

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Strukturelle Analyse von Kernporenkomplexen mittels Kryoelektronentomographie

Martin Beck

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff
3. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner (schriftliche Beurteilung)
Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 18.10.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 10.01.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	4
Abstract	5
1 Einleitung	4
1.1 Komponenten des Kerntransportsystems	4
1.1.1 Substrate	4
1.1.2 Karyopherine und Transportfaktoren	5
1.1.3 Nukleoporine	7
1.2 Transportmechanismus	10
1.3 Elektronenmikroskopische Analyse von Kernporenkomplexen	14
1.3.1 Entdeckung und Morphologie von Kernporen	14
1.3.2 Dreidimensionale Rekonstruktionen der Kernpore	16
1.3.3 Abbildung von Substraten während des Kerntransportes	17
1.4 Zielsetzung und Fragestellung	19
2 Hintergrund	21
2.1 Präparation von biologischen Proben für Transmissionselektronenmikroskopie	21
2.2 Transmissionselektronenmikroskopie	22
2.2.1 Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskopes	22
2.2.2 Bildentstehung	24
2.3 Kryo-Elektronentomographie	26
2.3.1 Dosisverteilung und Strahlenschäden	26
2.3.2 Automatisierte Datenaufnahme	27
2.4 Dreidimensionale Rekonstruktion	28
2.4.1 Tomographische Rekonstruktion	29
2.4.2 Einzelpartikel-Rekonstruktion	31
3 Materialien und Methoden	34
3.1 Standardmethoden	34
3.2 Proteinreinigung	34

3.2.1	Importin α	35
3.2.2	Importin β	35
3.2.3	NLS-2xGFP	35
3.2.4	Hefeproteasom	35
3.3	Proteinmarkierung	36
3.3.1	FITC-Markierung	36
3.3.2	Gold-Konjugation von Proteinen	36
3.4	Zellkultur	38
3.4.1	<i>E. coli</i>	38
3.4.2	HeLa-Zellen	38
3.4.3	<i>Dictyostelium discoideum</i>	38
3.5	Anreicherung von Zellkernen	39
3.5.1	Anreicherung für Elektronenmikroskopie	39
3.5.2	Reinigung zur Homogenität für Biochemie	40
3.6	<i>Import assays</i>	41
3.7	Lichtmikroskopie	42
3.8	Elektronenmikroskopie	43
3.8.1	Kryo-Präparation	43
3.8.2	Kryo-Elektronentomographie (Kryo-ET)	43
3.9	Bildbearbeitung	44
3.9.1	Rekonstruktion von Tomogrammen	44
3.9.2	Datenverarbeitung von Einzelpartikeln	44
3.10	Klonierung von <i>D. discoideum</i> -Nukleoporinen	48
3.10.1	Sequenz-Alignierung	48
3.10.2	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion	48
3.10.3	Klonierung, Subklonierung, Sequenzanalyse	52
3.11	Expression von <i>Dictyostelium</i> Nukleoporinen	53
3.11.1	Transformation	53
3.11.2	<i>Dilution cloning</i>	53
3.11.3	Sporulation	54
3.11.4	Synchronisieren von <i>D. discoideum</i> -Zellen	54
4	Ergebnisse und Diskussion	55
4.1	Präparation und Kryo-ET von isolierten und transportaktiven Zellkernen	55
4.2	Einzelpartikelanalyse von <i>D. discoideum</i> -Kernporen (NPCs)	58
4.2.1	Struktur des <i>D. discoideum</i> -Kernporenkomplexes	59
4.2.2	Einzelpartikelanalyse von NPC-Proteomeren	61
4.3	Einzelpartikel-Klassifizierung und Analyse von goldmarkierten Importsubstraten	65

4.3.1	Klassifizierung der Masse im zentralen Kanal (CP)	66
4.3.2	Lokalisierung von goldkonjugierten Transportkomplexen	71
4.3.3	Klassifizierung durch multivariate statistische Analyse	76
4.3.4	Implikationen für den Transportmechanismus	78
4.4	Lokalisierung von <i>D. discoideum</i> -Nukleoporinen während des Zellzyklus	80
4.4.1	Identifikation von <i>D. discoideum</i> -Nukleoporinen	80
4.4.2	Verhalten während der Mitose	82
5	Zusammenfassung und Ausblick	85
	Abkürzungen	88
	Literaturverzeichnis	89
	Danksagung	100

Zusammenfassung

Kernporenkomplexe ermöglichen den Stoffaustausch zwischen Zellkern und Zytoplasma. Im Rahmen dieser Arbeit wurden isolierte, transportaktive Zellkerne des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* mittels Kryo-Elektronentomographie untersucht. Diese Strategie ermöglicht die strukturelle Analyse von Kernporen (NPCs) im Zusammenhang mit der Kernhülle, als aktives Kerntransportsystem im quasi-nativen Zustand. Kernporen wurden in den erhaltenen Tomogrammen identifiziert und in einem Einzelpartikelverfahren analysiert. Die resultierende Kryo-EM-Struktur des *D. discoideum*-Kernporenkomplexes weist nicht nur alle bekannten morphologischen Details auf sondern wurde auch erstmals isotrop abgetastet und bis 8,8 nm aufgelöst (Kapitel 4.2.1). Durch die symmetrieunabhängige Analyse von etwa 4200 einzelnen NPC-Proteomeren¹ (asymmetrischen Einheiten) konnte die Auflösung bis auf 5,8 nm gesteigert werden und neue strukturelle Details wurden sichtbar (Kapitel 4.2.2). Einige Substrukturen der Kernporen, insbesondere die Masse im zentralen Kanal (CP) zeigten ein dynamisches Verhalten. Durch die Klassifizierung von NPC-Einzelpartikeln und die Lokalisierung von goldmarkierten Importkomplexen während des Transports, gelang es bestimmte Positionen des CP einzelnen Schritten des Importvorgangs zuzuordnen. Diese Korrelation zwischen strukturellen Zuständen und einzelnen Schritten des Kerntransports ermöglichte neue mechanistische Interpretationen (Kapitel 4.3.4).

¹Kernporen besitzen eine achtfache Rotationsymmetrie im Bezug auf die nukleozytoplasmatische Achse. Da jede der acht asymmetrischen Einheiten aus dreißig Proteinkomponenten besteht, die in bis zu vier Kopien pro Einheit vorkommen, werden sie in dieser Arbeit als Proteomere bezeichnet. Der Proteomer-Begriff wird im ursprünglichen Sinne in der Virologie auch zur Bezeichnung von Assemblierungszuständen verwendet, dies ist hier aber nicht gemeint.

Abstract

Nuclear pore complexes (NPCs) are large macromolecular assemblies and the only gateways for nucleocytoplasmic exchange. Mainly due to their sheer size, the structural and functional characterization using traditional methods has been challenging. To analyze their structure in a close-to-life state, transport-active, intact nuclei from *Dictyostelium discoideum* were studied by means of cryo-electron tomography. Subvolumes of the tomograms containing individual NPCs were extracted *in silico* and subjected to three-dimensional classification and averaging, whereby distinct structural states were observed. The central plug/transporter (CP) was variable in volume and could occupy different positions along the nucleocytoplasmic axis, supporting the notion that it essentially represents cargo in transit. Changes in the position of the CP were accompanied by structural rearrangements in the NPC scaffold. Furthermore, gold labelling techniques were used to trace import complexes during their translocation. Implications for the transport mechanism are discussed. Finally, by performing a single particle analysis of about 4200 nuclear pore proteomers (asymmetric units), an isotropically sampled structure resolved to 5.8 nm was obtained.

1. Einleitung

Ein wesentlicher Fortschritt bei der Evolution von eukaryontischen Zellen war ihre Unterteilung in Kompartimente mit differenzierten Funktionen. Die Aufrechterhaltung der unterschiedlichen Proteinkompositionen in den einzelnen Kompartimenten erfordert einen selektiven Transport von Makromolekülen über biologische Membranen. Kernporenkomplexe (*nuclear pore complexes*, NPCs) durchspannen die innere und äußere Kernmembran und ermöglichen den Stoffaustausch zwischen Kern- und Zytoplasma. Der evolutionäre Ursprung des NPC ist umstritten (Antonin und Mattaj 2005), erklärt sich aber möglicherweise aus seiner Verwandtschaft mit COP-Proteinkomplexen (coatamer proteins). Die COPI- und COPII-Komplexe erfüllen bestimmte Aufgaben bei der Membrankrümmung und Membranfusion in Falle des Golgi-Apparats und *coated vesicles* die funktionell mit dem Problem der Fusion der beiden Kernmembranen vergleichbar sind (Devos et al. 2004).

1.1 Komponenten des Kerntransportsystems

1.1.1 Substrate

Im Zellkern finden biologische Prozesse wie Transkription, Prozessierung von Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNAs), Chromatinkondensation, Assemblierung ribosomaler Untereinheiten, sowie Replikation und Reparatur von Desoxyribonukleinsäuren (*deoxyribonucleic acid*, DNAs) statt. Demzufolge müssen bestimmte Proteine wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, Ribonukleoproteine, Histone sowie ribosomale Proteine und Polymerasen nach ihrer Synthese im Zytoplasma in den Kern importiert werden. Die wichtigsten Substrate für den Export aus dem Zellkern sind ribosomale

Untereinheiten und andere Ribonucleoproteine sowie RNAs. Das Kerntransportsystem muß daher sehr effizient aber auch spezifisch funktionieren.

Die Erkennung von Substraten erfolgt auch beim Kerntransport, wie bei allen anderen Sortierungsvorgängen in der Zelle, gemäß der Signalhypothese (Blobel 2000). Substratproteine enthalten eine Signalsequenz aus 5 bis 10 Aminosäuren in ihrer Primärstruktur, welche die Lokalisierung in der Zelle bestimmt. Proteine, die in den Kern transportiert werden, enthalten mindestens ein Importsignal (*nuclear localization signal*, NLS) und zu exportierende Proteine dementsprechend Exportsignale (*nuclear export signal*, NES). Es existieren mehrere verschiedene NLS- und auch NES-Sequenzen in jedem Organismus. RNAs können nur im Komplex mit Proteinen exportiert werden. Die Diskriminierung unreifer Boten-RNA (mRNA) beim Export stellt eine wichtige Qualitätskontrolle dar.

1.1.2 Karyopherine und Transportfaktoren

Karyopherine, auch Importine, Exportine oder Transportrezeptoren genannt, erkennen und binden die Kerntransportsignale der Substrate. Die Interaktion eines so formierten Transportkomplexes mit dem NPC wird durch spezielle Eigenschaften der Karyopherine vermittelt (Kapitel 1.2). Importine und Exportine binden an unterschiedliche NLS- beziehungsweise NES-Sequenzen. Daraus erklärt sich die Spezifität des Transportsystems für verschiedene Substrate. Die Aktivität von Transportrezeptoren wurde erstmalig Mitte der Neunziger Jahre beschrieben (Görlich et al. 1994; Radu et al. 1995; Görlich et al. 1995).

Importin α bindet an die zuerst beschriebene klassische NLS-Sequenz. Desweiteren interagiert Importin α mit Importin β und bildet so einen Importkomplex. Importin β übernimmt die Wechselwirkung mit dem NPC während des eigentlichen Transportvorganges. Die N-terminale Domäne von Importin α (*importin β binding domain*, IBB) enthält eine intrinsische NLS, die eine autoinhibitorische Wirkung auf die zentrale NLS bindende Domäne ausübt. Importin β bindet und blockiert die autoinhibitorische Domäne von Importin α und ermöglicht so die Interaktion mit einem Substratimportsignal (Chook und Blobel 2001). Inzwischen wurden verschiedene nicht klassische NLS identifiziert, die meistens direkt, selten über Adaptorproteine an

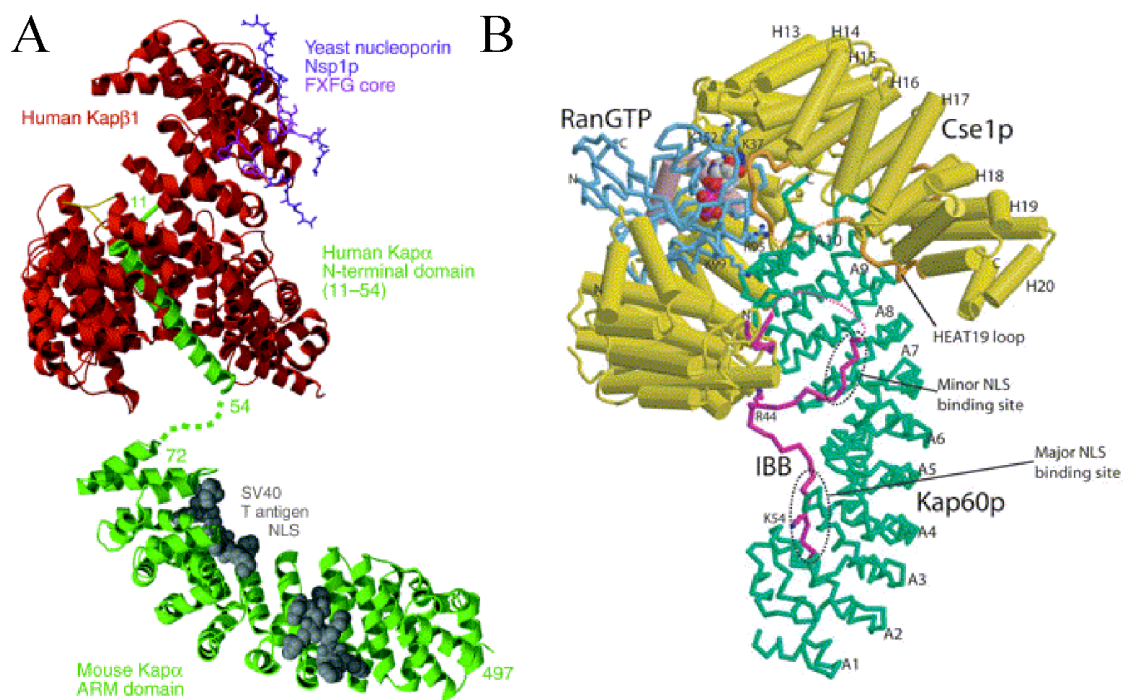


Abbildung 1.1: A. Modell eines Importkomplexes aus NLS/Importin α /Importin β angedockt an die FXFG-Motive eines Nukleoporins. Dieses Modell besteht aus den Kristallstrukturen zweier Subkomplexe (Chook und Blobel 2001). B. Kristallstruktur des Exportkomplexes aus Cse1p/Karyopherin 60p/RanGTP. Die N-terminale IBB-Domäne von Karyopherin 60p ist in magenta, α -Sekundärstrukturen sind als Zylinder dargestellt (Matsuura und Stewart 2004).

Importin β -Homologe binden. Es gibt mindestens 20 verschiedene humane Proteine, die zur Importin β -Familie gehören und unterschiedliche Substrate auf ihrem Transportweg begleiten. Bekannte Vertreter und ihre Substrate sind zum Beispiel Snurportin (snRNPs), Transportin (hnRNP) und Importin 7/Karyopherin β 1 (Histon H1). Die Tertiärstruktur aller Proteine dieser Familie setzt sich aus repetitiven α -Helices (HEATs) zusammen. Bei Importin α bilden multiple α -helikale Elemente (*armadillo repeats*, ARMs) eine superhelikale Tertiärstruktur aus (Abb. 1.1).

Die Struktur und Funktionsweise von Exportinen scheint denen von Importinen zu entsprechen (Abb. 1.1). Exportine mit bekannten Funktionen sowie Substraten sind zum Beispiel Crm1 (Proteine mit Leucin-reicher NES), CAS (Importin α), Exportin-t

(t-RNAs), Exportin 4 (Elongationsfaktor 5A). Das Hefe-Karyopherin 121p übt Funktionen beim Import und Export unterschiedlicher Substrate aus (Chook und Blobel 2001).

Transportfaktoren komplettieren das Bild der nicht stationären Komponenten des Kerntransportsystems. Die kleine GTPase Ran ist ein für fast alle Transportwege essentieller Transportfaktor und wurde 1993 unabhängig von zwei Forschungsgruppen entdeckt (Moore und Blobel 1993; Melchior et al. 1993). Da RanGAP (*Ran GTPase-activating Protein*) zytoplasmatisch und RanGEF (*Ran guanine nucleotide exchange factor*) im Kernplasma vorkommt, existiert Ran jeweils bevorzugt in seiner GTP-gebundenen Form im Zellkern und als RanGDP im Zytoplasma. Diese zwei Zustände werden in der Literatur oft als Ran-Gradient bezeichnet und sind für vektoriellen Transport notwendig. RanGTP bindet an Importkomplexe sobald sie das Kernplasma erreichen. Diese Interaktion initiiert die Dissoziation des Substrates. Der verbleibende Importin β -RanGTP-Komplex diffundiert zurück ins Zytoplasma, während für Importin α ein spezifisches Exportin existiert (siehe oben). Demgegenüber bindet RanGTP an Exportkomplexe bereits im Kernplasma. Allerdings tritt hierbei eine Stabilisierung des Komplexes ein. Erst nach dem Transport in das Zytoplasma wird durch die Hydrolyse von GTP eine Dissoziation des Substrates initiiert. Freies RanGDP bindet nun an NTF2 (*nuclear transport factor 2*) und kehrt zurück ins Kernplasma, wo der Austausch von GDP zu GTP stattfindet (Wente 2000).

1.1.3 Nukleoporine

Nukleoporine (*nucleoporins*, Nups) sind die stationären Bestandteile des Kernporenkomplexes. Mit der Weiterentwicklung von Präparationsmethoden und Massenspektrometrie konnte man den Kreis der Nukleoporine von anfangs 120 bis 150 Kandidaten auf circa 30 eingrenzen. Die NPCs von niederen und höheren Eukaryonten besitzen die gleiche Anzahl von Nukleoporinen, obwohl die Ähnlichkeit der Primärstruktur im Vergleich zu anderen Proteinfamilien gering ist (Rout et al. 2000; Cronshaw et al. 2002).

Die Röntgenkristallstruktur der N-terminalen Domäne von Nup159 aus Hefe entspricht dem Faltungsmotiv eines β -Propellers und übt eine Funktion beim Export

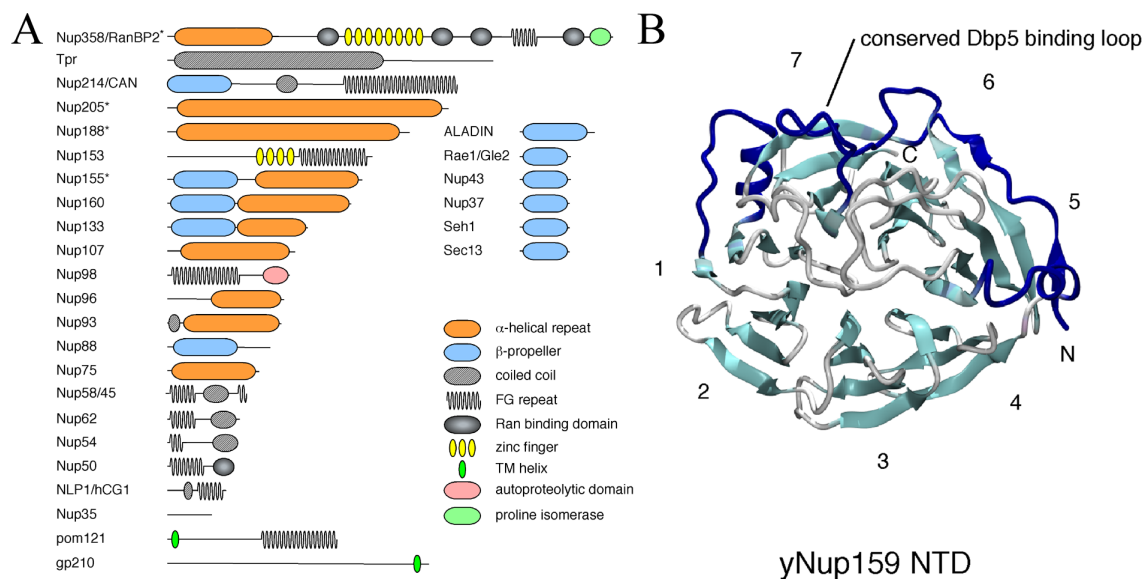


Abbildung 1.2: A. Primärstrukturelemente der Bestandteile des Vertebraten-NPC. B. Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von yNup159 (homolog zu hNup214). Das Faltungsmotiv des sieben-blättrigen- β -Propellers kommt wahrscheinlich bei einigen Nups vor (Schwartz 2005).

von mRNA aus (Berke et al. 2004; Weirich et al. 2004). Andere Daten für Nup-Strukturelemente basieren auf Sequenzanalysen, Sekundärstrukturvorhersagen beziehungsweise Aktivitätstests. Weitere wichtige Motive sind α -Armadillos, FG-repetitive Elemente (Phenylalanin-Glycin), Ran-bindende Domänen sowie *coiled coils* und Zinkfinger (Abb. 1.2). Einige Nukleoporine enthalten besondere Strukturelemente. Das Nup98/Nup96 Vorläuferprotein z.B. besitzt eine autoproteolytische Domäne mit deren Hilfe es sich in Nup98 und Nup96 aufspaltet. Das Größte aller Nukleoporine, Nup358 (Synonym: RanBP2), ist sowohl eine SUMO1-E3-Ligase (Pichler et al. 2002) als auch eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase. Die beiden Proteine POM121 und gp210 besitzen Transmembranhelices. Während eine große lumenale Domäne von gp210 wahrscheinlich den Übergang von Membranproteinen von der äußeren zur inneren Kernmembran erleichtert, verankert POM121 den NPC im Kernmembransystem (Mattaj 2004).

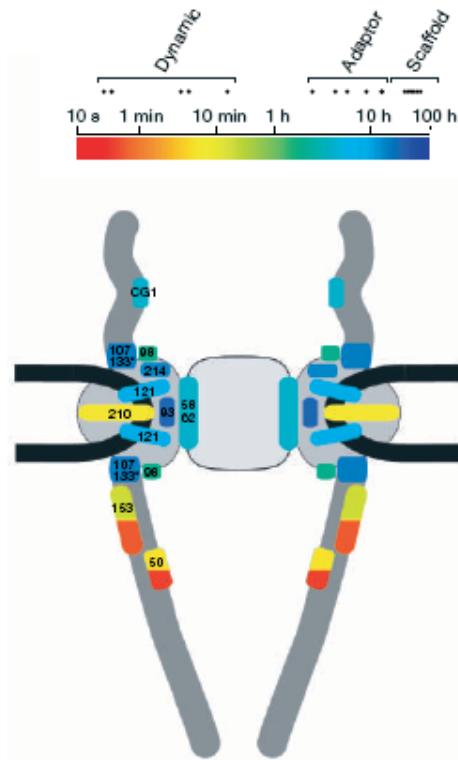


Abbildung 1.3: Dynamische Karte des NPC. Nucleoporine lassen sich gemäß ihrer mittleren Verweilzeit am NPC in drei Gruppen unterteilen: dynamische, Adaptor- und Gerüst-Nucleoporine (Rabut et al. 2004).

Eine besondere Stellung nimmt die Klasse der FG-Nucleoporine ein. Diese Nucleoporine enthalten Domänen mit dem repetitiven Primärstrukturmotiv Phenylalanin-Glycin. Diese Domänen besitzen keine konventionelle Sekundärstruktur, vielmehr interagieren sie "Tentakel-artig" miteinander und bilden so eine hydrophobe Phase im zentralen Transportkanal des NPC (Suntharalingam und Wentz 2003).

Die etablierte Unterteilung der Komponenten des Transportsystems in lösliche (Karyopherine und Transportfaktoren), sowie stationäre Bestandteile (Nucleoporine), wurde kürzlich weiter verfeinert. Die Anwendung von iFRAP (*inverse Fluorescence Recovery after Photobleaching*) ermöglichte die Bestimmung der mittleren Verweilzeiten von circa zwanzig mit Grün fluoreszierendem Protein (GFP) markierten Nucleoporinen am NPC (Rabut et al. 2004). Die erhaltenen Werte weisen eine starke Variation auf und führten zur Aufteilung in drei Untergruppen. Nucleoporine mit mittleren Verweilzeiten im Sekunden- oder Minutenbereich wurden als dynamisch eingestuft (*dynamic Nups*). Allerdings wurden nur für drei Vertreter kleinere Werte als 2,5 Stunden gemessen. Sechs Nucleoporine mit Werten von 2,5-30 Stunden wurden als strukturelle Adaptoren eingeordnet (*adaptor Nups*). Die zehn Vertreter der

größten Gruppe, die Gerüst-Nukleoporine (*scaffold Nups*), wiesen mittlere Verweilzeiten von mehr als 35 Stunden auf. Die Strukturbestimmung des NPC mit Methoden die auf Mittelung beruhen, wird durch das zum Teil dynamische Verhalten der Nukleoporine erschwert. Die in Abb. 1.3 dargestellte Karte des NPC gibt einen guten Überblick über statische und dynamische Komponenten.

1.2 Transportmechanismus

Kernporen ermöglichen die passive Diffusion kleinerer Moleküle von bis zu 40 kDa. Der spezifische Transport größerer Substrate erfolgt durch die Interaktion von Karyopherinen mit FG-Nukleoporinen. Der präzise Mechanismus dieser Interaktion ist ungeklärt, wird aber durch mehrere Modelle beschrieben.

Ein älteres Modell erklärt den gerichteten Transport mit einem Affinitätsgradienten entlang des zentralen Kanals (Ben-Efraim und Gerace 2001). Dieser könnte durch Variationen des x im FxFG-Motiv der FG-Nukleoporine gebildet werden. Demzufolge würden sich Transportkomplexe entlang dieses Gradienten bewegen und dabei von einem Interaktionspartner zum jeweils nächsten mit höherer Affinität "springen". Die Dissoziation vom letzten Interaktionspartner (höchster Affinität) wäre nur unter aktiven Energieaufwand möglich. Tatsächlich werden die Dissoziationskonstanten von Karyopherin- β 1 und Nukleoporinen entlang der Transportrichtung kleiner (Peters 2005). Allerdings sind die meisten FG-Nukleoporine nicht asymmetrisch entlang der nukleozytoplasmatischen Achse verteilt (Rout et al. 2003). Desweiteren zeigen kinetische Studien, daß Wechselwirkungen mit hoher Affinität nicht erforderlich sind.

Gemäß dem *selective phase*-Modell ist der zentrale Kanal des NPC mit einem hydrophoben Medium gefüllt (Ribbeck und Görlich 2001). Diese Phase wird durch schwache hydrophobe Interaktionen der ungefalteten, flexiblen FG-reichen Domänen gebildet und hat die Eigenschaften einer konzentrierten Polymerlösung. Karyopherine haben zum Teil hydrophobe Oberflächen und können in den zentralen Kanal diffundieren. Inerte Moleküle haben hydrophile Oberflächeneigenschaften und können deshalb keine hydrophoben Wechselwirkungen eingehen. Sie werden nicht transportiert, weil ihre Oberflächeneigenschaften das "Auflösen" im zentralen Kanal verhindern. Ein ähnliches Konzept liegt dem *virtual gating*-Modell zu Grunde (Rout et al. 2003). Hierbei

werden Transportkomplexe die mit dem NPC interagieren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit transportiert als andere Moleküle (Fahrenkrog und Aebi 2003; Becskei und Mattaj 2005). Allerdings geht man dabei nicht von hydrophoben Wechselwirkungen sondern spezifischen Affinitäten von Karyopherinen zu FG-Nukleoporinen aus. Die Evidenz für einen hydrophoben zentralen Kanal beruht auf der Tatsache, daß die dort lokalisierten Nukleoporine relativ viele Phenylalanine in ihren FG-Domänen besitzen. Ob schwache hydrophobe Interaktionen zwischen verschiedenen FG-Domänen zu einem hydrophoben Kollaps, also Aggregation führen würden, bleibt umstritten.

Vor allem das *selective phase*-Modell wird durch verschiedene experimentelle Ergebnisse unterstützt (Ribbeck und Görlich 2001; Ribbeck und Görlich 2002). Die Transportrate definiert sich anhand des Diffusionsflusses von Transportkomplexen J ($\text{mol nm}^{-2} \text{s}^{-1}$) gemäß des 1. Fickschen Gesetzes:

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (1.1)$$

wobei D der Diffusionskoeffizient ist und der Differentialquotient $\frac{\partial C}{\partial x}$ den Konzentrationsunterschied von Transportkomplexen im Zytoplasma und Kernplasma beschreibt. Die Permeabilität P ist direkt proportional zum Verteilungskoeffizienten K :

$$P = \frac{KD}{I} \quad (1.2)$$

Für den diskreten Fall mit einer Länge I des zentralen Kanals ergibt sich ein Konzentrationsunterschied von ΔC und entsprechend für den Diffusionsfluß von Transportkomplexen J (Becskei und Mattaj 2005):

$$J = \frac{KD}{I} \Delta C \quad (1.3)$$

Demnach ist die mittlere Verweilzeit eines Transportkomplexes im zentralen Kanal umso kleiner, je größer sein Diffusionskoeffizient ist. Diese Größe wurde für ein Fusionsprotein mit klassischer NLS und zwei Molekülen GFP (NLS-2xGFP) und für 2xGFP allein bestimmt (Yang et al. 2004). Der Diffusionskoeffizient eines NLS-2xGFP-Importkomplexes sollte also wegen der hydrophoben Oberflächeneigenschaften von Importinen größer sein als bei 2xGFP allein. Tatsächlich ist die gemessene mittlere Verweilzeit von NLS-2xGFP (10 ms) sehr viel kleiner als bei 2xGFP (150 ms).

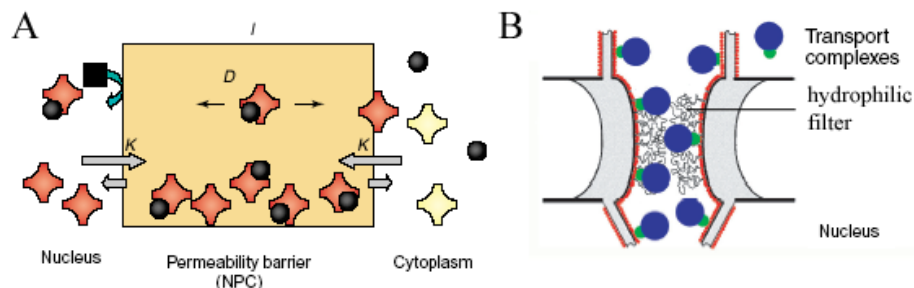


Abbildung 1.4: A. Export gemäß dem *selective phase*-Modell (Beckei und Mattaj 2005) mit dem FG-Netzwerk in braun, innerten Molekülen in schwarz und Exportinen als Rauten. Durch die Hydrolyse von RanGTP im Zytoplasma wird das Substrat entlassen. B. Kerntransport gemäß dem *Reduction of Dimensionality*-Modell (Peters 2005) mit FG-Motiven in rot, Karyopherinen in grün und Substraten in blau. Transportkomplexe bewegen sich zweidimensional entlang der FG-Motive.

