

**Biologische Referenzstrukturen und  
Protokolloptimierung in der hochauflösenden  
Fluoreszenzmikroskopie mit *d*STORM**

**Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Fakultät für Biologie

vorgelegt von

**Anna Löschberger**

geboren in Füssen

Würzburg 2014

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Seit der Erfindung des Mikroskops gibt es auf der Welt Bakterien.  
(Michail Genin)



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>ix</b>
<b>Summary</b>	<b>xi</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die zunehmende Bedeutung der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie in der Biologie . . . . .	1
1.1.1. Klassische Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	1
1.1.2. Lokalisationsmikroskopie . . . . .	2
1.1.3. Korrelative Mikroskopie . . . . .	3
1.1.4. Anforderungen an die Probenvorbereitung . . . . .	4
1.2. Der Kernporenkomplex als Modellstruktur für die hochauflösende Mikroskopie . . . . .	4
Biologische Funktion . . . . .	4
Aufbau und Struktur . . . . .	5
Eignung als Modellstruktur . . . . .	5
1.3. Chromatinorganisation durch D1 . . . . .	6
1.3.1. Chromatinaufbau . . . . .	6
1.3.2. Die AT-Hook-Proteine der HMGA-Familie . . . . .	6
1.3.3. Das chromosomale Protein D1 aus Drosophila . . . . .	7
Chromatin in Drosophila . . . . .	7
D1 . . . . .	7
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>9</b>
2.1. Mikrobiologische Methoden . . . . .	9
2.1.1. Flüssige Bakterienkulturen . . . . .	9
2.1.2. Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur . . . . .	9
2.1.3. Plattenkulturen . . . . .	10
2.1.4. Herstellung von Glycerinkulturen . . . . .	10
2.1.5. Herstellung von kompetenten Zellen . . . . .	10
2.1.6. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien . . . . .	11
2.2. Molekularbiologische Methoden . . . . .	12
2.2.1. RNA-Extraktion aus Zellen mit TriFast™ . . . . .	12
2.2.2. Herstellung von cDNA mit RT-PCR . . . . .	12
2.2.3. PCR - Polymerasekettenreaktion . . . . .	13
Primerdesign . . . . .	13
Annealing und Elongation . . . . .	13
PCR-Ansatz . . . . .	14
2.2.4. Kolonie-PCR . . . . .	14
2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	15
2.2.6. Plasmid-DNA-Gewinnung durch Miniprep . . . . .	16
2.2.7. Sequenzierung . . . . .	16

2.2.8.	Restriktionsverdau . . . . .	16
2.2.9.	Gelextraktion von DNA-Fragmenten . . . . .	17
2.2.10.	Ligation . . . . .	17
	Blunt-Ligation in pJet . . . . .	17
	Ligation in selbst geschnittenen Vektoren . . . . .	18
2.3.	Zellkultur . . . . .	19
2.3.1.	Transfektion . . . . .	19
	Transfektion mit FuGene <sup>®</sup> HD . . . . .	19
	Transfektion mit Effectene <sup>™</sup> . . . . .	19
2.4.	Markierungsmethoden . . . . .	20
2.4.1.	Markierung von lebenden Zellen mit SNAPtag oder Halotag . . . . .	20
2.4.2.	Immunfluoreszenzen . . . . .	20
	Standardprotokoll mit Formaldehydfixierung: . . . . .	20
	Methanolschritt-Erweiterung . . . . .	20
2.4.3.	Markierung von Kernhüllen aus <i>Xenopus laevis</i> Oocyten . . . . .	20
2.4.4.	EdU-Markierung von DNA . . . . .	21
	Click-Reaktion nach Invitrogen . . . . .	21
	ClickOx Reaktion . . . . .	22
2.5.	Mikroskopie . . . . .	23
2.5.1.	<i>d</i> STORM . . . . .	23
	Setup . . . . .	23
	Schaltpuffer . . . . .	23
	rapid <i>d</i> STORM . . . . .	24
2.5.2.	CLSM und FRAP-Experimente . . . . .	24
2.5.3.	Biostation . . . . .	24
2.5.4.	Raster-Elektronenmikroskopie . . . . .	24
	Vorbereitung der Proben . . . . .	24
	Messungen . . . . .	25
2.5.5.	Erstellen der korrelativen Bilder . . . . .	25
<b>3.</b>	<b>Publikationen und weitere Ergebnisse</b> . . . . .	<b>27</b>
3.1.	Publikationen . . . . .	27
3.1.1.	Modellstrukturen . . . . .	29
	Kernporen: Auflösung und Struktur, Manuskript 1 . . . . .	29
	Kernporen: Zwei-Farben-Messungen und 3D-Aufnahmen, Manuskript 2 . . . . .	29
	Kernporen: weitere Beiträge . . . . .	30
	Lebende Zellen: H2B, Manuskript 3 . . . . .	30
3.1.2.	Korrelative Mikroskopie, Manuskript 4 . . . . .	31
3.1.3.	ClickOx, Manuskript 5 . . . . .	31
3.1.4.	Chromatinorganisation, Manuskript 6 . . . . .	32
3.2.	Chromatinorganisation durch D1 . . . . .	33
3.2.1.	Lokalisation von D1-EGFP in Zellen . . . . .	33
3.2.2.	Herstellung der Funktionsmutante R10×G . . . . .	33
3.2.3.	Analyse von D1-induzierter Chromatin-Akkumulation mittels Hochauflösung von EdU-markierter DNA . . . . .	34
3.2.4.	Klonierung von Deletionsmutanten von D1 und R10×G . . . . .	36
3.2.5.	Untersuchung der Mobilität von D1-Mutanten mit FRAP . . . . .	37

<b>4. Diskussion</b>	<b>41</b>
4.1. Anforderungen an biologische Modellstrukturen . . . . .	41
4.1.1. Fixierte Proben: Kernporenkomplexe . . . . .	41
Strukturanalyse und laterale Auflösung . . . . .	41
Zweifarb-Experimente . . . . .	42
4.1.2. 3D: Kernhülle . . . . .	43
4.1.3. Lebende Zellen: H2B und Lamin C . . . . .	43
4.2. Korrelative Mikroskopie . . . . .	44
4.3. ClickOx . . . . .	45
4.4. Chromatinorganisation: Anwendungsbeispiel D1-Projekt . . . . .	46
4.5. Fazit und Ausblick . . . . .	48
<b>A. Anhang</b>	<b>59</b>
A.1. Antikörper und Fluoreszenz-Marker . . . . .	59
A.2. Molekularbiologische Arbeitsmittel . . . . .	60
A.2.1. Enzyme . . . . .	60
A.2.2. DNA Größenstandards . . . . .	60
A.2.3. Kits . . . . .	60
A.3. Biologisches Material . . . . .	60
A.3.1. Zelllinien . . . . .	60
A.3.2. Bakterienstämme . . . . .	61
A.4. Medien und Puffer . . . . .	61
A.4.1. Zellkultur . . . . .	61
A.4.2. dSTORM . . . . .	62
A.5. Oligonucleotide . . . . .	62
A.6. Konstrukte . . . . .	64
A.7. Programme, Online-Tools und Internetdatenbanken . . . . .	66
A.8. Geräte . . . . .	66
A.8.1. Laser . . . . .	67
A.8.2. EMCCD-Kameras . . . . .	67
A.9. Abkürzungsverzeichnis . . . . .	68
<b>B. Manuskripte</b>	<b>71</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>123</b>
<b>Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen</b>	<b>125</b>
<b>Danksagung</b>	<b>127</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>129</b>





# Zusammenfassung

Die Lokalisationsmikroskopie ist eine neue, vielversprechende Methode der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie. Sie ermöglicht detaillierte Einblicke in die Organisation und den strukturellen Aufbau von Zellen. Da die Vorbereitung der Proben und das Aufnehmen der Bilder im Vergleich zu herkömmlichen Methoden höhere Anforderungen stellt, mussten ihr Potential und ihre Zuverlässigkeit erst noch überzeugend gezeigt werden. Bis vor kurzem wurde das Auflösungsvermögen vor allem an Mikrotubuli gezeigt, deren filamentöse Struktur allerdings schon in konfokalen Bildern zu erkennen ist. Deswegen wurde in dieser Dissertation der Kernporenkomplex (NPC), dessen Struktur in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie nicht auflösbar ist, als Modellstruktur für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie eingeführt.

Dazu wurden Kernporenkomplexe aus Kernhüllen von *Xenopus laevis* Oocyten mit *d*STORM (*direct* stochastic optical reconstruction microscopy), einer Methode der Lokalisationsmikroskopie, hochaufgelöst. Damit konnte nun erstmals die Achtfachsymmetrie dieses Proteinkomplexes lichtmikroskopisch dargestellt werden. Desweiteren konnte der Zentralkanal mit einem Durchmesser von ca. 40 nm aufgelöst werden. Die Daten eigneten sich außerdem für eine automatisierte Bildanalyse nach dem sogenannten "particle averaging" - einer aus der Elektronenmikroskopie bekannten Methode, um eine Durchschnittsstruktur zu ermitteln.

Darüber hinaus wurden Zweifach-Färbungen von NPCs benutzt, um verschiedene Ansätze für Zweifarben-Aufnahmen mit *d*STORM zu testen. Neben dem mittlerweile standardmäßig benutzten, sequentiellen Ansatz mit zwei spektral getrennten Farbstoffen, wurde auch ein simultaner Ansatz mit zwei spektral überlappenden Farbstoffen erfolgreich angewandt. Auch für 3D-Messungen mit den Ansätzen Biplane und Astigmatismus eignete sich die Markierung der Kernhülle. Hier wurden jedoch A6-Zellen benutzt und die Krümmung des Zellkerns über die gefärbten Kernporen dargestellt.

*d*STORM-Messungen können nicht nur an fixierten, sondern auch in lebenden Zellen durchgeführt werden. Hierzu eignen sich vor allem sehr immobile Proteine, wie H2B oder Lamin C. Anhand von SNAP-Tag- und Halo-Tag-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass sich kommerziell erhältliche, organische Farbstoffe auch in endogener zellulärer Umgebung schalten lassen, wodurch Lebendzell-Aufnahmen mit *d*STORM möglich sind.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit befasst sich mit korrelativen Aufnahmen aus *d*STORM und Rasterelektronenmikroskopie (SEM). Hierzu wurden *Xenopus laevis* Kernhüllen zuerst mit *d*STORM hochaufgelöst und danach für die EM präpariert. Anschließend wurden zugehörige Bereiche am Rasterelektronenmikroskop aufgenommen. Mit den erhaltenen korrelativen Bildern konnte gezeigt werden, dass sich *d*STORM und SEM bei geeigneten Proben durchaus kombinieren lassen. Proteine können somit spezifisch markiert und im Rahmen ihrer strukturellen Umgebung mit nahezu molekularer Auflösung dargestellt werden.

Da hochwertige Aufnahmen eine ausgereifte Probenpräparation voraussetzen, darf deren Etablierung nicht zu kurz kommen. Unter dieser Prämisse wurde ein optimiertes Markierungsprotokoll mit dem Namen ClickOx entwickelt. Mit ClickOx bleibt bei der kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition die Feinstruktur von Aktinfilamenten, sowie die Fluoreszenz fluoreszierender Proteine, deutlich sichtbar erhalten. Während bei

den klassischen Click-Protokollen auf Grund der Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) feine zelluläre Strukturen, wie Aktinfilamente, angegriffen oder zerstört werden, schützt das neue Protokoll mit enzymatischem Sauerstoffzug Proteine und somit Strukturen vor Reaktionen mit ROS. Das unterstreicht, wie wichtig es ist auch sogenannte "etablierte" Protokolle weiterzuentwickeln, denn bestimmte Nebeneffekte in Präparationen werden unter Umständen erstmals in der Hochauflösung sichtbar.

Ein weiterer Aspekt war die Untersuchung des Einflusses von D1 auf die Chromatinorganisation. Mit verschiedenen mikroskopischen Methoden konnten Hinweise auf eine mögliche DNA-Cross-Linking-Fähigkeit dieses Proteins gesammelt werden. Hier wurde die Einzelmolekülinformation der *d*STORM-Filme genutzt, um unterschiedliche Grade von DNA- bzw. Chromatin-Akkumulation zu vergleichen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass wildtypisches D1 DNA vernetzen kann. Dies erfolgt über die sogenannten AT-Haken-Motive. Sobald diese alle durch Mutation funktionsunfähig gemacht werden - wie bei der verwendeten R10×G-Mutante - lässt sich keine Akkumulation der DNA mehr beobachten. Neben der Chromatinaggregation durch D1-Expression konnte in FRAP-Experimenten gezeigt werden, dass nur die "echten" AT-Haken eine hohe Affinität zum Chromatin aufweisen, die sogenannten "potentiellen" hingegen nicht.

# Summary

Localization microscopy is a new and promising imaging technique, which provides detailed insights into cellular organization and structural composition of cells with high spatial resolution. Due to the challenging preparation of samples and demanding imaging procedure, its potential and reliability had to be proven. Until recently the resolution has been shown mainly on microtubules, whose structure is already visible in confocal images. This thesis introduced the nuclear pore complex (NPC) as a more demanding model structure for super-resolution fluorescence microscopy as the structure of NPCs can not be resolved with conventional fluorescence microscopy.

For this purpose nuclear envelopes of *Xenopus laevis* oocytes were highly resolved with *d*STORM (*direct* stochastic optical reconstruction microscopy). With this localization microscopy method it was further possible to resolve the eightfold symmetry of nuclear pore complexes with light microscopy for the first time. In addition the central channel could be resolved with a diameter of about 40 nm. Furthermore, the localizations were used for single particle averaging, a well known image analysis method from electron microscopy, to calculate an average structure.

Double staining of NPCs was used to check the potential of two-color imaging with *d*STORM. Beside the common way of sequential imaging with two clearly spectrally separated dyes, a spectral demixing approach with spectrally overlapping dyes was applied. Labeling the nuclear envelope was also suitable for 3D measurements using two different approaches, i.e. biplane and astigmatism. In this case, labeled NPCs of *Xenopus laevis* A6-cells were used to illustrate the bending of the nucleus.

*d*STORM can be applied not only in fixed but also in living cells. Immobile proteins such as H2B or lamin C are especially suitable for this approach. Using fusion proteins with SNAP-Tag or Halo-Tag, it was shown that photoswitching of commercially available organic dyes is possible in an endogenous cellular environment and thus enabling *d*STORM in living cells.

Another aspect of this work covers correlative microscopy using *d*STORM and scanning electron microscopy (SEM). Therefore nuclear envelopes of *Xenopus laevis* were first imaged with *d*STORM and then prepared for SEM. After that, corresponding areas were imaged with SEM. The resulting correlative images showed clearly that - assuming one has appropriate samples - *d*STORM and SEM can be fairly combined. This way specifically labeled proteins can be imaged with nearly molecular resolution in the context of their structural environment.

Since the quality of localization microscopy strongly depends on sample preparation, ongoing developments of labeling protocols are required. On this premise an optimized labeling protocol called ClickOx was developed. ClickOx clearly preserves the fine structure of actin filaments and the fluorescence of fluorescent proteins when using copper-catalyzed azide-alkyne-cycloaddition. Whereas fine cellular structures such as actin filaments are affected by reactive oxygen species (ROS) under standard clicking procedures, the new protocol, which contains an enzymatic oxygen scavenger, protects proteins and thus cellular structures from reactions with ROS. This demonstrates the importance of further developing even so called “well established” protocols, because some side effects may appear only in super-resolution.

Another aspect addressed the influence of D1 on chromatin organization. Hints for a possible DNA cross-linking ability of D1 were collected using different microscopic approaches. The single-molecule information of *d*STORM measurements was used to analyse chromatin aggregation induced by D1 expression. The results indicate that wildtype D1 can cross-link DNA with its AT-hooks. Consequently the loss-of-function mutant R10×G is unable to aggregate chromatin. Furthermore FRAP experiments were performed to demonstrate that only “true” AT-hooks in D1 have a strong affinity to chromatin, but not the so called “potential” AT-hooks.

# 1. Einleitung

## 1.1. Die zunehmende Bedeutung der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie in der Biologie

### 1.1.1. Klassische Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Das Beobachten von kleinsten Strukturen, welche das menschliche Auge nicht mehr wahrnehmen kann, gehört schon seit langem zu den zentralen Aspekten der biologischen Forschung. Der niederländische Forscher Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) war der erste Mensch, dem es gelungen war, Bakterien sichtbar zu machen [Smit and Heniger, 1975]. Er gilt seither als einer der Gründerväter der Zell- und Mikrobiologie. 1838 entdeckte Matthias Schleiden mit einem einfachen Lichtmikroskop erstmals, dass einzelne Zellen die Grundbausteine für Pflanzen und Tiere bilden [Schleiden M. J., 1838]. Ernst Abbe zeigte 1873, dass die Auflösung der Lichtmikroskopie durch Beugung begrenzt ist und somit nicht besser als die halbe Wellenlänge des Lichts sein kann [Abbe, 1873]. Diese Auflösungsgrenze wird auch als Abbe-Limit bezeichnet. Mit der Einführung der Phasenkontrast-Mikroskopie in den Vierziger Jahren, welche eine Erhöhung des Eigenkontrastes von Strukturen zur Folge hat, sowie der Entwicklung der Differential-Interferenzkontrast-Mikroskopie in den Fünfzigern, konnten z.B. lebende Zellen deutlicher abgebildet werden. Diese Optionen finden sich daher häufig bei Zellkulturmikroskopen wieder.

Nachdem Adolf von Baeyer 1871 erstmals Fluorescein synthetisierte [Baeyer, 1871] und die Firma Carl Zeiss ab 1908 die ersten Fluoreszenzmikroskope zur Anregung von Fluorochromen entwickelte, folgten immer neuere organische Farbstoffe und bessere Technologien. Inzwischen zählen Fluoreszenzmikroskope zur Standardausstattung in vielen zellbiologischen Laboren. Mittels Immunfluoreszenz-Markierung können spezifische Moleküle lichtmikroskopisch auf fixierten Zellen lokalisiert werden (im Cytoplasma, Zellkern, Mitochondrien,...). Seit der Entdeckung von fluoreszierenden Proteinen [Shimomura et al., 1962], ist eine Lokalisation von Proteinen auch in lebenden Zellen möglich. Die Einführung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), bei welcher durch Abrastern mit einem Laserstrahl einzelne Ebenen scharf abgebildet werden, erlaubte noch kontrastreichere Bilder, da hier durch ein vorgeschaltetes Pinhole ausschließlich Fluoreszenz aus der Fokalebene zum Detektor gelangt. Diese Methode wird heute gerne für dreidimensionale Aufnahmen - insbesondere auch von Gewebeschnitten - genutzt. CLSMs ermöglichten auch Folge-Anwendungen wie die Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP), womit auch Messungen von Proteindynamiken in lebenden Zellen möglich sind [Meyvis et al., 1999].

Allerdings bleibt die klassische Fluoreszenzmikroskopie beugungsbegrenzt. Die abbesche Auflösungsgrenze wurde mittlerweile jedoch mit verschiedenen Methoden unterschritten. Hierzu gehören z.B. verschiedene Formen der Lokalisationsmikroskopie [Sauer, 2013], auf welche im nächsten Absatz genauer eingegangen wird, sowie Ansätze mit strukturierter Beleuchtung (SIM, Structured Illumination Microscopy) [Gustafsson, 2000] oder stimulierter Emission (STED, Stimulated Emission Depletion) [Klar et al., 2000]. Alle Methoden lassen sich unter dem Begriff der „hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie“ (Super-Resolution) zusammenfassen.

### 1.1.2. Lokalisationsmikroskopie

Normalerweise überlappen die Punktspreizfunktionen (PSFs) von emittierenden Fluorophoren innerhalb eines beugungsbegrenzten Bereichs. Der Grundansatz der Lokalisationsmikroskopie besteht nun darin, diese PSFs zeitlich so zu separieren, dass sie genügend Abstand zueinander haben, um ihre Zentren zu lokalisieren. Zum Schluss wird aus allen einzelnen Lokalisationen ein finales Bild rekonstruiert.

Dazu muss die Fluoreszenz der einzelnen Moleküle einer Probe zeitlich und räumlich getrennt und über einen längeren Zeitraum detektiert werden. Fluorophore müssen daher einen langen, nicht fluoreszierenden Aus-Zustand und einen kurzen fluoreszierenden An-Zustand haben. Um das zu erreichen, können photoschaltbare organische Farbstoffe bei STORM [Bates et al., 2007] und *d*STORM [Heilemann et al., 2008] oder photoaktivierbare Proteine bei PALM (photoactivated localization microscopy) [Betzig et al., 2006] und FPALM (fluorescence photoactivation localization microscopy) [Hess et al., 2006] verwendet werden. Die An-Zustände treten zufällig über die Zeit verteilt auf und werden nacheinander auf vielen einzelnen Bildern aufgenommen. Die Position der einzelnen Moleküle kann dann durch Fitten einer Punktspreizfunktion (PSF) bestimmt werden [Bobroff, 1986, Thompson et al., 2002]. Deswegen dürfen nicht zuviele Moleküle gleichzeitig an sein. Hierbei spielen Kinetiken des Photoschaltens sowie die Markierungsdichte der Proben eine große Rolle [van de Linde et al., 2010]. Zum Schluss wird die Information (Lokalisationen der Fluorophore) aller Einzel-Bilder in einem rekonstruierten finalen Bild zusammengefasst.

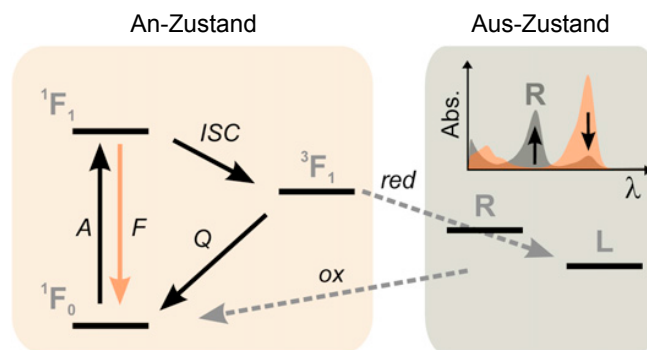


Abbildung 1.1.: *Photoschalten von organischen Farbstoffen unter reduzierenden Bedingungen. Bei der Anregung wechselt der Fluorophor zwischen dem Singulett Grundzustand  $^1F_0$  und dem ersten angeregten Zustand  $^1F_1$  hin und her (A = Absorption, F = Fluoreszenzemission). Durch ISC (Inter System Crossing) kann der Farbstoff in ein Triplett-System übergehen ( $^3F_1$ ). Die Triplets können entweder durch Sauerstoff gequenchet werden (Q) oder durch Reduktionsmittel, wie Thiole, gequenchet werden (red = Reduktion), wobei Fluorophor-Radikale (R) entstehen. Ein Teil der Fluorophore kann ein zweites Elektron akzeptieren und liegt dann in der vollständig reduzierten Leukoform (L) vor. Radikal- und Leukoform können durch Oxidation (ox) in den Singulettzustand zurückkehren. Bei den meisten Rhodamin-Derivaten können die Farbstoffradikale zusätzlich in einem Anregungsbereich um 400 nm absorbieren (oben rechts). Aus [van de Linde et al., 2013] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.*

Bei *d*STORM wird mit organischen, photoschaltbaren Farbstoffen gearbeitet. Durch Anregung mit Licht der richtigen Wellenlänge und Intensität, sowie einer reduzierenden

Umgebung werden die meisten Fluorophore in einen stabilen Aus-Zustand überführt (s. Abb.1.1). Die Anregung führt zunächst dazu, dass Fluorophore Licht absorbieren und zwischen ihrem Grundzustand (Singulett) und erstem Anregungszustand hin und her wechseln. Wenn sie zum Grundzustand zurückkehren, emittieren sie Photonen, wodurch Fluoreszenz beobachtet werden kann. Fluorophore können jedoch auch durch das sogenannte „Inter System Crossing“ in den Triplett-Zustand gelangen.

Dieser wird entweder durch Sauerstoff gequencht, wodurch der Fluorophor wieder in den Grundzustand zurückkehrt oder aber durch Reduktionsmittel, wie z.B. Thiole, in den Radikalzustand überführt. Ein Teil der Radikale kann noch ein weiteres Elektron aufnehmen und liegt dann in der vollständig reduzierten Leukoform vor. Radikal- und Leukoform eines Fluorophors kennzeichnen seinen Aus- oder Dunkelzustand. Beide können durch Oxidation wieder in den Singulettzustand zurückkehren. Fluorophore können solange zwischen An- und Aus-Zustand hin und herwechseln, bis sie photochemisch zerstört werden. Man spricht dann auch vom Photobleichen, da die Moleküle nach irreversiblen kovalenten Änderungen nicht mehr fluoreszieren.

Wichtige photoschaltbare Farbstoffe sind z.B. Cyaninfarbstoffe, wie Cy5 oder Alexa 647, die am besten unter Sauerstoffausschluss funktionieren [Heilemann et al., 2005], oder Rhodaminfarbstoffe wie ATTO 488 und TMR (Tetramethylrhodamin), bei welchen die Zugabe eines Reduktionsmittels wie MEA ( $\beta$ -Mercapto-Ethylamin, Cysteamin) oder sogar die endogene zelluläre Umgebung von lebenden Zellen ausreichend ist [Klein et al., 2011, van de Linde et al., 2011].

Die Schaltraten der Farbstoffe sind abhängig von der Laserleistung und der chemischen Umgebung. Durch Anpassen von pH-Wert, Konzentration des Reduktionsmittels und eventuellen Sauerstoffentzug kann das Schaltverhalten angepasst werden [van de Linde and Sauer, 2014].

Lokalisationsmikroskopie erzielt nicht nur eine hohe Auflösung (lateral besser als 20 nm möglich), sie ist auch deutlich weniger invasiv als beispielsweise Elektronenmikroskopie und dadurch auch für empfindlichere Anwendungen in der Biologie geeignet. Desweiteren kann die gewonnene Einzelmolekül-Information nicht nur zur Rekonstruktion hochaufgelöster Bilder, sondern auch für weiterführende Analysen verwendet werden.

