

Untersuchung des Kerntransports mittels nahfeldoptischer Fluoreszenz- Korrelationspektroskopie

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Michael Herrmann
aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referentin: Prof. Dr. Doris Wedlich

Korreferent: PD. Dr. Andreas Naber

Tag der mündlichen Prüfung: 07.-11.07.2008

Die vorliegende Arbeit wurde am Instiut für molekulare Entwicklungs- und Zellphysiologie (Zoologie II) und am Institut für Angewandte Physik der Universität Karlsruhe (TH) in der Zeit von Januar 2004 bis Mai 2008 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Michael Herrmann, Mai 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Zellkern wird über die Kernhülle im Zytoplasma verankert	2
1.2	Die Kernlamina stabilisiert die Kernhülle	3
1.3	Der Kernporenkomplex ist modular aufgebaut	7
1.4	Der Kernporenkomplex ist eine dynamische Struktur	10
1.5	Kerntransport	12
1.5.1	Steuerung des Kerntransports	17
1.5.2	Translokation von β -Catenin und der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren.....	19
1.5.3	Modelle des Kernporenmechanismus.....	22
1.6	Methoden zur Untersuchung des Kerntransports	25
1.6.1	Ultrahochauflösende Fernfeldmikroskopie	25
1.6.2	Nahfeldoptische Mikroskopie.....	28
1.6.3	Optische Rasternahfeldmikroskopie.....	29
1.6.4	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie	33
2	Zielsetzung.....	35
3	Material und Methoden	36
3.1	Material.....	36
3.1.1	Antikörper.....	36
3.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	37
3.1.3	Enzyme	38
3.1.4	Mikroorganismen und Zelllinien	38
3.1.5	Plasmide	39
3.1.6	Primer zur Klonierung rekombinanter DNA.....	40
3.1.7	Proteinreinigungssysteme	41
3.1.8	Reagenziensysteme.....	41
3.1.9	Geräte	42
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	43
3.2.1	Puffer und Lösungen	43
3.2.2	Restriktionsanalyse von DNA	44
3.2.3	Analytische Flachbettgelelektrophorese.....	44
3.2.4	Präparative Flachbettgelelektrophorese.....	45
3.2.5	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR.....	45

3.2.6	Sequenzspezifische Mutagenese.....	46
3.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	46
3.2.8	Herstellung und Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i>	46
3.2.9	Anlegen von Bakteriendauerkulturen.....	47
3.2.10	Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab	47
3.2.11	Fällung und Reinigung von DNA.....	48
3.2.12	Konzentrationsbestimmung von DNA	48
3.3	Proteinbiochemische Methoden	49
3.3.1	Puffer und Lösungen	49
3.3.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	51
3.3.3	Detektion aufgetrennter Proteine.....	52
3.3.4	Detektion immobilisierter Proteine (Immun-Blot).....	53
3.3.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	54
3.3.6	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	57
3.3.7	Herstellung des Rohextrakts zur Isolierung löslicher Proteine	58
3.3.8	Affinitätschromatographie.....	59
3.3.9	Enzymatische Spaltung von GST-Fusionskonstrukten	61
3.3.10	Dialyse und Aufkonzentration der Proteinlösung	61
3.3.11	Ionenaustauschchromatographie	62
3.3.12	Gelpermeationschromatographie.....	63
3.3.13	Kovalente Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern und Proteinen.....	63
3.3.14	Extraktion des Zytosols aus Rattenleberzellen.....	66
3.4	Zellbiologische Methoden und nahfeldoptische Mikroskopie	67
3.4.1	Puffer und Lösungen	67
3.4.2	Kultivierung und Passagieren von murinen L-Zellen	68
3.4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	68
3.4.4	Funktionsprüfung rekombinant exprimierter Proteine mittels Digitonin- permeabilisierter L-Zellen und ganzer Oozytenkerne.....	69
3.4.5	Froschhaltung	70
3.4.6	Froschoperation zur Gewinnung der Oozyten.....	70
3.4.7	Kernmembranpräparation und Antikörperfärbung.....	71
3.4.8	Herstellung der Flüssigkeitskammer	73
3.4.9	Herstellung der Dreiecksapertursonden.....	75
3.4.10	Messungen am nahfeldoptischen Mikroskop	75

4	Ergebnisse	77
4.1	Rekombinante Expression von XLef-1 und XTcf-1.....	77
4.1.1	Klonierung der Expressionskonstrukte und deren Induktion	77
4.1.2	Optimierung der Induktion durch unterschiedliche <i>E. coli</i> Stämme	80
4.1.3	Induktion von XLef-1 in Gegenwart von Importinen als mögliche Chaperone... 81	
4.1.4	Mutagenese putativer XLef-1-Bindungsstellen.....	83
4.2	Präparation der Transportfaktoren für Kerntransportmessungen	85
4.3	Funktionalitätstest der rekombinant exprimierten Proteine.....	92
4.4	Präparation freistehender Kernmembranen aus Oozyten	97
4.5	Validierung der Präparationsgüte	99
4.6	Konfokale Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie	105
4.7	Annäherung der Nahfeldsonde an die Kernmembran	109
4.8	Nahfeldoptische Messungen an einer freistehenden Kernmembran	114
4.9	Nahfeldoptische Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	124
5	Diskussion.....	129
5.1	XLef-1 reprimiert die eigene Expression in <i>E. coli</i>	129
5.2	Stabilität der freistehenden Kernmembran	130
5.3	Nahfeldoptische Darstellung der freistehenden Kernmembran.....	133
5.4	Untersuchung des Kerntransports mittels nahfeldoptischer FCS	136
6	Zusammenfassung.....	140
7	Literatur	141
8	Anhang.....	162
8.1	Aminosäuresequenz der klonierten Expressionskonstrukte	162
8.2	Weitere Informationen zu den exprimierten Konstrukten.....	163
8.3	Filmaufnahmen der Dreiecksapertursonde und einer freistehenden Kern- membran	163
8.4	Modell der begrenzten eindimensionalen Diffusion im optischen Nahfeld	165
8.5	Literatur des Anhangs.....	166
8.6	Publikation in einer Fachzeitschrift.....	167
8.7	Eigene Posterbeiträge zu wissenschaftlichen Tagungen	167

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>Aminoacids</i> (Aminosäuren)
AKF	Autokorrelationsfunktion
a.u.	<i>arbitrary units</i> (arbiträre Einheiten)
APD	<i>Avalanche Photodiode</i> (Lawinenfotodiode)
ARM	<i>Armadillo-Repeats</i> (Armadillo-Wiederholungen)
CCD	<i>Charged Coupled Device</i> (ladungsgekoppeltes Bauelement)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GEF	<i>Guaninnucleotid Exchange Factor</i> (Guaninnukleotid-Austauschfaktor)
GST	Glutathion-S-Transferase
HEAT	<u>H</u> untingtin, <u>E</u> longation Faktor 3, PR65/A-Untereinheit von Protein-Phosphatase A, <u>T</u> OR-Repeat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure
kDa	kilo Dalton
NES	<i>Nuclear Export Sequence</i> (Kernexportsequenz)
NLS	<i>Nuclear Localisation Sequence</i> (Kernlokalisationssequenz)
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i> (Kernporenkomplex)
Ntf-2	<i>Nuclear transport factor-2</i>
Ran	<i>Ras related nuclear protein</i>
RanBP	<i>Ran binding protein</i>
RCC1	<i>Regulator of chromosome condensation 1</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen/min)
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SNOM	<i>Scanning Near-field Optical Microscope</i> (Rasternahfeldoptisches Mikroskop)
TRIFM	<i>Total internal reflection fluorescence microscope</i> (Totalreflektionsfluoreszenzmikroskop)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
(v/v)	<i>volume per volume</i> (Volumen-Volumen-Verhältnis)
(w/v)	<i>weight per volume</i> (Gewichts-Volumen-Verhältnis)

1 Einleitung

Der Zellkern stellt eines der größten Kompartimente eukaryotischer Zellen dar. Sein Volumen füllt 8% des zytoplasmatischen Raums aus, wobei dieses Verhältnis während Wachstum und Differenzierung annähernd konstant bleibt (Jorgensen et al., 2007; Neumann & Nurse, 2007). Im Gegensatz dazu weisen die Nuklei der Tumorzellen charakteristische morphologische Aberrationen auf, die die Größe und die Gestalt ebenso wie die Organisation der Chromosomen betreffen und die auch heute noch ein elementarer Bestandteil der Tumordiagnostik darstellen (Zink et al., 2004).

Die Kernhülle separiert nicht nur die genetische Information vom zellulären Stoffwechsel, sondern ermöglicht durch die räumliche und zeitliche Trennung von Transkription und Translation die Prozessierung der Transkripte. Während Capping, Exon-Spleißen und Polyadenylierung ausschließlich intranukleär ablaufen, befinden sich insbesondere die an der RNA-Interferenz beteiligten RNA-editierenden Enzyme auch im Zytoplasma (Nishikura, 2006).

Der Austausch zwischen den beiden Kompartimenten wird durch symmetrische, supramolekulare Komplexe in der Kernmembran kontrolliert. Phylogenetische Sequenzanalysen von Nukleoporinen oder mit dem Kernporenkomplex assoziierter Proteine und die Rekonstruktion ihrer Ursequenzen zeigen eine auf der strukturellen Ebene evolutionär konservierte Kernpore, die sich auf Sequenzebene aus adaptiven und flexiblen Bestandteilen zusammensetzt, die teilweise prokaryotische Homologe besitzen (Denning & Rexach, 2007).

Während auf die Bedeutung der Kern-Zytoplasma-Relation bereits 1903 von Richard Hertwig hingewiesen wurde, zeigen neuere Untersuchungen, dass sich die Kernporendichte während Differenzierung, Wachstum und in Abhängigkeit von der metabolischen Aktivität der Zelle verändert. Der Nukleus einer Zelle in der G2-Phase besitzt annähernd doppelt so viele Kernporen wie in der G1-Phase mit $5 \text{ NPCs}/\mu\text{m}^2$ (Maeshima et al., 2006). In der Oogenese von *Xenopus laevis* fällt die Dichte von anfangs $32 \text{ Kernporenkomplexen (NPCs)}/\mu\text{m}^2$ auf $23 \text{ NPCs}/\mu\text{m}^2$ in reifen Oozyten (Schlune et al., 2006). Und während der Herzdifferenzierung steigt die Kernporenzahl um 60% von $10 \text{ NPCs}/\mu\text{m}^2$ in embryonalen Stammzellen auf $16 \text{ NPCs}/\mu\text{m}^2$ in Kardiomyozyten (Perez-Terzic et al., 2007).

1.1 Der Zellkern wird über die Kernhülle im Zytoplasma verankert

In der rezenten eukaryotischen Zelle fungiert die Kernmembran nicht nur als Barriere zwischen den beiden Kompartimenten, sondern vereint die zytoplasmatische mit der nukleären Architektur und spielt eine Rolle in der Signaltransduktion und im Verlauf der Mitose (Stewart et al., 2007). Die spezifische Lokalisation des Kerns innerhalb der Zelle ist für einige embryonale und zelluläre Prozesse wie beispielsweise Befruchtung, Zellteilung, Zellmigration und die Entstehung der Zellpolarität bedeutsam (Starr, 2007).

Transmembranproteine in der inneren und der äußeren Kernmembran gewährleisten durch die Interaktion ihrer periplasmatischen Domänen einen konstanten Abstand zwischen den beiden Membranen (Abb. 1). Außerdem markieren sie die äußere Kernmembran und machen sie somit für die Zelle vom ER unterscheidbar. Ferner ermöglichen sie sowohl die Bewegung des Kerns innerhalb der Zelle durch Interaktion mit den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten als auch seine Verankerung durch Bindung an alle drei Komponenten des Zytoskeletts (Starr, 2007).

Innerhalb des Zellkerns ist die Existenz einer strukturgebenden Matrix immer noch umstritten (Hancock, 2004). Trotz zahlreicher potentieller Matrixbildner im Nukleus wie neben Lamin A und B beispielsweise Aktin, Myosin und EAST (Enhanced Adult Sensory Threshold) (Lasky, 2000; Hancock, 2004; Zink et al., 2004; Pederson & Aebi, 2005), stehen elekt-

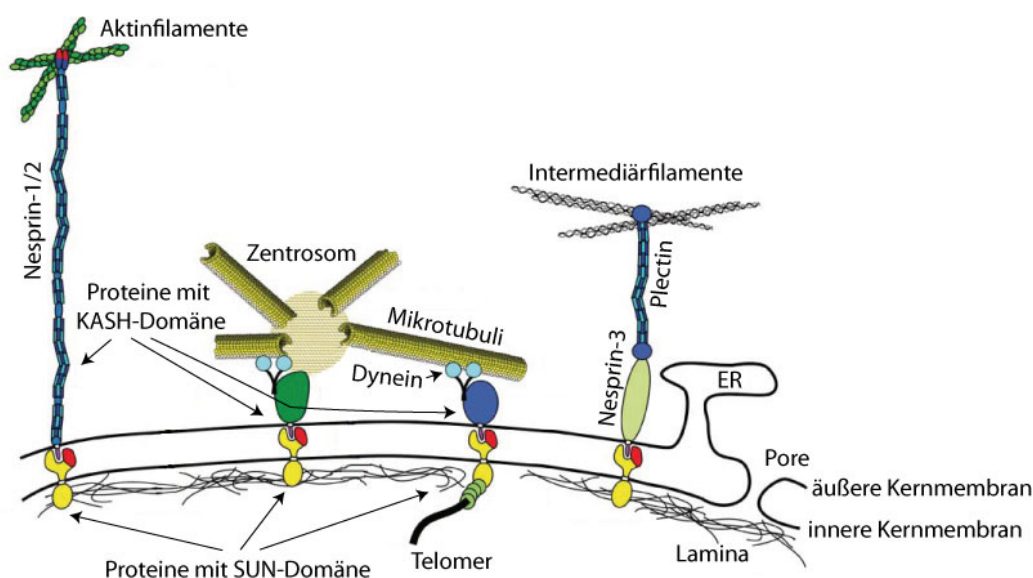


Abb. 1: Die Kernhülle verbindet das Zytoskelett mit der Kernlamina. Transmembranproteine der äußeren Kernmembran interagieren durch ihre KASH-Domäne (lila) mit der SUN-Domäne (rot) der Proteine der inneren Kernmembran und definieren dadurch den perinukleären Spalt auf 30-50 nm. Einige Mitglieder der großen KASH-Proteinfamilie verankern den Zellkern an Aktinfilamenten, andere verbinden über Dynein das Zentrosom mit dem Kern. An den Transmembranproteinen der inneren Kernmembran befestigte Telomere können so durch das zytoplasmatische Dynein bewegt werden. Das humane Nesprin-3 verknüpft über Plectin den Kern mit den Intermediärfilamenten. Aus Starr (2007).

ronenmikroskopische Darstellungen der Kernmatrix (Zhang et al., 1996; Nickerson, 2001; Kiseleva et al., 2004) im Verdacht, Präparationsartefakte abzubilden. Tatsächlich deuten neuere *in vivo* Studien eher auf eine dynamische, an der chromosomalen Organisation beteiligte Kernmatrix anstelle eines rigiden, den Nukleus stabilisierenden Gerüsts (Hancock, 2004; Tsutsui et al., 2005).

Indes ist die territoriale Organisation der Chromosomen weitgehend akzeptiert (Cremer et al., 2004). Aktive Gene befinden sich an der Oberfläche ihres chromosomalen Kompartiments und die RNA-Transkripte werden in interchromosomalen Spalten prozessiert und transportiert (Lamond & Earnshaw, 1998). Allerdings handelt es sich dabei um eine dynamische Ordnung. Das Interphasen-Chromatin bewegt sich teilweise schnell im begrenzt zur Verfügung stehenden Raum und ganze chromosomale Domänen werden aufgrund von Transkriptionsaktivitäts- oder Zellzyklusveränderungen entlang der radialen Achse umgelagert (Gasser, 2002). An der Kernperipherie sind die aktiven Gene in Kernporennähe lokalisiert und die inaktiven Gene werden in den porenfreien Zwischenräumen immobilisiert (Akhtar & Gasser, 2007).

1.2 Die Kernlamina stabilisiert die Kernhülle

An der Innenseite der Kernhülle wird der aus zwei Lipiddoppelschichten und dem flüssigkeitsgefüllten perinukleären Zwischenraum bestehende Verbundmantel mit einem Proteinnetzwerk aus Laminen verstärkt (Abb. 2). Lamine sind Typ-5-Intermediärfilamente mit einer α -helikalen, stabförmigen Domäne von etwa 45 nm Länge, die von je einer nicht- α -helikalen, Domäne an N- und C-Terminus flankiert wird (Herrmann et al., 2007). Die wesentlich längere C-terminale Region trägt die Kernlokalisationssequenz (NLS) und mittig eine Ig-ähnliche Domäne, die auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen als knotenartige Verdickung zu sehen ist (Herrmann & Aebi, 2004). Die Grundbausteine der Kernlamina bilden in gleicher Orientierung homodimerisierte Lamine, die sich Kopf an Schwanz zu polaren Protofilamenten zusammenlagern, aus denen durch laterale Assoziation dicke Filamentbündel oder parakristalline Anordnungen entstehen.

Während in einzelligen Eukaryoten, Prokaryoten und Pflanzen bisher ebenso wenig Lamine entdeckt wurden, besitzen sowohl der Cnidarier *Hydra vulgaris* als auch der Nematode *C. elegans* nur ein B-Typ Lamin-Gen (Herrmann & Aebi, 2004; Melcer et al., 2007). In *Drosophila* sind zwei Lamin-Gene Dm₀ und C bekannt, wobei nur ersteres essentiell ist (Goldman et al., 2002). Wirbeltiere besitzen mindestens drei Lamin-Gene LMNA, LMNB1 und LMB2, die bei Säugern für sieben alternativ gespleißte Isoformen kodieren, wobei allein aus LMNA die vier Isoformen A, A Δ 10, C und C2 hervorgehen (Gruenbaum et al., 2003). Während B-

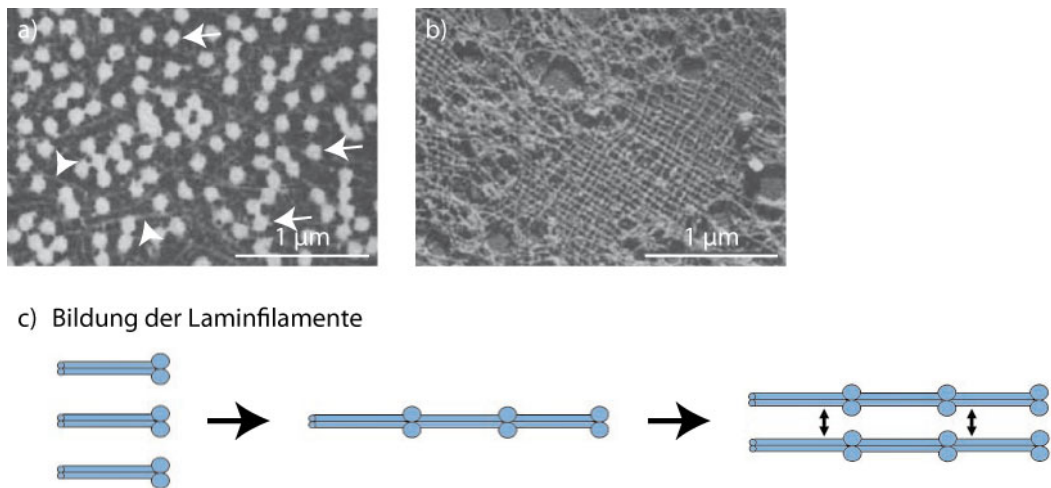


Abb. 2: Die Lamina bildet ein strukturiertes Proteinnetzwerk an der Kerninnenseite. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der inneren Kernmembran einer *Xenopus laevis* Oozyte (a) zeigt die zwischen den Kernporen (Pfeile) des negativ gefärbten Präparats verlaufenden Filamente der Kernlamina (Pfeilspitzen). Nach der mechanischen Entfernung der Kernporen (b) verbleibt die Lamina als ein wohlgeordnetes, schachbrettartiges Netzwerk. (c) Die Laminfilamente entstehen durch den Kopf-Schwanz-orientierten Zusammenbau von Homodimeren und deren Bündelung. Aus Aebi et al. (1986) und Herrmann & Aebi (2004).

Typ Lamine in jeder Zelle sowohl im Embryo als auch im adulten Tier vorhanden sind, werden A-Typ Lamine gewöhnlich erst zu Beginn der Gastrulation gewebsspezifisch exprimiert.

In *Xenopus laevis* ist das Muster mit fünf beschriebenen Laminen L_I , L_{II} , L_{III} , L_{IV} , und L_A (oder auch B_1 , B_2 , B_3 , L_{IV} und A) komplizierter (Stick, 1988). L_I , L_{II} und L_A sind die vorherrschenden somatischen Lamine (Krohne & Benavente, 1986; Wolin et al., 1987). Die Expression von L_I beginnt nach der Mittblastulatransition und die von L_{II} in der Gastrulation (Stick & Hausen, 1985), während Lamin L_A in allen adulten somatischen Zellen außer den Erythrozyten exprimiert wird (Wolin et al., 1987). Die Expression des wenig untersuchten Lamins L_{IV} beschränkt sich auf die männlichen Keimzellen (Krohne & Benavente, 1986). Während der Oogenese verschwindet die Lamina ohne Auflösung der Kernhülle zunächst in der Prophase und wird ab dem Diplotänstadium insbesondere aus Lamin L_{III} und zu geringeren Anteilen aus L_I und L_{II} neugebildet (Stick & Hausen, 1985; Lourim et al., 1996).

Die Gruppierung in A- und B-Typ Lamine beruht sowohl auf ihren biochemischen Eigenschaften als auch auf ihr Verhalten während der Mitose (Stuurman et al., 1998). Während A-Typ-Lamine einen nahezu neutralen isoelektrischen Punkt besitzen, sind B-Typ-Lamine saurer. Des Weiteren sind die B-Typ-Lamine über einen Farnesylrest am C-terminalen CaaX-Motif in der inneren Kernmembran verankert und bleiben es auch während der Mitose. Bei den A-Typ-Laminen dagegen wird die posttranslationale Isoprenylierung wieder proteolytisch entfernt. Den Isoformen Lamin C und C2 fehlt das CaaX-Motif, so dass die A- und C-Typ-Lamine nicht nur während der Mitose im Zytoplasma verteilt, sondern auch im postmitoti-

schen Zellkern in einer nichtmembranständigen Form vorhanden sind (Gruenbaum et al., 2005). Zu Beginn der Mitose wird die Lamina durch Phosphorylierung abgebaut. Zusammen mit Importin α und β bilden die Lamine einen stabilen Komplex, der eine zytoplasmatische Polymerisation verhindert und nach Rekonstitution des Kerns durch RanGTP gelöst wird (Adam et al., 2008).

Zusätzlich verankern Transmembranproteine die Lamina in der inneren Kernmembran. Einige dieser Lamin-assoziierten Polypeptide (LAP) interagieren über eine LAP2-, Emerin- und MAN1-homologe (LEM)-Domäne mit Signaltransduktoren und Chromatin organisierenden Faktoren. Emerin und Transmembranproteine mit einer SUN-Domäne binden A-Typ-Lamine, wohingegen der Lamin B-Rezeptor und LAP2 β ausschließlich mit B-Typ-Laminen interagieren (Schirmer & Foisner, 2007). LAP1 und MAN1 binden alle Lamine. Ferner immobilisiert der Lamin B-Rezeptor das Heterochromatin an der Kernperipherie durch Bindung des Heterochromatinprotein 1 (HP1), das als eine Strukturkomponente des kondensierten Chromatins spezifisch an Lys9-methylierte Histone-H3 gebunden ist (Schneider & Grosschedl, 2007). Am Ende der Mitose bewirkt diese Interaktion die Rekonstitution der Kernhülle durch Importin β -vermittelte Verankerung von Lamin B-Rezeptor-tragenden Membranvesikeln an den anaphasischen Chromosomen (Ma et al., 2007).

Das 10 kDa große, multifunktionale Protein Barrier to Autointegration Factor (BAF) verbindet als Heterodimer DNA-Stränge mit LEM-Domänen oder untereinander und ist auch in der Lage, Chromatin zu verdichten (Dorner et al., 2007). Darüber hinaus ist dephosphoryliertes BAF auch an der Lokalisation von Emerin beteiligt und verstärkt die Bindung zwischen Emerin und A-Typ-Laminen (Bengtsson & Wilson, 2006).

Lamin A/C-defiziente Mäuse entwickeln sich bis zur Geburt unauffällig, aber sind postnatal im Wachstum retardiert und sterben nach acht Wochen (Sullivan et al., 1999). Bereits nach drei bis vier Wochen verändert sich die Gangart der Tiere und sie zeigen Merkmale von Muskeldystrophie. Bemerkenswerterweise ist durch den Verlust von Lamin A/C die Lokalisation von Emerin in einer gewebsspezifischen Art und Weise gestört, wobei die Organe ansonsten größtenteils normal sind. Emerin-defiziente Mäuse zeigen dagegen keine offenkundige Muskeldystrophie oder Herzprobleme, sondern Anzeichen einer gestörten Muskelregeneration (Lammerding et al., 2005). Beim Menschen führen Mutationen von Emerin, MAN1, Lamin A/C oder Lamin B zu unterschiedlichen klinischen Phänotypen von Herz- und Skelettmyopathien, zu partieller Lipodystrophie und peripherer Neuropathie bis hin zur vorzeitigen Alterung (Somech et al., 2005).

Die Zellkerne Emerin- sowie Lamin A-defizienter Fibroblastenzellen weisen eine abnormale Form und Blasenbildung auf, aber nur die Lamin A-defizienten Zellen zeigen eine reduzierte Formsteifigkeit ihrer Kerne und reagieren auf zelluläre Dehnung verstärkt mit Apoptose (Lammerding et al., 2005). Der Verlust des Lamin B1-Gens dagegen verursacht vornehmlich lokale Störungen in der Kernhülle, die als Blasen sichtbar werden, wobei möglicherweise Defekte in der Gestalt, der Formsteifigkeit und der Kernorganisation durch das intakte Lamin B2-Gen kompensiert werden (Lammerding et al., 2006). Experimente, bei denen die Zelle samt Zellkern teilweise in eine Mikropipette eingesaugt wird, zeigen, dass die Zellkerne menschlicher embryonaler Stammzellen stark deformiert werden können und ihre Steifigkeit während der Differenzierung um das Sechsfache zunimmt (Pajerowski et al., 2007). Die reversible Verformbarkeit des Zellkerns ist für migrierende Zellen im Gegensatz zu mechanisch beanspruchten Zellen von Vorteil. Die Kerne adulter Stammzellen besitzen bereits eine intermediäre Steifheit und werden im Aspirationsexperiment irreversibel deformiert. Da alle Arten von Stammzellen ausschließlich B-Typ-Lamine exprimieren, ist die von den embryonalen zu den adulten Stammzellen zunehmende Steifigkeit Lamin A/C-unabhängig und auf eine ansteigende Lamindichte beziehungsweise auf Veränderungen im Nukleoplasma zurückzuführen.

Ferner erfährt der normalerweise reguläre und ellipsoide geformte Zellkern in vielen Tumorarten charakteristische Veränderungen, die mit einer modifizierten Organisation des Heterochromatins assoziiert sind und auf die sich die Diagnostik trotz zunehmender Anzahl molekularer Marker immer noch stützt (Zink et al., 2004). Eine steigende Zahl dieser Kernveränderungen konnte nun mechanistisch mit funktionalen, die Tumorentwicklung fördernden Modifikationen verknüpft werden. Interessanterweise zeigen in zweidimensionalen Kulturschalen kultivierte Zellen häufig normale Kernformen im Gegensatz zu den Zellen einer Tumorbiopsie, in vivo beobachteten Tumorzellen oder in dreidimensionalen Gewebekultursystemen wachsender Zellen (Zink et al., 2004).

Die Lamina verleiht allerdings nicht nur dem Kern Form und Festigkeit, sondern ist auch an der Lokalisation der Kernporenkomplexe (NPC) beteiligt. Während bereits länger bekannt ist, dass die Kernporen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit der Lamina verbunden sind (Scheer et al., 1976; Krohne et al., 2005), konnte anhand von Rekonstitutionsexperimenten mit *Xenopus laevis* Oozytenextrakten gezeigt werden, dass Lamin B3 durch Bindung innerhalb der C-terminalen Region von Nup153 dieses an den naszierenden NPC rekrutiert (Smythe et al., 2000). Außer den Laminen ist auch das Transmembranprotein Sun1 an der

mehr oder weniger gleichförmigen Verteilung der Kernporen innerhalb der Kernhülle beteiligt (Liu et al., 2007a).

1.3 Der Kernporenkomplex ist modular aufgebaut

Der Kernporenkomplex (NPCs) erscheint aufgrund vergleichender Strukturanalysen evolutionär konserviert (Stoffler et al., 1999a; Lim et al., 2008). Generell besitzen die Kernporen eine achtfache Rotationssymmetrie orthogonal zur Kernmembran (Abb. 3). Mittels Rastertransmissionselektronenmikroskopie (STEM) wurden Durchmesser und Masse des Hefe-NPC (100 nm, 66 MDa) und des Kernporenkomplexes in *Xenopus laevis* Oozyten (120 nm, 125 MDa) bestimmt, wobei die in einem proteomischen Ansatz abgeschätzte Masse mit 44 MDa für den Hefe-NPC und 60 MDa für den Wirbeltier-NPC deutlich geringer ausfällt (Reichelt et al., 1990; Rout & Blobel, 1993; Cronshaw et al., 2002).

Zusätzlich zur Symmetrieachse besitzt der Kernporenkomplex in der Mitte eine parallel zur Kernmembran orientierte Symmetrieebene, die sich auf die zentralen Ringentitäten beschränkt. Der zentrale Ring verankert nicht nur den Kernporenkomplex in der Kernmembran, sondern bildet mit seinen acht Speichen das eigentliche Tor zwischen dem nukleo- und dem zytoplasmatischen Kompartiment (Akey & Radermacher, 1993). Neben dem zentralen Kanal existieren acht etwa 10 nm große, periphere Kanäle im Speichenringkomplex (Hinshaw et al., 1992), der seinerseits von zwei Ringen eingerahmt wird. Vom zytoplasmatischen Ring ragen acht filamentartige Fibrillen 50 nm weit ins Zytoplasma hinein, während die acht vom nukleoplasmatischen Ring ausgehenden Filamente sich zu einem distalen Ring vereinigen und eine reusenartige, 55-60 nm hohe Struktur bilden, die als Kernkorb bezeichnet wird (Abb. 4).

Auf der molekularen Ebene setzten sich sowohl der Wirbeltier-Kernporenkomplex als auch der Hefe-NPC aus nur rund 30 verschiedenen Proteinen zusammen (Abb. 4), die in 8, 16 oder 32 Kopien vorliegen (Cronshaw et al., 2002). Bemerkenswerterweise bestehen die Nukleoporene ihrerseits aus lediglich acht verschiedenen Faltungstypen und lassen sich unab-

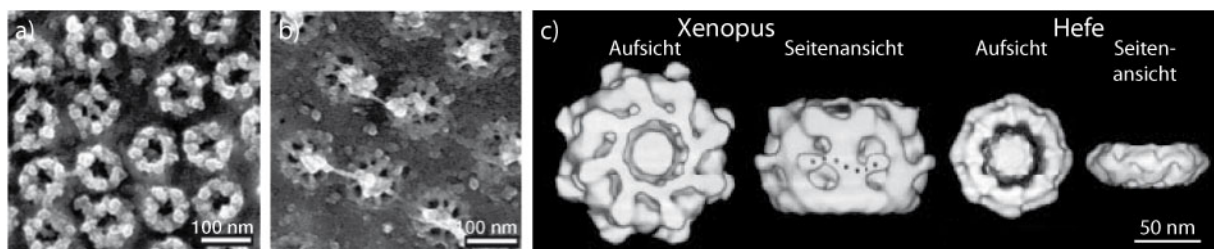


Abb. 3: Unterschiedliche mikroskopische Darstellungen zeigen die Rotationssymmetrie der Kernporen. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen negativ gefärbter (a und b) Kernmembranen aus *Xenopus laevis* Oozyten wird die achtfache Symmetrie des Kernporenkomplexes sichtbar, dessen 3D-Struktur (c) aus Aufnahmen mit unterschiedlichen Neigungswinkeln rekonstruiert wurde. Aus Fahrenkrog & Aebi (2003) und Stoffler et al. (1999a).

hängig von der auf elektronenmikroskopischen Studien beruhenden Strukturbeschreibung in drei funktionale Gruppe einteilen, die als konzentrische Schichten sowohl den zentralen als auch den nukleo- und den zytoplasmatischen Ring bilden (Abb. 5). Während die Membran-

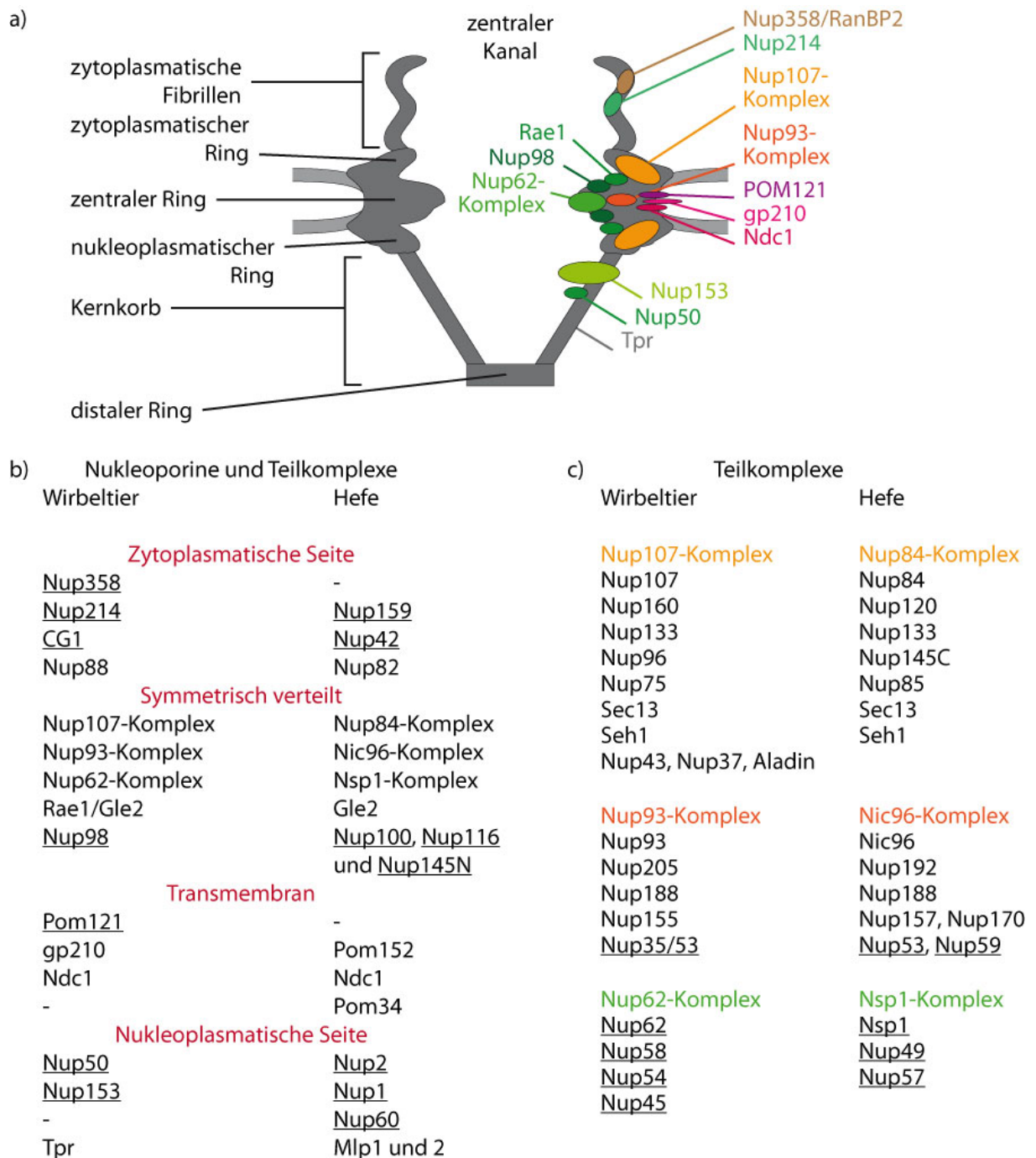


Abb. 4: Der supramolekulare Kernporenkomplex (a) besteht aus rund 30 Nukleoporinen. Die Nukleoporine lassen sich sowohl hinsichtlich ihrer Lokalisation als auch ihrer Funktionalität gruppieren (b und c). Die Transmembranproteine (pink, violett) verankern die Kernpore in der Kernmembran und bilden die Membranschicht. Daran schließt sich die Gerüstschicht (orange, hellrot) mit symmetrisch verteilten Nukleoporinen an. Die kanalbildende FG-Schicht (grün) besteht innerhalb der Pore aus symmetrisch angeordneten Nukleoporinen. Die peripheren Strukturen setzen sich aus einseitig verteilten Proteinen zusammen, von denen einige FG-Domänen (unterstrichen) besitzen und somit prinzipiell auch zur FG-Schicht beitragen können. Daten aus Cronshaw et al. (2002), Hetzer et al. (2005), Schwartz (2005), Handa et al. (2006) und Tran & Wentz (2006) zusammengestellt.

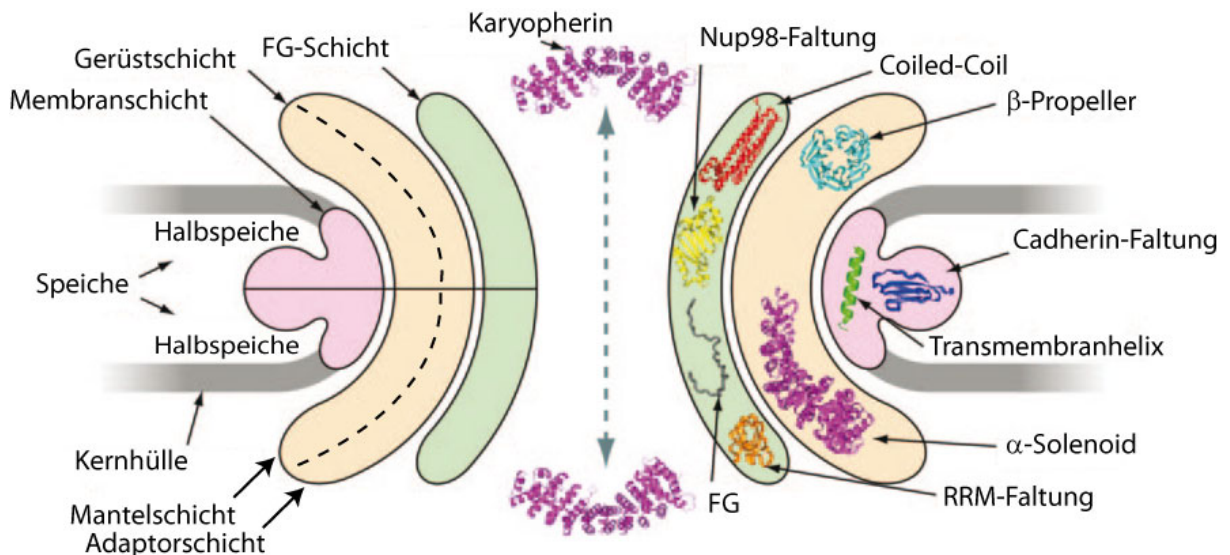


Abb. 5: Darstellung des Schichtmodells und der Lokalisationswahrscheinlichkeit unstrukturierter FG-Wiederholungen des Hefe-NPC. Die Membranschicht verankert den Kernporenkomplex. Daran schließt sich die Gerüstschicht an, die sich in eine Mantel- und eine Adaptorschicht unterteilen lässt. Die unstrukturierten FG-Wiederholungen (FG) bilden eine eigene Schicht, in der auch Domänen mit einer Nup98-, Coiled-Coil- und RNA-Erkennungsmotif (RRM)-Faltung vorhanden sind. Die Gerüstschicht besteht aus α -Solenoid und β -Propeller-Domänen. Pom121 besitzt zusätzlich zu Transmembranhelices noch eine Cadherin-ähnlich gefaltete Domäne. Aus Devos et al. (2006), verändert nach Hsia et al. (2004).

schicht den Kernporenkomplex in der Kernhülle verankert, stellt die Gerüstschicht die formgebende Komponente dar, an die sich eine den zentralen Kanal auskleidende FG-Schicht anschließt.

Aufgrund kristallographischer Studien schlug die Arbeitsgruppe von Günter Blobel kürzlich die Teilung der Gerüstschicht in eine Mantel- und eine Adaptorschicht vor. Nach ihrem Modell bilden acht Kopf-Schwanz-orientierte y Nup84-Komplexe¹ einen Reifen der Mantelschicht. Im zentralen Ring sind vier antiparallele Reifen axial übereinandergelagert, wobei sowohl das einen siebenblättrigen β -Propeller bildende y Sec13- y Nup145C-Heterodimer als auch y Seh1- y Nup85 durch Homodimerisation axial übereinander angeordnet sind. Dazwischen befindet sich jeweils eine Daube aus axial alternierendem y Nup120 und y Nup133- y Nup88. Die aus y Nic96-Komplexen bestehende Adaptorschicht stellt den nächsten konzentrischen Kreis dar und y Nsp1-Komplexe bilden den inneren FG-Ring (Hsia et al., 2007).

Die Bedeutung des y Nup84/Nup107-Komplexes zeigen Rekonstitutionsexperimente mit *X. laevis* Eiextrakten, in denen sich nach Depletion von Nup85 und Nup133 bzw. Nup107 durch entsprechende Antikörper Kernhüllen ohne Kernporen bildeten (Harel et al., 2003; Walther et al., 2003). In einem auf RNAi-basierenden Ansatz fehlten indes den Kernporen-

¹ Zur besseren Unterscheidung wird den Hefe-Nukleoporinen ein y vorangestellt, sofern sich der Abschnitt nicht explizit mit dem Hefe-NPC befasst.

komplexen in HeLa-Zellen nach Nup107-Depletion neben Nup133 sowohl die zytoplasmatischen Fibrillen als auch der Kernkorb und damit die peripheren Strukturen. Nup62 und die beiden Bestandteile des Nup107-Komplexes, Nup96 und Sec13, waren dagegen weiterhin in der Kernpore lokalisiert (Boehmer et al., 2003).

Zusammen mit den unstrukturierten FG-Wiederholungen stellen α -Solenoid und β -Propeller die drei häufigsten Domänen innerhalb der Nukleoporinen dar, wobei die letzteren beiden entweder einzeln oder gemeinsam in allen Proteinen der Gerüstschicht auftreten (Schwartz, 2005).

Kristallographische Untersuchungen der Coiled-Coil-Domänen des γ Nsp1/Nup62-Komplexes zeigen, dass sich diese α -helikale Region aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zu einem stabilen, antiparallelen, haarnadelförmigen Dimer faltet (Melcak et al., 2007). Zwei Dimere lagern sich zu einem antiparallel orientierten Tetramer zusammen, wobei die elektrostatische Natur der Interaktion und die alternierende Anordnung der Interaktionspartner eine Verschiebung der Dimere um etwa 1.1 nm ermöglicht, so dass nach dem von den Autoren vorgeschlagenen Gleitmodell der Porendurchmesser um 3 nm vergrößert werden kann.

1.4 Der Kernporenkomplex ist eine dynamische Struktur

Von kleinen Proteinkomplexen über Ribonukleopartikel bis hin zur großen ribosomalen Untereinheit passieren unterschiedlich große Rezeptor-Kargo-Komplexe die Kernpore. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen weist der zentrale Transportkanal der Kernpore in *Xenopus laevis* Oozyten einen Durchmesser von 50 nm und eine Länge von 90 nm auf, durch den mit Kernlokalisationssequenzen (NLS) beschichtete Goldnanopartikel bis zu einem Durchmesser von 39 nm transportiert werden (Panté & Kann, 2002; Stoffler et al., 2003).

Zusätzlich zu den gleitenden Coiled-Coil-Domänen tragen vor allem die FG-Wiederholungen selbst zur Dynamik innerhalb des Kernporenkomplexes bei. Diese Regionen sind hochflexibel und weisen keinerlei geordnete Sekundärstruktur auf (Denning et al., 2003). Berechnungen zufolge können sich die nativ ungefalteten FG-Domänen im N-Terminus von Nup62 (~300 aa) bzw. im C-Terminus von Nup153 (~700 aa) und Nup214 (~800 aa) über etwa 90 nm, 210 nm und 240 nm erstrecken (Fahrenkrog et al., 2004). Mittels domänenspezifischer Antikörper konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass der N-Terminus von Nup153 am nukleoplasmatischen Ring und die zentral gelegene Zinkfinger-Domäne am distalen Ring des Kernkorbs lokalisiert sind, während sich der flexible C-Terminus zwischen dem distalen und dem zytoplasmatischen Ring befindet (Fahrenkrog et al., 2002). Analog dazu ist der N-Terminus des zytoplasmatischen Nukleoporins Nup214 am

zytoplasmatischen Ring verankert und der C-Terminus bewegt sich durch den zentralen Kanal bis zum distalen Ring, wobei die räumliche Verteilung der flexiblen C-terminalen FG-Domänen mit der Transportaktivität der Kernpore korreliert (Paulillo et al., 2005).

Die räumliche Beweglichkeit der FG-Domänen wird möglicherweise durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Phenylalaninen eingeschränkt. Bei *in vitro* Polymerisationsexperimenten mit dem FG-reichen N-Terminus des essentiellen Hefe-Nukleoporins Nsp1 bewirkt ein pH-Wertsprung aus dem alkalischen in den physiologischen Bereich die Bildung eines formstabilen, elastischen Hydrogels, das dem Kernporenkomplex vergleichbare Permeabilitätseigenschaften für Makromoleküle besitzt (Frey et al., 2006; Frey & Görlich, 2007).

Darüber hinaus modifizieren auch lösliche Agenzien wie beispielweise ATP, Kalzium, Ethanol oder Steroide reversibel die Gestalt des Kernporenkomplexes. Während 1 mM ATP eine Art Kontraktion der Kernpore durch Höhenzunahme des zytoplasmatischen Rings (60-75%) und Verkleinerung des zentralen Kanals (20%) verursacht (Rakowska et al., 1998), weitet Kalzium (100 μ M) reversibel den distalen Ring auf, so dass eine Öffnung von 20-30 nm mittels Rasterkraftmikroskopie dargestellt werden kann (Stoffler et al., 1999b). Die Beobachtung, dass perinukleäre Ca^{2+} -Depletion die Permeabilität der Kernporen reduziert und zur vermehrten Pfropfenbildung („Plugs“) im zentralen Kanal führt (Perez-Terzic et al., 1996), konnte von Stoffler et al. (1999b) nicht bestätigt werden. In NRK-Zellen inhibiert die lumemale Ca^{2+} -Depletion ebenso wie Kälte (0-4°C) reversibel sowohl die passive Diffusion als auch den signalvermittelten Transport, wobei möglicherweise die Cadherin-ähnlich gefaltete lumemale Domäne von gp210 als Ca^{2+} -Sensor wirkt und die Konformation des Kernporenkomplexes verändert (Greber & Gerace, 1995).

Ethanol verursacht in klinisch relevanten Dosen (0.05-0.2%) nicht nur eine Clusterbildung und eine Versteifung der Kernporen, sondern reduziert auch die Permeabilität der Kernpore für Ionen und Makromoleküle und bewirkt dadurch ein Anschwellen des Zellkerns (Schafer et al., 2007). Diese Effekte lassen sich durch Transkriptionsblockade oder RNase-Behandlung unterbinden. Im Gegensatz dazu vergrößern Glucocorticoid-Analoga wie Dexamethason durch Aufweitung des zytoplasmatischen Rings und Verdopplung des Kanaldurchmessers die Permeabilität für Ionen und Makromoleküle (Shahin et al., 2005a; Shahin et al., 2005b; Kastrup et al., 2006). Die Inhibition der Translation mit Cycloheximid vergrößert den Porendurchmesser um etwa 6 nm ohne erkennbare Veränderung der passiven Diffusion oder des signalvermittelten Transports (Feldherr et al., 2001).

Nicht nur lösliche Rezeptor-Kargo-Komplexe, sondern auch membranständige Proteine passieren die Kernpore auf ihrem Weg vom ER zur inneren Kernmembran, in der sie, wie

beispielsweise Emerin, durch selektive Retention verbleiben (Burke & Ellenberg, 2002). Studien in Hefe an LEM2- und MAN-homologen Proteinen zeigten, dass diese beiden Proteine mit zwei Transmembrandomänen Kernlokalisationssequenzen (NLS) in den extralumenalen Domänen besitzen und den Kernporenkomplex Importin α - und β -abhängig passieren (King et al., 2006). Dabei entscheidet die Größe der extralumenalen Domäne über die Transportart. Während Domänen kleiner als 25 kDa durch die Kernpore diffundieren, werden integrale Membranproteine mit einer zyto/nukleoplasmatischen Domäne zwischen 25 und 75 kDa Importin α - und β -abhängig importiert und bei Domänen größer 75 kDa entscheidet die räumliche Lokalisation der NLS über den Import (Lusk et al., 2007). Die Entdeckung eines trunkierten Importin α ohne Importin β -Bindungsstelle (Imp α 16, 15 kDa), das bereits am ER an die frisch translatierte NLS von Proteinen der inneren Kernmembran bindet, weist auf einen speziellen Transportweg für integrale Membranproteine hin (Saksena et al., 2006)

Insgesamt ist die Kernpore ein modular aufgebauter, makromolekularer Komplex, dem aufgrund seiner Funktion als selektive Permeationsbarriere eine gewisse Flexibilität inne wohnt. Darüber hinaus reagiert der NPC auf intrazelluläre Signale mit Strukturänderungen und Clusterbildung, wobei deren Effekte auf den signalvermittelten Transport mangels geeigneter Untersuchungsmethoden bisher nur ansatzweise erforscht wurden. Ferner ist unklar, ob die untersuchten Effektoren ausschließlich auf die strukturgebenden Komponenten wirken oder auch die unstrukturierten, flexiblen FG-Wiederholungen beeinflussen.

1.5 Kerntransport

Zytoplasma und Nukleus sind durch mehrere Transportwege miteinander verbunden, die sich in ihrer Präferenz für bestimmte Kargomoleküle ebenso wie in den für die Passage eingesetzten Carrier unterscheiden (Cook et al., 2007; Tran et al., 2007). Trotz dieser Diversität lässt sich jeder Transportzyklus mit vier einfachen Schritten beschreiben. Zunächst wird das Kargomolekül vom Transportrezeptor erkannt und gebunden, anschließend transloziert der ternäre Komplex durch die Kernpore und dissoziiert am Zielort, wobei die Rückkehr des Transportrezeptors an den Ausgangspunkt den Kreislauf beendet (Abb. 6).

Die größte Transportrezeptorklasse wird von den Karyopherinen gebildet, wobei die importierenden Rezeptoren als Importine und die exportierenden als Exportine bezeichnet werden (Stewart, 2007). Viele Proteine werden durch Importin β und seinen Adapter Importin α in den Nukleus geschleust und mittels CRM1 wieder exportiert. Während CRM1 auch am Export von snRNA und rRNA beteiligt ist, wird tRNA von Exportin-t und miRNA von Exportin-5 durch die Kernpore geleitet. Im Gegensatz dazu erfolgt der mRNA-Export durch das

TAP/NXF1-p15/NXT1-Heterodimer, das keine Verwandtschaft zu den Karyopherinen besitzt (Kohler & Hurt, 2007).

Der Nuclear transport factor-2 stellt eine eigene, dritte Transportrezeptorart dar. Ntf2 ist ein konserviertes, homodimerisierendes Protein, das die kleine GTPase Ran in der GDP-gebundenen Form vom Zytoplasma in den Zellkern importiert (Görllich & Kutay, 1999). Dabei interagiert das 15 kDa große Ntf2 insbesondere mit der Switch-II-Region von RanGDP, die in der GTP-gebundenen Form eine andere Konformation einnimmt (Stewart et al., 1998; Vetter et al., 1999). Zusätzlich behindert die Switch-I-Region sterisch die Bindung zwischen Ntf2 und RanGTP.

Die geringe intrinsische GTPase-Aktivität des Ras-related nuclear Proteins (Ran) wird durch das RanGTPase aktivierende Protein-1 (RanGAP1) um den Faktor 10^5 angeregt. Ebenso erhöht der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Regulator of Chromatin Condensation 1 (RCC1) die Nukleotid-Dissoziationsrate von Ran um 10^5 (Klebe et al., 1995). Die antagonistischen Ran-Regulatoren RCC1 und RanGAP1 werden durch die Kernhülle voneinander getrennt und erzeugen dadurch einen RanGTP-Gradienten. Im Nukleus ist die RanGTP-Konzentration aufgrund des chromatingebundenen RCC1 hoch. Im Gegensatz dazu beschleunigt

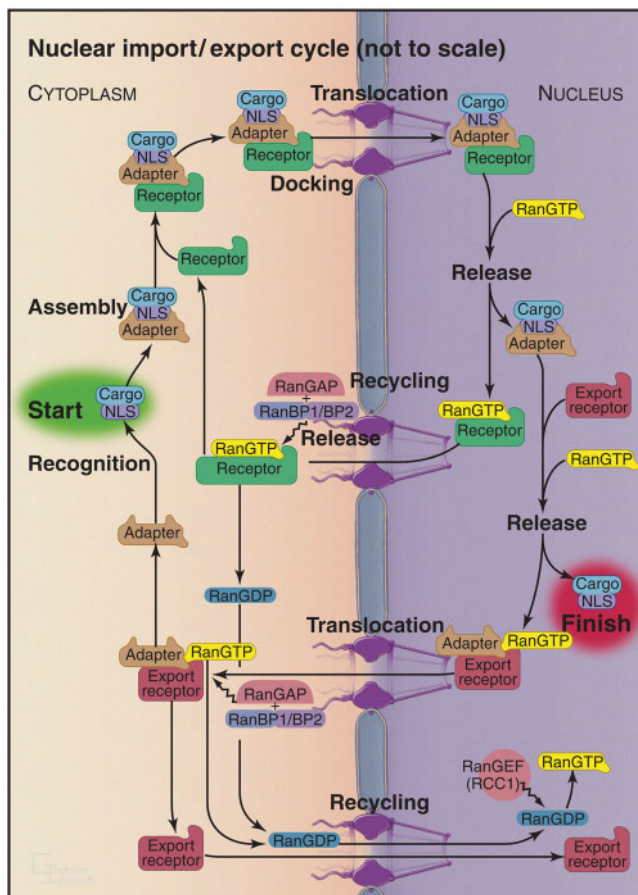


Abb. 6: Schematische Darstellung des Kerntransportzyklus. Der Zyklus beginnt mit der Bildung des Kargo-Adapter-Rezeptor-Komplexes (Assembly), der über den Rezeptor an die zytoplasmatischen Filamente des Kernporenkomplexes gebunden wird (Docking) und anschließend den zentralen Kanal passiert (Translocation). Im Nukleus bewirkt RanGTP die Dissoziation des trimeren Komplexes und die Freisetzung des Kargomoleküls (Release). Der Importrezeptor-RanGTP-Komplex transloziert ebenso wie der in Gegenwart von RanGTP gebildete Importadapter-Exportrezeptor-Komplex auf die zytoplasmatische Seite (Recycling bzw. Release). Das an den zytoplasmatischen Fibrillen lokalisierte GTPase-aktivierende Protein (RanGAP) triggert in Zusammenarbeit mit RanBP1 und RanBP2 die Hydrolyse von GTP, wodurch sowohl der Importrezeptor-RanGTP-Komplex als auch der Importadapter-Exportrezeptor-RanGTP-Komplex dissoziieren. Während Importrezeptor und -adapter für einen weiteren Zyklus zur Verfügung stehen, müssen der Exportrezeptor und RanGDP noch in den Nukleus zurückkehren, wo der Guanin-Austauschfaktor (RCC1) die GDP-GTP-Wechsel initiiert. Aus Pollard & Earnshaw (2002).

nigt RanGAP1 die GTP-Hydrolyse im Zytoplasma, wobei RanGAP1 sowohl in freier Form als auch in einem Komplex mit RanBP1 und Nup358/RanBP2 vorliegt. Nup358/RanBP2 besitzt vier Ran-Bindungsstellen und verankert RanGAP1 und RanBP1 an den zytoplasmatischen Filamenten des Kernporenkomplexes. RanBP1 löst RanGTP aus dem Transportrezeptoren-RanGTP-Komplex und ermöglicht dadurch dessen Interaktion mit RanGAP1 (Bischoff et al., 2002).

Obwohl das RanGTPase-System eine essentielle Komponente des Kerntransports darstellt, ist die Nukleotid-Hydrolyse nicht die treibende Kraft des Kerntransports. Vielmehr definiert die asymmetrische RanGTP-Verteilung die Transportrichtung, wie *in vitro* Experimente mit einer RanGAP-insensitiven Ran-Mutante zeigen (Nachury & Weis, 1999). Nach Simulationen des Ran-Zyklus übersteigt die RanGTP-Konzentration im Nukleus die zytoplasmatische um das 500-1000fache (Smith et al., 2002; Görlich et al., 2003). Für die Aufrechterhaltung des RanGTP-Gradienten ist neben dem GTP-GDP-Verhältnis und der Ntf2-Konzentration die Durchlässigkeit der Kernpore für RanGTP entscheidend (Görlich et al., 2003).

Somit muss der Kernporenkomplex die freie Diffusion von Ran (24 kDa, $r_H \sim 2.2$ nm) wirkungsvoll einschränken, während weiterhin kleinere und größere Rezeptor-Kargo-Komplexe die selektive Barriere passieren. Permeationsstudien mit unterschiedlich großen Partikeln bestätigen, dass Ionen und kleine Moleküle wie GTP (0.5 kDa) ungehindert durch die Pore diffundieren. Ab einem hydrodynamischen Radius r_H von 1.5 nm (~ 12 kDa) wird die Diffusion eingeschränkt und kommt oberhalb eines Radius von ~ 3 nm (z.B. Ovalbumin, 43 kDa) unter physiologischen Bedingungen praktisch zum Erliegen (Paine et al., 1975; Görlich & Kutay, 1999). Der langsamen Diffusion von RanGTP ins Zytoplasma steht eine mindestens 30fach höhere, unidirektionale Ran-Translokationsrate gegenüber, so dass die partielle RanGTP-Undichtigkeit der Kernpore den steilen Gradienten *in vivo* nicht beeinträchtigt (Smith et al., 2002; Naim et al., 2007).

Die Transportobergrenze der Kernporen wurde in *X. laevis* Oozyten mittels NLS-beschichteter Goldpartikel untersucht, wobei Rezeptor-Kargo-Komplexe mit einem effektiven Durchmesser von 39 nm noch in den Nukleus importiert wurden (Panté & Kann, 2002). *In vivo* stellt die ribosomale 60S Untereinheit mit einem Durchmesser von 20-30 nm das größte Kargomolekül dar.

Im Gegensatz zum mitochondrialen oder peroxisomalen Transport werden Kernlokalisations- und Kernexportsequenzen (NLS und NES) nicht proteolytisch prozessiert, so dass Proteine zwischen Zytoplasma und Nukleus pendeln können. Die Exportsequenzen bestehen aus vier großen hydrophoben Aminosäuren wie L, I, V, F, M, die in regelmäßigem Abstand in-

nerhalb von 8-10 Aminosäuren angeordnet sind (Kutay & Güttinger, 2005). Die Bindungsaffinität zum Exportrezeptor CRM1 ist kontextabhängig und eher schwach, um die Dissoziation des Kargo-Exportrezeptor-RanGTP-Komplexes an den zytoplasmatischen Fibrillen zu erleichtern.

Die klassische Kernlokalisationssequenz (cNLS) wird von 5-8 basischen Aminosäuren gebildet, die sowohl zusammenhängend als auch in zwei, von 10-12 Aminosäuren getrennten Teilen vorkommen. Die cNLS des SV40 large T antigen (PKKKRKV) ist der Prototyp der einteiligen und die von Nucleoplasmin (KRPAATKKAGQAKKKKK) der zweigeteilten cNLS (Kalderon et al., 1984; Dingwall & Laskey, 1991). Zusätzlich existieren zwei weitere NLS-Arten, die beim Import mRNA-bindender Proteine und reifer Ribonukleopartikel des Spleißosoms eine Rolle spielen. Die M9-NLS des mRNA-bindenden Proteins hnRNPA1 besteht aus 38 Aminosäuren mit einer positiven Nettoladung, die als linear ausgestrecktes Peptid an den C-terminalen Bogen von Transportin bindet (Lee et al., 2006). Snurportin1 erkennt als Importadapter im Zytoplasma die m₃G-Kappe des gereiften Ribonukleopartikel UsnRNP und transloziert dieses gemeinsam mit Importin β in den Nukleus (Cook et al., 2007).

Die große Familie der Karyopherine besteht beim Menschen aus mindestens 20 Mitgliedern, von denen elf (Importin β , Transportin 1, Transportin SR, Imp4, Imp5, Imp7, Imp8, Imp9, Imp11 und Imp13) am Import und acht (CRM1, CAS, Exportin-t, Exp4, Exp5, Exp6, Exp7 und Imp13) am Export beteiligt sind (Ström & Weis, 2001; Weis, 2003). Im Hefe-Genom wurden 14 Karyopherine identifiziert (Quan et al., 2008). Während die Sequenzen der Karyopherine untereinander nur wenig Ähnlichkeit aufweisen und die Molekulargewichte zwischen 90 und 130 kDa variieren, besitzen alle Karyopherine einen sauren isoelektrischen Punkt.

Die Molekülstruktur der Karyopherine ist durch HEAT-Wiederholungen gekennzeichnet, die zuerst in den namengebenden Proteinen Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A und TOR beschrieben wurden (Abb. 7). Die Grundeinheit besteht aus 32-61 Aminosäuren, die aus zwei antiparallelen α -Helices und einer scharfen Biegung eine Haarnadelstruktur bilden. Benachbarte Haarnadeln sind durch Bindeglieder verbunden, die wie in den Armadillo (ARM)-Wiederholungen auch die Form einer α -Helix einnehmen können (Lee et al., 2000).

Importin β zählt zu den am besten charakterisierten Importrezeptoren und transportiert gemeinsam mit den Mitgliedern der Importin α -Familie eine Vielzahl an Proteinen in den Nukleus. Importin β besteht aus 19 HEAT-Wiederholungen. In der achten HEAT-Domäne ersetzt eine Schleife mit einer negativen Nettoladung die scharfe Biegung zwischen den bei-

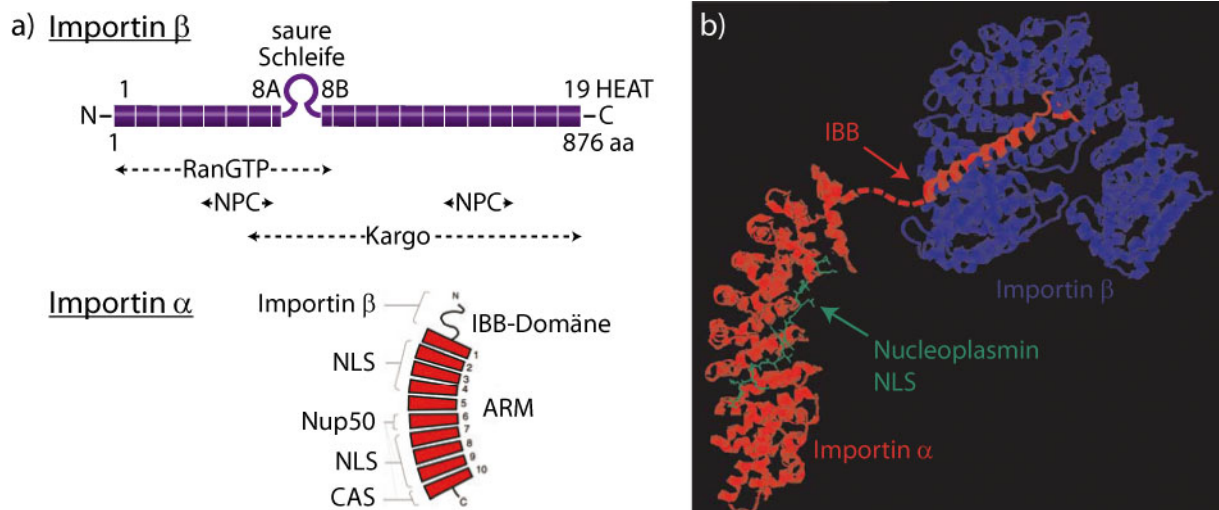


Abb. 7: Schematische Darstellung und Proteinstruktur von Importin α und β . Importin β (a) besteht aus 19 HEAT-Wiederholungen, von denen sich jede aus zwei α -Helices zusammensetzt, die durch einen kurzen Bogen verbunden sind. Dieser ist in HEAT-8 durch eine saure Schleife ersetzt, die eine wichtige Rolle bei der Kargobindung und -dissoziation spielt. RanGTP bindet an die ersten acht HEAT-Regionen. Die FG-Wiederholungen interagieren mit HEAT 5-7 und HEAT 14-16. HEAT 7-16 sind an der Bindung der Importin β -Bindungsdomäne (IBB) von Importin α beteiligt. Importin α (a) besteht aus zehn Armadillo (ARM)-Wiederholungen. Diese setzen sich aus drei α -Helices zusammen. Die IBB-Domäne befindet sich N-terminal. Die cNLS des Kargoproteins wird von ARM 2-4 und 7-9 erkannt. ARM 6-10 binden Nup50, das die Dissoziation des Importkomplexes auslöst. Der Exportrezeptor von Importin α CAS bindet an ARM 10. (b) Der trimere Komplex aus Importin α (rot), der klassischen, zweiteiligen cNLS von Nucleoplasmin (grün) und Importin β (lila) wurde aus zwei Kristallstrukturen zusammengesetzt und durch eine gestrichelte Linie zwischen Importin α und der IBB verbunden (b). Aus Goldfarb et al. (2004) und Rexach (2006), verändert nach Strom & Weis (2001) und Bednenko et al. (2003).

den antiparallelen α -Helices. Dadurch können die beiden C-förmigen HEAT-Wiederholungen 1-8 und 8-19 eine leicht S-förmige Gestalt im Raum einnehmen (Lee et al., 2005).

Der Importadapter Importin α besteht aus einer flexiblen, N-terminalen Importin β -Bindungsdomäne (IBB) und zehn ARM-Wiederholungen, wobei ARM 2-4 und 7-9 an der cNLS-Bindung beteiligt sind (Abb. 7). Die IBB-Domäne enthält eine cNLS-ähnliche, autoinhibitorische Sequenz (KRRNV), die entweder *in cis* mit der cNLS-Bindungsstasche oder *in trans* mit Importin β interagiert (Kobe, 1999). Aufgrund der geringen Bindungsaffinität der autoinhibitorischen Sequenz zur cNLS-Bindungsstelle kann die cNLS des Kargomoleküls die IBB-Domäne verdrängen. Insoweit kann die Bildung des trimeren Komplexes im Zytoplasma sowohl durch eine Importin α -Kargo- als auch durch eine Importin α/β -Interaktion initiiert werden (Goldfarb et al., 2004).

Infolge der Bindung von Importin β an die IBB-Domäne faltet sich diese in eine α -Helix und Importin β nimmt eine kompakte, proteolytisch resistente Form ein (Cingolani et al., 2000). Importin β besitzt auf jedem C-förmigen Bogen zwei Bindungsstellen für FG-Wiederholungen, wobei das FxFG-Peptid zwischen den Helices benachbarter HEAT-Wiederholung-

en bindet (Bayliss et al., 2000; Bednenko et al., 2003). Durch dynamische Simulationen wurden sechs weitere FG-Bindungsstellen auf hydrophoben Bereichen der Importin β -Oberfläche entdeckt (Isgro & Schulten, 2005).

Im Nukleus leitet RanGTP gemeinsam mit den Karyopherin releasing Faktoren CAS und Nup50 die Dissoziation des trimeren Importkomplexes ein. Während RanGTP am N-terminalen Bogen von Importin β bindet, öffnet die Schalter-I-Region die kompakte Form durch Abpreizung des C-terminalen Bogens und entfernt über einen allosterischen Mechanismus die IBB-Domäne (Lee et al., 2005). Im einfachsten Fall verdrängt die IBB-Domäne anschließend die cNLS und ermöglicht dadurch die Bindung des Exportrezeptors CAS an Importin α . Alternativ beschleunigt das Ran-bindende Protein Nup50 beide Schritte dieses Prozesses, indem es einerseits durch Bindung des Importkomplexes diesen in die Nähe von RanGTP bringt und auf der anderen Seite nach Bindung von Importin α die cNLS des Kargos aktiv entfernt. Später verdrängt CAS Nup50 von Importin α und bildet gemeinsam mit RanGTP einen Exportkomplex (Matsuura & Stewart, 2005). Nach der Kernporenpassage dissoziiert der CAS-Importin α -RanGTP-Komplex ebenso wie der Importin β -RanGTP-Komplex infolge der GTP-Hydrolyse im Zytoplasma und Importin α und β stehen einem neuen Importzyklus zur Verfügung.

1.5.1 Steuerung des Kerntransports

Der Austausch zwischen Nukleus und Zytoplasma kann auf drei verschiedenen Ebenen reguliert werden. Die erste und vielfältigste Steuerungsmöglichkeit stellt die Modifikationen der Kargobindung an die Transportmaschinerie dar. Zweitens wird die Aktivität der Transportmaschinerie dem Bedarf der Zelle angepasst und letztendlich kann der Kernporenkomplex selbst Ziel transportregulierender Maßnahmen sein (Kaffman & O'Shea, 1999; Poon & Jans, 2005; Terry et al., 2007).

Die Assemblierung des Transportkomplexes wird durch Komplexbildung, Phosphorylierung, oder Proteindegradation des Kargos gesteuert. Als Beispiele für die Regulation auf der Kargoproteinebene werden im Folgenden kurz der heterodimere Transkriptionsfaktor NF- κ B, das Zellzyklusprotein Cyclin B und der nukleäre Effektor der kanonischen Wnt-Signalkaskade β -Catenin beschrieben (Kaffman & O'Shea, 1999). Der an NF- κ B gebundene Inhibitor I κ B maskiert die NLS von NF- κ B und besitzt eine eigene Exportsequenz, so dass dieser Komplex zytoplasmatisch lokalisiert ist. Verschiedene Stimuli wie beispielsweise TNF- α bewirken die Phosphorylierung und den anschließenden Abbau des Inhibitors I κ B. Somit können Transportrezeptoren an die frei gewordenen NLS binden und NF- κ B in den Nukleus importieren.

Im Gegensatz dazu pendelt Cyclin B zwischen den Kompartimenten. Durch Phosphorylierung wird die Affinität von Cyclin B zum Exportrezeptor reduziert, so dass es im Kern akkumuliert. Die Konzentration von freiem β -Catenin wird sowohl durch die Verankerung an Cadherinen als auch durch die zytoplasmatische Instabilität gering gehalten. Die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade stoppt die Degradation von β -Catenin und ermöglicht so dessen Import.