Diese Werte wurden mittels zeitlich und räumlich hochauflösender Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie auch für andere Substrate und Transportfaktoren bestimmt. Ob die erzielte Genauigkeit von 30 nm beziehungsweise 2 ms ausreicht um Trajektorien von Einzelmolekülen aufzunehmen, ist jedoch umstritten (Peters 2005). Dennoch zeigten die Experimente von Yang *et al.* auch, daß Transportkomplexe innerhalb des zentralen Kanals zufällig gemäß der Brownschen Molekularbewegung diffundieren, was dem *selective phase*-Modell entsprechen würde (Yang *et al.* 2004). Zusammenfassend besteht ein einzelner Transportvorgang aus 3 Schritten: dem Eintreten in den zentralen Kanal, ungerichteter Diffusion im zentralen Kanal und dem Verlassen des zentralen Kanals (Abb. 1.4A). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt könnte also sowohl das Eintreten als auch das Verlassen der hydrophoben Phase sein.

Kürzlich wurde das *Reduction of Dimensionality*-Modell für Kerntransport vorgeschlagen (Peters 2005). Ihm liegt die Idee zugrunde, daß FG-Motive (rot) die Oberfläche des zentralen Kanals auskleiden, während ein hydrophiler Selektionsfilter das eigentliche Volumen einnimmt (Abb. 1.4B). Demnach würden Karyopherine (grün) nur zweidimensional (2D) entlang der Oberfläche diffundieren und Substrate (blau) in den Selektionsfilter exponiert. Die Reduktion der Freiheitsgrade für zufällige Diffusion im zentralen Kanal um eine Dimension erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß

Transportkomplexe die Barriere in kürzerer Zeit überwinden. Die ungehinderte Diffusion kleiner Moleküle wird mit einer 8-10 nm breiten Passage in der Mitte des Kanals erklärt. Die Oberflächeneigenschaften der Substrate wären nicht mehr relevant, da sie sich im hydrophilen Selektionsfilter bewegen. Beim *selective phase*-Modell hingegen kompensieren Karyopherine für die Oberflächeneigenschaften der Substrate (Ribbeck und Görlich 2002) und die freie Diffusion kleiner Moleküle wird durch die Maschengröße des Netzwerkes ermöglicht.

Einen weiteren Beweis für die wesentliche Rolle der FG-Nukleoporine lieferten die Experimente mit "minimal funktionellen" NPCs (Strawn et al. 2004). Hierbei wurden 13 verschiedenen FG-Domänen der Kernpore aus Hefe entfernt. Nur eine einzige dieser Domänen stellte sich als essentiell heraus. Die unterschiedlichen Deletionen wurden dann kombiniert und ein vitaler Hefestamm mit "minimal funktionellen" Kernporen mit sieben Deletionen konstruiert. Die Aufrechterhaltung einer hydrophoben Barriere im zentralen Kanal erscheint also wichtiger als spezifische Funktionen einzelner FG-Domänen. Dennoch wurden die Transportraten bestimmter Substrate von den einzelnen Deletionen zum Teil unterschiedlich beeinflusst. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, daß nicht alle Substrate nach exakt dem gleichen Mechanismus transportiert werden.

Systembiologische Methoden ermöglichten inzwischen die Analyse des Importin α/β Transportsystems in einem Computermodell (Riddick und Macara 2005). Die notwendigen Dissoziationskonstanten der beteiligten Interaktionspartner wurden bereits zuvor bestimmt. Dieses Modell machte Vorhersagen, welche experimentell bestätigt werden konnten. Überraschenderweise haben hohe Konzentrationen von Importin β and RanGEF einen inhibierenden Effekt.

Nicht zuletzt kostet der Transport entgegen eines Konzentrationsgefälles Energie. Der Transportvorgang selbst ist reversibel und energieunabhängig. Der Reaktionszyklus der kleinen GTPase Ran reguliert Bindung und Freigabe von Substraten und liefert so die notwendige Energie (Weis 2002).

1.3 Elektronenmikroskopische Analyse von Kernporenkomplexen

1.3.1 Entdeckung und Morphologie von Kernporen

Eine regelmäßige poröse Struktur in der Kernhülle (*nuclear envelope*, NE) von Kralenfröschen wurde erstmals 1950 als *nuclear annuli* beschrieben (Callan und Tomlin 1950). Anderson publizierte 1953 die Hypothese, die Kernhülle sei permeabel für Makromoleküle und enthalte Poren (Anderson 1953). Er stieß auf Interesse, aber auch auf Widerstand (Hogeboom und Schneider 1953). Diese Hypothese stand einer Theorie gegenüber, welche die Kontrolle über die Prozesse im Zellkern durch kleinere Moleküle während der Interphase favorisierte. Der Transport von Genprodukten in das Zytoplasma wurde mit der Deassemblierung der Kernhülle während der Mitose erklärt. Zur gleichen Zeit ermöglichten Fortschritte bei der Präparation von Proben für die Elektronenmikroskopie zahlreiche Entdeckungen (Palade 1952). Bereits Mitte der 50er Jahre wurde die Kernpore, unterstützt durch mehrere elektronenmikroskopische Untersuchungen (Watson 1954; Afzelius 1955), als ubiquitärer Bestandteil der Kernhülle anerkannt. Experimente von Feldherr lieferten erste Beweise für den Transport durch Kernporen (Feldherr 1962). Er beschichtete 5 nm Goldpartikel mit Polyvinylpyrrolidon und mikroinjizierte diese in das Zytoplasma von Amöben. Die Analyse durch Elektronenmikroskopie ergab eine zeitabhängige Anreicherung im Zellkern. Feldherr fand einige der Goldpartikel im Zentrum der Kernporen und schlug den Transport von "zumindest einigen Goldpartikeln" durch einen zentralen Kanal vor (Abb. 1.5).

Der grundsätzliche Aufbau des NPC ist in Abb. 1.6D zusammengefasst. Der NPC besitzt eine achtfache Rotationssymmetrie bezüglich der nukleozytoplasmatischen Achse und eine Masse von 90-120 MDa bei Vertebraten, beziehungsweise 50 MDa im Fall von Hefe (Fahrenkrog und Aebi 2003). Drei übereinander liegende Ringe, der zytoplasmatische Ring, der Speichenring und der nukleäre Ring umschließen den zentralen Kanal. Der Speichenring besteht aus acht Speichen. Sowohl mit dem zytoplasmatischen Ring als auch mit dem nukleären Ring sind jeweils acht Filamente verbunden. Die nukleären Filamente bilden zusammen mit dem distalen Ring den

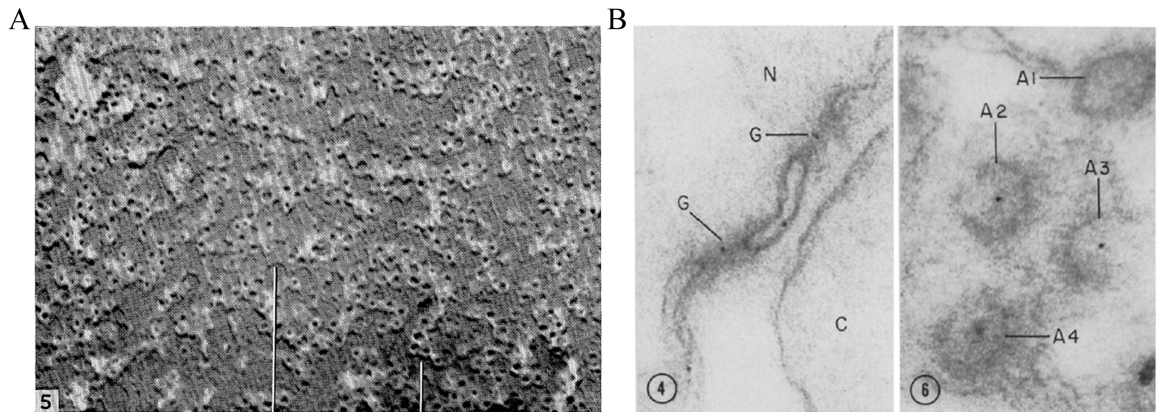


Abbildung 1.5: A. Callan und Tomlin bildeten erstmals Kernporen ab. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Krallenfrosch-Kernmembran, chemisch fixiert, auf Formvar-Film, kontrastiert durch Palladium-Beschichtung (Callan und Tomlin 1950). B. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kernporen die Goldpartikel (G) transportieren. Dünnschnitt einer fixierten und Plastik-eingebetteten Amöbenzelle mit Zellkern (N) und Zytoplasma (C). Modifiziert nach (Feldherr 1962).

nuclear basket. Die Masse im zentralen Kanal wird als *central plug* (CP) oder *central transporter* bezeichnet und hat wahrscheinlich keine definierte Struktur, sondern besteht aus FG-Domänen und Transportkomplexen. Die Kombination verschiedener Technologien und Experimente ermöglichte die Erforschung des prinzipiellen Aufbaus von Kernporen.

Durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, siehe Kapitel 2.2) von Plastik-eingebetteten, schwermetallkontrastierten Dünnschnitten wurden morphologische Bestandteile der Kernpore, wie die zytoplasmatischen und nukleären Filamente und der CP identifiziert (Franke et al. 1981). Die erste Analyse des NPC durch Kryo-TEM (siehe Kapitel 2.1) wurde 1989 durchgeführt (Akey 1989; Akey und Goldfarb 1989). Die drei übereinander liegenden Ringe, welche den zentralen Kanal bilden, wurden hier erstmalig beschrieben. Desweiteren erschien der NPC 822-symmetrisch, also achtfach rotationssymmetrisch bezüglich der nukleozytoplasmatischen Achse (z-Achse) und spiegelsymmetrisch im Bezug auf die x- und y-Achsen. Während TEM schon frühzeitig qualitative Daten über Kernporen lieferte (Afzelius 1955), wurden

genauere morphologische Details durch Rasterelektronenmikroskopie¹ (*scanning electron microscopy*, SEM) aufgedeckt. Die Anwendung von SEM auf schwermetallkontrastierte NEs ermöglichte Ris erstmalig die Abbildung des *nuclear basket* (Ris 1991). Durch diese Arbeit wurde die bis zu diesem Zeitpunkt angenommene 822-Symmetrie wiederlegt. In Kombination mit biochemischen Methoden wie Detergens-Extraktion und Proteolyse konnten jedoch auch innere Strukturen des NPC, wie die drei Ringe, analysiert werden (Goldberg und Allen 1996).

Die Identifikation der Nukleopore durch Massenspektrometrie ermöglichte ihre Lokalisierung mittels Immunogold-Markierung. Hierbei wurden Plastik-eingebettete Dünnschnitte mit Gold-konjugierten Antikörpern markiert und mittels TEM analysiert (Rout et al. 2003). Eine Quantifizierung dieser Daten ermöglichte eine grobe zweidimensionale Zuordnung der Position fast aller Nukleopore im Bezug auf die nukleozytoplasmatische Achse (innerhalb eines bestimmten statistischen Vertrauensbereiches). Durch eine Verfeinerung der Bildanalyse und die Verwendung Domänen-spezifischer Antikörper konnte das Nukleoporin Tpr (*translated promoter region*) als exklusiver Bestandteil der nukleären Filamente identifiziert werden (Krull et al. 2004). Diese Arbeit ist bisher die einzige, die ein morphologisches Detail des NPC konkret mit einem Nup assoziiert.

1.3.2 Dreidimensionale Rekonstruktionen der Kernpore

Die dreidimensionale (3D) Rekonstruktion aus Projektionen, die mit Hilfe eines Elektronenmikroskopes aufgenommen werden, basiert grundsätzlich auf dem Projektionstheorem (siehe Kapitel 2.4). Die ersten 3D-Rekonstruktionen des NPC gelangen mit negativ kontrastierten NEs von Krallenfröschen (Unwin und Milligan 1982; Hinshaw et al. 1992). Die Verwendung von Schwermetallen als Kontrastmittel hat jedoch gewisse Nachteile gegenüber der Abbildung biologischer Präparate mittels Kryo-EM (siehe Kapitel 2.1). Entsprechende Strukturen von Detergens-extrahierten und auch Membran-gebundenen NPCs aus Hefe und Krallenfrosch wurden später veröffentlicht

¹Bei der Rasterelektronenmikroskopie werden biologische Proben zur Kontrastierung zunächst mit Schwermetall bedampft, und dann Punkt für Punkt abgetastet, wobei die Sekundärelektronen detektiert werden. Die Rasterposition wird mit dem detektierten Signal korreliert und so ein Bild erstellt. Diese Methode liefert ein topologisches Abbild der Probe mit sehr hohem Signal zu Rausch-Verhältnis (*signal to noise ratio*, SNR) und relativ großer Tiefenschärfe.

(Akey und Radermacher 1993; Yang et al. 1998). Die präparative Anwendung von Detergenzien beinhaltet jedoch das Risiko eines Verlustes einiger Komponenten des NPC während der Extraktion. Der Hefe-NPC weist prinzipiell die gleichen morphologischen Merkmale wie der Krallenfrosch NPC auf, ist jedoch kleiner (Abb. 1.6 A und B). Beide Strukturen wurden im *random conical tilt*-Verfahren erstellt (siehe Kapitel 2.4). Durch Kryo-Elektronentomographie (ET) wurde die Struktur von Membranverankerten Krallenfrosch-NPCs bis zu 12 nm aufgelöst (Stoffler et al. 2003). Die höhere Auflösung dieser Rekonstruktion macht zusätzliche Details wie den distalen Ring und den Ansatz der zytoplasmatischen Filamente sichtbar (Abb. 1.6C). Der kleinere CP wird im direkten Vergleich mit der Struktur von Akey und Radermacher auffällig (trotz des ansonsten offenbar höheren Schwellenwertes der *isosurface*-Darstellung). Diese Tatsache läßt sich möglicherweise mit den unterschiedlichen Präparationsverfahren erklären. Bei allen drei genannten Rekonstruktionen nahmen die einzelnen NPCs auf dem EM-grid eine ähnliche Orientierung an: mit der nukleozytoplasmatischen Achse parallel zum Elektronenstrahl. Aufgrund technischer Einschränkungen beim Kippen der Probe im Elektronenmikroskop können die resultierenden Strukturen nicht in allen drei Dimensionen gleichförmig (isotrop) abgetastet werden (siehe Kapitel 2.4). Die Folge sind Artefakte wie eine niedrigere Auflösung entlang der nukleozytoplasmatischen Achse und eine Elongation der gesamten elektronenoptischen Dichte in dieser Richtung (Grünwald et al. 2003). Als praktische Konsequenz sind zum Beispiel die Regionen mit niedrigerer EM-Dichte zwischen den einzelnen Ringen nicht aufgelöst. Ebenen deren Normalenvektor parallel zur nukleozytoplasmatischen Achse verläuft, wie zum Beispiel die Kernmembranen, können nur verzerrt abgebildet werden.

1.3.3 Abbildung von Substraten während des Kerntransportes

Kinetische Studien des Kerntransportes wurden mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Substraten durchgeführt. Hierbei wird die Einstellung des Fließgleichgewichtes mittels quantitativer Fluoreszenzmikroskopie zeitlich verfolgt (Ribbeck und Görlich 2002). Diese Methode ist ein wichtiges Werkzeug um die Eigenschaften mechanistischer Transportmodelle im Experiment zu überprüfen. Eine weitere Möglichkeit ist die

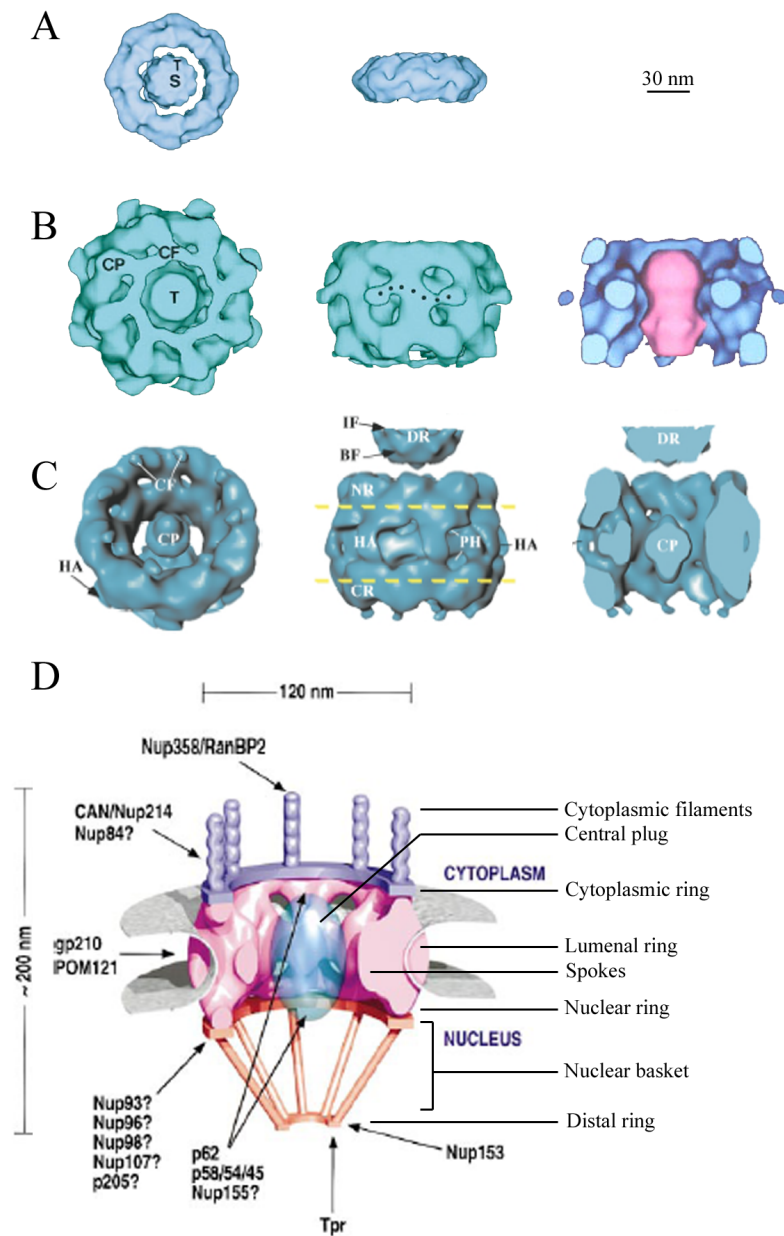


Abbildung 1.6: Dreidimensionale Rekonstruktionen des NPC durch Kryo-EM. A. Struktur des NPC aus Hefe erstellt durch konisches Kippen. B. Struktur des NPC des Krallenfrosches erstellt durch konisches Kippen und durch Einzelpartikel-Tomographie. C. Modifiziert nach (Akey und Radermacher 1993; Yang et al. 1998; Stoffler et al. 2003). D. Modell des Krallenfrosch-NPC. Modifiziert nach (Nakielny und Dreyfuss 1999).

Abbildung von einzelnen Substraten während des Transportes. Grundsätzlich sind zwei Verfahren möglich: Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie und die Abbildung von goldmarkierten Substraten mittels TEM. Die erste Methode erlaubt die zeitliche Analyse eines einzelnen Transportvorganges, wenn auch nur mit drei bis fünf Datenpunkten (Yang et al. 2004). Der Vorteil von TEM ist die wesentlich bessere Auflösung, auch wenn alle Proben fixiert werden müssen. 1989 untersuchten Akey und Goldfarb den Transport von goldmarkiertem Nukleoplasmin an eiseingebetteten (siehe Kapitel 2.1) Krallenfrosch NEs (Akey und Goldfarb 1989). Sie klassifizierten den radialen Abstand der Transportkomplexe vom zentralen Kanal in drei Gruppen (2D, rechtwinklig zur nukleozytoplasmatischen Achse) und schlugen einen dreistufigen Importmechanismus vor: periphere Bindung, Andocken an den CP und Translokation. Bei dieser Methode kann jedoch die Position der Transportkomplexe entlang der nukleozytoplasmatischen Achse nicht bestimmt werden. Bei plastikeingebetteten Dünnschnitten wird die Position der Transportkomplexe, je nach Schnittrichtung, entweder im Bezug auf die nukleozytoplasmatische Achse (Transportrichtung) oder radial, rechtwinklig zur nukleozytoplasmatischen Achse (parallel zur Membran) bestimmt. Bei einem einzelnen goldmarkierten Substrat besteht also immer Unklarheit über seine Position bezüglich einer Dimension. Dennoch beweist die Arbeit von Walther *et al.*, daß die zytoplasmatischen Filamente nicht essentiell für den klassischen Import von Substraten sind (Walther et al. 2002). Im Kontrast zu den Studien von Akey und Goldfarb war hier keine klare periphere Position der Transportkomplexe auf der zytoplasmatischen Seite sichtbar, was auf die Existenz von nicht essentiellen Bindungsstellen an den zytoplasmatischen Filamenten schließen läßt.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist eine strukturelle Analyse von Kernporenkomplexen in nativer Umgebung mittels Kryo-ET. Dies setzt die Etablierung einer biologischen Präparation voraus, welche nachweisbar transportaktive NPCs enthält. Diese Vorgehensweise hat einen wesentlichen Vorteil, aber auch einen Nachteil. Im Gegensatz zu gereinigten NPCs tragen alle an Transportvorgängen beteiligten Proteine zur beobachteten EM-Dichte bei, allerdings kann die Identität aller Komponenten des Systems nicht

bestimmt werden. Die tomographische Analyse von Membran-verankerten NPCs, die unterschiedliche, also freie Orientierungen einnehmen, ermöglicht in Kombination mit entsprechenden Strategien zur Einzelpartikelprozessierung die isotrope, artefaktfreie Abtastung der NPC-Struktur in 3D. Mit Hilfe von goldmarkierten Substraten ist eine präzise Lokalisierung von Transportkomplexen während des Transportvorgangs denkbar. Eine solche Analyse würde eine genauere Zuordnung der Interaktionen eines Transportkomplexes mit den morphologischen Bestandteilen des NPC ermöglichen und könnte wichtige Informationen über den Transportmechanismus und insbesondere die Natur und Funktion des CP liefern.

2. Hintergrund

2.1 Präparation von biologischen Proben für Transmissionselektronenmikroskopie

Im Hochvakuum im Inneren eines Elektronenmikroskopes würden wässrige Lösungen oder Suspensionen sofort verdampfen. Deswegen müssen biologische Proben grundsätzlich fixiert werden, um sie mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zu betrachten. Dies geschieht seit den fünfziger Jahren durch chemische Fixierung und die Einbettung in Hartplastik sowie Schwermetall-Kontrastierung (Palade 1952).

In den achtzigern Jahren wurde die Präparation von biologischen Proben durch J. Dubochet revolutioniert (Dubochet et al. 1988). Bei der sogenannten Kryo-EM wird die Probe im hydratisierten Zustand eingefroren. Dazu werden wässrige Proben auf einen löchrigen Kohle-Trägerfilm aufgebracht. Die überschüssige Flüssigkeit wird mit einem Filterpapier abgesogen, um eine Probendicke von weniger als $1\ \mu\text{m}$ zu erhalten. Die Probe wird dann in flüssiges Ethan mit einer Temperatur von circa $80\ \text{K}$ "eingeschossen". Bei einer Abkühlungsgeschwindigkeit von mindestens $10^4\ \text{K}$ pro Sekunde wird die Entstehung von kristallinem Eis verhindert. Die Wassermoleküle behalten ihre Orientierung, und es entsteht Eis im Glaszustand. Dadurch wird die Dehydratisierung von biologische Proben vermieden und das elektrostatische Potential kann in einem quasi-nativen Zustand abgebildet werden. Diese Methode erfordert bei allen weiteren Schritten, wie Probenlagerung, Transfer in den Probenhalter und Abbildung im EM, eine Temperatur von weniger als $140\text{-}150\ \text{K}$. Diese wird durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff erreicht.

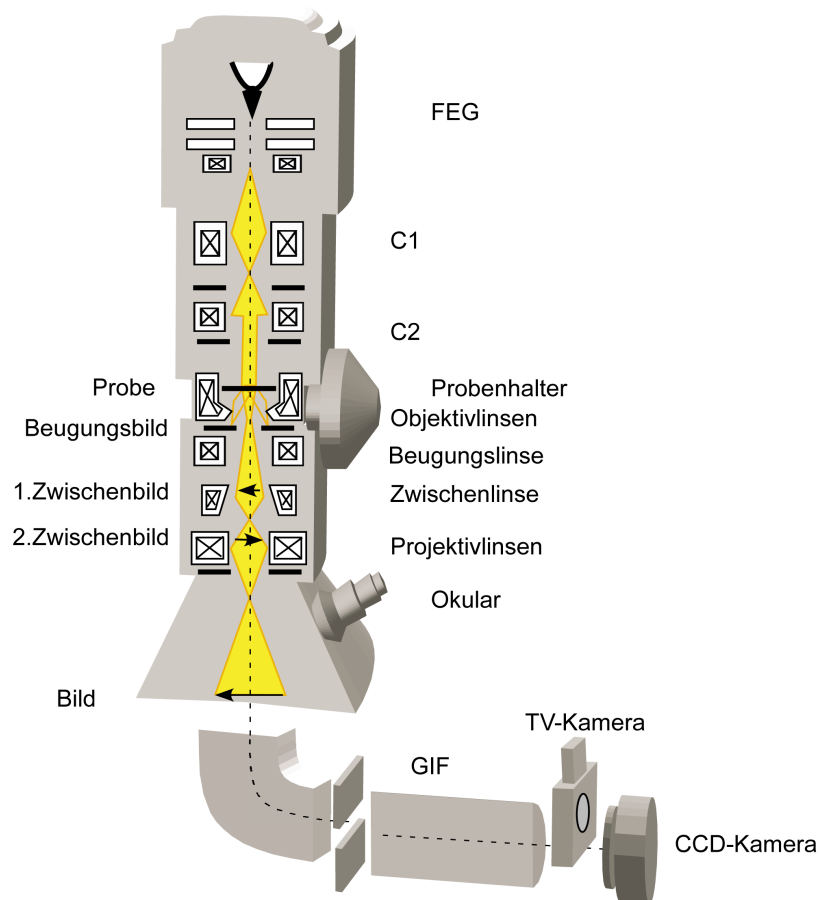


Abbildung 2.1: Prinzipieller Aufbau des Phillips CM300 TEM in Martinsried (Schweikert 2004).

2.2 Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.1 Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskopes

Ende der zwanziger Jahre gelang Ernst Ruska der experimentelle Beweis für die Tauglichkeit des von einer Spule erzeugten Magnetfeldes als Elektronenlinse. Diese Entdeckung führte Anfang der dreißiger Jahre zum Bau der ersten Elektronenmikroskope (Ruska 1987). Das grundlegende Konzept gilt auch für moderne Elektronenmikroskope (Abb. 2.1). Die Quelle emittiert Elektronen mittels eines Hochspannungsfeldes im Hochvakuum. Als Elektronenquelle dienen thermische Wolfram- und LaB_6 -Kathoden oder auch Feldemissionsquellen (FEG). Im Rahmen dieser Arbeit kamen ausschließlich FEGs zum Einsatz, die auf Grund der höheren örtlichen und zeitlichen Kohärenz

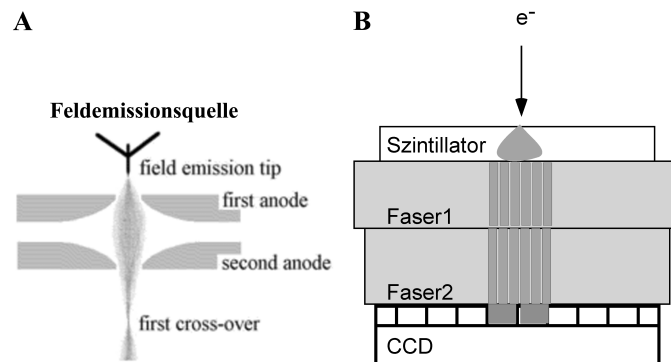


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau einer Feldemissionsquelle A (www.sem.com) und einer CCD-Kamera B (Schweikert 2004).

der erzeugten Elektronen eine potentiell bessere Auflösung erzielen. Eine FEG besteht aus einer Wolframspitze als Kathode und zwei nacheinander angeordneten Anoden (Abb. 2.2 A). Da die Spitze einen sehr kleinen Radius hat, entsteht ein sehr starkes elektrisches Feld, wodurch Elektronen aus der Kathode tunneln.

Der so erzeugte Elektronenstrahl wird durch die beiden Kondensoren C1 und C2 idealerweise parallel auf das Präparat gelenkt. Durch die Wechselwirkung mit dem Präparat wird ein Teil der Elektronen gestreut und durch eine Objektivlinse zur Interferenz mit dem Primärstrahl gebracht. Liegt der Streuwinkel außerhalb der darunterliegenden Objektivapertur, tragen sie nicht weiter zur Bildentstehung durch Phasenkontrast bei (siehe Kapitel 2.2.2). Das so erzeugte Zwischenbild wird durch das Projektivlinsensystem weiter vergrößert und kann auf einem Fluoreszenzschirm betrachtet werden.

Alternativ kann das Bild entweder direkt oder durch einen unterhalb der Mikroskopsäule angebrachten Energiefilter (*post column energy filter*) auf eine CCD-Kamera (*charged coupled device*) übertragen werden. Der Energiefilter spaltet den Elektronenstrahl mit Hilfe eines magnetischen Prismas spektral auf. Eine dahinter angeordnete Blende erlaubt nur die Passage von Elektronen eines ausgewählten Energieintervalls. Im sogenannten *zero loss*-Modus werden die Elektronen aus dem Energiebereich des Primärstrahls auf die CCD-Kamera abgebildet (typischerweise mit einem Energieintervall von circa 10 eV). Eine solche Kamera ist prinzipiell aus

einem Szintillator, einer doppelten Glasfaseroptik und einem CCD-Chip aufgebaut (Abb. 2.2B). Der Szintillator besteht aus Gadoliniumoxisulfid und Phosphor. Hier werden die Elektronen abgebremst und in Photonen umgewandelt, wobei es zu Streuprozessen kommt. Das so entstandene Licht wird durch die beiden, mit Immersionsöl gekoppelten, Glasfaserbündel auf den CCD-Chip geleitet. Dieser Chip besteht aus Metalloxid-Halbleiter (MOS)-Kondensatoren und wandelt die auftreffenden Photonen wiederum in ein Elektronensignal um, das letztendlich ausgelesen wird.

2.2.2 Bildentstehung

Phasenkontrast und Elektronenstreuung

Aufgrund der kleinen Wellenlänge der Elektronen arbeiten TEMs mit großer Tiefenschärfe. Deshalb stellen die aufgenommenen Bilder im Wesentlichen Projektionen des betrachteten Objektes dar (Lucic et al. 2005). Die Art der Bildentstehung hängt vom Probenotyp ab. Bei den in dieser Arbeit verwendeten nicht schwermetallkontrastierten Kryo-Präparaten (Eis im Glaszustand) entsteht das Bild hauptsächlich durch Phasenkontrast. Bei diesem Mechanismus entsteht der Kontrast durch die Interferenz der von der Probe gestreuten Strahlen mit dem Primärstrahl. Generell unterscheidet man zwischen zwei Streuungsarten von Elektronen durch Wechselwirkungen mit dem Präparat: elastische- und inelastische Streuung.

