

**Untersuchung von Morphologie, Enzymverteilungen und
Transportdynamik des Golgi-Apparates
lebender Säugerzellen mittels hochauflösender
MMM-4Pi-Mikroskopie in zwei Farben**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Tobias Müller

geb. am 22.10.1975 in Mainz

Mainz, den 18.06.2007

*“Structure without function is a corpse,
function without structure is a ghost”*

Vogel and Wainwright, 1969

Hochauflösende Untersuchung des Golgi-Apparates lebender Säugerzellen:

Seit der Entdeckung des Golgi-Apparates im Jahre 1898 gestaltet sich seine Erforschung in lebenden Zellen aufgrund der begrenzten Auflösung von Lichtmikroskopen schwierig. Zu einigen Schlüsselfragen, wie etwa den Mechanismen des Proteintransportes durch den Golgi-Apparat oder der Organisation der hoch komplexen Verteilung von Golgi-Enzymen innerhalb seiner Subkompartimente existieren daher noch immer mehrere konkurrierende Modelle. Zur Klärung dieser Fragen wird ein nicht-invasives Mikroskop benötigt, mit dem der Golgi-Apparat lebender Zellen gleichermaßen räumlich wie zeitlich hoch aufgelöst abgebildet werden kann.

Zur Zeit ist das MMM-4Pi-Mikroskop die einzige für die Untersuchung lebender Säugerzellen geeignete Methode, die eine Auflösung im Bereich von 100 bis 200 nm in allen Raumrichtungen mit einer Aufnahmezeit von 0,5 Hz verbindet. Es ist daher die gegenwärtig leistungsfähigste Methode zur hochauflösenden Untersuchung dynamischer Prozesse des Golgi-Apparates.

Anhand korrelativer TEM-/MMM-4Pi-Aufnahmen wird die Validität mit dem MMM-4Pi-Mikroskop abgebildeter Strukturen bestätigt und gezeigt, dass die Methode für die Untersuchung des Golgi-Apparates auf der Ebene seiner Subkompartimente geeignet ist. Nach Implementierung der Möglichkeit zu zweifarbigen Aufnahmen wird die Hochauflösung des MMM-4Pi-Mikroskops für Distanzanalysen der Verteilungen dreier Golgi-Enzyme genutzt und anschließend anhand einer Reihe von Zeitserien der Transport des Proteins VSVG durch den Golgi-Apparat untersucht.

High-resolution imaging of the Golgi complex of living cells

Since its discovery in 1898, the study of the Golgi complex in live cells has been hampered by the resolution limits of light microscopy. Thus, various competing models still exist for a number of key mechanisms, like that of Golgi transport or the organization of the highly complex distribution of Golgi enzymes within its sub-compartments. To approach these unsolved questions a non-invasive, fast scanning microscope capable of highly resolved live-cell imaging of the Golgi complex is needed.

To date, the MMM-4Pi-microscope is the only method capable of life-cell imaging that combines resolution in the range of 100 to 200 nm in all three dimensions with an acquisition rate of 0,5 Hz. It is therefore presently the most powerful tool for high-resolution studies of dynamic processes of the Golgi complex.

To confirm the validity of structures imaged with the MMM-4Pi-microscope and to demonstrate the applicability of the method to the study of Golgi sub-compartments, a correlative comparison with TEM images is conducted. After implementing two-colour imaging capability the high resolution of the MMM-4Pi-microscope is utilized for distance analyses of the distributions of three Golgi enzymes (2-OST, MannII, GalT), and finally the transport of the VSVG protein through the Golgi complex is studied in a number of time-lapse recordings.

Verzeichnis der Abkürzungen:

| | |
|--------|---|
| AFM | Atomic Force Microscope |
| CCD | Charge-Coupled Device |
| CGN | Cis-Golgi Netzwerk |
| CLEM | Correlative Light-/Electron Microscopy |
| CLSM | Confocal Laser Scanning Microscope |
| COPII | Coatomer Protein II |
| cps | counts per second |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid |
| DIC | Differential Interference Contrast |
| DMEM | Dulbecco's Minimum Essential Medium |
| DMSO | DiMethylSulfOxid |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| Erd | endoplasmic reticulum retention defective |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| GalT | Galaktosyltransferase |
| IC | Intermediäres Kompartiment (<i>Intermediary Compartment</i>) |
| KDEL | Einzelbuchstaben-Kode für Aminosäuren: K = Lys, D = Asp, E = Glu, L = Leu |
| LU | Linear Unmixing / Linear Unmixed = spektral getrennt |
| MannII | Mannosidase II |
| MMM | Multifocal Multiphoton Microscopy |
| MS | MiniStack |
| MTOC | MicroTubule Organizing Center |
| Noc | Nocodazol |
| 2-OST | 2-O-Sulfotransferase |
| PALM | PhotoActivated Localization Microscopy |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PC3 | Procollagen, Type III |
| PFA | ParaFormAldehyd |
| PM | Plasmamembran |
| PSF | Point Spread Function (Punktverteilungsfunktion) |
| SNOM | Scanning Nearfield Optical Microscope |
| SNR | Signal to noise ratio |
| STED | Stimulated Emission Depletion |
| TDE | 2,2'-Thiodiethanol |
| (T)EM | (Transmissions)ElektronenMikroskop(ie) |
| TGN | Trans-Golgi Netzwerk |
| TMD | Transmembrandomäne |
| VSVG | Vesicular Stomatitis Viral Glycoprotein |
| VYFP | venus Yellow Fluorescent Protein |

| | |
|--|------------|
| 2.2.4.2.5. Skalierung und Justage des Aufbaus..... | 42 |
| 2.2.4.2.6. Entfaltung..... | 45 |
| 2.2.5. Elektronenmikroskopie..... | 47 |
| 2.2.5.1. Transmissionselektronenmikroskopie..... | 47 |
| 2.2.5.2. Korrelative 4Pi-Licht-/Elektronenmikroskopie (4Pi-CLEM)..... | 49 |
| 2.2.6. Programme..... | 50 |
| 3. ERGEBNISSE..... | 51 |
| 3.1. Rekonstruktion dreidimensionaler Strukturen aus 4Pi-Aufnahmeserien | 52 |
| 3.1.1. Definition des Schwellenwertes..... | 55 |
| 3.2. 4pi-CLEM..... | 56 |
| 3.2.1. Prokollagen III als Probe für den Strukturenvergleich | 57 |
| 3.2.2. Adaption des optischen Aufbaus zur Positionsbestimmung der Zelle..... | 58 |
| 3.2.3. Datenanalyse zur Identifizierung spezifischer Golgi-Ministacks im TEM | 59 |
| 3.2.4. Dreidimensionale korrelative Rekonstruktion von Golgi-Ministacks | 62 |
| 3.3. Distanzanalyse von Enzymen des Cis-, Mid- und Trans-Golgi Apparates | 65 |
| 3.3.1. Zweifarben-MMM-4Pi-Mikroskopie..... | 65 |
| 3.3.1.1. Spektrale Trennung der Kanäle | 65 |
| 3.3.1.2. Ausrichtung der Kanäle | 67 |
| 3.3.2. Distanzanalyse mittels MMM-4Pi-Mikroskopie | 73 |
| 3.3.2.1. Erd2 als äußere Kontrolle | 77 |
| 3.3.3. Intra-Golgi Lokalisation von 2-OST..... | 79 |
| 3.4. Transport von VSVG..... | 83 |
| 3.4.1. Das Trans-Golgi-Kompartiment reagiert auf den VSVG-Puls..... | 85 |
| 4. DISKUSSION..... | 88 |
| 4.1. 4Pi-CLEM..... | 88 |
| 4.1.1. Strukturelle Validität der 4Pi-mikroskopischen 3D-Rekonstruktionen..... | 89 |
| 4.2. Distanzanalyse..... | 94 |
| 4.2.1. Die Reihenfolge der analysierten Enzyme in der Glykosylierungskette | 94 |
| 4.2.2. Beeinflusst die Überexpression von Fusionsproteinen ihre Lokalisation ? | 96 |
| 4.2.3. Erd2 als Marker zur Bestimmung der Lokalisierung von Golgi-Enzymen | 98 |
| 4.2.4. Beeinflusst die Inkubation mit Nocodazol die Distanzanalyse?..... | 99 |
| 4.2.5. Die Bedeutung der Auflösung für die Distanzanalyse..... | 100 |
| 4.2.6. Ausblick | 104 |
| 4.3. Transportdynamik..... | 105 |
| 4.3.1. Die Relokalisation von GalT erfolgt parallel zum VSVG-Transport | 106 |
| 4.3.2. Die Dynamik spricht für einen Transport über tubuläre Verbindungen | 112 |
| 4.3.3. Validität des Nocodazol-induzierten Ministack-Modells | 113 |
| 4.3.4. Ausblick | 113 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 115 |

1. Einleitung

Als eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung von Strukturen wie auch Funktionen in lebenden Zellen hat die nicht-invasive Lichtmikroskopie innerhalb der letzten Jahre eine beispiellose Entwicklung durchlaufen. Die größte Bedeutung kommt dabei der Fluoreszenzmikroskopie zu, mit deren Hilfe die spezifische Verteilung fluoreszent markierter Proteine, Lipide oder anderer biologischer Moleküle selektiv sichtbar gemacht werden kann. Seit der Entdeckung des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) im Jahre 1994 [1] ist unter Verwendung fluoreszenter Marker auch die Lichtmikroskopie lebender Zellen möglich. Durch Fusion der DNA-Sequenz von GFP mit der des Zielproteins kann mittels Vektoren ein fluoreszentes Hybridprotein in der lebenden Zelle exprimiert werden. Seitdem hat sich die Palette der verfügbaren fluoreszenten Proteine, unter anderem durch eine große Zahl von GFP-Mutanten mit veränderten spektralen Eigenschaften, stark erweitert. Durch Verwendung mehrerer, spektral unterschiedlicher Farbstoffe können die räumlichen Beziehungen der Verteilungen verschiedener Proteine untersucht werden, was Rückschlüsse über ihre funktionalen Beziehungen erlaubt.

Bei all ihrer Vielseitigkeit reichen herkömmliche lichtmikroskopische Verfahren aber hinsichtlich ihrer Auflösung von etwa 200 nm in der Fokalebene und 500-700 nm in Strahlrichtung nicht an die Leistungsfähigkeit der Transmissionselektronenmikroskopie heran. Diese stellt nach wie vor die Standardmethode zur strukturellen Untersuchung von Zellorganellen dar, da sie aufgrund der im Vergleich zu sichtbarem Licht erheblich kleineren Wellenlänge von Elektronen eine Auflösung im Bereich weniger Nanometer erreicht. Diese Auflösungslücke zwischen einem und einigen hundert Nanometern beginnt sich erst seit einigen Jahren durch die Entwicklung hochauflösender lichtmikroskopischer Verfahren wie 4Pi-, STED- (*Stimulated Emission Depletion*) [2-4] und PALM-Mikroskopie (*Photoactivated Localization Microscopy*) [5-7] zu schließen. Wie im folgenden Vergleich der Methoden begründet, wurde als optimaler Kompromiss von Auflösung, Aufnahmegeschwindigkeit und der Fähigkeit zur Arbeit unter physiologischen Bedingungen das MMM-4Pi-Mikroskop (Multiphoton Multifocal Microscope) [8] gewählt, um strukturelle wie funktionale Aspekte der Subkompartimentierung des Golgi-Apparates lebender Säugerzellen zu untersuchen.

1.1. Hochauflösende Mikroskopie

Bis ins vergangene Jahrzehnt war die maximale Auflösung von Fernfeld-Lichtmikroskopen nach dem Satz von Abbe beugungsbedingt auf etwa die halbe Wellenlänge des verwendeten Anregungslichts begrenzt. Hoch auflösende Bildgebung wurde durch das TEM ermöglicht, welches aber aufgrund der recht aufwendigen Probenpräparation die Lichtmikroskopie nicht ersetzen konnte. Spezielle Methoden wie die mechanische Abtastung von Oberflächen mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, *Atomic Force Microscopy*) sowie Nahfeldmikroskopie mittels SNOM (*Scanning Nearfield Optical Microscopy*) sind aufgrund der ihnen zugrunde liegenden Prinzipien nur für die Untersuchung von Oberflächen geeignet und daher hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit auf spezielle Fragestellungen beschränkt.

Aufgrund des großen Unterschiedes der erreichbaren Auflösungen standen licht- und elektronenmikroskopische Verfahren lange Zeit nicht in direkter Konkurrenz. Konfokale Laserrastermikroskope (CLSM, *Confocal Laser-Scanning Microscope*) erreichen ~200 nm Auflösung lateral und ~500 nm axial und sind für Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen sehr gut geeignet. Die Elektronenmikroskopie dagegen verwendet Schnittpräparate fixierter Proben und detektiert elektronendichte Kontrastmittel. Die im Vergleich zu lichtmikroskopischen Methoden erheblich aufwändigere Probenpräparation ist der wesentliche Nachteil der Methode, der durch die daraus entstehende Möglichkeit von Präparationsartefakten infolge der Fixation oder des Schneidens noch verstärkt wird. Außerdem müssen bei seriellen Schnitten die einzelnen Aufnahmen zur Rekonstruktion dreidimensionaler Strukturen gegeneinander ausgerichtet werden, was eine weitere Fehlerquelle und eine subjektive Einflussnahme des Experimentators darstellt. Tomographische Verfahren umgehen dieses Problem, sind aber präparativ wie auch zeitlich erheblich aufwändiger. Dafür können lateral Auflösungen im Bereich weniger Nanometer erreicht werden, während die axiale Auflösung von der Dicke der Schnitte bestimmt wird. Elektronentomographie ermöglicht auch axial eine Auflösung im Nanometerbereich, ist aber noch aufwändiger als die Arbeit mit seriellen Schnitten. Überdies ist die Standardmethode zum Nachweis von Proteinen im TEM die Immunmarkierung mit Goldpartikeln. Diese ist häufig schwach gegen den unspezifischen Hintergrund, und ihre Verteilung ist in der Regel vereinzelt und daher immer zu einem gewissen Grad eine Frage der Interpretation. Folglich

benötigt man eine große Zahl von Aufnahmen, um statistisch relevante Aussagen treffen zu können.

Seit der Einführung hochauflösender Lichtmikroskope (z.B. 4Pi, STED, PALM) bestehen echte Alternativen zur Elektronenmikroskopie, und die „Arbeitsteilung“ zwischen Licht- und elektronenmikroskopischen Verfahren wird in Frage gestellt. Von diesen neuen Methoden erreichen STED- und PALM- Mikroskope mit 15-20 nm die höchsten lateralen Auflösungen [3, 5]. Die axiale Auflösung dieser STED-Mikroskope beträgt dagegen nur 500 nm, während PALM bislang nur Strukturen in unmittelbarer Nähe der Oberfläche des Deckglases abbilden kann. Folglich eignen sich beide Methoden bislang am besten für die Untersuchung zweidimensionaler Objekte. Für die Darstellung dreidimensionaler Strukturen ist das 4Pi-Mikroskop mit einer Auflösung von ~150 nm axial und ~200 nm lateral besser geeignet. Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist aber seine Fähigkeit zur Untersuchung lebender Zellen.

Bei einer Steigerung der Auflösung (und gleichbleibendem Bildfeld) sinkt zwangsläufig die Aufnahmegeschwindigkeit. Kompensiert man dies durch eine schnellere Punktrasterung, verschlechtert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (siehe Abb. 1.01). Aus diesem Grund wurde das MMM-4Pi-Mikroskop entwickelt [8]. Die Rasterung einer Bildebene mit einem Gitter aus zwanzig Punktfokussen ermöglicht die Aufnahme eines Bildfeldes von 40 μm x 40 μm in zwei Sekunden. Die Methode ist damit sowohl zur Analyse der dreidimensionalen Struktur komplexer Zellorganellen als auch zur Untersuchung dynamischer Prozesse, wie etwa des sekretorischen Proteintransports in der lebenden Zelle geeignet. Innerhalb dieses Aufgabenbereiches ist das MMM-4Pi zur Zeit zweifellos das vielseitigste und leistungsfähigste nichtinvasive Mikroskop.

Ziel und Gegenstand dieser Arbeit war es daher, das MMM-4Pi-Mikroskop hinsichtlich der Darstellung hoch aufgelöster dreidimensionaler Strukturen zu validieren und es im Kontext mit zweifarbigem, zeitaufgelösten Aufnahmen an lebenden Zellen als Methode *par excellence* zu etablieren.

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1. Hochauflösende Mikroskopie | 2 |
| 1.1.1. Die Entwicklung des 4Pi-Mikroskops | 4 |
| 1.1.2. Grenzen der strukturellen Abbildungseigenschaften | 6 |
| 1.1.3. Das MMM-4Pi-Mikroskop bekommt Farbe | 8 |
| 1.2. Der Golgi-Apparat..... | 12 |
| 1.2.1. Die Bedeutung des Golgi-Apparates für die lebende Zelle | 12 |
| 1.2.2. Struktur | 13 |
| 1.2.3. Organisation des Golgi-Apparates..... | 16 |
| 1.2.4. Glykolysierung..... | 18 |
| 1.2.5. Golgi-Enzyme und ihre Lokalisation..... | 20 |
| 1.2.6. Transport..... | 21 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 24 |
| 2.1. Material..... | 24 |
| 2.1.1. Puffer und Lösungen..... | 24 |
| 2.1.2. Chemikalien | 24 |
| 2.1.3. Zellkultur..... | 25 |
| 2.1.4. Medien | 25 |
| 2.1.5. Plasmide..... | 26 |
| 2.1.6. Antikörper..... | 27 |
| 2.1.7. Einbettungsmedien..... | 27 |
| 2.1.8. Mikroskope | 28 |
| 2.1.8.1. Phasenkontrastmikroskopie | 28 |
| 2.1.8.2. Epifluoreszenzmikroskopie..... | 28 |
| 2.1.8.3. Konfokalmikroskopie | 29 |
| 2.1.8.4. Einphotonen-4Pi-Mikroskopie, Typ a | 29 |
| 2.1.8.5. MMM 4Pi-Mikroskopie..... | 30 |
| 2.1.8.6. Elektronenmikroskopie | 30 |
| 2.2. Methoden | 30 |
| 2.2.1. Plasmid-Isolierung | 30 |
| 2.2.2. Zellkultur..... | 31 |
| 2.2.2.1. Verwendete Zelllinien..... | 31 |
| 2.2.2.2. Einfrieren von Zellen | 31 |
| 2.2.2.3. Transfektion | 32 |
| 2.2.2.4. Inkubation mit Nocodazol, Jasplakinolid und Dipyrindyl..... | 33 |
| 2.2.3. Immunmarkierung..... | 34 |
| 2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie | 35 |
| 2.2.4.1. CLSM..... | 35 |
| 2.2.4.2. 4Pi-Mikroskopie | 36 |
| 2.2.4.2.1. Prinzip der 4Pi-Mikroskopie..... | 37 |
| 2.2.4.2.2. Das Multifokale Multiphotonen 4Pi-Mikroskop (MMM-4Pi) | 39 |
| 2.2.4.2.3. Die 4Pi-Einheit..... | 40 |
| 2.2.4.2.4. Probenpräparation für die 4Pi-Mikroskopie | 41 |

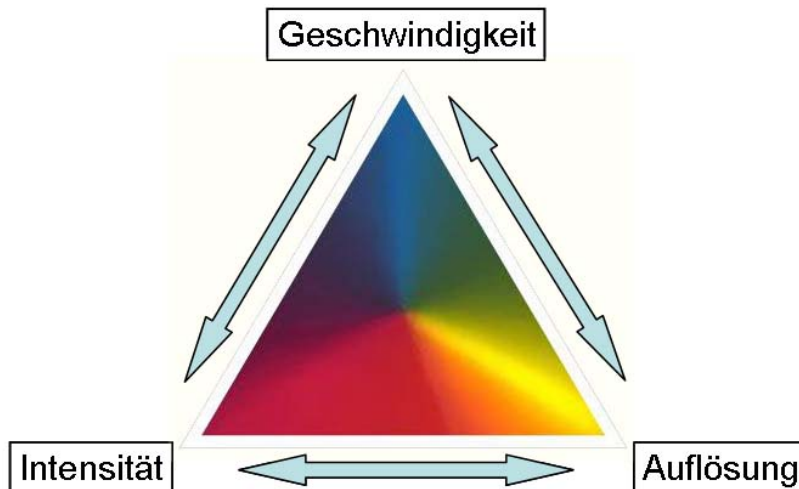


Abb. 1.01: Lichtmikroskopie stellt immer einen Kompromiss zwischen den drei Parametern Auflösung, Aufnahmegeschwindigkeit und detektierbarer Intensität dar. Diese drei Parameter können nicht gleichzeitig maximiert werden, sondern sind voneinander abhängig.

1.1.1. Die Entwicklung des 4Pi-Mikroskops

Das Funktionsprinzip eines 4Pi-Mikroskops beruht auf der kohärenten Überlagerung der sphärischen Wellenfronten zweier einander gegenüberliegender Objektive. Die Punktverteilungsfunktion eines 4Pi-Mikroskops (PSF, *Point Spread Function*) weist ein zentrales Hauptmaximum mit beiderseitigen, niedrigeren Nebenmaxima vor, deren Einhüllende der PSF des Konfokalmikroskops entspricht (Abb. 1.02). Die Nebenmaxima der 4Pi-PSF führen in der Aufnahme auf beiden Seiten des jeweiligen Objektes entlang der Z-Achse zu „Schatten“ oder „Phantombildern“. Diese können mittels einer linearen Entfaltung, also der Faltung der Bilddaten mit der inversen PSF des Mikroskops, mathematisch entfernt werden, sofern die Nebenmaxima nicht zu stark ausgeprägt sind. Die Auflösung des 4Pi-Mikroskops, definiert über die Halbwertsbreite des zentralen Hauptmaximums, beträgt im vorliegenden Fall (Zwei-Photonen-Anregung bei 890 nm Wellenlänge) etwa 150 nm axial, gegenüber 500 bis 600 nm bei konfokalen Mikroskopen, während lateral in beiden Fällen etwa 200 nm Auflösung erreicht wird. Damit leistet das 4Pi-Mikroskop als einziges lichtmikroskopisches System eine Auflösung von 200 nm oder weniger in allen Raumrichtungen.

Eine eingehende Beschreibung der Abbildungseigenschaften des verwendeten Mikroskops und der vorgenommenen Entfaltungen findet sich im Methodenteil des nächsten Kapitels.

Man unterscheidet drei Typen von 4Pi-Mikroskopen: Das innerhalb dieser Arbeit verwendete Mikroskop des Typs a nutzt eine Interferenz des Anregungslichtes, während bei Typ b das emittierte Licht interferiert. Die in ihrer technischen Realisation wie auch im Betrieb erheblich aufwendigeren 4Pi-Mikroskope des Typs c schließlich nutzen eine Kombination beider Effekte, um eine noch höhere Auflösung zu erzielen. Mit Blick auf eine Maximierung der Datenausbeute wurde in dieser Arbeit mit Typ a die einfachste und zugleich stabilste Implementierung gewählt.

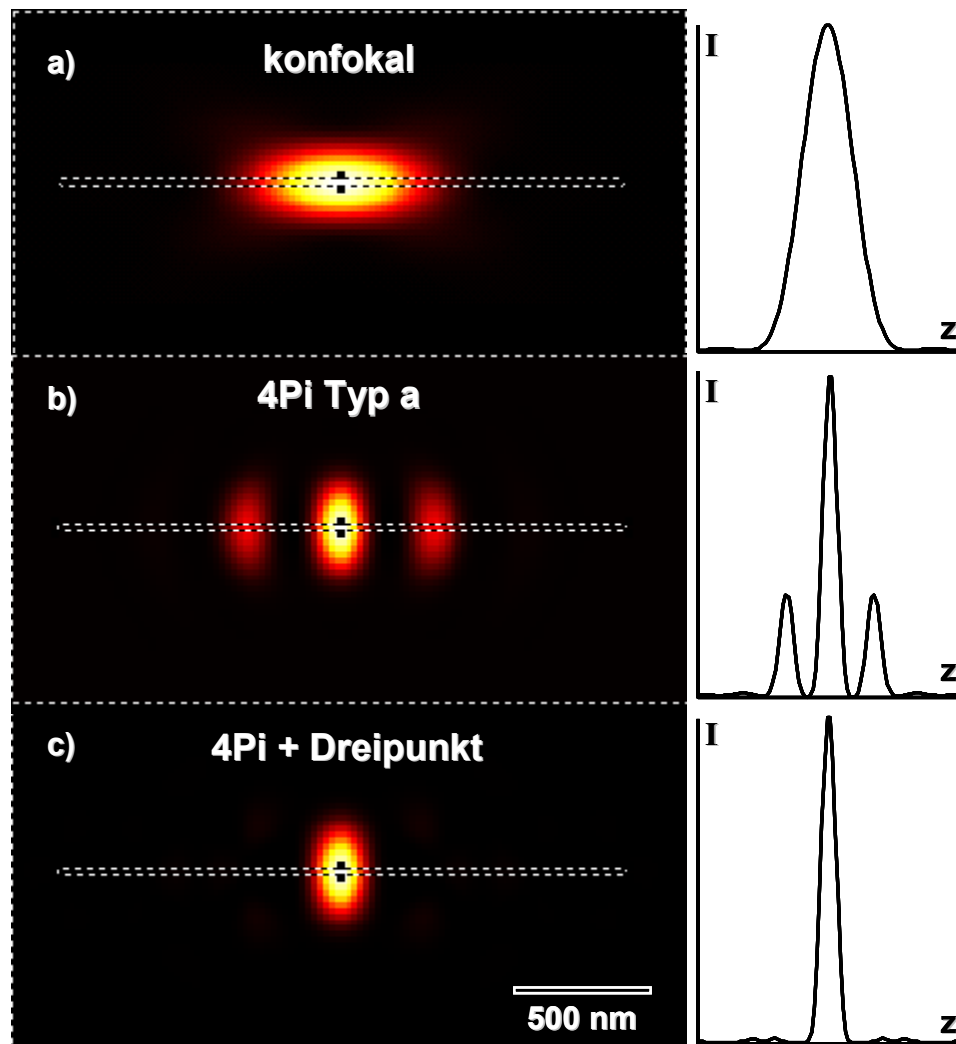


Abb. 1.02: Punktverteilungsfunktionen: konfokal (a), 4Pi (b), 4Pi nach Dreipunkt-Entfaltung (c).

In den letzten Jahren wurde das 4Pi-Mikroskop in verschiedene Richtungen konsequent weiterentwickelt. So kann unter Einsatz neuartiger, hochnumerischer Objektive (bei Ölimmersion) aufgrund der deutlich niedrigeren Nebenmaxima auf die sonst übliche Zwei-Photonen-Anregung verzichtet werden, was die Methode stark verbilligt [9]. Ein Mikroskop des Typs a wurde zur Marktreife entwickelt und wird als Leica TCS 4Pi vertrieben (*Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*) [10].

Diesen Varianten gemein ist, dass sie entweder aufgrund der Notwendigkeit zur Öl- oder Glycerinimmersion oder aufgrund der geringen Aufnahmegeschwindigkeit (Leica TCS 4Pi) für Untersuchungen an lebenden Zellen kaum in Frage kommen. Der erste Einsatz eines MMM-4Pi-Mikroskops an lebenden Zellen erfolgte 2002 zur Untersuchung der Struktur des mitochondrialen Netzwerks der Hefe *S. cerevisiae* [8]. 2004 wurde die Methode für die Untersuchung lebender Säugerzellen etabliert und der vollständige Golgi-Apparat lebender *Vero*-Zellen dreidimensional hoch aufgelöst dargestellt [11].

Ebenso wichtig im Hinblick auf die Arbeit mit lebenden Zellen war die Einführung der aktiven Phasenkompensation. Während des Rasterns durch die lebende Zelle ändern sich die optischen Weglängen der beiden Teilstrahlen und folglich die Phasenbeziehung der beiden Wellenfronten fortwährend. Diese muss jedoch über das gesamte Bildfeld konstant sein, damit die PSF ortsinvariant bleibt und die Aufnahme entfaltet werden kann. Dies wird durch die aktive Phasenkompensation ermöglicht.

1.1.2. Grenzen der strukturellen Abbildungseigenschaften

Die Auflösung des 4Pi-Mikroskops ermöglicht zwar eine detailliertere Darstellung zellulärer Organellen als mit herkömmlichen Lichtmikroskopen, ist aber für den Gegenstand dieser Arbeit, die Subkompartimente des Golgi-Apparates, grenzwertig. Deren Abmessungen liegen mit etwa 100 nm Erstreckung entlang der Cis-Trans-Achse in der gleichen Größenordnung wie die Auflösung des Mikroskops.

Zur besseren Einschätzung der Validität mit dem MMM-4Pi-Mikroskop dargestellter dreidimensionaler Strukturen wurden daher innerhalb dieser Arbeit CLSM, MMM-4Pi und TEM korrelativ eingesetzt und verglichen. Korrelative licht- und elektronenmikroskopische Studien sind unter dem Namen CLEM (*Correlative Light- and Electron Microscopy*) bekannt, dienen aber bislang primär der Kombination der schnellen lichtmikroskopischen Erfassung dynamischer Prozesse mit der hohen

elektronenmikroskopischen Auflösung einer (durch Fixierung herbeigeführten) Momentaufnahme [12, 13]. Ein struktureller Vergleich mittels CLEM fand bislang noch nicht statt. Ein Grund mag darin liegen, dass die Konfokalmikroskopie schon so lange etabliert und akzeptiert ist, dass die Validität ihrer strukturellen Abbildung nicht mehr oder nur noch selten hinterfragt wird. Die wesentliche Ursache ist aber, dass erst mit dem 4Pi-Mikroskop die in allen drei Raumachsen gleich hoch aufgelöste feinstrukturelle Darstellung von Zellorganellen möglich ist, woraus eine Notwendigkeit ihrer Verifizierung erwächst, die zuvor so nicht bestanden hat. Der Vergleich mit der TEM als einziger anderer hoch auflösenden Methode zur Aufklärung dreidimensionaler Strukturen bietet sich an, sollte aber nicht als einseitige Überprüfung betrachtet werden, in der sich nur das 4Pi-Mikroskop zu bewähren hat. Der geringeren Auflösung des 4Pi-Mikroskops steht die aufwändige Probenpräparation und die typischerweise relativ schwache Immunogoldmarkierung der Transmissionselektronenmikroskopie gegenüber. Da die Quellen potentieller struktureller Artefakte bei beiden Methoden somit vollkommen unterschiedlich geartet sind, wäre eine weitgehende Übereinstimmung der jeweiligen dreidimensionalen Strukturen ein schlagkräftiger Beweis für die relative Artefaktfreiheit *beider* Methoden.

Die zweite mittels dieses Ansatzes bearbeitete Frage war die nach der Begrenzung lichtmikroskopisch aufgenommener Strukturen. Während sich beim TEM diese Frage kaum stellt, da die ein Organell begrenzenden Membranen mit wenigen Nanometern Auflösung dargestellt werden können, bilden Lichtmikroskope (meist) die Verteilung fluoreszenz-markierter Makromoleküle ab, welche in der Aufnahme einer Faltung der tatsächlichen Verteilung mit der jeweiligen PSF entspricht. Kann man bei geometrisch einfachen Objekten (beispielsweise Polystyrolkugeln) noch die Halbwertsbreite zur Abmessung der Struktur definieren und somit also einen prozentualen Grenzwert in Relation zum Intensitätsmaximum verwenden, ist dies bei komplexen Intensitätsverteilungen unmöglich. Daher wurde eine von absoluten Intensitäten unabhängige Grenzwertbestimmung über die Nullstellen der Laplace-Funktion eingesetzt und anhand des korrelativen Vergleichs mit EM-Daten auf ihre strukturelle Zuverlässigkeit geprüft.

1.1.3. Das MMM-4Pi-Mikroskop bekommt Farbe

Die Fähigkeit zur Aufnahme zweifarbiger Bilder erweitert die Einsatzmöglichkeiten eines Mikroskops beträchtlich. Monochrome Fluoreszenz-Aufnahmen zeigen beispielsweise die Verteilung eines GFP-Fusionsproteins, ohne eine Möglichkeit, diese zu anderen Elementen einer Zelle in Bezug zu setzen. Sie sind daher in erster Linie auf rein strukturelle Aussagen oder die Untersuchung von Verteilungsmustern, wie etwa der Clusterbildung von integralen Membranproteinen beschränkt. Erst eine zweite Farbe ermöglicht eine Positionierung des observierten Objektes relativ zu einer Referenz, beispielsweise durch Färbung des Zellkerns oder der Zellmembran.

Der wesentliche Nutzen der zweiten Farbe besteht aber in der Möglichkeit, mittels zweier unterschiedlicher Markierungen räumliche Zusammenhänge zwischen Organellen, Proteinen oder anderen Makromolekülen zu untersuchen. Zur reinen Analyse von Strukturen kommt der Aspekt der Funktion hinzu.

Die Kompartimentierung der lebenden Zelle in getrennte, in ihrer stofflichen Zusammensetzung stark unterschiedliche Reaktionsräume weist schon darauf hin, dass die genaue Kenntnis der Lokalisation eines Proteins Aufschluss über seine Funktion geben kann. Aufgrund der weitreichenden gegenseitigen Abhängigkeit von Funktion und Struktur – ein Prinzip das in praktisch allen Kompartimenten der Zelle gilt – können außerdem Kollokalisierungsstudien Aufschluss darüber geben, ob zwischen zwei verschiedenen Proteinen die Möglichkeit der Interaktion besteht oder in welcher Reihenfolge sie innerhalb einer Reaktionskette, beispielsweise der O- oder N-Glykosylierung im Golgi-Apparat, agieren. Im Interesse größtmöglicher Genauigkeit ist man bei solchen Aussagen auf eine hoch aufgelöste und präzise Bestimmung von Distanzen und Kollokalisationsgraden angewiesen.

Weiterhin können mittels zeitaufgelöster Mikroskopie in zwei Farben Transportprozesse visualisiert werden, indem eine Markierung als weitgehend stationäre Referenz dient, während mit der zweiten Farbe ein Transportprotein markiert wird.

Aufgrund der technisch anspruchsvollen Implementierung ist die zweifarbige 4Pi-Mikroskopie ein Produkt der jüngsten Vergangenheit [9, 14, 15]. Eine Anwendung auf lebende Zellen fand bislang jedoch noch nicht statt, da erst die multifokale Rasterung, welche beispielsweise im kommerziellen Leica TCS 4Pi System (*Leica Microsystems*

CMS GmbH, Wetzlar) nicht implementiert ist, die für dynamische Prozesse notwendige Aufnahme­geschwindigkeit ermöglicht.

Aus diesem Vorteil erwächst aber auch ein nicht unerhebliches Problem. Bei einfacher Punktrasterung können Photomultiplier oder Avalanche Photodioden verwendet werden. Diese messen lediglich Intensitäten, während sich die räumliche Information aus der Rastersteuerung ergibt. Unter der Voraussetzung, dass chromatische Aberrationen innerhalb der Optik des Mikroskops kompensiert werden, bleibt die Information über die Zuordnung jedes einzelnen Bildpunktes einer Farbe zum korrespondierenden Pixel der anderen Farbe erhalten. Im MMM-4Pi-Mikroskop dagegen wird eine gekühlte CCD-Kamera eingesetzt, wobei alle zwei Sekunden eine komplette X/Y-Ebene ausgelesen wird. Dabei werden beide Farb-Kanäle nebeneinander auf den Chip der Kamera projiziert. Erst nach der Aufnahme werden die beiden Kanäle voneinander getrennt und als einzelne Dateien gespeichert. Damit stellt sich das Problem des Abgleichs der beiden Kanäle; sie müssen so übereinandergelegt werden, dass die Pixel beider Kanäle mit jeweils der gleichen räumlichen Information über das gesamte Bildfeld deckungsgleich sind. Dieses Problem besteht zusätzlich zu dem eventueller Verschiebungen durch chromatische Längs- und Querfehler bei der Detektion von Signalen unterschiedlicher Wellenlängen.

Es gibt zwei Möglichkeiten zur Bestimmung der Transformationsmatrix, mit der gegeneinander verschobene Kanäle aneinander ausgerichtet werden können. Im ersten Fall wird sie anhand der Bilddaten selbst ermittelt, im zweiten anhand einer vorherigen Eichmessung, bei der ein wohldefinierter Standard verwendet wird.

Für die erste Methode existieren automatisierte Routinen, welche Verschiebungen der Kanäle mittels der Kreuzkorrelationsfunktion korrigieren können. Diese werden beispielsweise zur Orientierung der einzelnen Schnittebenen bei tomographischen Verfahren eingesetzt. Weiterhin können zusätzliche Freiheitsgrade wie Rotationen, Streckungen oder Scherungen durch affine Transformationen ausgeglichen werden, bei denen mittels eines Simplex-Algorithmus ein Maß für die Güte der Übereinstimmung (die sogenannte *cost-function*), beispielsweise die Summe über die Quotienten deckungsgleicher Pixel, optimiert wird. Aber obgleich diese Operationen für viele Anwendungen absolut ausreichend sind, erbringen sie bei hoch auflösender Zwei-Farben-Mikroskopie nicht die notwendige Genauigkeit. Der Ausrichtungsfehler beträgt bei diesen Methoden in etwa 20% der Halbwertsbreite der PSF.

Dieses Problem wird im Verlauf der weiteren Bildbearbeitung noch verschärft: Da zur Anregung aus technischen Gründen nur ein Laser verwendet werden kann, müssen Farbstoffe eingesetzt werden, die bei derselben Wellenlänge angeregt werden können. Verwendet wurden EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) und vYFP (*venus-Yellow Fluorescent Protein*), deren Emissionsspektren (Abb. 1.03) sich so ähnlich sind, dass eine scharfe Aufspaltung der Signale in zwei separate Kanäle nicht möglich ist. Bei Kenntnis der prozentualen Aufspaltung jeder einzelnen Farbe in die beiden Detektionskanäle kann in einer Aufnahme aus dem Intensitätsverhältnis der Kanäle auf die Intensitäten der beiden Farben rückgeschlossen werden (siehe Ergebnisse: Spektrale Trennung der Kanäle). Als Folge davon wird jeder Fehler in der Ausrichtung der Kanäle durch die mathematische Trennung der Signale noch verstärkt. Der resultierende Fehler entspricht in etwa der Hälfte der Halbwertsbreite der PSF. Damit liegt er in der gleichen Größenordnung wie die Auflösung des Mikroskops und ist daher nicht zu tolerieren.

Eine Eichmessung vor Beginn der Aufnahme der jeweiligen Probe ermöglicht eine erheblich genauere Bestimmung der Transformationsparameter. Der Einsatz eines Standards (siehe Ergebnisse, Kapitel 3.3.1.2.) und die wiederholte Kontrolle der Eichung zu Beginn jedes Messtages ermöglichte eine ausreichend präzise Ausrichtung der Kanäle, um die Abstände intrazellulärer Proteinverteilungen mit der notwendigen Genauigkeit messen zu können.

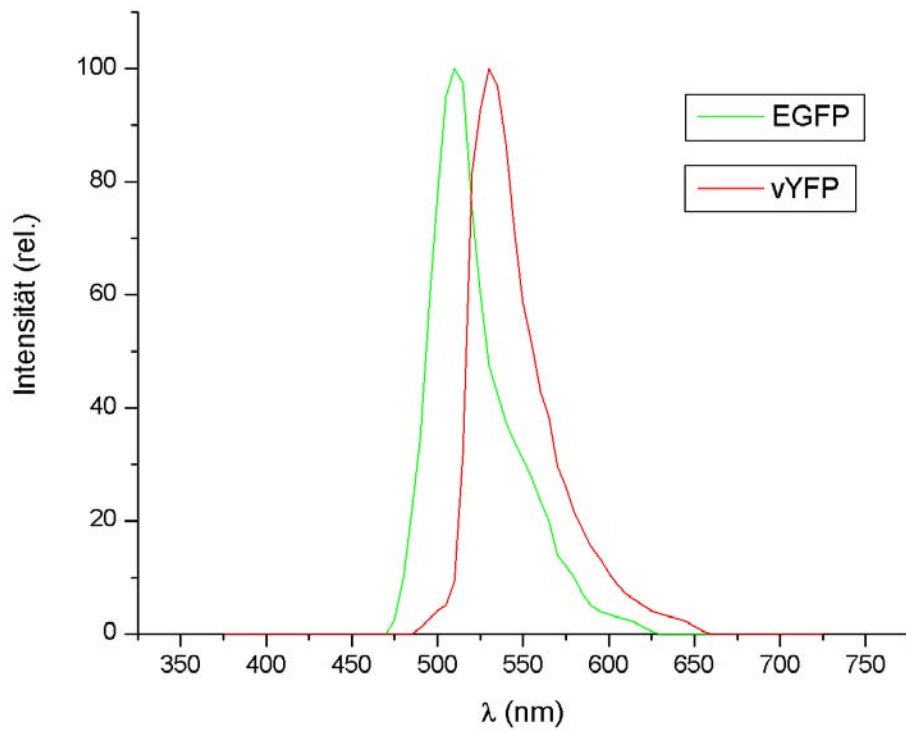


Abb. 1.03: Emissionsspektren von EGFP (grün) und vYFP (rot). Bei Zweifarben-Aufnahmen mit dem MMM-4Pi-Mikroskop wurden die Signale über einen dichroitischen Spiegel bei 525 nm getrennt und in zwei Kanäle aufgespalten.

1.2. Der Golgi-Apparat

Seit seiner Entdeckung durch Camillo Golgi im Jahre 1898 [16] wurde die Struktur des nach ihm benannten Golgi-Apparates intensiv untersucht und – mittels TEM – in hoher Auflösung dargestellt [12, 17-19], ebenso wurden weitreichende Aspekte seiner Funktion aufgeklärt [20-23]. Dennoch gibt dieses Organell noch fast ebenso viele Rätsel auf wie vor über 100 Jahren. Nicht zuletzt aufgrund des Fehlens hochauflösender lichtmikroskopischer Methoden lässt beispielsweise die Genauigkeit, mit der in der Vergangenheit die Verteilung von Golgi-Enzymen entlang der Cis-Trans-Achse des Golgi-Apparates bestimmt werden konnte, zu wünschen übrig. Die exakte Kenntnis dieser Lokalisationen ist aber zum Verständnis der Abfolge enzymatischer Reaktionen während des Proteintransports durch den Golgi-Apparat zwingend erforderlich. Während die für elektronenmikroskopische Untersuchungen eingesetzten, an Goldpartikel gekoppelten Antikörper in der Regel nur vereinzelt binden und zudem häufig einen deutlichen unspezifischen Hintergrund aufweisen, bildet das 4Pi-Mikroskop unmittelbar die Verteilung fluoreszenter Fusionsproteine in hoher Auflösung ab. Durch die Aufnahme zweier verschiedener, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierter Proteine kann deren räumliche Beziehung zueinander analysiert werden.

1.2.1. Die Bedeutung des Golgi-Apparates für die lebende Zelle

Der Golgi-Apparat ist Dreh- und Angelpunkt der Biosynthese sekretorischer wie auch lysosomaler Proteine. Seine Hauptfunktion ist die Glykosylierung von Lipiden und Proteinen, was unter anderem für eine „Adressierung“ der Proteine sorgt, indem bestimmte Oligosaccharide als Signal für den spezifischen Proteintransport zu verschiedenen Zielen erkannt werden. Beispielsweise werden lysosomale Proteine mit Mannose-6-Phosphat versehen, dessen Erkennung durch den Man 6-P-Rezeptor zum Transport zu den Lysosomen führt [24]. Der Großteil der im ER und im Golgi-Apparat glykosylierten Proteine wird zur Zellmembran transportiert, wo die unterschiedlichen Oligosaccharide wesentliche Funktionen bei der Interaktion von Zellen ausüben.

Um eine große Zahl von Substraten innerhalb eines einzigen Organells individuell unterschiedlich zu glykosylieren, bedarf es innerhalb des Golgi-Apparates einer mehrfachen Subkompartimentierung, innerhalb der sequenziell agierende Enzyme in

räumlich (weitgehend) getrennter Verteilung vorliegen. Struktur und Funktion des Golgi-Apparates bilden daher eine untrennbare Einheit, und müssen gleichermaßen untersucht werden, um dieses Organell als Ganzes zu verstehen.

1.2.2. Struktur

Der „typische“ Golgi-Apparat wird in der Literatur in der Regel als eine Ansammlung von flachen Membranstapeln, den so genannten Cisternen, beschrieben. Diese Stapel sind untereinander verbunden und von zahlreichen Vesikeln umgeben, die sich von den Cisternen abschnüren und auch wieder mit ihnen verschmelzen können. Ein solcher Stapel ist schematisch in Abbildung 1.04 dargestellt. Elektronentomographische Untersuchungen konnten in jüngster Zeit zeigen, dass es auch zumindest vorübergehende tubuläre Verbindungen zwischen hintereinander liegenden Cisternen gibt, teils sogar unter seitlicher Überbrückung oder Durchdringung dazwischen liegender Cisternen. Das Auftreten dieser Verbindungen steht vermutlich mit dem Auftreten großer zu transportierender Proteinmengen in Verbindung, da sie z.B. bei unterbundener Proteinbiosynthese (durch Zykloheximid) nicht zu finden sind [25].

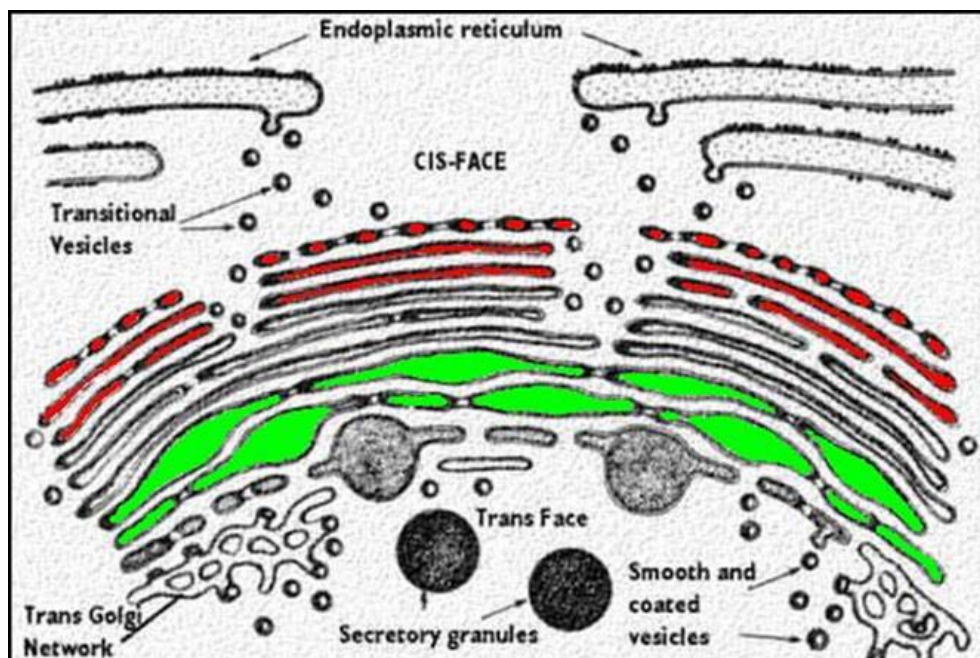


Abb. 1.04: Schematische Übersicht des Golgi-Apparates. Entlang der Cis-Trans-Achse unterscheidet man das Cis-Golgi-Netzwerk (rot, unterbrochen), Cis- Mid- und Trans-Golgi (rot, farblos, grün) und das Trans-Golgi-Netzwerk.