Die Aktivität der Transportmaschinerie wird sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene an den Bedarf der Zelle angepasst. Die Transportrezeptoren werden dazu nicht nur während des Zellzyklus unterschiedlich exprimiert, sondern zeigen auch ein gewebs- und entwicklungsspezifisches Expressionsmuster (Yasuhara et al., 2004; Poon & Jans, 2005). Die Genexpression der meisten Karyopherine steigt während der Mausentwicklung bis zu ihrem Höhepunkt zwischen Gastrulation und Neurulation (E6.5-E9.5) an, ehe sie ab E10.5 wieder abfällt (Quan et al., 2008). Die Expression von Ran zeigt in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* einen ähnlichen Verlauf und ist nach der Neurulation im Auge, Ohr, cranialen und neuralen Gewebe besonders markant, wobei wie in der Maus möglicherweise noch weitere Ran-Gene exprimiert werden (Onuma et al., 2000). Auch Karyopherin- β 3 und die fünf Mitglieder der Importin α -Familie zeigen im Froschembryo eine gewebs- und entwicklungsspezifische Expression (Wischnewski et al., 2000; Wischnewski et al., 2004). Beim Menschen variiert die Expression der sechs Importin α -Proteine zelltypspezifisch (Köhler et al., 2002). In Kardiomyozyten ist im Vergleich zu embryonalen Stammzellen die Expression der Transportrezeptoren mit Ausnahme von Importin β und Transportin 1 trotz höherer Kernporendichte stark reduziert (Perez-Terzic et al., 2007).

Die Transportrate einzelner Kargomoleküle wird generell durch die gewebs- und entwicklungsspezifische Expression von Transportfaktoren moduliert (Poon & Jans, 2005; Quan et al., 2008). Zusätzlich unterscheiden sich die Karyopherine in ihrer Substratspezifität. Während manche Kargoproteine wie Nucleoplasmin mit mehreren Importin α -Isoformen interagieren, bindet der siebenblättrige β -Propeller RCC1 auch aufgrund seiner Proteinstruktur spezifisch an Importin α 3 (Friedrich et al., 2006). Dadurch wirkt sich die Regulation der Transportmaschinerie auch auf die Ebene der Kargobindung aus.

Darüber hinaus bereiten Wachstumsfaktoren durch intrazelluläre Signaltransduktion auch die Transportmaschinerie auf die eintretende Veränderung der Genexpression vor. Die Phosphorylierung von RanBP3 sowohl durch PI3/AKT als auch durch ERK/RSK erhöht die RanBP3-Affinität zu RanGTP (Yoon et al., 2008). RanBP3 besitzt eine Nup50 ähnliche Domänenstruktur und bindet CRM1, Ran und RCC1 *in vitro* (Englmeier et al., 2001; Lindsay et

al., 2002; Yoon et al., 2008). Da partiell RanBP3-defiziente Zellen eine erhöhte zytoplasmatische Ran-Konzentration aufweisen, könnte phosphoryliertes RanBP3 Ran in trimeren Komplexen sowohl RCC1 als auch CRM1 zugänglich machen und somit gleichzeitig den RanGTP-Gradienten stabilisieren und die Effizienz des CRM1-abhängigen Exports steigern.

Die dritte Art der Transportregulation durch Modifikation des Kernporenkomplexes wird hauptsächlich von Viren eingesetzt. Während ein Protein des Vesicular Stomatitis Virus durch Bindung an Nup98 den RNA-Export blockiert und dadurch die Konzentration der zellulären mRNA reduziert, inhibieren andere RNA-Viren wie beispielsweise Polio- oder Rhinoviren den Proteinimport durch Proteolyse von Nup62 und Nup153 (Cronshaw & Matunis, 2004).

Allerdings wird der NPC auch in der murinen Embryonalentwicklung durch gewebsspezifische Expression von Nup50 und gp210 in seinen Transporteigenschaften modifiziert. Ferner wird die Permeabilität des Kernporenkomplexes während der geschlossenen Mitose bei *Saccharomyces cerevisiae* oder der halboffenen bei *Aspergillus nidulans* durch Phosphorylierung bestimmter Nukleoporene modifiziert und die Aktivität der Transportrezeptoren inhibiert (Terry et al., 2007).

1.5.2 Translokation von β -Catenin und der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren

Das Protoonkogen β -Catenin ist strukturell mit Importin α verwandt. Während Importin α aus einer N-terminalen IBB-Domäne und 10 ARM-Wiederholungen besteht, ist die Struktur von β -Catenin dreigeteilt (Abb. 8). 12 ARM-Wiederholungen werden von helikalen Domänen flankiert, die in unstrukturierten Regionen enden (Xing et al., 2008). Im Gegensatz zu Importin α besitzt β -Catenin keine NLS oder IBB-Domäne. Trotzdem passiert β -Catenin den Kernporenkomplex ohne Hilfe von Transportfaktoren (Huber et al., 1996; Fagotto et al., 1998). Auch Importin α gelangt *in vitro* Importin β -unabhängig in den Nukleus (Miyamoto et al., 2002).

Kompetitionsexperimente zeigen, dass Importin β im Gegensatz zu Importin α die Translokation von β -Catenin konzentrationsabhängig blockiert (Koike et al., 2004). Folglich nehmen Importin β und β -Catenin eine andere Route durch den Kernporenkomplex als Importin α . Diese Hypothese wird von *in vitro* Bindungsstudien gestützt. Während Importin β sowohl mit der an FG-Wiederholungen reichen zentralen Region von γ Nsp1 als auch mit dem nur sechs FG-Sequenzen enthaltenden C-Terminus interagiert (Percipalle et al., 1997; Cushman et al., 2006), bindet β -Catenin nur den C-Terminus (Fagotto et al., 1998). Ferner zeigt β -Catenin im Überlagerungsblot keine Interaktion mit den am Proteinimport beteiligten Nukleoporinen Nup62, Nup214 oder Nup358 (Suh & Gumbiner, 2003). Daher ist Importin β entweder in der

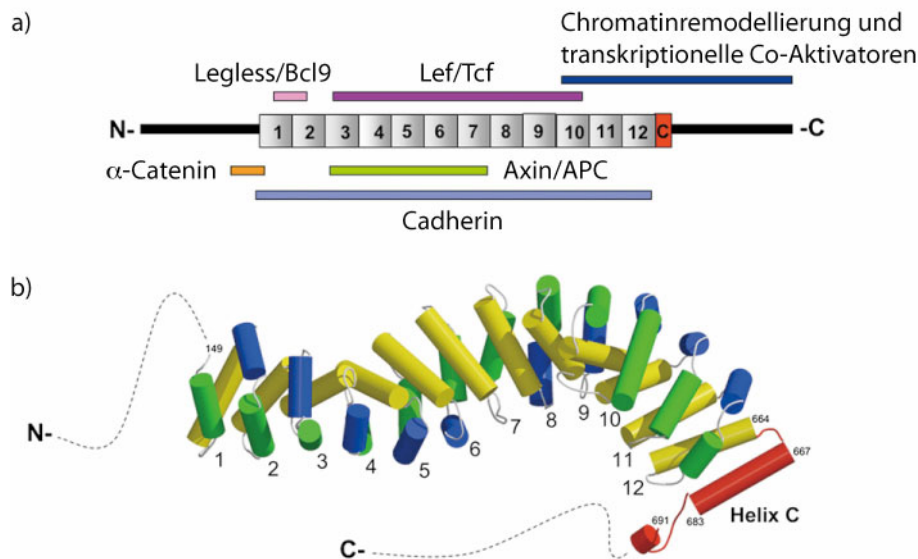


Abb. 8: Bindungspartner und Struktur von β -Catenin. Im Nukleus bindet β -Catenin (a) an Lef/Tcfs und aktiviert transkriptionelle Co-Aktivatoren wie Legless/Bcl9 oder Chromatin umgestaltende Faktoren. Im Zytoplasma verankert β -Catenin Cadherine über α -Catenin am Zytoskelett. Axin und APC, die in beiden Kompartimenten präsent sind, interagieren mit den ARM-Wiederholungen 3-7. Die 12 Arm-Wiederholungen (b) werden von helikalen Domänen flankiert, die in unstrukturierten Regionen enden. Aus Gottardi & Pfeiffer (2008).

Auswahl seiner Interaktionspartner innerhalb des Kernporenkomplexes weniger selektiv oder die Überlappung mit denen von β -Catenin ist lediglich partiell.

Die Kartierungen der für Im- oder Export von β -Catenin notwendigen Sequenzen liefern teilweise widersprüchliche Aussagen. Während Koike et al. (2004) die letzten beiden ARM-Wiederholungen zusammen mit dem C-Terminus nennen, sind bei Wiechens & Fagotto (2001) auch der N-Terminus bzw. die ersten acht ARM-Wiederholungen für den Export hinreichend. Sequenzanalysen zeigen, dass β -Catenin mindestens vier potentielle NES besitzt und CRM1-abhängig exportiert werden kann (Ki et al., 2008).

Derzeit gibt es vier verschiedene Modelle für den β -Catenin-Export. Während nach dem ersten Modell β -Catenin transportrezeptorunabhängig zwischen den Kompartimenten pendelt (Koike et al., 2004), beruhen die weiteren Exportwege auf Interaktionen mit anderen Proteinen. Im zweiten Fall bindet der Exportrezeptor CRM1 direkt an eine der β -Catenin-NES und exportiert das Protoonkogen (Ki et al., 2006; Ki et al., 2008). Drittens befördern die CRM1-abhängig exportierten Pendelproteine APC, Axin oder GSK-3 β β -Catenin Huckepack aus dem Kern (Henderson & Fagotto, 2002; Cong & Varmus, 2004; Meares & Jope, 2007). Und viertens transportiert der Exportfaktor RanBP3 β -Catenin CRM1-unabhängig ins Zytoplasma (Hendriksen et al., 2005). Indes ist unklar, welchen Anteil die einzelnen Exportmodelle am β -Catenin-Export haben und inwiefern posttranslationale Modifikationen von β -Catenin die

Transportwege beeinflussen. Zusammenfassend wird die Lokalisation des Protoonkogens β -Catenin ähnlich der Tumorsuppressorproteine APC, p53 oder Smad4 reguliert, die zwischen Nukleus und Zytoplasma pendeln und sich im Gleichgewichtsfall überwiegend in einem Kompartiment aufhalten, um dieses nach einem Stimulus rasch zu wechseln (Fabbro & Henderson, 2003). Dabei wird die Verteilung von β -Catenin durch Retention reguliert (Krieghoff et al., 2006).

Im Zellkern bindet β -Catenin an die Mitglieder der Lymphoid enhancer factor (Lef)/T-cell factor (Tcf)-Familie, die zur Superfamilie der High-Mobility-Group (HMG)-Box-Proteinen gehört (Barker et al., 2000). Die vier Mitglieder Lef-1, Tcf-1, Tcf-3 und Tcf-4 erkennen spezifisch 8-12 Basenpaare in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix (van Beest et al., 2000; Brantjes et al., 2002). Allerdings besitzen sie selbst keine intrinsische RNA-Polymerase-rekrutierende Aktivität, sondern benötigen β -Catenin als aktivierende Komponente für die Expression ihrer Zielgene. Umgekehrt enthält β -Catenin keine DNA-Bindungsstelle und ist für die Zielgenaktivierung auf die Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren angewiesen.

Die Lef/Tcf-Familienmitglieder besitzen eine NLS innerhalb ihrer HMG-Box. Obwohl sich die NLS von humanem Lef-1 (KKKKRKREK) und Tcf-1 (KKKRRSREK) nur in zwei Aminosäuren unterscheiden, wird Lef-1 im Gegensatz zu Tcf-1 von Importin β zusammen mit Importin α 1 oder α 5 importiert (Prieve et al., 1998). Für Tcf-1 ist der Transportrezeptor noch unbekannt. Bemerkenswerterweise sind nicht nur XLef-1, XTcf-1, XTcf-3 und XTcf-4 in der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* in distinkten Regionen des zukünftigen Gehirns exprimiert, sondern auch einige Transportrezeptoren weisen eine gewebsspezifische Expression auf (Wischniewski et al., 2000; Wischniewski et al., 2004; Arce et al., 2006; Hoppler & Kavanagh, 2007).

Des Weiteren zeigen Studien mit mutiertem Lef-1 ohne NLS, dass β -Catenin hinreichend für die Kernlokalisation von Lef-1 ist (Asally & Yoneda, 2005). Insoweit existieren für die Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren grundsätzlich zwei unabhängige Importwege, wobei der potentielle Transportrezeptor β -Catenin im Gegensatz zu den Karyopherinen vermutlich nicht zwischen den verschiedenen Familienmitgliedern unterscheidet.

1.5.3 Modelle des Kernporenmechanismus

Die Wirkungsweise des Kernporenkomplexes ist aufgrund seiner nanoskopischen Dimensionen und seiner Vielschichtigkeit immer noch nicht vollständig aufgeklärt. In den letzten zwanzig Jahren wurden mehrere, insbesondere auf biochemischen und elektronenmikroskopischen Studien basierende Modelle postuliert (Abb. 9), die die Selektivität der Barriere für inerte Moleküle und Transportrezeptor-Kargo-Komplexe erklären sollen (Fried & Kutay, 2003; Lim et al., 2008).

Unumstritten ist die Rolle der FG-Wiederholungen als ein wesentliches Element des Porenmechanismus. In jedem Kernporenkomplex befinden sich bis zu 12 unterschiedliche Nuk-

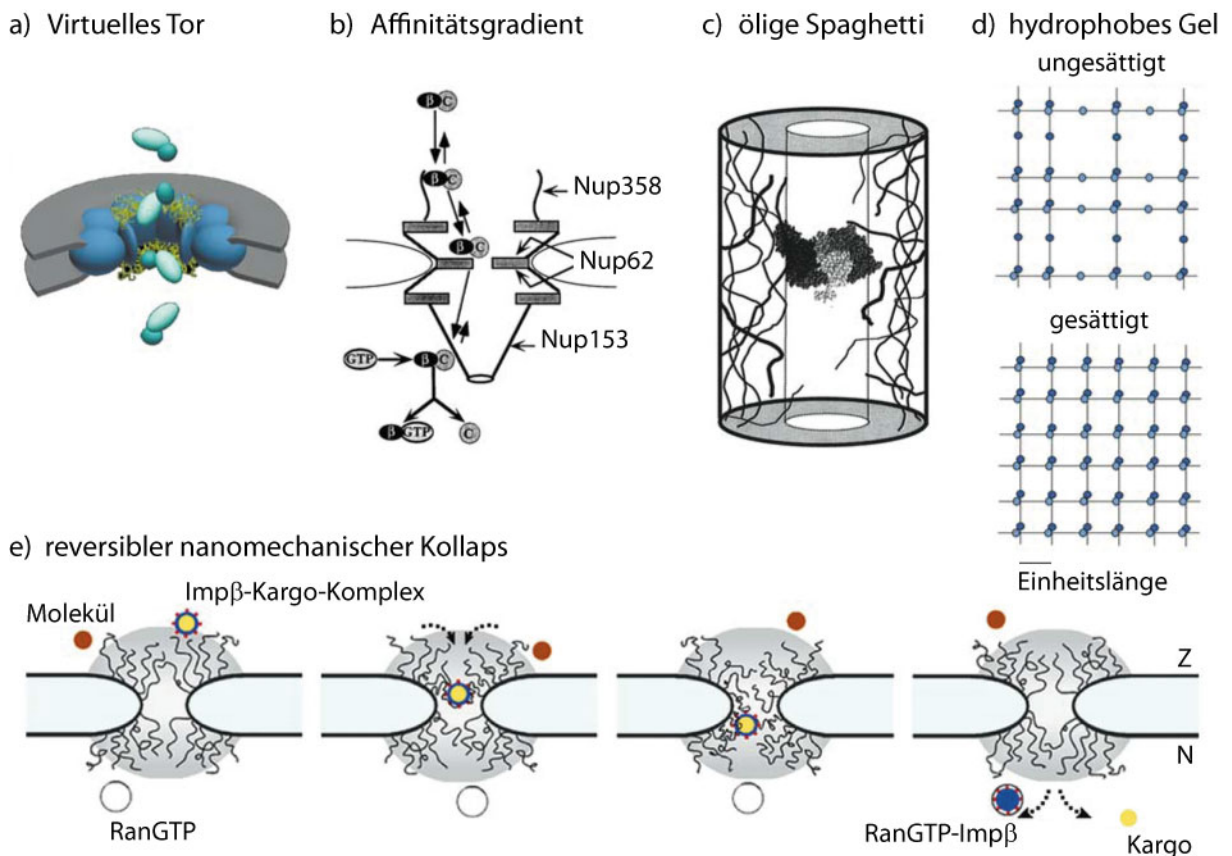


Abb. 9: Postulierte Modelle des Translokationsmechanismus. Die FG-Wiederholungen des Kernporenkomplexes wirken aufgrund entropischer Bewegungen als eine Art virtuelles Tor (a), das einerseits als Barriere für inerte Moleküle fungiert und andererseits durch Bindung des Transportrezeptor-Kargokomplexes dessen Translokationswahrscheinlichkeit erhöht. Nach dem Affinitätsgradienten-Modell (b) wird der Rezeptor-Kargo-Komplex an FG-Wiederholungen mit steigender Bindungsaffinität weitergereicht. Das ölige Spaghetti-Modell (c) schlägt vor, dass die den zentralen Kanal auskleidenden FG-Wiederholungen nur von Rezeptor-Kargo-Komplexen zur Seite gedrängt werden können. Aufgrund hydrophober Interaktionen zwischen den FG-Wiederholungen bildet sich ein ungesättigtes oder ein gesättigtes Gel (d) mit einer einheitlichen Maschenbreite, das von den Rezeptor-Kargo-Komplexen lokal aufgeschmolzen wird. Nach einem alternativen Modell (e) stellen sich die FG-Wiederholungen hingegen zu einer Art sich zufällig bewogender Polymerbürste auf, die inerte Moleküle abweist und durch die der Importin β -Kargo-Komplex aufgrund kurzzeitiger Bindungen transloziert. Aus Lim et al. (2008).

leoporine mit FG-Wiederholungen (Rout et al., 2000). Damit ist die Transportroute mit mindestens 128 FG-Domänen oder ~3,500 einzelnen FG-Wiederholungen bestückt (Strawn et al., 2004). Erstaunlicherweise bleibt die Funktionalität der selektiven Barriere auch nach Depletion der Hälfte dieser FG-Nukleoporine noch bestehen. Dabei sind die asymmetrisch verteilten FG-Nukleoporine wie beispielsweise Nup153 und Nup214 oder das die zytoplasmatischen Filamente bildende Nukleoporin Nup358 für den Kerntransport entbehrlich (Strawn et al., 2004; Zeitler & Weis, 2004).

Das virtuelle Tormodell, das ursprünglich als Brownsches Affinitätstornmodell bezeichnet wurde, betrachtet die Kernpore als entropische Barriere. Die Interaktion der Transportrezeptor-Kargo-Komplexe mit FG-Nukleoporinen erhöht deren Aufenthaltsdauer im Bereich des Kernporenkomplexes und dadurch auch deren Translokationswahrscheinlichkeit. Der Porendurchtritt erfolgt durch Brownsche Molekularbewegung. Inerte Moleküle dagegen werden zurückgestoßen. Wenn sie zufällig den Poreneingang finden, ist die Passage vom Moleküldurchmesser abhängig und oberhalb der Porenausschlussgröße nicht möglich (Rout et al., 2000; Rout et al., 2003; Alber et al., 2007).

Nach dem Affinitätsgradientenmodell bewegt sich der Transportrezeptor-Kargo-Komplex von einer FG-Domäne zur nächsten, wobei die Affinität stetig zunimmt. RanGTP oder RanGAP initiieren die Dissoziation von den terminalen FG-Domänen und beenden dadurch den Transportweg (Ben-Efraim & Gerace, 2001).

Das ölige Spaghetti-Modell postuliert, dass durch den mit FG-Domänen bestückten Transportkanal Moleküle mit einem Durchmesser bis zu 10 nm frei diffundieren. Größere Moleküle werden durch die FG-Domänen behindert. Die Transportkomplexe interagieren transient mit den FG-Wiederholungen und translozieren aufgrund zufälliger Bewegung. Die Transportrichtung ist keine Eigenschaft der Kernpore, sondern wird durch die Stabilität der Transportkomplexe in Gegenwart von RanGTP bestimmt (Macara, 2001).

Im Modell der selektiven Phasen, das neuerdings als hydrophobes Gel-Modell bezeichnet wird, bilden die FG-Domänen aufgrund hydrophober Wechselwirkungen ein Gel. Dabei definieren sowohl die Maschenweite des Netzwerks als auch die hydrophobe Natur des Gels die Porenausschlussgröße für die freie Diffusion. Die Transportrezeptor-Kargo-Komplexe schmelzen aufgrund ihrer Interaktionen mit den FG-Domänen lokal das Gel auf und passieren derart die selektive Barriere (Ribbeck & Görlich, 2002). Die FG-Domänen von yNsp1 polymerisieren *in vitro* zu einem Hydrogel, das allerdings erst bei einer Konzentration von 2.2 mM fsFG-Domänen die Eigenschaft einer selektiven Barriere aufweist. Unterhalb dieser Konzentration sind nicht alle hydrophoben FG-Wiederholungen miteinander verbunden und

das Gel liegt in einer ungesättigten Konformation vor, die auch größeren Molekülen die Passage erlaubt (Frey et al., 2006; Frey & Görlich, 2007).

Die durch einen unphysiologischen pH-Wertsprung induzierte yNsp1-Polymerisation lässt sich allerdings im Niederaffinitätsbindungsassay nicht bestätigen. Dabei wurde die Wechselwirkung zwischen an Glutathion-Sepharose immobilisierten und fluoreszent markierten Hefenukleoporinen analysiert, wobei nur GLFG-Domänen schwache kohäsive Bindungen eingingen, die FxFG-Domänen wie beispielsweise yNsp1 aber nicht (Patel et al., 2007). Infolgedessen schlugen die Autoren ein Doppeltor-Modell vor, das eine Synthese aus dem virtuellen Tormodell und dem selektiven Phasenmodell darstellt. Während die GLFG-Domänen des zentralen Rings ein hydrophobes Netzwerk bilden, agieren die peripheren FG-Nukleoporine sowohl attraktiv für Transportkomplexe als auch repulsiv auf inerte Moleküle.

Nach dem Modell des reversiblen nanomechanischen Kollapses stehen die FxFG-Domänen aufgrund der hohen Packungsdichte und ihrer Entropie von der Oberfläche ab. Während inerte Moleküle durch die Polymerbürste zurückgestoßen werden, verursacht die Bindung eines Transportrezeptor-Kargo-Komplexes lokal einen reversiblen Kollaps (Lim et al., 2006; Lim et al., 2007).

1.6 Methoden zur Untersuchung des Kerntransports

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet sich aufgrund ihrer hohen zeitlichen Auflösung für die Untersuchung physiologischer Prozesse wie den Kerntransport an. Doch die Verwendung fokussierten Lichts unterliegt der Beugungsgrenze, nach der sich nur die Objekte von einander unterscheiden lassen, deren Hauptmaxima mindestens um $\Delta d = \lambda / (2n \sin \alpha)$ voneinander getrennt sind (Abbe, 1873; Lord Rayleigh, 1879; Lord Rayleigh, 1896). Da die Wellenlänge des Lichts λ auf 400-700 nm und der halbe Öffnungswinkel des Lichtkegels α auf $<70^\circ$ begrenzt sind, liegt die in der klassischen Lichtmikroskopie erreichbare laterale Auflösung oberhalb 200 nm.

1.6.1 Ultrahochauflösende Fernfeldmikroskopie

Zur Überwindung der Beugungsbegrenzung wurden sowohl weitfeld- als auch nahfeldoptische Verfahren mit unterschiedlichen physikalischen oder mathematischen Ansätzen entwickelt, die sich verschiedenartig auf die laterale oder axiale Auflösung auswirken (Abb. 10) (de Lange et al., 2001; Hell, 2007; Rice, 2007).

In der konfokalen Mikroskopie wird die von außerhalb des Fokus stammende Fluoreszenz durch eine Lochblende blockiert und dadurch sowohl die axiale als auch die laterale Auflösung deutlich verbessert (Abb. 10). Die Verwendung gepulsten, infraroten Laserlichts in der Zwei-Photonen-Weitfeldmikroskopie reduziert das Anregungsvoxel axial, da nur die Fluorophore angeregt werden, die simultan zwei Photonen absorbieren. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist quadratisch proportional zur Anregungsintensität und somit im Laserfokus als dem Ort der höchsten Photonendichte am höchsten (Jaiswal & Simon, 2007).

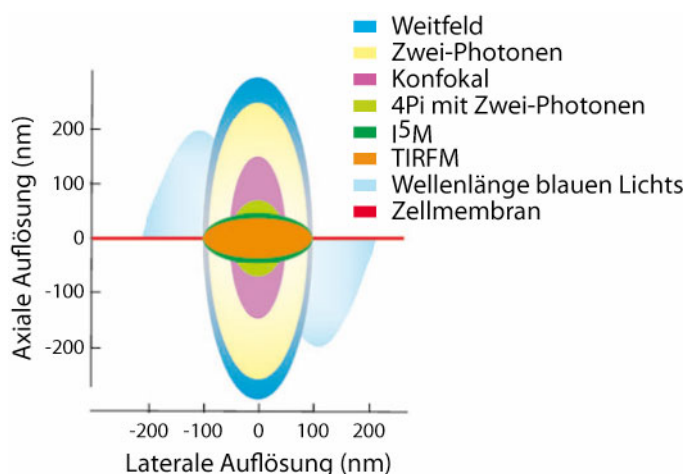


Abb. 10: Auflösungen unterschiedlicher abbildender Verfahren. Weitfeld- und Zwei-Photonen-Weitfeldmikroskopie weisen die geringste Auflösung auf. Die konfokale Mikroskopie und die Zwei-Photonen-4Pi-Mikroskopie stellen eine deutliche Verbesserung sowohl der lateralen als auch der axialen Auflösung dar. Der 3D-Weitfeldansatz I⁵M erreicht fast die axiale Auflösung der nahfeldoptischen TIRF-Mikroskopie, wobei sich die laterale Auflösung unverändert in der Größenordnung der Weitfeldmikroskopie bewegt. Zum Größenvergleich wurden eine Wellenlänge des blauen Lichts und die axiale Ausdehnung der Zellmembran eingezeichnet. Aus Jaiswal & Simon, (2007).

Dennoch wird bei diesen beiden fernfeldoptischen Verfahren die Beugungsgrenze von $\Delta r \approx \lambda/2n > 200 \text{ nm}$ und $\Delta z \approx \lambda > 450 \text{ nm}$ an sich lediglich verschoben, aber nicht wirklich überwunden (Hell, 2007). Durch den Einsatz stehender Wellenfelder indes lässt sich die axiale Auflösung im Vergleich zur Epifluoreszenzmikroskopie um das Drei- bis Siebenfache steigern (Hell, 2007). Dazu wird die Probe in dem stehenden Wellenfeld, das durch die Interferenz zweier aufeinander zulaufender kohärenter Laserstrahlen erzeugt wird, schrittweise entlang der Achse der beiden sich gegenüberliegenden Objektive bewegt. Diese Technik wird in der I⁵M-, SMI- und 4Pi-Mikroskopie eingesetzt.

Im 3D-Weitfeldfluoreszenzmikroskop I⁵M konnten fixierte Mikrotubuli mit unter 100 nm Auflösung dargestellt werden (Gustafsson et al., 1999). In der Gruppe von Prof. Dr. Dr. Cremer wurden mit einem ähnlichen, als Spatially Modulated Illumination (SMI) bezeichnetes Verfahren, 40 nm große Nanopartikel axial exakt abgebildet (Failla et al., 2002), während die laterale Auflösung weiterhin beugungsbegrenzt blieb.

Die 4Pi-Mikroskopie verbindet die stehenden Wellenfelder mit der konfokalen Mikroskopie, so dass die Probe nicht nur axial in Ebenen unterteilt sondern auch jede Ebene selbst punktwise abgebildet wird (Abb. 11). Aufgrund konstruktiver Interferenzen entstehen ober- und unterhalb der Brennebene Seitenmaxima, die sich zunächst mittels Zwei-Photonen-anregung reduzieren und schlussendlich mathematisch entfernen lassen (Hell, 2007). Die Kombination von kohärenter Anregung mit kohärenter Detektion ermöglicht axiale Auflösungen zwischen 80 und 150 nm (Gugel et al., 2004).

Die wichtigste Einschränkung der Fluoreszenzmikroskopie mit stehenden Wellen ist die

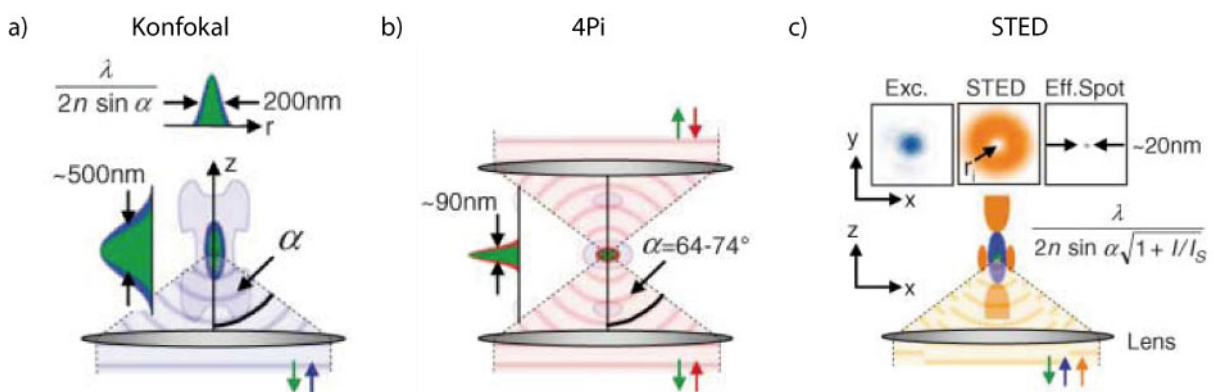


Abb. 11: Prinzip der konfokalen, der 4Pi- und der STED-Mikroskopie. Das eingestrahelte Licht (blau) wird im konfokalen Mikroskop (a) durch die Linse beugungsbegrenzt fokussiert, wobei die in diesem Voxel angeregte Fluoreszenz (grün) detektiert wird. Durch die Kombination der Wellenfelder aus zwei gegenüberliegenden Objektiven (b) wird die z-Auflösung bei der 4Pi-Mikroskopie deutlich verbessert. In der STED-Mikroskopie (c) dagegen wird der Anregungsstrahl (blau) durch einen donutförmigen STED-Strahl (orange) überlagert, welcher die vom Anregungsstrahl erzeugte Fluoreszenz abführt, so dass sich die effektiv detektierbare Fluoreszenz (grün) auf einen Durchmesser von beispielsweise 20 nm reduziert. Aus Hell (2007).

Probenstärke, die sich bei den Weitfeldansätzen in der Größenordnung der verwendeten Wellenlänge bewegt und bei der 4Pi-Mikroskopie nur etwa 200 nm betragen sollte (Rice, 2007). Des Weiteren sind diese Techniken aufgrund der aufwendigen Justage zeitraubend.

Bei der STED (Stimulated Emission Depletion)-Mikroskopie wird der Radius der detektierten Fluoreszenz dadurch eingeengt, dass die in der Peripherie des Fokus befindlichen Fluorophore reversibel in einen nichtfluoreszierenden Zustand überführt werden (Abb. 11). Dabei wird der beugungsbegrenzte, anregende Lichtstrahl mit einem langwelligeren, die Abregung stimulierenden STED-Lichtstrahl überlagert, der in der Mitte über eine Nullstelle verfügt und die Energie der im angeregten Zustand S_1 befindlichen Fluorophore als ein weiteres Photon abführt (Hell, 2007). Die resultierende laterale Auflösung wird durch die Dimension der Nullstelle im STED-Strahl bestimmt. Die Übersättigung der stimulierten Emission gewährleistet einerseits die effektive Abregung der peripheren Fluorophore, kann aber auf der anderen Seite durch rasche interne S_1 - T_1 -Übergänge innerhalb von Pikosekunden zum Bleichen führen. Die niedrige Wiederholungsrate der synchron gepulsten Laser ermöglicht die Relaxation des Triplett- in den Grundzustand, wobei mit dieser T-REX genannten Modifikation der STED-Mikroskopie eine laterale Auflösung zwischen 15 und 20 nm möglich sind (Donnert et al., 2006). Kürzlich konnten 30 nm große Nanopartikel in einem Zwei-Farben-STED-Mikroskop mit dem grünen Kanal exakt und im roten Kanal mit 65 nm abgebildet werden (Donnert et al., 2007). Die axiale STED-Auflösung liegt durch ein zusätzliches abregendes Maximum oberhalb der Fokusebene bei 100 nm, kann aber theoretisch durch Kombination mit der 4Pi-Mikroskopie auf 33-60 nm gesteigert werden (Hell, 2007).

Nachteilig ist insbesondere die für konfokale Darstellungen typische lange Aufnahmezeit (Rice, 2007), welche sich analog der konfokalen Mikroskopie durch multiple Anregung und Detektion mittels CCD-Kamera deutlich reduziert lässt.

Die mathematischen ultrahochauflösenden Konzepte beruhen auf der Punktspreizfunktion (PSF) einzelner Fluorophore in beugungsbegrenzten Aufnahmen. Dabei wird die Lokalisation der Fluorophore anhand ihrer PSF mit extrem hoher Genauigkeit von beispielsweise 1.5 nm bestimmt (Rice, 2007). Derart wurden mit einem Weitfeldfluoreszenzmikroskop in einer viskosen Lösung diffundierende GFP-Moleküle bzw. einzelne Rhodamin-Fluorophore in einer Lipiddoppelschicht mit 30 nm und membranständiges GFP-markiertes Pom121 mit 10 nm Genauigkeit lokalisiert (Schmidt et al., 1996; Kubitscheck et al., 2000; Kubitscheck et al., 2005).

Allerdings kann bei dieser Methode der feststehende Emissionsdipol des Fluorophors je nach seiner räumlichen Orientierung bezüglich der Polarität des eingestrahlten Laserlichts einen signifikanten Fehler von bis zu 10 nm in der Lokalisation bewirken (Rice, 2007).

1.6.2 Nahfeldoptische Mikroskopie

Die Nahfeldoptik betrachtet die nanometrische Informationen in den nicht-propagierenden (evaneszenten) Anteilen des elektromagnetischen Feldes, die der klassischen Lichtmikroskopie nicht unmittelbar zugänglich sind. Allgemein besitzt ein an einem submikroskopischen Objekt gestreutes elektromagnetisches Feld sowohl propagierende als auch evaneszente Anteile, wobei letztere mit einem unter $<\lambda/2$ abnehmenden Objektdurchmesser an Bedeutung gewinnen (Vigoureux & Courjon, 1992). Propagierendes Licht der Wellenlänge λ ist durch die Ausbreitungsbeziehung $c=\lambda*v$ streng an die Frequenz v gekoppelt, wohingegen der nicht-propagierende Charakter der evaneszenten Moden auf deren Unabhängigkeit von dieser Beziehung beruht (Naber, 2003). Die Amplitude der evaneszenten Wellen fällt vielmehr exponentiell mit dem Abstand z ab, so dass diese im Fernfeld ($z \gg \lambda$) nicht mehr detektierbar sind, sofern sie nicht zuvor in propagierende Moden umgewandelt wurden (Vigoureux et al., 1992). Diese Wandlung kann beispielsweise durch Beugung der nicht-propagierenden Welle an einer nanoskalischen Apertur in einem lichtundurchlässigen Metallfilm oder einem submikroskopischen Partikel wie einem Fluorophor geschehen.

In der TIR (Total Internal Reflection)-Fluoreszenzmikroskopie wird durch Totalreflektion eines kohärenten Laserstrahls an der Grenzfläche zwischen einem hoch- und einem niedrigbrechenden Medium in letzterem ein evaneszentes Feld von 50 bis 150 nm Höhe erzeugt (Toomre & Manstein, 2001). Dadurch können plasmamembrannahe Prozesse in einer lebenden Zelle weitgehend streulichtfrei in Echtzeit beobachtet und in Kombination mit Fluoreszenz-Korrelation-Spektroskopie auch deren Dynamiken analysiert werden (Jaiswal & Simon, 2007). Dabei bleibt die axiale Detektion auf das evaneszente Feld beschränkt und die Auflösung lateral weiterhin beugungsbegrenzt.

Mittels seriell photoaktivierter und anschließend gebleichter Fluorophore konnten Betzig et al. (2006) im TIR-Fluoreszenzmikroskop eine Lokalisationsgenauigkeit von 10 nm erzielen, in dem sie in zahlreichen Einzelaufnahmen mittels der Punktspreizfunktion die exakte Position einzelner Fluorophore berechneten und diese am Ende zu einem hochaufgelösten Gesamtbild vereinigten.

Darüber hinaus ermöglicht der Einsatz einer U-förmigen Hyperlinse aus nanostrukturier-tem Metamaterial die Umwandlung der evaneszenten Wellen von dem auf dem Boden des Linsenhalbrunds gelegenen submikroskopischen Objekt in eine propagierende Welle (Liu et

al., 2007c). Dabei vergrößert die plankonkave Gestalt der Superlinse das nanoskopische Objekt in eine mit einem optischen Lichtmikroskop darstellbare Dimension und erlaubt eine laterale Auflösung von 130 nm.

Die Superlinse dagegen verstärkt die evaneszenten Wellen durch Kopplung an die Oberflächenplasmonenstrahlung. Sie besteht aus einer einlagigen Materialschicht mit einem negativen Brechungsindex und ermöglicht Auflösungen im Bereich von 70 nm (Smolyaninov et al., 2007). Ein alternatives Konzept beschreibt eine abgeflachte Fernfeldsuperlinse mit periodischen Furchen zur Umwandlung der stehenden Wellen durch einen stärkeren Plasmonresonanzeffekt und 50 nm Auflösung (Liu et al., 2007b).

In einer bemerkenswerten Kombination aus optischer Rasternahfeld- und Zwei-Photonen-Lasermikroskopie verwendeten Nakayama et al. (2007) einen gepulsten Infrarotlaser, der sowohl als optische Pinzette die etwa fünf Mikrometer langen Nanoröhren aus Kaliumniobat (KNbO_3) positionierte als auch via Frequenzverdopplung die unter 200 nm starken Nanoröhren als eine evaneszente Lichtquelle mit einer Wellenlänge von 532 nm erstrahlen ließ. Auch wenn die Autoren keine Auflösungsgrenze angeben, so scheint dieser Methode das Potential zur Überwindung der Beugungsgrenze inhärent zu sein.

Allerdings wurde dieses neue ultrahochauflösende Abbildungsverfahren ebenso wie die Hyper- und Superlinsen bisher nur an artifiziellen Strukturen getestet; die Erprobung an biologischen Proben steht noch aus.

1.6.3 Optische Rasternahfeldmikroskopie

Die physikalischen und mathematischen Grundlagen der optischen Rasternahfeldmikroskopie (SNOM) sowie der apparative Aufbau und dessen Veränderungen wurden in zahlreichen Arbeiten der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Naber detailliert beschrieben (Höppener, 2003; Naber, 2003; Johnas, 2004; Dießel, 2006; Pérez, 2008).

Das Konzept der Nahfeldmikroskopie wurde bereits 1928 von E. Synge formuliert, indem er vorschlug, dünne Schnitte biologischer Proben mit einer starken Lichtquelle durch eine 100 nm große Apertur in einem opaken Metallfilm in einem Abstand unterhalb des Aperturdurchmessers punktuell zu beleuchten. Das in Vergessenheit geratene Gedankenexperiment wurde mehr als fünfzig Jahre später im Zuge der Entwicklung des Rastertunnelmikroskops von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander erneut erfunden und realisiert (Lewis et al., 1984; Pohl et al., 1984). Zu Beginn der neunziger Jahre erreichten Betzig und Kollegen durch den Einsatz konisch zulaufender, metallbeschichteter Apertursonden Auflösungen bis zu 12 nm und konnten experimentell zeigen, dass sich die Auflösung mit

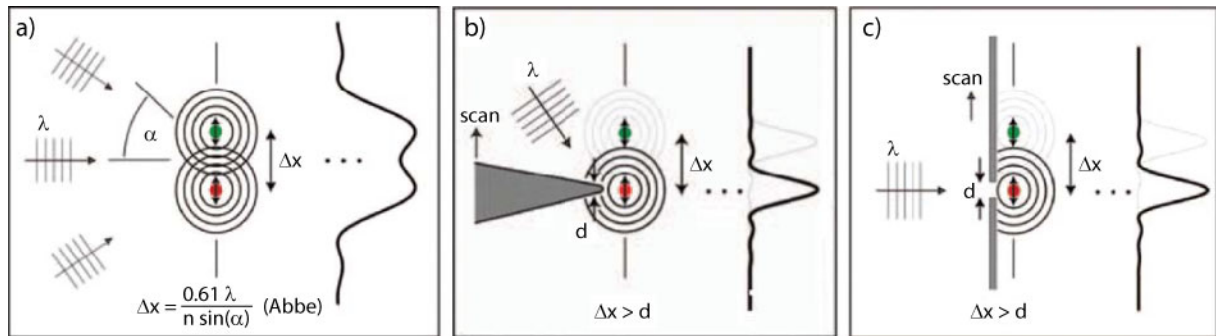


Abb. 12: Schematische Gegenüberstellung der Auflösung eines beugungsbegrenzten optischen Mikroskops und zweier optischer Rasternahfeldmikroskopansätze. (a) Das Rayleigh-Kriterium bestimmt den minimalen Abstand zweier noch getrennt wahrnehmbarer, beugungsbegrenzter Objekte Δx in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ , dem Brechungsindex n und dem Öffnungswinkel α . Bei einem optischen Rasternahfeldmikroskop hingegen wird die Auflösung in erster Näherung nur durch die Größe der nanoskopischen Lichtquelle (b) oder den Aperturdurchmesser (c) und nicht mehr durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts bestimmt. Aus Novotny & Stranick (2006).

zunehmender Apertur-Objekt-Entfernung schon bereits nach einigen Nanometern verschlechtert (Betzig et al., 1991; Betzig & Trautman, 1992; Betzig & Chichester, 1993).

In der optischen Rasternahfeldmikroskopie finden Sonden sowohl mit als auch ohne Apertur Anwendung (Abb. 12). Die aus einer Spitze oder einem Partikel bestehenden, aperturlosen Sonden wandeln entweder die evaneszenten Wellen des laserilluminieren, submikroskopischen Objekts in propagierende um oder wirken aufgrund unmittelbarer Bestrahlung selbst als nanoskopische Lichtquellen (Novotny & Stranick, 2006). Die Apertursonden wiederum bestehen häufig aus einer Glasfaser, deren Ende sich aufgrund eines Ätzprozesses oder thermischen Zugs verjüngt und die mit einer lichtundurchlässigen Metallschicht bedampft wurde. Da sowohl Konuswinkel als auch Aperturdurchmesser die Transmissionseigenschaf-

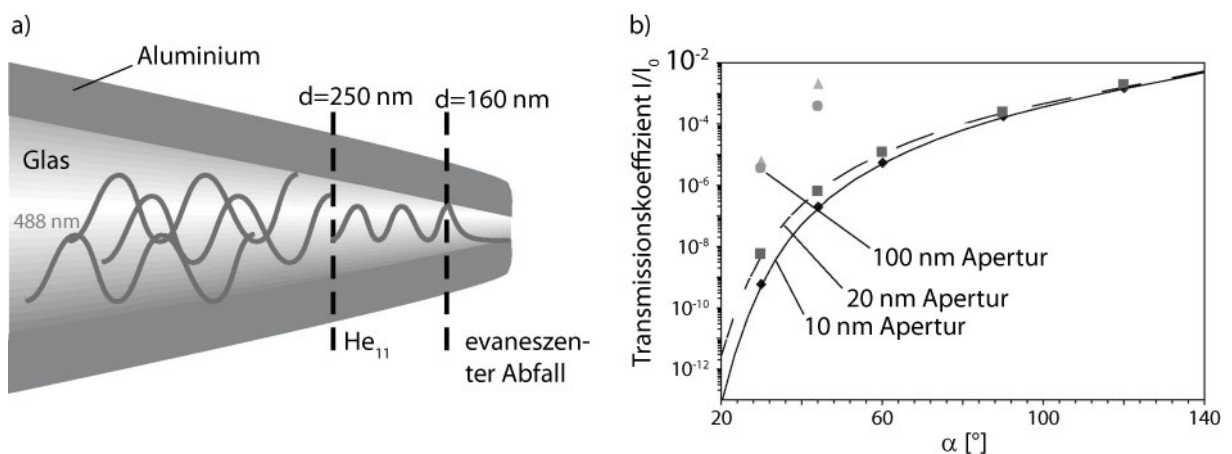


Abb. 13: Die Transmission wird mit abnehmendem Aperturdurchmesser geringer. (a) Die sich verjüngende, metallbeschichtete Glasfaser bewirkt die Aufspaltung der Moden, bis nur noch die Grundschwingung (HE_{11} -Mode) propagiert. Unter einem Durchmesser von 160 nm erfährt selbst die Grundmode ($\lambda=488$ nm) eine exponentielle Dämpfung. (b) Dieser Effekt kann durch Vergrößerung des vollen Konuswinkels α kompensiert werden. Aus Hecht et al. (2000).

ten der Sonde beeinflussen (Abb. 13), werden meist Aperturen von 50-100 nm Durchmesser verwendet (Hecht et al., 2000). Die Intensität an der Apertur lässt sich nur begrenzt durch die Erhöhung der eingestrahlichten Laserleistung steigern, da dadurch nicht nur die Apertursonde aufgeheizt, sondern auch oberhalb eines bestimmten Werts der Metallmantel über eine vom Konuswinkel abhängige Länge beschädigt wird (Dickenson et al., 2007). Der volle Konuswinkel thermisch gezogener Sonden ist mit typischerweise $<20^\circ$ kleiner als der chemisch geätzter oder mechanisch geschliffener Sonden (Höppener, 2003). Prinzipiell lassen sich Sonden mit bis zu 180° Öffnungswinkel herstellen, wodurch sich allerdings aufgrund des beträchtlichen Sondendurchmessers auf Aperturhöhe sowohl die optische als auch die topographische Auflösung verschlechtern würde.

Durch die Entwicklung dreiseitiger (TA) Apertursonden mit einem Gesamtöffnungswinkel von 90° konnte der Transmissionskoeffizient im Vergleich zu zirkulären Sonden ähnlicher Auflösung um drei Zehnerpotenzen gesteigert werden (Naber et al., 2002). Die Apertur dieser aus einem Deckglas hergestellten Sonden wird durch vorsichtiges Drücken auf eine glatte Oberfläche erzeugt (Abb. 14). In Einzelmolekülmessungen wurde mit solchen Sonden eine laterale Auflösung von 30 nm erzielt und die exakte Orientierung der fluoreszierenden Nanopartikel gemessen (Molenda et al., 2005). Die TA-Sonden werden ebenso wie die Fasersonden am Zinken einer als Kraftsensor dienenden piezoelektrischen Quarzstimmgabel befestigt und zu vertikalen Schwingungen unter 1 nm Amplitude angeregt (Tapping-Mode). Bei der

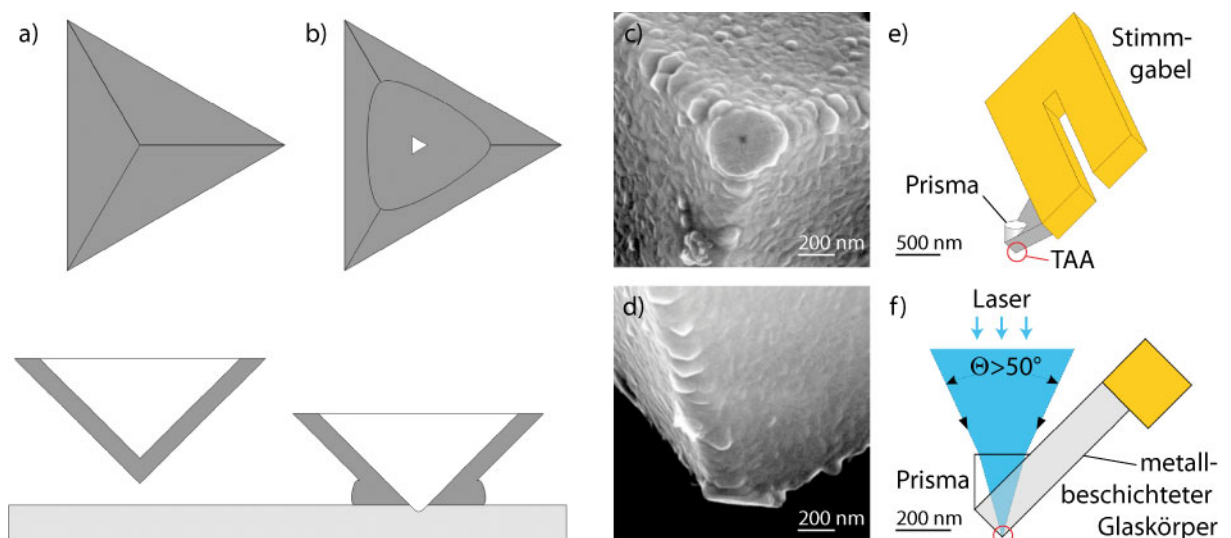


Abb. 14: Herstellung und Aufbau einer dreiseitigen (TA) Sonde. Der metallbeschichtete Glaskörper (a) wird vorsichtig gegen eine ebene Glasoberfläche gepresst, so dass durch Verdrängung des weicheren Metallfilms die Apertur (TAA) entsteht (b). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer gedrückten TA-Sonde zeigen in Aufsicht die winzige Apertur im Metallmantel (c) und in der Seitenansicht die Ebenheit des Sondenplateaus (d). Die TA-Sonde ist für die Kraftabstandskontrolle an einem aus einer Quarzstimmgabel bestehenden Kraftsensor befestigt und mit einem Prisma versehen (e), in das der Laserstrahl eingekoppelt wird (f). Aus Naber (2003).

Annäherung an die Probenoberfläche verändern sich sowohl die Resonanzfrequenz als auch die Amplitude, wobei die an einem Zinken angebrachte Sonde nicht nur diesen Effekt auf die Resonanzfrequenz schmälert, sondern auch die Güte der Stimmgabel beeinträchtigt (Naber, 1999).

Als alternative Kraftabstandskontrolle kann die Scherkraftmikroskopie eingesetzt werden, bei der beide Zinken der Stimmgabel senkrecht auf die Probenoberfläche zeigen und nicht wie im Tapping-Mode parallel zu ihr ausgerichtet sind, wobei die Fasersonde über die gesamte Zinkenlänge mit der Stimmgabel verbunden ist. Die Tatsache, dass zur Vermeidung der Eigenschwingungen der Sondenspitze diese nur einige Hundert Mikrometer über den Zinken hinausragen darf, hat sich bei Messungen in Flüssigkeit als unvorteilhaft herausgestellt, da die Stimmgabel bereits bei einem Millimeter Flüssigkeitspegel mit ihren Zinken eintaucht (Höppener, 2003). Die im Tapping-Mode betriebene Kraftabstandskontrolle erlaubt es dagegen, ohne merkliche Einbußen der Kraftempfindlichkeit, bis zu drei Millimeter lange Fasersonden an der Stimmgabel zu befestigen und damit Eintauchtiefen von bis zu zwei Millimeter zu realisieren (Höppener, 2003). Die geringe Höhe der TA-Sonden indes wirft bei Messungen in Flüssigkeit hinsichtlich der Kraftabstandskontrolle der Scherkraftmikroskopie ähnliche Probleme auf, so dass der Verzicht auf die herkömmliche Sonden-Probenoberflächen-Kontrolle und die Entwicklung einer neuen Strategie für die Analyse des Kerntransports mit der optischen Nahfeldmikroskopie notwendig erscheint (Dießel, 2006).

Die Schwierigkeit der Kraftabstandskontrolle in Flüssigkeit hat den Durchbruch der optischen Rasternahfeldmikroskopie verglichen mit der TIRFM in der biologischen Forschung behindert. Mittels Tapping-Mode-kontrollierter Fasersonden wurde die fluoreszent markierte Kernmembran von *Xenopus laevis* Oozyten mit 60 nm Auflösung abgebildet (Höppener et al., 2005). In einem anderen Ansatz, bei dem eine Tauchglocke die auf Scherkraftmikroskopie basierende Kraftabstandskontrolle vor der Flüssigkeit schützte, konnte die submikroskopische Organisation von Typ C-Lektinen auf unreifen dendritischen Zellen mit einer Auflösung von 90 nm dargestellt werden (Koopman et al., 2004). Mittels Bleichen einzelner Moleküle und der subtraktiven Überlagerung der Bilderserie einer mikroskopischen Gruppierung konnte kürzlich die Lokalisationsgenauigkeit einzelner Typ C-Lektine auf 6 nm gesteigert werden (de Bakker et al., 2007). Mit einem kommerziellen, ebenfalls die Scherkraftmikroskopie einsetzenden SNOM, wurde jüngst die Verteilung der mit halbleitenden Nanokristallen markierten, unstimulierten und stimulierten T-Zellrezeptoren mit 50 nm optischer Auflösung abgebildet (Chen et al., 2008).

Aufgrund des Nischendaseins der optischen Nahfeldmikroskopie in der biologischen Forschung und der damit verbundenen Reduktion auf ihr ultrahochoflösendes Potential ist die Vernetzung mit anderen Techniken zur Aufklärung dynamischer Prozesse oder von Protein-Protein-Interaktionen wie beispielsweise der Förster-Resonanzenergie-Transfer (FRET) oder der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) sehr selten.

1.6.4 Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) ist eine auf Einzelmolekülspektroskopie basierende Technik. Dabei werden die Intensitätsfluktuationen fluoreszierender Moleküle in einem System, das sich im Gleichgewicht befindet, statistisch analysiert, um molekulare Ereignisse wie Diffusion, Transport, chemische Reaktionen oder Konformationsänderungen zu bestimmen (Abb. 15). Die Methode wurde 1972 von Magde et al. zur Untersuchung der Diffusions- und Reaktionskonstanten von Ethidiumbromid und doppelsträngiger DNA vorgestellt. FCS erfuhr in den neunziger Jahren aufgrund der Kombination mit der konfokalen Mikroskopie eine Renaissance, die durch Reduktion des effektiven Detektionsvolumens den Einsatz nanomolarer Fluorophorkonzentrationen ermöglichte (Krichevsky & Bonnet, 2002).

Intensitätsfluktuationen entstehen im einfachsten Fall durch fluoreszierende Moleküle, die frei in das Anregungsvolumen hinein- und herausdiffundieren. Um quantitative Aussagen aus dem stochastischen, mit einer hochsensitiven Photodiode gemessenen Intensitätssignal zu erhalten, wird die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ des fluktuierenden Signals $F(t)$ bestimmt. Für frei bewegliche Moleküle beschreibt die charakteristische Abklingzeit von $G(\tau)$ die mittlere Aufenthaltsdauer eines Moleküls im Detektionsvolumen, aus welcher sich der Diffusionskoeffizient berechnen lässt. Dieser ist nach der Stokes-Einstein-Beziehung proportional zur Temperatur und reziprok zur Viskosität der Lösung bzw. dem hydrodynamischen Teilchenradius (Schwille & Haustein, 2002).

Zusätzlich zum Diffusionskoeffizienten kann mittels FCS auch die Konzentration bestimmt werden. Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, bei der höhere Fluorophorkonzentrationen zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis beitragen, sollten sich bei FCS-Experimenten im Mittel lediglich bis zu zehn Fluorophore im Detektionsvolumen befinden, da sich ansonsten die Intensitätsfluktuationen überlagern.

Befinden sich zwei unterschiedliche Molekülarten in der Lösung, so ist ihre Unterscheidbarkeit von der gezählten Photonenzahl, dem Größenunterschied und ihrer Konzentration abhängig. Bei einem starkem Fluoreszenzsignal und vergleichbarer Quantenausbeute können die beiden Spezies nur dann getrennt voneinander wahrgenommen werden, wenn sich ihre Diffusionszeiten mindestens um den Faktor 1.6 unterscheiden (Meseth et al., 1999).

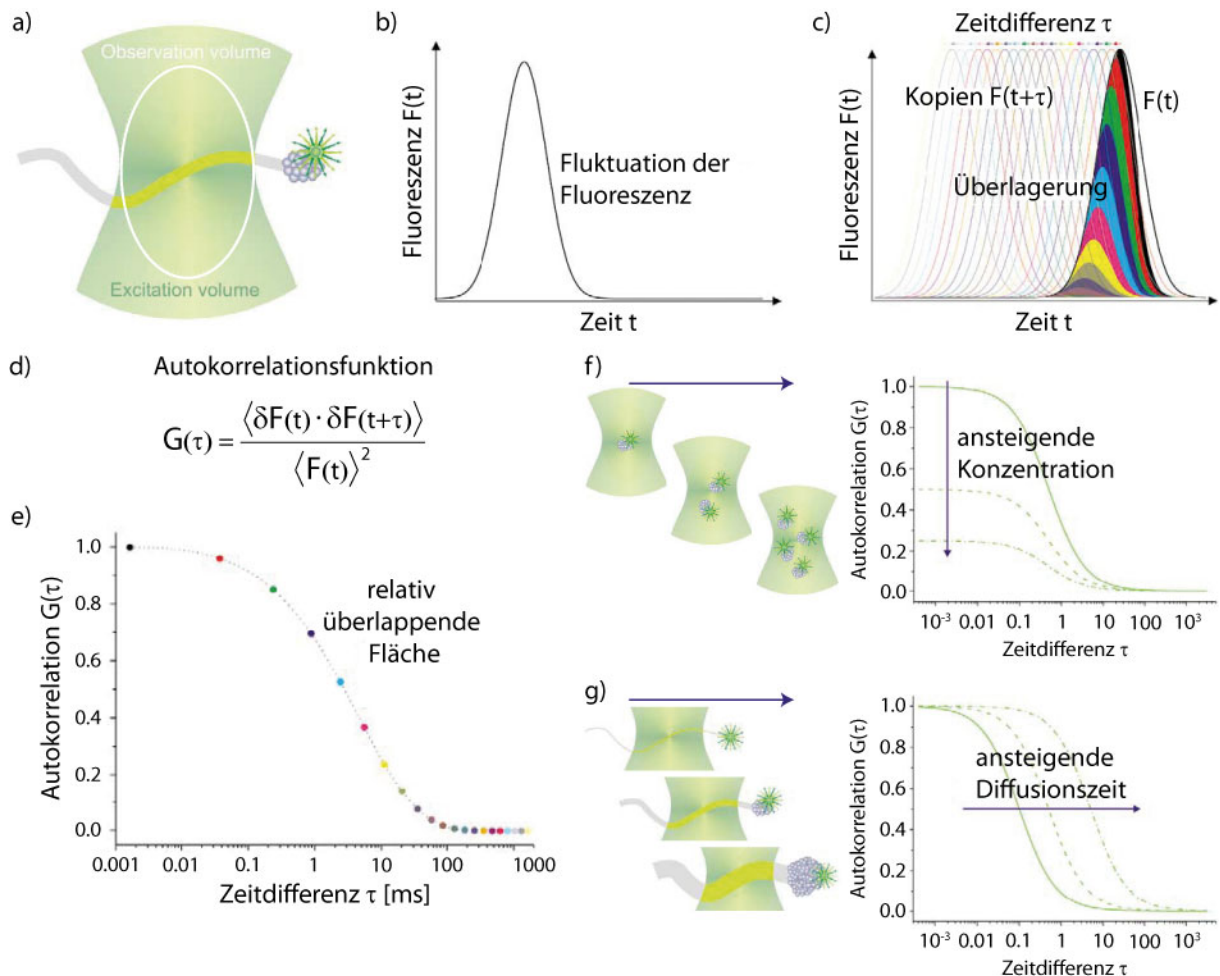


Abb. 15: Mittels Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie kann sowohl die Diffusionszeit als auch die Konzentration ermittelt werden. Fluoreszierende Moleküle, die sich durch das optisch definierte Detektionsvolumen bewegen (a), erzeugen eine geringe Fluktuation im detektierten Signal $F(t)$ (b). Durch Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie wird die Selbstähnlichkeit des Signals nach einer Zeitdifferenz τ bestimmt. (c) Zur Veranschaulichung wurden Kopien der beobachteten Fluktuation $F(t+\tau)$ relativ zum Originalsignal $F(t)$ um die Zeitdifferenz τ verschoben. Entsprechend der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ (d) werden $F(t)$ und $F(t+\tau)$ miteinander multipliziert. Die relativ überlappende Fläche ergibt den Autokorrelationswert für diese Zeitdifferenz τ (e). Die Zeit, bei der die Amplitude auf die Hälfte des Ausgangswerts abgefallen ist, gibt die mittlere Aufenthaltsdauer des fluoreszierenden Moleküls im Detektionsvolumen an und daraus lässt sich die Diffusionszeit berechnen. Bei steigender Konzentration (f) sinkt die Amplitude $G(0)$ proportional zur Teilchenzahl. Die Vergrößerung des Partikeldurchmessers (g) hingegen bewirkt durch eine längere Aufenthaltsdauer im Detektionsvolumen ein Anstieg der Diffusionszeit. Aus Hausteин & Schwille (2004).

Einer der bedeutenden Vorteile der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie ist der große dynamische Rahmen, der für Messungen zur Verfügung steht. Dadurch lassen sich aus FCS-Messungen nicht nur Aussagen über translatorische und rotatorische Diffusion, den aktiven Transport und den laminaren Fluss von Molekülen, sondern auch über chemische Reaktionen und intramolekulare Prozesse ableiten (Schwille & Hausteин, 2002).

2 Zielsetzung

Obwohl die Struktur des Kernporenkomplexes innerhalb der letzten Jahre eingehend untersucht wurde und zahlreiche molekulare Details beschrieben sind, werden die dynamischen Prozesse, die dem Kerntransport zugrunde liegen, kontrovers diskutiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zu entwickeln, die hochaufgelöste Einzelmolekülmessungen an intakten Kernporen erlaubt. Dabei ist die optische Rasternahfeldmikroskopie (SNOM) aufgrund ihrer hervorragenden Einzelmoleküldetektivität bei gleichzeitig sehr hoher lateraler Auflösung die Methode der Wahl. Die begrenzte Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bewirkt zusätzlich eine extrem hohe axiale Auflösung. Durch die erstmalige Kombination mit der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie soll ein leistungsstarkes Instrument zur Beobachtung von Einzelmolekülbewegungen geschaffen werden.

Dazu soll die Kernmembran aus Oozyten von *Xenopus laevis* freitragend präpariert und die Güte der Präparation sowohl mittels Fluoreszenz- als auch Rasterkraftmikroskopie verifiziert werden. Dieser Ansatz schließt die nahfeldoptische Abbildung der freistehenden Membran ein. Für die Analyse der Translokationsprozesse werden fluoreszent markierte Proteine eingesetzt, deren Funktionalität nach rekombinanter Expression und chromatographischer Aufreinigung *in vitro* bestätigt wurde. Bevor der Kerntransport von Effektoren der Wnt-Signalkaskade analysiert werden kann, soll die Funktionalität des neuartigen SNOM-FCS-Aufbaus anhand von Translokationsstudien des gut charakterisierten Transportrezeptors Ntf2 validiert werden. Dieser Ansatz würde Bewegungen innerhalb der Kernpore erstmals zeitlich hochaufgelöst zeigen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

Die folgende tabellarische Zusammenstellung enthält die im Rahmen dieser Arbeit für immunochemische Färbungen (IF) und Immun-Blot-Analysen (WB) eingesetzte Antikörper.

Tab. 1: Zusammenstellung der verwendeten primären und sekundären Antikörper

Primäre Antikörper	Antigen	Spezies	Verdünnung	Referenz
$\alpha\beta$ -Aktin	Klone AC-15 (DDDIAALVIDNGSGK)	Maus (monoklonal)	1:2 000 IF 1:10 000 WB	Sigma GmbH (Taufkirchen)
α Arp3	(CYEEIGPSIVRHNPVF GVMS)	Kaninchen (polyklonal)	unverdünnt	Welch et al., 1997
α BSA	Rinderserumalbumin	Kaninchen (polyklonal)	1:100 IF	Biomol GmbH (Hamburg)
α His ₅	fünf aufeinanderfolgende Histidine	Maus (monoklonal)	1:200 WB	Qiagen GmbH (Hilden)
α Lamin	Klon X223 <i>Xenopus</i> Lamin LII / LIII	Maus (monoklonal)	unverdünnt 1:20 WB	Höger et al., 1990
α Lef-1	Klon 5F12-111, Lef-1 (Domäne A und B)	Ratte (monoklonal)	1:10 WB	K. Mansperger (München)
mAb414	Zellkerne aus der Ratten- leber	Maus (monoklonal)	1:1 000 IF 1:5 000 WB	Covance (Ber- keley, USA)
α Nup153-C2	hNup153 (aa1375-1602) (C-Terminus)	Maus (monoklonal)	1:500 IF 1:500 WB	Fahrenkrog et al., 2002
α Nup153-Z	hNup153 (aa655-926) (Zinkfinger-Domäne)	Kaninchen (polyklonal)	1:1 000 IF 1:1 000 WB	Fahrenkrog et al., 2002
Sekundäre Antikörper	Antigen	Spezies	Verdünnung	Referenz
α -Kaninchen (GAR) Alexa Fluor [®] 532 Konjugat	IgG (H+L)	Ziege	1:100	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
α -Kaninchen (GAR) Alexa Fluor [®] 633 Konjugat	IgG (H+L)	Ziege	1:100	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
α -Kaninchen Meerrettich- peroxidase Konjugat	IgG + IgM (H+L)	Ziege	1:20 000	Dianova (Hamburg)
α -Maus (GAM) Alexa Fluor [®] 532 Konjugat	IgG (H+L)	Ziege	1:100	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
α -Maus (GAM) Alexa Fluor [®] 633 Konjugat	IgG (H+L)	Ziege	1:100	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
α -Maus Meerrettich- peroxidase Konjugat	IgG + IgM (H+L)	Ziege	1:20 000	Dianova (Hamburg)

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht explizit aufgeführten Reagenzien wurden über die folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka Chemie GmbH (Taufkirchen), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe) oder Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen).

Agarose für DNA Elektrophorese	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Alexa Fluor [®] 633 C ₅ maleimide	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Complete EDTA-frei Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Desoxyribonukleotide	Promega GmbH (Mannheim)
Dextran, Texas Red [®] (70 kDa)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
DiI C18(3)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Hellmanex [®] II	Hellma GmbH (Müllheim)
Kammerdeckglas, Lab-Tek [®]	Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden)
Latex Microparticles (Polystyrol)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Leibovitz's L-15 Medium	Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)
2-log DNA Marker	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main)
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH (Radolfzell)
NBT/BCIP	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Penicillin-Streptomycin	Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)
Phalloidin, Oregon Green [®] 488	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Precision Plus Protein [™] Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
SDS-PAGE Standard (broad range)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Su-8 5 Negativ-Fotolack	Micro Resist Technology GmbH, (Berlin)
Su-8 Entwickler	Micro Resist Technology GmbH, (Berlin)
Surgicryl USP 4/0 EP 1.5	Heiland Vet GmbH (Hamburg)
Sylgard [®] 184 Base Silicone Elastomer	Dow Corning Corp., (Michigan, USA)
Sylgard [®] 184 Curing Agent	Dow Corning Corp., (Michigan, USA)
TCEP	Merckbiosciences GmbH (Schwalbach)
Trypsin EDTA	Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)

3.1.3 Enzyme

Creatin-Phosphokinase	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
GoTaq [®] DNA-Polymerase	Promega GmbH (Mannheim)
Pfu turbo [®] DNA-Polymerase	Stratagene Europe (Amsterdam, NL)
Restriktionsendonukleasen	Promega GmbH (Mannheim)
Thrombin	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

3.1.4 Mikroorganismen und Zelllinien

Zur Permeabilisierung wurden murine Fibroblastenzellen (L-929, DSMZ Braunschweig) und zur Klonierung bzw. für die Expression rekombinanter Proteine die folgenden *E. coli* Stämme verwendet.

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> _B (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , (DE3)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RIL	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^f , <i>gal</i> , λ(DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> , [<i>argU ileY leuW</i> Camr]	Stratagene (Amsterdam, NL)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RIPL	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^f , <i>gal</i> , λ(DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> , [<i>argU proL</i> Camr] [<i>argU ileY leuW</i> Strep/Specr]	Stratagene (Amsterdam, NL)
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), [F ['] <i>traD36 proAB lacI</i> ^{qZ} ΔM15]	Promega GmbH (Mannheim)
<i>E. coli</i> M15	<i>NaIS</i> , <i>StrS</i> , <i>RifS</i> , <i>Thi</i> ⁻ , <i>Lac</i> ⁻ , <i>Ara</i> ⁺ , <i>Gal</i> ⁺ , <i>Mtl</i> ⁻ , <i>F</i> ⁻ , <i>RecA</i> ⁺ , <i>Uvr</i> ⁺ , <i>Lon</i> ⁺	Qiagen GmbH (Hilden)
<i>E. coli</i> Origami [™] B (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Kan ^R , Tet ^R)	Novagen [®] Merck KGaA (Darmstadt)
<i>E. coli</i> Rosetta [™] (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen [®] Merck KGaA (Darmstadt)
<i>E. coli</i> Rosetta gami [™] (DE3)	Δ(<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA PvuII phoR ara-D139 ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F' <i>[lac+ lacI^f pro]</i> <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE (Cam ^R , Kan ^R , Str ^R , Tet ^R)	Novagen [®] Merck KGaA (Darmstadt)
<i>E. coli</i> Rosetta gami [™] B (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE (Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R)	Novagen [®] Merck KGaA (Darmstadt)
<i>E. coli</i> SG13009	<i>NaIS</i> , <i>StrS</i> , <i>RifS</i> , <i>Thi</i> ⁻ , <i>Lac</i> ⁻ , <i>Ara</i> ⁺ , <i>Gal</i> ⁺ , <i>Mtl</i> ⁻ , <i>F</i> ⁻ , <i>RecA</i> ⁺ , <i>Uvr</i> ⁺ , <i>Lon</i> ⁺	Qiagen GmbH (Hilden)
<i>E. coli</i> Tg1	<i>supE</i> , <i>thi</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5(r _k ⁻ m _k ⁻) [F ['] <i>traD36 proAB lacI</i> ^{qZ} ΔM15]	Stratagene (Amsterdam, NL)

3.1.5 Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Plasmide zur Klonierung und zur Expression rekombinanter Proteine verwendet.