Bei der inelastischen Streuung kommt es zu einer Energieübertragung zwischen dem einfallenden Elektron und den Atomkernen der Probe. Dabei treten unter anderem die Anregung von Schwingungen oder quasi-freien Elektronen sowie Elementspezifische Ionisation auf. Für die Bildentstehung weitaus wichtiger ist die elastische Streuung durch die Ablenkung von Elektronen im elektrischen Feld der Atome. Unter Erhaltung von Energie und Impuls kommt es zur Richtungsänderung und einer vernachlässigbar geringen Phasenverschiebung. Der Streuwinkel der einzelnen Elektronen ist direkt proportional zur Frequenz. Aus diesem Grund limitiert die Objektivblende die Auflösung, funktioniert also als physikalischer Tiefpassfilter. Der Streuwinkel ist beim Hauptanteil der inelastisch gestreuten Elektronen kleiner als bei der elastischen Streuung. Bei den in dieser Arbeit angewendeten Vergrößerungen ist die Öffnung der Objektivblende jedoch so groß, daß nur wenige der elastisch gestreuten Elektronen

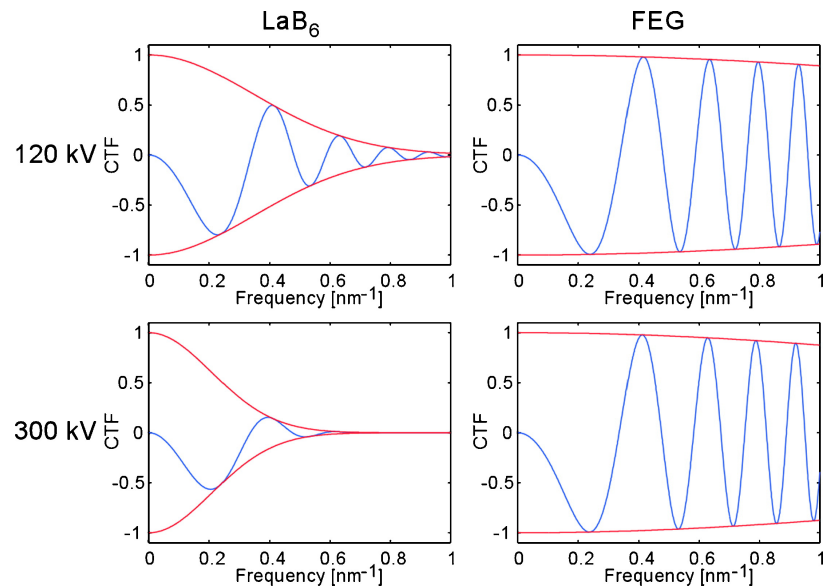


Abbildung 2.3: Darstellung der Abhängigkeit der CTF von der Kohärenz und Beschleunigungsspannung der Leuchtquelle. Die höhere Kohärenz einer FEG bedingt ein besseres Dämpfungsverhalten. Die Defokuswerte wurden so gewählt, daß die erste Nullstelle der CTF bei $(3 \text{ nm})^{-1}$ auftritt (Lucic et al. 2005).

entfernt werden.

Die oben ausgeführte Theorie beruht auf der Annahme der Einfachstreuung. Mit zunehmender Probendicke erhöht sich jedoch die Wahrscheinlichkeit für multiple Streuereignisse. Dies hat im Wesentlichen zwei Konsequenzen: eine Energieübertragung zwischen dem einfallenden Elektron und der Probe durch inelastische Streuung wird wahrscheinlicher und die Streuwinkel werden größer. Deshalb ist in der Praxis, vor allem bei den in dieser Arbeit betrachteten, relativ dicken Proben, der Einsatz von Objektivblende und Energiefilter durchaus sinnvoll (Grimm 1998).

Fokus und Kontrasttransferfunktion

Das aufgenommene Bild ist nicht direkt äquivalent mit der Projektion des elektrostatischen Potentials der Probe, sondern hängt auch von der Kontrasttransferfunktion (CTF, *contrast transfer function*) des verwendeten EMs ab. Die CTF kommt hauptsächlich durch den Fokuswert sowie die Eigenschaften der Leuchtquelle und CCD-Kamera zustande und beschreibt die Übertragungseffizienz in Abhängigkeit von der

Ortsfrequenz. Der Fokuswert beeinflusst die Phasenverschiebung zwischen Primärstrahl und gestreuten Elektronen sowie die Dämpfung der CTF. Durch eine Verkleinerung des Defokuswertes kommt es zu einer geringeren Dämpfung sowie Verschiebung der Nullstellen der CTF zu größeren Frequenzen. Das Arbeiten bei kleinen Defokuswerten ermöglicht also eine potentiell höhere Auflösung bei geringerem Kontrast. Der Einfluß der Kohärenz und Beschleunigungsspannung der Leuchtquelle auf die CTF ist in Abb. 2.3 dargestellt. Die höhere Kohärenz von FEG-Leuchtquellen bedingt ein besseres Dämpfungsverhalten und ermöglicht so das Arbeiten bei relativ großen Defokuswerten. Der so erzielte höhere Kontrast ist beim Betrachten der relativ dicken Proben für zelluläre ET von Vorteil.

2.3 Kryo-Elektronentomographie

Unter dem Begriff Tomographie werden verschiedene Verfahren zusammengefaßt, mit denen die räumliche Struktur eines Objektes ermittelt werden kann. Tatsächlich wird beim sogenannten *serial sectioning*, im ursprünglichen Sinne des griechischen Wortes *tòmos*, ein dreidimensionales Bild aus Schnitten erstellt. Im moderneren Sinne wird der Begriff Tomographie im Zusammenhang mit dem von Radon entdeckten, nicht invasiven Prinzip verwendet (Radon 1917). Demnach kann die 3D Dichteverteilung eines Objektes aus Projektionen, die aus unterschiedlichen Winkeln aufgenommen wurden, rekonstruiert werden. Elektronenmikroskopische Bilder sind Projektionen der betrachteten Probe (siehe Kapitel 2.2). Da das Präparat mit Hilfe eines drehbaren Probenhalters gekippt werden kann, eignet sich Elektronenmikroskopie als tomographische Methode.

2.3.1 Dosisverteilung und Strahlenschäden

Bei der inelastischen Wechselwirkung von beleuchtenden Elektronen mit der Probe kommt es zur Bildung von Radikalen. Folglich wird das Präparat durch radikalische Reaktionen beschädigt. Dies wird durch Blasenbildung im Eis und im Trägerfilm offensichtlich (Heide und Zeitler 1985). Die Sensitivität einer biologischen

Probe für Sekundärreaktionen hängt wesentlich von ihrer chemischen Zusammensetzung, insbesondere der Fähigkeit radikalische Elektronen zu delokalisieren ab. Da die Sekundärreaktionen unter anderem von der Moleküldiffusion abhängen, kann der Strahlschaden durch Kühlung eingeschränkt werden. Letztendlich bestimmt die zu erzielende Auflösung die tolerierbare Elektronendosis der Probe. Deshalb wird in der Praxis bei Verfahren die auf höchste Auflösung abzielen, wie Elektronenkristallographie oder Einzelpartikel-Analyse, eine wesentlich geringere Elektronendosis verwendet als bei tomographischen Anwendungen. Für Proteinkomplexe wurde eine Elektronendosis von bis zu $10 \text{ e}\text{\AA}^{-2}$ vorgeschlagen (Henderson 1995), während bei Kryoelektronentomographie $50\text{-}100 \text{ e}\text{\AA}^{-2}$ tolerierbar sind. Der Informationsgehalt eines Tomogrammes hängt nicht nur von der Elektronendosis sondern auch vom SNR ab. Die Signalstärke des Tomogrammes ist genauso groß wie die einer Einzelprojektion gleicher Dosis. Deshalb kann die Elektronendosis theoretisch auf beliebig viele Projektionen verteilt werden (Hegerl und Hoppe 1976; McEwen et al. 1995), was praktisch allerdings den Aufwand bei der Aufnahme und Bearbeitung von Daten erhöht.

2.3.2 Automatisierte Datenaufnahme

Bei der Aufnahme der einzelnen Projektionen eines Tomogrammes, müssen auf Grund von Ungenauigkeiten des Probenhalters, bestimmte Abweichungen nach dem Kippen der Probe korrigiert werden. Das betrifft insbesondere die Auswanderung der Probe und den Fokuswert. Gegebenenfalls muß auch die Position der Blende des Energiefilters angepaßt werden. Die automatisierte Datensammlung erleichtert und beschleunigt die Aufnahme von Projektionen und macht das Arbeiten unter *low dose*-Bedingungen möglich (Dierksen et al. 1993; Dierksen et al. 1992; Koster et al. 1997; Grimm 1998). Die Datenaufnahme erfolgt dabei in drei Schritten:

1. *Autofocus*. Auf der Basis zweier Bilder mit unterschiedlicher Strahlkippung wird die Auswanderung der Probe zwischen zwei aufeinander folgenden Kippwinkeln bezüglich der z-Achse korrigiert und der vorgegebene Defokuswert neu eingestellt (Koster et al. 1989; Ziese et al. 2003).

2. *Tracking*. Nach der Aufnahme eines Bildes mit niedriger Elektronendosis wird mittels Kreuzkorrelation mit dem vorherigen Bild die laterale Auswanderung bestimmt und korrigiert.
3. *Exposure*. In diesem letzten Schritt wird die eigentliche Projektion aufgenommen.

Durch die Verschiebung der Position des *Autofocus* und *Tracking* Schrittes entlang der Kippachse vom Probenort weg, kann eine dramatische Dosisersparung vorgenommen werden. Die Auswanderung der Probe in Abhängigkeit vom Kippwinkel ist bei modernen Probenhaltern, wie zum Beispiel bei dem verwendeten FEI Polara, sehr reproduzierbar und kann kalibriert werden. Mit dem resultierenden Vorhersagemodell kann die Häufigkeit des *Autofocus* und *Tracking* Schrittes reduziert und so eine wesentliche Zeitersparnis erzielt werden. Ein weiterer Zeitfaktor ist die Auslesegeschwindigkeit der CCD-Kamera. Deshalb wird in der Praxis im *Autofocus*- und *Tracking*-Modus die CCD-Kamera nicht vollständig ausgelesen, also eine geringere Abtastung verwendet als im *Exposure*-Modus.

Idealerweise verteilt sich die Elektronendosis gleichmäßig über alle Projektionen. Die Dicke der Probe ändert sich jedoch als Funktion des Kippwinkels. Aus diesem Grund kann die Belichtungszeit im *Exposure*-Modus automatisch angepaßt werden (zum Beispiel mit $1/\cos \alpha$). Die präzise Änderung hängt jedoch von der individuellen Form und Dicke der Probe ab und läßt sich schwer vorhersagen. Deswegen können neuere Software-Pakete, wie TEM-*Tomography* von FEI, die Belichtungszeit individuell auf der Basis des vorherigen Bildes anpassen.

2.4 Dreidimensionale Rekonstruktion

Die bei 3D-EM angewendeten Rekonstruktionsverfahren basieren auf dem Projektionstheorem. Demnach entspricht die 2D Fouriertransformierte der Projektion eines Objektes einem zentralen Schnitt durch seine 3D Fouriertransformierte, wobei der Projektionswinkel dem Schnittwinkel entspricht. Dieses Prinzip wurde zuerst von de Rosier und Klug sowie Hart umgesetzt (DeRosier und Klug 1968; Hart 1968; Klug 1982).

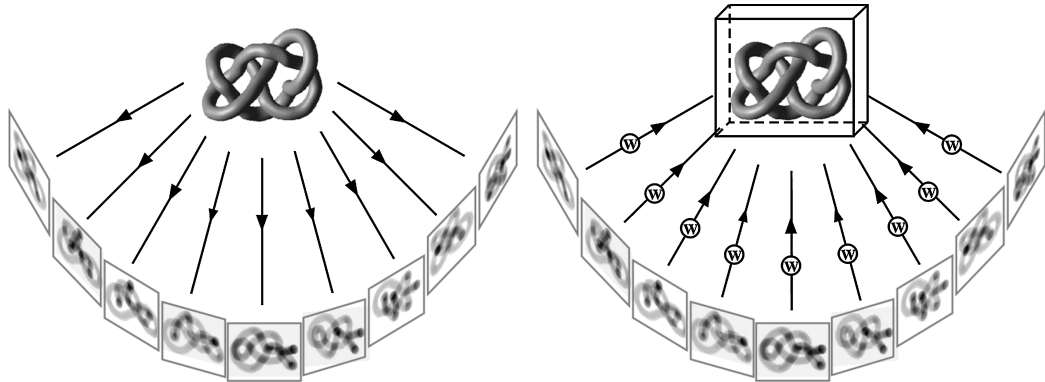


Abbildung 2.4: Das Prinzip der Tomographie. Es werden Projektionen des Präparates mit Hilfe eines drehbaren Probenhalters aus unterschiedlichen Winkeln aufgenommen. Die 3D Rekonstruktion erfolgt durch die Rückprojektion in ein gemeinsames Rekonstruktionsvolumen (Lucic et al. 2005).

Aufgrund der komplizierten Interpolation im Fourierraum werden moderne Rekonstruktionsverfahren für ET jedoch im Realraum durchgeführt (siehe unten).

2.4.1 Tomographische Rekonstruktion

Alignierung der Projektionen

Um für Verschiebungen des tomographierten Objektes in den einzelnen Projektionen zu kompensieren, müssen diese vor der eigentlichen Rekonstruktion aufeinander aligniert werden. Hierfür existieren zwei verbreitete Methoden: Alignierung mittels Kreuzkorrelation oder Markerpunkten (Lucic et al. 2005). Die Kreuzkorrelationsmethode ist relativ rauschempfindlich und erfordert Kenntnisse über die Lage der Kippachse und gegebenenfalls auch die Form des Objektes. Deshalb wurde in dieser Arbeit fast ausschließlich die Alignierung mittels Markerpunkten durchgeführt. Dabei wird die Position der Markerpunkte in allen Projektionen bestimmt. Auf der Basis dieser Information wird ein Alignierungsmodell berechnet und der Fehler als Funktion der lateralen Translation und dem Winkel der Kippachse minimiert (Lawrence 1992).

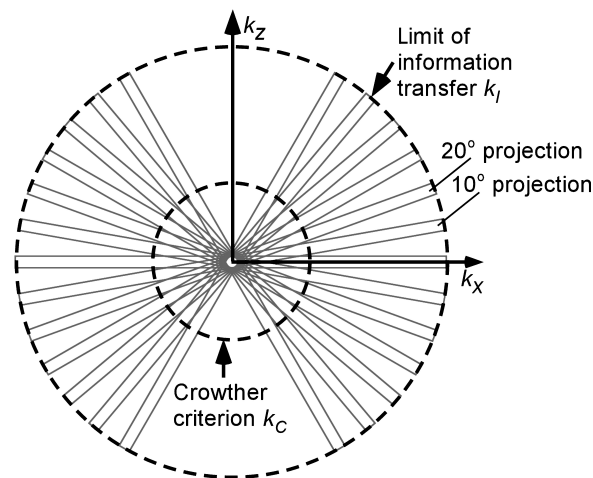


Abbildung 2.5: Das *sampling*-Problem im Fourierraum. Die Projektion eines Objektes der Dicke d entspricht einem zentralen Schnitt der Dicke $1/d$ im Fourierraum. Die dreidimensionale Information über die Probe ist außerhalb des *missing wedge* nur bis zur Frequenz k_c homogen (Lucic et al. 2005).

weighted backprojection-Methode

Die so alignierten Projektionen können mit mehreren unterschiedlichen Algorithmen zur Rekonstruktion verwendet werden (Frank 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die *weighted backprojection*-Methode angewendet. Bei diesem Verfahren werden die alignierten Projektionen in ein gemeinsames Volumen zurückprojiziert. Ein generelles Problem stellt die ungleichmäßige Abtastung im Fourierraum dar (Abb. 2.5). In Abhängigkeit von der Schnitthöhe d der einzelnen Projektionen im 3D Fourierraum, kommt es zur Überlappung tieffrequenter Information innerhalb des sogenannten *Crowther*-Kriteriums k_c . Die Strukturfaktoren des Objekts werden bis zur Frequenz k_c homogen aufgenommen, die darüber hinaus gehende Information ist unvollständig. Deshalb müssen die Projektionen vor der Rekonstruktion gewichtet werden. Hierfür existieren zwei Verfahren, die beide im Fourierraum arbeiten. Beim analytischen Verfahren wird eine Funktion direkt proportional zur Frequenz im rechten Winkel zur Kippachse für die Gewichtung verwendet. Das exakte Verfahren berücksichtigt die tatsächliche Dicke des Präparates (Harauz und van Heel 1986).

***missing wedge*-Problem**

Der maximale Kippwinkel der Probe im Mikroskop wird durch den Kopf des Probenhalters beschränkt. Derzeit erhältliche Kryo-Probenhalter von Gatan oder FEI erreichen bis zu $\pm 70^\circ$, weshalb in einem bestimmten Winkelbereich keine Projektionen aufgenommen werden können. Aus diesem Grund kann die Probe im 3D Fourierraum in einem keilförmigen Bereich entlang der z-Achse (*missing wedge*) nicht abgetastet werden (Abb. 2.5). Die in den Realraum zurücktransformierte Dichteverteilung ist deshalb nicht isotrop, d.h. die Auflösung nicht gleichförmig bezüglich aller räumlichen Richtungen. Entlang der z-Achse elongierte Dichten können nur verzerrt abgebildet werden.

2.4.2 Einzelpartikel-Rekonstruktion

Klassische Einzelpartikel-Analyse

Bei der Einzelpartikel-Analyse gereinigter Proteine oder Proteinkomplexe wird dieses Problem umgangen. Hierbei werden Proben verwendet, die eine zufällige Orientierung in der auf den Trägerfilm aufgetragenen wässrigen Lösung annehmen. Deshalb können Projektionen entlang aller räumlichen Richtungen der Probe aufgenommen werden ohne diese zu kippen. Die Bilder der Einzelpartikel werden aligniert und meist mittels Eigenvektor-Analyse klassifiziert. Die räumliche Orientierung der Partikel in den einzelnen Klassen wird dann im sogenannten *common lines*-Verfahren bestimmt: Zwei beliebige 2D Projektionen eines 3D Objektes haben eine gemeinsame eindimensionale Linie, aus deren Lage die Orientierung des projizierten Objektes bestimmt werden kann. Für ein asymmetrisches Objekt werden hierfür mindestens drei unterschiedliche Projektionen benötigt. Die Genauigkeit der Winkelbestimmung wird am Ende iterativ verfeinert (van Heel et al. 2000).

Natürlich ist dieses Verfahren auf Proben beschränkt, die in einer Vielzahl identischer Kopien erzeugt werden können. Eine Anwendung auf komplexere Systeme wie bei ET ist nicht möglich. Dennoch birgt es noch eine weitere Einschränkung in sich. Es kann nicht bei Einzelpartikeln angewendet werden, die eine bevorzugte Orientierung annehmen. Dies war jedoch bei gereinigten NPCs, speziell unter Kryo-Bedingungen,

bisher immer der Fall (Unwin und Milligan 1982; Hinshaw et al. 1992; Akey und Radermacher 1993; Yang et al. 1998; Stoffler et al. 2003).

Random conical tilt-Methode

Die bisherigen 3D-Strukturen vom NPC wurden oftmals mit der *random conical tilt*-Methode erstellt (Akey und Radermacher 1993; Yang et al. 1998). Bei dieser Methode wird die Probe nicht nur gekippt sondern auch (zufällig) gedreht. Verglichen mit dem bei tomographischen Verfahren derzeit üblichen Kippen um nur eine Achse, ergibt sich ein kleinerer nicht abgetasteter Bereich im 3D Fourierraum (Abb. 2.6). Dieser Vorteil macht sich beim NPC auf Grund seiner Rotationssymmetrie bezüglich der z-Achse jedoch kaum bemerkbar. Der nicht abgetasteter Bereich in der resultierenden Struktur hat in beiden Fällen eine konische Form.

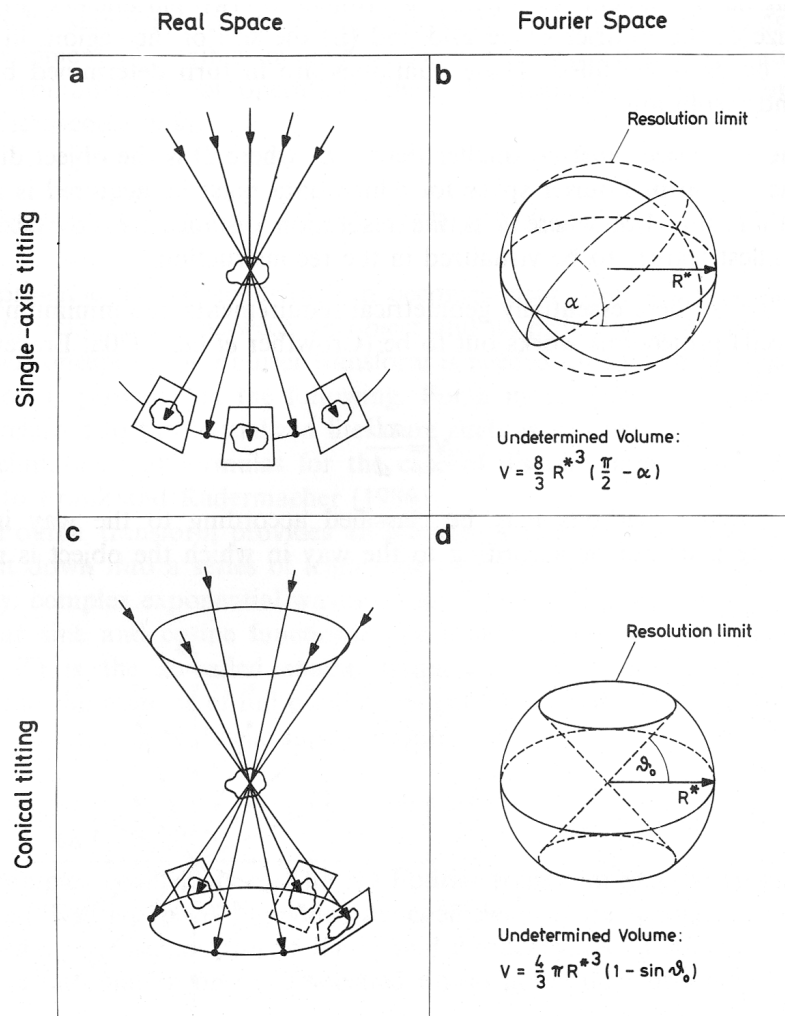


Abbildung 2.6: Gegenüberstellung der Geometrie der Datensammlung beim Kippen um eine Achse und dem konischen Kippen. Der nicht abgetastete Bereich im 3D Fourierraum hat eine konische- beziehungsweise eine Keilform (Frank 1992).

3. Materialien und Methoden

3.1 Standardmethoden

Die Konzentration von Proteinen und DNA wurde mittels UV-VIS-Spektroskopie an einem Lambda 40-Photometer (Perkin Elmer) bestimmt. Die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid electrophoresis*) durchgeführt (Laemmli 1970). Die Vermehrung und Reinigung bakterieller Plasmide erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Einsatz eines MiniPrep-Kits (Qiagen). Die analytische und präparative Trennung von DNA nach der Größe wurde mit Agarosegelelektrophorese, wie von Mühlhardt beschrieben (Mühlhardt 2000), durchgeführt.

3.2 Proteinreinigung

Die Expressionsvektoren für Importin α und β wurden freundlicherweise von Ian Mat-taj (EMBL, Heidelberg) und für NLS-2xGFP von Siegfried Musser (University System Health Science Center, USA) zur Verfügung gestellt. Die Proteine Ran, RanQ69L und FITC-BSA-NLS (*Fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin-NLS*) wurden freundlicherweise von Frauke Melchior (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. *Thermoplasma*-Proteasom wurde freundlicherweise von Karin Felderer (MPI für Biochemie) zur Verfügung gestellt. Alle FPLC-Reinigungsschritte (*fast protein liquid chromatography*) wurden an einem ÄKTA explorer (Amersham Biosciences) durchgeführt.

3.2.1 Importin α

Die Reinigung von rekombinantem humanen Importin α erfolgte wie in Görlich *et al.* beschrieben (Görlich *et al.* 1994; Görlich *et al.* 1995), mit den folgenden Modifikationen. Der Expressionsvektor wurde zusammen mit pRIL (Stratagene, seltene transfer-RNAs für Arginin, Isoleucin und Leucin) in *E. coli*-Zellen kotransformiert. Die Elution von 20 ml Ni-NTA (Nickel-Nitrilo-Triessigsäure-Granulat, Qiagen) erfolgte mit einem Gradienten von 0-500 mM Imidazol (Merck). Das Eluat wurde in 20 mM HEPES (Biomol), 200 mM NaCl (Merck), 8,7 % Glycerol (Merck), 2 mM β -Mercaptoethanol (Sigma) mit einer 180 ml S200 (Pharmacia) Säule gefiltert, mit NanoSep-Membranen (Pall Filtron) konzentriert, aliquotiert und in $N_2(l)$ schockgefroren.

3.2.2 Importin β

Die Reinigung von rekombinantem *Xenopus*-Importin β wurde analog zu Importin α durchgeführt (siehe oben).

3.2.3 NLS-2xGFP

Die Reinigung von rekombinantem NLS-2xGFP Fusionsprotein erfolgte wie in Yang *et al.* beschrieben (Yang *et al.* 2004), mit folgenden Veränderungen: Die Expression erfolgte in BL21-RIL-Zellen (Stratagene) bei 37 °C. Das Eluat von der Ni-NTA wurde direkt mit der S200-Säule gefiltert.

3.2.4 Hefeproteasom

Die Reinigung von Proteasomen aus Hefe erfolgte wie von Groll *et al.* beschrieben (Groll *et al.* 1997), mit den folgenden Modifikationen: 200 g handelsübliche Bäckerhefe (Wieninger) wurde über Nacht bei 4 °C in Aufschlußpuffer mit *yeast lytic enzyme* (ICN Biochemicals) verdaut und mittels *French press* (American Instruments Company) aufgeschlossen.

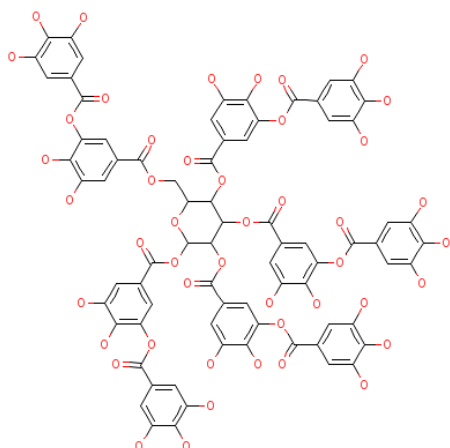


Abbildung 3.1: Eine der möglichen Strukturen von Gerbsäure (*tannic acid*, $C_{76}H_{52}O_{46}$). Aus NIST Chemistry Webook.

3.3 Proteinmarkierung

3.3.1 FITC-Markierung

Die FITC-Markierung von Hefe- und *Thermoplasma*-Proteasom wurde wie in Wang *et al.*, die von BSA wie von Melchior beschrieben, durchgeführt (Wang *et al.* 1997; Melchior 1998). Die Markierungseffizienz wurde spektroskopisch bestimmt und lag bei ungefähr 12:1 für FITC-Proteasom und 30:1 für FITC-BSA. Hierzu wurde die Absorption des markierten Proteins bei 280 und 495 nm nach Lambert-Beer ausgewertet (FITC-Extinktionskoeffizient bei 495 nm: $68000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; Proteasom bei 280 nm: etwa $1 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$).

3.3.2 Gold-Konjugation von Proteinen

Herstellung von kolloidalem Gold

Die Herstellung von 5 nm kolloidalem Gold wurde nach Slot und Geuze (Slot und Geuze 1985), jedoch mit einigen Modifikationen durchgeführt: 80 ml 0.012 %ige, wässrige NaAuCl_4 -Lösung (Sigma) und 20 ml 0.05 %iger Gerbsäure (je nach Lieferant im Wesentlichen *tannic acid* (Abb. 3.1), J.T.Baker, besser Mallinckrodt), 0.2 % Natriumzitrat-Dihydrat (Merck), wurden auf 60 °C erhitzt und unter heftigem Rühren schnell gemischt. Die Goldkolloide bilden sich binnen Sekunden, eine anschließende Reinigung ist nicht erforderlich.

Größe (nm)	[Gerbsäure] (% w/v)
3.5	0.25
4.0	0.125
5.0	0.05
6.0	0.025
7.5	0.012
9.5	0.005
10.0	0.004
11.5	0.0025
14.0	0.0012

Tabelle 3.1: Abhängigkeit der Größe des entstehenden kolloidalen Goldes von der Gerbsäurekonzentration (Slot und Geuze 1985). Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf ein Volumen von 20 ml vor dem Mischen mit 80 ml NaAuCl₄-Lösung. Die Effizienz der Reaktion hängt stark von der Präparation der Gerbsäure ab und kann je nach Lieferant variieren.

Konjugation von kolloidalem Gold mit Proteinen

Der pH-Wert von frisch hergestellten kolloidalem Gold wurde mit 0,1 N Natronlauge und pH-Testpapier (Neutralit, Merck) auf circa 8,0 eingestellt. Die Bestimmung der zur Konjugation erforderlichen Proteinkonzentration erfolgte mit Zsigmondy's Test (Zsigmondy 1925; Zsigmondy 1926). In mehrere 1 ml Aliquote kolloidaler Goldsuspension wurde das gewünschte Protein in Konzentrationen von 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Negativkontrolle: kein Protein, Positivkontrolle: hohe BSA-Konzentration, etwa 1 mg/ml). Danach wurde in alle Aliquote 10 μl 1 M NaCl zugegeben. Ist die Oberfläche des Goldes durch ausreichend Protein geschützt, bleibt die Farbe der Lösung gleich. Bei zu geringer Proteinkonzentration wird kolloidales Gold nach der Zugabe des Salzes in einer Redoxreaktion zerstört, aggregiert und sinkt ab, die Lösung wird dunkler.

Die Reaktion mit der richtigen Proteinkonzentration wurde nun im größeren Maßstab wiederholt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde das Konjugat konzentriert und durch Waschen in den gewünschten Puffer überführt. Die Lösung wurde hierzu zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das flauschige, leicht zerstörbare Pellet mit Puffer verdünnt. Die passende Zeit und Geschwindigkeit der Zentrifugation

hängt stark von der Goldgröße und Konzentration ab und wurde individuell empirisch ermittelt. Für 5 nm Gold eignen sich normalerweise drei Schritte mit 40 min bei 21000xg, für 15 nm Gold zwei Schritte mit 5 min bei 10000xg. Um die Goldoberfläche vollständig zu schützen wurde dem Pellet direkt nach der Zentrifugation BSA in hoher Konzentration zugesetzt. Gold-konjugierte Proteine sind bei 4 °C normalerweise 1-2 Wochen haltbar und können nicht eingefroren werden.

