Von der Universität Bayreuth zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

# Untersuchung von Struktur und Dynamik selbstorganisierter Zellvorgänge

von

Konstantin S. A. Speckner aus Amberg

Gutachter Prof. Dr. Matthias Weiss
 Gutachter Prof. Dr. Holger Kress

Tag der Einreichung: 01.05.2022 Tag des Kolloquiums: 29.07.2022

### Kurzzusammenfassung

Lebenswichtige Vorgänge entwickeln sich häufig dynamisch und in Abstimmung an die Umgebungsverhältnisse. Um den biologischen Abläufen innerhalb der Zelle geeignete Bedingungen zu gewährleisten, verfügen Zellen über zahlreiche Kompartimente mit einer strukturell und biochemisch spezifischen Zusammensetzung. Allerdings sind die überwiegend selbstständig organisierten Zellstrukturen nicht voneinander unabhängig und regulieren sich wechselseitig. Die Untersuchung von Ordnungsprinzipien in lebender Materie erfordert daher nicht nur Mikroskopiemethoden, die hochauflösende Beobachtungen ermöglichen, sondern auch Modellbildungen, um die Komplexität der erfassten Vorgänge reduzieren zu können. In der vorliegenden Arbeit werden selbstorganisierte Strukturbildungsprozesse an Lebendkulturen menschlicher Zellen untersucht. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Zellstrukturen mittels konfokaler Lichtmikroskopie abgebildet und deren orts- wie zeitabhängigen Rückwirkungen unter biochemischer Einflussnahmen quantifiziert. Die Ergebnisse dokumentieren eine gitterartige Anordnung der Austrittsstellen des endoplasmatischen Retikulums. Deren Eigenschaften werden entscheidend von der Beschaffenheit des endoplasmatischen Retikulums bestimmt und können mit einem diffusionsbestimmten Entmischungsprozess erklärt werden. Dabei wird eine kontrast- und auflösungsverbesserte Bildgebungsmethode konfokaler Aufnahmen charakterisiert und am tubulären Netzwerk des endoplasmatischen Retikulums angewandt. Außerdem werden die Bewegungen von Aktinfilamenten im Zellkern analysiert. Somit bildet nukleares Aktin dynamische und anpassungsfähige Strukturen, die einer heterogenen Subdiffusion in der viskoelastischen Umgebung des Zellkerns nach dem Modell einer zeitveränderlichen fraktionalen Brownschen Bewegung unterliegen. Zusammen mit den Modellerklärungen vermitteln die Ergebnisse dieser Arbeit neuartige Erkenntnisgewinne über die vielschichtigen Wechselbeziehungen zwischen der Organisation und Dynamik selbstorganisierter Vorgänge innerhalb von Zellen.

### Abstract

Vital processes frequently evolve dynamically and in response with their environment. To provide suitable conditions for biological activities occurring in living cells, they consist of compartments with a structurally and biochemically distinct composition. Usually self-organized cell structures do not operate autonomously but rather regulate themselves. Investigating ordering principles in living matter therefore not only requires microscopy methods that allow high spatiotemporal observations, but also modeling approaches to scale down the complexity of the activities recorded. In this thesis, self-organized processes of structure formation in living cultures of human cells are studied. To this end, fluorescently labeled cell structures are imaged by confocal light microscopy and their spatiotemporal response to biochemical perturbations is quantified. The results demonstrate a lattice-like arrangement of endoplasmic reticulum exit sites, which substantially depends on the constitution of endoplasmic reticulum and could be explained by a diffusion-limited demixing process. Also, a technique that allows for contrast- and resolution-enhanced visualization of confocal images is characterized and applied to the tubular network of endoplasmic reticulum. In addition, movements of actin filaments within cell nuclei are analyzed. As a result, nuclear actin forms dynamic and responsive structures that undergo a heterogeneous subdiffusion in the viscoelastic environment of the nucleus, corresponding to a fractional Brownian motion with time-varying diffusion coefficients. Taken together, the results and model explanations of the present thesis provide new insights into the complex interplay between organization and dynamics of self-organized processes within cells.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufbau der Arbeit	1
I	Biophysikalische Hintergründe	3
2	<ul> <li>Biologische und physikalische Grundlagen</li> <li>2.1 Strukturelle Organisation eukaryontischer Zellen</li></ul>	4 4 8 11
II	Strukturelle Organisation des ERs und der ERES	21
3	<ul> <li>Charakterisierung und Anwendung auflösungsverbessernder SRRF-Mikroskopie</li> <li>3.1 Experimentelle Charakterisierung der SRRF-Mikroskopiemethode</li></ul>	22 23 29 39
4	Entschlüsselung physikalischer Hintergründe der Organisation von ER Exit Sites         4.1       Motivation: Dynamische Selbstorganisation der ERES         4.2       Projektidee und Konzeption         4.3       Material, Methoden und Auswertung         4.4       Charakterisierung der Musterbildung von ERES         4.5       Musterbildung der ERES unter Nocodazol         4.6       Musterbildung der ERES unter RNA-Interferenz von Lunapark         4.7       Musterbildung der ERES unter Filipin         4.8       Musterbildung der ERES unter hypotonischer Behandlung         4.9       Gegenüberstellung der Musterbildung von ERES         4.10       Generische Modellierung der Musterbildung von ERES         4.11       Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	42 42 44 46 47 50 53 58 60 67 70 72
Ш	Dynamik von Aktinfilamenten im eukaryontischen Zellkern	77
5	<ul> <li>Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik</li> <li>5.1 Motivation: Aktin im Zellkern</li></ul>	78 78 79 81

5.4	5.4 Aktinfilamentdynamik unbehandelter Zellen				
	5.4.1	MSD, Anomalieparameter und Transportkoeffizient			
	5.4.2	Nicht-Gaußsche und heterogene Diffusion			
	5.4.3	Zeitkorreliertes Bewegungsverhalten			
	5.4.4	Spektrale Leistungsdichte und Variationskoeffizient			
	5.4.5	Dynamik gebündelter Aktinfilamente			
	Dynamik zytoplasmischer Aktinfilamente				
	5.4.7	Gegenüberstellung der Dynamik nuklearen Aktins			
5.5	Nuklea	ares Aktin unter biochemischen Veränderungen $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$ $105$			
	5.5.1	Aktinfilamentdynamik unter Nocodazol			
	5.5.2	Aktinfilamentdynamik unter hypotonischer Behandlung 107			
	5.5.3	Aktinfilamentdynamik unter hypertonischer Behandlung 109			
	5.5.4	Reorganisation und Dynamik unter Valproinsäure			
	5.5.5	Reorganisation unter Trichostatin A			
	5.5.6	Gegenüberstellung der Dynamik punktartiger Aktinfilamente 116			
5.6	Zusam	menfassung, Modellbildung und Diskussion $\ldots$			
	5.6.1	Schematische Modellierung der Aktinfilamentdynamik			
	5.6.2	Diskussion der Aktinfilamentdynamik im aktuellen Forschungsstand . 125			

#### Fazit und Ausblick

131

IV	Anh	ang	133			
А	Laborarbeit mit Kulturzellen					
	A.1 Kultivierung adhärenter, menschlicher Zellen					
	A.2	Transiente Transfektion über Lipofektion oder Elektroporation	134			
	A.3	Fixierung, Antikörper- und Phalloidinfärbung	136			
	A.4	Lebendzellbildgebungsexperimente	136			
	A.5	Biochemische Veränderungen	136			
	A.6	Zelllysate, Westernblot und Proteinmengenquantifizierung	141			
В	Lichtmikroskopaufbau und Bildgebungsdetails 14					
С	Umsetzung der SRRF-Mikroskopiemethode 145					
D	Quantitative Analyse der Fluoreszenzaufnahmen 147					
	D.1	Segmentierung und Auswertung der ERES und ER-Strukturen	147			
	D.2	Lokalisation, Auswertung und Modellierung nuklearen Aktins	151			
	D.3	Schema zur Beurteilung statistischer Signifikanzen	153			
Е	Zentrale Kenngrößen der Musterbildung von ERES 15					
F	Zentrale Kenngrößen der Aktinfilamentdynamik 157					

Abbildungsverzeichnis	160
Tabellenverzeichnis	161
Literaturverzeichnis	162
Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	201
Danksagung	203
Eidesstattliche Versicherung	204

### 1 Einleitung



"La génération spontanée est une chimére." – LOUIS PASTEUR

Pasteurs Experiment nach G. L. Figuier [1].

Alles Leben kommt von Leben. Die wohl zentrale Aufgabe jedes Lebewesens besteht darin, sich in einer Art und Weise zu organisieren, die es erlaubt, eine Lebensfähigkeit hervorzubringen und aufrechtzuerhalten sowie diese an Veränderungen anzupassen, um Wettbewerbsmöglichkeiten zu gewährleisten. In dieser Hinsicht sind alle Organismen über Zellen, die kleinsten Lebenseinheiten, organisiert, die ihre Lebensfähigkeit offenbar eigenständig bewältigen. Hierfür greifen die Zellen auf verschiedene Konzepte zurück, um ihre Gesamtordnung sicherzustellen [2]. So geben sie umfassende Informationen in Form ihres Erbguts über Generationen hinweg weiter, mit denen sich zahlreiche Strukturen nach vorgegebenen Bauplänen bilden lassen. Außerdem schaffen sie unterschiedliche subzelluläre Umgebungsbeschaffenheiten, um den unzähligen biologischen Vorgängen definierte Bedingungen zu garantieren. Dies können sowohl über Membranen getrennte Zellorganellen sein [2] als auch anhand von aktiven wie passiven Phasentrennungen [3, 4]gestaltete membranlose, flüssigartige Organellen [5]. Erstaunlicherweise sind die Prozesse innerhalb der Zelle in einem hohen Maße selbstorganisiert [6,7]. Die Abläufe sind daher nicht über lineare Kausalitäten vorbestimmt, sondern entwickeln sich dynamisch aus ihren Strukturelementen und deren Wechselbeziehungen. Dies verleiht den Zellen darüber hinaus die Fähigkeit, ihre komplexe Organisation über Rückkopplungen mit der Umgebung beständig abzustimmen [6-8].

Um Ordnungsprinzipien in lebenden Zellen zu untersuchen, sind naturwissenschaftliche Ansätze aus dem Übergangsbereich von Biologie, Biochemie und Physik gefordert. So eignen sich Kulturzellen als Modellsysteme, mit denen allgemeine Funktionsweisen von Organismen anhand molekularbiologischer Arbeitstechniken kontrolliert erforscht werden können. Lichtmikroskopiemethoden dienen als Schlüsseltechnologien, die Einblicke in die komplexe Organisation lebender Zellen ermöglichen. Insbesondere konnte durch die Entdeckung fluoreszierender Proteine [9] und die stetigen Weiterentwicklungen räumlich wie zeitlich hochauflösender Lichtmikroskopie [10,11] zunehmend aufgedeckt werden, dass verschiedene Moleküle, deren Verbünde oder die Zellorganellen weder unbeweglich sind, noch voneinander unabhängig agieren. Vielmehr sind die Vorgänge in der Zelle eng verknüpft und beeinflussen sich, fernab eines thermodynamischen Gleichgewichts, entscheidend über wechselseitige Beziehungen. Da nicht alle Abläufe und Abhängigkeiten vollständig und gleichzeitig erfasst werden können, ist es unumgänglich die Komplexität zu reduzieren. Auf diese Weise greift die Forschung auf ein grundlegendes Konzept der Physik zurück: den Störungsansatz. Hierbei wird das System zielgerichtet beeinflusst und dessen Rückwirkungen werden mittels geeigneter Observablen registriert. Basierend auf quantitativen Bildanalysen und computergestützten Modellierungen vermitteln biophysikalische Modellerklärungen ein tiefergehendes Verständnis und damit breitere Erkenntnisgewinne.

In der vorliegenden Arbeit werden selbstorganisierte Strukturbildungsmechanismen in lebenden Säugetierkulturzellen untersucht, indem Rückwirkungen biochemischer Einflussnahmen quantitativ bestimmt werden. Hierzu werden fluoreszenzgekoppelte Proteine spezifischer Zellbestandteile mit konfokaler Spinning-Disk Mikroskopie abgebildet und über moderne Bildsegmentierungsverfahren identifiziert. Ausgehend von orts- und zeitabhängigen Analysen struktureller Eigenschaften werden biophysikalische Modelle entwickelt, mit denen Kennzeichen dieser lebenswichtigen Selbstorganisationsvorgänge generisch wiedergegeben und so in einen Gesamtzusammenhang eingebunden werden können.

In Teil I werden Hintergründe der Organisation eukaryontischer Zellen und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dargelegt sowie eine auflösungsverbessernde Bildgebungstechnik vorgestellt. Außerdem werden Grundlagen der Brownschen Bewegung und Eigenschaften anomaler Diffusion in komplexen Umgebungen behandelt und geeignete Analysemethoden und Kenngrößen experimenteller Einzelteilchentrajektorien beschrieben.

Anschließend werden die Untersuchungen von zwei Selbstorganisationsphänomenen bei Säugetierzellen erläutert. So organisieren sich die auf den Austausch von sekretorischen Frachtmolekülen spezialisierten Austrittsstellen des endoplasmatischen Retikulums in einer gitterartigen Anordnung. Deren Eigenschaften sind entscheidend von der tubulären Beschaffenheit des endoplasmatischen Retikulums abhängig, dessen Struktur auch an auflösungsverbesserten Rekonstruktionen konfokaler Fluoreszenzaufnahmen bewertet wird (siehe Teil II). Daneben bilden Aktinfilamente dynamische und anpassungsfähige Strukturen, die einer heterogenen Subdiffusion in der viskoelastischen Umgebung des Zellkerns nach dem Modell einer zeitveränderlichen fraktionalen Brownschen Bewegung unterliegen (siehe Teil III). Die experimentelle Vorgehensweise mit den verwendeten Materialien und Methoden wie auch den computergestützten Bildanalysen ist zusammen mit Übersichten charakteristischer Kenngrößen im Anhang dieser Dissertation geschildert.

# TEIL I

# Biophysikalische Hintergründe

2	Biolo	ogische	und physikalische Grundlagen	4
	2.1	Strukt	urelle Organisation eukaryontischer Zellen	4
		2.1.1	Organisation eines dynamischen Zytoskeletts	4
		2.1.2	Organisation des Zellkerns über nukleares Aktin	5
		2.1.3	Organisation und Funktion von ER und ERES	5
		2.1.4	Organisation der Organellen über Membrankontakte	6
		2.1.5	Organisation intrazellulärer Transportvorgänge	8
	2.2	Grundl	agen der Fluoreszenzmikroskopie	8
		2.2.1	Fluoreszenz und fluoreszierende Proteine	8
		2.2.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	8
		2.2.3	Optische Abbildung und Auflösungsvermögen	9
		2.2.4	Mikroskopiemethode der Super Resolution by Radial Fluctuations	9
	2.3	Konzej	pte der Einzelteilchenverfolgung	11
		2.3.1	Grundzüge Brownscher Bewegung	11
		2.3.2	Anomale Diffusion und Subdiffusion	13
		2.3.3	Nicht-Gaußsche Eigenschaften heterogener Diffusion	14
		2.3.4	Experimentelle Einzelteilchenverfolgung	14
		2.3.5	Analysemethoden von Einzelteilchentrajektorien	15

### 2 Biologische und physikalische Grundlagen

In diesem Kapitel werden biologische und physikalische Hintergründe zu den Themenbereichen und Analysemethoden dieser Arbeit vorgestellt. Hierzu werden Grundzüge der Organisation eukaryontischer Zellen, der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie und der Einzelteilchenverfolgung erläutert.

#### 2.1 Strukturelle Organisation eukaryontischer Zellen

Die Zelle ist die kleinste Einheit des Lebens, aus deren Verbund sich alle höher entwickelten Organismen zusammenschließen [2]. Diese ist über eine teilweise durchlässige Membran von ihrer Umgebung getrennt und in zahlreiche Kompartimente unterteilt, die jeweils eine charakteristische Struktur, biochemische Zusammensetzung und Funktion aufweisen. So beinhaltet der eukaryontische Zellkern das Erbgut und regelt die Vorgänge in der Zelle. Im Zytoplasma, der flüssig bis gelartigen Umgebung außerhalb des Zellkerns, finden unzählige Stoffwechselvorgänge statt. Diese gedrängte Grundsubstanz ("Crowding") enthält das Zytoskelett und die Organellen, die vom Zytosol, einem wässrigen Gemisch gelöster Ionen, niedermolekularer Verbindungen und Biomakromolekülen, umgeben sind. Daneben stellen die Zellorganellen durch Membranen abgegrenzte Kompartimente dar, die spezifische Aufgaben erfüllen. Hierbei gewährleisten Mitochondrien die Energieversorgung, Lysosomen die intrazelluläre Verdauung oder Peroxisomen Entgiftungsfunktionen. Weiter verfügt die Zelle über eine Vielzahl membranloser Organellstrukturen, die sich eigenständig über Phasentrennungen zellulärer Bestandteile ausbilden. Die Abläufe innerhalb der Zelle sind in einem hohen Maße voneinander abhängig und weitgehend selbstorganisiert, was deren kontinuierliche und zugleich robuste Abstimmung sicherstellt [2–7].

#### 2.1.1 Organisation eines dynamischen Zytoskeletts

Das Zytoskelett verleiht Zellen nicht nur ihre mechanische Stabilität, sondern ermöglicht auch intrazelluläre Transportprozesse und aktive Zellbewegungen. Dieses umfasst drei strukturell und funktionell verschiedene Fasersysteme, die sich selbstständig auf- und abbauen, in ihren Eigenschaften angepasst werden und über vielzählige Proteine dynamische Verbindungen untereinander als auch mit anderen Zellbestandteilen knüpfen [2].

Die starrsten Elemente des Zytoskeletts, die Mikrotubuli, bilden hohlzylinderartige Röhrchen mit einem Durchmesser von etwa 25 nm. Diese polymerisieren ausgehend vom Zentrosom nahe des Zellkerns und kollabieren infolge ihrer dynamischen Instabilität, wenngleich ihr Wachstumsverhalten vielfältig modifiziert werden kann. Die Motorproteine Kinesin und Dynein binden an die Mikrotubuli und vermitteln damit einen gerichteten Transport von Biomolekülen, Vesikeln und Organellen oder der Chromosomen.

Aktin ist ein Strukturprotein aller Eukaryonten, dessen monomerische Form sowie polymerisierten Filamente zahlreich reguliert werden und dadurch vielfältige Funktionen übernehmen. Aktinfilamente bestehen aus einer 7 nm dicken Helix zweier Aktinstränge, deren Enden unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen. Diese Filamente bilden ein stabilisierendes Netzwerk unterhalb der Plasmamembran und bündeln sich zu Stressfasern. Über seine Assoziationen mit den Motorproteinen von Myosin trägt Aktin zur Adhäsion und Bewegung der Zellen wie auch zur Endozytose oder Zytokinese bei.

Intermediärfilamente mit einem Querschnitt von ca. 10 nm bestehen aus den verwandten Proteinen von Desmin, Keratin und Lamin. Diese erhöhen überwiegend die Stabilität im Zytoplasma wie auch im Zellkern. Ihre Eigenschaften sind je nach Zelltyp sehr verschieden.

#### 2.1.2 Organisation des Zellkerns über nukleares Aktin

Der Zellkern verkörpert eine heterogene und dynamische Umgebung, die zahlreiche Funktionen erfüllt und vielschichtig organisiert ist [2,12–14]. So werden die genetischen Erbinformationen der DNA über Histone gerollt, zu den Chromatinfasern gepackt und sind als Chromosomen in diskreten Territorien angeordnet. Diese Informationen werden über ein komplexes Zusammenwirken molekularer Aktivitäten erhalten und vererbt sowie zu RNA transkribiert und prozessiert [2,12]. Im Zwischenraum von Chromatin enthält der Zellkern vielzählige kleinere Strukturen wie Nukleoli, nukleare Speckles, Cajal- und PML-Körperchen, die sich über Phasenseparationen selbstorganisiert aus RNA und Proteinen formen [2,12,13]. Diese biomolekularen Kondensate sind an zahlreichen Zellvorgängen beteiligt und organisieren Moleküle, welche die Genregulation, den RNA-Metabolismus oder Signalübertragungen gewährleisten. Angesichts dieser facettenreichen Organisation und Dynamik sind rheologische Eigenschaften des Zellkerns äußerst komplex [14].

In dieser Hinsicht trägt nukleares Aktin wesentlich zur dynamischen Strukturierung des Zellkerns und wandlungsfähigen Organisation von Chromatin bei [15–17]. Hierbei interagiert globuläres Aktin mit den RNA-Polymerasen der Transkription und reguliert diese sowie mehrere Molekülkomplexe, welche die Zugänglichkeit von Chromatin kontrollieren. Außerdem wird eine Polymerisation filamentösen Aktins durch Signalgebungen angeregt und abgestimmt [15–17]. Auf diese Weise unterstützen nukleare Aktinfilamente Umstrukturierungen des Zellkerns während interner Regulationen wie der Zellteilung und Differenzierung oder externen Anpassungen in Verbindung mit der Adhäsion und Ausbreitung der Zellen. Nukleare Aktinfilamente und ihre zahlreichen Interaktionspartner sind für die Reparaturdynamik geschädigter DNA von entscheidender Bedeutung und vermitteln dabei langreichweitige Bewegungen von Reparaturstellen und Genloki [15–17].

#### 2.1.3 Endoplasmatisches Retikulum und ER Exit Sites

Die größte Organelle, das endoplasmatische Retikulum (ER), bildet einen kontinuierlichen Membrankörper, dessen Bereiche verschieden strukturiert sind, um spezifische Aufgaben zu erfüllen [2,18,19]. So findet die Translation, Faltung und Modifikation von Proteinen an den aus der Kernhülle hervorgehenden und mit Ribosomen besetzen Membranflächen des rauen ERs statt. Das tubulär-verzweigte System des glatten ERs ist hingegen auf bestimmte Stoffwechselprozesse, wie die Lipidbildung, Speicherung von Calcium oder Entgiftung spezialisiert. Hierbei formt das ER ein verästeltes Netzwerk untereinander verbundener Röhrchen und Zisternen, das ständigen Reorganisationen unterliegt [20–22]. Die aktiven Veränderungen sind entscheidend mit der Dynamik des Zytoskeletts und den Interaktionen zu anderen Organellen verknüpft und können in Umstrukturierungen der ER-Tubuli, Oszillationen der ER-Membranen und den Transport im ER-Lumen zusammengefasst werden [20–22]. In dieser Hinsicht wird die Gestaltung und Erhaltung des ERs maßgeblich über verschiedene Proteinfamilien bestimmt. Mutationen dieser strukturgebenden Proteine gehen unmittelbar mit morphologischen Schädigungen des ERs einher und werden mit mehreren Krankheitsbildern in Verbindung gebracht [20–22], auch wenn qualitätssichernde Mechanismen der Proteinsekretion im ER vorhanden sind [23].

#### Organisation und Funktion der ER Exit Sites

Die Austrittsstellen des ERs ("ER Exit Sites", ERES) stellen definierte und funktionelle Membrandomänen dar, an denen verschiedene Proteine wechselseitig daran beteiligt sind, den Austausch sekretorischer Frachtmoleküle mit dem Golgi-Apparat zu regulieren [24, 25]. Über eine Kaskade biochemischer Aktivierungen und Komplexbildungen werden hierzu die etwa 60 nm großen COPII-Vesikel gebildet [26, 27], wobei für den sekretorischen Transport größerer Moleküle auch ausgedehnte Exportstrukturen erzeugt werden können [28,29]. Durch diesen bei jedem Eukarvonten erhaltenen Mechanismus werden alle Proteine des sekretorischen Wegs über die ERES an den Golgi-Apparat weitergeleitet, wo sie modifiziert, sortiert und verteilt werden [2]. Während die COPII-Vesikel vorübergehende Transportstrukturen darstellen und die sekretorischen Proteine Residenzzeiten im Bereich weniger Sekunden an den ERES aufweisen, sind die ERES hingegen langlebige Komplexe [24–27]. Hierbei verfügen Säugetierzellen über mehrere hundert gitterartig angeordnete ERES und können deren Beschaffenheit an zellinterne Regulationen als auch externe Veränderungen dynamisch anpassen [28,29]. Die intrazelluläre Organisation der ERES wird zudem von physikalischen Interaktionen mit dem Zytoskelett und Bewegungen auf dem ER bestimmt. Nach derzeitigem Kenntnisstand gehen die ERES über einen etwa 50 nm schlanken Hals kontinuierlich aus dem ER hervor und formen mehrere, verworrene Ausstülpungen zur Entwicklung sekretorischer Exportstrukturen [29–31]. Der Export von Ladungsmolekülen wird von den COP-Proteinen im Zusammenwirken mit Tangol reguliert [29].

#### 2.1.4 Organisation und Kommunikation der Organellen über Membrankontakte

Die Organellen sind jedoch nicht voneinander unabhängig in der Zelle angeordnet [2,32]. Vielmehr sind diese über Membrankontakte miteinander verknüpft und kommunizieren sowie regulieren sich durch den Austausch von Ionen, Lipiden und weiteren kleinen Molekülen [33,34]. Die Interorganellkontaktstellen sind definierte Bereiche, an denen zwei Membranen mithilfe spezifischer Halteproteine und Bindekomplexe im Abstand



Abb. 2.1: Bestandteile der strukturellen Organisation einer eukaryontischen Zelle. Schematische abgebildet sind zentrale Funktionselemente einer eukaryontischen Zelle [2], die in der vorliegenden Arbeit thematisiert werden. Nicht wiedergeben lassen sich Wechselbeziehungen auf mehreren Längen- und Zeitskalen in der gedrängten Zellumgebung ("Crowding"). (a) Die Zelle ist in zahlreiche Kompartimente untergliedert, die eine charakteristische Struktur. biochemische Zusammensetzung und Funktion aufweisen sowie untereinander interagieren. Insbesondere bildet das ER einen zusammenhängenden Membrankörper aus strukturell und funktionell verschiedenen Bereichen, der mit nahezu allen Organellen interagiert und diese reguliert. Aktive Veränderungen des ERs sind mit der Dynamik der Mikrotubuli verknüpft. (b) Der Zellkern beinhaltet das Erbgut und stellt eine heterogene Umgebung dar, in der aktive Zellvorgänge ablaufen. Nukleares Aktin unterstützt in globulärer wie polymerisierter Form die beständige Organisation des Zellkerns und ist an der Reparaturdynamik von geschädigter DNA beteiligt. (c) Gegenwärtiger Forschungsstand über den Aufbau eines ERES [30,31]. Diese funktionellen Membrandomänen einer verästelten Geometrie ermöglichen mehrere Knospungsstellen für die Entwicklung sekretorischer Transportstrukturen. Die ERES sind langlebige und anpassungsfähige Zellstrukturen, die sich auf dem ER bewegen und gitterartig angeordnet sind.

von weniger als 30 nm zusammengehalten werden, aber nicht verschmelzen [33]. Diese physischen Kontakte können zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden andauern und erfüllen zahlreiche Funktionen, die sich in Signalgebungen, metabolischen Vorgängen und Regulierungen der Organellmembranen untergliedern lassen [34].

Im Zuge dessen interagiert das ausgedehnte Membransystem des ERs mit nahezu allen Organellen und reguliert diese entscheidend [32,35]. Insbesondere ist das Netzwerk der Mitochondrien eng mit dem ER verbunden, dessen Biogenese durch die Calciumaufnahme und den Lipidaustausch, sowie Teilungen und Organellvererbungen über die Kontakte mit dem ER dynamisch koordiniert werden [36]. Zugleich prägt das ER die Organisation membranloser Organellstrukturen [37] und ist mit der Plasmamembran funktionell verbunden [38]. Die Membrankontakte zwischen den Organellen sind ausreichend beständig, um bei einem hypoosmotischen Schock der Zellen stellenweise erhalten zu bleiben [39].

#### 2.1.5 Organisation intrazellulärer Transportvorgänge

Eukaryontische Zellen nutzen physikalisch unterschiedliche Transportmechanismen, um unzählige Komponenten an ihre Bestimmungsorte in der komplex-gedrängten Umgebung des Zytoplasmas zu leiten [40,41]. Für kurze Transportwege und kleine Strukturen ermöglicht die stochastische Brownsche Bewegung zügige Vermischungen und Kollisionen der Teilchen. Hierbei führt die Diffusion nicht nur zur räumlichen Dispersion, sondern ist zudem eine treibende Kraft biochemischer Reaktionen und Musterbildungen [4,8]. Die Überbrückung größerer Entfernungen und der Transport von Vesikeln oder Organellen, erfordert jedoch aktive Bewegungen entlang der Zytoskelettfilamente. Diesbezüglich rufen molekulare Motoren mechanische Kräfte über die Hydrolyse biochemischer Speicherstoffe hervor. Darüber hinaus besteht unmittelbarer Austausch über Membrankontakte und, besonders in pflanzlichen Zellen, aktiver Materialtransport über advektive Flüsse [40,41].

#### 2.2 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

#### 2.2.1 Fluoreszenz und fluoreszierende Proteine

Fluoreszenz ist die Aussendung eines Photons durch eine spin-erlaubte elektronische Relaxation eines zuvor angeregten Moleküls [42]. Ausgehend von seinem elektronischen Grundzustand wird das Fluorophor durch die Absorption eines geeigneten Photons in einen höheren Zustand angeregt (unter Berücksichtigung des Franck-Condon-Prinzips), von dem es strahlungslos (~  $10^{-12}$  s) in den ersten elektronischen Singulettzustand zurückfällt. Die Relaxation des Fluorophors unter der Emission eines Photons (~  $10^{-9}$  s) in ein Schwingungs- und Rotationsunterniveau des elektronischen Grundzustands bildet die Fluoreszenz. Somit verfügt das Fluoreszenzphoton über eine rotverschobene Wellenlänge (Stokes-Verschiebung) und das Emissionsspektrum über eine gewisse Bandbreite.

Viele synthetische Farbstoffmoleküle besitzen ein delokalisiertes Elektronensystem und damit die Eigenschaft der Fluoreszenz [42]. Diese können zur spezifischen Markierung von Zellbestandteilen eingesetzt werden, wenn sie an bestimmte Strukturmoleküle gekoppelt und von der Zelle aufgenommen werden. Daneben existieren autofluoreszierende Proteine, die vom grün-fluoreszierenden Protein (GFP) einer Quallenart abstammen [9]. Diese haben den Vorteil, in lebenden Zellen verwendet werden zu können. Dazu wird der genetische Code des Zielproteins und GFPs auf einer Plasmid-DNA aneinandergereiht und über eine Transfektion in die Zelle eingebracht. Neben den ursprünglichen Proteinen exprimieren diese anschließend fluoreszierende Fusionsproteine. Die Faltung wird normalerweise nicht durch das ca. 5 nm große GFP beeinträchtigt, das keine toxischen Wirkungen zeigt [9].

#### 2.2.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie stellt ein optisches Bildgebungsverfahren dar, dessen Detektion auf eine zum Objektiv konjugierte Ebene beschränkt ist [43]. Hierzu befindet sich eine Lochblende im Detektionsstrahlengang, die unfokussierte Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene abschirmt und so eine Tiefendiskriminierung ermöglicht. Auch verbessert dies den Kontrast und das Auflösungsvermögen gegenüber der Epifluoreszenzmikroskopie. Die erreichbare Tiefenschärfe wird von der Öffnung der Lochblende sowie der numerischen Apertur und Wellenlänge festgelegt. Durch die konfokale Abbildung über eine Lochblende kann jedoch nur eine Probenstelle detektiert werden. Bei einem konfokalen Spinning-Disk Mikroskop wird die Probe über etwa 2000 gleichzeitig genutzte Lochblenden parallelisiert und mehrmals innerhalb einer Umdrehung des Nipkow-Scheiben-Systems abgerastert [43].

#### 2.2.3 Optische Abbildung und Auflösungsvermögen

Die Welleneigenschaften elektromagnetischer Strahlung geben das Auflösungsvermögen optischer Instrumente vor. Deshalb erscheint jedes von einem Mikroskop abgebildete Objekt als beugungsbegrenztes Signal auf dem Detektor. Mathematisch wird die optische Abbildung über die Faltung des Intensitätsprofils der zu untersuchenden Objekte mit der optischen Transferfunktion des Instruments beschrieben [43]. Eine Punktlichtquelle, d.h. ein einzelnes Molekül, wird deshalb als ein Muster konzentrischer Kreise in der Bildebene registriert. Die Punktspreizfunktion einer Punktlichtquelle, das Airy-Profil, wird in sehr guter Näherung (FWHM<sub>Airy</sub>  $\simeq$  FWHM<sub>Gauss</sub>) von einer (eindimensionalen) Gaußfunktion

$$I(x) = I_0 \exp\left[-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_0^2}\right], \quad \text{mit} \quad \text{FWHM} = 2\sqrt{2\ln 2}\,\sigma_0 \tag{2.1}$$

beschrieben [43]. Dem Rayleigh-Kriterium folgend können zwei selbstleuchtende Punkte unterschieden werden, wenn das Intensitätsmaximum des eines Punktes mit dem ersten Minimum des anderen Profils zusammenfällt. Für ein Konfokalmikroskop beträgt das optische Auflösungsvermögen  $r_{\rm konf} = 0.61 \frac{\lambda}{\rm NA}$  [43], wodurch am Mikroskopaufbau (Wellenlänge  $\lambda = 491$  nm, Numerische Apertur NA = 1.4) keine Objekte separiert abgebildet werden können, deren Abstände geringer als  $r_{\rm konf} \simeq 214$  nm sind. Experimentell lässt sich das Rayleigh-Kriterium über die Punktspreizfunktion abschätzen, deren charakteristische Längenskala für den Abfall auf die halbe  $1/e^2$ -Breite  $\sigma_{\rm exp}$  sich nach (2.1), ausgehend von einem Gaußschen Intensitätsprofil FW( $1/e^2$ ) = 4  $\sigma_0$ , zu  $\sigma_{\rm exp} = 2 \sigma_0$  bestimmt.

#### 2.2.4 Mikroskopiemethode der Super Resolution by Radial Fluctuations

Die "Super Resolution by Radial Fluctuations" (SRRF) [44,45] ist eine fortschrittliche Mikroskopiemethode, mit der eine höchstauflösende Bildgebung bei lebenden Organismen erzielt werden kann, indem das Maß der lokalen Gradientenkonvergenz (Radialität) mit einer Subpixel-Genauigkeit aus Zeitserien lichtmikroskopischer Aufnahmen bestimmt wird. Die SRRF-Bildgebung [44] kombiniert räumliche Informationen von Radialitätsbildern mit Zeitstatistiken höherer Ordnungen von SOFI [46], um Intensitätsgradienten der Moleküle von unkorrelierten Helligkeitsschwankungen des Bildrauschens zu unterscheiden. Im entscheidenden Unterschied zur höchstauflösenden Mikroskopie über lokalisationsbasierte Ansätze [47] wird der Informationsgehalt der optischen Abbildungen nicht genutzt, um einzelne Emitter zu registrieren. Daher ist die SRRF-Mikroskopie bei Systemen mit einer hohen Dichte an fluoreszenten Molekülen vorteilhaft, wie es in biologischen Umgebungen verbreitet ist. Gegenwärtig konnte die SRRF-Methode von [44] bei Lebendzellbildgebungen von Weitfeld-, Konfokal- und TIRF-Aufnahmen eingesetzt werden [45,48,49] und wird ferner unter der Bezeichnung SRRF-Stream<sup>(+)</sup> kommerziell vertrieben [50,51].

#### Konzeption der Radialität und des SRRF-Algorithmus

Die SRRF-Methode basiert auf der Annahme, dass die optische Abbildung aus der Faltung von Punktlichtquellen mit einer Punktspreizfunktion gebildet wird, die eine höhere Symmetrie als das Hintergrundsignal aufweist [44, 45]. Unter dieser Voraussetzung lässt sich die Position eines Emitters ermitteln, indem das lokale Minimum des Helligkeitsgradientens ermittelt wird. Dieses Konzept der radialen Symmetrie [52] ermöglicht eine Lokalisation mit Subpixel-Genauigkeit, sofern das Bildrauschen und die diskretisierte Abbildung über einen Optimierungsalgorithmus ausgeglichen werden. Der SRRF-Algorithmus [44] greift auf diese Überlegung zurück, nutzt die Helligkeitsgradienten allerdings nicht zur Teilchenlokalisierung. Stattdessen wird die Nähe aller Bildpunkte zum Emitter auf einem Subpixelraster erfasst und zeitlich gewichtet. Bei den Radialitätsbildern können zwei gaußförmige Punktspreizfunktionen im Abstand  $\Delta r = 1.7 \sigma_0$  separiert werden [44]. Diese Eigenschaft einer höchstauflösenden Bildgebung ist einzig numerisch bekannt.

Die Radialitätsbilder werden mit dem SRRF-Algorithmus geometrisch konstruiert [44]. Hierzu wird die Radialität an einer Bildstelle über die senkrechten Abstände zu den Intensitätsgradienten in der Umgebung dieser Position quantifiziert und über mehrere Zeitpunkte korreliert. Zunächst wird das Gradientenbild berechnet, dessen Bildpunkte in ein Raster der Vergrößerung  $V_{\rm rad}$  unterteilt werden. Ausgehend von einem Subpixel  $\underline{r_c}$ werden unter Berücksichtigung von  $N_{\rm axes}$  Richtungsachsen  $2N_{\rm axes}$  Ringkoordinaten  $\underline{r'_i}$ gebildet, die gleichmäßig auf einem Ring mit Radius  $R_{\rm ring}$  um  $\underline{r_c}$  angeordnet sind (siehe Abb. 2.2a). An den Ringkoordinaten  $\underline{r'_i}$  werden die Intensitätsgradienten interpoliert und die kürzesten Entfernungen  $d_i$  des Gradientenfelds  $\underline{G_i}$  zum Subpixel  $\underline{r_c}$  bestimmt. Aus der Konstruktion von Abb. 2.2b wird die Radialität am Ort  $\underline{r_c}$  zum Zeitpunkt t

$$\mathcal{R}(\underline{r_c}, t) = \frac{1}{2N_{\text{axes}}} \sum_{i=1}^{2N_{\text{axes}}} \operatorname{sgn}(\underline{G_i} \cdot \underline{r_i}) \cdot \left(\frac{1 - d_i}{|\underline{r_i}|}\right)^2$$
(2.2)

als das Konvergenzmaß aller Gradientenlinien an den Ringkoordinaten definiert, das mit den Helligkeitswerten oder Feldstärken an  $\underline{r_c}$  gewichtet werden kann [44]. Auf Grundlage von (2.2) können die Radialitäten  $\mathcal{R}(\underline{r_c}, t)$  parallelisiert berechnet und die Orte  $\underline{r_c}$  weiter driftkorrigiert werden. In den Radialitätsbildern werden charakteristische Eigenschaften der optischen Abbildung erhalten [44]. Dabei werden die Halbwertsbreiten der Objekte über  $R_{\text{ring}}$  festgelegt und diese verringern sich linear mit  $R_{\text{ring}}$  [44].



Abb. 2.2: Konstruktionsmechanismus der SRRF-Mikroskopiemethode. Bei der Bildgebung über den SRRF-Algorithmus [44] wird die Radialität  $\mathcal{R}(\underline{r}_c, t)$  als das Maß der lokalen Gradientenkonvergenz [52] (a) an den Koordinaten  $\underline{r}_c$  eines Subpixelrasters der Vergrößerung  $V_{\rm rad}$  bestimmt, indem (b) die kürzesten Entfernungen  $d_i$  des Gradientenfelds  $\underline{G}_i$  an den 2 $N_{\rm axes}$  ringförmig im Radius  $R_{\rm ring}$  angeordneten Koordinaten  $\underline{r}'_i$  nach (2.2) summiert und (2.3) korreliert werden (Gezeigte Parameterwahl:  $V_{\rm rad} = 4$ ,  $N_{\rm axes} = 4$ ,  $R_{\rm ring} = 1$  Pixel).

Allerdings ist die Wiedergabe der Radialitäten  $\mathcal{R}(\underline{r}_c, t)$  einzig über den räumlichen Beitrag nach (2.2) anfällig gegenüber experimentellem Bildrauschen, weshalb zeitliche Informationen in den SRRF-Algorithmus [44] einbezogen werden. Im Zuge dessen werden nicht nur Mittelwert- oder Maximumsprojektion  $\langle \mathcal{R} \rangle_t$  sondern auch Statistiken höherer Ordnungen von SOFI [46] für die Ausgabe der Radialitätsbilder genutzt. Standardmäßig werden die Eigenkumulanten zweiter Art von nachfolgenden Bildern ( $\tau = \Delta t$ ) berechnet

$$\mathcal{R}(\underline{r_c},\tau) = \left\langle \left[ \mathcal{R}(\underline{r_c},t+\tau) - \left\langle \mathcal{R}(\underline{r_c},t+\tau) \right\rangle_t \right] \cdot \left[ \mathcal{R}(\underline{r_c},t) - \left\langle \mathcal{R}(\underline{r_c},t) \right\rangle_t \right] \right\rangle_t,$$
(2.3)

was einen geeigneten Kompromiss zwischen der Abbildungsgenauigkeit und dem Schärfegewinn der SRRF-Aufnahmen darstellt [44]. Die mit (2.3) bestimmten Helligkeitsprofile entsprechen idealerweise einer Punktspreizfunktion, deren Halbwertsbreite für  $R_{\rm ring} = \sigma_{\rm exp}$ um den Faktor  $\sqrt{2}$  verringert ist und linear mit  $R_{\rm ring}$  zurückgeht. Entscheidende Parameter bei der Berechnung der Radialitätsbilder mit dem SRRF-Algorithmus [44], der durch das Softwarepaket NanoJ [53] bereitgestellt wird, sind daher die Radialitätsvergrößerung  $V_{\rm rad}$ der Ringradius  $R_{\rm ring}$ , die Anzahl von Richtungsachsen  $N_{\rm axes}$  als auch die einbezogenen Lichtmikroskopieaufnahmen  $N_{\rm img}$  einer Pixelgröße nahe der Nyquist-Abtastung [50, 51]. Die Bildgebung konfokaler Fluoreszenzaufnahmen über die SRRF-Mikroskopiemethode wird in Kapitel 3 experimentell charakterisiert und an lebenden Zellen angewandt.