Im Vergleich der Golgi-Apparate verschiedener Arten oder auch nur unterschiedlicher Zelltypen muss allerdings festgestellt werden, dass es an der Struktur des Golgi-Apparats kaum etwas „typisches“ gibt. Während er in Säugerzellen meist als zusammenhängendes, mehr oder weniger kompaktes Gebilde in Kernnähe vorkommt, liegt er in Pflanzenzellen als Gruppe vereinzelter Membranstapel (Dictyosomen) vor, und fehlt ganz bei manchen primitiven Pilzen, bei denen seine Funktion von Ansammlungen von Vesikeln und Membrantubuli übernommen wird [26]. Auch die Zahl der Cisternen eines Golgi-Stapels ist hochgradig variabel. Höhere Organismen weisen meist drei bis zehn Schichten von Cisternen auf, doch kommen bei Protisten bis über 30 Cisternen pro Golgi-Stapel vor [27]. Und selbst wenn man sich, wie in dieser Arbeit, auf wenige Säuger-Zelllinien beschränkt, macht die hoch plastische und dynamische Struktur des Golgi-Apparates eine Typisierung schwierig. Großvolumige, weitmaschige Netzwerke, Gruppen deutlich getrennter, einzelner Elemente wie auch Kompakte, viertel- bis halbkreisförmig eng dem Zellkern anliegende Golgi-Apparate wurden in lebenden Zellen beobachtet, ohne augenscheinlich zu Unterschieden in der Lebensfähigkeit oder der Teilungsrate zu führen (siehe Abb. 1.05).

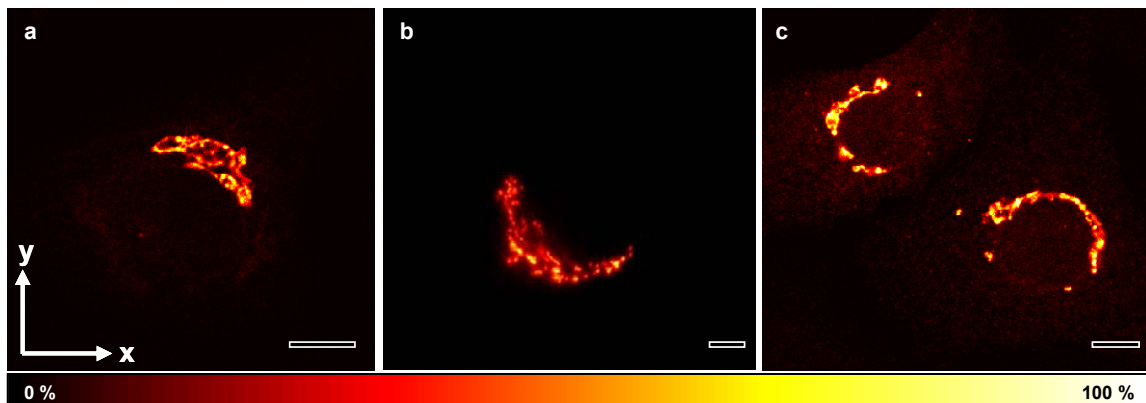


Abb. 1.05: Beispiele für verschiedene Golgi-Strukturen. Netzwerkartige Struktur (a), Dezentralisierte Cluster nicht miteinander verbundener Cisternen-Stapel (b), Kompakte, halbkreisförmig dem Kern anliegende Golgi-Apparate (c). Antikörperfärbung von GM130 (Cis-Golgi) in Epifluoreszenz. Der Größenbalken entspricht jeweils zehn Mikrometern.

Allen Formen von Golgi-Apparaten gemein ist ihre Polarität: Einer Cis-Seite, die dem ER zugewandt ist und von diesem Proteine und Lipide aufnimmt, liegt eine Trans-Seite gegenüber, von der aus Vesikel sowie tubuläre Transport-Träger abgeschnürt werden, welche die Produkte des Golgi-Apparates zur Zellmembran oder anderen Zielen wie den

Lysosomen transportieren. Auf beiden Seiten löst sich die einheitliche, durchgehende Struktur der Cisternen zu weitmaschigen, durch zahlreiche Fenster durchbrochenen Netzwerken auf, dem Cis-Golgi-Netzwerk (CGN) und dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Entlang dieser Cis-Trans-Achse erfolgt der Stofftransport wie auch die sequenzielle Modifikation von Proteinen.

Etwas willkürlich wird der Golgi-Apparat in drei Kompartimente unterteilt, die nicht notwendigerweise räumlich oder funktionell getrennten Gruppen von Cisternen entsprechen. Man unterscheidet den Cis-, Mid- und Trans-Golgi, definiert als jeweils ein Drittel der gesamten Ausdehnung des Membranstapels entlang der Cis-Trans-Achse. Begrenzt wird der Golgi-Apparat nach dieser Definition durch die jeweils äußersten, durchgängigen Membranen. Zwar entspricht diese Einteilung nicht direkt irgendeinem höheren oder funktionellen Merkmal, aber sie macht den Vergleich der Lokalisationen von Enzymen möglich, ohne von der von Zelle zu Zelle (und häufig sogar innerhalb ein und desselben Golgi-Stapels) variierenden absoluten Zahl der Cisternen abhängig zu sein.

Aufgrund seiner hochkomplexen inneren und globalen Struktur begrenzt bei dreidimensionalen Untersuchungen des Golgi-Apparates naturgemäß die Raumachse mit der schlechtesten Auflösung die Qualität der gesamten strukturellen Rekonstruktion. Zwar existiert in Folge der Cis-Trans-Achse eine relative Ausrichtung der Membranstapel, diese ist aber sehr flexibel und ist meist sogar im Verlauf eines einzigen Golgi-Apparates aufgrund von dessen gefaltetem Verlauf stark veränderlich (Abb. 1.06). Aus dieser Tatsache leitet sich die besondere Eignung der in allen drei Raumdimensionen gleich hoch auflösenden 4Pi-Mikroskopie zu Untersuchungen des Golgi-Apparates ab.

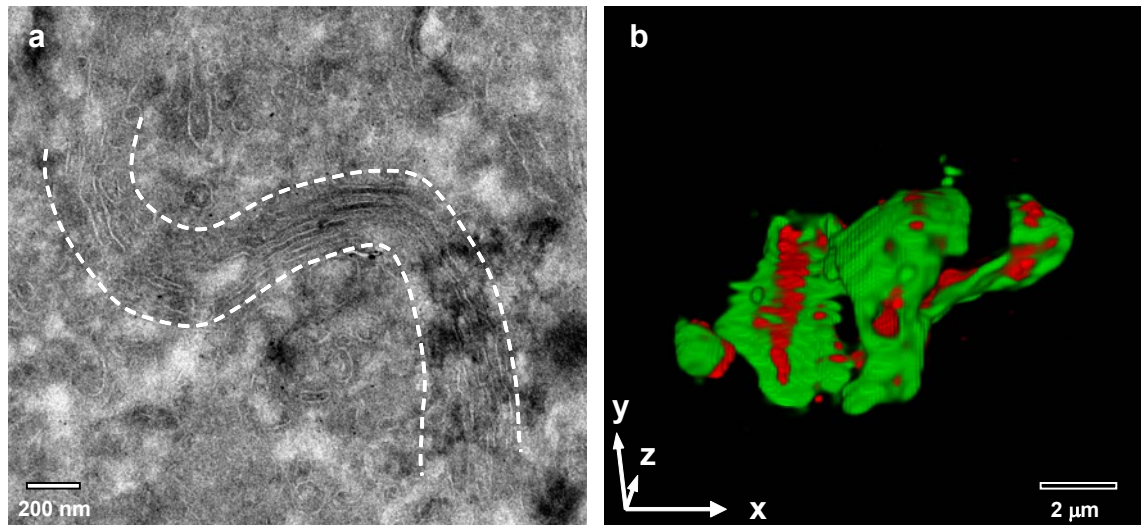


Abb. 1.06: Zwei Beispiele räumlich stark gefalteter Golgi-Apparate. a) EM-Aufnahme nach Bleizitrat-Färbung, b) 3D-Rekonstruktion aus seriellen 4Pi-Aufnahmen. Rot: GalT-vYFP, grün: 2-OST-GFP.

1.2.3. Organisation des Golgi-Apparates

In tierischen Zellen liegt der Golgi-Apparat meist in der Nähe Zellkerns, innerhalb der als Centrosom bezeichneten Region der Mikrotubuli-Organisation (MTOC, *Microtubule Organizing Center*). Diese Positionierung wird durch Mikrotubuli aufrechterhalten, entlang derer die innerhalb der gesamten Zelle aus dem ER exportierten, Golgi-typischen Proteine und Lipide zum Centrosom transportiert werden, wo sich aus ihnen der Golgi-Apparat zusammensetzt. Dass dieser Prozess auch *de novo* ablaufen kann, ist nach jeder Zellteilung erneut zu beobachten [28, 29]. Alle Golgi-Proteine werden im Verlauf der Metaphase vom ER resorbiert, um nach der Zytokinese in beiden Tochterzellen erneut funktionale Golgi-Apparate aufzubauen. Dieser Effekt kann reversibel durch Depolymerisierung der Mikrotubuli simuliert werden, was in der Nähe des ER, an den Stellen des Protein-Exports (den sogenannten ER-Exit-Sites) die Bildung kleiner, voll funktionaler Golgi-Stapel zur Folge hat (Abb. 1.07) [30]. Aufgrund ihrer reduzierten globalen Struktur, die für die Untersuchung der Intra-Golgi-Lokalisation von Enzymen ohnehin keine Rolle spielt, wurden innerhalb dieser Arbeit in den meisten Fällen diese als „Golgi-Ministacks“ bezeichneten, in der Regel 0,5 bis 1 μm durchmessenden Cisternenstapel als Modellsystem verwendet.

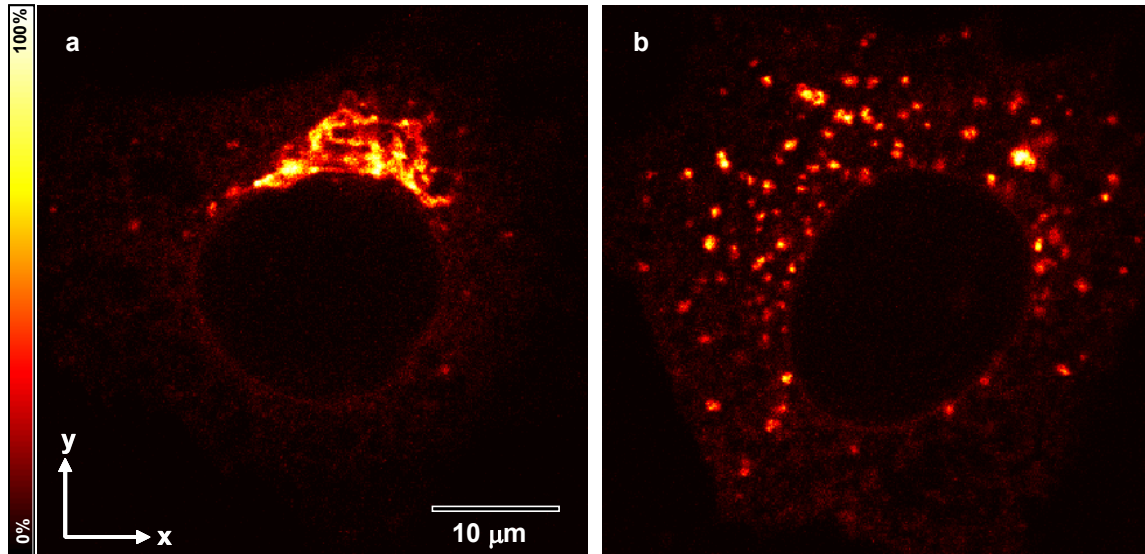


Abb. 1.07: Golgi-Apparat: links ohne, rechts mit Nocodazol-Inkubation (90 min). Der Golgi-Apparat zerfällt unter Nocodazol-Einwirkung in zahlreiche kleine Membranstapel (Ministacks), die über die gesamte Zelle verteilt sind. Vero-Zellen, transfiziert mit GalT-GFP.

In der Interphase zirkulieren alle Golgi-Enzyme kontinuierlich zwischen Golgi-Apparat und ER, wodurch ein dynamisches Fließgleichgewicht entsteht [31]. Aufgrund dieser Eigenschaft und seinem vollständigen Verschwinden in der Metaphase stellt sich die Frage, ob der Golgi-Apparat überhaupt als stabiles Organell existiert, oder vielmehr Folge eines dynamischen, sich selbst organisierenden Prozesses ist. Dieser Standpunkt wird durch die Beobachtung erhärtet, dass in Zellen, in denen der Proteinexport aus dem ER gehemmt wird, nach der Mitose kein neuer Golgi-Apparat aufgebaut werden kann [32]. Einige Matrix-Proteine relokalisieren allerdings nicht zusammen mit den Enzymen ins ER, sondern bleiben zurück [33] und bilden nach wie vor Golgi-artige Strukturen [34]. Als Matrix des Golgi-Apparates wird dabei die Summe aller Golgi-Proteine bezeichnet, die nicht durch Detergenzien ausgewaschen werden können. Daraus wurde gefolgert, dass auch bei einer vollständigen Resorption aller Enzyme ein Skelett aus Matrix-Proteinen bestehen bleibt, welches den „eigentlichen“ Golgi-Apparat darstellt. Dem widersprechen Beobachtungen, denen zufolge Matrix-Proteine zwar nicht ins ER resorbiert, aber zu den ER-Exit-Sites transferiert werden. Mutanten, denen diese Exit-Sites fehlen, können nach Resorption der Golgi-Enzyme ins ER keinen neuen Golgi-Apparat aufbauen [35]. Diese Beobachtung impliziert eine wesentliche Rolle dieser spezialisierten Regionen des ERs bei der Reorganisation des Golgi-Apparates.

1.2.4. Glykolysierung

Die Glykosylierung von Proteinen beginnt bereits im ER und wird im Golgi-Apparat fortgesetzt. Dabei erfüllen die jeweils zugefügten Oligosaccharide in beiden Fällen grundsätzlich unterschiedliche Funktionen. Im ER werden alle Proteine, die eine oder mehrere Sequenzen des Typs Asn-X-Ser/Thr tragen (wobei X eine beliebige Aminosäure ist), noch während ihrer Synthese an der Aminogruppe des Asparagins mit einem mannosereichen, aus 14 Zuckern bestehenden Oligosaccharid verbunden (N-gekoppelte Glykosylierung), welches in folgenden Schritten wieder sukzessive abgebaut wird (Abb. 1.08). Der korrekte Ablauf dieser Glykosylierungs- und Deglykosylierungsprozesse ist ein wesentliches Element innerhalb der Qualitätskontrolle von Proteinen im ER. Bei fehlgefalteten Proteinen findet die sekundäre Verkürzung der Oligosaccharidketten nicht statt, mit der Konsequenz, dass sie am Export aus dem ER gehindert und schließlich abgebaut werden [36-38].

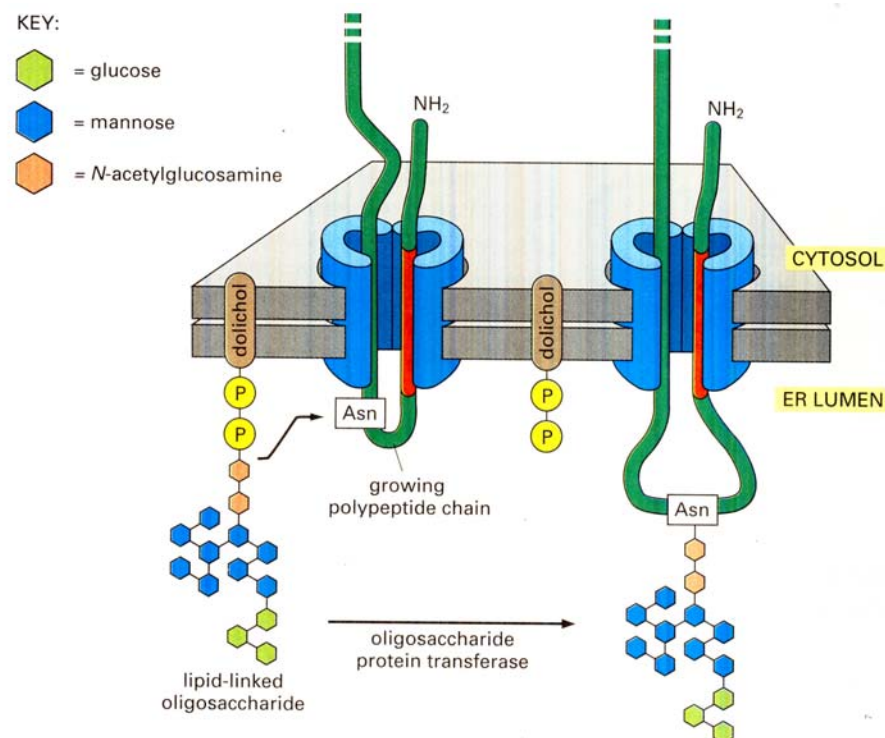


Abb. 1.08 N-Glykosylierung von Proteinen im ER. Jedes (Asn-X-Ser)-Motiv, wobei X eine beliebige Aminosäure ist, wird noch während der Translation glykosyliert. Ein aus 14 Zuckern bestehendes, mannosereiches Oligosaccharid wird an die Aminogruppe von Asparagin-Resten gebunden.

Abbildung entnommen aus: Essential Cell Biology, Alberts, Garland Publishing Inc., New York & London, 1998.

Im Golgi-Apparat setzt sich der Abbau der Reste der ursprünglichen, mannosereichen Oligosaccharidketten fort. Gleichzeitig werden aber auch neue Saccharide hinzugefügt. Zusätzlich findet hier eine zweite, an Serin- oder Threoninresten ansetzende Form der Glykosylierung (O-gekoppelte G.) statt [39]. Die Reihenfolge der einzelnen Schritte, bestimmend für die endgültigen Sequenzen der jeweiligen Oligosaccharide, ist dabei – im Gegensatz zur Bildung von DNA, RNAs oder der Translation – nicht die Folge einer Kodierung, sondern ausschließlich das Resultat der sequenziellen, zeitlich wie räumlich getrennten Abfolge einzelner enzymatischer Reaktionen. Um diese notwendige Trennung zu erreichen, ist der Golgi-Apparat, wie schon beschrieben, subkompartimentiert. Die Cisternen sind dabei allerdings nicht als scharf gegeneinander abgegrenzte Reaktionsräume zu verstehen. Die notwendige Dynamik dieses Organells sowie der anterograde Stofftransport von Cis- nach Trans und der retrograde Transport von Golgi-Enzymen würde eine solche Trennung gar nicht zulassen. Vielmehr bilden die Verteilungen der einzelnen Enzyme innerhalb der Golgi-Kompartimente Konzentrationsgradienten mit unterschiedlich lokalisierten, für das jeweilige Enzym charakteristischen Konzentrationsmaxima. Enzyme werden aufgrund ihrer Verteilung als Cis-, Mid- oder Trans-Golgi-Enzym bezeichnet.

Die Membranen der Golgi-Cisternen weisen einige Veränderungen entlang der Cis-Trans-Achse auf, welche die funktionelle Trennung der Enzyme unter Umständen begünstigen oder sogar verursachen könnte. Die Dicke ihrer Membranen nimmt in Trans-Richtung zu, was einigen Untersuchungen zufolge mit den Längen der Transmembrandomänen verschiedener Golgi-Enzyme korreliert und so deren Verteilung entlang der Cis-Trans-Achse beeinflussen könnte [22, 40, 41]. Diese Theorie wird aber von anderen Stellen angezweifelt [42, 43], und ein letztendlicher Beweis steht noch aus. Eine weitere Veränderung besteht in der graduellen Ansäuerung des Lumens der Cisternen in Trans-Richtung [44, 45]. Aufgrund unterschiedlicher, pH-abhängiger Aktivitätsoptima kann sich dadurch die Abgrenzung der Aktivität rein räumlich nicht sehr scharf getrennter Enzyme verstärken. Außerdem bewirkt bei spezialisierten sekretorischen Zellen der niedrige pH-Wert des Trans-Golgi-Netzwerkes (in Kombination mit einer hohen Ca^{2+} -Konzentration) eine Aggregation bestimmter Proteine, so dass diese in stark erhöhter Konzentration in sekretorische Vesikel eingelagert werden können [46, 47].

Die Glykosylierung innerhalb des Golgi-Apparates erfüllt viele verschiedene Funktionen. Für einige ungewöhnlich stark glykosylierte Transmembranproteine stellen die jeweils spezifischen Zuckerreste ein Erkennungssignal für den Transport zu den Lysosomen dar. Dort angekommen, verhindert die weitgehende Abschirmung ihrer dem Lumen zugewandten Domänen durch Oligosaccharide ihren Verdau durch die Proteasen des Lysosoms [24].

An der Zelloberfläche bilden Glykoproteine, Glykolipide und Proteoglykane gemeinsam die Glykokalyx, die zur mechanischen Verstärkung wie auch, über hygroskopische Effekte, der Befeuchtung der Zelloberfläche dient, was besonders für motile Zellen wichtig ist. Viel weitreichender ist jedoch ihre Funktion für die Zell-Zell-Erkennung, beispielsweise während der Befruchtung einer Eizelle durch ein Spermium oder bei der Rekrutierung neutrophiler Granulocyten an Entzündungsherden. Auch bei der Adhäsion von Krebszellen spielen Glykoproteine eine wesentliche Rolle [48]. Aufgrund der Möglichkeit, die Oligosaccharidketten nicht nur linear anzuordnen, sondern auch an jedem einzelnen Zucker in verschiedenen Weisen zu verästeln, sind die möglichen Sequenzen selbst bei kurzen Ketten nahezu unbegrenzt, was sie für die Verwendung als Element hochspezifischer Erkennungsmechanismen geradezu prädestiniert [49].

Je nach Zelltyp kann der Golgi-Apparat allerdings auch Funktionen ausüben, die weit über die bloße Modifikation von Proteinen hinausgehen. Ein Beispiel sind die „geformten Sekrete“ verschiedener Pflanzenzellen, bei denen im Golgi-Apparat durch Selbstorganisation Strukturen von bis zu einem Mikrometer Durchmesser entstehen. Beispiele sind Zellwandschuppen [50, 51], die auf Flimmergeißeln aufsitzenden Mastigonemen oder ganze Trichocysten, die bei Reizung zur Feindabwehr einen Proteinfaden „abschießen“ können [52, 53].

Eine weitere Spezialisierung ist der Einsatz des Golgi-Apparates zur Osmoregulation mittels aktiver Wasserausscheidung bei allen im Süßwasser lebenden Protisten [54].

1.2.5. Golgi-Enzyme und ihre Lokalisation

Die verhältnismäßig scharfe, auf einige wenige Cisternen begrenzte Lokalisation einiger Golgi-Enzyme wie auch mancher strukturbildender Proteine macht sie, unter Verwendung fluoreszierender Fusionsproteine, zu geeigneten Markern für die Kompartimente des Golgi-Apparates.

Beispiele sind das im Cis-Golgi lokalisierte Matrix-Protein GM130, welches die Bindung von Vesikeln an die Membranen des Cis-Golgi-Apparates vermittelt [55], der Mid-Golgi-Marker Mannosidase II (MannII), der die letzten Reste der ursprünglichen, der Glykosylierung im ER entstammenden mannosereichen Oligosaccharide entfernt, sowie UDP-galaktosyl: Glykoprotein,1,4- β -Galaktosyltransferase (GalT), welches im Trans-Golgi und dem TGN Galaktosereste überträgt [56].

Ein weiteres in dieser Arbeit verwendetes Enzym ist die Uronyl-2-O-Sulfotransferase (2-OST), welche ein Zwischenprodukt in der Heparansulfat-Biosynthese durch Sulfatierung stabilisiert. Heparansulfat kann mit zahlreichen verschiedenen Proteinen interagieren und spielt eine Rolle unter anderem in der Differenzierung, der Adhäsion und der Migration von Zellen sowie bei der Blutgerinnung [57]. 2-OST wurde in der Literatur teils dem Cis-Golgi, teils dem Mid-Golgi zugeordnet [11, 58]. Im Verlauf der Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass 2-OST im Mid- und Trans-Golgi-Apparat lokalisiert.

Alle drei hier behandelten Enzyme sind Transmembranproteine des Typs II, mit einer einzelnen Transmembrandomäne, einem kurzen cytosolischen Ende und einer über eine Stammregion mit dem Rest verbundenen C-terminalen katalytischen Domäne.

1.2.6. Transport

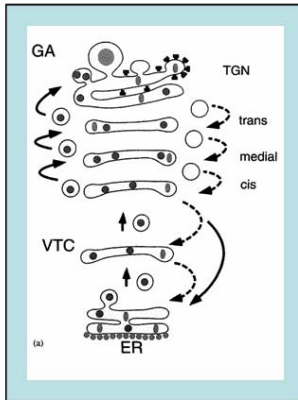
Ein seit geraumer Zeit intensiv untersuchter und doch nach wie vor im Detail wenig verstandener Aspekt der Funktion des Golgi-Apparates ist der Mechanismus des Proteintransports. Zur Zeit existieren vier Modelle. Das ursprünglichste davon, das 1957 postulierte Cisternen-Reifungs-Modell [59], wurde aufgrund elektronenmikroskopischer Befunde lange Zeit durch das Vesikel-Transport-Modell ersetzt [60, 61], erhält aber seit Einführung fluoreszenter Proteine und der dadurch entstandenen Möglichkeit zur Untersuchung von Transportprozessen in lebenden Zellen wieder Zuspruch. Der wesentliche Unterschied besteht in der Rolle, den Vesikel im jeweiligen Modell einnehmen. Im Vesikel-Transport-Modell bewerkstelligen sie sowohl den anterograden Stofftransport als auch den retrograden Enzymtransport. Das Cisternen-Reifungs-Modell geht dagegen davon aus, dass über Vesikel nur der retrograde Enzymtransport abläuft, während der Stofftransport die Folge einer Bewegung der Cisternen selbst ist, welche von Cis- zu Trans-Cisternen heranreifen, wobei sich ihre enzymatische Zusammensetzung ändert, der pH-Wert ihres Lumens ab- und die Dicke ihrer

Membranen zunimmt. Am Cis-Ende werden durch Fusion von Vesikeln [62-64] oder sogenannter Intermediärer Kompartimente [65] laufend neue Cisternen gebildet, während sie sich am Trans-Ende durch Abschnürung von Transportkomplexen auflösen. Ein Hybrid zwischen den beiden genannten Modellen wurde postuliert, um sowohl den Transport großer Objekte durch Cisternenreifung, als auch den vesikulären, schnellen Transport kleinerer Proteine zu erklären. Die geforderten unterschiedlichen Transportraten konnten aber noch nicht belegt werden.

Ein viertes, noch relativ spekulatives Modell geht vom Transport über kurzlebige tubuläre Verbindungen aus, die nur auftreten, wenn Transport stattfindet [25]. Solche Verbindungen konnten elektronentomographisch nachgewiesen werden. Ihre genaue Rolle beim Transport ist aber noch nicht geklärt, und die Frage, ob sie diese unabhängig von reifenden Cisternen oder Vesikeln erfüllen, kann noch nicht beantwortet werden..

Bislang bleibt keines der existierenden Modelle gänzlich frei von Widersprüchen zu experimentellen Befunden. Das Vesikel-Transportmodell hält keine Erklärung für den Transport von Proteinen oder „geformten Sekreten“ bereit, die größer sind als die ungefähr 70 nm durchmessenden Vesikel. Das Cisternen-Reifungs-Modell bleibt bislang den Beweis schuldig, dass Vesikel tatsächlich ausschließlich Enzyme transportieren. Natürlich ist es auch denkbar, dass je nach Zelltyp und je nach Anforderungen an den Transport unterschiedliche Mechanismen wirksam sind.

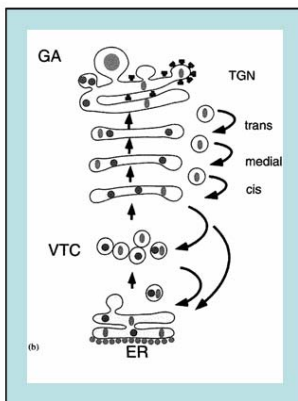
Die Tatsache, dass über 100 Jahre nach der Entdeckung des Golgi-Apparates immer noch vier verschiedenen Modelle des Proteintransports diskutiert werden, verdeutlicht, welchen Beschränkungen die Untersuchung des Golgi-Apparates mit herkömmlichen Mikroskopen unterliegt. Die offenkundige Ungenauigkeit konfokal ermittelter Enzymlokalisationen, wie am Beispiel von 2-OST gezeigt, ist ein weiterer Beleg dafür, dass die hochauflösende Mikroskopie lebender Zellen wesentlich zum Verständnis des Golgi-Apparates beitragen kann. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Eignung des MMM-4Pi-Mikroskops für die Untersuchung der Subkompartimente des Golgi-Apparates zu demonstrieren. Aufgrund ihrer Vielseitigkeit wird die Methode für die Bestimmung der räumlichen Verteilung von Golgi-Enzymen wie auch für die Untersuchung der Dynamik des Proteintransportes eingesetzt.

A) Das Vesikel-Transport-Modell (Vesicular Transport)

Der anterograde Transport von Proteinen erfolgt über Vesikel, der retrograde Transport dient nur dem Ausgleich der Verteilung von Lipidmembranen. Die Cisternen stellen stabile Kompartimente dar, die sich im Verlauf des Transportprozesses nicht verändern.

Dieses Modell kann den Transport von Strukturen, die größer als Vesikel sind (Procollagen, Zellwandschuppen), nicht erklären.

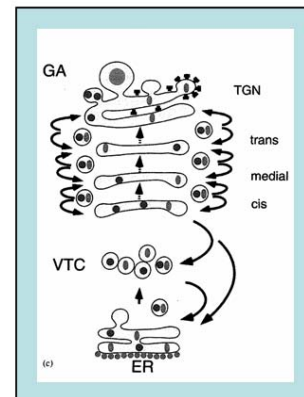
Diese und die folgenden drei Abb. entnommen aus: Elsner et al., 2003
Neu synthetisierte Proteine sind als Kreise dargestellt, Golgi-Enzyme als Ellipsen.
GA= Golgi Apparat, TGN= Trans-Golgi-Netzwerk, VTC= vesikuläre/tubuläre Cluster

B) Das Cisternen-Reifungs-Modell (Cisternal Maturation)

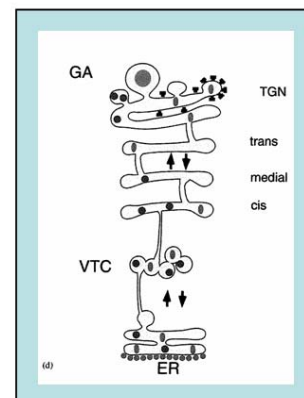
Die Cisternen selbst werden in anterograder Richtung transportiert und unterliegen einem Reifungsprozess, während dessen sich die Zusammensetzung ihrer Enzyme verändert. Vesikel übernehmen den retrograden, ausgleichenden Rücktransport der Enzyme. Am Trans-Ende gehen Cisternen in das TGN über und lösen sich unter Knospung von Transport-komplexen auf. Am Cis-Ende werden Cisternen durch Fusion intermediärer Kompartimente neu gebildet.

C) Hybridmodell zwischen A) und B)

Cisternenreifung sorgt für den Transport großer Objekte, während Vesikel einen parallelen, schnelleren Transportpfad für kleinere Proteine bilden. Vesikel übernehmen auch den retrograden Transport von Membranmaterial wie auch von Golgi-Enzymen.

D) Transport über tubuläre Verbindungen

Die Cisternen werden als stabil angenommen. Vesikel spielen innerhalb dieses Modells überhaupt keine Rolle. Transport findet sowohl anterograd wie auch retrograd über kurzlebige tubuläre Verbindungen zwischen den Cisternen statt. Eine Variante des Modells kombiniert es mit dem Cisternen-Reifungs-Modell und postuliert eine Beschränkung des tubulären Transports auf Golgi-Enzyme, während der anterograde Proteintransport über Cisternen-Reifung abläuft.



2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Puffer und Lösungen

Hersteller aller hier aufgeführten Chemikalien: *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*

| | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------|
| PFA (in PBS, pH 7.4): | | 4,0 % |
| PBS (pH 7.4): | KCl | 2,7 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| | NaCl | 137,0 mM |
| | Na ₂ HPO ₄ | 8,0 mM |
| Blocklösung: | Saponin | 0,1 % |
| | BSA | 0,5 % |
| | NH ₄ Cl | 50,0 mM |
| | NaN ₃ | 3,0 mM |
| Transfektionspuffer: (Cytomix) | KCl | 120 mM |
| | KH ₂ PO ₄ | 10 mM |
| | K ₂ HPO ₄ | 10 mM |
| | EGTA | 2 mM |
| | MgCl ₂ | 5 mM |
| | HEPES | 25 mM |
| | CaCl ₂ | 0,15 mM |

2.1.2. Chemikalien

Nocodazol (*Merck Biosciences GmbH, Schwalbach*):

Jasplakinolid (*Merck Biosciences GmbH, Schwalbach*):

Dipyridyl (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*):

2.1.3. Zellkultur

Inkubatoren:

BBD 6220 (Thermo Electron) CO₂-Inkubator mit aktiver Sterilbefeuchtung für die Langzeit-Zellkultur,

C42 (Labotect GmbH) Kleinstinkubatoren zur Probenaufbewahrung vor und während der Mikroskop-Aufnahmen sowie für spezielle Bedingungen (Protein-Transport-Block bei 40°C).

Zelllinien:

Tk-ts13: Derivat von BHK-21 Zellen (Baby Hamster Kidney; Nierenzellen von *Mesocricetus auratus*); wurden direkt übernommen vom *Institutio Mario Negri Sud, Chieti, Italien*. ATCC-Nummer: CRL-1632 (*Promochem*).

Vero: Nierenzellen der Grünen Meerkatze (*Chlorocebus aethiops*), ECACC-Nummer: 84113001 (*European Collection of Cell Cultures, ECACC*)

Cos-7: Derivat von CV-1 Zellen (Nierenzellen der Grünen Meerkatze, *Chlorocebus aethiops*); transformiert durch eine Mutante von SV40 (Simian Virus 40) mit defektem Origin. Erhöhte Transfektionseffizienz für rekombinantes VSVG (Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein).

2.1.4. Medien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

Auf einen Liter:

| | |
|-------------|-----|
| Hefeextrakt | 5g |
| NaCl | 5g |
| Pepton | 10g |
| NaOH (1M) | 5ml |

Für Platten:

| | |
|-----------|----------|
| Agar | 14g |
| Kanamycin | 50 µg/ml |

Zellkultur-Medium für BHK/Cos7/Vero

(für 500 ml)

| | | |
|-------------------------|--|--------------------------------------|
| FBS | 10 % | (Invitrogen, Carlsbad, USA) |
| DMEM(10x) ¹⁾ | 10 % | (Biochrom AG, Berlin) |
| Penicillin | 500 U | (Biochrom AG, Berlin) |
| Streptomycin | 100 µg/ml | (Biochrom AG, Berlin) |
| Glutamin | 4 mM (BHK) 2 mM (Cos/Vero) | (Biochrom AG, Berlin) |
| NaHCO ₃ | 0,15 % w/v (BHK) 0,375 % w/v (Cos/Vero) | (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) |

Mit H₂O (Milli-Q) auf 500 ml auffüllen und steril filtrieren (Filtersystem mit 0,2 mm Porengröße, VWR International GmbH, Hannover).

¹⁾ohne NaHCO₃, L-Glutamin und Na-Pyruvat, mit 4,5 g/l D-Glucose

4Pi-Einbettungsmedium

DMEM ohne Phenolrot (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 3,4% Dextran MW 39400 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) zur Einstellung des Brechungsindex.

Einfriermedium

Medium des jeweiligen Zelltyps ohne Antibiotika, mit insgesamt 20% FBS und 10% DMSO.

2.1.5. Plasmide

| <u>Konstrukt</u> | <u>Quelle</u> | <u>Funktion</u> |
|------------------|---------------|-------------------------------------|
| GalT-GFP | 1) | Golgi-Enzym |
| GalT-vYFP | 1) | Golgi-Enzym |
| 2-OST-GFP | 1) | Golgi-Enzym |
| 2-OST-vYFP | 1) | Golgi-Enzym |
| MannII-GFP | 1) | Golgi-Enzym |
| ERD2-vYFP | 1) | KDEL-Rezeptor |
| VSVG-GFP | 2) | SV40-Glycoprotein, Transportprotein |
| PC3-GFP | 2) | Prokollagen III, Transportprotein |

¹⁾ MPI für Biophysikalische Chemie, Abt. für Neurobiologie

²⁾ Consorzio Mario Negri Sud, Chieti

2.1.6. Antikörper

Primäre Antikörper

| | Verdünnung |
|---|------------|
| Anti-GFP Kaninchen IgG (<i>Abcam, Cambridge, England</i>) | 1:1000 |
| Anti-GM-130 Maus IgG (<i>BD Biosciences, Franklin Lakes, USA</i>) | 1:75 |

Sekundäre Antikörper

| | <u>Verdünnung</u> |
|--|-------------------|
| Alexa 647 Ziege anti-Maus IgG (<i>Invitrogen, Carlsbad, USA</i>) | 1:50 |
| Alexa 546 Ziege anti-Kaninchen IgG (<i>Invitrogen, Carlsbad, USA</i>) | 1:50 |
| NanoGold Ziege anti-Kaninchen (<i>Biotrend Chemikalien GmbH, Köln</i>) | 1:10 |

DNA-Markierung:

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*), ein mit DNA interkalierender blauer Farbstoff zur Färbung von Zellkernen. Konzentration: 5 µg/ml bei lebenden Zellen, 0,5 µg/ml bei fixierten. Inkubation für jeweils 30 Minuten direkt vor der Mikroskopie, danach dreifaches Auswaschen mit PBS.

2.1.7. Einbettungsmedien

Bei allen Präparationen für das MMM-4Pi Mikroskop wurde zur Einbettung lebender wie fixierter Zellen 4Pi Einbettungsmedium mit einem Brechungsindex von 1,34 verwendet (siehe Kapitel 3.4).

Proben für das Leica-4Pi, dessen hochnumerische Objektive den Einsatz von Medien mit höherem Brechungsindex als dem von Wasser bedingen, wurden in 97% TDE (2,2'-Thiodiethanol, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*) eingebettet. TDE ist

hydrophil. Abhängig vom Mischungsverhältnis mit Wasser kann daher der Brechungsindex linear zwischen dem von Wasser und dem von Öl einstellen. TDE beeinträchtigt die Fluoreszenz der meisten Fluorophore erheblich weniger als die meisten Immersionsöle.

2.1.8. Mikroskope

2.1.8.1. Phasenkontrastmikroskopie

Ein Phasenkontrastmikroskop (Leica DM6000B, *Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*) wurde zur Kontrolle des Zustandes und der Wachstumsdichte der in Kultur gehaltenen Zelllinien verwendet.

Verwendete Objektive (*Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*):

N PLAN 5x/ 0.12 (Luft)

N PLAN 10x/ 0.25 (Luft)

2.1.8.2. Epifluoreszenzmikroskopie

Zur schnellen Überprüfung der Qualität einer Antikörperfärbung oder der Erfolgsrate einer Transfektion wurde ein Epifluoreszenzmikroskop des Typs Leica DM-6000 (*Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*) eingesetzt.

Zur Anregung wurden eine Leica EL6000 Mischgaslampe (*Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*) und wechselbare Filter verwendet, detektiert wurde mit einer Kamera. Das Mikroskop wurde durch das Program LAS AF (*Leica Application Suit Advanced Fluorescence, Version 1.4.0 build 613*) gesteuert.

Verwendete Objektive (*Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*):

HCX PL APO 100x/ 1,4 (Öl)

HCX PL APO 63x/ 1.2 (Wasser)

HCX PL FLUOTAR 40x/ 0,75 (Luft)

HC PL FLUOTAR 20x/ 0,5 (Luft)

2.1.8.3. Konfokalmikroskopie

Konfokale Aufnahmen wurden mit einem inversen Fluoreszenz-Laserrastermikroskop (Leica TCS SP5, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar) und der zugehörigen Software LAS AF (Leica Application Suit Advanced Fluorescence, Version 1.4.0 build 613) durchgeführt. Es wurde ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer Numerischen Apertur (NA) von 1,2 (Leica HCX PL APO 63x/ 1.2W CORR, *Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*) verwendet.

2.1.8.4. Einphotonen-4Pi-Mikroskopie, Typ a

Der für die Typ a Einphotonen-Aufnahmen in zwei Farben verwendete 4Pi Aufbau besteht aus einem TCS SP2 Scanner (Leica Microsystems, Wetzlar) dessen Objektivrevolver durch ein im Herbst 2004 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg entwickeltes 4Pi Modul ersetzt wurde (Abb. 2.02).

Verwendete Objektive: Zweimal HCX PL APO CS 100/1.46 Oil, (*Leica Microsystems, Wetzlar*)

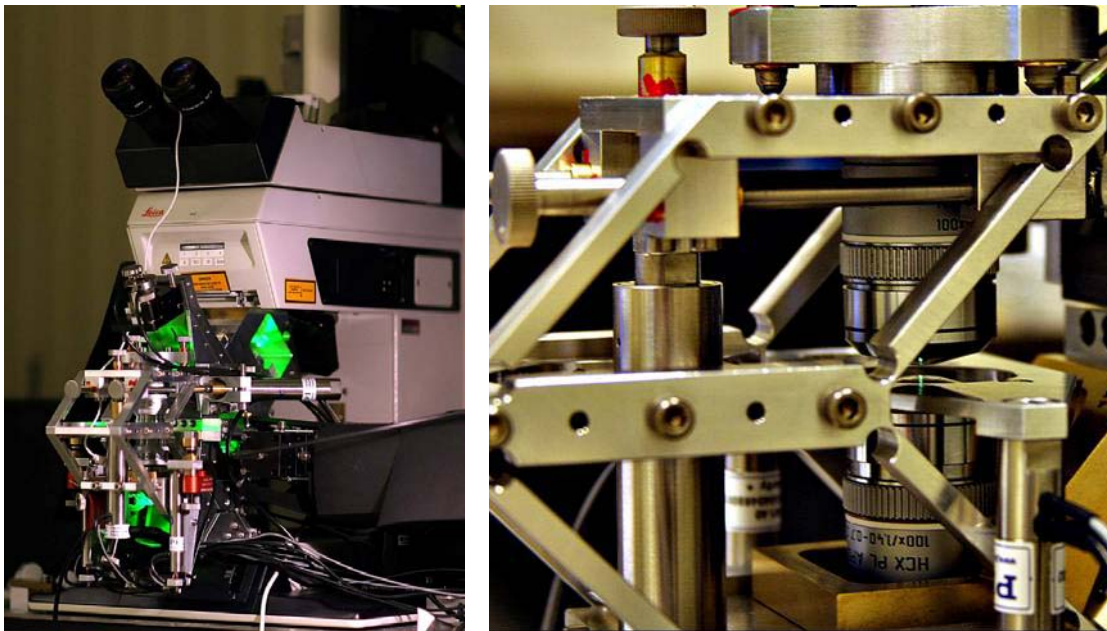


Abb. 2.02: Einphotonen-4Pi Mikroskop, Typ a. Links Ansicht des in ein Leica SP2 Konfokalmikroskop eingebauten 4Pi-Blocks, rechts Nahaufnahme des Objektivbereichs (hier noch Objektive mit 1,40 NA).

2.1.8.5. MMM 4Pi-Mikroskopie

Bei dem MMM 4Pi handelt es sich um einen experimentellen Aufbau, der nicht auf einem kommerziell erhältlichen Mikroskop basiert. Es wurde am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen entwickelt. Auf die einzelnen Komponenten wird im Methoden-Teil näher eingegangen.

2.1.8.6. Elektronenmikroskopie

Aufnahmen zur Bestätigung von Proteinlokalisationen wurden mit einem Phillips CM12 (FEI/Philips Electron Optics, Eindhoven, Niederlande) vorgenommen. Für die korrelative Licht-/Elektronenmikroskopie wurde ein Philips Tecnai-12 Elektronenmikroskop (FEI/Philips Electron Optics, Eindhoven, Niederlande) verwendet. Die Beschleunigungsspannung betrug 120 kV.

2.2. Methoden

2.2.1. Plasmid-Isolierung

Elektrokompetente *E. Coli* Bakterien (Stamm: DH5 α) wurden per Elektroporation (GenePulser I, BioRad) transformiert, danach sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Jeweils 20-100 μ l der Bakterien-Suspension wurden auf Agarplatten mit LB-Kan-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Eine einzelne Kolonie wurde angeimpft, in 100-200 ml LB-Kan-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde schließlich für 15 Minuten bei 6000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde zur Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels des Endo-Free-Plasmid Kits (*Qiagen GmbH, Hilden*) verwendet.

Bestimmung der Reinheit und Konzentration der Plasmid-DNA

Die gewonnene DNA wurde photometrisch auf ihre Reinheit überprüft und ihre Konzentration bestimmt. Dabei entspricht eine OD von 1 bei 260 nm in etwa 50 mg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Aufschluß über die Reinheit der Probe. Ein Verhältnis von 1.8 zeigt eine reine Präparation an, niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin.

Es wurde ein Photometer des Typs BioPhotometer (Eppendorf) verwendet.

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Verwendete Zelllinien

Vero-Zellen wurden für Distanzanalysen verschiedener Golgi-Enzyme eingesetzt (siehe Ergebnisse). Für strukturelle Aussagen wurden BHK-Zellen verwendet (4Pi-CLEM, Kapitel 2.2.5.2), deren Golgi-Apparat häufig regelmäßiger strukturiert ist, als der von Vero-Zellen (persönliche Beobachtung). Cos7-Zellen exprimieren stärker als die beiden anderen Zelltypen und wurden daher für die Untersuchung von Transportprozessen verwendet. Das infolge höherer Expressionsrate stärkere Signal erlaubt bei konstantem Bleichen mehr aufeinanderfolgende Aufnahmen.