15 nm Goldpartikel zum Alignment von Tomogrammen wurden wie oben beschrieben, jedoch mit 0.0012 %iger Gerbsäure hergestellt und direkt eingesetzt oder mit BSA geschützt, in Probenpuffer überführt und auf die ursprüngliche Konzentration verdünnt (Tab. 3.1).

3.4 Zellkultur

3.4.1 *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* wurde wie in *The QIAexpressionist* beschrieben durchgeführt (Qiagen 2003).

Transformation

Die Transformation bakterieller Plasmide in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen und Selektion auf Agar-Platten wurde mit *Ultracompetent cells* (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.4.2 HeLa-Zellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen in Suspension erfolgte wie von Melchior beschrieben (Melchior 1998). Der HeLa-Stamm CSH (*cold spring harbor*) wurde freundlicherweise von Frauke Melchior (Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

3.4.3 *Dictyostelium discoideum*

Die Kultivierung von *D. discoideum* des Stamms AX2 erfolgte in AX-Medium. Hierzu wurden 14,3 g Peptone (Difco), 7,15 g Hefeextrakt (Difco), 18 g Glukose (Merck),

0,62 g Na_2HPO_4 (Merck) und 0,49 g K_2HPO_4 (Merck) mit 1 Liter deionisiertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert (Graf 2001). Adhärenzte Kulturen wurden mit 10 ml Medium in Petri-Schalen (Falcon) und Schüttelkulturen in 30 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur und konstanter Lichteinstrahlung (gegebenenfalls bei 180 rpm) angezogen. Die Kultivierung des vegetativen Zellstadiums ist in Suspension bei einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ bis $2 \cdot 10^6$ ml^{-1} möglich. Bei höheren Zelldichten kommt es zur Zelldifferenzierung in das *slug*-Stadium. Das entsprechende Volumen zum Animpfen mit einer Vorkultur bei gewünschter Kultivierungszeit wurde mit folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{Z * V_K}{Z_{VK} * 2^n} \quad (3.1)$$

Hierbei ist V das benötigte Volumen aus der Vorkultur, Z die gewünschte Zelldichte nach n Generationszeiten, V_K das Kulturvolumen und Z_{VK} die Zelldichte der Vorkultur. Eine Generationszeit beträgt beim AX2-Stamm unter den beschriebenen Bedingungen acht Stunden. Zelldichten wurden mit einer Zählkammer (Neubauer) bestimmt.

3.5 Anreicherung von Zellkernen

3.5.1 Anreicherung für Elektronenmikroskopie

Alle Schritte erfolgten auf Eis oder unter Kühlung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. 100 ml *D. discoideum*-Schüttelkultur mit einer Zelldichte von maximal $2,5 \cdot 10^6$ ml^{-1} wurden in 50 ml eiskaltem Phosphatpuffer gewaschen (siehe Kapitel 3.4.3), erneut zentrifugiert und das Pellet mit modifiziertem, eiskaltem Nati's Puffer (50 mM Tris pH 7.6, 25 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 50 mM Saccharose, 1 mM Dithioeritol (alle von Merck) und Proteaseinhibitorcocktail (Roche) zu einer Zelldichte von $1 \cdot 10^8$ ml^{-1} resuspendiert (circa 1.5-3 ml). Das Einstellen der korrekten Zelldichte ist essentiell, um eine ausreichende Aufschlußeffizienz zu erreichen, wobei die Organellen intakt bleiben und zytoplasmatische Proteine in ausreichender Konzentration freigesetzt werden. Zum Zellaufschluß wurde die Zellsuspension mit einer Spritze zweimal langsam durch zwei übereinander liegende Polykarbonatfilter (Nuclepore Track-Etch-Membrane, 37 mm,

5 μm Porengröße) gedrückt und auf Eis gestellt. Die Qualität des Zellaufschlusses wurde lichtmikroskopisch untersucht (100x Vergrößerung, im Phasenkontrast). Zellkerne sollten rund und intakt also nicht geschrumpft sein und im Phasenkontrast deutlich sichtbare, dunkel erscheinende Kernkörperchen an der Oberfläche haben. Enthält das Lysat viele intakte Zellen, können diese größtenteils durch Zentrifugieren entfernt werden (1-2 min, 50xg). Allerdings kann die Konzentration zytoplasmatischer Proteine dann zu gering für *import assays* sein. Zur Anreicherung wurden 200 μl Lysat in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) 5 min bei 500xg zentrifugiert und in 600 μl Nati's Puffer gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und das Pellet des dritten Zentrifugates zunächst in 200 μl Nati's Puffer aufgenommen. Zur Einstellung der richtigen Dichte der angereicherten Zellkernsuspension für die folgende Kryo-Präparation, wurden 5 μl auf ein Deckgläschen pipettiert und im Lichtmikroskop betrachtet. Die Suspension muss zunächst 5 min erschütterungsfrei inkubiert werden, damit Zellkerne und kontaminierende intakte Zellen absinken (letztere sinken schneller ab). Die Dichte wurde dann subjektiv beurteilt, normalerweise ist eine Verdünnung von 1:2 bis 1:4 vor der Kryo-Präparation notwendig.

Die Präparation von HeLa-Zellkernen wurde in Anlehnung an das oben beschriebene Protokoll durchgeführt. Diese Methode hat gegenüber klassischen Verfahren den Vorteil, daß das bei Säugerzellkultur und Geweben übliche Anschwellen der Zellen unter Niedrigsalzbedingungen vor dem Homogenisieren durch *douncing*, umgangen wird (Melchior 1998; Berrios 1997). Unter diesen Bedingungen ist der NE durchaus physikalischem Stress ausgesetzt. HeLa-Zellen wurden in PBS gewaschen und 400 μl Zellpellet in 5 ml PBS, 20 mM Saccharose und Proteaseinhibitoren aufgenommen und einmal durch zwei übereinander liegende Polykarbonatfilter gedrückt. Die erhaltene Suspension enthielt Zellkerne in akzeptabler Ausbeute und Integrität und wurde nach vierfacher Verdünnung direkt zur Kryo-Präparation verwendet.

3.5.2 Reinigung zur Homogenität für Biochemie

Die Reinheit der oben beschriebenen angereicherten *D. discoideum*-Zellkern-Fraktion (Kapitel 3.5.1) reicht für ET aus und wurde in einem milden Verfahren gewonnen.

Für biochemische Zwecke wurden die Zellkerne zur Homogenität gereinigt. Da niedere Eukaryonten nicht über ein stabilisierendes Kernskelett aus Laminen verfügen, würden ihre Zellkerne auf einem Dichtegradienten zerplatzen. Deshalb wurden *D. discoideum*-Kerne zunächst mit einer *cushion*-Lösung an die höhere Viskosität adaptiert. In einem 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) wurde 1 ml Nati's, 1 M Saccharose (*cushion*-Lösung) vorsichtig mit 1 ml Zellaufschluß (siehe Kapitel 3.5.1) überschichtet und 10 min bei 4000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml *cushion*-Lösung resuspendiert, in einem weiteren 2 ml Reaktionsgefäß sorgfältig auf 1 ml Nati's, 2 M Saccharose gegeben und 10 min bei 21000xg zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 200 μ l Nati's, 2 M Saccharose aufgenommen und enthält Zellkerne in höchster Reinheit. Diese Suspension kann in $N_{2(l)}$ schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.6 *Import assays*

Import assays stellen eine einfache und elegante Methode dar, um die Transportaktivität intakter oder digitonisierter Zellen, sowie auch isolierter Zellkerne zu verifizieren (siehe Kapitel 1.2). Dabei wird ein fluoreszenzmarkiertes Substratprotein mit der Probe inkubiert und die Anreicherung des Signals im Zellkern in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Die *import assays* mit digitonisierten HeLa-Zellen sowie HeLa-Zellkernen wurden wie von Melchior (Melchior 1998) beschrieben durchgeführt.

Die *import assays* mit isolierten *D. discoideum*-Kernen wurden in Anlehnung an dieses Protokoll entwickelt. Zur Herstellung des zytoplasmatischen Überstandes wurde 1 ml Zellaufschluß (siehe Kapitel 3.5.1) 10 min bei 21000xg zentrifugiert und das Pellet verworfen. Für die Transportreaktionen wurden 30 μ l Zellaufschluß (oder ein Pellet angereicherter Zellkerne, resuspendiert in zytoplasmatischem Überstand) verwendet. Es wurden 50 $\mu\text{g/ml}$ Substratprotein (FITC-BSA-NLS oder NLS-2xGFP) und ein Energie-regenerierendes System (1,5 mM ATP (Adenosin-5'-Triphosphat), 5 mM Kreatinphosphat, 35 U/ml Keratinphosphatkinase, alle Sigma) zu einem totalen Volumen von 32 μ l zugegeben und 15 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Energieabhängigkeit wurde durch das Weglassen des regenerierenden Systems und auch durch Zugabe von 100 U/ml Apyrase (Sigma), beziehungsweise unterschiedlicher

Konzentrationen GMP-PNP (5'-Guanylylimidodiphosphat, Sigma), gezeigt. Die Abhängigkeit von NLS wurde mit hohen Konzentrationen FITC-BSA (375 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bewiesen. Zur Demonstration der Abhängigkeit von zytoplasmatischen Proteinen (Ran, NTF2, Importin α und β) wurden Pellets mit angereicherten Zellkernen in Puffer anstelle von zytoplasmatischem Überstand resuspendiert. Bei zeitlichen Experimenten wurde die Inkubationszeit von 1 min bis 1 h variiert und die Lichtmikroskopiebilder quantitativ ausgewertet. Dazu wurde die Fluoreszenz der individuellen Zellkerne gegen die Hintergrund-Fluoreszenz korrigiert und statistisch ausgewertet.

Import assays mit goldmarkiertem NLS-2xGFP oder RanQ69L wurden wie oben beschrieben, direkt im Lysat mit den gleichen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Die Reaktion wurde nach etwa 15 min, bedingt durch die Anreicherungsprozedur (Kapitel 3.5.1), durch Waschen mit Puffer gestoppt. Das Waschen und Abstoppen der Reaktion ist notwendig, weil in Gegenwart des zytoplasmatischen Überstandes eine relativ hohe Hintergrundkonzentration von Proteinen und Vesikeln die Datenaufnahme stört. Beim Waschen werden alle für Interaktionen mit dem NPC notwendigen Transportfaktoren und auch die Energie in Form von freiem GTP plötzlich entfernt. Dadurch wird das Andocken, die Freigabe und auch die Interaktion mit dem FxFG-Netzwerk während der eigentlichen Translokation, eingefroren. Es ist jedoch möglich, daß sich ein Transportkomplex von einer Interaktionsstelle schwacher Affinität auch nach dem Waschen weiter zu einer Interaktionsstelle höherer Affinität bewegt. Bestimmte transiente Interaktionen sind also in diesem Experiment nicht sichtbar.

3.7 Lichtmikroskopie

Alle Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 100x im Phasenkontrast-Modus aufgenommen. Dabei wurden die folgenden Mikroskoptypen verwendet: Axioplan 2, Axiovert 10, Axiovert 200M und Axiovert 35 mit konfokaler Lasereinheit (alle Zeiss).

3.8 Elektronenmikroskopie

3.8.1 Kryo-Präparation

Das Verfahren zur Kryo-Präparation von Zellkernen wurde zunächst wie in Beck *et al.* beschrieben entwickelt (Beck et al. 2004), jedoch später weiter verfeinert: EM-*grids* (200x200 Cu-mesh, 100 Holey Carbon Film R2/2, Quantifoil Micro Tools GmbH) wurden durch eine Behandlung von 30 Sekunden Dauer mit einem Plasma-*cleaner* (Harrick) hydrophilisiert und in Pinzetten eingespannt. 5 μl Zellkernsuspension wurde auf die Karbon-beschichtete Seite der EM-*Grids* pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur erschütterungsfrei inkubiert, um die Zellkerne absinken zu lassen. Um die Flüssigkeit-abziehende Kapillarwirkung der Pinzette während der relativ langen Inkubationszeit zu minimieren, können vorher 5 μl Puffer zwischen die beiden Arme der Pinzette pipettiert werden. Danach wurden 2 μl einer 15 nm Goldpartikelsuspension zugegeben (zur späteren Alignierung der Projektionen) und die Pinzette in die Einschußvorrichtung (Eigenbau Rudolf Gatz, MPI für Biochemie) eingespannt. Mit einem Filterpapier (Watman) wurde die überschüssige Flüssigkeit, von der unbeschichteten Seite der EM-*grids* aus, abgezogen (etwa 1-2 Sekunden) und der Einschußvorgang in flüssiges Ethan ausgelöst. Die Proben wurden dann in $\text{N}_2(l)$ überführt und bis zur Datenaufnahme gelagert.

3.8.2 Kryo-Elektronentomographie (Kryo-ET)

Alle Kryo-Elektronen-Tomogramme wurden an einem Phillips CM300 oder FEI Polara aufgenommen. Beide Mikroskope waren mit einer FEG (betrieben bei 300 kV) und einem *post column energy filter* mit CCD-Kamera (Gatan GIF 2002) ausgerüstet. Im Falle des Phillips CM300 wurde ein Kryo-Probenhalter von Gatan, im Falle des FEI Polara ein Kryo-*cartridge*-System (FEI), verwendet. Die Proben wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in den jeweiligen Probenhalter überführt und in das Mikroskop eingebaut. Alle Kippserien wurden typischerweise von -63 bis 63° und mit $1,5$ - 2° Inkrement bei einem Defokuswert von 12 - $15 \mu\text{m}$ aufgenommen. Die Pixelgrößen auf Probenebene bei gegebenem Defokuswert wurden mit Hilfe von Katalasekristallen bestimmt und waren 0.82 nm am CM300, sowie 0.79 nm (vor dem

20.12.2004) beziehungsweise 0.77 nm (nach dem 20.12.2004). Für die unterschiedlichen Pixelgrößen erfolgte eine Korrektur während der Alignierung von Einzelpartikeln (siehe unten). Die theoretische Auflösungsgrenze für ein individuelles Tomogramm war 4,9-5,5 nm (gegeben durch Defokuswert und die erste Nullstelle der CTF).

3.9 Bildbearbeitung

3.9.1 Rekonstruktion von Tomogrammen

Die Rekonstruktion von Tomogrammen erfolgte mittels der *weighted backprojection* Methode im EM Software-System (Hegerl 1996). Die rekonstruierten Volumen mit typischerweise 512x512x256 Voxels (420x420x210 nm³) entsprechen in ihrer Abtastungsrate einem Viertel der aufgenommenen Projektionen (2048x2048 Pixel). Alle 3D *Isosurface*-Darstellungen wurden mit dem Amira Software Paket (TGS) erstellt. Um das SNR des in Abb. 4.4 gezeigten Volumens zu verbessern, wurde ein anisotroper *denoising*-Algorithmus angewendet (Frangakis und Hegerl 2001).

3.9.2 Datenverarbeitung von Einzelpartikeln

Zur Prozessierung von Einzelpartikel-Subtomogrammen kamen im wesentlichen Algorithmen auf Basis der EM-, TOM- und *av3 for TOM*-Software-Pakete zum Einsatz (Hegerl 1996; Nickell et al. 2005; Förster et al. 2005). Alle Prozeduren des *av3 for TOM*-Paketes wurden von Friedrich Förster entwickelt. Zur Einzelpartikelanalyse von goldmarkierten Kernporen, sowie goldmarkierten und unmarkierten NPC-Proteomeren wurden die Prozeduren des *engager for TOM*-Paketes entwickelt.

3D Alignierung und Mittelung von NPC-Einzelpartikeln

Dieser Teil der Arbeit wurde wie in Beck *et al.* und Förster *et al.* ausführlich beschrieben durchgeführt (Beck et al. 2004; Förster 2005; Förster et al. 2005). In Kürze: Individuelle NPCs wurden mit Hilfe der Prozeduren `tom_picker.m` beziehungsweise `em_picker.inp` manuell in den Tomogrammen lokalisiert, die entsprechenden Subvolumen mit Einzelpartikeln von 64x64x64 Voxels ausgeschnitten, auf einen Mittelwert

von 0 sowie einer Standardabweichung von 1 normalisiert und separat abgespeichert (Voxelgröße von circa $3,3 \text{ nm}^3$ auf Probenebene). Die Hülle der Zellkerne in den einzelnen Tomogrammen wurde mit Hilfe des EM-Softwaresystems als Ellipsoid approximiert. Aus dem resultierenden Modell und den Koordinaten der Einzelpartikel wurde deren Normalenvektor bestimmt (Prozedur: `av3_ellipos2angle.m`) und als initiale Orientierung verwendet. Eine erste Referenz wurde durch manuelle Alignierung der Rotation und Auswanderung der Einzelpartikel mit Hilfe der Prozeduren `eva_angle.inp` und `eva_shift.inp` sowie anschließende Mittelung erhalten. Der nächste Schritt erfolgte iterativ: Die Prozedur `av3_scan_angles_exact.m` rotiert die Referenz in die angenommene Orientierung des Einzelpartikels und gewichtet vor der Kreuzkorrelation mit einem künstlichen *missing wedge* bekannter Größe (Parameter der Datensammlung). Aufgrund der Intensität des Kreuzkorrelationspeaks kann die Orientierung des Einzelpartikels optimiert werden, während die Position des Peaks Auskunft über die Auswanderung gibt. Die Konvergenz dieses Algorithmus wurde mit der Prozedur `av3_motlanalyze.m` überprüft. Zur Verbesserung des SNR wurden einzelne Partikel auf Grund der Höhe ihres Kreuzkorrelationspeaks ausgeschlossen. Die Orientierung eines Einzelpartikels wurde durch die Eulerschen Rotations- (ϕ), Nutations- (ψ) und Präzessionswinkel (θ) beschrieben. Dabei entspricht die Rotation um die nukleozytoplasmatische Achse dem Eulerwinkel ϕ und wurde zunächst zufällig gesetzt. Dieser Winkel kann durch die Prozedur `av3_phialig.m` separat aligniert werden, wobei der gesamte Winkelbereich in einem Schritt abgetastet wird. Hieraus ergab sich eine achtfache Rotationssymmetrie, welche für die weitere Alignierung für die Referenzen angenommen wurde¹. Am Ende wurden die alignierten Einzelpartikel mit $256 \times 256 \times 256$ Voxels rekonstruiert, mit Hilfe der GRID ZOOM-Funktion des EM-Systems für die unterschiedlichen Pixelgrößen korrigiert und wiederum auf $128 \times 128 \times 128$ Voxels (entspricht einer Voxelgröße von $1,64 \text{ nm}^3$ auf Probenebene) reduziert. Um gegebenenfalls für die Dämpfung der CTFs der unterschiedlichen CCD-Kameras korrigieren zu können, wurde bei dieser Abtastungsrate ein zweites Einzelpartikelset durch Dekonvolution generiert und separat gespeichert (Prozedur `av3_parti_deconv.m`). Hierzu wurde

¹Einzelpartikelalignierung mit angenommener Rotationsymmetrie (*imposed symmetry*) bedeutet, daß die Referenz vor der Kreuzkorrelation mit dem Einzelpartikel entsprechend der Symmetrie rotationsgemittelt wird. Hierdurch kann das SNR der Kreuzkorrelation deutlich verbessert werden.

jeder Einzelpartikel Fourier-transformiert, durch die entsprechende MTF (Modulationstransferfunktion, *modulation transfer function*) geteilt und zurücktransformiert. Um den Einfluß von den stärker verauschten sehr hohen Frequenzen zu minimieren, wurde die MTF jenseits der halben Nyquist-Frequenz als konstant angenommen. Die Alignierung wurde in beiden Fällen wie oben beschrieben zur Konvergenz gebracht und die Auflösung durch Fourierringkorrelation (*Fourier-ring correlation*, FRC) bestimmt (Saxton und Baumeister 1982).

3D Alignierung und Mittelung von NPC-Proteomeren

Nur wenn die acht asymmetrischen Einheiten jedes NPC-Einzelpartikels tatsächlich perfekt rotationsymmetrisch angeordnet sind, ist die bei der Alignierung angenommene Rotationssymmetrie richtig. Sollten einzelne Proteomere von der idealen Anordnung abweichen, würde sich dies als limitierender Faktor auf die Auflösung der gemittelten Struktur auswirken. Deshalb ist es sinnvoll diese Eventualität zu berücksichtigen und die einzelnen Proteomere symmetrieunabhängig zu alignieren.

Die Alignierung von NPC-Proteomeren erfolgte auf der Basis der NPC-Einzelpartikelalignierung mit Hilfe der Prozedur `engager_extrSU.m`. Die acht asymmetrischen Einheiten der Kernpore (Proteomere) sind durch Regionen niedrigerer Dichte voneinander getrennt und in der gemittelten Struktur subjektiv erkennbar. Zunächst wurden acht Vektoren mit einem ϕ -Inkrement von 45° im Polarkoordinatensystem generiert die jeweils das Zentrum eines Proteomers in der Referenzstruktur markieren. Mittels der aus der NPC-Einzelpartikelalignierung erhaltenen Information wurden diese Vektoren für jedes NPC-Einzelpartikel so rotiert, daß sie die Proteomere des Einzelpartikels markieren. Die asymmetrischen Einheiten wurden nun aus den NPC-Einzelpartikel ausgeschnitten und mit $64 \times 64 \times 64$ Voxels (entspricht einer Voxelgröße von $1,64 \text{ nm}^3$ auf Probenebene) gespeichert und eine neue Alignierungstabelle (Motivliste) mit dem des jeweiligen Proteomers entsprechenden Rotationswinkel (ψ , Inkrement von 45°) erstellt. Die Alignierung von 4184 so erhaltenen Einzelpartikeln erfolgte wie oben beschrieben, jedoch ohne die angenommene achtfache Rotationssymmetrie.

Klassifizierung des zentralen Kanals

Die Klassifizierung von Einzelpartikeln wurde durch eine Bestimmung des Schwerpunktes des CP durchgeführt (Beck et al. 2004; Förster 2005). Diese Methode funktioniert unabhängig von Verzerrungen durch den *missing wedge*, was durch eine Simulation gezeigt wurde. Die Einzelpartikel wurden mit einem Gauss-Filter geglättet und der zentrale Kanal ellipsoid maskiert. Die Intensitäten innerhalb der Maske unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes (Intensität des Puffers auf der zytoplasmatischen Seite) abgeschnitten. Der Schwerpunkt wurde ermittelt und ein Histogramm über alle Einzelpartikel entlang der nukleozytoplasmatischen Achse aufgetragen (Prozeduren `ctr_class.m` und `eva_ctrstack.m`). Die sich daraus ergebende Verteilung ließ sich annähernd durch eine "Doppel"-Gauss-Funktion beschreiben und wurde als Kriterium zur Separation der Einzelpartikel in zwei Klassen verwendet. Kurvenfits wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate in Matlab durchgeführt.

Klassifizierung und Lokalisierung von Goldpartikeln in Subtomogrammen

Die Lokalisierung von Goldpartikeln in Subtomogrammen erfolgte manuell mit Hilfe der Prozedur `clickit.inp`. Zur Klassifizierung der erhaltenen Koordinaten von goldmarkierten Importkomplexen wurde eine Eigenvektoranalyse (implementiert als *principal component analysis* im *av3 for TOM*-Software-Paket) durchgeführt. Um markierte asymmetrische Einheiten zu identifizieren und die Koordinaten der einzelnen Proteomere zu kombinieren, wurde die Prozedur `engager_rotateCoor.m` verwendet. Die Punktwolke wurde so in drei Klassen eingeteilt, die hauptsächlich Importkomplexen an den zytoplasmatischen Filamenten beziehungsweise im zentralen Kanal oder Kernplasma entsprechen. Aus diesen drei neuen Punktwolken konnten drei entsprechende strukturelle Klassen ermittelt werden. Die Einzelpartikel dieser strukturellen Klassen wurden mit und ohne angenommener Symmetrie mit dem oben beschriebenen Verfahren aligniert.

Desweiteren wurden im gleichen multivariaten statistischen Verfahren alle Einzelpartikel klassifiziert. Da goldmarkierte Partikel zu den einzelnen Klassen beitragen, ist die Darstellung der entsprechenden Koordinaten von Importkomplexen möglich. Mit

Hilfe der Prozeduren `class_maxdist.m` beziehungsweise `class_maxres.m` wurde entweder der Abstand des Mittelwertes der Koordinaten, oder die Auflösung der Struktur der Klassen durch die Wahl geeigneter Eigenvektoren maximiert.

Zur Berechnung von 3D-Aufenthaltswahrscheinlichkeiten wurde an jede durch die ermittelten Koordinaten beschriebene Position eine 3D-Gauss-Funktion zu einem Volumen (skaliert zur NPC-Struktur) addiert. Als Breite der Gauss-Funktionen wurde das Vertrauensintervall, gegeben durch die Auflösung der gemittelten Struktur (etwa 8 nm), angenommen. Nach der Addition für alle Koordinaten ergaben sich Regionen mit höherer und niedrigerer Intensität. Zur Verbesserung des SNR wurde die Information von den einzelnen asymmetrischen Einheiten durch die Anwendung von achtfacher Rotationssymmetrie kombiniert.

3.10 Klonierung von *D. discoideum*-Nukleoporinen

3.10.1 Sequenz-Alignierung

Die Identifikation putativer *D. discoideum*-Nukleoporine erfolgte durch Sequenzalignierung von Genen bekannter Nups (human und Hefe) mit der genomischen Sequenz von *D. discoideum* (DictyBase-Genominformationssystem). Als Quelle für bekannte Nup-Gene dienten SWISSProt und EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*). Ein genauere Sequenzvergleich wurde mit dem BLAST-Service von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) durchgeführt.

3.10.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion

$5 \cdot 10^7$ Zellen aus einer Suspensionskultur wurden mit Hilfe eines QIAshredder (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben aufgeschlossen. Die RNA-Präparation wurde mit einem RNeasy-Prepkit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Alle reversen Transkriptionen (RT, *reverse transcription*) und Polymerasekettenreaktionen (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) wurden mit einem OneStep-RT-PCR-Kit (Qiagen) und einem GeneAmp PCR 2400 (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben

durchgeführt. Es wurde folgendes Programm verwendet, wobei die Dauer der Polymerisation sowie *Annealing*-Temperatur individuell angepaßt wurden:

Schritt 1	30 min	50 °C	Reverse Transkription
Schritt 2	15 min	95 °C	Denaturierung
Zyklus 1 (50x)	45 s	94 °C	Schmelzen der DNA
	45 s	53 °C	<i>Annealing</i>
	1 min	72 °C	Polymerisation
Schritt 3	10 min	72 °C	Polymerisation

Die in Tab. 3.2 aufgeführten Primer (Metabion) wurden mit einer Endkonzentration von 0,6 μM verwendet.

Nukleoporin, DictyBase Id, <i>site</i>	Primer <i>sense, antisense</i>	Länge <i>tem- plate</i> (bp)	PCR- Produkt
DdRan, DDB0001991, Cla I	CCATCGATATGGCAGAAAAA- GAACAAATTAATTAG, CCATCGATTTACAAGTCATC- ATTGTCTTCTGG	639	ja
DdNup43, DDB0204323, BamH I Hind III	CGGGATCCGGTATGAGTTCA- GTCAGCGTAC, CGGGATCCTTAAAGTGATTT- TACAATTAACATTG CCCAAGCTTGGTATGAGTTC- AGTCAGCGTAC, CCCAAGCTTTTAAAGTGATT- TTACAATTAACATTG	1254	ja
DdNup62, DDB0167902, Cla I	CCATCGATATGTCAAACAAT- TTATTTGGTAC, CCATCGATTTATCTTCTTGA- AGTTTCAGG	2130	ja
DdNup75, DDB0186484, BamH I Hind III	CGGGATCCGGTATGTTTTCA- TTAAATCCACAATC, CGGGATCCTTAGGATATGAT- TGACTTTGC CCCAAGCTTGGTATGTTTTTC- ATTAAATCCACAATC, CCCAAGCTTTTAGGATATGA- TTGACTTTGC	2673	ja

DdNup93, DDB0189316, BamH I Hind III	CGGGATCCGGTATGAATGTA- AAGGAAATGGATTTTAATG, CGGGATCCTTAATTAGACAT- TGAGATAAATAAATTC CCCAAGCTTGGTATGAATGT- AAAGGAAATGGATTTTAATG, CCCAAGCTTTTAATTAGACA- TTGAGATAAATAAATTC	2940	ja
DdNup107, DDB0186582, BamH I Hind III	CGGGATCCGGTATGTCAGAA- AATTTTAAATGGAATTTAGG, CGGGATCCTTAATTTAATAA- TTTAATTGAACTTTCTC CCCAAGCTTGGTATGTCAGA- AAATTTTAAATGGAATTTAGG, CCCAAGCTTTTAATTTAATA- ATTTAATTGAACTTTCTC	2904	ja
DdNup155, DDB0189286, BamH I	CGGGATCCGGTATGCGTCAA- TCACAATTATACC, CGGGATCCTTAATAACCTCT- AAAATCTTTAAAAG	4728	ja
DdALADIN, DDB0168294, BamH I Hind III	CGGGATCCGGTATGATTGAA- GAACATAATTGTTTTG, CGGGATCCTTATTGTTTATA- TTGATATAATAATGGG CCCAAGCTTGGTATGATTGA- AGAACATAATTGTTTTG, CCCAAGCTTTTATTGTTTAT- ATTGATATAATAATGGG	1416	ja

DdGle2, DDB0185717, EcoR I	GGAATTCATGTTTTCAACAT- CAACAACACTAC, GGAATTCTTATCTCTTTTTA- GTTTGTCTATTTC	1029	ja
DdTpr, DDB0187764, BamH I	CGGGATCCGGTATGACATCT- GTTAGTGATTC, CGGGATCCTTATTCTTGCGA- TGGTTGATTATC	6114	nein
DdSeh1, DDB0169145, BamH I	GGAATTCATGAGAGTATTTTC- ATAGACTTTC, GGAATTCTTATCTGTCATAT- TTATCTTCTGTGC	1404	ja
DdSec13R, DDB0184189, Cla I	CCATCGATATGGAAGTAATA- TGGATAAGAAG, CCATCGATTTAATTATTTTC- AACATGAGAAATTAATTTC	1014	nein

Tabelle 3.2: Primer zur Klonierung putativer *D. discoideum*-Nukleoporine.