Tab. 3: Konstrukte zur Expression und Klonierung rekombinanter Fusionsproteine

Name	Spezies	Vektor	Tag	Referenz
GNG	SV-40	pGEX-5	GST	Marg et al., 2004
GST- β -Catenin	Murin	pGEX-4T1	GST	A. Menke (Ulm)
GST-Ntf-2	Human	pGEX-2T	GST	J-P. Siebrasse (Bonn)
GST-Ran	Human	pGEX-2T	GST	Plafker & Macara, 2000
Importin α 2	Maus	pET-21a	6x His	Radtke et al., 2001
Importin α 3	Human	pQE-60	6x His	Welch et al., 1999
Importin β 1	Human	pQE-60	5x His	Kutay et al., 1997
pGEM [®] -T	-	pGEM [®] -T	-	Promega GmbH (Mannheim)
pQE-30	-	pQE-30	6x His	Qiagen GmbH (Hilden)
pRSET A	-	pRSET A	6x His	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
XLef-1	<i>Xenopus</i>	pCS2	-	D. Gradl (Karlsruhe)
XTcf-1	<i>Xenopus</i>	pCS2+FLAG	FLAG	K. Mansperger (München)

Die Expressionsvektoren pQE-30 und pRSET unterscheiden sich nicht nur in der Anzahl der Kopien pro Bakterienzellen, sondern auch in der Steuerung des Expressionssystems.

Der aus der pDS-Plasmidfamilie stammende Vektor pQE-30 basiert auf dem T5-Promotor-Transkriptions-Translationssystem. Das optimierte Promotor-Operator Element (T5 + lacO) besteht aus dem Phage-T5-Promotor, der von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird, und zwei lac-Operatorsequenzen, die durch die erhöhte Bindungswahrscheinlichkeit des lac-Repressors die effiziente Repression des starken T5-Promotors sicherstellen. Daran schließt sich eine synthetische ribosomale Bindungsstelle für eine hohe Translationsrate an. Eine aus sechs Histidinen bestehende Affinitätsmarkierung (6xHis-tag) befindet sich 5' der zahlreichen Restriktionsschnittstellen für die Insertion eines DNA-Fragments. Die Transkription des klonierten Fusionskonstrukts wird durch zwei starke Terminatoren beendet. Zwischen den Terminatorsequenzen t_0 des Phagen λ und T1 des *rrnB*-Operons von *E. coli* befindet sich ein Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen, das aufgrund des fehlenden eigenen Promotors normalerweise nicht exprimiert wird. Das Plasmid, das in wenigen Kopien pro Bakterienzellen vorliegt, enthält den Replikationsursprung ColE1 und für die selektive Amplifikation ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR).

Die sehr hohe Transkriptionsrate des T5-Promotors wird durch das Doppeloperatorsystem in Kombination mit der konstitutiven Expression des *lac*-Repressors *in trans* kontrolliert. Das pREB4 Plasmid trägt neben dem *lacI*-Gen ein Kanamycin-Resistenzgen für die selektive bakterielle Amplifikation. Das p15A-Replikon sorgt für eine geringe Zahl des von pACYC abstammenden Helferplasmids in der Zelle.

Der Vektor pRSET besitzt den T7-Promotor, der im Phagen T7 die Expression des Gens 10 initiiert. Daran schließt sich das Translationsinitiationscodon ATG und eine aus sechs Histidinen bestehende Affinitätsmarkierung (6xHis-tag) an. Das Transkript wird durch eine 30 Basenpaare lange Sequenz aus dem bereits erwähnten Gen 10 stabilisiert. Für den immunologischen Nachweis des Fusionsproteins ist das aus acht Aminosäuren bestehende Xpress™ Epitop eingefügt, das zur Abtrennung des 31 Aminosäuren langen N-Terminus des Fusionsproteins die Erkennungssequenz einer Enterokinase beinhaltet. Die zahlreichen Restriktionsschnittstellen für die Insertion eines DNA-Fragments werden 3' von der T7-Terminatorsequenz begrenzt. Das Rückgrat des pRSET stammt aus dem Vektor pUC und enthält für die selektive bakterielle Amplifikation ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR). Das Plasmid trägt sowohl den Replikationsursprung f1 (f1 ori) für die Produktion einzelsträngiger Phagen-DNA und das Replikon (pUC ori) für die hohe Replikation und das Wachstum in *E. coli*.

3.1.6 Primer zur Klonierung rekombinanter DNA

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) in Auftrags-synthese hergestellt.

Klonierung von Lef-1 in den Vektor pRSET A

fwd 5'-CCTCTCGAGA TGCCTCAGCT CTCTGGAGCA-3'

rev 5'-GATTGT ACTCGAGTGA TCAGCAGCTG CCTCTGATGT AGGCAGCTGT CATTCT-3'

Klonierung von Lef-1 in den Vektor pQE-30

fwd 5'-CGGGGTACCA TGCCTCAGCT CTCTGGAGCA-3'

rev 5'-AGAATGACAG CTGCCTACAT CAGAGGCAGC TGCTGAGTCG ACGTCG-3'

Mutagenese von Lef-1 in pQE-30 und pRSET

fwd 5'-GTCTCCACCC ATTCCGCGGA CAAGCAACAA GGTCCCAGTG GTGCAG-3'

rev 5'-CTGCACCACT GGGACCTTGT TGCTTGTCCG CGGAATGGGT GGAGAC-3'

Klonierung von XTcf-1 in den Vektor pQE-30

fwd 5'-CGGGGTACCA TGCCCCAAAT GAACAGCGCC-3'

rev 5'-GACTGGTGCG GCCCATGCAG AGCCAGCTGC TAAGTCGACG TCG-3'

Plasmiddetektion in transformierten Bakterienzellen

Importin α 3	21 fwd	5'-GGACAACCAA CGGCTCAAG-3'
Importin α 3	481 rev	5'-GTGGCACAGC ATTGGACTG-3'
Importin β 1	28 fwd	5'-ACCGTGTCTC CCGATCGGCT GG-3'
Importin β 1	484 rev	5'-CCGATGGCTT CCAATGTCGA CTCC-3'
Lef-1	643 fwd	5'-CCACACCATA TGGTTTCTGG-3'
Lef-1	1119 rev	5'-CTGCACCACT GGGACCTTGT TGCTTGTCCG CGGAATGGGT GGAGAC-3'

3.1.7 Proteinreinigungssysteme

Benzamidine Sepharose™ 4 FF (high sub)	GE Healthcare Europe GmbH (München)
Spectra/Por® 1 Dialysemembrane	Spectrum Europe B.V. (DG Breda, NL)
Glutathione Sepharose™ 4 FF	GE Healthcare Europe GmbH (München)
GSTrap FF 1 ml	GE Healthcare Europe GmbH (München)
GSTrap HP 5 ml	GE Healthcare Europe GmbH (München)
HisTrap HP 1 ml	GE Healthcare Europe GmbH (München)
Mono Q 5/50 GL	GE Healthcare Europe GmbH (München)
NAP-5™	GE Healthcare Europe GmbH (München)
Ni ²⁺ -NTA Agarose	Qiagen GmbH (Hilden)
Slide-A-Lyzer Dialyse-Kassetten	Pierce Science Deutschland GmbH (Bonn)
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare Europe GmbH (München)
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Europe GmbH (München)
Vivaspin-Säulen	Sartorius AG (Göttingen)

3.1.8 Reagenziensysteme

Alexa Fluor® 532 Antibody Labeling Kit	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Alexa Fluor® 633 Protein Labeling Kit	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare Europe GmbH (München)
HMW Gel Filtration Calibration Kit	GE Healthcare Europe GmbH (München)
LMW Gel Filtration Calibration Kit	GE Healthcare Europe GmbH (München)
Qdot® Antibody Conjugation Kit	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega GmbH (Mannheim)
Wizard® Plus SV Minipreps	Promega GmbH (Mannheim)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH (Mannheim)

3.1.9 Geräte

Dokumentation Agarosegele	Gel Max, Intas GmbH (Göttingen)
Dokumentation Western Blot mit Software	Diana II, Raytest GmbH (Straubenhardt) Aida Image Analyzer V3.40, Raytest GmbH (Straubenhardt)
Fast Protein Liquid Chroma- tography (FPLC)	BioLogic HR mit Fraktionssammler Modell 2118, Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Flachbettgelelektrophorese	Hoefer™ HE 33, Amersham Biosciences (Freiburg)
Fluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera und Software	DMIRE2, Leica Microsystems AG (Bensheim) C4742-95-12 ERG, Hamamatsu GmbH (Herrsching) Openlab 4.0.3, Openlab (Heidelberg)
Fokussierter Ionenstrahl	1540 EsB CrossBeam, Carl Zeiss SMT AG (Oberkochen)
Gewebehomogenisator	Ultra Turrax T8, IKL Labortechnik GmbH (Staufen)
Konfokales Laserscanning Mikroskop	LSM 510 Meta, Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen)
Nahfeldoptischer Aufbau:	
Inverses Mikroskop	Eclipse TE2000-U, Nikon GmbH (Düsseldorf)
Digitalkamera	Digital Sight DS-2MBW, Nikon GmbH (Düsseldorf)
XYZ-beweglicher Tisch	P-517.3CL, Physik Instruments GmbH (Karlsruhe)
CCD-Kamera	CCD Fingerkamera, Conrad Elektronik SE (Hirschau)
Avalanche Photodiode	SPCM-AQR-14, Lasercomponents GmbH (Olching)
Laser	633 nm Helium-Neon-Laser 31-2108-000, Coherent (Dieburg) 532 nm Millennia V S/N 1502, Spectra-Physics Laser Inc. (Cal, USA)
Computer mit Zählerkarte	FAST 7882 und 16Bit-Digital/Analog-Wandlerkarte Acquetek PA-DA16ERMA, Electronic GmbH
Software	WSxM 4.0, Nanotec Electronica S.L. (Madrid, Spanien)
FCS	TimeHarp200 PC Karte, PicoQuant GmbH (Berlin) mit Korrelations- und Analysesoftware von PD Dr. A. Naber
PCR-Cycler	iCycler, Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Rasterkraftmikroskop	Nano Wizard® II BioAFM, JPK Instruments AG (Berlin) montiert auf AxioObserver A1, Carl Zeiss GmbH (Göttingen)
Rotationsbeschichter	WS-400A-6NPP/LITE, Laurell Inc. (North Wales, USA)
Schüttelinkubator	Orbital Shaker, Thermo Forma Inc. (Marietta, USA)
SDS-PAGE-Zubehör	Mini Protean II™, Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Stereomikroskop	Leica S6E mit L2, Leica Microsystems AG (Bensheim)

Tank Blot-Apparatur	Mini Trans Blot, Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Tischzentrifugen	Biofuge fresco, Kendro GmbH (Rodenbach) Centrifuge 5415R, Eppendorf AG (Hamburg) Multifuge 3S-R, Kendro GmbH (Rodenbach)
Ultraschallbad	Sonorex RK 100H, Bandelin electronic GmbH (Berlin)
Ultrazentrifugen	Sorvall Discovery M120 SE mit Festwinkelrotor S80-AT3, Kendro GmbH, Rodenbach Beckman Avanti J-30 I mit Festwinkelrotor JA 30.50Ti, Beckman Coulter GmbH (Krefeld)
UV-Lampe	UVAHAND 250, Dr. Hönle AG (Gräfelfing)
UV/VIS Spektralphotometer	Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences (Freiburg) mit Ultra-Mikro-Küvette 105.200-QS, Hellma GmbH (Müllheim)
Zellaufschlussgeräte	EmulsiFlex C3, Avestin Europe GmbH (Mannheim) Sonoplus HD 2070 mit Stufenhorn SH 70G und Sonotrode MS72, Bandelin electronic GmbH (Berlin)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und Aqua bidest. angesetzt. Bei der Verwendung von nicht autoklavierbaren Chemikalien wie z.B. Methanol bzw. Glukose werden die Lösungen durch Sterilfiltration (\emptyset 0.2 μ m) entkeimt.

- Antibiotikum-Stammlösungen (1 000x)
Ampicillin-Stammlösung: 50 mg Ampicillin pro ml a.bidest., bei -20°C lagern.
Kanamycin-Stammlösung: 30 mg Kanamycin pro ml a.bidest., bei -20°C lagern.
- Hogness-Einfriermedium
132 mM KH_2PO_4 , 362 mM K_2HPO_4 , 13.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.2 mM Na-Zitrat,
4.77 M Glycerin, autoklavieren, 4 mM MgSO_4 zugeben.
- 6x Ladepuffer für DNA-Auftrennung
0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol, 36% (v/v) Glycerin, 29.7 mM
Tris pH 7.6, bei 4°C lagern.
- $\text{LB}_{\text{Amp/Kana}}$ -Agar-Platten
1.5% (w/v) Select Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren; nach Abkühlen auf 55°C
1 ml der gewünschten Antibiotikum-Stammlösung pro Liter zugeben und in Petrischalen
(\emptyset 9.4 cm) gießen; die erkalteten Platten werden kopfüber bei 4°C gelagert.

- **LB (Luria Bertani)-Medium**
1% (w/v) Baktotrypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7.0.
- **LB_{Amp/Kana}-Medium**
1 ml der gewünschten Antibiotikum-Stammlösung pro Liter LB-Medium.
- **SOC-Medium**
2% (w/v) Baktotrypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 0.05% (w/v) NaCl, pH 7.0, autoklavieren, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose zugeben und sterilfiltrieren.
- **TAE-Puffer**
40 mM Tris-Acetat pH 8.3, 1 mM EDTA.
- **TFB1**
100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 5.8 mit Essigsäure einstellen und sterilfiltrieren.
- **TFB2**
100 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin, pH 6.8 mit KOH einstellen und sterilfiltrieren.

3.2.2 Restriktionsanalyse von DNA

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen und durchtrennen den DNA-Doppelstrang entweder glatt oder mit überhängenden Enden.

Für die Restriktionsanalyse werden 3 U Restriktionsendonuklease pro µg DNA und ein Zehntel Volumen des entsprechenden 10fach konzentrierten Puffers über Nacht in einem Ansatzvolumen von 20 µl bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert.

3.2.3 Analytische Flachbettgelelektrophorese

DNA-Fragmente wandern unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes proportional ihrer Größe durch die Agarosematrix. Je kleiner ein Molekül ist, desto schneller kommt es voran.

Für ein Flachbettgel werden 1.5% (w/v) Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach kurzer Abkühlung mit 0.01 µl Ethidiumbromid pro ml versetzt. Sobald die Suspension eine Temperatur von etwa 50°C erreicht hat, wird sie in die vorbereitete Form gegossen. Nach Aushärtung werden die mit Ladepuffer versetzten Proben in die Geltaschen gegeben und durch Anlegen einer Gleichspannung von 80 bis 120 V aufgetrennt, bis die Laufmittelfront die gewünschte Position erreicht hat. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und emittiert nach UV-Anregung, so dass das durch die Auftrennung entstandene Bandenmuster dokumentiert werden kann.

Die Größenordnung der DNA-Banden erfolgt durch den Laufstreckenvergleich mit einem parallel auf dem Gel aufgetrennten DNA-Standard-Größenmarker. In der vorliegenden Arbeit wurde der 2-log DNA-Marker der Firma New England Biolabs verwendet.

3.2.4 Präparative Flachbettgelelektrophorese

Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente können unter UV-Licht mit einem Skalpell aus der Matrix herausgeschnitten werden. Die DNA wird anschließend mittels eines Kits (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Dazu wird das Agarosestück zehn Minuten lang bei 50-65°C im selben Volumen Membranbindungslösung geschmolzen (100 mg Agarose ~100 µl). Dieser Puffer enthält chaotrope Salze, die die Struktur von Wasser modifizieren, und senkt den pH-Wert, so dass die DNA-Fragmente im nächsten Schritt an eine Silika-Gel-Membran adsorbieren können. Verunreinigungen wie Agarose, Ethidiumbromid und Farbstoffe fließen während der einminütigen Zentrifugation bei 16 000 g durch die Matrix. Die Salze werden mit 700 µl ethanolhaltiger Membranwaschlösung ausgewaschen und das noch in der Matrix vorhandene Ethanol durch eine zweite einminütige Zentrifugation entfernt. Die DNA-Fragmente werden mit 40 µl sterilem a.bidest. aus der Membran eluiert.

3.2.5 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR

Eine zwischen zwei flankierenden Primern liegende DNA-Sequenz kann mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) exponentiell amplifiziert werden. Dazu stehen verschiedene hitzestabile DNA-Polymerasen zur Verfügung. Die *Taq*-Polymerase arbeitet schnell, besitzt aber eine Fehlerrate von 1×10^{-5} Fehler pro Base (Herstellerangabe) und wird deshalb in der analytischen PCR eingesetzt. Die Pfu turbo[®] DNA-Polymerase arbeitet aufgrund ihrer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität langsamer, aber mit einer dreizehnfach höheren Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase (Herstellerangabe) und wurde in der vorliegenden Arbeit für Klonierungen verwendet.

Für 50 µl Ansatzvolumen werden 5 µl 10x PCR Puffer, 0.2 mM dNTPs, die beiden Primer je 0.25 µM, 50 ng DNA-Matrize und 2.5 U Pfu turbo[®] DNA-Polymerase auf Eis in ein 0.2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit einem spezifischen Programm amplifiziert. Zu Programmbeginn wird der Ansatz zwei Minuten lang bei 94°C inkubiert. In jedem Programmzyklus wird die DNA-Matrize zuerst für 30 Sekunden bei 94°C denaturiert, dann folgt eine halbe Minute bei 55°C für die Primerbindung und anschließend die Elongation bei 70°C, deren Dauer, beginnend bei einer Minute, in 40-Sekundenschritten auf sieben Minuten gesteigert

wird. Die Gesamtzyklenzahl beträgt 36. Anschließend wird der Ansatz noch weitere sieben Minuten bei 70°C inkubiert und auf 4°C gekühlt.

3.2.6 Sequenzspezifische Mutagenese

Über die Primer können auch sequenzspezifische Veränderungen mittels PCR in eine DNA-Sequenz eingefügt werden. Dabei sind neben einem Basenaustausch auch kleinere Deletionen oder Insertionen möglich. Die Primer werden so konzipiert, dass die Mutation mittig liegt. Die Amplifikation erfolgt durch die Pfu turbo[®] DNA-Polymerase. Das bakterielle, methylierte Matrizenplasmid wird nach der Amplifikation durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* spezifisch abgebaut. Das nicht-methylierte Amplifikat ist vor dem Verdau durch *Dpn I* geschützt.

Alle Schritte werden nach dem Protokoll des QuikChange[®] Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. In einem Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl werden 100 ng DNA-Matrize, je 100 ng der beiden Primer, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, 2,5 M dNTPs und 2,5 U *Pfu* DNA-Polymerase auf Eis gemischt. Der Ansatz wird zunächst eine Minute bei 94°C inkubiert.

Die PCR beinhaltet 20 Zyklen, bestehend aus einer Minute Denaturierung bei 94°C, einer Minute Primerbindung bei 55°C und zwölf Minuten Elongation bei 65°C. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf 14°C abgekühlt und eine Stunde lang mit 10 U *Dpn I* bei 37°C verdaut.

3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der enzymatischen Ligation von DNA-Fragmenten werden die Phosphatbrücken in der DNA enzymatisch geschlossen.

Für die Ligation werden in einem 10 µl Ansatz 7,5 ng Vektor, das einzufügende DNA-Fragment im dreifachen molaren Überschuss und 1 µl 10x T4 Ligationspuffer verwendet. Die Ligation wird durch Zugabe von 3 Einheiten T4 DNA-Ligase gestartet und erfolgt bei 14°C über Nacht.

3.2.8 Herstellung und Transformation chemokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemokompetenter Bakterien wird eine Flüssigkultur von 10 ml LB-Medium mit einigen Zellen des gewünschten *E. coli*-Stamms mittels einer sterilen Pipettenspitze inokuliert. Aus dieser Übernachtskultur wird eine Primärkultur von 1 l auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium angeimpft und bei 37°C so lange geschüttelt, bis sie eine optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,5–0,8 erreicht hat. Die Bakterienkultur wird fünf Minuten auf Eis gekühlt und dann fünf Minuten bei 4000 g kalt sedimentiert. Anschließend werden die Bakterien

in 1/25 des Ausgangsvolumens kaltem TFB1 resuspendiert und 60-90 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer fünfminütigen kalten Zentrifugation bei 4000 g wird das Bakteriensediment in 1/250 des Ausgangsvolumens eiskaltem TFB2 gelöst. Die Bakteriensuspension wird zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die chemokompetenten Bakterien sind bei -80°C ungefähr 6 Monate haltbar.

Für die Transformation chemokompetenter Bakterien werden 1 µl Plasmid-DNA, 3 µl des *Dpn I* verdauten Mutageneseansatzes oder 2-5 µl Ligationsansatz mit der Bakteriensuspension vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die positiv geladenen Calcium-Ionen komplexieren mit der negativ geladenen DNA und den Lipopolysacchariden der Bakterienmembran. Durch den sich anschließenden 45 Sekunden langen Hitzeschock werden die Kalzium-DNA-Komplexe in die Bakterienzellen aufgenommen. Zur Regeneration der Membran werden die Zellen für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden die Bakterien mit 900 µl SOC-Medium für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler bei 225 rpm inkubiert. Anschließend werden je nach Anzahl der zu erwartenden Kolonien 100-200 µl auf $\text{LB}_{\text{Amp/Kana}}$ -Agar-Platten ausgestrichen bzw. in eine Flüssigkultur gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.9 Anlegen von Bakteriendauerkulturen

Dauerkulturen werden angelegt, indem 900 µl einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Bakterienkultur mit 100 µl Hogness-Einfriermedium versetzt und durchmischt werden. Die Bakterien können bei -80°C über mehrere Jahre konserviert werden.

3.2.10 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA im Klein- und Mittelmaßstab

Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA nach selektiver Fällung chromosomaler DNA an eine Affinitätsmatrix adsorbiert, wodurch DNA hohen Reinheitsgrades gewonnen wird.

Für die Isolierung im Kleinmaßstab genügt eine 2 ml LB_{AMP} -Übernachtskultur aus *E. coli*-Zellen, die mit rekombinanten Plasmiden transformiert wurden. Die Bakterien werden bei 17 900 g eine Minute lang abzentrifugiert und in 250 µl Zellresuspensionslösung gelöst. Die alkalische Lyse erfolgt durch Zugabe von 250 µl NaOH-SDS-haltiger Zelllyse-Lösung. SDS löst die Phospholipide und Membranproteine; NaOH denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA bzw. Proteine. Nach fünf Minuten wird 10 µl alkalische Protease-Lösung zugegeben und abermals für fünf Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 350 µl der hochsalzhaltigen Neutralisationslösung gestoppt. Die hohe Salzkonzentration der Lösung lässt KDS (Kaliumdodecylsulfat) präzipitieren und mit denaturierten Proteinen, zellwandgebundener chromosomaler DNA und Zelltrümmern Komplexe bilden. Die kleinere ringförmige Plasmid-DNA renaturiert und bleibt in Lösung. Der anschließende Zentrifugationsschritt

trennt die Präzipitate ab. Nach der Adsorption an die Silika-Membran wird die Plasmid-DNA zweimal mit 750 µl bzw. 250 µl ethanolhaltiger Säulenwaschlösung gereinigt. Dadurch werden die chaotropen Salze, die die Elution unterbinden, entfernt und die Plasmid-DNA mit 40 µl sterilem a.bidest. eluiert.

Bei der Isolierung im Mittelmaßstab erfolgen Resuspension, Lysis und Neutralisation entsprechend der Isolierung im Kleinmaßstab in größeren Volumina. Die Behandlung mit alkalischer Protease-Lösung entfällt. Stattdessen werden bakterielle Endotoxine durch einen zusätzlichen Waschschrift entfernt. Die Elution erfolgt mit 600 µl sterilem a.bidest..

3.2.11 Fällung und Reinigung von DNA

Für die Fällung von Nukleinsäuren wird die Lösung mit einem Zehntel ihres Volumens 3 M Natriumacetat pH 5.2 sowie zwei Volumina absolutem Ethanol gemischt. Anschließend wird die Lösung eine Stunde bei -80°C oder über Nacht bei -20°C gelagert. Die präzipitierten Nukleinsäuren werden bei 4°C während 20 Minuten bei 20 000 g sedimentiert. Das Präzipitat wird mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und bei 42°C getrocknet.

Alternativ zur Fällung mit Ethanol kann man auch Isopropanol verwenden. Dabei werden der Lösung 0.7 Volumen Isopropanol zugegeben. Das Präzipitat wird ebenfalls mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen.

Bei der Reinigung durch Phenolextraktion werden die Nukleinsäuren in wässriger Lösung mit 0.5 Volumen Phenol pH 7.8 versetzt, ausgeschüttelt und zur Phasentrennung fünf Minuten bei 20 000 g zentrifugiert. Ein Großteil der Proteine wird dadurch gefällt und erscheint in der unteren, organischen Phase. Eine anschließende Extraktion mit 0.5 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entzieht der wässrigen Lösung Phenolreste.

3.2.12 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann geschätzt werden, indem man nach einer Flachbettgelelektrophorese die Intensität der Probenbanden mit der des DNA-Größenmarkers vergleicht.

Für eine genaue Bestimmung wird aus der Absorption einer Lösung die DNA-Konzentration und -Reinheit errechnet (photometrische Konzentrationsbestimmung). Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, das der Proteine bei 280 nm. Aus einer OD_{260} von 1.0 errechnet sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA bzw. RNA 40 µg/ml. Aus dem Quotient der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm wird die Reinheit errechnet. Für eine saubere Nukleinsäurelösung bewegt sich der Teiler zwischen 1.6 und 2.0.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und Aqua bi-dest. angesetzt. Bei der Verwendung von nicht autoklavierbaren Chemikalien, wie z.B. Methanol bzw. Glukose, werden die Lösungen durch Sterilfiltration (\varnothing 0.2 μm) entkeimt. In der Chromatographie eingesetzte Puffer und Lösungen werden vor der Verwendung durch eine 15 Minuten lange Ultraschallbehandlung entgast.

- Coomassie-Entfärbungslösung
45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure.
- Coomassie-Färbungslösung
10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.4% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R 250.
- Elektrophorese-Laufpuffer
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS.
- Gelfiltrationspuffer GPC1
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 5% (v/v) Glycerin.
- Gelfiltrationspuffer GPC2
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl.
- GST-Aktivitätstestmix (2x)
200 mM KH_2PO_4 pH 6.3, 2 mM Glutathion, 2 mM 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB).
- GST-Aufschlusspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 4 mM β -Mercaptoethanol.
- GST-Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM Glutathion.
- IEX-Startpuffer
50 mM Tris-HCl pH 7.5.
- IEX-Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl.
- Importin α 2-Aufschlusspuffer
50 mM NaPO_4 pH 7.3, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol.
- Importin α 2-Elutionspuffer
50 mM NaPO_4 pH 7.3, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol.
- Importin β 1-Aufschlusspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 4 mM β -Mercaptoethanol.

- Importin β 1-Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 500 mM Imidazol.
- Importin β 1-Übernachtskultur
2 YT_{Amp+Kana}, 2% (w/v) Glucose.
- Importin β 1-Hauptkultur 1
2 YT_{Amp+Kana}, 0.2% (w/v) Glucose.
- Importin β 1-Hauptkultur 2
LB_{Amp+Kana}, 0.2% (w/v) Glucose, 4% (v/v) Ethanol, 1mM IPTG.
- PBS
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.5.
- Ponceau-Färbungslösung
0.5% (v/v) Ponceau S, 1% (v/v) Essigsäure.
- RLE-Aufschlusspuffer
50 mM Hepes, 165 mM KOH, 2 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, pH 7.55.
- RLE-Dialysepuffer
250 mM Hepes, 500 mM KCl, 10 mM DTT, pH 7.2.
- 5x SDS-Ladepuffer
156 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% (w/v) SDS, 25% (v/v) Glycerin, 12,5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0.2% (w/v) Bromphenolblau.
- 5x SDS-Ladepuffer (nicht-reduzierend)
156 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% (w/v) SDS, 25% (v/v) Glycerin, 0.2% (w/v) Bromphenolblau.
- Silberfärbungslösung 1
50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Eisessig.
- Silberfärbungslösung 2
10% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Eisessig.
- Silberfärbungslösung 3
236 μ M Na₂B₄O₇, 4% (v/v) Glutaraldehyd.
- Silberfärbungslösung F
SF-F1 (0.3 g AgNO₃ in 10 ml a.bidest.) tropfenweise zu SF-F2 (950 μ l 1M NaOH und 750 μ l Ammoniak (32%) in 20 ml a.bidest.) geben und auf 50 ml mit a.bidest. auffüllen.
Trübung durch weitere Ammoniakzugabe lösen.
- Silberreduktionslösung
10% (v/v) Ethanol, 0.25% (v/v) Formalin, 0.3 mM Zitronensäure.

- TBS
50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl.
- TBST
TBS, 0.1% (v/v) Tween 20.
- Transferpuffer
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Methanol.
- 2YT-Medium
1.6% (w/v) Baktotrypton, 1.0% (w/v) Hefeextrakt, 0.5% (w/v) NaCl, pH 7.2.
- 2YT_{Amp/Kana}-Medium
1 ml der gewünschten Antibiotikum-Stammlösung pro Liter 2YT-Medium.

3.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Proteine besitzen aufgrund ihrer Mischung an geladenen Aminosäuren eine positive oder negative Nettoladung. In einem elektrischen Feld werden sie abhängig von ihrer Nettoladung, ihrer Größe und ihrer Gestalt aufgetrennt. Durch Zugabe des starken, negativ geladenen Detergenz SDS und einer reduzierenden Substanz wie β -Mercaptoethanol werden die Proteine zu gestreckten Polypeptidketten entfaltet. Die unpolaren Seitenketten des SDS maskieren die hydrophoben Seitenketten. SDS bindet Proteine in einem Massenverhältnis von 1.4:1, so dass das Protein eine negative Gesamtladung erhält, die der Größe proportional ist. Die Ladungsdichte ist bei kleinen und großen Polypeptidketten gleich; demzufolge werden sie in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt.

Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel für die Separation. Das Sammelgel ist geringer vernetzt und leicht sauer. Die Proteinbande im Sammelgel wird von den im elektrischen Feld schneller wandernden Chloridionen und dem langsameren Glycin eingerahmt. Dazwischen bildet sich eine Zone geringerer Leitfähigkeit mit einem steilen Spannungsgradienten, in der sich die Proteine befinden. Am Übergang zum basischen Trenngel werden die Glycinmoleküle ionisiert. Infolgedessen wandern sie durch die dicht gepackten Proteine, um im Anschluss an die Chloridionen das Trenngel zu passieren. Vom Glycindruck befreit, werden die Proteine dann der Größe nach aufgetrennt. Das Proteinbandenmuster des Trenngels wird durch Anfärbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht.

Das für den gewünschten Trennbereich entsprechende Trenngel wird entsprechend Tab. 4 angesetzt und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und 10% (w/v) Ammoniumper-sulfat gestartet. Dieser Ansatz wird bis auf 3/4 Höhe zwischen zwei in einer Gelapparatur eingespannte, acetongereinigte Glasplatten gegossen und mit a.bidest überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Wasser entfernt und das 5%ige Sammelgel aus 500 μ l

Tab. 4: Trennbereich und Pipettierschema der verwendeten Trenngele

	8%	10%	12%	15%
Trennbereich in kDa	40-100	20-70	20-60	10-40
a.bidest.	2.3 ml	1.9 ml	1.6 ml	1.1 ml
29.22% (w/v) Acrylamid, 0.78% (w/v) Bisacrylamid	1.3 ml	1.7 ml	2.0 ml	2.5 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml
10% (w/v) SDS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	3 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l

29.22% (w/v) Acrylamid, 0.78% (w/v) Bisacrylamid, 30 μ l 10% (w/v) SDS, 380 μ l 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 und 2.1 ml a.bidest. angesetzt. Für die Polymerisation werden 30 μ l TEMED und 3 μ l 10% (w/v) Ammoniumpersulfat zugegeben und das noch flüssige Sammelgel bis zur oberen Glaskante der Gelapparatur eingefüllt, wobei zur Ausbildung der Ladetaschen ein Kamm an deren Oberkante eingesetzt wird. Nach Aushärtung wird der Kamm entfernt und die Ladetaschen gründlich mit Laufpuffer gespült. Das einsatzbereite Gel wird mit den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt, welche man mit Elektrophorese-Laufpuffer flutet.

Die Proteinproben werden mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und für fünf Minuten bei 94°C denaturiert, bevor sie in die Geltaschen geladen werden. Die Elektrophorese wird durch Anlegen einer Spannung von 60 V gestartet. Nachdem die Proben in das Trenngel eingedrungen sind, wird die Spannung auf 120 V verdoppelt. Sobald die Bromphenolblaufront das Gelende erreicht hat, wird die Auftrennung gestoppt und das Polyacrylamidgel vorsichtig aus den Glasplatten befreit. Das Sammelgel wird verworfen. Das Trenngel kann für eine Immun-Blot Analyse verwendet oder durch Coomassie bzw. Silberionen gefärbt werden.

3.3.3 Detektion aufgetrennter Proteine

Coomassie-Brilliant-Blau (CCB) lagert sich als Triphenylmethan-Farbstoff an die basischen Seitenketten an. Die Nachweisgrenze einer Coomassiefärbung liegt bei 0.1 μ g Protein pro Bande. Die Färbung des Proteinrückgrats mit Silberionen ist dagegen hundertfach sensitiver und eignet sich damit besonders zur Reinheitsbestimmung einer Proteinaufreinigung. Allerdings ist diese zeitaufwendige Prozedur schwer reproduzierbar und färbt auch Nukleinsäuren und Lipide an.

Das Trenngel wird 30-60 Minuten lang in Coomassie-Färbungslösung gefärbt. Danach wird es zweimal ca. 20 Minuten lang in der Coomassie-Entfärbungslösung gewaschen. Soll-

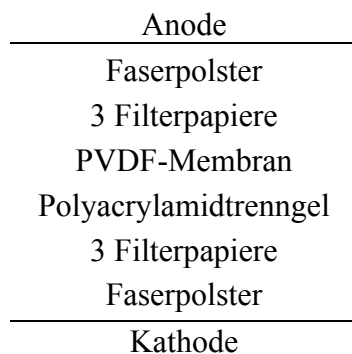
ten die Banden dann noch nicht deutlich sichtbar sein, kann der Vorgang verlängert bzw. wiederholt werden. Das Polyacrylamidgel wird zwischen zwei Cellophan-Papieren getrocknet und mittels eines Flachbettscanners digitalisiert.

Für die Silberfärbung können bereits CBB-gefärbte Gele verwendet werden. Das Trenngel wird über Nacht in der Silberfärbungslösung 1 fixiert. Anschließend wird es jeweils 20 Minuten lang in Silberfärbungslösung 2 geschüttelt, in a.dest. gewaschen und in Silberfärbungslösung 3 fixiert. Dann wird es dreimal je 20 Minuten lang in a.dest. gewaschen und im Dunkeln für 20 Minuten in der Silberfärbungslösung F geschüttelt. Nach vier einminütigen Waschschritten in a.dest. werden unter Sichtkontrolle die an die Proteine gebundenen Silberionen in der Silberreduktionslösung durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Wenn die Proteinbanden ausreichend stark gefärbt sind, wird die Entwicklung mit einer 7%igen Essigsäurelösung gestoppt. Anschließend wird das Polyacrylamidgel zweimal jeweils 20 Minuten lang in a.dest. gewaschen, zwischen zwei Cellophan-Papieren getrocknet und mittels eines Flachbettscanners digitalisiert.

3.3.4 Detektion immobilisierter Proteine (Immun-Blot)

Für den immunologischen Nachweis werden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine quantitativ auf eine PVDF-Membran transferiert und detektiert.

Es werden sechs 3 MM Filterpapierstücke und die PVDF-Membran in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere werden zusammen mit den beiden Faserpolstern ungefähr fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wird zunächst durch 10 Sekunden langes Schwenken in Methanol aktiviert, danach für fünf Minuten in a.dest. gewaschen und anschließend doppelt so lange in Transferpuffer äquilibriert. Diese Bestandteile werden wie in der nachfolgenden Darstellung luftblasenfrei zu einem Sandwich übereinander gelegt und in die mit Eis gekühlte Blotapparatur eingesetzt:



Der Transfer erfolgt für eine Stunde bei einer Spannung von 111 V. Danach wird die PVDF-Membran für fünf Minuten in der Ponceau-Färbungslösung inkubiert und vorsichtig mit a.dest. gewaschen, bis die Proteinbanden des Molekulargewichtsmarkers markiert werden

können. In der vorliegenden Arbeit wurden der Proteinstandard SDS-6H2 der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH mit Banden bei 29, 45, 66, 97.4, 116 und 200 kDa und der Precision Plus Protein™ Standards der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH mit Banden bei 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa verwendet.

Die freien Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran werden durch 30-minütige Inkubation mit 10% (w/v) Magermilchpulver in TBS blockiert. Anschließend wird die Membran dreimal zehn Minuten lang mit TBST gewaschen und mit dem entsprechend in TBS verdünnten primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

Der primäre Antikörper wird bei -20°C gelagert und kann je nach Art bis zu sechsmal verwendet werden. Die PVDF-Membran wird dreimal zehnminütig mit TBST gewaschen, mit dem entsprechend in TBS verdünnten Sekundäantikörper (Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Kaninchen, beide 1:20 000) zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert und abermals dreimal für je zehn Minuten in TBST gewaschen.

Der Proteinnachweis erfolgt über eine chemilumineszente Reaktion, die von der an den Sekundäantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Dazu werden die Lösungen A und B des ECL+plus Western Blotting Detection System im Verhältnis 40:1 gemischt, auf die PVDF-Membran gegeben und die Chemilumineszenz mit der CCD-Kamera der DIANA II aufgenommen.

3.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration wird abhängig von der Lösungsart auf zwei unterschiedliche Methoden bestimmt. Für bakterielle Rohextrakte und Proteinlösungen geringer Reinheit wird das Verfahren nach Bradford (1976) verwendet. Die Konzentration reiner Proteinlösungen dagegen wird spektrophotometrisch gemessen. Alternativ zur Bradford'schen Methode wird die Konzentration von GST-Fusionsproteinen im Rohextrakt rasch und sicher über die Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivität bestimmt (Habig & Jakoby, 1981).

Die Methode nach Bradford basiert darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Triphenylmethan-Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250 nach der Bindung an Proteine von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Der Farbstoff bildet in saurer Lösung sowohl mit den basischen als auch mit den unpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Dadurch wird die blaue, unprotonierte Sulfatform mit dem Absorptionsmaximum von 595 nm stabilisiert. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes bei dieser Wellenlänge sehr viel höher ist als der des freien Farbstoffs, kann die Absorptionzunahme durch die Komplexbildung mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens photometrisch gemessen werden. Weil das Ausmaß der Farbreaktion zwischen unterschiedlichen Proteinen

variiert, verwendet man idealerweise eine aus dem zu bestimmenden Protein bestehende Kalibrationslösung. Wenn das Zielprotein nicht zur Verfügung steht oder wenn die Konzentration von Proteingemischen bestimmt werden soll, werden Standardproteine wie Rinderserumalbumin (BSA) oder Immunglobulin G eingesetzt. Da das Testergebnis nicht nur von der Proteinmenge, sondern auch von der Zusammensetzung des Proteingemischs abhängt, ist diese Methode nur semi-quantitativ. Der Nachweisbereich im Mikrottest liegt bei 1-20 µg Protein/ml. Freie Aminosäuren, Peptide (z.B. Glutathion) oder Proteine unter 3 kDa sind nicht nachweisbar. Starke Laugen, Reduktionsmittel und Detergenzien stören die Farbreaktion.

Für die Messung werden 800 µl der zu bestimmenden Proteinlösung in einer geeigneten Verdünnung mit 200 µl fünffach konzentriertem Protein Assay Farbstoff-Konzentrat vermischt und nach 15 Minuten die Absorption bei 595 nm in einer Polystyroleinwegküvette gemessen. Um Farbstoffaggregate zu dispergieren, wird das Reaktionskonzentrat zuvor mehrmals sanft invertiert und der Reaktionsansatz vor der Messung kurz durchgewirbelt. Als Standard wird eine Konzentrationsreihe mit BSA (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25 µg) parallel gemessen. Über diese nicht-lineare Eichkurve wird die Konzentration der untersuchten Probe errechnet. Für alle Werte wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Konzentration reiner Proteinlösungen lässt sich bei bekanntem Extinktionskoeffizienten spektrophotometrisch einfach und genau bestimmen. Die Peptidbindungen absorbieren bei 205 nm. Die aromatischen Aminosäurereste weisen eine π - π^* -Absorption bei 280 nm auf. Im Gegensatz zu Tyrosin (Y) und der seltenen Aminosäure Tryptophan (W) trägt Phenylalanin kaum zur Absorption im nahen UV-Bereich bei. Die Absorption eines Proteins bekannter Sequenz lässt sich mit der folgenden Formel berechnen (Gasteiger et al., 2005), sofern es keine anderen bei 280 nm absorbierenden Chromophore trägt:

$$\varepsilon_{\text{Protein}} = \#_W \times \varepsilon_W + \#_Y \times \varepsilon_Y \quad (1)$$

wobei $\#_W$ die Anzahl der Tryptophanreste, $\#_Y$ die Anzahl der Tyrosinreste und ε_W bzw. ε_Y die entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten darstellen ($\varepsilon_W = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_Y = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Das durch Oxidation zweier Cysteine entstehende Cystin ($\varepsilon = 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ist aufgrund des reduktiven intrazellulären Milieus und entsprechenden Pufferzusätzen bei der Aufreinigung vernachlässigbar.

Nach photometrischer Doppelbestimmung der Extinktion E bei 280 nm in einer Quarzküvette wird die Konzentration der Proteinlösung c mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes bestimmt. d ist Schichtdicke in cm und $\varepsilon_{\text{Protein}}$ der Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$E = \varepsilon_{\text{Protein}} \times c_{\text{Protein}} \times d \quad (2)$$

Die Konzentration von GST-Fusionsproteinen lässt sich über die GST-Aktivität bestimmen. Die humanen Glutathion-S-Transferasen (GST) sind an der Entgiftung im menschlichen Körper beteiligte Enzyme. Durch eine Konjugationsreaktion übertragen sie das Tripeptid Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) auf elektrophile, meist schwerlösliche Xenobiotika, die dadurch über die Niere oder Galle bzw. Dünndarm ausgeschieden werden können. 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) stellt ein Substrat der Glutathion-S-Transferase dar, das in Gegenwart von Glutathion zum chromogenen 2,4-Dinitrophenylglutathion und HCl umgewandelt wird. Die Substratzunahme kann spektrophotometrisch bei 340 nm verfolgt werden und ist im linearen Bereich der enzymatischen Reaktion direkt proportional zur GST-Aktivität.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration über die GST-Aktivität wird zunächst einmalig die spezifische Aktivität des Fusionsproteins ermittelt. Zur Eichung wird das GST-Fusionsprotein aufgereinigt und anschließend die Proteinkonzentration der Lösung gemessen. 5-50 μ l dieser Lösung werden mit a.bidest. auf 500 μ l aufgefüllt und mit 500 μ l GST-Aktivitätstestmix (2x) gemischt. Für den Blindwert wird a.bidest. statt der Proteinlösung verwendet. Anschließend wird die Reaktionskinetik durch minütliche spektrophotometrische Messungen bei 340 nm über einen Zeitraum von fünf Minuten bestimmt. Aus der Kinetik werden die Extinktionsänderungen für alle sechs Messpunkte nach Gleichung (3) und deren Mittelwert berechnet. Wenn die Standardabweichung weniger als 10% beträgt, werden die Extinktionsänderungen der Doppelbestimmung in die Gleichung zur Berechnung der mittleren GST-Aktivität eingesetzt (4); andernfalls werden die Messwerte verworfen.

$$\Delta A_{340}(i) = \frac{A_{340}(t_i) - A_{340}(t_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})(ml_{\text{Probe}})} \quad \text{in } \text{min}^{-1} \text{ml}^{-1} \quad (3)$$

$$\bar{A}_{GST} = \frac{\frac{1}{10} \left(\sum_1^5 \Delta A_{340}(i) + \sum_1^5 \Delta A_{340}(j) \right)}{\varepsilon_{CDNB} \times d} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad \text{in } \frac{\mu\text{M}}{\text{min ml}} \quad (4)$$

ε_{CDNB} ist der molare Extinktionskoeffizient von CDNB ($\varepsilon_{CDNB} = 9.6 \text{ nM}^{-1} \text{cm}^{-1}$) und d die Schichtdicke der Küvette. Die spezifische GST-Aktivität $\bar{A}_{GST} / \text{mg}$ ergibt sich aus dem Quotienten der mittleren GST-Aktivität \bar{A}_{GST} des Eichansatzes und dessen Proteinkonzentration.

Um die Masse der an der Glutathion-SepharoseTM gebundenen GST-Fusionsproteine zu bestimmen, wird die mittlere GST-Aktivität \bar{A}_{GST} des Durchflusses und die des Rohextraktes wie oben beschrieben mittels der Reaktionskinetiken ermittelt. Das Probenvolumen wird zwischen 5 und 50 μ l so angepasst, dass eine fünfminütige Reaktionskinetik im linearen Be-

reich liegt. Die Differenz der GST-Aktivität des Rohextraktes zu der des Durchflusses wird durch die anfangs mittels des Eichansatzes bestimmte spezifische GST-Aktivität dividiert, wodurch man die Masse der gebundenen GST-Fusionsproteine GST-FP_{geb} erhält (5).

$$m(\text{GST} - \text{FP}_{\text{geb}}) = \frac{\bar{A}_{\text{GST}}(\text{Rohextrakt}) - \bar{A}_{\text{GST}}(\text{Durchfluss})}{\bar{A}_{\text{GST}} / \text{mg}} \quad \text{in mg} \quad (5)$$

3.3.6 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die *in vitro*-Untersuchung des Kerntransports werden rekombinant exprimierte Proteine verwendet. Zur heterologen Expression werden die Fusionskonstrukte in den Vektoren pET und pGEX durch einen Hitzeschock in chemokompetente *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Als Selektionsmarker dient in den Kulturlösungen Ampicillin. Die Fusionskonstrukte in den pQE-Vektoren werden dagegen in *E. coli* M15[pREP4] transformiert. Im Gegensatz zu den pET- und pGEX-Vektoren tragen die pQE-Vektoren kein *lacI*-Gen zur Repression der basalen Expression. Der *lac*-Repressor wird deshalb *in trans* von dem pREP4-Plasmid konstitutiv exprimiert. Zur seiner Erhaltung muss den Kulturlösungen für M15-Zellen Kanamycin zugesetzt werden.

Eine Flüssigkeitskultur aus 2YT-Medium wird mit frischen Bakterienzellen inokuliert und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Eine vorgewärmte Hauptkultur wird im Verhältnis 10:1 mit der Übernachtskultur angeimpft und bis zur gewünschten optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Anschließend wird die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert und die Temperatur abgesenkt, um das bakterielle Wachstum zu reduzieren.

Zur Kontrolle der Induktion werden vor der IPTG-Zugabe, sowie nach ein, zwei, drei und vier Stunden 600 µl entnommen. Die Proben werden 30 Sekunden lang bei 12 000 g abzentrifugiert und nach der Resuspension in 60 µl SDS-Probenpuffer 30 Minuten lang bei 95°C denaturiert. Je 10 µl werden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Am Ende der Induktionszeit werden die Bakterienzellen 30 Minuten lang bei 4 500 g kalt abzentrifugiert und das Sediment bei -80°C eingefroren.

Die Induktionsparameter wie Kulturmedium und -dichte, IPTG-Konzentration, Induktionstemperatur und -dauer sind abhängig von dem verwendeten *E. coli*-Stamm und dem Fusionsprotein und müssen für jede Kombination experimentell ermittelt werden.

Die Fusionsproteine Importin α3 und Importin β1 werden entsprechend den Protokollen von Prof. Dr. M. Köhler und Prof. Dr. D. Görlich induziert. Die Importin β1-Übernachtskultur wird mit frischen Bakterienzellen inokuliert und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Lösung enthält 2% (w/v) Glukose, die über die Inhibition der Adenylatzyklase die Induk-

tion des *lac*-Operons durch das Katabolitaktivatorprotein (CAP) verhindert. Zur Übernachtkultur wird das vierfache Volumen an vorgewärmte Importin β 1-Hauptkultur 1 gegeben und eine Stunde bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Wenn die optische Dichte OD₆₀₀ größer eins ist, wird das Volumen durch Zugabe eiskalter Importin β 1-Hauptkultur 2 verdoppelt und die Kultur bei 18°C drei Stunden lang induziert. Das in der induzierten Hauptkultur befindliche Ethanol aktiviert in einer Endkonzentration von 2% (v/v) bakterielle Chaperone und reduziert dadurch die Bildung von Einschlusskörperchen (Thomas & Baneyx, 1997).

3.3.7 Herstellung des Rohextrakts zur Isolierung löslicher Proteine

Die heterolog exprimierten Fusionsproteine werden extrahiert und nach Abtrennung der Zelltrümmer mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Für den Zellaufschluss stehen verschiedene chemische und physikalische Methoden zur Verfügung (Edebo, 1969; Middelberg, 1998). Das Einfrieren und Auftauen der Zellen ist ein schonendes, aber wenig effizientes physikalisches Verfahren. Die Zellen werden dabei durch die Bildung von Eiskristallen und der daraus resultierenden Volumenänderung aufgeschlossen.

Die Lipopolysaccharide der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien werden durch Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen stabilisiert. Die Behandlung mit Chelatbildnern wie beispielweise EDTA entfernt diese und ermöglicht den enzymatischen Abbau des Mureingerüsts der Zellwand mittels Lysozym. Aufgrund der Hyperosmolarität des Zytoplasmas platzen die zellwandlosen Bakterienzellen im Lysispuffer. Die Aufschlusseffizienz kann durch Scherkräfte, wie sie in einer engen Kanüle auftreten, verbessert werden. Dieses Verfahren ist nur für kleine Volumina geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit der Hochdruckhomogenisation und der Ultraschallbehandlung zwei mechanische Aufschlussverfahren verwendet, die effizient und kostengünstig einen hohen Aufschlussgrad liefern.

In einem Hochdruckhomogenisator wird die Zellsuspension stoßweise durch eine Öffnung gepresst, die mittels Luftdruck von einem Stöpsel verschlossen wird. Aufgrund des Druckunterschieds von bis zu 2 000 bar vor und hinter dem Ventilverschluss entstehen Mikrokavitäten in der Lösung, die zur Implosion der Zellen führen. Darüber hinaus stoßen die Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit auf einen Prallring, der das Ventil am Homogenisierspalt umgibt. Da die Lösung kontinuierlich durch das Rückschlagventil gepumpt wird, erhält man einen homogenen Zellaufschluss im Gegensatz zur Ultraschallbehandlung, bei der die Sonotrode in die Lösung eingetaucht wird und die Kavitäten nur wenige Millimeter um die Sonotrode entstehen. Dadurch ist nicht sichergestellt, dass in einem großen Volumen alle Zellen erfasst werden.

Der Hochdruckhomogenisator mit einem Totvolumen von 10 ml findet beim präparativen Zellaufschluss Verwendung. 10 g Bakteriensediment werden in 40 ml Proteaseninhibitoren enthaltenden Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Suspension wird in 6 Zyklen bei 1 000 bar homogenisiert, wobei das Gerät von außen gekühlt und zuvor mit eiskaltem Aufschlusspuffer gespült wird. Das Zellhomogenat wird ebenfalls 30 Minuten lang bei 48 000 g kalt zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand für die Aufreinigung abgetrennt.

Im analytischen Maßstab werden 1-2.5 g Bakteriensediment in 10 ml Aufschlusspuffer mit einem Proteaseninhibitorencocktail (complete, Roche) resuspendiert und bei 30% Leistung viermal 2.5 Minuten auf Eis mit je 2.5 Minuten Pause zwischen den Zyklen sonifiziert. Anschließend wird die Suspension kalt 30 Minuten lang in der Ultrazentrifuge bei 50 000 g geklärt und die Fusionsproteine im Überstand aufgereinigt.

3.3.8 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie stellt aufgrund der spezifischen Ligand-Analyten-Bindung eine gute Methode dar, rekombinant exprimierte Fusionsproteine von anderen bakteriellen Proteinen, insbesondere Proteasen, zu trennen, sie aufzukonzentrieren und dadurch zu stabilisieren. Als Liganden werden bei Enzymen Inhibitoren, Kofaktoren oder Substrate, bei Antikörpern das Antigen oder Protein A und G und bei Fusionsproteinen verschiedene Markierungen („tags“) wie poly-Histidin, Glutathion-S-Transferase (GST) oder Streptavidin eingesetzt. Der Ligand wird an eine stationäre Phase, die häufig aus quervernetzter Agarose besteht, gekoppelt. Die Matrix kann entweder als Suspension („batch“) oder in eine Säule gegossen verwendet werden, wobei die Suspension häufig im analytischen Maßstab Verwendung findet und die Säulen bei der präparativen Proteinaufreinigung eingesetzt werden. Der gebundene Analyt wird durch Competition, durch Änderung des pH-Werts oder selten durch Änderung der Ionenstärke eluiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die His-Fusionsproteine mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie (IMAC) und die GST-Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Für die analytische Proteinaufreinigung werden 200 μl Ni^{2+} -NTA Agarose bzw. Glutathione Sepharose™ 4 FF dreimal mit dem fünffachen Volumen Aufschlusspuffer gewaschen, indem die Suspension fünf Minuten lang kalt bei 500 g sedimentiert und die Matrixkügelchen nach Entfernung des Überstands in frischem Puffer resuspendiert werden. Anschließend werden sie für zwei Stunden bei 20 U/min und 4° C mit dem fünffachen Volumen an bakteriellem Rohextrakt inkubiert. Danach werden die proteinbeladenen Matrixkügelchen fünf Minuten lang kalt bei 500 g sedimentiert und dreimal mit dem fünffachen Volumen Aufschlusspuffer kalt gewaschen. Die Proteine werden mit dem einfachen Volumen Elutionspuffer abgelöst.

Bei Ni²⁺-NTA Agarose werden die His-Fusionsproteine schrittweise durch eine ansteigende Imidazolreihe von 100 mM, 200 mM und 300 mM eluiert. Die an Glutathione Sepharose™ 4 FF gebundenen GST-Fusionsproteine werden durch 5, 10 bzw. 20 Minuten lange Inkubationen mit dem glutathionhaltigen Elutionspuffer abgelöst.

Zur präparativen Aufreinigung wird der bakterielle Proteinrohextrakt nach Passage eines 0.45 µm Filters mit einer Flussrate von 15 cm/h bei 4°C auf eine in Aufschlusspuffer äquilibrierte Ni²⁺-Sephrose (HisTrap)-Säule oder Glutathion-Sephrose (GSTrap)-Säule an der Chromatographieranlage Biologic HR geladen. Der Säulendurchfluss wird in einer Messzelle spektrophotometrisch analysiert. Bei 280 nm absorbierende Volumen werden für die Analyse mittels SDS-PAGE durch den Fraktionssammler aufgefangen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Substanzen wird die Säule nach der Beladung mit Aufschlusspuffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm im Durchfluss wieder den Ausgangswert erreicht hat.

Das Fusionsprotein His-Importin α2 wird mit einer Flussrate von 15 cm/h bei 4°C über einen kontinuierlichen Gradienten von 20 Säulenvolumen von der Ni²⁺-Sephrose-Säule eluiert, in dem über ein Mischventil der Anteil des Elutionspuffers im Aufschluss-/Elutionspuffer-Gemisch gleichmäßig von 0% auf 100% gesteigert wird. His-Importin α2 löst sich bei 37% (v/v) Elutionspuffer von der Säule. Anschließend wird mit zehn Säulenvolumen Elutionspuffer gewaschen und die Säule in Aufschlusspuffer äquilibriert.

Für die Elution eines möglichst reinen His-Importin β1 wird ein Stufenprotokoll angewendet, da dieses Protein in der Ionenaustauschchromatographie seine Funktionalität verliert. Nach Beladung der Säule wird diese mit 10 Säulenvolumen 4% (v/v) Elutionspuffer in Aufschlusspuffer gewaschen und stärker gebundene Kontaminanten mit 4 Säulenvolumen 10% (v/v) Elutionspuffer entfernt. Anschließend wird die Säule wieder in fünf Säulenvolumen 4% (v/v) Elutionspuffer äquilibriert und das Fusionsprotein His-Importin β1 durch fünf Säulenvolumen 50% (v/v) Elutionspuffer in konzentrierter Form eluiert. Nach einer letzten Waschung mit fünf Säulenvolumen Elutionspuffer wird die Säule in Aufschlusspuffer äquilibriert.

GST-Fusionsproteine wie das GST-NLS-GFP (GNG)-Konstrukt werden über einen kontinuierlichen Gradienten von 20 Säulenvolumen bei einer Flussrate von 15 cm/h kalt eluiert. GNG löst sich bei 32% (v/v) Elutionspuffer von der Glutathion-Sephrose-Säule. Anschließend wird diese mit fünf Säulenvolumen Elutionspuffer gewaschen und in Aufschlusspuffer äquilibriert.

Aus den zu analysierenden Fraktionen werden Proben mit SDS-Probenpuffer aufgeköcht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches anschließend angefärbt oder nach dem Proteintransfer auf eine Membran immunologisch analysiert wird. Die das Fusionsprote-

in beinhaltenden Fraktionen werden vereinigt und die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt.

3.3.9 Enzymatische Spaltung von GST-Fusionskonstrukten

Aufgrund der hochspezifischen Bindung zwischen Ligand und Analyt lassen sich die rekombinant exprimierten GST-Fusionskonstrukte sauber aufreinigen. Proteine können jedoch durch die Kopplung an die 26 kDa große Glutathion-S-Transferase in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Deshalb besitzen die Vektoren der pGEX-T-Familie C-terminal der GST-Domäne eine Thrombinschnittstelle. Dabei bietet es sich an, das an der Matrix gebundene Fusionskonstrukt abzuspalten und von GST getrennt zu eluieren. Die Serin-Proteasen wie Thrombin oder Faktor Xa lassen sich wiederum mittels Affinitätschromatographie entfernen.

Die mit den GST-Fusionsproteinen beladene Säule wird mit fünf Säulenvolumen PBS umgepuffert und auf 37°C äquilibriert. Pro 2 nmol gebundenes Fusionsprotein werden 1 U (NIH) Thrombin in einem Säulenvolumen PBS gelöst und mit einer Spritze über einen Luer-Lock-Adapter langsam auf die Säule gegeben. Anschließend wird die Säule an beiden Enden verschlossen und zwei Stunden lang bei 20 U/min und 37° C inkubiert. Danach wird die Säule wieder an die Chromatographieanlage angeschlossen und das Zielprotein mit dem fünffachen Säulenvolumen PBS und einer Flussrate von 15 cm/h eluiert.

Das Thrombin wird über die Bindung an Benzamidin-Sepharose™ entfernt. Dazu werden die das Zielprotein beinhaltenden Fraktionen vereinigt und auf 500 mM NaCl eingestellt, um die unspezifische Bindung des Zielproteins an die Affinitätsmatrix zu minimieren. Die Hälfte dieses Volumens an Benzamidin-Sepharose™-Suspension wird 5 Minuten bei 500 g sedimentiert und dreimal mit dem fünffachen Volumen PBS/0.5 M NaCl gewaschen. Anschließend werden die Matrixkügelchen mit der thrombinhaltigen Zielproteinlösung für ein bis zwei Stunden bei 20 U/min und Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Suspension fünf Minuten lang bei 500 g sedimentiert und die Benzamidin-Sepharose™ zweimal mit dem einfachen Volumen PBS/0.5 M NaCl gewaschen. Die drei Überstände werden vereinigt und gegen den IEX-Startpuffer dialysiert.

Anschließend wird die auf der Säule verbliebene Glutathion-S-Transferase mit ebenfalls fünf Säulenvolumen GST-Elutionspuffer entfernt und die Säule in fünf Säulenvolumen Aufschlusspuffer äquilibriert.

3.3.10 Dialyse und Aufkonzentration der Proteinlösung

Die Dialyse basiert auf der Diffusion niedermolekularer Substanzen durch eine semipermeable Membran, die das Dialysegut umschließt. In diesem konzentrationsgetriebenen Pro-

zess stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Dialysat und der umgebenden Pufferlösung ein. Aufgrund des vielfach größeren Volumens und durch mehrmaligen Austausch der Lösung werden Ionen und Moleküle, die kleiner als die Ausschlussgröße der Membran sind, schonend aus dem Dialysegut entfernt.

Zunächst wird der Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 6-8 kDa in der geeigneten Länge (1.7 cm/ml Dialysat) für 15 Minuten in a.bidest. gekocht und dreimal in a.bidest. gewaschen. Anschließend wird das Dialysat in den kalten Schlauch gegeben und bei 4°C unter langsamem Rühren dreimal eine Stunde gegen je 800 ml geeigneten Puffer dialysiert.

An Stelle der Dialyse können die Proteine auch mittels Ultrazentrifugation (Vivaspin-Säulen) umgepuffert werden. Darüber hinaus eignet sich diese Methode auch zur Konzentration von Proteinen. Dazu wird die Proteinlösung zunächst kalt für 10 Minuten bei 3 000 g zentrifugiert. Anschließend wird das Reservoir zwei- bis dreimal mit dem neuen Puffer aufgefüllt und die Zentrifugation wiederholt. Danach wird die Probe aus der Konzentratortasche entnommen und auf das gewünschte Endvolumen gebracht. Diese Methode ist weniger schonend als die Dialyse und aufgrund möglicher Präzipitation bzw. Anhaftung an den Gefäßwänden nur bei großen Proteinmengen empfehlenswert.

3.3.11 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie (IEX) macht man sich die unterschiedlichen Ladungsverteilungen auf der Proteinoberfläche zunutze. Die stationäre Phase trägt je nach Typ positive oder negative Ladungen (Anionen- bzw. Kationenaustauscher). Wenn sich der pH-Wert der mobilen Phase und der isoelektrische Punkt pI eines Proteins gleichen, dann ist die Nettoladung dieses Proteins gleich Null und es bindet nicht an die stationäre Phase. Bei einem pH-Wert oberhalb des isoelektrischen Punkts treten ionische Wechselwirkungen zwischen der negativen Nettoladung des Proteins und der positiv geladenen Matrix des Anionenaustauschers auf, die je nach Stärke die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins verringern oder durch eine Bindung zum Stillstand bringen. Die gebundenen Proteine werden durch Erhöhung der Ionenstärke oder seltener durch Änderung des pH-Werts eluiert. Mit dieser Methode lassen sich Proteine nicht nur sehr effizient voneinander trennen, sondern auch aufkonzentrieren, da ein großes Ausgangsvolumen keinen Einfluss auf das Elutionsvolumen hat.

Die affinitätschromatographisch gereinigten Fusionsproteine müssen abhängig von der ionischen Stärke des Elutionspuffers mittels Dialyse in den IEX-Startpuffer überführt werden. Zur Entfernung von Präzipitaten wird die Probe sterilfiltriert, bevor sie mit einer Flussrate von 1.5 cm/h auf den Ionenaustauscher geladen wird. Anschließend wird die Säule mit dem fünf-fachen Säulenvolumen Startpuffer gewaschen. Die Proteine werden über einen kontinuierli-

chen Gradienten von 20 Säulenvolumen Elutionspuffer von der Säule gelöst und im Fraktionssammler aufgefangen. Der Ionenaustauscher wird nach fünf weiteren Säulenvolumen Elutionspuffer in Startpuffer äquilibriert.

Proben der zu analysierenden Fraktionen werden wie bei der Affinitätschromatographie mit SDS-Probenpuffer denaturiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, welches anschließend angefärbt wird. Die die Zielproteine beinhaltenden Fraktionen werden vereinigt und die Proteinkonzentration spektrophotometrisch bestimmt. Als Blindwert wird das gemittelte Mischungsverhältnis von Start- zu Elutionspuffer der vereinigten Fraktionen verwendet.

3.3.12 Gelpermeationschromatographie

Die stationäre Phase dieser Chromatographieart besteht aus Kügelchen eines porösen hochvernetzten Polymers. Die Moleküle der mobilen Phase diffundieren in die Hohlräume, wobei kleine Moleküle tiefer eindringen als große und damit länger in der stationären Phase verweilen. Die Auftrennung der Moleküle erfolgt reziprok proportional zum hydrodynamischen Radius der Teilchen. Die Auflösung einer Gelfiltrationssäule wird nicht nur von den Säulencharakteristika wie Dimension, Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung, Packungsdichte und Porosität der Partikel beeinflusst. Für das Trennergebnis spielen auch Flussrate, Viskosität der mobilen Phase und das Volumenverhältnis zwischen der aufgetragenen Probe und dem Säulenkörper eine Rolle. Deshalb wird eine Gelfiltrationssäule an einer Chromatographieanlage mit Molekülen bekannter Molekulargewichte bzw. Radien für eine bestimmte Flussrate und Puffer kalibriert (Cabré et al., 1989).

Die zur Verfügung stehenden Gelfiltrationssäulen Superdex 75 und Superdex 200 weisen einen Trennbereich für globuläre Proteine von 3-70 kDa bzw. 10-600 kDa auf. Über diese Säulen werden zwischen 0.1 ml und 1 ml Probe bei 4° C und einer Flussrate von 0.15 cm/h aufgetrennt. Die Elution erfolgt isokratisch mit Puffer GPC1. Für die Gelfiltration von Ntf-2 wird auch der Puffer GPC2 verwendet.

Die bei 280 nm absorbierenden Fraktionen werden gesammelt und mittels SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die die Zielproteine beinhaltenden Fraktionen werden vereinigt und die Proteinkonzentration spektrophotometrisch bestimmt. Anschließend werden die Proteine mit 250 mM Saccharose versetzt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.13 Kovalente Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern und Proteinen

Die Markierung von Proteinen mit Fluorophoren erfolgt vorwiegend über N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester-Kopplung an primäre Amine. Dabei wird durch einen nukleophilen An-

griff am deprotonierten Amin eine Amidbindung unter Abtrennung der NHS-Gruppe gebildet. Die Hydrolyse des NHS-Esters stellt die größte kompetitive Reaktion für die Konjugation dar. Bei pH 7.0 besitzen NHS-Ester eine Halbwertszeit von zwei bis vier Stunden, bei pH 9.0 nur wenige Minuten.

Wenn wie im Fall der aus basischen Aminosäuren bestehenden Kernlokalisationssequenz (NLS) eine Kopplung an die primären Amine unerwünscht ist, kann die Konjugation auch über oxidierte Carbohydrate, Carboxyl- oder Sulfhydrylgruppen erfolgen. Maleimide bilden mit Thiolgruppen bei einem pH-Wert zwischen 6.5 und 7.5 über einen nukleophilen Angriff eine Thioetherbindung. Ähnlich den NHS-Estern werden die Maleimide bei einem alkalischen pH-Wert (> 8.0) abgebaut.

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper mit NHS-Ester-funktionalisierten Fluorophoren (Alexa Fluor[®] 532 Monoclonal Antibody Labeling Kit und Alexa Fluor[®] 633 Protein Labeling Kit) und mit Quantenpunkt-Nanokristallen (Qdot[®] Antibody Conjugation Kit) konjugiert. Die heterolog exprimierten Proteine dagegen wurden mit Alexa Fluor[®] 633 C₅ maleimide gekoppelt.

Die IgG-Antikörperlösung muss für die Konjugation mittels NHS-Ester frei von Ammoniumionen oder primären Aminen (z.B. Tris oder Glycin) sein und kann bei Bedarf in PBS bzw. einen HEPES-Puffer umgepuffert werden. Bei der Kopplung mit Alexa Fluor[®] 532 werden 100 µg Antikörper pro Reaktion in 100 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Für die Markierung mit Alexa Fluor[®] 633 werden 1 mg Antikörper einer 2 mg/ml konzentrierten Lösung verwendet. Durch Zugabe von Bikarbonat zu einer Endkonzentration von 100 mM wird der pH-Wert in den für die Kopplungsreaktion optimalen Bereich von pH 7.5-8.5 gebracht. Die reaktiven Farbstoffe werden durch Zugabe der Antikörperlösung gelöst und eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden ungekoppelte Farbstoffmoleküle mittels Gelfiltration abgetrennt.

Die Gelfiltrationssäule wird während der Kopplungsreaktion aus den im Reagenziensystem enthaltenen Komponenten hergestellt. Das aus porösen Polyacrylamid-Kügelchen bestehende BioGel P-30 (Bio-Rad GmbH) bildet die stationäre Phase der Säule und besitzt einen Trennbereich von 2.5-40 kDa. Die rund 144 kDa schweren IgG-Antikörper passieren die Gelfiltrationssäule im Ausschlussvolumen, wohingegen die ungebundenen Farbmoleküle mit einer Größe von 0.7 kDa bei Alexa Fluor[®] 532 bzw. ~1.2 kDa bei Alexa Fluor[®] 633 die gesamte stationäre Phase durchqueren.

Für die Konjugation eines Antikörpers mit einem Quantenpunkt-Nanokristall muss dieser zunächst mit einem hetero-bifunktionalen Binder versehen werden. Die Polymerhülle der

Qdot[®] 655 wird über eine einstündige NHS-Ester-Kopplung mit einer Maleimidschicht funktionalisiert. Überschüssiger Binder wird mittels Gelfiltration über eine Nap-5-Säule entfernt. Parallel dazu werden die Antikörper 30 Minuten lang in 20 mM DTT reduziert. Anschließend wird das DTT ebenfalls über eine Nap-5-Säule entfernt. Die reduzierten Antikörper und die mit Maleimid beschichteten Nanokristalle werden in einem molaren Verhältnis von 4:1 gemischt und zur Bildung von Thioetherbindungen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 μ M β -Mercaptoethanol beendet. Zur Abtrennung ungekoppelter Nanokristalle wird die Reaktionslösung mittels Gravitation über eine Nap-5-Säule aufgetrennt, wobei nur die ersten zehn Tropfen gesammelt werden, da die nachfolgenden Tropfen einen größeren Anteil unkonjugierter Antikörper beinhalten.

Für die Konjugation der rekombinant exprimierten Proteine werden die Sulfhydrylgruppen zunächst reduziert. Im Gegensatz zu Dithiothreitol oder β -Mercaptoethanol beeinträchtigt das thiofreie Reduktionsmittel Tris(2-Carboxyethyl)phosphin die folgende Kopplungsreaktion nicht.

Die zu konjugierenden Proteine werden mit TCEP im 10-fachen molaren Überschuss für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die reduzierten Proteine äquimolar mit den reaktiven Farbstoffmolekülen gemischt und in Dunkelheit entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von Glutathion im 25-molaren Überschuss gestoppt. Ungekoppelte Fluorophore werden mittels Gelfiltration entfernt. Aus den zu analysierenden Fraktionen werden Proben mit nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgeköcht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Fluorophore im Trenngel werden mit Hilfe der Diana II dokumentiert, bevor die Proteine im Polyacrylamidgel angefärbt werden. Die die Zielproteine beinhaltenden Fraktionen werden vereinigt und die Proteinkonzentration spektrophotometrisch bestimmt.