#### 2.3 Konzepte der Einzelteilchenverfolgung

#### 2.3.1 Grundzüge Brownscher Bewegung

Die Brownsche Molekularbewegung lässt sich mit einer makroskopisch kontinuierlichen oder einer mikroskopisch statistischen Sichtweise erklären. Makroskopisch beschreibt die Diffusion den Ausgleich von Konzentrationsunterschieden. Dies bewirkt einen Teilchenstrom  $j = -D \nabla C$ , der zum Konzentrationsgradienten  $\nabla C$  gegensätzlich gerichtet ist und

über den Diffusionskoeffizienten D, einer makroskopischen Materialgröße, definiert wird. Mit dem Erhalt der Teilchenanzahl  $\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \cdot \underline{j} = 0$  folgt daraus die Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \,\nabla^2 C. \tag{2.4}$$

Diese beschreibt die zufälligen Bewegungen mikroskopischer Teilchen, die Brownsche Molekularbewegung. Mit (2.4) können jedoch keine Aussagen über den Bewegungsablauf einzelner Teilchen oder deterministische Vorhersagen künftiger Bewegungen getroffen werden. Als Wahrscheinlichkeiten aufgefasst versteht sich (2.4) als eine spezielle Form der Fokker-Planck-Gleichung. Die Wahrscheinlichkeit, ein Teilchen in einer Umgebung des Ortes <u>r</u> zum Zeitpunkt t zu finden, wird von  $\mathcal{P}(\underline{r}, t) d\underline{r}$  angegeben. Dessen Zeitentwicklung bestimmt sich nach der Diffusionsgleichung (2.4), mit einer Lösung in zwei Dimensionen

$$\mathcal{P}(x, y, t) = \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left[-\frac{(x^2 + y^2)}{4Dt}\right].$$
(2.5)

Die Verteilungsfunktion (2.5), der Propagator der Diffusion, ist von der Zeit t und dem Abstandsquadrat  $r^2 = x^2 + y^2$  abhängig. Ihre Momente charakterisieren die Diffusion des Teilchenensembles. Somit verändern sich die mittleren Positionen der Teilchen nicht. Das zweite Moment, die mittlere quadratische Verschiebung, ist MSD(t) = 4Dt. Die Teilchen überqueren daher eine linear zunehmende Fläche. Die Diffusion wird von der Diffusionsgleichung (2.4) und dem Propagator (2.5) vollständig und inhaltsgleich beschrieben.

In einer mikroskopischen Perspektive erfahren die Teilchen zufällige Bewegungen, die von andauernden Kollisionen mit den Lösungsmittelmolekülen hervorgerufen werden. Dies kann über einen Zufallslauf ("Random Walk") auf einem Gitter, dargestellt werden. Hierbei überqueren die Teilchen eine Gitterposition  $\Delta x$  innerhalb eines Zeitschritts, weshalb die *n*-te Position des *i*-ten Teilchens  $x_i(n) = x_i(n-1) \pm \Delta x$  beträgt. Ein Ensemble unabhängiger Teilchen mit unkorrelierten Schritten legt die mittlere quadratische Verschiebung

$$\left\langle x_{i}(n)^{2} \right\rangle_{E} = \left\langle x_{i}(n-1)^{2} \right\rangle_{E} + \Delta x^{2} = n \Delta x^{2}$$
(2.6)

zurück. Nach (2.6) steigt das  $MSD(t) = \langle x_i(n)^2 \rangle_E$  für d Dimensionen linear mit der Zeit:

$$MSD(t) = 2Dt \cdot d. \tag{2.7}$$

Im Zuge dessen wird der Diffusionskoeffizient der Teilchen als die zurückgelegte Wegfläche pro Zeiteinheit festgelegt  $D = \Delta x^2/2\Delta t$ . Die Modellvorstellung eines Bewegungsbildes, das einem Random-Walk folgt, kann physikalisch mit der Langevin-Gleichung formuliert werden. Nach Einstein und Smoluchowski setzt das Fluktuations-Dissipations-Theorem  $D = \mu k_B T$  die Beweglichkeiten  $\mu$  auf mikroskopischer Ebene in Zusammenhang mit der makroskopischen Materialeigenschaft D der Diffusion [54–56].

#### 2.3.2 Anomale Diffusion und Subdiffusion

Diffusionsbewegungen weichen in komplexen Umgebungen wie Zellen häufig von einer Brownschen Bewegung ab [54–57]. Dies zeigt sich, wenn die experimentell erfasste Dynamik einem Gaußschen Propagator widerspricht oder die Voraussetzungen eines Random Walks (zeitweise) gebrochen werden. Anomale Diffusion bezeichnet Prozesse, deren

$$MSD(t) = K_{\alpha} t^{\alpha}, \qquad \text{mit} \quad \alpha \neq 1$$
(2.8)

nach einem zu (2.7) verschiedenen Potenzgesetz skaliert. Die Form des MSD(t) wird vom Anomalieparameter der Diffusion  $\alpha$  festgelegt und der Proportionalitätsfaktor  $K_{\alpha}$ lässt sich als verallgemeinerter Transportkoeffizient (Einheit  $\frac{m^2}{s^{\alpha}}$ ) verstehen. Subdiffusion bezeichnet eine Dynamik mit  $\alpha < 1$ . Subdiffusive Bewegungen sind in biologischen Systemen für Strukturen verschiedenster Größen allgegenwärtig ( $\alpha \simeq 0.3 - 0.9$ ) und werden durch das molekulare "*Crowding"* zellartiger Umgebungen begünstigt [54–56]. Dieses kann entscheidenden Einfluss auf biochemische Bindungen und Reaktionen haben.

#### Modellbeschreibungen von Subdiffusion

Mathematisch lässt sich Subdiffusion über viele Modelle beschreiben. Im biologischen Kontext stellen der Continuous-Time Random Walk (CTRW), räumlich eingeschränkte Diffusion oder fraktionale Brownsche Bewegung (FBM) geläufige Modellvorstellungen dar. Jedes dieser Modelle kann eine Subdiffusion hervorrufen, diese müssen jedoch nicht notwendigerweise voneinander unabhängig im System auftreten [54–57].

Mit einer asymptotischen Verteilung von Wartezeiten (z.B. eine Cauchy-Verteilung) kann ein CTRW als Diffusion auf einer verlangsamten Zeitskala aufgefasst werden. Da immer mehr Teilchen durch eine große Wartezeit stillstehen, verlangsamt sich die Systemdynamik kontinuierlich. Der CTRW bricht das zentrale Grenzwerttheorem. Einzelne Teilchen zeigen diffusive Bewegungen, deren Ensemble zeitweise eine Subdiffusion ( $\alpha < 1$ ). Diese Eigenschaft wird als schwacher Ergodizitätsbruch bezeichnet. Die Trajektorien eines CTRW unterscheiden sich in ihrer Geometrie nicht von einer Brownschen Bewegung.

In räumlich unregelmäßigen Systemen können die Eigenschaften der Diffusion verändert sein, wenn der zugängliche Raum auf ein endliches Labyrinth eingeschränkt ist. So ist es bei einer sehr großen Zahl von Hindernissen möglich, dass diese ein Perkolationscluster mit einer selbstähnlichen, fraktalen Geometrie ausbilden. In dieser Umgebung werden subdiffusive Teilchenbewegungen transient hervorgerufen. Gewöhnlich wird eine räumlich eingeschränkte Diffusion mit Bewegungen auf biologischen Membranen verbunden.

Bei der FBM ist die Markow-Annahme unabhängiger Bewegungen verletzt, einzelne Schritte sind über Gedächtnisterme langreichweitig zeitlich korreliert. Antipersistente Teilchenbewegungen werden oftmals mit einer Viskoelastizität des umgebenden Mediums assoziiert. Eine antikorrelierte FBM kann subdiffusive Bewegungen mit einem beliebigen Anomalieparameter zwischen  $0 < \alpha < 1$  erklären und ist ergodisch.

#### 2.3.3 Nicht-Gaußsche Eigenschaften heterogener Diffusion

Zusätzlich zu einem von  $\alpha = 1$  verschiedenen Potenzgesetz des MSD(t) unterscheiden sich (anomale) Diffusionsbewegungen häufig von einer Gaußschen Diffusion (2.5) [58,59]. Der experimentelle Widerspruch einer Brownschen, nicht aber Gaußschen Diffusion bezüglich des zentralen Grenzwerttheorems entsteht, wenn die Zeitskalen zwischen der Bewegung der Teilchen und der Umgebung nicht eindeutig voneinander separieren oder räumlich wie zeitlich starken Veränderungen unterliegen. Relevante Beispiele stellen Umgebungen dar, in denen die Diffusion eingeschränkt und inhomogen ist: z.B. nematische Systeme, Filamentnetzwerke oder zelluläre Membranen und Flüssigkeiten [58–64]. Hierbei gestatten Modelle einer diffundierenden Diffusivität oder Superstatistiken mathematische Erklärungen der nicht-Gaußschen Diffusion [65, 66].

Außerdem zeigen sich weitere Eigenschaften bei Diffusionsexperimenten dieser Systeme. So können die registrierten Bewegungen nicht-stationär sein, d.h. die Charakteristika des Teilchenensembles verändern sich zeitlich. In diesem Falle unterscheidet sich das Skalenverhalten des zeitmittleren und ensemblemittleren MSD(t), man spricht von einer Verletzung der Ergodizitätshypothese. Andererseits weisen subdiffusive Bewegungen oftmals Alterungserscheinungen auf, d.h. die effektive Diffusivität der Teilchen verringert sich mit ihrem Trajektorienverlauf. Insbesondere in biologischen Umgebungen, fernab eines thermodynamischen Gleichgewichts, können diese Eigenschaften nur vorübergehend auftreten und durch die Aktivität des Systems wiederhergestellt werden [55, 56, 58, 59].

#### 2.3.4 Experimentelle Einzelteilchenverfolgung

Umfangreiche Kenntnisse der Diffusion können über Einzelteilchenverfolgungsexperimente gewonnen werden. Im Zuge dessen werden die Bewegungen der Objekte zeitabhängig und mit einer Lokalisationsgenauigkeit unterhalb der beugungsbegrenzten Abbildungen registriert [57, 67, 68]. Aus den Einzelteilchentrajektorien ergeben sich zahlreiche Rückschlüsse über die Eigenschaften der Objekte (z.B. Größe, Gestalt, Materialgrößen) und des umgebenden Mediums (z.B. Viskosität, Scherelastizität, Heterogenitäten). Ein Einzelteilchenverfolgungsexperiment gliedert sich in mehrere Schritte. Zuerst werden Zeitserien der spezifisch markierten Objekte aufgezeichnet, wobei die Teilchenkonzentration mit den räumlichen wie zeitlichen Abbildungseigenschaften geeignet abzustimmen ist. Im Lokalisierungsschritt werden alle Teilchen zu einem gegebenen Zeitpunkt gegenüber dem Hintergrundsignal unterschieden. Deren Positionen werden aus Analyse der Helligkeitsverteilungen, z.B. über Anpassungen an Gaußprofile (2.1), mit Subpixel-Genauigkeiten identifiziert. Die Lokalisationsgenauigkeit wird hauptsächlich durch das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt. Anschließend werden die Koordinaten verschiedener Zeitpunkte über einen Optimierungsalgorithmus zu durchgängigen Trajektorien verbunden. Dabei können nicht nur die zurückgelegten Wegstrecken, sondern auch Informationen der Teilchen, wie z.B. deren Helligkeiten, Größen und Formen, berücksichtigt werden [57,67,68].

#### 2.3.5 Analysemethoden von Einzelteilchentrajektorien

Ausgehend von den Einzelteilchentrajektorien eröffnen sich vielfältige Möglichkeiten, diffusive Bewegungen quantitativ zu untersuchen. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die experimentellen Teilchentrajektorien durch die zeitliche Auflösung der Bildgebung limitiert werden und in ihrer Gesamtdauer beschränkt sind. Weiterhin werden die registrierten Bewegungen von Messungenauigkeiten verfälscht und zeitmittlere Größen sind meist statistisch abhängig. Diese Einschränkungen experimenteller Daten können mit verschiedenen Techniken ausgeglichen werden. Insbesondere gewährleisten wiederholte Unterabtastungen und Informationen aus mehreren Zeitfenstern gesicherte Aussagen im Realraum wie im Frequenzspektrum. Zusammen mit Modellvergleichen und statistischen Einschätzungen können Mobilitätseigenschaften auf diese Weise fundiert bewertet werden. Im Folgenden werden mehrere Kenngrößen dargelegt (siehe z.B. [40,41]), mit denen sich Eigenschaften einer anomalen Diffusionsbewegung spezifisch charakterisieren lassen (siehe z.B. [55,56]). Nachfolgende Größen konnten in den letzten Jahren etabliert werden [69–80].

#### I. Mittlere quadratische Verschiebung

Die gebräuchlichste Größe ist die mittlere quadratische Verschiebung (MSD). Das MSD ist im zeitlichen Mittel einer Einzelteilchentrajektorie (Index i) über den Grenzwert

$$MSD_i(\tau) = \lim_{T \to \infty} \frac{1}{T} \int_0^T dt \, \left[\underline{r}_i(t+\tau) - \underline{r}_i(t)\right]^2$$
(2.9)

definiert. Dieser berechnet sich für eine zeitdiskretisierte Trajektorie von N Zeitschritten zu

$$MSD_i(\tau) = \frac{1}{N - \tau/\Delta t} \sum_{t_k = \Delta t}^{N\Delta t - \tau} \left[\underline{r}_i(t_k + \tau) - \underline{r}_i(t_k)\right]^2.$$
(2.10)

Das  $\mathrm{MSD}_i(\tau)$  ist eine Funktion der Verschiebungszeit  $\tau = \Delta t, 2\Delta t, \ldots, (N-1)\cdot\Delta t$ , dessen Zeitmittel über  $(N - \tau/\Delta t)$  Zeitpunkte  $t_k$  stattfindet. Somit sind die  $[\underline{r}_i(t_k + \tau) - \underline{r}_i(t_k)]^2$ statistisch nicht unabhängig. Nach (2.8) können der Anomaliewert  $\alpha_i$  und verallgemeinerte Transportkoeffizient  $K_{\alpha,i}$  aus Anpassung an  $\mathrm{MSD}_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i}$  bestimmt werden. Infolge der begrenzten Zeitstatistik sollte die Verschiebungszeit  $\tau_{\max} \simeq 0.15 T_i$  nicht überschreiten [81,82]. Experimentelle Abweichungen der tatsächlichen und registrierten Orte beeinflussen weiterhin das  $\mathrm{MSD}_i(\tau)$ . Diese können in statische und dynamische Lokalisationsunsicherheiten untergliedert werden [81,82]. Statische Beiträge, begründet durch zufällige Abweichungen der Varianz  $\varsigma$ , verursachen eine konstante Verschiebung:  $\mathrm{MSD}_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i} + 2 \varsigma^2$ . Dynamische Unsicherheiten, infolge der Teilchenbewegung während der Bildaufnahme  $\Delta t_{\mathrm{Aufn.}}$ , bewirken  $\mathrm{MSD}_i(\tau) = 4D\tau - \frac{4}{3}D\Delta t_{\mathrm{Aufn.}}$ . Abhängig vom Signal-Rausch-Verhältnis und den Beweglichkeiten kann daher eine Anpassung  $\mathrm{MSD}_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i} + L_i$  vorteilhaft sein. Anpassungen der  $\mathrm{MSD}_i(\tau)$  lassen sich z.B. mit dem Resampling-Verfahren von [73] umgehen. Dabei werden Lokalisationsunsicherheiten über  $MSD_{i,\Delta t}^{*}(\tau) = MSD_{i}(\tau) - MSD_{i}(\Delta t)$  ausgeglichen und das korrigierte  $MSD_{i,2\Delta t}^{*}(\tau)$ aus den geraden oder ungeraden Positionen (2 $\Delta t$ ) unterabgetastet. Damit bestimmt sich:

$$\alpha_i(\tau) = \frac{1}{\log 2} \log \left( \frac{\text{MSD}_{i,2\Delta t}^*(\tau)}{\text{MSD}_{i,\Delta t}^*(\tau)} \right).$$
(2.11)

Andererseits streuen die  $\text{MSD}_i(\tau)$  experimenteller Teilchentrajektorien üblicherweise über eine bis mehrere Größenordnungen. Infolgedessen können Unterschiede zwischen den Mittelwerten  $\langle \alpha_i \rangle$  bzw.  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  verschiedener Trajektorien und der Skalierung des mittleren  $\langle \text{MSD}_i(\tau) \rangle$  bestehen, insbesondere wenn  $\langle \text{MSD}_i(\tau) \rangle$  über arithmetische Mittelung gebildet wird. Um die Variationen innerhalb des Trajektorienensembles verlässlich zu bewerten, wurde ein Bootstrapping-Verfahren entwickelt [75,76]. Hierzu werden  $n \text{ MSD}_i(\tau)$  zufällig ausgewählt und deren arithmetisch oder geometrisch mittleres  $\langle \text{MSD}_i(\tau) \rangle$  angepasst. Mithilfe der aus  $N_{\text{boot.}}$  Iterationen dieses Verfahrens nachgebildeten Mittelwerte können die experimentellen Schwankungen des Trajektorienensembles besser beurteilt werden.

#### II. Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion

Die zeitliche Bewegungsabfolge kann mit der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion

$$C_{v,i}(\tau) = \langle \underline{v}_i(t_k + \tau) \cdot \underline{v}_i(t_k) \rangle_{t_k}, \quad \text{mit} \quad \underline{v}_i(t_k) = \frac{1}{\Delta t} \left[ \underline{r}_i(t_k + \Delta t) - \underline{r}_i(t_k) \right]$$
(2.12)

beschrieben werden. Diese ist für nicht-überlappende Schritte einer Brownschen Bewegung unkorreliert, für eine FBM zeitweise korreliert. Das Bewegungsmuster wird regelmäßig anhand dieser Eigenschaft bewertet, da besonders  $C_{v,i}(\Delta t)$  häufig stark korreliert ist (siehe z.B. [79–84]). Jedoch verursachen statische wie dynamische Lokalisationsunsicherheiten negativ bzw. positiv korrelierte Werte  $C_{v,i}(\Delta t)$  [81–83]. Dieser Einfluss lässt sich durch wiederholte Unterabtastungen der Geschwindigkeiten mit  $\Delta t \mapsto \delta t = n\Delta t$  überprüfen. Hierbei schwächt sich die Antikorrelation des statischen Beitrags  $C_{v,i}(\delta t) < 0$  mit  $n^{-2}$ ab [81–83]. Von  $\delta t$  unabhängige Korrelationen für Verschiebungszeiten  $\tau > \delta t$  spiegeln somit Gedächtniseffekte in den Teilchenbewegungen wider. Weiterhin charakterisiert der Kurvenverlauf der  $C_{v,i}(\tau)$  das diffusive Bewegungsmodell. Für eine FBM gilt [56]

$$C_{v,i}(\xi) = \frac{1}{2} \left[ (\xi+1)^{\alpha_i} + |\xi-1|^{\alpha_i} - 2\xi^{\alpha_i} \right]$$
(2.13)

in Abhängigkeit der dimensionslosen Verschiebungszeit  $\xi = \tau/\delta t$ . Üblicherweise sind die experimentellen Kurvenverläufe einzelner  $C_{v,i}(\xi)$  und ihre Korrelationen  $C_v(\xi=1)$ stark verrauscht, zeigen allerdings im Ensemblemittel ein zu (2.13) entsprechendes oder abweichendes Verhalten. Nach (2.13) ergibt sich eine unmittelbare Abhängigkeit zwischen dem Anomalieparameter  $\alpha_i$  und der Antikorrelation  $C_v(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1} - 1$ . Ein Kurvenverlauf nach (2.13) und eine gleichzeitige Bestätigung dieses Skalierungsverhaltens unter verschiedenen  $\delta t$  bilden ein starkes Indiz für eine Dynamik nach FBM (siehe z.B. [78–80]).

#### III. Merkmale heterogener Diffusion: nicht-Gaußianität

Die Gaußsche Eigenschaft der Diffusionsbewegung lässt sich mithilfe mehrerer Ansätze untersuchen [58–60]. Ausgehend vom Propagator (2.5) sind die Schrittinkremente von Gaußschen Einzelteilchentrajektorien zu allen Zeiten normalverteilt. Zur Analyse werden alle eindimensionalen Schrittinkremente einer Trajektorie  $\Delta x_i(\tau) = x_i(t_k + \tau) - x_i(t_k)$ der gegebenen Verschiebungszeit  $\tau = n \Delta t$  gebildet ( $\Delta y_i(\tau)$  analog). Um die Unterschiede zwischen den Teilchen auszugleichen, werden diese für jede Trajektorie individuell über  $\sqrt{\langle (\Delta x_i)^2(\tau) \rangle_{t_k}}$  normiert und deren Menge zu den normierten Schrittinkrementen

$$\chi_x(\tau) = \bigcup_i \frac{\Delta x_i(\tau)}{\sqrt{\langle (\Delta x_i)^2(\tau) \rangle_{t_k}}}, \qquad (\chi_y(\tau) \text{ analog})$$
(2.14)

zusammengefasst. Die Häufigkeitsverteilung  $p(\chi)$  kann für beide Koordinatenrichtungen einzeln oder gemeinsam betrachtet werden. Abweichungen von einer Gaußverteilung kennzeichnen eine heterogene Diffusion. Gewöhnlich besteht  $p(\chi)$  zwischen dem Grenzfall einer Normal- und Laplaceverteilung. Letztere kann aus diffundierenden Diffusivitäten innerhalb des Trajektorienverlaufs [65,66] oder Überlagerungen gaußscher Diffusionen mit verschiedenen Beweglichkeiten hervorgehen [58–60]. Begründet dadurch indizieren starke Heterogenitäten in Form einer Exponentialverteilung der normierten Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i} \rangle)$  häufig eine nicht-Gaußsche Diffusion.

#### Nicht-Gaußscher Parameter

Eine weitere Möglichkeit, nicht-Gaußsche Charakteristiken der Diffusion nachzuweisen und die Heterogenität der Teilchenmobilitäten zu bemessen, besteht über den nicht-Gaußschen Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$ . Dieser bestimmt sich nach [71] für eine zeitdiskretisierte Trajektorie über

$$\overline{\mathcal{G}}_{i}(\tau) = \frac{2\left\langle \left[\underline{r_{i}}(t_{k}+\tau)-\underline{r_{i}}(t_{k})\right]^{4}\right\rangle_{t_{k}}}{3\left\langle \left[\underline{r_{i}}(t_{k}+\tau)-\underline{r_{i}}(t_{k})\right]^{2}\right\rangle_{t_{k}}^{2}} - 1,$$
(2.15)

das Verhältnis des zweiten und vierten Moments. Dieser Parameter beträgt  $\overline{\mathcal{G}}_i(\tau) = 0$  für eine Gaußsche und  $\overline{\mathcal{G}}_i(\tau) = 1$  für eine stark heterogene Diffusionsbewegung. Außerdem ist eine eindimensionale Definition von  $\overline{\mathcal{G}}_i(\tau)$  nach [60] verbreitet.

#### IV. Merkmale heterogener Diffusion: zeitliche Heterogenität

Aus der zeitlichen Abfolge individueller Teilchenbewegungen können ebenso Merkmale einer heterogenen Diffusion abgeleitet werden [58,59]. Wie in [60] dargelegt wird, können hierzu spezifische Autokorrelationsfunktionen [85,86] berechnet werden. Diese bewerten, entgegen der Inkrementstatistik  $p(\chi)$ , nicht nur Abweichungen von einer Gaußschen Diffusion innerhalb des Gesamtteilchenensembles, sondern korrelieren die zeitlichen Informationen aus dem Bewegungsverhalten einzelner Trajektorien. Hierbei untersucht

17

die Autokorrelationsfunktion der quadrierten Inkremente [60,85]

$$G_{\Delta r^2,i}(\tau) = \left\langle \Delta r_i^2(t_k + \tau) \cdot \Delta r_i^2(t_k) \right\rangle_{t_k}, \quad \text{mit } \Delta r_i^2(t_k) = \frac{1}{\Delta t} \left| \underline{r}_i(t_k + \Delta t) - \underline{r}_i(t_k) \right|^2 (2.16)$$

wie stark verhältnismäßig große Schrittinkremente  $\Delta r_i^2$  einer möglichen Unterabtastung  $\Delta t \mapsto \delta t = n \Delta t$  zeitlich aufeinander folgen. In ähnlicher Weise quantifiziert die Autokorrelationsfunktion der lokalen Diffusivität [60,86]

$$G_{\Delta K,i}(\tau) = \left\langle \Delta K_i(t_k + \tau) \cdot \Delta K_i(t_k) \right\rangle_{t_k}, \text{ mit } K_i(t_k) = \frac{1}{2\Delta t} \left[ \Delta x_i(t_k) - \left\langle \Delta x_i(t_k) \right\rangle \right]^2 (2.17)$$

das Zeitverhalten des zu  $t_k$  instantanen Diffusionskoeffizientens  $K_i(t_k)$ , dessen Werte über den Trajektorienverlauf drift-korrigiert werden  $\Delta K_i(t_k) = K_i(t_k) - \langle K_i(t_k) \rangle_{t_k}$ . Beide Korrelationsfunktionen beruhen auf der Eigenschaft, dass bei einer zeitlich veränderlichen Teilchenmobilität große Schrittlängen voraussichtlich nacheinander zu erwarten sind. Die Autokorrelationen  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  und  $G_{\Delta K}(\tau)$  sind daher für eine homogene Gaußsche Diffusion zu allen Verschiebungszeiten  $\tau$  unkorreliert. Allerdings werden  $G_{\Delta r^2}(\Delta t)$  und  $G_{\Delta K}(\Delta t)$ durch Eigenkorrelationen der Inkremente und Lokalisationsunsicherheiten verstärkt. Beide Einflüsse können mit Unterabtastungen  $\Delta t \mapsto \delta t = n\Delta t$  vermindert werden. Weiterhin bewirken die endlichen Trajektorien leicht negative Werte im Langzeitverhalten [60, 75, 76]. Deshalb ist es sinnvoll, die Kurven  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  und  $G_{\Delta K}(\tau)$  mit Simulationen zu vergleichen.

#### V. Spektrale Leistungsdichte und Variationskoeffizient

Die spektrale Analyse bildet eine alternative Herangehensweise zur Untersuchung der Einzelteilchentrajektorien [74, 87]. Die (eindimensionale) spektrale Leistungsdichte ist über

$$PSD(f) = \frac{1}{T} \left| \int_0^T dt \, x(t) e^{ift} \right|^2 \qquad (y(t) \text{ analog})$$
(2.18)

definiert, was für zeitdiskretisierte Trajektorien ( $\omega = 2\pi f = n \frac{2\pi}{N\Delta t}$ ) mit dem Periodogramm

$$PSD(\omega) = \frac{1}{2\pi N} \left| \sum_{n=0}^{N-1} x_n e^{-i\omega n} \right|^2, \quad \text{mit} \quad -\pi < \omega \le \pi$$
(2.19)

abgeschätzt werden kann. Zahlreiche analytische Informationen sind über die Leistungsdichte  $PSD_i(\omega)$  von individuellen Trajektorien, die Variationen der  $PSD_i(\omega)$  und die Spektren stochastischer Prozesse bekannt [55,74,87]. Die Leistungsdichte einer FBM [88] klingt für Anomalieparameter  $\alpha \leq 1$  mit dem Potenzgesetz  $PSD(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$  ab. Dabei kann die Skalierung  $\alpha_i$  aus den Einzelteilchentrajektorien bestimmt werden, wogegen die Amplitude der  $PSD_i(\omega)$  stochastisch angenommen wird. So sind mehr als 10<sup>5</sup> Zeitschritte einer Trajektorie erforderlich, um den Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,i}$  aus einer  $PSD_i(\omega)$  von Brownscher Bewegung korrekt zu erfassen [87]. Andererseits spezifizieren die Variationen einzelner  $\text{PSD}_i(\omega)$  den stochastischen Prozess. Diesbezüglich werden die experimentellen Variationen mithilfe der normierten spektralen Leistungsdichte  $\text{PSD}^*(\omega)$  verringert, deren Positionen bei der Berechnung des Periodogramms (2.19) mit  $\sqrt{\langle \Delta x^2(\tau) \rangle_t}$  individuell normiert werden. Dies scheint die Skalierung  $\text{PSD}^*(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$  zu erhalten [78].

#### Variationskoeffizient der spektralen Leistungsdichte

Insbesondere charakterisiert der Variationskoeffizient  $\gamma$  der spektralen Leistungsdichten das Bewegungsmuster einer (fraktionalen) Brownschen Bewegung [74,87]. Dieser setzt die Standardabweichung  $\sigma$  aller (normierten)  $PSD_i(\omega)$  in Relation zu deren Mittelwert:

$$\gamma(f) = \gamma(\omega T) = \frac{\sigma\left(\operatorname{PSD}_{i}(\omega T)\right)}{\langle\operatorname{PSD}_{i}(\omega T)\rangle}, \qquad \text{bzw.} \qquad \gamma^{*}(f) = \frac{\sigma\left(\operatorname{PSD}_{i}^{*}(\omega T)\right)}{\langle\operatorname{PSD}_{i}^{*}(\omega T)\rangle}. \tag{2.20}$$

Der Variationskoeffizient  $\gamma(f)$  einer FBM konvergiert für kleine Frequenzen gegen den Grenzwert  $\gamma(f \to 0) = \sqrt{2}$  bzw. für  $f \to \infty$  gegen  $\gamma_{\infty}$ , das analytisch bekannt ist [74]:

$$\lim_{f \to \infty} \gamma(f) \coloneqq \gamma_{\infty} = \begin{cases} 1 & \text{für } \alpha < 1 \text{ (fallend konvergierend),} \\ \sqrt{5}/2 & \text{für } \alpha = 1 \text{ (konvergierend),} \\ \sqrt{2} & \text{für } \alpha > 1 \text{ (steigend konvergierend).} \end{cases}$$
(2.21)

Hierbei oszilliert  $\gamma(f)$  durchgängig und zeigt eine für  $\alpha$  spezifische Konvergenz gegen  $\gamma_{\infty}$ mit dem in (2.21) angegebenen Monotonieverhalten. Der Variationskoeffizient  $\gamma$  befindet sich für alle f im Intervall  $1 < \gamma(f) < \sqrt{2}$  [87]. Infolge verstärkter Variationen experimenteller  $PSD_i(\omega)$  kann  $\gamma(f)$  erhöht sein, wenngleich  $\gamma^*(f)$  gegen  $\gamma_{\infty}$  konvergiert [78,79]

#### VI. Weitere Kenngrößen und Analysemethoden

Darüber hinaus existieren unzählige Ansätze, mit denen die Eigenschaften einer anomalen Diffusion auf Grundlage der Einzelteilchentrajektorien quantitativ bestimmt werden können. Die hier vorgestellten Kenngrößen sind daher keineswegs vollständig, vermitteln jedoch einen geeigneten Kompromiss zwischen ihrer mathematischen Komplexität und einer robusten Anwendbarkeit bei Einzelteichenverfolgungsexperimenten unterschiedlicher Systeme [69–80]. Konkret ließen sich die Geradlinigkeit [77], die Aspherizität [81] oder eine Ergodizitätsverletzung [64,89] der Teilchenbewegungen näher untersuchen, sowie die Merkmale der lokalen konvexen Hülle [75] oder einer räumlichen Eingrenzung [80] der Trajektorien nutzen. Außerdem können die Bewegungen langreichweitig korreliert sein [90] oder sich zeitlich verändern [40]. Deshalb wurden konventionelle wie auf maschinellem Lernen basierende Klassifizierungsverfahren einzelner Trajektorien und ihrer Segmente entwickelt. Nicht zuletzt ist es erforderlich, die Informationen der Teilchendynamik mit mehreren Ansätzen zu erfassen und gemeinsam zu interpretieren. Insgesamt eröffnet dies eine Entwicklung von biophysikalischen Modellerklärungen [41,55] und damit eine experimentelle Zugänglichkeit über die komplexe Organisation lebender Materie [67,68].

# TEIL II

# Strukturelle Organisation des ERs und der ER Exit Sites (ERES)

3	Char	narakterisierung und Anwendung auflösungsverbessernder SRRF-Mikroskopie						
	3.1	Experimentelle Charakterisierung der SRRF-Mikroskopiemethode						
		3.1.1	SRRF-Bildgebung und Auflösungsvermögen an fixierten Strukturen	23				
		3.1.2	Optimierung der SRRF-Mikroskopieaufnahmen	26				
		3.1.3	Bildrauschen und Verbesserungspotential der SRRF-Anwendung	28				
	3.2	Lebenc	Izellanwendungen der SRRF-Mikroskopiemethode	29				
		3.2.1	SRRF-Bildgebung und Auflösungsvermögen an Zellstrukturen	29				
		3.2.2	SRRF-Bildgebung des ERs unbehandelter Zellen	32				
		3.2.3	Netzwerkanalyse des ERs mit Kovisualisierung der ERES	34				
		3.2.4	SRRF-Bildgebung des ERs biochemisch veränderter Zellen	36				
	3.3	Einord	nung und Diskussion der SRRF-Mikroskopiemethode	39				
4	Ents	chlüssel	ung physikalischer Hintergründe der Organisation von ER Exit Sites	42				
	4.1	Motivation: Dynamische Selbstorganisation der ERES						
	4.2	Projektidee und Konzeption						
	4.3	Material, Methoden und Auswertung						
	4.4	Charakterisierung der Musterbildung von ERES						
		4.4.1	Qualitative Darstellung über konfokale Fluoreszenzaufnahmen	47				
		4.4.2	Quantitative Untersuchung des ERES-Musters	48				
	4.5	Musterbildung der ERES unter Nocodazol						
	4.6	Muster	bildung der ERES unter RNA-Interferenz von Lunapark	53				
		4.6.1	Analyse des Gen-Knockdowns von Lunapark	53				
		4.6.2	Qualitative Darstellung über konfokale Fluoreszenzaufnahmen	54				
		4.6.3	Quantitative Untersuchung der ERES-Aggregationen	57				
	4.7	Musterbildung der ERES unter Filipin						
	4.8	Muster	bildung der ERES unter hypotonischer Behandlung	60				
		4.8.1	Ausbildung intrazellulärer Vesikel der Zellorganellen	60				
		4.8.2	Charakterisierung der intrazellulären Vesikel	62				
		4.8.3	Charakterisierung der ERES-Strukturen und ihres Phasenverhaltens .	63				
	4.9	Gegeni	iberstellung der Musterbildung von ERES	67				
	4.10	Generische Modellierung der Musterbildung von ERES						
	4.11	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick						

# 3 Charakterisierung und Lebendzellanwendung auflösungsverbessernder SRRF-Mikroskopie

In diesem Kapitel wird die experimentelle Bildgebung über die SRRF-Mikroskopietechnik und deren Anwendungsmöglichkeit charakterisiert als auch diskutiert. Mit der gesteigerten Bildschärfe und Kontrastzunahme ermöglichen die Radialitätsbilder von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen eine verbesserte Differenzierung tubulärer und sphärischer Zellstrukturen mit einer Zeitauflösung, die für Lebendzellexperimente geeignet ist. Insbesondere werden tubuläre Strukturen des ERs mit der SRRF-Methode auflösungsverbessert visualisiert, was quantitative Untersuchungen der Organell-Wechselbeziehungen in unbehandelten wie biochemisch veränderten Kulturzellen gestattet.

Die Beobachtung von dynamischen Vorgängen in lebenden Zellen erfordert Mikroskopiemethoden mit einem hohen räumlichen und zeitlichen Auflösungsvermögen. So formt das ER ein verzweigtes Membrannetzwerk, das nicht nur eine komplexe Morphologie aufweist, sondern auch aktiven Bewegungen und Reorganisationen unterliegt [20–22]. Dies lässt eine anpassungsfähige Organisation der Zellumgebung über die zahlreichen Interaktionen des ERs mit anderen Strukturen abstimmen [32,35]. Hierbei zählt die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zu den verbreitesten Bildgebungsmethoden, die einen günstigen Mittelweg zwischen den Anwendungsmöglichkeiten und dem Auflösungsvermögen an Lebendzellen gewährleistet, jedoch bei der Abbildung des ERs an ihre Grenzen gelangt [43].

Technologische Fortschritte in den letzten Jahren ermöglichten die Entwicklung lichtmikroskopischer Techniken, die das beugungsbegrenzte Auflösungsvermögen umgehen und höchstauflösende Abbildungen erzielen können [91]. Im Besonderen existieren fortschrittliche Mikroskopiemethoden, deren Aufnahmegeschwindigkeiten sich für die Verfolgung biologischer Vorgänge eignen [10,92]. Dadurch konnten dynamische Wechselbeziehungen des ERs mit dem Zytoskelett und den Organellstrukturen aufgeklärt werden [37,93] oder Mikrostrukturen von einheitlich angesehenen ER-Membranen wie gedrängte, tubuläre Gefüge und bewegliche Öffnungen im Nanometerbereich identifiziert werden [94,95]. Diesbezüglich verspricht die nach [50,51] kommerziell vertriebene bzw. nach [53] frei verfügbare SRRF-Methode [44] eine auflösungsverbesserte Bildgebung [45,48,49].

Im Folgenden werden experimentelle Eigenschaften der SRRF-Mikroskopie [44,45] charakterisiert und Lebendzellanwendungen dargestellt. Die Untersuchungen fokussieren sich auf die Bildgebung des ERs, dessen Netzwerkanalyse und Kovisualisierung mit den ERES bei den Experimenten aus der Masterarbeit des Autors [81] und den vorangegangenen Veröffentlichungen [70,71] auf das periphere ER begrenzt waren. Hierzu werden Zeitserien von konfokalen Spinning-Disk Fluoreszenzaufnahmen mit dem SRRF-Algorithmus [44] verarbeitet und deren Auflösungsvermögen quantifiziert. Die Abbildungseigenschaften der SRRF-Bildgebung werden an Strukturelementen lebender Zellen diskutiert und gegenüber anderen auflösungsverbessernden Mikroskopietechniken eingeordnet.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nähere Informationen zur Konfokal- und SRRF-Bildgebung werden in Anhang A-D erläutert.

#### 3.1 Experimentelle Charakterisierung der SRRF-Mikroskopiemethode

#### 3.1.1 SRRF-Bildgebung und Auflösungsvermögen an fixierten Referenzstrukturen

Zunächst wird die SRRF-Methode über Konfokalaufnahmen fluoreszenter Mikrosphären untersucht, die auf Glasobjektträgern fixiert sind.<sup>2</sup> Wie in Abb. 3.1a veranschaulicht wird, besteht ein merklicher Schärfegewinn gegenüber den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen, der von einer starken Kontrastzunahme begleitet ist. In den Radialitätsbildern werden Nanopartikel verschiedener Größen als sphärische Objekte dargestellt, wenngleich leicht sternförmige Intensitätsverläufe unter hohen Vergrößerungen erkennbar werden. Dies resultiert aus den  $N_{\text{axes}} = 8$  verfügbaren Richtungsachsen des SRRF-Algorithmus und den auf einem Subpixelraster interpolierten Helligkeitsgradienten. Hierbei unterscheiden sich die Intensitätsprofile der SRRF-Aufnahmen mit ihren verringerten Halbwertsbreiten FWHM =  $\sqrt{2 \ln 2} \sigma_{\text{exp}}$  von den beugungsbegrenzten Abbildungen der Fluoreszenzbilder, die mit Gaußschen Helligkeitsprofilen (2.1) übereinstimmen (siehe Abb. 3.1b).

Ausgehend vom Rayleigh-Kriterium wird das experimentelle Auflösungsvermögen  $\sigma_{exp}$  durch Anpassungen der Intensitätsprofile an (2.1) bestimmt und ist in Tab. 3.1a für unterschiedliche Messbedingungen zusammengefasst. Im Rahmen der experimentellen Schwankungen lässt sich der Grenzwert eines konfokalen Instruments  $r_{konf} \simeq 214 \text{ nm}$  mit  $\sigma_{exp} \simeq 230 \text{ nm}$  für die 40 nm großen Mikrosphären bestätigen. Durch die Eigenschaften des Kamerasensors verringern sich die Halbwertsbreiten für kleinere Belichtungszeiten, wogegen sie unter einem Pixel-Binning zunehmen. Für die 200 nm Mikrosphären hingegen, unterschreitet das Auflösungsvermögen der konfokalen Aufnahmen mit  $\sigma_{exp} \simeq 285 \text{ nm}$  den Grenzwert  $r_{konf}$ . Dies ist vermutlich auf Aggregationen der 200 nm Partikel zurückzuführen, da auch das Auflösungsvermögen des genutzten Konfokalmikroskops in der Doktorarbeit von Herrn Philipp Struntz [96] zu  $\sigma_{exp} \simeq 235 \text{ nm}$  bestimmt wurde, indem Intensitätverläufe derselben 200 nm Mikrosphären an (2.1) angeglichen wurden.