### 1.1.3. Korrelative Mikroskopie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen erlauben eine nahezu molekulare räumliche Auflösung. Korrelative Mikroskopie ermöglicht zum einen die Darstellung der gesamten biologischen Struktur im EM-Bild und zum anderen die spezifische Markierung einzelner Proteine im Kontext dieser Struktur. Mittels goldmarkierter Antikörper kann man zwar auch Immunlokalisationen auf EM-Präparaten durchführen, doch erscheint dem ungeübten Betrachter ein Fluoreszenzbild in der Regel eingängiger als eine EM-Immunlokalisation, bei der elektronendichte Goldpartikel als schwarzen Pünktchen dargestellt werden. Die Fixierung und Probenvorbereitung für EM kann außerdem zu Problemen in Bezug auf die Zugänglichkeit oder die Haltbarkeit der Antikörper führen. Es ist technisch nicht einfach, sowohl die Ultrastruktur, als auch die Antigenreaktivität zu erhalten [Morphew, 2007]. Bei der vorhergehenden Fluoreszenzmikroskopie können Markierung und Messung noch unter mildereren und „nativeren“ Bedingungen ablaufen. Andererseits wurde gezeigt, dass fluoreszierende Proteine, wie GFP, ihre Fluoreszenz nach Behandlung mit Uranylacetat nicht verlieren. Sie können, wie neuerdings auch chemische Tags, sogar nach den elektronenmikroskopischen Aufnahmen detektiert werden [Perkovic et al., 2014]. Insbesondere die Kombination aus hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie steht zur Zeit im Fokus der Biophysik. Kombinationen aus STED & EM, PALM &

EM sowie iPALM (interferometric PALM) & EM wurde bereits publiziert [Sochacki et al., 2014, Watanabe et al., 2011]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden korrelative Bilder aus dSTORM- und Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen von Kernhüllen aus *Xenopus laevis* Oocyten erstellt [Publikation eingereicht].

### 1.1.4. Anforderungen an die Probenvorbereitung

Für Lebendzell-Beobachtungen, oder aber wenn kein Antikörper gegen ein Protein zu Verfügung steht, wird häufig auf Fusionsproteine zurückgegriffen, die aus dem gewünschten Protein und einem gentechnisch angehängten fluoreszierenden Protein bestehen. Dazu gehören z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP) oder das rot fluoreszierende Protein (RFP). Diese in der Biologie häufig benutzten, klassischen Standardmarker müssen für die Lokalisationsmikroskopie durch photoaktivierbare Proteine oder durch Tags, an welche organische Farbstoffe binden können, ersetzt werden. Dazu gehören z.B. die kommerziell erhältlichen SNAP-, CLIP- und Halotags sowie eDHFR (*Escherichia coli* Dihydrofolatreduktase), an welches farbstoffmarkiertes Trimethoprim (TMP) binden kann [Wombacher et al., 2010]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden u.a. Versuche mit SNAPtag durchgeführt und publiziert [Klein et al., 2011]. Bei fixierten Proben kann alternativ auch mit direkt markierten anti-GFP-Antikörpern oder Nanobodies gearbeitet werden [Ries et al., 2012].

Für Hochauflösung ist es bei Immunfluoreszenzen sinnvoll auf F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente statt kompletten IgG-Antikörpern zurückzugreifen, denn die Größe der Markierungsproteine spielt eine nicht zu unterschätzende Rolle. Prinzipiell gilt, je kleiner die Labelmoleküle sind, umso genauer kann eine Struktur aufgelöst werden. Hier bietet insbesondere die Click-Chemie mit farbstoffmarkierten Alkinen oder Aziden interessante Ansätze [Kolb et al., 2001]. Durch die kovalente Bindung zwischen Alkin und Azid, kann hier sehr spezifisch und vor allem sehr sauber markiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf der Basis eines Standard-Clickprotokolls [Salic and Mitchison, 2008] ein strukturschonendes Clickprotokoll entwickelt und unter dem Namen „ClickOx“-Protokoll publiziert [Löschberger et al., 2014b]. Spezifisch bindende Toxine oder Lektine, wie Phalloidin oder Weizenkeimagglutinin (WGA), stellen, wenn sie direkt markiert sind, auch geeignete, kleine Marker dar. WGA wurde in dieser Arbeit zur Darstellung des Zentralkanals von Kernporenkomplexen verwendet [Löschberger et al., 2012].

## 1.2. Der Kernporenkomplex als Modellstruktur für die hochauflösende Mikroskopie

### Biologische Funktion

Mit ~120 MDa gehört der Kernporenkomplex (nuclear pore complex, NPC) zu den größten eukaryotischen Proteinkomplexen. NPCs perforieren die Doppelmembran der Kernhülle, welche das Genom im Zellkern umgibt. Die Hauptfunktion der Kernporen ist der nukleocytoplasmatische Transport. Während kleine Moleküle, wie Ionen, kleinere Metabolite oder globuläre Proteine von 20–40 kDa, ungehindert durch die Poren in den Kern hinein und auch heraus diffundieren können, werden Makromoleküle äußerst selektiv transportiert. Kernproteine enthalten ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) aus basischen Aminosäuren, um nach der Synthese im Cytoplasma an ihren Bestimmungsort im Zellkern transportiert werden zu können. Dieser Import erfolgt über sogenannte Importine. Der Export von Proteinen, tRNAs sowie der Untereinheiten von Ribosomen, die ja im Zellkern in den Nukleolen zusammengefügt werden, erfolgt mit



Hilfe von Shuttleproteinen. Diese enthalten neben einem NLS auch ein Kernexportsignal [Wente and Rout, 2010]. Neben ihrer zentralen Transportfunktion sind NPCs indirekt an vielen weiteren Prozessen wie Transkription, Replikation, DNA-Reparatur, Trennung der Chromosomen, Zelltod und Seneszenz beteiligt [D'Angelo and Hetzer, 2008, Strambio-De-Castilla et al., 2010].

### Aufbau und Struktur

Das Vorhandensein von Kernporen in der Kernhülle wurde bereits vor über 60 Jahren auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt [Callan and Tomlin, 1950]. Wenige Jahre später wurde erstmals die Oktagonalität der Kernporen beschrieben [Gall, 1967]. Kernporenkomplexe sind radförmige, zylindrische Proteinkomplexe mit einem Durchmesser von ca. 125 nm und einer Höhe von ca. 70 nm. Sie enthalten acht radialsymmetrische „Speichen“ und einen Zentralkanal mit 35–50 nm Durchmesser. An die cytoplasmatische Ringstruktur schließen Filamente an, welche lose ins Cytoplasma ragen. Die Ringstruktur auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernhülle ist mit einer korbähnlichen Struktur, dem sogenannten „Basket“, verbunden [D'Angelo and Hetzer, 2008, Scheer et al., 2005]. Mit Hilfe von Kryo-Elektronenmikroskopie wurde die Gesamtstruktur der Kernporenkomplexe bereits mit einer Auflösung von  $\sim 10$  nm dargestellt [Beck et al., 2004; 2007, Maimon et al., 2012].

Die Kernporenkomplexe selbst bestehen aus mehr als 30 verschiedenen Nukleoporinen, welche je Komplex acht mal oder häufig auch in durch acht teilbarer Kopienzahl vorliegen [Cronshaw et al., 2002]. Die meisten dieser Proteine assoziieren in biochemisch stabilen Subkomplexen und dienen vermutlich als Bausteine der NPCs. Zu den strukturellen Motiven der Nukleoporine gehören  $\beta$ -Propeller,  $\alpha$ -Solenoid, FG-Repeats (Wiederholungen der AS Phenylalanin und Glycin), coiled-coiled und transmembrane Domänen.

Bis auf drei Transmembranproteine, welche den Kernporenkomplex in der Kernhülle verankern, sind alle Proteine löslich [D'Angelo and Hetzer, 2008]. Zu den Verankerungsproteinen gehört auch das 1982 erstmals beschriebene gp210 [Gerace et al., 1982], welches im Rahmen dieser Arbeit mittels Immunfluoreszenz markiert und mit *d*STORM hochaufgelöst wurde [Löschberger et al., 2012]. Das integrale Membranprotein gp210 besitzt einen kleinen cytoplasmatischen C-Terminus und lokalisiert ansonsten im perinukleären Bereich der Kernmembran [Greber et al., 1990]. Desweiteren bildet es vermutlich Dimere [Favreau et al., 2001]. Neben gp210 wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Zentralkanal markiert. Hierfür wurde Weizenkeimagglutinin (WGA) verwendet, welches an N-Acetyl-Glucosamine von Nukleoporinen, wie beispielsweise Nup62 im zentralen Kanal, bindet [Davis and Blobel, 1987, Krohne et al., 1978].

### Eignung als Modellstruktur

Mit einem Durchmesser von  $\sim 125$  nm liegen Kernporen unterhalb der Auflösungsgrenze der klassischen Lichtmikroskopie. Außerdem ist ihre Struktur - insbesondere die radialsymmetrische Achtfachsymmetrie - bereits aus der Elektronenmikroskopie bestens bekannt. NPCs weisen somit nicht nur eine ideale Größe auf, ihr symmetrischer Aufbau liefert bereits eine interne strukturelle Kontrolle. Man erkennt also sehr schnell, ob Messungen funktionieren oder nicht.

Die Kernhüllen von *Xenopus laevis* zeichnen sich desweiteren durch eine sehr hohe Pordichte aus [Scheer et al., 2005]. Diese hat nach der Markierung eine hohe Labeldichte mit Fluorophoren zur Folge, was eine weitere Herausforderung an die Lokalisationsmikroskopie stellt. Desweiteren können die Kernhüllen von *Xenopus laevis* Oocyten sehr flach

auf Deckglas präpariert werden, wodurch die *d*STORM-Messung nicht durch zusätzliche störende Signale aus einer anderen Ebene des Präparats beeinflusst werden kann. In dieser Arbeit wurden die Kernporen als Modellstruktur für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie eingeführt. Sie dienen als solche für 2D-*d*STORM, Zweifarben-*d*STORM, 3D-*d*STORM sowie für erste korrelative Bilder aus *d*STORM und Rasterelektronenmikroskopie.

### 1.3. Chromatinorganisation durch D1

#### 1.3.1. Chromatinaufbau

In eukaryotischen Zellkernen ist die DNA stets mit Proteinen assoziiert, welche DNA verpacken. Diesen Komplex aus DNA und Proteinen bezeichnet man als Chromatin. Die Grundeinheit des Chromatins besteht aus DNA und kleinen basischen Histon-Proteinen, welche zusammen die Nukleosomen bilden. Die DNA windet sich hierbei alle 145–147 bp um den Nukleosomenkern, welcher aus einem Oktamer aus den vier Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 besteht [Finch et al., 1977, Luger et al., 1997]. Die regelmäßig angeordneten Nukleosomen werden durch 10-60 bp lange Linker-DNA-Abschnitte getrennt, an welche das Linker-Histon H1 binden kann [Luger et al., 2012]. Diese perlenförmige, 11 nm breite Fibrille ist die erste Verpackungsstufe der DNA [Finch et al., 1977, Sajan and Hawkins, 2012]. Die zweite Stufe ist die sogenannte 30 nm Faser, in der die Nukleosomen helixförmig kondensiert werden und deren Existenz *in vivo* teilweise umstritten ist [Tremethick, 2007]. In der nächsthöheren Kondensationsstufe lagert sich die 30 nm-Faser schleifenförmig entlang eines Nicht-Histon-Proteingerüsts („scaffold“), wodurch das Interphase-Chromosom gebildet wird [Earnshaw and Laemmli, 1983]. In der Metaphase erhält das Chromatin durch SMC-Proteine (structural maintenance of chromosome) seine kompakteste Form [Hirano, 2006]. Das Interphasechromatin kann in weniger dicht gepacktes, transkriptionell aktives Euchromatin und stark kondensiertes, transkriptionell eher inaktives Heterochromatin unterteilt werden. Hauptsächlich Strukturfunktion besitzt das konstitutive Heterochromatin, zu welchem Centromere, Telomere und Satelliten-DNA gehören. Heterochromatin mit codierenden Bereichen, die abhängig von Differenzierungs- oder Entwicklungsphasen aktiv sein können, nennt man fakultatives Heterochromatin. Es ist vor allem in ausdifferenzierten Zellen von Bedeutung [Grewal and Jia, 2007].

Neben den Histonen, gibt es eine Reihe weiterer Proteine, welche an der Chromatinorganisation beteiligt sind. Dazu gehören z.B. die HMG-Proteine, welche im Chromatin die zweithäufigste Proteinklasse neben den Histonen bilden [Bianchi and Agresti, 2005, Bustin, 1999]. Sie werden in Anlehnung an ihre DNA/Chromatin-Bindedomänen in die Familien der HMGA (AT-Hook), HMGB (HMG-Box) und HMGN (Nukleosomale Bindungsdomäne)-Proteine unterteilt. Alle HMG-Proteine binden dynamisch und reversibel an Chromatin [Catez and Hock, 2010]. Ihr Einfluss bei der Chromatinorganisation und Modulation des Chromatins wird an den Prozessen deutlich, an denen sie beteiligt sind. Dazu gehören Transkription, Replikation, Reparatur und epigenetische Modifikationen [Hock et al., 2007].

#### 1.3.2. Die AT-Hook-Proteine der HMGA-Familie

Die hoch konservierten HMGA-Proteine kommen in Zellkernen von Hefen, Pflanzen und Tieren vor. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Chromatinorganisation, da ihre Bindung an das Chromatin Prozesse wie Transkription, Replikation und DNA-Reparatur

fördern oder unterdrücken kann. Sie sind zudem maßgeblich an Differenzierungsprozessen von Zellen beteiligt und können bei Fehlregulation auch Krankheiten auslösen. So weisen maligne Tumore häufig eine Überexpression von HMGA auf [Hock et al., 2007, Reeves, 2010]. Die maximale Expression von HMGA selbst findet in der Embryonalentwicklung statt, während es in adulten Zellen nur auf sehr geringem Level vorkommt [Chiappetta et al., 1996].

Die vier Vertreter der Familie setzen sich aus den drei Spleißvarianten von HMGA1 (HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c) und HMGA2 zusammen. Das charakteristische Merkmal dieser Familie sind die sogenannten AT-Hooks (AT-Haken), mit welchen HMGA-Proteine an AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der B-Form DNA binden. Die drei Hauptvertreter (HMGA1a, HMGA1b, HMGA2) besitzen drei separate AT-Hooks, HMGA1c nur zwei. HMGA1a und HMGA1b unterscheiden sich nur durch eine Aminosäuresequenz von 11 AS, die bei HMGA1a zwischen dem ersten und zweiten AT-Haken liegen und bei HMGA1b fehlen [Johnson et al., 1989]. Außerdem weisen HMGA Proteine eine extrem hohe Anzahl von posttranslationalen Modifikationen auf [Reeves, 2001]. Desweiteren kann HMGA1 nicht nur an DNA binden, sondern auch DNA quervernetzen, was von Benjamin Vogel biochemisch und mittels Elektronenmikroskopie gezeigt wurde und im Rahmen dieser Arbeit ergänzend mit *d*STORM-Bildern sichtbar gemacht wurde [Vogel et al., 2011].

### 1.3.3. Das chromosomale Protein D1 aus *Drosophila*

#### Chromatin in *Drosophila*

Das Genom von *Drosophila* liegt, wie das von anderen Eukaryoten, in Form von Chromatin vor. Dieses wurde vor kurzem in fünf Haupttypen unterteilt. Es wird nicht mehr nur zwischen Eu- und Heterochromatin, sondern zwischen rotem, gelbem (entsprechen früherem Euchromatin), grünem, blauem und schwarzem (entsprechen früherem Heterochromatin) Chromatin unterschieden. Diese fünf Regionen unterscheiden sich nicht durch die reine Zusammensetzung der Proteine, sondern durch unterschiedliche Verhältnisse der Proteine zueinander. Im blauen und grünen Heterochromatin kommen beispielsweise vergleichsweise viele HP1 Proteine vor, im schwarzen Chromatin viel Histon H1 und D1. Das schwarze Chromatin deckt mit 48% den größten Chromatinanteil ab. Es enthält nur wenige Gene und ist sehr inaktiv. Essentielle Gene in diesen Bereichen zeigen sehr schwache Expressionsraten [Filion et al., 2010].

#### D1

Das chromosomale Protein D1 aus *Drosophila* wurde vor 40 Jahren entdeckt [Alfageme et al., 1974]. Mit seinen 10 AT-Haken gehört es zu den DNA bindenden Multi-AT-Hook Proteinen (MATH). Da es außerdem wie HMGA1 an AT-reiche Satelliten-DNA bindet [Levinger, 1985, Levinger and Varshavsky, 1982], wird eine orthologe Funktion zu HMGA1 in Vertebraten vermutet [Aulner et al., 2002]. Drei der zehn AT-Haken werden als „potentielle“ AT-Haken [Aulner et al., 2002] bezeichnet, da sie an Stelle des „*RGRP*“ Motivs die AS-Sequenz *A/V/LGRP* tragen, wobei das Tripeptid *GRP* häufig als zentrales Motiv betrachtet wird [Aravind and Landsman, 1998]. Abb. 1.2 zeigt die Ähnlichkeiten von D1 und HMGA1.

Über die genaue biologische Funktion von D1 ist noch relativ wenig bekannt. Wie HMGA kann es posttranslational modifiziert werden, so liegt es z.B. in der Embryogenese stark phosphoryliert vor und kann desweiteren wie HMGA1 an four-way-junction-DNA binden [Renner et al., 2000]. Studien mit D1-Null-Mutanten zeigten, dass *Drosophila*

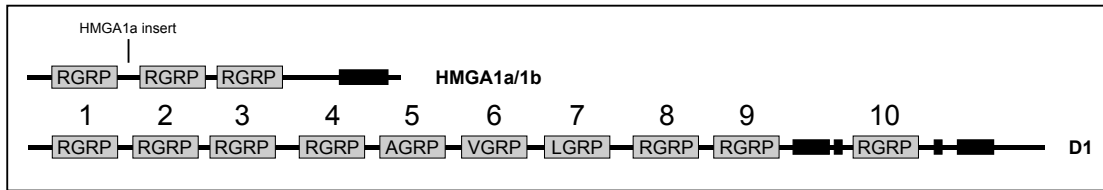


Abbildung 1.2.: Vergleich der Primärstrukturen von D1 mit HMGA1a/b: HMGA1a und HMGA1b sind durch drei AT-Haken (RGRP) und einen kurzen sauren C-Terminus (schwarze Box) gekennzeichnet. Die beiden Spleißvarianten unterscheiden sich durch eine 11 AS lange Sequenz, die nur bei HMGA1a, nicht aber in HMGA1b vorkommt. Die AT-Haken-ähnlichen Sequenzen des chromosomalen Proteins D1 aus *Drosophila melanogaster* sind von 1-10 durchnummeriert. Das RGRP-Motiv ist in sieben AT-Haken vorhanden. Nur die mittleren sogenannten „potentiellen“ AT-Haken 5, 6 und 7 unterscheiden sich in der ersten Aminosäure von diesem Motiv (A/V/L GRP). Bei D1 ist ebenfalls ein saurer C-Terminus vorhanden (schwarze Box). Abbildung in Anlehnung an: [Aulner et al., 2002]

nicht auf das D1-Gen angewiesen ist, um zu überleben. Dieselben Fliegen waren desweiteren über die F1-Generation hinaus fruchtbar [Weiler and Chatterjee, 2009]. Gain-of-function-Experimente zeigten hingegen, dass eine Überexpression von D1 verheerende Folgen haben kann. Bei lokal kontrollierter Expression kommt es in den Speicheldrüsen zu ektopischen Paarungen von polytären Chromosomen. Desweiteren kann die Entwicklung des adulten Auges gestört und die Spermatogenese inhibiert werden. Eine Überexpression von D1 in allen Zellen ist letal [Smith and Weiler, 2010]. Demnach scheint D1 im Zellkern vor allem regulatorische Funktionen zu haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit mikroskopischen Methoden untersucht, ob D1 ähnlich wie HMGA1 die Chromatinorganisation durch DNA-Vernetzung beeinflussen kann. Mittels *d*STORM lassen sich nicht nur hochaufgelöste Bilder erzeugen, man kann die Einzelmolekülinformation auch nutzen, um unterschiedliche Dichteverteilungen von Proteinen oder DNA zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde DNA hochaufgelöst und der Einfluss von DNA-bindenden Proteinen auf die Chromatinorganisation am Beispiel des Multi-AT-Hook-Proteins D1 gezeigt. Dafür wurde unter anderem eine Funktionsmutante in Anlehnung an R3×G von HMGA1a [Harrer et al., 2004] entwickelt, bei welcher alle AT-Haken mittels gezielter Punktmutation funktionsunfähig gemacht wurden. Desweiteren wurde D1 in kleine, HMGA1-ähnliche Fragmente unterteilt, um die Affinitäten von AT-Haken-Dreiergruppen zum Chromatin mit FRAP-Experimenten zu analysieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Mikrobiologische Methoden

#### 2.1.1. Flüssige Bakterienkulturen

*benötigte Lösungen:*

- LB-Medium, pH 7.4, autoklaviert:
  - 10 g Trypton
  - 10 g Hefe Extrakt
  - 5 g NaCl
  - ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter
- passendes Antibiotikum

Für eine Übernachtkultur wurden 7–10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (Tabelle 2.1) versetzt. Die gewünschte Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Spitze von einer Platte oder aus einem Glycerinstock gepickt und das Medium damit angeimpft. Für größere Volumina wurde zunächst eine Übernachtkultur angesetzt, welche in das gewünschte Volumen LB-Medium gegeben wurde. Es wurde bei 37 °C weiter geschüttelt bis die Bakterien dicht genug gewachsen waren und anderweitig verwendet werden konnten.

Tabelle 2.1.: *Konzentration der Arbeitslösungen ( $c_A$ ), sowie Konzentration ( $c_{St}$ ), Lösemittel und Aufbewahrung von Stammlösungen der eingesetzten Antibiotika*

Antibiotikum	$c_A$ ( $\frac{\mu g}{ml}$ )	$c_{St}$ ( $\frac{mg}{ml}$ )	Lösemittel	Lagerung
Ampicillin	100	100	H <sub>2</sub> O	4 °C
Kanamycin	50	50	H <sub>2</sub> O	4 °C
Chloramphenicol	34	34	100% Ethanol	−20 °C
Tetracyclin	12.5	12.5	100% Ethanol	−20 °C

In Lösung ist Ampicillin bei 4 °C nur 2 Wochen haltbar, weshalb es aliquotiert bei −20 °C gelagert wurde. Eine Kanamycin-Stammlösung kann 1 Jahr lang bei 4 °C aufbewahrt werden.

#### 2.1.2. Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur

Die Bakteriendichte wurde mittels eines Photometers bestimmt. Dabei wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (OD<sub>600</sub>). Unangeimpftes LB-Medium diente als Nullwert. Eine optische Dichte von 1 entspricht bei 1 cm Schichtdicke einer Bakteriendichte von  $8 \cdot 10^8$  Zellen.

### 2.1.3. Plattenkulturen

*benötigtes Material:*

- sterile Petrischalen ( $\varnothing$  100 mm)
- LB-Agar (LB-Medium, 1.5% Agar)

Autoklavierter, bei Raumtemperatur gelagerte LB-Agar wurde im Wasserbad und in der Mikrowelle erhitzt, um wieder flüssig zu werden (Rührfisch gleich dazugeben, sonst später evtl. Siedeverzug!). Der flüssige Agar wurde unter Rühren auf ca. 50–60 °C herabgekühlt und dann mit dem gewünschten Antibiotikum versetzt. 250 ml Agar reichten zum Gießen von 14–16 Platten. Sobald der Agar fest war, wurden sie mit dem Deckel nach unten bei 4 °C gelagert.

### 2.1.4. Herstellung von Glycerinkulturen

Um Bakterienkulturen langfristig lagern zu können, wurden Glycerinstocks hergestellt. Dazu wurden 650  $\mu$ l einer Übernachtskultur in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 650  $\mu$ l Glycerin versetzt. Die Bakterien-Glycerin-Mischung wurde gut gevortext und sofort bei –80°C eingefroren. Für neue Übernachtskulturen wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas von der gefrorenen Kultur abgestrichen und ein 50 ml Röhrchen mit 7–10 ml Medium angeimpft.

### 2.1.5. Herstellung von kompetenten Zellen

Kompetente Bakterien sind ein wichtiges Werkzeug für Klonierungen, da sie durch Transformation rekombinante Plasmide aufnehmen und somit später vermehren können. XL1 Blue-Zellen wurden mittels der TSS-Methode chemisch kompetent gemacht [Chung et al., 1989].

*benötigte Lösungen:*

- LB-Medium
- Tetrazyklin, bzw. Chloramphenicol
- TSS (Transformation and Storage Solution):
  - LB-Medium auf Basis von gekauftem ddH<sub>2</sub>O
  - 10 % ( $\frac{w}{v}$ ) PEG 3350 (4000 oder 4500, optimal)
  - 5 % ( $\frac{v}{v}$ ) DMSO
  - 62.5 mM MgSO<sub>4</sub>
  - pH 6.5, autoklavieren, lagern bei –20 °C

Zuerst wurde von einem Glycerinstock ausgehend eine 7 ml Übernachtskultur mit den entsprechenden Zellen angesetzt. Rosetta Zellen wurden mit 34  $\mu$ g/ml Chloramphenicol, XL1 Blue mit 12.5  $\mu$ g/ml Tetracyclin aufgezogen. In einem 500 ml Expressionskolben wurden 200 ml LB-Medium mit 5 ml der Übernachtskultur und ohne weiteres Tetracyclin angeimpft. Es wurde bei 37 °C geschüttelt bis eine OD<sub>600</sub> von 0.3–0.4 erreicht war. Die Kultur wurde auf vier 50 ml Röhrchen verteilt und 30 min bei 4 °C stehen gelassen.

Anschließend wurden die Bakterien bei 800 *g* und 4 °C 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment wurde in  $\frac{1}{30}$  bis  $\frac{1}{40}$  des Ausgangsvolumen mit TSS resuspendiert (z.B. 1.5 ml pro Pellet). Die Suspension wurde in Form von 100 µl Aliquots auf 1.5 ml Eppendorfgefäße verteilt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Die TSS Inkubationszeit muss möglichst kurz gehalten werden! Hier arbeitet man am besten zu zweit: Einer pipettiert, einer überführt die Aliquots sofort in flüssigen Stickstoff. Die besten Transformationseffizienzen erhält man, wenn das TSS-Medium frisch ist und insgesamt so kalt wie möglich (Spitzen, etc. vorkühlen) und nach dem Resuspendieren so schnell wie möglich gearbeitet wird!