Die Markierungseffizienz der Kopplungsreaktion wird spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wird zunächst die Extinktion der Probe bei 280 nm A_{280} und beim Anregungsmaximum des Fluorophors $A_{Ex\max}$ gemessen. Aus diesen Werten wird die Proteinkonzentration c_{Protein} der Lösung mit Hilfe der Gleichung (6) berechnet. Der Korrekturfaktor k_f berücksichtigt die Absorption des Fluorophors bei 280 nm und beträgt 0.09 für Alexa Fluor[®] 532 bzw. 0.55 für Alexa Fluor[®] 633.

$$c_{\text{Protein}} = \frac{(A_{280} - (A_{Ex\max} \times k_f)) \times D_f}{\epsilon_{\text{Protein}} \times d} \quad (6)$$

D_f ist der Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe und die Variable d steht für die Schichtdicke der Küvette. Die Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_{\text{Protein}}$ der exprimierten Fusionskonstrukte sind in Tab. 5 aufgelistet ($\varepsilon_{\text{IgG}} = 203\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Nach Berechnung der Proteinkonzentration lässt sich der Markierungsgrad in Anzahl der Fluorophore pro Anzahl der Moleküle bestimmen (7).

$$\text{Markierungsgrad} = \frac{A_{\text{Ex max}} \times D_f}{\varepsilon_{\text{Protein}} \times c_{\text{Protein}} \times d} \quad (7)$$

Tab. 5: Anregungs- und Emissionsmaxima der konjugierten Alexa Fluor® Farbstoffe mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten. Für die Qdot® 655 sind die für die beiden verwendeten Laserlinien bekannten Extinktionskoeffizienten angegeben.

Fluorophor	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum	Extinktionskoeffizient
Alexa Fluor® 532	530 nm	554 nm	81 000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Alexa Fluor® 633	632 nm	647 nm	100 000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Alexa Fluor® 633 C5 maleimid	622 nm	640 nm	143 000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Qdot® 655	bei 532 nm bei 638 nm		2 000 000 M ⁻¹ cm ⁻¹ 800 000 M ⁻¹ cm ⁻¹

3.3.14 Extraktion des Zytosols aus Rattenleberzellen

Für *in vitro*-Transportmessungen fluoreszent markierter Kargomoleküle können zytosolische Extrakte aus verschiedenen Wirbeltierzellen eingesetzt werden. Sie enthalten die in den Zellen vorhandenen Faktoren für den Kerntransport. Neben Retikulozyten- und Erythrozytenextrakten findet das Zytosol aus *Xenopus*-Oozyten oder aus der Leber von Ratten Verwendung (Adam et al., 1992).

Die frisch entnommene Leber wird in RLE-Aufschlusspuffer gewaschen und gewogen. Anschließend wird sie mit einer Schere zerkleinert und in 10 ml Proteaseninhibitoren enthaltendem RLE-Aufschlusspuffer pro g Leber bei 4°C homogenisiert. Die Plasmamembranen, die Zellkerne und Gewebereste werden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 6 000 g und 4°C abgetrennt. Der Überstand wird zur Entfernung der Organellen eine Stunde lang bei 100 000 g kalt zentrifugiert. Die im Überstand noch vorhandenen Vesikel werden durch eine dritte Zentrifugation bei 180 000 g und 4°C entfernt. Die zytoplasmatischen Proteine im Überstand werden durch die langsame Zugabe von Ammoniumsulfat zu einer Endkonzentration von 60% (w/v) unter Rühren kalt präzipitiert und weitere 30 Minuten kalt gerührt. An-

schließlich wird das Präzipitat 30 Minuten lang bei 7 000 g kalt zentrifugiert. Das Sediment wird in 0.5 ml RLE-Dialysepuffer pro g Leber resuspendiert. Das Ammoniumsulfat wird mittels zweier Dialyseschritte entfernt. Dazu wird das Dialysegut für drei Stunden und nochmals über Nacht gegen das fünfhundertfache Volumen RLE-Dialysepuffer bei 4°C dialysiert. Das Dialysat wird eine Stunde lang bei 100 000 g kalt zentrifugiert. Der Überstand wird aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4 Zellbiologische Methoden und nahfeldoptische Mikroskopie

3.4.1 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen werden entweder autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen und Aqua bidest. angesetzt. Bei der Verwendung von nicht autoklavierbaren Chemikalien, wie z.B. Methanol bzw. Glukose, werden die Lösungen durch Sterilfiltration (\varnothing 0.2 μ m) entkeimt.

- Alzianblau Beschichtungslösung
1% (w/v) Alzianblau, 1% (v/v) Essigsäure.
- DAPI-Kernfärbungslösung
1 μ g/ml DAPI in PBS.
- Digitonisierungslösung
40 μ g/ml Digitonin in Transportpuffer.
- DMEM-Komplettmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMEM, 10% (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, sterilfiltrieren.
- Einfrierlösung
10% (v/v) DMSO in DMEM Komplettmedium, sterilfiltrieren.
- KP (Kernpuffer)
10 mM NaCl, 90 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM N-Hydroxyethylendiaminotriessigsäure (HEDTA), 10 mM Hepes, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, pH 7.3.
- KP-BSA
1% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) in KP.
- KP-0.05% (v/v) Tween20
0.05% (w/v) Tween20 in KP.
- MHL (Modifiziertes Hepes-Leibovitz)-Medium
15 mM Hepes, 2 mM L-Glutamin, 5% (v/v) FKS, 60% (v/v) Leibovitz's L-15, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin.

- Mowiolgebrauchslösung
3 g Mowiol 4-88 in 10 ml PBS bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Anschließend 5 ml Glycerin hinzugeben und weitere acht Stunden rühren. Den pH-Wert mit 1 N NaOH auf 8.0 einstellen und 15 µl Thiomersal als Konservierungsmittel zugeben. Die fertige Mowiolgebrauchslösung 15 Minuten bei 4000 rpm zentrifugieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.
- PBS
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.5.
- PFA-Fixierlösung
4% (v/v) Paraformaldehyd in PBS.
- PFA-Glutar-Fixierlösung
4% (v/v) Formaldehyd und 0.1 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS.
- RIPA-Puffer
50mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% (w/v) Natriumdesoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton-X, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA.
- Transportpuffer
50 mM Hepes, 110 mM Kaliumacetat, 5 mM Natriumacetat, 2 mM Magnesiumacetat, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, pH 7.3.
- Transportsubstratlösung
1 µM Transportsubstrat (z.B. GNG oder Ntf-2-Alexa633), 0.5 µM Transportfaktoren (z.B. Importin α und Importin β) oder 50% (v/v) zytosolischer Rattenleberextrakt, 1 µM Kontrollsubstrat (z.B. BSA-Alexa488, BSA-Cy5 oder Texas Red[®] Dextran), 1 mM ATP, 1 mM GTP, 5 mM Phosphokreatin, 10 U/ml Creatin-Phosphokinase, complete Proteaseninhibitorencocktail in Transportpuffer oder KP-BSA.

3.4.2 Kultivierung und Passagieren von murinen L-Zellen

Murine L-Zellen werden bei 37°C unter 7% (v/v) CO_2 -Begasung in DMEM-Komplettmedium kultiviert. Konfluente Zellen werden mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst. Nach einigen Minuten sind die Zellen vereinzelt und können in geeigneter Verdünnung in neue Gewebekulturflaschen ausgesät werden.

3.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen werden trypsinisierte Zellen einer konfluenten Gewebekulturschale 3 Minuten lang bei 200 g und 22°C sedimentiert. 5×10^6 Zellen werden in 1 ml DMEM-Komplettmedium resuspendiert und zusammen mit 1 ml Einfrierlösung in ein Ein-

frierröhrchen überführt. Das schrittweise Einfrieren mit einer Rate von 1°C pro Minute bis zu einer Temperatur von -80°C erfolgt in einer mit Isopropanol gefüllten Kryo-Vorrichtung. Nach einer Lagerungszeit von sieben bis zehn Tagen bei -80°C werden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

In flüssigem Stickstoff sind die Zellen mehrere Jahre lagerfähig, ohne an Vitalität einzubüßen. Sie können bei Bedarf jederzeit aufgetaut werden.

Zum Auftauen von Zellen wird der Inhalt eines Einfrierröhrchens rasch erwärmt und in eine frische 25 cm² Gewebekulturschale mit 5 ml vorgewärmtem Kompletmedium überführt. Sobald sich die Zellen auf dem Boden der Kulturflasche abgesetzt haben, wird das Medium gewechselt, um das in der Einfrierlösung enthaltene DMSO zu entfernen.

3.4.4 Funktionsprüfung rekombinant exprimierter Proteine mittels Digitonin-permeabilisierter L-Zellen und ganzer Oozytenkerne

Für die Untersuchung des Kerntransports finden zwei *in vitro*-Systeme Anwendung. In dem auf *Xenopus*-Oozyten basierenden System werden manuell präparierte Kerne verwendet (Radtko et al., 2001). Der zweite Ansatz beruht auf mit Digitonin permeabilisierten Zellen (Adam et al., 1992). Digitonin ist ein mildes, nicht-ionisches Tensid aus dem Fingerhut *Digitalis purpurea*, das Cholesterol aus der Zytoplasmamembran entfernt. Die intrazellulären Membranen sind cholesterolarm und werden deshalb kaum angegriffen. Die Unversehrtheit des Zellkerns wird in beiden Ansätzen durch den Ausschluss eines fluoreszierenden Kontrollsubstrats überprüft. Dafür werden Moleküle wie beispielweise BSA oder 70 kDa große Dextrane verwendet, die für die freie Diffusion durch die Kernpore zu groß sind.

Für die Prüfung rekombinant exprimierter Proteine an Gewebekulturzellen werden zunächst sterile Deckgläser 20 Minuten lang mit Alzianblau beschichtet und gründlich mit DMEM-Kompletmedium gespült. Anschließend werden L-Zellen in geeigneter Dichte auf die Deckgläser ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Zur eigentlichen Funktionsanalyse werden die L-Zellen dreimal mit kaltem Transportpuffer gewaschen, fünf Minuten lang auf Eis in der kalten Digitonisierungslösung permeabilisiert und abermals dreimal mit kaltem Transportpuffer gespült. Anschließend wird der Transportpuffer durch die Transportlösung ersetzt und die Zellen 30 Minuten lang in einer Feuchte-kammer bei 30°C inkubiert. Die Importreaktion wird durch dreimaliges Spülen mit PFA-Fixierlösung gestoppt und die L-Zellen zehn Minuten lang bei Raumtemperatur mit PFA-Fixierlösung fixiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und fünf Minuten lang in DAPI-Kernfärbungslösung inkubiert. Zur Dokumentation am Fluoreszenz-

oder Laserscanningmikroskop werden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS tropfenweise mit der Mowiolgebrauchslösung benetzt und luftblasenfrei eingebettet.

Für die Funktionsprüfung der rekombinant exprimierten Proteine mittels ganzer Oozytenkerne werden diese aus Stadium VI-Oozyten präpariert und gereinigt. Anschließend werden je drei Kerne in ein Kammerdeckglas mit KMP-BSA überführt und dreißig Minuten lang mit fluoreszent markierten Proteinen (Transportsubstratlösung in KP-BSA) inkubiert. Für die Dokumentation am Fluoreszenz- oder Laserscanningmikroskop werden die Kerne in KMP-BSA überführt.

3.4.5 Froschhaltung

Die adulten *Xenopus laevis*-Weibchen werden in 50 Liter fassenden Aquarien bei einer Wassertemperatur von 18-20°C gehalten. Das Wasser, das durch die Anlage zirkuliert, wird über einen Bakterienfilter gereinigt und mittels UV-Licht entkeimt. Die Beleuchtungsdauer beträgt 14 Stunden. Die Tiere erhalten jeweils einmal in der Woche Fertigfutter und klein geschnittenes Rinderherz.

3.4.6 Froschoperation zur Gewinnung der Oozyten

Im Ovar eines adulten *Xenopus laevis*-Weibchens reifen nach der ersten meiotischen Teilung arretierte Oozyten heran. Progesteron induziert in den ausgewachsenen Stadium VI-Oozyten die zweite meiotische Teilung; der Zellkern wird aufgelöst und der Reifungsprozess abgeschlossen (Smith, 1989).

Für die nahfeldoptischen Kernmembranpräparationen werden operativ entfernte Oozyten mit dem größten Zellkern (Stadium VI) verwendet. Rechtlich handelt es sich hierbei um einen genehmigungspflichtigen Tierversuch nach dem deutschen Tierschutzgesetz. Grundsätzlich werden alle Lösungen, mit denen die Frösche in Berührung kommen, mit Leitungswasser angesetzt. Operiert werden lediglich Tiere, deren letzte Entnahme mindestens sechs Wochen zurückliegt und deren Operationswunde vollständig verheilt ist.

Das Froschweibchen wird für etwa 20 Minuten im Tauchbad in einer kalten 0.25% (w/v) Aminobenzolsäureethylester-Lösung narkotisiert. Die Betäubung wird an der totalen Erschlaffung der Beinmuskulatur überprüft. Das Tier wird mit Leitungswasser abgespült und im gereinigten Operationsfeld auf ein feuchtes Stück Küchenrolle gebettet. Die von der Operation unberührten Körperteile werden ebenfalls mit einem feuchten Tuch bedeckt. Mit einem sterilen Skalpell wird die Bauchdecke durch einen 1 cm langen Schnitt, 2-3 cm parallel zur Medianlinie und 2-3 cm oberhalb der Leistenbeuge, geöffnet. Die darunter liegende Facia ventralis und die geschichtete Bauchmuskulatur werden mit einer Schere durchgeschnitten. Durch diese

Öffnung wird ein Teil der fingerförmigen Ovariallappen mit Hilfe einer abgewinkelten Pinzette ergriffen, mit einer Schere abgetrennt und sofort in eine Petrischale mit MHL-Medium überführt.

Die Operationswunde wird von Oozyten und Blut gereinigt und mit synthetischem, absorbierbarem Nahtmaterial (Surgicryl USP 4/0 EP 1.5) verschlossen. Dazu werden die Bauchmuskulatur und die Bauchdecke separat durch je zwei Stiche genäht und die Naht mit einem chirurgischen Knoten gesichert. Anschließend wird das Tier gründlich mit Leitungswasser abgespült, um Narkosemittelreste vollständig zu entfernen und zum Aufwachen in ein kleines, teilweise abgedecktes Becken gesetzt. Nach ein bis zwei Stunden wird das Froschweibchen für eine Nacht in ein 0.5% (w/v) Meersalz enthaltendes, epidermales Regenerationsbad überführt, bevor es in die Aquarienanlage zurückgesetzt wird.

Das operativ entfernte Ovarstück wird je nach Verwendung unterschiedlich aufbewahrt. Die Oozyten können für Antikörperfärbungen in MHL-Medium bei 4°C bis zu einer Woche gelagert werden. Für Transportmessungen werden am besten frisch entnommene Oozyten verwendet. Das restliche Ovarstück wird bei 24°C und 7% CO₂-Begasung aufbewahrt, wobei das MHL-Medium täglich gewechselt wird.

3.4.7 Kernmembranpräparation und Antikörperfärbung

Im operativ entfernten Ovarlappen sind Oozyten aller Reifungsstadien vorhanden (Abb. 16). Unter dem Stereomikroskop werden die gewünschten Oozyten (Stadium VI) in Kernpuffer (KP) mittels feiner Pinzetten vereinzelt. Dabei werden nur solche Oozyten ausgewählt, die eine gleichmäßige Färbung innerhalb der animalen und vegetativen Hemisphäre aufweisen.

Die für die Präparation der Zellkerne verwendeten Petrischalen und Werkzeuge werden zunächst zwei Stunden lang in KP-BSA beschichtet, um die Haftung der Kerne zu reduzieren. Die verwendeten Lösungen und Puffer werden vor der Verwendung sterilfiltriert und durch eine 15 Minuten lange Ultraschallbehandlung entgast. Die Oozyte wird mit Hilfe zweier Uhrmacherpinzetten (Dumont No. 5 Biologie) am animalen Pol leicht geöffnet und der Kern, der sich in der animalen Hemisphäre befindet, durch leichten Druck in der Äquatorialebene ausgetrieben. Anschließend wird der Zellkern mit dem abgeschmolzenen Ende einer ausgezogenen Glaskapillare von anhaftenden Dotterplättchen gereinigt. Aufgrund des osmotischen Drucks schwillt der Zellkern in dem mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) versetzten Kernpuffer an und die Kernmembran wird entfaltet.

Für die Markierung der Kernmembran wird der Zellkern wahlweise mit dem lipophilen Farbstoff DiI C18(3) inkubiert. DiI ist ein Dialkylcarbocyanin, das sich in die Lipiddoppelschicht einlagert. Das Absorptionsmaximum liegt bei 549 nm und das Emissionsmaximum bei

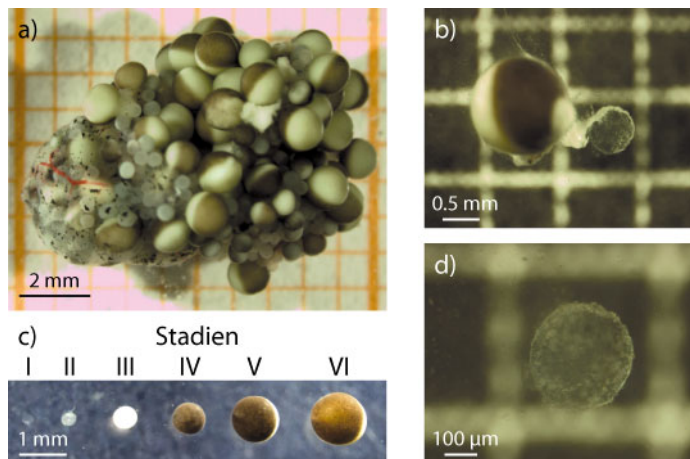


Abb. 16: Präparation der Kernmembran aus einer *Xenopus laevis*-Oozyte. Das operativ entfernte Ovarstück (a) enthält Oozyten aller sechs Reifungsstadien (c). Der Zellkern wird mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten aus Stadium VI-Oozyten präpariert (b) und schwillt im leicht hypoosmolaren Medium an (d).

565 nm. Der Zellkern wird 30 Minuten lang in KP-BSA mit 0.05% (w/v) DiI angefärbt und anschließend dreimal in KP-BSA gewaschen.

Mit Hilfe einer abgeflamten Pipettenspitze wird der Zellkern in der Flüssigkeitskammer über den Trögen platziert. Zur Präparation der nukleoplasmatischen Seite wird der Kern mittels zweier feiner Insektennadeln geöffnet und das Chromatin entfernt. Dabei ist zu beachten, dass eine möglichst große, ebene Membranfläche für die nahfeldoptische Messung entsteht. Für die Präparation der zytoplasmatischen Seite muss nach dem Öffnen des Kerns die Membran gewendet werden, bevor sie auf dem Boden der Kammer befestigt wird. Anschließend wird die Membran mit KP-BSA gewaschen, um das Chromatin aus der Flüssigkeitskammer zu entfernen.

Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wird das Präparat 15 Minuten mit KP-BSA blockiert und anschließend zweimal mit KP gewaschen. Die Kernmembran wird eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem in KP verdünnten primären Antikörper inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit KP entfernt, bevor das Präparat ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem in KP verdünnten sekundären Antikörper inkubiert wird. Anschließend wird die Kernmembran dreimal mit KP gewaschen und über Nacht bei 4°C gelagert, wenn nicht anders angegeben.

Für Doppelimmunfärbungen werden ungefärbte Kernmembranen auf den Trögen präpariert. Die Präparate werden zuerst mit α Nup153-Antikörper, anschließend mit mAb414 und zuletzt mit den beiden sekundären Antikörpern inkubiert. Zwischen den Schritten wird jeweils dreimal mit KP gewaschen. Die Antikörperinkubationsdauer beträgt jeweils eine Stunde.

Bei Präparaten, die noch am selben Tag nahfeldoptisch untersucht werden, verwendet man, soweit vorhanden, mit Fluorophoren konjugierte primäre Antikörper.

Für rasterkraftmikroskopische Aufnahmen werden die Kernmembranen entweder mit a.dest. gespült und getrocknet oder nach der Antikörperfärbung fünfzehn Minuten lang mit Phalloidin (1:100) inkubiert, dreimal mit KMP gespült, fünfzehn Minuten lang in PFA-Glutar-Fixierlösung fixiert und je dreimal mit PBS und KMP gewaschen.

Für die immunologische Analyse werden die gereinigten Zellkerne durch Auf- und Abpipettieren in RIPA-Puffer homogenisiert und mit SDS-Probenpuffer denaturiert.

3.4.8 Herstellung der Flüssigkeitskammer

Die zwei für die nahfeldoptische Untersuchung des Kerntransports benötigten Kompartimente werden durch eine mikrostrukturierte Oberfläche erzeugt. Trogförmige Vertiefungen im Boden der Flüssigkeitskammer werden durch die planar präparierte Kernmembran semi-permeabel verschlossen. Darüber befindet sich das zweite Kompartiment. Am Institut für Angewandte Physik wurden Lochtemplate sowohl mit statistisch verteilten (Johnas, 2004) als auch mit regelmäßig angeordneten Löchern (Dießel, 2006) entwickelt und hergestellt, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

Statistisch verteilte Löcher in Form von zylindrischen Trögen lassen sich durch Bedampfung von Kügelchen mit einem Film und deren anschließende Entfernung erzeugen. Zunächst wird ein Deckglas 15 Minuten lang in einer 70°C heißen 1% (v/v) Hellmanex-Lösung mit Ultraschall gereinigt. Nach dreimaligem Waschen in a.bidest. wird das Deckglas 30 Minuten lang mit einer Polyethylenimin (PEI)-Lösung oder einer Poly-L-Lysin (PLL)-Lösung von 1 mg/ml beschichtet, einmal mit a.bidest gewaschen und getrocknet. Anschließend wird eine Suspension mit Polystyrolkügelchen (Latex Microparticles), die zuvor einige Minuten im Ultraschallbad dispergiert wurden, auf das Deckglas gegeben und zwischen drei und acht Stunden in einer Feuchtekkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lochdichte wird über die Konzentration der Suspension gesteuert, wobei die Kügelchen zur Aggregation neigen und deshalb nicht zu dicht appliziert werden können. Es werden Polystyrolkügelchen mit einem Durchmesser von 0.581 und 1.15 μm verwendet. Nachdem das Deckglas mit a.bidest. gespült und liegend getrocknet wurde, wird mit einer Elektronenstrahl-Verdampfungsanlage eine 4 nm starke Haftschrift aus Chrom aufgedampft. Als Zwischenschicht werden 10 nm Aluminium oder 20 nm Gold aufgebracht, die mit 300 nm SiO_2 bedampft werden. Die Polystyrolkügelchen werden durch eine dreimalige Ultraschallbehandlung von je 15 Minuten in Dichlormethan aus dem strukturierten Deckglas herausgelöst, das in a.bidest. gewaschen und nochmals 15 Minuten lang in einer 70°C heißen 1% (v/v) Hellmanex-Lösung mit Ultraschall gereinigt wird. Anschließend wird es nochmals mit einer Polyethylenimin-Lösung oder einer

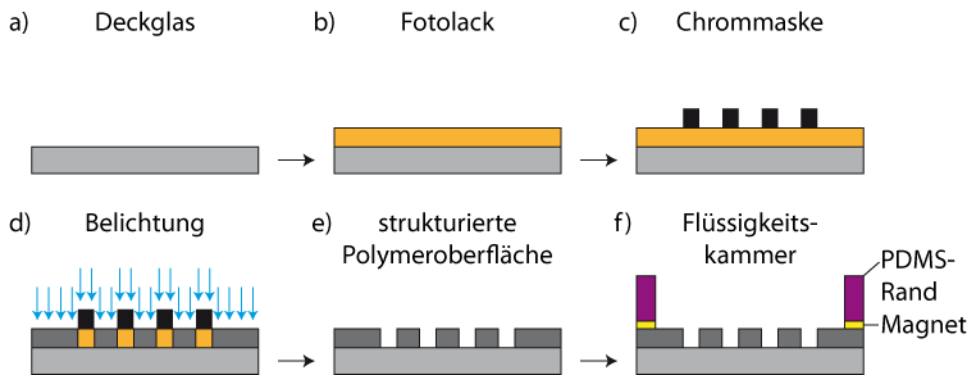


Abb. 17: Herstellung der Flüssigkeitskammer. Auf ein gereinigtes Deckglas (a) wird eine dünne Schicht Fotolack aufgebracht (b). Die Struktur einer Chrommaske (c) wird durch Belichtung (d) auf den Lack übertragen (e). Die Flüssigkeitskammer wird durch Verbindung eines PDMS-Rands mit der strukturierten Oberfläche komplettiert (f). Die im PDMS eingelassenen Magnete dienen der Verankerung der Kammer auf einem speziellen Probenteller.

Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet und durch Hinzufügen eines mit Vakuumpfett abgedichteten Teflonrands gebrauchsfertig gemacht.

Mittels Photolithographie können größere und tiefere Löcher in strukturierte Oberflächen eingebracht werden, die zudem in einem regelmäßigen Muster angeordnet sind. Dazu wird ein Deckglas 45 Minuten lang in einer aus einem Teil Schwefelsäure und zwei Teilen Wasserstoffperoxid bestehenden, kochenden Piranha-Lösung gereinigt und dreimal mit a.bidest. gewaschen. Auf das hydrophile Deckglas wird mittels Rotationsbeschichtung ein lichtempfindlicher, auf Epoxidharz basierender Su-8 5 Negativ-Fotolack aufgebracht (Abb. 17). Nach einer Hitzebehandlung, die das im Lack enthaltene Lösungsmittel entfernt, wird die Struktur einer dem Harz aufliegenden Chrommaske durch UV-Belichtung (365 nm) auf den Lack übertragen. Die belichteten Regionen werden durch eine wärmeinduzierte, säurekatalysierte Polymerisationsreaktion quervernetzt. Die unbelichteten Bereiche dagegen werden durch die anschließende Behandlung mit dem Su-8 Entwickler entfernt.

Auf dem mikrostrukturierten Deckglas wird ein 3 mm starker und 1 mm hoher Rand aus Polydimethylsiloxan (PDMS) aufgebracht (s. Abb. 17). Zunächst wird in Xylol gelöstes dimethylvinyliertes Siloxan mit einem Zehntelvolumen Platin-Katalysator (Sylgard[®] 184) vermischt, eine Stunde entgast und in eine Teflonform gegossen. In jede Ecke wird ein magnetischer Quader mit 2 mm Kantenlänge gelegt, damit die Flüssigkeitskammer rutschfest auf dem Probenteller verankert werden kann. Nach der einstündigen Polymerisation bei 70°C wird das PDMS-Elastomer vorsichtig der Teflonform entnommen, mit ein wenig flüssigem Siloxanmisch als Klebstoff auf dem mikrostrukturierten Deckglas aufgebracht und durch eine einstündige Inkubation bei 70°C fest verbunden. Die fertigen Flüssigkeitskammern können staubfrei mehrere Monate gelagert werden.

Vor der Kernpräparation wird die Oberfläche der Flüssigkeitskammern durch eine 30-minütige Plasmaätzung hydrophilisiert und durch eine mindestens einstündige Inkubation bei 4°C mit Poly-L-Lysin (1 mg/ml) beschichtet.

3.4.9 Herstellung der Dreiecksapertursonden

Die Güte der nahfeldoptischen Sonde bestimmt maßgeblich die Qualität der Messung. Der Öffnungswinkel beeinflusst die Lichtstärke der Sonde und der Aperturdurchmesser ihre optische Auflösung. Die Dichtigkeit des Metallfilms wirkt sich positiv auf das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung aus. Die Stärke der aufgedampften Metallschicht bestimmt die Fläche des Sondenplateaus. Die Vergrößerung des Plateaus verringert die topographische Auflösung.

Detaillierte Angaben zum Herstellungsprozess und der Sondencharakterisierung findet man in Diebel (2006). In der folgenden Beschreibung sind die Herstellungsschritte kurz dargestellt.

Die Dreiecksapertursonde wird durch Brechen eines gereinigten Deckglases hergestellt. Das Glas wird mit einem Diamantmesser parallel zu einer Kante eine Drittel Kantenlänge weit eingeritzt und durch leichten Druck gebrochen. Genauso wird eine zweite Bruchkante erzeugt, die orthogonal zur ersten verläuft, wobei im Schnittpunkt der beiden Bruchkanten eine dritte, senkrecht durch das Glas verlaufende Kante entsteht. Diese Quaderspitze bildet den Körper der zukünftigen Sonde, der zwecks Massenreduktion auf eine Kantenlänge von unter einem Millimeter getrimmt wird. Anschließend wird gegenüber der Quaderspitze eine Glasfaser im Winkel von 45° mit UV-härtendem Kleber befestigt, wodurch ein lichtdurchlässiges Prisma entsteht, das der Lasereinkoppelung dient. Die Sonde wird in einer Elektronenstrahl-Verdampfungsanlage mit einer 130-150 nm starken Aluminiumschicht bedampft und für die Abstandskontrolle auf einer piezoelektrischen Stimmgabel befestigt, die ihrerseits auf einem Metallplättchen angebracht wird. Die Apertur wird entweder durch die Entfernung der Spitze mit einem fokussierten Ionenstrahl oder durch kontrolliertes Drücken gegen eine harte Oberfläche erzeugt, wobei der Aluminiumfilm zur Seite gedrängt und das Plateau verbreitert wird. Anschließend wird die Glasfaser entfernt und die Sonde nach Einbau in den SNOM-Kopf charakterisiert.

3.4.10 Messungen am nahfeldoptischen Mikroskop

Nahfeldoptische Messungen an biologischen Systemen sind insbesondere unter Flüssigkeit sehr selten (Höppener et al., 2005) und speziell an freitragenden Strukturen nicht bekannt. Ein wichtiges Erfolgskriterium für derartige Untersuchungen ist die Stabilität des Systems, da während der Rasterung der Probe auftretende Drifte die Messung beeinflussen und das Mess-

ergebnis beeinträchtigen. Die erste Hürde stellt allerdings die Annäherung des Sondenplateaus auf wenige Nanometer an die Membran ohne Kraftabstandskontrolle dar.

Zunächst werden in einer DiI- oder Alexa Fluor[®] 532-markierten Kernmembranpräparation Tröge mit eben gespannten Membranen gesucht. Nach dem Auffinden einer geeigneten Probenstelle wird das über Nacht bei 4°C gelagerte Präparat im Gegensatz zu den frischen Präparationen für drei Minuten mit 0.05% (v/v) Tween in KP behandelt und anschließend dreimal mit KP gespült. Nach der Kontrolle des Flüssigkeitsspiegels in der Messkammer wird der SNOM-Kopf mit der Sonde aufgesetzt. Für detaillierte Informationen zur Justage der Sonde im SNOM-Kopf wird auf die Diplomarbeit von D. Diebel (2006) verwiesen. Die Dreiecksapertursonde wird mittig über dem Loch platziert und mit Hilfe eines im SNOM-Kopf eingebauten Elektromotors bis auf 5 µm über die Kernmembran abgesenkt. Anschließend wird der Tisch zuerst in 1 µm und später in 200 nm Schritten angehoben. Die Annäherung wird mittels einer Digitalkamera überwacht und gestoppt, sobald sich die Kernmembran und das Sondenplateau in einer Fokusebene befinden. Nach Feinjustage der Lasereinkopplung in das Prisma der Sonde wird die Rasterung der Probenoberfläche gestartet und bei Bedarf eine auftretende Drift korrigiert. Bei doppelt gefärbten Präparaten wird nach einer erfolgreichen Aufnahme die Laserlinie über eine Einkopplungsmimik gewechselt und nach erneuter Feinjustage der Lasereinkopplung dieselbe Probenstelle gerastert.

Nach Beendigung der Messung wird zunächst der Tisch vollständig abgesenkt, bevor die Sonde über den Elektromotor im SNOM-Kopf zurückgezogen wird. Anschließend wird der SNOM-Kopf abgenommen und die Probe gewechselt. Bei intakter Sonde kann diese für eine weitere Messung verwendet werden, andernfalls wird sie ebenfalls ausgetauscht.

4 Ergebnisse

4.1 Rekombinante Expression von XLef-1 und XTcf-1

Für die Untersuchung des Kerntransports mittels nahfeldoptischer Mikroskopie wurden heterolog exprimierte Proteine eingesetzt. Dabei stellte die Induktion der HMG-Box-Transkriptionsfaktoren XLef-1 und XTcf-1 im präparativen Maßstab eine besondere Herausforderung dar, da sie rekombinant sowohl in Bakterien als auch in eukaryotischen Zellen nur schwach exprimiert werden (Dr. A. Schambony und Prof. Dr. M. Waterman, persönliche Mitteilungen). Die niedrige Expressionsrate ist für elektrophoretische Mobilitätsprüfungen (EMSA) (Pukrop et al., 2001) oder Untersuchungen mittels Immun-Blot (PD Dr. D. Gradl, persönliche Mitteilung) hinreichend. In der nahfeldoptischen Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (noFCS) benötigt man dagegen aufgrund des kleinen, evaneszenten Detektionsvolumens fluoreszent markierte Proteine im mikromolaren Maßstab.

4.1.1 Klonierung der Expressionskonstrukte und deren Induktion

In der vorliegenden Arbeit wurden XLef-1 und XTcf-1 aus den zur Verfügung stehenden Konstrukten in geeignete Expressionsvektoren umkloniert. Der Vektor pQE-30 besitzt ein T5-Promotor-Transkriptions-Translationssystem, das durch zwei *lac*-Operatorsequenzen die basale Expression des Fusionsproteins effizient reprimiert. Im Expressionssystem des Vektors pRSET dagegen steuert der *lac*-Repressor die Expression der T7-RNA-Polymerase, die unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors als Prophage (λ DE3) in den Expressionsstamm integriert wurde. Die Expression des Fusionsproteins wiederum steht unter der Kontrolle des T7-Promotors.

Die XLef-1-cDNA wurde in einer PCR derart mit terminalen *XhoI*-Schnittstellen versehen, dass sich nach Subklonierung und Amplifikation in pGEM[®]-T (Promega) die kodierende Sequenz in pRSET im Leseraster der N-terminalen Polyhistidin-Markierung befand und C-terminal die Aminosäuren RGSC die Proteinsequenz beendete. Die korrekte Insertion wurde durch einen Verdau mit *XhoI* überprüft, bei dem zwei Fragmente von 1.1 und 2.9 kb entstehen (Abb. 18d), und durch Sequenzierung verifiziert.

Des Weiteren wurden XLef-1 und XTcf-1 in pQE-30 kloniert, wobei XLef-1 C-terminal um die Aminosäuren RGSC und XTcf-1 um ASC erweitert wurden. Dazu wurden beide cDNAs mittels PCR amplifiziert und durch geeignete Primer 5' der kodierenden Sequenzen eine *KpnI*- sowie 3' eine *Sall*-Schnittstelle so eingefügt, dass zwischen dem Leseraster der N-terminalen Polyhistidin-Markierung und dem der C-terminal zu insertierenden Fragmente keine Verschiebung auftrat. Nach dem *KpnI*-*Sall*-Restriktionsdoppelveidau wurden die DNA-

Fragmente gerichtet in pQE-30 kloniert. Die korrekte Insertion wurde für XLef-1 durch einen Verdau mit *EcoRI* überprüft. Das erwartete Bandenmuster (766 und 3822 bp) stimmte mit dem beobachteten überein (Abb. 18d). Die Klonierung von XTcf-1 in pQE-30 wurde durch eine Restriktionsanalyse mit *SacI* validiert, wobei abermals die erwarteten Banden (1054 und 3507 bp) auf dem Agarosegel zu sehen waren. Die Sequenzierung der beiden Konstrukte förderte für das XTcf-1 pQE-30-Konstrukt eine Punktmutation an Position 225 (Methionin zu Threo-

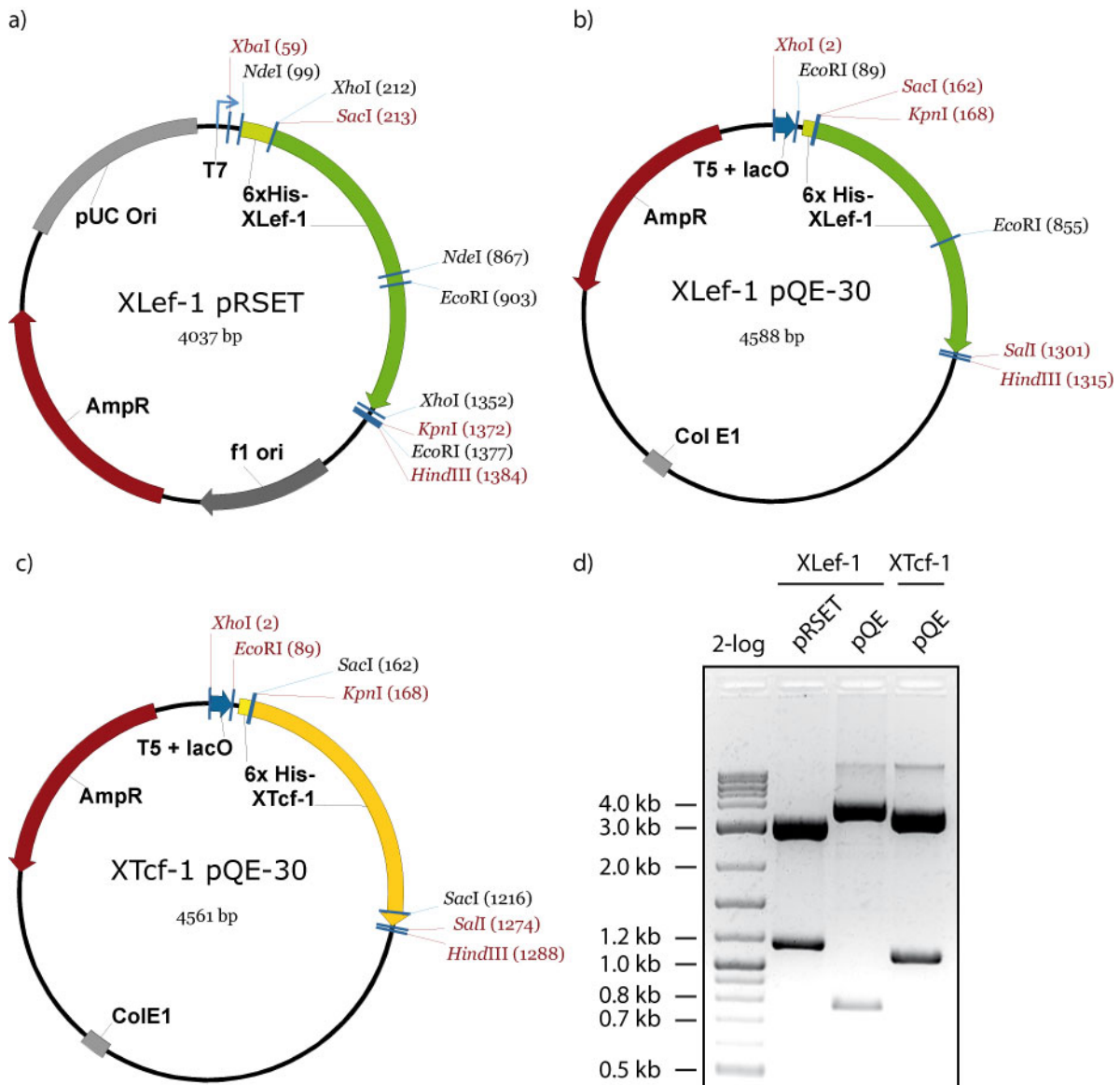


Abb. 18: Plasmidkarten und Restriktionsverdau der klonierten Expressionskonstrukte. Die XLef-1-DNA wurde C-terminal um die Peptidsequenz RGSC erweitert und über *XhoI* in den Vektor pRSET (a) bzw. über *KpnI* und *SalI* in den Vektor pQE-30 (b) inseriert. Die C-terminal um die Peptidsequenz ASC verlängerte XTcf-1-DNA wurde über *KpnI* und *SalI* in pQE-30 (c) ligiert. Alle Fusionsproteine tragen N-terminal eine 6xHis-Affinitätsmarkierung. (d) Der Restriktionsverdau des XLef-1 pRSET Konstrukts mit dem Enzym *XhoI* schneidet das insertierte Fragment (1.14 kb) aus dem Vektor (2.9 kb). Das Enzym *EcoRI* spaltet das XLef-1 pQE-30-Konstrukt in zwei Fragmente (766 bp und 3.8 kb). Das XTcf-1 pQE-30-Konstrukt wird durch das Restriktionsenzym *SacI* ebenfalls in zwei Fragmente geteilt (1054 bp und 3.5 kb). Als Größenstandard wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker 2-log auf dem 1.5%igen Agarosegel aufgetragen.

nin) zu Tage, wohingegen das XLef-1 pQE-30-Konstrukt keine Veränderungen aufwies.

Die Induktionen der XLef-1 und XTcf-1 pQE-30-Konstrukte im *E. coli*-Stamm M15 ließen sich ebenso wie die Induktion von XLef-1 pRSET in BL21 (DE3)-Zellen nicht auf einem Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel visualisieren (Abb. 19). Für die XLef-1-Fusionskonstrukte wurden aufgrund der cDNA Molekulargewichte von 46.6 kDa (pRSET) und 44 kDa (pQE-30) berechnet (Tab. 14, Anhang 8.2). Immun-Blot-Analysen zeigen XLef-1 im Bereich von 55 kDa (Abb. 21b und PD Dr. D. Gradl, persönliche Mitteilung). Das XTcf-1-Fusionsprotein wird aufgrund seines berechneten Molekulargewichts von 43.4 kDa nach der elektrophoretischen Auftrennung in derselben Größe wie XLef-1 erwartet.

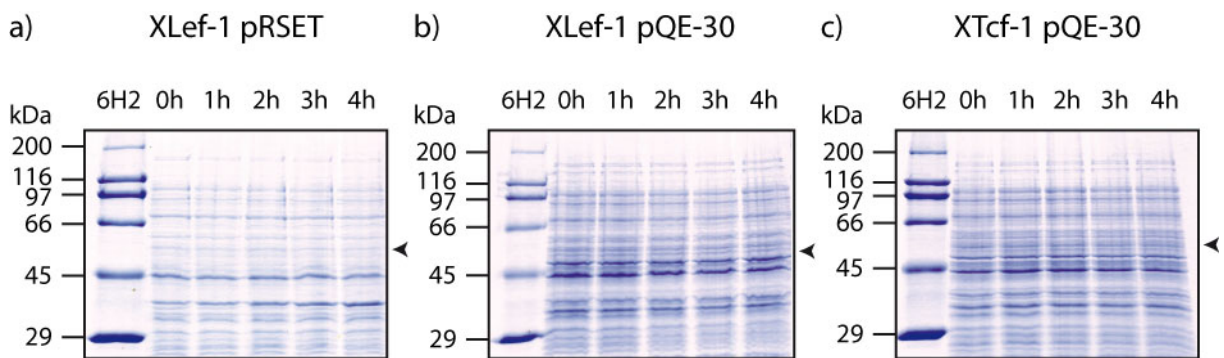


Abb. 19: Die Induktion der klonierten Konstrukte zeigte keine nennenswerte Expression der Fusionsproteine. XLef-1 pRSET (a) wurde mit 1 mM IPTG vier Stunden lang bei 30° C in BL21 (DE3)-Zellen ($OD_{600} = 0.6$) induziert. Die Induktion von XLef-1 pQE-30 (b) und XTcf-1 pQE-30 (c) erfolgte in M15-Zellen. Keines der Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgelle zeigte eine im Laufe der Induktion stärker werdende Bande in der erwarteten Größe (Pfeilspitze). Als Größenstandard wurde der Proteinstandard SDS-6H2 (Sigma GmbH) aufgetragen.

β -Catenin als der aktivierende Teil des heterodimeren β -Catenin-Lef/Tcf-Komplexes dagegen wird in BL21 (DE3)-Zellen bereits nach einer Stunde deutlich sichtbar exprimiert (Abb. 20). Die vierstündige Induktion bei 30°C lieferte eine für die chromatographische Aufreinigung hinreichende Masse rekombinant exprimierter Fusionsproteine.

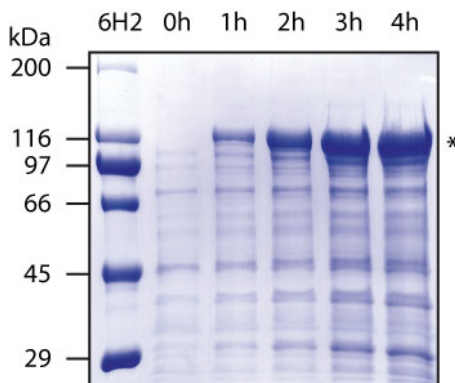


Abb. 20: β -Catenin wird in BL21 (DE3)-Zellen stark exprimiert. Das GST-Fusionsprotein wurde mit 1 mM IPTG vier Stunden lang bei 30°C induziert. Bereits nach einer Stunde war die Expression von β -Catenin zu sehen (Sternchen). Die Proteinzunahme innerhalb der vierten Stunde war weniger stark als zuvor, so dass für die rekombinante Expression von β -Catenin eine Induktionsspanne von vier Stunden als hinreichend anzusehen ist. Als Größenstandard wurde SDS-6H2 (Sigma GmbH) aufgetragen.

Der schlechten Induktion von XLef-1 und XTcf-1 können mehrere Ursachen zugrunde liegen. Möglicherweise interagiert die HMG-Box als positiv geladene DNA-Bindungsstelle mit genomischer DNA und reprimiert die Transkription bakterieller Gene oder sie bindet Polyanionen, wie beispielsweise tRNAs, und beeinträchtigt dadurch biochemische Prozesse innerhalb der Wirtszelle. Darüber hinaus kann die Translationsrate von XLef-1 und XTcf-1 durch die Existenz bestimmter Codons limitiert werden, die von in *E. coli* selten vorkommenden tRNAs erkannt werden. Auch der Mangel an geeigneten Chaperonen könnte durch Missfaltung zur Degradation des Zielproteins führen oder ionische Interaktionen durch fehlende Maskierung der HMG-Box fördern. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors an Lef-1-Bindungs-elemente innerhalb der Gensequenz spezifisch die eigene Transkription reprimiert.

Die fundamentale Mutation der HMG-Box stellt dabei keine Lösung der Expressionsproblematik dar, weil dadurch die Besonderheit dieser Transkriptionsfaktoren zerstört würde und dies dem Einsatz eines trunkierten oder gar eines artifiziellen Proteins gleich käme.

4.1.2 Optimierung der Induktion durch unterschiedliche *E. coli* Stämme

Die Codonanalyse der XLef-1-Sequenz zeigte, dass sieben der achtzehn Arginine als agg codiert waren und damit von einer in *E. coli* seltenen tRNA erkannt wurden. Insbesondere die beiden direkt aufeinanderfolgenden Arginine in der HMG-Box stellten dadurch einen möglichen translationalen Engpass dar, der im Extremfall zum Kettenabbruch führen kann. Die Gensequenz von XTcf-1 beinhaltet das Codon agg viermal, wovon drei Arginine in der HMG-Box lagen (s. Anhang 8.1).

Der Bakterienstamm Rosetta™ besitzt tRNAs für eukaryotische, in *E. coli* seltene Codons

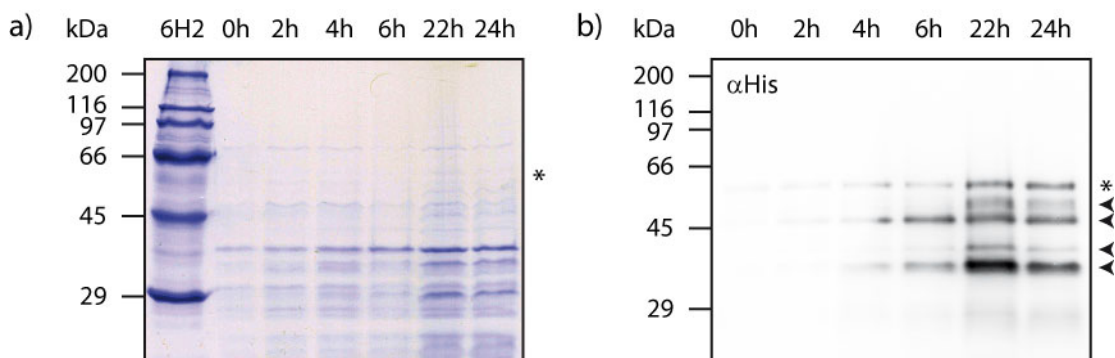


Abb. 21: XLef-1 (pQE-30) wurde im *E. coli* Stamm Rosetta™ langsam und schwach exprimiert. XLef-1 wurde mit 1 mM IPTG bei 25°C in Rosetta™-Zellen induziert. Das mit Coomassie gefärbte Polyacrylamidgel (a) zeigte innerhalb von sechs Stunden keine Proteinbande in der erwarteten Größe (Sternchen). Die schwache Expression von XLef-1 wurde erst auf dem Immun-Blot (b) mit einem α His-Antikörper sichtbar. Die schneller migrierenden Banden zeigten den Kettenabbruch während der Translation oder die Degradation des Zielproteins (Pfeilspitzen). Als Größenstandard wurde der Proteinstandard SDS-6H2 (Sigma GmbH) aufgetragen.

unter der Kontrolle der endogenen Promotoren. Die Expression von XLeF-1 pQE-30 in diesem Stamm war auf einem mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel ebenfalls nicht zu sehen (Abb. 21a). Der Immun-Blot jedoch zeigte eine schwache Induktion des Fusionsproteins, die 22 Stunden nach Induktionsbeginn prominent wurde (Abb. 21b). Die niedermolekularen Banden auf dem Immun-Blot wurden im Laufe der Induktion ebenfalls stärker und stammten möglicherweise von translationalen Kettenabbrüchen des XLeF-1-Fusionsproteins (pQE-30) oder stellten Degradationsprodukte dar.

Auch der Einsatz weiterer Bakterienstämme wie beispielweise BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RIPL, Origami™ B oder Rosetta gami™ brachte keine bessere Induktion. Ferner führten Veränderungen der Kulturdichte, der Induktionstemperatur in einem Bereich zwischen 20°C und 30°C, der IPTG-Konzentration und der Induktionszeit zu keiner signifikanten Verbesserung des Induktionsergebnisses.

4.1.3 Induktion von XLeF-1 in Gegenwart von Importinen als mögliche Chaperone

Die Mitglieder der Importin β -Superfamilie sind nicht nur essentielle Faktoren des Kerntransports, sondern binden im Zytoplasma basische Proteine wie beispielsweise Histone oder ribosomale Proteine und verhindern dadurch deren Präzipitation durch Polyanionen wie tRNAs (Jäkel et al., 2002). Nach Translokation durch die Kernpore werden die basischen Proteine an Chaperone des Zellkerns wie CAF-1 oder Nucleoplasmin im Falle der Histone (Philpott et al., 2000) übergeben oder möglicherweise von den Importinen bis an ihren Bestimmungsort eskortiert. Infolgedessen bieten sich Importine als eukaryotische Chaperone zur Maskierung der HMG-Box an.

Um einen potentiellen Effekt der Importine auf die Induktion von XLeF-1 ausfindig zu machen, wurde XLeF-1 zusammen mit denselbigen koexprimiert. Vor der Induktion eines einzelnen Klonierungsereignisses wurde die Präsenz der transformierten Plasmide mittels PCR verifiziert.

Die gemeinsame Induktion von XLeF-1 pRSET und Importin $\alpha 2$ in BL21 (DE3)-Zellen zeigte im Immun-Blot eine starke Expression von Importin $\alpha 2$ (Abb. 22b) und zwei schneller migrierende Banden im α LeF-Immuno-Blot (Abb. 22a), die möglicherweise Degradationsprodukte von XLeF-1 darstellten. Die Expressionsbande der erwarteten Größe fehlte. Bei der Koexpression von XLeF-1 pQE-30 und Importin β in M15-Zellen dagegen wurde nicht nur Importin β , sondern auch XLeF-1 exprimiert (Abb. 22). Bei der Dreifachexpression von XLeF-1 pQE-30, Importin $\alpha 3$ und β in M15-Zellen stellte sich der Effekt von Importin $\alpha 3$ auf die Expression von XLeF-1 je nach eingesetztem Antikörper unterschiedlich dar. Im α LeF-

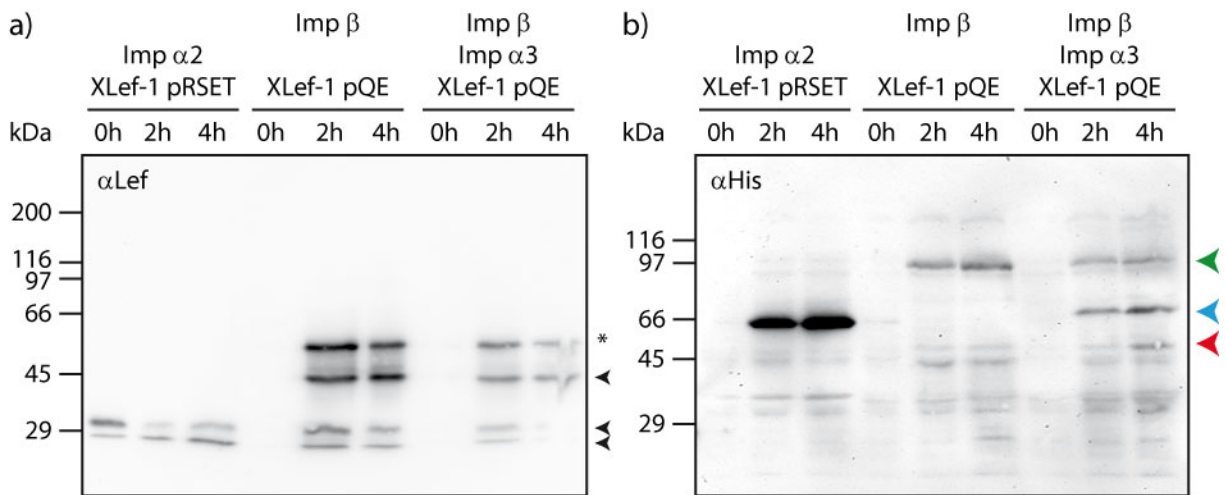


Abb. 22: Importin β stabilisiert als natürliches Chaperon die Expression von XLeF-1. Importin α 2 (blaue Pfeilspitze) wurde bei der gemeinsamen Induktion mit XLeF-1 pRSET in BL21 (DE3)-Zellen stark exprimiert (b), wobei es keinen stabilisierenden Effekt auf XLeF-1 ausübte (a). Importin β dagegen wirkte ohne und gemeinsam mit Importin α 3 positiv auf die Expression von XLeF-1 (Sternchen) in M15-Zellen (a). Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 30°C. Anschließend wurde die Expression der Poly-Histidin-Fusionsproteine XLeF-1 (pRSET und pQE-30) (rote Pfeilspitze), Importin β (grüne Pfeilspitze), Importin α 2 und α 3 (blaue Pfeilspitze) mittels α His-Antikörper analysiert (b) und mit dem α Lef-Immuno-Blot verglichen. Die schneller migrierenden Banden (schwarze Pfeilspitzen) stellen möglicherweise Degradationsprodukte dar (a).

Immun-Blot waren die detektierten Banden der Dreifachinduktion insgesamt schwächer als bei der Doppelinduktion (Abb. 22a). Demgegenüber zeigte der α His-Immuno-Blot im Laufe der Dreifachinduktion eine deutliche Zunahme der Induktionsbanden in der für XLeF-1 erwarteten Größe und im Vergleich zur Doppelinduktion eine insgesamt stärkere Expression (Abb. 22b).

Infolge der qualitativen Verbesserung der XLeF-1-Induktion durch die Koexpression der Importine wurden weitere Transformationsereignisse auf ihr Expressionspotential untersucht. Zusätzlich wurde die Präsenz der transformierten Plasmide in der Kultur am Induktionsende mittels PCR überprüft (Abb. 23). Dabei konnte in einer Kultur XLeF-1 erstmals in Mengen

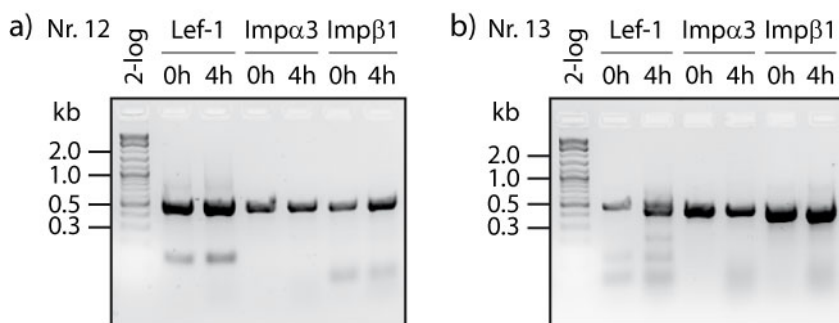


Abb. 23: Die Plasmide bleiben in der Gesamtkultur trotz identischer Resistenzgene erhalten. Einzelne Klonierungsereignisse wurden induziert und mittels PCR zu Beginn (0h) und am Ende (4h) der Induktion auf die Präsenz der transformierten Plasmide hin analysiert. In den dargestellten Induktionsansätzen 12 (a) und 13 (b) konnten alle drei Plasmide nachgewiesen werden. Als Größenstandard wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker 2-log aufgetragen.

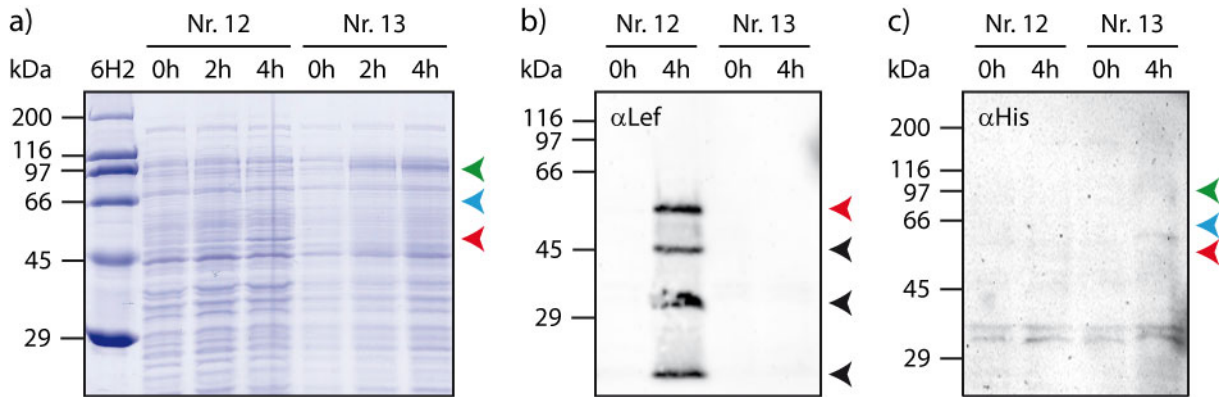


Abb. 24: Die gemeinsame Induktion von XLef-1, Importin α 3 und β 1 lässt sich mit den vorhandenen Plasmiden nicht steuern. Die auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (a) sichtbare Induktion von XLef-1 (rote Pfeilspitze, Nr. 12) in M15-Zellen mit 1 mM IPTG bei 25°C wurde durch den α Lef-Immuno-Blot bestätigt (b). Diese Expression erfolgte allerdings unabhängig von Importin α 3 (blaue Pfeilspitze) und Importin β (grüne Pfeilspitze), wie sowohl das Coomassie-gefärbte Gel (a) als auch der α His-Immuno-Blot (c) zeigen. Bei der parallel durchgeführten Induktion eines anderen Transformationsereignisses (Nr. 13) wurde keines der Fusionsproteine induziert. Die schneller migrierenden Banden in b) (schwarze Pfeilspitzen) stellen möglicherweise Degradationsprodukte dar. SDS-6H2 (Sigma GmbH) wurde als Größenstandard aufgetragen.

induziert werden, die mit Coomassie darstellbar sind, allerdings ohne nachweisbare Expression von Importin α und β (Nr. 12, Abb. 24). In einer anderen Kultur dagegen wurden Importin α und β in nachweisbaren Mengen induziert, dafür kein XLef-1. Somit ist zweifelhaft, dass durch die gleichzeitige Expression von XLef-1, Importin α und β die Induktion wesentlich verbessert werden kann.

4.1.4 Mutagenese putativer XLef-1-Bindungsstellen

Die kodierende XLef-1-Sequenz wurde mit Hilfe der „Transcription Element Search Software“ (TESS) auf Homologien zur Konsensussequenz der HMG-Box Faktoren [a(a/t)caa(a/t)g (van Beest et al., 2000)] untersucht. Dabei konnte ein potentielles Lef-1-Bindungs-element zwischen der β -Catenin-Bindungsstelle und der HMG-Box identifiziert werden (Abb. 25). Dieses wurde ohne Änderung der Aminosäuresequenz (SNK) mutagenisiert (tcaaaca nach agcaaca) und das Ergebnis durch Sequenzierung verifiziert.

Obwohl die Induktion von XLef-1 Mut pRSET in BL21 (DE3)-Zellen keine Verbesserung der Expression brachte, wurde das XLef-1 Mut pQE-30-Konstrukt im *E. coli* Stamm M15 bereits nach zwei Stunden deutlich exprimiert und war mit Coomassie darstellbar (Abb. 26a). Die immunologische Analyse dieser Induktion (Abb. 26b) zeigt im Vergleich zur Dreifachinduktion (Abb. 24b), dass durch Mutagenese des putativen Lef-1-Bindungselements die Stärke der drei schneller migrierenden Banden zu Gunsten des vollständigen Fusionsproteins reduziert werden konnte.

```

1  atgcctcagc tctctggagc cggggcggc aatgggggtg ggggggatcc tgagctgtgt
61  gccaccgatg agatgatccc ctttaaagat gaaggggatc cccaaaagga gaagatctat
121 gccgagatca gcaaccaga ggaggaagga gacctgcag atatcaagtc gtctctggtc
181 aatgagactg agattatccc cagcagcaac agtcacgaga tttccaggag aagactagac
241 tcttaccatg aaaaatcaag agaacatcca gaggatgcag gaaaacatcc ggatggaggc
301 ttatacagca aaggcccttc ttatactgga tacccaagot atatcatgat gccaaatatg
361 aataatgagc cttacatgtc aaatggatct ttgtctccac ccattccaag aacatcaaac
421 aaagtcccag tgggtgcagcc atcgcacgcc gtccatcctc taaccocact catcacttac
481 agtgacgagc actttgcacc aggagtacac ccatcacaca toccatcaga tatcaacaca
541 aagcaaggca tgcacaggca tcctcaagca ccagacctac ctacatttta cccaatgtcc
601 ccaggaagtg tgggccagat gacaccacca ttgggctggt atccacacca tatggtttct
661 ggtcctccgg gccctcacgc aactggaatt cctcaccag ctattgtcaa tcctcaggtt
721 aaacaagaac attcacacaa tgaccatgac ctaatgcaca tgaaccaca ccacgaacag
781 agaaaagagc aggaacccaa aagacctcac ataaagaaac ctttgaaatgc tttcatgttg
841 tatatgaaag aagtgagagc gaatgtagta gcagaatgta ctctcaaaga aagtgtctgcc
901 atcaaccaga ttctgggaag gaggtggcat gcattgtccc gggaggacca ggccaaatat
961 tatgagttag ctcgcaaaga aaggcaacta cacatgcagc tctatccagg atggtctgca
1021 agggacaact acggtaaaaa aaagaagagg aagcgggaga agttgcagga atccacatca
1081 ggtgcaggcc ccccaagaat gacagctgcc tacatcagag gcagctgctg a

```

Abb. 25: Putative XLeF-1-Bindungselemente in der XLeF-1-Gensequenz. Die kodierende XLeF-1-Sequenz wurde mit Hilfe der „Transcription Element Search Software“ (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) auf putative Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen untersucht. Dabei wurde eine XLeF-1-Bindungsstelle (rot) in der Sequenzmitte zwischen der β -Catenin-Bindungsstelle (hellblau) und der HMG-Box (orange) bzw. der Kernlokalisationssequenz (violett) entdeckt.

Somit verspricht die letzte der vier anfangs diskutierten Möglichkeiten zur Verbesserung der XLeF-1-Expression am ehesten Erfolg, XLeF-1 in einer für die chromatographische Aufreinigung hinreichenden Menge rekombinant zu exprimieren.

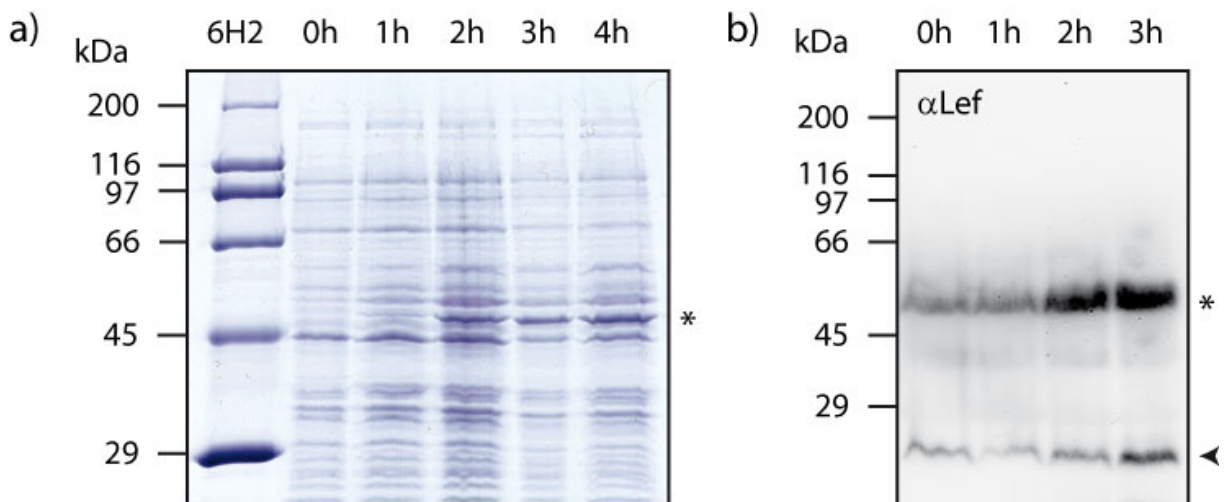


Abb. 26: Die Mutagenese eines Lef-1-Bindungselements im XLeF-1 pQE-30 Konstrukt ermöglicht dessen Expression. Nach der Inaktivierung des Lef-1-Bindungselements im XLeF-1 pQE-30-Expressionsvektor wurde die Expression von XLeF-1 in M15 Zellen mit 1 mM IPTG bei 30°C induziert. Das mit Coomassie gefärbte Polyacrylamidgel (a) zeigte zwei Stunden nach Induktionsbeginn die Zunahme einer Bande (Sternchen), die im Immun-Blot (b) durch den α Lef-1-Antikörper als rekombinant exprimiertes XLeF-1 bestätigt wird. Darüber hinaus sind die Degradationsbanden (Pfeilspitzen) im Vergleich zu denen in Abb. 24 deutlich reduziert. Als Größenstandard wurde der Proteinstandard SDS-6H2 (Sigma GmbH) aufgetragen.

4.2 Präparation der Transportfaktoren für Kerntransportmessungen

Zur Etablierung einer neuen Methode wie die nahfeldoptische Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (noFCS) ist es sinnvoll, zunächst möglichst gut charakterisierte Komponenten einzusetzen, um die Erwartungswerte leichter definieren und die Messergebnisse besser überprüfen zu können. Dafür bieten sich Kerntransportfaktoren wie Ntf2, Importin α und β zusammen mit dem artifiziellen Kargo GST-NLS-GFP (GNG) und der kleinen GTPase Ran an, die seit über zehn Jahren Gegenstand intensiver Forschung sind. Nach dem Funktionalitätsbeweis kann man sowohl die Transportdynamik anderer Proteine wie beispielsweise β -Catenin oder Lef-1 als auch den Effekt bestimmter Reagenzien auf den Transportmechanismus analysieren.

Für die chromatographische Aufreinigung der rekombinant exprimierten Fusionsproteine wurden zunächst die Induktionsbedingungen von GNG, Ntf2, Ran und Importin $\alpha 2$ optimiert (Tab. 6). Ferner wurde die spezifische GST-Aktivität von GST-Ntf2 (2 $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$) und GST-Ran (2.25 $\mu\text{M}/\text{min}/\mu\text{g}$) bestimmt, um die zur Abtrennung der Affinitätsmarkierung eingesetzte Protease Thrombin besser dosieren zu können.

Zur präparativen Ntf2-Aufreinigung wurden 7.5 g Bakteriensediment mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen (Abb. 27), wobei der GST-Ntf2-Anteil an der Gesamtproteinmasse des mittels Ultrazentrifugation geklärten Rohextrakts 2% (w/w) betrug (Tab. 7). Im ersten Durchfluss wurden von diesen 7.1 mg GST-Ntf2 25% (w/w) an der Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die Beladung konnte durch einen weiteren Durchgang auf 34% (w/w) gesteigert werden, so dass letztendlich 2.4 mg oder etwa 60 nmol GST-Ntf2 (41 kDa) gebunden waren. Durch den anschließenden Thrombinverdau wurden die 15 kDa großen Ntf2-Proteine nahezu vollständig von der Matrix abgespalten und eluiert, wobei durch die Thrombin-Entfernung mittels Benzamidin-Sepharose 11% (w/w) des Zielproteins verloren gingen. Die Glutathion-Sepharose wiederum wurde durch Elution des an der Matrix verblie-

Tab. 6: Experimentell ermittelte optimale Induktionsparameter der exprimierten Fusionskonstrukte. Die GST-Fusionsproteine wurden ebenso wie Importin $\alpha 2$ in BL21 (DE3) bei der angegebenen optischen Dichte OD_{600} mit 1 mM IPTG induziert. Die Induktionstemperatur und -dauer wurde ausgehend von den bekannten Werten optimiert.

Name	Vektor	Tag	OD_{600}	IPTG	Temp.	Dauer
GST-NLS-GFP	pGEX-5	GST	0.7	1 mM	30°C	4 h
GST-Ntf2	pGEX-2T	GST	0.6-0.8	1 mM	23°C	4 h
GST-Ran	pGEX-2T	GST	0.8	1 mM	25°C	3 h
Importin $\alpha 2$	pET-21a	6x His	0.6-0.8	1 mM	30°C	3 h

Tab. 7: Quantitative Analyse der Affinitätschromatographie von Ntf2. Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen aus Abb. 27a wurden mit dem Bradford'schen Verfahren bestimmt. Sowohl Masse als auch Stoffmenge an GST-Ntf2 im Rohextrakt und im zweiten Durchfluss (Dfl. 2) wurden durch die Messung der GST-Aktivität ermittelt. Die Ntf2-Stoffmengen nach dem Thrombinverdau (ÜS TV) und der Thrombin-Entfernung (ÜS BS) dagegen wurden ebenso wie die GST-Menge im Eluat unter Vernachlässigung der Reinheit aus der Proteinkonzentration errechnet.