Abb. 3.1: Charakterisierung von SRRF-Aufnahmen fluoreszenter Nanopartikel. (a) Verglichen zu konfokalen Fluoreszenzaufnahmen zeigen die Radialitätsbilder<sup>2</sup> der 200 nm Mikrosphären eine starke Kontrastzunahme mit (b) nicht-Gaußschen Intensitätsprofilen reduzierter Halbwertsbreiten  $\sigma_{\text{SRFF}} \simeq 110$  nm. (c) Fourier-Ring-Korrelationen bestätigen eine Zunahme des effektiven Auflösungsvermögens von  $\sigma_{\text{exp}} \simeq 230$  nm  $\simeq r_{\text{konf}}$  auf  $\sigma_{\text{SRFF}} \simeq 115$  nm.

<sup>2</sup> Carboxylat-Mikrosphären:  $\Delta t_{\text{SRRF}} = 10 - 50 \text{ ms}, N_{\text{img}} = 10, N_{\text{axes}} = 8, V_{\text{rad}} = 6, R_{\text{ring}} = 0.8 \cdot 90 \text{ nm}.$ 

Für die Radialitätsbilder der Nanopartikel wird ein Auflösungszugewinn der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen auf  $\sigma_{\text{SRBF}} \simeq 110 \,\text{nm}$  über Anpassungen der Helligkeitsprofile ausgewiesen (siehe Tab. 3.1a). Das Auflösungsvermögen ist weitgehend unabhängig von den verwendeten Mikrosphären, den experimentellen Probenhelligkeiten und den gewählten Kameraeinstellungen. In dieser Hinsicht gilt es hervorzuheben, die effektive Auflösung der SRRF-Aufnahmen  $\sigma_{\text{SRRF}}$  nicht unmittelbar als optisches Auflösungsvermögen aufzufassen, da mit der SRRF-Mikroskopie keine Intensitäten von lichtmikroskopischen Abbildungen sondern Radialitäten und deren zeitlich korrelierte Variationen wiedergegeben werden.

#### Auflösungsbestimmung über Fourier-Ring-Korrelation

Daneben stellt die Fourier-Ring-Korrelation (FRC) eine etablierte Methode dar, mit der sich das optische Auflösungsvermögen objektiv als auch unabhängig von den Strukturund Fluoreszenzeigenschaften der Proben bestimmen lässt [97,98]. Dazu werden zwei voneinander unabhängige Mikroskopieaufnahmen in den Fourierraum transformiert und deren normierte Kreuzkorrelationskoeffizienten in Abhängigkeit der radialen Raumfrequenz berechnet. Aus dem Abklingen dieser Korrelationsfunktion gegenüber dem unkorrelierten Hintergrundsignal kann das optische Auflösungsvermögen berechnet werden, wobei im Folgenden das gebräuchlichste Kriterium  $FRC(\sigma_{exp}^{-1}) = \frac{1}{7}$  genutzt wird [97,98]. Die FRC ist in gängigen Programmen höchstauflösender Lichtmikroskopie implementiert [53,97].

Wie in Abb. 3.1c dargestellt ist, klingen die FRC-Kurven der Mikroskopieaufnahmen nach einem Plateau für kleine Raumfrequenzen auf das Hintergrundrauschen ab. Nachdem die FRC-Kurven geringe Variationen und einen zugleich steilen Abfall aufweisen, kann das experimentelle Auflösungsvermögen der fluoreszenten Nanopartikel (siehe Tab. 3.1b) zuverlässig über  $FRC(\sigma_{exp}^{-1}) = \frac{1}{7}$  angegeben werden. Diesbezüglich lässt sich das optische

$\Delta t = 50 \mathrm{ms}$			$\Delta t = 10 \mathrm{ms}$		2×2-binning		
Partikel [nm]	200 (grün)	200 (rot)	40	200	40	200	40
$\sigma_{\rm exp}$ [nm]	$287 \pm 17$	$292\pm19$	$232\pm37$	$277\pm29$	$225\pm44$	$299 \pm 46$	$250\pm45$
$\sigma_{\rm SRRF}$ [nm]	$104 \pm 8$	$107\pm10$	$109\pm9$	$118\pm9$	$110\pm8$	$124\pm7$	$124\pm7$

(a) Auflösungsvermögen aus Anpassung der Intensitätsprofile.

(b) Auflösungsvermögen über Fourier-Ring-Korrelationen.							
	4	$\Delta t = 50 \mathrm{ms}$		4	$\Delta t = 10 \mathrm{ms}$		
Partikel [nm]	200 (grün)	200  (rot)	40	200 (grün)	$200~({\rm rot})$	40	
$\sigma_{\rm exp, FRC}$ [nm]	$227 \pm 16$	$233\pm21$	$223\pm19$	$237 \pm 21$	$239 \pm 18$	$219 \pm 23$	

 $117 \pm 10$ 

 $113 \pm 14$ 

 $122\pm12$ 

 $116 \pm 12$ 

 $118 \pm 12$ 

Tab. 3.1: Experimentelles Auflösungsvermögen konfokaler Mikroskopie  $\sigma_{exp}$  und effektive Auflösung der SRRF-Methode  $\sigma_{\text{SRRF}}$  bei verschiedenen Bedingungen. Ausgehend von Konfokalaufnahmen fluoreszenter Nanopartikel wird das Auflösungsvermögen (a) aus den Halbwertsbreiten durch Anpassungen von N > 300 Intensitätsprofilen an (2.1) und (b) über FRC von N = 10 Bildpaaren bestimmt (alle Angaben mit Standardabweichung).

 $\sigma_{\rm SRRF,FRC}$  [nm]

 $115 \pm 12$ 

Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops  $r_{\rm konf} \simeq 214 \,\rm nm$  mit  $\sigma_{\rm exp,FRC} \simeq 230 \,\rm nm$ unter allen Messbedingungen bestätigen. Im Einklang mit Tab. 3.1a wird ein merklicher Zugewinn der effektiven Ortsauflösung  $\sigma_{\rm SRRF,FRC} \simeq 115 \,\rm nm$  bei den SRRF-Aufnahmen nachgewiesen, der mit bis zu fünffach verringerten Halbwertsbreiten aus gegenwärtigen Veröffentlichungen [45,48,49] vergleichbar ist. Demzufolge können sphärische Nanopartikel anhand der SRRF-Methode mit reduzierten Beugungsprofilen visualisiert werden.

#### SRRF-Bildgebung von fixierten Mikrotubuli

Anschließend werden experimentelle Eigenschaften der SRRF-Mikroskopietechnik an zellulären Strukturen untersucht, wobei das dichte Netzwerk der etwa 25 nm dicken Mikrotubuli besonders geeignet ist, das optische Auflösungsvermögen innerhalb der Zelle zu quantifizieren. Ausgehend davon werden die Zytoskelettfilamente der Mikrotubuli über Antikörper von  $\alpha$ -Tubulin spezifisch markiert (siehe Anhang A.3), deren Fluoreszenz mit konfokaler Lichtmikroskopie abgebildet und zu SRRF-Aufnahmen verarbeitet wird.

In Abb. 3.2 ist eine Konfokalaufnahme zusammen mit dem Radialitätsbild derselben Zelle dargestellt.<sup>3</sup> Somit bilden die Mikrotubuli ein dicht ausgeprägtes Filamentnetzwerk, dessen Strukturen sich bei den konfokalen Aufnahmen beugungsbegrenzt überlagern und nur in peripheren Zellregionen eindeutig unterscheiden lassen. Dagegen verfügen die SRRF-Aufnahmen über eine höhere Bildschärfe, wodurch einzelne Mikrotubuli innerhalb der gesamten Zelle visuell voneinander getrennt werden können. Insbesondere ermöglichen die Radialitätsbilder erhebliche Kontrastverstärkungen in der Umgebung des Zentrosoms, ohne den Detailgrad an lichtschwachen Strukturen zu verlieren. Dabei können Mikrotubuli im Abstand von etwa 200 nm vollständig separiert werden und lokale Intensitätsmaxima bei überlagerten Filamenten korrigiert werden (siehe Intensitätsprofile in Abb. 3.2).

Entlang der Mikrotubuli bestehen jedoch sichtliche Helligkeitsschwankungen, womit diese bei den SRRF-Aufnahmen teilweise unterbrochen werden. Dies wird wahrscheinlich von ungleichmäßigen Verteilungen der Fluorophore als auch verschiedenen Objektebenen verursacht. Zugleich werden die Kreuzungspunkte mehrerer Mikrotubuli gewöhnlich mit verbreiterten Schnittflächen in den Radialitätsbildern dargestellt, da die lokalen Intensitäten von sich überlappenden Filamenten erhöht sind. Daher können stellenweise artifizielle Querverbindungen zwischen den Mikrotubuli hervorgerufen werden. Daneben zeichnet sich der experimentelle Hintergrund der SRRF-Aufnahmen durch ein tubulär strukturiertes Rauschmuster aus, das vom Schrotrauschen des sCMOS-Kamerasensors in Verbindung mit unspezifisch gebundenen Antikörpern bewirkt wird.

Entsprechend zu den Mikrosphären wird das experimentelle Auflösungsvermögen  $\sigma_{exp}$ aus den Halbwertsbreiten durch Anpassungen eindimensionaler Intensitätsprofile an (2.1) und über FRC [97] bestimmt (siehe Tab. 3.2). Unter beiden Vorgehen beträgt die effektive Auflösung der SRRF-Aufnahmen  $\sigma_{SRRF} \simeq 110 \,\mathrm{nm}$ , bei einem Auflösungsvermögen der

<sup>3</sup>  $\alpha$ -Tubulin:  $\Delta t_{\text{konf}} = 500 \text{ ms}, \Delta t_{\text{SRRF}} = 50 \text{ ms}, N_{\text{img}} = 20, N_{\text{axes}} = 8, V_{\text{rad}} = 6, R_{\text{ring}} = 0.8 \cdot 90 \text{ nm}.$ 

#### 3 Charakterisierung und Anwendung auflösungsverbessernder SRRF-Mikroskopie



Abb. 3.2: Konfokal- und SRRF-Mikroskopieaufnahmen fixierter Mikrotubuli. Gegenüber den (a) konfokalen Fluoreszenzaufnahmen ermöglichen die (b) Radialitätsbilder<sup>3</sup> eine räumliche Separation einzelner Mikrotubuli bei den fixierten HeLa-Zellen, wenngleich die Schärfe- und Kontrastzunahme mit Intensitätsmodulationen entlang der Filamente einhergeht.

konfokalen Fluoreszenzbilder, das mit  $\sigma_{\exp} \simeq 250 \,\mathrm{nm}$  etwas oberhalb des Grenzwerts  $r_{\mathrm{konf}} \simeq 214 \,\mathrm{nm}$  angegeben wird. Demnach korrespondiert das Auflösungsvermögen mit dem Schärfegewinn an den fluoreszenten Nanopartikeln und wird, wie in Tab. 3.1a, etwas über die Halbwertsbreiten überschätzt. Dies erlaubt eine optische Abgrenzung einzelner Mikrotubuli, ähnlich zu Radialitätsbildern zellulärer Aktinfilamente in [45,48].

Mikrotubuli	aus Anpassung	über FRC		
$\sigma_{\rm exp}$ [nm]	$253\pm39$	$239\pm21$		
$\sigma_{\rm SRRF}$ [nm]	$106\pm9$	$112\pm12$		

Tab. 3.2: Experimentelles Auflösungsvermögen an fixierten Mikrotubuli. Angegeben ist die Auflösung  $\sigma_{\rm exp}$  von konfokaler und  $\sigma_{\rm SRRF}$  von SRRF-Mikroskopie.<sup>3</sup>

#### 3.1.2 Optimierung der SRRF-Mikroskopieaufnahmen

Am Beispiel der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen des Mikrotubuli-Zytoskeletts werden nähere Anwendungsmerkmale der SRRF-Mikroskopie erläutert (siehe Abb. 3.3). Wie in Abb. 3.3a dargestellt, ist die effektive Auflösung der Radialitätsbilder  $\sigma_{\text{SRRF}} \simeq 110 \text{ nm}$ weitgehend unabhängig von der zeitlichen Komponente des SRRF-Algorithmus [44], was auch in [48,51] berichtet wird. Allerdings verbessert sich das Kontrastverhältnis der Mikrotubuli unter einer Zunahme der  $N_{\text{img}}$  in die SRRF-Methode einbezogenen Konfokalaufnahmen und ist für  $N_{\text{img}} \gtrsim 5$  annähernd konstant. Dabei verringert sich das experimentelle Hintergrundrauschen mit einer größeren Anzahl  $N_{\text{img}}$ , dessen tubuläre Strukturierung, bedingt durch lokale Intensitätsmaxima sowie ungebundene Fluorophore, kontinuierlich abnimmt (siehe Abb. 3.3b).

Im Zuge dessen vermittelt die SRRF-Technik bei einer festgelegten Aufnahmedauer von  $T_{\text{SRRF}} = N_{\text{img}} \cdot \Delta t_{\text{SRRF}} = 1$ s das bestmögliche Bild der Mikrotubuli, wenn zwischen  $N_{\text{img}} = 3 - 10$  Fluoreszenzaufnahmen zu einem Radialitätsbild verarbeitet werden. Somit



Abb. 3.3: Experimentelle Eigenschaften der SRRF-Mikroskopie. (a) Während die effektive Auflösung der Radialitätsbilder  $\sigma_{\text{SRRF}} \simeq 110 \text{ nm}$  unabhängig von den  $N_{\text{img}}$  einbezogenen Konfokalaufnahmen ist, verbessert sich das Kontrastverhältnis  $\mathcal{I}_{\text{Mikrot.}}/\mathcal{I}_{\text{Hint.}}$  und der (b) experimentelle Hintergrund verringert sich mit größerem  $N_{\text{img}}$ .

ist es in Abstimmung mit der verwendeten Kamera und den gängigen Probenhelligkeiten zweckmäßig, eine Belichtungszeit der Serienaufnahmen zwischen  $\Delta t_{\text{SRRF}} \simeq 0.1 - 0.2 \text{ s}$ anzustreben. Demzufolge überwiegen die räumlichen Informationen ("*Radialität*") gegenüber den zeitlichen Korrelationen ("*Fluktuationen*") beim experimentellen Einsatz der SRRF-Mikroskopiemethode, wie es gleichartig bei der Optimierung der Radialitätsbilder anhand verschiedener Zeitserien in [45] ersichtlich ist.

Neben den zeitlichen Voraussetzungen wird die Anwendungsfähigkeit der SRRF-Technik entscheidend von den optischen Eigenschaften der Lichtmikroskopieaufnahmen bestimmt. Unter Beachtung einer Nyquist-Abtastung ist daher eine Pixelgröße von  $\Delta x \simeq 100$  nm empfehlenswert [50,51]. Jedoch ist es experimentell von Vorteil, die Serienaufnahmen ohne ein Kamerabinning mit  $\Delta x = 56.2$  nm aufzunehmen und anschließend softwareseitig zu interpolieren. Auf diese Weise lässt sich vor der Skalierung ein Medianfilter auf die Fluoreszenzbilder anwenden, um das ausgeprägte Schrotrauschen der sCMOS-Kamera ohne räumliche Unschärfe unterhalb der Nyquist-Grenze auszugleichen.

Andererseits gilt es unterschiedliche Eigenschaften des SRRF-Algorithmus [44] zu berücksichtigen. So werden die experimentellen Halbwertsbreiten über den Ringradius  $R_{\rm ring}$  festgelegt, der den Abstand bemisst, über den die Intensitätsgradienten summiert werden. Diesbezüglich bildet  $R_{\rm ring} = 0.8$  Pixel einen geeigneten Kompromiss zwischen dem experimentellen Schärfegewinn und Rauschverhalten der Radialitätsbilder und  $R_{\rm ring}$  wird in SRRF-Anwendungen gewöhnlich innerhalb eines Bildpunkts gewählt [48,49]. Hierbei werden alle  $N_{\rm axes} = 8$  Richtungsachsen bei der Berechnung der SRRF-Aufnahmen durch das Softwarepaket NanoJ [53] genutzt. Dies ließe sich mit den  $N_{\rm axes} = 24$  Achsen des kommerziellen SRRF-Stream<sup>(+)</sup> [51] verbessern. Dagegen ist die Darstellung der Mikrotubuli größtenteils unabhängig von der Vergrößerung der Radialitätsbilder  $V_{\rm rad}$ . Zugunsten der Berechnungsdauer wird  $V_{\rm rad} = 6$  verwendet, was auch zu [48,49] vergleichbar ist.

#### 3.1.3 Bildrauschen und Verbesserungspotential der SRRF-Anwendung

Letztendlich wird die Anwendungsfähigkeit der SRRF-Methode entscheidend von einer geeigneten Abstimmung zwischen den technischen Voraussetzungen des Mikroskops und den optischen Eigenschaften der Fluoreszenzaufnahmen bestimmt. Dies vorausgesetzt, ist die Bildgebung durch den SRRF-Algorithmus weitgehend unabhängig von dessen zeitlicher Komponente und Parameterwahl (siehe Abschnitt 3.1.2), wenngleich Helligkeitsgradienten konzeptionsbedingt zuverlässiger an filamentösen Strukturen erfasst werden.

Hierbei verfügt die genutzte sCMOS-Kamera über eine hohe Lichtempfindlichkeit und Aufnahmerate, die jedoch technischen Beschränkungen unterliegen. Da die Bildpunkte mit 6.5 µm verhältnismäßig klein und einzeln adressiert sind, besteht ein ausgeprägtes Schrotrauschen (siehe Abb. 3.4a), das durch ein hardwareseitiges Kamerabinning kaum verbessert wird. Dieses kann indessen über einen Medianfilter und softwareseitiges Binning unterhalb der Nyquist-Grenze  $\Delta x \simeq 100$  nm ausgeglichen werden, ohne eine räumliche Unschärfe zu verursachen. Des Weiteren ist die Sensorfläche aus verschiedenen Bildblöcken zusammengesetzt, deren Raster im Kamerahintergrund ersichtlich wird und sich auf die SRRF-Aufnahmen in Abb. 3.4b überträgt. Diesbezüglich könnte das Hintergrundrauschen mit einer rückwärtig beleuchteten sCMOS-Kamera verringert werden und darüber hinaus die Zeitauflösung, infolge der verbesserten Quanteneffizienz, gesteigert werden.

Begründet durch lokale Helligkeitsschwankungen, die durch den Kamerasensor und eine ungleichmäßige Hintergrundfluoreszenz hervorgerufen werden, besteht ein strukturiertes Rauschmuster in den Radialitätsbildern. Dieses weist eine tubuläre Textur auf, die unter einer starken Kontrastanpassung erkennbar wird (siehe Abb. 3.4c) und sich an Objekten mit einer einheitlichen Fluoreszenz ähnlich abzeichnet (siehe Abb. 3.4b). Dabei werden die abgebildeten Strukturen, an denen sternförmige Intensitätsverläufe verbleiben, über eine rauschfreie Umgebung vom Hintergrundsignal abgegrenzt. Diese Schwachstellen bei der SRRF-Bildgebung über den Algorithmus von [44] ließen sich mit den 24 Richtungsachsen des kommerziellen SRRF-Stream<sup>(+)</sup> [51] reduzieren. Wie in Abschnitt 3.1.2 dargelegt, wird das Rauschen mit einer größeren Anzahl einbezogener Fluoreszenzbilder jedoch gemindert.



Abb. 3.4: Experimentelles Hintergrundrauschen der SRRF-Mikroskopie. Infolge (a) lokaler Helligkeitsschwankungen des Kamerasensors entsteht ein (b,c) tubulär strukturiertes Bildrauschen an einheitlichen Objekten und dem Hintergrund. (c) Bei Kontrastanpassungen sind sternförmige Radialitätsverläufe der fluoreszenten Mikrosphären erkennbar.

#### 3.2 Lebendzellanwendungen der SRRF-Mikroskopiemethode

Ausgehend vom Anwendungspotential der SRRF-Mikroskopie am Zytoskelett fixierter Mikrotubuli wird die Bildgebung bei lebenden Kulturzellen untersucht. Im Mittelpunkt steht dabei die Visualisierung des ERs, dessen tubulär-verzweigtes Membransystem nicht nur über eine komplexe Morphologie verfügt, sondern auch kontinuierlichen Oszillationen und Restrukturierungen unterliegt. Insbesondere wird die dynamische Organisation des ERs und der ERES veranschaulicht, die infolge einer optischen Unterscheidbarkeit bei den vorangegangenen Veröffentlichungen [70,71] auf periphere ER-Tubuli begrenzt war. Weiterhin werden biochemisch veränderte Zellen mit der SRRF-Methode visualisiert.

#### 3.2.1 SRRF-Bildgebung und Auflösungsvermögen an Zellstrukturen

Im Folgenden sind Konfokalaufnahmen und abgeleitete Radialitätsbilder von lebenden Zellen gegenübergestellt.<sup>4</sup> Beispielsweise ist das ER mit den Mitochondrien oder den ERES von transfizierten HeLa-Zellen (siehe Anhang A) in Abb. 3.5 dargestellt, wobei auch die Filamente des Zytoskeletts betrachtet werden (siehe Abb. 3.6b). Grundsätzlich ermöglicht die SRRF-Mikroskopie eine Visualisierung dieser dynamischen Zellbestandteile im Sekundenbereich mit verstärkten Kontrasten und verringerten Halbwertsbreiten.

Wie in Abb. 3.5a veranschaulicht wird, ist die Bildschärfe und der Detailgrad bei den SRRF-Aufnahmen erheblich gesteigert, womit gedrängte Anordnungen der ER-Tubuli oder überlappende Mitochondrien feiner aufgelöst werden. Hierbei zeigt das gesamte ER eine tubuläre Beschaffenheit, deren flächige Bereiche aus den Konfokalaufnahmen vergleichbar zu den peripheren ER-Tubuli organisiert scheinen. Insbesondere ermöglichen die Radialitätsbilder eine visuelle Abgrenzung der ER-Strukturen unabhängig ihrer Fluoreszenz, was die konfokale Bildgebung nicht beim rauen ER gewährleistet. Daneben werden die kreisförmigen ERES mit reduzierten Beugungsprofilen in den SRRF-Aufnahmen wiedergegeben, deren Hintergrundfluoreszenz zudem verschwindet (siehe Abb. 3.5b).

Darüber hinaus ist die SRRF-Mikroskopie mit einer Zeitauflösung  $T_{\text{SRRF}} \simeq 1$  s geeignet, Veränderungen zellulärer Strukturen zu erfassen. Dabei gestattet das Photobleichen experimentell bis zu 500 konfokale Fluoreszenzaufnahmen, aus denen sich gewöhnlich 50 Radialitätsbilder berechnen lassen. Somit können die stark mit dem ER-Netzwerk verknüpften Mitochondrien (siehe Abb. 3.5a) oder die auf dem ER beweglichen ERES (siehe Abb. 3.5b) zeitgleich abgebildet werden, für deren dynamische Organisation Wechselbeziehungen auf der Sekundenskala entscheidend sind [22,93]. Gleichermaßen können enge Assoziationen zwischen dem ER und dem Zytoskelett der Mikrotubuli visualisiert werden, da die zytoplasmische Fluoreszenz von Tubulin maßgeblich unterdrückt ist (siehe Abb. 3.6). Ebenso lässt sich die Bündelung von Aktinfilamenten an zytoplasmischen Stressfasern und dem Zellkortex mit einer verbesserten Abbildungsschärfe in den Radialitätsbildern hervorheben, selbst wenn diese Filamente etwas außerhalb der Fokusebene liegen.

<sup>4</sup> HeLa-Zellen (siehe Anhang A):  $\Delta t_{\text{konf}} = 500 \text{ ms}, \Delta t_{\text{SRRF}} = 100 \text{ ms}, N_{\text{img}} = 10, R_{\text{ring}} = 0.8 - 1.0 \cdot 90 \text{ nm}.$
#### 3 Charakterisierung und Anwendung auflösungsverbessernder SRRF-Mikroskopie



Abb. 3.5: Konfokal- und SRRF-Mikroskopieaufnahmen lebender Kulturzellen. Mit der Kontrast- und Schärfezunahme der SRRF-Methode können dichte Gefüge des ERs visuell in den Radialitätsbildern<sup>4</sup> separiert werden und zeitgleiche Assoziationen des tubulären ER-Netzwerks mit den (a) Mitochondrien und (b) ERES der HeLa-Zellen dargestellt werden.

Wie zuvor in Abschnitt 3.1 wird das experimentelle Auflösungsvermögen  $\sigma_{exp}$  aus den Halbwertsbreiten durch Anpassungen der Intensitätsverläufe an (2.1) und über FRC [97] der Fluoreszenzaufnahmen bestimmt (siehe Tab. 3.3). Demnach sind die Beugungsprofile von filamentösen und sphärischen Zellstrukturen etwa zweifach in den Radialitätsbildern verringert, was mit den fluoreszenten Partikeln und fixierten Mikrotubuli vergleichbar ist. Hierbei wird eine Schärfezunahme der SRRF-Aufnahmen  $\sigma_{SRRF} \simeq 120$  nm gegenüber der experimentellen Auflösung  $\sigma_{exp} \simeq 245$  nm nahe des optischen Werts  $r_{konf} \simeq 214$  nm ausgewiesen, die etwas höher über die Halbwertsbreiten angegeben wird. Diesbezüglich werden das ER und die Mitochondrien, begründet durch ihre Bewegungen, geringfügig verbreitert dargestellt, während sich die effektive Auflösung der Radialitätsbilder nicht zwischen den Zytoskelettfilamenten fixierter und lebender Zellen unterscheidet.

	Aktinfil.	Mikrot.	ER	Mitochondrien	ERES	Mittelwert
$\sigma_{\rm exp}$ [nm]	$266\pm28$	$253\pm38$	$260\pm35$	$250\pm17$	$238\pm23$	$253\pm28$
$\sigma_{\rm SRRF}$ [nm]	$104 \pm 10$	$102\pm9$	$104\pm11$	$119\pm10$	$124 \pm 9$	$111\pm10$

(a) Hanobangs (of mogon and finipassang dor moonstratspromo	(a)	Auflösungsvermögen	aus	Anpassung	$\mathbf{der}$	Intensitätsprofile.
---	-----	--------------------	-----	-----------	----------------	---------------------

(b) Auflösungsvermögen über Fourier-Ring-Korrelationen.

	Aktinfil.	Mikrot.	ER	Mitochondrien	ERES	Mittelwert
$\sigma_{\rm exp}$ [nm]	$239 \pm 17$	$222\pm20$	$238\pm22$	$264\pm32$	$247\pm30$	$243\pm25$
$\sigma_{\rm SRRF}$ [nm]	$119 \pm 14$	$118\pm17$	$141\pm19$	$138\pm24$	$127\pm18$	$128\pm18$

Tab. 3.3: Experimentelles Auflösungsvermögen an zellulären Strukturen. Angegeben ist das Auflösungsvermögen bestimmt aus (a) Anpassungen der Intensitätsprofile und (b) FRC von Konfokal- und SRRF-Mikroskopieaufnahmen fluoreszenzmarkierter Zellen.<sup>4</sup>

# Anwendungsbeispiele der kontrastverbesserten SRRF-Bildgebung des ERs

Die Kontrastzunahme und vergrößerte Abbildungsschärfe der SRRF-Mikroskopie zeichnet sich besonders bei der Bildgebung nahe der Kernhülle ab (siehe Abb. 3.6a). Daher können durch den gesteigerten Kontrastumfang dreidimensional verzweigte Anordnungen des rauen ERs oder dichte Akkumulationen der ERES am Golgi-Apparat veranschaulicht werden, obwohl deren Fluoreszenzen von spezifischen Markierungsproteinen lokal sehr verstärkt sind. Gleichzeitig lässt sich das tubuläre ER-Netzwerk unterhalb des Zellkerns näher aufzeigen, das durch seine Lage etwas außerhalb der konfokalen Fokusebene nur undeutlich bei den Fluoreszenzaufnahmen abgebildet wird.

Ahnlich dazu kann die dichte Anordnung der Mikrotubuli bei den Radialitätsbildern herausgestellt werden, wogegen einzelne Filamente bei den Konfokalaufnahmen, auch durch die Hintergrundfluoreszenz von ungebundenem Tubulin bedingt, nur eingeschränkt erkennbar sind (siehe Abb. 3.6b). Insbesondere ist es mit den reduzierten Beugungsprofilen möglich, den Verlauf der Mikrotubuli und die entsprechende Ausrichtung des tubulären ERs abzubilden. In dieser Hinsicht sind nahezu alle Verzweigungsstellen des ER-Netzwerks unmittelbar mit den Mikrotubuli verknüpft und das Erscheinungsbild dieser Strukturen aus Abb. 3.6b ähnelt den höchstauflösenden Mikroskopieaufnahmen von [93].

Des Weiteren scheinen flächige Gebiete des ERs, die in den Konfokalaufnahmen weitgehend einheitlich abgebildet werden, über nähere Unterstrukturen zu verfügen (siehe Abb. 3.6c). Bei den Radialitätsbildern peripherer ER-Membranen werden so kürzere tubuläre Geflechte ersichtlich, deren Beschaffenheit sich zeitlich stark verändert. Auch wenn diese infolge schwacher Helligkeitsgradienten verrauscht mit der SRRF-Methode dargestellt werden, könnte dies auf dichte Gefüge der ER-Tubuli [94] oder Membranöffnungen des ERs unterhalb des optischen Auflösungsvermögens [95] hinweisen. Deren Bildgebung erfordert gewöhnlich ein höchstes räumliches wie zeitliches Auflösungsvermögen [93]. Mit der SRRF-Methode kann somit das ER auflösungsverbessert visualisiert werden.



Abb. 3.6: Anwendungsbeispiele der SRRF-Mikroskopie am ER lebender Zellen. Gegenüber den konfokalen Aufnahmen ermöglichen die Radialitätsbilder<sup>4</sup> entscheidende Verbesserungen des Kontrastumfangs und der Abbildungsschärfe, mit der sich (a) das ER und Akkumulationen der ERES an der Kernhülle, (b) Verknüpfungen des tubulären ERs mit den Mikrotubuli und (c) tubuläre Strukturen in flächigen ER-Bereichen visualisieren lassen.

# 3.2.2 SRRF-Bildgebung des ERs unbehandelter Zellen

Aufbauend auf der SRRF-Bildgebung an lebenden Zellen werden die Phänotypen des ERs näher dargestellt. Wie im Grundlagenteil dargelegt, variiert die Gestalt des ERs zwischen den spezialisierten Bereichen des rauen und glatten ERs [18,20] und kann sich an zellinterne Regulationen als auch externe Veränderungen anpassen [19,32]. Darüber hinaus wird die Gestalt des ERs durch strukturgebende Proteine und Interaktionen mit dem Zytoskelett der Mikrotubuli bestimmt wie aufrechterhalten [21,22].

Der Anteil flächiger Bereiche des ERs unterscheidet sich erkennbar innerhalb des Spektrums konfokaler Fluoreszenzaufnahmen, dessen Bandbreite von den Phänotypen der HeLa-Zellen aus Abb. 3.7 wiedergegeben wird. In dieser Hinsicht wird das über CRT-GFP fluoreszenzmarkierte Lumen des ERs als ein kontinuierliches Membransystem abgebildet. Dieses erstreckt sich von einem vorwiegend planar verzweigten Netzwerk einzelner Tubuli des glatten ERs, in das flächigere Anordnungen eingegliedert sind, hin zu größtenteils ausgedehnten Regionen des rauen ERs, die aus dichter gedrängten Gefügen gebildet werden. Dabei ist auch der Phänotyp mit einem flächendeckend ausgedehntem ER angegeben (siehe Abb. 3.7c), der bei vereinzelten HeLa-Zellen festgestellt wird.

Bei den Radialitätsbildern der SRRF-Mikroskopiemethode ist das gesamte ER hingegen von einem tubulären Erscheinungsbild gekennzeichnet, da sich dichte Anordnungen der ER-Strukturen durch die Kontrast- und Schärfezunahme in Abb. 3.7 visuell unterscheiden lassen. Somit scheinen flächige Gebiete aus den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen ähnlich zu den ER-Tubuli organisiert zu sein. Hierbei grenzen sich diese Geflechte des ERs äußerlich über ihre hohe Dichte an kurzen tubulären Strukturen vom weitmaschigen Netzwerk des peripheren ERs ab und sind zeitlich starken Umschichtungen unterworfen. Diesbezüglich werden die ER-Tubuli mit reduzierten Beugungsprofilen wiedergegeben, die sich merklich vom Hintergrund abheben.



Abb. 3.7: Konfokal- und SRRF-Mikroskopieaufnahmen von ER-Phänotypen. (a) - (c) Das Erscheinungsbild des ERs (CRT-GFP) von unbehandelten HeLa-Zellen erstreckt sich als kontinuierliches Membrannetzwerk verzweigter Tubuli und gedrängter Anordnungen.

Jedoch ist das strukturierte Bildrauschen der SRRF-Methode (siehe Abschnitt 3.1.3) besonders stark in flächigen Regionen des ERs ausgeprägt und die mit radialen Ausläufern dargestellten ER-Tubuli werden vielfach unterbrochen. Für eine verbesserte Bildgebung müsste daher eine größere Anzahl von Fluoreszenzaufnahmen in den SRRF-Algorithmus einbezogen werden, was durch einen Kompromiss zwischen den Abbildungseigenschaften und der Dynamik des ERs experimentell eingeschränkt ist. Dabei erfordern die gängigen Probenhelligkeiten eine Belichtungszeit  $\Delta t_{\text{SRRF}} \simeq 0.1 - 0.2 \text{ s}$ , die, zusammen mit den  $N_{\text{img}} \geq 5$  benötigten Einzelbildern, in einer Gesamtaufnahmedauer der Radialitätsbilder von  $T_{\text{SRRF}} = N_{\text{img}} \cdot \Delta t_{\text{SRRF}} \simeq 1 \text{ s}$  resultieren. Infolgedessen können die Oszillationen der ER-Tubuli  $f_{\text{ER}} \simeq 5 \text{ s}^{-1}$  [70,94] nicht mit der SRRF-Methode verfolgt werden und führen weiter zu einer räumlichen Unschärfe in den Radialitätsbildern. Umstrukturierungen des ER-Netzwerks im Sekundenbereich können jedoch zeitlich aufgelöst werden.

In diesem Kontext dokumentieren gegenwärtige Veröffentlichungen eine überwiegend tubuläre Beschaffenheit des ER-Netzwerks bei Säugetierzellen. Mithilfe höchstauflösender Lichtmikroskopiemethoden werden hierbei dicht gedrängte und hochdynamische Gefüge der ER-Tubuli identifiziert, die in gewöhnlichen Fluoreszenzaufnahmen als einheitliche Membranen abgebildet werden [93,94]. Gleichzeitig ist die ER-Oberfläche mit Öffnungen unterhalb des optischen Auflösungsvermögens durchzeichnet, deren Bewegungen an die Dynamik des Zytoskeletts geknüpft sind [94,95]. Daneben lassen sich die komplexen Membranverformungen des ERs über Rekonstruktionen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen veranschaulichen [94]. Unter diesen Gesichtspunkten steht das tubuläre Erscheinungsbild der SRRF-Experimente im Einklang mit einer Bildgebung über fortschrittliche Mikroskopietechniken, wenngleich dichte Anordnungen der ER-Tubuli bei den Radialitätsbildern nicht eindeutig gegenüber dem Hintergrundrauschen differenziert werden können und die Zeitauflösung experimentell auf  $T_{\rm SRRF} \simeq 1$  s beschränkt ist.

# 3.2.3 Netzwerkanalyse des ERs mit Kovisualisierung der ERES

Außerdem wird die auflösungs- und kontrastverbesserte Bildgebung der SRRF-Methode genutzt, um Netzwerkeigenschaften des ERs mit dem Lokalisationsmuster der ERES quantitativ zu untersuchen. Dazu werden das ER und die ERES bei SRRF-Aufnahmen von HeLa-Zellen segmentiert und lokalisiert (siehe Anhang D.1 für Details). Begründet durch die dichte Anordnung der ER-Tubuli und der ERES von konfokalen Aufnahmen war die Netzwerkanalyse des ERs in der Masterarbeit des Autors [81] und die Kovisualisierung mit den ERES in der Veröffentlichung [71] auf periphere Zellregionen begrenzt.

## Netzwerkeigenschaften des ERs

Bei den Radialitätsbildern bildet das ER ein kontinuierliches Membransystem, dessen Topologie charakteristische Anzeichen eines räumlich geordneten Netzwerks aufweist. So sind die Tubuli des ERs zu etwa 90 % über Dreiwegekreuzungen verbunden, deren Wertigkeiten sich mit einem mittleren Grad  $\langle k \rangle = 3.0 \pm 0.1$  nur wenig und auch nicht räumlich unterscheiden. Daher ist die Verbundenheit einzelner Netzwerkknoten, wie sie beispielsweise über den Clusterkoeffizienten bemessen werden kann, vergleichsweise groß. Anhand der reinen Netzwerktopologie lassen sich jedoch keine Gemeinschaftsstrukturen in den ER-Graphen identifizieren. Im Gegensatz zu komplexen Netzwerken befinden sich zentrale Knoten mit den kürzesten Verbindungen im Mittelpunkt des ER-Netzwerks, deren Zentralität durch den verstärkten Verlauf kürzester Netzwerkpfade (*"Betweenness"*) gegenüber peripheren Randbereichen etwas erhöht ist.

Die mittlere Weglänge zwischen zwei Netzwerkpunkten beträgt  $\langle \Delta_{ij} \rangle \simeq 30$  Knoten, was dem Skalierungsverhalten eines gleichmäßig geordneten Graphens  $\langle \Delta_{ij} \rangle \propto \sqrt{N_{\text{Knoten}}}$ entspricht. Hierbei verfügen die Tubuli des ER-Netzwerks über typische Ausdehnungen zwischen 0.5 – 1.5 µm, bei einer mittleren Segmentlänge  $\langle l_{\text{ER}} \rangle = (1.06 \pm 0.11)$  µm (siehe Abb. 3.8b), die etwas größer als der mittlere Abstand einer ER-Verzweigungsstelle zu



Abb. 3.8: Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters in SRRF-Aufnahmen. (a) Bei den Radialitätsbildern (Ausschnitt aus Abb. 3.5b) lässt sich die Struktur des ERs (KDEL-RFP, Segmentierung in weiß) mit den gitterartig angeordneten ERES (Sec16-GFP) kovisualisieren. Hierbei sind (b) die Abstände der ERES  $d_{\text{ERES}}$  mit den Segmentlängen des ER-Netzwerks  $l_{\text{ER}}$  vergleichbar und (c) lokalisieren die Schwerpunktskoordinaten der ERES in optischer Verbindung  $d_{\text{ER,ES}}$  zu den Mittelpunktslinien der segmentierten ER-Tubuli.

benachbarten Knotenpunkten  $\langle d_{\rm ER} \rangle = (0.82 \pm 0.13) \,\mu\text{m}$  ist. Gegenüber den Analysen aus konfokalen Aufnahmen (siehe Abb. 4.2c und [81]) ist die mittlere Segmentlänge unverändert, wobei Übersegmentierungen mit  $l_{\rm ER} \lesssim 0.5 \,\mu\text{m}$  in Abb. 3.8b verringert sind.

Insgesamt stimmen die topologischen Merkmale des ER-Netzwerks mit den Untersuchungen von konfokalen Aufnahmen aus der Masterarbeit des Autors [81] überein. Dabei lässt sich das gesamte ER-Netzwerk mit der SRRF-Methode segmentieren und eine Übersegmentierung von kürzeren ER-Tubuli vermeiden. Durch die Helligkeitsschwankungen bei den Radialitätsbildern ist das kontinuierliche ER allerdings häufiger unterbrochen.

#### Lokalisationsmuster der ERES

Darüber hinaus können die ERES mit gesteigerten Kontrasten und einer verbesserten Bildschärfe gleichzeitig zum ER bei den SRRF-Aufnahmen visualisiert werden. Wie in Abb. 3.5b und Abb. 3.8a dargestellt, besteht ein Lokalisationsmuster der ERES mit hunderten punktartigen Ansammlungen von Sec16-GFP, die gitterartig in den Zellen dispergiert sind. Dabei sind geringe Entfernungen zwischen den ERES unterdrückt und der mittlere Abstand benachbarter ERES  $\langle d_{\text{ERES}} \rangle = (0.91 \pm 0.14) \,\mu\text{m}$  ist zur Segmentlänge des ERs vergleichbar (siehe Abb. 3.8b). Die ERES sind richtungsunabhängig zu den ER-Tubuli angeordnet. Mit einem Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}} \rangle = 0.82 \pm 0.02$  und einer Sphärizität  $\langle \mathcal{S}_{\text{ERES}} \rangle = 0.87 \pm 0.03$  werden die ERES nahezu kreisförmig abgebildet, da die sternförmigen Radialitätsverläufe nicht von der Segmentierung erfasst werden. Infolge ihrer Dynamik und der zeitlichen Auflösung  $T_{\text{SRRF}} = 1$  s wird die Form der ERES etwas ungleichmäßiger als bei den Konfokalaufnahmen wiedergegeben.