### 2.1.6. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Ein bei -70 °C gelagertes Aliquot kompetenter Zellen (Rosetta oder XL1 Blue) wurde für 10 min auf Eis gestellt. Dann wurde die entsprechende Menge Plasmid-DNA hinzugegeben und vorsichtig verrührt (nicht auf und ab pipettieren!). Bei Rosetta-Zellen wurden 200 ng, bei XL1 Blue-Zellen 10 ng DNA benötigt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 500 µl vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese je nach aufzubauender Antibiotikaresistenz 30 min (Ampicillin) bzw. 60 min (Kanamycin, Chloramphenicol) bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz 2 min bei 700 *g* zentrifugiert, 500 µl vom Überstand abgenommen und der Rest (ca. 100 µl ) mit einem sterilen, abgeflammtten Drygalskispatel ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. RNA-Extraktion aus Zellen mit TriFast™

*benötigtes Material:*

- ein 35 mm Schälchen Zellen (ca. 80% konfluent)
- TriFast™
- Chloroform
- Isopropanol
- 70% Ethanol
- nukleasefreies Wasser
- RNAsin

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem Kit peqGOLD TriFast™ von peqLab. Es eignet sich für die gleichzeitige Extraktion von DNA, Proteinen und RNA. Da TriFast Phenol enthält musste unter dem Abzug gearbeitet werden. Von den Zellen wurde das Medium abgegossen und zum Homogenisieren sofort 1 ml TriFast darauf pipettiert, in welchem die Zellen lysiert und aufgenommen wurden. Der Ansatz wurde in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurden 200 µl Chloroform dazugegeben, 30 s lang kräftig geschüttelt und alles für 10 min stehen gelassen. Es folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 12000 *g* und Raumtemperatur, um eine Phasentrennung zu erreichen. Von den drei Phasen enthält die untere, organische Phase vor allem Proteine und DNA, die Interphase DNA und die obere wässrige Phase RNA. Diese wurde abgenommen, mit 600 µl Isopropanol versetzt und 15 min auf Eis gefällt, um die RNA zu präzipitieren. Daraufhin wurde bei 4 °C und 12000 *g* 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde kurz getrocknet und in 30 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, dann wurden 1.5 µl RNAsin (RNase-Inhibitor) zur übrigen RNA dazugegeben. Diese konnte nun als Template für eine RT-PCR verwendet oder weggefroren werden.

### 2.2.2. Herstellung von cDNA mit RT-PCR

Mittels einer RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) kann RNA in cDNA (complementary DNA) übersetzt werden. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, welches als Template für die DNA-Synthese einzelsträngige RNA-Stränge verwendet. Die codierenden Sequenzen der cDNA bestehen, da das Ausgangsmaterial mRNA ist, aus einer intronfreien Abfolge von Exons. Die gewonnene cDNA dient als wichtiges Template für weitere Polymerasekettenreaktionen (PCRs).

*benötigtes Material:*

- 1 µg mRNA
- 1 µl Random Hexamer Primer
- 1 µl (40 u) RNAsin (Fermentas Life Sciences)



- 5× RT-Reaktionspuffer
- 1 µl (200 u) Reverse Transkriptase (Fermentas Life Sciences)
- 1 µl 10mM dNTPs
- ddH<sub>2</sub>O (auf 20 µl auffüllen)

1 µg RNA wurde zusammen mit den Primern und der insgesamt benötigten Menge ddH<sub>2</sub>O für 5 min bei 65°C denaturiert, um eventuelle Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Anschließend wurden dem Ansatz ATP, RNAsin, dNTPs, Puffer und reverse Transkriptase beigefügt. Es folgte eine 1-2 stündige Inkubation bei 50 °C. Bei Bedarf können auch Oligo(dT) Primer oder sequenzspezifische Primer verwendet werden. Die cDNA wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### 2.2.3. PCR - Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Fragmente *in vitro* spezifisch amplifizieren. Die PCR-Reaktion besteht aus drei Schritten. Bei der Denaturierung lösen sich auf Grund der hohen Temperatur die Wasserstoffbrücken, die den DNA-Doppelstrang zusammenhalten. Die DNA liegt nun einzelsträngig vor und kann im nächsten Schritt, dem Annealing von Primern gebunden werden, wodurch kleine doppelsträngige Bereiche entstehen. An diesen setzen DNA-Polymerasen an, die im Elongationsschritt in 5'→3' Richtung das Template entlang wandern und dabei neue DNA synthetisieren, wodurch sie den Einzelstrang verdoppeln.

#### Primerdesign

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI erstellt. Optimale Primer besitzen einen GC-Anteil von 50–60% und eine Schmelztemperatur  $T_m > 54$  °C, um Annealingtemperaturen zu erreichen, welche möglichst spezifische Amplifikationsprodukte garantieren. Des Weiteren führt ein G oder C am 3' Ende zu einer besseren Bindung und Elongation. Die Primersequenzen sollten möglichst spezifisch für das gewünschte Produkt sein und keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadelstrukturen (hair pins) ausbilden. Das Primerpaar sollte auch nicht miteinander hybridisieren können, da sonst die Bindung an die Template DNA reduziert werden kann. Schmelztemperatur, GC-Gehalt und palindromische Primerbereiche kann man sich in Vector NTI unter „Oligo Analysis → Thermodynamic Properties“ anzeigen lassen.

#### Annealing und Elongation

Die Annealing-Temperatur wurde in der Regel 1–2 °C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Primer gewählt, um möglichst spezifische PCR-Produkte zu erhalten. Sollten Restriktions-Schnittstellen angehängt oder Mutationen eingefügt werden, wurden bei Bedarf auch zweistufige PCRs durchgeführt. Hier werden die ersten fünf Zyklen bei einer deutlich niedrigeren Annealingtemperatur gefahren, welche in Abhängigkeit der Schmelztemperatur des Primeranteils ermittelt werden muss, der von Anfang an zum Template komplementär vorliegt. Die Annealingtemperatur der restlichen Zyklen richtet sich nach der Schmelztemperatur des gesamten Primers. Die Elongationszeit hängt von der Prozessivität der verwendeten Polymerase ab und wurde demnach im Bezug auf die Insertlänge bestimmt.

Tabelle 2.2.: PCR mit Phusion Polymerase

Zyklus	Anzahl	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	98 °C	30 s
2	25–30×	Denaturierung	98 °C	30 s
		Annealing	primerabhängig	20 s
		Elongation	72 °C	3000 $\frac{nt}{min}$
3	1×	terminale Kühlung	8 °C	

### PCR-Ansatz

PCR-Ansätze wurden wie in Tabelle 2.3 aufgeföhrt auf Eis zusammenpipettiert. Grundsätzlich wurde als erstes ddH<sub>2</sub>O vorgelegt und die Polymerase als letztes hinzugefügt, wenn das Programm für den Thermocycler bereits startbereit war. Bei hohem GC-Gehalt oder um die Schmelztemperatur der Primer zu senken wurde je nach PCR DMSO in den Ansatz dazugegeben.

Tabelle 2.3.: Pipettierschema für PCR-Reaktionen

	Phusion	Taq
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl	
10 mM dNTPs	1.0 µl	1.0 µl
10 pM fwd Primer	2.0 µl	1.0 µl
10 pM rev Primer	2.0 µl	1.0 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	-	3.0 µl
Puffer	10 µl (5×)	5 µl (10×)
DMSO	optional 1.5 µl	1.0 µl
template	2 µl cDNA oder 10 ng Vector	
Polymerase	0.5 µl	0.8 µl

Wurden PCRs mit proof-reading Polymerasen wie der Phusion durchgeführt, mussten die Ansätze nach der PCR-Reaktion auf Eis gestellt werden, da diese Polymerasen bei Raumtemperatur nicht nur überschüssige Primer abbauen, sondern auch PCR-Produkte angreifen können.

#### 2.2.4. Kolonie-PCR

Mit Hilfe der sogenannten Kolonie-PCR kann man überprüfen, ob Bakterienklone ein bestimmtes Insert in ihrem Plasmid enthalten, und ob dieses in der richtigen Orientierung vorliegt. Zweiteres ist vor allem bei ungerichteten Klonierungen mit nur einem Restriktionsenzym wichtig. Um die Orientierung zu überprüfen, muss einer der beiden Primer im Vektor, der andere im Insert liegen. Somit erhält man nur bei den Kolonien ein PCR-Produkt, die das Insert richtig herum eingebaut haben. Kolonie-PCRs wurden immer mit der Taq-Polymerase durchgeführt.

Zuerst wurde überprüft ob nach der Transformation Klone auf der Platte gewachsen waren. Dann wurde eine Masterplatte vorbereitet, indem auf eine frische Agarplatte ein

Tabelle 2.4.: PCR mit Taq Polymerase

Zyklus	Anzahl	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	1×	Denaturierung	95 °C	3 min
2	30×	Denaturierung	95 °C	30 s
		Annealing	primerabhängig	20 s
		Elongation	72 °C	1000 $\frac{nt}{min}$
3	1×	terminale Kühlung	8 °C	

quadratisches Gittermuster mit nummerierten Feldern aufgeklebt wurde. Die Platte wurde kurz bei 37°C vorinkubiert. Es wurde ein Mastermix angesetzt und auf die PCR-Caps verteilt. Dann wurden mit einer weißen Pipettenspitze einzelne Klone gepickt, die Spitze kurz auf ein Quadrat auf der Masterplatte gedrückt und der Rest anschließend im entsprechenden PCR-Cap (auf Eis) auf und ab pipettiert. Soweit möglich wurde immer eine Positivkontrolle mit angesetzt, um später evt. Pipettierfehler auszuschließen. Nach der PCR-Reaktion (s. Tabelle 2.4) wurde jeder Ansatz mit 10 µl 6× UF-Puffer versetzt und anschließend 13 µl je Probe auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Spuren, in welchen deutliche Banden zu sehen waren, zeigten welche Klone positiv waren, bzw. ob das Insert in der richtigen Orientierung im Plasmid vorlag. Von diesen Klonen wurden dann, ausgehend von der Masterplatte Übernachtskulturen angesetzt.

### 2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Die negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Je nach Agaroseanteil im Gel sind die Poren, durch welche die DNA wandern kann größer oder kleiner. Möchte man große Fragmente mit hoher Schärfe auftrennen, muss folglich eine geringere Konzentration Agarose eingesetzt werden, als bei kleinen Fragmenten. Den Gelen wird außerdem Ethidiumbromid beigefügt, welches in Nukleinsäuren interkaliert und bei UV-Anregung fluoresziert. Somit können DNA-Banden später auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht werden.

*benötigte Lösungen:*

- 1× SB-Puffer
- Agarose (peqGOLD Universal Agarose)
- Ethidiumbromid (Stammlösung: 10  $\frac{mg}{ml}$ )
- 6× DNA-Laufpuffer Ultra Fast
- Marker (z.B. Middle Range Marker)

Es wurden meist 1%ige Gele gegossen, d.h. für 50 ml Gel wurden 0.5 g Agarose in 50 ml SB-Puffer aufgeköcht und 0.6 µl Ethidiumbromidlösung je Gel beigefügt. Wenn das Gel auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurde es in die vorbereiteten Gelschritten gegossen, die mit Tesafilm abgedichtet und mit 1–2 Kämmen versehen worden waren. Sobald das Gel fest

### 20× SB-Puffer (1000 ml:)

- pH 8.0–8.5
- 8 g NaOH-Plätzchen
- 50 g Borsäure
- ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml

### 6× DNA-Laufpuffer Ultra Fast (10 ml:)

- 6 ml Glycerol
- 2 ml EDTA (0.2 M)
- 500 µl H<sub>2</sub>O
- 500 µl Orange G (4%)

war wurde der Tesafilm vom Gelschlitten entfernt und dieser in eine Gelkammer gestellt. Das Gel wurde mit SB-Puffer überschichtet und der Kamm vorsichtig herausgezogen. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 6× DNA Laufpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Bandengrößen zuordnen zu können wurden in einer Spur 3 µl Middle-Range Marker aufgetragen. Da das positiv geladene Ethidiumbromid im Gegensatz zur DNA zur Kathode läuft, wurde das Gel immer nur bis zur Hälfte laufen gelassen. Die angelegte Spannung wurde meistens bei 250 V gewählt. Wenn das Gel langsamer laufen sollte, wurde die Spannung erniedrigt. Das fertige Gel wurde auf einem UV-Tisch mit installierter Kamera fotografiert und bei Bedarf Banden ausgeschnitten.

### 2.2.6. Plasmid-DNA-Gewinnung durch Miniprep

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus Übernachtskulturen gemäß der Anleitung des Kits „NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)“, welches dem Prinzip der alkalischen Lyse folgt. Nach einer Neutralisierung des Lysats werden genomische DNA, präzipitierte Proteine und Zellbestandteile pelletiert. Danach wird die Plasmid-DNA an eine Silica-Membran gebunden und mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen. Die DNA wurde in 60 µl nukleasefreiem H<sub>2</sub>O eluiert, was sich im Vergleich zum mitgelieferten Elutionspuffer positiv auf weitere Schritte (z.B. Transfektion, Restriktionsverdau) auswirkte.

### 2.2.7. Sequenzierung

Für Sequenzierungen wurden Plasmid-DNA und Primer zu GATC geschickt.

### 2.2.8. Restriktionsverdau

Um Inserts wieder aus einem Vektor zu isolieren, wurde ein Restriktionsverdau angesetzt. Durch Hydrolyse der DNA mit Restriktionsendonukleasen wird das Insert aus dem Vektor herausgeschnitten. Die Restriktionsenzyme schneiden DNA an spezifischen, definierten Sequenzen. Dabei können glatte (blunt ends) oder überhängende (sticky ends) Enden entstehen.

*benötigtes Material:*

- sauberes Konstrukt
- 10× FastDigest Puffer
- ca. 1 µl Restriktionsenzym (abhängig von  $\frac{u}{\mu l}$ )

Zunächst wurde berechnet, wieviel Insert man nach dem Verdau haben möchte und die entsprechende Menge des Konstrukts vorgelegt. Dann wurde der 10× FD-Puffer abhängig vom Endvolumen und zuletzt 0.5–1.0 µl Restriktionsenzym hinzugefügt. Der Verdau wurde im Agarosegel analysiert, das Insert ausgeschnitten und Gel extrahiert. Bei der Gelextraktion tritt ein Verlust von ca. 30% auf, der bei der Berechnung der Insertmenge für die Ligation einkalkuliert werden muss.

### 2.2.9. Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Aus im Agarosegel aufgetrennten PCR- oder Restriktionsansätzen wurden die gewünschten Banden zügig auf dem UV-Schirm ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Gemäß der Anleitung des QIAEX II Gel Extraction Kit von Qiagen wurde die DNA aus dem Gel aufgereinigt. Eluiert wurde in 30 µl nukleasefreiem H<sub>2</sub>O.

### 2.2.10. Ligation

Um PCR-Produkte oder restriktionsverdaute Fragmente in Vektoren einzufügen, wurde eine Ligation durchgeführt. Unter ATP-Verbrauch verbindet eine T4-Ligase zwei DNA-Stränge kovalent mit einer Phosphodiesterbindung, bei der das 3'Hydroxy-Ende eines Nukleotids mit dem 5'Phosphatende eines anderen Nukleotids verknüpft wird.

*benötigtes Material:*

- 100 ng geschnittener Vektor, bzw. 0.5 µl pJet ( $50 \frac{ng}{\mu l}$ )
- geschnittenes Insert (3–10× mehr als Vector), bzw. eluiertes PCR-Produkt
- 10 mM ATP
- pEG 4000
- 10× T4 Ligase-Puffer
- T4 Ligase
- nukleasefreies H<sub>2</sub>O

#### Blunt-Ligation in pJet

Der linearisierte Vektor pJet1.2/blunt diente als Klonierungsvektor. In ihn wurden alle PCR-Produkte mit glatten Enden kloniert. Bei erfolgreichem Einbau des Inserts wird ein sogenanntes „Todesgen“ im Vektor unterbrochen, dessen Expression (z.B. bei Selbstligation des Vektors) zum Absterben der Bakterien führt. In der Regel erhält man somit nach einer Transformation ausschließlich Klone mit Inserts und muss nur noch deren Orientierung überprüfen.

Für einen 10 µl -Ligationsansatz wurden 1-6 µl PCR-Produkt mit ddH<sub>2</sub>O und 10x T4-Ligase-Puffer versetzt. Es wurden 1 µl 10 mM ATP und je 0.5 µl pEG 4000, pJet1.2/blunt und T-4 Ligase dazugegeben. Die Ligase wurde immer zum Schluss dazu pipettiert. Die Ligation fand 1–2h bei Raumtemperatur, bzw. bei 22 °C im Thermocycler statt. Danach konnte der Ansatz transformiert werden.

### **Ligation in selbst geschnittenen Vektoren**

Leere Vektoren, wie z.B. pSNAPTtagm, pEGFP oder pet28a wurden wie unter 2.2.8 beschrieben verdaut. Wurde nur ein Restriktions-Enzym benutzt, so wurde beim Verdau auch SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase) dazugegeben, um den Vektor zu dephosphorylieren und somit eine spätere Selbstligation zu verhindern. Für die Ligation wurden je 100 ng Vektor und stöchiometrisch(!) 3–10× mal mehr Insert eingesetzt. Deshalb wurde bereits bei der eingesetzten Plasmidmenge für den Restriktionsverdau darauf geachtet, genügend Insert zu erhalten. Desweiteren wurde ein Verlust von 30% bei der Gelextraktion mit eingerechnet. Die Ligation erfolgte für 1–2 h bei Raumtemperatur, bzw. 22 °C.

## 2.3. Zellkultur

Die Zellkultur-Arbeiten, insbesondere das Kultivieren und Passagieren von Zellen wurde zum größten Teil von Petra Gessner und Lisa Pließ durchgeführt, welche die Hauptkulturen regelmäßig umsetzten. *Xenopus laevis* A6-Zellen wurde von der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Biozentrum der Universität Würzburg bezogen.

### 2.3.1. Transfektion

#### Transfektion mit FuGene® HD

Für die Transfektionen von U2Os-Zellen und C2C12-Zellen wurde FuGene® HD von Promega verwendet.

*benötigte Lösungen:*

- farbloses DMEM (1  $\frac{g}{l}$  Glucose) ohne alles
- entsprechendes Kulturmedium
- FuGene® HD

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion angesetzt. Je Schälchen oder LabTekII wurde ein Transfektionsansatz benötigt. Dazu wurde die gewünschte Menge DNA in ein Eppendorf-Gefäße vorgelegt, mit 100  $\mu$ l farblosem DMEM (1  $\frac{g}{l}$  Glucose) vermischt und entsprechend des gewünschten Verhältnisses mit FuGene® HD versetzt. Nach sorgfältigem Mischen wurde diese Lösung 7 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Dann wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben und diese über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> weiter inkubiert.

#### Transfektion mit Effectene™

Die Transfektion von Hela-Zellen erfolgte zum Teil mit Hilfe von Effectene™ von Qiagen.

*benötigte Lösungen:*

- PBS (pH 7.4)
- Kulturmedium
- Transfektionskit von Qiagen: Effectene™, Enhancer, Puffer EC

Die zu transfizierenden Zellen wurden je Transfektionsansatz in 35 mm Schalen auf Deckgläsern angesetzt. Vor der Transfektion wurde überprüft, ob die Zellen richtig angewachsen waren. Für einen Transfektionsansatz wurden 400 ng DNA benötigt. Diese wurde mit 100  $\mu$ l Puffer EC vermischt und mit 3.2  $\mu$ l Enhancer versetzt. Es folgte eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 10  $\mu$ l Effectene™ dazugegeben und vermischt. In der darauf folgenden siebenminütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und dann mit 1600  $\mu$ l Kulturmedium versehen. Dann wurde der Transfektionsansatz mit 600  $\mu$ l Medium vermischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Diese wurden über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> weiterinkubiert.

## 2.4. Markierungsmethoden

### 2.4.1. Markierung von lebenden Zellen mit SNAPtag oder Halotag

Hep2, Cos7 und 3T3 Zellen wurden in farblosem Medium in LabTek II kultiviert, welche zuvor für 30–60 min mit 2 M Glycin beschichtet worden waren. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert. 24 h später wurden sie 20 min mit 0.2  $\mu$ M– 2  $\mu$ M SNAP-Cell TMR-Star oder SNAP-Cell 505 (NEB) gefärbt, dreimal 5 min mit Medium gewaschen und 30 min inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Vor den dSTORM-Messungen wurde das Medium nochmal gewechselt. Bei der Halotag Färbung mit HaloTag® TMR Ligand (Promega) wurde genauso vorgegangen.

### 2.4.2. Immunfluoreszenzen

verwendete Lösungen:

- 1  $\times$  PBS
- 4% Formaldehyd in PBS
- 0.05% Triton X-100 in PBS
- 5% BSA in PBS
- 1. und 2. AK in entsprechender Verdünnung (in PBS)

#### Standardprotokoll mit Formaldehydfixierung:

Die Zellen für die Immunfluoreszenz wurden in LabTek II, 8 well Sarstedt Kammern oder auf Deckgläsern gezogen. Vor der Durchführung wurde mikroskopisch überprüft, ob die Zellen richtig angewachsen waren. Die Zellen wurden kurz mit PBS gespült, dann wurde zum Fixieren für 10–15 min 4% Formaldehyd auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 5 min in PBS gewaschen. Es folgte eine 10 minütige Inkubation mit 0.05% Triton, um die Zellen zu permeabilisieren, woraufhin die Zellen nochmals 2  $\times$  2 min in PBS gewaschen wurden. Nach einer 45 minütigen Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen 2  $\times$  5 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 30 min. Die Zellen wurden nochmals 3  $\times$  5 min in PBS gewaschen, 5–10 min in 4% FA nachfixiert, kurz in PBS gewaschen und in PBS mit 10 mM Natriumazid gelagert.

#### Methanolschritt-Erweiterung

Bei manchen Antikörpern war es notwendig für ein sauberes Fluoreszenzergebnis einen zusätzlichen Methanolschritt durchzuführen. Die Zellen wurden nach der Triton Behandlung 5 min in PBS gewaschen und anschließend 3–10 min lang in –20 °C kaltes Methanol (Gefrierschrank) gestellt. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen nochmals 5 min in PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Standardprotokoll.

### 2.4.3. Markierung von Kernhüllen aus *Xenopus laevis* Oocyten

Die Kernhüllen der *Xenopus laevis* Oocyten wurden von Frau Marie-Christine Dabauvalle und Herrn Georg Krohne nach dem Protokoll von Gurdon in LabTek II oder auf Deckglas



präpariert [Gurdon, 1976]. Die Frösche stammten aus dem Tierstall des Lehrstuhls für Zell- und Entwicklungsbiologie am Biozentrum Würzburg. Die Kernhüllen wurden in 2% PFA übernommen, vorsichtig mit PBS gewaschen und 20 min mit 5% BSA in PBS abgesättigt. Es wurde nicht permeabilisiert. Für die Markierung des äußeren Ringes der Kernporenkomplexe wurde der Asc222a2 Antikörper gegen gp210 [Gajewski et al., 1996], sowie farbstoffmarkierter Sekundärantikörper benutzt. Der innere Ring wurde für 10 min mit farbstoffgekoppeltem Weizenkeimlektin WGA (wheat germ agglutinin) markiert. Die Proben wurden 5–10 min in 2% PFA/PBS oder 2% FA/PBS nachfixiert und bis zur Messung in PBS mit 10 mM Natriumazid gelagert.

#### 2.4.4. EdU-Markierung von DNA

EdU steht für 5-ethynyl-2'-deoxyuridine und wird an Stelle von Thymin während der S-Phase in die DNA eingebaut. Mit Hilfe des Click-iT™ EdU Alexa Fluor® Azid Reagenz kann das Thyminanalogon detektiert werden. Alexa Fluor® wird dabei kovalent an EdU gebunden (siehe Abb. 2.1). Replizierte DNA ist somit fluoreszenzmarkiert.

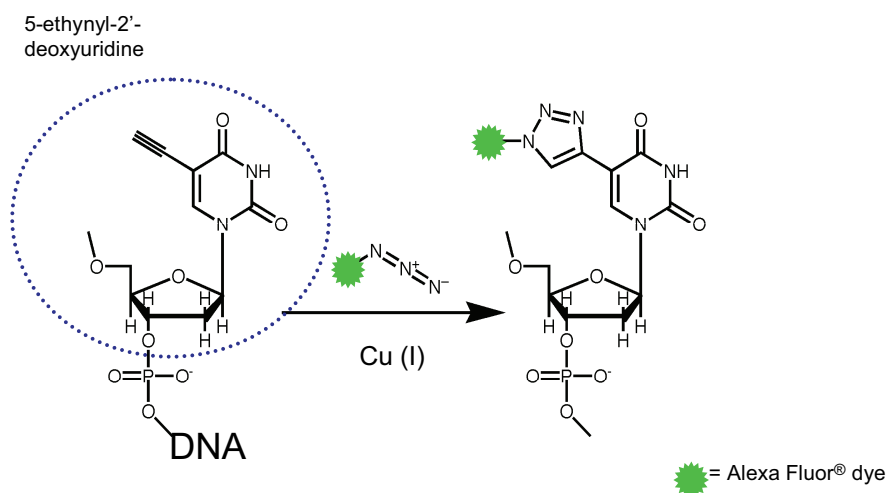


Abbildung 2.1.: Bei der Click-iT™-Reaktion wird die Reaktion zwischen dem terminalen EdU-Alkin und dem Alexa-Azid durch Cu(I) katalysiert. Es handelt sich um eine azidische Alkin-Cycloaddition. Bildquelle: Life Technologies

#### Click-Reaktion nach Invitrogen

Zellen wurden auf Deckgläschen oder in LabTek II gezogen und nach 24 h mit EdU (1:1000, nach Invitrogen) versetzt. Nach einer Inkubation von max. 24 h wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert (siehe 2.4.2) und gemäß des Protokolls von Invitrogen behandelt. Cu(II)SO<sub>4</sub> und das farbstoffmarkierte Azid wurden zuletzt in den Ansatz gegeben. Das Gemisch wurde sofort auf die Zellen gegeben und diese unter Lichtausschluss (wichtig!) für 10–15 min inkubiert.

### ClickOx Reaktion

Das von Salic et al. [Salic and Mitchison, 2008] beschriebene Clickprotokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit verbessert, um Strukturen wie Aktin oder fluoreszierende Proteine wie GFP zu schonen. Ähnlich wie beim sauerstoffziehenden Schaltpuffer (siehe 2.5.1) werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  entfernt, welche GFP schädigen und Aktin destabilisieren [Alnuami et al., 2008, Lassing et al., 2007] .

Die unten aufgeführten Komponenten wurden zusammenpipettiert (Wasser vorlegen). Zuletzt wurde Ascorbinsäure hinzugegeben, da diese die Reduktion von Cu(II) zu Cu(I) startet. Es wurde zügig gearbeitet und die Zellen unter Lichtausschluss für 10 min mit dem Clickcocktail inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min in einer 5 mM EDTA/PBS Lösung inkubiert, um überschüssiges Kupfer zu entfernen.