3.10.3 Klonierung, Subklonierung, Sequenzanalyse

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese und Extraktion (GelExtraction-Kit, Qiagen) gereinigt, mittels TOPO-Cloning-Kit (Invitrogen) kloniert, danach vermehrt und mit T7-Primern sequenziert. Das Insert wurde unter Verwendung der eingefügten Schnittstellen (siehe Tab. 3.2) in die *D. discoideum*-Insertions-Kassetten pDEX82 beziehungsweise pBsrH339-3 subkloniert. Diese Plasmide sind *E. coli* - *D. discoideum*-shuttle-Vektoren und wurden freundlicherweise von A. Müller-Taubenberger (MPI für Biochemie) zur Verfügung gestellt. Das Insert wurde als N-terminales

GFP- beziehungsweise RFP-Fusionsprotein exprimiert. Die Identifikation von Klonen mit korrekter Insertlänge und Orientierung erfolgte durch Restriktions- und Sequenzanalyse (MWG). Hierfür wurde ein Primer für die C-terminale Region von GFP verwendet (CTGATCTGATATCATCG).

3.11 Expression von *Dictyostelium* Nukleoporinen

3.11.1 Transformation

$1 \cdot 10^8$ Zellen wurden mit kaltem, sterilem Phosphatpuffer (5 min bei 400xg, 17 mM Kaliumphosphat pH 7,6) und mit 30 ml Elektroporationspuffer (100 mM Kaliumphosphat, 1 mM Saccharose pH 6,1) gewaschen, in 30 ml Elektroporationspuffer resuspendiert und gezählt. Die Zellsuspension wurde mit Elektroporationspuffer auf circa $5 \cdot 10^7 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt und mit 15-30 μg DNA in eine 800 μl Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 4 mm, Biorad) gegeben. Nach dem Puls von 3 μF und 1 kV wurden die Zellen kurz auf Eis und danach 15 min bei Raumtemperatur in einem *costar well* inkubiert. Nach der Zugabe von 8 μl $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ (0,1 M) wurde 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und je 200 μl auf 4 Petri-Schalen mit je 10 ml Medium verteilt (Negativkontrolle: Zellen ohne DNA). Die Schalen wurden über Nacht wie beschrieben kultiviert (siehe Kapitel 3.4.3) und dann die Antibiotika zur Selektion zugegeben (für pDEX82 mit $20 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ G418, für pBsrH339-3 mit $10 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ Bsr).

3.11.2 *Dilution cloning*

Die Insertions-Kassetten integrieren sich zufällig in das *D. discoideum*-Genom. Aus diesem Grund müssen zwei unabhängige Klone mit, von der Fluoreszenzmarkierung abgesehen, "normalem" Phänotyp selektiert werden. Das geschieht im *Dilution cloning*-Verfahren. Waren auf einer transformierten Schale (siehe Kapitel 3.11.1) Kolonien sichtbar (kann bis zu 3 Wochen dauern), wurden diese abgespült und einige Tropfen der Suspension auf eine SM-Platte mit Bakterienrasen gegeben (Kokultivierung mit *E. coli* B/R, siehe DictyBase). Die Zellen wurden mit einem Drigalski-Spatel verteilt

und zur Verdünnungen mit demselben Spatel auf zwei bis drei weitere Platten verteilt. Bei wachsenden Klonen bilden sich auf der Platte mit der richtigen Verdünnung gut sichtbare Löcher im Bakterienrasen, die mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in adhärenzte *costar well*-Flüssigkulturen überführt wurden (AX-Medium, Antibiotikum zur Selektion, Streptomycin 500 mg ml⁻¹). Die wachsenden Klone wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie selektiert und weiter kultiviert.

3.11.3 Sporulation

Zur Lagerung bei -80 °C wurden die *D. discoideum*-Stämme in das Sporen-Stadium überführt. Dazu wurden die Zellen von drei konfluenten Petri-Schalen in Phosphatpuffer (siehe Kapitel 3.4.3) gewaschen, in circa 1 ml demselben Puffer aufgenommen und auf Phosphatpuffer-Agarplatten verteilt. Nach einigen Tagen bilden sich Sporen, die in Phosphatpuffer aufgenommen und in vier bis acht 600 µl Aliquote eingefroren wurden.

3.11.4 Synchronisieren von *D. discoideum*-Zellen

Das Synchronisieren von *D. discoideum*-Zellen erfolgte mit zwei Methoden. Beim Temperatur-*shift*-Verfahren wurde das Medium der Zellen von einer Petri-Schale entfernt und statt dessen Phosphatpuffer hinzugegeben. Die Schale wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellzyklus wird durch Temperatur und Entzug des Mediums arretiert. Die Kulturen wurden am folgenden Morgen in frisches Medium überführt und bei Raumtemperatur weiter inkubiert. Die Zellen gehen aus dem so erzeugten Arrest relativ synchron zum normalen Zellzyklus über. Nach circa drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur sind viele Mitosen sichtbar.

Die Synchronisation mit 0.1 bis 0.5 % Thiabendazol (Sigma) ist weniger schonend, aber nach spätestens acht Stunden haben im Lichtmikroskop quasi 100 % der Zellen ein mitotisches Erscheinungsbild.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Präparation und Kryo-ET von isolierten und transportaktiven Zellkernen

Da die Anwendung von Kryo-Elektronentomographie (Kryo-ET) auf eine maximale Probendicke von circa 500-800 nm begrenzt ist, erscheint die Tomographie von Zellkernen in intakten Zellen für alle gängigen biologischen Modellsysteme absolut unmöglich. Desweiteren erlaubt ein offenes System wie ein isolierter Zellkern das Einführen von goldmarkierten Komponenten. Aus diesem Grund bildet die Präparation von isolierten, transportaktiven Zellkernen die Basis für diese Arbeit. Die Tatsache, daß die Kernhülle (NE, *nuclear envelope*) von isolierten Zellkernen oftmals nicht intakt ist und damit die Kerne nicht transportaktiv sind, schränkt die Anzahl der möglichen Modellsysteme weiter ein. Etablierte, offene und transportaktive Systeme wie rekonstituierte Zellkerne (Burke und Gerace 1986; Lohka 1997), mit Membranextrakt behandelte Rattenleberzellkerne oder reaktivierte *Xenopus*-NEs (Siebrasse und Peters 2002) erwiesen sich wegen ihrer Größe oder der Einzelpartikelorientierung der Kernporen (NPCs, *nuclear pore complexes*) als ungeeignet.

Der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ist leicht kultivierbar und verfügt über relativ kleine Zellkerne (circa 2-5 μm). Ein besonders schonendes Zellaufschlußverfahren (Kapitel 3.5.1) ermöglicht die Präparation von intakten Organellen. Aus einem solchen Lysat gelang die Anreicherung von transportaktiven Zellkernen (Abb. 4.1). Verschiedene Experimente bestätigten den Energie-abhängigen, aktiven Transport unterschiedlicher Substrate in isolierte *D. discoideum*-Zellkerne (Kapitel 3.6). Die Anreicherung eines Importsubstrates von ausreichender Größe ist GTP-abhängig, während Moleküle von weniger als 40 kDa frei diffundieren können. Sowohl bei digitonisierten HeLa-Zellen (Melchior et al. 1993) als auch bei isolierten *D. discoideum*-Zellkernen verläuft der Import von verschiedenen Modellsubstraten über ein gewisses

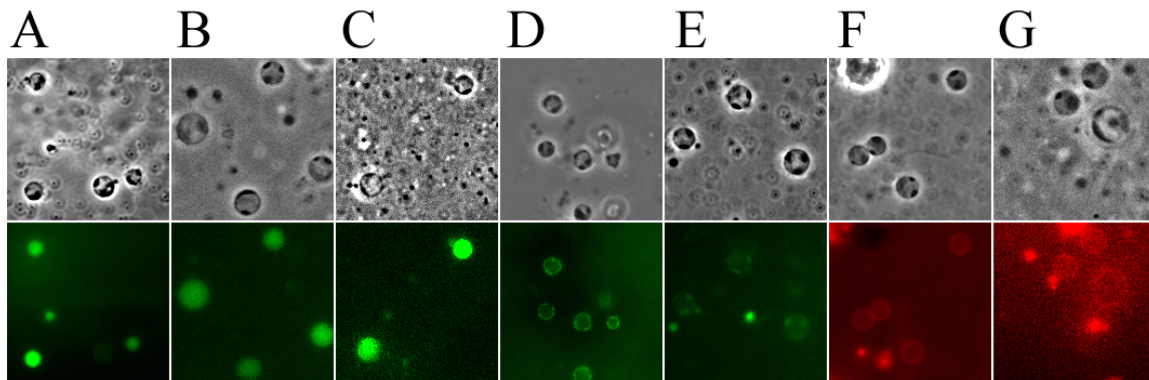


Abbildung 4.1: *Import assays* mit isolierten *D. discoideum*-Kernen und unterschiedlichen Substraten bei 100x Vergrößerung (Phasenkontrastbilder oben, Fluoreszenzbilder unten). A. und B. FITC-BSA-NLS. C. NLS-2xGFP. D. FITC-BSA-NLS mit rekombinantem Importin α , Importin β und Ran. E. FITC-Proteasom (*T. acidophilum*). F. Rhodamin-BSA-NLS. G. Rhodamin-BSA-NLS konjugiert mit kolloidalem Gold (5 nm). Die *Import assays* wurden im Fall von A, C, E, F und G im Zellaufschluß, im Fall von B mit angereicherten Zellkernen in zytoplasmatischem Überstand und im Fall von C mit angereicherten Zellkernen in Puffer durchgeführt. Die Bilder wurden mit verschiedenen Mikroskopen aufgenommen und sind nicht zueinander skaliert. Der Durchmesser eines *D. discoideum*-Zellkerns beträgt im Mittel circa 2-5 μm .

Zeitfenster linear (Abb. 4.2).

In einem analogen Präparationsverfahren gewonnene HeLa-Zellkerne (Kapitel 3.5.1) erwiesen sich an der Peripherie trotz ihrer Größe als tomographierbar, waren jedoch nicht transportaktiv. Als zusätzlicher Nachteil erwies sich die niedrigere Kernporendichte in der Kernhülle (Abb. 4.3), obwohl die Kernporen beider Organismen ungefähr die gleiche Größe haben. Die zum Teil beschädigte Kernhülle des HeLa-Zellkerns ist in der Rekonstruktion sichtbar. Das Zytoplasma der frei beweglichen *D. discoideum*-Zellen verhält sich außergewöhnlich dynamisch und deren ER ist nur an sehr wenigen Stellen durch sehr schmale Verbindungen mit dem Zellkern verknüpft (Muller-Taubenberger et al. 2001). Möglicherweise können sich die äußeren Kernmembranen von *D. discoideum*-Kernen deshalb nach ihrer Isolation während des Zellaufschlusses relativ schnell wieder versiegeln, während größere fehlende Stücke bei anderen Zelltypen geöffnet bleiben und die Ausbildung des Ran-Gradienten verhindern. Im letzteren Fall wäre somit das Kerntransportsystem nachhaltig gestört.

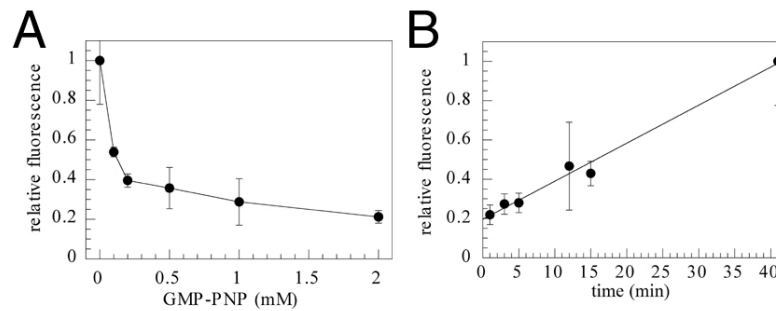


Abbildung 4.2: Aktiver, Energie-abhängiger Import von FITC-BSA-NLS in isolierte *D. discoideum*-Zellkerne. A. Transportrate in Abhängigkeit von der Konzentration des GTPase-Inhibitors GMP-PNP. B. Zeitabhängigkeit des Importvorgangs.

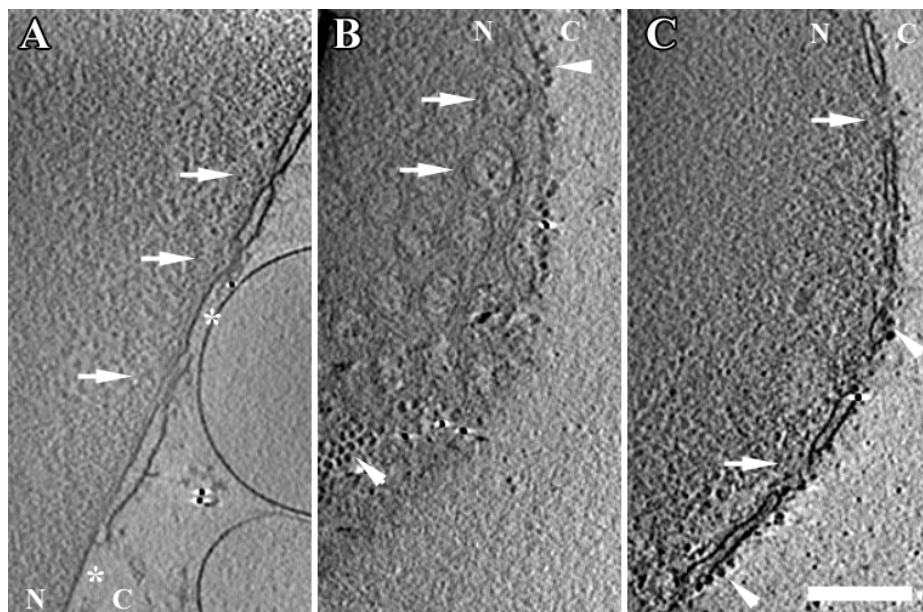


Abbildung 4.3: Schnitte von 3,28 nm Dicke durch Kryo-Elektronentomogramme von einem isolierten HeLa-Zellkern in A und einem *D. discoideum*-Zellkern in B und C. N und C zeigen die Kernplasma- beziehungsweise zytoplasmatische Seite an. Pfeile markieren individuelle Kernporen in Seitenansicht (A und C) sowie Aufsicht (B). Die zum Teil fehlende äußere Kernmembran des HeLa-Zellkerns ist mit Sternchen markiert. Pfeilspitzen zeigen mit der äußeren Kernmembran des *D. discoideum*-Zellkerns verbundene Ribosomen. Skalierungsbalken 200 nm.

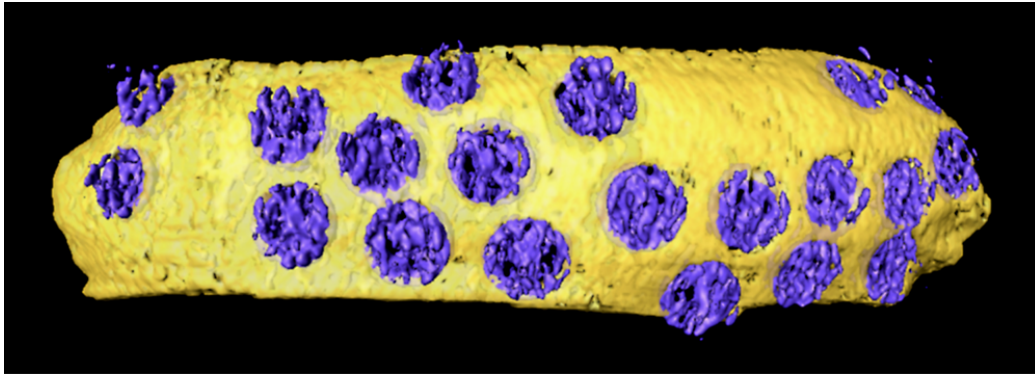


Abbildung 4.4: Tomogramm eines Ausschnittes der *D. discoideum*-Kernhülle als 3D-*isosurface*-Darstellung mit den Kernmembranen in gelb und Kernporen in blau. Die Dimensionen des gezeigten Volumens sind 1680x984x558 nm, die Kernporendichte entspricht circa $45 \mu\text{m}^{-2}$.

Zusammenfassend bieten *D. discoideum*-Zellkerne Vorteile für die strukturelle Analyse durch Kryo-ET gegeben durch ihre Größe, Kernporendichte, Einfachheit der biologischen Präparation, Transportaktivität und nicht zuletzt wegen der gut reproduzierbaren Kryo-Präparation (siehe Kapitel 3.8.1).

4.2 Einzelpartikelanalyse von *D. discoideum*-Kernporen (NPCs)

Im Gegensatz zur konventionellen Einzelpartikelanalyse sind durch Kryo-ET erhaltene Einzelpartikel bereits 3D rekonstruiert und werden durch circa 60-85 Einzelprojektionen repräsentiert. Anstelle des bei der klassischen Einzelpartikelanalyse gegebenen Winkelbestimmungsproblems, muss hier die räumliche Orientierung jedes Einzelpartikels 3D ermittelt werden. Dies wurde bereits früher erfolgreich durchgeführt (Walz et al. 1997; Stoffer et al. 2003). Infolge der freien Orientierung der NPC-Einzelpartikel innerhalb der Kernhülle eines intakten Zellkerns ergab sich im Vergleich zu den genannten Arbeiten allerdings ein zusätzliches Problem: Die erwünschte isotrop abgestete Struktur, welche als Referenz für die Alignierung fungierte, ist mit den in unterschiedlichen räumlichen Richtungen *missing wedge*-verzerrten Einzelpartikeln nicht

direkt vergleichbar. Tatsächlich ermöglichte die Anwendung der vorher veröffentlichten Algorithmen keine signifikante Alignierung der NPC-Einzelpartikel. Dieses Problem konnte mittels Gewichtung der Referenz mit einem künstlichen *missing wedge* vor dem Vergleich mit jedem Einzelpartikel durch Kreuzkorrelation behoben werden. Der hierfür erforderliche iterative Algorithmus zur NPC-Einzelpartikelalignierung wurde maßgeblich von Friedrich Förster entwickelt und ist in Kapitel 3.9.2 und in (Beck et al. 2004; Förster 2005; Förster et al. 2005) detaillierter beschrieben.

Vor der iterativen Alignierung der NPC-Einzelpartikel mußten jedoch zwei andere Probleme bewältigt werden. Die Lokalisierung der individuellen NPCs und das Ausschneiden von Subtomogrammen war ohne initiale Referenz nur manuell möglich. Von den so identifizierten Kernporen (siehe Abb. 4.4) wurde der Normalenvektor im Bezug auf die Kernhülle bestimmt. Diese erste grobe Orientierung und Auswanderung wurde manuell weiter verfeinert und danach durch Mittelung eine erste Referenz erzeugt (Kapitel 3.9.2). Die automatische Erkennung von Einzelpartikeln durch Mustererkennung mittels Kreuzkorrelationsmethoden erwies sich bei den hier vorliegenden membraneingebetteten Strukturen als äußerst schwierig und konnte auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht angewendet werden.

4.2.1 Struktur des *D. discoideum*-Kernporenkomplexes

Die so durchgeführte Alignierung und Mittelung von circa 250 Einzelpartikeln aus 16 Tomogrammen ergab eine Struktur des *D. discoideum*-NPCs mit einer Auflösung von 8,8 nm (Abb. 4.11). Alle bereits vorher durch mehrere andere Technologien in anderen biologischen Systemen entdeckten morphologischen Elemente des NPCs sind in der EM-Dichte sichtbar (Abb. 4.5). Dadurch wird die Konservierung dieser Elemente auch in niederen Eukaryonten deutlich. Ein auffallender Unterschied im Vergleich mit früheren Kryo-EM-Strukturen ist die geringere Ausdehnung entlang der nukleozytoplasmatischen Achse, die sich in der isotropen Abtastung begründet (siehe Kapitel 1.3.2 und Abb. 1.6). Tatsächlich erstreckt sich die Gerüststruktur der Kernpore, bestehend aus den drei Ringen, nur unwesentlich weiter als durch den Abstand der beiden Kernmembranen gegeben. Möglicherweise wird dieser Abstand genau hierdurch definiert. Die Masse im zentralen Kanal (CP, *central plug*) besteht aus einer kleineren

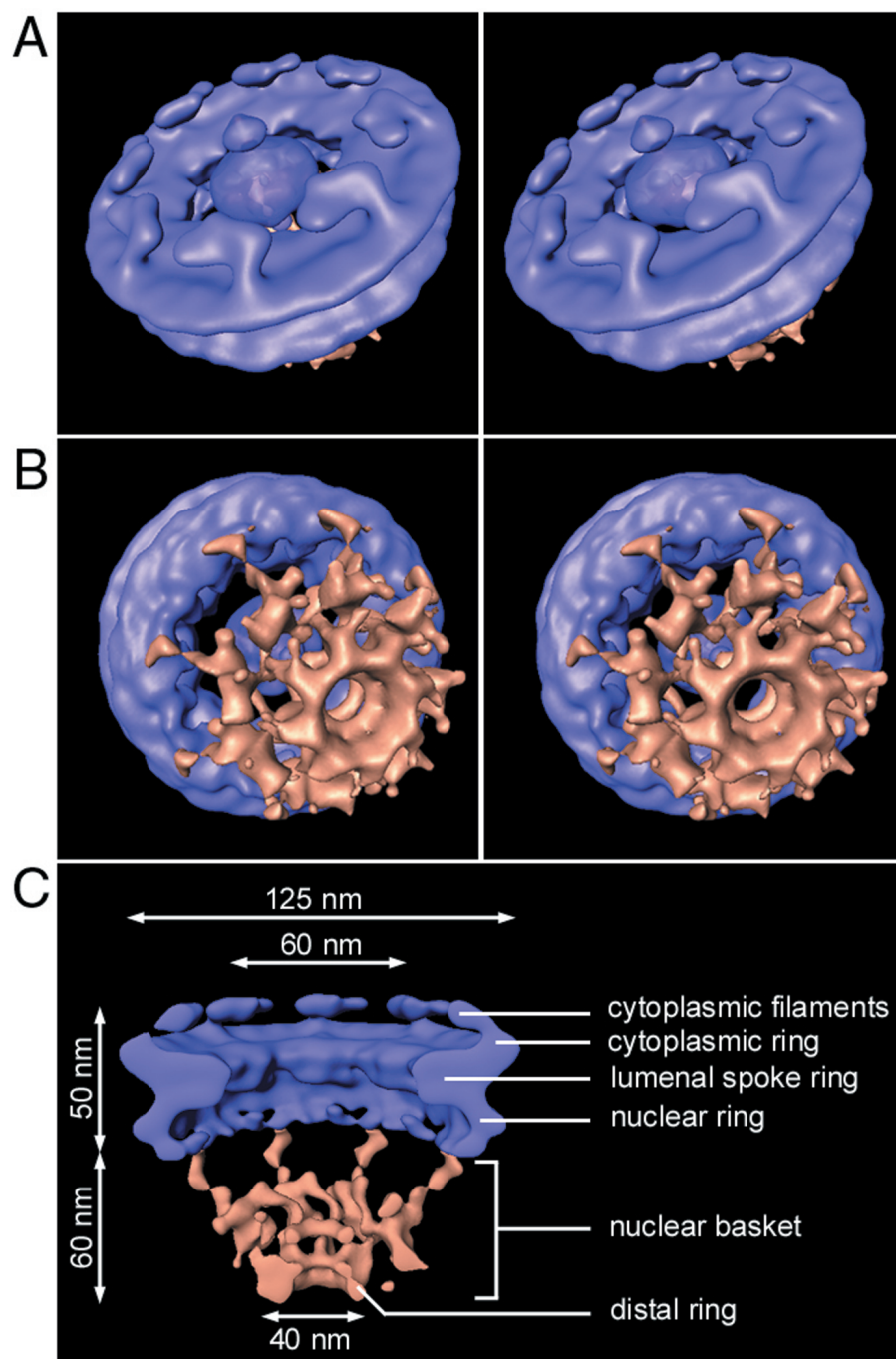


Abbildung 4.5: Kryo-EM-Struktur des *D. discoideum*-NPC mit einer Auflösung von 8,8 nm. A. zytosmatische Ansicht der Kernpore in stereo. Die zytosmatischen Filamente sind um den zentralen Kanal gruppiert gebogen und zeigen auf die Masse im Kanal (CP). B. Ansicht aus dem Kernplasma in stereo. Der distale Ring ist durch acht nukleäre Filamente mit dem nukleären Ring verbunden. C. Aufgeschnittene Ansicht ohne CP. Der zytosmatische Ring, Speichenring und nukleäre Ring formen einen zentralen Kanal mit einer maximalen Öffnung von circa 60 nm und einer Länge von circa 50 nm. Der *nuclear basket* ist in braun dargestellt. Die Dimensionen der wichtigsten Bestandteile sind angegeben.

Substruktur (etwa 18 nm) auf der zytoplasmatischen Seite und einer größeren Dichte (etwa 38 nm), die sich in einer Ebene mit dem Speichenring befindet.

4.2.2 Einzelpartikelanalyse von NPC-Proteomeren

Der NPC besteht aus acht asymmetrischen Einheiten (Proteomeren¹) die rotations-symmetrisch um die nukleozytoplasmatische Achse angeordnet sind. In SEM-Aufnahmen von Krallenfrosch-NPCs wird deutlich, daß diese Anordnung nicht immer perfekt kreisförmig, sondern teilweise leicht elliptisch vorliegt. Auch Kryo-EM-Experimente bestätigten eine gewisse Plastizität der NPC-Struktur (Akey 1995). Weiterhin konnten in Studien an negativ kontrastierten *Xenopus*-NEs neun- und zehnfache Rotations-symmetrien nachgewiesen werden, die allerdings nur mit sehr geringer Frequenz auftreten (Hinshaw und Milligan 2003). Anscheinend lassen die Verbindungsstellen zwischen den Proteomeren einen gewissen Spielraum in der Anordnung zu. Demzufolge kann deren tatsächliche Anordnung in der Natur von der für die Alignierung von NPC-Einzelpartikeln angenommenen, perfekt kreisförmig angeordneten, achtfachen Rotationssymmetrie abweichen. Dieses Problem kann sich wiederum limitierend auf die Auflösung der gemittelten Struktur auswirken. Tatsächlich hat eine vergleichbare Struktur basierend auf der doppelten Partikelanzahl keine höhere Auflösung als die im Kapitel 4.2.1 beschriebene. Dieses Problem läßt sich durch die unabhängige Alignierung der einzelnen Proteomere jedes NPC-Einzelpartikels lösen. Dadurch wird jeder einzelnen asymmetrischen Einheit ein gewisser Freiraum sowohl in der räumlichen Orientierung als auch in der Auswanderung erlaubt.

Basierend auf der NPC-Einzelpartikelalignierung wurde die Position jedes einzelnen Proteomers ermittelt und dieser separat ausgeschnitten. Die Alignierung der so gewonnenen 4184 Subtomogramme erfolgte mit demselben Algorithmus, jedoch symmetrieunabhängig. Die entsprechenden Strukturen sind mittels FRC bis 5,8 nm und mit Hilfe einer Korrektur für die MTF (Modulationstransferfunktion, siehe Kapitel 3.9.2) sogar bis 4,6 nm aufgelöst. Da keine Korrektur für die Kontrasttransferfunktion

¹Kernporen besitzen eine achtfache Rotationsymmetrie im Bezug auf die nukleozytoplasmatische Achse. Da jede der acht asymmetrischen Einheiten aus dreißig Proteinkomponenten besteht, die in bis zu vier Kopien pro Einheit vorkommen, werden sie in dieser Arbeit als Proteomere bezeichnet. Der Proteomer-Begriff wird im ursprünglichen Sinne in der Virologie auch zur Bezeichnung von Assemblierungszuständen verwendet, dies ist hier aber nicht gemeint.

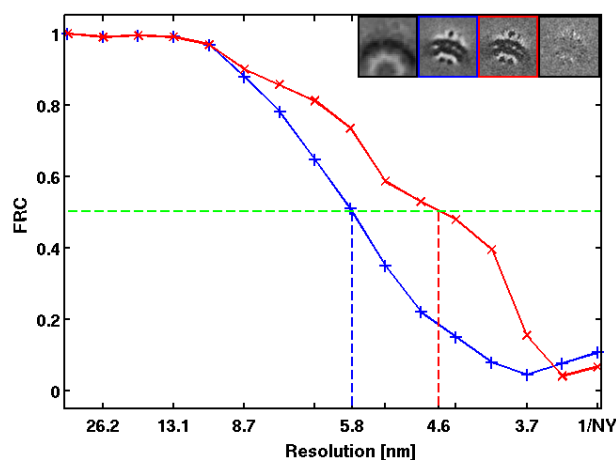


Abbildung 4.6: Auflösungsstest für die mit (rot) und ohne (blau) MTF-Korrektur gemittelten NPC-Proteomere durch Fourierringkorrelation, gemäß des 0,5-Kriteriums. Zentrale XY-Schnitte mit einer Dicke von 1,6 nm im Einsatz von links: Startreferenz zur Alignierung von NPC-Proteomeren, konvergierte Struktur ohne und mit MTF-Korrektur sowie Differenz der letzten Beiden. Die gemäß FRC-Test bis 4,6 nm aufgelöste, MTF-korrigierte Struktur hat deutlich schärfere Kanten. In der Differenz sind trotzdem keine extremen Unterschiede sichtbar.

(CTF, *contrast transfer function*) durchgeführt wurde, ist somit die erste Nullstelle der CTF (bei gegebenen Defokuswerten 4,9-5,5 nm) auflösungsbestimmend (Abb. 4.6).

Durch einen Vergleich der Einzelpartikelanalysen von NPCs und Proteomeren läßt sich das dynamische Verhalten der asymmetrischen Einheiten quantifizieren (Abb. 4.7). Im Bezug auf die ideale achtfache Rotationssymmetrie ist ein signifikanter Anteil der individuellen Proteomere innerhalb der Speichenringebene verdreht und im Mittel um etwa 4,5 nm ausgewandert.

Die Kryo-EM-Struktur eines Proteomers ist in Abb. 4.8 dargestellt. Auf Grund der besseren Auflösung wurden im Vergleich zur gesamten NPC-Struktur verschiedene neue Details sichtbar. Der zytoplasmatische- und nukleäre Ring erscheinen deutlich als durchgehende Substrukturen. Zwischen diesen beiden Ringen besteht eine Verbindung im lumenalen Membranzwischenraum. Diese längliche Verbindung könnte Funktionen als Abstandhalter und zur Stabilisierung haben. In der Literatur wird hingegen eine ringförmige lumenale Struktur beschrieben (Goldberg und Allen 1996).