Im Zuge dessen lässt sich die partielle Kolokalisation zwischen den ERES und dem ER eindeutig bei den Radialitätsbildern herausstellen, da die Tubuli des ERs durch die Schärfezunahme visuell voneinander unterschieden werden können. Wie in Abb. 3.8a veranschaulicht, lokalisieren die ERES bei einer zufälligen Orientierung zur nächsten ER-Verzweigungsstelle erkennbar neben den ER-Tubuli und stehen mit gewöhnlichen Abständen  $d_{\text{ER,ES}} \leq 0.25 \,\mu\text{m} \simeq r_{\text{konf}}$  optisch in Verbindung zum segmentierten ER (siehe Abb. 3.8c). Hierbei gleichen sich die Entfernungen zwischen den Radialitätsschwerpunkten der ERES und der Zentrallinie angrenzender ER-Filamente  $d_{\text{ER,ES}} = (0.16 \pm 0.11) \,\mu\text{m}$ mit  $\langle d_{\text{ER,COPII}} \rangle = (0.14 \pm 0.04) \,\mu\text{m}$  aus der Veröffentlichung [30], deren Bildgebung auf höchstauflösender Mikroskopie nach dem Airyscan-Prinzip [99] beruhte.

Somit verdeutlichen die SRRF-Aufnahmen eine räumliche Organisation der ERES als Proteinkomplexe an den ER-Membranen, deren mit den COPII-Proteinen besetzte Knospungsstellen [100] zu [30] vergleichbare Entfernungen vom ER aufweisen. Jedoch können die ERES infolge des Zeitversatzes der Mehrkanalaufnahmen nicht vollständig zeitgleich abgebildet werden, weshalb die Distanzen in Abb. 3.8c von Umstrukturierungen des ERs im Sekundenbereich [20,22] vermutlich vergrößert werden. Daneben gilt es die Zeitauflösung  $T_{\text{SRRF}} \simeq 1$  s zu berücksichtigen, durch die das oszillierende ER [70,94] und die beweglichen ERES [71] mit einer unvermeidbaren Unschärfe wiedergegeben werden.

# 3.2.4 SRRF-Bildgebung des ERs biochemisch veränderter Zellen

Weiterhin kann das ER über biochemische Eingriffe verändert werden (siehe Anhang A.5). Insbesondere wird die strukturelle Organisation des ERs durch das Zusammenwirken mit dem Zytoskelett der Mikrotubuli bestimmt [20,21] und strukturgebende Proteine mehrerer Familien beeinflussen die Eigenschaften der ER-Membranen [20,101]. Diesbezüglich tragen die Proteine des Lunapark-Gens zur Gestaltung des tubulären ER-Netzwerks bei, indem sie dessen Verzweigungsstellen stabilisieren [102]. In Fluoreszenzaufnahmen verstärkt sich daher das flächige Erscheinungsbild des ERs unter einem Gen-Knockdown von Lunapark [102–104] oder dem Rückgang der Mikrotubuli [105, 106] (siehe auch Kapitel 4).

### Auflösung der Mikrotubuli durch Nocodazol

Wie mit den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 3.9a veranschaulicht wird, bildet das ER ein kontinuierliches Membransystem, dessen verzweigtes Netzwerk peripherer Tubuli unter der Auflösung des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch Nocodazol zurückgeht. Hierbei ist die Beschaffenheit des ERs von überwiegend flächigen Gefügen gekennzeichnet, wenngleich die stärker gedrängten und dreidimensional verzweigten Geflechte des rauen ERs nahe der Kernhülle unverändert zu den unbehandelten Zellen erscheinen. Dieses Gesamterscheinungsbild des ERs unter dem Rückgang stützender Mikrotubuli stimmt visuell mit den Zellphänotypen aus [105, 106] überein.

In den SRRF-Aufnahmen von Abb. 3.9a spiegelt sich dagegen eine tubuläre Gestalt des ERs wider, dessen Segmente gegenüber den unbehandelten Zellen verkürzt sein könnten. Somit scheinen flächige Bereiche aus kurzen, tubulären Anordnungen hervorzugehen, die sich vom Hintergrund absetzen. Bei den konfokalen Aufnahmen sind tubuläre Strukturen zwar teilweise erkennbar, doch können diese nicht eindeutig voneinander getrennt werden. Dabei ist das Rauschen der SRRF-Bildgebung merklich ausgeprägt und dieses könnte die hohe Zahl ringförmiger Anordnungen mit einen Durchmesser von etwa 500 nm hervorrufen. Für eine aussagekräftige Quantifizierung der Radialitätsbilder sind die ER-Segmente jedoch zu häufig unterbrochen oder werden aber übersegmentiert.

Dagegen können über die SRRF-Methode Verbindungen zwischen den Zellstrukturen hervorgehoben werden, die bei den konfokalen Aufnahmen nicht unmittelbar erkennbar sind (siehe Hervorhebungen in Abb. 3.9a). Aufgrund der reduzierten Beugungsprofile und Hintergrundfluoreszenz der Radialitätsbilder werden die ERES als punktförmige Objekte an den ER-Tubuli oder die starken Verknüpfungen zwischen dem ER und den Mitochondrien sichtbar. Ausgehend von diesen Kontakten ist es wahrscheinlich anzunehmen, dass die Radialitätsbilder stellenweise ER-Tubuli wiedergeben, auch wenn diese unterbrochen dargestellt werden. Insgesamt lässt ein Netzwerk verkürzter und weniger geradliniger ER-Segmente unter dem Rückgang versteifender Mikrotubuli einen Spannungsverlust der ER-Membranen vermuten. Allerdings muss das tubulär-strukturierte Rauschen der Bildgebung über den SRRF-Algorithmus beachtet werden.



Abb. 3.9: Konfokal- und SRRF-Mikroskopie biochemisch veränderter Zellen. Bei den mit (a) Nocodazol oder (b) der RNA-Interferenz biochemisch veränderten HeLa-Zellen verringert sich die tubuläre Beschaffenheit des ERs konfokaler Fluoreszenzaufnahmen und es werden dichte, tubuläre Anordnungen des ERs (KDEL-RFP) durch die Kontrast- und Schärfezunahme der SRRF-Bildgebung ersichtlich. Teilweise aggregierte ERES (Sec16-GFP) zweigen sich von den tubulären ER-Strukturen ab und die Mitochondrien (Mito-GFP) sind eng mit dem ER verknüpft, wenngleich das strukturierte Rauschen der SRRF-Aufnahmen aufgrund schwacher Helligkeitsgradienten stärker ausgeprägt ist (siehe Hervorhebungen).

### Destabilisierung des tubulären ERs durch RNA-Interferenz

Ebenso werden Phänotypen lebender HeLa-Zellen mit der SRRF-Methode visualisiert, bei denen die Expression von Lunapark-Proteinen über eine RNA-Interferenz (siehe Anhang A.5) verringert ist. Wie auch in Abschnitt 4.6 erläutert, nimmt das tubuläre Erscheinungsbild des ERs bei konfokalen Fluoreszenzaufnahmen dieser Zellen ab und es entwickeln sich überwiegend flächige ER-Strukturen, die zum Knockdown aus [102–104] vergleichbar sind. In den Experimenten konfokaler Mikroskopie wird das ER-Lumen für etwa 20% der HeLa-Zellen flächendeckend ausgedehnt abgebildet (siehe Abb. 3.9b bzw. Abb. 4.5). Abgesehen von Bereichen ohne eine Fluoreszenz von KDEL-RFP, können keine Strukturen des ERs in den konfokalen Aufnahmen identifiziert werden. Bei den SRRF-Aufnahmen aus Abb. 3.9b wird das gesamte ER mit einer tubulären Beschaffenheit dargestellt, die sich in die Phänotypen von Abb. 3.7 einordnet. Im Zuge dessen veranschaulichen die Radialitätsbilder Verknüpfungen des tubulären ERs zu weiteren Zellbestandteilen (siehe Hervorhebungen). Somit sind die Mitochondrien zu einem Netzwerk zusammengeschlossen, das eng mit dem ER verbunden ist. Dieses scheint mit den beständigen ER-Tubuli und weniger mit den peripheren ER-Geflechten verknüpft zu sein. Daneben werden die ERES als weitgehend kreisförmige Objekte wiedergegeben, die von den ER-Tubuli ausgehen. Hierbei verfügen einige ERES über eine filamentöse Gestalt mit wechselnden Helligkeitsprofilen. Möglicherweise könnte dies gestreckte Membrantubuli der ERES reflektieren, die Transportstrukturen in Form einer perlenden Oberflächeninstabilität ausbilden können [30]. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Strukturen aus den filamentartigen Artefakten der SRRF-Bildgebung in Verbindung mit den Bewegungen der ERES [71] hervorgehen.

Des Weiteren unterscheiden sich die ER-Tubuli in ihrer Dynamik. So unterliegen die meisten der etwa 1 – 3 µm umfassenden ER-Tubuli Bewegungen im Sekundenbereich, die den Oszillationen des ER-Netzwerks [81,94] ähneln. Diese ER-Tubuli bewegen sich zwischen den Aufnahmen ( $T_{\text{SRRF}} = 1 \text{ s}$ ) ohne ihre Gestalt wesentlich zu verändern. Mit dem zuvor entwickelten Algorithmus [81] lassen sich die zeitabhängigen Bewegungen der ER-Verzweigungsstellen jedoch nicht erfolgreich quantifizieren und die bestimmten Werte wären durch die Zeitauflösung  $T_{\text{SRRF}} = 1 \text{ s}$  gegenüber den vorhandenen ER-Oszillationen  $f_{\text{ER}} \simeq 5 \text{ s}^{-1}$  [70,94] verfälscht. Andererseits restrukturieren sich stark gedrängte und oftmals periphere Geflechte mit einer Länge unterhalb von 1 µm (siehe Hervorhebungen in Abb. 3.9b) deutlich schneller zwischen den SRRF-Aufnahmen. Ob diese Anordnungen hochdynamische ER-Strukturen oder das strukturierte Rauschen der SRRF-Bildgebung widerspiegeln, kann mit diesen Experimenten nicht eindeutig erklärt werden.

Demnach lassen die SRRF-Aufnahmen auf ein tubuläres Erscheinungsbild des ERs bei den Zellen der RNA-Interferenz hinweisen, wenngleich das ausgeprägte SRRF-Rauschen aufgrund schwacher Helligkeitsgradienten berücksichtigt werden sollte. Ausgehend davon würden kürzere Geflechte des tubulären ERs im Einklang mit einem Stabilitätsverlust der ER-Membranen durch den Rückgang der Lunapark-Proteine [102, 104] stehen. In diesem Kontext belegen höchstauflösende Lichtmikroskopiemethoden dicht gedrängte Gefüge von peripheren ER-Tubuli [94], deren hohe Dynamik womöglich einen Austausch membrangebundener Proteine und dadurch eine Aggregation der ERES begünstigen könnte. Die zeitliche Auflösung der SRRF-Bildgebung am genutzten Konfokalmikroskop ist mit einer experimentellen Beschränkung auf  $T_{\text{SRRF}} \simeq 1$  s jedoch nicht geeignet, diese dynamischen Zellvorgänge auflösen zu können.

# 3.3 Einordnung und Diskussion der SRRF-Mikroskopiemethode

Wie in diesem Kapitel geschildert, konnte die SRRF-Mikroskopiemethode [44] ausgehend von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen an tubulären und sphärischen Referenzobjekten sowie Strukturelementen lebender Kulturzellen erfolgreich angewandt werden. Im Verlauf dessen ließen sich die Objekte mit etwa zweieinhalbfach reduzierten Beugungsprofilen und einem gesteigerten Kontrastverhältnis in den Radialitätsbildern darstellen (siehe Tab. 3.4), was mit gegenwärtigen Anwendungen der SRRF-Mikroskopie [45,48,49] vergleichbar ist. Weiterhin wurden experimentelle Eigenschaften der SRRF-Bildgebung charakterisiert und bezüglich des tubulär-strukturierten Rauschmusters optimiert.

Die SRRF-Methode ermöglichte mit einer gewöhnlichen Aufnahmedauer  $T_{\text{SRRF}} \simeq 1 \text{ s}$  verschiedene Einsatzmöglichkeiten an konfokalen Fluoreszenzaufnahmen lebender Zellen. Insbesondere vermittelte die SRRF-Bildgebung ein tubuläres Erscheinungsbild des ERs, das mit mehrere Zellstrukturen verknüpft war. Auf diese Weise konnte das tubuläre ER auflösungsverbessert charakterisiert werden, dessen Topologie mehrere Charakteristika eines räumlich geordneten Netzwerks zeigte. Über die Kontrast- und Schärfezunahme der Radialitätsbilder ließ sich auch in biochemisch veränderten Zellen das Lokalisationsmuster der ERES in Relation zum tubulären ER-Netzwerk kovisualisieren.

Darauf aufbauend könnte es sich anbieten, dynamische Wechselbeziehungen des ERs zu den Zellorganellen [22,32] und den membranlosen Organellstrukturen [35,37] mit der SRRF-Mikroskopie zu untersuchen. So ließe sich, auch im Hinblick auf die Organisation des Zytoskeletts [20,21], eine dreidimensionale Interaktionskarte des ERs bilden, die gleichzeitig topologische und dynamische Netzwerkeigenschaften des ERs [81] berücksichtigt. Allerdings ist es erforderlich, die SRRF-Bildgebung mit anderen fortgeschrittenen Lichtmikroskopietechniken experimentell zu vergleichen, um das Wechselverhältnis zwischen einer auflösungsverbesserten Rekonstruktion und dem tubulär strukturierten Rauschen der Radialitätsbilder fundiert bewerten zu können. Wahrscheinlich könnte das Hintergrundrauschen mit einer rückwärtig beleuchteten sCMOS-Kamera verringert und damit auch die Zeitauflösung der SRRF-Anwendung erhöht werden.

	$\sigma_{\exp}$ (Nanop.)	$\sigma_{\exp}$ (Mikrot.)	$\sigma_{\rm exp}$ (Zelle)	$T_{\rm Aufn.}$	$\Delta t_{\min}$	$N_{ m img}$
konfokal	$(230\pm20)\mathrm{nm}$	$(245\pm25)\mathrm{nm}$	$(250 \pm 30)\mathrm{nm}$	$50-250\mathrm{ms}$	$100\mathrm{ms}$	1(-5)
SRRF	$(115\pm10)\mathrm{nm}$	$(110\pm10)\mathrm{nm}$	$(120 \pm 15) \mathrm{nm}$	$0.5-5\mathrm{s}$	$50\mathrm{ms}$	5 - 50
ISM [96]	$(185\pm~5)\mathrm{nm}$	$150\mathrm{nm}$	$185\mathrm{nm}$	$10-50\mathrm{s}$	$20\mathrm{ms}$	250

#### Tab. 3.4: Typische Kennwerte des konfokalen Lichtmikroskopaufbaus.

Ausgehend von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen an unterschiedlichen Strukturen ist das experimentelle Auflösungsvermögen  $\sigma_{exp}$  der SRRF- und ISM-Mikroskopiemethode [96] am genutzen Mikroskopaufbau gegenübergestellt. Für die entsprechenden Bildgebungsverfahren mit einer gewöhnlichen Aufnahmedauer  $T_{Aufn.}$  sind etwa  $N_{img}$  Einzelbilder einer minimalen Belichtungszeit  $\Delta t_{min}$  erforderlich (siehe Anhang B, C und [96] für Details)

# Gegenüberstellung mit konfokaler Image Scanning Microscopy

In der Doktorarbeit von Herrn Philipp Struntz [96] wurde bereits die "Image Scanning Microscopy" (ISM) am genutzten Konfokalaufbau charakterisiert und angewandt. Mit der ISM lässt sich der Kontrast verstärken und das Auflösungsvermögen über den konfokalen Grenzwert steigern, da die Bildpunkte des Kamerasensors über einen unterschiedlichen Informationsgehalt der beugungsbegrenzten Abbildung verfügen [107, 108]. Um diese Informationen nutzbar zu machen, müssen die Probenbereiche einzeln aufgenommen und deren ortsverschobene Abbildungen zu einer Gesamtaufnahme zusammengesetzt werden [107, 108]. Hierbei kann die Bildgebung der ISM über eine Dekonvolution weiter verbessert werden [108] und die Aufnahmezeit durch die Beleuchtung mehrerer Foki bei einem Spinning-Disk Mikroskop auf den Sekundenbereich reduziert werden [96, 109]. Insgesamt lässt sich mit der ISM eine Auflösungsverbesserung um den Faktor  $\sqrt{2}$  erreichen, die, neben kontrollierten Beleuchtungs- und Detektionssequenzen der Spinning-Disk Einheit, keine weiteren technischen Anforderungen bedarf [107–109].

Zusammen mit den Eigenschaften der zugehörigen konfokalen Fluoreszenzaufnahmen sind experimentelle Kenngrößen der ISM und SRRF-Bildgebung am genutzten Mikroskop in Tab. 3.4 verglichen. In dieser Hinsicht werden sphärische wie tubuläre Objekte bei der SRRF-Methode mit circa zweifach reduzierten Beugungsprofilen  $\sigma_{\text{SRRF}} \simeq 115 \text{ nm}$ wiedergegeben, wogegen mit der ISM eine Verbesserung  $\sigma_{\text{ISM}} \simeq 170 \text{ nm}$  erzielt wird [96]. Dabei erfordert der SRRF-Algorithmus [44] weniger Einzelbilder als die Bildrekonstruktion von [109], deren Aufnahmen kleinere Belichtungszeiten aufweisen. Aufgrund dessen und den benötigten Zeitpuffern beträgt die Aufnahmedauer gewöhnlich etwa  $T_{\text{ISM}} \simeq 20 \text{ s}$ , was deren gegenwärtige Anwendung in Lebendzellexperimenten einschränkt.

Unter diesen Gesichtspunkten erweist sich eine Bildgebung über die SRRF-Methode als vorteilhafter, wobei die experimentelle Abbildungscharakteristik nicht nur von den Kenngrößen aus Tab. 3.4 beschrieben wird. In diesem Sinne verbessert sich die Bildschärfe der ISM zwar weniger stark, aber das Kontrastverhältnis steigert sich merklich, besonders wenn deren Raumfrequenzen zusätzlich gefiltert werden [96]. Dagegen ist die Kontrastzunahme und vergrößerte Abbildungsschärfe der SRRF-Aufnahmen mit einem tubulär-strukturierten Rauschmuster verbunden.

#### Perspektive: Methoden höchstauflösender Bildgebung

Andererseits gibt es unzählige Konzepte, mit denen höchstauflösende lichtmikroskopische Aufnahmen an lebenden Organismen realisiert werden können [10,91,92]. Diesbezüglich ist die Bildgebung über die SRRF-Methode bei Systemen mit einer hohen Dichte an fluoreszenten Molekülen, wie es bei Zellexperimenten typischerweise gegeben ist, zu einer Dekonvolution vergleichbar, wobei strukturelle Informationen mit einer Kontrastzunahme und höheren Abbildungsschärfe bei den Radialitätsbildern wiedergegeben werden [44]. Gegenüber den SRRF-Aufnahmen lassen andere Algorithmen, die eine auflösungsverbesserte Rekonstruktion über bildbasierte Ansätze ermöglichen, Schwachpunkte bei der Visualisierung und Berechnungsdauer erkennen [44].<sup>5</sup> Somit verfügt eine Bildgebung durch SOFI [46] nur über die Informationen aus zeitlichen Korrelationen, wogegen mit einer bayesschen Analyse der Photokinetik über den 3B-Algorithmus [110] die Filamente des Zytoskeletts zwar sehr definiert, aber nur teilweise erfasst werden. Dabei können Objekte mit verschiedenen Fluoreszenzdichten über deconSTORM [111] hervorgehoben werden, dessen Dekonvolution allerdings ringförmige Artefakte bewirkt. Eine Auflösungsverbesserung über lokalisationsbedingte Algorithmen lässt sich bei lebenden Organismen gewöhnlich nicht umsetzen, da ein entscheidender Kompromiss zwischen der Lokalisierung einzelner Moleküle, Phototoxizität und Zelldynamik eingegangen werden muss [47].

Letztendlich sollten die Rekonstruktionen über den SRRF-Algorithmus [44] mit höchstauflösenden Mikroskopiemethoden nach optischen Vorgehensweisen [10,91,92] verglichen werden. Im Zuge dessen dürfte eine strukturierte Beleuchtung [11] oder eine ISM [107] im Sinne des Airyscan-Prinzips [99] die zugänglichste Anwendbarkeit bei Lebendzellen bieten. Indessen findet die auflösungsverbesserte Darstellung über die SRRF-Methode zunehmend Anwendung in gegenwärtigen Veröffentlichungen [45, 48, 49], insbesondere wenn räumliche Informationen aus den reduzierten Beugungsprofilen der Radialitätsbilder mit Einzelmoleküleigenschaften aus Fluoreszenzkorrelationen verknüpft werden [48].

Unter Berücksichtigung des tubulär-strukturierten Bildrauschens und den zeitlichen Einschränkungen der SRRF-Bildgebung als auch den Oszillationen des ERs und den Bewegungen der ERES basieren die folgenden Untersuchungen auf Fluoreszenzaufnahmen konfokaler Spinning-Disk Lichtmikroskopie.

<sup>5</sup> Aus GUSTAFSSON et al. [44] übernommene Diskussion der SRRF-Bildgebung gegenüber anderen bildbasierten Algorithmen auflösungsverbesserter Rekonstruktionen.

# 4 Entschlüsselung physikalischer Hintergründe der Selbstorganisation von ER Exit Sites (ERES)

In diesem Kapitel wird die Selbstorganisation der ERES untersucht, indem die Auswirkungen biochemischer Veränderungen auf das Punktmuster der ERES bei Säugetierzellen analysiert werden. Die entscheidend an die Beschaffenheit des ERs geknüpfte Anordnung punktartiger und aggregierter ERES vermittelt, zusammen mit einer von lokaler Entmischung motivierten Modellbeschreibung, biophysikalische Erkenntnisse über die dynamische Selbstorganisation der ERES, deren biologische Mechanismen im derzeitigen Forschungsstand nicht eindeutig geklärt und auch umstritten sind.

# 4.1 Motivation: Dynamische Selbstorganisation der ERES

Bei allen bislang erfassten Eukaryonten sind ER Exit Sites (ERES) anzutreffen [112], wobei ihre Anzahl je nach Zelltyp von einem oder zwei bis zu mehreren hundert ERES variiert [112–114]. Im Zuge dessen stellen die ERES biochemisch funktionelle Membrandomänen des ERs dar, die auf den Austausch von Frachtmolekülen mit dem Golgi-Apparat spezialisiert sind [24, 25]. Hierzu bilden die ca. 400 nm großen ERES von Säugetierzellen mehrere mit den COPII-Proteinen besetzte Knospungsstellen [100, 115]. An den ERES ist eine Vielzahl spezifischer Proteine wechselseitig daran beteiligt, geeignete Transportstrukturen hervorzubringen und den Eintritt von Ladungsmolekülen mit anschließendem Export zu koordinieren [24,29]. Insbesondere fungiert das periphere Membranprotein Sec16 als ein vermeintliches Trägermolekül [112,116], das für die Ausbildung von ERES benötigt wird und über seine Interaktionen mit allen COPII-Komponenten zum Aufbau von Transportvesikeln entscheidend beiträgt als auch deren Umsatz reguliert [24, 117, 118]. Während die ERES-spezifischen Moleküle Residenzzeiten im Bereich weniger Sekunden an den ERES aufweisen und die COPII-Vesikel vorübergehende Transportstrukturen darstellen [26,119], sind die ERES hingegen langlebige und dynamische Membrandomänen des transitorischen ERs [114, 120], die auch den Organisationseinheiten früher Golgi-Membranen zugeordnet werden können [25,112].

Obwohl die COPII-Vesikelbildung an den ERES auf molekularer Ebene aufgeklärt werden konnte [26,27,121], ist die Entstehung und Regulation dieser spezialisierten Membrandomänen nur teilweise verstanden [112,122,123]. In dieser Hinsicht verfügen die ERES über Mechanismen, ihre Größe und Identität beizubehalten und ihr intrazelluläres Erscheinungsbild an interne wie externe Veränderungen anzupassen [24,25,124]. Zwar können ERES in Hefe- und Säugetierzellen miteinander fusionieren oder *de novo* entstehen, jedoch gleichen sich diese anschließend den weitgehend einheitlichen Eigenschaften der übrigen ERES an [125,126]. Daneben führt eine Überbeladung mit Frachtmolekülen kurzfristig zu weniger und vergrößerten ERES, während längerfristig mehr ERES mit einer normalen Größe in den Zellen gebildet werden [127]. Dabei können die ERES nicht nur ihre Durchmesser vergrößern, sondern auch ausgedehnte Transportstrukturen wie Exporttunnel [29] und Membrantubuli in Form einer perlenden Oberflächeninstabilität [30] ausbilden, die für größere Frachtmoleküle geeignet sind [28]. Hierbei werden die COPII-Komponenten durch das gegenseitige Zusammenwirken mit Tango1 an den etwa 50 nm schlanken Hälsen der ERES räumlich organisiert [30,115,128]. Die Phosphorylierung von Tango1 bedingt weiterhin einen Rückgang der ERES während der Zellteilung [129], der auch von strukturellen Umwandlungen des ERs begleitet ist [18,19,106].

### Dynamik der ERES und des tubulären ERs

Die intrazelluläre Organisation der ERES wird auch von ihrer Dynamik bestimmt. So erfahren die ERES eine indirekte Kopplung mit den Mikrotubuli, die von Bindungen der ERES-Membranen mit dem Dynein-Proteinkomplex p150 vermittelt wird [130,131]. Dies erlaubt einen Vesikeltransport. Zugleich tragen die Interaktionen von Kinesin mit den ERES und ihren Frachtmolekülen zum anterograden Transport der COPII-Vesikel sowie der räumlichen Anordnung von ERES in peripheren Zellregionen bei [130]. Daher sind die Bewegungen der ERES unter dem Knockdown dieser Motorproteine oder dem Abbau der Mikrotubuli verlangsamt [71,132]. Dazu bilden sich hunderte Fragmente des Golgi-Apparats unter der Einwirkung von Nocodazol, an denen die ERES aggregieren [114,133]. Die Bewegungen der ERES sind vom Aktin-Zytoskelett unabhängig [72,132].

Ebenso unterliegt das ER kontinuierlichen Veränderungen, die in Umstrukturierungen des tubulären ER-Netzwerks, anhaltende Oszillationen der Membranen und diffusiven Transport innerhalb des ER-Lumens untergliedert werden können [20,22]. Hierbei folgen die Oszillationen der ER-Tubuli und die Bewegungen der Verzweigungsstellen im Zeitbereich weniger Sekunden größtenteils einer starken Subdiffusion, die von der molekularen Gedrängtheit ("*Crowding"*) und Viskoelastizität des umgebenden Zytoplasmas verursacht sein könnte [70,94,134]. Gleichzeitig besitzen die ER-Membranen bewegliche Öffnungen und die Gesamtdynamik des ERs ist an seine Netzwerkeigenschaften geknüpft [94,95]. Die dynamische Organisation des ERs wird über zahlreiche Interaktionen mit dem Zytoskelett und den Organellstrukturen beeinflusst [35,37,93].

Diesbezüglich erläutern die vorangegangenen Veröffentlichungen [70, 71] die Bewegungen der ERES in Relation zur Dynamik des tubulären ERs. Somit bewegen sich die ERES mit einem Anomalieparameter  $\alpha_{\rm ERES} \simeq 0.6$  weniger subdiffusiv als die Verzweigungsstellen des ERs  $\alpha_{\rm ER} \simeq 0.5$  und verfügen über größere Transportkoeffizienten. Zusammen mit den stärker gerichteten Bewegungen der ERES verdeutlicht dies deren Beweglichkeit auf den ER-Membranen. Hierbei verlangsamt sich die Dynamik beider Strukturen unter der Auflösung der Mikrotubuli, wenngleich sich die relative Beweglichkeit der ERES zum ER erhöht. Daher ist die Subdiffusion auf unterschiedliche Weise mit dem Zytoskelett verbunden und diese ist zudem von der Umgebungstemperatur abhängig. Demzufolge kann die Dynamik der ERES [72], wie in Abb. 4.1a skizziert, mit einer eindimensionalen Diffusion auf einem Polymernetzwerk physikalisch erklärt und quantitativ abgebildet werden [71]. Im Zuge dessen werden die Bewegungen einer ER-Verzweigung [81] von der Dynamik eines Monomers in einer semiflexiblen Polymerkette wiedergegeben, die vom viskoelastischen Zytoplasma umgeben ist. Dadurch sind die kontinuierlichen Oszillationen des tubulären ER-Netzwerks langreichweitig gekoppelt, dessen Steifigkeit unter der Degradierung der stützenden Mikrotubuli verloren geht [70]. Gleichzeitig werden die Bewegungen der ERES über eine eindimensionale Diffusion auf dem ER beschrieben, indem diese zufallsgerichtet zwischen den Monomeren der Polymerkette springen. Die Gesamtdynamik der ERES wird hauptsächlich von den Sprungwahrscheinlichkeiten und weniger von der Biegesteifigkeit der ER-Filamente bestimmt [71].

# 4.2 Projektidee und Konzeption

Ausgehend von der Beweglichkeit der ERES auf den Membranen des ERs sowie der Modellvorstellung aus Abb. 4.1a eröffnet sich die Frage, ob die Verzweigungsstellen des ER-Netzwerks topologische Hindernisse für die Bewegungen der ERES darstellen und sie dadurch auf einen ER-Tubulus beschränken. Demnach ist es von grundlegender Bedeutung, mögliche Rückwirkungen zwischen den Eigenschaften des ERs und der ERES zu untersuchen. In dieser Hinsicht könnten strukturelle Veränderungen des ERs nicht nur die Dynamik sondern auch die räumliche Organisation der ERES beeinflussen. So ist es vorstellbar, dass die ERES Proteine untereinander austauschen und möglicherweise größere Verbünde auf ausgedehnten Membranbereichen ausbilden (siehe Abb. 4.1b). Dies ließe sich aus physikalischer Sicht als ein Entmischungsphänomen auffassen, dessen globales Erscheinungsbild von der Beschaffenheit des ERs gekennzeichnet ist. Daher könnte die gitterähnliche Anordnung punktartiger ERES aus Segregationen hervorgehen, deren Vergröberungen durch die tubuläre Gestalt des ERs unterdrückt werden.



Abb.4.1: Schematisches Bewegungsmodell mit Aggregationshypothese der ERES. (a) Auf Grundlage der vorangegangenen Veröffentlichungen [70,71] lässt sich die Dynamik der ERES durch eine eindimensionale Diffusion auf dem tubulären ER-Netzwerk, das zugleich langreichweitigen Oszillationen unterliegt, physikalisch abbilden. (b) Ausgehend von einer möglichen Einschränkung der ERES auf den ER-Tubuli, ist eine Aggregation der ERES im Sinne eines Entmischungsvorgangs auf ausgedehnten Membranbereichen des ERs denkbar.

Außerdem lassen mehrere Beobachtungen auf eine selbstorganisierte Musterbildung der ERES im Sinne der skizzierten Entmischungshypothese schließen. Zunächst vermitteln die vorangegangenen Publikationen [70,71] eine fundierte experimentelle wie theoretische Kenntnis der ERES-Dynamik in Relation zum ER. Insbesondere verdeutlicht der unterschiedliche Beitrag der Mikrotubuli zur Dynamik beider Strukturen die Beweglichkeit der ERES auf den ER-Membranen, die mit einer eindimensionalen Diffusion auf einer semiflexiblen Polymerkette abgebildet werden kann [71]. Daneben dokumentieren unveröffentlichte Zweikanalaufnahmen von Herrn Lorenz Stadler aus dem Peer-Review-Verfahren von [71] vereinzelte HeLa-Zellen, bei denen das fluoreszenzmarkierte ER flächendeckend ausgedehnt ist. Üblicherweise liegt bei diesen Zellen ein regelmäßig dispergiertes Muster von stärker aggregierten und weitgehend kreisförmigen ERES vor. Diese Beobachtung unterstützt zwar die Hypothese einer durch das tubuläre ER-Netzwerk unterdrückten Entmischung, kann diese jedoch nicht systematisch begründen.

Andererseits lässt sich die selbstorganisierte Musterbildung der ERES mit einem diffusionsbestimmten Entmischungmodell erklären, wenn attraktive Wechselwirkungen der ERES-Bestandteile angenommen werden [135]. Hierbei formen sich unter Verwendung physiologisch gestützter Modellparameter kreisförmige Proteindomänen, die sich selbstständig auf einer ausgedehnten Membran anordnen. Insbesondere sind diese Domänen im stationären Zustand nicht zufällig verteilt, sondern bilden eine quasikristalline Ordnung, die das dispergierte Muster der ERES quantitativ widerspiegelt. Allerdings vermittelt diese Modellierung Proteindomänen mit unterschiedlichen Größen, während die ERES weitgehend einheitliche Strukturen bilden. Demnach könnte das Entmischungsszenario von [135] eingehender bei Zellen mit flächigen Membranbereichen des ERs untersucht werden. Letztlich könnte eine Entmischungshypothese auch durch die bei Hefezellen beobachteten Fusionen der ERES mit *de novo* Entstehungen [125] begründet werden.

# Strukturelle Veränderungen des tubulären ERs: Autorenbeteiligung und Vorarbeiten

Deshalb sind geeignete Mechanismen erforderlich, mit denen die Beschaffenheit des tubulären ER-Netzwerks gezielt verändert werden kann. In dieser Hinsicht wird die Gestalt und Erhaltung des ERs maßgeblich von verschiedenen Proteinfamilien und deren Wechselbeziehungen bestimmt [21,101,103]. So werden die ER-Membranen über Atlastine verbunden, ER-Verzweigungsstellen mit Lunapark stabilisiert und Membrankrümmungen durch Retikulone begünstigt [19,20,102]. Vor diesem Hintergrund wird ein selektiver Gen-Knockdown durch eine RNA-Interferenz mit zellfremden siRNA-Molekülen bewirkt, für den eine Zunahme flächiger ER-Strukturen bei Säugetierzellen berichtet wird [102–104]. Weiterhin wird das tubuläre Erscheinungsbild des ERs durch verschiedene biochemische Eingriffe an den Lebendzellen verändert, als auch werden Verknüpfungen zwischen dem ER und dem Zytoskelett der Mikrotubuli untersucht. Hierzu konzipierte Herr Lorenz Stadler die technische Umsetzung zur Destabilisierung des tubulären ER-Netzwerks in Lebendzellen. Dieser entwickelte ein Anwendungsprotokoll der RNA-Interferenz von Lunapark und generierte erste Messungen der Zellexperimente sowie des Westernblots. Danach übernahm der Autor dieser Arbeit das Protokoll, führte alle Zellexperimente durch und erweiterte das Projekt um Schlüsselexperimente. Dieser entwickelte die Bildverarbeitungsroutine und wertete die Messungen aus. Alle Arbeitsvorgänge erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Weiß, der eine Modellbildung der beobachteten Phänomene entwickelte und analysierte. Die Ergebnisse wurden unter Beiteilung aller Autoren in SPECKNER et al. [136] veröffentlicht.

# 4.3 Material, Methoden und Auswertung

In den Experimenten werden fluoreszenzmarkierte HeLa-Zellen mit Aufnahmen konfokaler Spinning-Disk Lichtmikroskopie untersucht. Die Zellen exprimieren fluoreszierende Markierungsproteine bestimmter Zellbestandteile und unterliegen biochemischen Einflüssen zur gezielten Veränderung zellulärer Organellen und Molekülstrukturen. Informationen über die Kultivierung und biochemischen Behandlungen der Zellen oder der Bildgebung sind in Anhang A, B dargestellt. Die quantitative Analyse der Fluoreszenzaufnahmen mit zentralen Kenngrößen der ERES wird in Anhang D, E näher beschrieben.

### Lebendzellbildgebungsexperimente

In den Lebendzellexperimenten bei 37 °C werden Zweikanal-Serienaufnahmen aus 25 konfokalen Einzelbildern der Separationen von  $\Delta z = 0.1 \,\mu\text{m}$  mit einer Belichtungszeit von  $\Delta t = 0.5 \,\text{s}$  erstellt (siehe Anhang B). Dabei besteht ein Zeitversatz von 14.8 s zwischen den Detektionskanälen einer konfokalen Bildebene. Die ERES werden über die Fluoreszenz von Sec16-GFP [118] im grünen Kanal ( $\lambda_{\text{Anr.}} = 491 \,\text{nm}, \lambda_{\text{Det.}} = 500 - 550 \,\text{nm}$ ) abgebildet und in Kontrollexperimenten mit fluoreszenzgekoppelten COPII-Proteinen [119] gekennzeichnet. Im roten Bildkanal ( $\lambda_{\text{Anr.}} = 561 \,\text{nm}, \lambda_{\text{Det.}} = 575 - 625 \,\text{nm}$ ) werden das über KDEL-RFP [137] markierte ER oder fluoreszente siRNA-Moleküle kovisualisiert. Weitere Bildgebungsexperimente veranschaulichen die Gestalt verschiedener Zellorganellen in Hinblick auf die Struktur des ERs und der Zytoskelettfilamente. Dazu werden spezifische Markierungsproteine des ERs, der Mitochondrien oder des Golgi-Apparats als auch der Aktinfilamente und Mikrotubuli genutzt (siehe Tab. A.1).

# Biochemische Veränderungen der Kulturzellen

Die biochemischen Veränderungen der transfizierten HeLa-Zellen umfassen die Behandlung mit Nocodazol, Filipin und hypotonischem Medium sowie einen Gen-Knockdown über eine RNA-Interferenz (siehe Anhang A.5). Unter der Einwirkung von Nocodazol werden die Mikrotubuli aufgelöst und ihr Wachstum unterbunden [71]. Mit Filipin wird das ER zu hunderten Fragmente degradiert [138]. Unter dem Einfluss eines wässrigen Kulturmediums wandelt sich die Gestalt vieler membrangebundener Zellorganellen und mikrometergroße intrazelluläre Vesikel formen sich [39]. Über eine RNA-Interferenz mit zellfremder siRNA wird die Aktivität des Lunapark-Gens gehemmt, dessen Proteine Verzweigungsstellen des ERs stabilisieren [102]. Der Gen-Knockdown wird über einen Westernblot nachgewiesen.

## Quantitative Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen

Anhand der konfokalen Fluoreszenzaufnahmen werden strukturelle Eigenschaften der ERES und weiterer Zellbestandteile quantitativ untersucht (siehe Anhang D.1). Hierzu wird eine Routine entwickelt und angewandt, die auf der Software für maschinelles Lernen Ilastik [139] und eigenen Matlab-Skripten [140] basiert. Als Schnittstelle beider Programme dient ImageJ-Fiji [141]. Somit können charakteristische Kenngrößen der ERES, wie z.B. deren Größe, Form und Fluoreszenz quantitativ und in Bezug zu den biochemischen Veränderungen erfasst werden (siehe Anhang E). Über die Fläche der ERES (Schwellwert  $A_{\rm ERES} = 0.5 \,\mu m^2$ ) wird zwischen ERES-Singletts ( $A_{\rm ERES, Sing.} \leq 0.5 \,\mu m^2$ ) und ERES-Clustern ( $A_{\rm ERES, Clust.} > 0.5 \,\mu m^2$ ) unterschieden, wobei dichte Aggregationen der ERES mit hoher Fluoreszenz in der Region des Golgi-Apparats nicht berücksichtigt werden (siehe Abb. D.1). Alle Größen werden als Mittelwert mit Standardabweichung über die Ensemble von etwa 50 Zellen angegeben und statistische Signifikanzen (Kennzeichnung (\*)) mit geeigneten Hypothesentests zum Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$  beurteilt (siehe Anhang D.3).

# 4.4 Charakterisierung der Musterbildung von ERES

In den folgenden Abschnitten wird die selbstorganisierte Musterbildung der ERES im Hinblick auf die Beschaffenheit des ERs untersucht. Zunächst wird die Struktur des ERs und ERES-Musters über Konfokalaufnahmen fluoreszenzmarkierter HeLa-Zellen in diesem Abschnitt erläutert. In den Abschnitten 4.5–4.8 werden Veränderungen des ERES-Musters unter biochemischen Behandlungen der Kulturzellen analysiert. In Abschnitt 4.9 werden verschiedene Eigenschaften der ERES gegenübergestellt, die in Anhang E detaillierter zusammengefasst sind. Eine Modellerklärung über physikalische Hintergründe der Selbstorganisation von ERES wird in Abschnitt 4.10 erläutert.