	Rohextrakt	Dfl. 2	ÜS TV	ÜS BS	GST-Elution	
Masse (Protein)	350 mg	-	0.9 mg	0.8 mg	1.2 mg	0.5 mg
Masse (GST-Ntf2)	7.1 mg	4.7 mg	-	-	-	-
Stoffmenge	173 nmol GST-Ntf2	114 nmol GST-Ntf2	~60 nmol Ntf2	~53 nmol Ntf2	~46 nmol GST	~19 nmol GST

benen GST regeneriert.

Die nach der Thrombin-Entfernung geringe Ntf2-Konzentration wurde mittels Ionenaustauschchromatographie um den Faktor zehn gesteigert, wobei ebenfalls die Reinheit geringfügig verbessert werden konnte (Abb. 27). Der Kopplungsansatz wurde zur Entfernung der ungebundenen Fluorophore nach dem Reaktionsende einer Gelpermeationschromatographie unterzogen und das Ergebnis unter UV-Anregung dokumentiert. Abschließend wurden sowohl die Proteinkonzentration (0.01 mg/ml; 0.5 μ M) als auch die Kopplungsrate (0.5 Fluorophore pro Ntf2-Molekül) photometrisch bestimmt. Zusätzlich konnte durch Kalibration der Gelfiltrationssäule Superdex 75 mit Standardproteinen (Cabr e et al., 1989) sowohl das Molekulargewicht $MW = 33.1 \pm 0.8$ kDa als auch der hydrodynamische Radius $r_H = 3.28 \pm 0.03$ nm von Ntf2 im Eluat ermittelt werden. Der Vergleich mit dem aus der cDNA berechneten Molekulargewicht von 15.0 kDa zeigt, dass das fluoreszent markierte Ntf2 am Ende der chromatographischen Aufreinigung als Homodimer vorliegt.

Ferner wurden die Fusionsproteine His-Importin $\alpha 2$, His-Importin β und GST-Ran chromatographisch im mikromolaren Maßstab aufgereinigt, wobei die Affinitätsmarkierung von Ran analog zu GST-Ntf2 mittels Thrombinverdau und anschließender Benzamidin-Sepharose-Chromatographie entfernt wurde (Abb. 28). Zusätzlich zu Ntf2 wurde Importin $\alpha 2$ als ein weiterer Transportfaktor fluoreszent markiert (Kopplungsrate: 1/3 Fluorophor pro Importin $\alpha 2$ -Molekül).

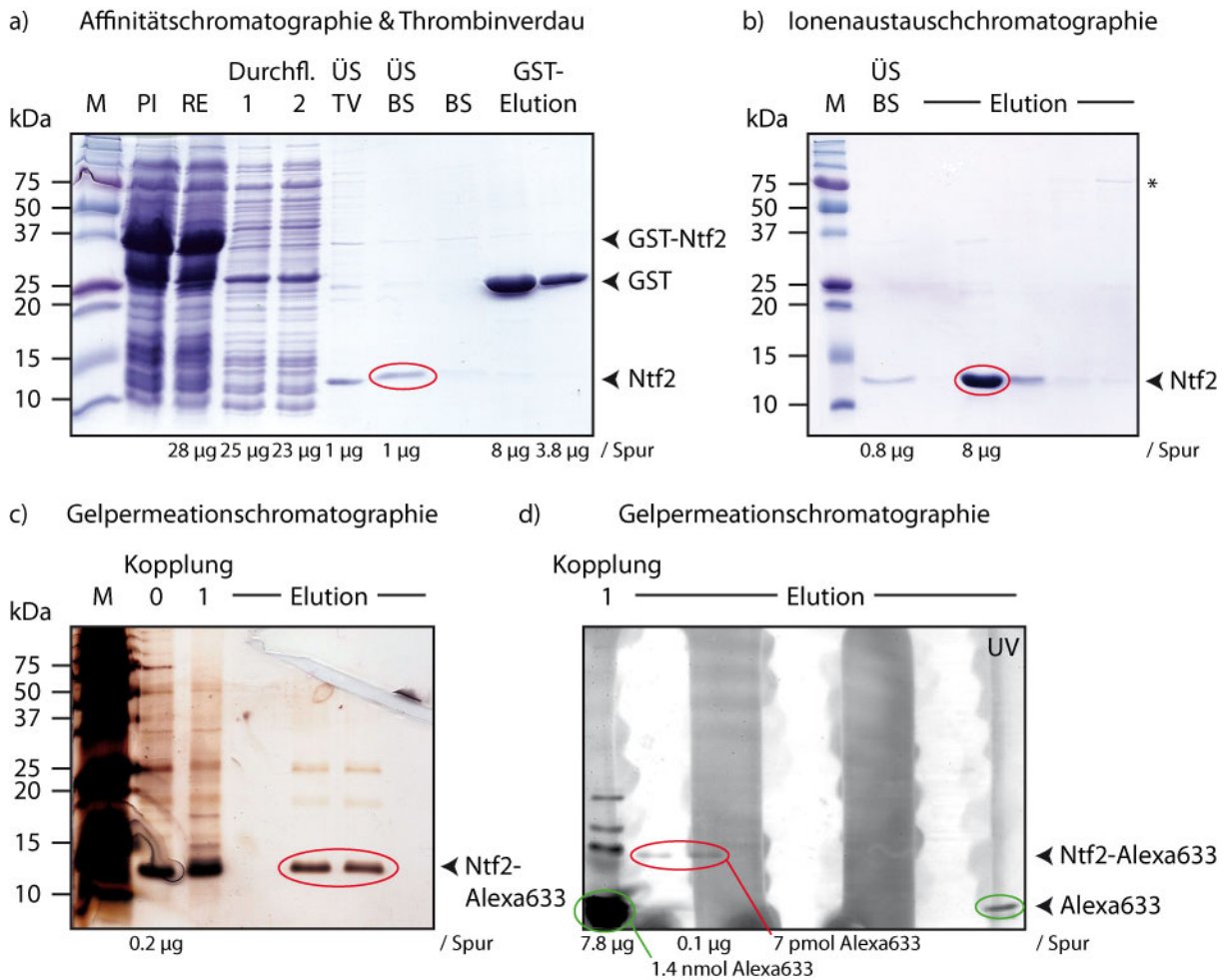


Abb. 27: Beispielhafte Darstellung der Aufreinigungsschritte von fluoreszent markiertem Ntf2. (a) Die induzierten Bakterien (7.5 mg Sediment; PI) wurden im Hochdruckhomogenisator lysiert. Der mittels Ultrazentrifugation geklärte Rohextrakt (RE) wurde sterilfiltriert und zweimal auf eine Glutathion-Sepharose-Säule geladen, wobei die GST-Ntf2-Bindung durch die Abnahme der entsprechenden Bande (GST-Ntf2 (41 kDa) Pfeilspitze) in den beiden Durchflüssen (Durchfl. 1 und 2) sichtbar wurde. Anschließend wurde Ntf2 mit 20 U Thrombin von der Matrix abgetrennt und eluiert (ÜS TV). Das Thrombin (37 kDa, 0.1-0.4 mg) wurde durch Bindung an Benzamidin-Sepharose (BS) aus dem Überstand (ÜS BS) entfernt. Die an der Matrix verbliebene GST wurde mit Glutathion eluiert (GST-Elution). Der Ntf2-haltige Überstand (ÜS BS) wurde mittels Ionenaustauschchromatographie (b) abermals von Kontaminanten (Sternchen) befreit und zehnfach konzentriert, bevor Ntf2 mit Alexa Fluor[®] 633 konjugiert wurde (c; Kopplung 0). Nach der Kopplungsreaktion (Kopplung 1) wurden sowohl ungebundene Fluorophore (grüne Ellipse; Alexa633) als auch langsamer migrierende Proteine durch Gelpermeationschromatographie (GPC) entfernt (c und d). In der Silberfärbung (c) wurden in den beiden vereinigten Fraktionen (rote Ellipse) zwei weitere, langsamer wandernde Banden sichtbar. Der Erfolg der Kopplungsreaktion und der Reinigung wurde unter UV-Anregung dokumentiert (d), wobei die ebenfalls konjugierten, langsamer wandernden Proteine im Gegensatz zum Alexa Fluor[®] 633-konjugierten Ntf2 (0.5 µM; Kopplungseffizienz: 0.5) durch die GPC verschwanden. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein[™] Standard (Bio-Rad GmbH) aufgetragen.

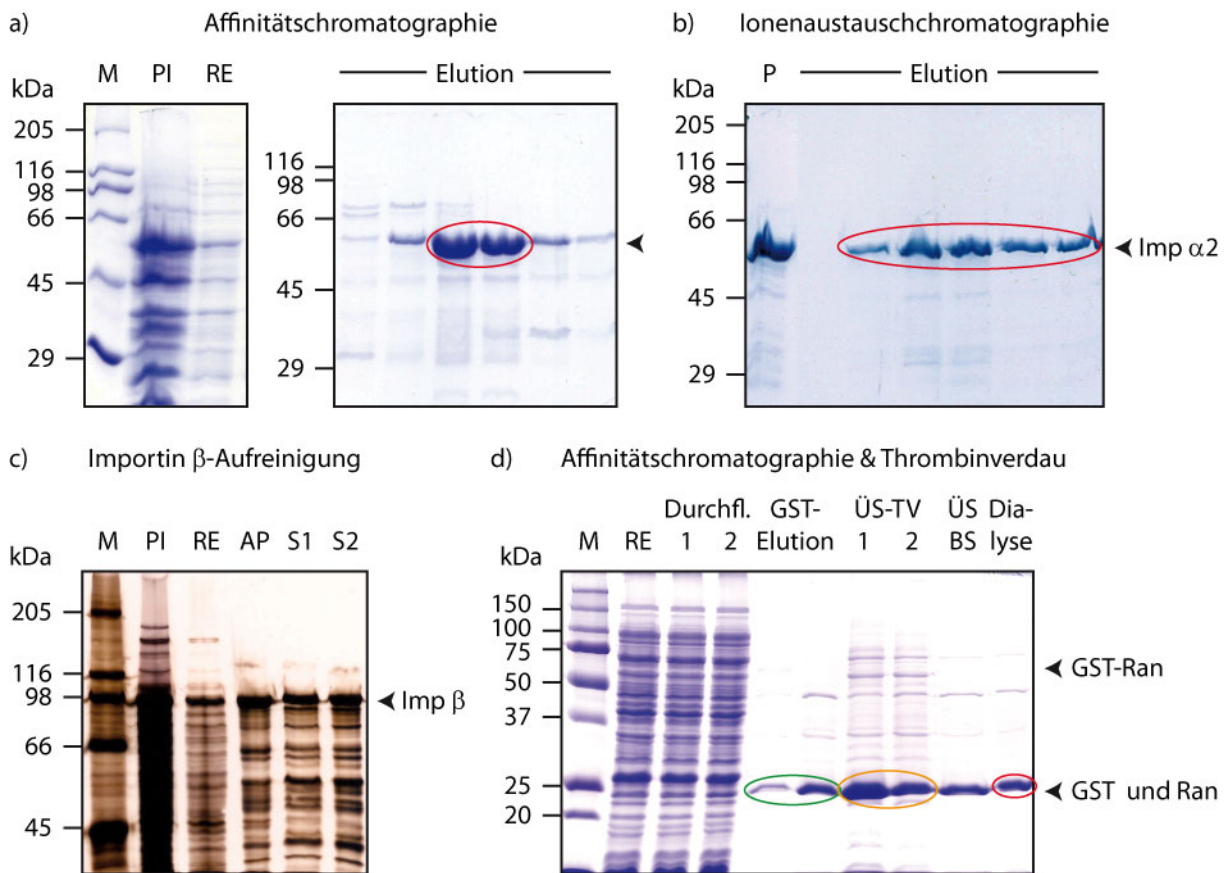


Abb. 28: Chromatographische Aufreinigung der rekombinant exprimierten Fusionsproteine His-Importin α , β und GST-Ran. (a) Nach der Lyse der mit Importin α_2 induzierten Bakterien (PI) wurde der Rohextrakt (RE) auf eine HisTrap-Säule geladen und das gebundene Importin α_2 mit einem Imidazolgradienten eluiert. (b) Anschließend wurden die vereinigten Fraktionen (rote Ellipse in a; P in b) einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen. (c) In der Silberfärbung waren die einzelnen Proteinbanden der mit Importin β induzierten Bakterienkultur (PI) nicht unterscheidbar. His-Importin β wurde aus dem Rohextrakt (RE) mittels Affinitätschromatographie extrahiert und die vereinigten Fraktionen (AP) durch Gelpermeationschromatographie umgepuffert, wobei sich die beiden analysierten Fraktionen (S1 und S2) in Gehalt und Reinheit kaum unterschieden. (d) GST-Ran wurde nach der Lyse (RE) in zwei seriellen Durchläufen (Durchfl. 1 und 2) an die Glutathion-Sepharose gebunden und mittels Thrombinverdau von der Matrix gelöst (US-TV 1 und 2). Nach jedem Durchlauf wurde die Matrix durch Entfernung der gebundenen GST regeneriert (GST-Elution). Die beiden Durchläufe (orangefarbene Ellipse) wurden vereinigt und zur Thrombin-Entfernung einer Affinitätschromatographie mit Benzamidin-Sepharose unterzogen. Anschließend wurde der Überstand (ÜS BS) gegen Transportpuffer dialysiert (Dialyse). Als Größenstandard wurden der Proteinstandard SDS-6H2 (Sigma GmbH) (a-c) und der Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad GmbH) (d) aufgetragen.

Für die Funktionalitätsprüfung der gereinigten Importine wurde ein artifizielles Kargomolekül, bei dem sich an die N-terminale GST-Domäne drei aufeinanderfolgende, starke SV40-Kernlokalisierungssignale und ein GFP anschlossen (GST-NLS-GFP, kurz GNG) (Marg et al., 2004), rekombinant exprimiert und chromatographisch aufgereinigt.

GNG besitzt aufgrund seiner Konstruktion aus zwei homodimerisierenden Domänen das Potential zur Polymerisation. Angesichts des Einflusses der Kargogröße auf die Translokationsdynamik wurde die Größe affinitätsgereinigter GNG-Fusionsproteine mittels Gelpermeationschromatographie untersucht, wobei in drei parallelen Ansätzen unterschiedliche Verfahren für den bakteriellen Aufschluss unter salzreichen Bedingungen eingesetzt wurden.

Im enzymatischen Aufschluss mit Bugbuster® (Novagen, Merck KGaA) wurde die bakterielle Zellwand durch Abbau der N-Azetylmuramidin-Bindungen mittels rLysozyme™ aufgelöst. Der Verdau chromosomaler DNA durch die Nuklease Benzonase® reduzierte die Viskosität des Rohextrakts. Diese schonende Lysis lieferte ausgesprochen große GNG-Polymere, deren Größe sich außerhalb des optimalen Trennungsbereichs der eingesetzten Gelfiltrations säule bewegte (Abb. 29). Demnach lag GNG in einem über 600 kDa großen Komplex vor.

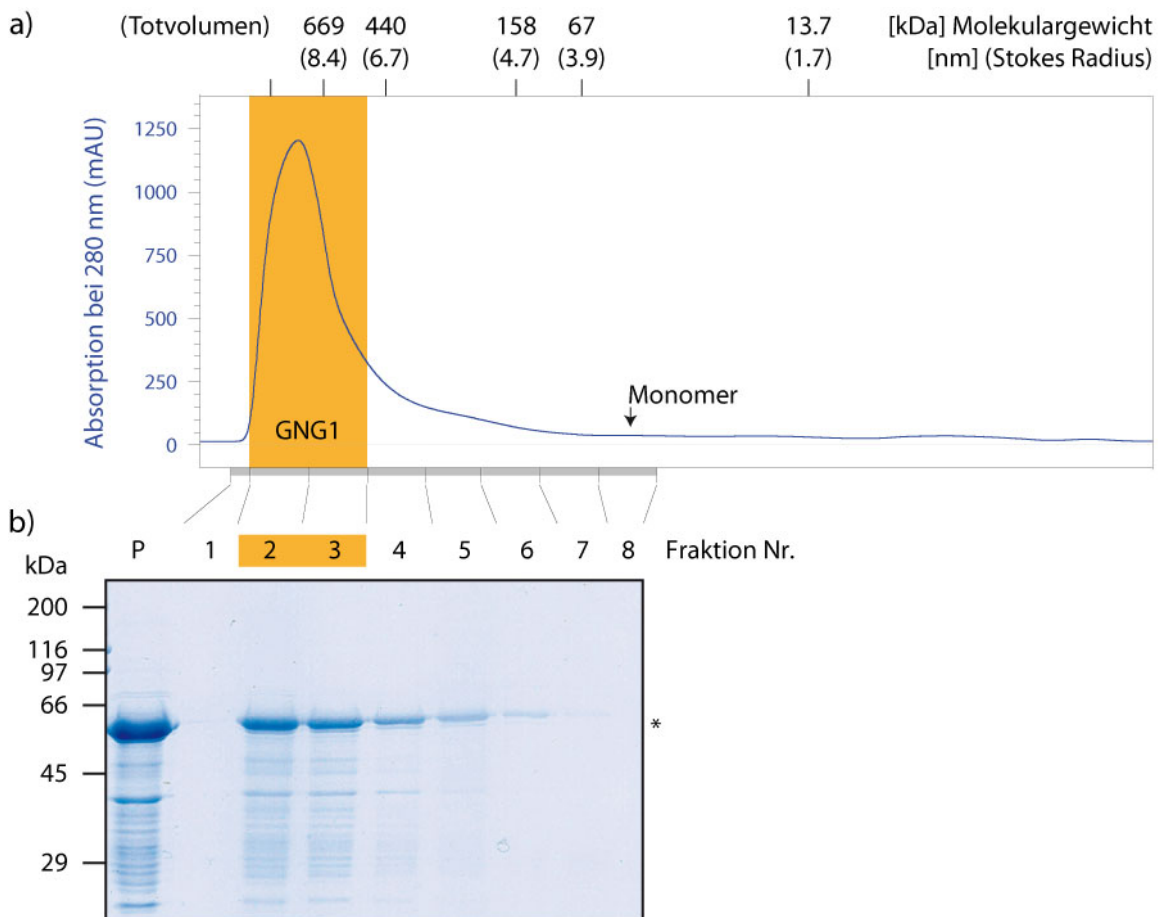


Abb. 29: Der enzymatische Zellaufschluss mit Bugbuster® (Novagen® Merck KGaA) setzt große multimere GNG-Polymere frei. Das Absorptionsmaximum im Chromatogramm (a) liegt außerhalb des optimalen Trennungsbereichs der Gelpermeationssäule von 10-600 kDa. Die beiden vereinigten Fraktionen Nr. 2 und 3 enthalten Polymere mit acht und mehr Untereinheiten. Das SDS-Polyacrylamidgel (b) zeigt von der aufgetragenen Probe (P) zu den gesammelten Fraktionen ein weitgehend unverändertes Massenverhältnis zwischen dem 59 kDa großen GNG (Sternchen) und den schneller wandernden Banden, wobei die Proteinmasse pro Spur entsprechend dem Chromatogramm (a) stetig abnimmt. Die Gesamtproteinmasse in den Fraktionen Nr. 1 und 2 beträgt 1.3 mg und entspricht 77% der aufgetragenen Probenmasse (P).

Des Weiteren waren schneller wandernde Proteinbanden in dem Komplex vorhanden, die von bakteriellen Proteinen oder GNG-Degradationen herrühren können (Abb. 29). Die beiden proteinreichsten Fraktionen (Nr. 1 und 2) wurden vereinigt. Sie enthalten 77% (w/w) der eingesetzten Proteinmasse und GNG-Polymere, bestehend aus acht und mehr Untereinheiten (Abb. 29). Aus 1.2 g Bakteriensediment wurden so 1.3 mg aufgereinigtes GNG gewonnen.

Der bakterielle Aufschluss mittels Ultraschall lieferte je nach Variation der Parameter GNG-Aggregate unterschiedlicher Größe. Kurze, harte Stöße von 75% Maximalleistung in drei Zyklen zu je 30 Sekunden führten zu zwei distinkten Aggregationsgrößen (Abb. 30). Einerseits wurden wie bei der enzymatischen Lyse über 600 kDa große Komplexe freigesetzt. Zusätzlich entstanden kleinere Aggregate mit einer Größe zwischen 120 und 270 kDa. Die

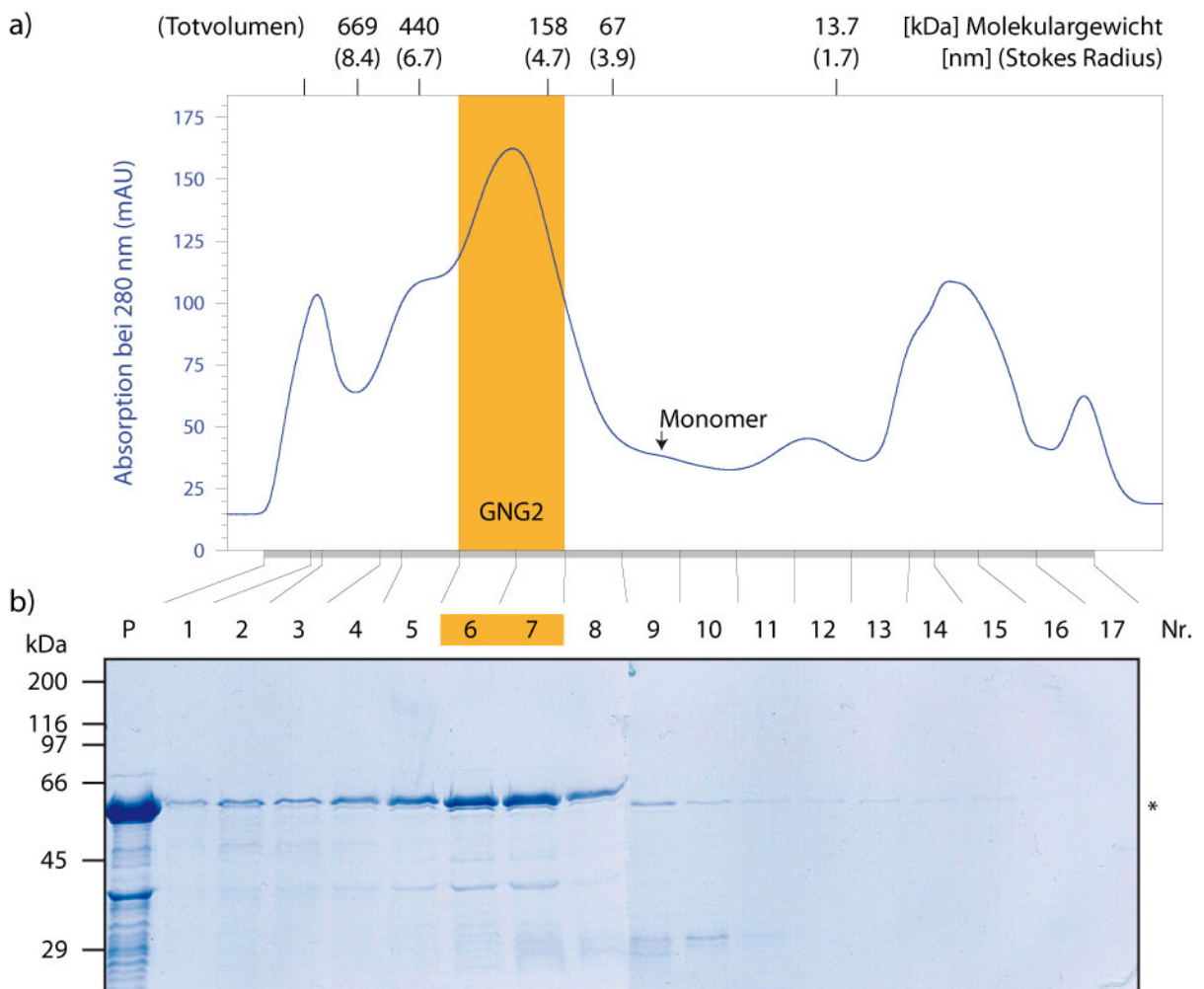


Abb. 30: Die GNG-Polymere werden durch Ultraschall verkürzt. Die Bakteriensuspension wurde dreimal 30 Sekunden lang bei 75% Leistung auf Eis sonifiziert. Zwischen den Zyklen wurde eine Minute pausiert. Das Chromatogramm der Gelfiltration (a) weist mehrere Absorptionsmaxima auf, die unterschiedlich große GNG-Polymere anzeigen (b). Die beiden Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden vereinigt. Sie überdeckten nominell einen Molekulargewichtsbereich von 118 bis 272 kDa. Das Absorptionsmaximum liegt bei 177 kDa und entspricht einem homotrimeren GNG-Komplex. Das Sternchen (b) markiert das monomere GNG (59 kDa). Die Gesamtproteinmasse in den Fraktionen Nr. 6 und 7 beträgt 0.4 mg und entspricht 35% der eingesetzten Probenmasse (P).

vereinigten Fraktionen (Nr. 6 und 7) enthalten 35% (w/w) der eingesetzten Proteinmasse (Abb. 30). Aus 1.1 g Bakteriensediment konnten somit 0.4 mg dimere bis pentamere GNG-Polymere aufgereinigt werden.

Viermal fünf Minuten lange Beschallung mit 20% Gesamtleistung dagegen erzeugte neben den über 600 kDa großen Komplexen eine gleichförmige Größenverteilung der GNG-Polymere (Abb. 31). Die vereinigten Fraktionen (Nr. 3-6) enthalten GNG-Aggregate größer 120 kDa. Mit einer gelpermeationschromatographischen Ausbeute von 78% (w/w) konnten aus 1.2 g Bakteriensediment 1.4 mg GNG gewonnen werden.

Die lange Ultraschallbehandlung erzielte im Vergleich zudem eine um den Faktor 1.75 größere Gesamtproteinausbeute nach der Ultrazentrifugation, während der schonende, enzymatische Aufschluss und die kurze, harte Beschallung mit 16 mg bakteriellen Proteinen pro Gramm Bakteriensediment gleichauf waren.

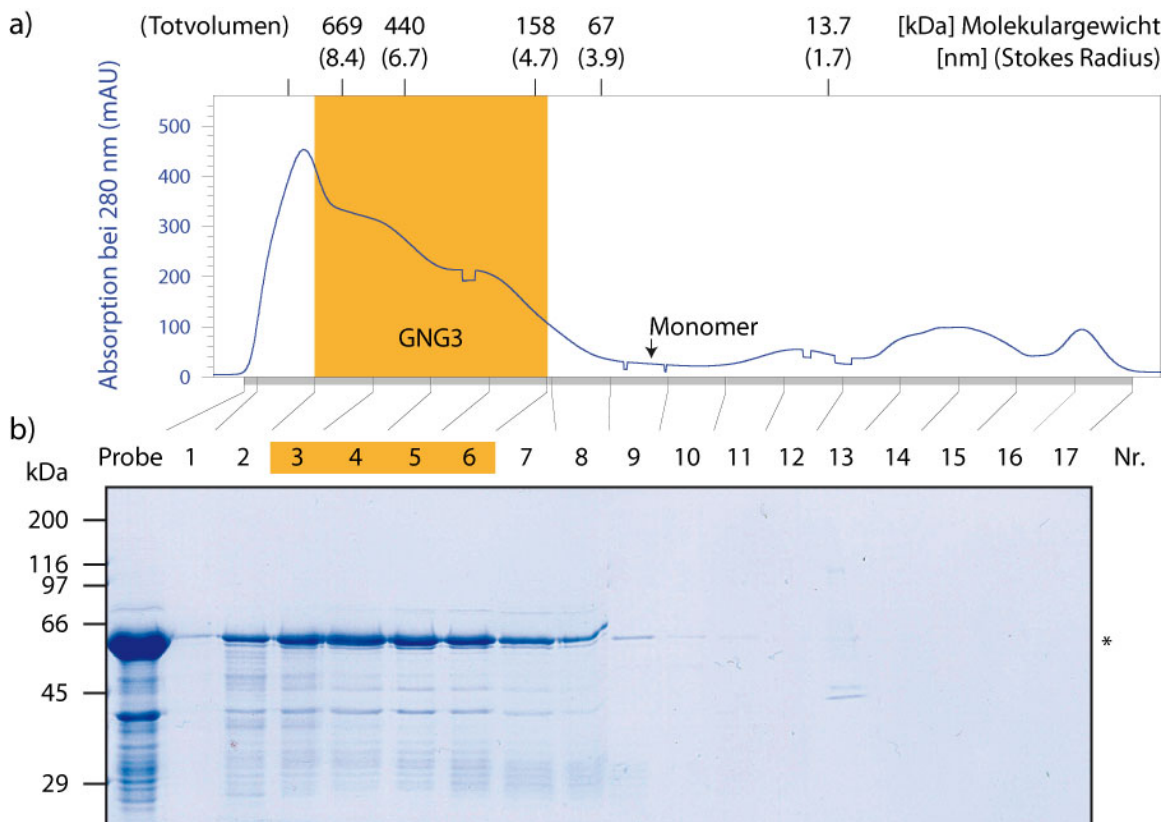


Abb. 31: Die Sonifizierungsenergie beeinflusst die Polymerlänge. Im dritten Ansatz wurde die Bakteriensuspension viermal fünf Minuten lang mit 20% Leistung und drei Minuten Pause zwischen den Zyklen sonifiziert. Das Chromatogramm (a) weist das charakteristische Maximum außerhalb des optimalen Trennungsbereichs auf, von dem die Absorptionslinie über zwei Sattelpunkte abfällt. Die numerische Größe der Polymere in den vereinigten Fraktionen Nr. 3 bis 6 ist größer als 127 kDa und die beiden Sattelpunkte entsprechen Polymeren, die aus etwa zehn bzw. vier Monomeren bestehen. (b) Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration wurden vereinigt. Das Sternchen markiert das monomere GNG (59 kDa). Die Gesamtproteinmasse im Zusammenschluss beträgt 1.4 mg und entspricht 78% der eingesetzten Probenmasse (P).

4.3 Funktionalitätstest der rekombinant exprimierten Proteine

Für die Funktionalitätsprüfung der heterolog exprimierten Proteine (Abb. 32) wurden sowohl ganze Oozytenkerne als auch mittels Digitonin permeabilisierte L-Zellen auf ihre Tauglichkeit getestet, wobei sich die zweite Methode als die robustere und zuverlässigere erwies.

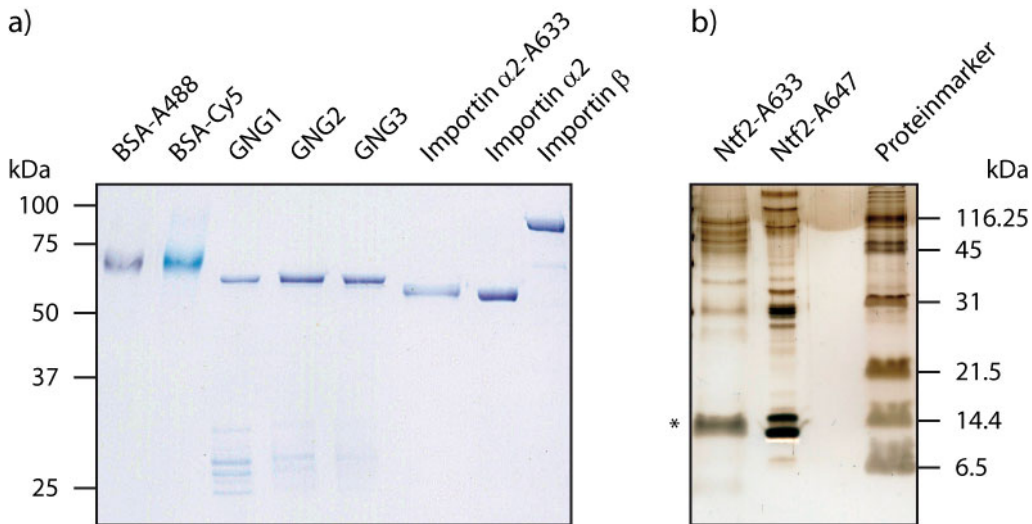


Abb. 32: Darstellung der in den Funktionalitätstests eingesetzten Proteine. (a) Das für die Permeabilitätskontrolle der L-Zellen verwendete, mit Alexa Fluor[®] 488 bzw. Cy5 konjugierte Rinderserumalbumin (BSA-A488 bzw. BSA-Cy5) wurde freundlicherweise von Dr. J.-P. Siebrasse zur Verfügung gestellt. Im Vergleich zu den kürzeren GNG-Komplexen (GNG2 und 3) zeigt das große GNG-Polymer (GNG1) einen geringfügig höheren Anteil schneller migrierender Banden. Das mit Alexa Fluor[®] 633 konjugierte Importin $\alpha 2$ (Importin $\alpha 2$ -A633) wandert aufgrund des Fluorophors etwas langsamer als die ungekoppelte Form. Von Importin β wurde wie auch von den anderen Proteinen jeweils ein μg pro Spur aufgetragen. (b) In der Silberfärbung werden beim Alexa Fluor[®] 633-konjugierten Ntf2 (Sternchen) einige langsamer wandernde Proteinbanden sichtbar, ebenso wie beim von Dr. J.-P. Siebrasse zur Verfügung gestellten, Alexa Fluor[®] 647-konjugierten Ntf2, das beim berechneten Molekulargewicht von 15 kDa eine bemerkenswerte Doppelbande aufweist. Die Stärke einer Bande des Proteinmarkers Broad Range Molecular Weight Markers (Bio-Rad GmbH) entspricht einer Proteinmasse von 2 μg in dieser Größe.

Vor Beginn der Funktionalitätstests wurde zunächst durch einen GST-Pulldown die Interaktion von GNG, Importin $\alpha 2$ und β *in vitro* bestätigt, wobei sich zeigte, dass erwartungsgemäß nur alle drei Proteine gemeinsam einen stabilen Komplex bilden (Abb. 33).

Anschließend wurde die Funktionalität der chromatographisch gereinigten Proteine an ganzen Oozytenkernen getestet. Das GNG-Fusionsprotein selbst ist zu groß, um mittels freier Diffusion alleine in den Zellkern zu gelangen (Abb. 34a). Wie die Akkumulation der Fluoreszenz im Oozytenkern zeigt, sind sowohl Importin $\alpha 2$ als auch Importin β funktional und hinreichend für den Import von GNG (Abb. 34b). Anstelle der rekombinant exprimierten Importine sind auch die im zytosolischen Extrakt vorhandenen Transportrezeptoren in der Lage, das artifizielle Kargo GNG zu importieren (Abb. 34c).



Abb. 33: GNG, Importin α 2 und β bilden *in vitro* einen trimeren Komplex. Importin α 2 oder Importin β binden alleine nicht an GNG. Erst alle drei Proteine zusammen bilden in einem äquimolaren Verhältnis einen stabilen Komplex, wobei die Importine nicht mit der Glutathion-Sepharose interagieren. Als Ladekontrolle wurden 8 μ g GNG, 13 μ g Importin α 2 und 22 μ g Importin β aufgetragen.

Bei dieser Funktionalitätsprüfung hatte sich die GNG-Konzentration als die kritische Größe herausgestellt. Eine geringe GNG-Konzentration verlangsamte den Import derart, dass die Akkumulation der Fluoreszenz im Kern nur schwach darstellbar war. Bei einer hohen GNG-Konzentration indes konnte aufgrund der Hintergrundfluoreszenz der Lösung die nukleäre GNG-Akkumulation nicht unmittelbar im Epifluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

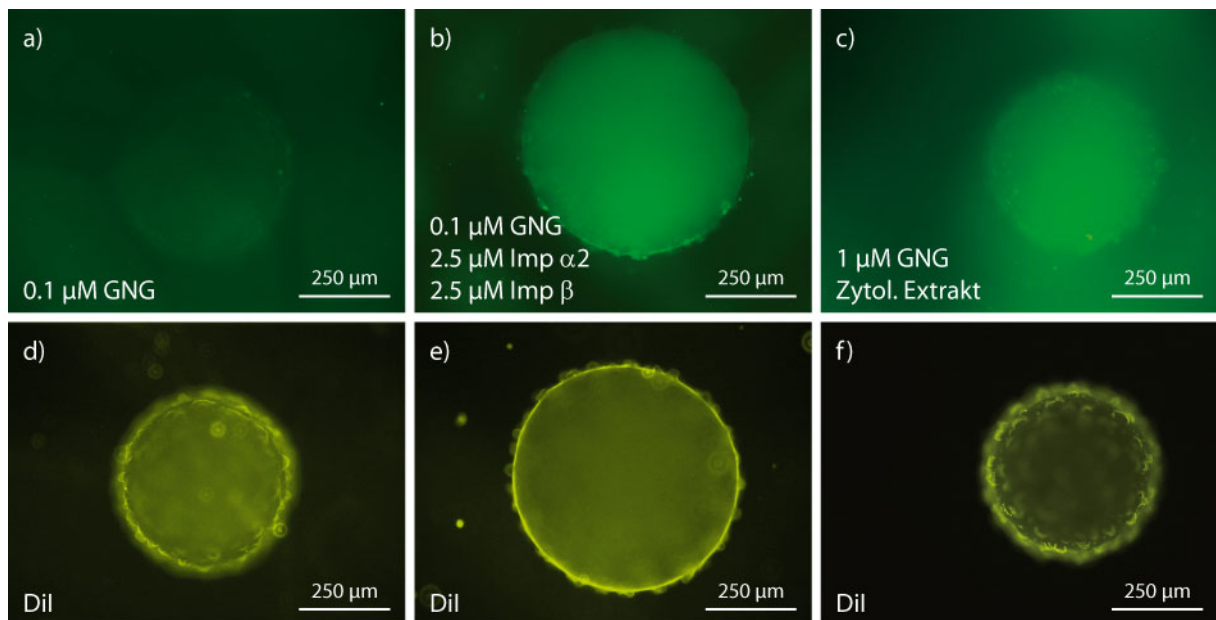


Abb. 34: GNG wird in Gegenwart von Importinen in den Oozytenkern importiert. (a) Das GNG-Fusionsprotein diffundiert nicht frei in den Zellkern. Der GNG-Import wird sowohl durch rekombinant exprimiertes Importin α 2 und β (b) als auch durch die im zytosolischen Extrakt enthaltenen Importine (c) vermittelt. Die aus Stadium VI Oozyten explantierten Zellkerne wurden für die mikroskopische Darstellung vor Versuchsbeginn mit Dil gefärbt (untere Reihe) und für die Dokumentation in eine GNG-freie Lösung transferiert (obere Reihe).

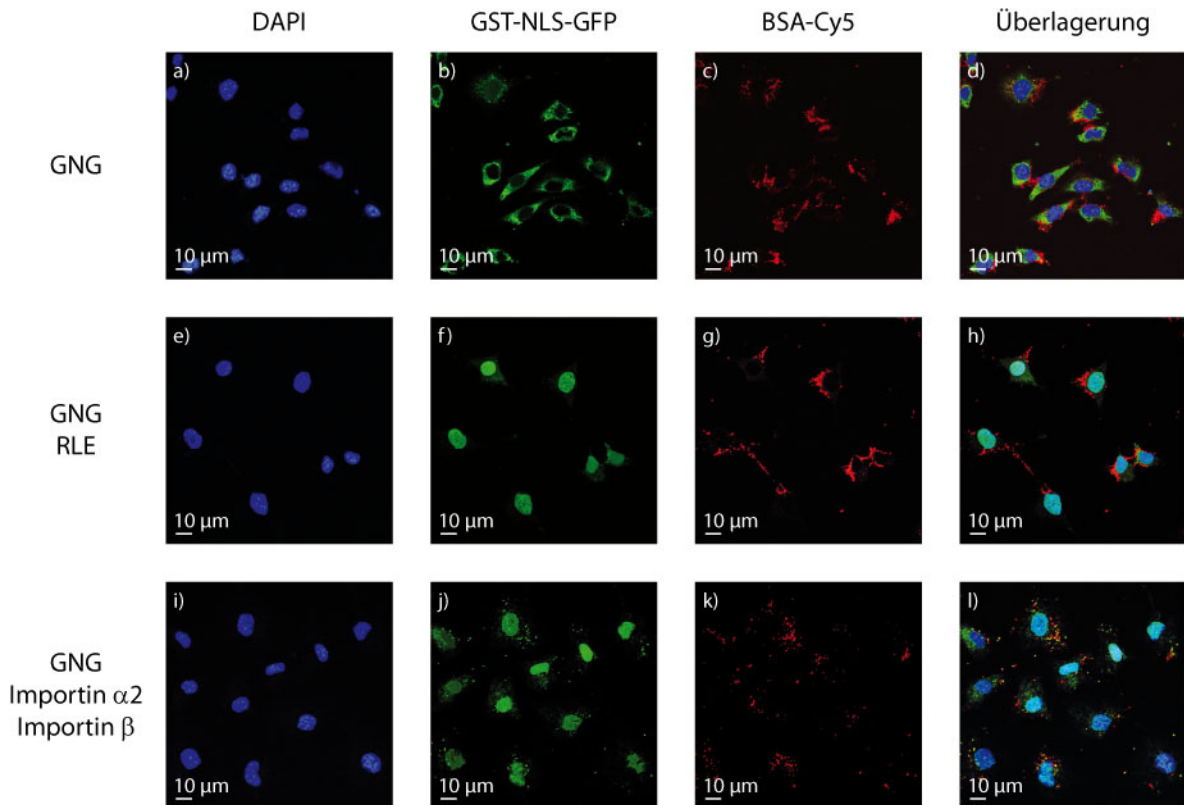


Abb. 35: Die rekombinant exprimierten Fusionsproteine GNG, Importin $\alpha 2$ und β sind funktional. (a-d) Das artifizielle Kargo GNG ist ohne die Hilfe der Transportfaktoren nicht in der Lage, in die Kerne der Digitonin-permeabilisierten L-Zellen zu gelangen. (e-h) Zytosolischer Rattenleberextrakt (RLE, 40% (v/v)) ermöglicht den Kernimport der dimeren bis pentameren GNG-Komplexe (GNG2, 1 μM) ebenso wie Importin $\alpha 2$ und β (je 0.5 μM) (i-l). Als Permeabilisationskontrolle wurde mit Cy5 konjugiertes BSA eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI im konfokalen Laserscanningmikroskop sichtbar gemacht.

Die Funktionalitätsprüfung der rekombinant exprimierten Fusionsproteine GNG, Importin $\alpha 2$ und β mittels Digitonin-permeabilisierter L-Zellen erhärtete die mit den ganzen Oozytenkernen gewonnenen Ergebnisse. Das artifizielle Kargo GNG, das durch freie Diffusion nicht in den Kern gelangte, wurde durch die im zytosolischen Rattenleberextrakt enthaltenen Transportfaktoren effizient importiert (Abb. 35e-h). Ebenso wirksam transportierten die chromatographisch gereinigten Importine $\alpha 2$ und β das GNG-Fusionsprotein in den Zellkern (Abb. 35i-l). Auch in diesem Ansatz erwiesen sich die aufgereinigten Importine somit als funktional.

Die unterschiedlich großen GNG-Polymere wurden unterschiedlich schnell durch Importin $\alpha 2$ und β in Kerne der Digitonin-permeabilisierten L-Zellen importiert. Während die über 600 kDa großen GNG-Komplexe (GNG1) mehrheitlich im Zytoplasma lokalisiert und nur in geringer Konzentration im Zellkern zu finden waren (Abb. 36a-d), wurden die dimeren bis pentameren GNG-Aggregate (120-270 kDa, GNG2) effizient importiert und waren nur punktuell zytoplasmatisch sichtbar (Abb. 36e-h). Die Mischung aus GNG-Komplexen größer als

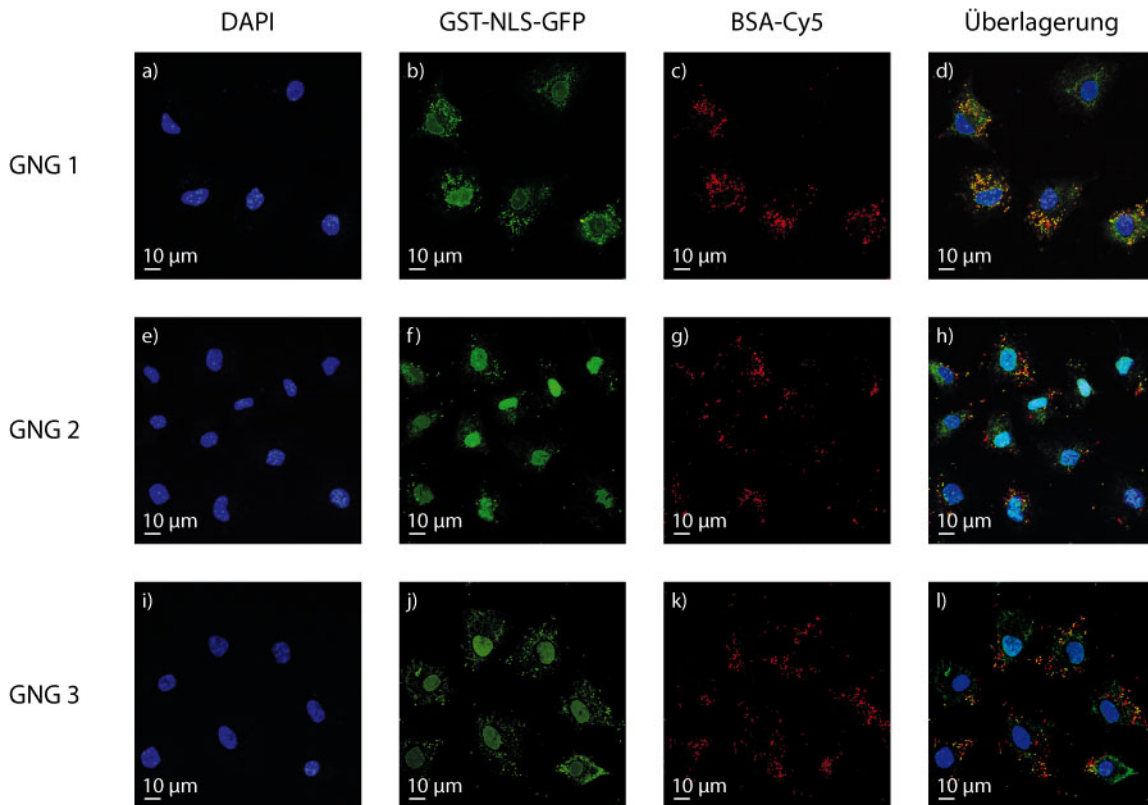


Abb. 36: Kleinere GNG-Polymere werden besser importiert. (a-d) Die über 600 kDa großen GNG-Polymere (1 μM GNG1) bleiben im Zytoplasma stecken und werden dadurch nur ineffizient von Importin $\alpha 2$ und β (je 0.5 μM) in die Kerne der Digitonin-permeabilisierten L-Zellen transportiert. (e-h) Die dimeren bis pentameren GNG-Komplexe (1 μM GNG2) indes zeigen eine deutlich höhere Importrate. (i-l) Während die großen Polymere aus der gemischten GNG-Population (1 μM GNG3) im Zytoplasma aufgehalten werden, akkumulieren die kleineren in den Zellkernen, die mit DAPI angefärbt wurden. Cy5 markiertes BSA fungierte als Permeabilisationskontrolle.

120 kDa (GNG3) wiederum zeigte eine ambivalente Verteilung von sowohl im Zytoplasma lokalisierter als auch im Kern akkumulierter Fluoreszenz (Abb. 36i-l).

Die Auswirkung der Fluorophore auf die Funktionalität Alexa Fluor[®] 633-konjugierter Proteine wurde sowohl mit Importin $\alpha 2$ als auch mit Ntf2 untersucht. In Digitonin-permeabilisierten L-Zellen ist Alexa Fluor[®] 633-konjugiertes Importin $\alpha 2$ nicht nur ausschließlich im Kern lokalisiert, sondern zeigt auch eine auffällige subnukleäre Verteilung (Abb. 37). Im Gegensatz dazu befindet sich Alexa Fluor[®] 633-markiertes Ntf2 vorzugsweise im Zellkern und an der Kernhülle, wohingegen Alexa Fluor[®] 647-markiertes Ntf2 (von Dr. J.-P. Siebrasse zur Verfügung gestellt) auch im Zytoplasma detektierbar ist (Abb. 37). In der Überlagerung der konfokalen Aufnahmen wird die punktiert gemusterte Kernmembran als eine rote Punktlinie um den mittels DAPI-Färbung visualisierten Zellkern sichtbar.

Somit standen neben dem artifiziellen Kargo GNG, Importin $\alpha 2$ und β auch die fluorescent markierten Transportfaktoren Importin $\alpha 2$ und Ntf2 als funktional intakte Proteine für Messungen zur Verfügung.

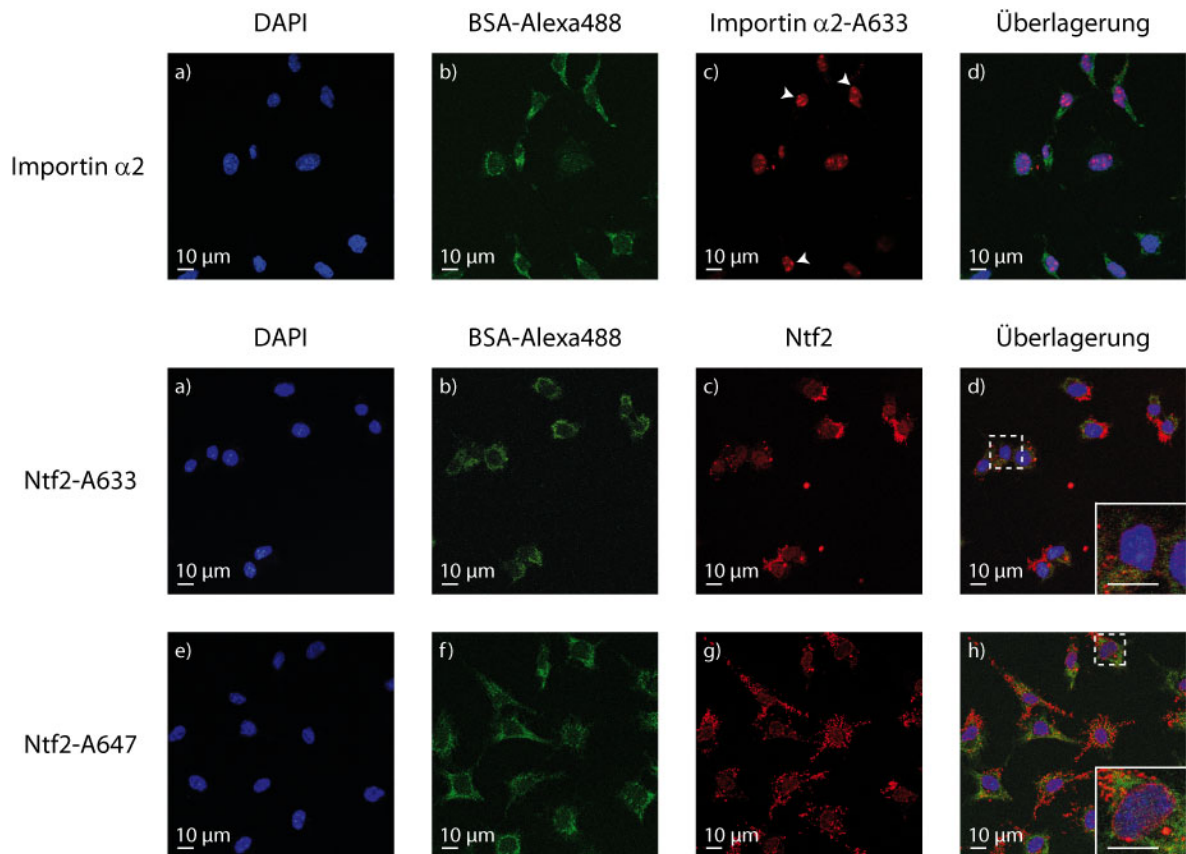


Abb. 37: Fluoreszent markiertes Importin $\alpha 2$ und Ntf2 translozieren in die Kerne Digitonin-permeabilisierter L-Zellen. (a-d) Während Alexa Fluor[®] 633-konjugiertes Importin $\alpha 2$ ($0.5 \mu\text{M}$) nach dem Import im Zellkern verbleibt und eine auffällige Konzentration in subnukleären Strukturen (Pfeilspitzen) zeigt, ist Alexa Fluor[®] 633-konjugiertes Ntf2 ($0.5 \mu\text{M}$) sowohl an der Kernmembran als auch in den Kernen der Digitonin-permeabilisierten L-Zellen lokalisiert. (e-h) Darüber hinaus findet man das Alexa Fluor[®] 647-markierte Ntf2 ($1 \mu\text{M}$) zusätzlich im Zytoplasma. In der Ausschnittsvergrößerung der überlagerten, konfokalen Aufnahme wird die Anfärbung der Kernhülle durch das fluoreszent markierte Ntf2 deutlich sichtbar. Alexa Fluor[®] 488-markiertes BSA diente als Permeabilisationskontrolle und die Zellkerne wurden mit DAPI dargestellt.

4.4 Präparation freistehender Kernmembranen aus Oozyten

In manuell aus *Xenopus laevis* Oozyten des Reifungsstadiums VI entfernten und fluoreszenz markierten Zellkernen sind die warzenartigen Auffaltungen der Kernmembran, die die Oberflächen des Zellkerns vergrößern, deutlich zu sehen (Abb. 38). Dazwischen befinden sich planare, für nahfeldoptische Messungen geeignete Membranbereiche. Die Anzahl und Größe dieser potentiellen Messflächen ist von der Stärke der Substratadhäsion abhängig. Auf einem gereinigten, mit Poly-L-Lysin (PLL)-beschichteten Deckglas haftete die Kernmembran in der Regel ausgezeichnet.

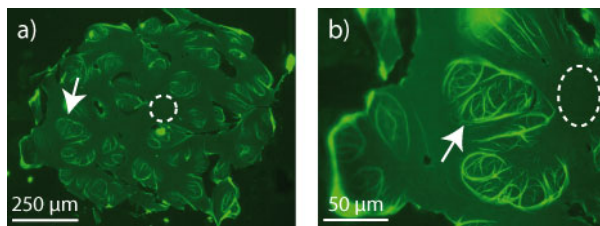


Abb. 38: Präparation der Kernmembran aus einer *Xenopus laevis* Oozyte auf einem Glassubstrat. Der Zellkern wurde auf einem Poly-L-Lysin (PLL)-beschichteten Deckglas ausgebreitet. Die warzenartigen Auffaltungen (Pfeile), die die ebenen Membranflächen (gestrichelte Kreise) unterbrechen, sind bei der fluoreszenz markierten Kernmembran deutlich sichtbar.

Im Gegensatz dazu variierte die Substratadhäsion auf den strukturierten Lochtemplaten innerhalb einer Charge und zwischen verschiedenen Chargen zum Teil erheblich. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Reinigungs- und Beschichtungsarten hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die Adhäsion der Kernmembran sowohl an Deckgläsern als auch an den verschiedenen Lochtemplaten getestet und miteinander verglichen.

Die ersten mikrostrukturierten Substrate wiesen bauartbedingt vergleichsweise kleine und flache Tröge mit einem Radius von $0.5 \mu\text{m}$ auf (Johnas, 2004). Da die Dreiecksapertursonde während der rasternahfeldoptischen Messung die Kernmembran einige zehn Nanometer in den Trog drückt, verbleibt nur ein relativ kleines Areal von $500 \times 500 \text{ nm}$ für die Analyse der Membran, da eine Kollision mit der Trogwand unweigerlich zur Beschädigung der Sonde

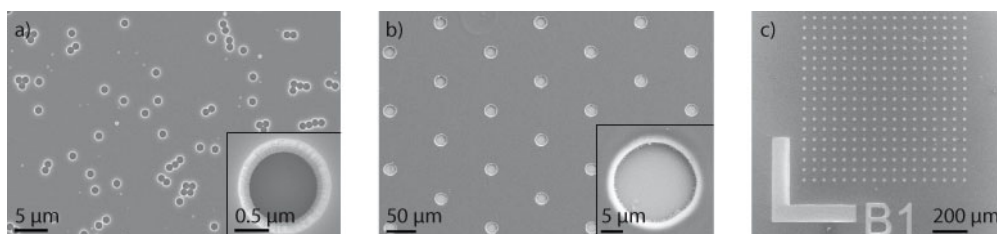


Abb. 39: REM-Aufnahmen der verwendeten Lochtemplate. Die statistische Verteilung der Löcher (a) erschwert das Auffinden geeigneter Messstellen. Die mittels Photolithographie strukturierten Deckgläser mit hexagonal angeordneten Trögen (b) weisen aufgrund der höheren Packungsdichte eine größere Wahrscheinlichkeit für das Auffinden eines geeigneten Lochs als bei der quadratischen Anordnung (c) auf. Die Kernmembranpräparation auf den letzteren Templaten ist im Mikroskop leichter zu analysieren. Bei den mittels Photolithographie hergestellten Trögen wurde ein Durchmesser von $20 \mu\text{m}$ gewählt, da sich bei den nahfeldoptischen Messungen die statistisch verteilten Löcher als zu klein herausgestellt hatten (Ausschnitt in a) und b). [Bilder von S. Johnas und J. Wissler]

führt. Die Schaffung größerer und tieferer zylindrischer Löcher mittels Photolithographie konnte diese Gefahr entschärfen (Abb. 39). Die Trogtiefe ist von mehreren Herstellungsschritten abhängig und wurde mit einer unbedampften, gezogenen Fasersonde mittels Rasterkraftmikroskopie in Luft auf 2.0–2.3 μm bestimmt. Die regelmäßige Anordnung der Löcher erleichtert das Auffinden einer geeigneten Messstelle.

Unabhängig von der Reinigung mit Hellmanex II[®] oder Piranha-Lösung erwies sich die Beschichtung der Lochtemplate der ersten Generation mit PLL im Vergleich zu der mit Polyethylenimin (PEI) als geeigneter. Allerdings offenbarte das PLL eine begrenzte Haltbarkeit, die sich in einer Reduktion der Adhäsivität bemerkbar machte.

Auf der hydrophoben Oberfläche des mittels Photolithographie strukturierten Deckglases adhärierte die Kernmembran trotz vorheriger PLL-Behandlung nicht. Erst die Hydrophilisierung des Su-8-Lacks durch Plasmaätzung und die sich direkt anschließende Oberflächenbeschichtung mit PLL führten zu einer ausreichend starken Membranadhäsion und ermöglichten dadurch qualitativ hochwertige, reproduzierbare Kernmembranpräparationen (Abb. 40a und d).

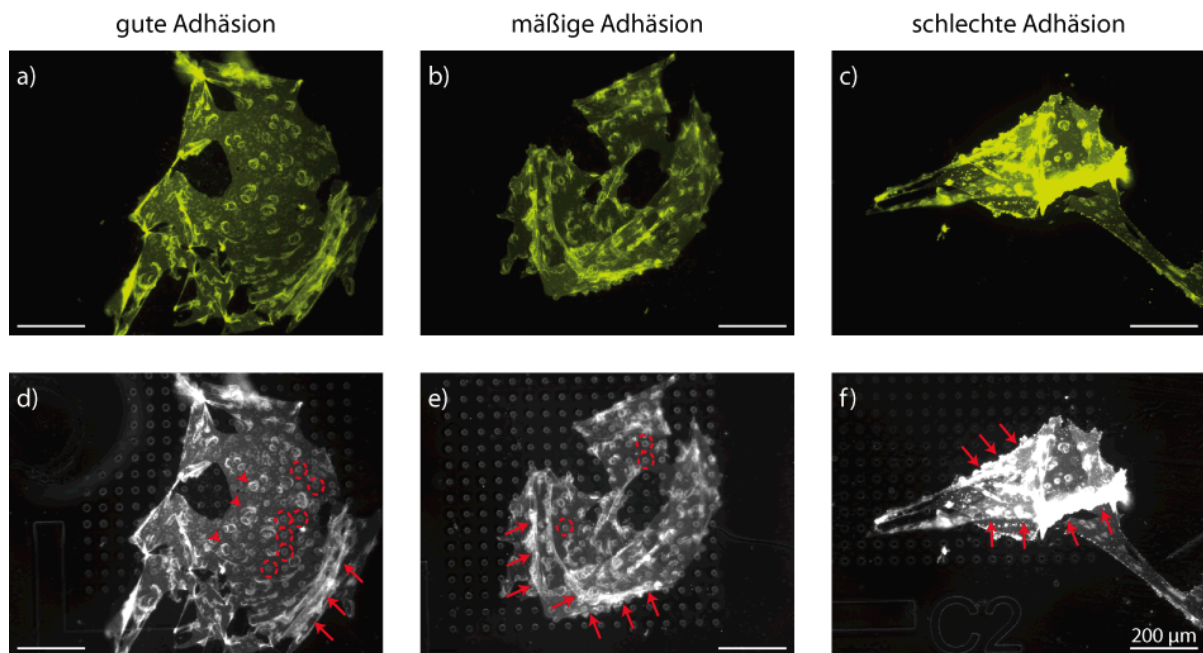


Abb. 40: Die Kernmembran adhärirt unterschiedlich gut am Substrat. Eine gute Präparation (a und d) zeichnet sich durch eine große, ebene Membranfläche mit vielen potentiellen Messstellen (gestrichelte Kreise) aus. Die mehrlagigen Membranstapel (Pfeile) entstehen bei der manuellen Präparation durch herabsinkende, nicht adhärirte Membranränder und eignen sich nicht für nahfeldoptische Messungen. Mittels Überlagerung der Fluoreszenz- (a-c) und Auflichtaufnahmen können die Stellen identifiziert werden, an denen die warzenartigen Membranauffaltungen (Pfeilspitzen) die Tröge der Flüssigkeitskammer verdecken, und kann somit die Güte einer Präparation eingeschätzt werden (d-f).

4.5 Validierung der Präparationsgüte

Die Kernmembranpräparationen wurden über Tröge mit 10 μm und 20 μm Durchmesser im Hinblick auf Membranintegrität und -straffheit analysiert (Diebel, 2006). Dazu wurde in einem Laserscanningmikroskop die axiale Höhendifferenz zwischen drei Messpunkten auf einer imaginären Linie über einem Loch bestimmt. Zunächst wurde der fokussierte Laserstrahl an einer Position auf den Lochrand scharf gestellt und das Loch gerastert (Abb. 41). Anschließend wurde auf die Lochmitte und dann auf den gegenüberliegenden Lochrand fokussiert. Aus der Höhendifferenz der beiden Messungen an den Lochrändern ergibt sich die horizontale Verkippung der Präparation. In Relation mit dem Messpunkt in der Lochmitte erhält man die Position der Kernmembran im Raum.

Der Laserstrahl, der zunächst auf den Lochrand scharf gestellt war, wird in der Lösung aufgrund des kleineren Brechungsindex früher fokussiert (Abb. 41a und b). Für eine scharfe Abbildung muss die Präparation um die Weglängendifferenz x abgesenkt werden (Abb. 41c). Diese Strecke kann wie folgt abgeschätzt werden: Unter der Annahme einer straff über den Trog gespannten Membran wird zur Vereinfachung ein Laserstrahl betrachtet, der die Membran unter einem kleinen Winkel α im Su-8 bzw. β in der Pufferlösung zur Senkrechten schneidet. Dabei ist die Strecke b für den Strahlengang durch den Su-8 gleich der für den Strahlengang durch die Pufferlösung nach Absenkung der Kammer um die Differenz x (Abb. 41). Daraus ergibt sich die folgende Beziehung:

$$(h_{\text{Su-8}} + x) \cdot \tan \alpha = h_{\text{Su-8}} \cdot \tan \beta \quad (8)$$

Gleichung (8) kann mittels der Prämisse der kleinen Winkel α und β , für die die Näherung $\tan \alpha \approx \sin \alpha$ gilt, und dem Snelliusschen Brechungsgesetz $n_{\text{Su-8}} \cdot \sin \alpha = n_P \cdot \sin \beta$ umformuliert werden:

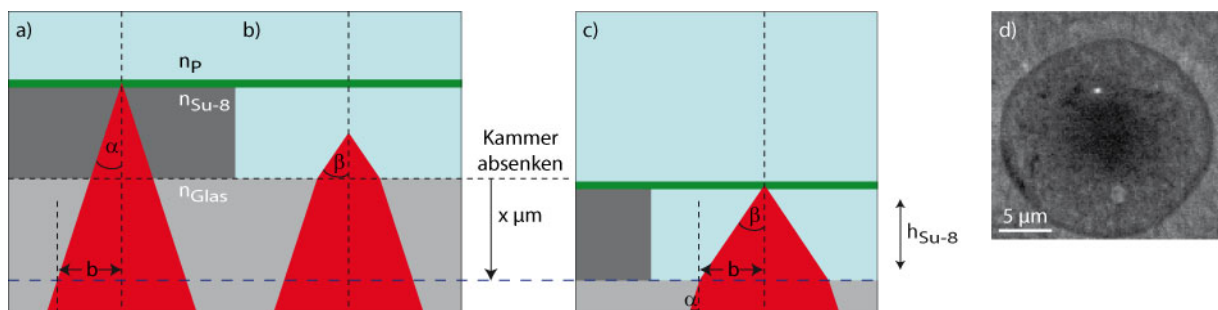


Abb. 41: Axiale Positionsanalyse der Kernmembran. Der auf den Trogrand fokussierte Laserstrahl (a) wird im Loch aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes (Su-8 Lack $n_{\text{Su-8}}=1.6$; Glas $n_{\text{Glas}}=1.6$; Pufferlösung $n_P=1.3$) früher fokussiert (b), so dass für die scharfe Abbildung der über den Trog gespannten Membran in einem Laserscanningmikroskop die Flüssigkeitskammer um $x \mu\text{m}$ abgesenkt werden muss (c). Der dunkle Bereich in der Lochmitte der mit mAb414 und GAM-Alexa 633 markierten Kernmembran liegt im Gegensatz zum Lochrand außerhalb des Fokus (d).

$$(h_{Su-8} + x) \cdot \tan \alpha = h_{Su-8} \cdot \tan \alpha \cdot \frac{n_{Su-8}}{n_P} \Leftrightarrow x = h_{Su-8} \cdot \left(\frac{n_{Su-8}}{n_P} - 1 \right) \quad (9)$$

Mit $n_{Su-8} = 1.6$ als den Brechungsindizes von Glas und Su-8 bzw. $n_P = 1.3$ als der Brechzahl der Pufferlösung ergibt sich für die scharfe Abbildung eine axiale Weglängendifferenz von $0.5 \mu\text{m}$ zwischen der Kernmembran auf Trograndhöhe und der in der Lochmitte. Wenn sich Luft ($n_{Luft} = 1.0$) unter der Membran befindet, steigt die Differenz auf $1.3 \mu\text{m}$ an.

Die mit einem Laserscanningmikroskop experimentell ermittelten Werte lassen sich vor diesem Hintergrund einordnen (Tab. 8). Bei einem der dreizehn vermessenen Tröge war die Kernmembran auf den Boden gesunken, bei zwei weiteren war sie straff gespannt und bei anderen zwei Löchern schien sie nach oben gewölbt. Die acht durchhängenden Membranen lassen sich nochmals differenzieren, wobei die schwach durchhängenden bzw. leicht nach oben gewölbten Kernmembranen durchaus für nahfeldoptische Messungen geeignet sind. Bei einer stark durchhängenden Membran besteht das Risiko, dass diese unter dem Druck der Sonde nachgibt und die Sonde durch Aufsetzen auf dem Trogboden beschädigt wird. Eine stark nach oben gewölbte Kernmembran hingegen kann sich seitlich um die in die Wölbung hineindrückende Sonde legen und dadurch das Abrastern der Membran erheblich behindern. Die Wölbung kann bei der Präparation durch eine lokale Deformation eines gering gequolle-

Tab. 8: Analyse der Membranstraffheit mittels Laserscanningmikroskopie. Die Werte geben an, um welche Weglängendifferenz die Flüssigkeitskammer bei einer auf den Trogrand fokussierten Kernmembran axial verschoben wurde, um die Membran in der Lochmitte scharf abzubilden.

gemessene Differenz	Interpretation	Eignung für nahfeldoptische Messungen
+2 200 nm	am Boden aufliegend	nein
+1 000 nm	stark durchhängend	nein
+950 nm	stark durchhängend	nein
+400 nm	mäßig durchhängend	nein
+335 nm	mäßig durchhängend	nein
+100 nm	schwach durchhängend	ja
+50 nm	schwach durchhängend	ja
0 nm	schwach durchhängend	ja
-100 nm	schwach durchhängend	ja
-300 nm	straff gespannt	ja
-500 nm	straff gespannt	ja
-1 100 nm	nach oben gewölbt o. Luft	nein
-1 500 nm	nach oben gewölbt o. Luft	nein

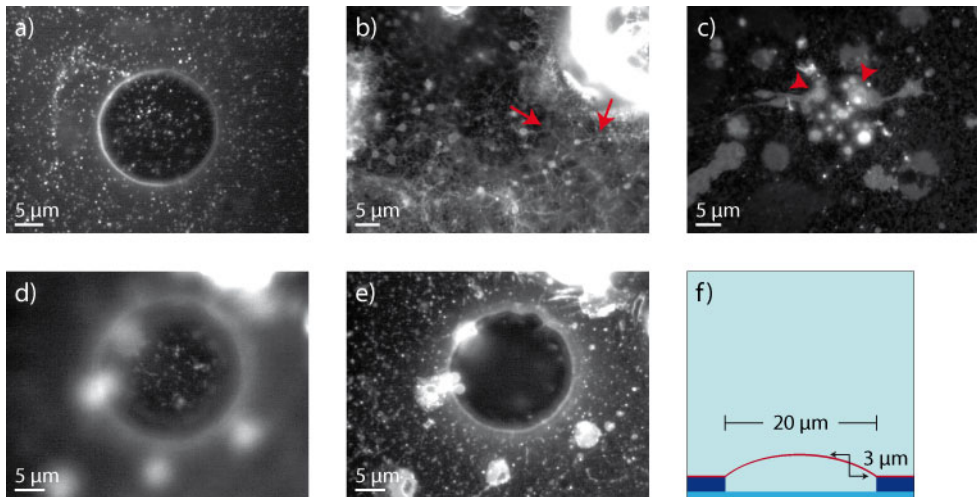


Abb. 42: Die Analyse der fluoreszent markierten Kernmembran mit einer Digital-Kamera gibt Aufschluss über die Güte potentieller Messstellen. (a) Für nahfeldoptische Messungen eignen sich Tröge, die eben von der Membran überspannt werden. Präparate, die filamentartige (Pfeile in Bild b) oder vesikuläre Strukturen (Pfeilspitzen in Bild c) aufweisen, werden nicht verwendet. (d-f) Die Kernmembran kann sich präparationsbedingt bis zu 3 µm über den Rand nach oben ausbeulen, wobei in d) auf die Lochmitte und in e) auf den Trogrand fokussiert wurde.

nen Kerns entstehen. Des Weiteren führt der Austausch der BSA-haltigen Pufferlösung nach der Membranpräparation gegen einen BSA-freien Puffer zu einem osmotischen Druck, der eine lokal stark adhärierte Membran dehnt. Unter der Prämisse, leicht vorgespannte Kernmembranen für die nahfeldoptischen Messungen zu verwenden, waren die Hälfte der in dieser Testreihe untersuchten membranüberspannten Tröge geeignet.