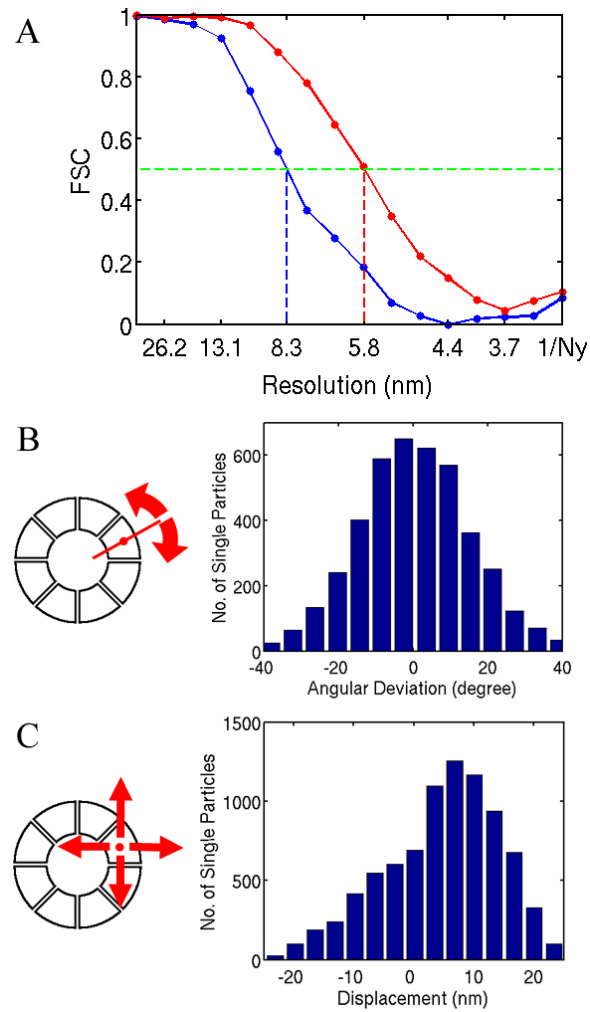


Abbildung 4.7: Quantifizierung der symmetrie-unabhängigen Alignierung von NPC-Proteomeren. A. Auflösungsbestimmung der Struktur eines NPC-Proteomers (rot) im Vergleich zu einer mittels herkömmlicher Einzelpartikelanalyse erhaltenen Struktur des NPCs (blau). Beide Strukturbestimmungen wurden mit identischen Daten durchgeführt. B. Verteilung der Abweichung der Rotation um die Z-Achse von der idealen achtfachen Rotationsymmetrie. C. Verteilung der Auswanderung innerhalb der Speichenringebene im Bezug auf die ideale achtfache Rotationsymmetrie.

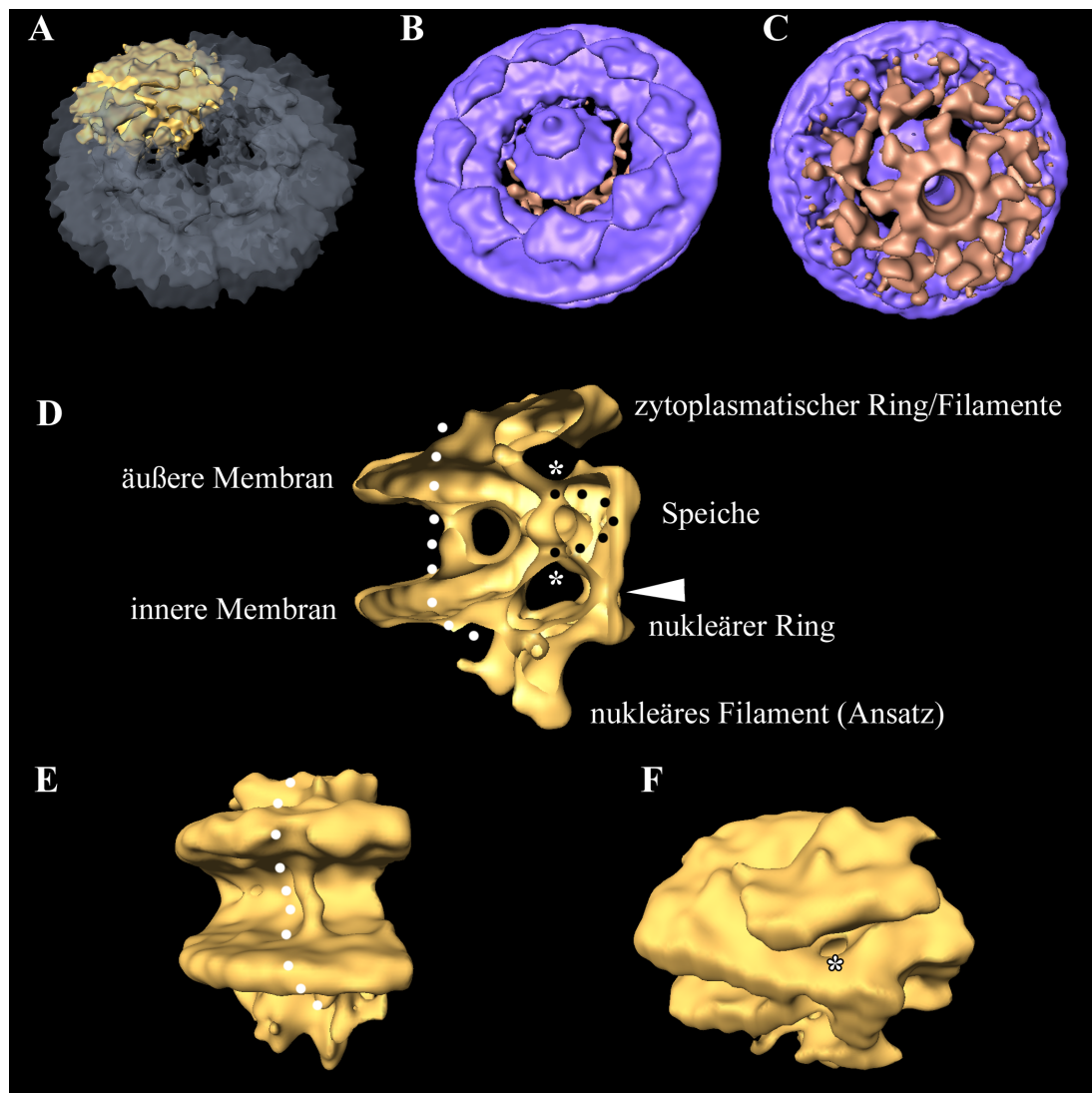


Abbildung 4.8: A Struktur eines NPC-Proteomers (gelb) zusammen mit einer daraus rekonstruierten Kernpore (transparent). Zytoplasmatische Ansicht (B) und Ansicht aus dem Kernplasma (C) einer mittels NPC-Einzelartikel Alignierung gewonnenen Struktur. Im Gegensatz zu der in Abb. 4.5 gezeigten Struktur wurde hier eine MTF-Korrektur angewendet. Dadurch sind Verbindungen zwischen den einzelnen zytoplasmatischen Filamenten in B sichtbar, die vorher nicht aufgelöst werden konnten. D-F: Detaillierte Ansichten eines einzelnen NPC-Proteomers als aufgeschnittene Seitenansicht in D, Ansicht aus dem Membranzwischenraum in E und in zytoplasmatischer Ansicht in F. Die Verbindung zwischen zytoplasmatischem- und nukleären Ring ist mit weißen Punkten, die U-förmige Struktur der Speiche mit schwarzen Punkten markiert. Die Pfeilspitze zeigt die Verbindung zwischen Speiche und nukleären Ring, die Eingänge des peripheren Kanals sind mit Sternchen markiert.

Die einzelnen Speichen formen eine U-förmige Struktur die "klammerartig" mit der konvexen Membranwölbung interagiert (Abb. 4.8). Wahrscheinlich wird dadurch die Membrankrümmung stabilisiert. Jede Speiche ist mit dem nukleären Ring im Bereich der Grenzfläche zwischen zwei Proteomeren verbunden. Der periphere Kanal wurde bereits in früheren Kryo-EM-Arbeiten mit niedrigerer Auflösung beschrieben (Stoffler et al. 2003) und ist nun auch in der *D. discoideum*-Struktur sichtbar. Er besteht nur im Bereich des Speichenrings und könnte die Diffusion von Molekülen mit einer Größe von bis zu 4 nm ermöglichen.

4.3 Einzelpartikel-Klassifizierung und Analyse von goldmarkierten Importsubstraten

Neben der Anordnung der einzelnen asymmetrischen Einheiten zeigt auch der zentrale Kanal der Kernpore ein dynamisches Verhalten. Zu welchen Anteilen dabei Transportsubstrate sowie mobile und stationäre Nukleporine eine Rolle spielen ist ungeklärt. Bei der Mittelung von Einzelpartikeln, die sich wenigstens zum Teil dynamisch verhalten, können grundsätzlich zwei Effekte auftreten: 1. Ist in einer bestimmten Position in den Einzelpartikeln Masse vorhanden, die allerdings unterschiedlicher Natur ist oder in verschiedenen Orientierungen vorkommt, ergibt sich in der entsprechenden Position in der gemittelten Struktur auch eine Dichte. Diese EM-Dichte stellt jedoch keine geschärfte Struktur dar, sondern vielmehr eine Überlagerung verschiedener Zustände und hat normalerweise eine recht glatte, unstrukturierte Erscheinung. 2. Kommt eine bestimmte Substruktur in den Einzelpartikeln in unterschiedlichen Positionen vor, wird die korrespondierende elektronenoptische Dichte während der Mittelung abgeschwächt und tritt in der resultierenden Struktur kaum oder gar nicht in Erscheinung. Die Lösung für ein solches Problem stellt normalerweise eine Klassifizierung dar, also die Einteilung von Einzelpartikeln in bestimmte Gruppen struktureller Homogenität.

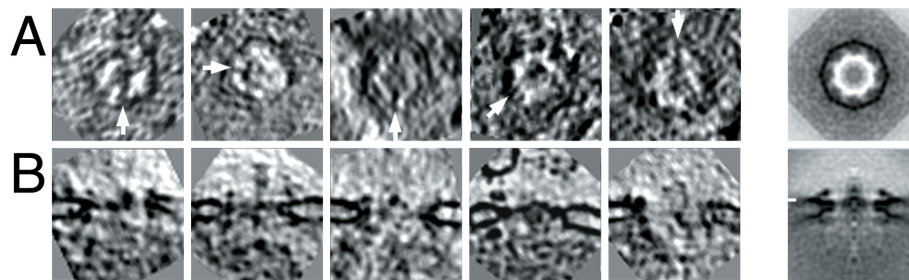


Abbildung 4.9: Schnitte von 3,28 nm Dicke in Aufsicht (A) und Seitenansicht (B) durch fünf verschiedene Einzelpartikel im Vergleich zur gemittelten Struktur (rechts). Die Struktur der Masse im zentralen Kanal (CP) weist eine starke Variabilität auf. Der CP ist durch interne Filamente mit der Gerüststruktur verbunden (Pfeile), die in der gemittelten Struktur nicht sichtbar sind. In der gemittelten Struktur (rechts unten) ist die Grenze zwischen den zwei Substrukturen des CP am Bildrand markiert.

4.3.1 Klassifizierung der Masse im zentralen Kanal (CP)

In Abb. 4.9 sind verschiedene NPC-Einzelpartikel dargestellt. Es wird deutlich, daß die EM-Dichte im zentralen Kanal (CP) unterschiedlich stark ausgeprägt ist und auch verschiedene Formen annehmen kann. In der gemittelten NPC-Struktur erscheint der CP dadurch als relativ glatt und unstrukturiert.

Um der Frage nachzugehen, ob der CP in individuellen NPCs aus den gleichen oder zum Teil unterschiedlichen Komponenten besteht, wurde das belegte Volumen im zentralen Kanal jedes Einzelpartikels bestimmt. Dabei diente die zytoplasmatische EM-Dichte in der gemittelten Struktur als Schwellenwert (Kapitel 3.9.2). Die Verteilung der belegten Volumina weist eine relativ breite Streuung auf und läßt sich nur sehr schlecht durch eine Normalverteilung beschreiben (Abb. 4.10). Wäre in den meisten Einzelpartikeln eine gemeinsame Substruktur im zentralen Kanal vorhanden, würde man einen definierten Peak oder wenigstens eine Normalverteilung erwarten. Deshalb unterstützt dieses Ergebnis die Auffassung, daß ein wesentlicher Anteil des CP durch Transportkomplexe gebildet wird, die sich zur Zeit der Präparation gerade im zentralen Kanal befanden (Fahrenkrog und Aebi 2003). Es erscheint jedoch wahrscheinlich, daß auch dynamische oder mobile Nukleoporine, wie FG-Nukleoporine oder der Nup62-Subkomplex (Schwartz 2005) zur Masse im zentralen Kanal beitragen.

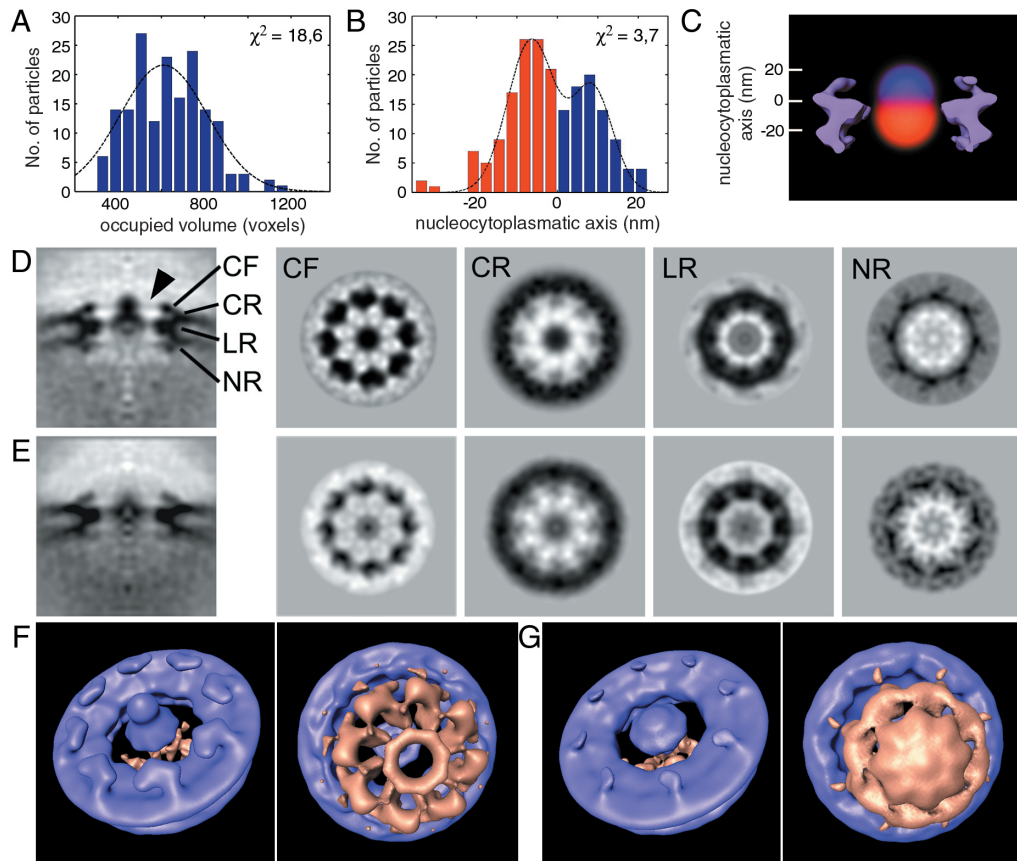


Abbildung 4.10: Die Position des CP korreliert mit strukturellen Veränderungen des NPC. A. Verteilung der belegten Volumina in individuellen CPs, mit Kurvenfit für eine Gauss-Verteilung. Die gemessene Verteilung ist deutlich breiter als eine Normalverteilung. B. Verteilung der Schwerpunkte individueller CPs mit Kurvenfit für eine doppelte Gauss-Funktion. Der Teil der Verteilung, welcher zur LR-Klasse beiträgt, ist rot dargestellt. C. Wahrscheinlichkeitswolken für die Schwerpunkte der CPs beider Klassen überlagert mit einem zentralen Schnitt durch die Struktur (CF-Klasse in blau, LR-Klasse in rot). D. Zentrale Schnitte mit einer Dicke von 7 nm durch die gemittelte Struktur der CF-Klasse, in einer Ebene mit den zytoplasmatischen Filamenten (CF), dem zytoplasmatischen Ring (CR), dem Speichenring (LR) und dem nukleären Ring (NR). E. Gleiche Ansichten wie in D jedoch für die LR-Klasse. F. 3D-Darstellung der zytoplasmatischen Ansicht (links) und der Ansicht aus dem Kernplasma (rechts) der CF-Klasse. G. Gleiche Ansichten wie in F jedoch für die LR-Klasse.

Ein weiterer Parameter, der sich unabhängig vom *missing wedge*-Problem bestimmen läßt, ist der Schwerpunkt der im zentralen Kanal beobachteten EM-Dichte (Kapitel 3.9.2). Die Verteilung der Schwerpunkte entlang der nukleozytoplasmatischen Achse in allen Einzelpartikeln kann durch eine doppelte Gauss-Funktion beschrieben werden (Abb. 4.10). Deshalb ist es wahrscheinlich, daß die beiden Dichten, die den CP in der gemittelten Struktur ausmachen (Abb. 4.5 und Abb. 4.9), durch zwei bevorzugte Positionen der Masse im zentralen Kanal zustande kommen.

Um diese These zu überprüfen, wurden die Einzelpartikel entsprechend zu den ermittelten Schwerpunkten in zwei Klassen eingeteilt. Das Minimum der Verteilung zwischen den zwei Peaks diente dabei als Aufspaltungskriterium. Die beiden Klassen wurden gemäß der Position des CP entlang der nukleozytoplasmatischen Achse als Speichenring-Klasse (LR-Klasse, *luminal spoke ring class*) und als zytoplasmatische-Filament-Klasse (CF-Klasse, *cytoplasmic filament class*) bezeichnet. Durch unabhängige Alignierung und Mittelung ergeben sich zwei NPC-Strukturen, die sich tatsächlich in der Position des CP unterscheiden (Abb. 4.10). Diese Veränderung wird jedoch von anderen strukturellen Unterschieden begleitet. Im wesentlichen sind die zytoplasmatischen Filamente in der CF-Klasse stärker ausgeprägt und der distale Ring hat in der LR-Klasse eine massivere Erscheinung.

In der klassischen Einzelpartikelanalyse wird Klassifizierung vor allem zur Verbesserung der Auflösung eingesetzt. Deswegen sollten strukturelle Klassen eine höhere Auflösung als die Struktur haben, welche sich aus der Mittelung aller Einzelpartikel ergibt. Dies ist hier nicht der Fall (Abb. 4.11). Jedoch war bei dieser ersten Analyse die Anzahl der Einzelpartikel limitierend für die Auflösung. Die beiden Klassen werden nur durch etwa die Hälfte der Partikel gebildet. Dennoch waren sie höher aufgelöst (10,5 nm) als eine Struktur aus der gleichen Anzahl zufällig gewählter Einzelpartikel (12 nm). Weiterhin verteilt sich die räumliche Orientierung beider Klassen sowie auch die der Gesamtstruktur frei und vom *missing wedge* unabhängig. Alle drei Strukturen sind somit isotrop abgetastet (Abb. 4.11).

Beide Klassen stellen strukturelle Zustände des NPC dar. Die Position des CP und auch die Gerüststruktur der Kernpore ist in der CF-Klasse besser definiert. Dieses Stadium könnte die langsame Aufnahme oder Freigabe von Transportkomplexen in

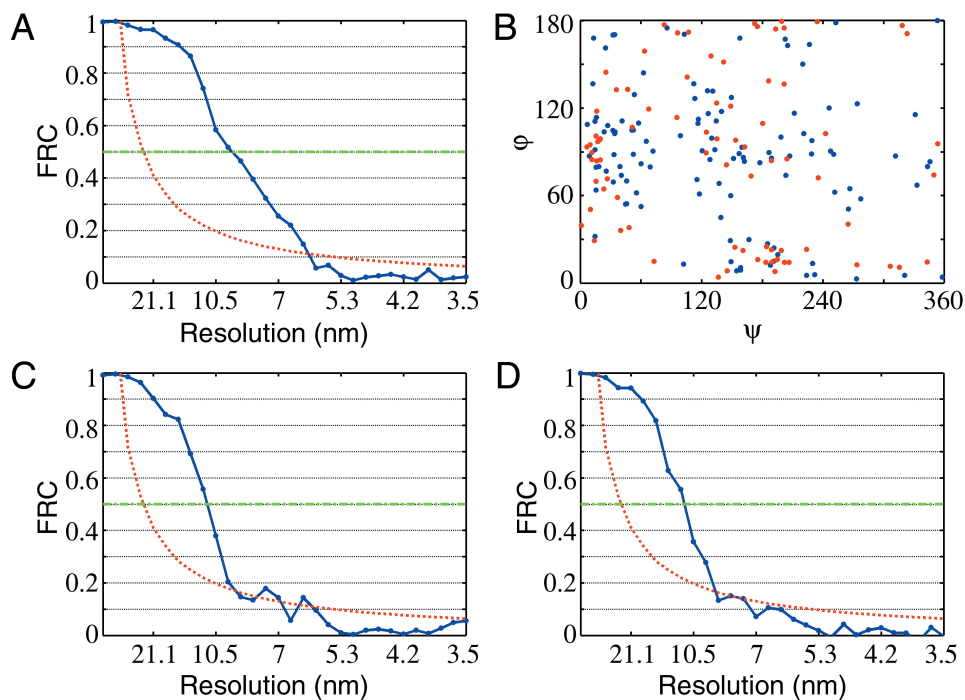


Abbildung 4.11: Bestimmung der Auflösung und Einzelpartikelorientierung. A. Auflösungsstest durch FRC für die in Abb. 4.5 gezeigte NPC-Struktur. Die FRC zweier Einzelpartikelsets fiel jenseits von 9 nm auf unter 0,5 (grüne Linie). Mittels 2σ -Kriterium (rote Kurve) ist die Auflösung 6,5 nm. B. Auftragung des Eulerwinkels ψ gegen den Eulerwinkel θ für die CF-Klasse in blau und die LR-Klasse in rot. Die Orientierungen der Einzelpartikel beider Klassen verteilen sich frei. Die Strukturen beider Klassen, sowie die gesamte Struktur sind deshalb isotrop abgetastet und unabhängig vom *missing wedge*. C. Gleiche Darstellung wie in A nur für die CF-Klasse. Die Auflösung ist 10,5 nm. D. Gleiche Darstellung wie in A nur für die LR-Klasse. Die Auflösung ist 10,5 nm.

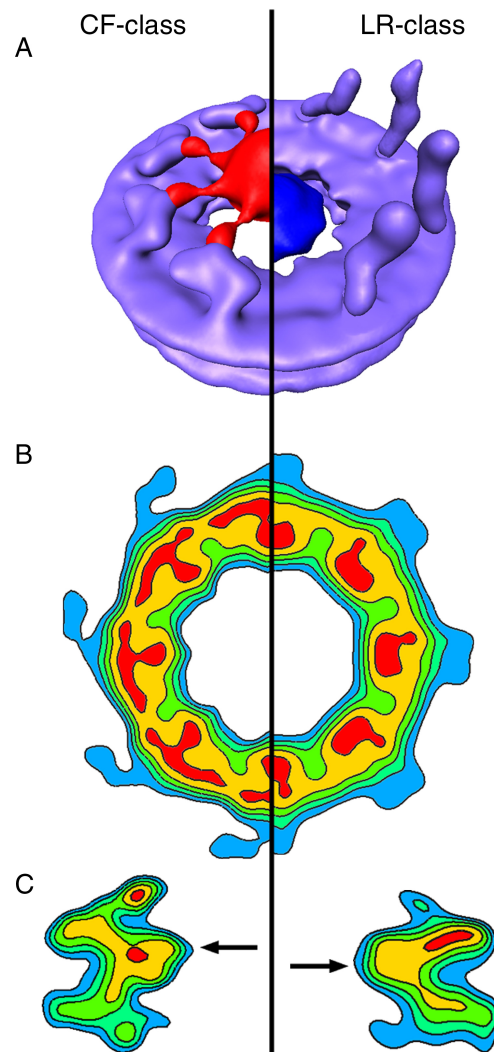


Abbildung 4.12: Vergleich der beiden strukturellen Zustände des NPC. A. Illustration der strukturellen Veränderungen der zytoplasmatischen Filamente. Überlagerung der Struktur mit den CPs beider Klassen mit erniedrigtem Schwellenwert für die *isosurface*-Darstellung. In der CF-Klasse nehmen die zytoplasmatischen Filamente eine eher bevorzugte Orientierung ein und interagieren mit dem CP. Die zytoplasmatischen Filamente der LR-Klasse sind in der gemittelten Struktur kaum sichtbar. Wahrscheinlich nehmen sie eine freie Orientierung in individuellen NPCs ein. B. Dichteverteilung von Schnitten durch den Speichenring beider Klassen. Die Speichen erscheinen geradlinig in der CF-Klasse und eher gekrümmt in der LR-Klasse. C. Dichteverteilung von zentralen Schnitten entlang der nukleozytoplasmatischen Achse. Die Position der engsten Stelle im zentralen Kanal befindet sich im Falle der CF-Klasse auf der zytoplasmatischen Seite des Speichenrings und im Falle der LR-Klasse auf der nukleären Seite (Pfeile).

das oder aus dem FxFG-Netzwerk repräsentieren. Es ist denkbar, daß die zytoplasmatischen Filamente diesen Vorgang durch eine Interaktion mit Transportkomplexen im zentralen Kanal unterstützen (Pante und Aebi 1996). Die Bindung von Transportkomplexen könnte ihre Bewegungsfreiheit einschränken und somit ihre bevorzugte Orientierung in der CF-Klasse bewirken (Abb. 4.12). Das insgesamt weniger definierte Erscheinungsbild der LR-Klasse legt die Vermutung nahe, daß es sich hier immer noch um eine Überlagerung von mehreren strukturellen Stadien handelt. Die weniger ausgeprägten zytoplasmatischen Filamente sind durch deren freie Orientierung erklärbar (Abb. 4.12). Die recht diffuse Position des CP macht deutlich, daß sich Transportkomplexe relativ frei bewegen können sobald sie in den zentralen Kanal eingedrungen sind. Ein Problem bei der Interpretation dieser Klassen stellt die während der Alignierung der Einzelpartikel angenommene achtfache Rotationssymmetrie dar. Bisher konnte kein Beweis erbracht werden, daß einzelne NPCs sich bestimmten Aufgaben widmen. Vielmehr könnte eine Überlagerung einer Vielzahl verschiedener Transportprozesse der Normalfall sein. Es erscheint deshalb relativ unwahrscheinlich, daß alle acht Proteomere einer individuellen Kernpore gemeinsam die gleiche Konformation einnehmen. Die beiden Klassen stellen deshalb eher angereicherte Zustände als absolute biologische Stadien dar. Weiterhin ist die Zuordnung einer biologischen Funktion zu beiden Klassen ohne die Markierung von Transportsubstraten schwierig, beziehungsweise nur spekulativ möglich.

4.3.2 Lokalisierung von goldkonjugierten Transportkomplexen

Mit Hilfe von goldmarkierten Importsubstraten kann die Position von Transportkomplexen während der eigentlichen Translokation relativ präzise bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde NLS-2xGFP¹ als Modellsubstrat für den klassischen Import (*classical nuclear import pathway*) und eine Variante der kleinen GTPase Ran (RanQ69L) als Kontrolle verwendet. RanQ69L bindet zwar GTP, dessen Hydrolyse ist jedoch bei dieser Variante des aktiven Zentrums unmöglich. Diese Reaktion findet normalerweise im Komplex mit RanGAP an einer Ran-bindenden Domäne

¹NLS-2xGFP ist ein künstliches Fusionsprotein aus NLS und zwei GFP-Molekülen (Yang et al. 2004).

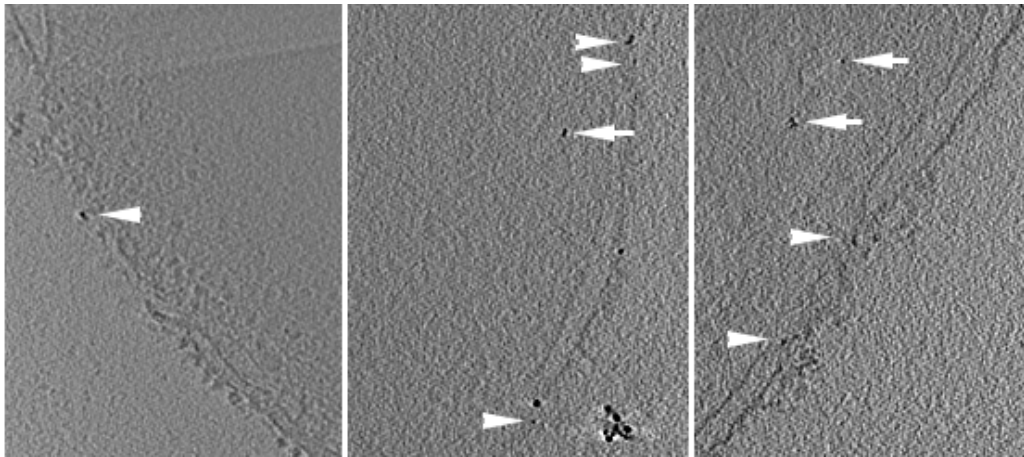


Abbildung 4.13: XY-Schnitte von 3,28 nm Dicke durch Tomogramme von *D. discoideum*-Zellkernen, die mit goldmarkierten NLS-2xGFP inkubiert wurden. Pfeilspitzen zeigen markierte Transportkomplexe in Interaktion mit NPCs, Pfeile bereits ins Kernplasma entlassene Transportkomplexe.

der zytoplasmatischen Filamente statt. Die RanQ69L-Variante sollte deshalb an den zytoplasmatischen Filamenten lokalisieren. NLS-2xGFP und RanQ69L wurden mit kolloidalem Gold von 4-5 nm Durchmesser konjugiert, mit transportaktiven *D. discoideum*-Zellkernen inkubiert (Kapitel 3.6) und die Reaktion durch Waschen mit Puffer gestoppt.

In Abb. 4.13 sind Schnitte durch Tomogramme von *D. discoideum*-Zellkernen, die mit goldmarkiertem NLS-2xGFP inkubiert wurden, dargestellt. Das kolloidale Gold hebt sich im Kontrast sehr deutlich von seiner Umgebung ab. Zur Alignierung der Projektionen wurden 15 nm-Goldpartikel eingesetzt, die deutlich unterscheidbar sind. Sowohl NLS2xGFP- als auch RanQ69L-goldmarkierte NPC-Einzelpartikel wurden nun wie bereits beschrieben in den Tomogrammen identifiziert, ausgeschnitten und aligniert (Kapitel 4.2). Die sehr kontrastreichen Goldpartikel können hierbei die Kreuzkorrelation stören, was aber durch eine entsprechende kontrastlimitierende Normalisierung der Intensitätsverteilung der NPC-Einzelpartikel weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Diese Strategie verhindert auch, daß die Dichte der Goldpartikel zur gemittelten Struktur beiträgt. Zusätzlich wurden goldmarkierte NPC-Einzelpartikel zur Alignierung mit unmarkierten gemischt, wodurch sich bei jedem Iterationsschritt eine weniger beeinflusste, gemittelte Referenz ergab.