### 4.4.1 Qualitative Darstellung über konfokale Fluoreszenzaufnahmen

Eine repräsentative Konfokalaufnahme des ERs und der ERES wird in Abb. 4.2a dargestellt. Somit bildet das mit KDEL-RFP markierte ER ein kontinuierliches Membrannetzwerk, das sich über die HeLa-Zellen erstreckt. Dieses besteht in den peripheren Gebieten des glatten ERs aus einem überwiegend planar verzweigten Netzwerk untereinander verbundener ER-Tubuli, in das flächigere Gefüge<sup>6</sup> eingegliedert sind. In den

<sup>6</sup> Die Bezeichnung eines Gefüges [94] soll auf gedrängte Anordnungen von ER-Tubuli und weitere Mikrostrukturen hinweisen, die mit höchstauflösender Mikroskopie erkennbar werden (siehe z.B. [93–95]).

Gebieten des rauen ERs existieren zumeist stärker gedrängte, aus tubulären und flächigen Gefügen gebildete Strukturen des ERs, die in den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen als ausgedehnte ER-Membranen abgebildet werden. Die Regionen in der Umgebung der Kernhülle und des Golgi-Apparats sind stärker dreidimensional verzweigt (siehe Teilbild mit  $\Delta z = 1 \,\mu$ m). Dabei ist der zytoplasmische Hintergrund von KDEL-RFP gegenüber der Fluoreszenz des ER-Lumens vernachlässigbar (siehe Abb. 4.2b). Diese Phänotypen der unbehandelten HeLa-Zellen werden gleichartig mit anderen Markierungsproteinen des ERs (CRT-GFP bzw. CNX-GFP) wiedergegeben und die Fluoreszenz der ER-Membranen und des ER-Lumens kolokalisiert ununterscheidbar bei den Konfokalaufnahmen (siehe Abb. 4.8a). Demnach stimmen die experimentellen Zellphänotypen mit der bekannten Gestalt des ERs von Säugetierzellen überein [18, 19, 23].

Zugleich existiert ein ausgeprägtes Lokalisationsmuster von Sec16-GFP mit hunderten punktförmigen Ansammlungen gegenüber einer weitgehend gleichmäßigen Hintergrundfluoreszenz (siehe Abb. 4.2a). Die ERES sind über das gesamte ER gitterförmig dispergiert und werden in den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen als weitgehend beugungsbegrenzte Strukturen abgebildet, welche etwa 1 µm voneinander entfernt sind (siehe Abb. 4.2b,c). Hierbei akkumulieren einzelne ERES in den verzweigten Gefügen des rauen ERs nahe des Golgi-Apparats, der als ein Bereich mit erhöhter Fluoreszenz von Sec16-GFP hervorsticht. Insgesamt deckt sich die gitterförmige Anordnung von Sec16-GFP mit den in der Literatur dargestellten Phänotypen der ERES von Säugetierzellen [114,117,142]. Zudem ist das Punktmuster der ERES während der experimentellen Zeiträume unverändert und es bleibt in verschiedenen Phasen des Zellzyklus erhalten [72]. Die ERES unterliegen kontinuierlichen Bewegungen auf den Membranen des dynamischen ER-Netzwerks im Zeitbereich weniger Sekunden [70,71].

In diesem Kontext ist das periphere ER-Membranprotein Sec16 als Markierungsprotein und wesentlicher Bestandteil der ERES anerkannt, da es über seine Interaktionen mit den COPII-Komponenten zur Organisation und Regulation der ERES beiträgt und der Export von COPII-Vesikeln in lebenden Zellen auch Sec16 voraussetzt [24,27]. Daneben werden vergleichbare Zellphänotypen mit einem punktartigen Muster der ERES festgestellt (siehe Abb. 4.2d), wenn spezifische Proteine der COPII-Vesikel fluoreszent markiert werden [26,121]. Dies umfasst Konfokalaufnahmen der inneren COPII-Vesikelhülle über die Fluoreszenz von Sec23-Sec24 Heterodimeren (YFP-Sec23A bzw. YFP-Sec24D) sowie der äußeren Vesikelhülle von Sec13-Sec31 Heterotetrameren (YFP-Sec31A).

# 4.4.2 Quantitative Untersuchung des ERES-Musters

Ausgehend von den konfokalen Aufnahmen werden die ERES über die Fluoreszenz von Sec16-GFP in der zentralen Bildebene segmentiert und strukturelle Eigenschaften der ERES und ihres Punktmusters untersucht. In den Zellen existieren ca. 750 ERES mit einer mittleren Fläche  $\langle A_{\text{ERES}} \rangle = (0.11 \pm 0.03) \,\mu\text{m}^2$  im Bereich des optischen Auflösungs-



Abb. 4.2: Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unbehandelter Zellen. (a) Bei den Konfokalaufnahmen bildet das ER (KDEL-RFP) ein kontinuierliches Netzwerk von verzweigten ER-Tubuli und dichter gedrängten Gefügen. Die ERES sind als punktförmige Ansammlungen von Sec16-GFP gitterartig über das ER dispergiert und akkumulieren nahe des Golgi-Apparats (Teilbild  $\Delta z = 1 \,\mu$ m). Die ERES und das ER werden (b) als beugungsbegrenzte Strukturen gegenüber der Hintergrundfluoreszenz abgebildet, deren (c) Abstände zwischen benachbarten ERES oder ER-Knotenpunkten [81] mit 0.5 – 2  $\mu$ m vergleichbar sind. (d) Gleichartige Zellphänotypen bestehen unter Markierungen mit COPII-Mantelproteinen.

vermögens. Somit befinden sich etwa zwei ERES innerhalb eines Quadratmikrometers,  $\tilde{N}_{\text{ERES}} = (0.45 \pm 0.09) \,\mu\text{m}^{-2}$  und diese nehmen  $(5 \pm 1) \,\%$  der Zellfläche ein. Nur ca. 2% aller ERES werden größeren Clustern  $\langle A_{\text{ERES, Clust.}} \rangle = (0.66 \pm 0.06) \,\mu\text{m}^2$  zugeordnet, wobei die 50 – 100 Objektverbünde der ERES in der Region des Golgi-Apparats nicht berücksichtigt werden können. Die ERES sind mit einem mittleren Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}} \rangle = 0.79 \pm 0.02$  und einer Sphärizität  $\langle \mathcal{S}_{\text{ERES}} \rangle = 0.91 \pm 0.01$  nahezu kreisförmig, wenngleich größere ERES-Cluster stärker asymmetrisch sind. Wie in Abb. 4.2c dargestellt, sind geringe Entfernungen zwischen benachbarten ERES  $d_{\text{ERES}} \lesssim 0.5 \,\mu\text{m}$  infolge ihrer gitterförmigen Anordnung unterdrückt. Da die Distanz  $\langle d_{\text{ERES}} \rangle = (0.86 \pm 0.08) \,\mu\text{m}$  zur Segmentlänge des peripheren ERs  $\langle l_{\text{ER}} \rangle = (0.93 \pm 0.09) \,\mu\text{m}$  [81] vergleichbar ist (siehe auch Kapitel 3.2.3), befindet sich durchschnittlich etwa ein ERES auf einem ER-Tubulus.

Die Fluoreszenz von Sec16-GFP lokalisiert verstärkt an den ERES. So untergliedert sich der relative Fluoreszenzbeitrag zu  $(45 \pm 10)$ % auf ERES-Singletts, zu  $(10 \pm 7)$ % auf ERES-Cluster und dem übrigen Anteil auf ERES der Golgi-Region. ERES-Cluster

sind etwa eineinhalbfach heller, deren Gesamtfluoreszenz aufgrund ihrer Größe zehnfach gegenüber den ERES-Singletts erhöht ist. Dabei verfügen ERES in der Golgi-Region über vergleichbare Intensitäten. Allerdings ist die Fluoreszenz des peripheren Membranproteins Sec16-GFP auch im Zytoplasma ausgeprägt. Daher wird nur  $(30 \pm 5)$ % der Fluoreszenz den segmentierten ERES zugeordnet. Jedoch sind die Intensitäten von Sec16-GFP in den ca. 5% der Zellfläche umfassenden ERES etwa zehnfach gegenüber dem Zytoplasma erhöht, wobei  $(15 \pm 9)$ % der Fluoreszenz von Sec16-GFP explizit dem zytoplasmischen Hintergrund zugewiesen wird. Im Zuge dessen kann die verbliebene Fluoreszenz aufgrund der dichten Aggregationen nahe des Golgi-Apparats und der beugungsbegrenzten Aufweitung an den Rändern der ERES nicht kategorisiert werden.

### Beurteilung des ERES-Musters verschiedener Zellen, Bildebenen und Zeitpunkte

Diese Merkmale des intrazellulären ERES-Musters werden unter verschiedenen Gesichtspunkten bestätigt. So verschiebt sich der relative Anteil punktartiger Singletts gleichmäßig für alle Messbedingungen bei einem Schwellwert zwischen  $A_{\rm ERES} = 0.3 - 0.7 \,\mu m^2$ . Die Charakteristika der ERES sind daher vom gewählten Schwellwert unabhängig und werden überwiegend von den punktartigen ERES-Singletts vorgegeben. Daneben sind die Unterschiede von etwa 20% in den Fluoreszenzeigenschaften von Sec16-GFP zwischen den Bildebenen einer Zelle geringer als die Variationen innerhalb des Zellensembles. Diesbezüglich erscheint das Lokalisationsmuster der ERES gleichartig zwischen transfizierten Zellen, die Sec16-GFP [118] oder andere COPII-Mantelproteine [119, 120] exprimieren.

Insgesamt wird mit den entsprechenden Gesamtensemble von etwa 50 Zellen angestrebt, die experimentellen Variationen zwischen den Phänotypen und Expressionsniveaus der mit Sec16-GFP [118] markierten HeLa-Zellen repräsentativ wiederzugeben. Nachdem die mittleren Zellflächen  $\langle A_{\text{Zelle}} \rangle = 1500 - 1700 \,\mu\text{m}^2$  zwischen den unbehandelten Zellen und allen weiteren Messbedingungen statistisch übereinstimmen, können absolute sowie relative Eigenschaften der ERES und ihrer Anordnungen verglichen werden. Während der Experimente werden, wie auch in [72] aufgeführt, keine zeitabhängigen Veränderungen des ERES-Musters auf der Zellebene festgestellt.

# 4.5 Musterbildung der ERES unter Nocodazol

Unter der Einwirkung von Nocodazol werden die Mikrotubuli bei lebenden Zellen abgebaut. Dies ermöglicht es, Assoziationen zwischen dem Zytoskelett und der tubulären Beschaffenheit des ERs sowie des punktartigen ERES-Musters zu untersuchen [21,114,133].

# Qualitative Darstellung über Fluoreszenzaufnahmen

Wie mit den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 4.3a dargestellt ist, wird das ER der mit Nocodazol behandelten Zellen als ein kontinuierliches Membransystem abgebildet,



#### 4.5 Musterbildung der ERES unter Nocodazol

Abb. 4.3: Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unter Nocodazol. (a) Unter der Auflösung der Mikrotubuli durch Nocodazol existiert weiterhin ein gitterartiges Punktmuster der ERES (Sec16-GFP) auf dem ER (KDEL-RFP), dessen Struktur in den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen als verzweigtes Netzwerk zunehmend flächiger Gefüge abgebildet wird. Bei einer (b) unveränderten Fluoreszenzverteilung von Sec16-GFP verringert sich (c) die Anzahl aller kategorisierten ERES um ca. 40 % und somit verstärkt sich (d) die Fluoreszenz der ERES, unabhängig von ihrer Länge signifikant.

ohne eine erhöhte Hintergrundfluoreszenz von KDEL-RFP aufzuweisen. Dabei besteht das ER aus einem verzweigten Netzwerk zunehmend flächiger Gefüge, dessen tubuläre Beschaffenheit des glatten ERs sich unter der Auflösung der Mikrotubuli merklich verringert. Die stärker gedrängten Gefüge des rauen ERs mit ihren hochverzweigten Strukturen in der Umgebung der Kernhülle wirken unverändert. Insgesamt stimmt das Erscheinungsbild des ERs visuell mit den Zellphänotypen aus [72,105,106] überein.

Das Lokalisationsmuster von Sec16-GFP unterscheidet sich nicht von den unbehandelten Zellen. So werden die ERES als punktartige und beugungsbegrenzte Ansammlungen von Sec16-GFP abgebildet, die in einer gitterartigen Anordnung über die Membranen des ERs dispergiert sind. In den Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen existieren etwa 450 ERES mit einer verstärkten Akkumulation im Bereich des rauen ERs nahe des Golgi-Apparats. Hierbei besteht eine annähernd gleichmäßige Hintergrundfluoreszenz von Sec16-GFP im Zytoplasma, die den unbehandelten Zellen gleichkommt. Ein unter der Einwirkung von Nocodazol beständiges Punktmuster der ERES deckt sich mit den Arbeiten [114,130].

#### Quantitative Untersuchung des ERES-Musters

Mit der Auflösung des Mikrotubuli-Zytoskeletts unter dem Einfluss von Nocodazol bleibt die Fluoreszenz von Sec16-GFP in den HeLa-Zellen unverändert (siehe Abb. 4.3b). Somit stimmt die Gesamtfluoreszenz einer Bildebene oder der Maximumsprojektion über alle konfokalen Ebenen innerhalb von  $(5 \pm 3)$ % mit den unbehandelten Kulturzellen überein. Weiterhin ist die absolute Fluoreszenz von Sec16-GFP sowie deren relativer Beitrag für alle Kategorisierungen der ERES erhalten (siehe Abb. 4.3b).

Hingegen verringert sich die Anzahl und Flächendichte der ERES um etwa 40 % (siehe Abb. 4.3c). Diese Reduktion umfasst die ERES aller Klassifizierungen gleichermaßen. Daher vergrößern sich die Entfernungen benachbarter ERES in ihrer gitterförmigen Anordnung  $\langle d_{\text{ERES}} \rangle = (1.02 \pm 0.10) \,\mu\text{m}$ . Hierbei decken sich die mittleren Flächen der ERES  $\langle A_{\text{ERES}} \rangle = (0.11 \pm 0.02) \,\mu\text{m}^2$  bzw.  $\langle A_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle = (0.67 \pm 0.10) \,\mu\text{m}^2$  als auch die Häufigkeitsverteilungen  $p(A_{\text{ERES}})$  mit den unbehandelten HeLa-Zellen.

Demnach erhöht sich die Fluoreszenz von Sec16-GFP innerhalb der ERES, deren Helligkeiten sich um etwa 60 % signifikant vergrößern (siehe Abb. 4.3d). Dieser Anstieg betrifft ERES aller Klassifizierungen gleichermaßen und ist von ihren Flächen unabhängig. Dabei ist die mittlere Fluoreszenz von Sec16-GFP im Zytoplasma etwas, jedoch nicht signifikant, verstärkt. Die Sphärizität aller ERES vergrößert sich zu  $\langle S_{\text{ERES}} \rangle = 0.93 \pm 0.02$ . Eine Zunahme der Sphärizität wird für ERES aller Größen festgestellt. Insbesondere nehmen ERES-Cluster mit einer Veränderung  $\Delta \langle S_{\text{ERES}}, \text{Clust.} \rangle = 0.07 \pm 0.08$  eine rundere Gestalt an. Hypothesentests bewerten die Mittelwerte bzw. Mediane von S mit  $\alpha < 0.01$  als signifikant verschieden gegenüber den unbehandelten Zellen.

# Potentielle Hinweise eines Aggregationsvorgangs

Demzufolge ist das gitterartige Punktmuster der ERES auf den ER-Membranen erhalten, wobei sich die Anzahl der ERES unter der Auflösung der Mikrotubuli verringert. Im Zuge dessen könnte die erhöhte Fluoreszenz zusammen mit einer größeren Sphärizität der ERES als eine verstärkte Kondensation des peripheren Membranproteins Sec16-GFP im Sinne der in Abb. 4.1b skizzierten Aggregation aufgefasst werden, die mit einem Rückgang des tubulären ER-Netzwerks bei den Konfokalaufnahmen einhergeht. Daneben wäre es denkbar, dass sich mit dem Wegfall der strukturgebenden Mikrotubuli auch die Oberflächenspannung der ER-Membran verringert und benachbarte ERES zu einem beugungslimitierten Objekt vereinigt werden. Ein möglicher Spannungsverlust wird auch vom fortschreitenden Zusammenfall des ERs unter der experimentellen Einwirkung von Nocodazol bekräftigt, bevor die Zellen nach ca. 2 h meist in Apoptose übergegangen sind. Längerfristige Veränderungen der ER-Gestalt erfordern daher andere Vorgehen.

# 4.6 Musterbildung der ERES unter RNA-Interferenz von Lunapark

Die Gestalt und Erhaltung des tubulären ER-Netzwerks wird von verschiedenen Proteinfamilien und deren Wechselbeziehungen maßgeblich bestimmt [21, 103]. So sind Atlastine für Bildung und Fusion der ER-Membranen erforderlich und Retikulone induzieren und stabilisieren Membrankrümmungen [20, 101]. Insbesondere wird die tubuläre Gestalt des ERs von Lunapark-Proteinen geprägt, indem diese an den ER-Verzweigungsstellen lokalisieren und sie stabilisieren [102, 143]. Daher sind ER-Verzweigungen ohne Lunapark dynamischer und unterliegen häufigeren Strukturwandlungen [102]. Im Folgenden werden Zusammenhänge zwischen der Beschaffenheit des tubulären ERs und des ERES-Musters untersucht, indem die Aktivität des Lunapark-Gens über RNA-Interferenz gehemmt wird.

### 4.6.1 Analyse des Gen-Knockdowns von Lunapark

Zunächst wird der Gen-Knockdown in den menschlichen Kulturzellen nachgewiesen. Dazu werden die zellfremden siRNA-Moleküle innerhalb der HeLa-Zellen visualisiert und der Knockdown von Lunapark-Proteinen anhand eines Westernblots bestimmt.

# Bildgebungsexperimente der siRNA

Die verwendete siRNA (siehe Anhang A.5.7) verfügt über eine Markierung mit einem Alexa-Fluorophor 633. Sie kann somit sehr gut in Epifluoreszenz ( $\lambda_{\text{Det.}} = 605 - 685 \text{ nm}$ ) und nur bedingt mit konfokaler Mikroskopie ( $\lambda_{\text{Det.}} = 575 - 625 \text{ nm}$ ) abgebildet werden. In den Experimenten werden die fluoreszenten siRNA-Moleküle der RNA-Interferenz von Lunapark oder der Negativkontrolle für nahezu 100 % der HeLa-Zellen nachgewiesen, die als Agglomerationen fluoreszenter Sphären in den Regionen nahe der Kernhülle und des Golgi-Apparats lokalisieren (siehe Abb. A.2). Im Zuge dessen werden vermehrt Zellen ohne eine erkennbare Fluoreszenz der siRNA-Moleküle registriert, wenn die Behandlungsdauer der RNA-Interferenz von 48 h auf 72 h erhöht wird.

#### Proteinmengenbestimmung über einen Westernblot

Die Gesamtmenge der Lunapark-Proteine in den Zellen kann über eine Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot bestimmt werden (siehe Anhang A.6). Hierzu werden die Zellen lysiert, deren Proteine massenabhängig getrennt und mit Antikörpern spezifisch gefärbt. Die Chemilumineszenzaufnahme des Westernblots ist in Abb. 4.4 für unbehandelte Kontrollzellen und Zellen der RNA-Interferenz von Lunapark nach 24 h bzw. 48 h dargestellt. Somit verringert sich die Helligkeit der Proteinbanden von Lunapark (ca. 50 kDa) stark unter der RNA-Interferenz. Die Intensitäten werden zu  $I_{\text{LNP},24\,\text{h}} = 0.66 I_{\text{unbeh},24\,\text{h}}$  und  $I_{\text{LNP},48\,\text{h}} = 0.46 I_{\text{unbeh},48\,\text{h}}$  bestimmt (siehe Anhang A.6). Werden zusätzlich die unterschiedlichen Proteinbeladungen über die Chemilumineszenz der GAPDH-Kontrollbanden berücksichtigt, berechnet sich die insgesamte Reduktion  $R_{\text{LNP}} = I_{\text{LNP}}/I_{\text{GAPDH}} - 1$  der Lunapark-Proteine zu  $R_{\text{LNP},24\,\text{h}} = -45\%$  bzw.  $R_{\text{LNP},48\,\text{h}} = -66\%$ . Die ungleichmäßigen



Abb. 4.4: Nachweis des Gen-Knockdowns von Lunapark über einen Westernblot. (a) Die verringerten Helligkeiten der Lunapark-Proteinbanden bei ca. 50 kDa veranschaulichen den Gen-Knockdown durch die RNA-Interferenz. (b) Aus den Intensitätsverhältnissen wird die Reduktion  $R_{\rm LNP} = I_{\rm LNP}/I_{\rm GAPDH} - 1$  der Lunapark-Proteine in den HeLa-Zellen zu  $R_{\rm LNP,24\,h} = -45\%$  bzw.  $R_{\rm LNP,48\,h} = -66\%$  bestimmt (siehe Anhang A.6 für Details).

Intensitäten der Kontrollbanden von Histon 3-Proteinen werden nicht berücksichtigt. Zusammenfassend besteht daher ein sichtlicher Gen-Knockdown von Lunapark in den HeLa-Zellen 48 h nach der Transfektion mit der siRNA. Weitere Zellexperimente von Herrn Lorenz Stadler [72] dokumentieren eine geringfügig verstärkte Reduktion von Lunapark bei einer Behandlungsdauer von 72 h. Diese ist jedoch mit einer erhöhten Zahl geschädigter oder siRNA-freier Zellen verbunden [72].

#### 4.6.2 Qualitative Darstellung über konfokale Fluoreszenzaufnahmen

Mit der Gewissheit über den erfolgreichen Knockdown der Lunapark-Proteine bei den HeLa-Zellen werden die Phänotypen des ERs und der ERES charakterisiert. Eine Referenz bilden Kulturzellen mit einer Negativkontrolle der RNA-Interferenz. Eine Negativkontrolle beinhaltet nicht-zielgerichtete siRNA-Moleküle, um unspezifische Nebenwirkungen der RNA-Interferenz an den Zellen wiederzugeben [144].

### ER-Phänotypen unter der RNA-Interferenz von Lunapark

Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen dokumentieren eine veränderte Struktur des mit KDEL-RFP markierten ERs unter der RNA-Interferenz von Lunapark (siehe Abb. 4.5). So verringert sich die tubuläre Beschaffenheit des ERs in allen konfokalen Bildebenen merklich. Wie in Abb. 4.5a dargestellt ist, formen sich in den meisten Zellen überwiegend flächig ausgedehnte ER-Strukturen. Diese umfassen Bereiche des rauen sowie des glatten ERs. Bemerkenswerterweise ist das ER-Lumen für etwa 20 % dieser Zellen flächendeckend über die gesamte Zelle ausgedehnt und das Netzwerk der Mitochondrien äußert sich über fluoreszenzfreie Bereiche von KDEL-RFP (siehe Abb. 4.5c). Üblicherweise variiert die Gestalt des ERs unter der RNA-Interferenz von Lunapark zwischen den Phänotypen aus Abb. 4.5a bzw. Abb. 4.5b,c, die etwa zwei Drittel aller Zellen charakterisieren. Mit etwa 15% wird ein vorwiegend tubuläres Erscheinungsbild des ERs nur seltener unter dem Knockdown der Lunapark-Proteine registriert. Daneben kommen die Phänotypen der Negativkontrolle mit einem verzweigten Netzwerk des tubulären ERs und flächigeren Regionen nahe der Kernhülle (siehe Abb. 4.5d) den unbehandelten Zellen gleich.

In der vergleichenden Literatur werden ähnliche Phänotypen von Säugetier-Kulturzellen mit einem verstärkt flächig ausgedehntem ER unter der RNA-Interferenz von Lunapark berichtet [102–104]. Diese Phänotypen werden für Markierungen des ER-Lumens oder der ER-Membranen als auch verschiedenen Sequenzen von siRNA-Molekülen zum Knockdown des Lunapark-Gens nachgewiesen [102, 103]. Im Zuge dessen erhöht sich die Häufigkeit mit einer vorwiegend flächigen Beschaffenheit des ERs zu 50 - 80%, gegenüber ca. 20%der unbehandelten Kulturzellen [102, 103]. Dennoch kann die Entstehung eines tubulären ER-Netzwerks in peripheren Gebieten, auch unter einem vollständigen Gen-Knockout von Lunapark über CRISPR, nicht bei allen Zellen unterdrückt werden [103]. Andererseits können sich die Durchmesser der ER-Tubuli unter einer starken Überexpression von Lunapark auf über 0.5 µm ausdehnen [103, 104]. Letztlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die flächigen ER-Bereiche unter dem Knockdown der Lunapark-Proteine über weitere Mikrostrukturen, wie etwa dicht gedrängte Gefüge der ER-Tubuli [94] oder über bewegliche Membranöffnungen unterhalb des konfokalen Auflösungsvermögens [95], verfügen (siehe auch SRRF-Bildgebung der Zellphänotypen in Abschnitt 3.2.4).

#### ERES-Phänotypen unter der RNA-Interferenz von Lunapark

Dabei verändern sich die Phänotypen der ERES unter der RNA-Interferenz von Lunapark (siehe Abb. 4.5 für repräsentative Konfokalaufnahmen). Wie in Abb. 4.5a dargestellt, bilden sich für etwa zwei Drittel der HeLa-Zellen circa 100 vorwiegend statische Aggregationen mit einer hohen Fluoreszenz von Sec16-GFP, welche über die flächig ausgedehnten ER-Strukturen verteilt sind. Diese etwa  $1 - 2 \mu m$  voneinander entfernten Aggregationen von Sec16-GFP lokalisieren vermehrt im Bereich des rauen ERs und sind gelegentlich ringförmig um den Zellkern angeordnet (siehe Abb. D.1b). Die Aggregationen verfügen über ein annähernd sphärisches Erscheinungsbild und schließen mit einer gewöhnlichen Ausdehnung von etwa einem Mikrometer mehrere konfokale Bildebenen ein. Dazwischen befindet sich, insbesondere in der unteren Zellhälfte, ein dispergiertes Punktmuster mit beugungsbegrenzten Ansammlungen von Sec16-GFP. In der Zellperipherie existieren größtenteils punktartige ERES mit unregelmäßig verteilten, größeren Aggregationen.

Üblicherweise spiegelt sich das Lokalisationsmuster der ERES zwischen den in Abb. 4.5a bzw. Abb. 4.5b,c dargestellten Phänotypen der HeLa-Zellen wider. Demnach variiert dessen Beschaffenheit zwischen einem dispergierten Muster von etwa  $1 - 2 \mu m^2$  großen Aggregationen und dichteren Ansammlungen von stärker elongierten Strukturen, die bis zu  $5 \mu m^2$  einnehmen können (siehe Abb. 4.5a). Diesbezüglich korreliert ein regelmäßig



Abb. 4.5: Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unter RNA-Interferenz. (a) Unter der RNA-Interferenz von Lunapark verringert sich die tubuläre Beschaffenheit des ERs (KDEL-RFP) und es formen sich ausgedehnte bis flächendeckende ER-Strukturen. Dabei besteht ein dispergiertes Muster der ERES mit sphärischen bis stärker elongierten Aggregationen von Sec16-GFP der typischen Flächen von ca.  $1-2 \mu m^2$ . (b, c) Vergleichbare Phänotypen des ERES-Musters werden bei Markierungen mit Sec31-YFP nachgewiesen. (d) Die Negativ-kontrollen der RNA-Interferenz entsprechen mit einem gitterartigen Punktmuster der ERES und einem vorwiegend tubulären ER-Netzwerk den unbehandelten HeLa-Zellen.

dispergiertes Muster der ERES-Aggregationen tendenziell zu den Zellphänotypen mit einem flächendeckend ausgedehnten ER (siehe Abb. 4.5c). Demgegenüber entsprechen die Phänotypen der Negativkontrolle mit einigen hundert gitterartig auf dem tubulären ER verteilten ERES den unbehandelten Zellen (siehe Abb. 4.5d). Somit werden die ERES in der überwiegenden Mehrheit der Kontrollzellen als punktartige und beugungsbegrenzte Ansammlungen von Sec16-GFP abgebildet, die vorrangig in der Umgebung des Golgi-Apparats lokalisieren. Hingegen werden Phänotypen mit punktförmigen ERES nur für etwa 20 % aller Zellen unter dem Knockdown der Lunapark-Proteine nachgewiesen. Eher ungewöhnlich sind die verbliebenen ca. 15 % von Zellphänotypen der RNA-Interferenz von Lunapark. So ist die Expression von Sec16-GFP häufig erhöht und das ER formt ungewöhnliche Strukturen, an die sich Aggregationen von Sec16-GFP angliedern. Parallel dazu werden, wie in Abb. 4.5b,c veranschaulicht, gleichartige Phänotypen des ERES-Musters bei der Markierung mit dem Mantelprotein YFP-Sec31A festgestellt. Dies beinhaltet weitere Experimente mit den COPII-spezifischen Proteinen YFP-Sec23A und YFP-Sec24D. Für alle Markierungsproteine lokalisiert die Fluoreszenz der ERES vorwiegend etwas neben den flächig ausgedehnten Strukturen des ERs. Daher besteht eine Kolokalisation zwischen KDEL-RFP und den COPII-Komponenten häufig nur an den Ansätzen der aggregierten ERES (siehe Abb. 4.5a,b). Bei den Zellen der RNA-Interferenz von Lunapark wird keine Fragmentierung des Golgi-Apparats beobachtet. Demnach zeigen sich bei ARF1-GFP markierten Zellen leicht gebogene und gestapelte Anreihungen von Golgi-Membranen, die nur an einer Stelle an die Kernhülle angelagert sind. Hierbei formen die Mitochondrien ein stark mit den ER-Tubuli verwobenes Netzwerk, das vergleichbar zu den unbehandelten Zellen erscheint. Die Struktur des Zytoskeletts, mit einer ausgeprägten Fluoreszenz von Aktin-GFP an den zytoplasmischen Stressfasern und dem Zellkortex als auch vielen dicht geordneten Mikrotubuli, bei einer moderaten Hintergrundfluoreszenz von fluoreszenzgekoppeltem  $\alpha$ -Tubulin, wirkt unverändert.

# 4.6.3 Quantitative Untersuchung der ERES-Aggregationen

Mit den segmentierten Konfokalaufnahmen von Sec16-GFP (siehe Abb. D.1) können die Veränderungen unter der RNA-Interferenz von Lunapark quantitativ erfasst werden. Bei den 48 Zellen verringert sich die Anzahl aller ERES um ca. 60 % auf  $N_{\text{ERES}} = 300 \pm 150$ , was größere Abstände  $\langle d_{\text{ERES}} \rangle = (1.3 \pm 0.2) \,\mu\text{m}$  bedingt. Insbesondere steigt der relative Anteil der ERES-Cluster auf  $(24 \pm 8)$  %, deren Flächen  $\langle A_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle = (2.2 \pm 1.0) \,\mu\text{m}^2$ sich verdreifachen. Dadurch weicht die asymmetrische Häufigkeitsverteilung  $p(A_{\text{ERES}})$ systematisch von der logarithmischen Normalverteilung der unbehandelten Zellen als auch der Negativkontrolle ab (siehe Abb. 4.6a). Infolge der verstärkten Aggregationen der ERES vergrößert sich die mittlere Fläche  $\langle A_{\text{ERES}} \rangle = (0.65 \pm 0.36) \,\mu\text{m}^2$  und die Gesamtfläche aller segmentierten ERES verdoppelt sich auf  $(11 \pm 3)$  %.



Abb. 4.6: Charakterisierung der ERES-Aggregationen unter RNA-Interferenz. Unter dem Knockdown von Lunapark vergrößert sich (a) die mittlere Fläche aller ERES  $\langle A_{\text{ERES}} \rangle = (0.65 \pm 0.36) \,\mu\text{m}^2$  und  $p(A_{\text{ERES}})$  weicht systematisch von der logarithmischen Normalverteilung der unbehandelten HeLa-Zellen und Negativkontrolle ab. (b) Die relative Ausdehnung  $\mathcal{E}(A_{\text{ERES}})$  verdeutlicht die Aggregation von Sec16-GFP zu stärker sphärischen Clustern bei einer (c) etwa zehnfach erhöhten Hintergrundfluoreszenz im Zytoplasma.

#### 4 Entschlüsselung physikalischer Hintergründe der Organisation von ER Exit Sites

In diesem Zusammenhang unterscheidet sich auch die Gestalt und Anordnung der ERES von den unbehandelten Zellen. Begründet durch die relative Zunahme der ERES-Cluster verringert sich die mittlere Sphärizität  $\langle S_{\text{ERES}} \rangle = 0.88 \pm 0.03$  und das Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}} \rangle = 0.75 \pm 0.03$  aller ERES. Dabei ist die Sphärizität der ERES-Singletts mit  $\langle \mathcal{S}_{\text{ERES}, \text{Sing.}} \rangle = 0.92 \pm 0.02$  erhalten, wogegen sich  $\langle \mathcal{S}_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle = 0.81 \pm 0.08$  erhöht. Daher dokumentieren diese strukturellen Kenngrößen die zunehmende Aggregation von Sec16-GFP zu verstärkt kreisförmigen ERES. Diese wird umso mehr durch die relative Ausdehnung der ERES zu ihren Begrenzungsrechtecken hervorgehoben. Wie in Abb. 4.6b aufgezeigt, erhöht sich  $\mathcal{E}(A_{\text{ERES}})$ , abseits der beugungsbegrenzten ERES, signifikant für alle Flächen  $A_{\text{ERES}}$ . Die größeren Aggregationen von Sec16-GFP unter dem Knockdown der Lunapark-Proteine bestehen demzufolge, nicht wie bei der Negativkontrolle oder den unbehandelten Zellen, aus Verbünden punktartiger ERES-Singletts. Indessen vergrößern sich die Entfernungen der am nächsten benachbarten ERES etwa eineinhalbfach.

Weiterhin verlagert sich das Fluoreszenzverhältnis von den ERES-Singletts zu den ERES-Clustern. Somit bestimmt sich die relative Fluoreszenz der aggregierten ERES zu  $\tilde{f}_{\text{ERES, Clust.}} = (90 \pm 6) \%$ , bei einem gleichartigen Flächenanteil  $\tilde{a}_{\text{ERES, Clust.}} = (82 \pm 9) \%$ . Räumlich gesehen lokalisiert ein Großteil der Fluoreszenz innerhalb einer ca. 5 µm dicken Schale um die Kernhülle, in der viele ERES-Cluster angelagert sind (siehe Abb. D.1b). Hierbei lokalisiert die Fluoreszenz stärker in einer konfokalen Bildebene als bei der Negativkontrolle oder den unbehandelten Zellen. Daneben ist die Gesamtfluoreszenz von Sec16-GFP etwa fünffach gegenüber den Kontrollzellen erhöht. Die Intensitäten der ERES verstärken sich, ungeachtet ihrer Flächen, etwa achtfach und die Hintergrundfluoreszenz von Sec16-GFP intensiviert sich gleichermaßen für alle Zellen (siehe Abb. 4.6c). Dabei erhöht sich der relative Fluoreszenzbeitrag des Zytoplasmas, entsprechend zu den mit Nocodazol oder Filipin behandelten HeLa-Zellen, auf  $(25 \pm 10)$  %. Im Gegensatz dazu stimmt die Fluoreszenz und Beschaffenheit des ERES-Musters quantitativ zwischen der Negativkontrolle und den unbehandelten Zellen überein, wobei die Fluoreszenz von Sec16-GFP bei der Negativkontrolle in der Region des Golgi-Apparats, vermutlich durch die siRNA-Moleküle, verringert wird.

# 4.7 Musterbildung der ERES unter Filipin

Ausgehend von der Behandlung mit Filipin werden Zusammenhänge zwischen der Gestalt des ERs und des ERES-Musters untersucht, indem die tubuläre Beschaffenheit des ERs in lebenden Zellen verändert wird. Wie in Abb. 4.7a veranschaulicht, wird das tubuläre ER durch die Einwirkung von Filipin zu etwa 500 - 1000 zueinander unverbundenen Fragmenten abgebaut. Die auf diese Weise gebildeten Fragmente des rauen und glatten ERs sind weitgehend statisch und das tubuläre Erscheinungsbild des ERs kann unter der Einflussnahme von Filipin während der experimentellen Zeiträume nicht wiederhergestellt werden. Hierbei werden die ER-Fragmente in den Konfokalaufnahmen gleichsam über die Fluoreszenz des ER-Lumens (KDEL-RFP) oder der ER-Membranen abgebildet, ohne eine im Zytoplasma erhöhte Hintergrundfluoreszenz aufzuzeigen.

Der Durchmesser der ER-Fragmente beträgt gewöhnlich etwa 1 µm, wobei diese in der Umgebung der Kernhülle, insbesondere in der oberen Zellhälfte, Flächen von ca.  $2-5 \,\mu\text{m}^2$ umfassen können. In dieser Hinsicht sind die ER-Fragmente mit einer mittleren Fläche  $\langle A_{\text{ER}} \rangle = (0.56 \pm 0.15) \,\mu\text{m}^2$  kleiner als die unter einem hypoosmotischen Schock gebildeten ER-Vesikel (siehe Abschnitt 4.8 bzw. Abb. 4.9a). Mit einem mittleren Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\text{ER}} \rangle = 0.79 \pm 0.17$  sind die ER-Fragmente größtenteils sphärisch, auch wenn einige Objekte über eine stärker asymmetrische Form verfügen (siehe Abb. 4.9b). Obwohl die Anwendung von Filipin zur Fragmentierung des ERs verbreitet ist [138], scheinen diese strukturellen Kenngrößen der ER-Fragmente noch nicht bestimmt worden zu sein.

### Persistenz des punktförmigen ERES-Musters auf den ER-Fragmenten

Das Lokalisationsmuster von Sec16-GFP ist unter der Degradierung des ERs durch Filipin nahezu unverändert zu den unbehandelten Zellen. Somit besteht ein dispergiertes Punktmuster mit etwa 250 – 900 ERES gegenüber der zytoplasmischen Fluoreszenz von Sec16-GFP. Die ERES sind über die Fragmente des ERs verteilt und lokalisieren zunehmend in der Region nahe des Golgi-Apparats als intensivierte Aggregationen von Sec16-GFP. Im Durchschnitt befindet sich ein ERES auf einem ER-Fragment, wenngleich kleinere Segmente in der Zellperipherie häufiger frei von ERES sind. Dabei existieren auf den größeren Fragmenten des rauen ERs einzeln voneinander getrennte ERES mit einer punktförmigen Gestalt, die vermutlich aus den zuvor verstärkten Akkumulationen nahe des Golgi-Apparats hervorgehen. Demgegenüber werden vereinzelt ERES ohne einen



Abb. 4.7: Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unter Einwirkung Filipins. (a) Unter der Degradierung des tubulären ERs in hunderte Fragmente mit einer typischen Fläche von ca. 1 µm<sup>2</sup> besteht das dispergierte Punktmuster der ERES nahezu unverändert innerhalb der HeLa-Zellen. (b) Nachdem sich die Anzahl der ERES bei einer unveränderten Gesamtfluoreszenz von Sec16-GFP verringert, erhöhen sich die Helligkeiten der ERES um etwa 40 %. Die Fluoreszenz des zytoplasmischen Hintergrunds ist statistisch unverändert.

erkennbaren Kontakt zum fluoreszenzmarkierten ER registriert (siehe Abb. 4.9a), wenn diese fortwährenden Bewegungen im Zeitbereich weniger Sekunden auf den vorwiegend statischen ER-Fragmenten unterliegen. Diesbezüglich scheinen einzelne ERES zwischen den ER-Fragmenten ausgetauscht werden zu können, indem sie, vermutlich entlang der Mikrotubuli, gerichtet durch das Zytosol transportiert werden.

Unter der Einwirkung von Filipin bleiben die strukturellen Eigenschaften der ERES erhalten. Mit einem Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}} \rangle = 0.80 \pm 0.02$  entspricht die sphärische Gestalt aller ERES sowie größerer ERES-Cluster  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle = 0.80 \pm 0.06$  den unbehandelten Zellen. Ebenso unverändert sind die Größenverteilungen  $p(\mathcal{A}_{\text{ERES}})$  und mittleren Flächen  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}} \rangle = (0.11 \pm 0.03) \, \mu\text{m}^2$  bzw.  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle = (0.67 \pm 0.16) \, \mu\text{m}^2$ . Allerdings verringert sich die Anzahl und Flächendichte der ERES unter dem Einfluss von Filipin um etwa 25 %, da signifikant weniger ERES-Singletts vorhanden sind. Hierbei stimmt die gesamte Fluoreszenz von Sec16-GFP zu  $(4 \pm 3)$  % mit den unbehandelten Zellen überein. Daher verstärkt sich die Fluoreszenz der ERES-Singletts um etwa 30 %, bei einer vergleichbaren Zunahme der anderen Kategorisierungen, jedoch unveränderten zytoplasmischen Fluoreszenz (siehe Abb. 4.7b). Die mittleren Helligkeiten der ERES sind statistisch gleichwertig zu den gesteigerten Intensitäten der ERES unter der Einwirkung von Nocodazol. Insgesamt sind die Eigenschaften des punktartigen Lokalisationsmuster der ERES unter dem Rückgang des tubulären ERs durch Filipin erhalten.