Die zeitaufwendige Membrananalyse konnte durch den Einsatz einer Digitalkamera und der zusätzlichen Verwendung von Fluorophoren mit dem Emissionsmaximum um 560 nm optimiert werden. Dabei wurden neben dem lipophilen Fluoreszenzmarker DiI ($E_{m_{max}}$ 565 nm) auch mit Alexa Fluor[®] 532 ($E_{m_{max}}$ 554 nm) konjugierte Antikörper für Doppelfärbungen eingesetzt. Die Schärfentiefe des Mikroskops von etwa 0.5 µm ausnützend, wurden die Präparate mit einer 100fachen Vergrößerung im Okular betrachtet und die Güte potentieller Messstellen mittels Digitalkamera dokumentiert. Diese Vorgehensweise erlaubte nicht nur die Auswahl von Trögen mit einer straff gespannten Kernmembran, sondern auch den Ausschluss ungeeigneter Präparate (Abb. 42). Auf manchen DiI-gefärbten Kernmembranen waren von einer Membran umschlossene, sich rasch bewegende Fäden zu sehen. Diese Vesikel hatten einen Durchmesser von 200 bis 2 000 nm. Das gehäufte Auftreten bei bestimmten Operationschargen deutete auf intrazelluläre Parasiten in den Oozyten hin. Andere Präparate wiederum wiesen filamentartige Strukturen auf, die die Sondenannäherung erheblich behinderten.

Durch weitere Fluoreszenzuntersuchungen der Präparate konnte ausgeschlossen werden, dass Chromatin oder Rinderserumalbumin-Ablagerungen auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran die Annäherung der Dreiecksapertursonde beeinträchtigen.

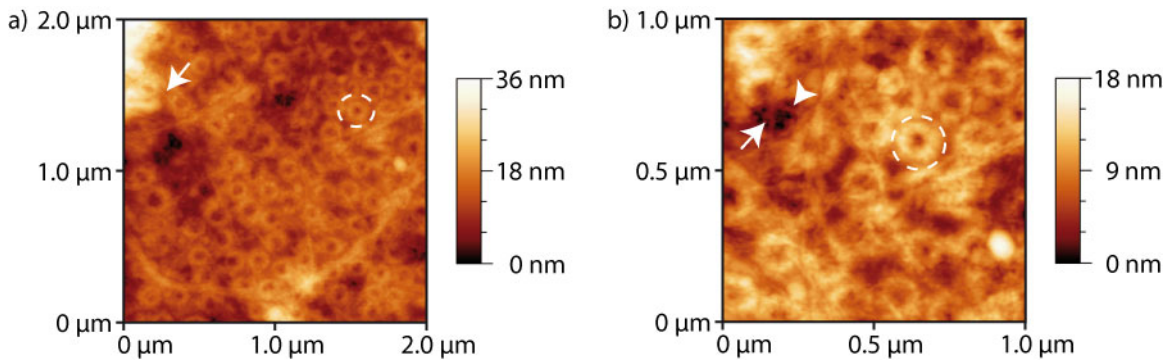


Abb. 43: Rasterkraftmikroskopische Analyse der Kernpräparation auf einem Glassubstrat. Auf der nukleoplasmatischen Seite einer getrockneten Kernmembran werden die Kernporen (gestrichelter Kreis) von filamentartigen Strukturen mit 18 nm (Pfeil) bzw. 13 nm (Pfeilspitze) teilweise überlagert. [Aufnahmen in Kooperation mit S. Johnas und Dr. H. Gliemann]

Auf der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme einer getrockneten Kernmembran sind der zentrale Kanal und der ihn umgebende nukleoplasmatische Ring der Kernporen deutlich zu erkennen, da der durch die Trocknung des Präparats zerstörte Kernkorb die Pore nicht mehr verdeckt (Abb. 43). Auffällig sind feine Filamente mit einer Stärke von 13 bzw. 18 nm, die der Kernmembran aufliegen. Die rasterkraftmikroskopische Abbildung der freitragenden Kernmembran unter Flüssigkeit zeigt im Randbereich des Troges intakte Kernkörbe, die

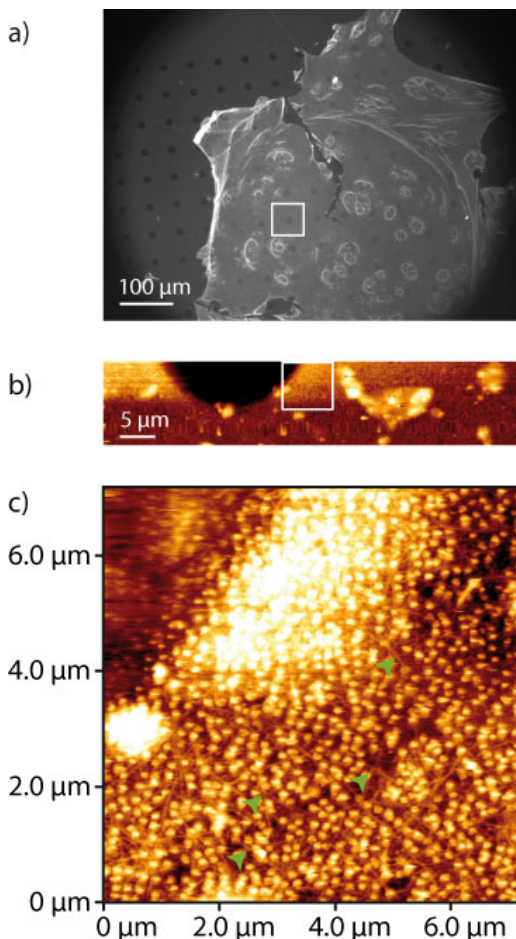
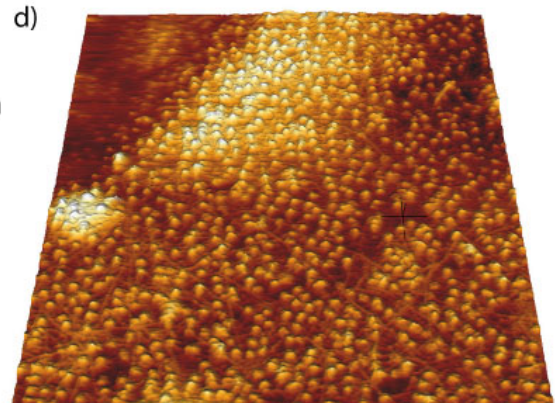


Abb. 44: Rasterkraftmikroskopische Analyse der freitragenden Kernmembranpräparation. Die nukleoplasmatische Seite einer mit Phalloidin markierten, fixierten Kernmembran wurde über dem Randbereich eines Troges rasterkraftmikroskopisch unter Flüssigkeit vermessen. Das durch ein weißes Quadrat in der Fluoreszenzaufnahme markierte Loch (a) wurde mittels AFM partiell abgebildet (b) und ein Ausschnitt für die genauere Analyse gewählt (weißes Quadrat). Die intakten Kernkörbe sind im „tapping mode“ als helle Flecken (c) oder in der 3D-Projektion (d) als Hügel zu erkennen. Dazwischen verlaufen die Filamente der Kernlamina (grüne Pfeilspitzen). [Aufnahmen in Kooperation mit Dr. C. Franz]



durch Filamente verbunden sind (Abb. 44). Die Kernporendichte liegt aufgrund der präparationsbedingten leichten Schwellung des Zellkerns mit 18.3 ± 1.03 Poren pro μm^2 unter der Dichte der ungedehnten, getrockneten Kernmembran von 22.0 ± 4.30 NPCs/ μm^2 (Abb. 43) und der in Schlune et al. (2006) publizierten Dichte von 23.4 ± 1.07 NPCs/ μm^2 für Zellkerne der Stadium VI-Oozyten.

Der Vergleich rasterkraftmikroskopischer Aufnahmen unter Flüssigkeit von einer direkt nach der Präparation fixierten Kernmembran mit einer erst gelagerten und dann fixierten Kernhülle zeigt, dass die über dem Trog freistehende Membran in beiden Fällen leicht durchhängt (Abb. 45). Beim erst nach Übernachtlagerung fixierten Präparat ließ sich der freistehende Membranabschnitt im Gegensatz zum direkt fixierten Präparat hochaufgelöst abbilden.

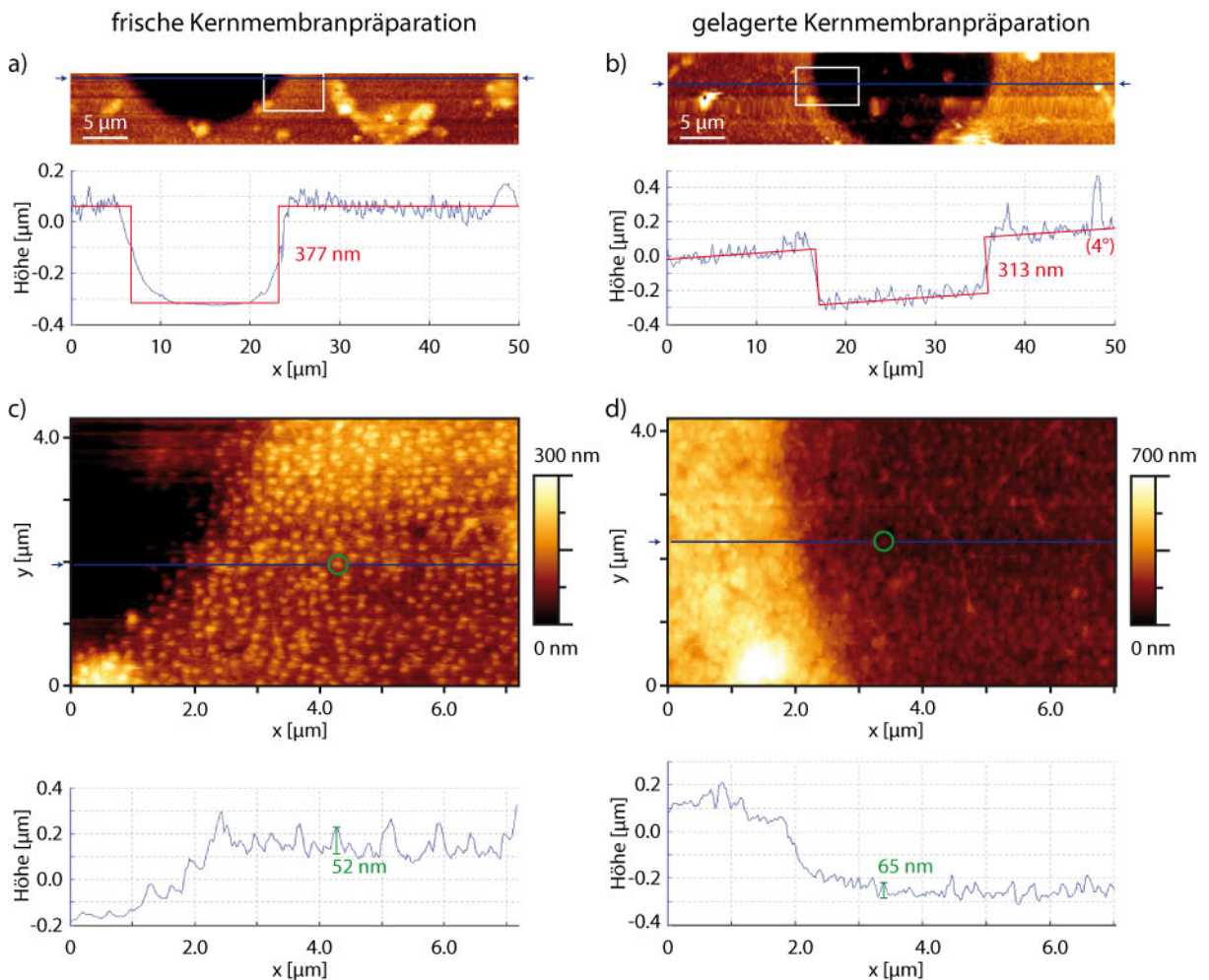


Abb. 45: Rasterkraftmikroskopischer Vergleich einer tagesfrischen Kernmembranpräparation mit einer über Nacht gelagerten. Die freistehende Kernmembran hängt sowohl bei der frischen (a) als auch bei der gelagerten Präparation (b) leicht durch. Während sich bei der tagesfrischen Präparation nur die über dem Substrat befindliche nukleoplasmatische Seite der Kernmembran hochaufgelöst darstellen ließ (c), konnte nach der Übernacht Lagerung bei 4°C die freistehende Kernhülle deutlich abgebildet werden (d). Unter der Annahme einer temperaturabhängigen Reduktion unterscheiden sich zwei willkürlich ausgewählte Kernkörbe nicht wesentlich in ihrer Höhe. Die Proben wurden nach der Präparation (a und c) bzw. nach der Lagerung (b und d) für die rasterkraftmikroskopische Darstellung fixiert. [Aufnahmen in Kooperation mit Dr. C. Franz]

Tab. 9: Quantitative Analyse der Oberflächenrauheit. Dazu wurden die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in kleinere, nicht überlappende Areale unterteilt und mit der Analysesoftware Gwyddion 2.9 sowohl die mittlere Rauheit R_a als auch die quadratische Rauheit R_q dieser ebenen Bildausschnitte berechnet. R_a gibt den mittleren Abstand eines Punktes zur Mittellinie durch das Höhenprofil an und R_q wird aus dem Mittel der Abweichungsquadrate berechnet. Die Flächen der frischen Präparation F1-F6 und die der gelagerten G1-G6 weisen nahezu identische Werte bei beiden Berechnungsarten auf ($R_a(F) = 20.4 \pm 1.3$ nm, $R_a(G) = 19.9 \pm 1.2$ nm; $R_q(F) = 25.9 \pm 1.6$ nm, $R_q(G) = 25.8 \pm 1.5$ nm).

Nr.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Länge	3.622	4.170	5.208	2.752	1.951	4.506	
x Breite [μm]	x 1.320	x 1.320	x 1.320	x 0.884	x 1.348	x 1.769	
Fläche [μm^2]	4.78	5.50	6.87	2.43	2.63	7.97	
$R_a(F)$ [nm]	21.3	21.6	18.6	19.1	19.7	22.0	Ø 20.4
$R_q(F)$ [nm]	27.0	27.3	23.6	24.3	25.1	27.9	Ø 25.9

Nr.	G1	G2	G3	G4	G5	G6	
Länge	4.158	3.006	1.990	2.179	2.271	4.670	
x Breite [μm]	x 1.482	x 1.606	x 3.623	x 1.722	x 2.015	x 0.513	
Fläche [μm^2]	6.16	4.83	7.21	3.75	4.58	2.40	
$R_a(G)$ [nm]	20.2	19.5	21.9	18.3	20.8	18.7	Ø 19.9
$R_q(G)$ [nm]	26.2	25.6	28.0	25.0	26.9	23.2	Ø 25.8

Um einen möglichen Effekt der Lagerung bei 4°C auf die Höhe der Kernkörbe zu untersuchen, wurde die Oberflächenrauheit ebener, nicht überlappender Ausschnitte der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen unter Flüssigkeit mit der Software Gwyddion 2.9 analysiert. Dabei wird die Abweichung von der Mittellinie durch das Höhenprofil sowohl in Form des arithmetischen Mittels R_a oder auch des für Ausreißer weniger empfindlichen quadratischen Mittels R_q berechnet. Beide Rauheitswerte sind von der Verteilung der Höhenwerte über die Fläche unabhängig.

Die mittlere Rauheit frischer Präparate von 20.4 ± 1.3 nm unterscheidet sich nicht wesentlich von der gelagerter Präparationen mit 19.9 ± 1.2 nm (Tab. 9). Zusammen mit der quadratischen Rauheit von 25.9 ± 1.6 nm für frische und 25.8 ± 1.5 nm für gelagerte Präparate kann ein lagerungsbedingtes Einsinken der Kernkörbe ausgeschlossen werden.

4.6 Konfokale Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie

Zur Etablierung der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie wurden nicht nur Messungen mit der nahfeldoptischen Sonde, sondern auch mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop durchgeführt. Der Vorteil der auf konfokaler Mikroskopie basierenden FCS liegt in der Existenz theoretischer Autokorrelationsfunktionen für die Diffusion im zwei- und dreidimensionalen Raum. Nachteilig für die Untersuchung des Kerntransports ist das verhältnismäßig große, beugungsbegrenzte Detektionsvolumen.

Zur Vermeidung von Korrelationsfehlern, die durch Nachpulsen der Avalanche-Photodiode (APD) im einstelligen Mikrosekundenbereich entstehen, wurde die emittierte Fluoreszenz durch eine Y-Faser auf zwei APD aufgeteilt und die detektierten Photonen beider Photodioden gekreuzkorreliert.

Mit diesem konfokalen FCS-Ansatz wurden der Tailenradius des fokussierten Laserstrahls, der Diffusionskoeffizient von fluoreszent markiertem Ntf2 in der Pufferlösung ermittelt und die Ntf2-Bindung an der freistehenden Kenmembran nachgewiesen. Dazu wurde im ersten Schritt die Autokorrelationsfunktion von unkonjugiertem Alexa Fluor[®] 633 in freier Lösung experimentell bestimmt (Abb. 46) und dessen Aufenthaltsdauer im Detektionsvolumen τ_D mittels der Korrelationsfunktion für dreidimensionale Diffusion $G_{3D}(\tau)$ nach Gleichung (10) errechnet (Tab. 10).

$$G_{3D}(\tau) = \left(1 - TA + TA \cdot e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_T}\right)} \right) \cdot \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \cdot \tau_D}}} \quad (10)$$

Tab. 10: Fit-Ergebnisse dreier FCS-Messungen an ungekoppeltem Alexa Fluor[®] 633 in freier Lösung. Die Autokorrelationsfunktionen wurden mit 5 kW/cm² oder 10 kW/cm² Anregungsintensität experimentell ermittelt und mittels der theoretischen Autokorrelationsfunktion für dreidimensionale Diffusion $G_{3D}(\tau)$ angefitet (fixierter Parameter $S = 7$). Während die mittlere Teilchenzahl $\langle N \rangle$ im Lauf der Messung zunimmt, beträgt die Diffusionszeit τ_D im Durchschnitt $90 \pm 4 \mu\text{s}$. Der Tripletanteil TA und die Tripletzeit τ_T weisen Schwankungen auf. Die Fit-Abweichung liegt unter einem Prozent (Ausgangskonzentration 1 nM; Messzeiten: 605 s, 600 s bzw. 942 s).

Anregungsintensität I	10 kW/cm ²	5 kW/cm ²	5 kW/cm ²	Ø
mittlere Teilchenzahl $\langle N \rangle$	1.0	1.6	2.0	1.6
mittlere Diffusionszeit τ_D	85.8 μs $\pm 2.3 \mu\text{s}$	96.1 μs $\pm 5.4 \mu\text{s}$	90.7 μs $\pm 5.4 \mu\text{s}$	90.1 μs $\pm 4.2 \mu\text{s}$
Tripletanteil TA	13%	15%	7%	12%
Tripletzeit τ_T	6.1 $\pm 1.1 \mu\text{s}$	2.8 $\pm 1.5 \mu\text{s}$	6.0 $\pm 4.9 \mu\text{s}$	5.0 $\pm 1.5 \mu\text{s}$
Fit-Abweichung	0.0093	0.0097	0.0095	–

Dabei steht TA für den Tripletanteil, τ_T für die Tripletzeit und $\langle N \rangle$ für die mittlere Teilchenzahl im Detektionsvolumen. Der Faktor S beschreibt das Verhältnis des axialen zum lateralen Strahlradius ω_z/ω_{xy} und wurde für die konfokalen Messungen auf sieben festgesetzt.

Der Tailenradius ω_{xy} des fokussierten Laserstrahls wurde mittels Gleichung (11) aus der mittleren Diffusionszeit τ_D (Tab. 10) und der Diffusionskonstanten von Alexa Fluor[®] 633 ($D \approx 341 \mu\text{m}^2/\text{s}$; Dr. Geert van den Bogaart, persönliche Mitteilung) errechnet und beträgt $\omega_{xy} = 351 \text{ nm}$.

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4 \cdot \tau_D} \quad (11)$$

Ferner wurde das effektive Detektionsvolumen V_{eff} aus dem Durchschnitt der mittleren Teilchenzahl ($\langle \bar{N} \rangle = 1.6$), der Avogadro-Konstanten (6.022×10^{23} Teilchen pro mol) und der Ausgangskonzentration (1 nM) berechnet und beträgt $2.66 \times 10^{-15} \text{ l}$.

Im zweiten Schritt wurden die Diffusionszeiten von Alexa Fluor[®] 647-konjugiertem Ntf2 in freier Lösung gemessen (Tab. 10) und der Diffusionskoeffizient $D = 126 \mu\text{m}^2/\text{s}$ aus der mittleren Aufenthaltsdauer im Detektionsvolumen $\tau_D = 244 \pm 4 \mu\text{s}$ ermittelt. Bei bekanntem hydrodynamischen Radius des Moleküls r_H kann der Diffusionskoeffizient auch theoretisch

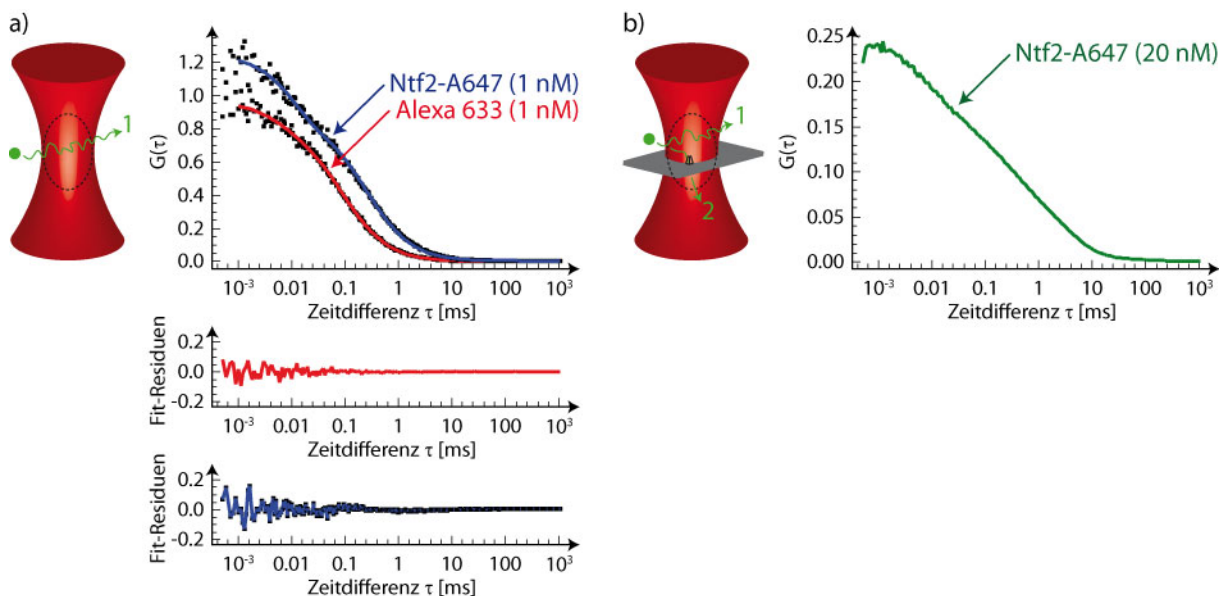


Abb. 46: Autokorrelationskurven von Alexa Fluor[®] 633 und fluoreszent markiertem Ntf2 in freier Lösung und an einer Kernmembran. (a) Die experimentell bestimmten Autokorrelationsfunktionen (schwarze Punkte) von Alexa Fluor[®] 633 und von Alexa Fluor[®] 647-konjugiertem Ntf2 in freier Lösung wurden mittels der theoretischen AKF für 3D-Diffusion angefitet, wobei der Fit für Alexa 633 (rote Kurve) weniger Fit-Residuen aufweist als der Fit für Ntf2 (blaue Kurve) (Anregungsintensität $I = 10 \text{ kW}/\text{cm}^2$, Fixierter Parameter $S = 7$). (b) Eine in der Mitte des Detektionsvolumens positionierte Kernmembran beeinflusst die Aufenthaltsdauer und -wahrscheinlichkeit der Moleküle im Detektionsvolumen, so dass die experimentell bestimmte Autokorrelationsfunktion in Ermangelung einer theoretischen Autokorrelationskurve für diese Situation nicht angefitet werden kann.

über die Stokes-Einstein-Beziehung (12) berechnet werden.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H} \quad (12)$$

Dabei steht k_B für die Boltzmannkonstante (1.38065×10^{-23} J/K). Setzt man den mittels Gel-permeationschromatographie bestimmten hydrodynamischen Radius $r_H = 3.28$ nm für das Ntf2-Dimer zusammen mit der Temperatur $T = 274$ K und der Viskosität für Wasser bei 4°C $\eta = 1$ mPa/s in Gleichung (12), so erhält man $D = 62 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dieser Wert beträgt annähernd die Hälfte der experimentell bestimmten Diffusionskonstante und stimmt mit dem publizierten Wert ($D = 59 \mu\text{m}^2/\text{s}$) überein (Ribbeck & Görlich, 2001).

Folglich wurde bei den Fluoreszenzmessungen in freier Lösung aufgrund der niedrigen Konzentration die Bewegung von monomerem Ntf2 beobachtet. Dieses Ergebnis wird durch die mittels Ultrazentrifugation bestimmte Dissoziationskonstante der Ntf2-Homodimere von $1 \mu\text{M}$ bestätigt (Chaillan-Huntington et al., 2001).

Zusätzlich wurden mit dem Laserscanningmikroskop FCS-Messungen an einer freistehenden Kernmembran durchgeführt. Dazu wurde die planar präparierte Kernmembran mittig im fokussierten Laserstrahl positioniert (Abb. 46). Infolge des Tailenradius $\omega_{xy} = 351$ nm und der präparationsbedingten Kernporendichte von 18.3 NPC/ μm^2 befanden sich durchschnittlich sieben Kernporen im Detektionsvolumen. Die sich zwischen den Kernporen befindende Kernmembran wirkt als Diffusionsbarriere und verändert die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Moleküle derart, dass die theoretische Autokorrelationsfunktion (AKF) für dreidi-

Tab. 11: Fit-Ergebnisse der FCS-Messungen an Alexa Fluor® 647-konjugiertem Ntf2 in freier Lösung. Die Diffusionszeit τ_D von Ntf2-A647 wurde in freier Lösung bei unterschiedlichen Fluorophorkonzentrationen und Anregungsintensitäten bestimmt und beträgt über alle Messungen gemittelt $244 \mu\text{s}$. Bei einer Konzentration von 1 nM befindet sich durchschnittlich ein Fluorophor im Detektionsvolumen und bei 10 nM steigt die mittlere Teilchenzahl $\langle N \rangle$ proportional an. Während der Tripletanteil TA konstant bleibt, sinkt die Tripletzeit τ_T bei steigender Anregungsintensität I . Die Fit-Abweichung liegt unter 2.5% (fixierter Fitparameter $S = 7$).

Konzentration	1 nM	1 nM	1 nM	10 nM	10 nM	10 nM
Anregungsintensität I	10 kW/cm ²	20 kW/cm ²	40 kW/cm ²	10 kW/cm ²	20 kW/cm ²	40 kW/cm ²
Teilchenzahl $\langle N \rangle$	0.80	0.88	0.98	9.18	8.46	8.34
Diffusionszeit τ_D	239 μs $\pm 7 \mu\text{s}$	247 μs $\pm 4 \mu\text{s}$	244 μs $\pm 3 \mu\text{s}$	253 μs $\pm 9 \mu\text{s}$	247 μs $\pm 4 \mu\text{s}$	249 μs $\pm 2 \mu\text{s}$
Tripletanteil TA	30%	31%	32%	31%	30%	30%
Tripletzeit τ_T	10.6 μs $\pm 0.7 \mu\text{s}$	7.6 μs $\pm 0.3 \mu\text{s}$	4.8 μs $\pm 0.1 \mu\text{s}$	12.4 μs $\pm 0.9 \mu\text{s}$	7.8 μs $\pm 0.3 \mu\text{s}$	5.3 μs $\pm 0.1 \mu\text{s}$
Fit-Abweichung	0.0221	0.0117	0.0084	0.0022	0.0014	0.0008

mensionale Diffusion $G_{3D}(\tau)$ ihre Gültigkeit verliert und zum Anfitten der an der Kernmembran experimentell bestimmten AKF erst eine neue AKF für diesen speziellen Fall hergeleitet werden muss (Gennerich & Schild, 2000).

Infolge dieser Komplikation wurden die an der Kernmembran ermittelten Autokorrelationen nicht angefittet, was aber auch nicht notwendig war. Ziel der auf konfokaler Mikroskopie basierenden FCS-Messungen war die Etablierung der Methode und insbesondere der Bindungsnachweis von fluoreszent markiertem Ntf2 an der freistehenden Kernmembran. Im Vergleich zur AKF der freien Lösung zeigt die in Gegenwart einer Kernmembran bestimmte AKF eine deutlich erhöhte Verweildauer von Ntf2 im Detektionsvolumen (Abb. 46). Daraus kann auf eine starke Wechselwirkung der Ntf2-Moleküle mit den Kernporen im beugungsbegrenzten Laserstrahl geschlossen werden.

4.7 Annäherung der Nahfeldsonde an die Kernmembran

Die im Folgenden dargestellten nahfeldoptischen Messungen wurden gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Andreas Naber am Institut für Angewandte Physik durchgeführt, wobei insbesondere Nicole Neuberth den apparativen Aufbau realisierte. SNOM-Messungen an biologischen Systemen in Flüssigkeit sind generell selten (Höppener et al., 2005; Chen et al., 2006; de Bakker et al., 2007) und konnten an freitragenden Kernmembranen erstmalig im Rahmen dieser engen Kooperation erfolgreich realisiert werden.

Die wegen ihrer Lichtstärke eingesetzte Dreiecksapertursonde wurde aufgrund ihrer geringen Höhe im Vergleich zur Fasersonde komplett mit Prisma und Stimmgabel in die Pufferlösung eingetaucht (Abb. 47 und Abb. 48). Dadurch konnte die Kraftdetektion weder zur Annäherung noch zur Abstandskontrolle eingesetzt und die Topographie ebenso wenig aufgezeichnet werden.

Die manuelle Annäherung der Dreiecksapertursonde wurde visuell mit Hilfe der Digitalkamera durchgeführt und das Verhalten der fluoreszent markierten Kernmembran aufgenommen (s. Anhang 8.3). Aufgrund der Dehnbarkeit des Präparats konnte die Sonde einige Hundert Nanometer in die präparationsbedingt vorgespannte Kernmembran hineingedrückt werden, ohne dabei die freitragende Membran sichtbar zu beschädigen. Beim Zurückziehen der

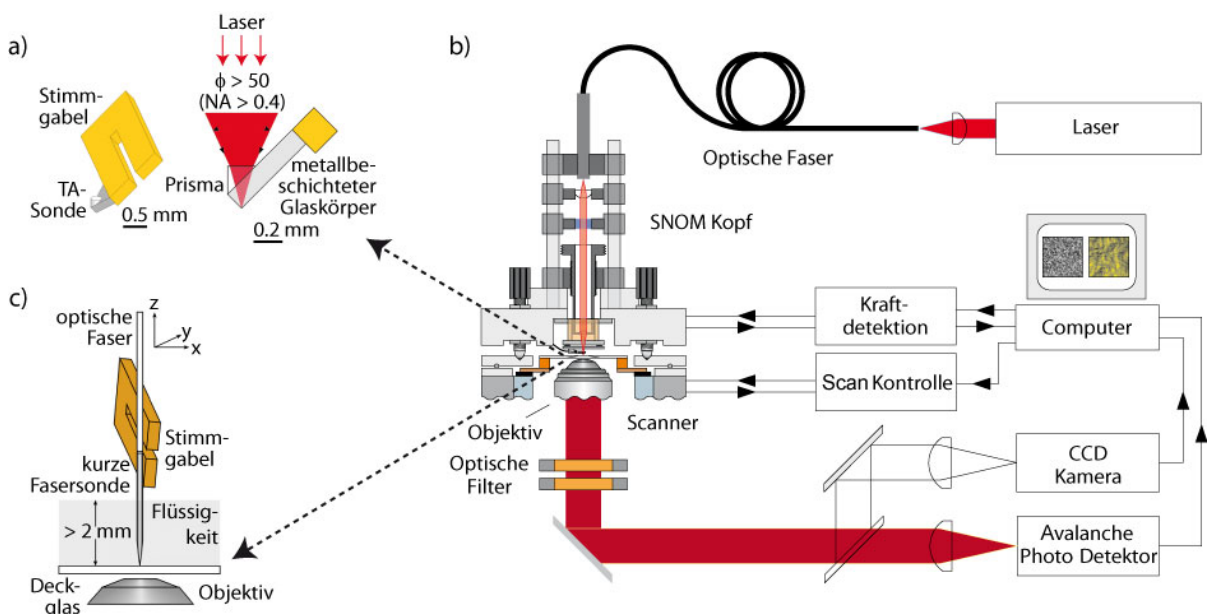


Abb. 47: Schematische Darstellung des SNOM-Aufbaus (b) und zweier Sondentypen (a+c). Bei der Dreiecksapertursonde (a) wird der freie Laserstrahl in ein Prisma eingekoppelt, das an der Sonde befestigt ist. Bei Messungen unter Flüssigkeit wird der gesamte Komplex aus Dreiecksapertursonde, Prisma und Stimmgabel untergetaucht. Die Fasersonde (c) dagegen wird nur mit der ausgezogenen Spitze eingetaucht. Dadurch kann die Stimmgabel auch bei Messungen in Flüssigkeiten für die Kraftabstandskontrolle eingesetzt werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten nahfeldoptischen Messungen wurde die Kraftabstandskontrolle nur zur Sondencharakterisierung im Trockenen eingesetzt (b). [verändert nach Naber (2003)]

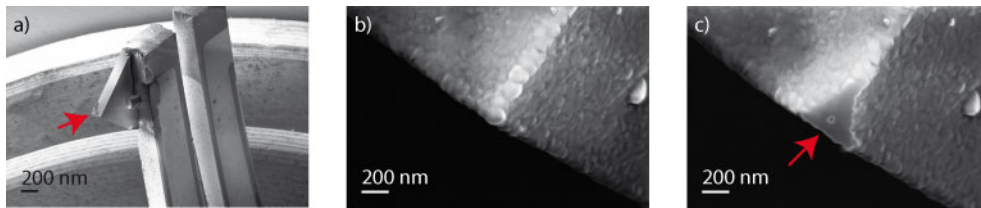


Abb. 48: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer Dreiecksapertursonde. (a) Die Dreiecksapertursonde (Pfeil) der ersten Generation wurde an einem Zinken der Stimmgabel befestigt. Die Spitze des mit einem Aluminiumfilm bedeckten Glaskörpers (b) wurde mit einem fokussierten Ionenstrahl dekaptiert, so dass eine Apertur der gewünschten Größe entstand (Pfeil in c). [Bilder von N. Neuberth]

Sonde wurde die Kernmembran in axialer Richtung mitbewegt, bis die Rückstellkraft die Wechselwirkung zwischen dem Sondenplateau und der Membran überwog und die Kernhülle in die Ausgangsposition zurückkehrte. Bei lateralen Bewegungen hingegen war keine Interaktion festzustellen. Die Sonde glitt vielmehr wie auf einem Wasserfilm über die Membran, ohne diese dabei zu stauchen oder einzureißen. Die axiale Wechselwirkung kann auf van-der-Waals-Kräfte oder Dipol-Dipol-Interaktionen zwischen dem positiv geladenen Aluminiummantel der Sonde und der negativen Nettoladung der Kernlamina und der Aktinfilamente beruhen.

Während der Messung verursachten die auf die Nahfeldsonde wirkenden Kapillarkräfte und die sich aufgrund der Verdunstung ändernde Oberflächenspannung axiale und laterale Driften. Um die Stabilität des Systems insbesondere axial zu erhöhen, wurde zunächst die Stimmgabel der ersten Generation nach der Sondencharakterisierung mit Klebstoff überzogen (Abb. 48). Durch die Herstellung reproduzierbarer Aperturen mit dem fokussierten Ionenstrahl (FIB) konnte auf die Charakterisierung verzichtet werden, so dass bei den Sonden der zweiten Generation für driftarme Messungen die Stimmgabel durch eine Metallplatte ersetzt wurde.

Die Stabilität wurde bei den Dreiecksapertursonden der dritten Generation aufgrund einer komplett neuen Konstruktion deutlich verbessert, wobei der Verzicht auf die Stimmgabel und die Befestigung der Sonde auf einem größeren, mit einem Deckglas von 10 x 10 mm verbundenen Prisma die Kraftdetektion generell ausschloss (Pérez, 2008). Mit einer Gesamthöhe von 2 mm tauchte dabei nur ein Teil des Prismas in die Pufferlösung ein. Die komplette Anordnung wurde mit einem 130 nm starken Goldfilm beschichtet, so dass bei diesen Sonden das Laserlicht direkt in das Prisma eingekoppelt werden konnte. Dadurch wurde das Streulicht, das insbesondere bei der Einkopplung in ein in Flüssigkeit befindliches Prisma entsteht, vollständig unterdrückt.

Der große Zellkern der *Xenopus* Oocyte wird intranukleär durch ein Netzwerk aus Aktinfilamenten (F-Aktin) stabilisiert (Bohnsack et al., 2006), welches durch das Anschwellen des

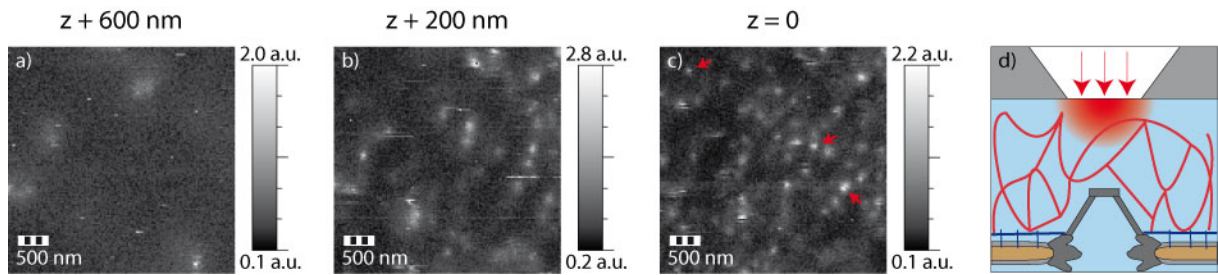


Abb. 49: Annäherung an die nukleoplasmatische Seite einer mit $\alpha\beta$ -Aktin markierten Kernmembran. In einer größeren Entfernung (a) sind wenige, unscharfe Flecken zu sehen, die 400 nm näher schärfer werden (b). Im Nahfeld der Goldsonde mit einer 80 nm großen Apertur zeichnen die angeregten Fluorophore punktuell die Filamente nach. Durch die Annäherung um weitere 200 nm (c) komprimierte das Sondenplateau das Aktinfilamentgeflecht, so dass mehr Fluorophore im Nahfeld angeregt wurden und die Anregungsintensität für die Aufnahme abgeschwächt werden musste. Die Halbwertsbreite der abgebildeten Flecken (rote Pfeile) beträgt 65-100 nm. In der Schemazeichnung (d) sind die Aktinfilamente rot und die Kernlamina blau dargestellt.

Kerns im hypoosmolaren Präparationsmedium unkontrolliert reißt. In einiger Entfernung der immunfluoreszent markierten Aktinfilamente wurden nur diejenigen Fluorophore angeregt, die in das Nahfeld der Dreiecksapertursonde hineinragten (Abb. 49). Durch die weitere Annäherung der Sonde an die Kernmembran konnten mehr Fluorophore angeregt und detektiert werden. Die punktförmige Darstellung der Aktinfilamente kann sowohl durch die begrenzte Zugänglichkeit des N-terminalen Epitops als auch durch die räumliche Anordnung der Aktinfilamente hervorgerufen werden. Die freitragende Kernhülle wurde durch die fortschreitende Annäherung des Sondenplateaus soweit gedehnt, bis sich aufgrund der intrinsischen Rückstellkraft der optimale Abstand einstellte. Eine weitere Annäherung würde das Ergebnis nicht verbessern, sondern die Kernmembran irreversibel schädigen.

Der eingesetzte nahfeldoptische Aufbau ist für die genauere Untersuchung der Aktinfilamente wenig geeignet. Da diese aber die Annäherung der Sonde an den Kernporenkomplex behindern, wurde das F-Aktin für die weiteren Messungen durch Kältebehandlung (Pokorna et al., 2004) und anschließender Spülung mit 0.05% (v/v) Tween20 weitgehend entfernt.

Bei der nahfeldoptischen Messung rastert die Sonde die Probe sowohl von links nach rechts als auch in der umgekehrten Richtung. Da sich das Sondenplateau in unmittelbarer Nähe der Probenoberfläche bewegt, gibt der Vergleich der beiden Aufnahmen Aufschluss über die thermische Drift der Sonde und bei bekannten Sondeneigenschaften auch über die ausgeübten lateralen Kräfte. Bei der Korrelation der beiden Bilder wird die Matrix des ersten Bildes $f(x,y)$ mit der des zweiten $g(x,y)$ multipliziert und über alle x,y summiert. Ausgehend von der Bildmitte wird dieser Vorgang nach der Verschiebung um k und l in der X- und Y-Achse wiederholt und das Ergebnis bildlich mit dem höchsten Wert in Weiß und dem niedrigsten in Schwarz dargestellt:

$$G(k_1, k_2) = \sum_{x, y} f(x_i, y_j) g(x_i + k, y_j + l) \quad (13)$$

Je ähnlicher zwei Bilder sind, desto größer ist der Wert der Kreuzkorrelation. Bei der Auto-korrelation gilt $f(x, y) = g(x, y)$ und der höchste Wert liegt mit k und l gleich Null in der Bildmitte.

Die vor- und rückwärts gerichteten Aufnahmen der mit $\alpha\beta$ -Aktin gefärbten Kernmembran zeigen in der Überlagerung eine deutliche Abweichung (Abb. 50). Die Korrelation des rechts

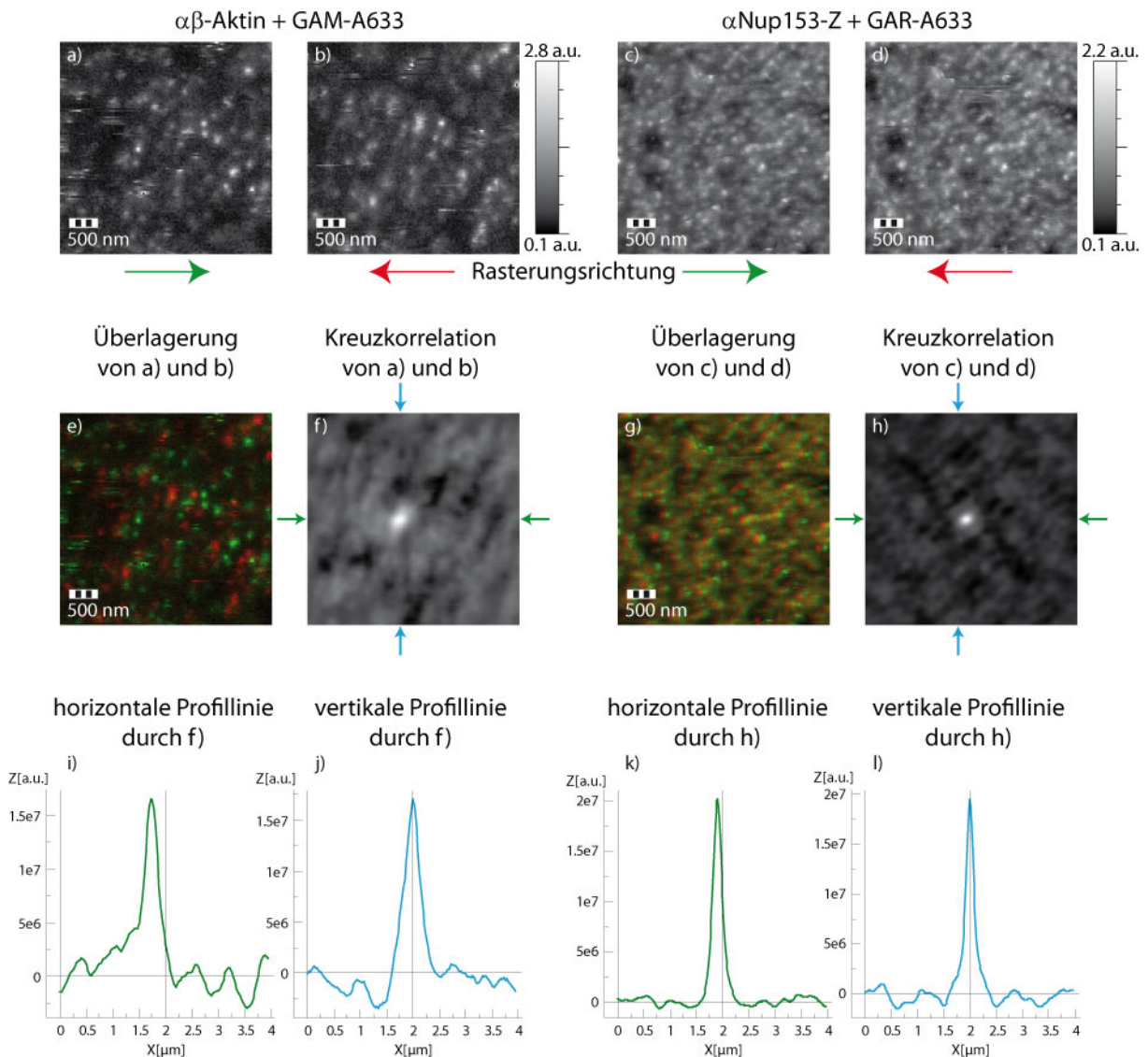


Abb. 50: Vergleich der beiden Rasterungsrichtungen zweier unterschiedlicher Messungen. Die nukleoplasmatische Seite der Kernmembran wurde sowohl von links nach rechts als auch in umgekehrter Richtung gerastert. Die Überlagerung der beiden Aufnahmen zeigt den Versatz und damit die Festigkeit der Probe. Die frisch präparierte, mit $\alpha\beta$ -Aktin gefärbte Kernmembran (a) und (b) zeigt in der Überlagerung einen deutlichen Versatz (Bild e), wobei a) in grün und b) in rot dargestellt wurden). Mit Hilfe der horizontalen Profilinie (i) durch die Kreuzkorrelation (f) kann die Verschiebung auf 280 nm quantifiziert werden, wohingegen das vertikale Profil keine Abweichung aufweist (j). Die Markierung des distalen Rings mit α Nup153-Z (c und d) zeigt in der Überlagerung (g) nur eine kleine Differenz. Das über Nacht bei 4°C gelagerte und mit 0.05% (v/v) Tween20 gespülte Präparat weist in der Kreuzkorrelation (h) einen etwa 99 nm großen horizontalen Versatz auf (k).

nach links gerasterten Bildes mit der Vorwärtsaufnahme weist eine horizontale Verschiebung des Maximums um 280 nm auf. Die nukleoplasmatische Seite einer mit α Nup153-Z markierten Kernmembran dagegen zeigt in der Kreuzkorrelation eine Abweichung von etwa 100 nm (Abb. 50). Zur Entfernung des F-Aktins wurde dieses Präparat wie nach Pokorna et al. (2004) über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit 0.05% (v/v) Tween20 gespült.

Die Stabilität des Systems wird durch die in vertikaler Richtung versatzlose Kreuzkorrelation deutlich. Bei der Betrachtung der horizontalen Differenz wurde die geringe systemimmanente Abweichung durch die verzögerte Messung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zur angegebenen Position vernachlässigt.

Der Antikörper α Nup153-Z bindet an die Zinkfinger-Domäne von Nup153, die am distalen Ring des Kernkorbs lokalisiert ist (Fahrenkrog et al., 2002). Die acht Filamente, die den distalen Ring am nukleoplasmatischen Ring verankern, erlauben dieser terminalen Struktur nur eine eingeschränkte Flexibilität.

Die Differenz zwischen den beiden Aufnahmen der mit α Nup153-Z markierten Kernmembran von 100 nm setzt sich aus der eingeschränkten Beweglichkeit des distalen Rings und der Sondengeschwindigkeit zusammen. Ein sich schneller bewegendes Sondenplateau verursacht eine größere laterale Scherung des distalen Rings. Darüber hinaus bewirkt die Verdopplung der Pixelgröße eine Driftvergrößerung um 30% (Tab. 12).

Die Aktinfilamente auf der nukleoplasmatischen Seite einer frisch präparierten Kernmembran wurden durch das darüber gleitende Sondenplateau um 60 nm weiter verschoben als der distale Ring unter vergleichbaren Bedingungen (Tab. 12).

Tab. 12: Quantitative Driftanalyse unterschiedlicher Messungen in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit und der Auflösung. Die Verdopplung der Geschwindigkeit erhöht physikalisch die laterale Drift, wobei deren Berechnung durch die Lokalisationsgenauigkeit der Fluorophore eingeschränkt wird. Aus der Driftdifferenz zweier unter vergleichbaren Bedingungen vermessener Proben kann deren relative Steifigkeit qualitativ bestimmt werden.

Präparation	α Nup153	α Nup153	mAb414	mAb414	α Nup153	$\alpha\beta$ -Aktin
Pixelgröße [nm]	15.625	15.625	15.625	31.25	31.25	31.25
Geschwindigkeit	2 μ m/s	4 μ m/s	4 μ m/s	4 μ m/s	8 μ m/s	8 μ m/s
Horizontale Drift	65 nm 74 nm 76 nm	99 nm 99 nm 100 nm	123 nm 121 nm 122 nm 115 nm	149 nm 160 nm 158 nm 155 nm	187 nm 196 nm 195 nm 209 nm	265 nm 280 nm 288 nm 236 nm 222 nm 260 nm 261 nm
Drift \emptyset	72 nm	100 nm	120 nm	156 nm	197 nm	259 nm

4.8 Nahfeldoptische Messungen an einer freistehenden Kernmembran

Für die nahfeldoptische Charakterisierung der freistehenden Kernmembran wurden der pan-NPC Marker mAb414 und die beiden domänenspezifischen Antikörper α Nup153-C2 und α Nup153-Z eingesetzt (Abb. 51). Der monoklonale Antikörper mAb414 wurde durch Immunisierung von Mäusen mit Rattenleberzellkernen hergestellt (Davis & Blobel, 1986). Er reagiert mit einer Reihe Proteine, die FXFG-Wiederholungen besitzen, wie p62, Nup153, Nup214/CAN und Nup358/RanBP2 (Walther et al., 2001). Im Immun-Blot erkennt mAb414 nicht nur p62, sondern auch ein in der Größe von Nup153 laufendes Protein (Abb. 51). Nup214/Can und Nup358/RanBP2 wurden für die immunologische Detektion aufgrund ihrer Größe von 214 und 358 kDa in nichtausreichender Menge auf die Blotmembran übertragen.

α Nup153-Z ist gegen die am distalen Ring lokalisierte Zinkfinger-Domäne und α Nup153-C2 gegen den flexiblen, an FXFG-Wiederholungen reichen C-Terminus des *Xenopus* Nup153 gerichtet (Fahrenkrog et al., 2002). Im Immun-Blot detektierten die beiden domänenspezifischen Antikörper nicht nur Nup153, sondern noch ein ca. 50 kDa großes Protein (Abb. 51). Der mittels Affinitätschromatographie gereinigte Antikörper α Nup153-Z kreuzreagiert in höherer Konzentration mit Nup358/RanBP2 und der mittels Protein G gereinigte Antikörper α Nup153-C2 zeigt in der Immunpräzipitation Kreuzreaktivität mit einigen FG-reichen Nukleoporinen (persönliche Mitteilung Prof. Dr. K. Ullman).

Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen eines IgG-Antikörpers zeigen ein Y mit 6.0-6.5 nm Schenkellänge (San Paulo & Garcia, 2000). Ein mit monoklonalen primären und fluores-

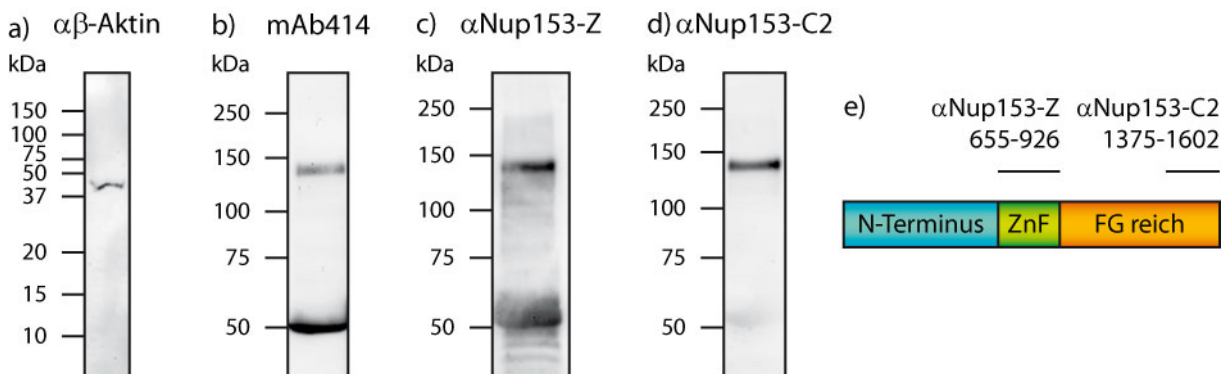


Abb. 51: Immunologische Analyse der *Xenopus* Oozyten-Zellkerne. (a) Die riesigen Nuklei werden durch ein Netzwerk aus Aktin (44 kDa) stabilisiert. (b) Der monoklonale pan-NPC-Marker mAb414 detektiert ein p62 und ein Protein, das in der Größe von Nup153 läuft. Die beiden domänenspezifischen Antikörper α Nup153-Z (c) und α Nup153-C2 (d) reagieren nicht nur mit Nup153, sondern detektieren noch mindestens ein weiteres Nukleoporin. Die schwächeren Banden auf dem Immun-Blot α Nup153-Z (c) stammen von unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers GAR-POD. (e) α Nup153-Z ist gegen die Zinkfinger-Domäne (ZnF, 655-926aa) und α Nup153-C2 gegen den an FxFG-Wiederholungen reichen C-Terminus (1375-1602aa) des *Xenopus* Nup153 gerichtet .

zierenden sekundären Antikörpern markiertes Epitop weist somit Fluorophore im Umkreis von 12-20 nm auf. Durch Konjugation der primären Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen wird deren Verteilung auf einen Radius von 6-11 nm reduziert, wobei sich die Helligkeit des markierten Epitops drastisch reduziert. Solange die Fluoreszenz nicht zur Annäherung der Sonde benötigt wird, ist dieser Umstand für nahfeldoptische Messungen weniger gravierend, da die Intensität der Fluoreszenz nur von der Entfernung der Fluorophore zur Apertur abhängig ist. Das Messergebnis wird durch die Photostabilität der Fluorophore und das Signal/Rausch (S/N)-Verhältnis beeinflusst. Letzteres ist stark von der Lasereinkopplung in das Prisma der Dreiecksapertursonde, der Undurchlässigkeit des Metallfilms und von der unspezifischen Antikörperbindung abhängig.

Für zeitlich aufgelöste Lokalisationsstudien und für tagesfrische Messungen wurden die Antikörper mAb414, α Nup153-C2 und α Nup153-Z mit Alexa Fluor[®] 633 bzw. 532 konjugiert und die Kopplungsrate spektrophotometrisch bestimmt (Tab. 13). Des Weiteren wurden die Antikörper mit halbleitenden Nanokristallen Qdot[®] 655 dotiert. Die rekombinant exprimierten und chromatographisch gereinigten Proteine Importin α 2 und Ntf-2 wurden für Fluoreszenzkorrelationsspektroskopische (FCS) Messungen mit Alexa Fluor[®] 633 markiert und die Kopplungsrate wurde ebenfalls spektrophotometrisch bestimmt.

Um eine unspezifische Bindung der sekundären Antikörper oder der Fluorophore an die Kernmembran zu überprüfen, wurden vier Präparate mit je zwei unterschiedlichen sekundären Antikörpern inkubiert. Dabei diente als Positivkontrolle der sekundäre Antikörper, der den primären Antikörper erkennt (z.B. α Nup153-Z + GAR-A633) und als Negativkontrolle der sekundäre Antikörper, der primäre Antikörper einer anderen Spezies erkennt (z.B. α Nup153-Z, GAM-A532). Um die Abbildungsqualität sicherzustellen, wurde diesselbe Probe jeweils in der Reihenfolge Positiv-Negativ-Positivkontrolle vermessen.

Tab. 13: Kopplungsrate der direkt konjugierten Proteine. Angegeben ist die spektrophotometrisch bestimmte und nach Gleichung (7) berechnete Anzahl der Fluorophore pro Protein. Die Werte für die Quantenpunkte Qdot[®] 655 entsprechen der im Handbuch angegebenen durchschnittlichen Kopplungsrate.

	Alexa Fluor [®] 532 (Fluorophore/Protein)	Alexa Fluor [®] 633 (Fluorophore/Protein)	Qdot [®] 655 (Qdots/Protein)
mAb414	4/3	3	1/4
α Nup153-C2	-	2/3	1/4
α Nup153-Z	-	1/3	1/4
Importin α 2	-	1/3	-
Ntf-2	-	1/2	-

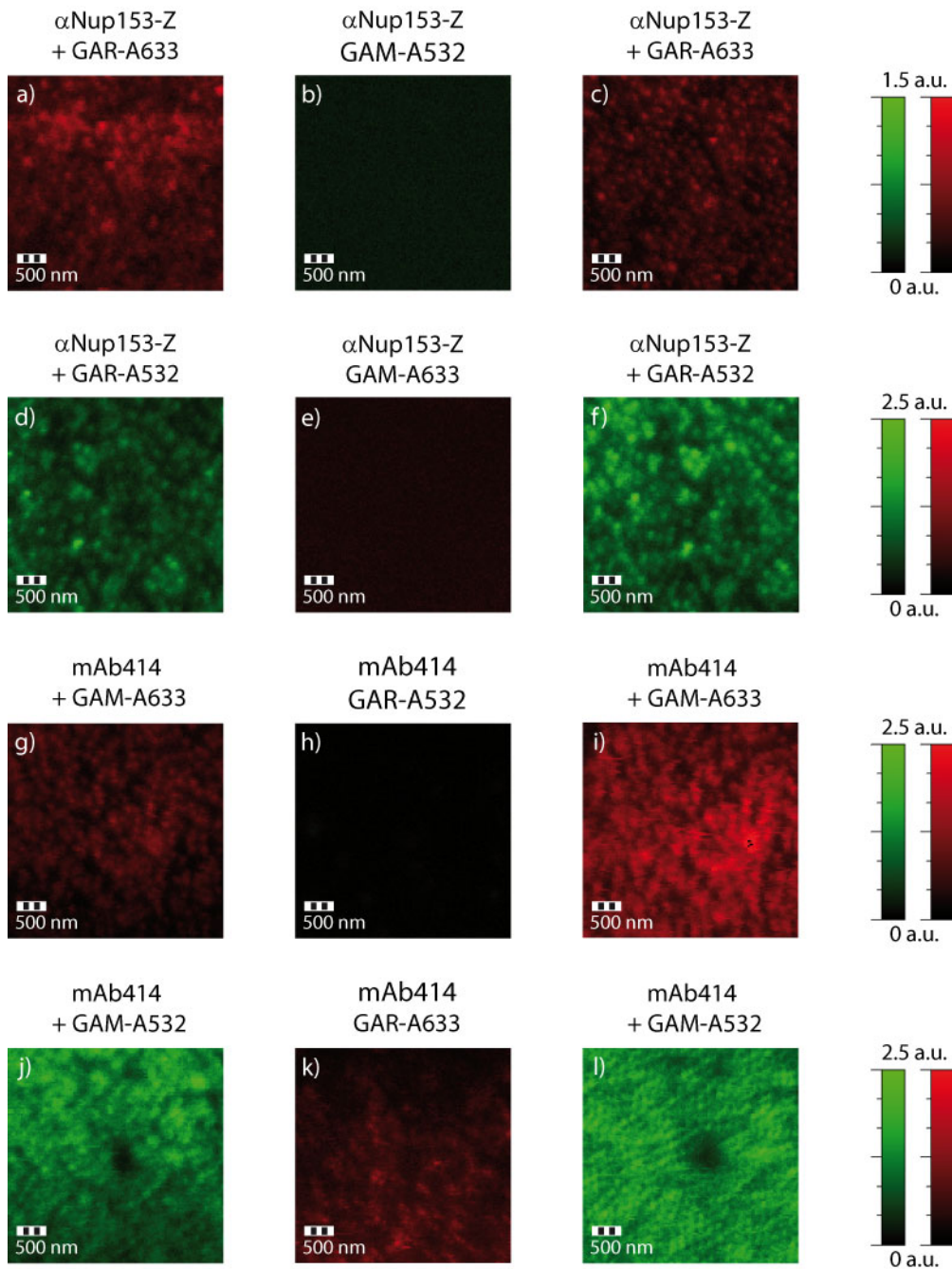


Abb. 52: Die eingesetzten sekundären Antikörper zeigen nur geringe unspezifische Bindungsaffinitäten. Zur Prüfung der vier für die nahfeldoptischen Messungen eingesetzten sekundären Antikörper auf unspezifische Bindung wurden in vier Ansätzen die Kernmembranen mit den primären Antikörpern α -Nup153-Z (a-f) oder mAb414 (g-l) markiert und mit einem passenden sekundären Antikörper sichtbar gemacht (linke Spalte). Zusätzlich wurde der gegen die andere Spezies gerichtete und mit dem anderen Fluorophor konjugierte sekundäre Antikörper hinzugegeben. Die über Nacht bei 4°C gelagerten und mit 0.05% (v/v) Tween20 gespülten Präparate wurden in der abgebildeten Reihenfolge (a-l) mit derselben Nahfeldsonde (Apertur: 80 nm) analysiert, wobei zunächst die nukleoplasmatische Seite der Kernmembran abgebildet wurde (linke Spalte). Anschließend wurde mit der zweiten Laserlinie in ähnlicher Intensität angeregt (mittlere Spalte) und zuletzt die Membran wieder mit der ursprünglichen Wellenlänge aufgenommen (rechte Spalte). Die Abbildungen in einer Reihe wurden auf die größte Intensität der drei Aufnahmen normiert. Die letzte Reihe zeigt deutlich die Beanspruchung der Dreiecksapertursonde der zweiten Generation durch den mehrmaligen Probenwechsel. Die sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus und Ziege-anti-Kaninchen wurden mit GAM bzw. GAR abgekürzt und die Konjugat Alexa Fluor[®] 532 und Alexa Fluor[®] 633 mit -A532 bzw. -A633.

Tatsächlich zeigt die Positivkontrolle in jedem Fall eine hochaufgelöste Kernporenfärbung, während die Negativkontrolle keinerlei Färbung aufweist (Abb. 52). Einzig in der zuletzt vermessenen Probe sind unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers GAR-Alexa Fluor[®] 633 sichtbar, die nicht mit den beiden Positivkontrollen dieser Probe korrelieren. Diese zeigen eine deutliche Reduktion der Abbildungsqualität, die auf die lange Beanspruchung der mit Aluminium beschichteten Dreiecksapertursonde und den häufigen Probenwechsel zurückgeführt werden kann. Somit ist klar, dass weder Fluorophore noch sekundäre Antikörper unspezifisch die Kernporen markieren und dass somit die hochaufgelösten Abbil-

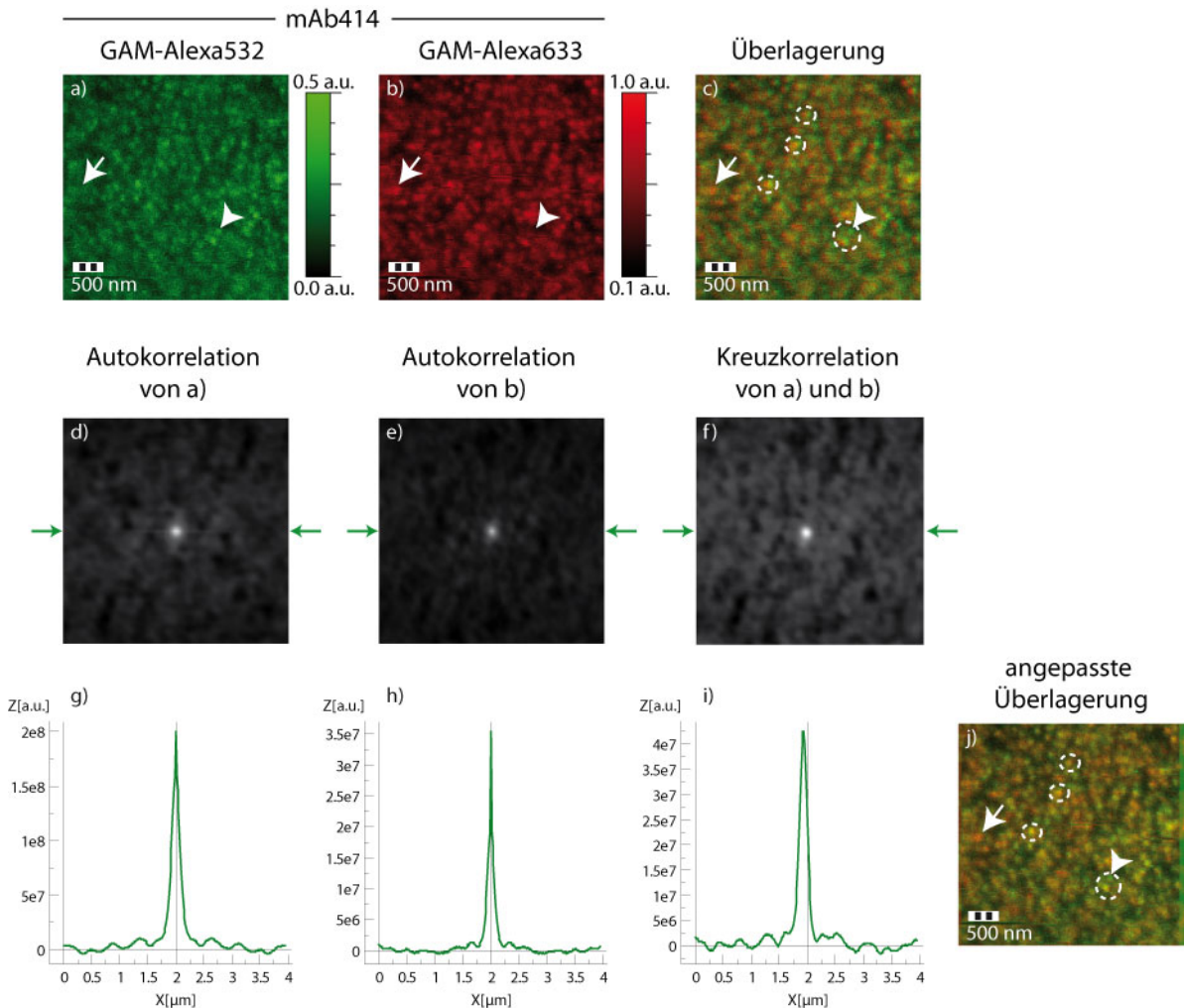


Abb. 53: Doppelmehrte freistehende Kernmembranen können exakt abgebildet werden. Der an die Membran gebundene primäre Antikörper mAb414 wurde mit den beiden sekundären Antikörpern GAM-Alexa Fluor[®] 532 und GAM-Alexa Fluor[®] 633 fluoreszent markiert. Nach der F-Aktin-Entfernung wurde die nukleoplasmatische Seite der Kernmembran mit den Laserlinien 532 nm (a) und 633 nm (b) unter Verwendung einer Sonde der zweiten Generation mit einer 50 nm großen Apertur nacheinander mit 4 $\mu\text{m/s}$ abgebildet. Die Überlagerung (c) zeigt eine partielle Kolokalisation der sekundären Antikörper (gestrichelte Kreise). Nur wenige Kernporen wurden ausschließlich mit einer Fluorophorspezies markiert (Pfeil: GAM-A633, Pfeilspitze: GAM-A532). Die Autokorrelationen (d und e) weisen das erwartete Maximum in der Bildmitte auf und zeigen im horizontalen Linienprofil (g und h) keine lateralen Differenzen. Das horizontale Linienprofil (i) der Kreuzkorrelation der beiden Aufnahmen (f) zeigt einen leichten Versatz, der durch eine kleine laterale Verschiebung eines der Bilder um 77 nm ausgeglichen werden kann (j).

dungen tatsächlich Kernporen zeigen.

Zur Kontrolle der optischen Abbildung bei serieller Verwendung zweier Anregungslaserlinien wurde eine mit mAb414 und den beiden sekundären Antikörpern GAM-A532 und GAM-A633 markierte Kernmembran nahfeldoptisch dargestellt (Abb. 53).

Die Überlagerung der beiden hochaufgelösten Aufnahmen zeigt viele vollständige oder partielle Kolokalisationen (Abb. 53 c). Nur wenige Kernporen wurden ausschließlich mit einem der beiden sekundären Antikörper markiert. Bei der Autokorrelation der Immunfluoreszenzaufnahmen ist entsprechend der Theorie ein zentrales Maximum sichtbar (Abb. 53 e) und f). Das horizontale Linienprofil durch das Maximum der Kreuzkorrelation der beiden nahfeldoptischen Aufnahmen zeigt einen geringen Versatz von 77 nm. Die Verschiebung einer der Abbildungen um diesen Betrag erhöht die Zahl der vollständigen Kolokalisationen auf der überlagerten Darstellung (Abb. 53 j). Bei anderen Messungen bewegt sich die laterale Drift zwischen zwei nacheinander, mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen aufgenommenen Bildern in einem Bereich von 30 bis 100 nm.

Kolokalisationsstudien an zweifach markierten Kernmembranen zeigen nur wenige Kernporen, bei denen sowohl α Nup153-Z und als auch mAb414 hochaufgelöst dargestellt werden konnten (Abb. 54). Wider Erwarten konnte der fluoreszierende Primärantikörper mAb414-A532 im Gegensatz zu dem mit Sekundärantikörpern markiertem mAb414 nicht hochaufgelöst dargestellt werden (Abb. 54 b) und f). Das schlechte S/N-Verhältnis weist darüber hinaus auf einen hohen Fernfeldanteil bei der Anregung hin. Somit befinden sich die Fluorophore nur noch bedingt im optischen Nahfeld der Dreiecksapertursonde. Durch die Bindung fluoreszierender Sekundärantikörper vergrößert sich der Radius, in dem die Fluorophore um das Epitop herum lokalisiert sein können, um ca. 10 nm. Somit könnte die Reduktion der Lokalisationsgenauigkeit des Epitops im Falle von mAb414 einige Fluorophore aus dem Grenzbereich ins optische Nahfeld zurück bringen und die hochaufgelöste Darstellung selbiger ermöglichen.