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ (Cos7, BHK) bzw. 10% CO₂ (Vero) kultiviert. Alle drei Zelllinien wurden bei Erreichen von etwa 90% Konfluenz umgesetzt und in einem Verhältnis von eins zu zwei bis eins zu zehn vereinzelt. Die Zellen wurden bis zur zwanzigsten Passage für Transfektionen verwendet.

2.2.2.2. Einfrieren von Zellen

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden Cos-7 und Vero-Zellen zur längerfristigen Aufbewahrung eingefroren. Es wurde das Medium der jeweiligen Zelllinie mit 10% DMSO und 20% FBS (beides *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*) ohne Antibiotika verwendet. Hierfür wurden die frischen, gekauften Zellen in zwei Passagen stark vermehrt. Bei Erreichen von etwa 80-90% Konfluenz wurden die Zellen wie bei einer normalen Passage mit Trypsin abgelöst und in Medium aufgenommen. Die

Zellsuspensionen wurden zu Aliquots von ein bis zwei Millionen Zellen aufgeteilt (Abschätzung mit einer Zählkammer des Typs Neubauer Improved bright-lined, VWR International GmbH, Hannover). Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm und Absaugen des Mediums wurde jedes Pellet in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert und in zum Einfrieren geeignete Röhrchen gefüllt (Nunc Cryotube Vials, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden). Unter Nutzung eines mit Isopropanol gefüllten Gefäßes (Nalgene Cryo 1°C Freezing container, Nalge Nunc, Rochester, N.Y., USA) wurden die Zellen mit einer konstanten Rate von minus 1°C/Minute im -70°C-Schrank eingefroren. Bei Erreichen von -70°C wurden die Röhrchen in die Gasphase eines Behälters mit flüssigem Stickstoff, und am Folgetag in die flüssige Phase überführt.

2.2.2.3. Transfektion

Für einfache Transfektionen wurden 2-3 x 10⁶ Zellen abzentrifugiert und in 100 µl Cytomix mit 5 mM GSH und 2 mM ATP (beides Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) sowie 10 µg Plasmid-DNA in einer Elektroporationsküvette resuspendiert. Die Elektroporation wurde mittels eines Square-wave-Protokolls bei einer Spannung von 100 V und einer Pulsdauer von 13 ms mit einem Gene-Pulser X-Cell (BioRad, Hercules, USA) vorgenommen. Die transfizierten Zellen wurden daraufhin in 10 ml Medium aufgenommen und in einer Dichte von etwa 20.000 Zellen / cm² auf sterilen Deckgläsern in 6-well Platten mit je 2 ml Medium ausgesät.

Bei Kotransfektionen mit zwei verschiedenen Konstrukten wurden beide Plasmide gemeinsam im Cytomix gelöst. Das Mengenverhältnis wurde für jede Kontransfektion optimiert:

| | | | | | |
|------------|---|-------------|--------|---|--------|
| GalT-vYFP | + | 2-OST-GFP: | 6 µg | + | 3 µg |
| GalT-vYFP | + | MannII-GFP: | 3 µg | + | 15 µg |
| GalT-GFP | + | ERD2-vYFP: | 1 µg | + | 3 µg |
| GalT-vYFP | + | VSVG-GFP: | 1 µg | + | 17 µg |
| 2-OST-vYFP | + | MannII-GFP: | 1 µg | + | 20 µg |
| 2-OST | + | ERD2: | 0,5 µg | + | 1,2 µg |
| MannII-GFP | + | ERD2-vYFP: | 8 µg | + | 2 µg |

Die optimale Dauer zwischen Transfektion und Beobachtung hängt stark vom verwendeten Konstrukt ab. Für GalT- und MannII-Konstrukte stellte sich eine Inkubation von 12-24 Stunden als optimal heraus, während 2-OST erst nach 48 Stunden optimal exprimiert wurde und ERD2 schon nach 8 Stunden überexprimiert war (Ausfüllung des ER). Um Überexpression zu vermeiden, wurde bei Kotransfektionen mit unterschiedlichen optimalen Inkubationszeiten die jeweils kürzere Zeit gewählt.

Bei Transfektionen mit VSVG-GFP wurden die Zellen über Nacht bis unmittelbar vor der Aufnahme bei 40°C inkubiert. Bei dieser Temperatur liegt VSVG denaturiert vor und wird daher im ER zurückgehalten. Unterhalb von 39,5°C wird das Protein renaturiert und durch den Golgi transportiert.

2.2.2.4. Inkubation mit Nocodazol, Jasplakinolid und Dipyrindyl

Nocodazol

Für alle Aufnahmen mit dem MMM-4Pi-Mikroskop wurden die Zellen zuvor mit 33 µM Nocodazol in DMEM bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit betrug bei den korrelativen Aufnahmen und den Distanzanalysen mindestens drei Stunden und bei der Untersuchung des VSVG-Transportes 90 Minuten. Nocodazol depolymerisiert Mikrotubuli und führt so zum Abbau des nativen Golgi-Apparats. Inkubation mit 33 µM Nocodazol führt nach 1-2 Stunden zur Bildung kleiner (etwa 1 µm Durchmesser) voll funktionaler Membranstapel (sog. Ministacks) in unmittelbarer Nähe des ERs, deren Aufbau dem des nativen Golgis gleicht ([66]). Ministacks können wegen ihrer einfachen, weitgehend planaren großräumlichen Struktur als Modellobjekte zur Untersuchung von Proteinverteilungen im Golgi oder von Transportprozessen verwendet werden.

Jasplakinolid

Bei den korrelativen Aufnahmen und den 4Pi-Aufnahmen des VSVG-Transportes wurde für 30 Minuten bei 37°C mit 400 nM Jasplakinolid inkubiert. Jasplakinolid polymerisiert und stabilisiert F-Actin ([67]), was zu einer Abflachung der behandelten Zellen und zur Immobilisierung von Golgi-Ministacks führt. Dies führt zur Anordnung der meisten Ministacks in der X/Y-Ebene nahe am Deckglas, was das abzubildende Volumen verringert und so die Aufnahmezeiten verkürzt.

Dipyridyl

Zur Anreicherung von PC3-GFP im Golgi-Apparat für korrelative Aufnahmen wurden die Zellen für 60 Minuten bei 40°C mit 300 µM Dipyridyl inkubiert. Dipyridyl inhibiert Prolyl-Hydroxylase ([68], [69]) und damit die Hydroxylierung von Prolinen. Dies verhindert die Faltung von Prokollagen III reversibel und hält das Protein im ER zurück. Nach 60 Minuten wurde Dipyridyl ausgewaschen, für weitere 30 Minuten bei 37°C mit 50 µg/ml Ascorbinsäure inkubiert und anschließend mit 4% PFA + 0,05% Glutaraldehyd fixiert. Das Lösen des Hydroxylierungsblocks führt zum Export eines PC3-GFP-Pulses, der nach einer halben Stunde den Mid-Golgi-Apparat erreicht.

2.2.3. Immunmarkierung

Immunfärbungen wurden in dieser Arbeit nur zu Kontrollzwecken eingesetzt. Für zur Korrelation mit dem TEM angefertigte MMM-4Pi-Aufnahmen wurden Zellen mit GalT-GFP transfiziert und fixiert. Nach der Aufnahme wurde ein primärer Antikörper gegen GFP eingesetzt. Die Probe wurde mit dem „Goldenhance“-System entwickelt. Dabei wird ein mit 1,4 nm Goldpartikeln konjugierter sekundärer Antikörper verwendet, an dem unter Verwendung eines Kits (GoldEnhance EM (GEEM), *Biotrend Chemikalien GmbH, Köln*) Gold ausfällt. Die Dauer der Behandlung (hier acht Minuten) bestimmt die Größe der Goldkugeln.

Für die elektronenmikroskopische Überprüfung der Befunde der Distanzanalysen wurde ebenso verfahren, nur dass anstelle des sekundären Antikörpers und des „Goldenhance“-Systems mit Goldpartikeln (10 nm) gekoppeltes Protein A verwendet wurde.

Aufnahmen mit dem Einphotonen-4Pi-Mikroskop wurden - nach Transfektion mit 2-OST-GFP - wegen der Notwendigkeit der Ölimmersion fixiert und aufgrund der TDE-Einbettung immungefärbt (anti-GFP + Alexa 546, anti-GM130 + Alexa 647), da TDE im Gemisch von 97% mit 3% Wasser die Fluoreszenz von GFP und VYFP löscht.

Protokoll:

Vero-Zellen wurden so auf Deckgläschen ausgesät, dass sie am Tag der Fixierung eine Konfluenz von 70-90% erreichten.

| | |
|--|--------|
| Fixierung (4% PFA) | 20 min |
| Waschen mit PBS (4x) | 5 min |
| Saponin in Blocklösung | 20 min |
| Primärer Antikörper (Raumtemperatur) | 60 min |
| Waschen mit Saponin in Blocklösung (2x) | 5 min |
| Waschen mit PBS (4x) | 5 min |
| Sekundärer Antikörper (Raumtemperatur) | 60 min |
| Waschen mit Saponin in Blocklösung (2x) | 5 min |
| Waschen mit PBS (4x) | 5 min |
| Nachfixierung (4% PFA + 0,05% Glutaraldehyd) | 15 min |

2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie

2.2.4.1. CLSM

Die Konfokale Laserrastermikroskopie ermöglicht eine optische Sektionierung dreidimensionaler Strukturen in axialer Richtung, während die laterale Auflösung (X, Y) sich nicht von der eines Epifluoreszenzmikroskops unterscheidet.

Maximal erreichbare Auflösung: ~200 nm (X,Y), ~500-700 nm (Z)

Prinzip des CLSM:

Eine Punktlichtquelle wird durch ein Objektiv in die Probe abgebildet. Die Intensitätsverteilung in der Probe entspricht daher dem Beugungsbild der Lichtquelle, der Beleuchtungs-PSF. Das Fluoreszenzsignal wird durch das selbe Objektiv gesammelt und mittels eines dichroitischen Spiegels auf eine Lochblende abgebildet. Unmittelbar vor dem Detektor (hier Photomultiplier) stellt diese sicher, dass nur Licht aus der Fokalebene detektiert wird. Der Radius der Lochblende beeinflusst die Auflösung

und das Detektionssignal. Bei größerem Radius wird bei entsprechend niedrigerer Auflösung ein größeres Volumen (und damit ein stärkeres Signal) detektiert und umgekehrt. Für die im Zuge dieser Arbeit gemachten Aufnahmen wurde als Lochblendengröße eine Airy-Einheit gewählt. Als Airy-Scheibe bezeichnet man den durch die ersten Minima begrenzten Bereich der PSF.

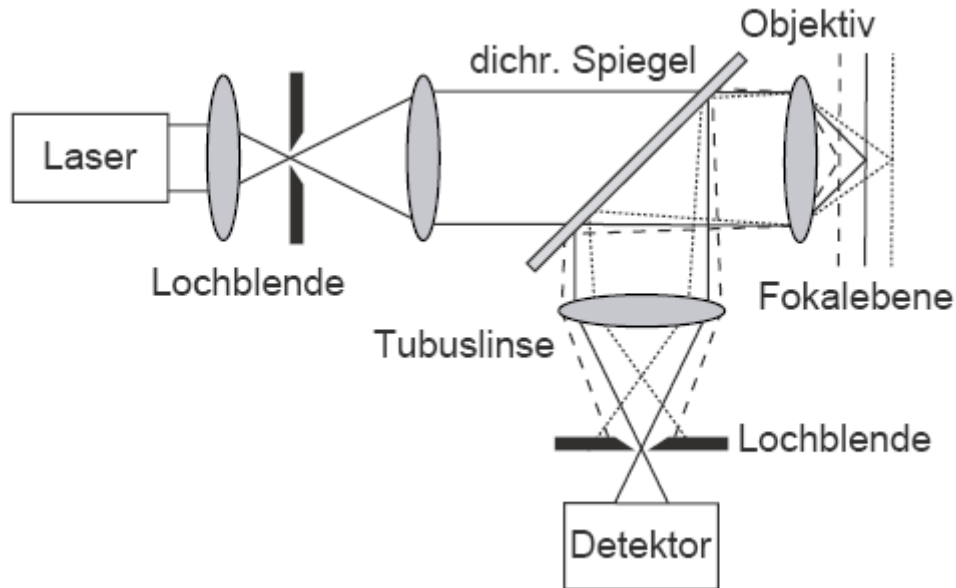


Abb. 2.03: Strahlengang eines Konfokalmikroskops. Signalbeiträge von außerhalb der Fokalebene werden durch die Lochblende vor dem Detektor ausgefiltert.

2.2.4.2. 4Pi-Mikroskopie

Das 4Pi-Mikroskop erreicht eine gegenüber Konfokalmikroskopen deutlich erhöhte axiale Auflösung. Seine PSF, deren Einhüllende der konfokalen PSF entspricht, weist ein zentrales Hauptmaximum auf, welches axial von Nebenmaxima flankiert wird (siehe Abb. 2.04). Diese treten in der Aufnahme eines Objektes als Geisterbilder in Z-Richtung in Erscheinung, die aber durch Entfaltung des Bildes (= Faltung mit der inversen PSF) weitgehend entfernt werden können.

Maximal erreichbare Auflösung: ~ 200 nm (X,Y), ~ 100 nm (Z)

Verwendete Pixelgröße (X,Y): 153 nm, verwendetes Raster in Z: 80 nm

Aufnahmegeschwindigkeit: eine Sekunde pro X/Y-Ebene, zuzüglich eine Sekunde Auslesezeit der Kamera

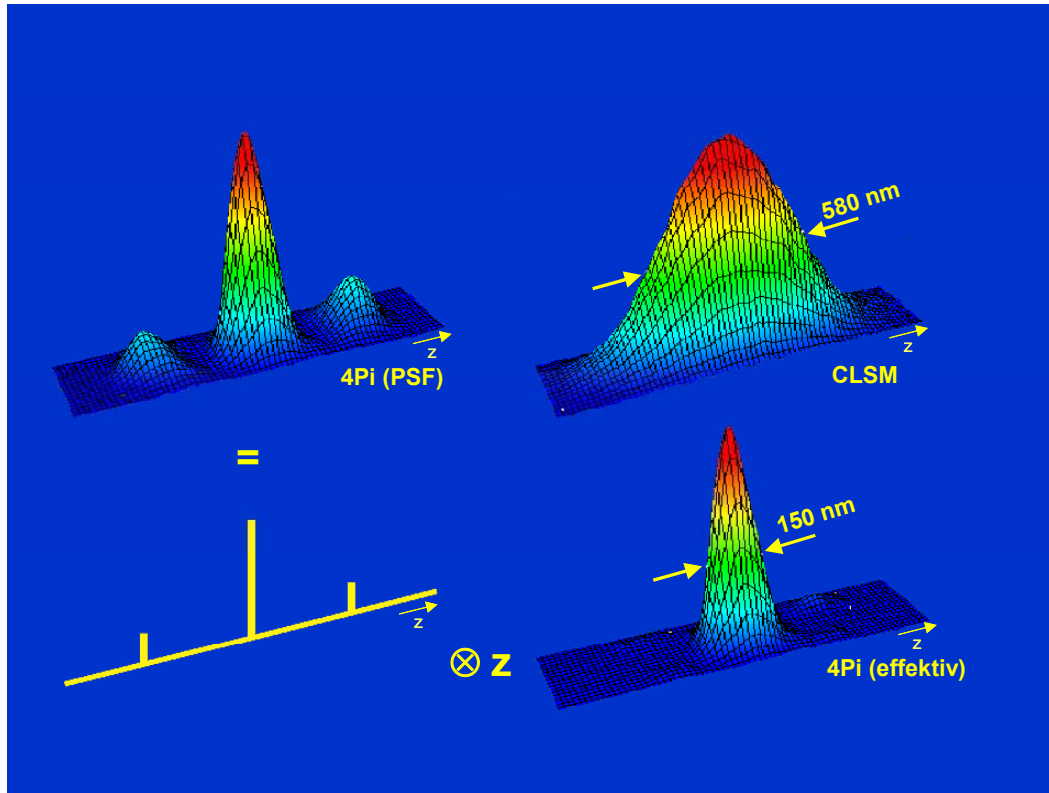


Abb. 2.04: PSF des 4Pi-Mikroskops (oben links) im Vergleich zu der des CLSM (oben rechts). Die konfokale PSF ist die Einhüllende der 4Pi-PSF. Die effektive 4Pi-PSF entspricht dem zentralen Maximum der 4Pi-PSF und ist etwa vier mal schmaler als die PSF des CLSM. Sie geht aus der 4Pi-PSF durch Faltung mit einer inversen Kammfunktion hervor.

2.2.4.2.1. Prinzip der 4Pi-Mikroskopie

Zur Bestimmung der erreichbaren axialen Auflösung gilt für die klassische Fluoreszenzmikroskopie der Satz von Abbe:

$$d = \frac{2\lambda n}{(NA)^2}$$

(d = Auflösung, λ = Wellenlänge, n = Brechungsindex des Immersionsmediums, NA = Numerische Apertur des Objektivs)

Sowohl der Brechungsindex des Einbettungsmediums als auch der Öffnungswinkel des Objektivs können dabei nicht beliebig gesteigert werden: Zur Beobachtung lebender

Zellen muss zwangsläufig ein wässriges Einbettungsmedium verwendet werden ($n(\text{H}_2\text{O}) = 1,334$), und damit auch ein wässriges Immersionsmedium, da bei zu stark abweichenden Brechungsindizes sphärische Aberrationen die Folge sind. Der derzeit erreichbare Öffnungswinkel liegt für Öbobjektive bei 74° , für Wasserimmersionsobjektive bei etwa 64° ($\text{NA} = 1,2$) und lässt sich aus konstruktionstechnischen Gründen kaum noch steigern.

Um die axiale Auflösung zu erhöhen verwendet das 4Pi-Mikroskop daher zwei Objektive (HCX PL APO 63x/ 1,2W CORR CS, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar), die bei kohärenter Beleuchtung und/oder Detektion als ein einzelnes Objektiv mit doppeltem Öffnungswinkel verstanden werden können, was zu einer entsprechend höheren Auflösung führt. Die Probe wird durch die beiden gegenübergestellten, auf den selben Punkt fokussierenden Objektive beleuchtet. Die Interferenz der beiden Wellenfronten erzeugt die typische PSF des 4Pi mit ihrem im Vergleich zum Konfokalmikroskop etwa vier mal engeren Hauptmaximum und den beidseitigen axialen Nebenmaxima.

Die maximal erreichbare Auflösung des 4Pi-Mikroskops ist ebenso wie die der klassischen Fluoreszenzmikroskope beugungsbegrenzt.

Man unterscheidet drei Typen von 4Pi-Mikroskopen: Typ s lässt nur die Wellenfronten der Anregung interferieren, Typ b nur die der Detektion, und Typ c beide. In dieser Reihenfolge nimmt die Auflösung zu, die Typen b und c sind aber technisch anspruchsvoller und (besonders Typ c) aufwändiger zu justieren. Mit einem 4Pi-Mikroskop des Typs a lassen sich daher in einem gegebenen Zeitraum mehr verwendbare Aufnahmen machen als mit einem Mikroskop der anderen Typen. Da dies für die statistische Auswertung von Proteinlokalisationen von großer Bedeutung war, wurde für alle Aufnahmen von lebenden Zellen ein MMM-4Pi-Mikroskop des Typs a eingesetzt.

2.2.4.2.2. Das Multifokale Multiphotonen 4Pi-Mikroskop (MMM-4Pi)

Die im MMM-4Pi eingesetzte Multiphotonen-Mikroskopie macht sich die quadratische Intensitätsabhängigkeit der Zweiphotonen-Anregung zunutze um das Anregungsvolumen räumlich zu begrenzen. Auf die Lochblende der konfokalen Mikroskope kann daher im Prinzip verzichtet werden. Für die vorliegende Arbeit wurde zur Anregung ein durchstimmbarer, gepulster Titan-Saphir-Laser (MaiTai, *Newport Spectra Physics, Mountain View, USA*) mit einer Pulslänge von 200 fs bei einer Wellenlänge von 890 nm verwendet.

Um eine höhere Aufnahmegeschwindigkeit als etwa die des kommerziell erhältlichen Leica TCS 4Pi zu erreichen, wurde statt einfacher Punktrasterung ein Gitter aus 20 Mikrolinsen ($\varnothing_{MI} = 400 \mu\text{m}$, Brennweite $f = 10,7 \text{ mm}$, Abstand (in der Probe) = $4 \mu\text{m}$) zur Erzeugung ebensovieler Punktfokusse eingesetzt. Das Rastern erfolgte mit einem Galvanometer-Scanner (M2S, GSI, Lumonics Inc., Kanata, ON, Canada) in X-Richtung, durch lineare Verschiebung des Mikrolinsengitters und des nachgeschalteten Lochblendengitters mittels eines motorisierten Linearmesstisches (*Limes 90, Owis GmbH, Staufen*) in Y-Richtung, sowie durch die Verschiebung der Probe durch ein Piezoelement (*P-780.20 Scanning Stage, Physik Instrumente und GmbH & Co, Waldbronn*) in Z-Richtung.

Das Lochblendengitter, welches sowohl vom Anregungs- als auch vom Fluoreszenzlicht passiert wird, ist trotz Zweiphotonenanregung aus zweierlei Gründen notwendig: Zum einen beseitigen die Lochblenden bei der Anregung Aberrationen der Mikrolinsen, zum anderen unterdrückt die Konfokalisierung die Nebenmaxima. Außerdem führt die Superposition der von den Mikrolinsen ausgehenden Wellenfronten zu lokalen Anregungsmaxima außerhalb der Fokalebene (Talbot-Effekt), deren Beiträge zum Signal aber aufgrund der Konfokalisierung nicht detektiert werden.

Das Lochblendengitter ist so ausgerichtet, dass seine Einheitsvektoren parallel zu den beiden Rasterachsen (X und Y) liegen. Das Mikrolinsengitter wurde zu Beginn jedes Aufnahmetages auf die Lochblenden ausgerichtet (siehe „Justage“).

2.2.4.2.3. Die 4Pi-Einheit

Abbildung 2.05 zeigt den Aufbau der 4Pi-Einheit des Mikroskops. Die Laserstrahlen werden durch die Tubuslinse (TL_1) kollimiert und durch den Strahlteilerwürfel in zwei Strahlen gleicher Intensität aufgeteilt. Wie bei einem Interferometer können (hier durch das Verschieben des Strahlteilers mittels des $\Delta\phi$ -Piezos (Feineinstellung) oder grob durch eine Mikrometerschraube) die optischen Weglängen der beiden Teilstrahlen gegeneinander abgeglichen werden. Dieser Abgleich ist wichtig, um sicherzustellen, dass die Femtosekundenpulse der beiden Teilstrahlen des Lasers im Fokus aufeinandertreffen. Während des Scanvorgangs, bei dem die Probe in Z-Richtung bewegt wird, bleiben zwar die geometrischen Weglängen der beiden Teilstrahlen konstant, aufgrund der Unterschiede der Brechungsindizes von Immersionsmedium, Glas und Einbettungsmedium ändern sich aber die optischen Weglängen mit jeder Verschiebung in Z. Die daraus resultierende Veränderung ihrer Phasenbeziehung wird durch eine automatische Verschiebung des Strahlteilerwürfels mittels des $\Delta\phi$ -Piezos kompensiert (Phasenkompensation). Dabei wird für jeden Schritt, um den die Probe weiterbewegt wird, synchron auch der Strahlteiler um eine Distanz bewegt, die vom Brechungsindex des Einbettungsmediums abhängt.

Das Fluoreszenzlicht der Probe wird mit dem rechten Objektiv (siehe Abb. 2.05) gesammelt, durch einen dichroitischen Spiegel (DS_1) mit einer Kante bei 675 nm vom Anregungslicht getrennt und durchläuft eine zweite Tubuslinse (TL_2), die zur Korrektur des Farblängsfehlers dient und die Detektionsfokusse mit den Beleuchtungsfokussen axial zur Deckung bringt. Über einen weiteren dichroitischen Spiegel (DS_2) wird das Fluoreszenzlicht zurück auf die Lochblenden gelenkt und danach durch einen dritten dichroitischen Spiegel wieder vom Anregungslicht getrennt. Indem das Signal über die Rückseite des (beidseitig reflektierenden) Galvanometerspiegels auf die gekühlte CCD-Kamera (*MicroMax 512EBFT, Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA*) gelenkt wird, verlaufen die Rasterung der Anregung und die der Detektion exakt deckungsgleich.

Das Licht des Anregungslasers wird außerdem nach Passieren der Probe und einer dritten Tubuslinse (TL_3) auf eine andere CCD-Kamera abgebildet, die der Kontrolle der Justage dient (siehe Abb. 2.05, im Folgenden als Justagekamera bezeichnet).

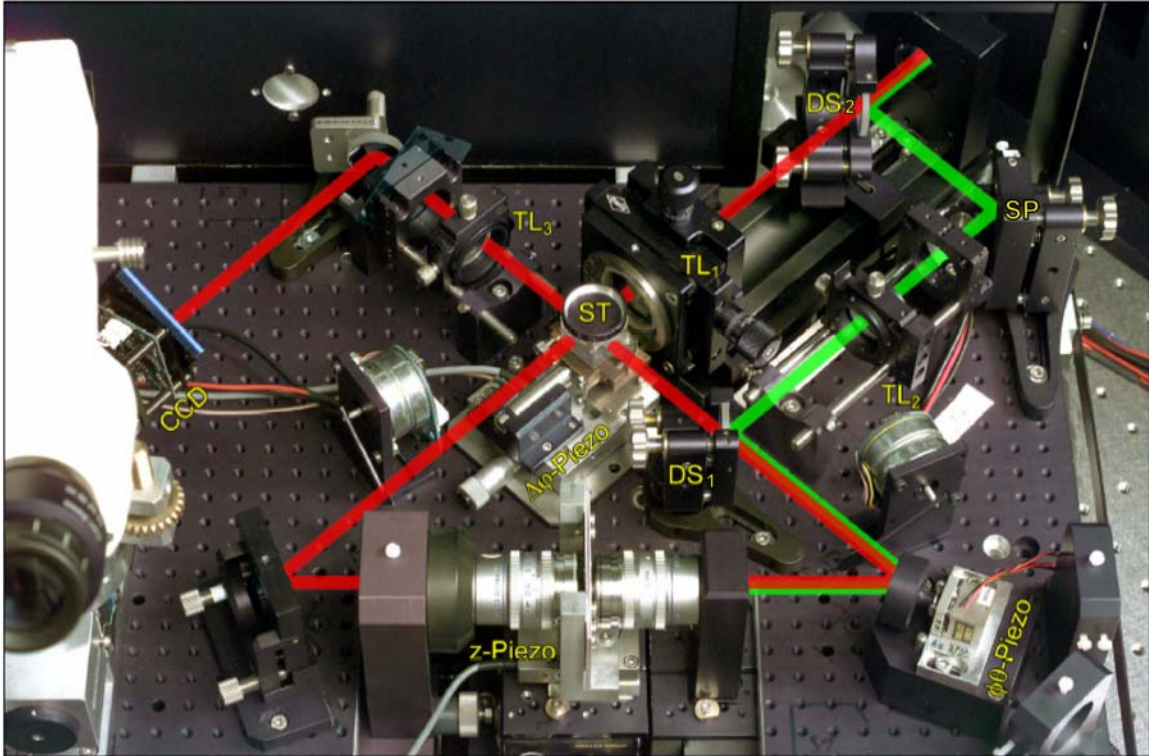


Abb. 2.05: Aufsicht auf das 4Pi-Element des MMM-4Pi Mikroskops. Das Anregungslicht (rot) wird nach Aufweitung durch eine Tubuslinse (TL_1) im Strahlteilerwürfel (ST) in zwei Strahlen gleicher Intensität aufgeteilt und auf die Rückapertur der Objektive abgebildet. Das Fluoreszenzlicht (grün) wird durch einen dichroitischen Spiegel (DS_1) vom Anregungslicht getrennt, durchläuft eine weitere Tubuslinse (TL_2) zur Korrektur des chromatischen Längsfehlers und wird danach zurück auf die Lochblenden abgebildet (hier nicht zu sehen). Das Anregungslicht wird zu Justagezwecken auf eine CCD-Kamera abgebildet.

2.2.4.2.4. Probenpräparation für die 4Pi-Mikroskopie

Für die 4Pi-Mikroskopie können aufgrund des geringen Arbeitsabstandes der Objektive keine herkömmlichen Glas-Objektträger verwendet werden. Daher wird die Probe zwischen zwei Deckgläsern eingebettet, deren Dicke zuvor auf $\pm 2\mu\text{m}$ genau ausgemessen wurde. Dies ist nötig, um die Aberrationen, die aufgrund des mehrfachen Übergangs von Wasser ($n = 1,334$) zu Glas ($n = 1.518$) und zurück auftreten, durch Korrekturringe an den Objektiven kompensieren zu können, ohne ständig nachjustieren zu müssen.

Als Probenhalter wird ein Metallträger mit zentralem Beobachtungsfenster verwendet (siehe Abb. 2.06). Auf dieses wird zunächst ein halbseitig mit Aluminium bedampftes (somit verspiegeltes) Deckglas mit der bedampften Seite nach oben aufgelegt. Der Spiegel dient zur Justage des Aufbaus (siehe unten). Nach Zugabe von 20 μ l Einbettungsmedium wird das mit Zellen bewachsene Deckglas mit der bewachsenen Seite nach unten aufgelegt und ringsum mit schnell trocknendem Silikonkleber (Twinsil additionsvernetztes Dubliersilikon, Picodent, Wipperfürth) abgedichtet und fixiert. Der ursprünglich aus der Zahnmedizin stammende Silikonkleber hat den Vorteil, dass er ungiftig ist (insbesondere in Bezug auf die lebenden Zellen zwischen den Deckgläsern), innerhalb von etwa fünf Minuten trocknet und relativ leicht wieder zu entfernen ist. Der fertige Probenhalter wird senkrecht zwischen den Objektiven angeschraubt (siehe Abb. 2.05)

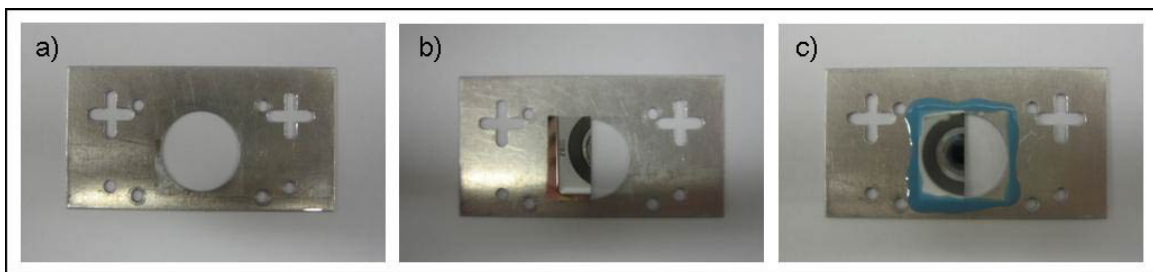


Abb. 2.06: Probenpräparation fürs 4Pi: Auf einen metallenen Probenhalter (a) wird ein halbseitig verspiegeltes Deckglas gelegt (b), auf dieses das mit Zellen bewachsene Deckglas. Beides wird mit schnell trocknendem Silikonkleber versiegelt (c).

2.2.4.2.5. Skalierung und Justage des Aufbaus

Skalierung

Die Skalierung der Bildachsen des MMM-4Pi-Mikroskops wurde anhand der Reflektion an extrem feinmaschigen TEM-Kupfernetzen (2000-mesh, Plano, Wetzlar) überprüft (Abb. 2.07).

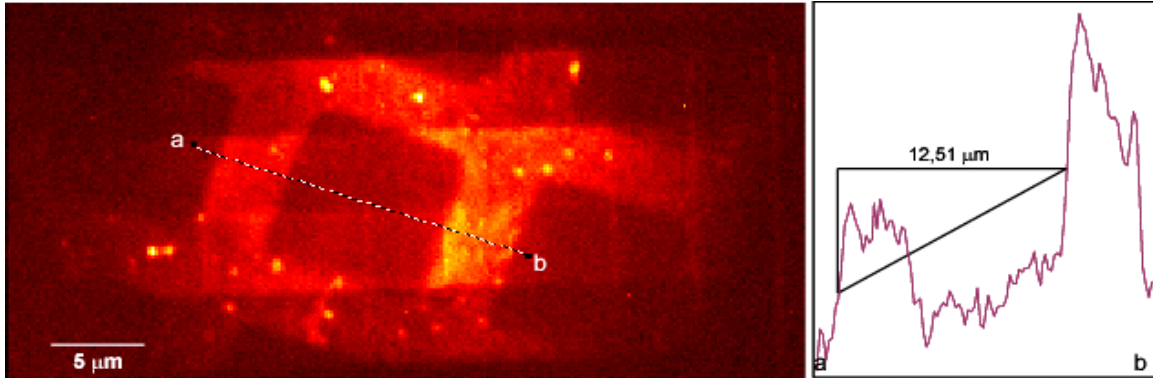


Abb. 2.07: MMM-4Pi-Aufnahme der Reflektion an einem EM-Kupfernetz. Das 2000-mesh-Netz weist eine Periodizität von 12,5 μm auf und dient als Referenz zur Skalierung des Mikroskops.

Justage

Um bei den Aufnahmen optimale Resultate zu erzielen wurde der Aufbau zu Beginn jedes Aufnahmetags neu justiert. In der Regel wurde zu diesem Zweck eine Farbstofflösung (20 μl des Farbstoffes Oregon Green mit 50 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Die Farbstofflösung liefert ein absolut homogenes Signal.

Schritt eins: Ausrichtung des Mikrolinsengitters.

Am Mikrolinsengitter wird der Laserstrahl in parallele Teilstrahlen aufgespalten. Um mit diesen die Lochblenden optimal zu treffen kann das Gitter in X- und Y-Richtung verschoben sowie innerhalb seiner Ebene gedreht werden.

Schritt zwei: Ausrichtung des Fluoreszenzlichtes auf die Lochblenden.

Das Fluoreszenzlicht muss zentrisch auf die Lochblenden treffen. Hierfür wird ein in zwei Achsen verkipperbarer Spiegel verwendet (SP in Abb. 2.05). Die Fluoreszenz eines Oregon-Green Sees dient dabei als Signal, welches durch die Justage des Spiegels maximiert wird.

Schritt drei: Weglängenabgleich

Um eine maximale Modulation der PSF zu gewährleisten, müssen die optischen Weglängen der beiden Teilstrahlen zwischen Strahlteiler und Fokalebene abgeglichen werden. Um dies zu gewährleisten, wird zunächst die Probe durch eine Stellschraube so

verschoben, dass der halbseitig aufgedampfte Spiegel (siehe „Probenpräparation“) in den Strahlengang tritt. Durch Blenden zwischen dem Strahlteiler und den Objektiven kann jeweils der linke oder der rechte Arm der Beleuchtung blockiert werden, so dass man den Probenstisch mittels einer Stellschraube in Z-Richtung verschieben und in den Fokus des linken, unbeweglichen Objektivs bringen kann, bis (bei blockiertem rechtem Beleuchtungsarm) die Mikrolinsen auf der Justagekamera scharf abgebildet werden. Das rechte Objektiv wird (bei blockiertem linkem Arm) auf den Spiegel scharf gestellt. Entfernt man beide Blenden wieder, ist auf dem Schirm der Justagekamera innerhalb der senkrecht verlaufenden Linien (die den in X-Richtung rasternden Punktfokussen entsprechen) ein Interferenzmuster erkennbar, da sich die beidseitig am Spiegel reflektierten Einzelstrahlen im Strahlteiler wieder treffen und zusammen auf die Justagekamera abgebildet werden. Die Modulation dieser Interferenz ist genau dann maximal, wenn die optischen Weglängen zwischen Strahlteiler und Fokalebene für beide Teilstrahlen gleich sind. Um dies zu erreichen, kann der Strahlteilerwürfel mittels einer Stellschraube verschoben werden, um einen der beiden Wege zu verlängern oder zu verkürzen.

Schritt vier: Abgleichen der Fokusse.

Die Fokusse beider Objektive müssen zur Deckung gebracht werden. Zu diesem Zweck wird zunächst wieder die unverspiegelte Seite des Deckglases in den Strahlengang gebracht. Dann wird das rechte Objektiv mittels dreier Mikrometerschrauben in X-, Y- und Z-Richtung verschoben. Zur Feinjustage dient eine piezoelektrische XYZ-Verstelleinheit (*NanoBlock, Melles Griot, Irvine, Ca, USA*). Bei optimaler Justage in Z-Richtung sind bei ausgeschaltetem Galvanometer-Scanner die Fokusse der Mikrolinsen als scharfe Punkte auf der Justagekamera erkennbar. Ist der Scanner eingeschaltet, wird das Mikrolinsengitter in Form paralleler Streifen abgebildet.

Die Punkt- bzw. Streifenmuster der beiden Objektive können nun durch Verschiebung des rechten Objektivs in X- und Y-Richtung zur Deckung gebracht werden. Da die Justagekamera am destruktiven Interferometerarm des Aufbaus detektiert, resultiert dies in einer Auslöschung des Signals.

Schritt fünf: Einstellung der Phasenebene.

Um in jedem Punkt des Bildfeldes konstruktive Interferenz zu erzielen, muss sichergestellt sein, dass die beiden Objektive in einer über die X/Y-Ebene invarianten

Phasenbeziehung stehen. Anders ausgedrückt: Die Ebene gleicher Phase muss zur Fokalebene parallel sein.

Es wird wieder die verspiegelte Seite des Deckglases in den Strahlengang gebracht. Auf dem Kontrollschirm erscheint das Interferenzmuster, dessen Modulation in Schritt drei optimiert wurde. Diese Interferenz stellt einen Ausschnitt eines Musters konzentrischer Ringe dar. Mittels eines in zwei Achsen verkippbaren Spiegels vor dem linken Objektiv kann die Phasenebene plangestellt werden, was sich auf dem Schirm dadurch äußert, dass das Zentrum der konzentrischen Interferenzringe erreicht wird.

Für die weitere Justage wird der verspiegelte Bereich des Deckglases wieder aus dem Strahlengang geschoben.

Nach der Justage wird das Präparat mit dem Oregon Green-See ausgebaut und durch den Objektträger mit der eigentlichen Probe ersetzt. Da das rechte Objektiv zu diesem Zweck weit aus dem Fokus herausgeschoben werden muss, ist es nötig, die Schritte vier und fünf bei jeder neuen Probe zu wiederholen, während die Ausrichtung von Anregung und Detektion auf die Lochblenden sowie der Weglängenabgleich (Schritte eins bis drei) über einen Messtag hinweg stabil bleibt.

2.2.4.2.6. Entfaltung

Bei Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven und der zur Verkürzung der Aufnahmezeiten unerlässlichen Multifokalmikroskopie liegen die Nebenmaxima der 4Pi-PSF typischerweise bei 40-50% des Hauptmaximums, was zu störenden Schatten oder „Geisterbildern“ beidseitig in Z-Richtung führt. Diese können aber durch eine Entfaltung weitgehend entfernt werden, wobei es mehrere unterschiedliche Verfahren gibt. Als Faustregel gilt, dass die Höhe der Nebenmaxima für eine gute Entfaltung nicht mehr als 50% des Hauptmaximums betragen darf, da diese sonst nicht vollständig entfernt werden können. Zudem muss die PSF über den gesamten Aufnahmebereich hinweg invariant bleiben. Da die PSF zur Entfaltung bekannt sein muss, an Objekten zu großer axialer Ausdehnung aber nicht zu bestimmen ist, verwendet man entweder fluoreszierende Polystyrolkugeln (Beads) von 100-200 nm Durchmesser in der Probe, oder lässt die Zellen auf Deckgläsern aufwachsen, die zuvor mit einer

monomolekularen Schicht eines Fluorophors (z.B. Oregon Green 488) versehen wurden.

Im vorliegenden Fall erwies sich beides als unnötig, da der Golgi-Apparat immer Bereiche aufweist, die für eine Bestimmung der PSF dünn genug sind.

Bei der linearen Dreipunktentfaltung wird die typische 4Pi-PSF als ein einzelnes, zentrales Maximum betrachtet, das mit einer Kammfunktion gefaltet ist. Diese wird durch die relative Höhe der Nebenmaxima und ihre Abstände vom Hauptmaximum definiert. Durch Faltung mit der inversen Kammfunktion lassen sich die Nebenmaxima weitgehend entfernen. Diese Operation ist sehr schnell und vollständig reversibel.

Nichtlineare Entfaltungsalgorithmen sind in der Lage unter Ausnutzung einiger Vorkenntnisse über das Objekt, wie etwa das Fehlen negativer Intensitätswerte, nicht übertragene Raumfrequenzen teilweise zu rekonstruieren und so die Auflösung noch weiter zu erhöhen. Der Richardson-Lucy-Algorithmus etwa faltet ein geschätztes Bild nach Angabe der relativen Höhe und Abstände der Nebenmaxima mit der PSF des Mikroskops (anhand der Aufnahme eines 200 nm-Beads als Referenz) und vergleicht das Resultat mit der tatsächlichen Aufnahme. Durch iteratives Variieren des Schätzers wird diese dem ungefalteten Objekt angenähert (*maximum likelihood estimation*). Allerdings verändern sich hierbei die Verhältnisse der Intensitäten einzelner Bildbereiche zueinander, was besonders bei der Entfaltung von Zeitserien eine Quantifizierung von Fluorophorkonzentrationen zumindest fragwürdig werden lässt. Für quantitative Aussagen und strukturelle Vergleiche wurde daher ausschließlich die lineare Entfaltung verwendet.

2.2.5. Elektronenmikroskopie

2.2.5.1. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die mit dem 4Pi-Mikroskop gewonnenen Erkenntnisse über die Lokalisation von Golgi-Proteinen zu überprüfen, sowie als Teil der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie (CLEM, siehe unten) für die vergleichende Analyse von Strukturen.

Prinzip:

Die Bildgebung mittels Elektronen ermöglicht aufgrund der (im Vergleich zur Lichtmikroskopie) erheblich kleineren Wellenlänge von Elektronen eine laterale Auflösung im Nanometerbereich. Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht prinzipiell keine Erfassung von Strukturen in axialer Richtung, da eine TEM-Aufnahme eine Projektion in Z darstellt. Für 3D-Rekonstruktionen müssen daher Ultradünnschnitte verwendet werden, deren Dicke entsprechend die Z-Auflösung bestimmt. Typischerweise werden Schnittpräparate von 50 bis 100 nm Dicke hergestellt. Die Aufnahme serieller Schnitte ermöglicht nach der Ausrichtung der einzelnen Aufnahmen eine Rekonstruktion dreidimensionaler Strukturen. Alternativ kann die präzisere, aber auch aufwendigere Methode der EM-Tomographie verwendet werden, bei der ein Schnitt im Mikroskop gedreht und aus verschiedenen Winkeln aufgenommen wird. Die 3D-Struktur kann aus den Einzelaufnahmen berechnet werden, ohne dass eine manuelle (und damit subjektive und potentiell fehlerträchtige) Ausrichtung von Schnitten vorgenommen werden muss.

Für viele Anwendungen, auch die für diese Arbeit wichtige Überprüfung von Proteinlokalisationen sind allerdings zweidimensionale Aufnahmen völlig ausreichend, solange darauf geachtet wird, dass das untersuchte Objekt in der für die Aussage relevanten Orientierung abgebildet wird. Für den Golgi-Apparat bedeutet das beispielsweise, dass die Aufnahmeebene orthogonal zu den Membranflächen der Zisternen stehen muss.

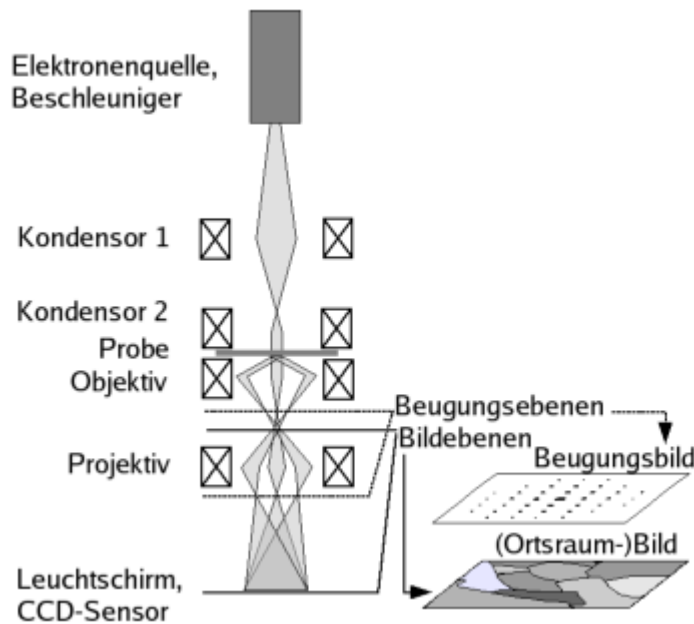


Abb. 2.08: Aufbau des Transmissionselektronenmikroskops (TEM).

Probenpräparation:

In Kulturschalen mit zehn Zentimetern Durchmesser aufgewachsene, für ein GFP-Hybridprotein transfizierte Zellen wurden zunächst mit 2% (w/v) Paraformaldehyd (4% PFA in 100 mM PBS; pH 7,4 in 1:1 Mischung mit warmem Kulturmedium) für 30 Minuten bei RT, danach für 2 Stunden mit 4% PFA und 0,2% Glutaraldehyd (EM-Grade; Plano, Wetzlar) auf Eis fixiert.

Die Zellen wurden mit einer Glyzylösung (0,2 M in 100mM PBS; 3x 2 min bei RT) gewaschen, von den Platten abgeschabt, das Zellpellet in einer 10%igen (w/v in PBS), 37°C warmen Gelatinelösung resuspendiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte dann eine Pelletierung (StatSpin microPrep2 Zentrifuge, 12.000 rpm) für 15 Sekunden. Nach einer Inkubation auf Eis wurde das Mikroreaktionsgefäß entfernt und das Zellpellet in kleine Würfel geschnitten. Nach einer Inkubation in 2,3 M Saccharose (in 100 mM PBS) über Nacht bei 5 °C wurden die Blöckchen auf Metallpins aufgebracht und in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Herstellung der Cryoultradünnschnitte:

Die Herstellung der Cryoschnitte erfolgte bei -110 °C in einem Cryoultramikrotom (Leica Ultracut UCT EM FCS, Leica Wien) mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz). Die Schnittbänder wurden mit einer Metallschleife, die einen Tropfen Lösung enthielt (1 Teil 2% (w/v) Methylcellulose; 1 Teil 2,3 M Sucrose), auf mit Formvar und Kohle beschichtete Nickelgrids (Plano, Wetzlar, 75 mesh) übertragen.