# 4.8 Musterbildung der ERES unter hypotonischer Behandlung

Ebenso kann die Beschaffenheit des ERs über einen hypoosmotischen Schock verändert werden, wobei die Auswirkungen der hypotonischen Behandlung von [39] auf die Zellorganellen noch nicht umfassend erforscht sind. Jedoch bilden sich intrazelluläre Vesikel der Organellen, die als biologische Modellsysteme betrachtet werden können [39,145]. Die Forschungsgemeinschaft erhofft sich damit, vergleichbar zur Isolation großer Vesikel der Plasmamembran [146], neuartige Einsichten über die mikroskopische Organisation und das Phasenverhalten biologischer Membranen zu gewinnen [147,148]. Weiterhin könnte zu den Wechselbeziehungen zwischen den Organellstrukturen beigetragen werden [147,148], die über beständige Membrankontakte reguliert werden [32–35]. Im folgenden Abschnitt werden die Effekte der hypotonischen Behandlung von [39] an den kultivierten HeLa-Zellen wiedergegeben und Struktur- und Fluoreszenzeigenschaften der intrazellulären Vesikel charakterisiert. Auf dieser Grundlage wird das Lokalisationsmuster von ERES-spezifischen Proteinen unter der hypotonischen Behandlung untersucht.

# 4.8.1 Ausbildung intrazellulärer Vesikel der Zellorganellen

Unter dem hypoosmotischen Schock der Zellen wandelt sich die Gestalt vieler membrangebundener Organellen innerhalb weniger Minuten und es formen sich mikrometergroße, inztrazelluläre Vesikel. Die mehrheitlich sphärischen Vesikel des ERs, der Mitochondrien,



Abb. 4.8: Ausbildung intrazellulärer Vesikel unter hypotonischer Behandlung. Unter einem hypoosmotischen Schock wandeln viele membrangebundene Zellorganellen ihre Gestalt in hunderte, mikrometergroße Vesikel. (a) Auf den ER-Vesikeln separieren Proteine der ER-Membranen (CNX-GFP) und des ER-Lumens (CRT-GFP bzw. KDEL-RFP), die bei den Konfokalaufnahmen unbehandelter HeLa-Zellen kolokalisieren. (b) Mitochondrien-Vesikel (Mito-GFP) stehen häufig in Kontakt zu ER-Vesikeln. (c) Das Zytoskelett der Mikrotubuli (Tubulin-GFP) und (d) Aktinfilamente (Aktin-GFP) wird vollständig degradiert.

Lysosomen und Endosomen kennzeichnen sich durch eine räumliche Separation ihres Lumens und ihrer Membranen [39]. Dabei sind die Membrankontaktstellen, an denen ein Austausch von Ionen, Lipiden und weiteren kleinen Molekülen zwischen verschiedenen Organellen stattfindet [35,37], stellenweise erhalten [39]. Ähnlich zur Forschungsarbeit von KING et al. [39], werden konfokale Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen vor und nach der hypotonischen Behandlung in Abb. 4.8 dargestellt.

Wie in Abb. 4.8a veranschaulicht wird, sind die intrazellulären ER-Vesikel aus Proteinen des ER-Lumens (KDEL-RFP) zusammengesetzt, welche von den beugungsbegrenzten ER-Membranen (CNX-GFP) nach außen hin vollständig umschlossen werden. Demnach separieren die Bestandteile des ERs räumlich voneinander, wogegen die Fluoreszenz des tubulären ER-Netzwerks bei den Konfokalaufnahmen der unbehandelten HeLa-Zellen kolokalisiert. Im Zuge dessen wird das Lumen der intrazellulären ER-Vesikel gleichwertig über KDEL-RFP oder CRT-GFP abgebildet. Hierbei stimmen die Intensitäten dieser Markierungsproteine quantitativ mit der Einwirkung von Filipin überein und sind auch im Zytoplasma nicht verstärkt (siehe Abschnitt 4.8.2). Insgesamt verbleiben daher die ER-spezifischen Proteine auf den intrazellulären Vesikeln und die Gesamtintegrität des ERs ist, wie in [39] erläutert, unter dem hypotonischen Eingriff bewahrt.

Die Generation intrazellulärer ER-Vesikel kann durch die Zugabe des ursprünglichen Kulturmediums umgekehrt werden, womit einzelne Tubuli des ERs nach wenigen Minuten entstehen. Allerdings wird das Zytoskelett der Mikrotubuli (siehe Abb. 4.8c), Aktinfilamente (siehe Abb. 4.8d) und Intermediärfilamente [149] nahezu vollständig und irreversibel unter dem hypoosmotischen Schock abgebaut. Daher sind die intrazellulären Vesikel weitgehend statisch, wenngleich vereinzelt bewegliche Objekte in der Zellperipherie registriert werden. Daneben formen sich bei wenigen Zellen bis zu ca. 10 µm große ER-Vesikel nahe des Zellkerns. Wie auch von [145] berichtet wird, werden wahrscheinlich die Kernporenkomplexe verändert, welche die Doppelmembran der Kernhülle verbinden. Gleichermaßen bilden sich unter der hypotonischen Behandlung hunderte intrazelluläre Mitochondrien-Vesikel, die häufig in optischem Kontakt zu den ER-Vesikeln stehen (siehe Abb. 4.8b). Dementsprechend können unterschiedliche Auswirkungen des hypoosmotischen Schocks aus [39, 145] experimentell an den HeLa-Zellen bestätigt werden.

### 4.8.2 Charakterisierung der intrazellulären Vesikel

Ausgehend von den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen werden strukturelle Eigenschaften der intrazellulären ER- und Mitochondrien-Vesikel untersucht (siehe Tab. E.2). In den HeLa-Zellen bilden sich durchschnittlich etwa 300 ER- und 150 Mitochondrien-Vesikel. Deren Anzahl variiert zwischen ca. 200 - 500 bzw. 50 - 300 Objekten innerhalb verschiedener Bildebenen und Zellen. Dabei nehmen die segmentierten Vesikel etwa 10 - 20%der Zellfläche ein. Die ER-Vesikel lokalisieren vermehrt in der unteren Zellhälfte und die Mitochondrien-Vesikel befinden sich häufig etwas oberhalb dieser. Somit scheinen die intrazellulären Vesikel an den Positionen der ursprünglichen Organellen zu verbleiben, wohl auch, da langreichweitige Bewegungen ohne die Filamente des Zytoskeletts durch das "Crowding" des Zytoplasmas räumlich stark eingeschränkt werden.

Die Durchmesser der Vesikel umfassen typischerweise ca.  $1-2 \,\mu\text{m}$ , mit einer Bandbreite zwischen  $0.5 - 5 \,\mu\text{m}$ . Hierbei bestimmt sich die längste Hauptachse der ER-Vesikel zu  $\langle d_{\text{ER}} \rangle = (1.2 \pm 0.3) \,\mu\text{m}$ , wobei die Mitochondrien-Vesikel mit  $\langle d_{\text{Mito.}} \rangle = (0.9 \pm 0.2) \,\mu\text{m}$ etwas kleiner sind. Wie in Abb. 4.9a dargestellt ist, werden die Häufigkeiten aller Vesikelquerschnittsflächen gut von einer logarithmischen Normalverteilung charakterisiert. Deren Flächen betragen  $A_{\text{ER}} = 1.2 \,\mu\text{m}^2$  mit einer Standardabweichung  $\sigma_{\text{ER}} = 1.9 \,\mu\text{m}^2$ , bzw.  $A_{\text{Mito.}} = (0.9 \pm 0.7) \,\mu\text{m}^2$ . Demzufolge ist die Polydispersität  $\mathcal{P} = (\sigma/\mu)^2$  der intrazellulären ER-Vesikel  $\mathcal{P}_{\text{ER}} = 2.5$  bedeutend größer als  $\mathcal{P}_{\text{Mito.}} = 0.7$  der Mitochondrien. Dies dokumentiert das breitere Spektrum zwischen großflächigen ER-Vesikeln nahe der Kernhülle und vorwiegend kleineren Vesikeln in peripheren Zellregionen.

Die Querschnitte aller intrazellulären ER-Vesikel sind mit einer mittleren Sphärizität  $\langle S_{\text{ER}} \rangle = 0.95 \pm 0.11$  und einem Aspekteverhältnis  $\langle A_{\text{ER}} \rangle = 0.86 \pm 0.13$  annähernd kreisförmig. Über alle konfokalen Bildebenen gesehen, weichen die intrazellulären Vesikel nicht von einem sphärischen Erscheinungsbild ab. Die kumulative Verteilung p(S) bestätigt eine kreisförmige Gestalt  $S \geq 0.9$  für 85 % der Vesikel, deren Skalenverhalten zwischen den Vesikeln des ERs und der Mitochondrien übereinstimmt (siehe Abb. 4.9b). Hierbei



Abb. 4.9: Eigenschaften der intrazellulären ER- und Mitochondrien-Vesikel. (a) Die Häufigkeiten aller Vesikel-Querschnittsflächen p(A) werden von einer logarithmischen Normalverteilung mit  $A_{\rm ER} = (1.2 \pm 1.9) \,\mu\text{m}^2$  bzw.  $A_{\rm Mito.} = (0.9 \pm 0.7) \,\mu\text{m}^2$  charakterisiert. (b) Die kumulative Verteilung aller Sphärizitäten p(S) als auch  $\langle S_{\rm ER} \rangle = 0.95 \pm 0.11$  bzw.  $\langle S_{\rm Mito.} \rangle = 0.96 \pm 0.09$  verdeutlichen die kreisförmige Gestalt der Vesikel. Vergleichend sind die Merkmale der ER-Fragmente unter der Einwirkung von Filipin aus Abschnitt 4.7 angegeben.

sind die Mitochondrien-Vesikel mit einem Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\text{Mito.}} \rangle = 0.91 \pm 0.09$  etwas sphärischer und unterliegen weniger Variationen. Diesbezüglich existieren keine stärker asymmetrischen Vesikel der Mitochondrien, wogegen insbesondere größere Vesikel des rauen ERs häufiger von einer kreisförmigen Beschaffenheit abweichen. Verglichen zu den unter der Einwirkung von Filipin gebildeten ER-Fragmenten sind die intrazellulären ER-Vesikel jedoch größer und, unabhängig von ihren Flächen, auch sphärischer.

Unter dem hypoosmotischen Schock ist die Fluoreszenz der Zellorganellen erhalten. So werden allen segmentierten ER-Vesikeln  $(60 \pm 8)$ % der Fluoreszenz von KDEL-RFP zugeordnet, die etwa fünfzehnfach gegenüber der zytoplasmischen Hintergrundfluoreszenz erhöht ist. In dieser Hinsicht stimmt der relative Fluoreszenzbeitrag der ER-Vesikel und die Gesamtfluoreszenz der Zellen quantitativ zur Fragmentierung des ERs unter der Einwirkung von Filipin überein. Entsprechend dazu lokalisieren  $(85 \pm 13)$ % der Fluoreszenz von Mito-GFP in den Mitochondrien-Vesikeln, bei einem vernachlässigbaren Hintergrund. Demzufolge verbleiben diese Markierungsproteine auf den intrazellulären Vesikeln, deren Lumen und Membranen für das ER räumlich separieren.

# 4.8.3 Charakterisierung der ERES-Strukturen und ihres Phasenverhaltens

Zusätzlich zur strukturellen Veränderung des ERs mit einer Separation des Lumens und der Membranen wird von einer Phasenseparation auf den intrazellulären ER-Vesikeln berichtet [39]. Somit gehen aus der einheitlichen Phase der ER-Membranen stärker und schwächer geordnete Lipiddomänen hervor, besonders, wenn die hypotonisch behandelten Zellen unterhalb von 20 °C mikroskopiert werden. Diese lässt sich durch eine Erwärmung auf 40 °C umkehren [39]. Es ist daher physikalisch interessant, Effekte der hypotonischen Behandlung auf das punktartige Lokalisationsmuster der ERES zu untersuchen.

# Persistenz punktartiger Sec16-Phänotypen auf den ER-Vesikeln

Mit der durch den hypoosmotischen Schock bewirkten Umstrukturierung des ERs wird das periphere Membranprotein Sec16-GFP zunehmend in das Zytoplasma freigesetzt, wobei punktartige ERES (siehe Abb. 4.10a) für etwa 40 % der HeLa-Zellen beobachtet werden. Diese Ansammlungen von Sec16-GFP lokalisieren einzig auf den Membranen der intrazellulären ER-Vesikel und ihre beugungsbegrenzten Abbildungen stehen in optischem Kontakt zum mit KDEL-RFP markierten ER-Lumen. Hierbei sind die ERES größtenteils unbeweglich. Typischerweise befindet sich ein einzelnes ERES auf einem intrazellulären ER-Vesikel, wenn auch auf vielen Membranen keine Ansammlungen von Sec16-GFP ersichtlich sind. Seltener existieren mehrere punktartige ERES auf den Oberflächen größerer ER-Vesikel. Insbesondere sind diese punktartigen ERES räumlich voneinander getrennt und vereinigen sich während der Experimente nicht zu größeren Aggregationen. Zugleich werden die Akkumulationen von Sec16-GFP in der Region des Golgi-Apparats durch die hypotonische Behandlung aufgelöst, wenngleich eine leicht erhöhte Dichte in den Experimenten festzustellen ist.

In diesem Zusammenhang unterscheidet sich die Beschaffenheit der ERES mit einer Fläche  $\langle A_{\rm ERES} \rangle = (0.12 \pm 0.02) \,\mu m^2$  und einem Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\rm ERES} \rangle = 0.82 \pm 0.03$ nicht von den punktartigen ERES der unbehandelten Zellen. Allerdings reduziert sich die Anzahl  $N_{\rm ERES} \simeq 170$  erheblich und die 50 – 300 fluoreszenten Objekte umfassen nur ca. 2% der Zellfläche (siehe Abb. 4.10b). Gleichzeitig verringert sich die Gesamtfluoreszenz der Zellen etwa fünffach und das punktförmige Expressionsmuster von Sec16-GFP ist bedeutend abgeschwächt. Dabei reduziert sich die Fluoreszenz der ERES etwa siebenfach, womit deren Intensitäten nur noch zweifach gegenüber dem zytoplasmischen Hintergrund von Sec16-GFP erhöht sind (siehe Abb. 4.10c). Insgesamt besteht somit ein punktartiges Lokalisationsmuster der ERES auf den intrazellulären ER-Vesikeln, bei einer verringerten Fluoreszenz von Sec16-GFP. In den übrigen circa 60% der Zellen wird nur eine homogene Fluoreszenzverteilung ohne erkennbare Ansammlungen von Sec16-GFP abgebildet.

# Persistenz punktartiger Phänotypen von COPII-spezifischen Proteinen

Bei der Behandlung mit dem hypotonischen Medium bestätigen sich die Zellphänotypen, wenn die ERES über spezifische Bestandteile der COPII-Vesikel fluoreszent markiert werden. Somit bestehen ebenso definierte Punktstrukturen auf den Oberflächen der intrazellulären ER-Vesikel, wie sie über die Hervorhebung der inneren COPII-Vesikelhülle durch YFP-Sec23A in Abb. 4.11a dargestellt werden. In weiteren Experimenten kann ein zu Abb. 4.11a vergleichbares Lokalisationsmuster durch YFP-Sec31A als Mantelprotein der äußeren COPII-Hülle nachgewiesen werden. Hingegen werden mit YFP-Sec24D nur gleichmäßige Fluoreszenzverteilungen in den Zellen abgebildet. Wahrscheinlich ist dies jedoch auf die Eigenschaften des Sec24-Plasmids zurückzuführen, dessen Expression von fluoreszenzmarkierten Sec23-Sec24 Heterodimeren bereits bei unbehandelten Kulturzellen



Abb. 4.10: Beschaffenheit punktartiger ERES-Strukturen auf den ER-Vesikeln. (a) Auf den Membranen der intrazellulären ER-Vesikel besteht bei etwa 40 % der HeLa-Zellen eine punktartige Lokalisation von Sec16-GFP mit einer unveränderten Gestalt separierter ERES. Dabei verringert sich (b) die Anzahl N und der Flächenanteil  $\widetilde{A}$  der ERES bzw. (c) die mittlere Fluoreszenz  $\langle \mathcal{F} \rangle$  von Sec16-GFP innerhalb der ERES, Zellen und des Zytoplasmas.

gegenüber den anderen Konstrukten vermindert war. Zusammenfassend lässt sich daher eine Persistenz des punktartigen Lokalisationsmusters auf den intrazellulären ER-Vesikeln für unterschiedliche Markierungsproteine der ERES folgern. Allerdings sind tiefergehende Untersuchungen erforderlich, um eine Beständigkeit der ERES als auch einen funktionellen Vesikeltransport über das transitorische ER unter der hypotonischen Einflussnahme der Zellen begründen zu können.

# Temperaturabhängige Experimente

Wie eingangs geschildert, kann auch das Phasenverhalten der ER-Lipiddomänen und assoziierten Membranproteinen mithilfe der intrazellulären ER-Vesikeln näher untersucht werden [39,148]. Experimentell wird ein weiterhin punktartiges Lokalisationsmuster von Sec16-GFP beobachtet, wenn die HeLa-Zellen zusätzlich zum hypoosmotischen auch einen temperaturabhängigen Schock durch eine eisgekühlte hypotonische Lösung erfahren.<sup>7</sup> Im Zuge dessen existieren bei etwa einem Drittel der Zellen einzelne ERES auf den Membranen der ER-Vesikel, die auf der Oberfläche größerer Vesikel auch räumlich voneinander getrennt sind. Demnach scheint das punktförmige Erscheinungsbild der ERES nicht durch eine von Temperaturveränderungen bewirkte Phasenseparation auf den ER-Vesikeln beeinflusst zu werden. Möglicherweise könnte eine Aggregation der ERES-spezifischen Proteine mit weiteren biochemischen Veränderungen an den temperaturveränderten Zellen hervorgerufen werden, insbesondere wenn sekretorische Frachtmoleküle vor dem hypoosmotischen Schock im ER zurückgehalten werden.

<sup>7</sup> Dazu werden sie für 15 min auf Eis inkubiert und unverzüglich in eisgekühltem Medium mikroskopiert.
Entstehung flächig ausgedehnter Aggregationen von Sec16-GFP abseits der ER-Vesikel Allerdings werden gelegentlich Zellen unter der hypotonischen Behandlung beobachtet, die über flächige Aggregationen von Sec16-GFP verfügen (siehe Abb. 4.11b,c). So existieren bei diesen Zellen etwa 100 ringförmige Ansammlungen von Sec16-GFP, welche die Oberflächen der intrazellulären Vesikel teilweise bis vollständig umfassen. Wie durch die Mittelwertprojektionen konfokaler Ebenen in Abb. 4.11c hervorgehoben wird, handelt es sich um zusammenhängende und ausgedehnte Strukturen mit gewöhnlichen Flächen von ca.  $1 - 3 \,\mu\text{m}^2$ . Innerhalb der flächigen Aggregationen besteht eine annähernd gleichmäßige Fluoreszenz von Sec16-GFP, wobei leichte Inhomogenitäten auf größeren Vesikeln vorliegen können. Parallel dazu sind nur wenige punktartige Ansammlungen auf den ER-Vesikeln dieser Phänotypen von HeLa-Zellen vorhanden.

Erstaunlicherweise lokalisieren die flächig ausgedehnten Aggregationen von Sec16-GFP ausschließlich auf Vesikeloberflächen, die im Inneren frei von KDEL-RFP sind. Dies ließe zunächst intrazelluläre ER-Vesikel vermuten, deren Membranen und Lumen unter dem hypoosmotischen Schock voneinander separiert werden. Jedoch ist eine gesamte Abtrennung aller ER-Membranen äußerst unwahrscheinlich und würde der bewahrten Gesamtintegrität der ER-Vesikel aus Abschnitt 4.8.1 sowie den Untersuchungen von KING et al. [39] widersprechen. Dabei heben auch die wenigen punktartigen Ansammlungen von Sec16-GFP den Erhalt von ER-Membranen auf den mit KDEL-RFP markierten Vesikeln hervor. Weiterhin stimmt die Fluoreszenz des ER-Lumens quantitativ zwischen der hypotonischen Behandlung und der Fragmentierung durch Filipin (siehe Abschnitt 4.8.2) überein und KDEL-RFP müsste bei diesen Zellen vollständig aus dem Lumen vieler ER-Vesikel verdrängt werden. Demzufolge ist davon auszugehen, dass diese Aggregationen von Sec16-GFP nicht auf den Membranen der intrazellulären ER-Vesikel vorkommen.

Die intrazellulären Vesikel mit flächigen Aggregationen von Sec16-GFP befinden sich üblicherweise in unmittelbarer Umgebung der mit KDEL-RFP markierten ER-Vesikel und stehen in optischer Verbindung zu deren Oberflächen (siehe Abb. 4.11b,c). Dies könnte auf die Assoziationen des ERs zu weiteren Organellen hinweisen, die über spezifische Membrankontakte hergestellt werden [32,35,37]. Hierbei ist nicht ausgeschlossen, dass die Interorganellkontaktstellen den Übergang von Sec16-GFP auf die Membranen anderer Vesikel ermöglichen. Diese Hypothese wird auch von der Forschungsarbeit [39] unterstützt, die einen Erhalt der Kontaktstellen unter dem hypoosmotischen Schock mit einem zudem verstärkten Einsatz der Phasenseparation an diesen Orten auf den Membranen der intrazellulären ER-Vesikel nachweisen konnte.

Aufgrund ihrer Anzahl, Größe und Lage könnte es sich um intrazelluläre Mitochondrien-Vesikel handeln, auf denen diese Aggregationen von Sec16-GFP vorliegen. Insbesondere sind die Netzwerke der Mitochondrien und des ERs stark miteinander verbunden und der stetige Austausch zwischen beiden Organellen über Membrankontaktstellen ist für deren dynamische Regulation von entscheidender Bedeutung [34–36]. Ebenso würden

#### 4.9 Gegenüberstellung der Musterbildung von ERES



Abb. 4.11: Existenz punktartiger sowie flächig ausgedehnter ERES-Strukturen. Unter der hypotonischen Einwirkung bestehen (a) vergleichbare ERES-Punktstrukturen auf den Membranen intrazellulärer ER-Vesikel bei der Markierung von COPII über YFP-Sec23A. (b, c) In wenigen Zellen bilden sich flächig ausgedehnte Aggregationen von Sec16-GFP auf Vesikeln, die im Inneren frei von Proteinen des ER-Lumens (KDEL-RFP) sind und an die ER-Vesikel zumeist angrenzen (siehe auch Mittelwertprojektionen in (c),  $\Delta z = 3 \mu m$ ).

die Mitochondrien befürworten, warum diese ca. 1 µm großen Vesikel von Zellorganellen vollständig frei von KDEL-RFP und Sec16-GFP sind, da Proteine des ER-Lumens und der ERES ohne spezifische Importsequenzen nicht in diese aufgenommen werden können. Allerdings könnte es sich, bezogen auf das Erscheinungsbild aus [39], auch um intrazelluläre Vesikel der Lysosomen handeln. Letztendlich ist es erforderlich, verschiedene Bestandteile der ERES, Zellorganellen und Halteproteine systematisch zu markieren, um diese Auswirkung des hypoosmotischen Schocks eindeutig aufklären zu können. Möglicherweise ließen sich die flächigen Aggregationen der ERES-spezifischen Proteine häufiger unter einer vorangegangenen Rückhaltung von Frachtmolekülen nachweisen.

# 4.9 Gegenüberstellung der Musterbildung von ERES

Anschließend werden die Eigenschaften der ERES zwischen den unbehandelten und den biochemisch veränderten Zellen verglichen (siehe Kapitel 4.4–4.7). Dies beinhaltet die Auflösung der Mikrotubuli durch Nocodazol, den Gen-Knockdown von Lunapark über RNA-Interferenz (mit Negativkontrolle) und die Degradierung des ERs durch Filipin. Dabei werden statistische Signifikanzen der in Anhang E aufgeschlüsselten Kenngrößen mit geeigneten Hypothesentests<sup>8</sup> nachgewiesen (siehe Anhang D.3). Exemplarisch sind die Anzahl, mittlere Größe und Fluoreszenz der ERES für punktartige Singletts und größere Cluster ( $A_{\rm ERES} \ge 0.5 \,\mu m^2$ ) in Abb. 4.12 aufgetragen. Infolge der geringeren Zellstatistik und verschiedenen Phänotypen wird der hypoosmotische Schock aus Kapitel 4.8 nicht berücksichtigt. Grundlegende Eigenschaften des punktartigen Lokalisationsmusters von Sec16-GFP auf den intrazellulären ER-Vesikeln sind jedoch in Tab. E.2 zusammengefasst.

<sup>8</sup> Vorwiegend Zweistichproben-t- oder Kolmogorov-Smirnov-Tests zum Signifikanzniveau $\alpha=0.05$ 

# Strukturelle Eigenschaften der ERES-Singletts und ERES-Cluster

Zwischen allen Bedingungen sind die Zellflächen  $\langle A_{\text{Zelle}} \rangle = 1500 - 1700 \,\mu\text{m}^2$ , die innerhalb der 43 – 54 Zellen normalverteilt sind, statistisch gleichwertig. Daher können absolute und relative Kenngrößen der ERES miteinander verglichen werden. Die Anzahl aller ERES und Singletts verringert sich bei der RNA-Interferenz von Lunapark mit  $N_{\text{ERES}} \simeq 300$ erheblich gegenüber der unveränderten Negativkontrolle  $N_{\text{ERES}} \simeq 750$  (siehe Abb. 4.12a). Ebenso reduziert sich  $N_{\text{ERES}}$  signifikant mit den strukturellen Veränderungen des ERs durch Nocodazol oder Filipin. Dabei ist die Anzahl größerer ERES-Cluster einzig unter dem Knockdown von Lunapark erhöht und unter jeder Messbedingung erhalten, wenn alle ERES in der Golgi-Region als Cluster gezählt werden. Somit ist die Anzahl und gleichermaßen die Dichte der ERES stark mit der Beschaffenheit des ERs verbunden.

Die mittleren Flächen aller ERES  $\langle A_{\rm ERES} \rangle = (0.11 \pm 0.03) \,\mu\text{m}^2$  stimmen, abseits der Knockdown-Zellen von Lunapark, überein und werden größtenteils von den punktartigen Singletts  $\langle A_{\rm ERES, Sing.} \rangle = (0.10 \pm 0.02) \,\mu\text{m}^2$  bestimmt (siehe Abb. 4.12b). Wie zudem in Abb. 4.6a dargestellt ist, werden die Häufigkeiten aller ERES-Flächen  $p(A_{\rm ERES})$  von einer logarithmischen Normalverteilung wiedergegeben. Hingegen unterscheidet sich  $p(A_{\rm ERES})$ unter der RNA-Interferenz und  $\langle A_{\rm ERES, Sing.} \rangle$  steigt geringfügig an (siehe Abb. 4.12b). Begründet durch die zunehmende Aggregationen der ERES in den Knockdown-Zellen erhöht sich die mittlere Fläche aller ERES  $\langle A_{\rm ERES} \rangle = (0.65 \pm 0.36) \,\mu\text{m}^2$ , wobei sich die Flächen der ERES-Cluster zu  $\langle A_{\rm ERES, Clust.} \rangle = (2.2 \pm 1.0) \,\mu\text{m}^2$  verdreifachen (siehe Abb. 4.12b) und mitunter die ERES in der Golgi-Region übertreffen. Insgesamt verdoppelt sich die Gesamtfläche aller segmentierten ERES bei der RNA-Interferenz von Lunapark, wogegen sie unter der Einwirkung von Nocodazol oder Filipin vergleichbar zum Rückgang der ERES abnimmt. Demnach sind die Flächen aller ERES und deren Häufigkeitsverteilungen unverändert, abgesehen von den Zellen des Gen-Knockdowns.

Darüber hinaus ist die mittlere Form der ERES mit der Flächenverteilung  $p(A_{\text{ERES}})$ verbunden, da größere ERES typischerweise stärker asymmetrisch sind. Somit ist die kreisförmige Gestalt der ERES-Singletts mit einer Sphärizität  $\langle S_{\text{ERES}, \text{Sing.}} \rangle = 0.92 \pm 0.02$ und einem Aspekteverhältnis  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}, \text{Sing.}} \rangle = 0.80 \pm 0.02$  für jede Bedingung erhalten. Ebenso ist die Sphärizität der ERES-Cluster mit  $\langle \mathcal{S}_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle = 0.78 \pm 0.08$  zwischen den biochemischen Veränderungen vergleichbar. Für die Zellen der RNA-Interferenz von Lunapark verringert sich  $\langle \mathcal{A}_{\text{ERES}} \rangle$  im Mittel aller ERES, da die Aggregationen von Sec16-GFP seltener aus Verbünden punktartiger Singletts bestehen (siehe Abb. 4.6b). Demgegenüber ist das sphärische Erscheinungsbild der ERES unter der Einwirkung von Nocodazol nach Zweistichproben-t-Tests signifikant für alle Flächen verstärkt.

# Fluoreszenzeigenschaften unter den biochemischen Veränderungen

Die Fluoreszenz der ERES untergliedert sich mit einem Anteil  $f_{\text{ERES, Sing.}} = (85 \pm 9) \%$  hauptsächlich auf die punktartigen ERES-Singletts, der unter den Behandlungen mit Nocodazol oder Filipin zudem erhalten ist. Weiterhin stimmt das Fluoreszenzverhältnis



Abb. 4.12: Eigenschaften der ERES unter den biochemischen Veränderungen. Streuung der Anzahl  $N_{\text{ERES}}$ , zellmittleren Fläche  $\langle A_{\text{ERES}} \rangle$  und Fluoreszenz  $\langle F_{\text{ERES}} \rangle$  von punktartigen Singletts und größeren Clustern der ERES. (a) Die Anzahl sowie Dichte der ERES ist stark mit der Beschaffenheit des ERs verbunden. (b) Die mittleren Flächen unter Nocodazol oder Filipin stimmen mit den Kontrollzellen überein, bei einer (c) etwas erhöhten Fluoreszenz der ERES-Singletts. In den Zellen der RNA-Interferenz vergrößert sich die Fläche der ERES-Singletts und Cluster bei einer verstärkten Fluoreszenz von Sec16-GFP.

 $\tilde{f}'_{\text{ERES, Sing.}} = (43 \pm 14) \%$  zwischen diesen Bedingungen überein, wenn die kategorisierten ERES der Golgi-Region einbezogen werden. Hingegen kehrt sich  $\tilde{f}_{\text{ERES, Sing.}} = (10 \pm 6) \%$  bei den Zellen der RNA-Interferenz um. Wie in Abb. 4.12c dargestellt wird, ist die mittlere Fluoreszenz der ERES-Singletts etwa fünffach unter dem Gen-Knockdown, und eineinhalbfach unter Filipin oder Nocodazol, verstärkt. Ausgehend von der Negativkontrolle ist die Fluoreszenz der ERES-Cluster einzig bei den Zellen der RNA-Interferenz erhöht.

Die absolute Fluoreszenz von Sec16-GFP aller segmentierten ERES stimmt, abgesehen vom Knockdown des Lunapark-Gens, exakt mit den unbehandelten Zellen überein. Dies umfasst auch die insgesamte Fluoreszenz der Golgi-Region und ihrer ERES. Ebenso ist die Gesamtfluoreszenz über alle konfokalen Bildebenen zwischen den Kontrollzellen und den biochemischen Veränderungen durch Nocodazol oder Filipin statistisch unverändert. Dagegen ist die Gesamtfluoreszenz in den Zellen der RNA-Interferenz etwa fünffach erhöht und lokalisiert stärker in einer konfokalen Bildebene. Dabei erhöhen sich die Intensitäten der ERES etwa achtfach. Im Zytoplasma ist die mittlere Hintergrundfluoreszenz von Sec16-GFP statistisch unverändert zwischen den Kontrollzellen und den Behandlungen mit Nocodazol oder Filipin. Zusammenfassend ist die intrazelluläre Fluoreszenzverteilung von Sec16-GFP und der ERES unter den kurzzeitigen, strukturellen Veränderungen des ERs quantitativ erhalten und verändert sich einzig bei den Knockdown-Zellen.

# 4.10 Generische Modellierung der Musterbildung von ERES

Aus physikalischer Sicht kann die Musterbildung der ERES als ein Entmischungsvorgang aufgefasst werden, dessen Segregationen mit der Beschaffenheit des ERs verbunden sind. Im Folgenden wird die von Herrn Professor Weiß entwickelte Modellbildung [136] erläutert, mit der das gitterartige Punktmuster der ERES nachgebildet und die Auswirkungen der biochemischen Veränderungen in einen übergeordneten Kontext gesetzt werden können.

#### Mesoskopische Modellbildung eines Entmischungsvorgangs

Zur Modellierung wird ein stetiger Austausch der ERES-spezifischen Moleküle zwischen den Membranen des ERs und dem Zytosol über die Assoziation und Dissoziation mesoskopischer Teilchen an eine Oberfläche beschrieben. Die als eine Spezies angenommenen Partikel diffundieren auf der zweidimensionalen Oberfläche der Seitenlänge L und verbinden sich bei einer Kollision zu kreisförmigen Domänen, was deren thermodynamische Entmischung widerspiegelt. Die Diffusionskoeffizienten der Teilchenverbünde sind größenabhängig und folgen einer erweiterten Saffman–Delbrück Beziehung, welche an die experimentellen Beweglichkeiten der ERES angepasst wurde. Dabei ist die Oberfläche gleichmäßig in Quadrate der Kantenlänge  $\lambda = L/N$  unterteilt und ein Übergang zwischen diesen Bereichen findet nur über einen Spalt der Öffnung  $0 \le g \le \lambda$  statt. Somit sind die Bewegungen größerer Membrandomänen räumlich eingeschränkt, wobei reflektierende Randbedingungen angenommen werden. Typischerweise setzt sich ein modelliertes ERES mit einem Durchmesser von 500 nm aus etwa 75 Teilchen zusammen und weitere Eigenschaften der Simulationen (siehe [136] für Details) sind an die Experimente angelehnt.

#### Entmischung auf einer durchgängigen Membranoberfläche

In den Simulationen einer ausgedehnten Membran  $(L \gtrsim 3 \,\mu\text{m}, g = 0)$  bilden sich voneinander unabhängige Proteindomänen, deren Flächen nach dem Potenzgesetz von [150]  $p(A) \propto A^{2/3}$  skalieren. Da mikroskopische Domänen und ihre Bewegungen im Experiment nicht erfasst werden können, werden die Teilchenpositionen der simulierten Fluoreszenzaufnahmen zusätzlich mit einem Unschärfefilter überlagert. Daher sind kleine Domänen unterdrückt und die modellierten Flächen p(A) werden weitgehend von einer logarithmischen Normalverteilung wiedergegeben. Demnach ist die lokale Entmischung auf einer ausgedehnten Membran mit einer breiten Flächenverteilung der ERES verbunden.

Auf kleineren Membranen gewinnt hingegen der diffusionsbestimmte Austausch an Bedeutung. So bildet sich im Grenzfall eines wohlgemischten Systems nur eine Domäne, da es den Teilchen während ihrer Assoziationszeit ermöglicht ist, die gesamte Oberfläche zu überqueren. Dies geschieht mit den gewählten Modellparametern bei einer Systemlänge  $L \simeq 1 \,\mu\text{m}$ , wobei sich für  $L \lesssim 2.5 \,\mu\text{m}$  Abweichungen zum Entmischungsszenario auf einer ausgedehnten Membran abzeichnen. Insbesondere betrifft dies die Modellierung der ERES auf räumlich getrennten ER-Fragmenten mit einer angenommenen Fläche von ca.  $2 \,\mu\text{m}^2$ .

#### Entmischung auf einem unterteilten Membransystem

Auf einem unterteilten Membransystem wird die globale Entmischung maßgeblich von den Spaltöffnungen  $0 \le g \le \lambda$  bestimmt, die den diffusiven Austausch zwischen den Bereichen der Kantenlänge  $\lambda = L/N$  limitieren. Somit besteht bei der Modellierung des tubulären ER-Netzwerks ( $\lambda = 1.5 \,\mu\text{m}, g = 0.15 \,\mu\text{m}$ ) ein dispergiertes Muster mit einer dominanten Proteindomäne innerhalb jedes Membranbereichs. Hierbei variieren die Flächen aller Domänen  $\langle A \rangle \simeq 0.2 \,\mu\text{m}^2$  nur wenig und p(A) ist identisch zur Entmischung bei räumlich getrennten Segmenten. Daneben wird die gitterartige Anordnung der Domänen mit ihren nahezu gleichmäßigen Flächen für Spaltöffnungen  $0 \le g \le 0.5 \,\mu\text{m}$  beibehalten. Eine Kopplung zwischen den Bereichen ergibt sich, wenn größere Domänen über die Spalte ausgetauscht werden können und die Entmischung geht für  $g \to \lambda$  in den Grenzfall einer ausgedehnten Membran über. Demzufolge ist das Entmischungszenario auf dem nachgebildeten ER-Netzwerk von einer gitterartigen Anordnung gleichmäßiger ERES gekennzeichnet.

### Hypothese eines unterdrückten Entmischungsphänomens

Die Simulationen unterstützen daher die Hypothese, dass die Bildung des ERES-Musters auf der mesoskopischen Skala als ein gehemmter, zweidimensionaler Entmischungsprozess verstanden werden kann. Demnach bilden sich auf einer ausgedehnten Membran Proteindomänen unterschiedlicher Größen, die räumlich weitgehend unabhängig voneinander funktionieren. Hierbei stimmen die Domänengrößen aus der Modellierung qualitativ mit der breiten Flächenverteilung  $p(A_{\rm ERES})$  der RNA-Interferenz Zellen überein. Gleichzeitig wird der diffusionsbestimmte Austausch auf kleineren Oberflächen bedeutsamer und die Proteine konzentrieren sich in einer Domäne. Dies könnte die Musterbildung der ERES auf den ca. 1 µm großen ER-Fragmenten unter der Einwirkung von Filipin reflektieren. Bei der Entmischung auf dem nachgebildeten ER-Netzwerk ist der Austausch zusätzlich räumlich eingeschränkt. Insbesondere erinnert die Modellierung mit einer dominanten Proteindomäne in jedem Membranbereich an das punktartige Lokalisationsmuster von Sec16-GFP bei den unbehandelten HeLa-Zellen. Dabei könnte die Beständigkeit dieses Entmischungsszenarios unter verschiedenen Spaltöffnungen den Erhalt des punktartigen ERES-Musters unter der Behandlung mit Nocodazol bekräftigen.

Dieses Entmischungsszenario vermittelt somit eine generische Modellbeschreibung, die eine Bezugnahme zwischen der Gestalt der ERES und des ERs ermöglicht. Im Besonderen kann das ERES-Muster mit einem fixierten Parametersatz für verschiedene Veränderungen qualitativ abgebildet werden. In diesem Kontext ist eine Segregation vorzeitiger Domänen mit einer Vergröberung zu kreisförmigen ERES physikalisch durch eine positive Interaktionsenergie der ERES-Proteine motiviert. Zudem wird eine Entmischungshypothese durch die bei Hefezellen beobachtete Fusion von ERES mit einer *de novo* Entstehung [125] unterstützt. Jedoch werden Mikrostrukturen des ERs [94,95] und krümmungsabhängige Eigenschaften der ERES [113] nicht bei dieser Modellierung [136] berücksichtigt.

# 4.11 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

In diesem Kapitel wurden physikalische Hintergründe der Selbstorganisation von ERES untersucht, indem die Auswirkungen biochemischer Veränderungen auf das punktartige Muster der ERES quantitativ mit Bezug auf die Beschaffenheit des ERs erfasst wurden. Hierzu wurden die ERES mit konfokaler Lichtmikroskopie, vorwiegend über die Fluoreszenz des peripheren ER-Membranproteins Sec16-GFP [118], bei lebenden Kulturzellen abgebildet. Dabei wurden Struktur- und Fluoreszenzeigenschaften der ERES mit einer eigenen Bildverarbeitungsroutine bestimmt und zwischen den unbehandelten und biochemisch veränderten HeLa-Zellen verglichen. Zusammen mit einer von lokaler Entmischung motivierten Modellerklärung vermitteln diese Ergebnisse neue biophysikalische Erkenntnisse über die dynamische Selbstorganisation der ERES in Säugetierzellen [136].

# I. Charakterisierung der ERES auf dem ER unbehandelter Zellen

Bei den unbehandelten Zellen (siehe Abschnitt 4.4) bestand ein definiertes Lokalisationsmuster mit etwa 750 punktartigen ERES gegenüber der zytoplasmischen Fluoreszenz von Sec16-GFP. Die weitgehend beugungsbegrenzten und sphärischen ERES waren gitterartig auf dem tubulären ER-Netzwerk angeordnet und größere ERES-Cluster trugen nur wenig zur Charakteristik aller ERES bei. Außerdem wurden vergleichbare Phänotypen bei Markierungen der ERES über fluoreszenzgekoppelte Proteine der inneren oder der äußeren COPII-Vesikelhüllen [119,120] nachgewiesen. Diese Beschaffenheit entspricht dem bekannten Lokalisationsmuster von Sec16 bei Säugetierzellen (siehe z.B. [117,118,142]). Weiterhin stimmen die Phänotypen mit konfokalen Fluoreszenzaufnahmen überein, bei denen etwa 400 punktartige Ansammlungen von exprimierten GFP-Sec16A Proteinen in HeLa-Zellen registriert wurden [118]. Die höhere Anzahl in dieser Arbeit ist wahrscheinlich auf eine bessere Bildqualität und Objekterkennung zurückzuführen.