Die Überlagerung der korrelierten nahfeldoptischen Immunfluoreszenzaufnahmen zeigt nicht nur kolokalisierte α Nup153-Z- und mAb414-Antikörper sondern auch unmittelbar benachbarte, nicht überlappende Fluoreszenzen (Abb. 54 k), die entweder von variierenden lateralen Driften oder von unbewegten, nebeneinander liegenden Epitopen herrühren. Letzteres ist in Einklang mit der Hypothese, dass die Zinkfingerdomäne von Nup153 nicht nur an den distalen Ring, sondern auch an den nukleären Ring bindet und die FG-reiche Domäne möglicherweise mit der Kernlamina interagiert (Ball & Ullman, 2005).

Darüber hinaus zeigt die in Abb. 54 i) und j) dargestellte Doppelfärbung neben einer geringen Fluktuation eine nahezu identische Auflösung der α Nup153-Z- und mAb414-Antikörper.

Weitere Auswertungen bestätigen, dass sich die Auflösungen mAb414-oder Nup153-Z-

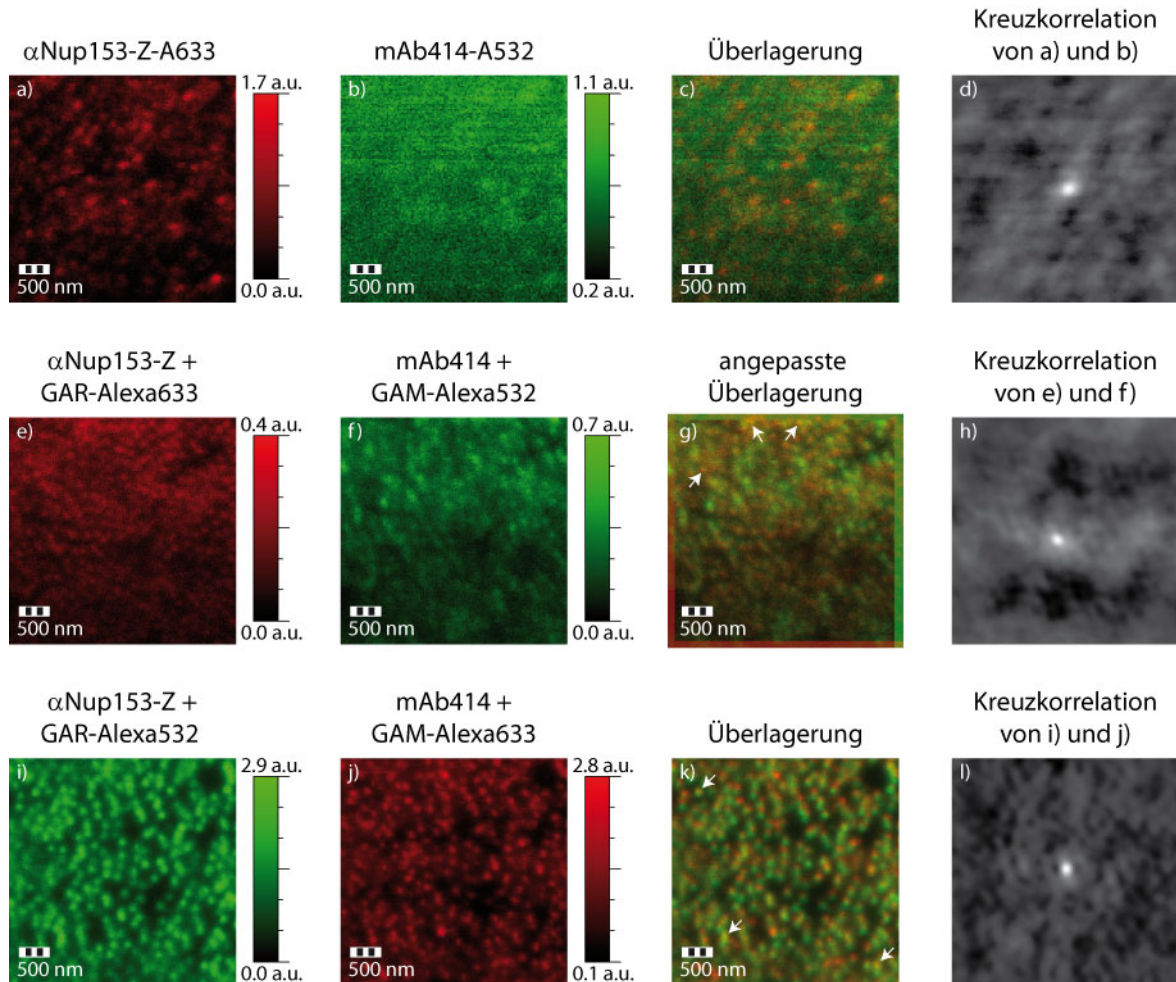


Abb. 54: Die Antikörper α Nup153-Z und mAb414 sind an manchen Kernporen kolokalisiert. (a) Die Alexa Fluor[®] 633-konjugierten α Nup153-Z-Antikörper konnten bei der nahfeldoptischen Vermessung der nukleoplasmatischen Seite einer zweifach markierten Kernmembran hochaufgelöst dargestellt werden. (b) Im Gegensatz dazu war die Auflösung der mit Alexa Fluor[®] 532 gekoppelten mAb414-Antikörper deutlich reduziert. (c) Aufgrund des schlechten S/N-Verhältnisses sind auf der Überlagerung keine Kolokalisationen zu erkennen, obwohl die beiden Fluoreszenzaufnahmen korreliert sind (d). Bei der Verwendung sekundärer Antikörper wurden sowohl die α Nup153-Z (e und i) als auch mAb414-Antikörper (f und j) hochaufgelöst dargestellt. Die Überlagerungen der korrelierten nahfeldoptischen Abbildungen (g und h) zeigen wenige Kolokalisationen (Pfeile). Für die Überlagerung von e) und f) wurden die Aufnahmen entsprechend der Kreuzkorrelation (h) gegeneinander verschoben. Für die Überlagerung c) und k) wurde die Deckkraft der Alexa Fluor[®] 532-Abbildungen reduziert. Die nahfeldoptischen Immunfluoreszenzaufnahmen allerdings wurden nicht verändert, um beispielsweise den Verlust der Einkopplung in e) und f) zu kompensieren. Die minimale Halbwertsbreite der Fluoreszenzpunkte auf den mit α Nup153-Z markierten Membranen liegt bei 100 nm (a) bzw. 70 nm (e und i). Letzterer Wert unterscheidet sich nicht vom minimalen Durchmesser der mit mAb414 und GAM-A633 markierten Kernmembran (j). Die Präparate wurden zur F-Aktin-Entfernung über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei die Präparation der Aufnahmen i) und j) eine weitere Nacht bei 4°C gelagert worden war. Für die Vermessung wurden 60 nm (a und b) bzw. 65 nm große Dreieckspertursonden verwendet.

markierter Strukturen nicht wesentlich unterscheiden (Abb. 55 und Abb. 56). Ferner ist die Auflösung nicht durch das Auflösungsvermögen der Sonde begrenzt, das sich bei diesem Aufbau zwischen 30 und 40 nm bewegt (Molenda et al., 2005).

Wider Erwarten wiesen die mit primären und sekundären Antikörpern gefärbten Kernmembranpräparationen durchgehend eine bessere Auflösung auf als die mit fluoreszierenden Primärantikörpern markierten Strukturen (Abb. 55 und Abb. 56). Während bei mAb414-A633 Halbwertsbreiten (FWHM) von 105-175 nm gemessen wurden, betragen sie bei α Nup153-Z-A633 105-142 nm. Die mit mAb414 und GAM-A633 markierten Fluoreszenzpunkte indes wiesen Halbwertsbreiten von 87-113 nm auf. Im Gegensatz dazu zeigten die mit Nanokristal-

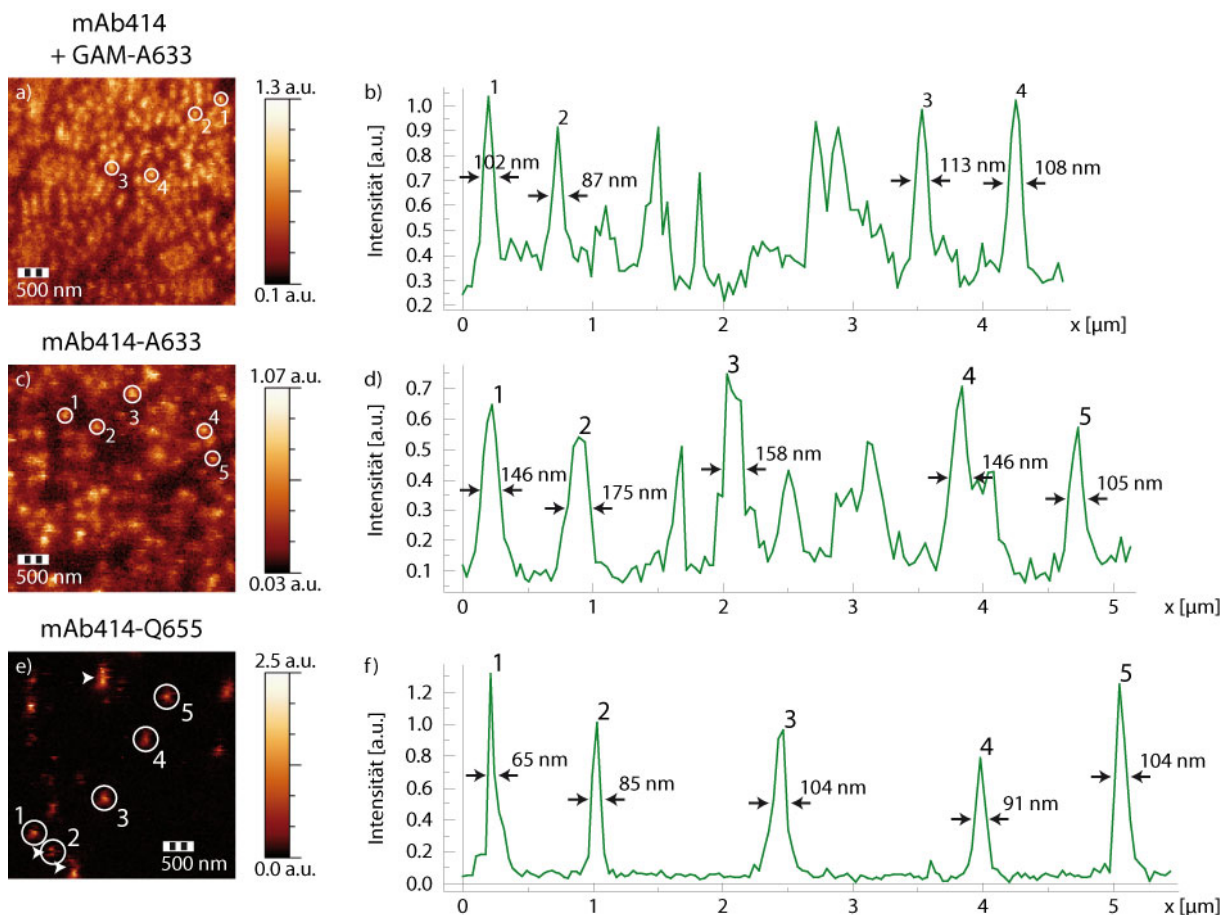


Abb. 55: Der pan-NPC-Marker mAb414 kann hochauflöst dargestellt werden. (a) Die nukleoplasmatische Seite einer mit mAb414 und GAM-A633 markierten Kernmembran zeigt Gruppen von schachbrettartig angeordneten Kernporen. Die Dichte beträgt 14.2 ± 1.56 Kernporen pro μm^2 . (b) Die Halbwertsbreite (FWHM) ausgewählter Fluoreszenzpunkte ist deutlich größer als die Sondenapertur von 50 nm. (b und c) Durch die Verwendung Fluorophor-gekoppelter Primärantikörper konnte die Auflösung wider Erwarten nicht verbessert werden (Apertur: 65 nm). Allerdings ist bei diesem Präparat die Kernporendichte mit 6.6 ± 2.24 NPCs/ μm^2 deutlich reduziert. Die mit Nanokristallen konjugierten Antikörper mAb414-Q655 (e) zeigen im Linienprofil (f) ihre Helligkeit in Form des einmaligen S/N-Verhältnisses. Die Halbwertsbreite der Fluoreszenzpunkte geht bis auf den Aperturdurchmesser von 60 nm herunter. In der Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzaufnahme wird das Blinken der halbleitenden Kristalle durch dunkle Streifen sichtbar (Pfeilspitzen in e). Alle Präparate wurden zur F-Aktinentfernung über Nacht bei 4°C inkubiert und mit 0.05% (v/v) Tween20 gespült.

len konjugierten Primärantikörper ein brillantes S/N-Verhältnis. Die Auflösung von 65-104 nm lässt sich infolge der geringen Konzentration leicht bestimmen und liegt im Bereich der publizierten Auflösung für mAb414 von ~60 nm (Höppener et al., 2005). Jedoch eignen sich die Quantenpunkte aufgrund ihres charakteristischen Blinkens, das auf der rasternahfeldoptischen Aufnahme durch dunkle Streifen sichtbar wird, nicht für FCS-Messungen (Abb. 55 e) und f).

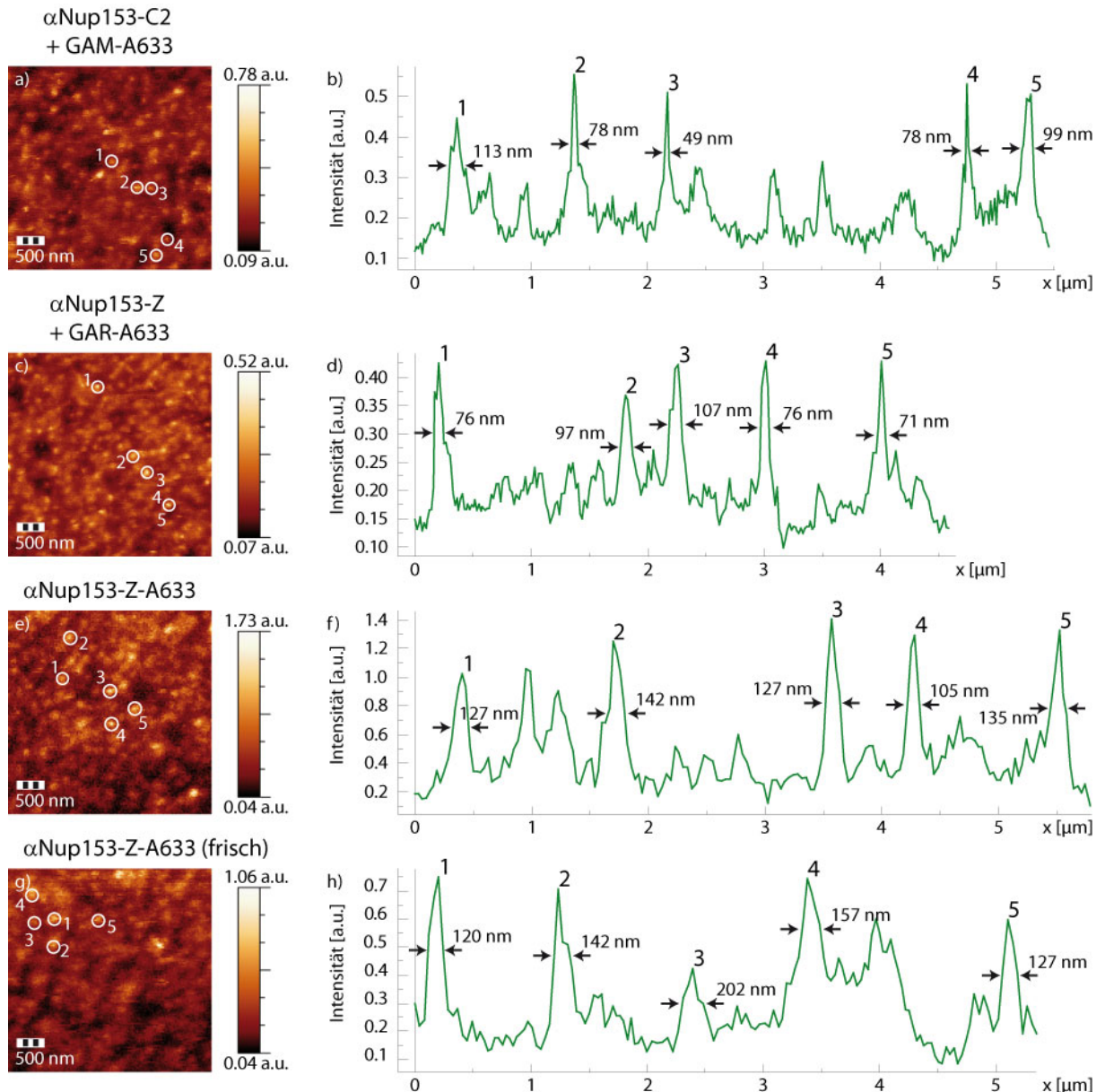


Abb. 56: Die domänenspezifischen Antikörper $\alpha\text{Nup153-C2}$ und $\alpha\text{Nup153-Z}$ werden ebenfalls hochaufgelöst dargestellt. Die Linienprofile ausgewählter Fluoreszenzpunkte von $\alpha\text{Nup153-C2}$ - (a) und $\alpha\text{Nup153-Z}$ - (b) markierten Kernmembranen zeigen eine ähnliche Verteilung der Halbwertsbreiten (b und d), wobei die Kernporendichte des mit $\alpha\text{Nup153-C2}$ gefärbten Präparats ($10.3 \pm 1.31 \text{ NPCs}/\mu\text{m}^2$) geringer ist als die der mit $\alpha\text{Nup153-Z}$ behandelten Kernhülle ($15.6 \pm 2.57 \text{ NPCs}/\mu\text{m}^2$). Die optische Auflösung konnte durch den Einsatz mit Fluorophoren gekoppelter primärer Antikörper (e) nicht verbessert werden (f), wobei sich die Auflösung bei der Vermessung der nukleoplasmatischen Seite einer frisch präparierten Kernmembran (g) nochmals verschlechterte (h).

Die Markierung des flexiblen C-Terminus von Nup153 mit α Nup153-C2 und GAM-A633 erzielte mit 49-113 nm eine bessere Auflösung als die Markierung des distalen Rings mit α Nup153-Z und GAR-A633, bei der Halbwertsbreiten von 71-107 nm gemessen wurden (Abb. 56).

Darüber hinaus verursachte die Verwendung frischer Kernmembranpräparationen einen zusätzlichen Auflösungsverlust. Während über Nacht gelagerte, mit α Nup153-Z-A633 markierte Strukturen Halbwertsbreiten von 105-142 nm aufwiesen, wurden bei einem frischen Präparat 120-202 nm gemessen (Abb. 56).

Abschließend wurde der pan-NPC-Marker mAb414 zusammen mit dem lipophilen Farbstoff DiI abgebildet (Abb. 57). Dazu wurden im Zuge der Kernpräparation intakte Zellkerne in der DiI-Färbelösung inkubiert, so dass der Farbstoff vornehmlich in die äußere Kernmembran interkalierte. Diese ist bei der rasternahfeldoptischen Vermessung der nukleoplasmatischen Seite für eine hochauflösende Abbildung zu weit entfernt, so dass im Gegensatz zu mAb414-A633 keine einzelnen DiI-Moleküle dargestellt werden konnten (Abb. 57 b) und c). Durch inverse Präparation der Kernmembran und Abbildung der zytoplasmatischen Seite hingegen werden einzelne DiI-Fluorophore sichtbar (Abb. 57 f). Auch der fluoreszent markierte Primärantikörper mAb414-A633 konnte so aufgrund seiner Bindung an die zytoplasmatischen Nukleoporene Nup214 und Nup358 hochaufgelöst dargestellt werden (Walther et al., 2001). Keine der Überlagerungen oder Kreuzkorrelationen deutet auf eine mögliche Kollokalisierung von mAb414 und DiI hin (Abb. 57).

Im Gegensatz dazu konnte die markierte Kernlamina dargestellt werden (Abb. 57 j). Dabei wiesen die mit einem α Lamin-Antikörper markierten Strukturen Halbwertsbreiten von 70 nm auf. Bemerkenswerterweise waren auf der Überlagerung der nahfeldoptischen Fluoreszenzaufnahmen einige Fluoreszenzpunkte benachbart und konnten durch horizontale Verschiebung um 60 nm zur Deckung gebracht werden, wobei die Kreuzkorrelation neben dem zentralen Maximum und auch sehr viele weitere, kleinere Maxima aufwies, die auf eine periodische Anordnung der Fluoreszenzpunkte hindeuten (Abb. 57 l, o) und p).

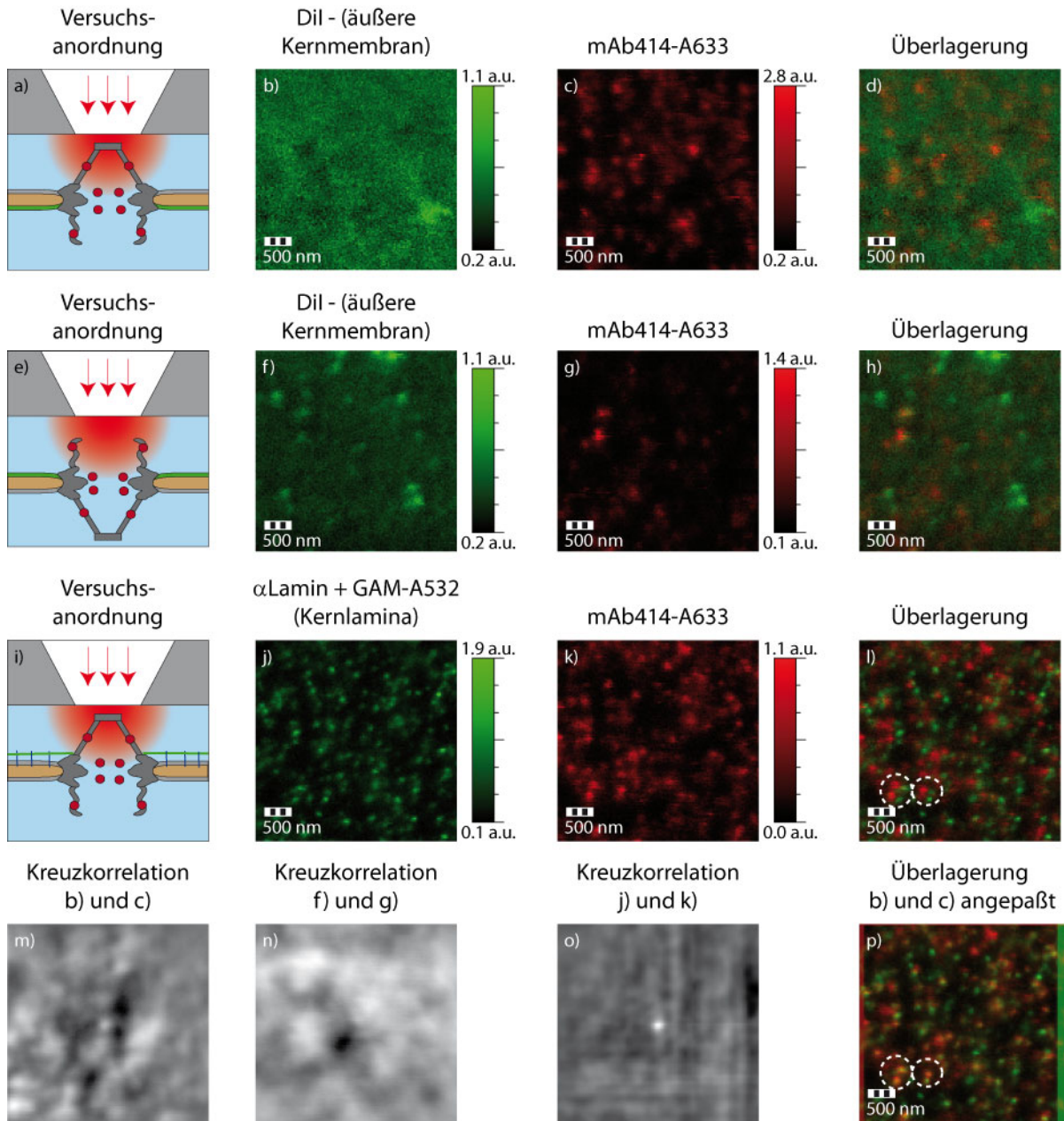


Abb. 57: Die nahfeldoptische Darstellung der Kernmembran ist axial begrenzt. (a und b) Die äußere mit DiI markierte Kernmembran (grün) ist bei der Vermessung der nukleoplasmatischen Seite eines frischen Präparats für eine hochaufgelöste Darstellung einzelner Moleküle zu weit entfernt. Durch die inverse Präparation (e) gelangt die äußere Kernmembran näher an die Sonde und einzelne Fluorophore werden sichtbar (f). Die Aufnahmen der doppelt markierten Kernmembranen zeigen den fluoreszent markierten Antikörper mAb414-A633 sowohl bei der Vermessung der nukleoplasmatischen (c) als auch bei der zytoplasmatischen Seite (g) hochaufgelöst. Die zusammengehörenden Aufnahmen weisen für keinen der beiden Ansätze eine Kolokalisation (d und h) oder eine Korrelation auf (m und n). Im Gegensatz dazu wird der α Lamin-Antikörper bei der Vermessung der nukleoplasmatischen Seite einer Kernmembran mit einer 65 nm großen Dreiecksapertursonde nach der F-Aktin-Entfernung hochaufgelöst dargestellt (j). Die minimale Halbwertsbreite der Fluoreszenzpunkte liegt bei 70 nm. In der Überlagerung mit dem pan-NPC-Marker mAb414 liegen auffallend viele Fluoreszenzpunkte benachbart (l), von denen einige (gestrichelte weiße Kreise) durch die horizontale Verschiebung einer der beiden Aufnahmen um 60 nm zur Deckung gebracht werden können (p). Die Kreuzkorrelation der beiden Fluoreszenzaufnahmen weist allerdings neben dem zentralen Maximum sehr viele weitere kleinere Maxima auf, die auf eine periodische Anordnung der Fluoreszenzpunkte hinweisen (o). Für die Vermessung der DiI-markierten Präparate wurden 80 nm (b und c) bzw. 45 nm große Dreiecksapertursonden (f und g) verwendet. Die potentiellen Lokalisationen des mAb414 in der Kernpore sind in den Schemata durch rote Punkte markiert.

4.9 Nahfeldoptische Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Die Kombination von SNOM und FCS ermöglicht die Analyse dynamischer Prozesse in einem um zwei bis drei Zehnerpotenzen kleineren Anregungsvolumen als bei auf konfokaler Mikroskopie basierender FCS. Nahfeldoptische Messungen an immobilisierten fluoreszierenden Nanopartikeln zeigten, dass die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bei dem im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehenden SNOM-Aufbau 24 nm beträgt (Pérez, 2008). Dabei wurde die Intensität I der angeregten Fluoreszenz in unterschiedlichen Entfernungen gemessen und gegen den Abstand d aufgetragen (Abb. 58). Die Eindringtiefe d ist definiert als der Punkt, an dem die Intensität auf $1/e$ der ursprünglichen Intensität I_0 abgesunken ist.

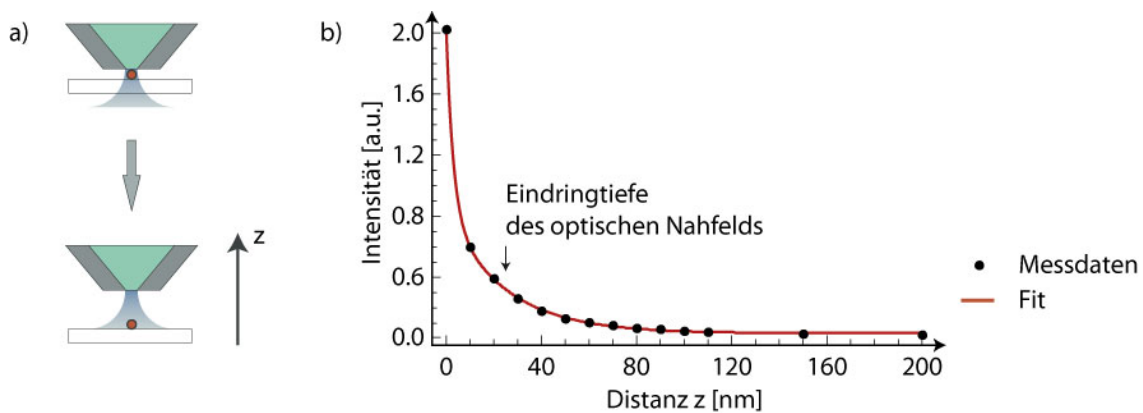


Abb. 58: Nahfeldoptische SNOM-Messungen bestätigen den exponentiellen Abfall des evaneszenten Feldes. (a) Eine TA-Sonde mit einer Apertur von 80 nm wurde über einem fluoreszierenden Polystyrolkugelchen platziert und die Fluoreszenzintensität in unterschiedlichen Abständen gemessen. (b) Dabei nimmt die Intensität mit steigendem Abstand z doppelt exponentiell ab und erreicht nach $z = 24$ nm $1/e$ der Ausgangsintensität I_0 . Dieser Wert bezeichnet die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes. [Messung von J. Pérez]

Die Eindringtiefe bestimmt gemeinsam mit dem Aperturdurchmesser das Anregungsvolumen der nahfeldoptischen Sonde. Durch dessen geringe Dimension sind frei diffundierende Fluorophore nur kurze Zeit im evaneszenten Feld detektierbar, wie die hohe Fluktuation im Intensitätssignal einer nahfeldoptischen Fluoreszenzmessung bestätigt (Abb. 59). Die experimentell bestimmte Autokorrelationsfunktion (AKF) sinkt bereits nach ~ 10 μ s auf die Hälfte ihrer Ausgangsamplitude ab. Aufgrund der komplexen Feldverteilung einer Dreiecksapertursonde (Molenda et al., 2005) fehlt bisher ein einfaches analytisches Modell, das zur Herleitung der theoretischen Autokorrelationsfunktion für das optische Nahfeld einer TA-Sonde herangezogen werden könnte.

Im Gegensatz zur freien Lösung zeigte das Intensitätssignal nahfeldoptischer Fluoreszenzmessungen an einer Kernmembran immer wieder Ereignisse, bei denen überdurchschnittlich viele Photonen in einem Zeitraum von einigen Millisekunden detektiert wurden (Abb.

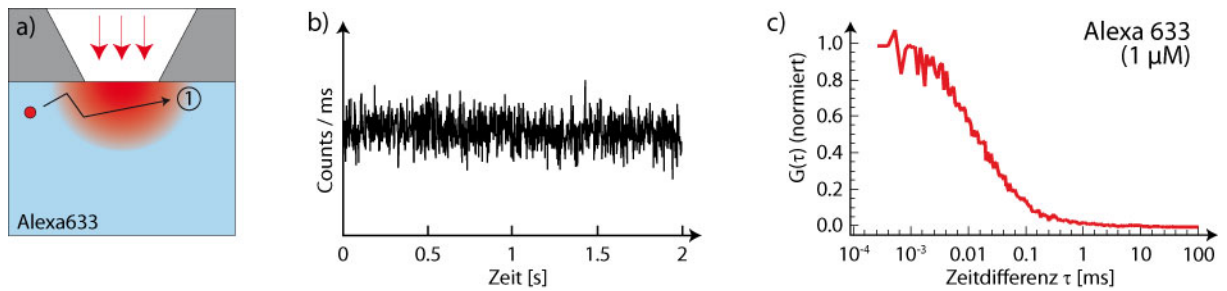


Abb. 59: Nahfeldoptische Fluoreszenzmessungen in freier Lösung zeigen hohe Fluktuationen von ungekoppeltem Alexa Fluor® 633. (a) Die Fluorophore diffundieren ungehindert durch das Nahfeld der TA-Sonde (Apertur 35 nm), wobei sie in Abhängigkeit von ihrer Entfernung zur Apertur unterschiedlich stark angeregt werden. (b) Der zwei Sekunden lange Ausschnitt des Intensitätssignals einer 1 μM Alexa Fluor® 633-Lösung weist hohe Fluktuationen auf (Gesamtmesszeit: 600 s). (c) Die normierte Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ bestätigt die kurze Diffusionszeit. Bereits nach $\sim 10 \mu\text{s}$ ist $G(\tau)$ auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes G_0 gesunken. [Messung in Kooperation mit J. Pérez]

60). Bei einer höheren zeitlichen Auflösung werden wesentlich kürzere Fluktuationen sichtbar, die die Bewegungen einzelner Fluorophore im evaneszenten Feld darstellen.

Infolge der Messanordnung wird die Diffusion der Moleküle sowohl durch das Sondenplateau als auch durch die Kernmembran begrenzt. Befindet sich die Sonde oberhalb einer Kernpore, kann das fluoreszent markierte Ntf2 zusätzlich zur lateralen Diffusion auch an den Kernporenkomplex binden und translozieren (Abb. 60).

Dabei unterscheiden sich die oberhalb und neben einer Kernpore gemessenen Intensitätssignale zunächst kaum. Beide zeichnen sich durch Ereignisse mit höherer Intensität aus, die insbesondere im zeitlichen Umfang und in der Abfolge der Einzelmolekülfuktuationen diffe-

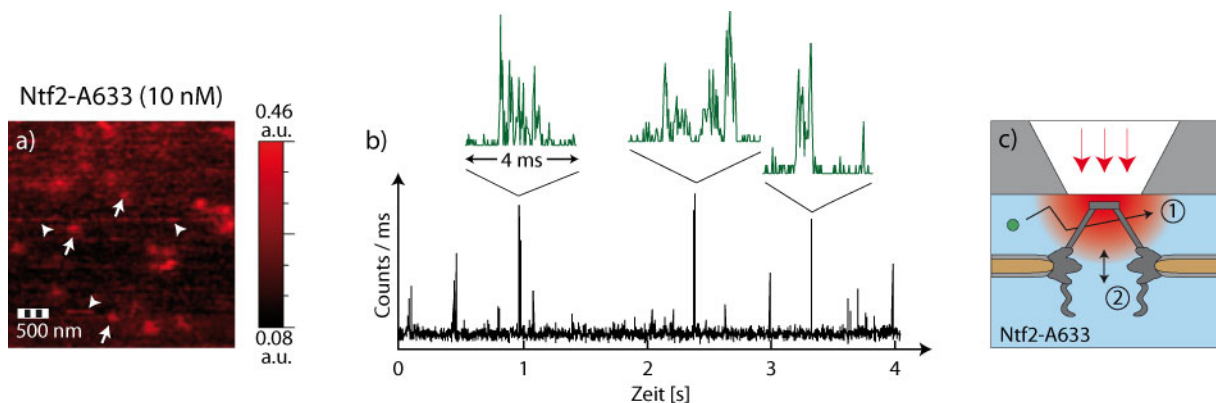


Abb. 60: Nahfeldoptische Fluoreszenzmessungen am Kernporenkomplex setzen sich aus zwei Komponenten zusammen. (a) Auf der nahfeldoptischen Darstellung der nukleoplasmatischen Seite einer frisch präparierten Kernmembran werden die Kernporen durch gebundenes Alexa Fluor® 633-markiertes Ntf2 abgebildet (Pfeile). Ferner sind auch diffundierende Ntf2-A633-Moleküle zu sehen (Pfeilspitzen). (b) Das Intensitätssignal zeigt innerhalb von vier Sekunden mehrere hohe Ereignisse an. Bei einer höheren zeitlichen Auflösung (Zeitfenster 25 μs) stellen sich diese als Fluktuationen variierender Intensität in unregelmäßigen Intervallen heraus. (c) Die Molekülbewegung wird sowohl von der Kernmembran als auch vom Plateau der nahfeldoptischen Sonde begrenzt. Dadurch können sie entweder im Zwischenraum diffundieren oder am Kernporenkomplex binden. [Messungen mit PD Dr. A. Naber und J. Pérez]

rieren. Dieser Unterschied wird erst in der Autokorrelation wirklich deutlich sichtbar.

Im Gegensatz zur Diffusion im Sonden-Membran-Zwischenraum lässt sich die Bewegung innerhalb des Transportkanals relativ einfach modellieren. Der geringe Kanaldurchmesser von etwa 50 nm erlaubt die Annahme, dass die Feldverteilung orthogonal zur Kanalachse homogen sei. Somit verursachen laterale Bewegungen des Moleküls weder eine Intensitätsänderung noch beeinflussen sie die AKF, so dass der Fall einer begrenzten eindimensionalen Diffusion eintritt (Abb. 61).

Dabei bewegt sich ein fluoreszierendes Molekül zufällig innerhalb eines schmalen Kanals der Länge L , der von einem evaneszenten Feld mit der Eindringtiefe d beleuchtet wird. Für $L = d$ diffundiert das Molekül in einem flachen Intensitätsgradienten, so dass die Autokorrelationsfunktion von der Dissoziation des Moleküls am Ende des Kanals bestimmt wird. Der Intensitätsgradient wird durch Verlängerung des Kanals steiler. Folglich nimmt die Zeitspanne zu, in der sich das Molekül zwar im Kanal, aber nicht in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bewegt. Ein sehr langer Kanal ($L/d \rightarrow \infty$) entspricht der Anordnung bei der Totalreflektion, wofür schon seit langem theoretische Autokorrelationsfunktionen bekannt sind (Thompson et al., 1981; Ries et al., 2008).

Für den allgemeineren Fall einer begrenzten Diffusion (beliebiger L/d) sind wir im Rahmen unserer Kooperation zu einer analytischen Lösung der Autokorrelationsfunktion gelangt (Herleitung s. Anhang 8.4):

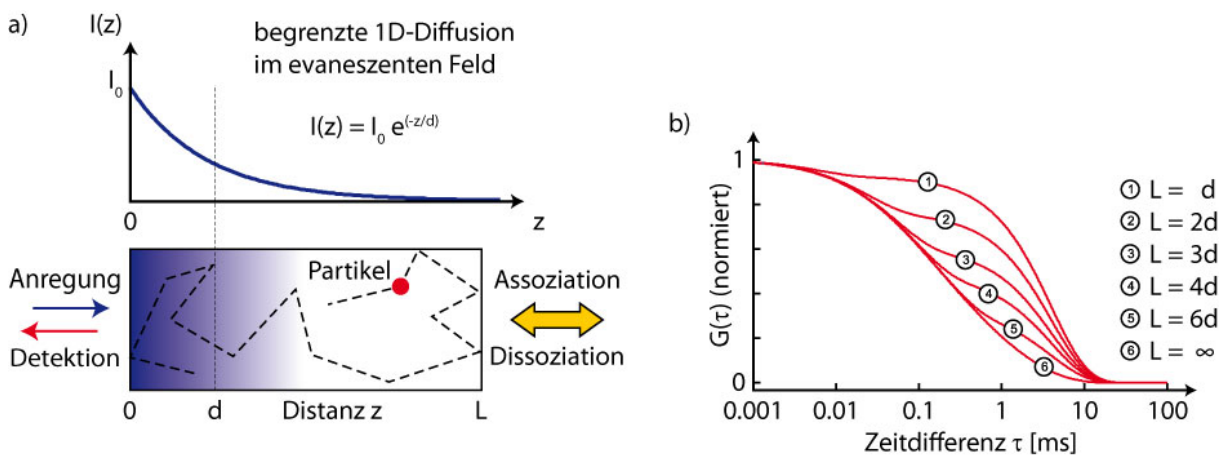


Abb. 61: Modell der begrenzten eindimensionalen Diffusion. (a) Ein fluoreszierendes Partikel bewegt sich zufällig innerhalb eines schmalen Kanals der Länge L , der von einem evaneszenten Feld mit einer Eindringtiefe d beleuchtet wird. Dabei ist die Feldverteilung orthogonal zur Kanalachse homogen, so dass sich die Intensität bei einer Bewegung senkrecht zur Anregungsrichtung nicht ändert. Das Molekül kann den Kanal am Ende verlassen oder umkehren. (b) ① Für $L = d$ bewegt sich das Molekül in einem flachen Intensitätsgradienten und die Autokorrelationsfunktion wird von der Dissoziation des Moleküls bestimmt. ②-⑤ Der Intensitätsgradient wird durch Verlängerung des Kanals steiler und dadurch verlängert sich auch die Zeitspanne, in der sich das Molekül zwar im Kanal, aber nicht in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes bewegt. ⑥ $L = \infty$ entspricht der TIRFM-Anordnung.

$$G(\tau) \propto \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \left(1 + 2 \sum_{m=1}^{\infty} \frac{e^{-(m\pi/L)^2 D \tau}}{(1 + (m\pi d/L)^2)^2} \cdot \left(\frac{1 - (-1)^m \cdot e^{-L/d}}{1 - e^{-L/d}} \right)^2 \right) \cdot e^{-\tau/\tau_D} \quad (14)$$

mit der Zeitdifferenz τ und der mittleren, im Kanal gebundenen Teilchenzahl $\langle N \rangle$.

Bemerkenswerterweise werden durch die in Gleichung (14) dargestellte theoretische AKF die numerischen Werte der Kanallänge L und der mittleren Verweildauer τ_D bestimmt, obwohl bei der nahfeldoptischen Fluoreszenzmessung nur ein Teil des Volumens beleuchtet wurde.

Allerdings enthält die experimentell über einer Kernpore ermittelte AKF nicht nur die Intensitätsfluktuation innerhalb des Transportkanals, sondern auch die aus dem Spalt zwischen der Kernmembran und dem Sondenplateau stammende Fluktuation, für die keine theoretische AKF existiert (Abb. 62). Um diese Komponenten zu berücksichtigen, kann man in einem heuristischen Ansatz die Fluktuationen im Spalt als Hintergrund betrachten und deren AKF durch Fluoreszenzmessungen neben einer Kernpore experimentell bestimmen. Diese als $BG(\tau)$ bezeichnete AKF wird anschließend als eine Art Hintergrund-Korrelationsfunktion mit einem unbekanntem Gewichtungsfaktor in den Fit eingefügt. Über die Funktion

$$f(\tau) = A \cdot G_{LD}(\tau) + B \cdot BG(\tau) \quad (15)$$

kann so die Fluktuation innerhalb des Transportkanals anhand des Modells der begrenzten

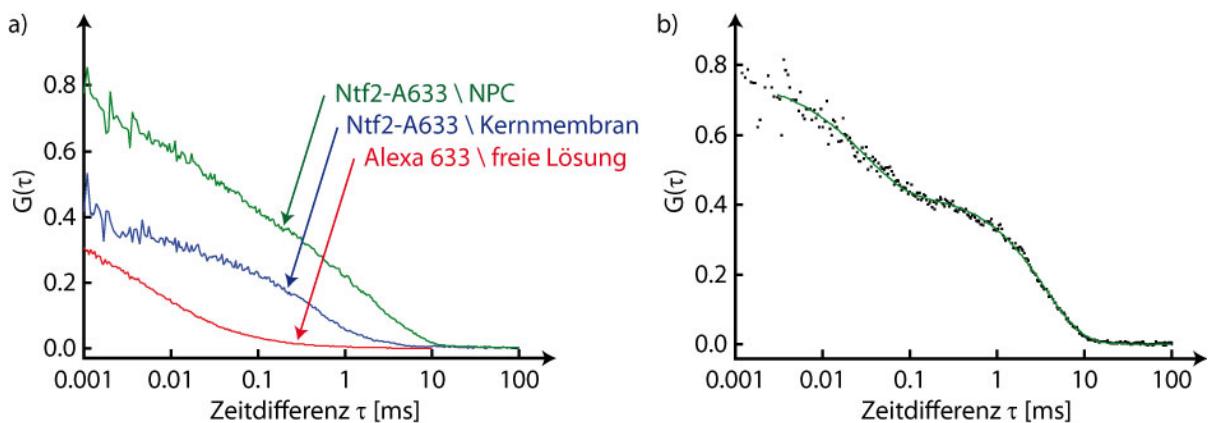


Abb. 62: Nahfeldoptische Fluoreszenzmessungen in freier Lösung und an einer Kernmembran. (a) Die experimentell bestimmte AKF (rot) der FCS-Messung von Alexa Fluor[®] 633 in freier Lösung lässt mangels einer theoretischen AKF nicht anfitzen. Gleichfalls existiert für die Bewegung im optischen Nahfeld zwischen Sondenplateau und der parallel dazu angeordneten Kernmembran kein plausibles Modell (blaue Kurve). Allerdings sind diese Bewegungen als eine Art Hintergrund auch in der AKF (grün) enthalten, die über einer Kernpore gemessen wurde. (b) Durch Subtraktion dieses sogenannten Hintergrunds kann die über dem NPC gemessene AKF mit der theoretischen AKF für begrenzte eindimensionale Diffusion angefitzt werden. Dabei erhält man neben der Diffusionskonstanten innerhalb des Transportkanals ($20 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) eine mittlere Verweildauer am NPC von 3.6 ± 0.1 ms (fixierter Parameter $d = 25$ nm). Die Kanallänge von 82 ± 1 nm deckt sich mit den Ergebnissen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen. [Messung mit PD Dr. A. Naber und J. Pérez]

eindimensionalen Diffusion analysiert werden. Bei einer gegebenen Eindringtiefe des evaneszenten Feldes von $d = 25$ nm wurde mittels der Funktion (15) die mittlere Verweildauer und der Diffusionskoeffizient von Alexa Fluor[®] 633-markiertem Ntf2 innerhalb des Transportkanals angefitet, wobei für den Diffusionskoeffizienten $20 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und die mittlere Verweildauer 3.6 ± 0.1 ms errechnet wurden.

Während die von Kubitscheck et al. (2005) gemessene Ntf2-Transportzeit von 5.8 ± 0.2 ms die mittlere Verweildauer am Kernporenkomplex insgesamt umfasst, bezieht sich die nahfeldoptisch gemessene mittlere Aufenthaltsdauer nur auf den Transportkanal. Auch die ebenfalls angefitete Kanallänge von 82 ± 1 nm ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen elektronenmikroskopischer Arbeiten (Akey & Radermacher, 1993; Stoffler et al., 2003).

5 Diskussion

Die Untersuchung der Translokation von Proteinen durch den Kernporenkomplex erfordert nicht nur ein hohes räumliches, sondern auch ein hohes zeitliches Auflösungsvermögen. Die optische Rasternahfeldmikroskopie bietet eine exzellente Einzelmoleküldetektivität, gepaart mit einer ebenso hohen lateralen wie axialen Auflösung. Das verhältnismäßig kleine Anregungsvolumen der nahfeldoptischen Sonde setzt dabei fluoreszent markierte Proteine im mikromolaren Maßstab voraus.

5.1 XLef-1 reprimiert die eigene Expression in *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurde die rekombinante Expression von XLef-1 wesentlich verbessert und konnte in einem mittels Coomassiefärbung darstellbaren Maßstab gezeigt werden.

Da sich die geringe Expressionsrate von XLef-1 in *E. coli* weder mit den üblichen Optimierungsschritten noch durch den Einsatz speziell für die Expression eukaryotischer Proteine geschaffener Bakterienstämme deutlich verbessern ließ, stellte sich die Frage, ob nicht auch ein anderer Effekt für die schwache Induktion verantwortlich sein könnte.

Als Lösungsansätze wurden sowohl die kodierende XLef-1-Sequenz auf Lef-1-Bindungs-elemente untersucht als auch das Potenzial der Chaperone zur Maskierung der basischen HMG-Box analysiert. Dabei wurde die posttranslationale Stabilisierung des rekombinant exprimierten XLef-1 durch die gemeinsame Expression mit bakteriellen Chaperonen aufgrund der niedrigen Expressionsrate von XLef-1 verworfen, da sich der Einsatz bakterieller Chaperone hauptsächlich bei falsch gefalteten, in Einschlusskörperchen akkumulierten Zielproteinen bewährt hat (Dr. Wayne A. Fenton, persönliche Mitteilung). Statt dessen wurden mit Importin α und β zwei eukaryotische Transportrezeptoren gewählt, die auch *in vivo* als Chaperone für Proteine mit einer positiven Nettoladung fungieren (Jäkel et al., 2002).

Indes verbesserten bei der bakteriellen Koinduktion weder Importin β noch die Importine $\alpha 2$ und $\alpha 3$ die Expression von XLef-1. Hierdurch ist allerdings dieser Lösungsansatz nicht widerlegt, da für diese Importine eine Interaktion mit XLef-1 bisher noch nicht gezeigt wurde. Ferner besitzen alle Expressionsplasmide identische Selektionsmarker und teilweise auch den gleichen Replikationsursprung, so dass die Amplifikation und Verteilung der Plasmide während der Zellteilung nicht kontrolliert werden kann. Um diese Problematik zukünftig zu umgehen, wäre die Konstruktion eines tricistronischen Expressionsvektors optimal, in dem die kodierenden Sequenzen von XLef-1, Importin $\alpha 1$ und Importin β , durch ribosomale Bindungsstellen getrennt, 3' des Promoters angeordnet sind.

Nachdem die HMG-Box durch Koexpression mit Importin α und β nicht zweifelsfrei als Expressionshemmnis identifiziert werden konnte, wurde die kodierende Sequenz auf Homologien zur Konsensussequenz der HMG-Box-Faktoren untersucht und ein potentielles Lef-1-Bindungselement zwischen der β -Catenin-Bindungsstelle und der HMG-Box entdeckt. Dieses wurde in beiden XLeF-1-Expressionsvektoren ohne Änderung der Aminosäuresequenz mutagenisiert. Während die Induktion von XLeF-1 Mut pRSET in BL21 (DE3)-Zellen keine Verbesserung der Expression brachte, wurde das XLeF-1 Mut pQE-30-Konstrukt im *E. coli* Stamm M15 bereits nach zwei Stunden in einer mit Coomassie darstellbaren Intensität exprimiert. Die immunologische Analyse dieser Induktion ergab zudem, dass durch Mutagenese des putativen Lef-1-Bindungselements die Stärke der schneller migrierenden Banden zu Gunsten des vollständigen Fusionsproteins reduziert werden konnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die heterologe Expression von XLeF-1 durch eine negative Autoregulation reprimiert wird. Ferner kann der Einsatz von Transportrezeptoren als Chaperone die rekombinante Expressionsrate steigern. Somit wurde erstmalig ein Weg beschrieben, der die Expression von Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren im mikromolaren Maßstab ermöglicht.

Folglich stehen prinzipiell neben β -Catenin auch Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren für Transportmessungen zur Verfügung.

5.2 Stabilität der freistehenden Kernmembran

Die Grundlage für die Untersuchung des Kerntransports mittels nahfeldoptischer Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ist die planare Präparation der Kernmembran auf einem löchrigen Substrat. Vor der Messung wird die Dreiecksapertursonde unter Flüssigkeit der freitragenden Membran bis auf einige Nanometer ohne Kraftabstandskontrolle angenähert. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nicht bekannt, ob die so präparierte Kernmembran den bei der Annäherung und Fluoreszenzmessung auftretenden Kräften Stand halten oder dabei irreversibel geschädigt werden würde.

Deshalb wurde die Stabilität der Kernmembran sowohl durch die Abschätzung der auf die freitragende Membran wirkenden Kraft als auch durch fluoreszenzmikroskopische Analysen validiert. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine freistehende Kernmembran rasterkraftmikroskopisch unter Flüssigkeit charakterisiert.

Durch die Annäherung der TA-Sonde gerät die Kernmembran unter Zugspannung und nimmt vermutlich eine konische Form an. Dabei reduziert sich aufgrund der elastischen Rückstellkraft der Kernmembran ihr Abstand zum Sondenplateau. Die Annäherung wird beendet, sobald sich die Intensität der Fluoreszenz oder die Auflösung nicht mehr verbessern. Bei einer

hochauflösenden Darstellung beträgt der Abstand zwischen der Kernmembran und dem Sondenplateau dann vermutlich weniger als 20 nm. Normalerweise befindet sich die Sondenspitze dann $\sim 0.3 \mu\text{m}$ unterhalb des Trograndes.

Bemerkenswerterweise bindet die Kernmembran dabei nicht irreversibel an die Sonde und selbst Rasterungsgeschwindigkeiten von mehr als $4 \mu\text{m/s}$ verursachen keine im optischen Mikroskop sichtbaren Zerstörungen. Es scheint, als ob das flache Sondenplateau wie ein Schlittschuh auf einem dünnen Wasserfilm über die Kernmembran gleitet und dadurch nur geringe Scherkräfte auftreten.

Dieser Abstand zwischen der Kernmembran und dem Sondenplateau könnte durch entropische Abstoßungskräfte hervorgerufen werden. Eine freistehende Membran wird durch thermische Anregung zur Eigenschwingung (Flickern) angeregt (Helfrich, 1973). Die Sondenannäherung reduziert lokal die Schwingungsfreiheitsgrade der Kernmembran und die daraus resultierende entropische Abstoßung überwiegt die van-der-Waals-Anziehung bei einem Abstand von 10 nm, so dass dort die Kernmembran als stationär angesehen werden kann (Johnas, 2004). Dieser Umstand ist eine wichtige Voraussetzung für die Lokalisation eines Moleküls mit nanoskalischer Genauigkeit.

Die Abschätzung der auf die Kernmembran wirkenden Kraft liefert einen vergleichsweise geringen Wert. Durch Absenken der TA-Sonde werden zunächst Auffaltungen aus der Membran entfernt. Drückt man die Sonde darüber hinaus noch tiefer in die Kernmembran, so wirken der weiteren Flächenzunahme intermolekulare Kräfte in der Kernlamina ebenso wie in den beiden Lipiddoppelschichten entgegen. Die Energiedichte pro Fläche ist dabei gegeben durch

$$g_{ext} = \frac{1}{2} \cdot K_A \cdot \left(\frac{\partial A}{A} \right)^2 \quad (16)$$

mit dem Flächenkompressionsmodul K_A und der Fläche A (Sackmann, 1995). Unter der Annahme, dass die Membran mit dem Radius R im Ausgangszustand eben sei und unter dem Druck der Sonde einen Konus der Höhe z bildet, kann man bei Vernachlässigung der Biegekräfte an der Sondenspitze die Rückstellkraft F_P zwischen der Membran und der Sonde durch

$$F_P = -\frac{\partial W}{\partial z} = -\frac{\pi}{2} \cdot K_A \cdot \frac{z^3}{R^2} \quad (z \ll R) \quad (17)$$

berechnen, wobei $W = g_{ext} \cdot A$ die Spannungsenergie darstellt. Für eine freistehende Kernmembran mit dem Radius $R = 10 \mu\text{m}$, einer Konushöhe von $z = 0.3 \mu\text{m}$ und $K_A = 1 \text{ N/m}$ beträgt die Abstoßungskraft $F_P \sim 0.4 \text{ nN}$. Unterhalb des Sondenplateaus mit einer Kantenlänge von $\sim 0.7 \mu\text{m}$ befinden sich bei einer mittleren Kernporendichte von $18 \text{ NPCs}/\mu\text{m}^2$ etwa vier

Kernporen, so dass bei der Abbildung der nukleoplasmatischen Seite auf jedem Kernkorb ein Druck von etwa 0.1 nN lastet. Im Vergleich dazu hielt der 70 nm hohe Kernkorb bei rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen schon zehnfach größeren Kräften von ~ 1 nN Stand (Stoffler et al., 1999b).

Neben der theoretischen Abschätzung der auf die freistehende Kernmembran wirkenden Kraft ist die optische Beurteilung der Güte potentieller Messstellen von besonderer praktischer Bedeutung für die anschließende nahfeldoptische Messung. Dabei wurden straff gespannte Membranstücke bevorzugt und stark durchhängende bzw. am Trogboden aufliegende Membranen wegen offensichtlicher Beschädigung ausgeschlossen.

Indes sind die nach oben gewölbten Membranstücke ein Zeichen zu geringer Dehnung. Infolge der Präparation des Zellkerns in einer BSA-haltigen Pufferlösung wird das Rinderseumalbumin, das nur sehr langsam durch die Kernpore diffundiert, im Trog eingeschlossen. Der anschließende Austausch der BSA-haltigen gegen eine BSA-freie Pufferlösung bewirkt einen osmotischen Gradienten, durch den die nicht ausreichend vorgespannte Membran nach oben gewölbt wird.

Die Dehnung der vermessenen Kernmembran wurde auch durch Analysen der Kernporendichte bestätigt. Während kraftmikroskopische Untersuchungen der freitragenden Kernmembran eine Reduktion der Kernporendichte um 20% gegenüber der von Schlune et al. (2006) gemessenen zeigten, lag die nahfeldoptisch bestimmte Porendichte 33% bzw. 39% unterhalb des publizierten Wertes für ungeschwollene Zellkerne aus *Xenopus laevis* Oozyten dieses Entwicklungsstadiums (Schlune et al., 2006). In somatischen Zellen kann durch Anschwellen die Oberfläche des Zellkerns um mindestens 70% reversibel vergrößert werden, wodurch die Kernporendichte um 40% abnimmt (Dahl et al., 2005).

Die Kernmembran unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung von anderen zellulären Membranen durch einen höheren Proteinanteil. Ihre Masse setzt sich aus 20-35% Lipiden und 60-75% Proteinen zusammen (Franke et al., 1970; Khandwala & Kasper, 1971). Ungeachtet dessen besitzt die Kernmembran die Fluidität einer Lipiddoppelschicht und ist über das ER mit dem intrazellulären Membransystem verbunden (Rowat et al., 2008). Demgegenüber zeigen die Proteine der Kernpore und der Lamina das Verhalten eines kontinuierlichen zweidimensionalen Netzwerks. Dabei weisen Mikroaspirationsexperimente darauf hin, dass die Dehnung der Kernmembran keine Auswirkung auf den Kernporendurchmesser hat, sondern eine Streckung der inhomogenen Kernlamina bewirkt (Rowat et al., 2005).

Lamine besitzen im Gegensatz zu Aktinfilamenten und Mikrotubuli eine ungewöhnliche Dehnbarkeit. Kraftmikroskopische Studien zeigen, dass ein anderes, aus Desmin bestehendes

Intermediärfilament 1-2 nN standhält, bevor es, 3.5fach gestreckt, bei einer Zugspannung von 250% bricht (Herrmann et al., 2007). Bei der Kernlamina entscheidet auch die Zusammensetzung über ihre Dehnbarkeit. Der nur Lamin B enthaltende Stammzellkern ist doppelt so dehnbar wie der Nukleus einer Fibroblastenzelle, die auch A- und C-Typ-Lamine exprimiert (Pajerowski et al., 2007). Die Dehnbarkeit der in unseren Experimenten eingesetzten Kernmembranen aus *Xenopus laevis* Oozyten liegt dazwischen.

Im optischen Mikroskop wird die Golfball-ähnliche Struktur des ungeschwollenen Oozyten-Zellkerns sichtbar. Durch Anschwellen des Kerns in der leicht hypoosmotischen BSA-haltigen Pufferlösung entfaltet sich die Lamina aus ihrem komprimierten Zustand und geht in ein flaches, orthogonales Netzwerk über, wie es bereits auf elektronenmikroskopischen Darstellungen sichtbar gemacht wurde (Aebi et al., 1986; Dahl et al., 2004).

Dieser Prozess stellt die kritische Größe bei der Membranpräparation dar. Während eine weitgehend unentfaltete Lamina durch tiefes Eindrücken der nahfeldoptischen Sonde in die Kernmembran nachgespannt werden muss, kann ein zu starkes Anschwellen Risse verursachen und die Kernmembran irreversibel schädigen.

Mit der optischen Validierung der Güte potentieller Messstellen wurde in dieser Arbeit ein Werkzeug geschaffen, das eine effiziente Charakterisierung der Kernmembranpräparation ermöglicht und die Auswahl der zu vermessenden freitragenden Membranstücke beschleunigt.

5.3 Nahfeldoptische Darstellung der freistehenden Kernmembran

Nahfeldoptische Fluoreszenzmessungen an freistehenden Kernmembranen in Flüssigkeit konnten erstmalig im Rahmen dieses Projekts erfolgreich verwirklicht werden. Dabei bestand die Herausforderung nicht nur in der hochauflösenden Darstellung der Kernporenkomplexe, sondern auch in der Stabilisierung der nahfeldoptischen Sonde, die durch die Messung in Flüssigkeit notwendig wurden. Die auf die Nahfeldsonde wirkenden Kapillarkräfte verursachten ebenso wie die sich aufgrund der Verdunstung ändernde Oberflächenspannung axiale und laterale Driften. Die bei den Messungen gewonnenen Erfahrungen führten zu einer stetigen Verbesserung der Sondenstabilität und führten zu einer neuartigen Konstruktion der Dreiecksapertursonde für optimale SNOM-Messungen in Flüssigkeit (Pérez, 2008).

Die ersten Messungen an der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran zeigten, dass der Kernporenkomplex und insbesondere der Kernkorb nicht hochaufgelöst dargestellt werden konnte. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass die Annäherung der TA-Sonde an den Kernkorb durch Reste der Kernmatrix behindert wurde.

Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen der inneren Kernmembran von *Xenopus laevis* Oozyten sind vom Kernkorb ins Kerninnere projizierende Filamente zu sehen (Ris & Malecki, 1993; Ris, 1997). Von jedem distalen Ring gehen acht solcher 6 nm starken Filamente aus, die ein hohles, zylindrisches Kabel bilden und sich etwas tiefer im Kern zu einem verzweigten System vereinigen. Immunfluoreszenzaufnahmen und biochemische Untersuchungen bestätigen die Existenz eines stabilisierenden Aktin-Netzwerks im Nukleus der *Xenopus laevis* Oozyten (Bohnsack et al., 2006). In diesen Zellen ist die Aktin-Konzentration im Kern dreimal größer als die zytoplasmatische, wobei sich der Anteil diffusiver Aktin-Moleküle in den beiden Kompartimenten nicht wesentlich unterscheidet (Paine, 1984). Insoweit verwundert es nicht, dass auch Aktin-bindende Proteine wie beispielsweise das Protein 4.1 im Nukleus entdeckt wurden (Gruenbaum et al., 2005). Ferner bindet Emerin *in vitro* das (-)-Ende von F-Aktin und stabilisiert so möglicherweise das intranukleäre Aktin-Netzwerk (Holaska et al., 2004).

Inwieweit Aktin tatsächlich die Annäherung der TA-Sonde behinderte, wurde mittels α -Aktin-Antikörper untersucht. Dazu wurden immunfluoreszent markierte Aktinfilamente erstmalig nahfeldoptisch dargestellt und als potentielles Hindernis identifiziert. Während in einiger Entfernung nur wenige Fluorophore nahfeldoptisch angeregt wurden, steigerte sich die Anzahl der detektierten $\alpha\beta$ -Aktin-Antikörper durch eine weitere Annäherung der Sonde. Die punktförmige Darstellung der Aktinfilamente kann sowohl durch die räumliche Anordnung als auch durch die von Aktin-bindenden Proteinen verursachte begrenzte Zugänglichkeit des N-terminalen Epitops hervorgerufen worden sein.

Da bei nahfeldoptischen Messungen die Sonde die Probe sowohl von links nach rechts als auch in umgekehrter Richtung rastert, kann durch den Vergleich beider Aufnahmen bei bekannten Sondereigenschaften und thermischer Drift die Beweglichkeit analysiert werden. Diese Untersuchung erhärtete zusätzlich die Vorstellung eines auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran aufliegenden Aktin-Netzwerks. Das komprimierte Aktinengeflecht wies trotz einer hohen Rasterungsgeschwindigkeit eine um 50% höhere Beweglichkeit als der distale Ring des Kernkorbs auf.

Dadurch entstand die Vorstellung, dass infolge des präparationsbedingten Anschwellens des riesigen Oozytenkerns das Aktin-Netzwerk in der Kernperipherie unkontrolliert abreißt, wobei die Höhe des an der nukleoplasmatischen Seite verbleibenden Aktin-Netzwerks nicht regulierbar ist. Deshalb wurde versucht, die Aktinfilamente für hochaufgelöste Darstellungen durch temperaturbedingte Depolymerisation (Pokorna et al., 2004) weitgehend zu entfernen. Zusätzlich wurde das Präparat vor der nahfeldoptischen Messung mit einer 0.05% (v/v)

Tween20 enthaltenden Pufferlösung gespült. Diese Tween20 Konzentration liegt weit unter dem für den Kernkorb kritischen Wert von 1.3% (v/v) (Prof. Dr. Volker Cordes, persönliche Mitteilung). Tatsächlich konnten dadurch die Kernporenkomplexe hochaufgelöst dargestellt werden.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte kraftmikroskopische Analyse konnte ausgeschlossen werden, dass diese Behandlung die Höhe des Kernkorbs verändert. Die über dem Substrat ermittelte Höhe ist ebenso wie die im freitragenden Membranabschnitt gemessene in guter Übereinstimmung mit dem an nicht-freitragenden Membranen gemessenen Wert von 70 nm (Stoffler et al., 1999b).

Das 267 kDa große Tpr-Molekül stellt die formgebende Komponente des Kernkorbs dar. Die Filamente des Kernkorbs bestehen aus Coiled-Coil-Tpr-Homodimeren oder -Oligomeren, die am nukleoplasmatischen Ring eine Kehre machen und durch Interaktion mit dem N-Terminus von Nup153 dort verankert werden (Fahrenkrog et al., 2002; Krull et al., 2004). Der hydrophile C-Terminus von Tpr liegt dem distalen Ring auf und bildet eine Art 20 nm hohe Kuppel, die zusammen mit den 50 nm langen nukleoplasmatischen Filamenten die insgesamt 70 nm große Struktur ergeben (Prof. Dr. Volker Cordes, persönliche Mitteilung). Während die Filamente aufgrund ihrer reusenartigen Anordnung eine begrenzte Flexibilität besitzen und durch eine Kältebehandlung in ihrer Stabilität nicht beeinträchtigt werden, kann der hydrophile C-Terminus durchaus zur Seite geschoben werden und beispielsweise in das Lumen des Kernkorbs fallen. Ob allerdings dieser Teil vom Tpr-Molekül zu den anfänglichen Schwierigkeiten bei der Annäherung beitrug, konnte aufgrund fehlender peptidspezifischer Antikörper nicht geklärt werden.

Um die Leistungsfähigkeit des nahfeldoptischen Mikroskops zu zeigen, wurden mit dem pan-NPC-Marker mAb414 gefärbte Kernmembranen freistehend abgebildet. Die nahfeldoptischen Darstellungen der nukleoplasmatischen Seite wiesen Kernporendichten leicht geschwollener Kerne auf.

Die Halbwertsbreite der mAb414-markierten Strukturen von 65-110 nm stimmte mit der rasterkraftmikroskopisch gemessenen lateralen Ausdehnung des Kernkorbs überein (Stoffler et al., 1999b). Da das Auflösungsvermögen der eingesetzten TA-Sonden bereits früher auf 30-40 nm bestimmt wurde (Molenda et al., 2005), spiegelten die Fluoreszenzpunkte die laterale Ausdehnung des Kernkorbs wider und waren nicht auflösungsbegrenzt. Bedenkt man, dass die mAb414-Antikörper gegen die Nup62-Komplexe gerichtet sind und dass diese sich in der FG-Schicht des zentralen Rings befinden, so würde man aufgrund des Abstands von über 100 nm zur Sondenapertur eine deutlich niedrigere Auflösung und ein schlechteres Signal-

Rausch-Verhältnis erwarten. Da der mAb414 jedoch auch mit anderen FG-Nukleoporinen kreuzreagiert (Walther et al., 2001) und die FG-Nukleoporine Nup153 und Nup98 am Kernkorb lokalisiert sind (Frosst et al., 2002), lag die Vermutung nahe, dass nur die am Kernkorb gebundenen Antikörper dargestellt wurden. In diesem Fall sollte die Darstellung einer mit mAb414 und α Nup153-Z zweifach markierten Kernmembran eine nahezu identische Auflösung für beide Antikörper aufweisen. In der Tat besaßen beiden Abbildungen eine ähnliche Auflösung und ein ähnliches Signal-Rausch-Verhältnis, auch wenn sich lokal die Fluoreszenzintensität einiger Kernporen unterschied.

Auch die Halbwertsbreite der Strukturen, die mit dem gegen den flexiblen C-Terminus von Nup153 gerichteten Antikörper α Nup153-C2 markiert wurden, stimmte mit der von mAb414- oder α Nup153-Z-markierten Epitopen überein.

Infolge dieser Messergebnisse wurde in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Andreas Naber die Kernmembranpräparation ebenso wie das bestehende nahfeldoptische Mikroskop weiterentwickelt und ein stabiles System geschaffen, das hochauflösende Darstellungen der Kernmembran in Flüssigkeit ebenso wie positionsgenaue Fluoreszenzmessungen an Kernporenkomplexen mit einer minimalen Drift gestattet.

5.4 Untersuchung des Kerntransports mittels nahfeldoptischer FCS

Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) basiert auf der Analyse von Intensitätsfluktuationen fluoreszierender Moleküle, die das Detektionsvolumen betreten und es wieder verlassen. Aus diesen Intensitätsänderungen wird die experimentelle Autokorrelationsfunktion (AKF) berechnet, die mit einer auf einem theoretischen Modell beruhenden AKF angefitet wird. Dabei entscheidet letztendlich die Qualität des Modells über die Aussagekraft der Fitparameter.

Zusätzlich ist die Homogenität des Systems ebenso wie das thermische Gleichgewicht eine wichtige Voraussetzung für FCS-Messungen. Diese können sowohl durch die Messung unter definierten Bedingungen als auch durch die Reduktion des Detektionsvolumens erreicht werden. Deshalb sind auf konfokaler Mikroskopie basierende FCS-Messungen innerhalb substruktureicher Zellen schwierig zu interpretieren.

Die hohe Kernporendichte der *Xenopus laevis* Oozyten führt dazu, dass sich im fokussierten Laserstrahl sieben NPCs befinden, wodurch die Auswertung der experimentell bestimmten Autokorrelationsfunktion wesentlich komplizierter wird. Deshalb wurde die auf konfokaler Mikroskopie basierende FCS lediglich zur Einstellung der Ntf2-Konzentration auf im Mittel ein Molekül pro Kernpore eingesetzt.

Im Gegensatz zum beugungsbegrenzten Strahl illuminiert das evaneszente Feld der TA-Sonde ausschließlich den Kernkorb einer Kernpore. Ferner ermöglicht die partielle nahfeldoptische Beleuchtung des Kernporenkomplexes Translokationsstudien mittels FCS, da dadurch an den Transportkanal assoziierende oder davon dissoziierende Moleküle beobachtet werden können. Die Zeitspur des Intensitätssignals nahfeldoptischer Fluoreszenzmessungen oberhalb einer Kernpore zeigte bei höherer zeitlicher Auflösung Fluktuationen variierender Intensität in unregelmäßigen Intervallen an. Somit können diese aufeinanderfolgenden Fluktuationen als ein einzelnes, sich zufällig im evaneszenten Feld am Kernkorb bewegendes Ntf2-Molekül interpretiert werden, das bis zu seiner Dissoziation an der zytoplasmatischen oder nukleoplasmatischen Seite immer wieder mit Unterbrechungen angeregt wird.