#### *Click-Ansatz:*

- 100 mM Tris/HCl (pH 8.5)
- 1 mM  $\text{CuSO}_4$
- 100 mM Ascorbinsäure (aus Natriumascorbat)
- 2  $\mu\text{M}$  Atto 488 Azide, bzw. Alexa Fluor® Azide
- 1 % Glucose (w/v)
- GlucOx Enzymmix (2 u Glucoseoxidase, 40 u Katalase)

## 2.5. Mikroskopie

### 2.5.1. *d*STORM

#### Setup

Der Aufbau eines *d*STORM-Setups wurde ausführlich von Sebastian van de Linde beschrieben [van de Linde et al., 2011]. Zusammengefasst entspricht er folgendem Weitfeld-Aufbau: Auf einem schwingungsgedämpften Tisch befindet sich ein inverses Mikroskop IX-71 von Olympus. Für normale Durchlichtmikroskopie werden eine 100 W Halogenlampe und für die Fluoreszenzanregung verschiedene Laser benutzt (siehe A.8.1). Über diverse LaserMUX-Filter (Semrock), Linsen und Spiegel (Thorlabs) wird das Licht der einzelnen Laser in einen gemeinsamen Strahlengang geführt. Der Strahl wird mit einer auswechselbaren Linse aufgeweitet, um unterschiedliche Ausleuchtungen zu erreichen. Eine zweite Linse fokussiert die Laserstrahlen auf der hinteren Fokalebene (back focal plane, BFP) des Objektivs (Olympus, 60 × PlanApo, NA 1.45 / NA 1.49). Das Objektiv kann über eine Nosepiece Stage IX2-NPS (Olympus) mit dem Probenhalter gekoppelt und vom Probentisch entkoppelt werden. Dadurch lässt sich die Drift in alle Richtungen minimieren.

Ein dichroitischer Strahlteiler vor dem Objektiv reflektiert Licht der Anregungswellenlänge und erlaubt die Transmission des emittierten Lichts. Die Ausleuchtungslinsen und die fokussierende Linse sind zusammen mit einem Spiegel auf einer Schiene gelagert, um verschiedene Beleuchtungen zu ermöglichen (Epi, HILO, TIRF).

Die im Mikroskop verbaute Tubuslinse erzeugt ein reelles Bild. Dieses wird über zwei weitere Linsen, die als Teleskop angeordnet sind, auf einer EMCCD Kamera abgebildet (siehe A.8.2). Mit Hilfe von dichroitischen Strahlteilern (Chroma) können verschiedene Emissionswellenlängen separiert und danach auf unterschiedlichen Kameras (Andor) abgebildet werden. Details zu den Messungen (Strahlteiler, Filter) an modifizierten oder anderen *d*STORM Setups können dem jeweiligen Methodenteil der Publikationen entnommen werden.

#### Schaltpuffer

Da Photoschalten am besten unter reduzierenden und teilweise sauerstofffreien Bedingungen funktioniert, wurden 80-100 mM MEA in PBS oder aber ein sauerstoffziehender Schaltpuffer verwendet, bei welchem durch Zugabe von Glucose, sowie einem Enzymmix aus Glucoseoxidase und Katalase, Sauerstoff entfernt wird [Benesch and Benesch, 1953]. Typischerweise verwendet man 1–10% Glucose und 1–100 u Glucoseoxidase [Schäfer et al., 2013]. Je nach Farbstoff und Art der Probe musste zusätzlich der pH-Wert mit KOH optimiert werden. Der Schaltpuffer wurde immer frisch angesetzt.

*GlucOx-Ansatz (1 ml):*

- 350  $\mu$ l 1× PBS (pH 7.4)
- 350  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 300  $\mu$ l Glucose (aus 10 % v/v mit 10 % w/v Glycerin)
- 80-100  $\mu$ l MEA (aus 1 M, pH 7.4 oder 7.8), final: 80-100 mM
- 2-5  $\mu$ l GlucOx Enzymmix (siehe A.4.2)

- bei Bedarf KOH für gewünschten pH-Wert

### rapidSTORM

Die Auswertung der *d*STORM-Messungen erfolgte mit Hilfe der Software rapidSTORM, zu der eine genaue Beschreibung von Steve Wolter vorliegt [Wolter et al., 2010]. Das finale *d*STORM-Bild wird aus vielen einzelnen Lokalisationen rekonstruiert, die wiederum aus einigen tausend Einzelbildern ermittelt werden. In jedem einzelnen Bild werden die potentielle Lokalisationen mit einem zweidimensionalen Gaußfit ermittelt. Im Abgleich mit einer als ideal vorgegeben PSF entscheidet der Algorithmus, welche Koordinaten in die Lokalisationsdatei aufgenommen werden. Die Software kann auf der Seite des Lehrstuhls für Biotechnologie und Biophysik heruntergeladen werden: [http://www.super-resolution.biozentrum.uni-wuerzburg.de/research\\_topics/rapidstorm](http://www.super-resolution.biozentrum.uni-wuerzburg.de/research_topics/rapidstorm)

### 2.5.2. CLSM und FRAP-Experimente

Die Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP), wird benutzt, um Informationen über die Mobilität von Proteinen zu gewinnen. FRAP-Experimente mit unterschiedlichen GFP-transfizierten U2Os-Zellen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 von Zeiss durchgeführt. Dieses war mit einem Argon (488 nm, 458 nm, 514 nm) und zwei Helium-Neon-Lasern (542 nm, 633 nm) ausgestattet. Es wurde ein Halbkern-FRAP durchgeführt, um unterschiedlich dichte Chromatinbereiche im Zellkern abzudecken. Dazu wurde eine region of interest (ROI) um den halben Zellkern gelegt. Dieser Bereich wurde bei maximaler Laserleistung (488 nm, 458 nm) und langem Pixeldwell gebleicht und anschließend mit geringerer Intensität und kurzem Pixeldwell über eine Zeitserie hin weiterverfolgt. Zwei weitere ROIs wurden für Referenzwerte in eine weitere Zelle, sowie außerhalb der Zellen für den Hintergrund gelegt, um die FRAP-Daten zu bereinigen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem FRAP-Tool der Zeiss Software ZEN 2009 und OriginPro 8.5G zur besseren Darstellung der Erholungskurven.

### 2.5.3. Biostation

Für die Lebendzellbeobachtung im Durchlicht/Phasenkontrast oder auch mit Fluoreszenz wurde eine Biostation IM von Nikon verwendet. Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für bis zu 30 h beobachtet. Dabei wurden in definierten zeitlichen Abständen (i. d. Regel alle 15 min) Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Aufnahmen gemacht. Die Belichtungszeit im Phasenkontrast wurde stets auf  $\frac{1}{250}$  s und die in der Fluoreszenz auf  $\frac{1}{7}$  s bis  $\frac{1}{10}$  s eingestellt.

### 2.5.4. Raster-Elektronenmikroskopie

#### Vorbereitung der Proben

Die EM-Probenvorbereitung wurde von Georg Krohne und Mitarbeitern der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Biozentrums durchgeführt. Nach der Durchführung der *d*STORM-Experimente wurden die *Xenopus laevis* Kernhüllen 24 h bei 4°C mit 2.5% Glutaraldehyd (50 mM Natriumkakodylat pH 7.2, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>) fixiert. Es folgten drei Waschschritte für 3 min mit 50 mM Natriumkakodylat (pH 7.2). Dann wurden die Proben für 2 h bei 4°C mit 2% OsO<sub>4</sub> (gepuffert mit 50 mM Natriumkakodylat, pH 7.2)

fixiert, mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und schrittweise mit Aceton dehydriert und im Kritisch-Punkt-Trockner (CPD 030; BAL-TEC, Liechtenstein) getrocknet. Getrocknete Proben wurden mit Kohle bedampft (MED 010 BAL-TEC, Liechtenstein) und bis zum Messen im Exikator gelagert.

### **Messungen**

Die EM-Aufnahmen wurden zusammen mit Georg Krohne an einem JEOL Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (JSM-7500F) bei einer Spannung von 1 kV aufgenommen. Es wurde der Benutzermodus „gentle beam high“ ausgewählt. Der Arbeitsabstand betrug 4.5 – 5 mm.

#### **2.5.5. Erstellen der korrelativen Bilder**

Dank ihrer hohen Symmetrie, konnten die Zentren der Kernporen in den SEM- und *d*STORM-Bildern jeweils manuell als Landmarken markiert werden. Das *d*STORM Bild wurde dann mit bUnwarpJ [Arganda-Carreras et al., 2006], einem Plugin in Fiji [Schindelin et al., 2012], in das SEM-Bild transformiert. Für die Transparenz des *d*STORM-Bildes sowie den Overlay beider Bilder wurde Gimp 2.8.10 benutzt.



## 3. Publikationen und weitere Ergebnisse

### 3.1. Publikationen

Die vorliegende Arbeit basiert hauptsächlich auf folgenden Publikationen, welche im Anhang eingebunden sind:

#### Manuskript 1

Löschberger A., van de Linde S., Dabauvalle M. C., Rieger B., Heilemann M., Krohne G. and Sauer M. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell Sci.* 125: 570-575. [Löschberger et al., 2012]

#### Manuskript 2

Wolter S., Löschberger A., Holm T., Aufmkolk S., Dabauvalle M.-C., van de Linde S. and Sauer M. (2012). rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat. Methods* 9(11): 1040-1041. [Wolter et al., 2012]

#### Manuskript 3

Klein T., Löschberger A., Proppert S., Wolter S., van de Linde S. and Sauer M. (2011). Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods*. 8(1):7-9. [Klein et al., 2011]

#### Manuskript 4

Löschberger A., Franke C., Krohne, G., van de Linde S. and Sauer M. (2014). Correlative dSTORM and scanning electron microscopy *J. Cell Sci.*, submitted (entered review process). [Löschberger et al., 2014a]

#### Manuskript 5

Löschberger A., Niehörster T. and Sauer M. (2014). Click chemistry for the conservation of cellular structures and fluorescent proteins: ClickOx. *Biotechnol. J.*, 9(5):693-697. [Löschberger et al., 2014b]

#### Manuskript 6

Vogel B., Löschberger A., Sauer M. and Hock R. Cross-linking of DNA through HMGA1 suggests a DNA scaffold. (2011). *Nucleic Acids Res.*, 39(16):7124-33. [Vogel et al., 2011]

### Weitere Beiträge zu Reviews und Publikationen

van de Linde S., Löschberger A., Klein T., Heidebreder M., Wolter S., Heilemann M. and Sauer M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protoc.* 6(7): 991-1009. [van de Linde et al., 2011]

van de Linde S., Aufmkolk S., Franke C., Holm T., Klein T., Löschberger A., Proppert S., Wolter S. and Sauer M. (2013). Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem. Biol.* 20(1):8-18. [van de Linde et al., 2013]

Holm T., Klein T., Löschberger A., Klamp T., Wiebusch G., van de Linde S. and Sauer M. (2013). A Blueprint for Cost-Efficient Localization Microscopy. *Chemphyschem.* 15(4):651–654.  
[Holm et al., 2014]



### 3.1.1. Modellstrukturen

#### Kernporen: Auflösung und Struktur, Manuskript 1

Löschberger A., van de Linde S., Dabauvalle M. C., Rieger B., Heilemann M., Krohne G. and Sauer M. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell Sci.* 125: 570-575. [Löschberger et al., 2012]

##### *Eigener Anteil:*

Etablierung und Durchführung sämtlicher Färbungen mit WGA sowie aller Immunfluoreszenzen mit gp210, sämtliche *d*STORM-Messungen, Auswertung und Erstellen der Bilder mit *rapid*STORM (Fig. 1, Fig. S1 – S4), Bestimmen der Durchmesser der Ringstrukturen (manueller Auswertungsteil mit Fiji), sowie der Halbwertsbreiten (Fig. 2).

##### *Zusammenfassung:*

In dieser Publikation konnte erstmals die Achtfachsymmetrie von Kernporenkomplexen lichtmikroskopisch dargestellt werden. Kernhüllen von *Xenopus laevis* Oocyten wurden mit gp210 und WGA markiert, um den äußeren Verankerungsring und den Zentralkanal der Kernporenkomplexe zu zeigen. Aus den *d*STORM-Daten wurde für den Zentralkanal ein Durchmesser von ca. 40 nm, für den gp210-Ring ein Durchmesser von ca. 160 nm ermittelt. Bei den Präparaten mit WGA konnte eine laterale Auflösung (Halbwertsbreite) von 15 nm erzielt werden. Desweiteren werden Bilder von Durchschnittskernporen gezeigt, welche über das sogenannte „particle averaging“ ermittelt wurden. Ein erster Zwei-Farben-Ansatz verdeutlicht zum einen das Potential von *d*STORM-Messungen in der Biologie und bestätigt zum anderen die Eignung des Kernporenkomplexes als Modellstruktur für die Hochauflösung. Weitere Details sind in Manuskript 1 im Anhang nachzulesen.

#### Kernporen: Zwei-Farben-Messungen und 3D-Aufnahmen, Manuskript 2

Wolter S., Löschberger A., Holm T., Aufmkolk S., Dabauvalle M.-C., van de Linde S. and Sauer M. (2012). *rapid*STORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat. Methods* 9(11): 1040-1041. [Wolter et al., 2012]

##### *Eigener Anteil:*

Sämtliche Färbungen mit farbstoffmarkiertem WGA, Durchführung aller Immunfluoreszenzen mit gp210 und mab414, sämtliche *d*STORM-Messungen, Berechnung der Zweifarben-Bilder mit *rapid*STORM und Alignment-Fitter bei spektral überlappenden Aufnahmen (Fig. 1), Berechnung der Zweifarben-Bilder mit *rapid*STORM und bUnwarpJ bei sequentiellen Aufnahmen (Fig. S2).

##### *Zusammenfassung:*

Die Publikation behandelt die Stärken von *rapid*STORM. Um das Potential der Software zu veranschaulichen, wurden unterschiedliche Arten von Zwei-Farben Bildern von Kernporenkomplexen aus Kernhüllen von *Xenopus laevis* Oocyten gezeigt: Zum einen aus sequentiellen Aufnahmen und zum anderen aus simultanen, spektral überlappenden Aufnahmen. In beiden Fällen umgibt der äußere gp210-Ring sauber den inneren, mit WGA markierten Zentralkanal. Desweiteren wurde die Kernhülle von *Xenopus laevis* A6-Zellen

dreidimensional dargestellt. Dies erfolgte mit den Ansätzen Biplane und Astigmatismus. Genauere Details befinden sich in Manuskript 2.

#### **Kernporen: weitere Beiträge**

##### *Zusammenfassung:*

Es konnten Immunfluoreszenzen mit gp210 auf *Xenopus laevis* Kulturzellen (A6-Zellen) etabliert werden, deren Bilder in Form eines Reviews in *Chemistry and Biology* [van de Linde et al., 2013] (Fig. 6) sowie in einer methodischen Publikation in *ChemPhysChem* [Holm et al., 2014] (Fig. 2) veröffentlicht wurden. Bei letzterem wurde die Tauglichkeit eines günstigen Praktikumssetups getestet. Hier konnten zwar nicht alle acht Dömanen, aber immerhin Ringstrukturen aufgelöst werden.

#### **Lebende Zellen: H2B, Manuskript 3**

Klein T., Löschberger A., Proppert S., Wolter S., van de Linde S. and Sauer M. (2011). Live-cell *d*STORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods*. 8(1):7-9. [Klein et al., 2011]

##### *Eigener Anteil:*

Alle Transfektionen und *d*STORM-Aufnahmen von H2B-SNAPtag in Cos7- und Hep2-Zellen (Fig. 1, Fig. S3), Kontroll-Aufnahmen am CLSM von H2B-SNAPtag und H2B-EGFP (Fig. S1), sowie CLSM-Aufnahmen von murinen 3T3-Zellen mit mRFP, EGFP und H2B-SNAP mit SNAP-Cell TMR-Star und SNAP-Cell 505 (Fig. S4).

##### *Zusammenfassung:*

Die Publikation zeigt am Beispiel von H2B, dass Lebendzell-*d*STORM mit kommerziell erhältlichen SNAP-Tags, an welche organische Farbstoffe (SNAP-Cell TMR-Star, SNAP-Cell 505) binden, unter endogenen Bedingungen möglich ist. Allerdings gibt es bei den Färbungen Farbstoff- und Zelllinien abhängige Unterschiede. Die Ergebnisse zeigen z.B., dass der Fluoreszenzfarbstoff SNAP-Cell 505 nicht in Kerne von murinen Zellen vordringen kann. Eine H2B-Färbung mit dem SNAP-Cell TMR-Star Ligand hingegen funktioniert in allen getesteten Zelllinien. Desweiteren veranschaulichen die Ergebnisse, dass die Radikale des verwendeten TMR-Farbstoffs auch mit 405 nm angeregt werden können, wodurch die Dichte der fluoreszierenden Farbstoffe reguliert werden kann. Weitere methodische Details sind in Manuskript 3 nachzulesen.

Ein Teil dieser Ergebnisse sowie eine detaillierte Versuchsbeschreibung wurden desweiteren in *Nature Protocols* publiziert [van de Linde et al., 2011].

### 3.1.2. Korrelative Mikroskopie, Manuskript 4

Löschberger A., Franke C., Krohne, G., van de Linde S. and Sauer M. (2014). Correlative *d*STORM and scanning electron microscopy. *J. Cell Sci.*, submitted manuscript, entered review process. [Löschberger et al., 2014a]

*Eigener Anteil:*

Probenvorbereitung der *Xenopus laevis* Kernhüllen für *d*STORM (Färbungen mit WGA und Immunfluoreszenz mit gp210), sämtliche *d*STORM-Messungen (Fig. 1, Fig2), Errechnen von WGA-Bildern mit unterschiedlichen Pixelgrößen (Fig. S2), Erstellung von Fluoreszenz-Übersichtsbildern für SEM (Fig. S3), Zuordnen von korrelativen Bereichen (*d*STORM-SEM) am SEM, Auswertung: Overlay der SEM und *d*STORM-Bilder (Fig. 2, Fig S5) (Bestimmen von Landmarken und Bildtransformation mit bUnwarpJ, Fig. S4).

*Zusammenfassung:*

Für dieses Manuskript wurden korrelative Bilder mit *d*STORM und Rasterelektronenmikroskopie (SEM) von Kernhüllen aus *Xenopus laevis* Oocyten erstellt. Präparationsbedingt wird im SEM-Bild vor allem die nukleoplasmatische Seite der Kernhülle gezeigt, für die *d*STORM-Aufnahmen spielte die Orientierung keine Rolle. Die Struktur selbst (Kernporen) konnte zum Setzen von Landmarken verwendet werden, wodurch eine sehr genaue Bildtransformation möglich war. Die Ergebnisse zeigen, dass *d*STORM und SEM unter dieser Voraussetzung sehr gut kombiniert werden können. In den *d*STORM-Aufnahmen konnten desweiteren vereinzelt Poren mit 9-fach Symmetrie identifiziert werden. Weitere Details befinden sich in Manuskript 4.

### 3.1.3. ClickOx, Manuskript 5

Löschberger A., Niehörster T. and Sauer M. (2014). Click chemistry for the conservation of cellular structures and fluorescent proteins: ClickOx. *Biotechnol. J.*, 9(5):693-697 [Löschberger et al., 2014b]

*Eigener Anteil:*

Entwicklung des ClickOx-Protokolls, Vorbereitung der Präparate (EdU-Einbau, Phalloidin-färbung sowie Anwendung verschiedener Click-Protokolle), Weitfeld-, CLSM- und *d*STORM-Aufnahmen, Auswertung der Weitfeld-Daten, Fig. 1-3, Fig. S1-S8.

*Zusammenfassung:*

In dieser Publikation wird ein neu entwickeltes Click-Protokoll unter dem Namen „ClickOx“ vorgestellt. Zunächst wurde gezeigt, dass ROS, welche bei der standardmäßigen kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition entstehen, zelluläre Strukturen wie das Aktinskelett zerstören können und auch die Fluoreszenz von fluoreszierenden Proteinen beeinträchtigen. Mit CLSM und *d*STORM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass der neue ClickOx-Ansatz, bei welchem der Reaktion enzymatisch Sauerstoff entzogen wird, zu einer Erhaltung feiner Aktin-Filamente führt. Desweiteren zeigen die Ergebnisse, dass GFP- und YFP-Fluoreszenzen unter Verwendung des neuen Protokolls weniger stark geschwächt werden. Daher eignet sich dieser Ansatz insbesondere für hochauflösenden Methoden. Genauere Angaben finden sich in Manuskript 5.

#### 3.1.4. Chromatinorganisation, Manuskript 6

Vogel B., Löscherger A., Sauer M. and Hock R. Cross-linking of DNA through HMGA1 suggests a DNA scaffold. (2011). *Nucleic Acids Res.*, 39(16):7124-33 [Vogel et al., 2011].

*Eigener Anteil:*

Durchführung und Auswertung der *d*STORM-Messungen von Immunlokalisationen von HMGA1 und DNA in Cos7 Zellen.

*Zusammenfassung:*

Die Publikation zeigt erstmals, dass HMGA1 nicht nur linear an DNA-Stränge binden, sondern diese auch quervernetzen kann. Die *d*STORM-Aufnahmen zeigen eine deutliche Akkumulation von DNA bei Übertransfektion von HMGA1a-EGFP im Vergleich zu Kontrollzellen und stehen somit im Einklang mit den Ergebnissen des Cross-Linking-Assays und den elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Eine ausführliche Darstellung dieser DNA-Cross-Linking Eigenschaft, sowie eine Beschreibung der entsprechenden Domäne von HMGA1 befindet sich in Manuskript 6. Die Ergebnisse dieser HMGA1-Publikation dienten als Basis für das im Folgenden beschriebene D1-Projekt.

## 3.2. Chromatinorganisation durch D1

### 3.2.1. Lokalisation von D1-EGFP in Zellen

D1 wurde aus cDNA von *Drosophila* Schneider 2 Zellen (S2-Zellen) amplifiziert, in den pEGFPN2-Vektor kloniert und die Sequenz überprüft. Um die Lokalisation von D1 im Zellkern zu überprüfen, wurde das fertige D1-EGFP Konstrukt in Cos7 Zellen exprimiert und die Zellen zusätzlich mit Hoechst 33258 gefärbt.

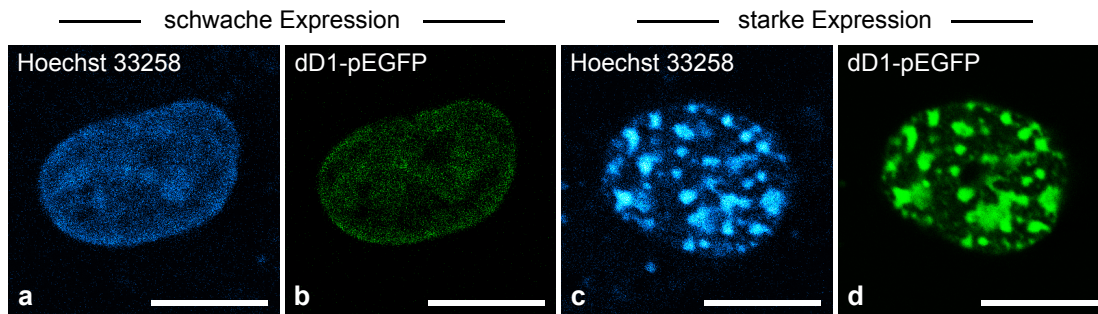


Abbildung 3.1.: *Expression und Lokalisation von D1-EGFP: D1-EGFP wurde in Cos7 Zellen exprimiert und am CLSM analysiert. Die Zellen wurden fixiert und mit Hoechst 33258 gefärbt, um die DNA im Zellkern sichtbar zu machen. Die linken beiden Bilder zeigen eine schwache Expression (a, b), die rechten beiden Bilder eine starke Expression von D1 (c, d). Das DNA-bindende D1-Protein zeigt dasselbe Muster wie die mit Hoechst gefärbte DNA. Bei starker Expression akkumuliert die DNA.*

D1-EGFP lokalisiert immer im Zellkern, je nach Expressionsstärke kann es jedoch in unterschiedlichen Mustern vorliegen. Bei schwacher Expression ist der Zellkern diffus gefärbt (Abb. 3.1 a, b), bei etwas stärker Expression akkumuliert D1-EGFP und bei sehr starker Expression liegt es in großen Klumpen vor (Abb. 3.1 c, d). Die Vergleichsfärbung der DNA mit Hoechst 33258 zeigt jeweils dasselbe Muster und bestätigt somit die chromatinbindenden Eigenschaften des D1-Proteins. Das C-terminal angehängte EGFP stört hierbei nicht.

### 3.2.2. Herstellung der Funktionsmutante R10×G

In Anlehnung an eine frühere Arbeit mit HMGA1 [Harrer et al., 2004] wurde für D1 eine Mutante mit funktionsunfähigen AT-Haken hergestellt. Bei der Funktionsmutante R10×G von D1 wurden die AT-Haken-Motive durch Mutation verändert. Das Arginin an dritter Stelle im Motiv, wurde durch Glycin ersetzt. Aus RGRP wurde somit RGGP. Auch die „potentiellen“ AT-Haken [Aulner et al., 2002] 4, 5, und 6 (AGRP, VGRP und LGRP) wurden auf diese Weise mutiert. Da insgesamt 10 Mutationen notwendig waren, um das DNA-bindende RGRP-Motiv der AT-Haken zu RGGP zu mutieren, wurde die R10×G Mutante am Computer *in silico* entworfen und anschließend synthetisieren lassen (von GeneArt). Somit musste sie nur noch in pEGFPN2 umkloniert werden. Abb. 3.2 zeigt ein Schema der R10×G-Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

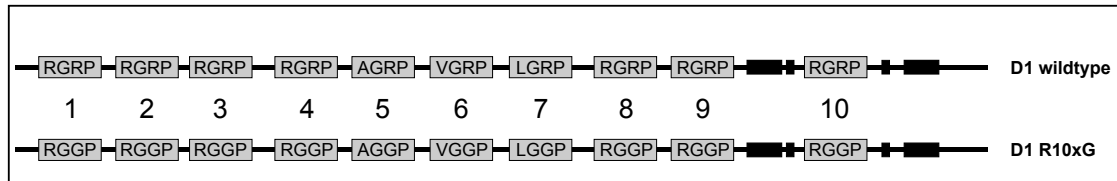


Abbildung 3.2.: Schematischer Vergleich von wildtypischem D1 und der Funktionsmutante  $R10 \times G$ . Bei der Mutante  $R10 \times G$  von D1 wurden die AT-Haken-Motive durch Mutation funktionsunfähig gemacht. Das Arginin an dritter Stelle im DNA-bindenden Motiv wurde durch Glycin ersetzt. Aus RGRP wurde somit RGGP, aus AGRP entsprechend AGGP, usw.