Mit einem anti-GFP Antikörper und Protein-A-Gold (10 nm; George Posthuma; Utrecht) wurde das Hybridprotein der jeweiligen Transfektion markiert, sowie zum Vergleich der *Trans*-Golgi Marker Clathrin in der gleichen Weise mit Protein-A-Gold (5 nm).

Die Schnitte wurden mit einer Lösung aus Uranylacetat/ Methylcellulose (9 Teile MC/ 1 Teil Uac) für 10 min auf Eis inkubiert (Kontrastierung) und in der gleichen Lösung eingebettet.

2.2.5.2. Korrelative 4Pi-Licht-/Elektronenmikroskopie (4Pi-CLEM)

Zum Vergleich der Bildgebung der 4Pi-Mikroskopie mit jener der seit über 30 Jahren etablierten Elektronenmikroskopie wurden Proben korrelativ mit beiden Methoden in 3D abgebildet. Als für einen Vergleich besonders geeignete, sehr markante Struktur wurden Golgi-Ministacks gewählt, die das Transportprotein Prokollagen III enthielten. Zur korrelativen Abbildung wurden transfizierte Zellen mit dem 4Pi mikroskopiert, danach in Harz eingebettet, geschnitten und im TEM identifiziert und seriell abgebildet.

Zu diesem Zweck wuchsen die Zellen auf speziellen Deckgläsern auf, die ein eingätztes, nummeriertes Gitter enthielten (*Photoetched Coverslips, Dunn Labortechnik, Asbach*). Nach der 4Pi-Mikroskopie und einer Aufnahme mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) zum Vergleich wurden die Deckgläser voneinander gelöst, mit Glutaraldehyd nachfixiert und wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben immungefärbt.

Die fixierten und gefärbten Zellen wurden für 45 Minuten mit Osmiumtetroxid (OsO₄, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*) behandelt, danach in Epon 812 Epoxidharz (Epoxy Embedding Medium Kit, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München*) eingebettet und das Deckglas mit Flusssäure (40%) aufgelöst. Der Umbettung ging eine schrittweise Dehydrierung voraus: Je zehn Minuten in 50, 70, 90 und dreimal in 100% Ethanol, zwei Stunden in einem 1:1 Epon/Ethanol-Gemisch, 2 Stunden in 100% Epon.

Zur besseren Handhabung wurde ein stiftförmiger Aufsatz, ebenfalls aus Epon-Harz, aufgeklebt. Danach wurde mit einer Rasierklinge der interessante Bereich an der Spitze des Stiftes ausgeschnitten, wobei die Zahlen und Linien des im Deckglas eingezätzten Gitters als Negativabdruck sichtbar waren und eine Orientierung ermöglichten. Nach dem seriellen Schneiden wurde die Zelle mit dem TEM erneut anhand ihres Umrisses identifiziert und mit der anfangs gemachten DIC-Aufnahme verglichen.

Im mit dem 4Pi-Mikroskop aufgenommenen Abschnitt der Zelle wurden zunächst Übersichtsaufnahmen mit geringer Vergrößerung gemacht, um Golgi-Ministacks anhand ihrer relativen Lage in der Zelle zu identifizieren. Diese wurden daraufhin in höherer Vergrößerung seriell aufgenommen. Die Aufnahmen wurden aneinander ausgerichtet, Membranen wurden am Computer von Hand markiert und mit dem Programm VMD (Visual Molecular Dynamics, *University of Illinois, USA*) dreidimensional rekonstruiert. Das Resultat wurde mit einer 3D-Rekonstruktion der entfalteten 4Pi-Aufnahme verglichen.

2.2.6. Programme

Zur visuellen Analyse zwei- und dreidimensionaler lichtmikroskopischer Aufnahmen und zur Dreipunktentfaltung wurde das Programm Inspector (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) verwendet.

Die Ausrichtung der Kanäle von 4Pi-Aufnahmen in zwei Farben, das Trennen der spektral vermischten Kanäle (linear unmixing) sowie die Distanzanalysen wurden mit Matlab 7.1 (*MathWorks Inc, Natick, USA*) unter Verwendung der Funktionsbibliotheken „Optimization“ und „Image Processing“ durchgeführt.

Für 3D-Rekonstruktionen wurde Amira 4.1 (*Mercury Computer Systems Inc., Chelmsford, USA*) bzw. für 4Pi-CLEM das Programm VMD (Visual Molecular Dynamics, *University of Illinois, USA*), Version 1.8.4a22 verwendet.

3. Ergebnisse

Das Spektrum bildgebender Methoden, die zur Untersuchung von Struktur und Funktion des Golgi-Apparates zur Verfügung stehen, weist zwischen konfokaler Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie eine Lücke hinsichtlich der Auflösung im Bereich von einem bis einigen hundert Nanometern auf.

Es wird in diesem Abschnitt gezeigt, dass das MMM-4Pi-Mikroskop geeignet ist, diese Lücke teilweise zu schließen. Zu diesem Zweck wird im Folgenden zunächst die Datenaufnahme mit dem MMM-4Pi-Mikroskop und die Rekonstruktion dreidimensionaler Strukturen beschrieben und danach die Anwendbarkeit der Methode auf drei wesentliche Aspekte des Golgi-Apparates demonstriert: Seine Struktur, die Verteilung dreier Golgi-Enzyme sowie die Dynamik von Transportprozessen:

1. In Korrelation mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die strukturelle Validität der MMM-4Pi-Abbildungen analysiert und untersucht, ob eine 3D-Auflösung von 150-200 nm der strukturellen Untersuchung von Golgi-Ministacks angemessen ist.
2. Der funktionale Aspekt der sequentiellen Lokalisation von Enzymen innerhalb der Subkompartimente des Golgi-Apparates entlang der Cis-Trans-Achse wurde über die Analyse ihrer mittleren Distanzen relativ zueinander untersucht. Zu diesem Zweck musste die Möglichkeit zur gleichzeitigen Aufnahme von zwei Farben in das MMM-4Pi-Mikroskop implementiert werden.
3. Schließlich wurde die Eignung der Methode zur raschen dreidimensionalen Aufnahme des Golgi-Apparates lebender Säugerzellen genutzt, um den Transport von VSVG durch das mit GalT-vYFP markierte Trans-Golgi-Kompartiment zu visualisieren.

3.1. Rekonstruktion dreidimensionaler Strukturen aus 4Pi-Aufnahmeserien

Die im Vergleich mit dem CLSM axial deutlich höhere Auflösung des 4Pi-Mikroskops ermöglicht eine in Z-Richtung erheblich detailliertere Darstellung der Struktur des Golgi-Apparates. Abbildung 3.1.01 zeigt einen Schnitt durch einen Golgi-Apparat einer Vero-Zelle entlang der XZ-Ebene in konfokaler und in 4Pi-Darstellung, sowie die jeweilige PSF entlang der Z-Achse. Die für das 4Pi-Mikroskop charakteristischen Nebenmaxima können an (in Z-Richtung) dünnen Bereichen der Probe erkannt und von strukturellen Elementen eindeutig unterschieden werden (siehe Abb. 3.1.01). Die räumliche Invarianz der PSF vorausgesetzt, erhält man über die Höhe und Distanz der Nebenmaxima die Parameter für die Entfaltung der Aufnahme.

Durch eine einfache Dreipunkt-Entfaltung (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.2.4.2.) können die Nebenmaxima weitgehend entfernt werden. In der Regel weist der Golgi-Apparat genügend Bereiche auf, die in axialer Richtung ausreichend dünn sind, um die Parameter der PSF abzulesen, so dass der Einsatz fluoreszierender Beads oder monomolekularer Schichten unnötig ist.

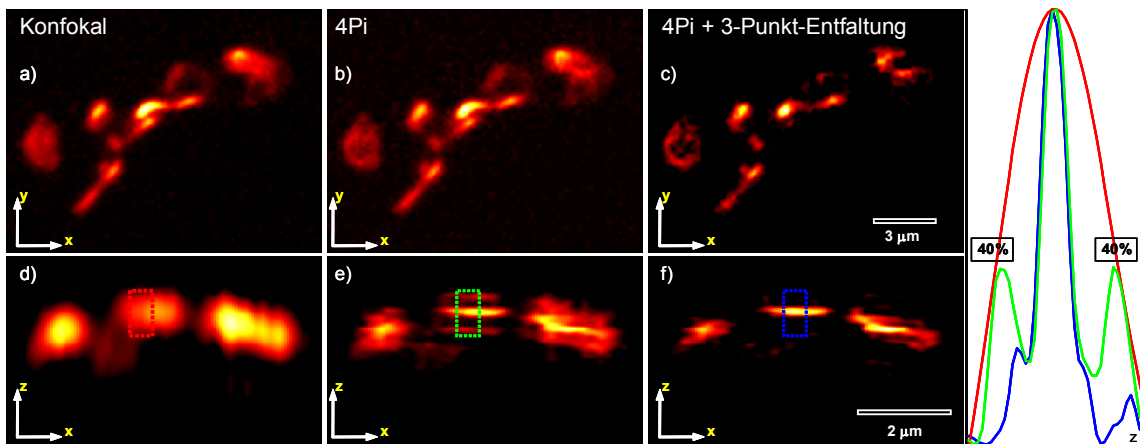


Abb. 3.1.01: Schnitt durch den Golgi-Apparat einer lebenden Vero-Zelle (Transfektion mit 2-OST-vYFP). Oben (a, b, c) in XY-Ansicht, unten (d, e, f) in XZ-Ansicht (Ausschnitt). Verglichen wird die konfokale Darstellung (a, d) mit einer 4Pi-Aufnahme vor (b, e) und nach einer Dreipunkt-Entfaltung (c, f). Die Nebenmaxima betragen 40% des Hauptmaximums und verschwinden nach Entfaltung fast vollständig. Die rechts aufgetragenen PSFs in Z-Richtung wurden an den mit gleichfarbigen Kästchen markierten Stellen in d, e und f abgelesen und entlang der X-Ausdehnung der Kästchen gemittelt.

In Abbildung 3.1.02 wird die dreidimensionale Darstellung der konfokal abgebildeten Struktur des Golgi-Apparates mit jener der 4Pi-Aufnahme (mit und ohne Dreipunkt-Entfaltung) verglichen. Die Aufnahmen wurden hinsichtlich ihrer Intensität normiert. Für die Berechnung der dargestellten Fläche wurde in allen drei Fällen ein Schwellenwert von 20% der maximalen Intensität verwendet. Da die Auflösung des Konfokalmikroskops axial zwei bis drei mal schlechter ist als lateral, erscheint der Golgi-Apparat in Z-Richtung verwaschen. Details unter 500 nm Größe (axial) können nicht dargestellt werden. Die 4Pi-Aufnahme gibt aufgrund ihrer in allen drei Raumrichtungen in etwa gleichwertigen Auflösung sowohl die Proportionen des Golgi-Apparates als auch seine strukturellen Details besser wieder.

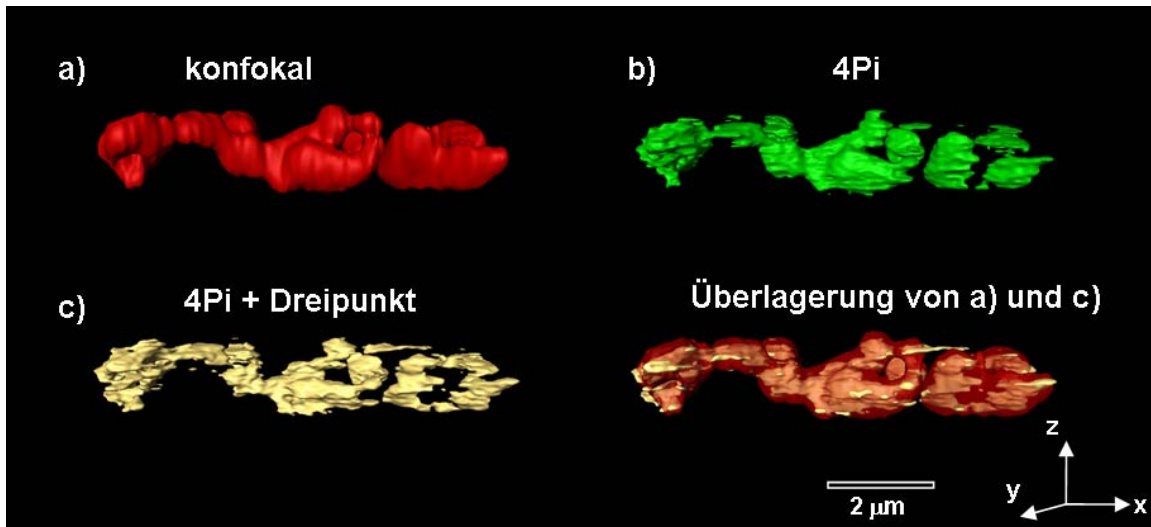


Abb. 3.1.02: Dreidimensionale Rekonstruktion des Golgi-Apparates aus Abb. 3.1.01.

a) konfokal, b) 4Pi-Aufnahme, c) 4Pi-Aufnahme nach Dreipunkt-Entfaltung. Rechts unten zum direkten Vergleich eine Überlagerung von a) und c). In Z-Richtung weist die 4Pi-Aufnahme erheblich feinere strukturelle Details auf als im konfokalen Fall.

In beiden Fällen hängt allerdings die dargestellte Struktur wesentlich von den gewählten Schwellenwerten ab. Besonders bei quantitativen Analysen wie etwa der Bestimmung von Größen, Abständen oder (bei Zweifarbenaufnahmen) des Kollokalisationsgrades zweier Proteinverteilungen ist die Wahl des Schwellenwertes von entscheidender Bedeutung. Bei einfach strukturierten Objekten kann zur Bestimmung der genannten Größen die Halbwertsbreite herangezogen werden (Abb. 3.1.03), indem ein Schwellenwert von 50% der maximalen Intensität verwendet wird. Im Profil entspricht die Hälfte des Intensitätsmaximums der Lage einer Kante des Objektes.

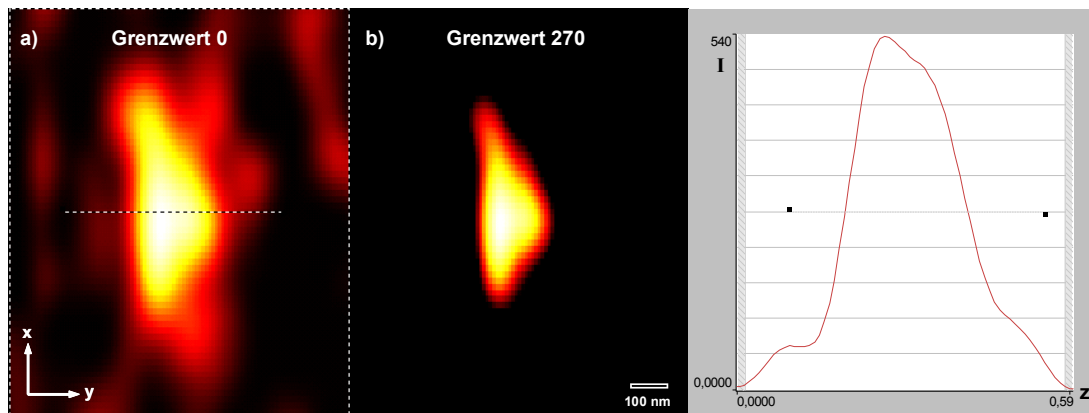


Abb. 3.1.03: 4Pi-Aufnahme eines Golgi-Ministacks nach Dreipunktentfaltung (Transfektion mit PC3-GFP). Die Hälfte der maximalen Intensität (hier 270 cps) stellt bei sehr einfachen Strukturen ein verlässliches Maß zur Bestimmung des Schwellenwertes dar.

Bei komplexeren Intensitätsverteilungen ergibt ein über das gesamte Bildfeld konstanter Schwellenwert aber keinen Sinn, da so Strukturen niedrigerer Intensität verschluckt oder abgeschnitten werden, und/oder Strukturen höherer Intensität stark vergrößert erscheinen (Abb. 3.1.04). Es muss daher eine Schwellenwertdefinition gefunden werden, die von absoluten Intensitätswerten unabhängig und zur quantitativen Analyse aller Strukturen des gesamten Bildfeldes geeignet ist.

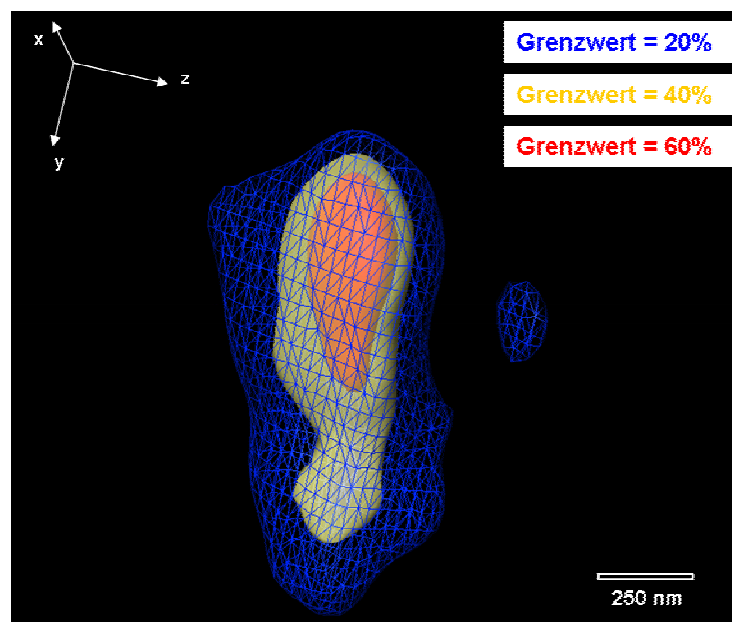


Abb. 3.1.04: Dreidimensionale Rekonstruktion eines Golgi-Ministacks unter Verwendung verschiedener Intensitäts-Schwellenwerte. Aufgrund seiner komplexen Intensitätsverteilung ist nicht nur die Ausdehnung, sondern auch die Struktur des Ministacks maßgeblich von dem gewählten Schwellenwert abhängig.

3.1.1. Definition des Schwellenwertes

Der Laplace-Operator, also die Summe der zweiten partiellen Ableitungen eines Bildes entlang der drei Raumrichtungen, stellt eine geeignete Methode dar, um die Grenzen von Strukturen unabhängig von absoluten Intensitätswerten zu definieren. In Abb. 3.1.05 ist dies schematisch für den eindimensionalen Fall gezeigt. Der Laplace-Operator entspricht hier der zweiten partiellen Ableitung, deren Nullstellen den Wendepunkten der Intensitätsverteilung entsprechen. Diese dienen als objektive Begrenzungen der verschiedenen Strukturelemente. Im zwei- und dreidimensionalen Fall ergeben die Nulldurchgänge der Laplace-Transformation geschlossene Umrisslinien bzw. Grenzflächen, deren Inhalt nach einer Binärisierung des Bildes gefüllt und selektiv dargestellt werden kann (Abb. 3.1.06). Man erhält so eine Maske, mit deren Hilfe alle Strukturelemente des Bildes gleichermaßen zuverlässig begrenzt werden können, unabhängig von ihren absoluten Intensitäten. Dies ermöglicht die objektive Analyse der Dimensionen, Abstände oder Koloalisationsgrade abgebildeter Strukturen.

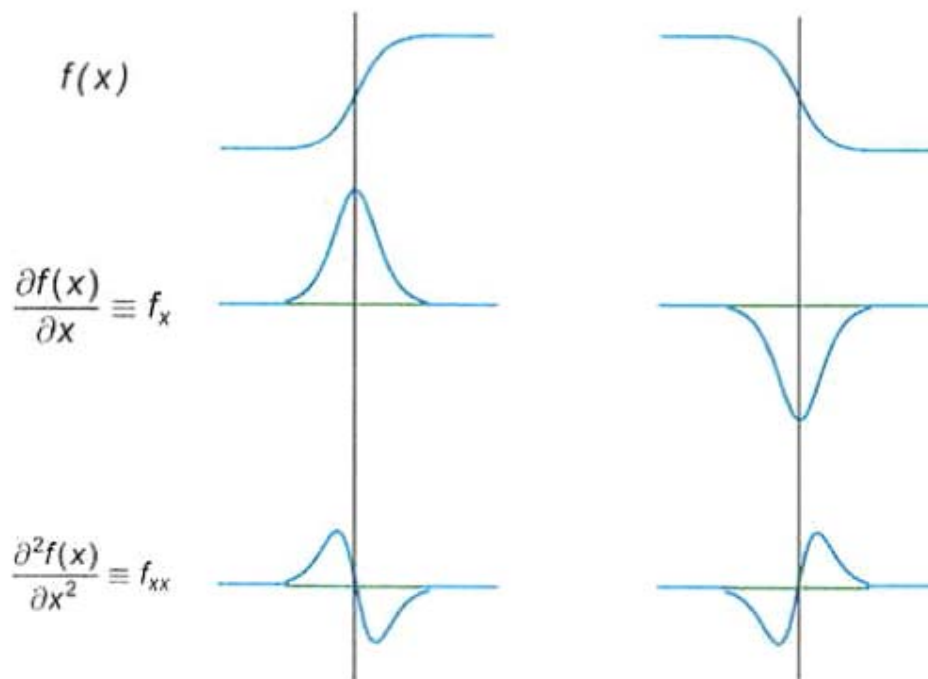


Abb. 3.1.05: Erste und zweite Ableitung einer Kurve (eindimensionaler Fall). Die Nulldurchgänge der zweiten Ableitung entsprechen den Wendepunkten der ursprünglichen Kurven, und sind so ein geeignetes Mittel zur Identifikation von Kanten.

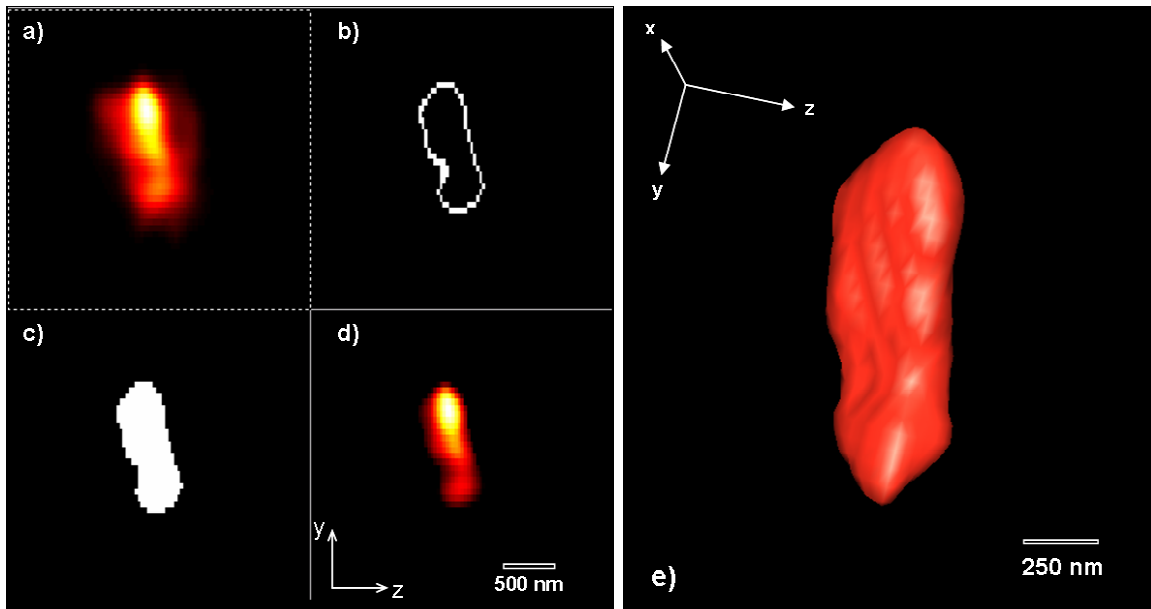


Abb. 3.1.06: Bestimmung des Schwellenwertes mit der Laplace-Transformation: Von einem Rohdatensatz (a) werden die Nullstellen seiner Laplace-Transformierten bestimmt (b), welche den Wendepunkten der Intensitätsverteilung und damit den Kanten des Objektes entsprechen. Indem der Umriss gefüllt wird (c) erhält man eine Maske zur objektiven, von absoluten Intensitäten unabhängigen Begrenzung der Struktur (d). In (e) ist die endgültige Struktur als dreidimensionale Rekonstruktion dargestellt.

3.2. 4pi-CLEM

Zur strukturellen Validierung der dreidimensionalen Rekonstruktion von Golgi-Apparaten aus 4Pi-Bildstapeln wurde als höher auflösende Methode die Transmissionselektronenmikroskopie herangezogen. Durch korrelative Aufnahmen dreidimensionaler Bildstapel mit dem 4Pi-Mikroskop einerseits und sequenzieller Schnittserien mit dem Transmissionselektronenmikroskop andererseits wurde sichergestellt, dass ein und derselbe Golgi-Apparat mit beiden Methoden abgebildet wurde. Als Marker für den Golgi-Komplex wurde das mit GFP hybridisierte sekretorische Protein Prokollagen III-GFP eingesetzt.

3.2.1. Prokollagen III als Probe für den Strukturrevergleich

Prokollagen besteht aus drei in Form einer dreifachen, rechtshändigen Helix angeordneten Untereinheiten von jeweils etwa 300 nm Länge, den sogenannten α -Ketten. Prokollagen des Typs III (im Folgenden als „PC3“ abgekürzt, von „Procollagen III“) ist ein Homotrimer aus drei $\alpha 1(III)$ -Ketten, die nach Hydroxylierung ihrer Proline und Lysine im ER spontan trimerisieren.

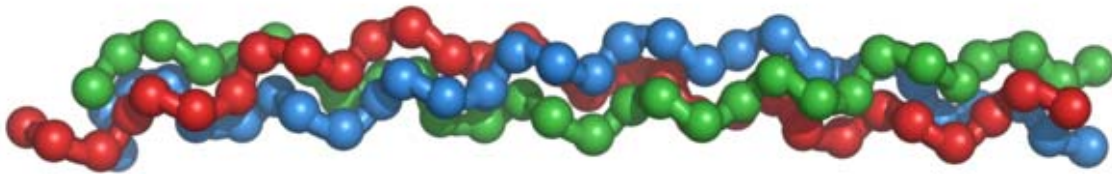


Abb. 3.2.01: Prokollagen III. Die 300 nm langen $\alpha 1(III)$ -Ketten trimerisieren spontan.

Durch Inhibition der Prolyl-Hydroxylase wird die Ausbildung der Quartärstruktur verhindert, wodurch der Export von PC3 zum Golgi-Apparat unterbunden und dieses im ER angereichert wird. Diesen Effekt erreicht man über einen reversiblen Hydroxylierungsblock durch Zugabe von 2,2'-Dipyridyl und Inkubation der Zellen bei 40°C. Nach Lösen des Blocks durch Senkung der Temperatur und Zugabe von Ascorbinsäure wird Prokollagen III aus dem ER exportiert und erreicht den Golgi-Apparat im Verlauf von 30 bis 60 Minuten.

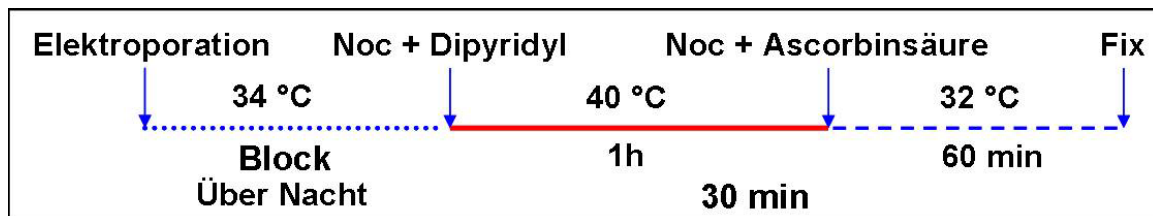


Abb. 3.2.02: Zeitleiste des Anreicherungsprotokolls für PC3. Der Export-Block wird durch Auswaschung des Dipiridyl und Zugabe von Ascorbinsäure gelöst. Der Transport verläuft relativ langsam; nach 60 Minuten befindet sich PC3 im Golgi-Apparat.

Durch das sequenzielle Anlegen und Lösen des Blocks und eine genau definierte Wartezeit bis zur Fixierung der Zellen kann gewährleistet werden, dass PC3 den Golgi-Apparat in Form eines scharfen Pulses erreicht. Somit erreicht man eine für die

Mikroskopie relevante Verstärkung des Golgi-internen PC3-Signals und gleichzeitig durch die Entleerung des ERs eine Reduktion der Hintergrundfluoreszenz.

Prokollagen III wurde als Probe für 4Pi-CLEM ausgewählt, da es aufgrund seiner Größe beim Durchlaufen des Golgi-Apparates sackartige Ausstülpungen der Golgi-Cisternen verursacht (Abb. 3.2.03). Diese sehr markanten Strukturen ermöglichen einen aussagekräftigen strukturellen Vergleich der mit beiden Methoden abgebildeten Golgi-Ministacks.



Abb. 3.2.03: EM-Aufnahmen von Golgi-Ministacks. Deutlich sind die seitlichen Ausstülpungen erkennbar, welche mit Goldpartikeln markiertes PC3 enthalten (grüne Kreise).

3.2.2. Adaption des optischen Aufbaus zur Positionsbestimmung der Zelle

Die Bestimmung der genauen Position der Zelle war essentiell um sie nach der Präparation für die korrelative Elektronenmikroskopie wiederzufinden. Zu diesem Zweck wurden Deckgläser mit einem eingetätzten, numerierten Gitter verwendet, auf dem die Zellen aufwuchsen. Unmittelbar nach der 4Pi-Aufnahme wurde im Hellfeld der Umriss der Zelle sowie ein zum Ablesen der Gitternummer genügend großer Ausschnitt des Deckglases aufgenommen. Nummern, Gitterlinien und der Umriss der Zelle waren bei Beleuchtung mit einer Quecksilberdampfampe in Reflektion deutlich erkennbar. Da die zur Kontrolle der optischen Justage im 4Pi-Mikroskop eingesetzte CCD-Kamera aufgrund der großen Brennweite der Tubuslinse drei (TL₃ in Abb. 3.2.04) nur ein kleines Bildfeld darstellen kann, wurde parallel eine zweite Kamera eingebaut (CCD₂ in Abb.

3.2.04). Durch Verwendung einer vierten Tubuslinse (TL₄ in Abb 3.2.04) mit kleinerer Brennweite konnte ein genügend großer Bereich der Probe dargestellt werden, um die Position einer Zelle auf dem Gitter des Deckglases zu bestimmen.

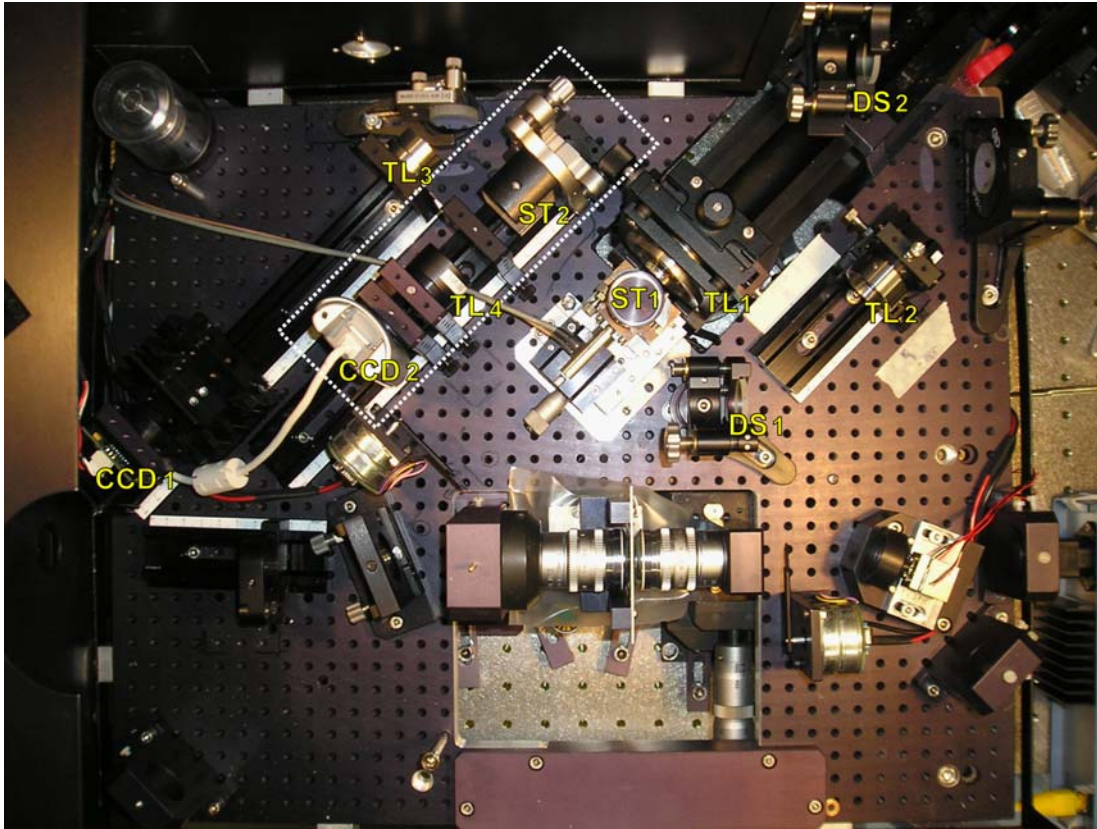


Abb. 3.2.04: Aufbau des MMM-4Pi-Mikroskops mit zweiter CCD-Kamera (CCD₂), zusätzlichem Strahlteiler (ST₂) und Tubuslinse (TL₄) zur Positionsbestimmung von Zellen für korrelative Aufnahmen. DS = dichroitischer Spiegel. Zum Strahlengang siehe Abb. 2.05 (Kapitel 2, Material und Methoden).

3.2.3. Datenanalyse zur Identifizierung spezifischer Golgi-Ministacks im TEM

Zur Vereinfachung der späteren Identifikation einer Zelle in der TEM-Aufnahme wurde sie zunächst anhand der im 4Pi-Mikroskop ermittelten Position und Gestalt in verschiedenen Vergrößerungen mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) (Leica DM6000, *Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar*) abgebildet und mit dem Fluoreszenzsignal überlagert (Abb. 3.2.05).

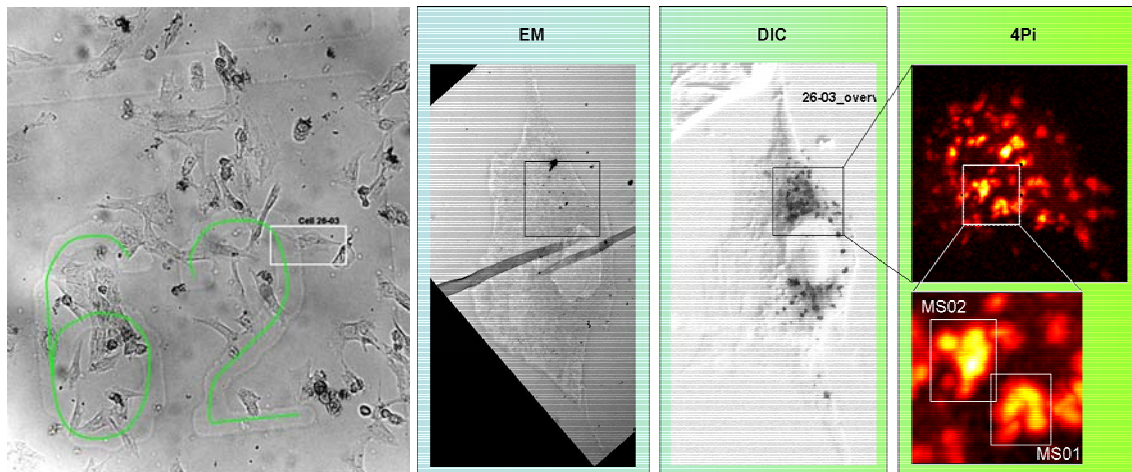


Abb. 3.2.05: Identifizierung einer Zelle. Linkes Bild: DIC-Aufnahme eines mit BHK-Zellen bewachsenen Deckglases mit eingezähtem Gitter. Die Gitterzahl 62 (grün nachgefahren) ist erkennbar. Rechtes Bild: Darstellung derselben Zelle im TEM (links), mit DIC (Mitte, überlagert mit den fluoreszierenden Ministacks) und im 4Pi (Ausschnitt, rechts oben). Von den beiden markierten Ministacks dieser Zelle wurde MS01 für den korrelativen Vergleich bearbeitet.

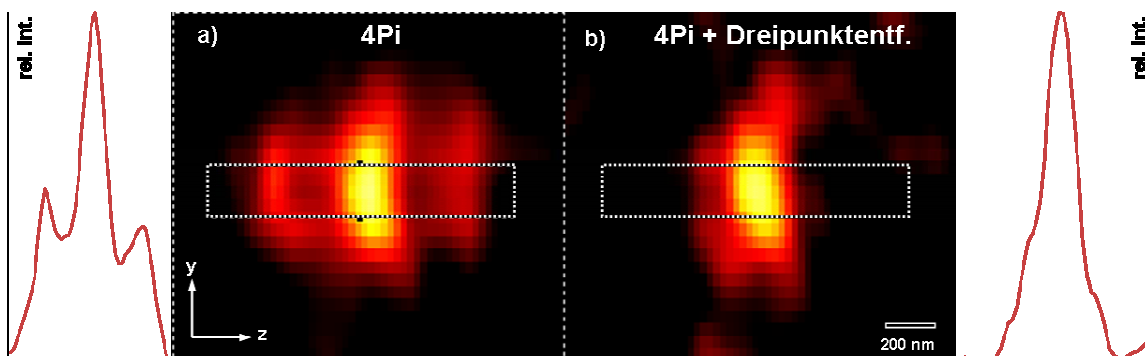


Abb. 3.2.06: MS03 (siehe Rekonstruktion in Abb. 3.2.10) vor und nach Dreipunktentfaltung. Die Nebenmaxima konnten vollständig entfernt werden.

Da die Elektronenmikroskopie inklusive aller Präparationsschritte erheblich zeitaufwändiger ist als die 4Pi-Mikroskopie, wurden zunächst die Ergebnisse letzterer Methode analysiert. Aufnahmen mit ausreichend niedrigen Nebenmaxima wurden entfaltet (Abb. 3.2.06) und zur leichteren Identifizierung des ausgewählten Ministacks binärisiert, auf den Bereich größter lokaler Intensität reduziert und in serielle Bildstapel von jeweils 400 bis 500 nm Dicke unterteilt (Abb. 3.2.07). Diese Vorgehensweise vereinfacht die Identifikation der Ministacks im 80 nm dicken EM-Schnitt.

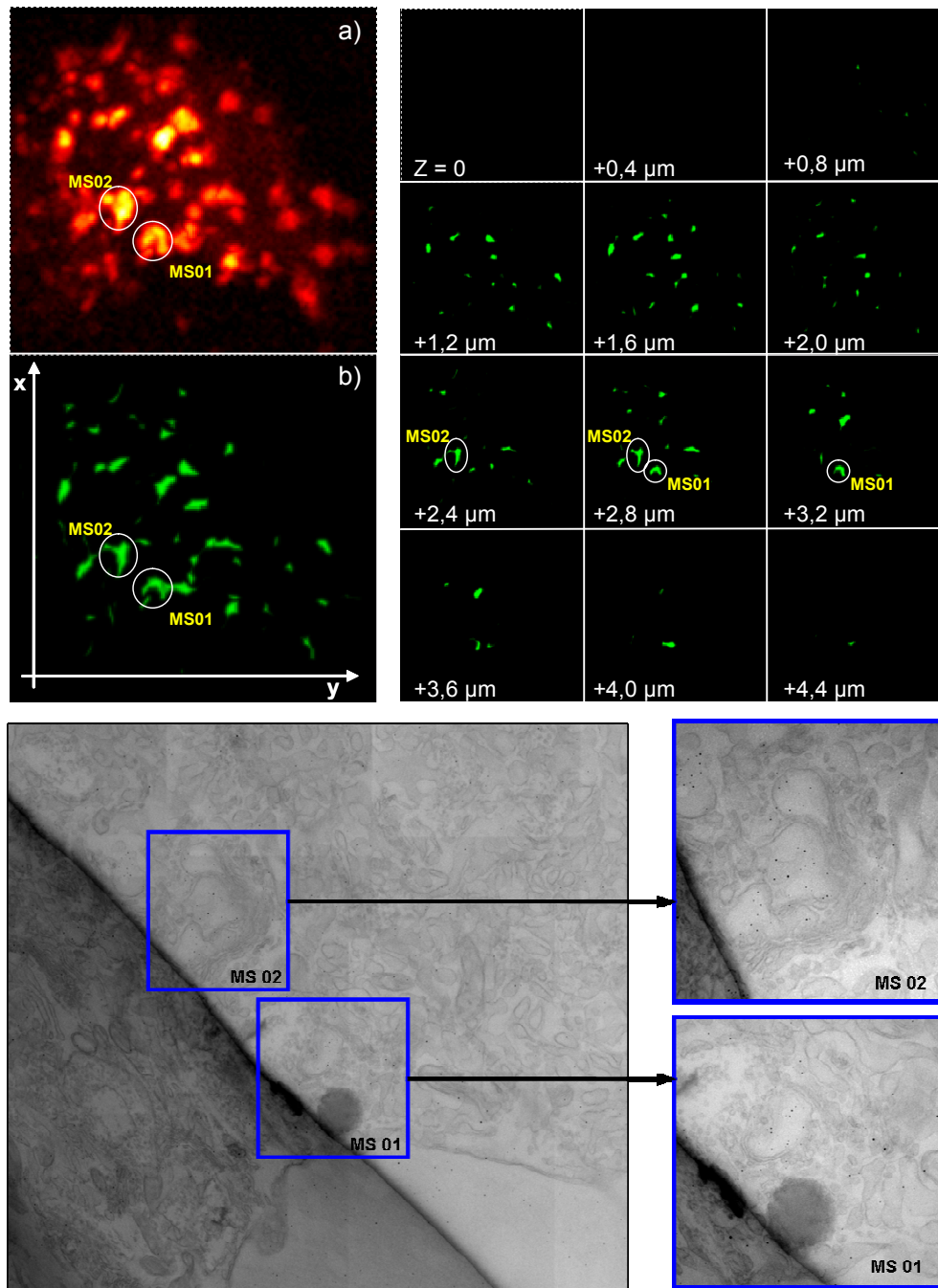


Abb. 3.2.07: Die 4Pi-Bilddaten (a) wurden binärisiert und erodiert (b) um die Ausdehnung der Ministacks auf ihren Kernbereich zu reduzieren und so ihre axiale Position besser bestimmen zu können. Der Bildstapel wurde axial in 400 nm dicke Schichten unterteilt (oben rechts). Diese Vorgehensweise vereinfacht die Identifizierung der Ministacks in den seriellen EM-Schnitten (unten).

Die Orientierung der identifizierten Ministacks wurde überprüft, da Cisternen, Aussackungen und Transportkompartimente nur bei vertikal (entlang der Cis-Trans-Achse) angeschnittenen Membranstapeln identifiziert werden können. Die seriellen

TEM-Aufnahmen der ausgewählten Ministacks wurden manuell aneinander ausgerichtet. Die Membranen von Strukturelementen, die Immunogoldmarkierung aufwiesen, wurden zur Anfertigung dreidimensionaler Rekonstruktionen nachgezeichnet (Abb. 3.2.08).

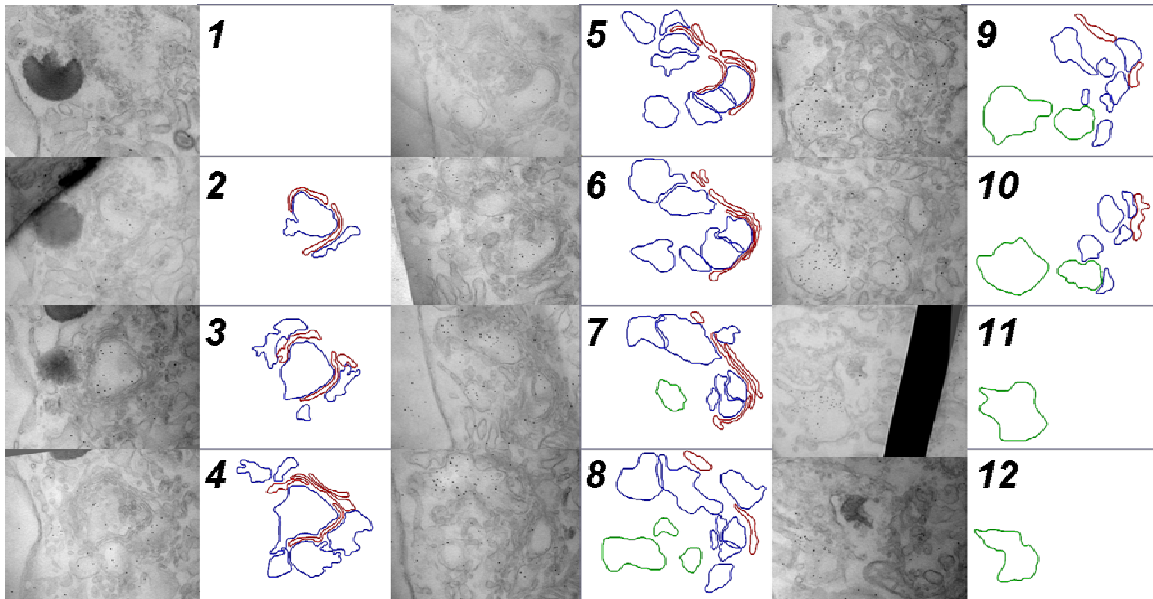


Abb. 3.2.08: TEM-Schnittserie eines Golgi-Ministacks (MS01 aus Abb. 3.2.05). Farbige Markierungen: Rot = Golgi-Cisternen, Blau = PC3-Aussackungen, Grün = nicht-kontinuierliche Transportkomplexe

3.2.4. Dreidimensionale korrelative Rekonstruktion von Golgi-Ministacks

In der dreidimensionalen Rekonstruktion von 4Pi- und EM-Daten zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung beider Aufnahmeserien. In Abb. 3.2.09 ist MS01 exemplarisch als überlagerte 3D-Rekonstruktion gezeigt. Die Übereinstimmung ist klar ersichtlich und demonstriert eindrucksvoll die (nach Entfaltung) in allen drei Raumrichtungen zuverlässige Wiedergabe hoch aufgelöster Strukturen mit dem MMM-4Pi Mikroskop. Die Abweichungen der Rekonstruktionen betragen maximal 100-200 nm. Sie liegen damit innerhalb der Größenordnung der 4Pi-Auflösung und sind daher auflösungsbedingt zu erwarten. Cisternen und PC3-Aussackungen können zwar in der 4Pi-Aufnahme nicht aufgelöst werden, aber die beiden großen Aussackungen an den Enden des hufeisenförmigen Ministacks sind klar voneinander zu unterscheiden. Die

detaillierte Übereinstimmung mit den TEM-Daten lässt die Annahme zu, dass unter Zuhilfenahme von Zweifarben-Aufnahmetechniken in Zukunft auch zwischen Cisternen und Aussackungen unterschieden werden kann.