Für die quantitative Auswertung dieser Messdaten wurde eine theoretische Autokorrelationsfunktion gesucht. Während für das bei der Totalreflektion entstehende optische Nahfeld schon seit langem theoretische AKF bekannt sind (Thompson et al., 1981; Ries et al., 2008), existiert aufgrund der komplexen Feldverteilung einer Dreiecksapertursonde (Molenda et al., 2005) kein einfaches analytisches Modell, das zur Herleitung der theoretischen AKF einer TA-Sonde herangezogen werden könnte.

Im Gegensatz dazu ließ sich die Bewegung innerhalb des zentralen Kanals der Kernpore relativ einfach modellieren und eine theoretische AKF für die begrenzte eindimensionale Bewegung im optischen Nahfeld herleiten. Indes setzte sich die experimentell oberhalb eines NPC bestimmte AKF aus zwei miteinander verbundenen Komponenten zusammen. Das fluoreszierende Molekül bindet mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit am Transportkanal und verschwindet darin oder es diffundiert alternativ im Raum zwischen der Kernmembran und dem Sondenplateau, wobei sich diese Bewegung auch wieder in eine laterale und eine axiale Komponente aufspalten lässt.

Um diese multiplikativ verbundenen Komponenten formal korrekt voneinander zu trennen, müsste man zunächst die axiale und die laterale Fluktuation im Zwischenraum auflösen und anschließend mit Hilfe der Daten der lateralen Zwischenraum-Diffusion die oberhalb der Kernpore ermittelte AKF anfitten.

Diese Vorgehensweise ist aufgrund der fehlenden theoretischen AKF für das optische Nahfeld einer TA-Sonde nicht möglich. Deshalb wurde ein heuristischer Ansatz gewählt, in dem die neben einer Pore bestimmte AKF mit einem unbekanntem Gewichtungsfaktor additiv in den Fit der oberhalb einer Kernpore ermittelten AKF eingefügt wurde. Damit musste nur ein zusätzlicher Parameter in den Fit eingefügt werden.

Trotz der Vereinfachung überzeugt das Fit-Resultat in zweierlei Hinsicht. Erstens liegt die so ermittelte Kanallänge mit 82 nm zwischen den elektronenmikroskopisch bestimmten Werten für den zentralen Transportkanal von 62 nm (Akey & Radermacher, 1993) und 90 nm (Stoffler et al., 2003). Und zweitens ist die mittlere Aufenthaltsdauer im Transportkanal mit 3.6 ms kleiner als die von Kubitscheck et al. (2005) videomikroskopisch gemessene Gesamtverweildauer von Ntf2 am NPC (5.8 ms).

Dabei hat der videomikroskopische Ansatz, bei dem die Lokalisation einzelner fluoreszent markierter Proteine durch in schneller Folge aufgenommene Bilder bestimmt wird, zwei Nachteile im Vergleich zum SNOM-FCS-Ansatz. Erstens beschränkt die Geschwindigkeit der Digitalkamera die zeitliche Auflösung auf wenige Millisekunden und zweitens beeinträchtigen die Drift oder Membranflickern die Lokalisationsgenauigkeit. Im Gegensatz dazu reicht die zeitliche Auflösung des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten nahfeldoptischen FCS-Aufbaus bis in den Mikrosekundenbereich hinunter und der Abstand zwischen Kernmembran und TA-Sonde stellt sich infolge der Membranspannung und der Sondenposition automatisch ein.

Die Konzentration der Fluorophore wird bei Einzelmolekülmessungen so gewählt, dass sich im Mittel nur ein fluoreszierendes Molekül im Detektionsvolumen aufhält. Aufgrund des Größenunterschieds zwischen dem nahfeldoptischen und dem konfokalen Anregungsvolumen lag die Konzentration der fluoreszent markierten Proteine in unserem Ansatz mit 10 nM um zwei Größenordnungen höher als bei den mittels Digitonin permeabilisierten HeLa-Zellen (Yang et al., 2004; Kubitscheck et al., 2005) oder nach Mikroinjektion (Yang & Musser, 2006) durchgeführten Kerntransportmessungen.

Die Ntf2-Konzentration innerhalb der Zelle ist indes deutlich höher und beträgt in HeLa-Zellen ebenso wie im Rattenleberzellhomogenat im Mittel 2 μM . Infolge der inhomogenen Verteilung und der bevorzugten Lokalisation an der Kernhülle steigt die Ntf2-Konzentration an der Kernmembran auf etwa 20 μM an (Chaillan-Huntington et al., 2000).

Die bei höheren Konzentrationen bestimmte Ntf2-Transportkinetik stimmt weitgehend mit den Resultaten der Einzelmolekülmessungen überein. So wurden bei einem Konzentrationsgradienten von 0 μM nukleoplasmatischem und 100 μM zytoplasmatischem Ntf2 in permeabilisierten Zellen Transportraten von 2 500 Translokationen pro NPC und Sekunde gemessen (Ribbeck & Görlich, 2001). Bei einer Konzentrationsdifferenz von 0 μM im Nukleus und 15 μM im Zytoplasma waren es an Kernmembranen aus *Xenopus laevis* Oozyten etwa 1 500 Translokation pro NPC und Sekunde (Siebrasse & Peters, 2002). Auf einen Konzentrations-

gradienten von 1 μM bezogen, entsprechen diese Ergebnisse 250 bzw. 100 Ntf2-Molekülen pro NPC und Sekunde.

Ntf2 interagiert als Importrezeptor von RanGDP mit FG-Nukleoporinen des Kernporenkomplexes. Mittels kristallographischer Untersuchungen und durch dynamische Simulationen von Molekülinteraktionen wurden auf der Ntf2-Oberfläche sechs, in einem Streifen angeordnete Bindungsstellen für FG-Domänen entdeckt (Bayliss et al., 2002; Cushman et al., 2004; Isgro & Schulten, 2007). Dabei wird eine Bindungsstelle von RanGDP maskiert und die Affinität zweier weiterer Bindungsstellen zu FG-Nukleoporinen möglicherweise durch gebundenes RanGDP verändert, so dass die Simulationsresultate von Isgro und Schulten (2008) die Vorstellung von unterschiedlichen Routen durch den Kernporenkomplex untermauern.

Die Anordnung der Bindungsstellen in einem regelmäßigen Abstand von 1-1.5 nm ist mit den wesentlichen Transportmodellen, dem Modell des virtuellen Tores, dem Affinitätsgradienten-Modell, dem Modell der öligen Spaghetti, dem Modell des hydrophoben Gels und dem Modell des reversiblen nanomechanischen Kollapses, vereinbar. Auch die nahfeldoptisch bestimmte Translokationszeit von Ntf2 ist in Einklang mit diesen Modellen. Der ebenfalls ermittelte Diffusionskoeffizient $D = 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$ hingegen unterscheidet sich deutlich von dem im synthetischen Hydrogel bestimmten Ntf2-Diffusionskoeffizienten $D \approx 0.1-0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Frey & Görlich, 2007). Dieses hydrophobe Gel wurde aus den FG-Domänen von γNsp1 hergestellt und spiegelt dadurch nicht die reale Situation innerhalb der Kernpore wider.

Am Beispiel des Transportrezeptors Ntf2 wurde die Funktionalität unseres nahfeldoptischen FCS-Aufbaus validiert, der nun für weitere Translokationsstudien zur Verfügung steht.

Mit diesem Werkzeug könnte die Translokationsdynamik unterschiedlicher Transportrezeptoren und Transportrezeptor-Kargo-Komplexe untersucht und dabei die Arbeitshypothese einer Bahnung des Transportweges infolge erhöhter Konzentration der Annahme einer Sättigung der Bindungsstellen innerhalb des Kernporenkomplexes gegenübergestellt werden.

Darüber hinaus besteht nun die Möglichkeit, die Methode nach der Weiterentwicklung zur Zwei-Kanal-Kreuzkorrelationsspektroskopie auch zur Untersuchung der verschiedenen Transportwege innerhalb der Kernpore einzusetzen und beispielweise die Translokation von unterschiedlich fluoreszent markiertem Importin β und β -Catenin parallel zu analysieren.

6 Zusammenfassung

Durch die erstmalige Kombination von nahfeldoptischer Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein leistungsstarkes Werkzeug zur Untersuchung von hochaufgelösten Einzelmolekülbewegungen geschaffen.

Zur Analyse der Translokation wurden rekombinant exprimierte Proteine chromatographisch gereinigt und *in vitro* auf ihre Funktionalität getestet. Ferner wurde eigenständig eine neue Strategie für die Expression der Lef/Tcf-Transkriptionsfaktoren im mikromolaren Maßstab entwickelt, die es ermöglicht, die Bindung dieser Proteine an Transportrezeptoren und deren Translokation zu untersuchen.

Die Kernmembran aus *Xenopus laevis* Oozyten wurde freitragend präpariert und erstmalig sowohl kraftmikroskopisch als auch nahfeldoptisch in Flüssigkeit charakterisiert. Dazu wurde in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Andreas Naber das bestehende raster-nahfeldoptische Mikroskop zu einem stabilen System für positionsgenaue Fluoreszenzmessungen unter Flüssigkeit weiterentwickelt. Die begrenzte Eindringtiefe des evaneszenten Feldes erforderte die Herleitung einer theoretischen Autokorrelationsfunktion für die begrenzte eindimensionale Diffusion. Dadurch konnte nicht nur der Diffusionskoeffizient von Ntf2 ($D = 20 \mu\text{m}^2/\text{s}$) im Transportkanal, sondern auch die Translokationszeit von Ntf2 auf 3.6 ± 0.1 ms bestimmt werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine sowohl zeitlich als auch räumlich hochauflösende Methode zur Analyse der Translokation durch den Transportkanal des Kernporenkomplexes entwickelt wurde, die ein Fundament für die weitergehende Erforschung von Diffusionsprozessen auf nanoskalischer Ebene darstellt.

7 Literatur

- Abbe, E.** (1873). Beiträge zur Theorie der Microscope und der Microscopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikrosk. Anat.* **9**, 413-68.
- Adam, S. A., Sterne-Marr, R. & Gerace, L.** (1992). Nuclear protein import using digitonin-permeabilized cells. In *Methods Enzymol*, Vol. Reconstitution of Intracellular Transport (Hrsg. J. E. Rothman), S. 97-110. Academic Press, Inc., San Diego.
- Adam, S. A., Sengupta, K. & Goldman, R. D.** (2008). Regulation of Nuclear Lamin Polymerization by Importin α . *J Biol Chem* **283**, 8462-8.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. & Gerace, L.** (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560-4.
- Akey, C. W. & Radermacher, M.** (1993). Architecture of the *Xenopus* Nuclear Pore Complex revealed by Three-Dimensional Cryo-Electron Microscopy. *J Cell Biol* **122**, 1-19.
- Akhtar, A. & Gasser, S. M.** (2007). The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* **8**, 507-17.
- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprapto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., et al.** (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**, 695-701.
- Arce, L., Yokoyama, N. N. & Waterman, M. L.** (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**, 7492-504.
- Asally, M. & Yoneda, Y.** (2005). β -Catenin can act as a nuclear import receptor for its partner transcription factor, lymphocyte enhancer factor-1 (lef-1). *Exp Cell Res* **308**, 357-63.
- Ball, J. R. & Ullman, K. S.** (2005). Versatility at the nuclear pore complex: lessons learned from the nucleoporin Nup153. *Chromosoma* **114**, 319-30.
- Barker, N., Morin, P. J. & Clevers, H.** (2000). The Yin-Yang of TCF/ β -catenin signaling. *Adv Cancer Res* **77**, 1-24.
- Bayliss, R., Littlewood, T. & Stewart, M.** (2000). Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin β in nuclear trafficking. *Cell* **102**, 99-108.
- Bayliss, R., Leung, S. W., Baker, R. P., Quimby, B. B., Corbett, A. H. & Stewart, M.** (2002). Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *Embo J* **21**, 2843-53.
- Bednenko, J., Cingolani, G. & Gerace, L.** (2003). Importin β contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. *J Cell Biol* **162**, 391-401.

- Ben-Efraim, I. & Gerace, L.** (2001). Gradient of Increasing Affinity of Importin β for Nucleoporins along the Pathway of Nuclear Import. *J Cell Biol* **152**, 411-7.
- Bengtsson, L. & Wilson, K. L.** (2006). Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. *Mol Biol Cell* **17**, 1154-63.
- Betzig, E., Trautman, J. K., Harris, T. D., Weiner, J. S. & Kostelak, R. L.** (1991). Breaking the Diffraction Barrier: Optical Microscopy on a Nanometric Scale. *Science* **251**, 1468-70.
- Betzig, E. & Trautman, J. K.** (1992). Near-Field Optics: Microscopy, Spectroscopy, and Surface Modification Beyond the Diffraction Limit. *Science* **257**, 189-95.
- Betzig, E. & Chichester, R. J.** (1993). Single Molecules Observed by Near-Field Scanning Optical Microscopy. *Science* **262**, 1422-5.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J. & Hess, H. F.** (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642-5.
- Bischoff, F. R., Scheffzek, K. & Ponstingl, H.** (2002). How Ran is Regulated. In *Nuclear Transport*, Vol. 35 (Hrsg. K. Weis), S. 49-66. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Boehmer, T., Enninga, J., Dales, S., Blobel, G. & Zhong, H.** (2003). Depletion of a single nucleoporin, Nup107, prevents the assembly of a subset of nucleoporins into the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 981-5.
- Bohnsack, M. T., Stuken, T., Kuhn, C., Cordes, V. C. & Görlich, D.** (2006). A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. *Nat Cell Biol* **8**, 257-63.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brantjes, H., Barker, N., van Es, J. & Clevers, H.** (2002). TCF: Lady Justice Casting the Final Verdict on the Outcome of Wnt Signaling. *Biol Chem* **383**, 255-61.
- Burke, B. & Ellenberg, J.** (2002). Remodelling the walls of the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 487-97.
- Cabré, F., Canela, E. I. & Canela, M. A.** (1989). Accuracy and precision in the determination of Stokes radii and molecular masses of proteins by gel filtration chromatography. *J Chromatogr* **472**, 347-56.

- Chaillan-Huntington, C., Braslavsky, C. V., Kuhlmann, J. & Stewart, M.** (2000). Dissecting the interactions between NTF2, RanGDP, and the nucleoporin XFXFG repeats. *J Biol Chem* **275**, 5874-79.
- Chaillan-Huntington, C., Butler, P. J., Huntington, J. A., Akin, D., Feldherr, C. M. & Stewart, M.** (2001). NTF2 monomer-dimer equilibrium. *J Mol Biol* **314**, 465-77.
- Chen, Y., Dai, X., Haas, A. L., Wen, R. & Wang, D.** (2006). Proteasome-dependent down-regulation of activated Stat5A in the nucleus. *Blood* **108**, 566-74.
- Chen, Y., Shao, L., Ali, Z., Cai, J. & Chen, Z. W.** (2008). NSOM/QD-based nanoscale immunofluorescence imaging of antigen-specific T-cell receptor responses during an in vivo clonal V γ 2V δ 2 T-cell expansion. *Blood* **111**, 4220-32.
- Cingolani, G., Lashuel, H. A., Gerace, L. & Muller, C. W.** (2000). Nuclear import factors importin α and importin β undergo mutually induced conformational changes upon association. *FEBS Lett* **484**, 291-8.
- Cong, F. & Varmus, H.** (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2882-7.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M. & Conti, E.** (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* **76**, 647-71.
- Cremer, T., Küpper, K., Dietzel, S. & Fakan, S.** (2004). Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell* **96**, 555-67.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. & Matunis, M. J.** (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**, 915-27.
- Cronshaw, J. M. & Matunis, M. J.** (2004). The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 34-9.
- Cushman, I., Bowman, B. R., Sowa, M. E., Lichtarge, O., Quioco, F. A. & Moore, M. S.** (2004). Computational and Biochemical Identification of a Nuclear Pore Complex Binding Site on the Nuclear Transport Carrier NTF2. *J Mol Biol* **344**, 303-310.
- Cushman, I., Palzkill, T. & Moore, M. S.** (2006). Using peptide arrays to define nuclear carrier binding sites on nucleoporins. *Methods* **39**, 329-41.
- Dahl, K. N., Kahn, S. M., Wilson, K. L. & Discher, D. E.** (2004). The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci* **117**, 4779-86.
- Dahl, K. N., Engler, A. J., Pajerowski, J. D. & Discher, D. E.** (2005). Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys J* **89**, 2855-64.

- Davis, L. I. & Blobel, G.** (1986). Identification and Characterization of a Nuclear Pore Complex Protein. *Cell* **45**, 699-709.
- de Bakker, B. I., de Lange, F., Cambi, A., Korterik, J. P., van Dijk, E. M., van Hulst, N. F., Figdor, C. G. & Garcia-Parajo, M. F.** (2007). Nanoscale organization of the pathogen receptor DC-SIGN mapped by single-molecule high-resolution fluorescence microscopy. *Chemphyschem* **8**, 1473-80.
- de Lange, F., Cambi, A., Huijbens, R., de Bakker, B., Rensen, W., Garcia-Parajo, M., van Hulst, N. & Figdor, C. G.** (2001). Cell biology beyond the diffraction limit: near-field scanning optical microscopy. *J Cell Sci* **114**, 4153-60.
- Denning, D. P., Patel, S. S., Uversky, V., Fink, A. L. & Rexach, M.** (2003). Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2450-5.
- Denning, D. P. & Rexach, M. F.** (2007). Rapid evolution exposes the boundaries of domain structure and function in natively unfolded FG nucleoporins. *Mol Cell Proteomics* **6**, 272-82.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Williams, R., Alber, F., Eswar, N., Chait, B. T., Rout, M. P. & Sali, A.** (2006). Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2172-7.
- Dickenson, N. E., Erickson, E. S., Mooren, O. L. & Dunn, R. C.** (2007). Characterization of power induced heating and damage in fiber optic probes for near-field scanning optical microscopy. *Rev Sci Instrum* **78**, 053712.
- Dießel, D. E.** (2006). Neue Methode zur nahfeldoptischen Abbildung biologischer Membranen. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Physik, Karlsruhe.
- Dingwall, C. & Laskey, R. A.** (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* **16**, 478-81.
- Donnert, G., Keller, J., Medda, R., Andrei, M. A., Rizzoli, S. O., Luhrmann, R., Jahn, R., Eggeling, C. & Hell, S. W.** (2006). Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11440-5.
- Donnert, G., Keller, J., Wurm, C. A., Rizzoli, S. O., Westphal, V., Schonle, A., Jahn, R., Jakobs, S., Eggeling, C. & Hell, S. W.** (2007). Two-color far-field fluorescence nanoscopy. *Biophys J* **92**, L67-9.
- Dorner, D., Gotzmann, J. & Foisner, R.** (2007). Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2 α , Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *Febs J* **274**, 1362-73.

- Edebo, L.** (1969). Disintegration of cells. In *Fermentation advances: recent advances in fermentation technology ; papers presented at the Third International Fermentation Symposium, September 2 - 6, 1968* (Hrsg. D. Perlman). Academic Press, Inc., New York.
- Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F. R., Petosa, C., Mattaj, I. W. & Kutay, U.** (2001). RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep* **2**, 926-32.
- Fabbro, M. & Henderson, B. R.** (2003). Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* **282**, 59-69.
- Fagotto, F., Glück, U. & Gumbiner, B. M.** (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of β -catenin. *Curr Biol* **8**, 181-90.
- Fahrenkrog, B., Maco, B., Fager, A. M., Köser, J., Sauder, U., Ullman, K. S. & Aebi, U.** (2002). Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *J Struct Biol* **140**, 254-267.
- Fahrenkrog, B. & Aebi, U.** (2003). The Nuclear Pore Complex: Nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 757-66.
- Fahrenkrog, B., Köser, J. & Aebi, U.** (2004). The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem Sci* **29**, 175-82.
- Failla, A. V., Spoeri, U., Albrecht, B., Kroll, A. & Cremer, C.** (2002). Nanosizing of fluorescent objects by spatially modulated illumination microscopy. *Appl Opt* **41**, 7275-83.
- Feldherr, C. M., Akin, D. & Cohen, R. J.** (2001). Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. *J Cell Sci* **114**, 4621-7.
- Franke, W. W., Deumling, B., Baerbelermen, Jarasch, E.-D. & Kleinig, H.** (1970). Nuclear membranes from mammalian liver. I. Isolation procedure and general characterization. *J Cell Biol* **46**, 379-95.
- Frey, S., Richter, R. P. & Görlich, D.** (2006). FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* **314**, 815-7.
- Frey, S. & Görlich, D.** (2007). A Saturated FG-Repeat Hydrogel Can Reproduce the Permeability Properties of Nuclear Pore Complexes. *Cell* **130**, 512-23.
- Fried, H. & Kutay, U.** (2003). Nucleoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1659-88.
- Friedrich, B., Quensel, C., Sommer, T., Hartmann, E. & Kohler, M.** (2006). Nuclear localization signal and protein context both mediate importin α specificity of nuclear import substrates. *Mol Cell Biol* **26**, 8697-709.

- Frosst, P., Guan, T., Subauste, C., Hahn, K. & Gerace, L.** (2002). Tpr is localized within the nuclear basket of the pore complex and has a role in nuclear protein export. *J Cell Biol* **156**, 617-30.
- Gasser, S. M.** (2002). Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* **296**, 1412-6.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook* (Hrsg. J. M. Walker), S. 571-607. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Gennerich, A. & Schild, D.** (2000). Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used. *Biophys J* **79**, 3294-306.
- Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T. & Adam, S. A.** (2004). Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**, 505-14.
- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K. & Spann, T. P.** (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev* **16**, 533-47.
- Görlich, D. & Kutay, U.** (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-60.
- Görlich, D., Seewald, M. J. & Ribbeck, K.** (2003). Characterization of Ran-driven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation. *Embo J* **22**, 1088-1100.
- Gottardi, C. J. & Peifer, M.** (2008). Terminal Regions of β -Catenin Come into View. *Structure* **16**, 336-8.
- Greber, U. F. & Gerace, L.** (1995). Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus. *J Cell Biol* **128**, 5-14.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R. D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., Dayani, Y., Prokocimer, M. & Enosh, A.** (2003). The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol* **226**, 1-62.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K. & Wilson, K. L.** (2005). The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 21-31.
- Gugel, H., Bewersdorf, J., Jakobs, S., Engelhardt, J., Storz, R. & Hell, S. W.** (2004). Co-operative 4Pi excitation and detection yields sevenfold sharper optical sections in live-cell microscopy. *Biophys J* **87**, 4146-52.

- Gustafsson, M. G. L., Agard, D. A. & Sedat, J. W.** (1999). I⁵M: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution. *J Microsc* **195**, 10-6.
- Habig, W. H. & Jakoby, W. B.** (1981). Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* **77**, 398-405.
- Hancock, R.** (2004). Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model. *Biol Cell* **96**, 595-601.
- Handa, N., Kukimoto-Niino, M., Akasaka, R., Kishishita, S., Murayama, K., Terada, T., Inoue, M., Kigawa, T., Kose, S., Imamoto, N., et al.** (2006). The Crystal Structure of Mouse Nup35 Reveals Atypical RNP Motifs and Novel Homodimerization of the RRM Domain. *J Mol Biol* **363**, 114-24.
- Harel, A., Orjalo, A. V., Vincent, T., Lachish-Zalait, A., Vasu, S., Shah, S., Zimmerman, E., Elbaum, M. & Forbes, D. J.** (2003). Removal of a single pore subcomplex results in vertebrate nuclei devoid of nuclear pores. *Mol Cell* **11**, 853-64.
- Haustein, E. & Schwille, P.** (2004). Single-molecule spectroscopic methods. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 531-40.
- Hecht, B., Sick, B., Wild, U. P., Deckert, V., Zenobi, R., Martin, O. J. F. & Pohl, D. W.** (2000). Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications. *J Chem Phys* **112**, 7761-74.
- Helfrich, W.** (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Naturforsch [C]* **28**, 693-703.
- Hell, S. W.** (2007). Far-field optical nanoscopy. *Science* **316**, 1153-8.
- Henderson, B. R. & Fagotto, F.** (2002). The ins and outs of APC and β -catenin nuclear transport. *EMBO Rep* **3**, 834-39.
- Hendriksen, J., Fagotto, F., van der Velde, H., van Schie, M., Noordermeer, J. & Fornerod, M.** (2005). RanBP3 enhances nuclear export of active β -catenin independently of CRM1. *J Cell Biol* **171**, 785-97.
- Herrmann, H. & Aebi, U.** (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* **73**, 749-89.
- Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. & Aebi, U.** (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 562-73.
- Hertwig, R.** (1903). Über Korrelation von Zell- und Kerngröße und ihre Bedeutung für die geschlechtliche Differenzierung und Teilung der Zelle. *Biologisches Centralblatt* **23**, 49-62 u. 108-119.

- Hetzer, M. W., Walther, T. C. & Mattaj, I. W.** (2005). Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 347-80.
- Hinshaw, J. E., Carragher, B. O. & Milligan, R. A.** (1992). Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* **69**, 1133-41.
- Höger, T. H., Zatloukal, K., Waizenegger, I. & Krohne, G.** (1990). Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma* **100**, 67-9.
- Holaska, J. M., Kowalski, A. K. & Wilson, K. L.** (2004). Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol* **2**, E231.
- Höppener, C.** (2003). Optische Rasternahfeldmikroskopie an funktionell intakten Membranen in Flüssigkeiten. *Dissertation*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Fachbereich Physik, Münster.
- Höppener, C., Siebrasse, J. P., Peters, R., Kubitscheck, U. & Naber, A.** (2005). High-resolution near-field optical imaging of single nuclear pore complexes under physiological conditions. *Biophys J* **88**, 3681-8.
- Hoppler, S. & Kavanagh, C. L.** (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* **120**, 385-93.
- Horiike, T., Hamada, K., Kanaya, S. & Shinozawa, T.** (2001). Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of Archaea in Bacteria is revealed by homology-hit analysis. *Nat Cell Biol* **3**, 210-4.
- Hsia, K.-C., Stavropoulos, P., Blobel, G. & Hoelz, A.** (2007). Architecture of a coat for the nuclear pore membrane. *Cell* **131**, 1313-26.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G. & Kemler, R.** (1996). Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* **59**, 3-10.
- Isgro, T. A. & Schulten, K.** (2005). Binding dynamics of isolated nucleoporin repeat regions to importin β . *Structure* **13**, 1869-79.
- Isgro, T. A. & Schulten, K.** (2007). Association of Nuclear Pore FG-repeat Domains to NTF2 Import and Export Complexes. *J Mol Biol* **366**, 330-45.
- Jaiswal, J. K. & Simon, S. M.** (2007). Imaging single events at the cell membrane. *Nat Chem Biol* **3**, 92-8.

- Jäkel, S., Mingot, J.-M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. & Görlich, D.** (2002). Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *Embo J* **21**, 377-86.
- Johnas, S. K. J.** (2004). Freischwebende biologische Membranen zur Untersuchung mit der optischen Nahfeldmikroskopie. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Physik, Karlsruhe.
- Jorgensen, P., Edgington, N. P., Schneider, B. L., Rupes, I., Tyers, M. & Futcher, B.** (2007). The Size of the Nucleus Increases as Yeast Cells Grow. *Mol Biol Cell* **18**, 3523-32.
- Kaffman, A. & O'Shea, E. K.** (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 291-339.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
- Kastrup, L., Oberleithner, H., Ludwig, Y., Schafer, C. & Shahin, V.** (2006). Nuclear envelope barrier leak induced by dexamethasone. *J Cell Physiol* **206**, 428-34.
- Khandwala, A. S. & Kasper, C. B.** (1971). The fatty acid composition of individual phospholipids from rat liver nuclear membrane and nuclei. *J Biol Chem* **246**, 6242-6.
- Ki, H., Jung, H.-C., Park, J.-H., Kim, J.-S., Lee, K. Y., Kim, T. S. & Kim, K.** (2006). Overexpressed LEF-1 proteins display different nuclear localization patterns of β -catenin in normal versus tumor cells. *Cell Biol Int* **30**, 253-61.
- Ki, H., Oh, M., Chung, S. W. & Kim, K.** (2008). β -Catenin can bind directly to CRM1 independently of adenomatous polyposis coli, which affects its nuclear localization and LEF-1/ β -catenin-dependent gene expression. *Cell Biol Int* **32**, 394-400.
- King, M. C., Patrick Lusk, C. & Blobel, G.** (2006). Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature* **442**, 1003-7.
- Kiseleva, E., Drummond, S. P., Goldberg, M. W., Rutherford, S. A., Allen, T. D. & Wilson, K. L.** (2004). Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J Cell Sci* **117**, 2481-90.
- Klebe, C., Bischoff, F. R., Ponstingl, H. & Wittinghofer, A.** (1995). Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry* **34**, 639-47.
- Kobe, B.** (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nat Struct Biol* **6**, 388-97.

- Kohler, A. & Hurt, E.** (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 761-73.
- Köhler, M., Fiebler, A., Hartwig, M., Thiel, S., Prehn, S., Kettritz, R., Luft, F. C. & Hartmann, E.** (2002). Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. *Cell Physiol Biochem* **12**, 335-44.
- Koike, M., Kose, S., Furuta, M., Taniguchi, N., Yokoya, F., Yoneda, Y. & Imamoto, N.** (2004). β -Catenin shows an overlapping sequence requirement but distinct molecular interactions for its bidirectional passage through nuclear pores. *J Biol Chem* **279**, 34038-47.
- Koopman, M., Cambi, A., de Bakker, B. I., Joosten, B., Figdor, C. G., van Hulst, N. F. & Garcia-Parajo, M. F.** (2004). Near-field scanning optical microscopy in liquid for high resolution single molecule detection on dendritic cells. *FEBS Lett* **573**, 6-10.
- Krichevsky, O. & Bonnet, G.** (2002). Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its application. *Rep Prog Phys* **65**, 251-97.
- Krieghoff, E., Behrens, J. & Mayr, B.** (2006). Nucleo-cytoplasmic distribution of β -catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* **119**, 1453-63.
- Krohne, G. & Benavente, R.** (1986). The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp Cell Res* **162**, 1-10.
- Krohne, G., Benavente, R., Scheer, U. & Dabauvalle, M.-C.** (2005). The nuclear lamina in Heidelberg and Würzburg: a personal view. *Eur J Cell Biol* **84**, 163-79.
- Krull, S., Thyberg, J., Björkroth, B., Rackwitz, H.-R. & Cordes, V. C.** (2004). Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket. *Mol Biol Cell* **15**, 4261-77.
- Kubitscheck, U., Kückmann, O., Kues, T. & Peters, R.** (2000). Imaging and tracking of single GFP molecules in solution. *Biophys J* **78**, 2170-9.
- Kubitscheck, U., Grünwald, D., Hoekstra, A., Rohleder, D., Kues, T., Siebrasse, J. P. & Peters, R.** (2005). Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **168**, 233-43.
- Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W. & Görlich, D.** (1997). Dominant-negative mutants of importin β block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *Embo J* **16**, 1153-63.
- Kutay, U. & Güttinger, S.** (2005). Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* **15**, 121-24.

- Lammerding, J., Hsiao, J., Schulze, P. C., Kozlov, S., Stewart, C. L. & Lee, R. T.** (2005). Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol* **170**, 781-91.
- Lammerding, J., Fong, L. G., Ji, J. Y., Reue, K., Stewart, C. L., Young, S. G. & Lee, R. T.** (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem* **281**, 25768-80.
- Lamond, A. I. & Earnshaw, W. C.** (1998). Structure and function in the nucleus. *Science* **280**, 547-53.
- Lasky, L. A.** (2000). The nucleoskeleton: go EAST, young man. *Nat Cell Biol* **2**, E74-E76.
- Lee, B. J., Cansizoglu, A. E., Suel, K. E., Louis, T. H., Zhang, Z. & Chook, Y. M.** (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin $\beta 2$. *Cell* **126**, 543-58.
- Lee, S. J., Imamoto, N., Sakai, H., Nakagawa, A., Kose, S., Koike, M., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yoneda, Y. & Tsukihara, T.** (2000). The adoption of a twisted structure of importin β is essential for the protein-protein interaction required for nuclear transport. *J Mol Biol* **302**, 251-64.
- Lee, S. J., Matsuura, Y., Liu, S. M. & Stewart, M.** (2005). Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* **435**, 693-96.
- Lewis, A., Isaacson, M., Harootunian, A. & Muray, A.** (1984). Development of a 500 Å spatial resolution light microscope : I. light is efficiently transmitted through $\lambda/16$ diameter apertures. *Ultramicroscopy* **13**, 227-31.
- Lim, R. Y., Huang, N.-P., Köser, J., Deng, J., Lau, K. H. A., Schwarz-Herion, K., Fahrenkrog, B. & Aebi, U.** (2006). Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9512-7.
- Lim, R. Y., Koser, J., Huang, N.-P., Schwarz-Herion, K. & Aebi, U.** (2007). Nanomechanical interactions of phenylalanine-glycine nucleoporins studied by single molecule force-volume spectroscopy. *J Struct Biol* **159**, 277-89.
- Lim, R. Y., Aebi, U. & Fahrenkrog, B.** (2008). Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex. *Histochem Cell Biol* **129**, 105-16.
- Lindsay, M. E., Plafker, K. S., Smith, A. E., Clurman, B. E. & Macara, I. G.** (2002). Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin- α : β -mediated nuclear protein import. *Cell* **110**, 349-60.
- Liu, Q., Pante, N., Misteli, T., Elsagga, M., Crisp, M., Hodzic, D., Burke, B. & Roux, K. J.** (2007a). Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. *J Cell Biol* **178**, 785-98.

- Liu, Z., Durant, S., Lee, H., Pikus, Y., Fang, N., Xiong, Y., Sun, C. & Zhang, X.** (2007b). Far-field optical superlens. *Nano Lett* **7**, 403-8.
- Liu, Z., Lee, H., Xiong, Y., Sun, C. & Zhang, X.** (2007c). Far-field optical hyperlens magnifying sub-diffraction-limited objects. *Science* **315**, 1686.
- Lord Rayleigh, F. R. S.** (1879). Investigations in optics with special reference to the spectroscope. *Philos. Mag.* **8**, 261-74.
- Lord Rayleigh, F. R. S.** (1896). On the theory of optical images with special reference to the microscope. *Philos. Mag.* **5**, 167-95.
- Lourim, D., Kempf, A. & Krohne, G.** (1996). Characterization and quantitation of three B-type lamins in *Xenopus* oocytes and eggs: increase of lamin LI protein synthesis during meiotic maturation. *J Cell Sci* **109** (Pt 7), 1775-85.
- Lusk, C. P., Blobel, G. & King, M. C.** (2007). Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 414-20.
- Ma, Y., Cai, S., Lv, Q., Jiang, Q., Zhang, Q., Sodmergen, Zhai, Z. & Zhang, C.** (2007). Lamin B receptor plays a role in stimulating nuclear envelope production and targeting membrane vesicles to chromatin during nuclear envelope assembly through direct interaction with importin beta. *J Cell Sci* **120**, 520-30.
- Macara, I. G.** (2001). Transport into and out of the Nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 570-94.
- Maeshima, K., Yahata, K., Sasaki, Y., Nakatomi, R., Tachibana, T., Hashikawa, T., Imamoto, F. & Imamoto, N.** (2006). Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *J Cell Sci* **119**, 4442-51.
- Magde, D., Elson, E. L. & Webb, W. W.** (1972). Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys Rev Lett* **29**, 705-8.
- Marg, A., Shan, Y., Meyer, T., Meissner, T., Brandenburg, M. & Vinkemeier, U.** (2004). Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* **165**, 823-33.
- Matsuura, Y. & Stewart, M.** (2005). Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *Embo J* **24**, 3681-9.
- Meares, G. P. & Jope, R. S.** (2007). Resolution of the Nuclear Localization Mechanism of Glycogen Synthase Kinase-3: FUNCTIONAL EFFECTS IN APOPTOSIS. *J Biol Chem* **282**, 16989-7001.

- Melcak, I., Hoelz, A. & Blobel, G.** (2007). Structure of Nup58/45 suggests flexible nuclear pore diameter by intermolecular sliding. *Science* **315**, 1729-32.
- Melcer, S., Gruenbaum, Y. & Krohne, G.** (2007). Invertebrate lamins. *Exp Cell Res* **313**, 2157-66.
- Meseth, U., Wohland, T., Rigler, R. & Vogel, H.** (1999). Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys J* **76**, 1619-31.
- Middelberg, A. P. J.** (1998). The release of intracellular bioproducts. In *Bioseparation and Bioprocessing*, Vol. II: Processing, Quality and Characterization, Economics, Safety and Hygiene (Hrsg. G. Subramaniam), S. 131-164. Wiley-VCH, Weinheim.
- Miyamoto, Y., Hieda, M., Harreman, M. T., Fukumoto, M., Saiwaki, T., Hodel, A. E., Corbett, A. H. & Yoneda, Y.** (2002). Importin α can migrate into the nucleus in an importin β - and Ran-independent manner. *Embo J* **21**, 5833-42.
- Molenda, D., Colas des Francs, G., Fischer, U. C., Rau, N. & Naber, A.** (2005). High-resolution mapping of the optical near-field components at a triangular nano-aperture. *Optics Express* **13**, 10688-96.
- Naber, A.** (1999). The tuning fork as sensor for dynamic force distance control in scanning near-field optical microscopy. *J Microsc* **194**, 307-10.
- Naber, A., Molenda, D., Fischer, U. C., Maas, H. J., Höppener, C., Lu, N. & Fuchs, H.** (2002). Enhanced light confinement in a near-field optical probe with a triangular aperture. *Phys Rev Lett* **89**, 210801.
- Naber, A.** (2003). Contributions to Near-Field Optical Microscopy: New Methods and Applications. *Habilitationsschrift*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Fachbereich Physik, Münster.
- Nachury, M. V. & Weis, K.** (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9622-7.
- Naim, B., Brumfeld, V., Kapon, R., Kiss, V., Nevo, R. & Reich, Z.** (2007). Passive and facilitated transport in nuclear pore complexes is largely uncoupled. *J Biol Chem* **282**, 3881-8.
- Nakayama, Y., Pauzauskie, P. J., Radenovic, A., Onorato, R. M., Saykally, R. J., Liphardt, J. & Yang, P.** (2007). Tunable nanowire nonlinear optical probe. *Nature* **447**, 1098-101.
- Neumann, F. R. & Nurse, P.** (2007). Nuclear size control in fission yeast. *J Cell Biol* **179**, 593-600.

- Nickerson, J. A.** (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* **114**, 463-74.
- Nishikura, K.** (2006). Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 919-31.
- Novotny, L. & Stranick, S. J.** (2006). Near-field optical microscopy and spectroscopy with pointed probes. *Annu Rev Phys Chem* **57**, 303-31.
- Onuma, Y., Nishihara, R., Takahashi, S., Tanegashima, K., Fukui, A. & Asashima, M.** (2000). Expression of the *Xenopus* GTP-binding protein gene *Ran* during embryogenesis. *Dev Genes Evol* **210**, 325-27.
- Paine, P. L., Moore, L. C. & Horowitz, S. B.** (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**, 109-14.
- Paine, P. L.** (1984). Diffusive and nondiffusive proteins in vivo. *J Cell Biol* **99**, 188s-95s.
- Pajerowski, J. D., Dahl, K. N., Zhong, F. L., Sammak, P. J. & Discher, D. E.** (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15619-24.
- Panté, N. & Kann, M.** (2002). Nuclear Pore Complex is able to Transport Macromolecules with Diameters of ~39 nm. *Mol Biol Cell* **13**, 425-34.
- Patel, S. S., Belmont, B. J., Sante, J. M. & Rexach, M. F.** (2007). Natively Unfolded Nucleoporins Gate Protein Diffusion across the Nuclear Pore Complex. *Cell* **129**, 83-96.
- Paulillo, S. M., Phillips, E. M., Köser, J., Sauder, U., Ullman, K. S., Powers, M. A. & Fahrenkrog, B.** (2005). Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J Mol Biol* **351**, 784-98.
- Pederson, T. & Aebi, U.** (2005). Nuclear actin extends, with no contraction in sight. *Mol Biol Cell* **16**, 5055-60.
- Percipalle, P., Clarkson, W. D., Kent, H. M., Rhodes, D. & Stewart, M.** (1997). Molecular interactions between the importin α/β heterodimer and proteins involved in vertebrate nuclear protein import. *J Mol Biol* **266**, 722-32.
- Perez-Terzic, C., Pyle, J., Jaconi, M., Stehno-Bittel, L. & Clapham, D. E.** (1996). Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear Ca^{2+} stores. *Science* **273**, 1875-7.
- Perez-Terzic, C., Faustino, R. S., Boorsma, B. J., Arrell, D. K., Niederlander, N. J., Behfar, A. & Terzic, A.** (2007). Stem cells transform into a cardiac phenotype with remodeling of the nuclear transport machinery. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4 Suppl 1**, S68-76.

- Pérez, J. R. C.** (2008). Aufbau eines optischen Rasternahfeldmikroskops für Transmissions- und Reflexionsmessungen. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Physik, Karlsruhe.
- Philpott, A., Krude, T. & Laskey, R. A.** (2000). Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 7-14.
- Plafker, K. & Macara, I. G.** (2000). Facilitated nucleocytoplasmic shuttling of the Ran binding protein RanBP1. *Mol Cell Biol* **20**, 3510-21.
- Pohl, D. W., Denk, W. & Lanz, M.** (1984). Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *Appl. Phys. Lett.* **44**, 651-3.
- Pokorna, J., Schwarzerova, K., Zelenkova, S., Petraek, I., Janotova, I., Apkova, V. & Opatrny, Z.** (2004). Sites of actin filament initiation and reorganization in coldtreated tobacco cells. *Plant Cell Environ* **27**, 641-53.
- Pollard, T. D. & Earnshaw, W. C.** (2002). Cell biology. Philadelphia, Pa [u.a.]: Saunders.
- Poon, I. K. H. & Jans, D. A.** (2005). Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* **6**, 173-86.
- Prieve, M. G., Guttridge, K. L., Munguia, J. E. & Waterman, M. L.** (1998). Differential Importin- α recognition and nuclear transport by Nuclear Localization Signals within the High-Mobility-Group DNA binding domains of Lymphoid Enhancer Factor 1 and T-Cell Factor 1. *Mol Cell Biol* **18**, 4819-32.
- Pukrop, T., Gradl, D., Henningfeld, K. A., Knöchel, W., Wedlich, D. & Köhl, M.** (2001). Identification of Two Regulatory Elements within the High Mobility Group Box Transcription Factor XTCF-4. *J Biol Chem* **276**, 8968-78.
- Quan, Y., Ji, Z.-L., Wang, X., Tartakoff, A. M. & Tao, T.** (2008). Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin β superfamily proteins. *Mol Cell Proteomics*, im Druck.
- Radtke, T., Schmalz, D., Coutavas, E., Soliman, T. M. & Peters, R.** (2001). Kinetics of protein import into isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2407-12.
- Rakowska, A., Danker, T., Schneider, S. W. & Oberleithner, H.** (1998). ATP-Induced shape change of nuclear pores visualized with the atomic force microscope. *J Membr Biol* **163**, 129-36.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. & Aebi, U.** (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* **110**, 883-94.
- Rexach, M. F.** (2006). A sorting importin on Sec61. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 476-8.

- Ribbeck, K. & Görlich, D.** (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J* **20**, 1320-30.
- Ribbeck, K. & Görlich, D.** (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J* **21**, 2664-71.
- Rice, J. H.** (2007). Beyond the diffraction limit: far-field fluorescence imaging with ultrahigh resolution. *Mol Biosyst* **3**, 781-93.
- Ries, J., Petrov, E. P. & Schwille, P.** (2008). Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy: Effects of Lateral Diffusion and Surface Generated Fluorescence. *Biophys J*, im Druck.
- Ris, H. & Malecki, M.** (1993). High-resolution field emission scanning electron microscope imaging of internal cell structures after Epon extraction from sections: a new approach to correlative ultrastructural and immunocytochemical studies. *J Struct Biol* **111**, 148-57.
- Ris, H.** (1997). High-resolution field-emission scanning electron microscopy of nuclear pore complex. *Scanning* **19**, 368-75.
- Rout, M. P. & Blobel, G.** (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* **123**, 771-83.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapato, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. & Chait, B. T.** (2000). The Yeast Nuclear Pore Complex: Composition, Architecture, and Transport Mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635-51.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Magnasco, M. O. & Chait, B. T.** (2003). Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol* **13**, 622-8.
- Rowat, A. C., Foster, L. J., Nielsen, M. M., Weiss, M. & Ipsen, J. H.** (2005). Characterization of the elastic properties of the nuclear envelope. *J R Soc Interface* **2**, 63-9.
- Rowat, A. C., Lammerding, J., Herrmann, H. & Aebi, U.** (2008). Towards an integrated understanding of the structure and mechanics of the cell nucleus. *Bioessays* **30**, 226-36.
- Sackmann, E.** (1995). Physical basis of self-organization and function of membranes: physics of vesicles. In *Structure and dynamics of membranes* (Hrsg. R. Lipowsky & E. Sackmann). Elsevier, Oxford, UK.
- Saksena, S., Summers, M. D., Burks, J. K., Johnson, A. E. & Braunagel, S. C.** (2006). Importin α 16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 500-8.
- San Paulo, A. & Garcia, R.** (2000). High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophys J* **78**, 1599-605.

- Schafer, C., Ludwig, Y., Shahin, V., Kramer, A., Carl, P., Schillers, H. & Oberleithner, H.** (2007). Ethanol alters access to the cell nucleus. *Pflugers Arch* **453**, 809-18.
- Scheer, U., Kartenbeck, J., Trendelenburg, M. F., Stadler, J. & Franke, W. W.** (1976). Experimental disintegration of the nuclear envelope. Evidence for pore-connecting fibrils. *J Cell Biol* **69**, 1-18.
- Schirmer, E. C. & Foisner, R.** (2007). Proteins that associate with lamins: Many faces, many functions. *Exp Cell Res* **313**, 2167-79.
- Schlune, A., Shahin, V., Enss, K., Schillers, H. & Oberleithner, H.** (2006). Plugs in nuclear pores: transcripts in early oocyte development identified with nanotechniques. *J Cell Biochem* **98**, 567-76.
- Schmidt, T., Schütz, G. J., Baumgartner, W., Gruber, H. J. & Schindler, H.** (1996). Imaging of single molecule diffusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2926-9.
- Schneider, R. & Grosschedl, R.** (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* **21**, 3027-43.
- Schwartz, T. U.** (2005). Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 221-6.
- Schwille, P. & Haustein, E.** (2002). Fluorescence Correlation Spectroscopy: A Tutorial for the Biophysics Textbook Online. In *Biophysics Textbook Online (BTO)*. Biophysical Society (<http://www.biophysics.org/education/>).
- Shahin, V., Albermann, L., Schillers, H., Kastrup, L., Schäfer, C., Ludwig, Y., Stock, C. & Oberleithner, H.** (2005a). Steroids dilate nuclear pore imaged with atomic force microscopy. *J Cell Physiol* **202**, 591-601.
- Shahin, V., Ludwig, Y., Schafer, C., Nikova, D. & Oberleithner, H.** (2005b). Glucocorticoids remodel nuclear envelope structure and permeability. *J Cell Sci* **118**, 2881-9.
- Siebrasse, J. P. & Peters, R.** (2002). Rapid translocation of NTF2 through the nuclear pore of isolated nuclei and nuclear envelopes. *EMBO Rep* **3**, 887-892.
- Smith, A. E., Slepchenko, B. M., Schaff, J. C., Loew, L. M. & Macara, I. G.** (2002). Systems analysis of Ran transport. *Science* **295**, 488-91.
- Smith, L. D.** (1989). The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development* **107**, 685-99.
- Smolyaninov, I. I., Hung, Y.-J. & Davis, C. C.** (2007). Magnifying superlens in the visible frequency range. *Science* **315**, 1699-701.

- Smythe, C., Jenkins, H. E. & Hutchison, C. J.** (2000). Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Embo J* **19**, 3918-31.
- Somech, R., Shaklai, S., Amariglio, N., Rechavi, G. & Simon, A. J.** (2005). Nuclear envelopathies--raising the nuclear veil. *Pediatr Res* **57**, 8R-15R.
- Starr, D. A.** (2007). Communication between the cytoskeleton and the nuclear envelope to position the nucleus. *Mol Biosyst* **3**, 583-9.
- Stewart, C. L., Roux, K. J. & Burke, B.** (2007). Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. *Science* **318**, 1408-12.
- Stewart, M., Kent, H. M. & McCoy, A. J.** (1998). Structural basis for molecular recognition between nuclear transport factor 2 (NTF2) and the GDP-bound form of the Ras-family GTPase Ran. *J Mol Biol* **277**, 635-46.
- Stewart, M.** (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 195-208.
- Stick, R. & Hausen, P.** (1985). Changes in the nuclear lamina composition during early development of *Xenopus laevis*. *Cell* **41**, 191-200.
- Stick, R.** (1988). cDNA cloning of the developmentally regulated lamin LIII of *Xenopus laevis*. *Embo J* **7**, 3189-97.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. & Aebi, U.** (1999a). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 391-401.
- Stoffler, D., Goldie, K. N., Feja, B. & Aebi, U.** (1999b). Calcium-mediated Structural Changes of Native Nuclear Pore Complexes Monitored by Time-lapse Atomic Force Microscopy. *J Mol Biol* **287**, 741-52.
- Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D. & Aebi, U.** (2003). Cryo-electron Tomography Provides Novel Insights into Nuclear Pore Architecture: Implications for Nucleocytoplasmic Transport. *J Mol Biol* **328**, 119-30.
- Strawn, L. A., Shen, T., Shulga, N., Goldfarb, D. S. & Wentz, S. R.** (2004). Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat Cell Biol* **6**, 197-206.
- Ström, A.-C. & Weis, K.** (2001). Importin β -like nuclear transport receptors. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3008.
- Stuurman, N., Heins, S. & Aebi, U.** (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* **122**, 42-66.

- Suh, E.-K. & Gumbiner, B. M.** (2003). Translocation of beta-catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins. *Exp Cell Res* **290**, 447-56.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L. & Burke, B.** (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* **147**, 913-20.
- Synge, E. H.** (1928). A suggested method for extending microscopic resolution into the ultra-microscopic region. *Philos. Mag.* **6**, 356-62.
- Terry, L. J., Shows, E. B. & Wentz, S. R.** (2007). Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* **318**, 1412-6.
- Thomas, J. G. & Baneyx, F.** (1997). Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **11**, 289-96.
- Thompson, N. L., Burghardt, T. P. & Axelrod, D.** (1981). Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophys J* **33**, 435-54.
- Toomre, D. & Manstein, D. J.** (2001). Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol* **11**, 298-303.
- Tran, E. J. & Wentz, S. R.** (2006). Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* **125**, 1041-53.
- Tran, E. J., Bolger, T. A. & Wentz, S. R.** (2007). SnapShot: nuclear transport. *Cell* **131**, 420.
- Tsutsui, K. M., Sano, K. & Tsutsui, K.** (2005). Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama* **59**, 113-20.
- van Beest, M., Dooijes, D., van de Wetering, M., Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O. & Clevers, H.** (2000). Sequence-specific High Mobility Group Box Factors Recognize 10-12-Base Pair Minor groove Motifs. *J Biol Chem* **275**, 27266-73.
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D. & Wittinghofer, A.** (1999). Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**, 635-46.
- Vigoureux, J. M. & Courjon, D.** (1992). Detection of nonradiative fields in the light of Heisenberg uncertainty principle and Rayleigh criterion. *Appl Opt* **31**, 3170-7.
- Vigoureux, J. M., Depasse, F. & Girard, C.** (1992). Superresolution of near-field optical microscopy defined from properties of confined electromagnetic waves. *Appl Opt* **31**, 3036-45.

- Walther, T. C., Fornerod, M., Pickersgill, H., Goldberg, M. W., Allen, T. D. & Mattaj, I. W.** (2001). The nucleoporin Nup153 is required for nuclear pore basket formation, nuclear pore complex anchoring and import of a subset of nuclear proteins. *Embo J* **20**, 5703-14.
- Walther, T. C., Alves, A., Pickersgill, H., Loiodice, I., Hetzer, M., Galy, V., Hülsmann, B. B., Köcher, T., Wilm, M., Allen, T. D., et al.** (2003). The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell* **113**, 195-206.
- Weis, K.** (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-51.
- Welch, K., Franke, J., Kohler, M. & Macara, I. G.** (1999). RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin $\alpha 3$. *Mol Cell Biol* **19**, 8400-11.
- Welch, M. D., Iwamatsu, A. & Mitchison, T. J.** (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**, 265-9.
- Wiechens, N. & Fagotto, F.** (2001). CRM1- and Ran-independent nuclear export of β -catenin. *Curr Biol* **11**, 18-27.
- Wischnewski, J., Solter, M., Chen, Y., Hollemann, T. & Pieler, T.** (2000). Structure and expression of *Xenopus* karyopherin-beta3: definition of a novel synexpression group related to ribosome biogenesis. *Mech Dev* **95**, 245-8.
- Wischnewski, J., Rudt, F. & Pieler, T.** (2004). Signals and receptors for the nuclear transport of TFIIIA in *Xenopus* oocytes. *Eur J Cell Biol* **83**, 55-66.
- Wolin, S. L., Krohne, G. & Kirschner, M. W.** (1987). A new lamin in *Xenopus* somatic tissues displays strong homology to human lamin A. *Embo J* **6**, 3809-18.
- Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J. D., Zheng, J. J., Moon, R. T. & Xu, W.** (2008). Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. *Structure* **16**, 478-87.
- Yang, W., Gelles, J. & Musser, S. M.** (2004). Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12887-12892.
- Yang, W. & Musser, S. M.** (2006). Nuclear import time and transport efficiency depend on importin β concentration. *J Cell Biol* **174**, 951-61.
- Yasuhara, N., Takeda, E., Inoue, H., Kotera, I. & Yoneda, Y.** (2004). Importin α/β -mediated nuclear protein import is regulated in a cell cycle-dependent manner. *Exp Cell Res* **297**, 285-93.
- Yoon, S.-O., Shin, S., Liu, Y., Ballif, B. A., Woo, M. S., Gygi, S. P. & Blenis, J.** (2008). Ran-Binding Protein 3 Phosphorylation Links the Ras and PI3-Kinase Pathways to Nucleocytoplasmic Transport. *Mol Cell* **29**, 362-75.

-
- Zeitler, B. & Weis, K.** (2004). The FG-repeat asymmetry of the nuclear pore complex is dispensable for bulk nucleocytoplasmic transport in vivo. *J Cell Biol* **167**, 583-90.
- Zhang, C., Jenkins, H., Goldberg, M. W., Allen, T. D. & Hutchison, C. J.** (1996). Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in *Xenopus* egg extract. *J Cell Sci* **109** (Pt 9), 2275-86.
- Zink, D., Fischer, A. H. & Nickerson, J. A.** (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 677-87.

8 Anhang

8.1 Aminosäuresequenz der klonierten Expressionskonstrukte

Die aus den Expressionsvektoren stammenden Sequenzen (grün) sind unterschiedlich lang. Bei dem Vektor pRSET schließt sich C-terminal des Polyhistidin-tags eine das Transkript stabilisierende Sequenz aus dem Gen 10 des Phagen T7 (MASMTGGQQM) und das Xpress™-Epitop (DLYDDDDDK) mit der Enterokinase-Erkennungssequenz an. Danach folgt die β -Catenin-Bindungsstelle (blau). Das Konstrukt XLef-1 in pRSET besitzt eine Punktmutation (rot; G47R) ebenso wie das XTcf-1 Fusionsprotein (M225T). Die Kernlokalisationssequenz (pink) befindet sich C-terminal der HMG-Box (orange). Am C-Terminus wurde bei jedem Konstrukt mittels Klonierungsprimer eine kurze Sequenz (violett) mit einem terminalen Cystein eingefügt. Die Arginine, die in *E. coli* durch eine seltene tRNA translatiert werden, sind durch einen Unterstrich markiert (Codon aag).

XLef-1 in pRSET

415aa

```

1 MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDRWGSELEM PQLSGARGGN GGGGDPELCA
61 TDEMIPFKDE GDPQKEKIYA EISNPEEEGD LADIKSSLVN ETEIIPSSNS HEISRRLDS
121 YHEKSREHPE DAGKHPDGGL YSKGPSYTG YPSYIMPMNM NEPYMSNGSL SPPIPRTSNK
181 VPVQPSHAV HPLTPLITYS DEHFAPGVHP SHIPSDINTK QGMHRHPQAP DLPTFYPMSP
241 GSVGQMTPLP GWYPHMHVSG PPGPHATGIP HPAIVNPQVK QESHNDHDL MHMKPHHEQR
301 KEQEPKRPHI KKPLNAFMLY MKEVRANVVA ECTLKESAAI NQILGRRWHA LSREDQAKYY
361 ELARKERQLH MQLYPGWSAR DNYGKKKKRKR REKLQESTSG AGPPRMTAAY IRGSC

```

XLef-1 in pQE-30

394aa

```

1 MRGSHHHHHH GSACELGTMP QLSGAGGGNG GGGDPELCAT DEMIPFKDEG DPQKEKIYAE
61 ISNPEEEGDL ADIKSSLVNE TEIIPSSNSH EISRRLDSY HEKSREHPED AGKHPDGGLY
121 SKGPSYTGYP SYIMPMNMN EPYMSNGSL PPIPRTSNKV PVVQPSHAV PLTPLITYS
181 EHFAPGVHPS HIPSDINTKQ GMHRHPQAPD LPTFYPMSPG SVGQMTPLPG WYPHMHVSGP
241 PPHATGIPH PAIVNPQVKQ ESHNDHDL HMKPHHEQRK EQEPKRPHIK KPLNAFMLYM
301 KEVRANVVAE CTLKESAAIN QILGRRWHA SREDQAKYYE LARKERQLHM QLYPGWSARD
361 NYGKKKKRKR EKLQESTSGA GPPRMTAAYI RGSC

```

XTcf-1 in pQE-30

385aa

```

1 MRGSHHHHHH GSACELGTMP QMNSAGEDDL GASDEMISFK DEGDQEEKIR ENGFTERDLA
61 DLKSSLVNES EVASHPRVPE THPEAIRAQ DVQLVYQDKF SAHMEDGIKH QDEGMYKSGS
121 YPGYPFLMLS DPYLSNGSVS ALSNKVPVQ PSHGVHPLIP YNSESFSHGS HSPHLPVDLN
181 QKQGVHRPSQ TPDVPTFYPL PSGGVGQISP SMGWFPHPLM LSPSTHTTGI PHPAIIHSG
241 NKMDIYERN MKQHSEPKRE KEPKKPAIKK PLNAFMLYMK EMRANVIAEC TLKESAAINQ
301 ILGGRWHA LS REEQSKYYEL ARKERQLHM QLYPGWSARDN YGKRKRRTRE KHQDSSSDPG
361 SPKKCRARFG LNQQTDWCGP CRASC

```


8.2 Weitere Informationen zu den exprimierten Konstrukten

Die folgende tabellarische Zusammenstellung enthält wissenswerte Angaben für die Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine.

Tab. 14: Zusammenstellung einiger Parameter der exprimierten Proteine. Neben der Aminosäurezahl (# aa) und dem Molekulargewicht sind auch der isoelektrische Punkt (pI) und die Anzahl der Cysteine (C), Tyrosine (Y) bzw. Tryptophane (W), aufgelistet. Der molare Extinktionskoeffizient (Ext.koeffizient) wurde nach Gleichung (1) unter reduzierenden Bedingungen mit Hilfe von Expasy Protparam berechnet (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>). Für GST-Fusionsproteine sind auch die aus einer enzymatischen Spaltung hervorgegangenen Proteine aufgeführt.

Name	# aa	Molekulargewicht [Da]	pI	Ext.koeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	# C	# W	# Y
GNG	514	58 686	6.46	64 750	6	5	25
GST-β-Catenin	1015	112 687	5.60	106 690	15	11	31
β-Catenin	791	86 539	5.48	63 830	11	7	17
GST-Ntf-2	357	41 135	5.68	63 830	7	7	17
Ntf-2	133	14 987	5.10	20 970	3	3	3
GST-Ran	441	50 584	6.48	71 280	7	7	22
Ran	217	24 436	7.17	28 420	3	3	8
Importin α2	537	58 933	5.75	47 440	6	7	6
Importin α3	531	59 097	5.05	41 940	9	6	6
Importin β1	886	98 358	4.78	78 270	23	8	23
XLef-1Cys pQE-30	394	43 976	7.21	40 340	4	3	16
XLef-1Cys pRSET	415	46 603	6.77	47 330	3	4	17
XTcf-1Cys pQE-30	385	43 407	7.76	41 370	6	4	13

8.3 Filmaufnahmen der Dreiecksapertursonde und einer freistehenden Kernmembran

Die drei Filme auf der beiliegenden CD zeigen die nukleoplasmatische Seite einer freistehenden, mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiI markierten Kernmembran in der Fokusebene, die während der Aufnahmen nicht verändert wurde. Für die Analyse der Membran-Sonden-Interaktionen wurde sowohl die Dreiecksapertursonde in axialer Richtung als auch das Präparat lateral bewegt.

-
- 1-Sondenbewegung_axial.avi** Die Dreiecksapertursonde nähert sich der im Fokus befindlichen freistehenden Kernmembran an. Die Apertur wird in der Bildmitte als weißes Dreieck sichtbar und die Sonde drückt noch einige Hundert Nanometer in die Membran hinein. Anschließend wird die Sonde zurückgezogen und nimmt die Membran mit. Nach Ablösung von der Sonde kehrt die Kernmembran unversehrt wieder in die Fokusebene zurück. [in Kooperation mit PD Dr. A. Naber und N. Neuberth]
- 2-Sondenbewegung_lateral.avi** Die freistehende Kernmembran wird nach Annäherung der Dreiecksapertursonde lateral bewegt. Die Membran zeigt dabei keine Stauchungen oder Rupturen. Hellere Punkte auf der Kernmembran zeigen sowohl bei moderater als auch größerer Geschwindigkeit, dass die freistehende Kernmembran bei lateraler Bewegung nicht an der Sonde haftet. [in Kooperation mit PD Dr. A. Naber und N. Neuberth]
- 3-Sondenbewegung_lateral-axial.avi** Die angenäherte Dreiecksapertursonde gleitet über die freistehende Kernmembran, die zunächst lateral bewegt wird. Durch eine axial wirkende Kraft nimmt die zurückziehende Sonde die weiterhin lateral bewegte Membran mit. [in Kooperation mit PD Dr. A. Naber und N. Neuberth]

8.4 Modell der begrenzten eindimensionalen Diffusion im optischen Nahfeld

Das Modell der begrenzten eindimensionalen Diffusion beschreibt die theoretische Autokorrelationsfunktion eines unendlich lange diffundierenden Partikels im optischen Nahfeld. Die Herleitung erfolgt analog zu Gennerich & Schild (2000), die ein Modell für die axial begrenzte Diffusion bei einer Gauß'schen Intensitätsverteilung entwickelt haben.

Die Diffusion ist in x-Richtung durch die eindimensionale Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion

$$\rho(x, x', \tau) = \frac{1}{d} \cdot \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{-D\tau(m\pi/d)^2} \cdot \cos\left(\frac{m\pi x}{d}\right) \cdot \cos\left(\frac{m\pi x'}{d}\right) \quad (18)$$

charakterisiert (Elson & Magde, 1974). Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ des Fluoreszenzsignals $i(t)$,

$$i(t) = \int_0^d dx \cdot I(x) \cdot \bar{C}(x, t) \cdot Q \quad (19)$$

mit der Anregungsintensität $I(x) = I_0 \cdot e^{-x/l}$, der Konzentrationsfluktuation $\bar{C}(x, t) = \langle c \rangle$ und der angenommenen Quantenausbeute $Q = 1$, ist definiert durch

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle i \rangle^2} \cdot \int_0^d dx \int_0^d dx' \cdot I(x) \cdot I(x') \cdot \phi(x, x', \tau) \quad (20)$$

mit der Konzentrationskorrelationsfunktion $\phi(x, x', \tau) = \langle c \rangle \cdot \rho(x, x', \tau)$.

Um die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ zu erhalten, wird zunächst das durchschnittliche Fluoreszenzsignal $\langle i \rangle$ mittels der exponentiellen Intensitätsverteilung $I(x)$,

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-x/l}, \quad (21)$$

berechnet:

$$\langle i \rangle = I_0 \cdot \langle c \rangle \cdot \int_0^d dx \cdot e^{-x/l} = I_0 \cdot \langle c \rangle \cdot l \cdot (1 - e^{-d/l}) = I_0 \cdot N_{exc} \cdot (1 - e^{-d/l}), \quad (22)$$

wobei N_{exc} für die Zahl der Partikel im Anregungsvolumen steht, und anschließend in Gleichung (20) eingesetzt:

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \frac{I_0^2 \cdot \frac{N}{l}}{I_0^2 \cdot N^2 \cdot (1 - e^{-d/l})} \cdot \int_0^d \int_0^d dx dx' \cdot e^{-x/l} \cdot e^{-x'/l} \cdot \rho(x, x', \tau) \\ &= \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{l \cdot d} \cdot (1 - e^{-d/l})^{-2} \cdot \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{-D\tau(m\pi/d)^2} \cdot \left[\int_0^d dx \cdot e^{-x/l} \cdot \cos\left(\frac{m\pi x}{d}\right) \right]^2. \end{aligned} \quad (23)$$

Das Integral in Gleichung (23) lässt sich wie folgt lösen:

$$F(x) = \int e^{-ax} \cdot \cos(bx) dx = e^{-ax} \cdot \frac{b \cdot \sin(bx) - a \cdot \cos(bx)}{a^2 + b^2} \quad (24)$$

mit $a = 1/l$ und $b = m\pi/d$

$$F(x) = \int_0^d \frac{l}{1 + (m\pi l/d)^2} \cdot \left(1 - (-1)^m \cdot e^{-d/l}\right) \quad (25)$$

Setzt man Gleichung (25) in Gleichung (23) ein, so erhält man die Autokorrelationsfunktion für die eindimensionale Diffusion im optischen Nahfeld:

$$G(\tau) = \frac{1}{N_{exc}} \cdot \frac{1}{l \cdot d} \cdot \left(1 - e^{-d/l}\right)^{-2} \cdot l^2 \cdot \left(\left(1 - e^{-d/l}\right)^2 + 2 \sum_{m=1}^{\infty} \frac{e^{-D\tau(m\pi/d)^2}}{\left(1 + (m\pi d/l)^2\right)^2} \cdot \left(1 - (-1)^m e^{-d/l}\right)^2 \right) \quad (26)$$

oder mit $N_{abs} = \langle c \rangle \cdot d$:

$$G(\tau) = \frac{1}{N_{abs}} \cdot \left(1 + 2 \sum_{m=1}^{\infty} \frac{e^{-D\tau(m\pi/d)^2}}{\left(1 + (m\pi l/d)^2\right)^2} \cdot \left(\frac{1 - (-1)^m e^{-d/l}}{1 - e^{-d/l}} \right)^2 \right) \quad (27)$$

8.5 Literatur des Anhangs

Gennerich, A. & Schild, D. (2000). Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used. *Biophys J* **79**, 3294-306.

Elson, E. L. & Magde, D. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**, 1-27.

8.6 Publikation in einer Fachzeitschrift

M. Herrmann, N. Neuberth, J. Wissler, J. Pérez, D. Gradl und A. Naber (2008)

High resolution imaging and dynamic processes on freestanding nuclear membranes by near-field optical microscopy.

Nature, wird eingereicht

8.7 Eigene Posterbeiträge zu wissenschaftlichen Tagungen

M. Herrmann, N. Rau, C. Höppener, S. K. J. Johnas, D. Gradl und A. Naber

Observing individual nuclear import events on an unsupported nuclear envelope by near-field optical microscopy.

28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Heidelberg, 16.-19. März 2005

N. Rau, M. Herrmann, C. Höppener, D. Gradl und A. Naber

Observing individual transport events through single pores on an unsupported nuclear membrane by near-field optical microscopy.

Summer School „Nano-Biology“ des DFG-Center for Functional Nanostructures, Bad Herrenalb, 5.-8. September 2005

N. Rau, M. Herrmann, C. Höppener, D. Gradl und A. Naber

Observing individual transport events through single pores on an unsupported nuclear membrane by near-field optical microscopy.

FRONTIERS Annual Meeting 2005, Karlsruhe, 18.-21. September 2005

M. Herrmann, J. Wissler, N. Neuberth, D. Gradl und A. Naber

Investigation of nuclear transport by near-field optical microscopy and fluorescence correlation spectroscopy.

Summer School „Nano-Biology“ des DFG-Center for Functional Nanostructures, Bad Herrenalb, 20.-23. August 2007

Eine Doktorarbeit ist wie ein langer und oftmals steiniger Weg, auf dem es wichtig ist, Freunde und hilfreiche Gefährten zu haben.

Deshalb sage ich Danke:

meiner Doktormutter Prof. Dr. Doris Wedlich für die Betreuung, die Einführung in die Kunst der Kernpräparation und ihre kritischen Bemerkungen zu meiner Arbeit,
PD Dr. Andreas Naber für die Übernahme des Korreferats und die vielen Diskussionen in den gemeinsamen Sitzungen ebenso wie im SNOM-Labor,
meinem Betreuer Dr. Dietmar Gradl für sein Vertrauen, die Überlassung des Themas und die lange Leine; stets für mich da und begeistert dabei („Habt ihr was am SNOM gesehen?“),
PD Dr. Birthe Fahrenkrog, Prof. Dr. Uli Kubitscheck, PD Dr. Harald Herrmann-Lerdon,
Prof. Dr. Reimer Stick und Prof. Dr. Kathy Ullman für ihr Interesse und die zur Verfügung gestellten Antikörper,
den Ex-Münsteranern Antje Grünwald, Dr. David Grünwald und Dr. Jan-Peter Siebrasse für ihre Unterstützung in Fragen der Transportfaktorenaufreinigung,
Dr. Wayne A. Fenton und Prof. Dr. Art Horwich für die Hilfe bei der Suche nach bakteriellen Chaperonen,
den Ehemaligen & Aktiven der AG Naber, Daniela Dießel, Dr. Christiane Höppener,
Dr. Simone Johnas, Nicole Neuberth, José Pérez und Jörg Wissler, für die Einführung in die optische Nahfeldmikroskopie und die gemeinsame Messzeit („Sind wir schon dran?“),
meinen Kollegen im Heimatinstitut, die sich immer freuten, mich wiederzusehen, wenn ich von einem der vielen Ausflüge in die Physik zurückkam; dabei gilt mein besonderer Dank
Monika Diecker für die Pflege der operierten Frösche und die zuverlässige Versorgung mit sauberen Glaswaren,
Dr. Daniela Kobbe aus dem botanischen Institut für diverse Bakterienstämme und Sandra Baumann aus der technischen Biologie für die Einführung in die Hochdruckhomogenisation und die Gespräche beim Kaffee,
Dr. Harald Bothe und Dr. Stefan Thiele stellvertretend für alle Hilfreichen Geister in den Heißen Linien,
der DFG und insbesondere dem CFN für die Forschungsfinanzierung,
meiner Familie für die materielle und ideelle Unterstützung,
meinen Freunden („Wann gibst du ab?“),
und vor allem meiner Ehefrau Barbara und meiner Tochter Hannah, ersterer für Gespräche und Korrekturen, beiden für ihre Geduld und Liebe.