### 3.2.3. Analyse von D1-induzierter Chromatin-Akkumulation mittels Hochauflösung von EdU-markierter DNA

Die unterschiedlichen Muster der hoechstgefärbten DNA in CLSM-Aufnahmen zeigten bereits einen Einfluss von D1 auf die Chromatinorganisation. Um diesen genauer zu untersuchen, wurde die DNA mit EdU und Alexa 647-Azid markiert und verschiedene *d*STORM-Messungen durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit D1-EGFP sowie der Funktionsmutante  $R10 \times G$ -EGFP transfiziert und gleichzeitig mit EdU behandelt. Nach 24 h wurden sie fixiert und die DNA nach dem selbst entwickelten ClickOx-Protokoll mit Alexa 647-Azid gefärbt [Löschberger et al., 2014b]. In transfizierten Zellen wurde die farbstoffmarkierte DNA der Zellkerne mit *d*STORM hochaufgelöst. Außerdem wurde ein zusätzlicher Transfektionsansatz mit einem leeren EGFP-Vektor durchgeführt, um den Einfluss von EGFP überprüfen zu können. Ein weiterer Ansatz ohne Transfektion, aber ebenfalls mit geclickter DNA, diente als Kontrolle.

Abb. 3.3 zeigt, neben den jeweiligen hochaufgelösten Beispielbildern, Histogramme mit den relativen Häufigkeiten des Auftretens von nächsten Nachbarn (nearest neighbors) einzelner Lokalisationen. Die Nearest-Neighbor-Analyse wurde von Christian Franke durchgeführt. Sie basiert auf den von *rapid*dSTORM ermittelten Lokalisationsdaten der einzelnen EdU-Messungen. Als nächste Nachbarn wurden pro Lokalisation die Anzahl der weiteren Lokalisationen im Umkreis von 100 nm bestimmt. Die Kontrolle, in welcher die EdU-markierte DNA ohne zusätzliche Transfektion gefärbt wurde, zeigt eine homogene Gaußverteilung der nächsten Nachbarn. Viele Lokalisationen haben eine ähnliche Anzahl an Nachbarn, nur wenige Lokalisationen haben wenige oder viele Nachbarn, d.h. die Lokalisationen sind hier recht homogen verteilt. Anders sieht es beim wildtypischen D1-Protein aus. Hier liegt eine deutlich breitere Verteilung vor, es gibt viel mehr Lokalisationen mit wenigen nächsten Nachbarn und auch viel mehr Lokalisationen mit einer höheren Anzahl an nächsten Nachbarn als in der Kontrolle. Da die Verteilung nach rechts hin asymmetrisch wird (mehr Lokalisationen mit höherer Anzahl an Nachbarn) ist auch die Schiefe dieser Verteilung größer. Die *d*STORM-Bilder selbst lassen auch erkennen, dass die DNA hier deutlich akkumuliert vorliegt. Der Effekt bei der  $R10 \times G$  Funktionsmutante ist hingegen recht gering. Die Anzahl der Lokalisationen mit mehr oder weniger nächsten Nachbarn ist hier nur etwas höher als bei der Kontrolle. Die Transfektion des leeren EGFP-Vektors führt zu einem ähnlichen Ergebnis wie die  $R10 \times G$ -Transfektion. Am hinteren Histogrammabschnitt kann man im Vergleich zur Kontrolle gut erkennen, dass hier mehr Lokalisationen mit einer höheren Anzahl an nächsten Nachbarn vorliegen als bei nicht transfizierten Zellen.

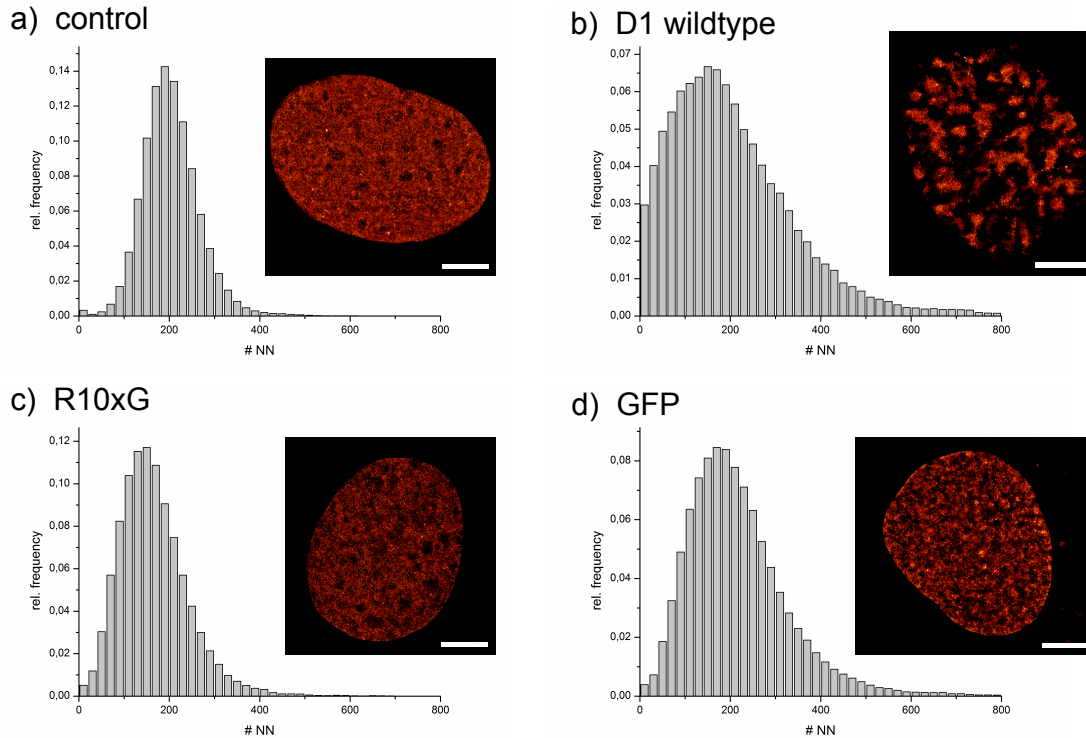


Abbildung 3.3.: *dSTORM*-Aufnahmen von DNA in *U2Os*-Zellkernen. Alle Zellen wurden für 24 h mit EdU behandelt. **a)** zeigt die Kontrolle ohne Transfektion. Die anderen Ansätze wurden mit D1-EGFP (**b**), R10×G-EGFP (**c**) oder leerem EGFP-Vektor (**d**) transfiziert. Nach dem Fixieren wurde die modifizierte DNA mit Alexa 647-Azid via ClickOx-Reaktion gefärbt. Die Histogramme zeigen die relativen Häufigkeiten der nächsten Nachbarn (# NN) aller Lokalisationen.

Um den „Verklumpungsgrad“ der DNA in den unterschiedlichen Ansätzen vergleichen zu können, wurden die Schiefen der jeweiligen Verteilungen der nächsten Nachbarn betrachtet. In Abb. 3.4 a sind die aus den oben beschriebenen Messreihen ermittelten Schiefen der Nearest-Neighbor-Verteilungen in einem vergleichenden Säulendiagramm dargestellt. Beim D1-Wildtypprotein liegt die größte Verklumpung, bei der Kontrolle die geringste vor. Wie bereits in Abb. 3.3 gezeigt, liegt die EdU-markierte DNA dort sehr gleichmäßig verteilt vor. R10×G und EGFP sind im Rahmen des Fehlers identisch.

Die Weitfeldaufnahmen in Abb. 3.4 b zeigen desweiteren, dass D1-EGFP und R10×G-EGFP ausschließlich im Zellkern lokalisieren, wobei nur eine Transfektion mit D1-EGFP zu akkumulierten Strukturen führt. Mit R10×G-EGFP übertransfizierte Zellen zeigen neben einem diffusen Muster im Kern die typische Überexpressions-Aggregation in den Nukleolen. Da in den EdU-*dSTORM*-Aufnahmen keine nukleolären Strukturen sichtbar sind, wirkt sich die Ansammlung dieses überschüssigen Proteins in den Nukleolen wohl nicht auf die generelle Verteilung/Akkumulation der DNA im Zellkern aus. Freies EGFP aus der Transfektion mit leerem EGFP-Vektor lokalisiert unspezifisch im Kern und Cytoplasma. Der im Vergleich zum Wildtyp zwar geringe, aber in Bezug auf die Kontrolle klar darstellbare Verklumpungsgrad der DNA (Abb. 3.4 a) ist anhand der Muster von R10×G-EGFP und den nicht fusionierten EGFP-Proteinen in den Weitfeldaufnahmen nicht zu erkennen (s. Abb. 3.4 b). Er kann erst in *dSTORM*-Aufnahmen und über die

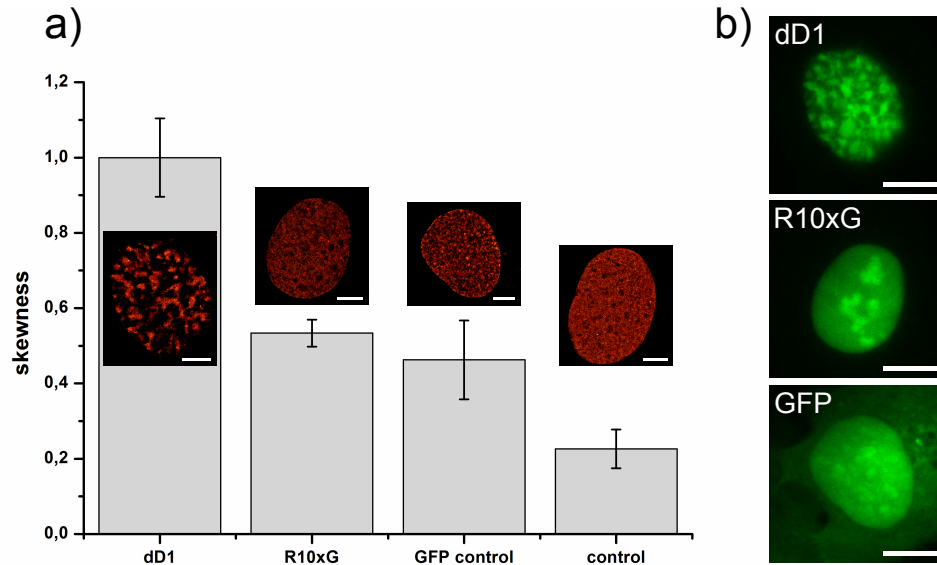


Abbildung 3.4.: Die Schiefe (*skewness*) der Nearest-Neighbor-Verteilung als Maß für die Verklumpung der DNA bei verschiedenen Ansätzen (a). Die Daten wurden auf die Schiefe der Verteilung des Ansatzes mit dem D1-Wildtyp-Konstrukt normiert. (b) zeigt Weitfeld-Fluoreszenzaufnahmen der transfizierten EGFP-Konstrukte D1, R10×G und leerer EGFP-Vektor. Die Eichstriche betragen 5 µm in a) und 10 µm in b).

ermittelte Schiefe der Lokalisationsverteilung nach der Nearest-Neighbor-Analyse dargestellt werden.

### 3.2.4. Klonierung von Deletionsmutanten von D1 und R10×G

Um die Funktionalität von AT-Haken Gruppierungen in D1 zu untersuchen, wurden drei Deletionsmutanten hergestellt. Beim Design der einzelnen Mutanten diente das HMG1 Protein als Orientierung, welches 3 DNA-bindende AT-Haken und einen sauren C-Terminus besitzt [Reeves, 2001]. Die Deletionsmutanten von D1 bestehen deshalb aus einem kurzen N-Terminus und jeweils 3 AT-Haken. Sie wurden desweiteren so deletiert, dass sie im c-terminalen Bereich noch einige saure Aminosäuren besitzen. Der N-Terminus von D1 wurde als D1 ΔC bezeichnet, da hier der c-terminale Bereich deletiert wurde. Es enthält die AS 1-76. Bei D1 ΔN wurde entsprechend der N-Terminus deletiert, hier ist also der C-Terminus des wildtypischen D1 übrig (AS 189-355). Bei D1 ΔNC (AS 108-193) fehlen Bereiche vom N- und C-Terminus, das Protein enthält die potentiellen AT-Haken 5-7. Dieselben Deletionsmutanten wurden auch aus dem R10×G Konstrukt erstellt. Diese Funktionsmutanten wurden entsprechend D1 ΔC, R3×G, D1 ΔNC R3×G und D1 ΔN R3×G genannt. Die verschiedenen Mutanten sind in Abb. 3.5 schematisch aufgeführt.

Bei der Herstellung der Mutanten machte sich ein interessanter Effekt bei der ungerichteten Klonierung bemerkbar. Die Bakterien (XL1Blue) starben sobald wildtypische Sequenzabschnitte von D1 in Leserichtung in den EGFP-Vektor kloniert wurden. Mit Hilfe von Kolonie-PCR zeigte sich, dass Kolonien mit „falsch herum“ eingebauter Sequenz überlebten. Erst als ein anderes Vektor-Backbone gewählt wurde, konnten die EGFP-Konstrukte richtig orientiert kloniert werden. Beim ursprünglichen EGFP-Vektor befanden sich Antibiotikaresistenz und Insert auf demselben DNA-Strang. Beim Back-



bone des SNAPtag-Vektors liegen Resistenz und Insert auf sense und antisense Strang verteilt. Der SNAPtag in diesem Vektor wurde im Rahmen dieser Arbeit durch EGFP ersetzt und als „GFP-Snapbone“ Vektor bezeichnet (s. A.6). Vermutlich führte eine geringe Expressionsrate der inserierten DNA zum Absterben der Bakterien.

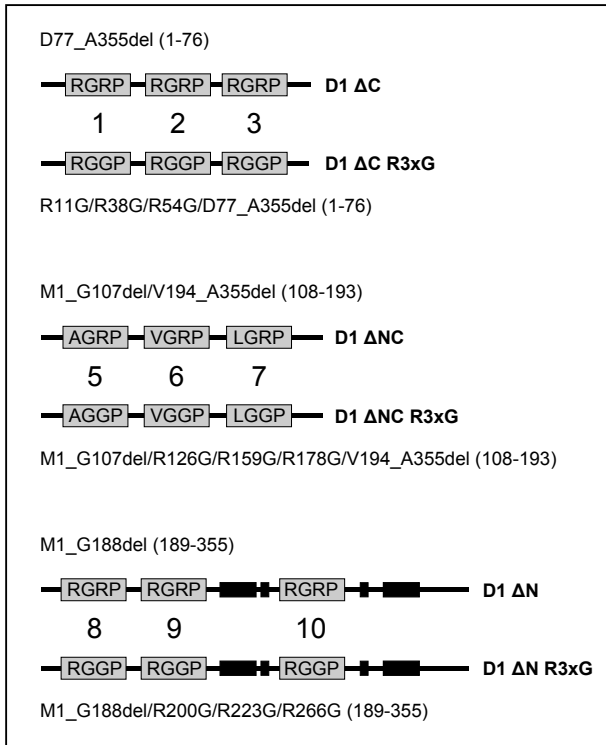


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung von D1-Deletions- und Deletions-Funktionsmutanten: Bei  $D1\Delta C$  wurde der C-Terminus deletiert. Das trunkierte Protein besteht aus den AS 1-76 und enthält die ersten drei AT-Haken. Bei  $D1\Delta C R3\times G$  wurden die AT-Haken wie bei der Funktionsmutante  $R10\times G$  mutiert. Bei  $D1\Delta NC$  (AS 108-193) sind die potentiellen AT-Haken 5-7 enthalten, die entsprechende Funktionsmutante dazu ist  $D1\Delta NC R3\times G$ . Bei  $D1\Delta N$  wurde der N-Terminus deletiert. Die Deletionsmutante enthält die letzten drei AT-Haken und den C-Terminus von D1 (AS 189-355).  $D1\Delta N R3\times G$  ist die entsprechende Funktionsmutante.

### 3.2.5. Untersuchung der Mobilität von D1-Mutanten mit FRAP

Um die Affinität einzelner Abschnitte von D1 zum Chromatin zu untersuchen, wurden FRAP-Experimente durchgeführt. Ähnliche Experimente zur dynamischen Interaktion von HMGA1a und Chromatin wurden bereits vor einigen Jahren durchgeführt [Harrer et al., 2004]. Um die Mobilität von D1 sowie den einzelnen D1-Mutanten zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit FRAP-Messungen mit D1 sowie den oben aufgeführten Deletionsmutanten (Abb. 3.5), durchgeführt. Die jeweiligen Funktionsmutanten ( $R10\times G$ ,  $3\times R3\times G$ ), deren DNA-bindende Domänen in Anlehnung an HMGA1 [Harrer et al., 2004] durch Mutation funktionsunfähig gemacht wurden, dienten als Negativ-Kontrollen. Ein Teil der FRAP-Messungen wurde von Ludwig Leidinger im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

Da das Chromatin im Kern unterschiedliche Muster aufweist und bereits bekannt ist, dass Proteindynamiken im Eu- und Heterochromatin unterschiedlich sind, wurde bei den FRAP-Messungen jeweils der halbe Zellkern gebleicht. Somit wurde sicher gestellt, die verschiedenen Chromatinbereiche möglichst gleichmäßig mit einzubinden. Anschließend wurde die Fluoreszenzerholung gemessen (siehe 2.5.2). Die Zeit  $t_{\frac{1}{2}}$  beschreibt den Zeitpunkt, nach welchem die Hälfte der maximal zurückgewinnbaren Intensität erreicht wurde. Für die Fluoreszenzerholung des wildtypischen D1-EGFP wurde  $t_{\frac{1}{2}} = 21.3 \pm 5.8$  s (SD, Standardabweichung) ermittelt. Die hohe Zahl an Messungen liefert stabile Daten. Mittelwert ( $t_{\frac{1}{2}} = 21.3$ ) und Median ( $t_{\frac{1}{2}} = 20.06$ ) unterscheiden sich um weniger als 6 %

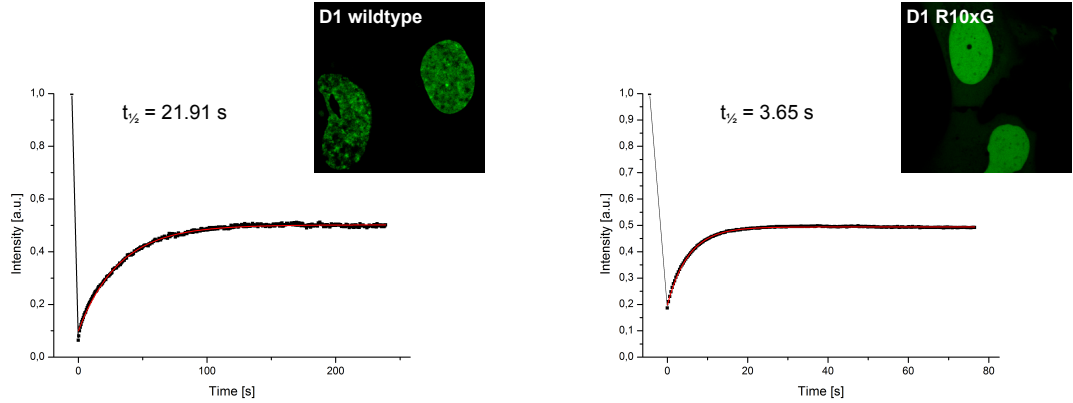


Abbildung 3.6.: Beispiele für FRAP-Experimente mit D1-EGFP und R10 $\times$ G-EGFP. Die linke Kurve zeigt die Fluoreszenzerholung des wildtypischen D1-Proteins, die rechte Kurve die Fluoreszenzerholung der Funktionsmutante R10 $\times$ G, welche keine funktionsfähigen AT-Haken mehr besitzt. Die Erholungszeiten  $t_{\frac{1}{2}}$  sind für die jeweils dargestellten Einzelmessungen angegeben. D1 weist mit  $t_{\frac{1}{2}} = 21.91$  s in diesem Beispiel eine 6 $\times$  langsamere Erholung auf als R10 $\times$ G mit  $t_{\frac{1}{2}} = 3.65$  s

(siehe 3.1), der Standardfehler liegt bei  $SE = 0.67$  s.

Im Vergleich zum Wildtypprotein, zeigt die R10 $\times$ G-Mutante eine deutlich schnellere mittlere Fluoreszenzerholung mit  $t_{\frac{1}{2}} = 3.45 \pm 0.8$  s (Beispielkurve in Abb. 3.6). Die Fluoreszenzerholung der Deletionsmutanten D1 $\Delta$ C und D1 $\Delta$ N liegt mit  $t_{\frac{1}{2}} = 4.7$  s, bzw.  $t_{\frac{1}{2}} = 4.0$  s zwar deutlich unter der Erholungszeit des Wildtypproteins, aber über der der Funktionsmutante R10 $\times$ G. Die Dauer der Fluoreszenzerholung von D1 $\Delta$ NC liegt mit  $t_{\frac{1}{2}} = 2.2$  s unter der Erholung von R10 $\times$ G. Die deletierten Funktionsmutanten D1 $\Delta$ C R3 $\times$ G, D1 $\Delta$ NC R3 $\times$ G und D1 $\Delta$ N R3 $\times$ G weisen mit jeweils  $t_{\frac{1}{2}} = 1.9$  s die kürzesten Fluoreszenzerholungszeiten auf. Die Gesamtauswertung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Beispiele für Erholungskurven zeigt Abb. 3.7.

Tabelle 3.1.: Zusammenstellung der FRAP-Ergebnisse aller D1-Konstrukte. Für jedes untersuchte Konstrukt sind folgende Werte angegeben: Anzahl der Messungen ( $N$ ), Mittelwert der Fluoreszenzerholungszeit  $t_{\frac{1}{2}}$  in s, Standardabweichung von  $t_{\frac{1}{2}}$  ( $SD$ ) in s, Standardfehler des Mittelwerts ( $SE$ ) in s und der Median ( $M$ ) in s.

Konstrukt	$N$	$t_{\frac{1}{2}}$ (s)	$SD$ (s)	$SE$ (s)	$M$ (s)
D1 wildtype	74	21.29	5.79	0.67	20.06
D1 R10 $\times$ G	82	3.45	0.80	0.09	3.29
D1 $\Delta$ C	64	4.71	1.16	0.14	4.67
D1 $\Delta$ C R3 $\times$ G	65	1.91	0.35	0.04	1.92
D1 $\Delta$ NC	77	2.19	0.43	0.05	2.14
D1 $\Delta$ NC R3 $\times$ G	58	1.90	0.30	0.04	1.90
D1 $\Delta$ N	64	4.01	0.89	0.11	4.04
D1 $\Delta$ N R3 $\times$ G	42	1.86	0.40	0.06	1.75

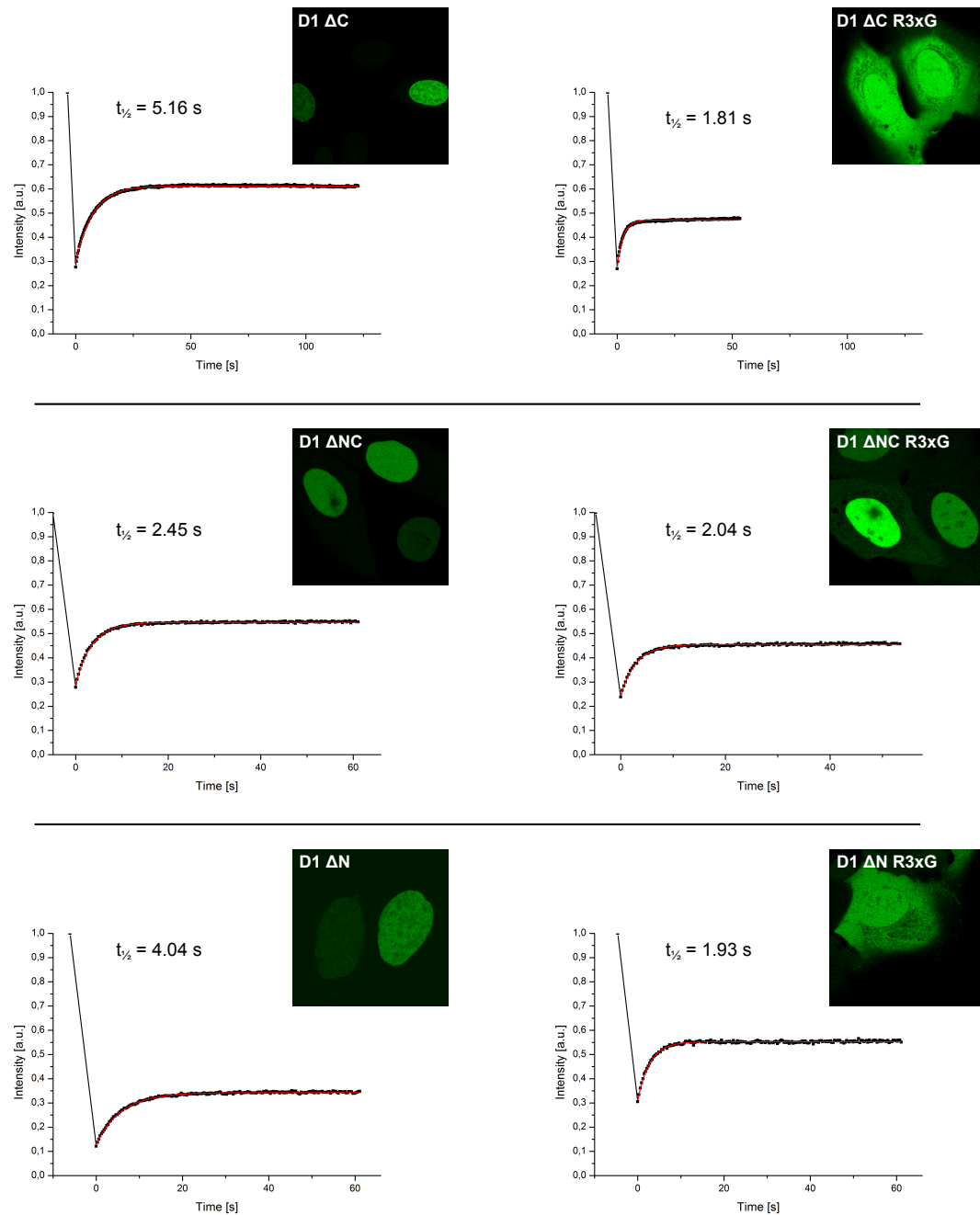


Abbildung 3.7.: FRAP-Experimente mit D1-Deletions- und zugehörigen Funktionsmutanten, bei welchen die AT-Haken funktionsunfähig gemacht wurden. Die Abbildung zeigt Beispiele von typischen Fluoreszenzerholungskurven von  $D1 \Delta C$ ,  $D1 \Delta C R3 \times G$ ,  $D1 \Delta NC$ ,  $D1 \Delta NC R3 \times G$ ,  $D1 \Delta N$  und  $D1 \Delta N R3 \times G$ . Die Erholungszeiten  $t_{1/2}$  sind für die jeweils dargestellten Einzelmessungen angegeben.