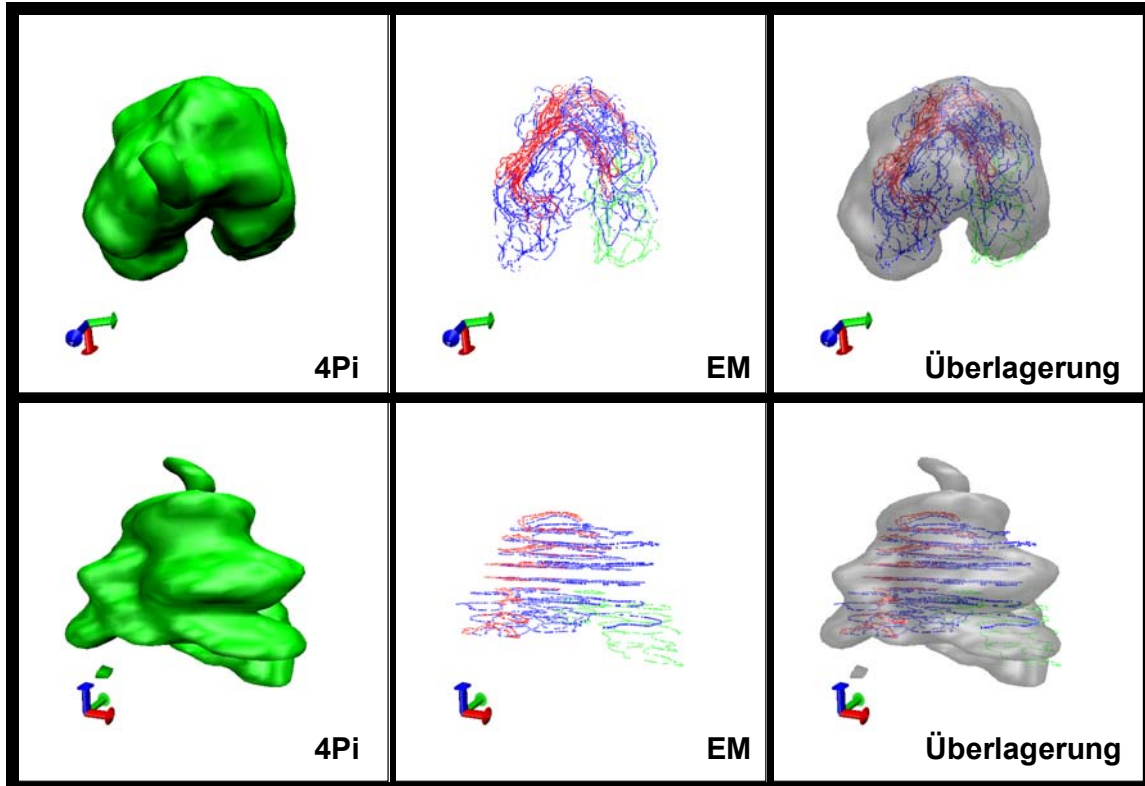


Abb. 3.2.09: MS01 in 4Pi- und EM-Darstellung, sowie als Überlagerung. Darstellung der Achsen: Rot = X, Grün = Y, Blau = Z. Die Abweichungen der beiden Rekonstruktionen liegen mit maximal 100-200 nm im Bereich des Auflösungsunterschiedes.

Ein weiterer Ministack (aus einer anderen Aufnahme) wurde korrelativ mit konfokaler Mikroskopie sowie mit 4Pi- und Elektronenmikroskopie aufgenommen (Abb. 3.2.10). Im direkten Vergleich wird unmittelbar deutlich, dass erst die hohe axiale Auflösung des 4Pi-Mikroskops einen strukturellen Vergleich mit dem Elektronenmikroskop überhaupt sinnvoll macht. Konfokal ist die Struktur des Ministacks aufgrund der Verwaschung in Z nicht zu erkennen. In der 4Pi-Aufnahme zeigt sich nicht nur ein hohes Maß an struktureller Übereinstimmung mit der Rekonstruktion aus EM-Schnitten. Auch die Zuverlässigkeit der Schwellenwertbestimmung über die Nulldurchgänge der Laplace-Funktion wird deutlich, da die auf diesem Weg ermittelte Struktur in erster Linie den PC3-gefüllten Aussackungen entspricht, während die wesentlichen Unterschiede zur EM-Rekonstruktion auf schmale Cisternen zurückzuführen sind, die sehr wahrscheinlich

kein oder nur wenig PC3 enthielten und daher zumindest nicht wesentlich zum Fluoreszenzsignal beitragen (Abb. 3.2.10f).

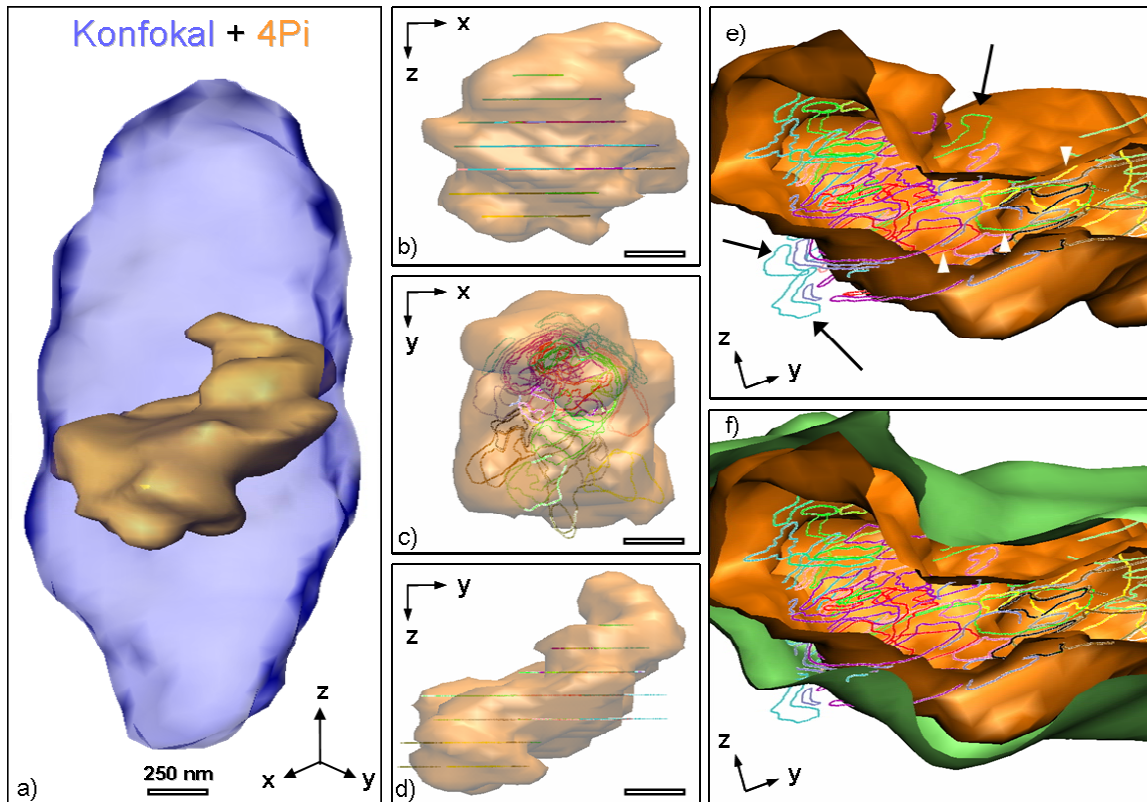


Abb. 3.2.10: MS03; Vergleich der 3D-Rekonstruktionen konfokaler und 4Pi-mikroskopischer Aufnahmen (a). Die Korrelation von 4Pi- (orange) und TEM-Aufnahmen (Linien) zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung (b-d). In der Detailansicht (e, f) zeigt sich, dass in erster Linie Cisternen der TEM-Rekonstruktion (schwarze Pfeile) außerhalb des Bereichs der 4Pi-Rekonstruktion liegen, während die PC3-gefüllten Aussackungen (weiße Pfeilspitzen) dem 4Pi-Signal entsprechen. Im Vergleich zur Schwellenwertbestimmung mittels Nulldurchgängen der Laplace-Funktion (orangene Oberfläche) zeigt ein fester Schwellenwert (20%, grüne Oberfläche in f) keine solche Korrelation.

3.3. Distanzanalyse von Enzymen des Cis-, Mid- und Trans-Golgi Apparates

3.3.1. Zweifarben-MMM-4Pi-Mikroskopie

Um die räumlichen Beziehungen verschiedener Proteinverteilungen zueinander untersuchen zu können, wurde die Möglichkeit zur gleichzeitigen Aufnahme von zwei Farben in das MMM-4Pi-Mikroskop implementiert. Da es sich bei diesem Mikroskop um ein parallelisiertes System handelt, ergeben sich im Vergleich zu Mikroskopen mit nur einem Fokus zusätzliche Herausforderungen an die Detektion. Werden bei einfacher Punktrasterung zur Detektion meist Photomultiplier oder Avalanche-Photodioden eingesetzt, so ist bei multifokaler Bildgebung die Verwendung einer Kamera besonders zweckmäßig. Bei der Aufnahme zweier spektral getrennter Kanäle werden zwei getrennte Bilder aufgenommen, die anschliessend wieder aneinander ausgerichtet werden müssen. Unabhängig von der Methode der Rasterung oder der Detektion müssen die Kanäle nach der Ausrichtung in einem zweiten Schritt spektral getrennt werden, wenn die verwendeten Fluorophore deutlich überlappende Emissionsspektren aufweisen. Da sich Fehler in der Ausrichtung der Kanäle bei ihrer spektralen Trennung fortpflanzen können, wird dieser zweite Schritt zum besseren Verständnis hier zuerst erklärt.

3.3.1.1. Spektrale Trennung der Kanäle

Die Verwendung von Fluorophoren mit überlappenden Anregungs- und Emissionsspektren bringt für die Zweifarben-4Pi-Mikroskopie eine Reihe von Vorteilen mit sich. Zum einen können beide Farbstoffe mit derselben Wellenlänge simultan angeregt werden. Somit entfällt die Notwendigkeit eines zweiten Lasers, was den Justageaufwand erheblich reduziert und damit die Erfassung statistisch relevanter Datenmengen stark beschleunigt. Darüber hinaus ist so die Beleuchtungs-PSF für beide Farben identisch und die Detektions-PSF sehr ähnlich. Der chromatische Längsfehler der Detektion ist daher gering und kann mit einer Tubuslinse vollständig korrigiert werden. Folglich sind die Abbildungseigenschaften des Mikroskops für beide Farben gleich, was für die Bestimmung exakter Distanzen verschiedenfarbig markierter

Proteinverteilungen besonders wichtig ist. Für den Grossteil der Versuche dieser Arbeit wurden die Fluorophore GFP und vYFP verwendet, deren Emissionsspektren in Abbildung 3.3.01 dargestellt sind. Bei einer Trennung bei 525 nm tragen GFP und vYFP gemäß folgender Tabelle zu den beiden Kanälen bei:

| Fluorophor | Kanal 1 (≤ 525 nm) | Kanal 2 (> 525 nm) |
|------------|--------------------------|-----------------------|
| GFP | 57 % =A1 | 43 % =B1 |
| vYFP | 21 % =A2 | 79 % =B2 |

Bei Kenntnis der Parameter $B1 = (B2-1)$ und $A2 = (A1-1)$ können die Kanäle wie folgt spektral getrennt werden:

$$\text{GFP} = (B2 \cdot \text{Kanal}_1 + (B2-1) \cdot \text{Kanal}_2) / (B2 + A1 - 1)$$

$$\text{vYFP} = (A1 \cdot \text{Kanal}_2 + (A1-1) \cdot \text{Kanal}_1) / (B2 + A1 - 1)$$

Da infolge der spektralen Trennung das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (im Folgenden SNR abgekürzt, *Signal-to-Noise-Ratio*) verschlechtert wird, muss die Wellenlänge, bei der getrennt wird, optimal gewählt werden. Abb. 3.3.02 zeigt die relative Verschlechterung des SNR in Relation zur gewählten Wellenlänge. Diese ist bei 525 nm minimal.

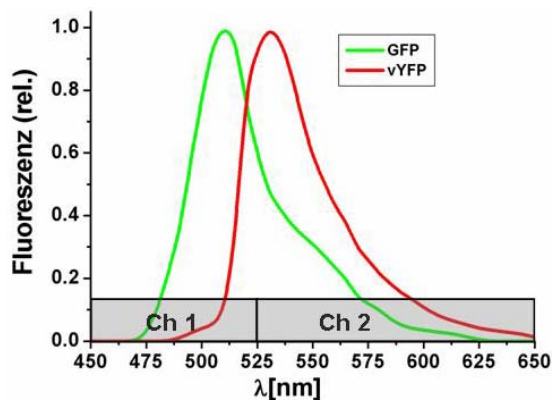


Abb. 3.3.01: Emissionsspektren von GFP und vYFP. Emissionsmaxima bei 509 nm bzw. 535 nm. Ein Dichroitischer Spiegel mit einer Kante bei 525 nm spaltet das Fluoreszenzlicht in zwei Kanäle auf

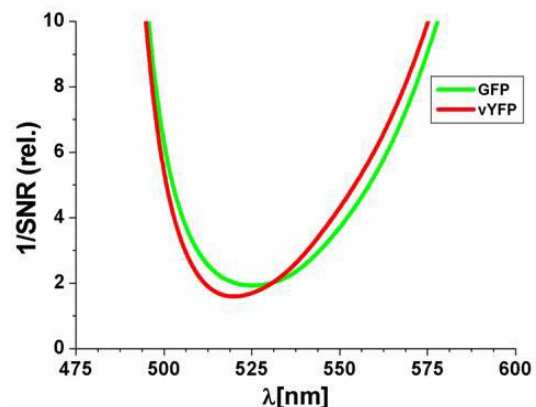


Abb. 3.3.02: Relative Abnahme des SNR nach der spektralen Trennung der Kanäle in Abhängigkeit zur Kante des dichroitischen Spiegels. Eine Trennung bei 525 nm führt zur geringsten Verschlechterung des SNR (um den Faktor 2).

3.3.1.2. Ausrichtung der Kanäle

Die beiden Kanäle wurden nach ihrer Trennung durch einen Strahlteiler auf unterschiedliche Bereiche derselben Kamera abgebildet und lagen daher bei jeder Aufnahme gemeinsam in einem Bilddatensatz nebeneinander vor. Die beiden Bildhälften wurden in einem Nachbearbeitungsschritt voneinander getrennt und separat gespeichert. Nach dem Trennen der Bildhälften lagen die Kanäle zwar einzeln, aber in der Regel gegeneinander verschoben, verdreht und sogar leicht geschert vor. Da die exakte Anpassung der Kanäle die grundlegende Voraussetzung für eine verlässliche Analyse jedweder räumlicher Beziehung zweier Strukturen darstellt, war dies ein dringendes, aber keineswegs triviales Problem.

Zur Überprüfung der Kanalausrichtung diente eine Oregon-Green Farbstofflösung als Testobjekt. Die Farbstofflösung wurde mit den Punktfokussen der Mikrolinsen beleuchtet ohne das Bildfeld abzurastern. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung des Strahlteilers (Kante bei 525 nm) auf zwei Kanäle abgebildet. Oregon Green wurde dabei zu etwa 33% auf Kanal eins (≤ 525 nm), zu 67% auf Kanal zwei (>525 nm) aufgeteilt. Da die Punktfokusse beider Kanäle den gleichen Ursprung haben, müssen sie nach der Kanalausrichtung exakt übereinander liegen (Abb. 3.3.03). Zur Kontrolle wurde eine Distanzanalyse durchgeführt (in Kapitel 3.2.2 näher erläutert), um den mittleren Abstand der korrespondierenden Punkte beider Kanäle und damit den Fehler der Ausrichtung zu ermitteln (Abb. 3.3.04).

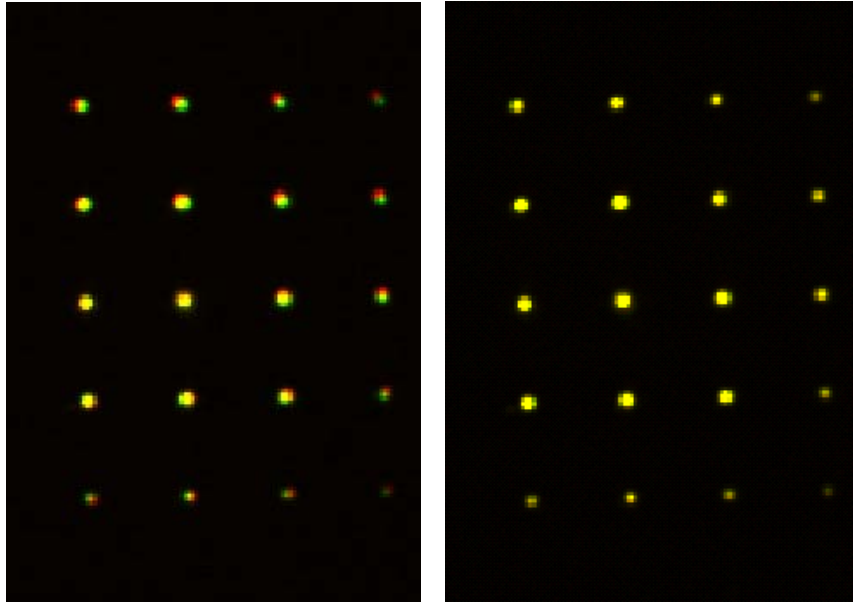


Abb. 3.3.03: Mit dem Gitter aus zwanzig Mikrolinsen wurde (ohne Rasterung) eine Oregon-Green-Farbstofflösung beleuchtet. Das Fluoreszenzsignal wurde durch einen dichroitischen Spiegel im Verhältnis 1:2 in zwei Kanäle aufgeteilt. Wie im linken Bild erkennbar, sind die beiden Kanäle (rot und grün) nicht deckungsgleich. Mit einer affinen Transformation nach Analyse der Verschiebung der Schwerpunkte korrespondierender Fokusse wird dies korrigiert (rechts).

a) Bestimmung der affinen Transformation mittels Simplex-Algorithmus

Zunächst wurde die Ausrichtung der Kanäle über eine affine Transformation durchgeführt, die mittels eines Simplex-Algorithmus optimiert wurde. Dabei sollte der Umstand genutzt werden, dass die Kanäle (unter Verwendung von GFP und vYFP) spektral gemischt aufgenommen wurden, und daher beide Kanäle anteilig die Information beider Farbstoffe enthielten. Tests mit den Punktfokussen zeigten jedoch, dass die Kanäle nur mit einer Genauigkeit von $28 \text{ nm} \pm 14 \text{ nm}$ ausgerichtet werden konnten. Zweifarbige, spektral gemischte Datensätze müssen aber nach der Ausrichtung noch spektral getrennt werden. Da hierfür das Verhältnis der absoluten Intensitäten der beiden Kanäle für jeden einzelnen Bildpunkt erfasst und direkt in das Verhältnis der Anteile beider Farben umgerechnet wird, können Fehler bei der Ausrichtung durch das spektrale Trennen noch verstärkt werden. Dies resultierte beim Test der (eigentlich identischen) Punktfokusse zu Ausrichtungsfehlern von $69 \text{ nm} \pm 32 \text{ nm}$ (Abb. 3.3.04). Da die Ungenauigkeit der Ausrichtung der Kanäle damit in ihrer Größenordnung nahezu der Auflösung des Mikroskops entspricht, wird die Aussagekraft

der Aufnahmen erheblich herabgesetzt, insbesondere wenn eng benachbarte Proteinverteilungen untersucht werden sollen, wie etwa die weiter unten beschriebenen Golgi-Enzyme. Diese Methode wurde daher nur als grobe Vor-Ausrichtung verwendet, um die Kanäle für die folgende Bearbeitung schon einmal annähernd zur Deckung zu bringen.

b) Bestimmung der affinen Transformation mittels Schwerpunkt-Analyse

Die Schwerpunkte der Punktfokusse beider Kanäle wurden bestimmt. Aus den jeweiligen Abständen korrespondierender Fokusse beider Kanäle wurde eine affine Transformation berechnet, mit der eine auf $26 \text{ nm} \pm 17 \text{ nm}$ genaue Ausrichtung erzielt werden konnte (Abb. 3.3.04). Diese Abweichung ist klein genug, um bei Analysen in Dimensionsbereichen von 100-300 nm nicht mehr ausschlaggebend zu sein.

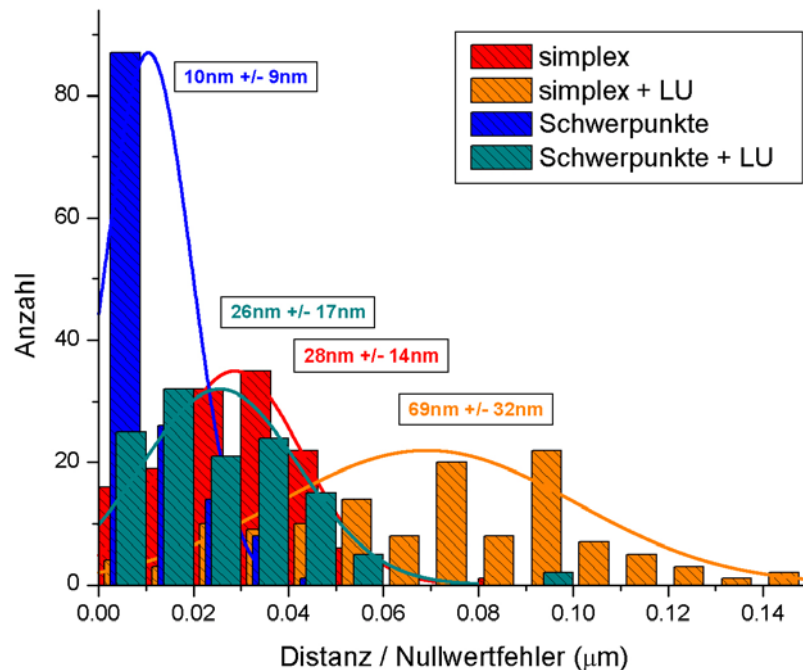


Abb. 3.3.04: Analyse der Fehler bei Bestimmung der Nulldistanz aus den Aufnahmen der Punktfokusse aus Abb. 3.3.03. Die Verwendung eines simplex-Algorithmus zur Ausrichtung der Kanäle führt im Mittel zu Fehlern von 28 nm vor und 69 nm nach spektraler Trennung der Kanäle (rot, bzw. orange). Die Berechnung einer affinen Transformationsmatrix aus den Verschiebungen der Schwerpunkte korrespondierender Fokusse führt zu einer erheblich größeren Genauigkeit (10 nm vor und 26 nm nach spektraler Trennung, blau bzw. türkis).

Es musste festgestellt werden, dass keine praktikable Möglichkeit bestand, die Vorgehensweise der Schwerpunkt-Analyse direkt auf Messdaten anzuwenden. Die Schwerpunktbestimmung ist nur bei regelmäßigen, annähernd punktförmigen Objekten wie etwa den Punktfokussen genau genug, um für die Ausrichtung der Kanäle herangezogen werden zu können. Komplexere Objekte, etwa Golgi-Ministacks oder gar der äußerst kompliziert strukturierte native Golgi-Apparat, lassen sich mit dieser Methode nicht zuverlässig ausrichten.

Aus diesem Grund wurde zu Beginn jedes Messtages sowie zwischen jedem Probenwechsel eine Aufnahme der auf eine Oregon-Green Farbstofflösung abgebildeten Punktfokusse vorgenommen. Aus dieser wurde die Transformation für die nachfolgenden Aufnahmen berechnet.

Um die Validität der so ermittelten Transformation zu überprüfen, wurden die Punktfokusse über einen Zeitraum von zwei Stunden mehrfach abgebildet. Die aus der ersten Aufnahme ermittelte Transformation konnte auf alle folgenden Aufnahmen angewendet werden, ohne zu erhöhten Ausrichtungsfehlern zu führen.

In einem weiteren Test wurde wie oben beschrieben aus einer Aufnahme der Punktfokusse die Transformation bestimmt. Danach wurde eine Probe grüngelb fluoreszierender Polystyrol-Beads von 200 nm Durchmesser in zwei Kanälen aufgenommen, die unter Verwendung der Transformation ausgerichtet wurden (Abb. 3.3.05). Der Farbstoff dieser Beads verhält sich ähnlich wie Oregon Green und ist bei Verwendung eines Strahlteilers mit einer Kante bei 525 nm ebenfalls in beiden Kanälen sichtbar. Ähnlich wie bei den Punktfokussen sollten die Signale der beiden Kanäle nach deren Ausrichtung für jedes Bead exakt identisch sein. Der Fehler der Ausrichtung betrug für die Beads $17\text{nm} \pm 12\text{ nm}$ vor und $35\text{ nm} \pm 13\text{ nm}$ nach der spektralen Kanaltrennung (Abb. 3.3.06). Dies zeigt, dass die aus den Punktfokus-Aufnahmen gewonnenen Transformationen auf Messdaten übertragen werden können, ohne dass der Fehler der Ausrichtung sich wesentlich vergrößert.

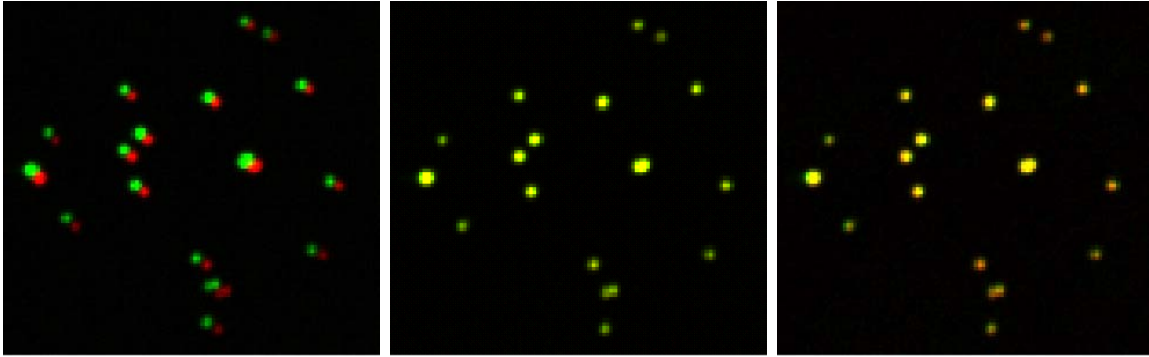


Abb. 3.3.05: Gelb-grüne 200 nm Polystyrolkugeln (Beads) in der 4Pi-Aufnahme. Das Fluoreszenzlicht dieses Farbstoffes wird an einem dichroitischen Spiegel im Verhältnis 1:2 in zwei Kanäle aufgespalten. Die einfarbige Aufnahme wurde behandelt wie eine zweifarbige Aufnahme mit 100 % Kolo-kalisation. a) vor und b) nach Ausrichtung der Kanäle, c) nach spektraler Trennung. Es ist erkennbar, dass die Deckung der Signale nach spektraler Trennung in peripheren Bereichen nicht perfekt, insgesamt aber sehr gut ist.

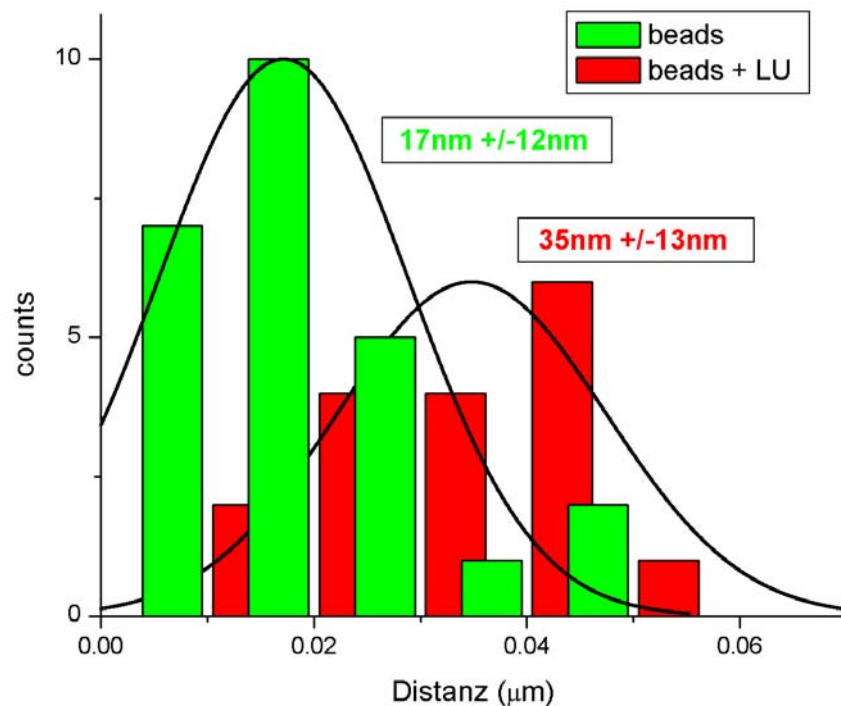


Abb. 3.3.06: Analyse der Distanzen der Beads aus Abb. 3.3.05 vor spektraler Trennung (grün) und danach (rot; LU = linear unmixing). Der Fehler der Nullwertbestimmung liegt hier ein wenig höher als bei den Punktfokussen (Abb. 3.3.04), ist aber mit im Mittel 17 nm vor und 35 nm nach spektraler Trennung noch vertretbar.

Um einen Eindruck der höchst variablen Erscheinungsformen des komplexen nativen Golgi-Apparates in der zweifarbigen MMM-4Pi-Aufnahme zu vermitteln, ist in Abb. 3.3.07 beispielhaft eine Übersicht über typische Golgi-Apparate mit und ohne Inkubation mit Nocodazol dargestellt. Der Vergleich macht auch deutlich, weshalb für die folgenden quantitativen Analysen Golgi-Ministacks (das Resultat der Depolymerisierung der Mikrotubuli durch Nocodazol) eingesetzt wurden.

Wenngleich voll funktional, sind Golgi-Ministacks doch erheblich einfacher strukturiert als der native Golgi und in der gesamten Zelle anzutreffen, was den Vorteil hat, dass etwaige Aberrationen durch den hohen Brechungsindex des Kerns vermieden werden können. Erst die Aufhebung der für die Verteilung der untersuchten Proteine auf die Golgi-Subkompartimente unerheblichen globalen Struktur machte die in Kapitel 3.3.2 dargestellte Distanzanalyse praktikabel.

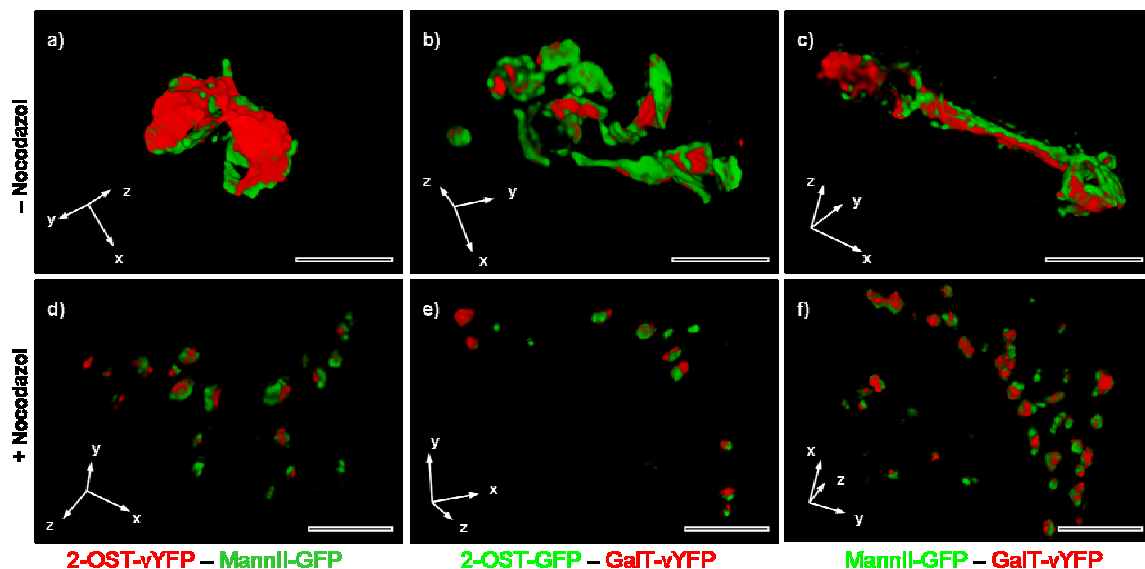


Abb. 3.3.07: 4Pi-Aufnahmen nativer Golgi-Apparate (a-c) und Golgi-Ministacks (d-f) lebender Vero-Zellen (nach nichtlinearer Entfaltung [70]). Fluoreszente Hybride der Golgi-Enzyme 2-OST, MannII und GalT wurden jeweils paarweise kotransfiziert. Der Vergleich zeigt die sehr variable und komplexe Struktur des nativen Golgi-Apparates. Ministacks sind erheblich einfacher strukturiert und erlauben deshalb einfachere und zuverlässigere Untersuchungen der Verteilung ihrer Enzyme entlang der Cis-Trans-Achse. Die Größenbalken entsprechen in allen Aufnahmen fünf Mikrometern.

3.3.2. Distanzanalyse mittels MMM-4Pi-Mikroskopie

Um die mittleren Distanzen der Verteilungen dreier Golgi-Enzyme zu analysieren wurden Golgi-Ministacks als Modellsystem eingesetzt. Aufgrund ihrer annähernd sphärischen Gestalt kann eine Schwerpunktanalyse eingesetzt werden, um den mittleren Abstand der Verteilung der in ihren Subkompartimenten lokalisierten Proteine zu bestimmen.

Um die Zuverlässigkeit der Distanzanalyse mit dem MMM-4Pi-Mikroskop zu testen sollten gut untersuchte Marker für jeweils den Cis-, Mid- und Trans-Golgi eingesetzt werden, wobei GFP- bzw. vYFP-Fusionsproteine dieser Marker jeweils paarweise in Vero-Zellen kotransfiziert wurden.

UDP-galaktosyl: Glykoprotein,1,4- β -Galaktosyltransferase (GalT), ein Marker für den Trans-Golgi und das TGN wurde gekürzt in Form eines Fusionsproteins der ersten 60 Aminosäuren mit GFP bzw. vYFP eingesetzt. Diese enthalten den N-terminalen zytoplasmischen Anteil, die Transmembrandomäne des Proteins sowie 17 Aminosäuren der dem Lumen zugewandten Domäne. Es ist gezeigt worden, dass dieser Abschnitt in der Zelle ebenso im Trans-Golgi lokalisiert wie Wildtyp-GalT [23].

Mannosidase II (MannII) ist ein typischer, häufig verwendeter Marker für den Mid-Golgi-Apparat. MannII wurde als GFP-Fusionsprotein mit vYFP-Hybriden der anderen Marker kombiniert.

Für die Markierung des Cis-Golgi Kompartimentes sollte ursprünglich 2-OST eingesetzt werden. Dieses Enzym war in verschiedenen Veröffentlichungen als ein für den Cis-/Mid-Bereich typisches Protein beschrieben worden.

Visuell war bei allen Kotransfektionen ein hoher Kollokalisationsgrad feststellbar (Abb. 3.3.08). Erst die Analyse der mittleren Distanzen ihrer Aufenthaltsverteilungen zeigte leichte Unterschiede (Abb. 3.3.09). Während die mittlere Distanz zwischen MannII und GalT wie auch die zwischen MannII und 2-OST in etwa 140 nm beträgt, was in guter Übereinstimmung zur vielfach belegten Lokalisation von MannII (Mid) und GalT (Trans) in etwa dem halben mittleren Durchmesser des Golgi-Membranstacks entspricht, scheinen sich GalT und 2-OST nur um 125 nm zu unterscheiden.

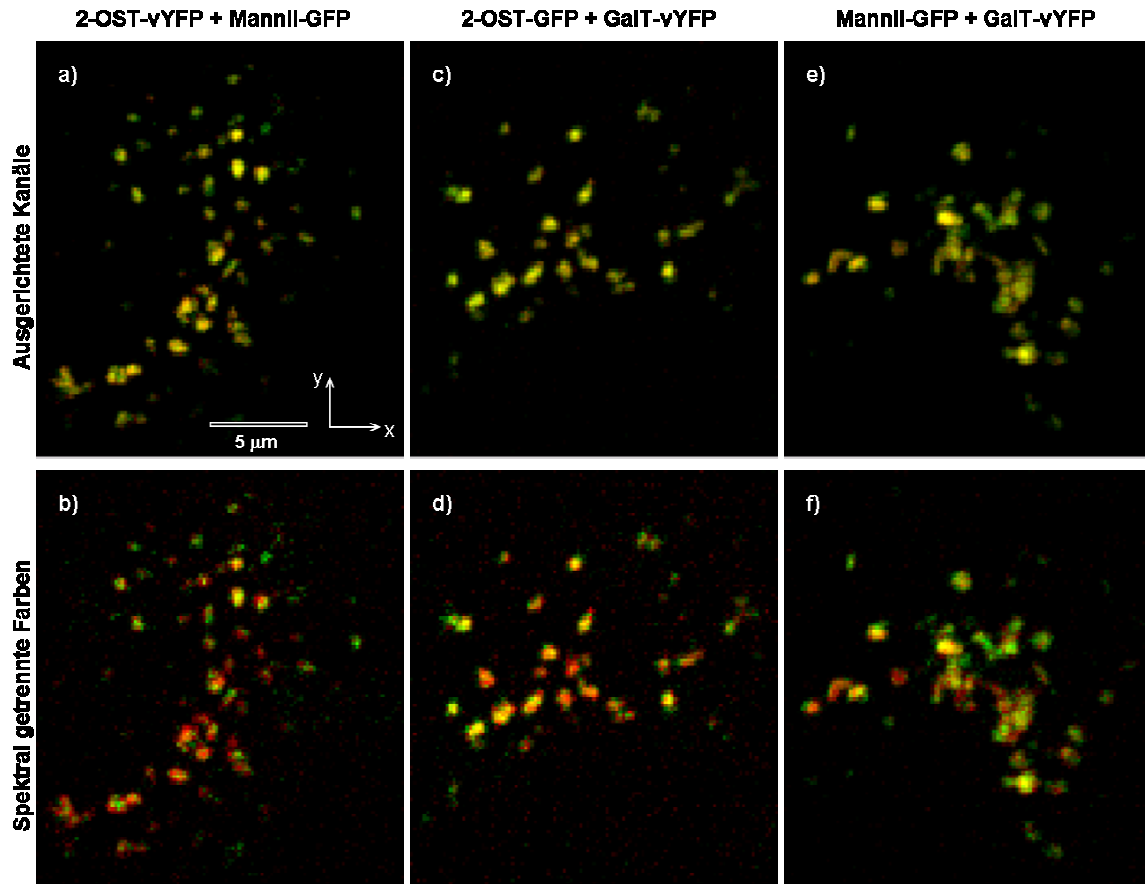


Abb. 3.3.08: 4Pi-Aufnahmen des Golgi-Apparates lebender Vero-Zellen nach Behandlung mit 33 μM Nocodazol (> 3h). Kotransfektion von 2-OST-vYFP mit MannII-GFP (a, b), 2-OST-GFP mit GalT-vYFP (c, d) und MannII-GFP mit GalT-vYFP (e,f). Zum Vergleich sind die beiden ausgerichteten Kanäle jeweils überlagert vor (a, c, e) und nach spektraler Trennung (b, d, f) gezeigt. Die Unterschiede der mittleren Abstände sind nicht unmittelbar ersichtlich und gehen erst aus der Distanzanalyse hervor (siehe Abb. 3.3.09).

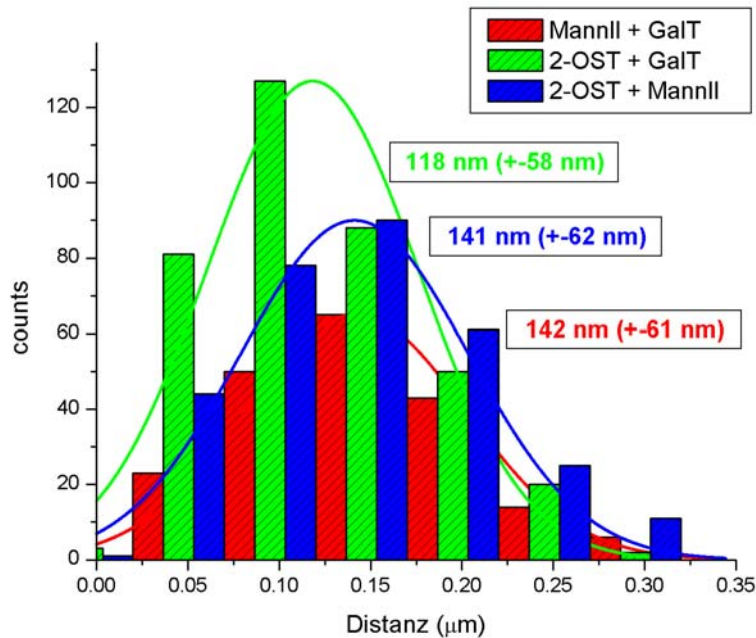


Abb. 3.3.09: Distanzanalyse der Verteilungen von 2-OST, MannII und GalT (jeweils paarweise kotransfiziert). Der mittlere Abstand des Mid-Golgi-Markers MannII zum Trans-Golgi-Marker GalT (142 nm) entspricht dem von MannII zu 2-OST. Die mittlere Distanz von 2-OST zu GalT ist aber niedriger (118 nm), was innerhalb des linearen Cis-Trans-Systems des Golgi-Apparates nicht erklärbar ist. Aufgrund des Abstandes zum Mid-Golgi-Marker MannII kann 2-OST nur im Cis- oder im Trans-Golgi-Apparat lokalisiert sein. Als Cis-Golgi-Marker sollte 2-OST einen sehr großen Abstand zu GalT aufweisen, als Trans-Golgi-Marker einen sehr kleinen. Beides ist nicht der Fall.

Da man den Golgi-Apparat hinsichtlich der Abfolge und damit auch der relativen Distanzen seiner Enzyme näherungsweise als lineares System betrachten kann (Unterschiede der Lokalisation spielen sich in erster Linie entlang der Cis-Trans-Achse ab), sind die hier erhaltenen Distanzwerte mit den bisherigen Annahmen bezüglich der Enzym-Lokalisationen nicht in Deckung zu bringen. Wenn MannII gegenüber GalT den gleichen Abstand aufweist, wie gegenüber 2-OST, muss davon ausgegangen werden, dass GalT und 2-OST entweder kolokalisieren (und damit einen Abstand von Null haben müssten), oder einander auf der Cis-Trans-Achse gegenüberliegen. Zwar darf man aufgrund der recht hohen Standardabweichung nicht unbedingt erwarten, dass in diesem Fall der Abstand exakt das Doppelte des Cis-Mid- bzw. Mid-Trans-Abstandes beträgt, aber höher als dieser sollte er auf jeden Fall sein. Keiner von beiden Fällen scheint zuzutreffen.

Es ist daher anzunehmen, dass die tatsächliche Distanz zwischen den Verteilungen von 2-OST und GalT entweder (Fall a) deutlich grösser oder (Fall b) deutlich kleiner ist, als das Resultat der Distanzanalysen.

Fall a ist unwahrscheinlich, da die Genauigkeit der Analyse bei grösseren Distanzen nicht ab- sondern zunehmen sollte. Bei einer sehr geringen Distanz (Fall b) wäre dagegen eine Abweichung vorstellbar. Die Nulldistanzanalysen ergaben (nach spektraler Trennung der Kanäle) bei Punktfokussen eine Abweichung von $26 \text{ nm} \pm 17 \text{ nm}$ und bei Beads eine Abweichung von $35 \text{ nm} \pm 12,5 \text{ nm}$. Distanzen unterhalb dieser Werte können nicht mit statistischer Relevanz bestimmt werden. Unter der Annahme, dass dieser Nulldistanzfehler bei Golgi-Ministacks erheblich grösser und der tatsächliche Abstand zwischen den Verteilungen von 2-OST und GalT sehr gering ist, wären die Ergebnisse der Distanzanalyse erklärbar.

Zur Überprüfung dieser These wurden daher zur Nullwertbestimmung Kotransfektionen von GalT-GFP mit GalT-vYFP bzw. von 2-OST-GFP mit 2-OST-vYFP durchgeführt. Da sich GFP und vYFP strukturell kaum voneinander unterscheiden, darf davon ausgegangen werden, dass ihre Fusionsprodukte mit demselben Enzym auch gleich lokalisieren. Ähnlich wie bei den entsprechenden Analysen von Punktfokussen und beads beträgt der zu erwartende tatsächliche Abstand Null.

In beiden Fällen betrug das Resultat der Distanzanalyse etwa 100 nm (Abb. 3.3.10). Es muss daher im Falle von Golgi-Ministacks davon ausgegangen werden, dass Distanzen unter 100 nm nicht zuverlässig bestimmt werden können. Während die Distanz zwischen MannII und den beiden anderen Proteinen von 140 nm zumindest als signifikante Tendenz betrachtet werden kann, ist diesen Daten allein nichts Genaueres über Lage oder Beziehung von GalT und 2-OST zu entnehmen. Die Annahme, dass 2-OST und GalT im gleichen oder unmittelbar benachbarten Kompartimenten vorliegen und ihre Verteilungen entsprechend geringe Abstände aufweisen, liegt zwar nahe, kann aber zunächst nicht bewiesen werden.

Im wesentlichen lassen sich aus den Unterschieden der Aufnahmen von Punktfokussen, beads und Ministack zwei mögliche Ursachen für die stark unterschiedlichen Fehler der Nulldistanz ableiten. Zum einen nehmen in dieser Reihenfolge sowohl der Durchmesser als auch die strukturelle Komplexität der jeweiligen Objekte zu. Zum anderen nimmt das typische SNR ab. Beide Effekte könnten sich auf die Genauigkeit auswirken, mit der die

Schwerpunkte bestimmt werden können, und damit auf den Fehler der Nulldistanzanalyse. Auf diesen Punkt wird in der Diskussion (Kapitel 4.2.5) näher eingegangen.