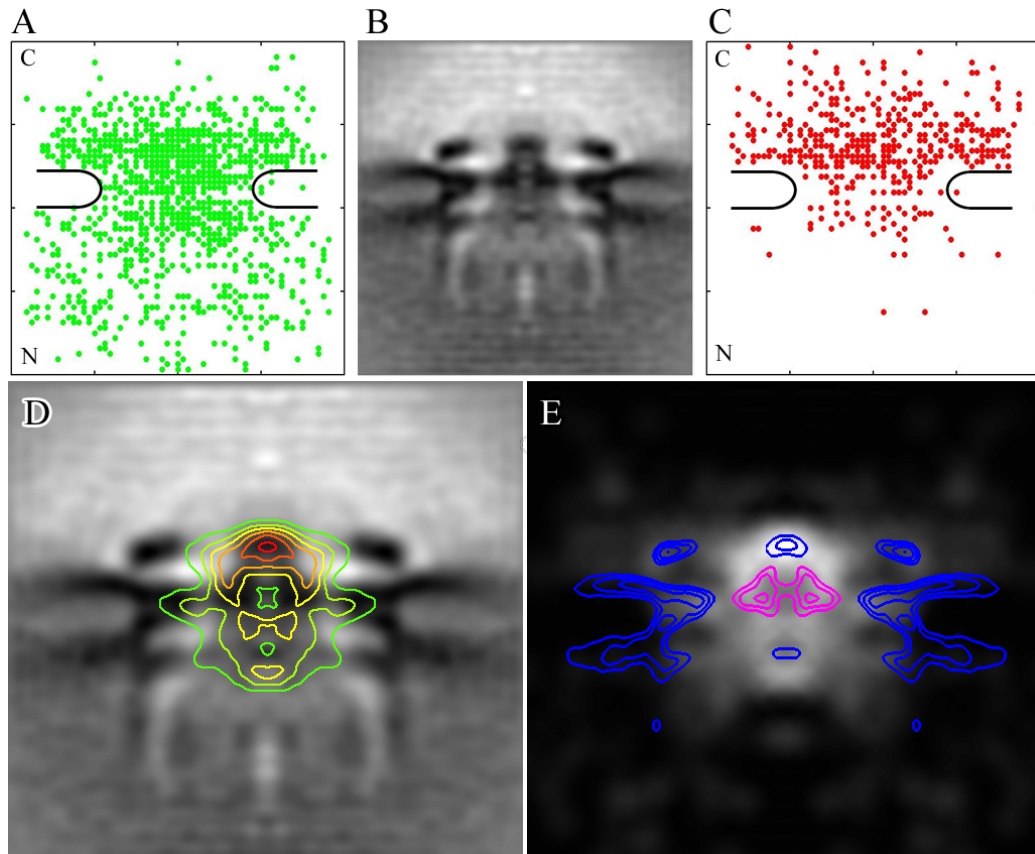


Abbildung 4.14: Räumliche Zuordnung von goldmarkierten Importkomplexen und RanQ69L. 2D-Auftragung der Koordinaten von NLS-2xGFP (A, grün $n=638$) und RanQ69L (C, rot $n=234$), skaliert zu einem zentralen Schnitt durch die gemittelte Struktur (B; nukleozytoplasmatische Achse gegen XY). RanQ69L lokalisiert hauptsächlich zytoplasmatisch, während NLS-2xGFP am häufigsten im zentralen Kanal auftritt, jedoch auch an der zytoplasmatischen- sowie Kernplasmaseite. D. Die aus den NLS-2xGFP-Koordinaten ermittelte Wahrscheinlichkeitsverteilung (unter Anwendung achtfacher Rotationssymmetrie) als Höhenliniendiagramm überlagert mit einem zentralen Schnitt durch die gemittelte Struktur. E. Wie D, nur mit der Struktur als Höhenliniendiagramm. Der Teil des CP, der sich in einer Ebene mit dem Speichenring befindet (analog zur LR-Klasse in Abb. 4.10) ist in pink dargestellt. In diesem Bereich ist die Dichte in der Wahrscheinlichkeitsverteilung geringer als in der Umgebung.

Es wurden im Falle von NLS-2xGFP 300 Einzelpartikel aus 20 Tomogrammen gewonnen, wovon 251 goldmarkiert waren. Im Falle von RanQ69L waren von 184 Einzelpartikeln, aus 7 Tomogrammen, 127 goldmarkiert. Die gesamte Anzahl der Goldcluster, deren Koordinaten ermittelt werden konnten, war $n=638$ im Falle von NLS-2xGFP beziehungsweise $n=234$ (RanQ69L). Trägt man die Koordinaten aus beiden Experimenten 2D auf (nukleozytoplasmatische Achse gegen XY), wird deutlich, daß RanQ69L wie erwartet hauptsächlich auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert, während NLS-2xGFP am häufigsten im zentralen Kanal, aber auch an der zytoplasmatischen sowie Kernplasmaseite vorkommt (Abb. 4.14). Aus den einzelnen Koordinaten wurden wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben 3D-Aufenthaltswahrscheinlichkeiten berechnet. Bereits aus der zweidimensionalen Visualisierung dieser Wahrscheinlichkeitsverteilungen im Vergleich zur NPC-Struktur in Abb. 4.13 wird deutlich, daß beide durch die Klassifizierung des CP bestimmten Positionen (Abb. 4.10) durch Importkomplexe eingenommen werden können (Unter der Annahme, daß NLS-2xGFP im zentralen Kanal nur als Importkomplex vorliegt). Jedoch ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der zytoplasmatischen Position (CF-Klasse) erhöht, während sie in der Ebene des Speichenringes (LR-Klasse) im Vergleich zur Umgebung sogar erniedrigt ist. Zusätzlich ist ein weiterer Dichtepunkt in der Ebene des nukleären Ringes im zentralen Kanal sichtbar, der sowohl in der EM-Struktur als auch in der Wahrscheinlichkeitsverteilung durch eine höhere Intensität gekennzeichnet ist.

Die 3D-Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten von NLS-2xGFP sowie RanQ69L in Abb. 4.15 zeigt die Unterschiede auf. Im Gegensatz zu NLS-2xGFP treten bei RanQ69L die höchsten Intensitäten ringförmig um die durch die CF-Klasse beschriebene, äußere Position des CP sowie direkt an den zytoplasmatischen Filamenten auf. Niedrigere Wahrscheinlichkeiten treten im gesamten zytoplasmatischen Bereich und im zentralen Kanal, nicht jedoch im Kernplasma auf. Die Wahrscheinlichkeitsdichte im Kernplasma ist bei NLS-2xGFP im Vergleich zum Zytoplasma relativ gering und diffus. Sie beschreibt höchstwahrscheinlich Partikel, die nach dem Importvorgang bereits ins Kernplasma entlassen worden sind. Der Mangel an distinkten Intensitätspunkten deutet darauf hin, daß der *nuclear basket* als Interaktionspartner in den klassischen Importweg nicht involviert ist, sondern Importsubstrate vielmehr direkt aus dem zentralen Kanal entlassen werden.

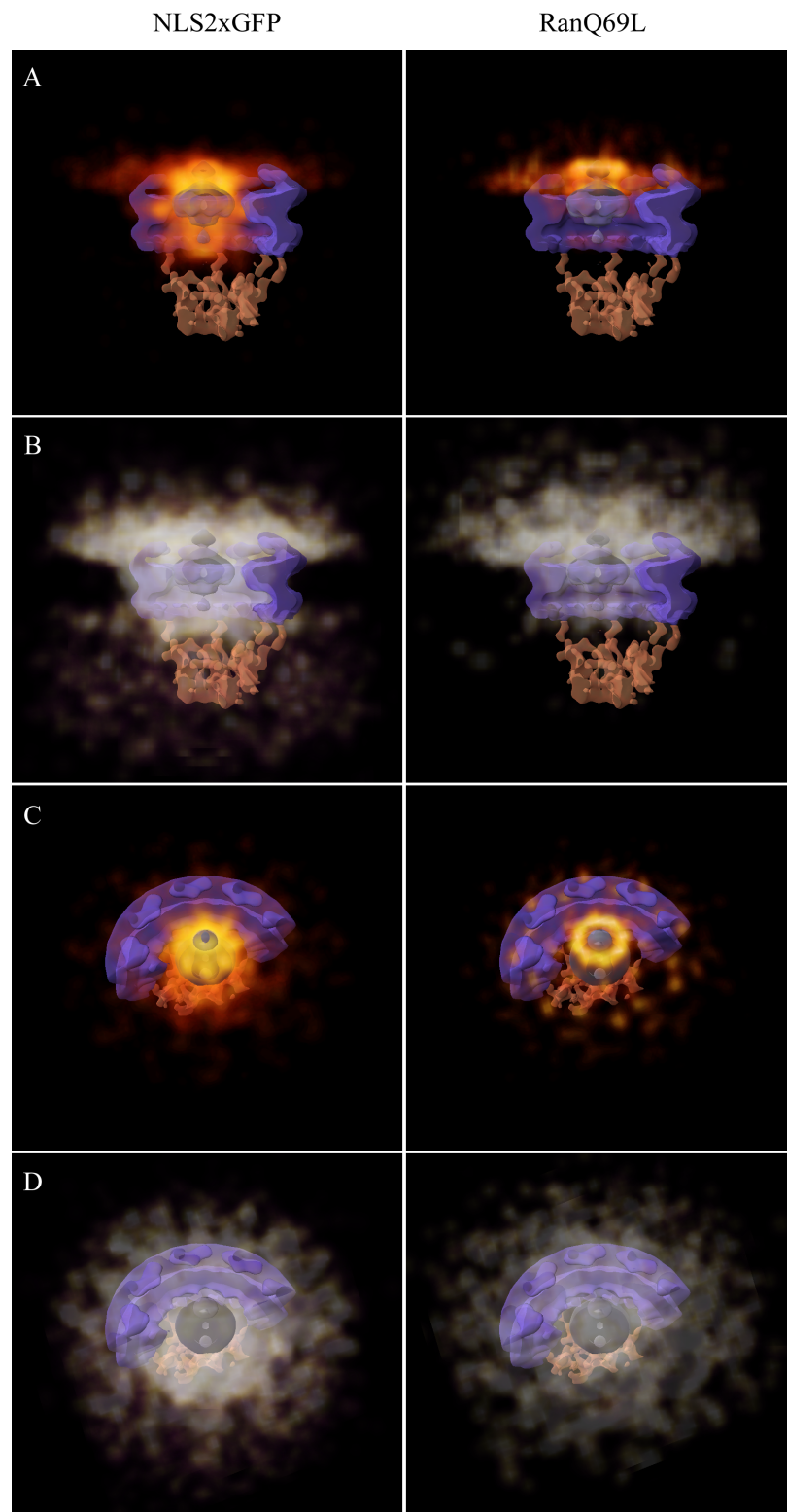


Abbildung 4.15: Dreidimensionale Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten von NLS2xGFP-Transportkomplexen (links) und RanQ69L (rechts) in Seitenansicht (A und B) sowie Aufsicht (C und D) überlagert mit der Kernporenstruktur. In A und C sind höhere (Farbverlauf von rot nach gelb zu höheren Intensitäten), in B und D niedrigere Wahrscheinlichkeiten dargestellt.

4.3.3 Klassifizierung durch multivariate statistische Analyse

Die Verzerrung durch den *missing wedge* ist ein stark ausgeprägtes Detail von Kryo-ET-Einzelpartikeln. Aus diesem Grund wird die objektive Klassifizierung solcher Einzelpartikel normalerweise durch das *missing wedge*-Problem gestört. Ein objektiver, *missing wedge*-unabhängiger Klassifizierungsalgorithmus für Kryo-ET-Einzelpartikel, der nur den überlappenden, gleichmäßig abgetasteten Bereich im Fourierraum berücksichtigt, war erst im späteren Verlauf dieser Arbeit verfügbar. Dieses Verfahren basiert auf Eigenvektorzerlegung der Kovarianzmatrix und ist in (Förster 2005) detailliert beschrieben. Durch die Verwendung von Masken können dabei bestimmte Regionen einer Struktur gezielt klassifiziert werden. Bei der in Abb. 4.16A gezeigten Klassifizierung wurde ausschließlich die Region des zentralen Kanals berücksichtigt. Hierbei wurden für diverse Eigenvektorkombinationen Klassen erstellt und als Abstandskriterium entweder die Auflösung mittels FRC oder die Distanz zwischen den mittleren Positionen der NLS-2xGFP-Koordinaten zweier Klassen maximiert (Kapitel 3.9.2). Letzteres Verfahren ergab keine signifikanten Ergebnisse. Die in Abb. 4.16A gezeigten Klassen weisen eine sehr unterschiedliche Verteilung der EM-Dichte im zentralen Kanal auf. Da zu den vier gezeigten Klassen NLS-2xGFP-goldmarkierte Einzelpartikel beitragen, können die Koordinaten von Importkomplexen innerhalb der einzelnen Klassen verglichen werden. Die unterschiedlichen Strukturen des CP korrelieren jedoch nicht mit den ermittelten NLS-2xGFP-Koordinaten, welche sich unabhängig von den Klassen stets gleichmäßig verteilen.

Die beiden Klassen "class4531" (zyan) und "class4533" (gelb) ergaben sich aus denselben Eigenvektoren, sind also ausschließlich durch unterschiedliche Einzelpartikel repräsentiert. Die Position des CP ist in der Klasse "class4533" und der LR-Klasse (Kapitel 4.3.1) identisch. Diese Position in einer Ebene mit dem Speicherring entspricht einer relativ niedrigen Intensität in der Wahrscheinlichkeitsverteilung von NLS-2xGFP (Abb. 4.16B). In der Klasse "class4533" tritt die EM-Dichte im zentralen Kanal in einer Ebene mit den zytoplasmatischen Filamenten auf, was der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen CF-Klasse entspricht. Zusätzlich ist in derselben Klasse ein weiterer Dichtepunkt in einer Ebene mit dem nukleären Ring im zentralen Kanal

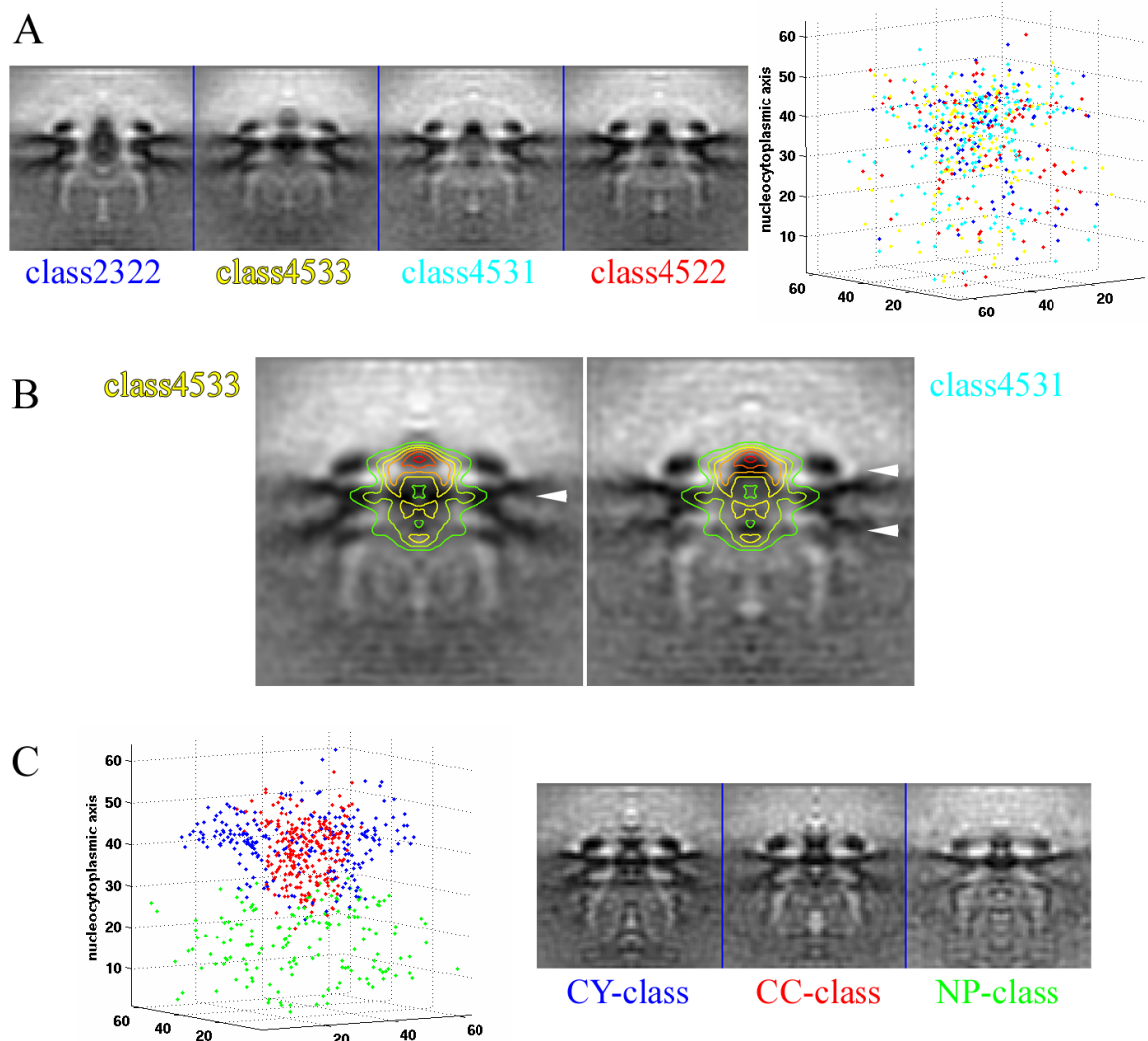


Abbildung 4.16: A. Klassifizierung der CP-Region durch *principal component analysis*. Nomenklatur der Klassenbezeichnung in vier Ziffern: 1. Nummer des ersten Eigenvektors, 2. Nummer des letzten Eigenvektors, 3. Gesamtanzahl der Klassen, 4. Klassennummer. Vier beispielhafte Klassen sind als zentrale Schnitte durch die gemittelte Struktur dargestellt (links). Die Klassenbezeichnungen sind farbkodiert und entsprechen den zugehörigen Koordinaten von NLS-2xGFP in der Auftragung rechts. Diese Koordinaten korrelieren nicht mit den strukturellen Veränderungen des CP. B. Zentrale Schnitte durch die Strukturen der beiden Klassen "class4533" und "class4531" überlagert mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit von NLS-2xGFP als Höhenliniendiagramm. Die Positionen mit hoher EM-Dichte im zentralen Kanal sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. C. Klassifizierung der Koordinaten von NLS-2xGFP durch Eigenvektoranalyse. Die Punktwolke (links) wurde in drei Klassen eingeteilt, die gemäß ihrer Lokalisierung im Zytoplasma, zentralen Kanal und Kernplasma als CY-Klasse (blau), CC-Klasse (rot) und NP-Klasse (grün) bezeichnet wurden. Zentrale Schnitte durch die hieraus abgeleiteten strukturellen Klassen sind rechts dargestellt.

sichtbar. Diese beiden EM-Dichten sind ungefähr symmetrisch oberhalb und unterhalb der Speichenringebene lokalisiert und korrelieren mit relativ hohen Intensitäten in der Wahrscheinlichkeitsverteilung von NLS-2xGFP (Abb. 4.16B).

Eine weitere Möglichkeit zur Klassifizierung stellt die Anwendung der Eigenvektoranalyse auf die NLS-2xGFP-Koordinaten anstelle der Einzelpartikel dar. Mit Hilfe dieser Strategie wurde die Punktwolke in drei Klassen unterteilt, die gemäß ihrer Lokalisierung im Zytoplasma, zentralen Kanal und Kernplasma als CY-Klasse (blau), CC-Klasse (rot) und NP-Klasse (grün) bezeichnet wurden (Abb. 4.16C). Die sich aus den drei Klassen ergebenden gemittelten Strukturen weisen jedoch keine nennenswerten Unterschiede auf. Da zu diesen drei Strukturen nur NLS-2xGFP-goldmarkierte Einzelpartikel beitragen ist das SNR, bedingt durch die geringe Partikelanzahl, relativ niedrig.

4.3.4 Implikationen für den Transportmechanismus

Die mangelnde Korrelation zwischen den strukturellen Klassen und den ermittelten Koordinaten der Importkomplexe unterstützt die Annahme, daß Transportvorgänge an individuellen Kernporen nicht sequentiell, sondern vielmehr gleichzeitig in verschiedenen Stadien stattfinden. Außerdem laufen im vorliegenden System in Gegenwart von zytoplasmatischem Überstand höchstwahrscheinlich verschiedene Transportwege gleichzeitig ab und tragen zur beobachteten EM-Dichte bei, während nur der klassische Importweg durch Goldmarkierung sichtbar gemacht wurde.

Aus einer theoretischen Betrachtung des Transportmechanismus (Becskei und Mat-taj 2005), die in Kapitel 1.2 genauer erläutert wurde, geht hervor, daß ein Transportvorgang aus drei Schritten besteht: dem Eintreten in den zentralen Kanal, ungerichteter Diffusion im zentralen Kanal und dem Verlassen des zentralen Kanals (Abb. 1.4A). Alle drei Schritte können unter bestimmten Bedingungen geschwindigkeitsbestimmend werden. Diese drei Stadien könnten den in der Klassifizierung gefundenen drei Positionen des CPs entsprechen (siehe Abb. 4.16B), welche sich am Eingang und Ausgang, sowie direkt im Zentrum des zentralen Kanals befinden. Die höhere Aufenthaltswahrscheinlichkeit von NLS-2xGFP am Eingang und Ausgang des zentralen Kanals korreliert mit den beiden Dichtepunkten der Klasse "class4531". Möglicherweise

findet das Eintreten in das FG-Netzwerk, als auch das Verlassen des zentralen Kanals bevorzugt an diesen zwei Positionen statt. Eine Unterstützung dieser Vorgänge durch bestimmte Nukleoporine ist denkbar. Zum Beispiel wurde das humane Nukleoporin Nup214 in einer zentralen Region auf der zytoplasmatischen Seite des CP lokalisiert (Walther et al. 2002; Paulillo et al. 2005). Die geringere Aufenthaltswahrscheinlichkeit von NLS-2xGFP im Zentrum des zentralen Kanals ist durch eine geringere Konzentration von Importkomplexen, bedingt durch freie Diffusion, erklärbar. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß bestimmte dynamische Nukleoporine mit höheren Wahrscheinlichkeiten im Zentrum des zentralen Kanals lokalisieren und Importkomplexe "verdrängen" könnten. Somit würde deren Translokation relativ nah an den Speichen stattfinden. Zum Beispiel sind für den Transport von RNAs Helikasen notwendig, die allerdings auch von Nup214 gebunden werden (Weirich et al. 2004). Im Falle des Exports ist die GTP-Hydrolyse von Ran der Auslöser für die Deassemblierung der Exportkomplexe. Ohne gebundene Exportine kann das Exportsubstrat nicht mehr mit dem FG-Netzwerk interagieren und muß ins Zytoplasma entlassen werden. Eine sehr hohe Aufenthaltswahrscheinlichkeit von RanQ69L umschließt die zytoplasmatische Position des CPs ringförmig (Abb. 4.15C, rechts). Demnach findet wahrscheinlich auch die GTP-Hydrolyse, das terminale Ereignis beim Verlassen des zentralen Kanals, in einer sehr distinkten Position statt. Zusammenfassend könnte der zentrale Kanal in drei Zentren unterteilt werden: Zwei kleinere, sehr definierte Positionen ober- und unterhalb der Speichenringebene, die von Transportkomplexen beim Eindringen oder Verlassen des Kanals bevorzugt durchlaufen werden und einer mehr diffusen Position im Zentrum des Kanals, welche höchstwahrscheinlich dem FG-Netzwerk entspricht.

Die Art der Interaktion zwischen FG-Nukleoporinen und Transportkomplexen sowie der Aufbau des FG-Netzwerkes spielt in diesem Zusammenhang keine Rolle. Deshalb stehen die gezogenen Schlußfolgerungen nicht im Widerspruch zum *virtual gating-* oder auch *selective phase-*Modell.

4.4 Lokalisierung von *D. discoideum*-Nukleoporinen während des Zellzyklus

Während der offenen Mitose bei Vertebraten wird die Kernhülle deassembliert und Membranvesikel sowie NPC-Subkomplexe diffundieren frei im Zytoplasma (Suntharalingam und Went 2003). Nach der Chromosomenseparation werden von Chromatin zunächst Membranen und bestimmte Nukleoporine rekrutiert und zuletzt die Kernporen wieder assembliert. In fast allen niedrigeren Eukaryonten bleibt die Kernhülle während der Zellteilung intakt und die Chromosomenseparation findet im Zellkern statt. Dieser Vorgang wird als geschlossene Mitose bezeichnet. Eine Mitose-assoziierte Deassemblierung der NPCs findet zum Beispiel in Hefen definitiv nicht statt. Kürzlich wurde aber bekannt, daß bei dem Pilz *Aspergillus niger* bestimmte FG-Nukleoporine, induziert durch Phosphorylierung, während der Mitose vom NPC dissoziieren (De Souza et al. 2004). Weiterhin wurde spekuliert, ob der Ran-Gradient durch diesen Vorgang beeinträchtigt sein könnte (Sazer 2005). *Aspergillus niger* ist ein mit *D. discoideum* nah verwandter Organismus (niedere Eukaryonten). Ein entsprechender Vorgang in *D. discoideum* wäre interessant, weil er die Möglichkeit eröffnen könnte, verschiedene Assemblierungsstadien des NPC mittels Kryo-ET strukturell zu charakterisieren.

4.4.1 Identifikation von *D. discoideum*-Nukleoporinen

Um das Verhalten von *D. discoideum*-Nukleoporinen während der Mitose zu untersuchen, mußten die entsprechenden Gene zunächst identifiziert werden. Dies geschah durch Sequenzvergleiche mit dem Genom. Dabei ergaben nur 19 der 30 Komponenten des NPC signifikante Treffer (Tab. 4.1). Dies ist für die relativ niedrig konservierte Nukleoporinfamilie jedoch nicht untypisch. Abgesehen von drei Ausnahmen waren humane Referenzgene am nächsten verwandt. Die genetische Komposition des *D. discoideum*-NPCs ist demnach nicht außergewöhnlich, sondern durchaus mit anderen Modellsystemen vergleichbar.

Referenz	<i>D. discoideum</i> -Gen	score	Genom/ORF [Basen]
RC4/Ran	DDB0001991	1e-84	639/1303
Nup35	DDB0169513	5e-9	1569/1675
Nup43	DDB0204323	3e-18	1254/1473
Nup62	DDB0167902	6e-50	2130/2238
Nup75	DDB0186484	2e-33	2673/3135
Nup93	DDB0189316	4e-26	2940/3163
Nup98-96 precursor	DDB0183864	1e-131	6162/6751
Nup107	DDB0186582	5e-68	2904/3315
Nup153-Nup1 (H)	DDB0167688	1e-38	5421/5786
Nup155	DDB0189286	5e-58	4728/4802
Nup214/CAN-Nup159 (H)	DDB0203095	1e-22	3642/4020
ALADIN	DDB0168294	2e-25	1416/1819
GLE1	DDB0189646	2e-22	2514
GLE2 (X)	DDB0185717	1e-87	1029/1321
NLP1/hGC-1	DDB0183831	6e-17	2355
TPR	DDB0187764	1e-134	6114/6436
NupSEH1/Sec13L	DDB0169145	2e-63	1404/1621
Sec13R	DDB0184189	2e-98	1014/3021
POM121	DDB0188529	2e-30	5115/5429

Tabelle 4.1: Durch Sequenzvergleiche identifizierte Gene von *D. discoideum*-Nukleoporinen und Ran. In fast allen Fällen ergab die humane Sequenz den höchsten *score*, drei Ausnahmen sind mit (H) für Hefe beziehungsweise (X) für *Xenopus* gekennzeichnet.

4.4.2 Verhalten während der Mitose

Um die Lokalisierung von *D. discoideum*-Nukleoporinen während der Mitose zu untersuchen, wurden verschiedene Nup-Gene kloniert und deren Genprodukte als GFP- oder RFP-Fusionsproteine in *D. discoideum*-Zelllinien exprimiert (Kapitel 3.10 und 3.11). Alle *D. discoideum*-Nukleoporine wurden nach dem humanen Homolog benannt. Die Lokalisierung während der Mitose wurde mit zeitlich aufgelöster konfokaler Lichtmikroskopie an lebenden Zellen ermittelt (Abb. 4.17A). *DdGLE2* und *DdSec13L* verblieben während der gesamten Zellteilung an der Kernhülle. Die zyto- und kernplasmatischen Konzentrationen waren vergleichsweise niedrig. Im Falle von *DdGLE2* steht diese Beobachtung im Widerspruch zu der veröffentlichten Arbeit an *Aspergillus niger* (De Souza et al. 2004). Das FG-Nukleoporin *DdNup62* zeigt während der Prophase und Telophase eine nur leicht erhöhte Konzentration an der Kernhülle und relativ hohe Konzentrationen im Kern- und Zytoplasma. Während der Zytokinese und Interphase sind diese Konzentrationen jedoch niedrig und die Konzentration an der Kernhülle relativ hoch. *DdNup62* dissoziiert während der Mitose also tatsächlich vom NPC.

Um zu überprüfen ob der Ran-Gradient durch die Dissoziation von FG-Nukleoporinen beeinträchtigt wird, wurde eine RFP-Ran/GFP-Tubulin-exprimierende Zelllinie untersucht. Der Ran-Gradient ist anhand der zehnfach höheren Konzentration von RanGTP im Kernplasma (als RanGDP im Zytoplasma) deutlich sichtbar. Tubulin ist ein guter Marker für den Zellzyklus und wird während der Interphase, nicht aber der Mitose, aus dem Zellkern ausgeschlossen. Die Abb. 4.17A (rechts) zeigt eine mitotische Zelle im Vergleich zu Interphasezellen. Der Ran-Gradient ist während der Pro- und Telophase nicht vorhanden und wird erst während der Zytokinese wieder etabliert. Demzufolge ist wahrscheinlich das gesamte Transportsystem während der Mitose nicht funktionsfähig. Hieraus erklärt sich auch die gleichmäßige Konzentration von frei diffundierenden Proteinen, wie nicht polymerisiertem Tubulin, im Zyto- und Kernplasma.