## 4. Diskussion

### 4.1. Anforderungen an biologische Modellstrukturen

*Zu Manuskript 1, 2 und 3.:*

Biologische Modellstrukturen in der Hochauflösung dienen in erster Linie der „Qualitätssicherung“. Deswegen sollten folgende Fragen mit Hilfe von guten Modellstrukturen beantwortet werden können: Wie verlässlich sind die Ergebnisse, die man mit seiner mikroskopischen Methode, in diesem Fall *d*STORM, erzielen kann? Wie präzise ist die Auswertung? Funktionieren die Färbungen, gibt es Nebeneffekte?

#### 4.1.1. Fixierte Proben: Kernporenkomplexe

Da sie einen Durchmesser unterhalb der klassischen Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie aufweisen und ihre Größe und Achtfachsymmetrie seit langem aus der Elektronenmikroskopie bekannt sind [Callan and Tomlin, 1950, Gall, 1967, Scheer et al., 1988], können Kernporenkomplexe als ideale Modellstruktur für die hochauflösende Mikroskopie betrachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor allem Kernhüllen von *Xenopus laevis* Oocyten verwendet, deren hohe Porendichte - und somit auch Dichte der Gesamtstruktur - eine weitere Herausforderung an die Hochauflösung stellt. Zur Sichtbarmachung der Achtfachsymmetrie dienen Immunfluoreszenzen gegen gp210-Proteine, welche den Kernporenkomplex in der Kernhülle verankern [Greber et al., 1990]. Der zentrale Kanal wurde mit WGA (Weizenkeimagglutinin) markiert, welches an N-Acetylglucosamine einiger zentraler Nukleoporene, wie z.B. Nup62, bindet [Davis and Blobel, 1986].

#### Strukturanalyse und laterale Auflösung

Mit der gp210-Immunfluoreszenz konnte die Achtfachsymmetrie der Kernpore erstmals mit einer lichtmikroskopischen Methode aufgelöst werden. Dasselbe gilt für die Darstellung des zentralen Kanals, welcher mit WGA markiert wurde. Für den Durchmesser der äußeren gp210-Ringstruktur wurde ein Wert von  $161 \text{ nm} \pm 17 \text{ nm}$  und für den inneren WGA-Ring ein Wert von  $38 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  bestimmt. Diese Werte wurden von unserem Kooperationspartner Bernd Rieger im Rahmen des Fehlers bestätigt. Dazu führte er mit einer automatisierten Bildanalyse, dem sogenannten „particle averaging“, aus den Lokalisationen vieler Einzelporen die Berechnung einer „Durchschnittskernpore“ durch. Dieses Verfahren stammt ursprünglich aus der Elektronenmikroskopie und dient dazu, aus vielen Einzelbildern eine optimale, teils auch dreidimensionale Rekonstruktion einer bestimmten Struktur zu erzeugen. Die Kombination aus Hochauflösung und „single particle averaging“ wurde später auch von Jan Ellenbergs Gruppe mit verschiedenen Nukleoporenen publiziert [Szymiorska et al., 2013]. Vereinzelt konnten in späteren *d*STORM-Aufnahmen bei der manuellen Auswertung Kernporen mit Neunfachsymmetrie entdeckt werden, deren Vorkommen in *Xenopus laevis* Kernhüllen in der Literatur bereits beschrieben ist [Hinschaw and Milligan, 2003]. Demnach bestehen 2% der Kernporen in Oocyten-Kernhüllen aus mehr als acht Untereinheiten. Solche strukturellen Subpopulationen werden bei einer Methode, wie „particle averaging“ nicht erkannt.

Die laterale Auflösung der *d*STORM-Bilder konnte über die Halbwertsbreite (full width half maximum, FWHM) für gp210 mit  $29 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$  angegeben werden. Eine höhere Auflösung wurde bei der Markierung des Zentralkanals erreicht. Die Halbwertsbreite betrug hier  $15 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ . Die bessere laterale Auflösung lässt sich mit der Größe des Markierungsmoleküls erklären. Während das direkt markierte WGA nur etwa 5 nm groß ist, haben IgG und F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, welche bei der indirekten Immunfluoreszenz zum Einsatz kommen, eine Größe von 8–10 nm. Generell gilt, je kleiner die Fluoreszenzsonden bei der Markierung von Proben sind, umso exakter können die entsprechenden Strukturen aufgelöst werden.

Alles in allem passen die *d*STORM-Ergebnisse optimal mit den Erkenntnissen bisheriger elektronenmikroskopischer Aufnahmen zusammen und zeigen, dass Kernporenkomplexe eine geeignete Modellstruktur für die Hochauflösung sind. Da nun auch strukturell glaubhaft gezeigt werden konnte, dass mit *d*STORM eine laterale Auflösung von bis zu 15 nm möglich ist, bzw. Ringstrukturen von 40 nm Durchmesser problemlos dargestellt werden können, können die entsprechenden Präparate durchaus zum Testen solcher mikroskopischer Aufbauten verwendet werden. Gp210-Immunfluoreszenzen auf A6-Zellen, die zu sehr sauberen Ergebnissen führen [van de Linde et al., 2013], wurden bereits zum Testen eines kostengünstigen Praktikumssetups benutzt, welches von Thorge Holm aufgebaut worden war [Holm et al., 2014]. Hier konnten zwar nicht die Achtfachsymmetrien, aber zumindest die Ringstrukturen der Kernporen mit einer lateralen Auflösung, bzw. Halbwertsbreite, von 60–65 nm aufgelöst werden.

#### Zweifارben-Experimente

Bereits die ersten Zweifarben-Aufnahmen, die noch mit einer einzigen Kamera sequentiell aufgenommen wurden, so dass Orientierungspunkte (landmarks) für die Bildkorrektur per Hand ausgewählt mussten, führten zu hervorragenden Ergebnissen [Löschberger et al., 2012]. Der mit WGA-Atto520 markierte zentrale Kanal der Kernporen, befand sich durchgehend innerhalb des äußeren gp210-Ringes, welcher via Immunfluoreszenz mit Alexa 647 markiert worden war. Somit konnten später die beiden „echten“ Zweifarben-Methoden sowie deren Auswertung auf ihre Güte kontrolliert werden:

Bei den sequentiellen Aufnahmen werden die Signale der beiden Farbkanäle nun auf zwei aufeinander abgestimmten Kameras abgebildet. Eine Bildsequenz aus Tetraspecs, welche auf beiden Kanälen detektiert wird, dient als Grundlage für das spätere Alignment der beiden *d*STORM-Aufnahmen mit bUnwarpJ [Arganda-Carreras et al., 2006]. Korrigiert werden auf diese Weise chromatische Abberationen, die bei der Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe, wie z.B. Alexa 647 und Alexa 532, auftreten.

Die zweite Methode greift auf zwei spektral überlappende Farbstoffe, in diesem Fall Alexa 647 und Alexa 700, zurück. Deren Fluoreszenz wird auf zwei, durch einen entsprechenden Strahlteiler getrennten, Kanälen aufgenommen. Die Emission eines Farbstoffes wird somit auf beiden Kameras, aber mit unterschiedlichen Intensitäten, detektiert. Über die so entstehenden unterschiedlichen Intensitätsverhältnisse können die einzelnen Signale nun dem Ursprungsfarbstoff zugeordnet werden [Wolter et al., 2012].

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Methoden, insbesondere im Hinblick auf die Datenauswertung, verlässlich funktionieren und keine Artefakte abgebildet werden. Der innere WGA-Ring befindet sich jeweils im Zentrum des gp210-Rings. Folglich kann man davon ausgehen, dass auch Aufnahmen unbekannter Strukturen zu biologisch „richtigen“ Abbildungen führen. Somit sind die Kernporen eine ideale Struktur, um die Qualität eines Setups für Zweifarbenmessungen zu überprüfen.

### 4.1.2. 3D: Kernhülle

Die Kernporen der Kerne von A6-Zellen dienten auch als Teststruktur für die 3D-Auswertung mit der von Steve Wolter entwickelten Software *rapidSTORM* [Wolter et al., 2012]. In Zusammenarbeit mit Thorge Holm konnten Aufnahmen mit den beiden Ansätzen Biplane und Astigmatismus gezeigt werden. Die Z-Position der mit mab414 markierten Kernporen, und somit die Krümmung des Zellkerns, wurde farbcodiert wiedergegeben. Details wurden nicht aufgelöst. Die Kernhülle war vor allem deshalb so gut geeignet, da sie trotz eines verhältnismäßig großen Durchmessers (Zellkern) insgesamt sehr „dünn“ markiert war. Eine zu hohe Markierungsdichte kann bei 3D-Aufnahmen zu Problemen führen. Die Ergebnisse zeigen also, dass Messungen und Auswertung bei 3D-*dSTORM* prinzipiell artefaktfrei möglich sind. Die Herausforderung für 3D-Aufnahmen wird in Zukunft zum großen Teil auch in der Probenvorbereitung liegen. So müssen z.B. Hintergrundfluoreszenzen so gering wie möglich gehalten werden.

### 4.1.3. Lebende Zellen: H2B und Lamin C

Die ersten publizierten *dSTORM* Lebendzellaufnahmen wurden mit farbstoffmarkiertem Trimethoprim (TMP), welches an *Escherichia coli* Dihydrofolatreduktase (eDHFR) bindet durchgeführt [Wombacher et al., 2010]. Genau wie bei GFP-Konstrukten, wird auch eDHFR als Fusionsprotein mit dem zu untersuchenden Protein exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung des kommerziell erhältlichen SNAP-Tags sowie zweier dazugehöriger Farbstoffe für Lebendzelleexperimente mit *dSTORM* untersucht. Beim SNAP-Tag handelt es sich um die O<sup>6</sup>-Benzylguanin-DNA-Alkyltransferase, an welche O<sup>6</sup>-Benzylguaninderivate, wie SNAP-Cell 505 oder SNAP-Cell TMR-Star, binden. Das Fusionsprotein H2B-SNAP wurde in verschiedenen Zelllinien (Cos7, Hep2 und 3T3) exprimiert und nach Färbung mit SNAP-Cell TMR-Star erfolgreich mit *dSTORM* hochaufgelöst [Klein et al., 2011]. Die Ergebnisse zeigen auch, dass der verwendete TMR-Farbstoff - genauer gesagt, dessen Radikale - mit 405 nm erfolgreich angeregt werden kann. Mit kurzen Pulsen kann somit die Dichte der fluoreszierenden Farbstoffe reguliert werden. Für ein gutes Bild ist es aber nicht zwingend notwendig diese Wellenlänge zuzuschalten.

In Kotransfektionsexperimenten mit H2B-EGFP konnte die Spezifität der SNAP-Tag-Markierung über die Kolo-kalisation beider Färbungen (SNAP-Cell TMR-Star, EGFP) bestätigt werden. Desweiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Markierung von H2B-SNAPtag mit SNAP-Cell 505 zwar in menschlichen, aber nicht in Mauszellen (3T3, C2C12) funktioniert. Demnach scheint dieser Farbstoff nicht in der Lage zu sein, die murine Kernmembran zu durchdringen.

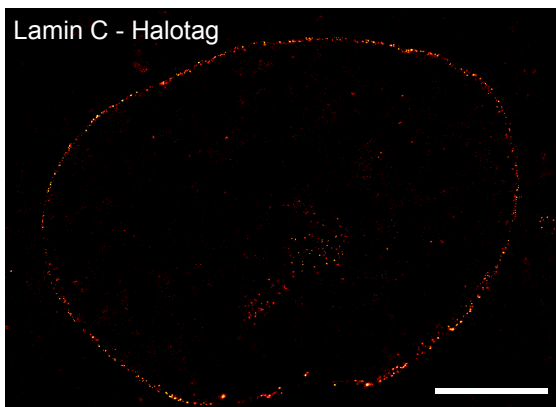


Abbildung 4.1: *dSTORM*-Aufnahme einer lebenden HeLa-Zelle, die mit GNAEGR-mLamin-C Halotag transfiziert und vor der Aufnahme mit dem HaloTag® TMR-Ligand gefärbt wurde. Die Markierung über den Halotag und TMR-Farbstoff ist insgesamt sehr sauber, der markierte Bereich im inneren des Zellkerns ist auf die Faltung der Kernmembran zurückzuführen. Eichstrich: 5 µm

Generell kann man sagen, dass das Core-Histon H2B ein ideales Zielprotein zum Testen von Tags und zugehörigen Farbstoffen für Lebendzellaufnahmen ist, da es sehr immobil ist. Frühere FRAP-Experimente zeigten, dass nur etwa 3% der H2B-Population schnell ausgetauscht werden, 40% dagegen nur sehr langsam und 50% bleiben stabil am Chromatin gebunden [Kimura, 2005].

Ein großes Problem bei *d*STORM in lebenden Zellen liegt darin begründet, dass sich zum einen die Zellen selbst bewegen, und einige Proteine auch eine hohe Dynamik aufweisen. Im Gegensatz zu H2B-SNAP, führten Experimente mit selbstkloniertem SNAP-Tubulin und SNAP-Aktin-Konstrukten zu keinem brauchbaren Ergebnis, d.h. die Struktur war nicht erkennbar. Das äußerst immobile myr-Lamin C [Jahn et al., 2010] hingegen eignete sich ebenfalls sehr gut für die Hochauflösung und wurde erfolgreich als Fusionsprotein mit Halotag getestet (s. Abb. 4.1). Weitere Farbstoffe und Tags wurden von Teresa Klein im Rahmen ihrer Dissertation untersucht.

## 4.2. Korrelative Mikroskopie

*Zu Manuskript 4:*

Während die Elektronenmikroskopie ein elektronendichtes Relief der gesamten biologische Struktur eines Präparats zeigt, liefert das hochaufgelöste überlagerte Fluoreszenzbild Informationen über die Position einzelner, spezifischer Proteine innerhalb dieser Struktur. Die Kernhülle von *Xenopus laevis* Oocyten eignet sich sehr gut für korrelative Mikroskopie, da sie sehr flach auf ein Deckglas präpariert werden kann. Somit können zuerst von unten durch das Deckglas die üblichen *d*STORM-Aufnahmen gemacht werden und später, wenn das Präparat für die EM vorbereitet ist, von oben Bilder mit dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen werden. Da bei der Präparation der Kernhülle in der Regel die cytoplasmatische Seite auf dem Deckglas zu liegen kommt, sieht man auf den korrelativen Aufnahmen im EM meistens die innere, nukleoplasmatische Seite mit den Baskets. Nur durch die Fluoreszenz am *d*STORM-Setup kann nicht beurteilt werden, wie herum die Kernhülle auf dem Deckglas liegt.

Da man die Kernporen aus beiden Bildern einander recht gut zuordnen kann, ist bei diesen Aufnahmen ein intrinsisches Alignment über die Struktur möglich. Die Zentren einiger Kernporen, die optimal übereinander passen, werden in beiden Bildern als zusammengehörige Referenzpunkte (Landmarken) markiert, wodurch das *d*STORM-Bild vor dem Overlay in das EM-Bild transformiert werden kann. Die Transformation erfolgt genauso, wie bei den oben erwähnten Zweifarben-Aufnahmen, mit dem Programm `bUnwarpJ`.

Die Bilder, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden, zeigen, dass eine Kombination aus *d*STORM und SEM unter Verwendung guter Landmarken sehr gut möglich ist. In der Regel kann jedoch nicht die Struktur selbst für das Alignment der Bilder verwendet werden. Dann muss auf Hilfsmarker zurückgegriffen werden, die in der Fluoreszenz und im EM sichtbar sind. Diese dürfen sich dann bei der EM-Probenvorbereitung im Bezug auf ihre strukturelle Umgebung nicht verschieben. Dies wird in Zukunft eine große Herausforderung an die Probenvorbereitung stellen, denn je höher die angestrebte Auflösung der korrelativen Bilder ist, umso kleiner muss der Fehler dieser Landmarken gehalten werden.



### 4.3. ClickOx

*Zu Manuskript 5:*

Die kupferkatalysierte Click-Chemie, welche 2002, in Erweiterung der 1,3 dipolaren Cycloaddition von Rolf Huisgen [Huisgen, 1963], von zwei unabhängigen Gruppen publiziert wurde [Rostovtsev et al., 2002, Tornøe et al., 2002], erfreut sich, einerseits dank ihrer hohen Spezifität und andererseits dank ihrer Einfachheit, zunehmender Beliebtheit. Dies gilt insbesondere für die Hochauflösung, da dort möglichst kleine Fluoreszenzmarker erwünscht sind [Sauer, 2013, van de Linde et al., 2013]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein erweitertes, struktur- und proteinschonendes Click-Protokoll entwickelt und unter dem Namen „ClickOx“ veröffentlicht [Löschberger et al., 2014b].

Das ursprüngliche Ziel bestand darin, eine Zelle im Rahmen eines sFLIM-Projekts mit möglichst vielen Fluoreszenzsonden zu markieren. Da man bei Antikörpern speziesbedingt schnell an Grenzen stößt, wurde zusätzlich auf fluoreszierende Proteine (EGFP, mRFP), Mitotracker (Mitochondrien), Phalloidin (F-Aktin), Draq5 (gesamte DNA) und auch EdU (replizierte DNA), welches über Click-Chemie mit fluoreszenzmarkierten Aziden detektiert wird, zurückgegriffen. Jede dieser Färbungen funktioniert für sich alleine zuverlässig. Erst bei Kombination der Markierungs-Protokolle zeigt sich, ob sie zueinander kompatibel sind.

Die Angaben von Life Technologies zur Inkompatibilität der EdU-Färbung via Click-Chemie mit Phalloidin, sowie der Hinweis, einen Tubulin-Antikörper zum Färben des Cytoskeletts zu verwenden, führten zu der Theorie, dass Aktinfilamente möglicherweise bei dieser Reaktion zerstört werden. Diese Annahme konnte, sowohl experimentell als auch durch Literaturrecherchen, bestätigt werden: Eine Behandlung mit  $\text{CuSO}_4$  führt bei Muscheln zu abgerundeten Filopodien sowie einer Auflösung von Filamenten des Aktin-Netzwerks und desorganisiertem Fibronectin [Fagotti et al., 1996]. Desweiteren schädigt Kupfer insbesondere Leberzellen und kann zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Hydroxylradikalen ( $\cdot\text{OH}$ ), beitragen [Gaetke and Chow, 2003]. Aktinfilamente wiederum depolymerisieren, wenn sie mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt werden [Lassing et al., 2007]. Mit Hilfe von Ascorbinsäure wird nach dem gängigen Click-Protokoll der EdU-Azid-Markierung  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  reduziert [Salic and Mitchison, 2008]. Ascorbat ist jedoch auch in der Lage,  $\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu reduzieren, welches wiederum mit  $\text{Cu}^+$  zu Hydroxylradikalen reagieren kann [Fry, 1998]:



Darauf folgte die Überlegung, der Click-Reaktion den Sauerstoff enzymatisch zu entziehen [Benesch and Benesch, 1953], was zum besseren Photoschalten von Cyaninfarbstoffen auch bei *d*STORM-Messungen gebräuchlich ist [van de Linde et al., 2011]. So wurden im Rahmen dieser Arbeit für die EdU-Markierung der DNA folgende Protokolle miteinander verglichen: Ein bereits publiziertes Standardprotokoll [Salic and Mitchison, 2008], das Protokoll von Life Technologies (gemäß „EdU Imaging Kit“) und das selbst erweiterte „ClickOx“-Protokoll mit Sauerstoffentzug und einem zusätzlichem EDTA-Waschschritt zur Entfernung von  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Schäden am Aktin-Cytoskelett unter Standardbedingungen bei geringer Kupfer-Konzentration in den *d*STORM-Experimenten viel deutlicher zu erkennen sind als auf konfokalen Bildern. Bei letzteren fällt vor allem ein Intensitätsverlust der Fluoreszenz auf. Erhöht man nun die Kupferkonzentration, so ist der zerstörerische Effekt der ROS-Spezies auch hier klar erkennbar. Beim kommerziellen Kit sind alle Aktinfilamente zerstört, wie bereits durch die von Life Technologies erwähnte Inkompatibilität

mit Phalloidin, welches an F-Aktin bindet und dieses stabilisiert, angedeutet. Wird jedoch der Sauerstoff im Reaktionsansatz mit Hilfe von Glucoseoxidase und Katalase entzogen, wie es beim „ClickOx“-Puffer der Fall ist, so bleiben die Feinstrukturen und auch die Fluoreszenz-Intensitäten der Filamente sehr gut erhalten. Die Erhaltung von filamentösen Feinstrukturen ist insbesondere für hochauflösende Mikroskopie-Methoden, wie *d*STORM, von großer Bedeutung.

ROS schädigen jedoch nicht nur Aktinfilamente, sondern führen auch zum Fluoreszenzverlust von fluoreszierenden Proteinen [Alnuami et al., 2008]. Im Vergleich zum Standardprotokoll konnte mit Hilfe des ClickOx Protokolls eine um 67% höhere Intensität der gesamten eYFP-Fluoreszenz in HEK293-Zellen gezeigt werden. Die maximalen Intensitäten (hellsten Pixel) von GFP in PC3-GFP-Zellen lagen unter ClickOx-Bedingungen, sowohl bei niedriger als auch hoher Kupferkonzentration, etwa 46% über dem Standardprotokoll. Da demnach auch fluoreszierende Proteine von diesem Protokoll profitieren, ist auch ein positiver Effekt bei hochauflösenden PALM-Experimenten mit beispielsweise mEos2 oder pamCherry zu erwarten.

Die *in vitro* Zerstörung des Aktinskeletts gehört vermutlich zu den stärkeren Schäden, welche durch ROS in fixierten Zellen erzeugt werden. Doch häufig reicht bereits eine kleine Veränderung von Epitopen, um eine folgende Immunfluoreszenz unmöglich zu machen. Dafür spricht auch die Beobachtung im Rahmen meiner Diplomarbeit, dass Immunfluoreszenzen, welche vor der Click-Reaktion durchgeführt werden, besser funktionieren als solche, die nach der Click-Reaktion durchgeführt werden. Deshalb wurden die AK-Inkubationen damals immer vor der Click-Reaktion durchgeführt [Löschberger, 2009].

Eine Alternative zur kupferhaltigen Click-Chemie arbeitet mit Biarylazacyclooctinonen (BARAC) [Jewett et al., 2010]. Allerdings reagieren gespannte Cyclooctine langsamer mit Aziden als endständige Alkine, welche Kupfer benötigen [Uttamapinant et al., 2012]. Eine andere, etwas schonendere Methode verwendet zwar Kupfer, aber zusätzlich den Kupferchelator THPTA [Hong et al., 2009, Uttamapinant et al., 2012]. Mit einer Kombination aus „ClickOx“ und THPTA sind vermutlich noch bessere Ergebnisse in Bezug auf die Strukturhaltung möglich. Es könnte sich daher lohnen, dieser Fragestellung experimentell nachzugehen, da die Strukturen somit nicht nur vor ROS, sondern auch vor freiem Kupfer geschützt werden, welches ja letztendlich wieder ein Auslöser der ROS Entstehung ist.

### 4.4. Chromatinorganisation: Anwendungsbeispiel D1-Projekt

*Zu Manuskript 6 und Abschnitt 3.2:*

Bereits die CLSM-Bilder zeigten, dass eine starke Expression von D1 zur Akkumulation von DNA führt (s. Abb. 3.1). Während eine niedrige Expressionsrate noch eine gleichmäßige, diffuse Hoechstfärbung zur Folge hat, kommt es bei starker Expression zu großen „Hoechst-Klumpen“. Eine starke Überexpression von HMGA1 führt ebenfalls zu solchen Mustern von DNA im Zellkern, was auf dessen DNA-Cross-Linking-Eigenschaft von HMGA1 zurückzuführen ist [Vogel et al., 2011].

Die offensichtlichen Ähnlichkeiten zwischen HMGA1 und D1 bei Überexpression lassen vermuten, dass bei D1 ein ähnlicher Sachverhalt vorliegt. Um dies zu überprüfen wurde zunächst eine Funktionsmutante (R10×G) des D1-Proteins hergestellt, bei welcher alle AT-Haken funktionsunfähig gemacht wurden (s. Abb. 3.2). DNA in Zellen wurde mit EdU markiert und ihre Anordnung unter dem Einfluss von Transfektionen mit D1-EGFP,

D1-R10×G-EGFP und leerem EGFP-Vektor gezeigt. Die mit *d*STORM hochaufgelösten Bilder bestätigten, dass DNA in der Kontrolle sehr gleichmäßig verteilt ist, was auch bereits von Zessin et al. gezeigt wurde [Zessin et al., 2012]. Wird das wildtypische D1-Protein exprimiert, so kommt es wieder zu einer starken Akkumulation der DNA. Das liegt vermutlich daran, dass D1 mit mindestens sieben AT-Haken - nimmt man die „potentiellen“ AT-Haken mit dazu, sind es sogar zehn - an DNA binden kann. Da das Protein im Vergleich zu HMGA1 auch wesentlich länger ist, kann es durchaus sein, dass es mit unterschiedlichen AT-Haken an unterschiedliche DNA-Stränge bindet und diese somit vernetzt. Die DNA-Muster von R10×G-EGFP und leerem EGFP-Vektor sehen im Weitfeld aus wie die Kontrolle. Die DNA ist hier recht gleichmäßig verteilt, die Mutante scheint also, - wie R3×G bei HMGA1, - tatsächlich nicht mehr an DNA binden zu können. Im hochaufgelösten Bild ist die Verteilung nicht mehr ganz so homogen, allerdings liegen keine extrem dichten Bereiche, wie bei D1-EGFP, vor.