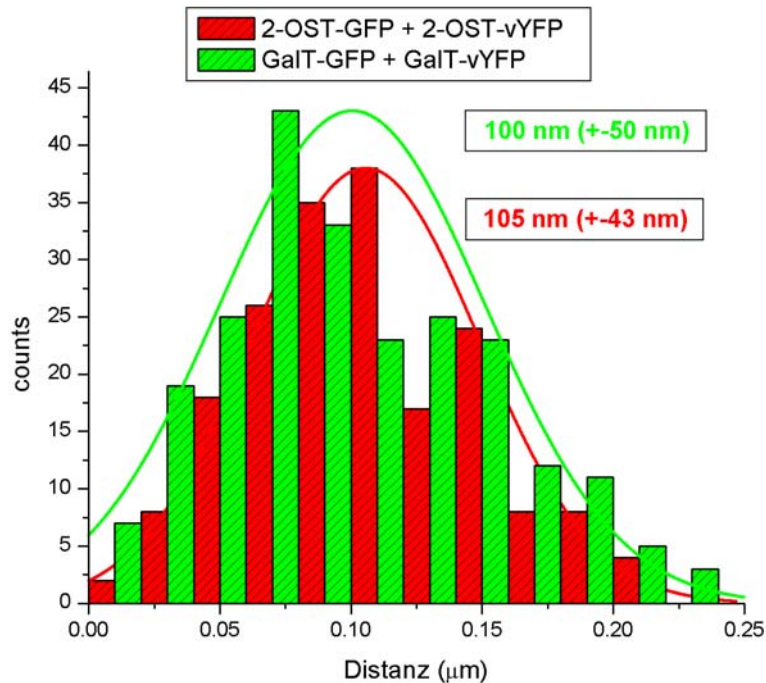


Abb. 3.3.10: Distanzanalyse kolokalisierender Marker. Vero-Zellen wurden mit 2-OST-GFP und 2-OST-vYFP und in einem parallelen Experiment mit GalT-GFP und GalT-vYFP kotransfiziert. Es ist anzunehmen, dass die GFP- und vYFP-Signale in beiden Fällen weitgehend kolokalisiert vorliegen. Die Distanzanalyse führt jedoch im Mittel zu Abständen um 100 nm. Dieser Abstand bezeichnet daher die Auflösungsgrenze der Distanzanalyse.

3.3.2.1. Erd2 als äußere Kontrolle

Zur Aufklärung der Lokalisation von 2-OST und GalT wurde ein weiterer Marker herangezogen. Der zwischen ER und Cis-Golgi zirkulierende KDEL-Rezeptor Erd2 markiert das IC und den Cis-Golgi und ist daher in der Regel über 100 nm von den in Mid- und Trans-Golgi lokalisierten Enzymen MannII und GalT entfernt. Daher wurden jeweils paarweise Kotransfektionen von Erd2-vYFP mit GFP-fusioniertem 2-OST, GalT und MannII durchgeführt. Abbildung 3.3.11 zeigt die mittleren Distanzen dieser Kombinationen. Die Distanz von 161 nm zu MannII bestätigt erneut dessen Position im

Mid-Golgi-Apparat. 2-OST und GalT sind beide weiter von Erd2 entfernt und damit im Trans-Golgi lokalisiert. Die größte mittlere Distanz liegt mit 202 nm erwartungsgemäß zwischen GalT und Erd2, da GalT auch im TGN lokalisiert ist [56]. 2-OST dagegen scheint auf den Bereich des Mid- bis Trans-Golgi-Apparates beschränkt zu sein, wie die Distanz von 185 nm zu Erd2 andeutet.

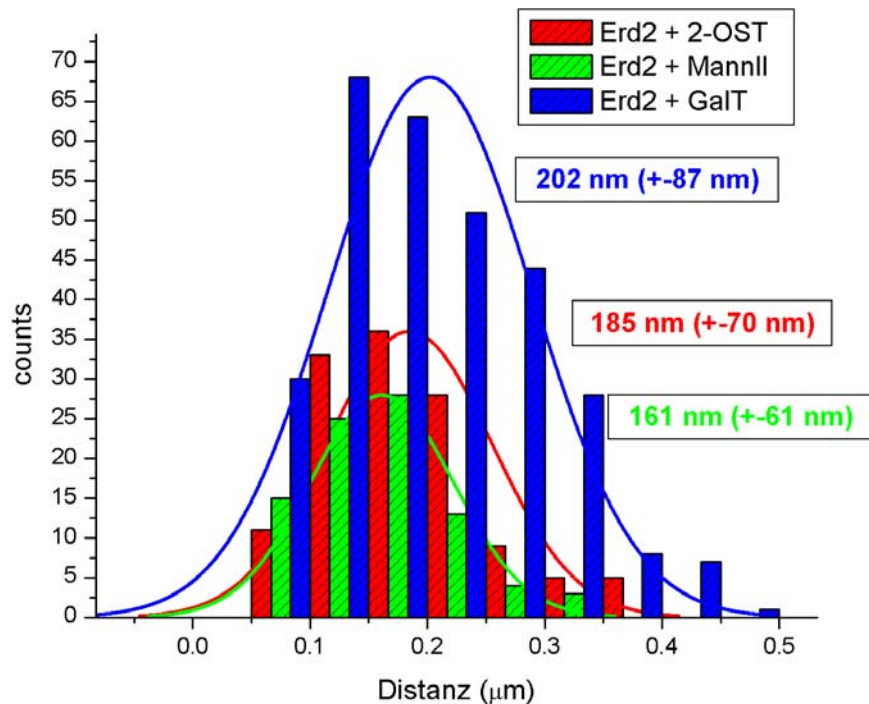


Abb. 3.3.11: Mittlere Distanzen der Golgi-Enzyme 2-OST, MannII und GalT zum Cis-Golgi-Marker Erd2. Der Mid-Golgi-Marker MannII weist erwartungsgemäß die geringste Distanz auf, der Trans-Golgi-Marker GalT die größte. 2-OST liegt dazwischen und lokalisiert daher offenkundig im Mid- und Trans-Golgi-Apparat.

Aufgrund der recht breiten Verteilung wurde die Signifikanz der Mittelwerte mit Student's T-Test untersucht:

| | Erd2_MannII / Erd2_2-OST | Erd2_MannII / Erd2_GalT | Erd2_GalT / Erd2_2-OST |
|--------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| A(t,n) | 99,00 % | 99,99 % | 95,00 % |
| t | 2,58 | 4,13 | 1,94 |
| n | 213 | 386 | 425 |

Dabei ist n die jeweilige Anzahl analysierter Ministacks, t der T-Wert des Student's T-Tests und $A(t,n)$ die Wahrscheinlichkeit, dass der Unterschied des Mittelwertes zweier Verteilungen einen realen Unterschied in den Daten wiedergibt. Entsprechend bezeichnet $1-A(t,n)$ die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Unterschied nur auf einem Zufall beruht.

Wie nicht anders zu erwarten, ist der Unterschied der Distanzen von MannII und GalT (jeweils zu Erd2) mit großer Sicherheit (99,99%) statistisch relevant. Die beiden Proteine weisen den größten Abstand zueinander auf und sind durch zahlreiche Untersuchungen gut als Mid- bzw. Trans-Golgi-Marker belegt. Der Unterschied zwischen der Verteilung von MannII und 2-OST ist ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit (99,00%) relevant. Dies untermauert die Signifikanz der beobachteten Lokalisation von 2-OST im Mid-/Trans-Golgi-Apparat. Für die Verteilungen von 2-OST und GalT gilt eine Wahrscheinlichkeit von 5%, dass sie eigentlich identisch sind, und ihre Mittelwerte sich nur zufällig unterscheiden. Dies ist wenig verwunderlich, da beide signifikante Unterschiede zur Verteilung von MannII zeigen und auf der Trans-Seite des Golgi-Apparates lokalisiert sind. Entsprechend überlappen ihre Verteilungen zwangsläufig stark.

3.3.3. Intra-Golgi Lokalisation von 2-OST

Da aus den Distanzanalysen auf eine Mid/Trans-Lokalisation von 2-OST geschlossen wurde, dies aber im Widerspruch zu Angaben aus der Literatur steht, wurden zwei weitere Untersuchungen durchgeführt, um dieses Ergebnis zu überprüfen.

Da Erd2 nicht sehr scharf lokalisiert ist und überdies in Einzelfällen auch schon im Mid- und im Trans-Golgi-Apparat nachgewiesen worden ist, wurde es für eine Reihe von Aufnahmen durch GM130 ersetzt, einen weiteren Standard-Marker für den Cis-Golgi-Apparat. Um weiteren etwaigen systematischen Fehlern entgegenzutreten, wurde ein anderes 4Pi-Mikroskop mit Einphotonen-Anregung und hochnumerischen Ölimmersionsobjektiven verwendet. Mit 2-OST-GFP transfizierte Vero-Zellen wurden mit Antikörpern gegen GM130 (Alexa 647) und GFP (Alexa 546) gefärbt. Letzteres war wegen der Einbettung der Zellen in TDE (Thiodiethanol) notwendig, was einen vollständigen Verlust der GFP-Fluoreszenz zur Folge hat. Aufgrund der im Vergleich zu Erd2 schärferen Lokalisation von GM130 ist in der 4Pi-Aufnahme eine deutliche Trennung des Signals von dem von 2-OST erkennbar (Abb. 3.3.12). Eine nennenswerte

Überlappung der Signale kann dagegen nicht beobachtet werden. Da Golgi-Enzyme typischerweise über mehrere Cisternen verteilt vorliegen, ist dies ein weiterer, deutlicher Hinweis darauf, dass 2-OST in einem anderen Kompartiment lokalisiert ist als GM130.

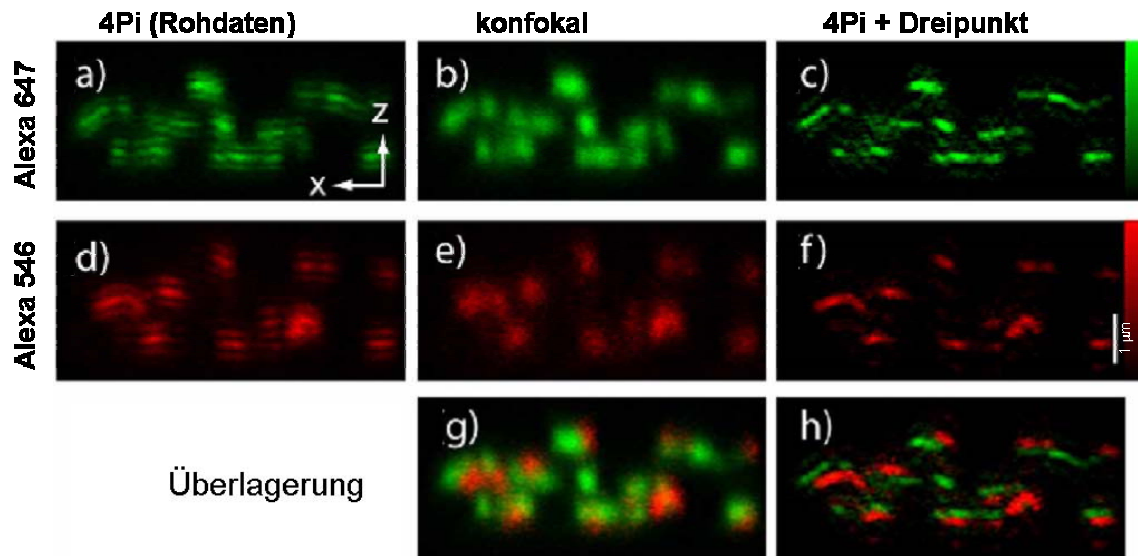


Abb. 3.3.12: Konfokaler und 4Pi-mikroskopischer Schnitt durch den Golgi-Apparat einer fixierten Vero-Zelle. GM130 (Cis-Golgi) wurde mit Alexa 647 markiert (grün), 2-OST mit Alexa 546 (rot). In der entfalteten 4Pi-Aufnahme ist die deutliche Trennung beider Signale klar erkennbar. Die Abstände der Signale zueinander betragen im Mittel 200 nm.

Abschließend wurde die lichtmikroskopische Analyse der Lokalisation von 2-OST durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung ergänzt. Dabei sollte auch überprüft werden, ob 2-OST im nativen Golgi-Apparat anders lokalisiert ist, als in den durch Nocodazol induzierten Ministacks. Zu diesem Zweck wurden Vero-Zellen mit 2-OST-GFP transfiziert, für Kryo-Elektronenmikroskopie präpariert und mit einem anti-GFP Antikörper mit Goldpartikeln (10 nm) markiert. Als Vergleichsmarker diente Klathrin, das mit 5 nm großen Goldpartikeln markiert wurde. Klathrin bildet die Hülle eines bestimmten Typs von Vesikeln, der Transportfunktionen zwischen Trans-Golgi, Endosomen und der Zellmembran übernimmt. Man findet Klathrin außerdem im Trans-Golgi-Netzwerk, was diesen Marker dafür eignet, die Polarität des Golgi-Cisternenstapels anzuzeigen.

Abbildung 3.3.13 zeigt exemplarisch einen Cisternenstapel mit 2-OST- und Klathrinmarkierung. Die polarisierte 2-OST-Verteilung ist deutlich zu erkennen. Anhand

der Klathrin-Markierung kann diese Seite des Golgi-Apparates als Trans-Seite identifiziert werden.

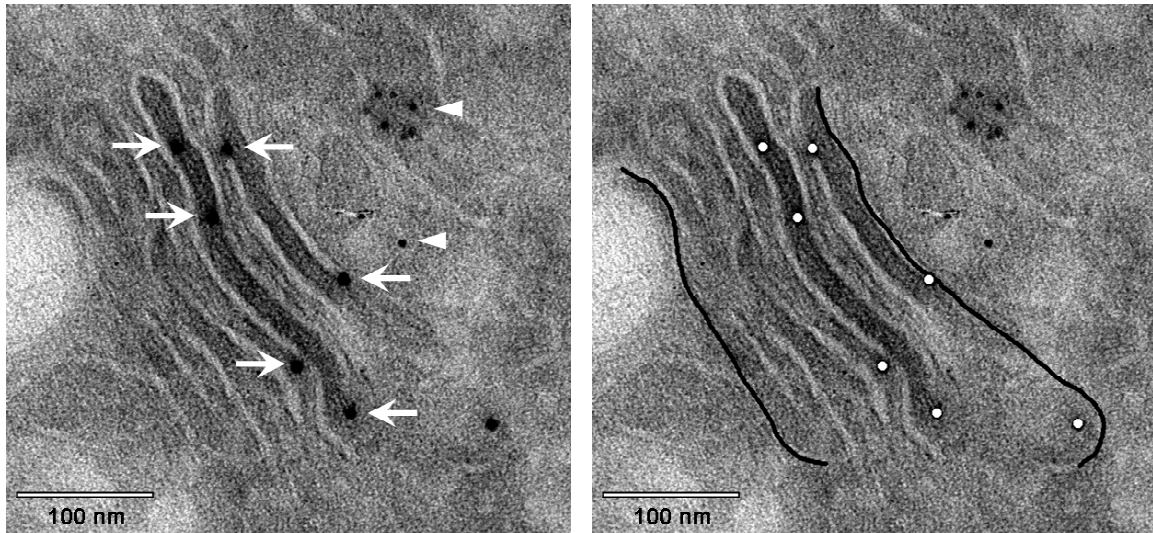


Abb. 3.3.13: TEM-Aufnahme eines Golgi-Cisternenstapels einer Vero-Zelle. Es sind vier Cisternen erkennbar, von denen zwei 2-OST enthalten (10 nm Goldpartikel, Pfeile). Klathrin (5 nm Goldpartikel, Pfeilspitzen) markiert die Trans-Seite des Golgi-Apparates. Die Mid/Trans-Lokalisation von 2-OST wird bestätigt. Rechts: Markierung der den Golgi-Apparat auf der Cis- und Trans-Seite begrenzenden Membranen, sowie der an 2-OST gebundenen Goldpartikel.

Eine Serie von 19 TEM-Aufnahmen wurde hinsichtlich der relativen Position der 2-OST-Markierungen entlang der Cis-Trans-Achse der jeweiligen Golgi-Apparate analysiert, um eine statistisch signifikante Aussage über die Lokalisation des Enzyms treffen zu können. Zu diesem Zweck wurde in jeder Aufnahme manuell jeder Goldpartikel und, nach Betrachtung der Klathrin-Markierung, die äußerste Membran der Cis- bzw. der Trans-Seite des Golgi-Apparates markiert (Abb. 3.3.13). Mit dem Programm Matlab wurden die kürzesten Abstände jedes 2-OST-Punktes zu diesen begrenzenden Membranen berechnet. Anschließend wurde die Distanz von 2-OST zur Cis-Seite auf die gesamte Cis-Trans-Erstreckung des Golgi-Apparates an dieser Stelle normiert. Der so erhaltene Wert zwischen null und eins wurde als relativer Lokalisationsparameter für die statistische Auswertung verwendet (Abb. 3.3.14). Einige Datenpunkte die jenseits der Trans-Membran lagen (wahrscheinlich im TGN) wurden außer Acht gelassen, da ihre relative Lage nur schwer objektiv erfassbar gewesen wäre. Das Ergebnis der Statistik ist daher leicht in Cis-Richtung verfälscht.

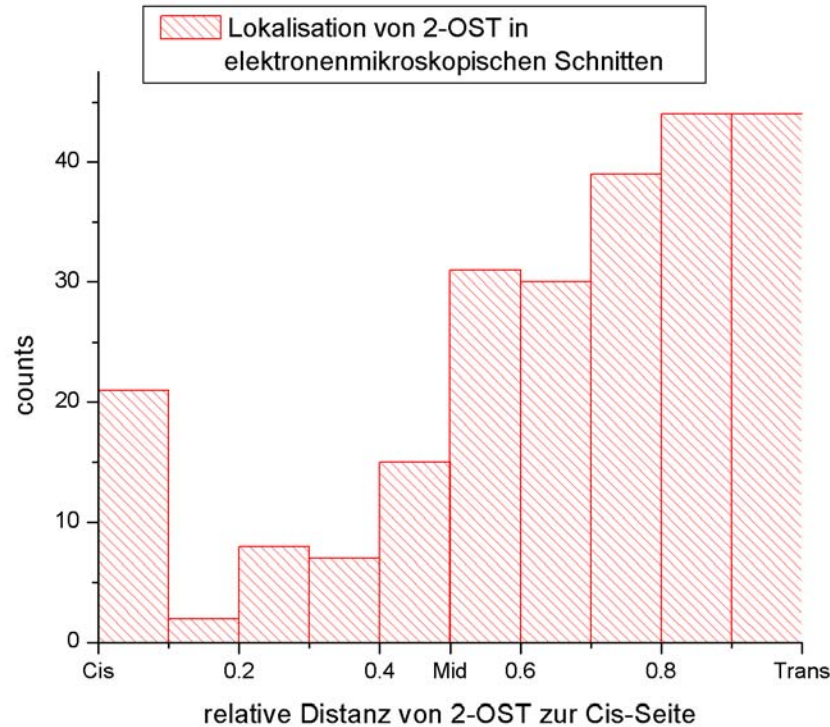


Abb. 3.3.14: Histogramm der Lokalisation von 2-OST. Die relative Distanz von Immunogold-Markierungen (10 nm Goldpartikel) zur ersten Golgi-Membran auf der Cis-Seite wurde ermittelt. Deutlich ist ein in Trans-Richtung ansteigender Konzentrations-Gradient erkennbar.

Dennoch zeigt die Statistik deutliche Präferenz der 2-OST-Lokalisation in Trans-Golgi-Richtung. Wie für ein Golgi-Enzym zu erwarten war, ist seine Verteilung nicht auf eine oder zwei Cisternen begrenzt, sondern folgt einem von Cis nach Trans ansteigenden Konzentrationsgradienten. Auch die relativ hohe Streuung der 4Pi-mikroskopischen Distanzanalysen findet in den EM-Daten eine Bestätigung und ist daher als nicht methodenimmanent zu betrachten.

Wie auch in der Statistik zu erkennen ist, wiesen die analysierten Golgi-Apparate zwar immer größtenteils Goldmarkierungen im Trans-Bereich auf, häufig aber auch einige Markierungen unmittelbar am Cis-Ende. Es ist bekannt, dass die Enzyme des Golgi-Apparates zwecks fortlaufender Qualitätskontrolle kontinuierlich ins ER resorbiert und aus diesem wieder exportiert werden [71, 72]. Daher ist denkbar, dass die Cis-nahen 2-OST-Markierungen Proteinen auf dem Weg vom ER zum Mid-/Trans-Golgi entsprechen. Da die Statistik aber keinen homogenen Hintergrund zeigt, sondern eine deutliche Anreicherung von 2-OST im äußersten Cis-Bereich und damit der Grenze zwischen Cis-Golgi und Cis-Golgi-Netzwerk (CGN), muss dieser Theorie folgend davon

ausgegangen werden, dass Enzyme während des Transportes zum Golgi-Apparat im CGN angereichert werden, bevor der weitere Transport in Trans-Richtung erfolgt. Von einer solchen Beobachtung wurde bislang zwar nicht berichtet, dies mag aber auch eine Folge der begrenzten Auflösung herkömmlicher Fluoreszenzmikroskope sein.

Nach dem heute weitgehend akzeptierten Cisternen-Reifungs-Modell [59, 73] wäre ein solches Verhalten vorstellbar. Falls Vesikel innerhalb des Golgi-Apparates Enzyme auch anterograd transportieren, könnten sich Trans-Enzyme während der Fusion intermediärer Kompartimente zu einer neuen Cis-Cisterne geringfügig anreichern, bevor sie über Vesikel (oder, einem anderen Modell zufolge, über kurzlebige tubuläre Verbindungen [25]) zum Trans-Golgi-Apparat transportiert werden.

3.4. Transport von VSVG

Die infolge der MMM-4Pi-Abbildungstechnik gesteigerte Aufnahmegeschwindigkeit macht die Beobachtung dynamischer Prozesse in der lebenden Zelle möglich. Um den anterograden Stofftransport durch den Golgi-Apparat zu untersuchen wurde ein GFP-Hybrid von VSVG (*Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein*) gemeinsam mit GalT-vYFP in Cos7-Zellen kotransfiziert und die Zellen bei 40°C über Nacht inkubiert. Bei dieser Temperatur liegt VSVG fehlgefaltet vor, wird im Endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten und reichert sich daher dort an. Vor der Aufnahme erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 33 µM Nocodazol (90 min), um den Zerfall des Golgi-Apparates zu zahlreichen Ministacks auszulösen, und mit 400 nM Jasplakinolid (30 min) zur Abflachung der Zelle durch die Bindung und Stabilisierung von F-Aktin. Unmittelbar vor Aufnahmebeginn wurden die Zellen dem 40°-Milieu entnommen, auf einen Objektträger aufgebracht und schnellstmöglich mikroskopiert (siehe Zeitleiste in Abb. 3.4.01). Die Versiegelung der Probe, der Einbau ins Mikroskop und die Justage der Fokusse nahm typischerweise etwa dreieinhalb Minuten in Anspruch.

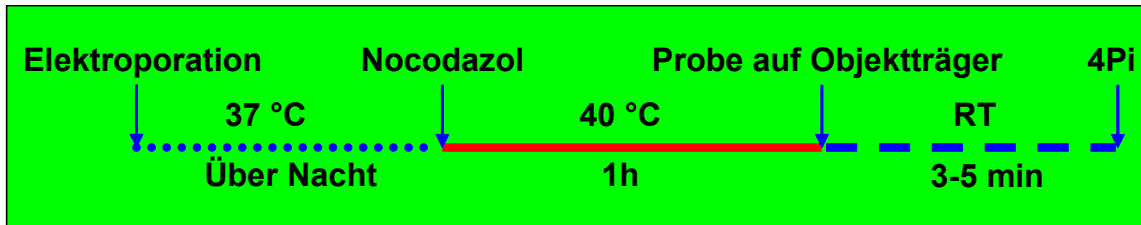


Abb. 3.4.01: VSVG-Puls-Protokoll. VSVG-GFP wird nach Elektroporation über Nacht exprimiert und danach für eine Stunde bei 40°C im ER angereichert. Zeitgleich mit dem Aufbringen der Probe auf den Objektträger beginnt die Freisetzung von VSVG, welches typischerweise drei bis fünf Minuten für den Transport zum Golgi-Apparat benötigt. In dieser Zeit wird die Probe in das Mikroskop eingebracht und dieses feinjustiert.

VSVG wird nach Lösen des 40°C-Blocks in Form eines Konzentrations-Pulses zum Golgi-Apparat transportiert und erreicht diesen nach fünf bis zehn Minuten. Innerhalb weiterer 25 bis 30 Minuten durchquert der Puls die Cisternen, wonach VSVG in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert wird. Die Gegenfärbung mit GalT-vYFP ermöglichte erstens die Verfolgung der relativen Position und Bewegung des VSVG-Pulses und zweitens der strukturellen Veränderung des Trans-Golgi-Kompartimentes in Reaktion auf dessen Ankunft.

Es wurden alle 90 Sekunden Aufnahmestapel von in der Regel 30 Bildebenen gemacht. Aufgrund des Bleichens der Probe waren im Höchstfall neun aufeinander folgende Aufnahmen möglich, was ausreichte, das Durchqueren des Trans-Golgi-Apparates weitgehend darzustellen. Es konnten keine einzelnen intermediären Kompartimente oder Vesikel beobachtet werden. Die Ankunft des Pulses im Golgi-Ministack äußerte sich durch ein dort plötzlich auftauchendes und rasch anwachsendes VSVG-GFP-Signal in unmittelbarer Nähe zur GalT-vYFP-Markierung. Entgegen der Erwartung lagen aber in den meisten Fällen entweder beide Signale bereits zu Beginn der Aufnahmen vor, oder es konnte eine deutliche, gleichzeitige Intensitätszunahme beider Signale beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Transport von GalT aus dem Zentralbereich der Zelle zu den peripheren Ministacks noch nicht beendet war und gleichzeitig mit dem Transport von VSVG stattfand.

Aus Aufnahmeserien mit jeweils neun zeitlich aufeinander folgenden Bildstapeln wurde der Transport durch zwölf individuelle Ministacks analysiert. Es wurden große individuelle Unterschiede hinsichtlich der Transportdynamik gefunden. Der einfachste zu erwartende Fall – eine Annäherung beider Signale, ihre gegenseitige Durchdringung bei maximaler Kollokalisierung und eine anschließende Entfernung – wurde nicht beobachtet.

In vier Ministacks war gar keine Veränderung des Abstandes beider Signale erkennbar und die Form beider Signale blieb weitgehend punktförmig. Der Abstand der Signale zueinander war dabei sehr variabel und reichte von fast vollständiger Kolokalisation von der ersten bis zur letzten Aufnahme bis zu Abständen von 200-300 nm. Dagegen bewegten sich beide Signale koordiniert um Distanzen bis über 1 μm , teils linear, teils in zwei Phasen mit deutlichem Richtungswechsel. Auf diesen Fall der Transportdynamik wird in der Diskussion (Kapitel 4.3.1) näher eingegangen.

In weiteren vier Fällen lässt sich eine komplexe Dynamik der jeweiligen Umrisse, des Abstandes und des Kolokalisationsgrades erkennen, die wenig gerichtet erscheint. Annäherung, Durchdringung und Entfernung der Signale sind dabei in einigen Fällen als Tendenzen erkennbar, aber zu einer auch nur annähernd hundertprozentigen Kolokalisation kommt es zu keinem Zeitpunkt. Auch in diesen Fällen weisen beide Signale Bewegungen auf, die weniger synchron und weniger weit verlaufen als oben beschrieben. Aber auch hier zeigt sich eine lineare Ausrichtung der Bewegung, oder wiederum ein abrupter Richtungswechsel nach wenigen Minuten.

3.4.1. Das Trans-Golgi-Kompartiment reagiert auf den VSVG-Puls

Neben einigen Ministacks, bei denen, je nach Lage des Aufnahmeintervalls, nur der unmittelbare Beginn oder das Ende des Transportprozesses in wenigen Aufnahmen erfasst wurde, gibt es vier Ministacks, bei denen der Transport – definiert durch ein Anfangsstadium mit getrennten Signalen, einen Zeitraum maximaler Kolokalisation und ein anschließendes Auseinanderlaufen der Signale – ganz oder weitgehend dokumentiert werden konnte. Bei dreien davon geht die Deckung der beiden Signale (also die Ankunft von VSVG im Trans-Golgi) mit einer deutlichen Elongation des GalT-Signals einher.

Abbildung 3.4.02 zeigt einen Golgi-Ministack zu sechs Zeitpunkten, entnommen aus einer Sequenz von neun aufeinanderfolgenden Aufnahmen, bei dem die beiden Signale – VSVG und GalT – anfangs deutlich getrennt und annähernd sphärisch vorliegen (T = 7:50 min nach Start des VSVG-Pulses). Bei T = 11:00 min sind beide Signale weitgehend deckungsgleich und die Verteilung von GalT beginnt sich zu verformen. VSVG ist nach T = 12:40 Minuten als ein zentrales Intensitätsmaximum mit zwei flankierenden, dunkleren und damit weniger konzentrierten Bereichen zu sehen, wobei die Erstreckung der gesamten Verteilung sich weitgehend mit der von GalT deckt. Bei

T = 14:20 Minuten ist VSVG über den gesamten, nun maximal elongierten von GalT markierten Bereich verteilt, weist aber nach wie vor ein sehr deutliches, annähernd sphärisches Intensitätsmaximum auf, an dem sich das GalT-Signal entlangbewegt. Nach T = 15:55 Minuten teilt sich GalT in zwei durch einen dünnen Tubulus verbundene Domänen auf, von denen eine in etwa mit der Ausgangsposition von GalT identisch ist, während die andere, deutlich größere und intensivere, nun jenseits des VSVG-Signals liegt. Innerhalb der nächsten zwei Minuten verschwindet der Rest des ursprünglichen GalT-Signals völlig, während die neue Domäne bestehen bleibt und nun deutlich getrennt vom VSVG-Signal vorliegt (T = 17:30 min).

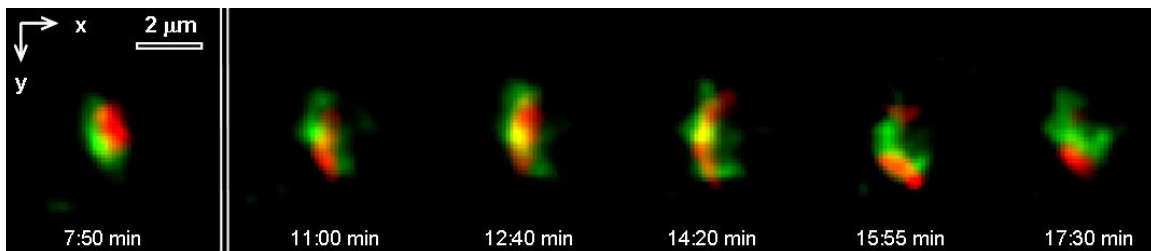


Abb. 3.4.02: Transport von VSVG (grün) relativ zum Trans-Golgi-Marker GalT (rot) in Cos7-Zellen. VSVG zeigt erheblich weniger Dynamik als GalT, dessen Verteilung nach etwa dreizehn Minuten deutlich elongiert und sich an dem Bereich größter VSVG-Konzentration vorbeibewegt. Nach etwa sechzehn Minuten sind zwei GalT-markierte Bereiche erkennbar, von denen der untere, jenseits des VSVG-Signals, an Intensität gewinnt, während der obere allmählich verschwindet. Die VSVG-Verteilung bleibt kompakter. Zwar ist auch hier eine Streckung erkennbar, aber die peripheren Bereiche weisen eine deutlich niedrigere Intensität und damit auch eine geringere Konzentration auf.

In der Analyse des Koloalisationsgrads von VSVG (C_{VSVG}) spiegelt sich dieses Verhalten wieder (Abb. 3.4.03). C_{VSVG} wird berechnet wie folgt:

$$C_{VSVG} = \frac{\sum_j B_j}{\sum_i A_i} = \frac{\text{kolokalisiertes Volumen}}{\text{Gesamtvolumen (VSVG)}} \quad (\text{nach Intensitäten gewichtet})$$

Dabei sind A_i und B_j die Intensitäten der Pixel i bzw. j aus der Verteilung von VSVG (A) bzw. dessen Schnittmenge (B) mit der Verteilung von GalT. C_{VSVG} gibt also den nach Intensitäten gewichteten Anteil des Volumens der VSVG-Verteilung an, der mit der Verteilung von GalT überlappt.

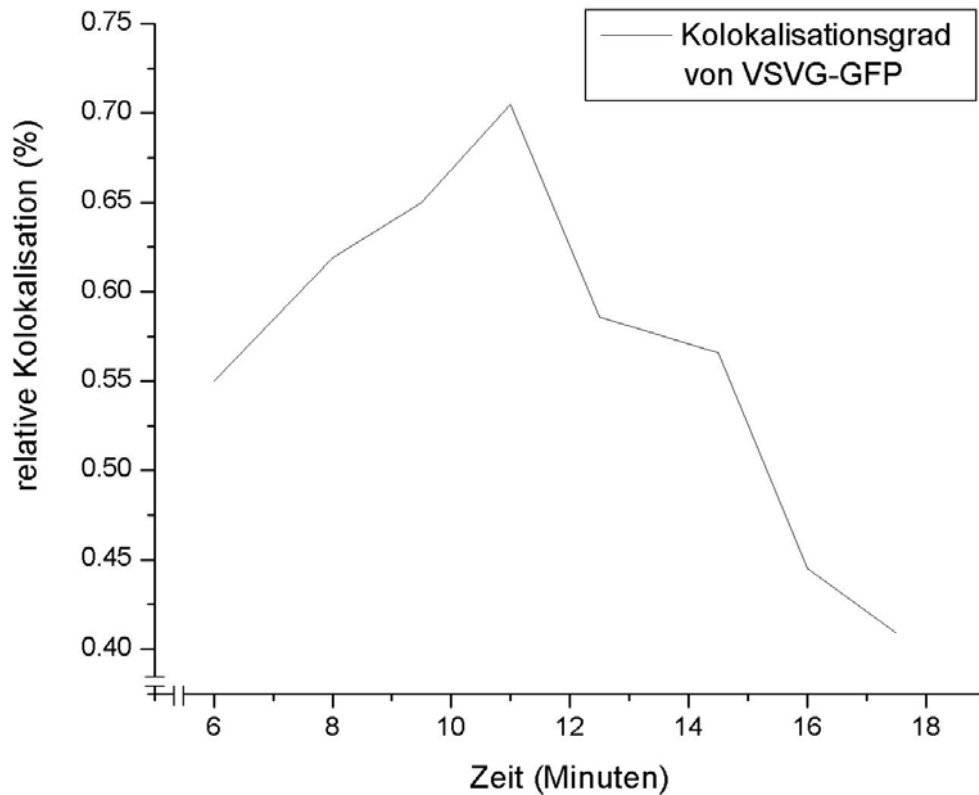


Abb. 3.4.03: Verlauf der Kolokalisation von VSVG und GalT. In acht aufeinanderfolgenden Aufnahmen im zeitlichen Abstand von jeweils 90 Sekunden wurde der Grad der Kolokalisation des VSVG-GFP-Signals mit GalT-vYFP, also der Anteil deckungsgleichen Volumens relativ zum VSVG-Gesamtvolumen berechnet und nach Intensität gewichtet. Maximale Kolokalisation zeigt sich elf Minuten nach Beginn des VSVG-Exports aus dem ER. Nach 18 Minuten beträgt die Deckung nur noch 40%. Demnach ist VSVG zu diesem Zeitpunkt bereits dabei, das TGN zu verlassen.

Aufgrund der Unterschiedlichkeit in der Transportkinetik selbst benachbarter Ministacks in derselben Zelle sind diese Resultate schwierig zu interpretieren. Vorläufig bleibt im Wesentlichen festzustellen, dass in keinem einzigen Fall eine auch nur annähernd vollständige Kolokalisation von GalT und VSVG beobachtet werden konnte. Sowohl Vesikel-basierte Transportmodelle als auch das klassische Cisternen-Reifungs-Modell gehen aber – innerhalb einer individuellen Cisterne - von einer ubiquitären Verteilung sowohl der Enzyme als auch der transportierten Proteine aus. Während des anterograden Proteintransportes (Vesikel-Transport-Modell) oder des retrograden Enzymtransportes (Cisternen-Reifungs-Modell) müsste es demnach zwangsläufig zu einer Phase (fast) vollständiger Kolokalisation kommen. Dass dies nicht der Fall ist, könnte auf eine Inhomogenität der Verteilung von Enzymen oder transportierten Proteinen hindeuten.

4. Diskussion

4.1. 4Pi-CLEM

Mit dem TEM und dem MMM-4Pi-Mikroskop korrelativ abgebildete Strukturen können nicht ohne weiteres verglichen werden, da sich die Vorgehensweise der dreidimensionalen Bildrekonstruktion in beiden Fällen grundlegend unterscheidet.

Zur Rekonstruktion von Strukturen aus TEM-Aufnahmen wird der Verlauf kontrastierter Membranen nachgezeichnet. Es werden dabei nur Kompartimente einbezogen, die eine spezifische Immunogoldmarkierung (in diesem Fall für PC3) aufweisen. So entstehen serielle Schnittebenen durch Strukturen, deren Umrisse klar definiert sind. Informationen über die Konzentrationsverteilung des markierten Proteins enthalten sie nicht. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen stellen dagegen die mit der jeweiligen PSF gefaltete Verteilung von Fluorophoren dar. Sie weisen daher komplexe, konzentrationsabhängige Intensitätsverteilungen auf.

Zur Definition der Oberflächen lichtmikroskopisch abgebildeter Strukturen wird meist ein willkürlich gewählter, über das gesamte Bildfeld konstanter Schwellenwert angelegt. Dies dient in der Regel mehr der optischen Aufbereitung von Aufnahmen als der Bestimmung der tatsächlichen Dimensionen von Strukturen. Eine objektivere Methode bestimmt den Schwellenwert anhand des Histogramms der Bildintensitäten. Sie dient der automatischen Selektion einzelner Strukturelemente aufgrund von Besonderheiten ihrer Morphologie oder ihrer typischen Signalintensität [74], oder der objektiven Trennung von Hintergrund und Signal [75]. Auch hier ist der Schwellenwert aber über das gesamte Bildfeld konstant und verzerrt daher die Dimensionen unterschiedlich heller Strukturelemente.

Die Definition von Oberflächen mit Hilfe der Wendepunkte der Intensitätsverteilung, bestimmt über die Nullstellen ihrer zweiten partiellen Ableitung in allen drei Raumrichtungen, ist dagegen intensitätsunabhängig. Nach der Bestätigung dieser Methode durch den Vergleich mit dreidimensionalen Rekonstruktionen aus TEM-Aufnahmen ist nun eine zuverlässige Bestimmung der Oberflächen lichtmikroskopisch aufgenommener Strukturen möglich. Damit können Abstände und Kollokalisationsgrade wesentlich präziser bestimmt werden, als zuvor.

4.1.1. Strukturelle Validität der 4Pi-mikroskopischen 3D-Rekonstruktionen

Während die weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse aus 4Pi- und Transmissionselektronenmikroskopie unmittelbar erkennbar ist, bedürfen die nichtsdestotrotz vorhandenen Unterschiede und ihre Ursachen einer näheren Betrachtung. Um abzuwägen, ob einer der beiden Methoden dabei eine größere Zuverlässigkeit bei der dreidimensionalen Bildgebung zugeordnet werden kann, und wenn ja, welcher, werden im Folgenden die möglichen Fehlerquellen untersucht. Diese liegen für das MMM-4Pi-Mikroskop bei der im Vergleich zum TEM geringeren Auflösung sowie dem Bleichen während der Aufnahme und der Entfaltung. Die Rekonstruktion aus TEM-Aufnahmen dagegen bedingt die Einbettung der Probe in Harz, das Schneiden ultradünner Schichten und die manuelle Markierung von Strukturen. Vor der dreidimensionalen Rekonstruktion müssen zudem die einzelnen Schnittebenen relativ zueinander ausgerichtet werden.

Die unterschiedliche Auflösung der beiden Methoden führt insbesondere bei feinen strukturellen Details naturgemäß zu Unterschieden in der Rekonstruktion. Um zu demonstrieren, dass es darüber hinaus nur unwesentliche Unterschiede in den ermittelten Strukturen gibt, wurden exemplarisch die TEM-Daten von Ministack MS02 (siehe Ergebnisse, Abb. 3.2.05 bis 3.2.09) mit einer PSF gefaltet, die jener der entfalteten 4Pi-Daten entspricht (siehe Material und Methoden, Abb. 2.04, effektive 4Pi-PSF). Auflösungsbedingte Unterschiede konnten so herausgerechnet werden.

Abbildung 4.01 zeigt die weitgehende Übereinstimmung der beiden Rekonstruktionen. Der Grad der Korrelation wurde wie folgt berechnet [76]:

$$C_{korr} = \frac{\sum_i A_i \cdot B_i}{\sqrt{\sum_i A_i^2} \cdot \sqrt{\sum_i B_i^2}}$$

Dabei sind \mathbf{A}_i und \mathbf{B}_i die Intensitäten korrespondierender Pixel i in den Aufnahmen \mathbf{A} (4Pi) und \mathbf{B} (mit effektiver 4Pi-PSF gefaltete EM-Aufnahme).

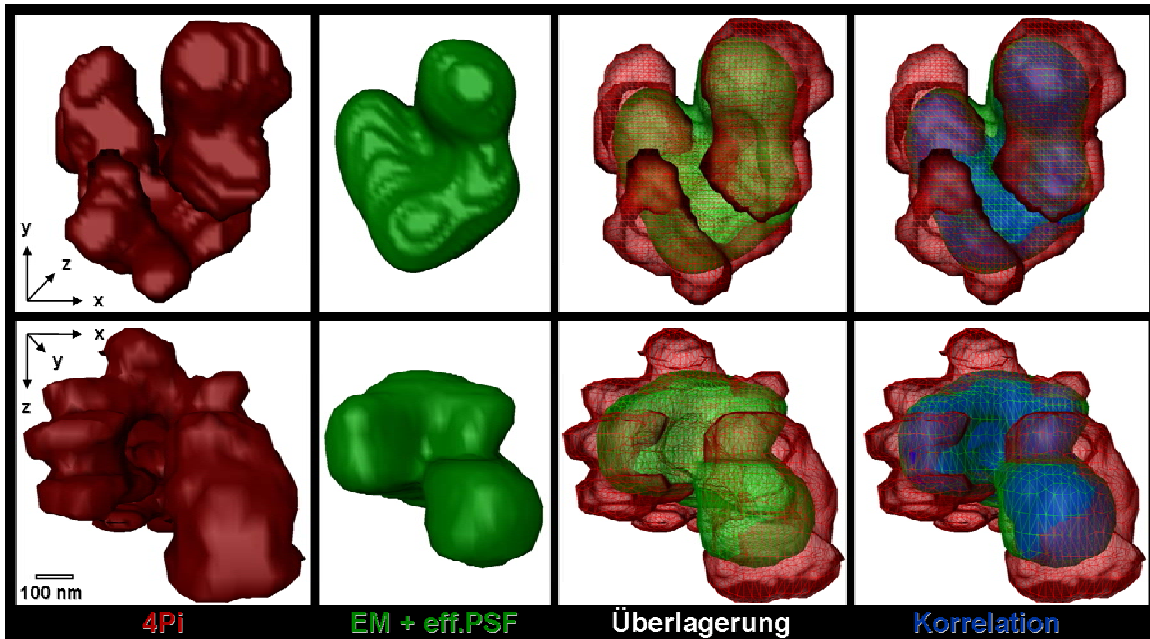


Abb. 4.01: Dreidimensionale Rekonstruktion eines Golgi-Ministacks (MS01): 4Pi-Aufnahme (rot), EM-Schnitte gefaltet mit der effektiven 4Pi-PSF (grün). Der Bereich, in dem beide Rekonstruktionen überlappen, ist blau dargestellt. Da in EM-Aufnahmen die Information über die Konzentrationsverteilung des markierten Proteins (PC3-GFP) weitgehend verloren geht, wurde näherungsweise von einer homogenen Verteilung ausgegangen. Die EM-Rekonstruktion weist daher eine deutlich glattere, unmodulierte Struktur auf.

Die mit den beiden Methoden ermittelten Strukturen stimmen zu **80%** überein. In die Berechnung dieses Wertes gehen einige Näherungen ein:

- Die beiden Rekonstruktionen wurden per Rotation und Translation aneinander ausgerichtet. Die Ausrichtung ist zweifellos gut, möglicherweise aber nicht ideal, so dass ein kleiner Fehler in der Ausrichtung nicht ausgeschlossen werden kann.
- Die PSF, mit der die EM-Aufnahmen gefaltet wurden, wurde simuliert, da die effektive PSF der 4Pi-Aufnahmen nicht exakt bestimmt werden kann. Sie stimmt in ihrer Halbwertsbreite in allen Raumrichtungen mit jener der 4Pi-PSF überein, ist aber zwangsläufig nicht exakt identisch.
- Aufgrund der für Immunogold-Färbungen typischen eher sporadischen Markierung von PC3 in den EM-Aufnahmen kann nicht mit Sicherheit auf dessen Verteilung geschlossen werden. Es wurde daher angenommen, dass PC3 im Ministack weitgehend homogen verteilt ist. Die 4Pi-Aufnahme weist keine

extremen Intensitätsschwankungen auf, was auf eine gleichmäßige Konzentrationsverteilung hinweist. Dennoch ist sie nur in erster Näherung homogen, was bei der Berechnung des Korrelationsgrades zu unvermeidlichen Unterschieden führt.

- Alle Strukturen, in denen PC3-Markierungen vorkamen, wurden gleichwertig in die Rekonstruktion einbezogen. Ihre mit Osmiumoxid kontrastierten Membranen wurden zur Bestimmung der strukturellen Grenzen verwendet. Dies ist das einzig adäquate Mittel zur Strukturbestimmung aus EM-Aufnahmen, entspricht aber nicht notwendigerweise der Verteilung der Fluorophore.

Diese notwendigen Näherungen tragen zu einem gewissen Teil zu den 20% Unterschied zwischen den beiden Rekonstruktionen bei. Vor diesem Hintergrund ist eine Übereinstimmung von 80% als signifikant zu werten. Dennoch existieren offensichtlich auch geringfügige strukturell bedingte Unterschiede zwischen den beiden Rekonstruktionen. Die den beiden Methoden immanenten potentiellen Ursachen für diese werden im folgenden diskutiert:

- Starkes Bleichen während der Aufnahme kann im 4Pi-Mikroskop dazu führen, dass die Probe bei der Rasterung in Z schon während der Anregung mit dem ersten Nebenmaximum der Beleuchtungs-PSF an Intensität verliert, was in der Detektion ein entsprechend niedrigeres Hauptmaximum zur Folge hat. Damit ist die Abbildung nicht mehr eindeutig bestimmt. Über Graufilter im Strahlengang des Anregungslasers wurde aber die Beleuchtungsintensität kontrolliert, so dass bei zwei konsekutiven Aufnahmen das Bleichen insgesamt nur maximal 20% betrug. Diese Fehlerquelle kann daher ausgeschlossen werden.
- Für eine zuverlässige Entfaltung der 4Pi-Daten muss die Invarianz der PSF über den gesamten Aufnahmebereich gewährleistet sein. Lokale Unterschiede des Brechungsindex innerhalb der Zelle, etwa durch inhomogene Proteinverteilungen oder den Zellkern, können zu einer Verschiebung der Phasenbeziehung während der Rasterung in Z führen. Dies ist im gegenwärtigen Fall allerdings ohne Bedeutung, da die PSF für jeden Ministack anhand dünner Strukturelemente individuell ermittelt wurde. In allen untersuchten Fällen war die jeweilige PSF über die gesamte räumliche Ausdehnung des Ministacks konstant.