Die strukturelle Analyse verschiedener Assemblierungsstadien des *D. discoideum*-NPCs mittels Kryo-ET setzt das Synchronisieren von Zellkernen mit relativ hoher Ausbeute voraus. Dies ist mit dem Pflanzenschutzmittel und Fungizid Thiabendazol

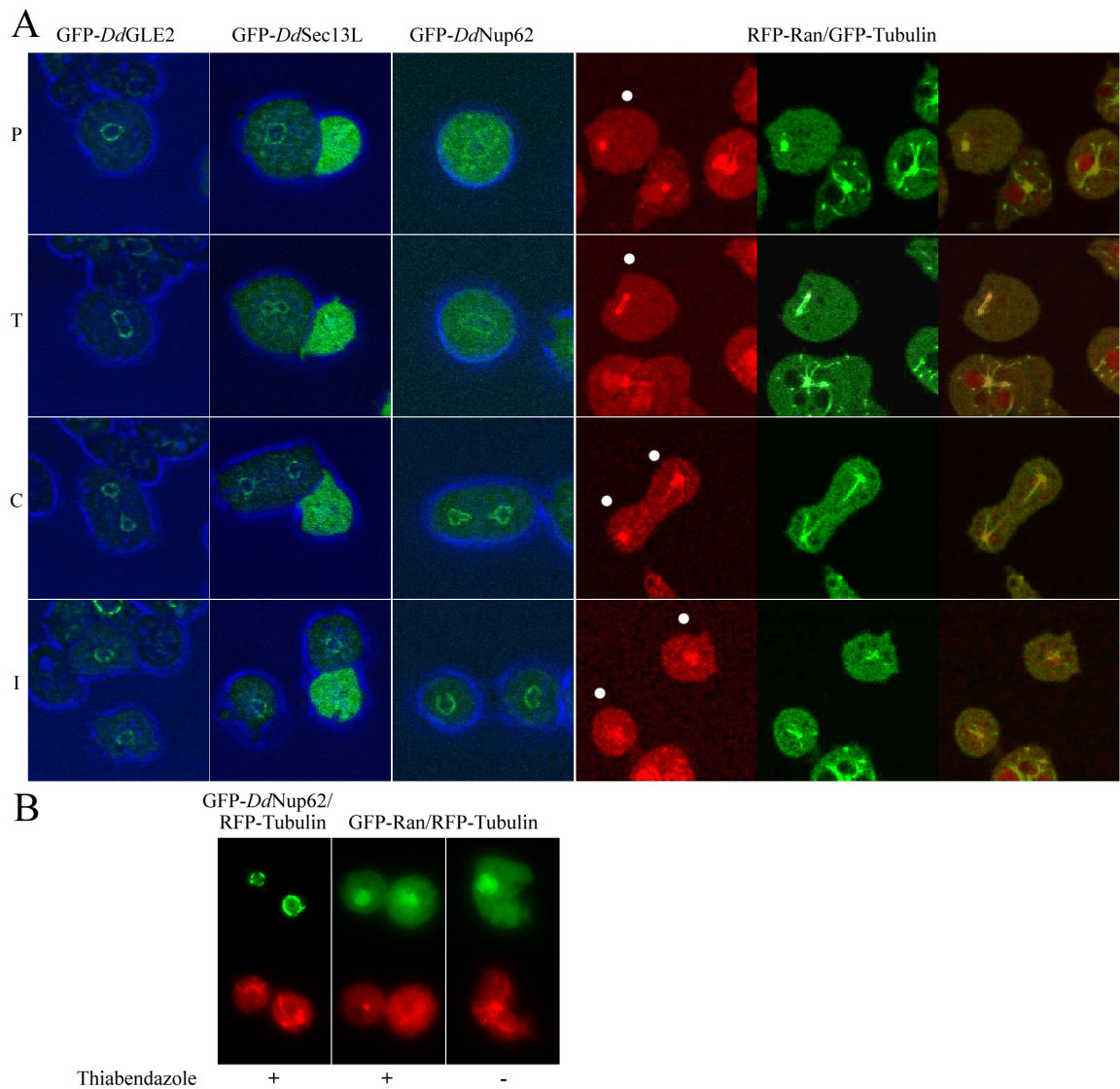


Abbildung 4.17: Lokalisierung von *D. discoideum*-Nukleoporinen und Ran während der Mitose. A. Konfokale Lichtmikroskopiebilder von GFP-*DdGLE2*-, GFP-*DdSec13L*-, GFP-*DdNup62*- und RFP-Ran/GFP-Tubulin-exprimierenden Zellen während der Prophase (P), Telophase (T), Zytokinese (C) und Interphase (I). Im Falle von RFP-Ran/GFP-Tubulin ist rechts eine Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle dargestellt und die sich teilenden Zellen sind mit weißen Punkten markiert. Der Zeitrahmen für eine Mitose ist etwa 2 Minuten. Die Zellen wurden im Temperatur-*shift*-Verfahren synchronisiert (Kapitel 3.11.4). B. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-*DdNup62*/RFP-Tubulin- und GFP-Ran/RFP-Tubulin-exprimierenden Zellen, die mit Thiabendazol synchronisiert wurden. Rechts: Kontrolle ohne Thiabendazol.

möglich. Thiabendazol-synchronisierte Zellen sind in Abb. 4.17B gezeigt. Leider ist in solchen Zellen, deren Erscheinungsbild im Phasenkontrast Prophasezellen sehr ähnlich ist, der Ran-Gradient völlig intakt. Auch *DdNup62* lokalisiert an der Kernhülle. Um in Zukunft mitotische Zellkerne mittels Kryo-ET zu untersuchen, müssen diese entweder direkt auf dem EM-Grid mittels Lichtmikroskopie identifiziert, oder bessere Synchronisierungsverfahren entwickelt werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden isolierte, transportaktive Zellkerne des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* mittels Kryo-Elektronentomographie untersucht. Diese Strategie ermöglicht die strukturelle Analyse von Kernporen (NPCs) im Zusammenhang mit der Kernhülle, als aktives Kerntransportsystem im quasi-nativen Zustand. Kernporen wurden in den erhaltenen Tomogrammen identifiziert und in einem Einzelpartikelverfahren analysiert. Die resultierende Kryo-EM-Struktur des *D. discoideum*-Kernporenkomplexes weist nicht nur alle bekannten morphologischen Details auf, sondern wurde auch erstmals isotrop abgetastet und bis 8,8 nm aufgelöst (Kapitel 4.2.1). Durch die symmetrieunabhängige Analyse von etwa 4200 einzelnen NPC-Proteomeren konnte die Auflösung bis auf 5,8 nm gesteigert werden und neue strukturelle Details wurden sichtbar (Kapitel 4.2.2). Einige Substrukturen der Kernporen, insbesondere die Masse im zentralen Kanal (CP) zeigten ein dynamisches Verhalten. Durch die Lokalisierung von goldmarkierten Importkomplexen während des Transports, gelang es bestimmte Positionen des CP einzelnen Schritten des Importvorgangs zuzuordnen. Diese Korrelation zwischen strukturellen Stadien und einzelnen Schritten des Kerntransports ermöglichte neue mechanistische Interpretationen (Kapitel 4.3.4).

Um die Funktionsweise von Kernporen detailliert zu verstehen, bedarf es eines strukturellen Modells mit atomarer Auflösung. Ein solches Modell kann wahrscheinlich nur unter Anwendung unterschiedlicher Technologien zur Strukturaufklärung gewonnen werden. Informationen aus der Röntgenkristallographie von Nukleoporinen, Einzelpartikelanalyse von Subkomplexen und Kryo-ET von Kernporen können durch *fitting* sowie *docking*-Algorithmen kombiniert werden. Die Assemblierung von Subkomplexen oder gar ganzen Kernporen *in vitro* könnte hierbei hilfreich sein. Auch *pull downs* von mitotischen, freien Subkomplexen aus Vertebraten und deren strukturelle Analyse im klassischen Einzelpartikelverfahren erscheinen vielversprechend.

Die Möglichkeiten von Kryo-ET werden im folgenden diskutiert.

Verbesserung der Auflösung

Eine Verbesserung der Auflösung der NPC-Struktur ist möglich, hängt aber sowohl von technischen als auch biologischen Parametern ab. Das Arbeiten bei kleineren Defokuswerten von bis zu 5 μm bedingt eine Verschiebung der 1. Nullstelle der CTF, wodurch sich eine theoretische Auflösungsgrenze von 3,2 nm ergibt. Es wurde bereits praktisch gezeigt, daß der bei solchen Defokuswerten stark erniedrigte Kontrast noch immer die Alignierung von Einzelpartikeln erlaubt (Förster 2005). Die in der genannten Arbeit verwendeten Viruspartikel sind allerdings sehr viel kleiner als Zellkerne und die gewonnenen Daten demzufolge durch ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) gekennzeichnet. Im Falle von Kernporen kann das SNR durch die Verwendung von transportaktiven Vesikeln der Kernhülle, anstelle von Zellkernen, stark verbessert werden. Diese aus Vertebraten gewonnenen Vesikel sind in ihrem Inneren weniger dicht und außerdem sehr viel kleiner als Zellkerne (Riedel und Fasold 1987).

Die Einführung einer CTF-Korrektur, die Aufnahme von Tomogrammen bei unterschiedlichen Defokuswerten und die Berücksichtigung des kippungsbedingten Fokusgradienten könnte die Auflösung von Kryo-ET-Einzelpartikelanalysen in der Zukunft noch weiter steigern (Winkler und Taylor 2003). Im Falle von Kernporen müßte hierzu jedoch die Abtastungsrate während der Alignierung von Einzelpartikeln erhöht werden, was bei der momentan verfügbaren Computerleistung jedoch nicht sinnvoll ist. Abhilfe könnte hier die Parallelisierung des Alignierungsalgorithmus schaffen. Ein weiterer Auflösungs-begrenzender Faktor ist jedoch die biologische Dynamik innerhalb der NPC-Struktur selbst.

Analyse biologischer Stadien des NPC

Der Einfluß dieser biologischen Dynamik läßt sich einerseits durch das Arbeiten mit kleineren Substrukturen, wie einzelnen Proteomeren (Kapitel 4.2.2), beschränken. Andererseits ist auch eine Eingrenzung durch das "Einfrieren" bestimmter Stadien denkbar. Dies könnte für Transportvorgänge durch die Verwendung von molekularbiologisch modifizierten Transportfaktoren und Substraten sowie für Mitose-assoziierte

Prozesse durch Synchronisieren von Zellen (Kapitel 4.4) möglich sein.

Mechanistische Studien

Die in dieser Arbeit angewandte Strategie zur Visualisierung von Kerntransport durch Goldmarkierung von Substraten ist natürlich auf andere Transportwege übertragbar. Die Verwendung von zytosolischem Überstand hat allerdings verschiedene Nachteile und sollte durch eine definiertere Mischung aus rekombinanten Proteinen ersetzt werden. Für den klassischen Importweg müßten tatsächlich nur vier Proteine kloniert, exprimiert und gereinigt werden: Ran, NTF2, Importin α und Importin β . Diese Methode verbessert nicht nur das SNR, sondern schließt auch den gleichzeitigen Ablauf mehrerer Transportwege weitgehend aus. Weiterhin wird die Goldmarkierung von Transportfaktoren und deren molekularbiologische Varianten ermöglicht. Für Exportwege ist die Markierung von Substraten problematisch, weil Mikroinjektion in *D. discoideum*-Zellkerne oder auch NE-Vesikel auf Grund ihrer Größe praktisch unmöglich ist. Die Goldmarkierung von *shuttle*-Faktoren wie Exportinen ist jedoch denkbar.

Solche Untersuchungen könnten Transportweg-abhängig unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten von Transportkomplexen liefern. Zusammen mit der präzisen Lokalisierung insbesondere von dynamischen Nukleoporinen innerhalb der NPC-Struktur wären genauere Rückschlüsse auf den Transportmechanismus möglich.

Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
CF-Klasse	zytoplasmatische-Filament-Klasse, <i>cytoplasmic filament class</i>
CP	Masse im zentralen Kanal, <i>central plug</i>
CTF	Kontrasttransferfunktion, <i>contrast transfer function</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäuren, <i>deoxyribonucleic acid</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ET	Elektronentomographie
FEG	Feldemissionsquelle, <i>field emission gun</i>
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FRC	Fourierkorrelation, <i>Fourier-ring correlation</i>
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMP-PNP	5'-Guanylylimidodiphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
IBB	Importin β bindende Domäne des Importin α
Da	Dalton
LR-Klasse	Speichenring-Klasse, <i>luminal spoke ring class</i>
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure, <i>messenger ribonucleic acid</i>
MTF	Modulationstransferfunktion, <i>modulation transfer function</i>
NE	Kernhülle, <i>nuclear envelope</i>
NES	Exportsignal, <i>nuclear export signal</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Triessigsäure-Granulat, <i>nickel-trinitrilotriacetic acid-resin</i>

NLS	Importsignal, <i>nuclear localization signal</i>
NPC	Kernporenkomplex, <i>nuclear pore complex</i>
Nup	Nukleoporin
ORF	offenes Leseraster, <i>open reading frame</i>
RanGAP	Ran GTPase aktivierender Faktor, <i>Ran GTPase-activating protein</i>
RanGEF	Ran Guanin Nukleotid austauschender Faktor, <i>Ran guanine nucleotide exchange factor</i>
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonucleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RT	reverse Transkription, <i>reverse transcription</i>
SEM	Rasterelektronenmikroskopie, <i>scanning electron microscopy</i>
SNR	Signal zu Rausch-Verhältnis, <i>signal to noise ratio</i>
Tab	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

Literaturverzeichnis

- B. A. Afzelius (1955). *The ultrastructure of the nuclear membrane of the sea urchin oocyte as studied with the electron microscope*. Experimental Cell Research, 8(1):147–158.
- C. W. Akey (1989). *Interactions and structure of the nuclear pore complex revealed by cryo-electron microscopy*. J Cell Biol, 109(3):955–70.
- C. W. Akey (1995). *Structural plasticity of the nuclear pore complex*. J Mol Biol, 248(2):273–93.
- C. W. Akey und D. S. Goldfarb (1989). *Protein import through the nuclear pore complex is a multistep process*. J Cell Biol, 109(3):971–82.
- C. W. Akey und M. Radermacher (1993). *Architecture of the Xenopus nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy*. J Cell Biol, 122(1):1–19.
- N. G. Anderson (1953). *On the Nuclear Envelope*. Science, 117(3046):517–521.
- W. Antonin und I. W. Mattaj (2005). *Nuclear pore complexes: round the bend?*. Nat Cell Biol, 7(1):10–2.
- M. Beck, F. Forster, M. Ecke, J. M. Plitzko, F. Melchior, G. Gerisch, W. Baumeister und O. Medalia (2004). *Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography*. Science, 306(5700):1387–90.
- A. Becskei und I. W. Mattaj (2005). *Quantitative models of nuclear transport*. Curr Opin Cell Biol, 17(1):27–34.
- I. Ben-Efraim und L. Gerace (2001). *Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import*. J Cell Biol, 152(2):411–7.

- I. C. Berke, T. Boehmer, G. Blobel und T. U. Schwartz (2004). *Structural and functional analysis of Nup133 domains reveals modular building blocks of the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 167(4):591–7.
- M. Berrios (1997). *Isolation and Characterization of Karyoskeletal Protein-Enriched Fractions from Vertebrate Livers*. In: M. Berrios, Hrsg.: *Nuclear Structure and Function*, Bd. 53 d. Reihe *Methods in Cell Biology*, S. 3–23. Academic Press, New York.
- G. Blobel (2000). *Protein targeting (Nobel lecture)*. Chembiochem, 1(2):86–102.
- B. Burke und L. Gerace (1986). *A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis*. Cell, 44(4):639–52.
- H. G. Callan und S. G. Tomlin (1950). *Experimental Studies on Amphibian Oocyte Nuclei .1. Investigation of the Structure of the Nuclear Membrane by Means of the Electron Microscope*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences, 137(888):367–378.
- Y. M. Chook und G. Blobel (2001). *Karyopherins and nuclear import*. Curr Opin Struct Biol, 11(6):703–15.
- J. M. Cronshaw, A. N. Krutchinsky, W. Zhang, B. T. Chait und M. J. Matunis (2002). *Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex*. J Cell Biol, 158(5):915–27.
- C. P. De Souza, A. H. Osmani, S. B. Hashmi und S. A. Osmani (2004). *Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in Aspergillus nidulans*. Curr Biol, 14(22):1973–84.
- D. J. DeRosier und A. Klug (1968). *Reconstruction of 3 Dimensional Structures from Electron Micrographs*. Nature, 217(5124):130.
- D. Devos, S. Dokudovskaya, F. Alber, R. Williams, B. T. Chait, A. Sali und M. P. Rout (2004). *Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture*. PLoS Biol, 2(12):e380.

- K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl und W. Baumeister (1993). *Towards Automatic Electron Tomography .2. Implementation of Autofocus and Low-Dose Procedures*. Ultramicroscopy, 49(1-4):109–120.
- K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl, A. J. Koster und W. Baumeister (1992). *Towards Automatic Electron Tomography*. Ultramicroscopy, 40(1):71–87.
- J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell und P. Schultz (1988). *Cryo-electron microscopy of vitrified specimens*. Q Rev Biophys, 21(2):129–228.
- B. Fahrenkrog und U. Aebi (2003). *The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(10):757–66.
- C. M. Feldherr (1962). *The nuclear annuli as pathways for nucleocytoplasmic exchanges*. J Cell Biol, 14:65–72.
- A. S. Frangakis und R. Hegerl (2001). *Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion*. J Struct Biol, 135(3):239–50.
- J. Frank, Hrsg. (1992). *Electron tomography: Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope*. Plenum Press, New York.
- W. W. Franke, U. Scheer, G. Krohne und E. D. Jarasch (1981). *The Nuclear-Envelope and the Architecture of the Nuclear Periphery*. Journal of Cell Biology, 91(3):S39–S50.
- F. Förster, O. Medalia, N. Zauberman, W. Baumeister und D. Fass (2005). *Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(13):4729–34.
- F. G. Förster (2005). *Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden*. Doktorarbeit, Technische Universität München.
- M. W. Goldberg und T. D. Allen (1996). *The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy*. J Mol Biol, 257(4):848–65.

- R. Graf (2001). *Isolation of centrosomes from Dictyostelium*. Methods in Cell Biology, Vol 67, 67:337–357.
- R. Grimm (1998). *Anwendung von Energiefilterung bei der automatisierten Elektrentomographie von eiseingebetteten biologischen Proben*. Doktorarbeit, Technische Universität München.
- D. Görlich, S. Kostka, R. Kraft, C. Dingwall, R. A. Laskey, E. Hartmann und S. Prehn (1995). *Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope*. Curr Biol, 5(4):383–92.
- D. Görlich, S. Prehn, R. A. Laskey und E. Hartmann (1994). *Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import*. Cell, 79(5):767–78.
- K. Grünewald, O. Medalia, A. Gross, A. C. Steven und W. Baumeister (2003). *Prospects of electron cryotomography to visualize macromolecular complexes inside cellular compartments: implications of crowding*. Biophys Chem, 100(1-3):577–91.
- M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik und R. Huber (1997). *Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*. Nature, 386(6624):463–71.
- G. Harauz und M. van Heel (1986). *Exact filter for general geometry three-dimensional reconstruction*. Optik, 73:146–156.
- R. G. Hart (1968). *Electron Microscopy of Unstained Biological Material - Polytropic Montage*. Science, 159(3822):1464.
- M. van Heel, B. Gowen, R. Matadeen, E. V. Orlova, R. Finn, T. Pape, D. Cohen, H. Stark, R. Schmidt, M. Schatz und A. Patwardhan (2000). *Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution*. Quarterly Reviews of Biophysics, 33(4):307–369.
- R. Hegerl (1996). *The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy*. J Struct Biol, 116(1):30–4.

- R. Hegerl und W. Hoppe (1976). *Influence of electron noise on three-dimensional image reconstruction*. Z. Naturforschung, 31a:1717–1721.
- H. G. Heide und E. Zeitler (1985). *The Physical Behavior of Solid Water at Low-Temperatures and the Embedding of Electron Microscopical Specimens*. Ultramicroscopy, 16(2):151–160.
- R. Henderson (1995). *The Potential and Limitations of Neutrons, Electrons and X-Rays for Atomic-Resolution Microscopy of Unstained Biological Molecules*. Quarterly Reviews of Biophysics, 28(2):171–193.
- J. E. Hinshaw, B. O. Carragher und R. A. Milligan (1992). *Architecture and design of the nuclear pore complex*. Cell, 69(7):1133–41.
- J. E. Hinshaw und R. A. Milligan (2003). *Nuclear pore complexes exceeding eightfold rotational symmetry*. J Struct Biol, 141(3):259–68.
- G. H. Hogeboom und W. C. Schneider (1953). *On the Nuclear Envelope*. Science, 118(3067):419–419.
- A. Klug (1982). *Noble lecture. From Macromolecules to Biological Assemblies*. In: T. Frängsmyr, Hrsg.: *Nobel Lectures, Chemistry 1981-1990*. World Scientific Publishing Co., Singapore.
- A. J. Koster, R. Grimm, D. Typke, R. Hegerl, A. Stoschek, J. Walz und W. Baumeister (1997). *Perspectives of molecular and cellular electron tomography*. J Struct Biol, 120(3):276–308.
- A. Koster, W. d. Ruijter, A. v. d. Bos und K. D. v. d. Mast (1989). *Autotuning of a TEM using minimum electron dose*. Ultramicroscopy, 27:251–72.
- S. Krull, J. Thyberg, B. Bjorkroth, H. R. Rackwitz und V. C. Cordes (2004). *Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket*. Molecular Biology of the Cell, 15(9):4261–4277.

- U. K. Laemmli (1970). *Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4*. *Nature*, 227(5259):680.
- M. Lawrence (1992). *Least-Squares Method of Alignment Using Markers*. In: J. Frank, Hrsg.: *Electron tomography: Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope*. Plenum Press, New York.
- M. Lohka (1997). *Analysis of Nuclear Envelope Assembly Using Extracts of Xenopus Eggs*. In: M. Berrios, Hrsg.: *Nuclear Structure and Function*, Bd. 53 d. Reihe *Methods in Cell Biology*, S. 357–367. Academic Press, New York.
- V. Lucic, F. Förster und W. Baumeister (2005). *Structural Studies by Electron Tomography: From Cells to Molecules*. *Annu. Rev. Biochem.*, 74:833–65.
- Y. Matsuura und M. Stewart (2004). *Structural basis for the assembly of a nuclear export complex*. *Nature*, 432(7019):872–7.
- I. W. Mattaj (2004). *Sorting out the nuclear envelope from the endoplasmic reticulum*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(1):65–9.
- B. F. McEwen, K. H. Downing und R. M. Glaeser (1995). *The relevance of dose-fractionation in tomography of radiation-sensitive specimens*. *Ultramicroscopy*, 60(3):357–73.
- F. Melchior (1998). *Nuclear protein import in a permeabilized cell assay*. In: *Methods Mol Biol*, Bd. 88, S. 265–73.
- F. Melchior, B. Paschal, J. Evans und L. Gerace (1993). *Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor*. *J Cell Biol*, 123(6 Pt 2):1649–59.
- C. Mühlhardt (2000). *Molekularbiologie*. Der Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heiderlberg - Berlin.
- M. S. Moore und G. Blobel (1993). *The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus*. *Nature*, 365(6447):661–3.

- A. Muller-Taubenberger, A. N. Lupas, H. Li, M. Ecke, E. Simmeth und G. Gerisch (2001). *Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis*. *Embo J*, 20(23):6772–82.
- S. Nakielny und G. Dreyfuss (1999). *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus*. *Cell*, 99(7):677–90.
- S. Nickell, F. Forster, A. Linaroudis, W. D. Net, F. Beck, R. Hegerl, W. Baumeister und J. M. Plitzko (2005). *TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography*. *J Struct Biol*, 149(3):227–34.
- G. E. Palade (1952). *A Study of Fixation for Electron Microscopy*. *Journal of Experimental Medicine*, 95(3):285–307.
- N. Pante und U. Aebi (1996). *Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import*. *Science*, 273(5282):1729–32.
- S. M. Paulillo, E. M. Phillips, J. Koser, U. Sauder, K. S. Ullman, M. A. Powers und B. Fahrenkrog (2005). *Nucleoporin Domain Topology is Linked to the Transport Status of the Nuclear Pore Complex*. *J Mol Biol*, 351(4):784–98.
- R. Peters (2005). *Translocation Through the Nuclear Pore Complex: Selectivity and Speed by Reduction-of-Dimensionality*. *Traffic*, 6(5):421–7.
- A. Pichler, A. Gast, J. S. Seeler, A. Dejean und F. Melchior (2002). *The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity*. *Cell*, 108(1):109–20.
- Qiagen, Hrsg. (2003). *The QIAexpressionist*.
- G. Rabut, V. Doye und J. Ellenberg (2004). *Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells*. *Nature Cell Biology*, 6(11):1114–U27.
- J. Radon (1917). *Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten*. *Berichte Sächsische Akademie der Wissenschaften, Leipzig, Math.-Phys. Kl.*, 69:262–277.

- A. Radu, G. Blobel und M. S. Moore (1995). *Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(5):1769–73.
- K. Ribbeck und D. Görlich (2001). *Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes*. Embo J, 20(6):1320–30.
- K. Ribbeck und D. Görlich (2002). *The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion*. Embo J, 21(11):2664–71.
- G. Riddick und I. G. Macara (2005). *A systems analysis of importin-alpha-beta mediated nuclear protein import*. J Cell Biol, 168(7):1027–38.
- N. Riedel und H. Fasold (1987). *Nuclear-envelope vesicles as a model system to study nucleocytoplasmic transport. Specific uptake of nuclear proteins*. Biochem J, 241(1):213–9.
- H. Ris (1991). *The three dimensional structure of the nuclear pore complex as seen by high voltage electron microscopy and high resolution low voltage scanning electron microscopy*. EMSA Bull, 21:54–56.
- M. P. Rout, J. D. Aitchison, M. O. Magnasco und B. T. Chait (2003). *Virtual gating and nuclear transport: the hole picture*. Trends Cell Biol, 13(12):622–8.
- M. P. Rout, J. D. Aitchison, A. Suprapto, K. Hjertaas, Y. Zhao und B. T. Chait (2000). *The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism*. J Cell Biol, 148(4):635–51.
- E. Ruska (1987). *Nobel lecture. The development of the electron microscope and of electron microscopy*. Biosci Rep, 7(8):607–29.
- W. O. Saxton und W. Baumeister (1982). *The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein*. J Microsc, 127 (Pt 2):127–38.
- S. Sazer (2005). *Nuclear envelope: nuclear pore complexity*. Curr Biol, 15(1):R23–6.
- T. U. Schwartz (2005). *Modularity within the architecture of the nuclear pore complex*. Curr Opin Struct Biol, 15(2):221–6.

- G. Schweikert (2004). *Quantitativer Vergleich der Strahlenschädigung biologischer Proben im Transmissions-Elektronenmikroskop bei Stickstoff und Helium Temperatur*. Diplomarbeit, Technische Universität München.
- J. P. Siebrasse und R. Peters (2002). *Rapid translocation of NTF2 through the nuclear pore of isolated nuclei and nuclear envelopes*. EMBO Rep, 3(9):887–92.
- J. W. Slot und H. J. Geuze (1985). *A New Method of Preparing Gold Probes for Multiple-Labeling Cyto-Chemistry*. European Journal of Cell Biology, 38(1):87–93.
- D. Stoffer, B. Feja, B. Fahrenkrog, J. Walz, D. Typke und U. Aebi (2003). *Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport*. J Mol Biol, 328(1):119–30.
- L. A. Strawn, T. Shen, N. Shulga, D. S. Goldfarb und S. R. Wentz (2004). *Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport*. Nat Cell Biol, 6(3):197–206.
- M. Suntharalingam und S. R. Wentz (2003). *Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function*. Dev Cell, 4(6):775–89.
- P. N. Unwin und R. A. Milligan (1982). *A large particle associated with the perimeter of the nuclear pore complex*. J Cell Biol, 93(1):63–75.
- T. C. Walther, H. S. Pickersgill, V. C. Cordes, M. W. Goldberg, T. D. Allen, I. W. Mattaj und M. Fornerod (2002). *The cytoplasmic filaments of the nuclear pore complex are dispensable for selective nuclear protein import*. J Cell Biol, 158(1):63–77.
- J. Walz, D. Typke, M. Nitsch, A. J. Koster, R. Hegerl und W. Baumeister (1997). *Electron Tomography of Single Ice-Embedded Macromolecules: Three-Dimensional Alignment and Classification*. J Struct Biol, 120(3):387–95.
- H. R. Wang, M. Kania, W. Baumeister und P. M. Nederlof (1997). *Import of human and Thermoplasma 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences*. Eur J Cell Biol, 73(2):105–13.

- M. L. Watson (1954). *Pores in the Mammalian Nuclear Membrane*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 15(4):475–479.
- C. S. Weirich, J. P. Erzberger, J. M. Berger und K. Weis (2004). *The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore*. *Mol Cell*, 16(5):749–60.
- K. Weis (2002). *Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border*. *Curr Opin Cell Biol*, 14(3):328–35.
- S. R. Wentz (2000). *Gatekeepers of the nucleus*. *Science*, 288(5470):1374–7.
- H. Winkler und K. A. Taylor (2003). *Focus gradient correction applied to tilt series image data used in electron tomography*. *J Struct Biol*, 143(1):24–32.
- Q. Yang, M. P. Rout und C. W. Akey (1998). *Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications*. *Mol Cell*, 1(2):223–34.
- W. D. Yang, J. Gelles und S. Musser (2004). *Single-molecule imaging of translocation through nuclear pore complexes*. *Biophysical Journal*, 86(1):364a–364a.
- U. Ziese, W. J. Geerts, T. P. Van Der Krift, A. J. Verkleij und A. J. Koster (2003). *Correction of autofocusing errors due to specimen tilt for automated electron tomography*. *J Microsc*, 211(Pt 2):179–85.
- R. Zsigmondy (1925). *Lehrbuch der Kolloidchemie*. Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig.
- R. Zsigmondy (1926). *Nobel lecture. Properties of colloids*. In: *Nobel Lectures, Chemistry 1922-1941*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Wolfgang Baumeister für die stetige Unterstützung und insbesondere für die Hilfe in verschiedenen entscheidenden Situationen.

Ohad Medalia for excellent advise, continuous support and a good time.

Friedrich Förster für die angenehme Zusammenarbeit und das Beantworten meiner zahlreichen Fragen zur Bildbearbeitung.

Frauke Melchior, Mary Ecke, Jana Köhler, Emmanuel Burghardt und Günther Gerisch für die sehr gute Zusammenarbeit.

Reiner Hegerl und Vladan Lucic für viele anregende Diskussionen.

Karoline Bopp, Peter Zwickl, Kay Grünewald und Katja Knauth für das Korrekturlesen der Arbeit.

Jürgen Plitzko für die Hilfe beim Umgang mit TEMs.

Günther Pfeifer, Oana Mihalache und Brigitte Kühlmorgen für die Hilfe bei vielen praktischen Problemen.

Ian Mattaj (EMBL Heidelberg), Siegfried Musser (Texas A&M University), Anette Müller-Taubenberger und Karin Felderer für Reagenzien.

Den Mitarbeitern der Abteilung molekulare Strukturbiologie, insbesondere der EM-Gruppe und der Zwickl-Gruppe für das gute Arbeitsklima.

Ganz besonderen Dank schulde ich meiner Freundin für zahlreiche Ratschläge, Motivation und Nachsicht sowie meiner Familie für die Hilfe und Unterstützung während meiner Ausbildung.