Sobald die Einzelmolekül-Information der *d*STORM-Messungen genutzt wird, um mit den einzelnen Lokalisationen eine Nearest-Neighbor-Analyse durchzuführen, lassen sich die Unterschiede in der Chromatinverteilung über die Schiefe der Nearest-Neighbor-Verteilung (Abweichung von einer idealen Gaußverteilung) darstellen. Hierbei werden die relativen Häufigkeiten der nächsten Nachbarn (im Umkreis von 100 nm) betrachtet (s. Abb. 3.3). Bei der Kontrolle erhält man eine sehr homogene Gaußverteilung, da die DNA hier gleichmäßig im Zellkern verteilt ist. Die starke Akkumulation der Fluoreszenz der Edu markierten DNA bei Expression des wildtypischen D1 Proteins spiegelt sich hingegen in einer hohen Schiefe der Verteilung wider. Anhand dieser Nearest-Neighbor-Verteilung wird nun auch deutlich, dass bereits die Transfektion eines leeren EGFP-Vektors zu einer geringen Umverteilung der DNA im Zellkern führt. Die Ergebnisse von R10×G-EGFP und der Transfektionskontrolle mit leerem EGFP sind im Rahmen des Fehlers identisch (s. Abb. 3.4). Wie erwartet kann demnach R10×G DNA nicht mehr akkumulieren und hat vermutlich keinen - oder zumindest keinen optisch darstellbaren - Einfluss mehr auf die Chromatinorganisation. Die Tatsache, dass die DNA bereits bei einer Transfektion mit EGFP eine andere Verteilung als in der Leer-Kontrolle aufweist, liegt vermutlich darin begründet, dass EGFP keine Affinität zu Chromatin hat und sich somit in den Bereichen außerhalb des Chromatins ansammelt oder dieses auf Grund von Platzmangel auch etwas zusammendrängt.

Um die Mobilität - und somit auch die Affinität zum Chromatin - von D1, R10×G sowie einzelner AT-Gruppierungen zu untersuchen, wurden FRAP-Messungen durchgeführt (s. Abb. 3.6, 3.7 und Tab. 3.1). Um alle Chromatinbereiche mit einzubinden, wurde jeweils der halbe Zellkern gefrap. Das wildtypische D1 weist mit  $t_{\frac{1}{2}} = 21.3 \pm 5.8$  s (SD) die langsamste Fluoreszenzerholung auf. Die zugehörige Funktionsmutante R10×G-EGFP zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine sechsmal schnellere Erholung mit  $t_{\frac{1}{2}} = 3.45 \pm 0.8$  s (SD). Diese Ergebnisse bestätigen, dass D1 mit seinen AT-Haken an Chromatin bindet, und dass R10×G diese Fähigkeit verloren hat. Die Schwankungen innerhalb der FRAP-Messungen lassen sich durch unterschiedliche Kernformen (rund bis länglich) erklären. Die FRAP-Ergebnisse der Deletionsmutanten D1  $\Delta$ C, D1  $\Delta$ N und der dazugehörigen Funktionsmutanten D1  $\Delta$ C R3×G und D1  $\Delta$ N R3×G zeigen, wie erwartet, ähnliche Ergebnisse. Mit  $t_{\frac{1}{2}} = 4.7$  s und  $t_{\frac{1}{2}} = 4.1$  s haben sie eine langsamere Erholung als ihre entsprechenden Funktionsmutanten (je  $t_{\frac{1}{2}} = 1.9$  s), was, wie eben schon erwähnt, damit zu begründen ist, dass nur Fusions-Proteine mit funktionierenden AT-Haken an DNA binden können. Die beiden wildtypischen Deletionsmutanten weisen eine 2.2–2.5 × langsamere Fluoreszenzerholung auf als die entsprechenden R3×G-Mutanten. Anders sieht es bei der wildtypischen Deletionsmutante D1  $\Delta$ NC aus, in welcher die drei „potentiellen“

AT-Haken [Aulner et al., 2002] vorliegen. Sie unterscheidet sich mit  $t_{\frac{1}{2}} = 2.2\text{s}$  kaum von ihrer zugehörigen Funktionsmutante D1  $\Delta$ NC R3 $\times$ G, welche wie die anderen beiden R3 $\times$ G-Mutanten eine Fluoreszenzerholung mit  $t_{\frac{1}{2}} = 1.9\text{s}$  besitzt (s. Tab. 3.1). Das bedeutet, dass diese „potentiellen“ AT-Haken vermutlich nicht wie gedacht an DNA binden und D1  $\Delta$ NC höchstens eine geringfügig höhere Affinität zum Chromatin aufweist als die entsprechende D1  $\Delta$ NC R3 $\times$ G-Mutante.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die potentiellen AT-Haken-Motive „AGRP“, „VGRP“ und „LGRP“ anscheinend nicht in der Lage sind, DNA so zu binden, wie das klassische „RGRP“-Motiv. Um genauere Aussagen treffen zu können, müsste man jedoch die drei potentiellen AT-Haken-Motive getrennt voneinander und im unmittelbaren Vergleich zu „RGRP“ untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das D1-Protein mit mikroskopischen Methoden untersucht. Alles in allem ist auf Grund der Ergebnisse stark davon auszugehen, dass D1 in der Lage ist, DNA quer zu vernetzen. Einen weiteren Hinweis auf die DNA-Quervernetzung durch D1 lieferten Ergebnisse von Ludwig Leidinger, der im Rahmen seines F-Praktikums bei mir zeigen konnte, dass U2Os-Zellen nach Transfektion mit D1-EGFP im Vergleich zu R10 $\times$ G die Mitose nicht überleben. Die starke Verklumpung der DNA durch D1 führte beim Wildtyp zu einer Todesrate von 95%, bei R10 $\times$ G nur zu einer Todesrate von 13%. Hier wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion für weitere 24 h in der Biostation beobachtet. Die Filme zeigten deutlich, dass die Mitose der Zeitpunkt war, den stark transfizierte Zellen nicht überlebten. Folglich macht sich spätestens hier ein negativer Effekt dieser künstlich erzeugten Chromatin-Aggregation bemerkbar. Ob die Cross-Linking-Eigenschaft auf die vorderen und hinteren Gruppen von AT-Haken zurückzuführen ist, welche an separate DNA-Stränge binden, oder ob es eventuell eine Cross-Linking-Domäne wie bei HMGA1 gibt, ist jedoch nicht klar. Hierzu müssten biochemische Versuche, wie z.B. Cross-Linking-Assays mit aufgereinigten Mutanten *in vitro*, durchgeführt werden.

### 4.5. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kernporenkomplex als Modellstruktur für die Hochauflösung eingeführt. Daran konnte gezeigt werden, dass neben sauberen Einfarbenmessungen auch Zweifarben-Experimente und sogar korrelative Aufnahmen mit hoher Qualität möglich sind. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass dies ohne einen qualitativ hochwertigen Antikörper, wie den gegen gp210, nicht möglich gewesen wäre. Der Antikörper erkannte äußerst spezifisch gp210 und erzeugte fast keinen Hintergrund durch unspezifische Bindung.

Desweiteren konnte, in Zusammenarbeit mit Christian Franke, die Einzelmolekülinformation aus *d*STORM-Bildern zur Beschreibung der Chromatinorganisation unter Einfluss von D1 herangezogen werden. Die Nearest-Neighbor-Analyse und die daraus ermittelten Schiefen der Verteilungen der nächsten Nachbarn können verwendet werden, um Informationen über den Verpackungsgrad von DNA zu gewinnen. Man könnte mit diesem Ansatz generell die Verteilung von Chromatinproteinen im Zellkern genauer untersuchen. Anstatt unterschiedliche Chromatinbereiche zu extrahieren, um unterschiedliche Zusammensetzungen des Chromatins biochemisch zu untersuchen, könnte hiermit die Einzelmolekülinformation der *d*STORM-Messungen genutzt werden, um unterschiedliche Dichteverteilungen eines Proteins in unterschiedlichen Chromatinbereichen aufzuzeigen. Man läge hier sicher um einiges näher am nativen Zustand des Chromatins als bei proteinbiochemischen Analysen, wie z.B. der Chromatin-Immunpräzipitation. Da es immer mehr Antikörper gegen spezifische Modifikationen von Chromatinproteinen gibt, könnte

mit *d*STORM ein epigenetisches Mapping von Zellkernen durchgeführt werden. Auch hierfür sind spezifische, hintergrundarme Antikörper Voraussetzung.

Neben guten Antikörpern, sind auch ausgereifte Färbeprotokolle notwendig, um gute Ergebnisse zu erzielen. Hier sei das in dieser Arbeit entwickelte ClickOx-Protokoll genannt, welches bei der Azid-Alkin-Cycloaddition den negativen Einfluss von ROS auf biologische Strukturen, wie z.B. Aktin, reduziert. Im Gegensatz zu CLSM- oder Weitfeldaufnahmen, sind im hochaufgelösten Bild präparationsbedingte, subzelluläre Effekte klar zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass einige „etablierte“ Protokolle, vor allem bei der Verwendung von hochauflösenden Methoden, daraufhin überprüft werden müssen. Permeabilisierungs- oder Fixierungsschritte können strukturelle Auswirkungen mit sich bringen, welche erst ab einer gewissen Auflösung sichtbar werden und dann die Ergebnisse verfälschen. Wenn quantitativ gearbeitet werden soll, muss insbesondere auf die mögliche Veränderung der Epitop-Zugänglichkeit bei unterschiedlichen Fixierungsprotokollen und das Herauswaschen von löslichen Proteinen bei Detergenz enthaltenden Permeabilisierungs- und Waschschritten, geachtet werden.

Folglich zählt die Optimierung der Probenvorbereitung zu den zentralen Aufgaben der Biologie in diesem photophysikalischen Feld. Da es auf Grund der hohen Vielfalt an biologischen Proben und deren unterschiedlichen Eigenschaften kein Standard-Rezept für *d*STORM-Proben geben kann, muss man sich bei allen biologischen Fragestellungen zuerst dieser Herausforderung stellen. Wenn die Probenvorbereitung ausgereift ist, können die Experimente durch Einstellung von Leistungsdichten, Schaltraten (Laserintensität, Ausleuchtung) oder Pufferbedingungen (pH-Wert, MEA-Konzentration) photophysikalisch und photochemisch optimiert werden. Das Ziel sind gute Schaltraten, hohe Photonenausbeuten und auswertbare Lokalisationsdichten [Sauer, 2013, van de Linde et al., 2013, van de Linde and Sauer, 2014]. Dann erhält man auch artefaktfreie Bilder. Das Potential von *d*STORM selbst konnte anhand der Aufnahmen von Kernporenkomplexen, v.a. auch in den Zweifarbenexperimenten, überzeugend gezeigt werden. Vermutlich wird die Lokalisationsmikroskopie - wenn zunächst auch mit erhöhtem Präparationsaufwand verbunden - in den nächsten Jahren eine immer größere Rolle bei der Beantwortung biologischer Fragestellungen einnehmen.

Außerdem stellt die Auswertung der Daten einen extrem wichtigen Aspekt dar, um die Einzelmolekülinformation möglichst vollständig zu nutzen - und nicht nur „hübsche“ Bilder zu erzeugen. Somit ist es sinnvoll, interdisziplinär auf diesem Gebiet zu arbeiten, wie es hier am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik der Universität Würzburg der Fall ist.



# Literaturverzeichnis

- Abbe, E. (1873). *Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Arch. Mikr. Anat. 9.
- Alfageme, C. R., Zweidler, A., Mahowald, A., and Cohen, L. H. (1974). Histones of drosophila embryos. electrophoretic isolation and structural studies. *The Journal of biological chemistry*, 249(12):3729–3736.
- Alnuami, A. A., Zeedi, B., Qadri, S. M., and Ashraf, S. S. (2008). Oxyradical-induced GFP damage and loss of fluorescence. *Int. J. Biol. Macromol.*, 43(2):182–186.
- Aravind, L. and Landsman, D. (1998). AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic acids research*, 26(19):4413–4421.
- Arganda-Carreras, I., Sánchez-Sorzano, C. O., Marabini, R., Carazo, J. M., Ortiz-de Solorzano, C., and Kybic, J. (2006). Consistent and elastic registration of histological sections using vector-spline regularization. *Lecture Notes in Computer Science*, 4241:85–95.
- Aulner, N., Monod, C., Mandicourt, G., Jullien, D., Cuvier, O., Sall, A., Janssen, S., Laemmli, U. K., and Käs, E. (2002). The AT-hook protein d1 is essential for drosophila melanogaster development and is implicated in position-effect variegation. *Mol. Cell. Biol.*, 22(4):1218–1232.
- Baeyer, A. (1871). *Über eine neue Klasse von Farbstoffen*. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 4.
- Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T., and Zhuang, X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 317(5845):1749–1753.
- Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., and Medalia, O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 306(5700):1387–1390.
- Beck, M., Lucić, V., Förster, F., Baumeister, W., and Medalia, O. (2007). Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature*, 449(7162):611–615.
- Benesch, R. E. and Benesch, R. (1953). Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods. *Science*, 118(3068):447–448.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645.
- Bianchi, M. E. and Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15(5):496–506.

- Bobroff, N. (1986). Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. *Rev. Sci. Instrum.*, 57(5):1152–1157.
- Bustin, M. (1999). Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 19(8):5237–5246.
- Callan, H. G. and Tomlin, S. G. (1950). Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. i. investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 137(888):367–378.
- Catez, F. and Hock, R. (2010). Binding and interplay of HMG proteins on chromatin: lessons from live cell imaging. *Biochimica et biophysica acta*, 1799(1-2):15–27.
- Chiappetta, G., Avantaggiato, V., Visconti, R., Fedele, M., Battista, S., Trapasso, F., Merciai, B. M., Fidanza, V., Giancotti, V., Santoro, M., Simeone, A., and Fusco, A. (1996). High level expression of the HMGI (y) gene during embryonic development. *Oncogene*, 13(11):2439–2446.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7):2172–2175.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T., and Matunis, M. J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.*, 158(5):915–927.
- D’Angelo, M. A. and Hetzer, M. W. (2008). Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends Cell Biol.*, 18(10):456–466.
- Davis, L. I. and Blobel, G. (1986). Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. *Cell*, 45(5):699–709.
- Davis, L. I. and Blobel, G. (1987). Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21):7552–7556.
- Earnshaw, W. C. and Laemmli, U. K. (1983). Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. *J. Cell Biol.*, 96(1):84–93.
- Fagotti, A., Di Rosa, I., Simoncelli, F., Pipe, R. K., Panara, F., and Pascolini, R. (1996). The effects of copper on actin and fibronectin organization in mytilus galloprovincialis haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 20(6):383–391.
- Favreau, C., Bastos, R., Cartaud, J., Courvalin, J. C., and Mustonen, P. (2001). Biochemical characterization of nuclear pore complex protein gp210 oligomers. *Eur. J. Biochem*, 268(14):3883–3889.
- Filion, G. J., van Bommel, J. G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L. D., Brugman, W., de Castro, I. J., Kerkhoven, R. M., Bussemaker, H. J., and van Steensel, B. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in drosophila cells. *Cell*, 143(2):212–224.



- Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M., and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*, 269(5623):29–36.
- Fry, S. C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.*, 332 ( Pt 2):507–515.
- Gaetke, L. M. and Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2):147–163.
- Gajewski, A., Lourim, D., and Krohne, G. (1996). An antibody against a glycosylated integral membrane protein of the xenopus laevis nuclear pore complex: a tool for the study of pore complex membranes. *European Journal of Cell Biology*, 71(1):14–21.
- Gall, J. G. (1967). Octagonal nuclear pores. *J Cell Biol*, 32(2):391–399.
- Gerace, L., Ottaviano, Y., and Kondor-Koch, C. (1982). Identification of a major polypeptide of the nuclear pore complex. *The Journal of Cell Biology*, 95(3):826–837.
- Greber, U. F., Senior, A., and Gerace, L. (1990). A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail. *EMBO J*, 9(5):1495–1502.
- Grewal, S. I. S. and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.*, 8(1):35–46.
- Gurdon, J. B. (1976). Injected nuclei in frog oocytes: fate, enlargement, and chromatin dispersal. *Journal of embryology and experimental morphology*, 36(3):523–540.
- Gustafsson, M. G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 198(Pt 2):82–87.
- Harrer, M., Lührs, H., Bustin, M., Scheer, U., and Hock, R. (2004). Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J. Cell. Sci.*, 117(Pt 16):3459–3471.
- Heilemann, M., Margeat, E., Kasper, R., Sauer, M., and Tinnefeld, P. (2005). Cyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(11):3801–3806.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpehl, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47(33):6172–6176.
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., and Mason, M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.*, 91(11):4258–4272.
- Hinshaw, J. E. and Milligan, R. A. (2003). Nuclear pore complexes exceeding eightfold rotational symmetry. *J. Struct. Biol.*, 141(3):259–268.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7(5):311–322.
- Hock, R., Furusawa, T., Ueda, T., and Bustin, M. (2007). HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.*, 17(2):72–79.

- Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Klamp, T., Wiebusch, G., van de Linde, S., and Sauer, M. (2014). A blueprint for cost-efficient localization microscopy. *Chemphyschem*, 15(4):651–654.
- Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C., and Finn, M. G. (2009). Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 48(52):9879–9883.
- Huisgen, R. (1963). 1.3-dipolare cycloadditionen rückschau und ausblick. *Angewandte Chemie*, 75(13):604–637.
- Jahn, D., Schramm, S., Benavente, R., and Alsheimer, M. (2010). Dynamic properties of meiosis-specific lamin c2 and its impact on nuclear envelope integrity. *Nucleus*, 1(3):273–283.
- Jewett, J. C., Sletten, E. M., and Bertozzi, C. R. (2010). Rapid cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(11):3688–3690.
- Johnson, K. R., Lehn, D. A., and Reeves, R. (1989). Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. *Molecular and Cellular Biology*, 9(5):2114–2123.
- Kimura, H. (2005). Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. *DNA Repair (Amst.)*, 4(8):939–950.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., and Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(15):8206–8210.
- Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., van de Linde, S., and Sauer, M. (2011). Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods*, 8(1):7–9.
- Kolb, H. C., Finn, M. G., and Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40(11):2004–2021.
- Krohne, G., Franke, W., and Scheer, U. (1978). Major polypeptides of nuclear-pore complex. *Exp. Cell Res.*, 116(1):85–102.
- Lassing, I., Schmitzberger, F., Björnstedt, M., Holmgren, A., Nordlund, P., Schutt, C. E., and Lindberg, U. (2007). Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. *J. Mol. Biol.*, 370(2):331–348.
- Levinger, L. (1985). Nucleosomal structure of two drosophila melanogaster simple satellites. *J. Biol. Chem.*, 260(21):11799–11804.
- Levinger, L. and Varshavsky, A. (1982). Protein d1 preferentially binds a + t-rich DNA in vitro and is a component of drosophila melanogaster nucleosomes containing a + t-rich satellite DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79(23):7152–7156.
- Luger, K., Dechassa, M. L., and Tremethick, D. J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13(7):436–447.

- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251–260.
- Löschberger, A. (2009). *Die Rolle der HMGN-Proteine bei der Chromatinorganisation und Replikation*. Diplomarbeit. Universität Würzburg, Fakultät für Biologie.
- Löschberger, A., Franke, C., Krohne, G., van de Linde, S., and Sauer, M. (2014a). Correlative *d*storm and scanning electron microscopy. *J. Cell. Sci.* submitted, entered review process.
- Löschberger, A., Niehörster, T., and Sauer, M. (2014b). Click chemistry for the conservation of cellular structures and fluorescent proteins: ClickOx. *Biotechnol J*, 9(5):693–697.
- Löschberger, A., van de Linde, S., Dabauvalle, M.-C., Rieger, B., Heilemann, M., Krohne, G., and Sauer, M. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell. Sci.*, 125(3):570–575.
- Maimon, T., Elad, N., Dahan, I., and Medalia, O. (2012). The human nuclear pore complex as revealed by Cryo-Electron tomography. *Structure*, 20(6):998–1006.
- Meyvis, T. K., De Smedt, S. C., Van Oostveldt, P., and Demeester, J. (1999). Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. *Pharm. Res.*, 16(8):1153–1162.
- Morphew, M. K. (2007). 3D immunolocalization with plastic sections. *Methods Cell Biol.*, 79:493–513.
- Perkovic, M., Kunz, M., Endesfelder, U., Bunse, S., Wigge, C., Yu, Z., Hodirna, V.-V., Scheffer, M. P., Seybert, A., Malkusch, S., Schuman, E. M., Heilemann, M., and Frangakis, A. S. (2014). Correlative light- and electron microscopy with chemical tags. *J. Struct. Biol.*
- Reeves, R. (2001). Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene*, 277(1-2):63–81.
- Reeves, R. (2010). Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochimica et biophysica acta*, 1799(1-2):3–14.
- Renner, U., Ghidelli, S., Schäfer, M. A., and Wiśniewski, J. R. (2000). Alterations in titer and distribution of high mobility group proteins during embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Biochimica et biophysica acta*, 1475(1):99–108.
- Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H., and Ewers, H. (2012). A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods*, 9(6):582–584.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., and Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41(14):2596–2599.
- Sajan, S. A. and Hawkins, R. D. (2012). Methods for identifying higher-order chromatin structure. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 13:59–82.

- Salic, A. and Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7):2415–2420.
- Sauer, M. (2013). Localization microscopy coming of age: from concepts to biological impact. *J. Cell. Sci.*, 126(Pt 16):3505–3513.
- Scheer, U., Dabauvalle, M. C., Krohne, G., Zahedi, R. P., and Sickmann, A. (2005). Nuclear envelopes from amphibian oocytes - from morphology to protein inventory. *Eur. J. Cell Biol.*, 84(2-3):151–162.
- Scheer, U., Dabauvalle, M. C., Merkert, H., and Benevente, R. (1988). The nuclear envelope and the organization of the pore complexes. *Cell Biol. Int. Rep.*, 12(9):669–689.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, 9(7):676–682.
- Schleiden M. J., Schwann T., S. M. (1838). *Beiträge zur Phyto-genesis*. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft Geest u. Portig, Neudruck 1987.
- Schäfer, P., van de Linde, S., Lehmann, J., Sauer, M., and Doose, S. (2013). Methylene blue- and thiol-based oxygen depletion for super-resolution imaging. *Anal. Chem.*, 85(6):3393–3400.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J Cell Comp Physiol*, 59:223–239.
- Smit, P. and Heniger, J. (1975). Antoni van leeuwenhoek (1632-1723) and the discovery of bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 41(3):219–228.
- Smith, M. B. and Weiler, K. S. (2010). Drosophila d1 overexpression induces ectopic pairing of polytene chromosomes and is deleterious to development. *Chromosoma*, 119(3):287–309.
- Sochacki, K. A., Shtengel, G., van Engelenburg, S. B., Hess, H. F., and Taraska, J. W. (2014). Correlative super-resolution fluorescence and metal-replica transmission electron microscopy. *Nat. Methods*, 11(3):305–308.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 11(7):490–501.
- Szyborska, A., de Marco, A., Daigle, N., Cordes, V. C., Briggs, J. A. G., and Ellenberg, J. (2013). Nuclear pore scaffold structure analyzed by super-resolution microscopy and particle averaging. *Science*, 341(6146):655–658.
- Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.*, 82(5):2775–2783.

- Tornøe, C. W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.*, 67(9):3057–3064.
- Tremethick, D. J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 128(4):651–654.
- Uttamapinant, C., Tangpeerachaikul, A., Grecian, S., Clarke, S., Singh, U., Slade, P., Gee, K. R., and Ting, A. Y. (2012). Fast, cell-compatible click chemistry with copper-chelating azides for biomolecular labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(24):5852–5856.
- van de Linde, S., Aufmkolk, S., Franke, C., Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., and Sauer, M. (2013). Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem. Biol.*, 20(1):8–18.
- van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc*, 6(7):991–1009.
- van de Linde, S. and Sauer, M. (2014). How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. *Chemical Society Reviews*, 43(4):1076.
- van de Linde, S., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2010). The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging. *J. Biotechnol.*, 149(4):260–266.
- Vogel, B., Löschberger, A., Sauer, M., and Hock, R. (2011). Cross-linking of DNA through HMGA1 suggests a DNA scaffold. *Nucleic Acids Res.*, 39(16):7124–7133.
- Watanabe, S., Punge, A., Hollopeter, G., Willig, K. I., Hobson, R. J., Davis, M. W., Hell, S. W., and Jorgensen, E. M. (2011). Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nat. Methods*, 8(1):80–84.
- Weiler, K. S. and Chatterjee, S. (2009). The multi-AT-hook chromosomal protein of drosophila melanogaster, d1, is dispensable for viability. *Genetics*, 182(1):145–159.
- Wente, S. R. and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10):a000562.
- Wolter, S., Löschberger, A., Holm, T., Aufmkolk, S., Dabauvalle, M.-C., van de Linde, S., and Sauer, M. (2012). rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat. Methods*, 9(11):1040–1041.
- Wolter, S., Schüttpelz, M., Tscherepanow, M., van de Linde, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2010). Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *J Microsc*, 237(1):12–22.
- Wombacher, R., Heidbreder, M., van de Linde, S., Sheetz, M. P., Heilemann, M., Cornish, V. W., and Sauer, M. (2010). Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat. Methods*, 7(9):717–719.
- Zessin, P. J. M., Finan, K., and Heilemann, M. (2012). Super-resolution fluorescence imaging of chromosomal DNA. *J. Struct. Biol.*, 177(2):344–348.



# A. Anhang

## A.1. Antikörper und Fluoreszenz-Marker

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Antikörper für die Immunfluoreszenz in 1× PBS verdünnt.