- Zur Präparation für die Elektronenmikroskopie wurden die Zellen nach der Goldfärbung nachfixiert, entwässert, in Harz eingebettet und geschnitten. Diese Methode ist ein für TEM-Untersuchungen üblicher Standard, aber nicht ganz frei von Artefakten, wie Abb. 4.02 zeigt. Im Vergleich einer DIC-Aufnahme vor und einer TEM-Aufnahme nach der Präparation ist der Umriss der Zelle zwar fast identisch (Unterschiede dürften von der Position und Orientierung des nur 70nm dicken Schnitts herrühren), aber am Kern ist eine deutliche Verfaltung erkennbar. Auch wenn man annimmt, dass die relativ kompakten Ministacks nach Fixierung mit Glutaraldehyd (Vernetzung von Proteinen) und Osmiumtetroxid (Vernetzung von Lipiden und damit Stabilisierung von Membranen) besser erhalten sind, kann eine Verzerrung von Strukturelementen während des Entwässerns und/oder Schneidens nicht ausgeschlossen werden. Auch können beim Schneiden geringfügige Schwankungen der Schnittdicke auftreten, die zu leichten Verzerrungen in Z-Richtung führen können.

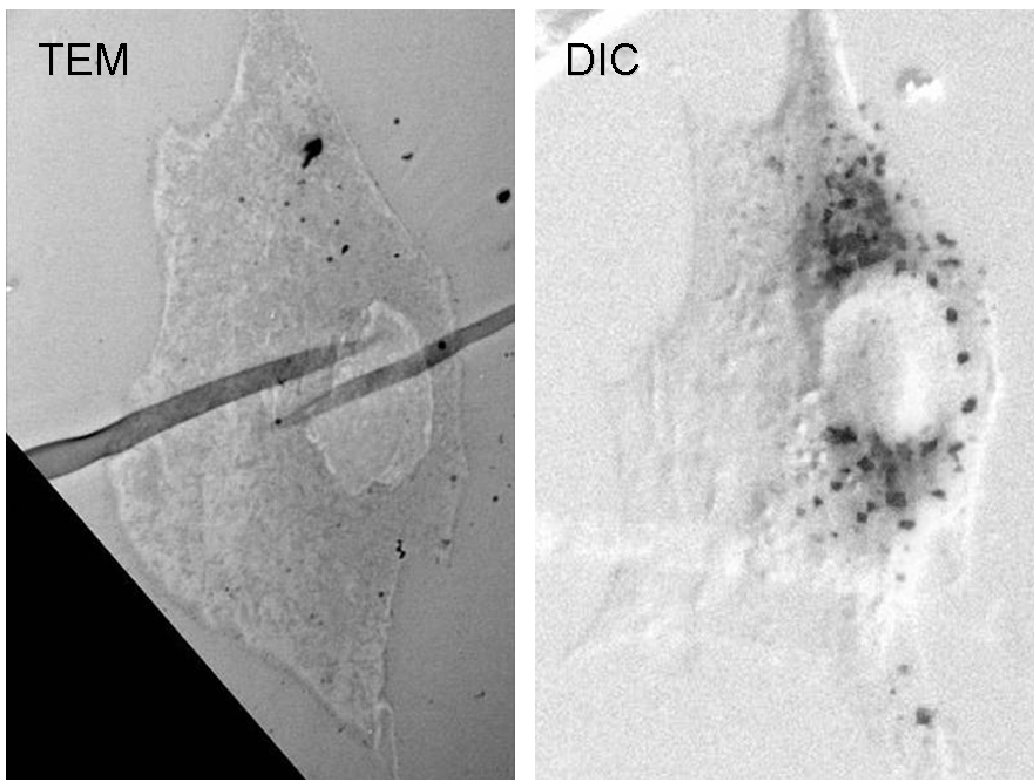


Abb. 4.02: Korrelative Aufnahmen derselben Zelle. Links TEM, rechts DIC, überlagert mit einer Epifluoreszenzaufnahme, in der die Ministacks als dunkle Punkte zu erkennen sind. Nach Präparation für das Elektronenmikroskop sind einige strukturelle Veränderungen erkennbar, besonders deutlich am geschrumpften, gefalteten Zellkern.

- Ähnliches gilt für die Ausrichtung der Schnittebenen. Aufgrund der Teils erheblichen morphologischen Veränderungen der Subkompartimente des Golgi-Apparates über zwei aufeinanderfolgende Schnitte hinweg fließt in die Ausrichtung der Schnitte ein gewisses Maß an Subjektivität mit ein. Das sukzessive Ausrichten der seriellen Schnitte kann über den gesamten Bildstapel hinweg durchaus eine Torsion der gesamten Struktur zur Folge haben.
- Ein weiterer Unterschied beider Methoden liegt in der Art der Markierung: Während die Lichtmikroskopie unmittelbar die der Fluorophorkonzentration proportionale Intensität darstellt, was aufgrund der Faltung des Objekts mit der PSF zu Beginn erläuterte Problem der Bestimmung des Schwellenwertes aufwirft, muss bei TEM-Aufnahmen aufgrund einer Markierung mit Goldpartikeln entschieden werden, welche Strukturelemente zu dem untersuchten Objekt gehören, und welche nicht. Die Unterscheidung zwischen spezifisch und unspezifisch gebundenen Antikörpern ist dabei recht subjektiv. Daher und weil sich Konzentrationsunterschiede nicht sonderlich deutlich in der Markierung widerspiegeln, können Strukturelemente übersehen oder irrtümlich mit in die Rekonstruktion aufgenommen werden.

Insgesamt folgt aus dieser Betrachtung, dass beim Vergleich der Methoden keineswegs die TEM-Rekonstruktion als reales Maß gelten kann, anhand derer sich die 4Pi-Rekonstruktion messen lassen muss. Vielmehr fließen potentielle Fehlerquellen beider Methoden in den Vergleich ein. Das große Maß an Übereinstimmung bestätigt nicht nur die 4Pi-Mikroskopie, sondern beide Methoden als strukturell gleichermaßen valide. Wo die Hochauflösung des TEMs nicht zwingend notwendig ist, hat das MMM-4Pi-Mikroskop aufgrund der einfacheren Handhabung und Probenpräparation und nicht zuletzt durch die Möglichkeit, lebende Zellen abzubilden, klare Vorteile. Dieser Punkt ist besonders für Untersuchungen dynamischer Prozesse wichtig, da mit dem 4Pi-Mikroskop die Veränderung einer einzelnen Struktur beobachtet werden kann, statt wie mit dem TEM unterschiedliche, zu verschiedenen Zeitpunkten fixierte Objekte vergleichen zu müssen.

Die vergleichsweise hohe Aufnahmegeschwindigkeit des MMM-4Pi-Mikroskops eröffnet in Korrelation mit dem TEM allerdings noch eine weitere Möglichkeit. Da seit der Entdeckung des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) und der Herstellung seiner zahlreichen Derivate die lebende Zelle mehr und mehr in den Fokus lichtmikroskopischer Untersuchungen gerückt ist, werden korrelative Ansätze verstärkt genutzt, um die zeitliche Auflösung der Lichtmikroskopie mit der räumlichen Hochauflösung des TEM zu verbinden [12, 13]. Bei dieser Vorgehensweise werden zunächst Prozesse in lebenden Zellen lichtmikroskopisch beobachtet. Zum geeigneten Zeitpunkt werden die Zellen fixiert und als Momentaufnahme mit dem TEM hochaufgelöst abgebildet, um etwa bei Transport-, Teilungs- oder Fusionsprozessen den entscheidenden Zeitpunkt exakt abpassen und dann im Detail untersuchen zu können. Die große „Auflösungslücke“ zwischen CLSM und TEM erschwert dabei natürlich die Arbeit, da z.B. bei Fusionen die Unterschreitung der beugungsbedingt auflösbaren Distanz die Bestimmung des genauen Zeitpunktes, zu dem fixiert werden sollte, unsicher macht. Eine erhöhte Auflösung mittels 4Pi-Mikroskopie könnte in korrelativer Anwendung zu präziseren Resultaten führen.

4.2. Distanzanalyse

4.2.1. Die Reihenfolge der analysierten Enzyme in der Glykosylierungskette

Aufgrund der starken gegenseitigen Abhängigkeit von Struktur und Funktion des Golgi-Apparates muss eine Bestimmung der räumlichen Abfolge der Verteilungsschwerpunkte von Enzymen entlang der Cis-Trans-Achse immer auch in den jeweiligen biosynthetischen Kontext eingeordnet und auf Stimmigkeit in Bezug auf ihre Position innerhalb der Kette von Proteinmodifikationen untersucht werden.

Mannosidase II und UDP-galaktosyl: Glykoprotein,1,4- β -Galaktosyltransferase (GalT) sind Teil eines umfangreichen, im ER und im Golgi-Komplex lokalisierten Glykosylierungsapparates. Dabei fällt zunächst mannosereichen Asparagin-gebundenen Oligosacchariden im ER eine wesentliche Funktion bei der Qualitätskontrolle von Proteinen vor dem Export zu [36, 77]. Im Laufe dieses Prozesses werden die

Zuckerreste im ER in Abhängigkeit vom Faltungszustand der betreffenden Proteine Schritt für Schritt wieder verkürzt [37, 78]. Dieser Prozess setzt sich bis in den Golgi-Apparat hinein fort und endet durch die Entfernung zweier weiterer Mannosereste durch Mannosidase II [79]. Die sukzessive, erneute Elongation der Oligosaccharide, beispielsweise in Form der N-Glykosylierung durch Galaktosyltransferase, baut auf diesen Kürzungen auf und ist von ihnen abhängig. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Schwerpunkte der Verteilungen von MannII und GalT entsprechend ihrer sequentiellen Wirkungsweise auch in unterschiedlichen Subkompartimenten entlang des biosynthetischen Pfades vorliegen, MannII im Mid- und GalT im Trans-Golgi und im TGN [56].

Uronyl-2-O-Sulfotransferase ist Teil der Heparansulfat-Biosynthese und in dieser Funktion einer Reihe anderer Golgi-Enzymen nachgeschaltet. Vor der 2-O-Sulfatierung wirken die Enzyme GalTI (nicht zu verwechseln mit dem in dieser Arbeit untersuchten Trans-Golgi-Marker UDP-GalT) und GlcATI, welche Serin-gebundene Polysaccharidketten modifizieren und verlängern. Fluoreszenzmikroskopische Korrelationsstudien zeigten eine nur teilweise Überlappung von GalTI mit dem Mid-Golgi-Marker MannII und deuten daher auf eine Cis-Lokalisation dieses Enzyms hin, während das innerhalb der Biosynthese später agierende GlcATI mit MannII kolokalisiert und entsprechend dem Mid-Golgi zuzurechnen ist [58]. Nach weiteren Modifikationen der Polysaccharidkette (Deacetylierung und N-Sulfatierung) wandelt Glucuronyl C5-Epimerase D-Glukuronsäurereste zu L-Iduronsäure um. 2-OST stabilisiert diese Epimerisierung durch eine Sulfatierung an der C2-Position der L-Iduronsäuren [57]. Beide Enzyme bilden offenbar Heterodimere, was eine nahtlose sequentielle Abfolge dieser beiden Schritte garantiert. *Pinhal et al.* zufolge kolokalisieren auch diese beiden Enzyme mit MannII, während in anderen Quellen von einer Cis-Mid-Lokalisation ausgegangen wird [11]. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der nacheinander agierenden Enzyme GalTI und GlcATI und der weiteren, zwischen diese und den Epimerase/2-OST-Komplex geschalteten Enzyme erscheint die durch Distanzanalysen mit dem MMM-4Pi-Mikroskop ermittelte Lokalisation von 2-OST im Mid- / Trans-Golgi aber wahrscheinlicher und biochemisch sinnvoller. Die scheinbare Kolokalisation mit MannII bei *Pinhal et al.* dürfte auf die bei Verwendung herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie unvermeidlichen auflösungsbedingten Beschränkungen der

Genauigkeit zurückzuführen sein, schließlich überlappen sich beide Verteilungen weitgehend und unterscheiden sich im Mittel nur um wenige zehn Nanometer.

Bezüglich der ermittelten Reihenfolge der drei Enzyme muss einschränkend bemerkt werden, dass leichte Unterschiede in der Lokalisation je nach Zelltyp beobachtet wurden [80]. Insbesondere angesichts der sehr geringen mittleren Distanz zwischen den Verteilungen von MannII und 2-OST und da es keine funktionalen Beziehungen zwischen beiden Enzymen gibt, mag sich der Abstand oder sogar die Reihenfolge in anderen Zelltypen anders darstellen.

4.2.2. Beeinflusst die Überexpression von Fusionsproteinen ihre Lokalisation ?

Bei allen Analysen der Verteilung fluoreszenter Fusionsproteine muss die Möglichkeit einer Abweichung vom Verhalten der endogenen Wildtypen in Betracht gezogen werden. Um zu demonstrieren, wie wenig wahrscheinlich das Auftreten solcher Artefakte im gegenwärtigen Fall ist, werden im Folgenden die strukturellen Besonderheiten der Golgi-Enzyme und die gegenwärtig wahrscheinlichsten Modelle der Mechanismen ihrer Lokalisation besprochen.

Die Glykosyltransferasen des Golgi-Apparates, ebenso wie die meisten Sulfotransferasen (darunter 2-OST), sind Transmembranproteine des Typs II [39]. Der zytoplasmatische N-Terminus besteht aus wenigen Aminosäuren, die einzelne Transmembrandomäne ist etwa 14-16 Aminosäuren lang. Der luminal Teil besteht aus einer Stammregion von je nach Enzym variabler Länge und einer C-terminalen katalytischen Domäne [81]. Es gibt zwischen kolokalisierenden Enzymen keine erkennbare Sequenzhomologie, die zur Identifikation eines Retentionssignales ausreichen würde [82]. Auch eine Analyse der Auswirkungen von Punktmutationen erbrachte keine solche Signalsequenz [41]. Es wurden daher zwei Modelle aufgestellt, welche den Mechanismus der spezifischen Lokalisation ausschließlich auf strukturellen Merkmalen begründen.

Das Doppelschicht-Dickenmodell (*bilayer thickness model*), zuerst aufgestellt 1993 sowohl von *Bretscher und Munro* [22], als auch von *Masibay et al.* [41], kennzeichnet die Länge der Transmembrandomäne (TMD) als einziges für die Lokalisation

verantwortliches Merkmal. Demnach akkumulieren Transmembranproteine je nach Länge ihrer TMD in Lipiddoppelmembranen von entsprechendem Durchmesser. Dieser sollte entsprechend dieses Modells vom ER zum Golgi-Apparat und innerhalb dessen entlang der Cis-Trans-Achse zunehmen. Den größten Durchmesser haben demnach die Membranen der Vesikel und der vesikulär-tubulären Transportkomplexe, die den Transport zur Plasmamembran (PM) bewerkstelligen, sowie die PM selbst. Ursache dieser graduellen Zunahme des Membrandurchmessers soll die zunehmende Konzentration von Sphingolipiden und Cholesterin sein [40, 83]. Für verschiedene Proteine, darunter GalT [84, 85] konnte gezeigt werden, dass eine Verlängerung der TMD eine Verlagerung in Richtung Plasmamembran zur Folge hatte, eine Verkürzung der TMD dagegen eine verstärkte Retention im Golgi-Apparat [30, 86]. In anderen Fällen zeigte sich eine solche Abhängigkeit weniger stark [87] oder gar nicht [42].

Das Oligomerisierungsmodell (*oligomerization model = kin recognition model*), 1991 von Machamer aufgestellt [88], sieht dagegen die Ursache der Retention von Enzymen im Golgi-Apparat in ihrer Zusammenlagerung zu Homooligomeren, die für Transportvesikel zu groß sind. Auch Heterooligomere verschiedener Enzyme könnten nach diesem Modell deren Kolo-kalisation erklären [89]. Belegt werden konnte dies für Oligomere aus MannII und GlcNAcTI, deren Bindung über ihre Stammregionen zustande kommt [90]. Ihre Kopplung ist auch funktionell sinnvoll, da sie die notwendige sequenzielle Abfolge ihrer jeweiligen Wirkungen garantiert [91]. Nicht erklären kann dieses Modell die hohe Mobilität von Golgi-Enzymen innerhalb der Cisternen [23]. Auch das Vorhandensein tubulärer Verbindungen, über welche Enzyme diffundieren können [92] [93], spricht zumindest für das Vorhandensein monomerer Populationen zusätzlich zu Oligomeren.

Die widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen lassen eine kombinierte Wirkungsweise beider Modelle wahrscheinlich erscheinen. Im Übrigen sind auch Fälle bekannt, in denen das zytoplasmatische Ende des Enzyms wesentlichen Anteil an der korrekten Lokalisation hat [94, 95].

Für die Eingangs gestellte Frage nach der Möglichkeit eines Einflusses der Fusion mit GFP bzw. vYFP auf die Lokalisation ist dabei nur wichtig, dass aufgrund der Platzierung der Fluorophore am luminalen C-Terminus weder die Transmembrandomäne noch die für Oligomerisierungen wichtigen Bereiche des Stamms und des zytoplasmatischen N-Terminus beeinflusst werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Lokalisation der Fusionsproteine jener der Wildtypen entspricht. Speziell für die gekürzten Fusionsproteine GalT-GFP und GalT-vYFP, welche das zytoplasmatische

Ende und die TMD, aber nur 17 Aminosäuren der luminalen Domäne von GalT enthalten, wurde gezeigt, dass die Kürzung keinen Einfluss auf die Verteilung im Golgi-Apparat hat [23].

Bei der Transfektion mit Fusionsproteinen besteht der zweite wesentliche Unterschied zur Verteilung der endogene Enzympopulation in ihrer deutlich erhöhten Konzentration. Bei starker Überexpression kommt es zu einer Fehllokalisierung, bei der außer den typischen Kompartimenten zunächst auch angrenzende Cisternen und schließlich auch andere Bereiche der Zellen, im Wesentlichen das ER, ausgefüllt werden. Ein solcher Einfluss kann nicht voll und ganz ausgeschlossen, aber durch die Auswahl der observierten Zellen unter Ausschluss von Fällen mit erkennbarer Fluoreszenz im ER minimiert werden. Die statistische Erfassung einer großen Zahl von Zellen dürfte den verbleibenden Einfluss etwaiger, leicht überexprimierter Zellen auf eine erhöhte Standardabweichung reduzieren, ohne die Lage der Distanzmittelwerte, und erst recht nicht deren relativen Tendenzen, nennenswert zu beeinflussen.

Die Auswirkungen von Überexpression auf die Verteilung von 2-OST wurde mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Es zeigte sich mit zunehmender 2-OST-Konzentration eine allmähliche Ausfüllung der Golgi-Cisternen von Trans nach Cis. Eine scharfe Fehllokalisierung oder Inversion der Verteilung wurde dagegen nicht beobachtet. Ein systematischer Fehler durch Überexpression kann daher ausgeschlossen werden.

4.2.3. Erd2 als Marker zur Bestimmung der Lokalisierung von Golgi-Enzymen

Der KDEL-Rezeptor Erd2 bindet an Proteine, welche die KDEL-Lipidsequenz tragen und sorgt für ihren rückwärtigen Transport vom Cis-Golgi zum ER. Erd2 ist daher sowohl im ER, als auch in intermediären Kompartimenten und im Cis-Golgi zu finden. Er wurde innerhalb der Distanzanalyse als Marker verwendet, da aufgrund seiner Lokalisation von relativ großen Distanzen zu Mid- und Trans-Golgi-Markern ausgegangen werden konnte, wie es sich auch bestätigt hat. Rückblickend wäre aber eventuell ein reiner Cis-Golgi-Marker wie etwa GM-130 die bessere Wahl gewesen. In den Distanzanalysen mit Erd2 fällt die recht hohe Standardabweichung unangenehm auf. Zwar dürften methodische Gründe wie weiter unten diskutiert einen wesentlichen Anteil daran haben, aber auch die sehr breite Verteilung von Erd2 dürfte dazu beigetragen haben. Auch der

im Vergleich zu reinen Golgi-Markern höhere Bildhintergrund durch Signalbeiträge des im ER enthaltenen Erd2 beeinträchtigt die Qualität der Analyse, da der somit schlechtere Kontrast die Selektion der Strukturen und die Bestimmung ihrer Schwerpunkte erschweren oder gar verfälschen kann.

Außerdem gestaltete sich die Kotransfektion von Erd2 mit den drei Golgi-Enzymen schwierig. Erd2 wurde schon nach acht Stunden Expression im ER angereichert, was die korrekte Lokalisation in Frage stellte, während die Golgi-Enzyme ihre maximale Expression üblicherweise erst nach 12-24 Stunden erreichten. Bei noch kürzerer Expressionsdauer reichte häufig das Erd2-Signal im Golgi für eine Analyse nicht aus. Durch eine Auswahl der in die Analyse einfließenden Daten konnte sichergestellt werden, dass die Distanzen nicht durch deutlich überexprimiertes Erd2 verfälscht werden konnten. Aufnahmen mit zu schlechtem Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurden während der Analyse automatisch entfernt. Allerdings war dadurch die Datenerfassung entsprechend verlustreich und langwierig.

In der Literatur wird von einer gelegentlichen Ausdehnung der Verteilung von Erd2 bis in den Mid- und Trans-Golgi-Apparat berichtet. Solche Beobachtungen konnten bei der elektronenmikroskopischen Überprüfung der Lokalisation von 2-OST teilweise bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde nach anfänglichen Versuchen mit einem Antikörper gegen Erd2 (als Cis-Marker) einer gegen Klathrin (als Trans-Marker) verwendet. Da solche Lokalisationsverschiebungen von Erd2 aber nur sporadisch auftraten, darf im Falle der statistischen Analyse mit dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgrund des hohen Datenvolumens ($N_{\text{GalT}} = 331$, $N_{2\text{-OST}} = 127$, $N_{\text{MannII}} = 88$ Ministacks) davon ausgegangen werden, dass sie allenfalls einen geringfügigen Einfluss auf die ermittelten Distanzen hatten, und insbesondere die relativen Distanzunterschiede nicht verfälscht wurden.

4.2.4. Beeinflusst die Inkubation mit Nocodazol die Distanzanalyse?

Die Verwendung eines vereinfachten Modellsystems des Golgi-Apparates in Gestalt der Golgi-Ministacks birgt natürlich die Gefahr der Erfassung nichtphysiologischer Artefakte. Die Auswirkungen der durch Nocodazol hervorgerufenen Depolymerisierung der Mikrotubuli auf die Morphologie des Golgi-Apparates sind weitreichend, haben aber keinen erkennbaren Effekt auf die Substruktur und die Anordnung der Cisternen im Golgi-Ministack. Darüber hinaus hat der Nocodazol-induzierte Zerfall des Golgi-

Apparates große Ähnlichkeit mit dessen Verhalten während der Mitose [28-30]. Die über die Zelle verteilten Ministacks sind folglich ein ebenso natürlicher Zustand des Golgi-Apparates wie das interphasische Netzwerk untereinander verbundener Cisternenstapel in Kernnähe.

Untersuchungen von Cole et al. und Lucocq et al. beobachteten in HeLa-Zellen einen Zerfall des Golgi-Apparates sowohl während der Mitose als auch nach Einwirkung von Nocodazol in etwa 250 Ministacks [96, 97]. Diese lagen in beiden Fällen in unmittelbarer Nähe der sogenannten ER Exit Sites vor, von denen der Transport von Proteinen und Membranelementen zum Golgi-Apparat ausgeht. Folglich darf davon ausgegangen werden, dass Mikrotubuli zwar zur Ansammlung der Golgi-Membranen in der Nähe der Zentrosomen, nicht aber zur Bildung isolierter Ministacks in unmittelbarer Nähe der Exit Sites notwendig ist. Deren Funktionalität wurde sowohl in Bezug auf die Kinetik des Transportes von VSVG [97, 98], als auch in Bezug auf dessen Glykosylierung [99] mehrfach belegt.

Die Bestätigung der Funktionalität legt aufgrund der starken Abhängigkeit von Funktion und Struktur des Golgi-Apparates schon eine Konservierung der Anordnung der Cisternen und der Lokalisation der Enzyme nahe. In Bestätigung dieser Erwartung entspricht die ermittelte Reihenfolge von Erd2, MannII und GalT den aus vorherigen Arbeiten am nativen Golgi hinlänglich bekannten Daten, während die Einordnung des von Literaturangaben abweichenden 2-OST mittels einer elektronenmikroskopischen Untersuchung, ebenfalls am nativen Golgi-Apparat, überprüft und bestätigt werden konnte.

Aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeit, mit der Golgi-Enzyme relokalisieren [100], ist für frühe Stadien kurz nach Zugabe von Nocodazol ein störender Effekt auf ihre relativen Distanzen denkbar. Aus diesem Grund betrug die Inkubationszeit mit 33 μ M Nocodazol in allen Fällen über drei Stunden, um die stabile Relokalisation aller betrachteten Proteine zu gewährleisten.

4.2.5. Die Bedeutung der Auflösung für die Distanzanalyse

Bei der Analyse der Distanzen von Proteinverteilungen im Golgi-Apparat spielen Formfaktoren offenkundig besonders in Bereichen unter 100 nm eine große Rolle. Aus Ermangelung eines geeigneten, zweifarbigen Testobjektes mit definierten Distanzen ist

es schwer, die Eignung der Methode für Distanzen unter 100 nm bei einfacher strukturierten Objekten zu definieren. Einen Hinweis gibt der Nullwertabgleich mittels Punktfokussen und Beads. Die hier erzielte Genauigkeit von 26 nm (± 12 nm) bzw. 35 nm (± 13 nm) nach der spektralen Trennung der Kanäle lässt bei punktförmigen Objekten die Messung kürzerer Distanzen durchaus möglich erscheinen.

Das Resultat des Nullwertabgleichs von Golgi-Ministacks (~ 100 nm ± 50 nm) zeigt dagegen, dass die Genauigkeit der Distanzanalysen bei biologischen Proben auf etwa 100 nm begrenzt ist.

Punktfokusse, beads und Golgi-Ministacks unterscheiden sich in zwei wesentlichen Punkten: Entlang dieser Reihenfolge nimmt die durchschnittliche Signalintensität ab, während Durchmesser und Komplexität des Signals zunehmen. Die Genauigkeit der Positionsbestimmung ist proportional zur Wurzel des SNR [101]. Beads von 200 nm Durchmesser sind im Durchschnitt etwa vier bis sechs mal heller als die Ministacks in den für den Nullwertabgleich verwendeten Aufnahmen. Entsprechend ist eine etwa zwei bis zweieinhalb mal bessere Positionsbestimmung zu erwarten. Die tatsächlich etwa drei mal genauere Distanzbestimmung der Beads im Vergleich zu den Ministacks ist also in erster Linie intensitätsbedingt.

Die zweite Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Methode der Schwerpunktanalyse. Golgi-Ministacks stellen zwar gegenüber dem nativen Golgi-Apparat strukturell eine erhebliche Vereinfachung dar, weichen aber nichtsdestotrotz signifikant von der für die Analysemethode idealen Punktform ab.

Insbesondere unterscheidet die Methode nicht zwischen axialen (entlang der Cis-Trans-Achse) und lateralen (entlang der Erstreckung von Golgi-Cisternen) Distanzen. Letztere könnten durch lokale Konzentrationsschwankungen der Enzyme entstehen, wodurch unterschiedliche Umrissformen in beiden Kanälen entstehen, was zu lateral verschobenen Schwerpunkten führt. Dieser Effekt würde sich um so stärker äußern, je kleiner der axiale Abstand der untersuchten Enzymverteilungen ist, und bei Kolokalisation (wie etwa bei GalT-GFP + GalT-vYFP) dominant werden.

Die genannten methodischen Unsicherheiten treten bei größeren Distanzen zwar nicht mehr dominant zutage, tragen aber sicherlich zu den relativ hohen Standardabweichungen bei. Auch eine systematische Erhöhung der Messwerte aufgrund dieser Fehler kann nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten die Distanzwerte nicht absolut verstanden werden, was bei den dynamischen

Enzymverteilungen innerhalb des hochplastischen Golgi-Apparates ohnehin wenig sinnvoll wäre. Vielmehr müssen die Ergebnisse der Analyse als relative mittlere Distanzen verstanden werden, die erst im Kontext zueinander Sinn ergeben.

Da der Beitrag der genannten Fehler der Schwerpunktanalyse in allen Fällen gleich ist, liegt die Stärke der Methode in der Ermittlung auch kleiner Unterschiede zwischen den Distanzen zweier Enzymverteilungen zu einem äußeren Kontrollmarker. Dieser sollte, wie hier der KDEL-Rezeptor Erd2, von den untersuchten Enzymen mehr als 100 nm entfernt sein. Nicht die absoluten Distanzwerte, sondern deren Differenzen führen dann zu einer, wie durch die elektronenmikroskopische Kontrolle gezeigt, hochpräzisen Einordnung der Enzyme in Relation zueinander. Eine Untersuchung der Validität der absoluten Distanzwerte wäre durch eine korrelative Untersuchung mit 4Pi- und Elektronenmikroskopie zwar möglich, hätte aber aufgrund der aus statistischen Gründen notwendigen hohen Zahl von korrelativen EM-Aufnahmen den Rahmen dieser Arbeit bei weitem gesprengt.

Aufgrund der erwähnten Formfaktoren, die bei komplexen Strukturen wesentlichen Einfluss auf die Leistung der Methode im Bereich geringer Distanzen haben, ist eine hohe Auflösung in allen drei Raumachsen zwingend erforderlich. Insbesondere axial eng benachbarte Ministacks können konfokal nicht unterschieden werden, was zu Fehlern in der Schwerpunktanalyse und damit zu einer schlechteren Auflösung der Distanzen führt (Abb. 4.03).

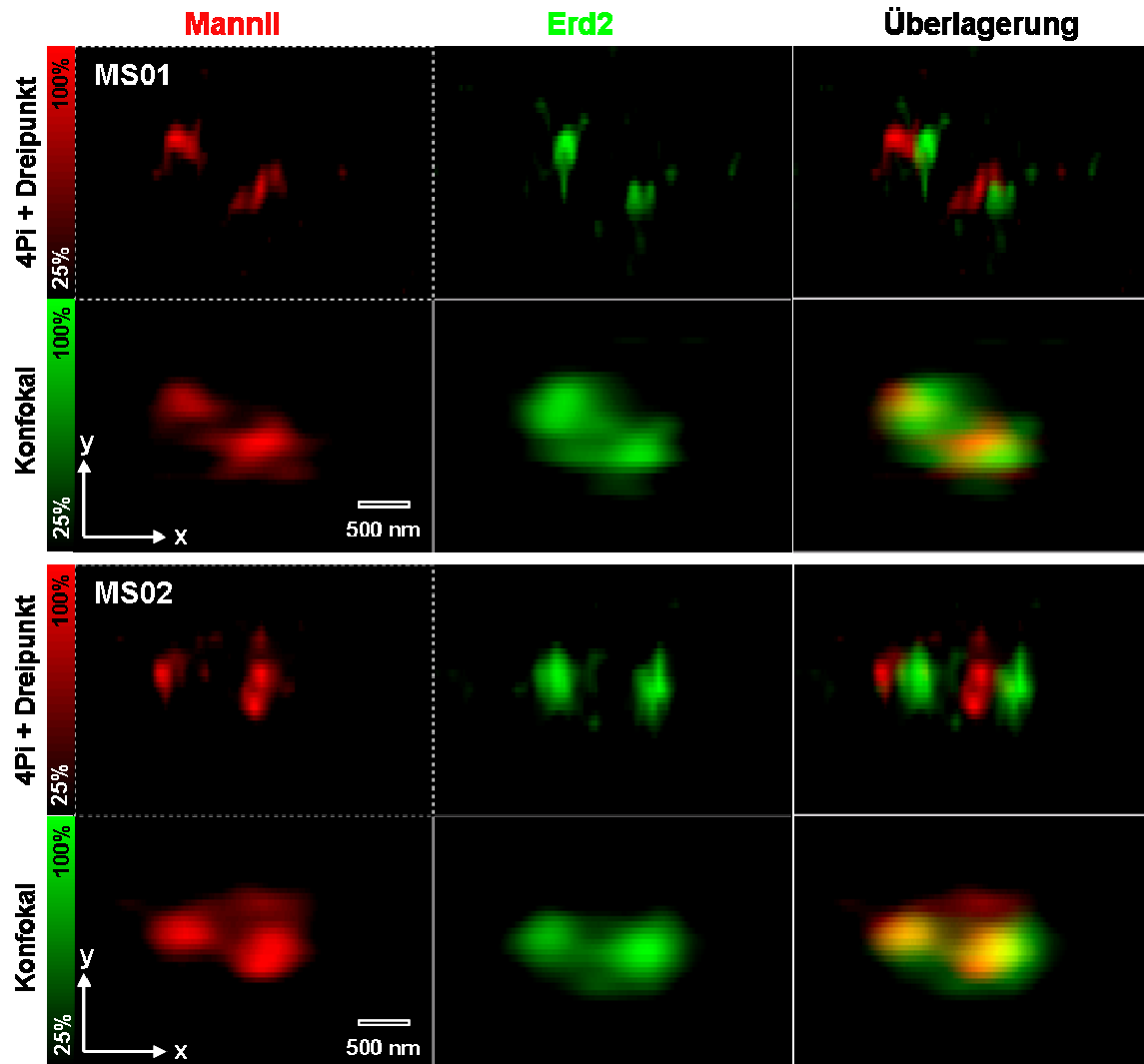


Abb. 4.03: Eng benachbarte Ministacks können in der 4Pi-Aufnahme einwandfrei unterschieden werden, im Gegensatz zum konfokalen Fall. Zur fehlerfreien Analyse der Schwerpunkte aller Ministacks und ihrer jeweiligen Distanzen ist daher eine hohe Auflösung in allen Raumrichtungen zwingend erforderlich.

4.2.6. Ausblick

Die Distanzbestimmung mittels des MMM-4Pi-Mikroskops ist hinsichtlich ihrer Präzision insbesondere in Kombination mit der Fähigkeit, am lebenden Objekt zu arbeiten, ohne Konkurrenz. Natürlich bedeutet die Arbeit mit lebenden Zellen in der Regel, dass nicht endogene Proteinpopulationen erfasst werden, sondern Fusionsproteine eingesetzt werden müssen.

Die Notwendigkeit der Kotransfektion mit zwei verschiedenen Konstrukten für fluoreszierende Fusionsproteine stellte sich als nicht immer unproblematisch heraus. Zur optimalen Analyse sollte die Intensität beider Farben in etwa gleich sein (Verhältnisse der Intensitäten von 1:3 bis 3:1 wurden akzeptiert). Dieses Kriterium erfüllten in der Regel 10-20% der transfizierten Zellen. Für Erd2-Kotransfektionen lag die Effizienz aufgrund der oben näher beschriebenen Gründe etwas niedriger. Diese Einschränkung beeinflusst weder die Durchführbarkeit noch die Aussagekraft der Arbeit mit kotransfizierten Zellen, wie sie innerhalb der hier beschriebenen Versuche durchgeführt wurde. Dennoch erscheint die Suche nach Alternativen lohnenswert.

Eine Kotransfektion könnte sich beispielsweise durch den Einsatz von mit Fluorophoren gekoppelten Substanzen erübrigen, die selektiv in bestimmten Golgi-Kompartimenten angereichert werden. Beispiele dafür sind Sphingolipide [102], welche von der Zelle endozytotisch aufgenommen und je nach Struktur in die Membranen des Cis-, Mid- oder Trans-Golgi-Apparates eingelagert werden, sowie Lectine, die selektiv an für einzelne Kompartimente spezifische Zuckerreste binden.

Da diese Vorgehensweise auch die weitgehende Beschränkung auf GFP-Derivate aufheben würde, könnten Zweifarben-Studien mit spektral sauber getrennten Kanälen durchgeführt werden, was helfen würde, den Fehler der Ausrichtung der Kanäle zu verringern. Kombiniert mit Kotransfektionen bestünde zwar wiederum das Problem der niedrigen Effizienz, dafür könnten zwei Golgi-Proteine gleichzeitig untersucht werden, wobei der an Lectin oder Sphingosin gebundene Farbstoff als Kontrolle dienen würde (analog zur Funktion des Erd2 in dieser Arbeit), um beispielsweise relative Abstandsveränderungen zweier Proteine mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Diese Methode könnte beispielsweise zur Untersuchung von Transportprozessen eingesetzt werden. Bislang existieren allerdings nur zwei kommerzielle, an Bodipy-FL, bzw NBD gekoppelte Sphingolipide [103, 104].

4.3. Transportdynamik

Im Laufe der Aufnahmen von Zeitserien von mit VSVG-GFP und GalT-vYFP kotransfizierten Cos7-Zellen stellte sich das Transportverhalten individueller Ministacks in derselben Zelle als sehr uneinheitlich heraus. Der Transport von VSVG von den ER Exit Sites über den Cis- zum Trans-Golgi-Apparat verläuft innerhalb einer Zelle nicht synchron, sondern kann sich bis über 15 Minuten nach Beginn des VSVG-Pulses (siehe Material und Methoden) verzögern oder ganz ausbleiben. Dieser Umstand macht die Aufnahme statistisch relevanter Datenmengen schwierig. Um den Transport in seiner vollen Länge beobachten zu können, muss unmittelbar nach Beginn des VSVG-Pulses (und dem Einsetzen der Probe ins Mikroskop) mit den Aufnahmen begonnen werden. Pro Bildstapel (30 X/Y-Ebenen á 80 nm) wurden 90 Sekunden benötigt (inklusive Datenspeicherung). Um den Transport über einen Zeitraum von mindestens zehn Minuten in möglichst hoher Aufnahme Frequenz zu beobachten, mussten daher mindestens sieben aufeinander folgende Bildstapel aufgenommen werden.

Aufgrund eines Bleichens von zehn bis zwanzig Prozent in aufeinander folgenden Aufnahmen wurde dieses Ziel nur in wenigen Fällen erreicht. Die bei Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven unverzichtbare Zwei-Photonen-Anregung begrenzt naturgemäß das Fluoreszenzsignal und bedingt eine Anregung mit relativ hoher Intensität. In den meisten Fällen konnten zwei bis drei Aufnahmen einer Zelle mit akzeptablem Signal-zu-Rausch-Verhältnis gemacht werden, in seltenen Fällen fünf. Nur in wenigen Ausnahmen gelangen mehr als sieben aufeinander folgende Aufnahmen. Aufgrund der geringen Datenausbeute hätte Untersuchung des Transports in Ministacks in statistisch relevanter Zahl den Rahmen dieser Arbeit bei weitem gesprengt. Dennoch führte die Analyse von zwölf Ministacks mit jeweils sieben bis neun Aufnahmen (zehn bis vierzehn Minuten Aufnahmelänge) zu einigen Ergebnissen.

Zwei Eigenschaften des Transportes wurden dabei unmittelbar deutlich: Erstens war kein einheitliches Transportverhalten erkennbar, vielmehr fand in derselben Zelle Transport bei manchen MS statt, bei anderen auch über einen längeren Zeitraum offenbar nicht. Zweitens verhielt sich die Verteilung von GalT-vYFP dort, wo Transport stattfand, erheblich dynamischer als die von VSVG-GFP.

Von den zwölf untersuchten Ministacks zeigten fünf keinen erkennbaren Transport von VSVG, wie sich aus dem konstant bleibenden Kollokalisationsgrad schließen ließ. Wo

sich beide Proteine in diesen Fällen befanden, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Es ist bekannt, dass VSVG bei einer Temperatur von 20°C nicht aus dem TGN exportiert wird. Da aber die Temperatur bei den Messungen bei 27°C lag, kann eine Retention von VSVG im TGN weitgehend ausgeschlossen werden. Außerdem wäre anzunehmen, dass in diesem Fall innerhalb der 14 Minuten Aufnahmezeit (beginnend sechs Minuten nach Start des VSVG-Pulses) zumindest der Transport durch Cis-, Mid- und Trans-Golgi zu beobachten gewesen wäre. Von einer derart langen Verweildauer im Golgi-Apparat ohne erkennbare Transportkinetik ist bislang nicht berichtet worden.

4.3.1. Die Relokalisation von GalT erfolgt parallel zum VSVG-Transport

Für das beobachtete Verhalten sind zwei Erklärungen denkbar: Entweder VSVG verharrt in manchen Fällen als scharfer Puls im ER, intermediären Kompartimenten oder im Cis-Golgi-Apparat, was aber aufgrund der weitgehenden Überlappung mit dem GalT-Signal sehr unwahrscheinlich ist, oder beide Proteine durchlaufen simultan einen Transport von einer ER Exit Site zum Golgi-Apparat.

Die Relokalisation der Golgi-Enzyme geht vom Aufenthaltsort des ursprünglichen Golgi-Apparates aus und erreicht nach etwa 90 Minuten die Peripherie der Zelle. Zu diesem Zeitpunkt ist der kernnahe Golgi-Apparat vollständig abgebaut [98]. Bei allen Experimenten zur Transportkinetik von VSVG wurde als Standardprotokoll [105] für 90 Minuten mit Nocodazol inkubiert, zuzüglich der darauf folgenden Messzeit, da Nocodazol im Einbettungsmedium enthalten war.

Auch danach findet aber offenbar noch ein Transport der Golgi-Enzyme vom Zentrum in die Peripherie statt, wobei aber keine neuen Ministacks gebildet werden [97]. Es wäre daher möglich, dass dieser Umverteilungsprozess noch nicht vollständig abgeschlossen war, und daher bei einigen Ministacks noch beobachtet wurde. Da bekannt ist, dass in frühen Phasen der Einwirkung von Nocodazol der anterograde Transport von VSVG vollständig blockiert ist und erst wieder aufgenommen wird, wenn die Golgi-Enzyme die den jeweiligen Exit Sites zugeordneten Ministacks erreicht haben [97], wäre es denkbar, dass VSVG und GalT gleichzeitig in Richtung der Trans-Golgi Cisternen transportiert wurden. Die Folge wäre eine über lange Zeit gleich bleibende, weitgehende Kolokalisation beider Signale, aber eine simultane Bewegung relativ zu anderen Ministacks.

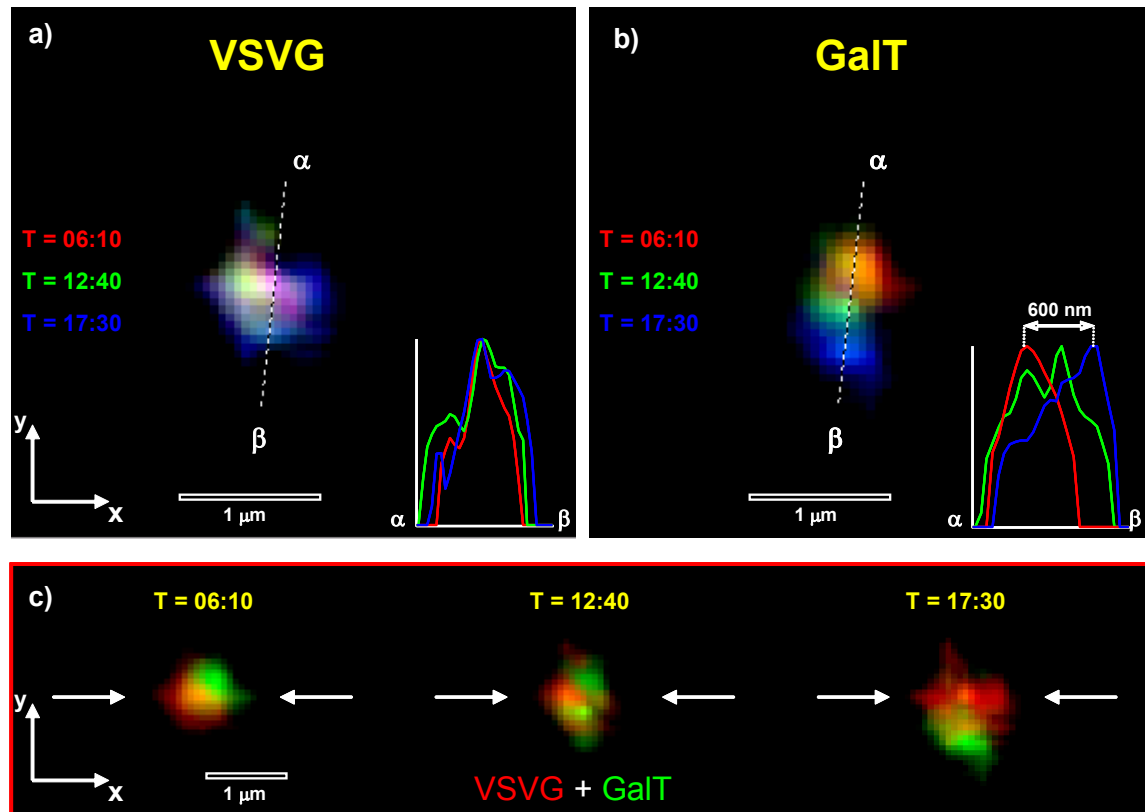


Abb. 4.04: Golgi-Transport (MMM-4Pi): VSVG bleibt stationär, während die Verteilung des Trans-Golgi-Enzyms GalT im Verlauf der Aufnahmen elongiert und sich am VSVG-Signal vorbeibewegt.

a) Überlagerung der VSVG-Signale, b) Überlagerung der GalT-Signale zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Lösen des 40°-Blocks (rot: T = 6:10 Minuten nach Beginn des VSVG-Exports aus dem ER, grün: T = 12:40 Minuten, blau: T = 17:30 Minuten). Die Intensitätsprofile verdeutlichen Elongation und Bewegung des GalT-Signals. c) Überlagerung der Signale von VSVG-GFP (rot) und GalT-vYFP (grün) zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Pfeile markieren die y-Position des VSVG-Signals zum Zeitpunkt T = 6:10.

Tatsächlich zeigt sich eine solche Tendenz in den Daten: Ministacks, bei denen sich VSVG gegenüber GalT bewegt, bleiben insgesamt weitgehend stationär (Abb. 4.04). Ministacks, bei denen dagegen keine Veränderung der Distanz zwischen VSVG und GalT erkennbar ist, bewegen sich linear um bis zu 1 μm (Abb. 4.05). Da sich Ministacks nach Einwirkung von Nocodazol unmittelbar angrenzend zu ER Exit Sites bilden [97], entspricht eine Distanz von etwa 1 μm durchaus dem Weg, den die Proteine von der Exit Site bis zum Trans-Golgi zurücklegen müssen.