In biologischer Hinsicht ist Sec16 als ein spezifisches Markierungsprotein der ERES anerkannt [24,27] und die Fluoreszenz exprimierter GFP-Sec16A Proteine kolokalisiert mit Antikörperfärbungen verschiedener ERES-Bestandteile [117,142]. Hierbei ist Sec16 über seine Interaktionen mit den COPII-Proteinen an der Organisation und Regulation der ERES beteiligt [24,27]. Das punktartige Lokalisationsmuster von Sec16 ist unabhängig von den sich anlagernden COPII-Proteinen [117], die, wie auch ihre Antikörperfärbungen, weitgehend mit endogenem Sec16 kolokalisieren [117,142]. Endogene Proteine des orthologen Gens Sec16B sind hingegen nicht bei Säugetierzellen nachweisbar [24,151].

Vor diesem Hintergrund kann davon ausgegangen werden, dass die punktartigen Ansammlungen von Sec16-GFP die ERES der HeLa-Zellen fluoreszent kennzeichnen. Die Experimente könnten allerdings verbessert werden. So ließen sich die ERES spezifischer über Antikörperfärbungen markieren und die Variationen über eine Entwicklung stabiler Zelllinien verringern. Fortgeschrittene Lichtmikroskopiemethoden könnten weiter eine auflösungsverbesserte Bildgebung der ERES und des ERs bei Lebendzellen ermöglichen.

#### II. Zusammenwirken mit dem Zytoskelett der Mikrotubuli

Bei der Degradierung der Mikrotubuli durch die Einwirkung Nocodazols in Abschnitt 4.5 wurde das ER vermehrt als Netzwerk flächiger Gefüge abgebildet. Hierbei war die gitterartige Anordnung und Größe der ERES als auch die gesamte Fluoreszenz der Zellen und ERES-Kategorisierungen erhalten. Unter dem Rückgang auf etwa 450 ERES erhöhte sich daher die Fluoreszenz von Sec16-GFP innerhalb der ERES, deren sphärische Gestalt sich verstärkte. Diese Veränderungen sind im Einklang mit der in Abb. 4.1b skizzierten Entmischungshypothese. Somit ist es vorstellbar, dass sich die Oberflächenspannung der ER-Membranen durch die Auflösung der Mikrotubuli reduziert und benachbarte Ansammlungen von Sec16-GFP zu einem beugungsbegrenzten ERES vereinigt werden. Dies könnte als verstärkte Kondensation von Sec16-Proteinen verstanden werden.

Die anhaltende Degradierung der Mikrotubuli beeinträchtigt jedoch mehrere Zellvorgänge. So sind die Bewegungen der ERES verringert und weniger stark gerichtet [71,72], da auch ein langreichweitiger Transport der ERES über die Motorproteine Kinesin und Dynein unterbunden ist [130,132]. Des Weiteren fragmentiert der Golgi-Apparat und sekretorische Frachtmoleküle werden im ER zurückgehalten [114,133]. Diesbezüglich werden Verlagerungen peripherer Membranproteine durch die Inkubationszeit von 30 min experimentell ausgeglichen. Längerfristig bewirkt die Einwirkung von Nocodazol einen Zusammenfall des ERs mit Akkumulation der ERES [114] und einen mitotischen Stillstand der Zellen, der von Schädigungen des Chromatins begleitet ist [152,153]. Die Experimente weisen daher eine kurzzeitige Anpassung des punkartigen ERES-Musters nach.

#### III. Zusammenwirken mit strukturgebenden Proteinen des ERs

Unter dem Knockdown strukturgebender Proteine des ERs in Abschnitt 4.6 verringerte sich die tubuläre Gestalt des ER-Netzwerks bei den Konfokalaufnahmen fluoreszenzmarkierter HeLa-Zellen. Im Zuge dessen formten sich überwiegend flächige ER-Strukturen, die bei manchen Zellen flächendeckend ausgedehnt waren. Bei unveränderten Phänotypen der Negativkontrolle wurde eine um ca. 66 % verringerte Expression von Lunapark-Proteinen anhand eines Westernblots bestimmt. Insgesamt stimmen die ER-Phänotypen mit dem flächigen Erscheinungsbild überein, das für verschiedene ER-Markierungsproteine und Varianten des Gen-Knockdowns von Lunapark in Säugetierzellen berichtet wird [102–104]. Neben Lunapark sind jedoch andere Proteinfamilien und Interaktionen dieser für die Formgebung des ERs entscheidend [20, 101]. Deshalb kann das tubuläre ER-Netzwerk auch unter einem Knockout von Lunapark nicht bei allen Zellen unterdrückt werden [103].

Bei den Knockdown-Zellen existierten etwa 100 größtenteils sphärische Aggregationen mit einer erhöhten Fluoreszenz von Sec16-GFP und etwa 200 beugungsbegrenzten ERES in peripheren Zellregionen. Somit verlagerte sich das Fluoreszenzverhältnis von den ERES-Singletts zu den ERES-Clustern und diese prägten die Eigenschaften aller ERES. Gleichartige Aggregationen wurden von fluoreszenzgekoppelten Markierungsproteinen der COPII-Vesikelhüllen nachgewiesen. Im derzeitigen Forschungsstand ist eine Aggregation der ERES-spezifischen Proteine im Sinne einer physikalisch begründeten Entmischung auf flächigen ER-Strukturen, wie sie in Abb. 4.1b skizziert ist, nicht bekannt.

In biologischem Zusammenhang sind jedoch Anpassungen der ERES und ihres Musters dokumentiert [30,118,127]. So verstärkt sich die Fluoreszenz der ERES unter einer seruminduzierten Stimulation oder der Freisetzung zurückgehaltener Frachtmoleküle, die jeweils mit einer veränderten Anzahl der ERES einhergehen [118,127]. Daneben können die ERES ihre Größe verdoppeln [30] und gestreckte Exportstrukturen [28–30] über das Zusammenwirken mit Tango1 [29,128] ausbilden. Da hohe Membrankrümmungen für die Entwicklung der ERES wesentlich sind [113], könnte der Proteinumsatz im frühen sekretorischen Weg [25] durch die Veränderungen des ERs beeinträchtigt sein. Dies ließe sich über Fluoreszenzerholungsexperimente an einzelnen ERES [118,119] und der Zeitentwicklung des ERES-Musters unter der RNA-Interferenz tiefergehend untersuchen.

# IV. Zusammenwirken mit der tubulären Beschaffenheit des ERs

Wie in Abschnitt 4.7 dargelegt, wurde das kontinuierliche Membransystem des ERs durch die Behandlung mit Filipin in etwa 700 unverbundene Fragmente aufgelöst. Das punktartige Lokalisationsmuster von ca. 600 beugungsbegrenzten ERES war auf den ER-Fragmenten mit einem Durchmesser von ca. 1 µm gleichbleibend erhalten. Bei einer unveränderten Gesamtfluoreszenz von Sec16-GFP verstärkte sich dabei die Fluoreszenz der ERES. Dies bekräftigt eine Konzentration von membrangebundenem Sec16-GFP in einer zentralen Domäne innerhalb eines ER-Fragments, entsprechend zum diffusionsbestimmten Entmischungsszenario eines unterteilten Membransystems aus Abschnitt 4.10. Basierend auf dieser Modellvorstellung und dem unveränderten Lokalisationsmuster von Sec16-GFP, lässt sich folgern, dass der diffusionsbestimmte Austausch ERES-spezifischer Proteindomänen auf dem tubulären ER-Netzwerk der unbehandelten Zellen limitiert ist.

#### V. Zusammenwirken unter hypotonischer Behandlung

Durch einen hypoosmotischen Schock (siehe Abschnitt 4.8) wandelten das ER und andere membrangebundene Organellen ihre Gestalt zu intrazellulären Vesikeln, deren Lumen und Membranen räumlich separierten. Die etwa 300 ER-Vesikel der HeLa-Zellen wiesen eine sphärische Beschaffenheit mit einem Durchmesser von ca. 1 µm auf. Unter einer stark verringerten Fluoreszenz wurden zwei Lokalisationsmuster von ERES-spezifischen Proteinen verzeichnet. So zeigten ca. 40 % der Zellen 150 punktartige Ansammlungen von Sec16-GFP oder fluoreszenten COPII-Proteinen auf den Membranen der ER-Vesikel. Diese Lokalisation wurde von temperaturbedingten Phasentrennungen der ER-Membranen [39] nicht beeinflusst. Demgegenüber bildeten wenige Zellen ca. 100 flächige Ansammlungen von Sec16-GFP. Diese Aggregationen lokalisierten einzig auf Vesikeloberflächen ohne eine Fluoreszenz des ER-Lumens und grenzten häufig an die ER-Vesikel an. Die veränderte Fluoreszenz und Lokalisation unter der hypotonischen Einwirkung verdeutlichen, dass die Entwicklung des ERES-Musters auch von biochemischen Aspekten bestimmt wird. Um erklären zu können, weshalb sich das Lokalisationsmuster von Sec16-GFP trotz vergleichbarer Gestalt der ER-Vesikel und ER-Fragmente unterscheidet, müssten mikroskopische Eigenschaften der ERES-spezifischen Proteine untersucht werden. Dabei könnte die Beständigkeit der ERES auf den ER-Vesikeln durch Sec16 als potentielles Trägerprotein [112,116] vermittelt sein, das oligomerisieren kann [112,154]. Auf anderen Vesikeln scheinen die Eigenschaften von Sec16-GFP verändert zu sein, was Aggregationen dieser Proteine ermöglicht. Insofern könnten die stellenweise erhaltenen Membrankontaktstellen [39] Übergänge von Sec16-GFP auf die Oberflächen anderer Vesikel ermöglichen, die von Phasentrennungen der ER-Membranen an diesen Stellen [39] begünstigt sein könnten.

#### VI. Modellerklärung der ERES-Musterbildung über einen Entmischungsvorgang

Mit der von Herrn Professor Weiß entwickelten Modellierung einer diffusionsbestimmten Entmischung [136] konnte das Lokalisationsmuster der ERES bei verschiedenen Membrangeometrien des ERs erklärt werden (siehe Abschnitt 4.10). Hierbei waren Entmischungsvorgänge auf einer ausgedehnten Membran von unterschiedlich großen Proteindomänen gekennzeichnet. Deren Größen spiegelten die breite Flächenverteilung der ERES bei den Zellen der RNA-Interferenz wider. Auf kleineren Oberflächen konzentrierten sich die Teilchen hingegen in einer zentralen Domäne und zeigten nur geringfügige Größenunterschiede. Dieser Grenzfall eines wohlgemischten Systems charakterisierte die Musterbildung der ERES auf den ER-Fragmenten unter der Einwirkung von Filipin. Bei der Entmischung auf dem nachgebildeten ER-Netzwerk war der diffusionsbestimmte Austausch zwischen den Membranbereichen stark limitiert, was nahezu einheitliche Proteindomänen einer gitterartigen Anordnung bewirkte. Dies erinnerte an das punktartige Lokalisationsmuster der ERES auf dem tubulären ER. Die Beständigkeit gegenüber verschiedenen Spaltöffnungen bekräftigte den Erhalt des ERES-Musters unter dem Einfluss von Nocodazol.

Die Modellerklärung einer diffusionsbestimmten Entmischung ermöglicht somit eine Bezugnahme zwischen der Beschaffenheit der ERES und des ERs auf zellulärer Ebene. Die Modellierung könnte jedoch um mikroskopische Details erweitert werden, um die Eigenschaften der ERES quantitativ und unter den Veränderungen der hypotonischen Behandlung nachzubilden. So werden Tangol- und Sec16-Proteine für die Entwicklung der ERES bei menschlichen Zellen benötigt [24,154]. Diese interagieren zudem mit den COPII-Proteinen und können in ihren Eigenschaften reguliert werden [27,129]. Außerdem ließen sich größenabhängige Anpassungen der ERES [118,127] über Aufspaltungen der Proteindomänen modellieren und strukturelle Eigenschaften des ER-Netzwerks [81,134] berücksichtigen. Diese Erweiterungen erfordern jedoch umfassende Kenntnis der Proteininteraktionen und Membrantopologie. Entgegen eines Entmischungsvorgangs, könnte die Ausbildung der ERES über ein Modell von Bindungsstellen auf dem ER dargestellt werden.

# VII. Musterbildung der ERES: Perspektive

Insgesamt gesehen vermitteln diese Ergebnisse eine entscheidend mit der Beschaffenheit des ERs verbundene Anordnung der ERES, die mit einem diffusionsbestimmten Entmischungsvorgang physikalisch erklärt werden kann. In dieser Hinsicht ließe eine selbstorganisierte Musterbildung der ERES, welche durch die strukturellen Eigenschaften des ERs abgestimmt werden kann, flexible Anpassungen lebenswichtiger Zellprozesse unter veränderten Umgebungsbedingungen ermöglichen. Demnach könnte der Übergang von einem punktartigen zu einem ringförmigen Lokalisationsmuster der ERES während der Differenzierung bei Muskelzellen durch die Umstrukturierungen des ERs in das weitläufige Netzwerk des sarkoplasmatisches Retikulums veranlasst sein [155]. Gleichermaßen ist der Rückgang von ERES während der Zellteilung [129] mit strukturellen Umwandlungen des ERs [19,106] verbunden, auch wenn die Wechselbeziehungen zwischen verschiedenen ERES-spezifischen Proteinen vom Zellzyklus abhängig reguliert werden können [129].

# Dynamik von Aktinfilamenten im eukaryontischen Zellkern

5	Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik					
	5.1	Motivation: Aktin im Zellkern				
	5.2	2 Material, Methoden und Auswertung				
	5.3	3 Charakterisierung filamentösen Aktins im Zellkern				
	5.4	Aktinfilamentdynamik unbehandelter Zellen				
		5.4.1	MSD, Anomalieparameter und Transportkoeffizient			
		5.4.2	Nicht-Gaußsche und heterogene Diffusion			
		5.4.3	Zeitkorreliertes Bewegungsverhalten			
		5.4.4	Spektrale Leistungsdichte und Variationskoeffizient			
		5.4.5	Dynamik gebündelter Aktinfilamente			
		5.4.6	Dynamik zytoplasmischer Aktinfilamente			
		5.4.7	Gegenüberstellung der Dynamik nuklearen Aktins			
	5.5	Nuklea	res Aktin unter biochemischen Veränderungen			
		5.5.1	Aktinfilamentdynamik unter Nocodazol			
		5.5.2	Aktinfilamentdynamik unter hypotonischer Behandlung $\ldots$ $\ldots$ $107$			
		5.5.3	Aktinfilamentdynamik unter hypertonischer Behandlung 109			
		5.5.4	Reorganisation und Dynamik unter Valproinsäure $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 110$			
		5.5.5	Reorganisation unter Trichostatin A $\ldots \ldots 114$			
		5.5.6	Gegenüberstellung der Dynamik punktartiger Aktinfilamente $\ldots$ 116			
	5.6	Zusammenfassung, Modellbildung und Diskussion $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots 118$				
		5.6.1	Schematische Modellierung der Aktinfilamentdynamik			
		5.6.2	Diskussion der Aktinfilamentdynamik im aktuellen Forschungsstand . 125			

# 5 Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik im Zellkern

Dieses Kapitel behandelt dynamische Eigenschaften filamentösen Aktins im Zellkern. Hierzu werden die Bewegungen nuklearer Aktinfilamente mit Einzelteilchenverfolgungsexperimenten registriert und über vielfältige Kenngrößen anomaler Diffusion analysiert. Ebenfalls wird die Lokalisation und Dynamik von Aktin unter biochemischen Veränderungen der Zellen untersucht. Zusammen mit einer schematischen Modellierung der Aktinfilamentdynamik kann somit eine physikalische Interpretation zur bisher vorwiegend biologisch fokussierten Untersuchung nuklearen Aktins beigetragen werden.

# 5.1 Motivation: Aktin im Zellkern

Nachdem die Existenz filamentösen Aktins im Zellkern über mehrere Jahrzehnte kontrovers diskutiert wurde, ist diese nun zweifelsfrei anerkannt und einige Aspekte der vielschichtigen Funktionen nuklearen Aktins sind vergleichsweise gut verstanden [156–159]. Insbesondere verstärkt sich die zentrale Bedeutung der Polymerisation nuklearer Aktinfilamente, um eine wandlungsfähige Strukturierung des Zellkerns und eine beständige Organisation des Chromatins sicherzustellen [15,160–162]. In diesem Kontext werden die Transkription der DNA [158–160] als auch die Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen in kondensiertem wie gelockertem Chromatin [16,17,163,164] über Interaktionen durch nukleares Aktin vermittelt. Ebenfalls ist die Polymerisation von Aktinfilamenten entscheidend in die Regulation und Umgestaltung von Chromatin involviert [15,160–162], auch bei der Zellteilung [161,165] oder bei Anpassungen auf externe Stimulationen [166–168]. Dabei sind Transportvorgänge im Zellkern häufig mit Myosinen und damit assoziierten Aktinfilamenten verbunden [159,164]. Ferner wird der Austausch globulären Aktins mit dem Zytoplasma präzise gesteuert, indem dessen Bindungseigenschaften zu signalgebenden Proteinen kontrolliert reguliert werden [15,162].

Insgesamt konnten zwar, auch dank entscheidender Fortschritte bei der Visualisierung durch fluoreszente Reportermoleküle [169–172], viele Funktionen von Aktin im Zellkern identifiziert werden, aber die Bedeutung nuklearer Aktinfilamente ist bislang noch nicht umfassend ergründet [15,159–161]. Insbesondere sind beteiligte Interaktionspartner wie Formine oder die Familie von Aktin-ähnlichen Proteinen (ARP) und deren Wechselbeziehungen im Detail aufgeschlüsselt [16,17,160]. Physikalische Aspekte der dynamischen Rekrutierung nuklearer Aktinfilamente sind jedoch weitaus weniger untersucht. Lediglich wird über eine Brownsche Bewegung mit teilweise räumlich eingeschränkter Diffusion von Utrophin-markierten Aktinfilamenten im Zellkern berichtet [169]. Hingegen ist die Reparaturdynamik von DNA-Doppelstrangbrüchen besser erforscht [17,164,173]. So bewegen sich die Reparaturstellen von geschädigter DNA überwiegend subdiffusiv in Hefe- wie Säugetierzellen [174,175] und werden kurzzeitig über eine von Myosin-gesteuerte Relokalisation entlang nuklearen Aktins an die Kernhülle gerichtet transportiert [17,164]. Somit könnten die dynamischen Eigenschaften nuklearen Aktins und die Veränderungen unter biochemischen Einflüssen einen tieferen Einblick über die Organisation des Zellkerns sowie des Genoms vermitteln und eine Modellbeschreibung der Aktindynamik könnte weitere physikalische Perspektiven dieser lebensnotwendigen Prozesse eröffnen.

# 5.2 Material, Methoden und Auswertung

Im Folgenden werden fluoreszenzmarkierte U2OS-Zellen mit Aufnahmen konfokaler Lichtmikroskopie untersucht, die eventuellen biochemischen Behandlungen zur Veränderung zellulärer Molekülstrukturen unterliegen (siehe Anhang A, B, D, F für Details).

#### Visualisierung von Aktin und Chromatin

In den Bildgebungsexperimenten zur Kovisualisierung Aktins und Chromatins werden Spinning-Disk Serienaufnahmen mit einer Belichtungszeit von  $\Delta t = 0.2$  s über 35 – 50 konfokale z-Bildebenen im Abstand von  $\Delta z = 0.2$  µm bei einer Temperatur von 37 °C aufgezeichnet (siehe Anhang B). Hierbei wird filamentöses Aktin über die Fluoreszenz der Utrophin-Trunkierungsmutante UTR230-GFP [169] im grünen Kanal ( $\lambda_{Anr.} = 491$  nm,  $\lambda_{Det.} = 500 - 550$  nm) abgebildet. Im roten Kanal ( $\lambda_{Anr.} = 561$  nm,  $\lambda_{Det.} = 575 - 625$  nm) wird Chromatin über die fluoreszenzmarkierten Histone 2B-mCherry [176] detektiert. Daneben wird filamentöses Aktin bei ergänzenden Experimenten über die Fluoreszenz von Lifeact-GFP/RFP [177,178] oder an nukleare Importsequenzen gekoppeltes Lifeact-GFP [169] visualisiert. Eine Referenz bilden fixierte U2OS-Zellen mit Aktinfärbungen über fluoreszenzmarkiertes Phalloidin (siehe Anhang A).

#### Einzelteilchenverfolgungsexperimente nuklearer Aktinfilamente

Für die Einzelteilchenverfolgung nuklearer Aktinfilamente werden Zeitserienaufnahmen von U2OS-Zellen im grünen Anregungs- und Detektionskanal erstellt. Die Zellen sind über Nukleofektion mit UTR230-GFP [169] transient transfiziert. Es werden bis zu 1250 Einzelbilder der Zeitauflösung von  $\Delta t = 0.1$  s aufgenommen. Während der Messungen ruht die Lüftung der vorgewärmten Klimatisierungskammer, um externe Vibrationen zu verringern. Aus den konfokalen Fluoreszenzaufnahmen werden zeitabhängige Positionen nuklearen Aktins extrahiert und zu kontinuierlichen Einzelteilchentrajektorien verbunden. Hierzu wird eine ImageJ-Fiji [141] Bildverarbeitungsroutine zur Kontrastverbesserung, Registrierung und Einzelteilchenverfolgung (Erweiterung Trackmate [179]) entwickelt und angewandt (siehe Anhang D.2). Die minimale Länge einer Aktinfilamenttrajektorie beträgt 50 Zeitschritte, bei einer Größe eines Bildpunktes von  $\Delta x = 56.2$  nm nach der Bildverarbeitung. Die Gesamtteilchenensemble aus 7 – 20 Zellkernen umfassen zwischen 2000 – 5000 Trajektorien von Aktin mit Trajektorienlängen von 50 – 200 Zeitschritten.

#### Biochemische Veränderungen der Kulturzellen

Die biochemischen Veränderungen der transfizierten U2OS-Zellen umfassen die Behandlung mit Nocodazol, einem hypo- bzw. hypertonischen Kulturmedium, Valproinsäure und Trichostatin A (siehe Anhang A.5). Mit Nocodazol werden die Mikrotubuli zerstört und deren Polymerisation unterbunden [71]. In wässrigem Kulturmedium formen sich mikrometergroße intrazelluläre Vesikel vieler membrangebundener Organellen und die Filamente des Zytoskeletts werden nahezu vollständig zerstört [39]. Unter der von einer hypertonischen Saccharose-Lösung bedingten Wasserabgabe der Zellen segregieren verschiedene Bestandteile des Zellkerns und Chromatin verdichtet sich zunehmend [180]. Mit der Einwirkung von Valproinsäure oder Trichostatin A werden die Deacetylierungen der Histone gehemmt und DNA-Schädigungen hervorgerufen [181,182]. Hierbei bedingt die verstärkte Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen räumliche Umstrukturierungen von Chromatin, die weitere Dekondensationen der Chromatinfasern bewirken [181,182].

#### Auswertung und Simulation der Aktinfilamentdynamik

Die statistischen Auswertungen (siehe Anhang D.2) der Einzelteilchentrajektorien nuklearen Aktins erfolgen mit eigenen Matlab-Skripten, deren Funktionsweise über Random-Walk Simulationen und Diffusionsexperimente fluoreszenter Nanopartikel in wässrigen Glycerinmischungen sowie zellartigen Fluiden [78] verifiziert wurde. Die Untersuchungen beruhen auf spezifischen Kenngrößen, die verschiedene Eigenschaften einer anomaler Diffusion quantitativ between (siehe Abschnitt 2.3.5). Insbesondere werden die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) mit generalisiertem Transportkoeffizienten  $K_{\alpha}$  und Anomaliewert  $\alpha$ , die Statistik normierter Schrittinkremente  $p(\chi)$ , der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  sowie die Autokorrelationsfunktionen der quadrierten Inkremente  $G_{\Delta r^2}(\tau)$ , lokalen Diffusivitäten  $G_{\Delta K}(\tau)$  und Geschwindigkeiten  $C_v(\tau)$  analysiert. Zudem werden die spektrale Leistungsdichte  $PSD(\omega)$  mit dem Variationskoeffizienten  $\gamma(f)$  der, ggf. normierten, Trajektorien Aktins im Zellkern untersucht. Dabei sind nähere Informationen zu diesen zentralen Kenngrößen für die verschiedenen Ensemble der Aktinfilamenttrajektorien in Anhang F tabelliert und werden im Folgenden als Mittelwert mit Standardabweichung über alle Zellen angegeben. Die statistische Signifikanz innerhalb der experimentellen Häufigkeitsverteilungen (Kennzeichnung  $(\star)$ ) wird über geeignete Hypothesentests beurteilt, wobei alle Signifikanzniveaus  $\alpha = 0.05$  betragen (siehe Anhang D.3).

Weiterhin werden Einzelteilchentrajektorien zweidimensionaler fraktioneller Brownscher Bewegung (FBM) nach der spektralen Zirkulantenmethode [183] erstellt, mit denen die Auswertung nicht nur verifiziert, sondern auch die Dynamik nuklearer Aktinfilamente simuliert wird. Diesbezüglich bildet die schematische Modellierung eine Grundbewegung nach einer subdiffusiven FBM mit zeitveränderlichen und heterogenen Beweglichkeiten im Zellkern ab und berücksichtigt ebenfalls statische Lokalisationsunsicherheiten der experimentellen Einzelteilchendetektion (siehe Anhang D.2).

# 5.3 Charakterisierung filamentösen Aktins im Zellkern

Die Möglichkeiten filamentöses Aktin in lebenden Zellen und besonders die geringen Mengen innerhalb des Zellkerns fluoreszent zu markieren sind stark begrenzt, da die wissenschaftliche Referenzfärbung mit Phalloidin nur schwer die Kernhülle durchdringt und zudem fixierte Zellen voraussetzt [16,172]. Zu den verbreitetsten Molekülen für die Lebendzellvisualisierung von Aktinfilamenten zählen fluoreszenzgekoppelte Proteine von Lifeact, F-Tractin oder Utrophin. Diese binden hochspezifisch an zelluläres Aktin, können jedoch auch die Bindungseigenschaften globulären Aktins verändern und filamentöses Aktin weiterhin stabilisieren [16,172]. In der Veröffentlichung von BELIN et al. [169] wurden verschiedene Moleküle für die Visualisierung von monomerischem oder filamentösem Aktin in Kernen lebender Zellen entwickelt und überprüft. Weitere Fluoreszenzreporter, mit denen nukleare Aktinfilamente bei lebenden Zellen markiert werden können, finden sich z.B. in [170,171] und werden in [172] gegenübergestellt.

In dieser Arbeit wird die fluoreszente Utrophin-Trunkierungsmutante UTR230-GFP aus [169] genutzt, um die Dynamik filamentösen Aktins im Zellkern näher zu untersuchen. Durch die Veröffentlichung [169] ist bekannt, dass UTR230-GFP endogene Strukturen von kurzen Aktinfilamenten im Zellkern kennzeichnet. Mit UTR230-GFP markiertes Aktin befindet sich vermehrt in Interchromatinregionen und kolokalisiert zu phalloidinmarkiertem Aktin im Zytoplasma sowie nach der Einwirkung von Latrunculin B auch im Zellkern [169]. Zunächst wird das Lokalisationsmuster nuklearer Aktinfilamente mit den Phänotypen aus [163,169] verglichen, womit eine korrekte Expression von UTR230-GFP innerhalb der verwendeten U2OS-Zelllinie überprüft werden soll. Bei der gleichzeitigen Visualisierung von UTR230-GFP und H2B-mCherry (siehe Abb. 5.1) zeigen sich drei charakteristische Phänotypen der U2OS-Zellen: punktartig bis filamentöses nukleares Aktin, gebündeltes nukleares Aktin und zytoplasmisches Aktin.

#### Phänotyp I: punktartiges bis filamentöses nukleares Aktin

Eine repräsentative Aufnahme von punktartigem bis filamentösem nuklearen Aktin ist in Abb. 5.1a dargestellt. Diese Strukturen von UTR230-GFP bilden punktförmige bis kurze Filamente mit einer typischen Länge von etwa 500 nm im Nukleoplasma aus. Die Filamente von UTR230-GFP befinden sich vermehrt in der oberen Hälfte des Zellkerns und in Bereichen außerhalb des mit H2B-mCherry markierten Chromatins. An der Kernhülle ist die Dichte der Aktinfilamente etwas erhöht. Neben der starken Hervorhebung von etwa 100 - 300 kurzen Aktinfilamenten im Zellkern sind vereinzelt punktförmige Strukturen im Zytoplasma erkennbar. Auch werden zytoplasmische Stressfasern und der aktinfilamente umfasst etwa 40 % der U2OS-Zellen. Weitere 30 % der Zellen weisen eine vergleichbare Lokalisation mit einer schwächeren Expression von UTR230-GFP auf, wodurch nukleares Aktin weniger gut erkennbar ist. Eine eindeutige Klassifikation ist jedoch nicht möglich.

81

#### 5 Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik



Abb. 5.1: Lokalisationsmuster nuklearen Aktins unbehandelter U2OS-Zellen.
(a) Im Zellkern existieren hunderte punktförmige bis filamentöse Aktinstrukturen. UTR230-GFP lokalisiert im Interchromatinbereich (H2B-mCherry), vermehrt in der oberen Hälfte des Zellkerns und bindet an zytoplasmische Stressfasern und den Aktinkortex. Weniger häufig existieren (b) gebündelte, nukleare oder (c) punktartige, zytoplasmische Aktinfilamente.

Insgesamt stimmt das Lokalisationsmuster von UTR230-GFP mit den Phänotypen der markierten U2OS-Zellen aus [169] überein. Diesbezüglich sind die Häufigkeiten des nuklearen Aktins vergleichbar mit den als diffus (ca. 53%) und filamentös (ca. 40%) bezeichneten Phänotypen von UTR230-GFP markierten HeLa-Zellen [163]. Wie auch in [169] berichtet, sind die nuklearen Aktinfilamente hochdynamisch. Deren dynamische Aspekte werden in den Abschnitten 5.4.1–5.4.4 näher untersucht und in Abschnitt 5.4.7 mit den weiteren Phänotypen unbehandelter Zellen verglichen.

#### Phänotyp II: gebündeltes nukleares Aktin

In Abb. 5.1b ist eine charakteristische Aufnahme von gebündelten Aktinstrukturen im Zellkern gezeigt. In diesen Zellen bilden sich etwa 50, zumeist sphärische, Bündel von UTR230-GFP mit einem Durchmesser von ca. 1 µm und einer höheren Fluoreszenz aus. Manche Zellen verfügen über elongierte Filamente mit Längen im Bereich von 1 - 3 µm. Insgesamt werden gebündelte Aktinstrukturen von UTR230-GFP bei etwa 10 - 15% der transfizierten Zellen beobachtet. Häufig bestehen in diesen Zellkernen Gebiete mit einer erhöhten Fluoreszenz von H2B-mCherry, was besonders dichte Chromatinregionen reflektiert. Die gebündelten Aktinfilamente lokalisieren ausschließlich außerhalb dieser Bereiche, grenzen jedoch häufig daran an. Indessen ist das Lokalisationsmuster von UTR230-GFP an den zellulären Stressfasern, dem Aktinkortex und zytoplasmischen Aktin unverändert zum Phänotyp punktartiger Aktinfilamente.

In der Literatur [163,169] werden Phänotypen von gebündeltem UTR230-GFP nicht explizit für unbehandelte Zellen berichtet. Allerdings besteht eine große Ähnlichkeit zu den am häufigsten vorkommenden Phänotypen, wenn nukleoplasmische Exportfaktoren über eine RNA-Interferenz unterbunden werden [169]. Im Zuge dessen wird auf einen zehnprozentigen Anteil von unbehandelten oder Kontrollzellen hingewiesen, bei denen wenige Foki mit einer höheren Fluoreszenz von UTR230-GFP registriert werden [169]. Es ist davon auszugehen, dass ein verstärkter Import oder verminderter Export die Bündelung von nuklearen Aktin in gewissen Zellen begünstigt. Die gebündelten Aktinfilamente sind weiterhin mobil, allerdings sind deren Bewegungen stark gegenüber der Dynamik punktartigen Aktins im Zellkern verringert. Die dynamische Eigenschaften gebündelter Aktinfilamente werden in Abschnitt 5.4.5 analysiert und in 5.4.7 gegenübergestellt.

#### Phänotyp III: punktartiges bis gebündeltes, zytoplasmisches Aktin

Für die übrigen ca. 15 % der Zellen ist die Expression von UTR230-GFP außerhalb der Zellkerne verstärkt. Das zytoplasmische Lokalisationsmuster variiert zwischen hunderten punktartigen Aktinfilamenten (siehe Abb. 5.1c) und größeren, zumeist runden Aktinbündeln, deren Form und Größe (Durchmesser ca. 1 µm) gleichartig zu gebündeltem Aktin im Zellkern ist. Häufig zeigen sich bei diesen Zellen ausgeprägte zytoplasmische Stressfasern bei einer starken Fluoreszenz des Aktinkortex und weiteren Regionen mit dekondensiertem Chromatin. Die größeren Aggregationen von UTR230-GFP bilden sich jedoch nicht zwangsläufig im Zytoplasma der Zellen, deren Gesamtfluoreszenz erhöht ist.

Die Phänotypen mit einer mehrheitlich zytoplasmischen Lokalisation von UTR230-GFP und gebündeltem Aktin nahe der Kernhülle werden in [163] für 7% der Zellen berichtet. Es ist möglich, dass eine erhöhte Expression von UTR230-GFP die Aggregierung von UTR230-GFP an zytoplasmischen Aktinfilamenten verstärkt und sich eventuell nichtendogene Aktinstrukturen bilden. Die Dynamik punktartigen Aktins im Zytoplasma wird in Abschnitt 5.4.5 untersucht und in 5.4.7 mit den anderen Phänotypen unbehandelter Zellen verglichen. Weitere Informationen über die Aggregierung von UTR230-GFP nach biochemischen Veränderungen der Zellen werden in Abschnitt 5.5 diskutiert.

#### Referenzfärbungen mit Phalloidin

In diesem Zusammenhang bildet sich ein zu Abb. 5.1a vergleichbares Lokalisationsmuster von zellulärem Aktin an den zytoplasmischen Stressfasern und dem Aktinkortex, wenn untransfizierte Kontrollzellen mit fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin markiert werden (nicht gezeigte Experimente). Bei einer zusätzlichen Phalloidinfärbung von UTR230-GFP transfizierten Zellen kolokalisiert Phalloidin an allen zytoplasmischen Aktinstrukturen von UTR230-GFP (siehe auch Abb. 5.18d). Hierbei kann eine Kolokalisation zwischen UTR230-GFP und phalloidinmarkierten Aktinfilamenten im Zellkern unter weiteren biochemischen Veränderungen der Zellen erzielt werden (siehe Experimente in [169]).

# 5.4 Aktinfilamentdynamik unbehandelter Zellen

In diesem Abschnitt werden dynamische Eigenschaften nuklearen Aktins biochemisch unbehandelter Zellen untersucht. Zunächst werden punktartige Aktinfilamente (Phänotyp I aus Abschnitt 5.3) in den Abschnitten 5.4.1–5.4.4 anhand charakteristischer Eigenschaften anomaler Diffusion analysiert. Anschließend werden gebündeltes, nukleares (Phänotyp II) und punktartiges, zytoplasmisches Aktin (Phänotyp III) in Abschnitt 5.4.5 bzw. 5.4.6 untersucht und in Abschnitt 5.4.7 miteinander verglichen. Dabei ist eine nähere Übersicht zentraler Kenngrößen in Anhang F tabelliert.

Bei den nachfolgenden Untersuchungen ist es wichtig, mehrere Aspekte experimenteller Einzelteilchentrajektorien zu beachten. So sind die Trajektorien auf 50 – 200 Schritte der Zeitauflösung  $\Delta t = 0.1$ s begrenzt und es können Detektionen fehlen. Infolge sich überlappender Zeitfenster sind zeitgemittelte Größen statistisch nicht unabhängig und die registrierten Bewegungen werden von statischen wie dynamischen Lokalisationsunsicherheiten verfälscht. Diese Einschränkungen können mit wiederholten Unterabtastungen und statistischen Verfahren kompensiert werden, besonders wenn die Diffusionseigenschaften über spezifische Kenngrößen und teilweise redundante Vorgehensweisen bewertet als auch mit Modellbildungen verglichen werden (siehe Abschnitt 2.3.5).

5.4.1 Mittlere quadratische Verschiebung, Anomalieparameter und Transportkoeffizient Die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) ist die gebräuchlichste Kenngröße (siehe Übersichtsaritkel [41,55–57,67,68]), um die von den Aktinfilamenten zurückgelegten Wegstrecken und deren charakteristischen Zeitverlauf zu beschreiben. In Abb. 5.2 sind repräsentative Beispiele für das zeitgemittelte MSD individueller Trajektorien  $MSD_i(\tau)$ dargestellt. Für die Mehrheit nuklearer Aktinfilamente skaliert das  $MSD_i(\tau)$  stark subdiffusiv zur Verschiebungszeit  $\tau$ . Gewöhnlich beträgt der Anomaliewert der Diffusion  $\alpha_i \approx 0.5$ und der verallgemeinerte Transportkoeffizient  $K_{\alpha,i} \approx 30 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$ . Eine diffusive Skalierung findet sich nur für wenige Trajektorien.

Zur quantitativen Untersuchung der Aktinfilamentdynamik werden die individuellen  $MSD_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i}$  im Zeitbereich  $\tau = 0.2 - 2.5$  sangepasst. Die zurückgelegten Flächen



#### Abb. 5.2: Subdiffusives Skalierungsverhalten des MSDs.

Die  $\text{MSD}_i(\tau)$  punktartiger Aktinfilamente als auch das arithmetisch  $\langle \text{MSD}_i \rangle_a$  oder geometrisch  $\langle \text{MSD}_i \rangle_g$  mittlere MSD einer unbehandelten U2OS-Zelle skalieren stark subdiffusiv mit einem typischen Anomaliewert der Diffusion  $\alpha \simeq 0.55$  und werden für  $\tau = 0.2 - 2.5$  s an  $\text{MSD}_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i}$ angepasst (siehe Tab. 5.1 für nähere Details). Weiterhin sind repräsentative Kurven Aktins im Zellkern einer fixierten Zelle angegeben (siehe Abschnitt 5.5.3). 5.4 Aktinfilamentdynamik unbehandelter Zellen

$T_{ m Traj.}$ $N_{ m Traj.}$	$\begin{array}{c} 5-20\mathrm{s}\\ 4670 \end{array}$	$5 \mathrm{s}$ 8018	$\begin{array}{c} 10\mathrm{s} \\ 2452 \end{array}$	$20\mathrm{s}$ 502
$\begin{array}{c} \mathrm{MSD}_{i}(\tau\!=\!1\mathrm{s}) & [\mu\mathrm{m}^{2}] \\ \mathrm{\langle MSD}_{i}(\tau\!=\!1\mathrm{s}) \rangle & [\mu\mathrm{m}^{2}] \end{array}$	$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	$ \begin{array}{ } (27 \pm 29) \cdot 10^{-3} \\ (31 \pm 9) \cdot 10^{-3} \\ \end{array} $	$\begin{array}{c} (22\pm21)\cdot10^{-3} \\ (24\pm7)\cdot10^{-3} \end{array}$	$\begin{array}{c} (14 \pm 13) \cdot 10^{-3} \\ (16 \pm 5) \cdot 10^{-3} \end{array}$
$\left  \begin{array}{c} \alpha_i \\ \langle \alpha_i \rangle \end{array} \right $	$0.57 \pm 0.31$ $0.59 \pm 0.06$	$0.53 \pm 0.36$ $0.55 \pm 0.05$	$0.54 \pm 0.29 \\ 0.56 \pm 0.05$	$0.51 \pm 0.24$ $0.53 \pm 0.08$
$\frac{\text{MSD}_{\langle \text{MSD}_i \rangle_a}(1 \text{ s}) \ [\mu \text{m}^2]}{\text{MSD}_{\langle \text{MSD}_i \rangle_a}(1 \text{ s}) \ [\mu \text{m}^2]}$	$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	$\begin{array}{c} (25\pm7)\cdot10^{-3} \\ (17\pm6)\cdot10^{-3} \end{array}$	$\begin{array}{c} (16\pm5)\cdot10^{-3} \\ (12\pm4)\cdot10^{-3} \end{array}$
$lpha_{\langle { m MSD}_i  angle_a} \ lpha_{\langle { m MSD}_i  angle_g}$	$0.69 \pm 0.08$ $0.57 \pm 0.07$	$0.73 \pm 0.10$ $0.52 \pm 0.05$	$0.70 \pm 0.08$ $0.55 \pm 0.05$	$0.65 \pm 0.12 \\ 0.53 \pm 0.08$

Tab. 5.1: Diffusionscharakteristika punktartiger Aktinfilamente im Zellkern. Zusammengefasst sind das zeitgemittelte MSD individueller Trajektorien  $MSD_i(\tau)$  (Zeitpunkt  $\tau = 1 \text{ s}$ ) und der Anomalieparameter der Diffusion  $\alpha_i$  (Intervall 0.2 - 2.5 s) für die Gesamtteilchenensemble der Trajektorienlängen  $T_{\text{Traj.}}$ . Zudem sind  $\langle \alpha_i \rangle$  und  $\langle MSD_i \rangle$  im Zellmittel sowie beide Kenngrößen des arithmetisch oder geometrisch mittleren  $\langle MSD_i \rangle_{a,g}$  angegeben (Trajektorien von 20 Zellkernen, Angaben mit Standardabweichung, siehe auch Tab. F.1).