Tabelle A.1.: *Antikörper, Phalloidine und Azide, sowie deren Verdünnungen*

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
a-gp210 bzw. asc222a2 (mouse)	Prof. Dr. Georg Krohne	IF: 1:300 - 1:600
mAB 414 (mouse)	Abcam	IF: 1:400
a-POM121 (rabbit)	GeneTex	IF: 1:200
a-Nup153 (mouse)	Abcam	IF: 1:500
mAb72B9, a-Fibrillarin (mouse)	Prof. Dr. U. Scheer	IF: 1:1000
a-HMGA1a (rabbit)	Immunoglobine	IF: 1:100
a-rabbit-Alexa-488 F(ab') <sub>2</sub>	Life Technologies	IF: 1:200
a-rabbit-Alexa-532 IgG	Life Technologies	IF: 1:200
a-rabbit-Alexa-647 F(ab') <sub>2</sub>	Life Technologies	IF: 1:200
a-rabbit-Alexa-700 IgG	Life Technologies	IF: 1:200
a-mouse-Alexa-488 F(ab') <sub>2</sub>	Life Technologies	IF: 1:200
a-mouse-Alexa-532 IgG	Life Technologies	IF: 1:200
a-mouse-Alexa-555 IgG	Life Technologies	IF: 1:200
a-mouse-Alexa-647 F(ab') <sub>2</sub>	Life Technologies	IF: 1:200
a-mouse-Alexa-700 IgG	Life Technologies	IF: 1:200
a-human-Alexa-647 IgG	Life Technologies	IF: 1:200
ATTO 520 Phalloidin	ATTO-TEC	25 nM
Alexa 647 Phalloidin	Life Technologies	1:100
ATTO 655 Phalloidin	ATTO-TEC	100 nM
WGA Alexa 647	Sigma	1–5 µg / µl
ATTO 488 Azid	ATTO-Tec	2 µM
Alexa 647 Azid	Life Technologies	1:2000 - 1:10000

## A.2. Molekularbiologische Arbeitsmittel

### A.2.1. Enzyme

- Restriktionsenzyme FastDigest® (Fermentas Life Sciences)
- Taq-Polymerase (Promega, AG Seibel)
- Phusion Polymerase (Finnzymes)
- T4 Ligase (Fermentas Life Sciences)
- Shrimp Alkalische Phosphatase (Fermentas Life Sciences)
- Reverse Transkriptase (Promega)
- RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase (Fermentas Life Sciences)

### A.2.2. DNA Größenstandards

- FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range (Fermentas Life Sciences)
- GeneRuler™ Express DNA Ladder (Fermentas Life Sciences)

### A.2.3. Kits

- NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)
- QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
- peqGOLD TriFast™ (peqLab)
- FuGene® HD
- Effectene Transfection Reagent (Qiagen)
- TransFectin™ Lipid Reagent (Bio-Rad)
- CloneJET™ PCR Cloning Kit
- nexttec 1-Step DNA Isolation Kit, Tissue & Cells (nexttec Biotechnologie GmbH)

## A.3. Biologisches Material

### A.3.1. Zelllinien

- U2Os Zellen (human)
- Hela Zellen (human)
- A6 Zellen (*Xenopus laevis*), bezogen aus der Zoologie 1
- C2C12-Zellen (murin)
- 3T3-Zellen (murin), bezogen aus der Zoologie 1
- Hep2-Zellen (human), bezogen aus der Zoologie 1
- PC3-GFP Zellen (human)



### A.3.2. Bakterienstämme

- *E. coli* XL1 Blue
- *E. coli* Rosetta™ DE3 (Novagen)

## A.4. Medien und Puffer

### A.4.1. Zellkultur

*Medium für 3T3 und Hep2-Zellen:*

- DMEM 1000  $\frac{mg}{l}$  (Gibco)
- 10% FCS (Gibco)
- 1% L-Glutamin (Gibco)
- 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco)

*Medium für U2Os-Zellen:*

- DMEM 1000  $\frac{mg}{l}$  F-12 Ham (PAA)
- 10% FCS (PAA)
- 1% L-Glutamin (PAA)
- 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma)

*Medium für C2C12-Zellen:*

- DMEM 4500  $\frac{mg}{l}$  (PAA)
- 10% FCS (PAA)
- 1% L-Glutamin (PAA)
- 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma)
- % 1100  $\frac{mg}{l}$  Na-Pyruvat (Sigma)

*weitere Lösungen für die Zellkultur*

- Trypsin (Sigma)
- 1× PBS verdünnt aus 10× PBS (PAA)

### A.4.2. dSTORM

*GlucOx Enzymmix [5 ml]*

- 125 µl KCl (1 M)
- 110 µl Tris-HCl pH 7.0 (1 M)
- 10000 U Glucose Oxidase (Sigma)
- 200000 U Katalase (Sigma)
- 20 µl TCEP (1 M)
- 50% Glycerin für Lagerung bei -20°C

### A.5. Oligonucleotide

Primer für PCR-Reaktionen auf DNA-Basis wurden bei Biomers bestellt. Für die reverse Transkription wurden random Primer von Promega benutzt. Nicht alle Primer waren für diese Arbeit relevant, sind der Vollständigkeit halber jedoch mitaufgeführt.

Tabelle A.2.: Liste der erstellten Primer

ID	Name	Sequenz
001	pJet-fwd-seq	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
002	pJet-rev-seq	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
003	prSeta-fwd-seq	GCTAGCATGACTGGTGGACAGC
004	prSeta-rev-seq	GCAGCAGCCAACTCAGCTTCC
005	pBAD/HisB-fwd-seq	GGCGTCACACTTTGCTATGCC
006	pBAD/HisB-rev-seq	CAGACCGCTTCTGCGTTCTG
007	pEGFP-N1-rev-seq	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
008	pEGFP-N1-fwd-seq	GCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA
009	pSnap-tagm-fwd-seq	CTCACTATAGGGAGACCCAAGC
010	pSnap-tagm-rev-seq	GCTATCCAGGGTGGTGCCTTC
014	pamcherry-kolpcr	CTGAAGGTGACCAAGGGTGGC
015	mEos2-kolpcr	CACCACTTTGTGATCGACGGA
016	mCENPA-ecoRI-fwd	GAATTCATGGGCCCGCGTCGCAAAC
017	mCENPA-ecoRI-rev	GAATTCGGGGAGTCCGCCCTCGAAGC
018	mTubG1-EcoRI-FWD	GAATTCATGCCGAGAGAAATCATCACC
019	mTubG1-EcoRI-rev	GAATTCCTGCTCCTGGGTGCCCCAG
020	hCENPA-ecoRI-fwd	GAATTCATGGGCCCGCGCCGCGGAG
021	hCENPA-ecoRI-rev	GAATTCGCCGAGTCCCTCCTCAAGG
022	hNup62-xmaI-fwd	CCCGGGATGAGCGGGTTTAATTTTG
023	hNup62-g-xmaI-rev	CCCGGGCGTCAAAGGTGATCCGGAAG
034	mTubA1a-bam-fwd	GGATCCATGCGTGAGTGCATCTCCATCC
035	mTubA1a-bam-rev	GGATCCTTAGTATTCCTCTCCTTCTTCC
036	mActA1-eco-fwd	GAATTCATGTGCGACGAAGACGAGACC
037	mActA1-ecoRI-rev	GAATTCGAAGCATTTGCGGTGCACAATG

038	PAmCherry-C1-herstellung-rev	GAATTCGAAGCTTGAGCTCGAGAT CTGAGTCCGGACTTGTACAGCTCG TCCATGCC
039	PAmCherryN2-herstellung-fwd	GGATCCACCGGCCGGTCGCCACCAT GGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAAC
040	mEos2-N2-herstellung-fwd	GGATCCACCGGCCGGTCGCCACCAT GAGTGCGATTAAGCCAGACATGAAG
041	mEos2-C1-herstellung-rev	GAATTCGAAGCTTGAGCTCGAGAT CTGAGTCCGGATCGTCTGGCATTG TCAGGCAATCC
042	HMGA1a-fwd-ecoRI	GAATTCATGAGTGAGTCGAGCTCGAAGTCC
043	HMGA1a-rev-linker-cys-stop-ecoRI	GAATTCACAACCCAGGATTCCCTG CTCCTCCTCCGAGGACTCCTGC
044	EGFP-Backbone-seq-rev	GCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGG
045	GNAEGR-mLamC-fwd-ecoRI	GAATTCATGGGGAACGCTGAGGGCCGCGAG
046	GNAEGR-mLamC-rev-EcoRI	GAATTCGCGGCGGCTGCCACTCACACGGTG
050	hHMGB1-EcoRI-fwd	GAATTCATGGGCAAAGGAGATCCTAAGAAG
051	hHMGB1-EcoRI-rev	GAATTCCTTCATCATCATCTTCTTCTTC
060	HMGA1a-rev+trp	GAATTCACCAACCCAGGATCTGCTCCTC CTCCGAGGACTCCTGCGAG
061	Drosi-D1-varA-fwd-ecorI	GAATTCATGGAGGAAGTTGCGGTAAAGAAG
062	Drosi-D1-varA-rev-ecorI	GAATTCAGGCAGCTACCGATTCCGGAATC GTTG
063	Drosi-D1-varA-rev-ohne-stop-ecorI	GAATTCGGCAGCTACCGATTCCGGAATCGTTG
064	dD1-little-hmga-rev-eco	GAATTCGCCCGTCCTCCTCCCCCTCGTC
065	dD1-little-hmga-fuerpet28-rev-eco	GAATTCAGCCGTCTCCTCCCCCTCGTC
066	Haloseq-rev-fuerBam	CAGGACTTCCACATAATGGGGGTC
067	seq-rev-fuer-eco	CTCGAGAGCTCGCCTGCAGGAATTG
076	dD1-111-191-ecorI-fwd	GAATTCGATTTCGGTGAAGACGCCCGGTTT
077	dD1-111-191-rev-ecorI	GAATTCCTCCCCATCGCCATTGGACTCGAC
078	dD1-111-191-stop-ecorI-rev	GAATTCCTCCCCATCGCCATTGGACTCGAC
079	dD1-C-terminus-ecorI-fwd	GAATTCACCAAGTGCCCAAGAAACGCGGTC
080	GFP-GFPN2-fwd-eco+g	GAATTCGTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCAC
081	GFP-GFPN2-rev-hindIII	CAAGCTTGGGCTGCAGGTCGAGGGATCTTC
082	gfp-snapbackbone-rev-bamHI	GGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG CCGAG
083	gfp-snapbone-fwd-eco-pro-gly-ser	GAATTCACCAAGTACCATGGTGAGCAA GGGCGAGGAG
096	dD1-little2-ecorI-atg-fwd	GAATTCATGGATTTCGGTGAAGACGCCCGGTTT
097	dD1-deltaC-ecorI-atg-fwd	GAATTCATGCCACAAGTGCCCAAGAAACGCG
101	Cox8a-ecorIfwd	GAATTCATGTCCGTCTGACGCCGCTG
102	Cox8a-linker-ecori-reverse	GAATTCACCGGTCTGTACAGATTTAAATGC

## A.6. Konstrukte

Die Konstrukte wurden alle von mir selbst geplant und die dafür nötigen Primer designed (siehe A.2). Ludwig Leidinger hat im Rahmen seines F-Praktikums und seiner Bachelor-Arbeit, die ich betreut habe, einige der dD1-Mutanten kloniert (s. Tabelle).

Tabelle A.3.: Liste aller erstellter oder verwendeter Konstrukte

<b>ID</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>Kommentar</b>
A-01	pamCherry pBAD/His B	aus Bielefeld
A-02	mEOS2 pRSet A	aus Bielefeld
A-03	pSNAPm-tag leer	NEB
A-05	pSNAP H2B	NEB
A-06	pEGFP N1 leer	Clontech
A-07	pEGFP N2 leer	Clontech
A-08	pEGFP N3 leer	Clontech
A-09	pEGFP C1 leer	Clontech
A-10	pEGFP C2 leer	Clontech
A-11	pEGFP C3 leer	Clontech
A-12	pet28a leer	Novagen
A-13	pRSet a leer	Invitrogen
A-14	dD1-pEGFPN2	selbst kloniert
A-15	pamCherry-überhang-pJet für N1	selbst kloniert
A-17	H2B-EGFP	aus Bielefeld
A-20	mTubA1a	selbst kloniert
A-24	mEos2-pJet für N1	selbst kloniert
A-26	mActA1 pJet	selbst kloniert
A-27	LaminC-EGFP	Manfred Alsheimer
A-31	Pet21a – leer	Zoologie 1
A-33	mTubA1a pSNAPtag	selbst kloniert
A-35	PamCherry für C1 pJet	selbst kloniert
A-36	pet28a leer	A-12 umtransformiert
A-40	dD1-mEos	selbst kloniert
A-43	mAct1a-SNAPtag	selbst kloniert
A-45	dD1-PAmCherry	selbst kloniert
A-49	mEos pJet für C1	selbst kloniert
A-50	PAmCherry pJet für N2	selbst kloniert
A-51	mEos pJet für N2	selbst kloniert
A-52	dD1-pJet für pet28a	selbst kloniert
A-53	PAmCherry C1	selbst kloniert
A-55	dD1-SNAPtag	selbst kloniert
A-56	dD1-pet28a	selbst kloniert
A-57	mEOS2 C1	selbst kloniert
A-58	hHMGA1a-Tryptophantag	selbst kloniert
A-59	hHMGA1a-Cysteintag	selbst kloniert
A-60	hCenpA pJet	selbst kloniert
A-63	dD1-pJet für mEos	selbst kloniert
A-65	hHMGA1a-Cyst-pet21a	selbst kloniert
A-66	hCenpA-Snap-tag	selbst kloniert
A-68	mEOS2 N1	selbst kloniert/T. Klein

A-69	GNAEGR-mLaminC-pJet	selbst kloniert auf A-27
A-70	mRFP-leer	aus Zoologie 1
A-76	GNAEGER-mLaminC-pSnaptag	selbst kloniert
A-75	Halotag leer c-terminal	Promega Kol 1
A-76	Halotag leer c-terminal	Promega Kol 2

<b>ID</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>Kommentar</b>
B-03	PAmCherry N1	selbst kloniert/T. Klein
B-04	mEOS2 N2	selbst kloniert/T. Klein
B-05	PAmCherry N2	selbst kloniert/T. Klein
B-19	LamC-GNAEGR-fuerHalo pJet	selbst kloniert
B-22	Halotag n-terminal	Promega
B-23	dD1 R10xG	selbst designed, GeneArt®
B-27	dD1-R3xG-Del-mut für N2 pJet	selbst kloniert
B-28	dD1-R3xG-Del-mut für pet28a	selbst kloniert
B-30	dD1-R10xG für pet pJet	selbst kloniert
B-31	dD1-Delmut-little HMGA für pet	selbst kloniert
B-32	dD1-R10xG-pEGFPN2	selbst kloniert
B-33	dD1-R10xG-pSNAPtag	selbst kloniert
B-34	dD1-R10xG-pHalotag	selbst kloniert
B-35	CenpA-Halotag	selbst kloniert
B-36	dD1-Delmut little HMGA1a	selbst kloniert
B-37	dD1-R10xG pet28a	selbst kloniert
B-38	dD1-Delmut little HMGA Halotag	selbst kloniert
B-39	dD1-Delmut little HMGA SNAPtag	selbst kloniert
B-40	dD1-Delmut little HMGA SNAPf	Ludwig Leidinger
B-41	pSNAPf-tag leer	NEB
B-51	dD1-littleHMGA fuer N2 pJet	selbst kloniert
B-56	pCAG-GFP mutiert	selbst kloniert
B-59	pCAG-GFP mutiert	selbst kloniert
B-60p	CAG-GFP addgene	addgene
B-62	pJet GFP fuer CAG-GFPN2 pJet	selbst kloniert
B-62	pJet EGFP fuer Snapbone pJet	selbst kloniert
B-63	CAG-GFP leer	addgene
B-67	dD1-little2 pSNAPftag	Ludwig Leidinger
B-68	dD1deltaC pSNAPftag	Ludwig Leidinger
B-72	dD1 wildtype pSNAPftag	Ludwig Leidinger
B-73	dD1-R10xG pSNAPftag	Ludwig Leidinger
B-76	GFP-SNAPbone	selbst kloniert
B-77	dD1-littleHMGA2 (ATG) pJet	Ludwig Leidinger
B-78	dD1-deltaC (ATG) pJet	Ludwig Leidinger

Tabelle A.5.: Liste aller erstellten oder verwendeten Konstrukte

<b>ID</b>	<b>Konstrukt</b>	<b>Kommentar</b>
C-02	dD1 Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-03	dD1-R10xG Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-04	dD1-Delmut-little2 pJet	Ludwig Leidinger
C-05	dD1-Delmut-deltaC pJet	Ludwig Leidinger
C-06	dD1-littleHMGA Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-07	dD1-R3xG Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-15	dD1-C-Terminus WT Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-19	dD1-C-little2 WT Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-21	dD1-little1 R3xG Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-22	dD1-little 2 wt Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-24	dD1-little 2 R3xG Snapbone-GFP	Ludwig Leidinger
C-37	Cox8a-Snapbone-GFP	selbst kloniert

## A.7. Programme, Online-Tools und Internetdatenbanken

- Andor SOLIS for Imaging
- *rapid*STORM 1
- *rapid*STORM 2
- *rapid*STORM 3
- Fiji (ImageJ)
- OriginPro 8.5G
- GIMP 2.8.10 (The GNU Image Manipulation Program)
- ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch>)
- BLAST, Pubmed und Sequenzsuchen auf den Seiten des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
- ISI Web of Knowledge (<http://apps.isiknowledge.com>)
- Inkscape 0.48 (Vektorgrafik)
- L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X(Textsatzprogramm)

## A.8. Geräte

- Biostation IM (Nikon)
- Brutschrank CO<sub>2</sub>-Auto-Zero (Hereaus)
- Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop JSM-7500F
- Gelsystem für Agarosegele Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT (BIO-RAD)

- Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM710 (Zeiss)
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SP2/AOBS (Leica Lasertechnik GmbH)
- Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)
- Magnetrührer IKAMAG® RCT (Willi Fischer KG Laboratoriumsbedarf, Frankfurt/Main)
- Mikrowelle NN-K105WB (Panasonic)
- Minifuge RF (Heraeus Sepatech)
- Nanophotometer™ Pearl (Implen)
- Pipetten (Abimed)
- PowerPac™ Basic 300V/400mA/75W (BIO-RAD)
- Präzisions-pH-Meter E510 (Metrohm Herisau)
- Schüttelinkubator IKA® KS 4000 i control (IKA)
- Tischzentrifuge Harmony Mini-Centrifuge MCF-1350 (LMS)
- Thermocycler C1000™ Thermal Cyclers (BIO-RAD)
- Thermoschüttler TS1 Thermoshaker (biometra)
- UV-Geldokumentation Intas Gel Imager (INTAS)
- Vortex GLW L46 (Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg)

### A.8.1. Laser

#### *Setup 1:*

- 405 nm: Cube 405-100C (Coherent)
- 488 nm: Sapphire 488 LP (Coherent)
- 532 nm: Nano250 (Linos)
- 641 nm: Cube 640-100C (Coherent)

#### *Setup 2:*

- 488 nm: iBeam Smart (Toptica)
- 514 nm: Genesis MX 514-500 STM (Coherent)
- 639 nm: Genesis MX 639-1000 (Coherent)

### A.8.2. EMCCD-Kameras

- iXON DU897 (Andor)
- iXON Ultra (Andor)

## A.9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicilin
AK	Antikörper
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
DG	Deckgläschen
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dSTORM	<i>direct</i> stochastic optical reconstruction microscopy
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
g; <i>g</i>	Gramm; Erdbeschleunigung (gravity)
G	Guanin
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HMG	High Mobility Group
IF	Immunfluoreszenz
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	<i>Luria Broth</i> ; ein Bakterienmedium
m	Meter
M	molar
<i>M</i>	Median
mA	Milli-Ampere
MEA	$\beta$ Mercaptoethylamine, Cysteamine
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mM	millimolar
mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein



mRNA	messenger RNA
n	nano
N	Anzahl
NLS	Kernlokalisierungssignal
NPC	Kernporenkomplex
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi (für die Analyse)
PALM	photoactivated localization microscopy
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PSF	Punktspreizfunktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
s	Sekunde
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SB	Natrium-Borat
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
SEM	Rasterelektronenmikroskopie
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween-20	Polyoxyethylen-20-Sorbitan-Monolaurat
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
vv	Volumen pro Volumen
wv	Gewicht pro Volumen



## B. Manuskripte

Die Manuskripte befinden sich in den gedruckten Versionen der Dissertation und sind desweiteren online bei den jeweiligen Verlagen verfügbar.



# Publikationsliste

## 2011:

Klein T., Löschberger A., Proppert S., Wolter S., van de Linde S. and Sauer M. (2011). Live-cell *d*STORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nat. Methods*. 8(1):7-9.

Vogel B., Löschberger A., Sauer M. and Hock R. Cross-linking of DNA through HMGA1 suggests a DNA scaffold. (2011). *Nucleic Acids Res.*, 39(16):7124-33.

van de Linde S., Löschberger A., Klein T., Heidebreder M., Wolter S., Heilemann M. and Sauer M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protoc.* 6(7): 991-1009.

## 2012:

Löschberger A., van de Linde S., Dabauvalle M. C., Rieger B., Heilemann M., Krohne G. and Sauer M. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell Sci.* 125: 570-575.

Wolter S., Löschberger A., Holm T., Aufmkolk S., Dabauvalle M.-C., van de Linde S. and Sauer M. (2012). *rapid*STORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat. Methods* 9(11): 1040-1041.

## 2013:

van de Linde S., Aufmkolk S., Franke C., Holm T., Klein T., Löschberger A., Proppert S., Wolter S. and Sauer M. (2013). Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem. Biol.* 20(1):8-18.

## 2014:

Holm T., Klein T., Löschberger A., Klamp T., Wiebusch G., van de Linde S. and Sauer M. (2013). A Blueprint for Cost-Efficient Localization Microscopy. *Chemphyschem.* 15(4):651–654.

Löschberger A., Niehörster T. and Sauer M. (2014). Click chemistry for the conservation of cellular structures and fluorescent proteins: ClickOx. *Biotechnol. J.*, 9(5):693-697.

Löschberger A., Franke C., Krohne, G., van de Linde S. and Sauer M. (2014). Correlative *d*STORM and scanning electron microscopy *J. Cell Sci.*, submitted (entered review process)



# Teilnahme an wissenschaftlichen Veranstaltungen

Oktober 2010	Teilnahme an Trends in Microscopy, Berlin
Oktober 2011	Trends in Microscopy, Würzburg, <b>Poster</b>
Januar 2012	47th Winterseminar, Klosters, Schweiz <b>Vortrag:</b> The nuclear pore complex as seen by <i>d</i> STORM
Februar 2012	Biophysical Society 56th Annual Meeting, San Diego, USA <b>Posterpräsentation:</b> The nuclear pore complex as seen by <i>d</i> STORM
März 2012	Besuch der Analytica 2012, München
Januar 2013	48th Winterseminar, Klosters, Schweiz, <b>Mitarbeit Poster</b>
Juli 2013	<b>Biozentrumspreis, Vortrag:</b> A model structure for super-resolution: The nuclear pore complex as seen by <i>d</i> STORM
Oktober 2013	EMBO EMBL Symposium: Seeing is Believing- Imaging the Processes of Life, Heidelberg, <b>Posterpräsentation</b>
Januar 2014	49th Winterseminar, Klosters, <b>Posterpräsentation</b>
April 2014	Besuch der Analytica 2014, München





# Danksagung

Hier möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Markus Sauer dafür bedanken, dass er mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat, mir die Möglichkeit gegeben hat spannende Projekte zu bearbeiten und mir dabei wirklich sehr viel Freiheit bei der Gestaltung meiner Arbeit gewährt hat.

Desweiteren danke ich Georg Krohne für die Unterstützung beim “Kernporen-Projekt”, d.h. für die Bereitstellung des besten Antikörpers aller Zeiten, unzähligen Präparationen, gemeinsamen Messungen am SEM und nicht zuletzt natürlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

An dieser Stelle auch ein Dankeschön an Marie-Christine Dabauvalle für das Präparieren vieler Kernhüllen und auch ein Dankeschön an Markus Engstler dafür, dass ich vor allem in der Anfangszeit noch ein paar Dinge an “meinem alten Lehrstuhl“ machen durfte.

Ich danke auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls. Danke an Lisa und Petra für die vielen Zellen, Danke an Marcus für viele große und kleine praktische Dinge, wie z.B. die PDMS-Kammern, Danke an Oli für die Hilfe bei Computer-Problemen, Danke an Albert und Willi für das Basteln von neuen und Warten von alten Laborgeräten, Danke an Astrid und Sigrid für eure stetige freundliche Unterstützung, wenns mal um “Papierkram“ ging. Ihr habt alle dazu beigetragen, dass die Arbeit “am Laufen“ blieb.

Ein ganz großes Danke geht an Sepp für die Einführung in die Welt der Laser, Farbstoffe und einzelnen Moleküle. Du hattest bei Fragen aller Art immer ein offenes Ohr und hast vor allem als begeisternder Wissenschaftler zu einem tollen Arbeitsklima beigetragen.

Danke an Christian und Steve für ihre Hilfe bei der Auswertung sowie der geduldigen und verständlichen Übersetzung selbiger für Nicht-Physiker/Informatiker.

Danke auch all meinen Labor- und Bürokollegen für die tolle Zeit. Dazu gehören:

... zu allererst Teresa, die mich während der ganzen Zeit in der Biotech begleitet hat. Am Anfang waren wir zwar in der Unterzahl (Biologen), aber wir haben uns wacker geschlagen! Neben all dem Ernst der Arbeit, war es auch immer wieder lustig. Danke für unzählige Gespräche, Tipps, und das Verständnis bei gewissen Problemen. So manche kleine Dinge waren zusammen doch leichter zu ertragen ☺. Danke für eine tolle Zeit!

... Thorge für die Hilfe bei Fragen rund ums Setup, vor allem auch Danke für die Geduld bei anfänglichen Problemchen a la “der Shutter war ja noch zu.”, aber auch

für viele erheiternde Gespräche in und außerhalb der Uni, z.B. beim Segeln ☺. Unsere Zeit als Bürokollegen war leider etwas kurz, sie wird mir aber stets in Erinnerung bleiben!

... Thonie, der für alles in der Physik (und meistens auch darüber hinaus) eine Erklärung parat hat und auch mal die Arbeit liegen lässt, um aufmerksam und neugierig die spannenden Gesprächen seiner Bürokolleginnen zu verfolgen. Ich denke wir haben uns in den letzten zwei Jahren gegenseitig recht gut unterstützt und hatten darüber hinaus auch sonst jede Menge Spaß, wie z.B. beim Skifahren oder Segeln. Auch vielen Dank fürs Korrektur-Lesen!

... Joseph, der anfangs mit Tracy und mir das Triumvirat der Molbio gebildet hat und mit dem man stundenlang über alles mögliche (auch gruselige Sachen) diskutieren kann,

... Ludwig, der eine klasse Bachelorarbeit bei mir gemacht hat,

... Sven, der öfter mal seine Kaffeetasse bei uns ausgesetzt hat,

... sowie natürlich auch allen anderen hier am Lehrstuhl - es hat Spaß gemacht mit euch!

Mein größter Dank gehört meinem Benny, der immer sehr viel Zeit und Verständnis für mich aufgebracht hat und von dem ich ursprünglich auch das wissenschaftliche Arbeiten gelernt habe, sowie natürlich meiner Familie für ihre stetige Unterstützung während der ganzen Zeit. Ihr musstet euch immer wieder die verschiedensten Dinge anhören und da es natürlich nicht immer nur einfach war, danke ich euch auch für eure Geduld. Ein ganz besonderer Dank wird immer auch meinem Opa gehören, der leider nur noch die Anfangszeit dieser Arbeit erleben durfte, aber ohne den ich nicht das geworden wäre, was ich jetzt bin.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg erkläre ich hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig, ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt wurde und ich keine anderen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, als angegeben.

Außerdem versichere ich an Eides statt, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen habe und auch keine Person oder Organisation entgeltlich beauftragt habe, mir einen Betreuer für die Dissertation zu suchen.

Desweiteren erkläre ich hiermit, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden.

Weiterhin habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen, oder diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Neben dem Grad des Diplom-Biologen habe ich noch keine weiteren akademischen Grade erworben.

Würzburg, Mai 2014

.....