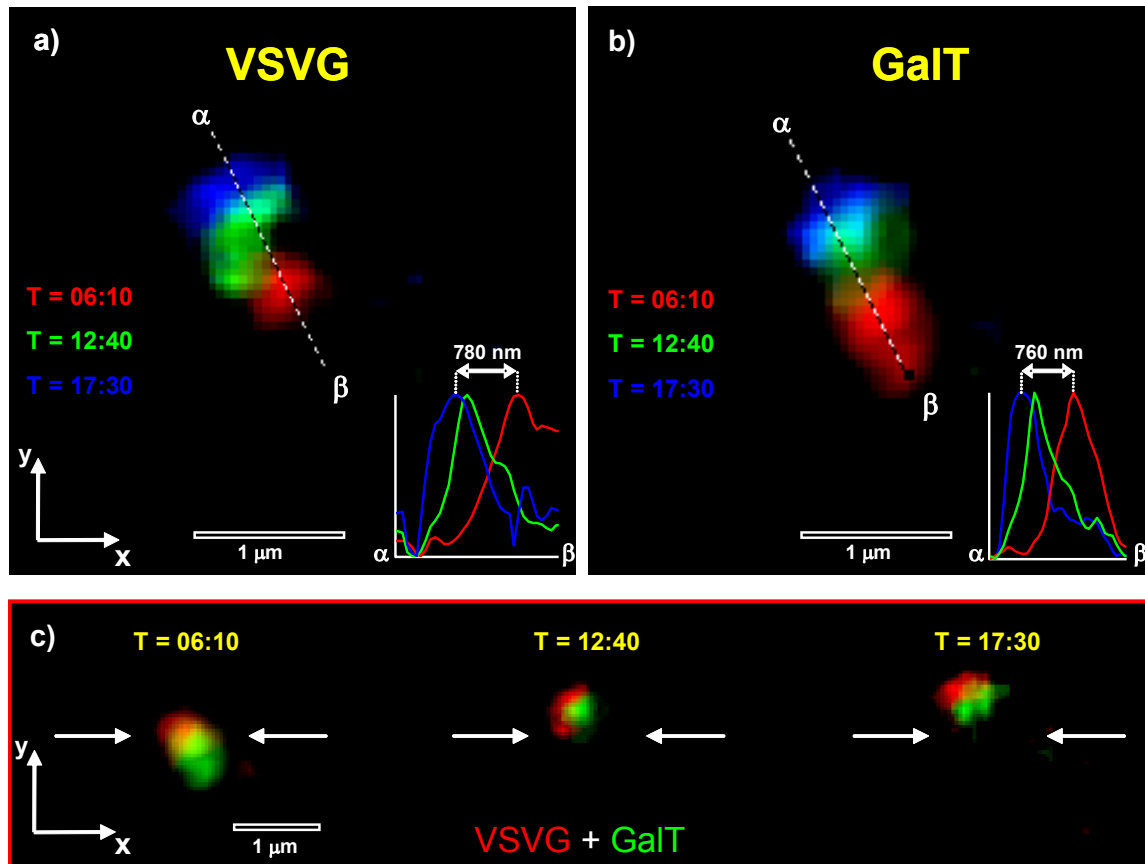


Abb. 4.05: Golgi-Transport (MMM-4Pi): Ministacks, die im Verlauf der Aufnahmen keinen Transport von VSVG relativ zu GalT aufweisen, bewegen sich, häufig geradlinig, um Strecken von bis zu einem Mikrometer. Der Abstand der beiden Signale zueinander bleibt dabei in jeder Aufnahme in etwa gleich. a), b) Signale von VSVG bzw. GalT zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Lösen des 40° – Blocks. c) Überlagerung der Signale von VSVG-GFP (rot) und GalT-vYFP (grün) zum jeweiligen Zeitpunkt. Die Pfeile markieren die y-Position des VSVG-Signals zum Zeitpunkt T = 6:10 um die weitgehend synchrone Bewegung beider Signale zu verdeutlichen.

Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass einige der Ministacks zwei deutlich unterscheidbare Bewegungsphasen aufweisen: Nach Beginn der Aufnahmen bewegen sich die GalT- und VSVG-Signale eines Ministacks synchron und geradlinig um 400 bis 600 nm, ändern nach sechs bis sieben Minuten abrupt ihre Richtung und bewegen sich wiederum geradlinig um weitere 400 bis 600 nm (Abb. 4.06). In dieser zweiten Phase verändern sich in einigen Fällen auch die Abstände der Signale zueinander, was auf einen Transport von VSVG durch den Golgi-Apparat hinweist. Es ist denkbar, dass die erste Phase mit dem Transport von den ER Exit Sites zum Cis-Golgi-Apparat (oder intermediären Kompartimenten in dessen unmittelbarer Nähe) identisch ist, an den sich in der zweiten Phase der Transport vom Cis- zum

Trans-Golgi-Apparat anschließt. Da die Cis-Trans-Achse nicht zwangsläufig auf einer Linie mit der jeweiligen Exit Site des ERs liegen muss, wäre ein zweiphasiger Transport mit abruptem Richtungswechsel, wie beobachtet, zu erwarten.

Durch Vergleich mehrerer Ministacks innerhalb einer Zelle wurde sichergestellt, dass es sich bei der beobachteten Bewegung nicht nur um eine Drift innerhalb des mikroskopischen Aufbaus handelte. Weiterhin wiesen auch die Ministacks ein solches zweiphasiges Bewegungsverhalten auf, in denen kein VSVG, sondern ausschließlich GalT beobachtet wurde. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass es sich um eine Reaktion des Trans-Golgi-Kompartimentes auf die Ankunft des VSVG-Pulses handelt.

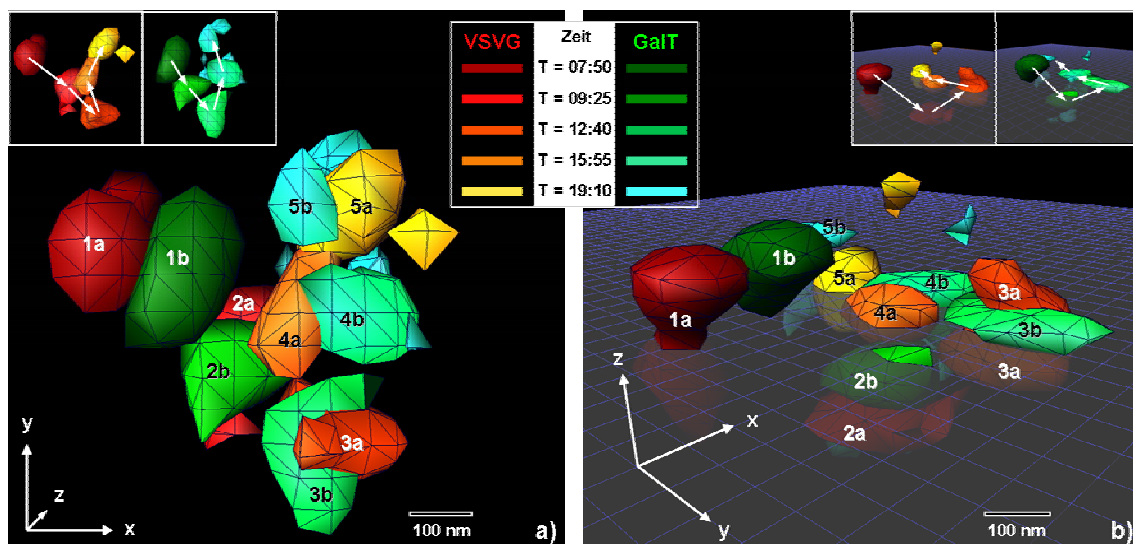


Abb. 4.06: Dreidimensionale Rekonstruktion einer Zeitserie von fünf zweifarbigen 4Pi-Aufnahmen. Die zeitliche Abfolge der Aufnahmen (beginnend 7:50 Minuten nach Start des VSVG-Pulses, bis 19:10 Minuten) ist als fünfstufiger Farbverlauf dargestellt. Der Verlauf von Rot nach Gelb stellt die Bewegung des VSVG-Signals dar (1a bis 5a), der Verlauf von Grün nach Türkis den des GalT-Signals (1b bis 5b).

- Ansicht der X/Y-Ebene. Die Bewegung verläuft in zwei weitgehend linearen Phasen (Phase eins: 1a/b bis 3a/b, Phase zwei: 3a/b bis 5a/b), zwischen denen eine Richtungsänderung um etwa 135° erfolgt.
- In seitlich verkippter Ansicht wird deutlich, dass die Bewegung weitgehend in einer Ebene erfolgt. Nur bei $T = 09:25$ befinden sich beide Signale unterhalb der Ebene. Im Verlauf der gesamten Bewegung bleibt der Abstand der Signale beider Kanäle relativ zueinander weitgehend konstant.

Hinweis: Die in der Abbildung dargestellten Strukturen sind zum besseren Verständnis in ihrer Ausdehnung reduziert. Es wurden nur Bereiche von $\geq 90\%$ der Maximalintensität dargestellt.

In zwei der fünf Fällen, bei denen kein Transport von VSVG relativ zum GalT-Signal beobachtet werden, tauchten im Verlauf der Beobachtung zusätzliche GalT-markierte Objekte auf, die offenbar mit dem primären, durch GalT und VSVG markierten Signal verschmolzen (Abb. 4.07). Dies ist ein weiterer Hinweis auf den nach wie vor stattfindenden Transport von GalT in periphere Zellregionen. Zudem konnte auf einigen Aufnahmen unmittelbar nach Beginn des Exports von VSVG eine gleichzeitige, allmähliche Konzentration von VSVG und GalT beobachtet werden, wahrscheinlich an Exit Sites des ER (Abb. 4.08). Auch hier trat wieder die lineare Bewegung des GalT-Signals parallel zu der des VSVG-Signals über eine Strecke von mehr als 500 nm auf.

Der Export von VSVG aus dem ER konnte zwar ohne einen Marker für die Exit Sites innerhalb dieser Untersuchung nicht sicher bestimmt werden, aber in einigen Fällen konnte die allmähliche Anreicherung von VSVG wie auch GalT dargestellt werden. Dieser Prozess spielt sich sehr wahrscheinlich in den ER Exit Sites ab. Zwar ist es nicht ausgeschlossen, dass hier stattdessen die Bildung eines intermediären Kompartiments beobachtet wurde, das durch homotypische Fusion von COPII-Vesikeln entsteht, wie es von einem der gängigen Modelle beschrieben wird [62-64]. Auch in diesem Fall wäre eine stetige Zunahme des Signals zu erwarten. Es konnten jedoch keine Vesikel beobachtet werden. Selbst unter der Annahme, dass solche Vesikel aufgrund ihrer geringen Größe sehr leuchtschwach sind, erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass sie überhaupt nicht zu detektieren wären.

Auch eine homotypische Fusion mehrerer, direkt den Exit Sites entstammender ICs zwecks Formung einer neuen Cis-Golgi-Cisterne, wie von *Trucco et al.* postuliert [25], konnte nicht beobachtet werden. Der Export aus dem ER und der Transport zum und durch den Golgi-Apparat verlief stattdessen offenbar über eine einzelne Struktur, „en bloc“, wie von *Mironov et al.* beschrieben [65]. Die Intensität des Signals dieses Körpers nahm in aufeinander folgenden Aufnahmen um jeweils zehn bis zwanzig Prozent ab, wie es aufgrund des Bleichens für ein Objekt konstanter Größe und Konzentration zu erwarten ist.

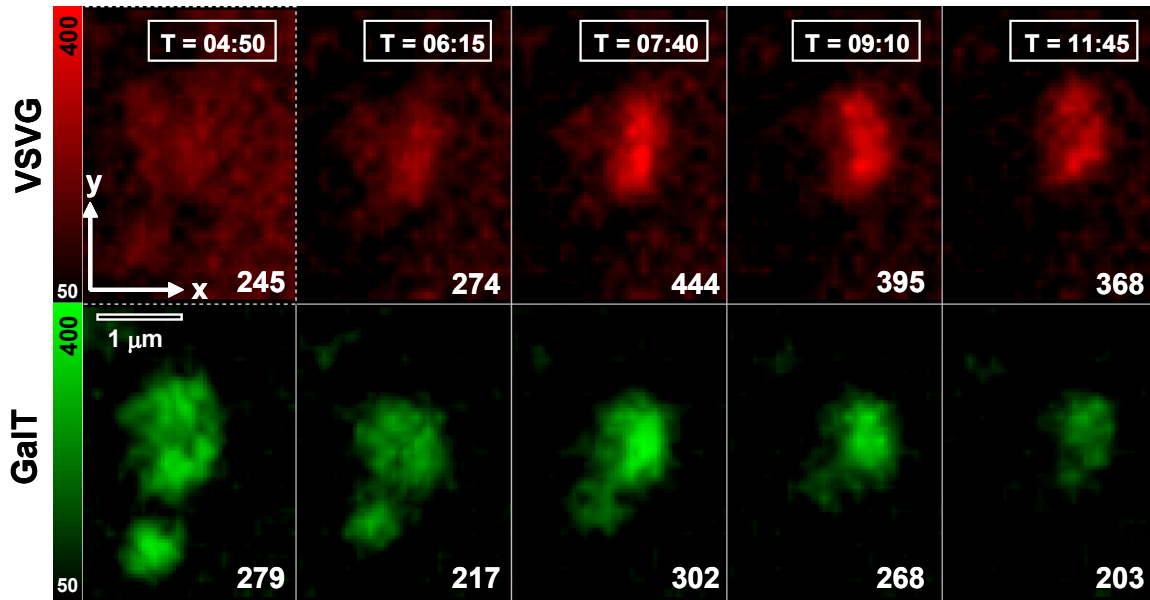


Abb. 4.07: 4Pi-Aufnahmeserie eines Ministacks nach GalT/VSVG-Kotransfektion. Die erste Aufnahme, 4:50 Minuten nach Start des VSVG-Pulses, zeigt VSVG im ER verteilt und zwei deutlich getrennte GalT-Signale. Während sich VSVG anreichert, verschmelzen die GalT-Signale (T = 07:50), was mit einer deutlichen Steigerung der maximalen Intensität einhergeht (jeweils rechts unten angegeben).

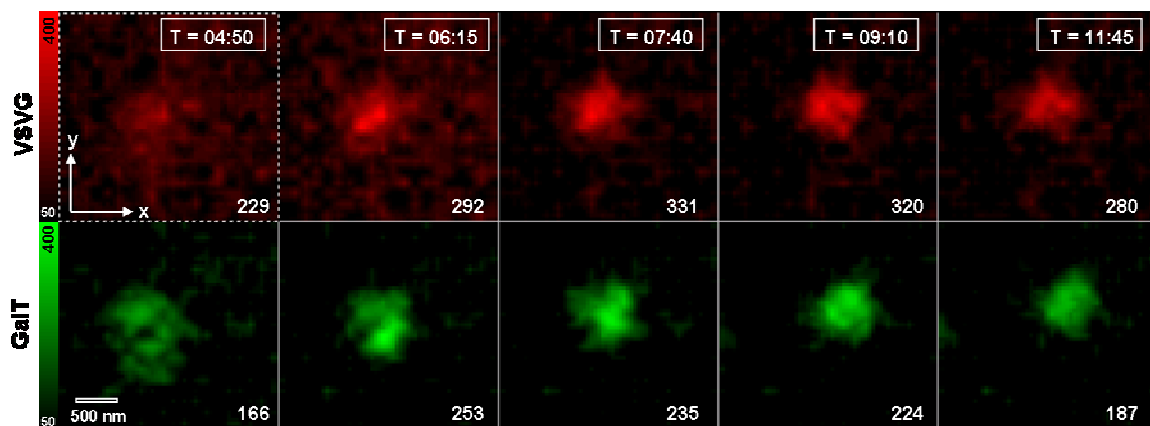


Abb. 4.08: 4Pi-Aufnahmeserie mit Beginn kurz nach Start des VSVG-Pulses (4:50 Minuten). Für jeden Zeitpunkt ist die jeweilige maximale Intensität angegeben (rechts unten). Die Intensitätszunahme mit der Zeit folgt aus der Anreicherung der Proteine. Während ein solches Verhalten für VSVG während des Exports aus dem ER zu erwarten ist, überrascht die Ähnlichkeit des Verhaltens von GalT. Es ist daher möglich, dass der Transport von GalT aus dem Zentralbereich der Zelle zu den peripheren Ministacks noch nicht abgeschlossen war. Aufgrund eines Bleichens von etwa 10 % in aufeinander folgenden Aufnahmen nimmt die Intensität schließlich wieder ab.

4.3.2. Die Dynamik spricht für einen Transport über tubuläre Verbindungen

Der am Beispiel von Abb. 3.4.02 (Ergebnisse) dargestellte Verlauf des Transportes von VSVG bestätigt Ergebnisse einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von *Trucco et al.* [25], der zufolge Ministacks bei Ankunft des VSVG-Pulses tubuläre Verbindungen zwischen den Cisternen ausbilden, über die Golgi-Enzyme frei diffundieren können. Über diese Verbindungen kann der im *Cisternal-maturation*-Modell notwendige retrograde Enzymrücktransport ablaufen, welcher die Vorwärtsbewegung der reifenden Cisternen von Cis nach Trans ausgleicht. VSVG dagegen ist von diesen tubulären Verbindungen weitgehend, aber nicht völlig ausgeschlossen, was dem Puls die Form eines hochkonzentrierten Zentrums gibt, das von geringer konzentrierten Ausläufern flankiert ist. Diese Beobachtung stimmt gut mit der im 4Pi-Mikroskop abgebildeten Intensitätsverteilung des VSVG-Signals überein, welches bei Erreichen des Ministacks rasch elongiert, aber sein Zentrum mit der höchsten Intensität während des weiteren Transportes beibehält.

Bemerkenswert ist dabei, dass die Reaktion der GalT-Verteilung der Elongation des VSVG-Signals, welche dessen beginnende, teilweise Diffusion in Richtung Trans-Golgi-Cisternen anzeigt, nicht nur zeitverlustfrei zu folgen, sondern ihr sogar voranzugreifen scheint. Dies spricht für ein doppelt genutztes, anterograd wie retrograd funktionierendes Transportsystem. Unter Annahme der erwähnten Bildung tubulärer Verbindungen zwischen den Cisternen muss demnach davon ausgegangen werden, dass diese bei Ankunft des VSVG-Pulses am Cis-Golgi-Apparat über den gesamten Membranstapel hinweg, also auch auf der Trans-Seite und damit dem Verteilungsbereich von GalT gebildet werden und die Diffusion von GalT zudem schneller erfolgt als die von VSVG. Das könnte über den erwähnten weitgehenden Ausschluss transportierter Proteine von den tubulären Verbindungen begründet sein, wenngleich der Mechanismus dieses Effektes noch unbekannt ist.

Daneben besteht nach wie vor die Möglichkeit eines aktiven Transportes, über Verbindungen oder Vesikel. Über deren Aufnahme von Golgi-Enzymen wurden in der Vergangenheit mehrfach widersprüchliche Angaben gemacht, schlüssig widerlegt wurde diese Möglichkeit noch nicht.

4.3.3. Validität des Nocodazol-induzierten Ministack-Modells

Mehr noch als bei der Distanzanalyse muss bei der Analyse von Transportkinetiken die Möglichkeit einer Artefaktbildung infolge der depolymerisierten Mikrotubuli in Betracht gezogen werden. Im nativen Golgi-Apparat verläuft der gesamte anterograde (nicht aber der retrograde) Transport von Enzymen wie auch von Frachtproteinen vom ER kommend entlang der Mikrotubuli. Könnte der Abbau dieses Teils des Zytoskeletts auch für den Intra-Golgi-Transport Folgen haben? Zusätzlich zu den weiter oben schon eingehend besprochenen Gründen für die Verwendbarkeit des Ministack-Modellsystems und die Übertragbarkeit der daran gewonnenen Ergebnisse auf den nativen Golgi-Apparat kamen *Trucco et al.* zu dem Schluss, dass der Transport durch Ministacks kinetisch von dem durch den nativen Golgi in keinster Weise zu unterscheiden ist [25]. Überdies gilt als sicher, dass Mikrotubuli nur für den Transport über weite Distanzen, wie etwa vom ER zum nativen Golgi in Kernnähe, nötig sind, nicht aber für den Intra-Golgi-Transport [106]. Stattdessen werden Aktin und verschiedene Aktin-bindende Proteine diskutiert, darunter Tropomyosin, Spectrin und Ankyrin [107], die von Nocodazol unbeeinflusst bleiben. Es gibt somit kein Indiz für die Annahme einer verfälschenden Auswirkung der Versuchsbedingungen auf die Transportkinetik von VSVG.

4.3.4. Ausblick

In jüngster Zeit wurde ein 4Pi-Mikroskop entwickelt, welches unter Verwendung hochnumerischer Objektive mit Einphotonen-Anregung arbeitet. Es wurde bereits für die dreidimensionale Darstellung zweifarbig markierter Golgi-Apparate verwendet [9] (siehe auch Ergebnisse, Abb. 3.3.12). Bislang ist allerdings der Betrieb mit Wasserimmersionsobjektiven noch nicht etabliert, und das Mikroskop liegt auch nicht in einer multifokalen Ausführung vor. Dennoch könnte die 4Pi-Mikroskopie mit Einphotonen-Anregung bei entsprechender Weiterentwicklung infolge weniger starken Bleichens längere Aufnahmeserien ermöglichen.

In der Regel werden zur Senkung der Nebenmaxima der 4Pi-PSF jeweils zwei von drei Methoden kombiniert: Konfokalisierung, Zweiphotonen-Anregung, oder 4Pi-Mikroskopie des Typs c (Interferenz sowohl des Anregungs- als auch des Fluoreszenzlichtes). Ein konfokalisiertes, multifokales 4Pi-Mikroskop des Typs c mit Einphotonen-Anregung und Wasserimmersionsobjektiven wäre demnach denkbar, wenn auch technisch sehr

anspruchsvoll und nicht leicht zu realisieren. Es würde alle für die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen relevanten Vorteile vereinen: Geringes Bleichen, hohe Aufnahmegeschwindigkeit, hohe Auflösung in allen Raumrichtungen und, aufgrund der beidseitigen Detektion mit zwei Objektiven, eine erhöhte Signalintensität.

5. Zusammenfassung

Seit der Entdeckung des Golgi-Apparates im Jahre 1898 wurden seine Struktur, seine enzymatische Zusammensetzung und die Dynamik des in ihm stattfindenden Proteintransports intensiv untersucht. Dennoch blieben bis heute wesentliche Fragen zu seiner Funktionsweise unbeantwortet. So existieren nach wie vor mehrere konkurrierende Modelle zur Organisation der hoch komplexen räumlichen Verteilung seiner Enzyme sowie zum grundlegenden Mechanismus des Intra-Golgi Transports. Die Beantwortung dieser und weiterer Fragen ist für das Verständnis des Golgi-Apparates essentiell, aber aus methodischen Gründen höchst schwierig, da es bisher nicht möglich war die Struktur und Dynamik des Golgi-Apparates lebender Zellen mit der hierfür notwendigen Auflösung und Geschwindigkeit zu untersuchen.

Bis heute gibt es für die funktionsmorphologischen Untersuchungen des Golgi-Apparates lebender Zellen keine echte Alternative zur Fernfeld-Fluoreszenzmikroskopie. Das MMM-4Pi-Mikroskop ermöglicht als erstes Fluoreszenzmikroskop, aufgrund seiner Auflösung von ~200 nm in der Fokalebene und 100-150 nm entlang der optischen Achse, die Untersuchung der Subkompartimente des Golgi-Apparates und kann, aufgrund seiner hohen Aufnahmegeschwindigkeit von 0.5 Hz, die Dynamik des Intra-Golgi Transports zeitlich auflösen. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Golgi-Apparate lebender Zellen in zwei Farben sowie mit einer bisher nicht möglichen räumlichen und zeitlichen Auflösung zu untersuchen.

Um die Leistungsfähigkeit der dreidimensionalen Bildgebung dieser Methode zu überprüfen, wurde erstmals der Golgi-Apparat fixierter Säugerzellen korrelativ mit dem Transmissionselektronenmikroskop und dem MMM-4Pi-Mikroskop aufgenommen. Die rekonstruierten Strukturen korrelierten in allen drei Raumrichtungen zu über 80%, was die Validität beider Methoden eindrucksvoll unter Beweis stellt. Zudem konnten mit dem MMM-4Pi-Mikroskop Aussackungen von Golgi-Cisternen aufgelöst werden, was die Eignung dieser Methode zur strukturellen Analyse der Subkompartimente des Golgi-Apparates unterstreicht.

Des Weiteren wurde, in einer Reihe zweifarbiger Aufnahmeserien, die Verteilung dreier Golgi-Enzyme in lebenden Säugerzellen untersucht, und ihre mittlere relative Distanz bestimmt. Ihre aus der Literatur bekannten Lokalisationen konnten in zwei Fällen

bestätigt (GalT, MannII) und in einem Fall korrigiert werden (2-OST). Im Gegensatz zu der konfokal bestimmten Cis-/Mid-Lokalisation von 2-OST [11, 58] zeigen die Ergebnisse der hoch aufgelösten Distanzanalyse deutlich, dass eine Mid-/Trans-Lokalisation vorliegt. Dieses Ergebnis wurde elektronenmikroskopisch überprüft und bestätigt. Da die räumliche Anordnung der Golgi-Enzyme die Reihenfolge ihrer Aktivität widerspiegelt, ist eine möglichst präzise Bestimmung ihrer Konzentrationsverteilungen essentiell, um die Funktion des Golgi-Apparates zu verstehen. Insbesondere zeigt dieses Resultat, dass die Bestimmung der Lokalisation von Golgi-Enzymen über konfokale Kollokalisationsstudien zu falschen Ergebnissen führen kann.

Die Kombination hoher räumlicher Auflösung mit einer schnellen Datenaufnahme erlaubte die Analyse der Transportdynamik innerhalb des Golgi-Apparates von Säugerzellen. In mehreren Zeitserien zweifarbiger Aufnahmen wurde der Transport des Frachtproteins VSVG relativ zum Trans-Golgi-Marker GalT untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Trans-Golgi-Kompartiment in einigen Fällen durch eine deutliche Formänderung auf die Ankunft eines VSVG-Transportpulses reagierte und sich insgesamt wesentlich dynamischer verhielt als der Transportpuls selbst. Diese Beobachtung bestätigt tendenziell Transportmodelle, die den Golgi-Apparat nicht als statisches, sondern als dynamisches, aktiv am Transport beteiligtes Organell beschreiben [25].

Die hier vorgestellten Experimente stellen die ersten Untersuchungen zur Verteilung von Golgi-Enzymen sowie zur Transportdynamik des Golgi-Apparates lebender Zellen mit einer dreidimensionalen Auflösung im Bereich von 100-200 nm dar. Wie am Beispiel von 2-OST gezeigt, ist es mit dem MMM-4Pi-Mikroskop allgemein möglich, die Lokalisation von Golgi-Enzymen wesentlich präziser als bisher zu bestimmen. Bei der Untersuchung dynamischer Prozesse ist in naher Zukunft eine Steigerung der Leistungsfähigkeit der Methode zu erwarten. Zum einen werden CCD-Kameras mit kürzeren Auslesezeiten und einer elektronischen Verstärkung des Signals die Datenaufnahme weiter beschleunigen. Zum anderen könnte durch die Entwicklung eines parallelisierten Mikroskops mit Einphotonen-Anregung das Bleichen konsekutiver Aufnahmen verringert werden, wodurch längere Aufnahmeserien möglich sein werden.

Publikationen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen vorab veröffentlicht worden, bzw. werden in Kürze veröffentlicht werden:

Lang, M., T. Müller, J. Engelhardt, S. W. Hell, *4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging*. Opt. Exp., 2007. **15**(5): p. 2459-2467.

Müller T., Verrier S.E., , Sölling H.D., Hell S.W. und Egner A., *Elucidating Golgi Enzyme Localizations in Live Mammalian Cells by Two Colour 4Pi-Microscopy*. In Arbeit.

Müller T.*, Perinetti G.*, Spaar A., Luini A., Hell S.W., Polishchuk R. und Egner A., *Correlative 4Pi-/ Electron Microscopy*. In Arbeit

* Diese Autoren trugen in gleichem Maß zu dieser Veröffentlichung bei.

Literatur:

1. Chalfie M, et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
2. Hell, S.W. and J. Wichmann, *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. Opt. Lett., 1994. **19**(11): p. 780-782.
3. Donnert, G., et al., *Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy*. PNAS, 2006. **103**(31): p. 11440-11445.
4. Donnert, G., et al., *Two-Color Far-Field Fluorescence Nanoscopy*. Biophys. J., 2007. **92**(8): p. L67-69.
5. Betzig, E., et al., *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1642-1645.
6. Hess, S.T., T.P.K. Girirajan, and M.D. Mason, *Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*. Biophys. J., 2006. **91**(11): p. 4258-4272.
7. Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. 2006. **3**(10): p. 793-796.
8. Egner, A., S. Jakobs, and S.W. Hell, *Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast*. PNAS, 2002. **99**(6): p. 3370-3375.
9. Lang, M., T. Müller, J. Engelhardt, S. W. Hell, *4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging*. Opt. Exp., 2007. **15**(5): p. 2459-2467.
10. Gugel, H., et al., *Cooperative 4Pi Excitation and Detection Yields Sevenfold Sharper Optical Sections in Live-Cell Microscopy*. Biophys. J., 2004. **87**(6): p. 4146-4152.

11. Egner, A., et al., *4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells*. Journal of Structural Biology, 2004. **147**(1): p. 70-76.
12. Polishchuk, R.S., et al., *Ultrastructure of Long-Range Transport Carriers Moving from the trans Golgi Network to Peripheral Endosomes*. Traffic, 2006. **7**(8): p. 1092-1103.
13. Mironov, A.A., R.S. Polishchuk, and A. Luini, *Visualizing membrane traffic in vivo by combined video fluorescence and 3D electron microscopy*. Trends in Cell Biology, 2000. **10**(8): p. 349-353.
14. Khimich, D., et al., *Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling*. 2005. **434**(7035): p. 889-894.
15. Medda, R., et al., *4Pi microscopy of quantum dot-labeled cellular structures*. Journal of Structural Biology, 2006. **156**(3): p. 517-523.
16. Golgi, C., *On the structure of the nerve cells of the spinal ganglia*. 1898. J.Microsc., 1989. **155**: p. 3-7.
17. Bloch, D.P., et al., *A Correlated Histochemical and Microscopic Study of the Intracellular Crystalline Aggregates of Adenovirus (RI-APC Virus) in HeLa Cells*. J. Cell Biol., 1957. **3**(1): p. 1-8.
18. Grabenbauer, M., et al., *Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation*. 2005. **2**(11): p. 857-862.
19. Gaietta, G.M., et al., *Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy*. PNAS, 2006. **103**(47): p. 17777-17782.
20. Payne GS and S. R., *Clathrin: a role in the intracellular retention of a Golgi membrane protein*. Science, 1989. **245**(4924): p. 1358-65.
21. Chung KN, et al., *Molecular sorting in the secretory pathway*. Science, 1989. **243**(4888): p. 192-7.

22. Bretscher, M. and S. Munro, *Cholesterol and the Golgi apparatus*. Science, 1993. **261**: p. 1280-1281.
23. Cole, N., et al., *Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells*. Science, 1996. **273**(5276): p. 797-801.
24. Sly, W., *Receptor-mediated transport of acid hydrolases to lysosomes*. Curr. Top. Cell Regul., 1985. **26**: p. 27-38.
25. Trucco, A., et al., *Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments*. 2004. **6**(11): p. 1071-1081.
26. Dacks, J.B. and W.F. Doolittle, *Reconstructing/Deconstructing the Earliest Eukaryotes: How Comparative Genomics Can Help*. Cell, 2001. **107**(4): p. 419-425.
27. Becker, B. and M. Melkonian, *The secretory pathway of protists: spatial and functional organization and evolution*. Microbio. Rev., 1996. **60**(4): p. 697-721.
28. Lucocq, J., et al., *A mitotic form of the Golgi apparatus in HeLa cells*. J. Cell Biol., 1987. **104**(4): p. 865-874.
29. Warren, G., *Membrane Partitioning During Cell Division*. Annual Review of Biochemistry, 1993. **62**(1): p. 323-348.
30. Lippincott-Schwartz, J. and K.J.M. Zaal, *Cell cycle maintenance and biogenesis of the Golgi complex*. Histochemistry and Cell Biology, 2000. **V114**(2): p. 93-103.
31. Lippincott-Schwartz, J., et al., *Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: Evidence for membrane cycling from Golgi to ER*. Cell, 1989. **56**(5): p. 801-813.
32. Zaal, K.J.M., et al., *Golgi Membranes Are Absorbed into and Reemerge from the ER during Mitosis*. Cell, 1999. **99**(6): p. 589-601.
33. Nakamura, N., et al., *Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130*. J. Cell Biol., 1995. **131**(6): p. 1715-1726.

34. Seemann, J., et al., *Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus*. 2000. **407**(6807): p. 1022-1026.
35. Ward, T.H., et al., *Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export*. J. Cell Biol., 2001. **155**(4): p. 557-570.
36. Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius, *Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1882-1888.
37. Trombetta, E.S. and A. Helenius, *Conformational Requirements for Glycoprotein Reglucosylation in the Endoplasmic Reticulum*. J. Cell Biol., 2000. **148**(6): p. 1123-1130.
38. Helenius, A. and M. Aebi, *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum*. Annu. Rev. Biochem., 2004. **73**: p. 1019-49.
39. de Graffenried, C.L. and C.R. Bertozzi, *The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus*. Current Opinion in Cell Biology, 2004. **16**(4): p. 356-363.
40. Nezil, F. and M. Bloom, *Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphilic peptides upon bilayer thickness in model membranes*. Biophys. J., 1992. **61**(5): p. 1176-83.
41. Masibay, A., et al., *Mutational analysis of the Golgi retention signal of bovine beta-1,4-galactosyltransferase*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(13): p. 9908-9916.
42. Nilsson, T., et al., *The role of the membrane-spanning domain and stalk region of N-acetylglucosaminyltransferase I in retention, kin recognition and structural maintenance of the Golgi apparatus in HeLa cells*. J Cell Sci, 1996. **109**(7): p. 1975-1989.
43. Dahdal, R. and K. Colley, *Specific sequences in the signal anchor of the beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase are not essential for Golgi localization. Membrane flanking sequences may specify Golgi retention*. J. Biol. Chem., 1993. **268**(35): p. 26310-26319.

44. Axelsson, M.A.B., et al., *Neutralization of pH in the Golgi apparatus causes redistribution of glycosyltransferases and changes in the O-glycosylation of mucins*. *Glycobiology*, 2001. **11**(8): p. 633-644.
45. Machen, T.E., et al., *pH of TGN and recycling endosomes of H⁺/K⁺-ATPase-transfected HEK-293 cells: implications for pH regulation in the secretory pathway*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **285**(1): p. C205-214.
46. De Lisle, R.C., *Role of sulfated O-linked glycoproteins in zymogen granule formation*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(14): p. 2941-2952.
47. Wu, M.M., et al., *Mechanisms of pH Regulation in the Regulated Secretory Pathway*. *J. Biol. Chem.*, 2001. **276**(35): p. 33027-33035.
48. Krishnan, V., et al., *Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium*. *Clinical and Experimental Metastasis*, 2005. **22**(1): p. 11-24.
49. Hans-Joachim Gabius, H.-C.S., Sabine André, Jesús Jiménez-Barbero, Harold Rüdiger,, *Chemical Biology of the Sugar Code*. *ChemBioChem*, 2004. **5**(6): p. 740-764.
50. Brown, R.M., Jr., et al., *SCALE FORMATION IN CHRYSOPHYCEAN ALGAE: I. Cellulosic and Noncellulosic Wall Components Made by the Golgi Apparatus*. *J. Cell Biol.*, 1970. **45**(2): p. 246-271.
51. Perasso, L., et al., *The Golgi apparatus of the scaly green flagellate Scherffelia dubia: uncoupling of glycoprotein and polysaccharide synthesis during flagellar regeneration*. *Planta*, 2000. **210**(4): p. 551-562.
52. Vayssie, L., N. Garreau de Loubresse, and L. Sperling, *Growth and form of secretory granules involves stepwise assembly but not differential sorting of a family of secretory proteins in Paramecium*. *J Cell Sci*, 2001. **114**(5): p. 875-886.
53. Gautier, M., et al., *Evidence for defects in membrane traffic in Paramecium secretory mutants unable to produce functional storage granules*. *J. Cell Biol.*, 1994. **124**(6): p. 893-902.

54. Heywood, P., *Osmoregulation in the alga Vacuolaria virescens. Structure of the contractile vacuole and the nature of its association with the Golgi apparatus.* J Cell Sci, 1978. **31**(1): p. 213-224.
55. Marra, P., et al., *The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment.* Nat. Cell Biol., 2001. **3**: p. 1101-1113.
56. Rabouille, C., et al., *Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides.* J Cell Sci, 1995. **108**(4): p. 1617-1627.
57. Koichi Honke, N.T., *Sulfotransferases and sulfated oligosaccharides.* Medicinal Research Reviews, 2002. **22**(6): p. 637-654.
58. Pinhal, M.A.S., et al., *Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: Uronosyl 5-epimerase and 2- O-sulfotransferase interact in vivo.* Proc. Natl. acad. Sci., 2001. **98**(23): p. 12984-12989.
59. Grassé, P.P., *Ultrastructure, polarity and reproduction of Golgi apparatus.* Comptes Rendus de L'Academy des Sciences Paris, 1957. **245**: p. 1278-1281.
60. Jamieson, J.D., Palade, G.E., *Role of the Golgi complex in the intracellular transport of secretory proteins.* PNAS (USA), 1966. **55**: p. 424-431.
61. Jamieson, J.D. and G.E. Palade, *INTRACELLULAR TRANSPORT OF SECRETORY PROTEINS IN THE PANCREATIC EXOCRINE CELL: I. Role of the Peripheral Elements of the Golgi Complex.* J. Cell Biol., 1967. **34**(2): p. 577-596.
62. Ladinsky, M.S., et al., *Golgi Structure in Three Dimensions: Functional Insights from the Normal Rat Kidney Cell.* J. Cell Biol., 1999. **144**(6): p. 1135-1149.
63. Klumperman, J., *Transport between ER and Golgi.* Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**(4): p. 445-449.
64. Horstmann, H., et al., *Ultrastructural characterization of endoplasmic reticulum - Golgi transport containers (EGTC).* J Cell Sci, 2002. **115**(22): p. 4263-4273.

-
65. Mironov, A.A., et al., *ER-to-Golgi Carriers Arise through Direct En Bloc Protrusion and Multistage Maturation of Specialized ER Exit Domains*. *Developmental Cell*, 2003. **5**(4): p. 583-594.
66. Dinter, A. and E.G. Berger, *Golgi-disturbing agents*. *Histochemistry and Cell Biology*, 1998. **109**(5): p. 571-590.
67. Bubb, M., et al., *Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin*. *J. Biol. Chem.*, 1994. **269**(21): p. 14869-14871.
68. Chvapil, M., et al., *Mechanism of the Action of Chelating Agents on Proline Hydroxylation and its Incorporation into Collagenous and non-Collagenous Proteins*. *European Journal of Biochemistry*, 1967. **2**(2): p. 229-235.
69. Derian, C., et al., *Inhibitors of 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases block aspartyl beta-hydroxylation of recombinant human factor IX in several mammalian expression systems*. *J. Biol. Chem.*, 1989. **264**(12): p. 6615-6618.
70. Nagorni, M. and S.W. Hell, *Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. II. Power and limitation of nonlinear image restoration*. *J. Opt. Soc. Am. A*, 2001. **18**: p. 49-54.
71. Klausner, R., J. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz, *Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure*. *J. Cell Biol.*, 1992. **116**(5): p. 1071-1080.
72. Cole, N.B., et al., *Retrograde Transport of Golgi-localized Proteins to the ER*. *J. Cell Biol.*, 1998. **140**(1): p. 1-15.
73. Glick, B.S., T. Elston, and G. Oster, *A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack*. *FEBS Letters*, 1997. **414**(2): p. 177-181.
74. Hutcheon, B., L.A. Brown, and M.O. Poulter, *Digital analysis of light microscope immunofluorescence: high-resolution co-localization of synaptic proteins in cultured neurons*. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000. **96**(1): p. 1-9.

75. Umesh Adiga, P.S. and B.B. Chaudhuri, *Some efficient methods to correct confocal images for easy interpretation*. *Micron*, 2000. **32**(4): p. 363-370.
76. Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, and J.A. Aten, *Measurement of co-localisation of objects in dual colour confocal images*. *J. Microscopy*, 1993. **169**: p. 375-382.
77. Wickner, S., M.R. Maurizi, and S. Gottesman, *Posttranslational Quality Control: Folding, Refolding, and Degrading Proteins*⁸. *Science*, 1999. **286**(5446): p. 1888-1893.
78. Sousa, M. and A. Parodi, *The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins*. *EMBO J.*, 1995. **14**(17): p. 4196-203.
79. Moremen, K., R.B. Trimble, and A. Herscovics, *Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway*. *Glycobiology*, 1994. **4**(2): p. 113-125.
80. Velasco, A., et al., *Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of alpha-mannosidase I and II*. *J. Cell Biol.*, 1993. **122**(1): p. 39-51.
81. Gleeson, P.A., *Targeting of proteins to the Golgi apparatus*. *Histochemistry and Cell Biology*, 1998. **V109**(5): p. 517-532.
82. Campbell, J., et al., *A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities*. *Biochem. J.*, 1997. **326**(Pt 3): p. 929-39.
83. Orci, L., et al., *Heterogeneous distribution of filipin--cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus*. *Proc. Natl. acad. Sci. USA*, 1981. **78**(1): p. 293-297.
84. Teasdale, R., G. D'Agostaro, and P. Gleeson, *The signal for Golgi retention of bovine beta 1,4-galactosyltransferase is in the transmembrane domain [published erratum appears in J Biol Chem 1992 Jun 25;267(18):13113]*. *J. Biol. Chem.*, 1992. **267**(6): p. 4084-4096.
85. Teasdale, R.D., F. Matheson, and P.A. Gleeson, *Post-translational modifications distinguish cell surface from Golgi-retained {beta}1,4 galactosyltransferase*

- molecules. Golgi localization involves active retention.* Glycobiology, 1994. **4**(6): p. 917-928.
86. Munro, S., *An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention.* EMBO J., 1995. **14**(19): p. 4695-704.
87. Burke, J., et al., *Medial-Golgi retention of N-acetylglucosaminyltransferase I. Contribution from all domains of the enzyme.* J. Biol. Chem., 1994. **269**(16): p. 12049-12059.
88. Machamer, C.E., *Golgi retention signals: do membranes hold the key?* Trends in Cell Biology, 1991. **1**(6): p. 141-144.
89. Nilsson, T., et al., *Kin recognition : A model for the retention of Golgi enzymes.* FEBS Letters, 1993. **330**(1): p. 1-4.
90. Nilsson, T., et al., *Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells.* EMBO J., 1994. **13**(3): p. 562-74.
91. Roth, J., *Protein N-Glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to Organelle Topography and Function, Protein Quality Control, and Cell Interactions.* Chem. Rev., 2002. **102**(2): p. 285-304.
92. Sciaky, N., et al., *Golgi Tubule Traffic and the Effects of Brefeldin A Visualized in Living Cells.* J. Cell Biol., 1997. **139**(5): p. 1137-1155.
93. Polishchuk, R., E. Polishchuk, and A. Mironov, *Coalescence of Golgi fragments in microtubule-deprived living cells.* Eur J Cell Biol., 1999. **78**(3): p. 170-85.
94. Milland, J., et al., *The Cytoplasmic Tail of alpha 1,2-Fucosyltransferase Contains a Sequence for Golgi Localization.* J. Biol. Chem., 2001. **276**(15): p. 12012-12018.
95. Grabenhorst, E. and H.S. Conradt, *The Cytoplasmic, Transmembrane, and Stem Regions of Glycosyltransferases Specify Their in Vivo Functional Sublocalization and Stability in the Golgi.* J. Biol. Chem., 1999. **274**(51): p. 36107-36116.

96. Lucocq, J., E. Berger, and G. Warren, *Mitotic Golgi fragments in HeLa cells and their role in the reassembly pathway*. J. Cell Biol., 1989. **109**(2): p. 463-474.
97. Cole, N.B., et al., *Golgi Dispersal during Microtubule Disruption: Regeneration of Golgi Stacks at Peripheral Endoplasmic Reticulum Exit Sites*. Molecular Biology of the Cell, 1996. **7**: p. 631-650.
98. Rogalski, A., J. Bergmann, and S. Singer, *Effect of microtubule assembly status on the intracellular processing and surface expression of an integral protein of the plasma membrane*. J. Cell Biol., 1984. **99**(3): p. 1101-1109.
99. Van De Moortele S, et al., *Nocodazole and taxol affect subcellular compartments but not secretory activity of GH3B6 prolactin cells*. Eur J Cell Biol., 1993. **60**(2): p. 217-227.
100. Yang, W. and B. Storrie, *Expression of a Cytoplasmically Epitope-Tagged, human Glycosyltransferase in Homologous Cells Results in Mislocalization of Multiple Golgi Proteins*. Cell Biology International, 1997. **21**(4): p. 223-228.
101. Thompson, R.E., D.R. Larson, and W.W. Webb, *Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes*. Biophys. J., 2002. **82**: p. 2775-2783.
102. Pagano, R., M. Sepanski, and O. Martin, *Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: interaction with endogenous lipids provides a trans-Golgi marker for both light and electron microscopy*. J. Cell Biol., 1989. **109**(5): p. 2067-2079.
103. Pagano, R., *The Golgi Apparatus: insights from lipid biochemistry*. Biochem Soc Trans., 1990. **18**(3): p. 361-366.
104. Rosenwald, A. and R. Pagano, *Intracellular transport of ceramide and its metabolites at the Golgi complex: insights from short-chain analogs*. Adv Lipid Res., 1993. **26**: p. 101-118.
105. Dinter, A. and E.G. Berger, *Golgi-disturbing agents*. Histochemistry and Cell Biology, 1998. **109**(5 - 6): p. 571-590.

106. Elsner, M., H. Hashimoto, and T. Nilsson, *Cisternal maturation and vesicle transport: join the band wagon! (Review)*. *Molecular Membrane Biology*, 2003. **20**(3): p. 221-229.
107. De Matteis, M. and J. Morrow, *Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway*. *J Cell Sci*, 2000. **113**(13): p. 2331-2343.

Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ausschliesslich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Göttingen, den 2007-06-13

Tobias Müller