 $MSD_i(1 s) = K_{\alpha,i} \cdot 1 s$  und Anomaliewerte  $\alpha_i$  sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Für alle Trajektorienlängen  $T_{Traj}$  liegen stark subdiffusive Bewegungen von nuklearem Aktin vor. Hierbei beträgt der Anomalieparameter des Gesamtteilchenensembles  $\alpha_i = 0.6 \pm 0.3$  und das Ensemblemittel einzelner Zellen  $\langle \alpha_i \rangle = 0.6 \pm 0.1$ . Die mittleren in einer Sekunde überquerten Flächen werden zu  $\langle MSD_i(1 s) \rangle = 15 - 40 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2$  bestimmt. Ob die mittleren Transportkoeffizienten aller Teilchen oder die Zellmittelwerte betrachtet werden, ist von den Trajektorienlängen unabhängig. Allerdings verfügen längere Trajektorien über geringere Beweglichkeiten und Variationen (siehe Tab. 5.1).

Ebenso folgt das mittlere  $MSD(\tau)$  einer Zelle einem subdiffusiven Potenzgesetz mit vergleichbarer Skalierung (siehe Abb. 5.2). Bei arithmetischer Mittelung  $\langle MSD_i \rangle_a$  wird der mittlere Transportkoeffizient bestätigt und der Anomaliewert etwas überschätzt (siehe Tab. 5.1). Hingegen wird  $\langle \alpha_i \rangle$  unter geometrischer Mittelung  $\langle MSD_i \rangle_g$  bestätigt und  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  geringfügig unterschätzt. Dies ist eine Folge der heterogenen Beweglichkeiten innerhalb der Einzelteilchentrajektorien einer Zelle [75, 76, 78].

#### MSD-Anpassungen: Wahrscheinlichkeitsverteilungen und Lokalisationsunsicherheiten

Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen des Anomalieparameters  $p(\alpha_i)$  und generalisierten Transportkoeffizientens  $p(K_{\alpha,i})$  sind in Abb. 5.3 dargestellt. Diese werden aus Anpassung individueller  $MSD_i(\tau)$  für das Intervall  $\tau = 0.2 - 2.5$  s bestimmt. Alle folgenden Analysen beziehen sich auf das Teilchenensemble mit Trajektorienlängen  $T_{\text{Traj.}} = 5 - 20$  s.

Der Anomalieparameter individueller Aktinfilamente (siehe Abb. 5.3a) variiert stark und zeigt für etwa 85 % der Trajektorien eine subdiffusive Skalierung  $\alpha < 1$ . Infolge der asymmetrischen Verteilung von  $p(\alpha_i)$  sind die häufigsten Anomalieparameter  $\alpha_i$  etwas geringer als die Ensemblewerte  $\alpha_i = 0.57 \pm 0.31$  oder das Zellmittel  $\langle \alpha_i \rangle = 0.59 \pm 0.06$ . Der generalisierte Transportkoeffizient einzelner Aktinfilamente (siehe Abb. 5.3b) variiert



Abb. 5.3: Anomalieparameter und generalisierter Transportkoeffizient. Wahrscheinlichkeitsverteilungen des (a) Anomalieparameters  $p(\alpha_i)$  und (b) generalisierten Transportkoeffizientens  $p(K_{\alpha,i})$ , bestimmt aus Anpassungen der  $MSD_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i}$  für  $\tau = 0.2 - 2.5 \text{ s} (N_{\text{Traj.}} = 4670, T_{\text{Traj.}} = 5 - 20 \text{ s}, 20 \text{ Zellen})$ . Zusätzlich sind die Verteilungen aus Angleichung von  $MSD_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i} + L_i$ , die Zellmittel sowie die Werte des Bootstrapping-Verfahrens und eine logarithmische Normalverteilung von  $p(K_{\alpha,i})$  eingetragen.

über etwa zwei Größenordnungen zwischen  $K_{\alpha,i} \simeq 10^{-3} - 10^{-0.5} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$ , wobei die meisten Teilchen eine Beweglichkeit von  $30 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2$  innerhalb einer Sekunde aufweisen. Insgesamt wird  $p(K_{\alpha,i})$  sehr gut von einer logarithmischen Normalverteilung mit Mittelwert  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -1.63$  und Standardabweichung  $\sigma_{\log(K_{\alpha,i})} = 0.37$  beschrieben, wie es bei anderen Einzelteilchenverfolgungsexperimenten biologischer Systeme mit einer vergleichbaren Statistik verbreitet ist [61,69,71,78]. Weiterhin besteht das empirische Skalierungsverhalten  $K_{\alpha,i} = C \,\mathrm{e}^{2\alpha_i}$  [78,79] zwischen den Mobilitätsgrößen  $K_{\alpha,i}$  und  $\alpha_i$ der Aktinfilamentdynamik (Vorfaktor  $C = 7 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\mathrm{s}^{-\alpha}$ ).

Werden experimentelle Lokalisationsunsicherheiten der Teilchendetektion L bei der Anpassung der  $MSD_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i} + L_i$  einbezogen, verändern sich die Verteilungen  $p(\alpha_i)$ und  $p(K_{\alpha,i})$  nur wenig (siehe Abb. 5.3). So besitzt  $p(\alpha_i)$  eine asymmetrische Form und die Anomalieparameter nuklearen Aktins  $\alpha_i = 0.60 \pm 0.36$  als auch die Zellmittel  $\langle \alpha_i \rangle = 0.62 \pm 0.06$  erhöhen sich nur geringfügig. Insbesondere nimmt der Anteil superdiffusiver Trajektorien und damit auch die Heterogenität des Ensembles zu. Erneut wird  $p(K_{\alpha,i})$  von einer logarithmischen Normalverteilung wiedergegeben. Die Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,i} = (32 \pm 28) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  und  $\langle K_{\alpha,i} \rangle = (36 \pm 12) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  sind zu den Werten aus Tab. 5.1 unverändert. Demnach dokumentieren die Ergebnisse unter Berücksichtigung von Lokalisationsunsicherheiten ebenso eine stark subdiffusive Dynamik mit einer Beweglichkeit von wenigen  $10 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2$  innerhalb einer Sekunde.

Ferner kann die Anpassung  $MSD_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i} + L_i$  genutzt werden, die Lokalisationsunsicherheit  $\varsigma = \sqrt{L/2}$  zu bestimmen. Dabei beträgt  $\langle L_i \rangle = (6.9 \pm 2.8) \cdot 10^{-4} \, \mu m^2$  im Zellmittel oder  $L_i = (6 \pm 28) \cdot 10^{-4} \, \mu m^2$  über alle Filamente. Wie in Abb. 5.2 erkennbar, stimmt die Achsenverschiebung L sehr gut mit den nahezu konstanten  $MSD_i(\tau)$  der fixierten Zellen überein. Hiermit wird die experimentelle Unsicherheit bei der Lokalisation nuklearen Aktins zu  $\varsigma = \sqrt{L/2} \simeq 20 \, \text{nm}$  bestimmt. Darüber hinaus verdeutlichen die Schwankungen von  $L_i$  stärker fehlerbehaftete Angleichungen der  $MSD_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i} + L_i$ unter drei offenen Anpassungsparametern. Da sich die Verteilungen  $p(\alpha_i)$  und  $p(K_{\alpha,i})$ sowie die Ensemble- und Zellmittelwerte von  $\alpha_i$  und  $K_{\alpha,i}$  unter Berücksichtigung von Lnur marginal verändern, werden Lokalisationsunsicherheiten nicht weiter berücksichtigt. Alternativ könnten die  $MSD_i(\tau)$  mit  $-\langle L_i \rangle = -7 \cdot 10^{-4} \,\mu\text{m}^2$  korrigiert werden.

#### Bootstrapping-Verfahren und Zellstatistik

Außerdem wird das in [75,76] etablierte Bootstrapping-Verfahren angewandt, wodurch statistisch gesicherte Aussagen über die Mittelwerte der Häufigkeitsverteilungen  $p(\alpha_i)$ und  $p(K_{\alpha,i})$  erlaubt werden. Dazu werden 100 MSD<sub>i</sub>( $\tau$ ) aus dem Gesamtteilchenensemble zufällig ausgewählt und deren arithmetisch oder geometrisch mittleres  $(MSD_i(\tau))$  im Zeitbereich  $\tau = 0.2 - 2.5$  s angepasst. Die durch 200 Iterationen dieses Verfahrens nachgebildeten Mittelwerte sind in Abb. 5.3 eingetragen. Mit dem Bootstrapping-Verfahren werden ein Anomaliewert  $\langle \alpha \rangle_q = 0.55 \pm 0.04$  und ein generalisierter Transportkoeffizient  $\langle K_{\alpha} \rangle_a = (25 \pm 10) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  der nuklearen Aktinfilamente bestimmt. Wie bereits beim zellmittleren  $\langle MSD_i(\tau) \rangle$  in Tab. 5.1 ersichtlich ist, überschätzt  $\langle \alpha \rangle_a = 0.68 \pm 0.05$ den Anomalieparameter und  $\langle K_\alpha\rangle_g = (15\pm7)\cdot 10^{-3}\,\mu{\rm m}^2\,{\rm s}^{-\alpha}$ unterschätzt den generalisierten Transportkoeffizienten. Somit werden die Zellmittelwerte  $\langle \alpha_i \rangle$  und  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  mit deren Standardabweichung über das Bootstrapping-Verfahren bestätigt. Dies bekräftigt weiter, dass die Mittelwerte der 20 unbehandelten Zellen statistisch das Gesamtteilchenensemble repräsentieren. Insbesondere wirkt sich die verschiedene Anzahl zwischen ca. 50 - 400Trajektorien einer Zelle nicht auf den Zellmittelwert und dessen Standardabweichung aus. Insgesamt verdeutlicht das Bootstrapping-Verfahren [75, 76] die stark subdiffusiven Bewegungen punktartiger Aktinfilamente im Zellkern.

# Bestimmung des Anomalieparameters ohne Anpassung der MSD-Kurven

Weiterhin wird der Anomalieparameter ohne Anpassung der zeitgemittelten MSD-Kurven mit dem in [73] entwickelten Resampling-Verfahren bestimmt. Diesbezüglich berechnet sich der Anomaliewert einer Einzelteilchentrajektorie aus dem Verhältnis (2.11)

$$\alpha_i(\tau) = \frac{1}{\log 2} \log\left(\frac{\text{MSD}_{i,2\Delta t}^*(\tau)}{\text{MSD}_{i,\Delta t}^*(\tau)}\right),\tag{5.1}$$

der korrigierten  $\text{MSD}_i^*(\tau)$  zu unterschiedlichen Zeitinkrementen  $\Delta t$ . Hierbei werden statische Lokalisationsunsicherheiten anhand von  $\text{MSD}_{i,\Delta t}^*(\tau) = \text{MSD}_i(\tau) - \text{MSD}_i(\Delta t)$ berücksichtigt. Ferner wird das korrigierte  $\text{MSD}_{i,2\Delta t}^*(\tau)$  mit dem Zeitinkrement  $\tau = n \cdot 2\Delta t$ aus den Teilchenpositionen gerader oder ungerader Zeitpunkte berechnet und gleichsam um den Lokalisationsfehler korrigiert. Die mit (5.1) bestimmten  $\alpha_i(\tau)$  werden wie bei der Anpassung über das Zeitintervall  $\tau = 0.2 - 2.5$  s gebildet. Mit dem Resampling-Verfahren berechnet sich  $\alpha_i = 0.60 \pm 0.49$  des Trajektorienensembles sowie  $\langle \alpha_i \rangle = 0.63 \pm 0.09$  der Zellmittelwerte. Der nach (5.1) bestimmte Anomalieparameter der geometrisch oder arithmetisch mittleren MSD-Kurve beträgt  $\langle \alpha \rangle_g = 0.53 \pm 0.08$  und  $\langle \alpha \rangle_a = 0.67 \pm 0.11$ . Dabei besteht kein systematischer Zusammenhang zwischen dem Anomaliewert nach (5.1) und dem Zeitpunkt  $\tau$ . Zusammenfassend bestätigt das Resampling-Verfahren die starke Subdiffusion punktartiger Aktinfilamente im Zellkern. Die Werte des Anomaliparameters unterliegen jedoch größeren Schwankungen als bei der Anpassung der MSD-Kurven.

#### 5.4.2 Nicht-Gaußsche und heterogene Diffusion

Mit den Informationen aus den Einzelteilchentrajektorien lässt sich das zeitabhängige Bewegungsmuster nuklearen Aktins näher erfassen. Diesbezüglich kann eine Dynamik zwar von einer Brownschen Bewegung vorgegeben sein, in ihren Eigenschaften aber von einer Gaußschen Diffusion abweichen [58,59]. Eine Brownsche jedoch nicht-Gaußsche Diffusion [58,59] liegt häufig vor, wenn die Zeitskalen zwischen der Bewegung der Teilchen und der Umgebung nicht eindeutig separieren. Dies kann aus zeitveränderlichen Diffusionskoeffizienten [60,75] im Sinne einer "diffundierenden Diffusivität" [65,66] oder räumlichen Heterogenitäten [62–64] hervorgehen. Experimentell kann eine nicht-Gaußsche Diffusion z.B. über Abweichungen von normalverteilten Schrittinkrementen herausgestellt werden. Im Folgenden wird die Statistik normierter Schrittinkremente  $p(\chi)$  untersucht, wie sie bei einer viskoelastischen Subdiffusion bakterieller RNA-Moleküle erläutert wurde [60,63]. Hierzu werden die eindimensionalen Schrittinkremente der Verschiebungszeit  $\tau$  gebildet, für jede Trajektorie individuell normiert und zu den normierten Inkrementen (2.14)

$$\chi_x(\tau) = \frac{\Delta x(\tau)}{\sqrt{\langle (\Delta x)^2(\tau) \rangle_t}}, \quad \text{mit } \Delta x(\tau) = x(t+\tau) - x(t), \ \tau = n \,\Delta t \ (\chi_y(\tau) \text{ analog}) \ (5.2)$$

zusammengefasst. In Abb. 5.4a sind die Häufigkeitsverteilungen  $p(\chi_x)$  und  $p(\chi_y)$  von den Trajektorien einer Zelle zur Verschiebungszeit  $\tau = \Delta t$  dargestellt. Die Statistik  $p(\chi)$  besteht zwischen dem Grenzfall einer Normal- bzw. Laplaceverteilung. Für kleine Inkremente  $|\chi| \leq 2$  entspricht  $p(\chi)$  weitgehend einer Normalverteilung, unterschreitet diese jedoch etwas. Hierbei wird die verstärkte Wahrscheinlichkeit  $p(\chi=0)$  durch duplizierte Positionen fehlender Teilchendetektionen verursacht. Für größere Inkremente  $|\chi| \geq 3$ ist  $p(\chi)$  erkennbar gegenüber einer Normalverteilung erhöht. Somit kann die Diffusion punktartigen Aktins im Zellkern als nicht-Gaußsch bezeichnet werden.

Anhand der Form der Inkrementstatistik (siehe Abb. 5.4a) lässt sich die nicht-Gaußsche Diffusion nuklearer Aktinfilamente näher charakterisieren. Diese ist symmetrisch für positive und negative Werte  $p(\chi > 0) = p(\chi < 0)$  sowie richtungsunabhängig bezüglich beider Koordinatenachsen  $p(\chi_x) = p(\chi_y)$ . Zudem gibt die Inkrementstatistik  $p(\chi_x)$  der Trajektorien eines Zellkerns bereits die Verteilung des Gesamtzellensembles  $p(\chi)$  wieder. Wie in Abb. 5.4b,c aufgezeigt, bestehen Abweichungen von einer Gaußschen Diffusion bei Häufigkeitsverteilungen sich überlappender Inkremente zu den Verschiebungszeiten



Abb. 5.4: Wahrscheinlichkeitsverteilung normierter Schrittinkremente. Dargestellt sind die Häufigkeiten  $p(\chi)$  eindimensionaler, jeder Trajektorie individuell normierter Schrittinkremente  $\chi_x(\tau) = \Delta x / \sqrt{\langle (\Delta x)^2 \rangle_t}$  der Verschiebungszeit  $\tau = n \Delta t$  (siehe (5.2)) sowie Normal- und Laplaceverteilungen der Inkrementstatistik. Mit erhöhten Wahrscheinlichkeiten dokumentiert  $p(\chi)$  Abweichungen von Gaußscher Diffusion für  $|\chi| \gtrsim 3$ . (a) Die Verteilung  $p(\chi)$  ist symmetrisch  $(p(\chi^+) = p(\chi^-))$  und richtungsunabhängig  $(p(\chi_x) = p(\chi_y))$ , wobei die Statistik einer Zelle das Gesamtensemble repräsentiert. Für Verschiebungszeiten (b)  $\tau = 3 \Delta t$  und (c)  $\tau = 10 \Delta t$  zeigen sich Merkmale einer nicht-Gaußschen Diffusion.

 $\tau = 2-15 \Delta t$ . Infolge einer mangelnden Statistik unterschreitet  $p(\chi)$  eine Normalverteilung für  $\tau > 20 \Delta t$ . Insgesamt existiert eine nicht-Gaußsche Diffusion für einzelne Zellen und alle Filamente punktartigen Aktins, unabhängig vom betrachteten Zeitintervall.

# Nicht-Gaußscher Parameter

Eine andere Möglichkeit, nicht-Gaußsche Charakteristiken der Diffusion nachzuweisen und die Heterogenität zu bemessen, besteht über das Verhältnis (2.15) [71]

$$\overline{\mathcal{G}}(\tau) = \frac{2\left\langle r^4(\tau) \right\rangle_t}{3\left\langle r^2(\tau) \right\rangle_t^2} - 1, \qquad \text{mit } r = \underline{r}(t+\tau) - \underline{r}(t) \text{ und } \tau = n \,\Delta t.$$
(5.3)

Der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  nimmt für normalverteilte Inkremente den Wert  $\overline{\mathcal{G}}=0$ an und strebt für stark heterogene Diffusion gegen  $\overline{\mathcal{G}}=1$ . Ebenso ist eine eindimensionale Definition von  $\overline{\mathcal{G}}$  verbreitet [60]. Mit einem mittleren Wert ist  $\langle \overline{\mathcal{G}}_i \rangle = 0.18 \pm 0.04$  für die Bewegungen punkartigen Aktins im Zellkern signifikant von Null verschieden. Für alle Trajektorien unterliegt  $\overline{\mathcal{G}}_i = 0.18 \pm 0.23$  einer größeren Streuung, beträgt jedoch nur für wenige Filamente  $\overline{\mathcal{G}}_i \simeq 0$ . Da keine Zeitabhängigkeit festgestellt wird, werden die experimentellen Werte  $\overline{\mathcal{G}}_i(\tau)$  über alle Verschiebungszeiten  $\tau = n \Delta t$  gemittelt. Hierbei ist der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  vergleichbar zur heterogenen Subdiffusion bakterieller RNA-Moleküle  $\overline{\mathcal{G}} \simeq 0.4$  [60] oder spezifischer Membranproteinkomplexe  $\overline{\mathcal{G}} \simeq 0.3$  [71]. Somit begründet der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  eine nicht-Gaußsche und heterogene Diffusion punktartiger Aktinfilamente über den Zeitbereich weniger Sekunden.

#### Ensemblestatistik normierter Transportkoeffizienten

Außerdem wird die Statistik von normierten Transportkoeffizienten untersucht, um die heterogenen Beweglichkeiten zwischen verschiedenen Aktinfilamenttrajektorien genauer darzustellen. Dazu ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  der aus Anpassung individueller  $MSD_i(\tau)$  bestimmten und normierten Transportkoeffizienten in Abb. 5.5 aufgetragen. Mit einer exzellenten Übereinstimmung zu einer Exponentialverteilung des Mittelwerts  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  dokumentiert diese eine große Heterogenität für die Teilchenmobilitäten eines Zellkerns und auch des Gesamtzellensembles. Wie eine weitere Gegenüberstellung mit FBM-Simulationen veranschaulicht<sup>9</sup>, lässt sich eine Exponentialverteilung von  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  nicht durch die statistischen Fluktuationen der mit 50 – 200 Lokalisationen begrenzten Trajektorienlängen erklären. Diesbezüglich sei auf die gleichartige Verteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  von FBM-Simulationen mit unterschiedlichen Trajektorienlängen zwischen 30 - 1000 Zeitschritten in [60] hingewiesen. Physikalisch gesehen steht die Exponentialverteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  im Zusammenhang mit einem breiten Spektrum der Aktinfilamentmobilitäten. Dies ist Einklang mit der Beobachtung Brownscher jedoch nicht-Gaußscher Diffusion in räumlich und zeitlich stark heterogenen Systemen, bei denen Signaturen nicht-Gaußscher Diffusion auftreten können, auch wenn die Teilchen einer (fraktionellen) Brownschen Bewegung folgen [58–60,62].



#### Abb. 5.5: Verteilung von normierten Transportkoeffizienten.

Die aus Anpassungen einzelner  $\text{MSD}_i(\tau)$ bestimmten  $K_{\alpha,i}$  sind zu einer Exponentialverteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  des Ensemblemittelwerts  $\langle K_{\alpha,i}\rangle$  konsistent. Die Heterogenität der Teilchenmobilitäten nuklearen Aktins lässt sich nicht durch statistische Fluktuationen der begrenzten Trajektorienlängen erklären (siehe FBM-Simulationen<sup>9</sup> als auch [60]).

#### Korrelationsfunktionen zur Untersuchung zeitlich heterogener Diffusionsbewegung

Weiterhin wird die heterogene Diffusion nuklearen Aktins anhand spezifischer Korrelationsfunktionen untersucht. Mit der Autokorrelation quadrierter Inkremente  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  (2.16) [85] wird überprüft, inwiefern die Inkremente  $\Delta r^2$  d.h. verhältnismäßig große Schritte zeitlich aufeinander folgen. Im Zuge dessen verdeutlicht ein Abklingen nach  $G_{\Delta r^2}(\tau) \propto e^{-k\tau}$ einen zeitabhängigen Wechsel der Diffusion zwischen zwei Mobilitätszuständen zu einer Rate k [85]. Die Autokorrelationsfunktionen individueller Trajektorien  $G_{\Delta r^2,i}(\tau)$  sind in Abb. 5.6a mit dem Mittelwert einer Zelle dargestellt. Wie begleitende FBM-Simulationen<sup>9</sup> unterstützen (siehe Inset in Abb. 5.6a), sind die experimentellen Zellmittel  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau) \rangle$ 

9  $\alpha = 0.5, K_{\alpha} = 0.03 \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}, N_{\text{Traj.}} = 2500, T_{\text{Traj.}} = 5 - 20 \,\text{s}, \Delta t = 0.1 \,\text{s}, \varsigma = 20 \,\text{nm}.$ 



Abb. 5.6: Autokorrelationsfunktionen zur Untersuchung heterogener Diffusion. (a) Die Autokorrelation quadrierter Inkremente [85] individueller Trajektorien  $G_{\Delta r^2,i}(\tau)$ fluktuiert stark, ist im Zellmittel jedoch positiv zu einem Abklingen  $G_{\Delta r^2}(\tau) \propto e^{-k\tau}$  einer typischen Umschaltzeit  $k^{-1} \simeq 2$ s korreliert. Eine erneute Abtastung der Inkremente mit dem Zeitinkrement  $\delta t = 2\Delta t$  bestätigt eine signifikante Korrelation gegenüber FBM-Simulationen finiter Trajektorien<sup>9</sup>. (b) Die Autokorrelation der lokalen Diffusivität  $G_{\Delta K}(\tau)$  [60] weist ebenso eine zeitliche Korrelation nach. Beide Korrelationsfunktionen kennzeichnen daher zeitlich veränderliche Beweglichkeiten punktartiger Aktinfilamente in den Kernen aller Zellen.

zu den Zeiten  $\tau \leq 5$ s signifikant positiv korreliert, auch wenn die  $G_{\Delta r^2,i}(\tau)$  punktartigen Aktins stärkeren Variationen unterliegen. Hierbei ist das experimentelle Abklingen von  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  unverändert, wenn die Inkremente mit  $\delta t = 2\Delta t$  abgetastet werden, um mögliche Eigenkorrelationen zu vermindern. Allerdings verstärken Lokalisationsunsicherheiten die Korrelationen zum Zeitpunkt  $\tau = \Delta t$  [60] und das statistische Rauschen der finiten Trajektorien bewirkt ein Abklingen zu leicht negativen Werten im Langzeitverhalten experimenteller und simulierter Trajektorien [60,75,76]. Aus Anpassungen des Abklingens an  $G_{\Delta r^2}(\tau) = a e^{-k\tau} + c$  wird eine Rate  $k \simeq 0.3 - 0.7 \,\mathrm{s}^{-1}$ , gleichbedeutend zum zeitlichen Wechsel der Diffusivität punktartigen Aktins nach  $t = k^{-1} \simeq 1.5 - 3.5 \,\mathrm{s}$ , bestimmt, wenn Verschiebungszeiten  $\tau \leq 5 \,\mathrm{s}$  berücksichtigt und Zeitpunkte  $\tau = \delta t$  ausgeschlossen werden. Somit manifestiert die Autokorrelation der quadratischen Inkremente  $G_{\Delta r^2}(\tau)$ eine heterogene Diffusion punktartiger Aktinfilamente im Zellkern und verdeutlicht weiter eine zeitlich veränderliche Beweglichkeit innerhalb einzelner Trajektorien.

Ebenso können heterogene Teilchenmobilitäten mit der Autokorrelationsfunktion der lokalen Diffusivität  $G_{\Delta K}(\tau)$  (2.17) [60] bewertet werden. In Anlehnung an die Korrelation der Trajektorienamplituden [86] untersucht  $G_{\Delta K}(\tau)$  wie stark der weiter drift-korrigierte, instantane Diffusionskoeffizient  $K = (\Delta x - \langle \Delta x \rangle)^2/2\delta t$  korreliert ist. Die Autokorrelation  $G_{\Delta K}(\tau)$  ist in Abb. 5.6b für individuelle Trajektorien mit dem Mittelwert einer Zelle angegeben. Folglich ist die lokale Diffusivität  $\Delta K$  für Zeiten  $\tau \leq 2$ s verstärkt korreliert, unabhängig ob Abtastintervalle  $\delta t = 1 - 5 \Delta t$  betrachtet werden. Erneut bedingen die endlichen Trajektorienlängen ein Abklingen von  $G_{\Delta K}(\tau)$  zu negativen Werten im Langzeitverhalten. Dabei beeinflussen statische und dynamische Lokalisationsunsicherheiten einzig  $G_{\Delta K}(\tau = \delta t)$ , da diese zeitlich unkorreliert sind [60,82]. Demnach besteht eine schwache, allerdings signifikante Korrelation von  $G_{\Delta K}(\tau)$  gegenüber den unkorrelierten Werten der FBM-Simulationen (siehe Inset in Abb. 5.6b). Die Autokorrelationsfunktion der lokalen Diffusivität  $G_{\Delta K}(\tau)$  bestätigt so, wie  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  der quadratischen Inkremente, eine nicht-Gaußsche Diffusion im Zellkern infolge zeitlich veränderlicher Beweglichkeiten einzelner, punktartiger Aktinfilamente.

#### 5.4.3 Zeitkorreliertes Bewegungsverhalten

Die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  (2.12) charakterisiert die Abfolge der Teilchenbewegungen in Abhängigkeit zur Verschiebungszeit  $\tau$ . Aufgrund ihrer Eigenschaft verschiedene Arten diffusiver Bewegung spezifisch zu unterscheiden, wird  $C_v(\tau)$  häufig zur statistischen Analyse von Einzelteilchentrajektorien eingesetzt (siehe z.B. [64,70,79,84]). Hierbei bilden antikorrelierte Werte  $C_v(\tau) < 0$  mit einem subdiffusiven Anomaliewert  $\alpha < 1$ ein starkes Indiz von FBM. Jedoch kann zwischen Subdiffusion oder Lokalisationsunsicherheiten als Ursache einer Antikorrelation  $C_v(\tau) < 0$  nur gesichert unterschieden werden, wenn die Geschwindigkeiten  $\underline{v}(t) = \frac{1}{\delta t} [\underline{r}(t + \delta t) - \underline{r}(t)]$  bei der Berechnung von  $C_v(\tau)$ nach (2.13) wiederholt mit  $\delta t = n\Delta t$  abgetastet werden [83]. Infolgedessen wird  $C_v(\tau)$  in Abhängigkeit der dimensionslosen Verschiebungszeit  $\xi = \tau/\delta t$  dargestellt.

Eine Übersicht der  $C_{v,i}(\xi)$  individueller Filamenttrajektorien ist in Abb. 5.7a mit dem Ensemblemittel eines Zellkerns gegeben. Für die meisten Trajektorien ist  $C_{v,i}(\xi = 1)$ negativ korreliert, klingt schnell mit der Zeit ab und fluktuiert anschließend um  $C_{v,i} \simeq 0$ . Im Ensemblemittel besteht eine exzellente Übereinstimmung zur analytischen Vorhersage von FBM (2.13) für verschiedene  $\delta t$ . Teilweise sind die experimentellen Werte etwas weniger antikorreliert, als durch eine FBM zum mittleren Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.55$  vor-



Abb. 5.7: Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion mit Abtastungsverfahren. (a) Die  $C_{v,i}(\xi)$  individueller Trajektorien ( $\delta t = 3\Delta t$ ) sind zum Zeitpunkt  $\xi = 1$  antikorreliert und fluktuieren um  $C_{v,i} \simeq 0$  für größere  $\xi$ . Das Ensemblemittel einer Zelle folgt sehr gut der analytischen Vorhersage von FBM (2.13). (b) Die wiederholte Unterabtastung des zellmittleren  $\langle C_{v,i}(\xi) \rangle$  bei verschiedenen  $\delta t = n\Delta t$  bestätigt das Skalierungsverhalten einer antikorrelierten FBM der nuklearen Aktinfilamente zum Anomalieparameter  $\langle \alpha \rangle \simeq 0.55$ .

gegeben ist. Die wiederholte Unterabtastung mit unterschiedlichen  $\delta t$  (siehe Abb. 5.7b) verifiziert den Verlauf der zellmittleren Autokorrelationsfunktion zur analytischen Vorhersage (2.13). Somit wird nicht nur die Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1)\rangle \simeq -0.25$  sondern auch das zeitliche Abklingverhalten experimentell bestätigt. Dabei wird die Antikorrelation zum Zeitpunkt  $\delta t = \Delta t$  nicht durch die Lokalisationsungenauigkeiten hervorgerufen, da sie unverändert für alle  $\delta t$  besteht und nicht mit  $\delta t^{-2}$  abklingt [83]. Einzig wird eine etwas geringere Antikorrelation  $C_v(\xi=1)$  infolge der Lokalisationsunsicherheiten für die Kurven ohne Abtastungen ( $\delta t = \Delta t$ ) berichtet. Zusammenfassend sind die Bewegungen der punktartigen Aktinfilamente daher stark zueinander antikorreliert und entsprechen der Vorhersage einer subdiffusiven FBM im Zellkern.

#### Streuungen der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion

Infolge der exzellenten Übereinstimmung der zellmittleren Autokorrelationsfunktion  $\langle C_{v,i} \rangle$ zum Verhalten von FBM (2.13) werden die Antikorrelationen individueller Trajektorien  $C_{v,i}(\xi=1)$  näher untersucht (siehe auch [79]). Nach (2.13) ergibt sich eine Abhängigkeit  $C_v(\xi=1) = 2^{\alpha-1} - 1$  zum Anomaliewert. Beide Größen sind in Abb. 5.8 für das Gesamtensemble punktartigen Aktins zu verschiedenen  $\delta t$  gegeneinander aufgetragen. Insgesamt wird der Zusammenhang  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1}-1$  für alle Anomaliewerte  $\alpha_i$  bestätigt. Trotz der statistischen Unsicherheiten der begrenzten Trajektorienlängen und den Variationen der  $\alpha_i$  streut  $C_{v,i}(\xi=1)$  nur mäßig, und symmetrisch, um die analytische Vorhersage von FBM. Besonders gut ist die Übereinstimmung zu  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1} - 1$  für  $\delta t = 2 - 5 \Delta t$ , da hier die Varianz um den theoretischen Verlauf gering ist. Wie zuvor bedingen die Lokalisationsunsicherheiten etwas weniger korrelierte Werte von  $C_{v,i}(\xi=1)$  für  $\delta t = \Delta t$ und daher einen stärker horizontalen Kurvenverlauf der Antikorrelationen. Daneben zeigt sich für  $\delta t = 7 \Delta t$  eine stärker konkave Abhängigkeit, die sich für  $\delta t = 10 \Delta t$ weiter verstärkt. Somit bestätigt die Darstellungsweise von  $C_{v,i}(\xi=1)$  aus Abb. 5.8 das Bewegungsmuster einer FBM für individuelle Aktinfilamente, was mit dem zeitlichen Verlauf aus Abb. 5.7 nur im Zellmittel wiedergegeben werden konnte. Die Bewegungen punktartigen Aktins korrelieren demnach mit einer FBM im Zellkern, unabhängig des Anomaliewerts individueller Filamenttrajektorien.



#### Abb. 5.8: Streuung der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion.

Die Antikorrelationen  $C_{v,i}(\xi = 1)$  aller Trajektorien punktartiger Aktinfilamente  $(N_{\text{Traj.}} = 4670, 20 \text{ Zellen})$  folgen der Skalierung von FBM  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1} - 1$ für alle Anomaliewerte  $\alpha_i$  sowie Abtastzeiten  $\delta t = 1, 3, 5, 7 \Delta t$ . Lokalisationsunsicherheiten bedingen für  $\delta t = \Delta t$  einen etwas horizontaleren Kurvenverlauf.

#### Kreuzkorrelationen der Aktinfilamentbewegungen

Außerdem werden die zeitabhängigen Bewegungen der punktartigen Aktinfilamente zueinander untersucht. Hierbei ist die Geschwindigkeitskreuzkorrelationfunktion  $C_{v,ij}(\tau)$ für individuelle Trajektorien und deren Zellmittel unkorreliert. Infolge der statistischen Schwankungen individueller  $C_{v,ij}(\tau)$  (siehe auch  $C_{v,i}$  in Abb. 5.7a) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Bewegungen einzelner Aktinfilamente miteinander korreliert sind. Ebenfalls unterliegt die Korrelationsfunktion relativer Abstandsschwankungen [90] über den experimentellen Zeitbereich weniger Sekunden keinem spezifischen Potenzgesetz. Daher sind die registrierten Bewegungen punktartiger Aktinfilamente an verschiedenen Orten des Zellkerns nicht miteinander gekoppelt.

#### 5.4.4 Spektrale Leistungsdichte und Variationskoeffizient

Die spektrale Analyse individueller Teilchentrajektorien (siehe Übersichtsartikel [74,87]) bildet eine alternative Herangehensweise, stochastische Prozesse näher zu untersuchen. Im Folgenden wird die spektrale Leistungsdichte  $PSD(\omega)$  durch das Periodogramm der zu den diskretisierten Zeitpunkten  $t = n \Delta t$  aufgezeichneten Trajektorien filamentösen Aktins im Zellkern berechnet. Die  $PSD(\omega)$  ist als Funktion der Frequenz  $\omega = 2\pi f = n \frac{2\pi}{T}$ in Abb. 5.9a dargestellt. Die eindimensionalen  $PSD_{x,i}(\omega)$  einzelner Filamenttrajektorien klingen schnell ab und weisen frequenzabhängige Fluktuationen auf. Hierbei variiert der Kurvenverlauf stark zwischen verschiedenen  $PSD_{x,i}(\omega)$ . Im Ensemblemittel einer Zelle bestätigt sich das Potenzgesetz  $PSD(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$  für FBM [88] zum Anomalieparameter  $\alpha = 0.55$ . Dabei stimmen die mittleren Leistungsdichten beider Koordinatenrichtungen im Rahmen der experimentellen Schwankungen überein. Wie Gegenüberstellungen mit



Abb. 5.9: Spektrale Leistungsdichte der (normierten) Einzelteilchentrajektorien. (a) Die eindimensionalen Leistungdichten  $\text{PSD}_{x,i}(\omega)$  individueller Trajektorien nuklearen Aktins fluktuieren stark und klingen mit der Frequenz  $\omega = n \cdot 2\pi\Delta t$  ab. Das Zellmittel  $\langle \text{PSD}_i \rangle = (\langle \text{PSD}_{x,i} \rangle + \langle \text{PSD}_{y,i} \rangle)/2$  und die arithmetischen oder geometrischen Mittelwerte über alle Trajektorien stimmen sehr gut mit dem Potenzgesetz  $\text{PSD}(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$  für FBM [88] zum Anomaliewert  $\alpha = 0.55$  überein. (b) Für normierte Trajektorien punktartiger Aktinfilamente besteht das Skalierungsverhalten  $\text{PSD}^*(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$ , bei geringeren Variationen.

FBM-Simulationen darlegen<sup>10</sup>, sind die Abweichungen der experimentellen Werte für Frequenzen  $\omega > \frac{\pi}{2\Delta t}$  durch die Zeitdiskretisierung begründet und werden zusätzlich von Lokalisationsungenauigkeiten verstärkt. Ebenso wird die Skalierung PSD( $\omega$ )  $\propto \omega^{-2+\alpha}$  für Aktinfilamenttrajektorien aller Zellkerne nachgewiesen. Infolge der großen Heterogenität der PSD<sub>i</sub>( $\omega$ ) unterscheiden sich das arithmetische und geometrische Mittel der PSD( $\omega$ ) geringfügig in ihrem Skalierungsverhalten (siehe Abb. 5.9a).

Allerdings beeinträchtigen es die starken Variationen der spektralen Leistungsdichte, die Diffusionskoeffizienten einzelner Teilchen aus den jeweiligen  $\text{PSD}_i(\omega)$  zu bestimmen. In diesem Fall zeigen theoretische Untersuchungen, dass mehr als  $10^5$  Lokalisationen erforderlich sind, um die stochastisch angenommene Amplitude aus der  $\text{PSD}_i(\omega)$  von einer Trajektorie Brownscher Bewegung zu berechnen [87]. Im Folgenden wird die normierte spektrale Leistungsdichte  $\text{PSD}^*(\omega)$  untersucht, mit der sich die Variationen der experimentellen  $\text{PSD}_i(\omega)$  verringern lassen [78]. Analog zu (5.2), werden hierbei die mit  $\sqrt{\langle \Delta x^2(\tau) \rangle_t}$  eindimensional normierten Aktinfilamenttrajektorien zur Berechnung des Periodogramms verwendet. Die normierte  $\text{PSD}^*(\omega)$  ist in Abb. 5.9b für individuelle Trajektorien und das Ensemblemittel punktartigen Aktins einer oder aller Zellkerne dargestellt. Somit bestätigt sich das Potenzgesetz  $\text{PSD}^*(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$  einer FBM zum mittleren Anomalieparameter  $\alpha = 0.55$  für die normierte  $\text{PSD}^*(\omega)$ , deren Variationen mit  $\sigma_{\text{PSD}_i^*(\omega)} / \sigma_{\text{PSD}_i(\omega)} \simeq 0.6 - 0.9$  etwas geringer sind. Zusammenfassend kann die stark subdiffusive Bewegung der Aktinfilamente über den Zeitraum weniger Sekunden im Zellkern auch mit der (normierten)  $\text{PSD}(\omega)$  begründet werden.

# Variationskoeffizient der spektralen Leistungsdichte

Weiterhin sind die Variationen individueller  $\text{PSD}_i(\omega)$  für die Art der stochastischen Teilchenbewegung charakteristisch [74,87]. Der Variationskoeffizient  $\gamma$  (2.20) der spektralen Leistungsdichte setzt die Heterogenität aller  $\text{PSD}_i(\omega)$  in Relation zu deren Mittelwert,  $\gamma(\omega) = \sigma_{\text{PSD}_i(\omega)} / \langle \text{PSD}_i(\omega) \rangle$ . Für eine FBM konvergiert  $\gamma(\omega \to 0) = \sqrt{2}$  nach zwischenzeitlichen Oszillationen  $1 < \gamma(\omega) < \sqrt{2}$  für Frequenzen  $\omega \to \infty$  gegen den Grenzwert  $\gamma_{\infty}$ . Dieser beträgt nach (2.21) für Brownsche Bewegung  $\gamma_{\infty} = \sqrt{5}/2$ , für subdiffusive FBM  $\gamma_{\infty} = 1$ und für superdiffusive FBM  $\gamma_{\infty} = \sqrt{2}$  [74].

Der Variationskoeffizient der  $PSD_i(\omega)$  punktartiger Aktinfilamente wird in Abb. 5.10a als Funktion von  $f = \omega T$  dargestellt und mit FBM-Simulationen verglichen. Demnach klingen die Werte von  $\gamma(f)$  frequenzabhängig ab und sättigen mit  $\gamma_{\infty} \simeq 1.25$  zwischen den Grenzwerten Brownscher Bewegung oder Superdiffusion. Es besteht kein Unterschied, ob Trajektorien beider Koordinatenrichtungen einzeln, deren Vereinigungen oder von allen Zellen analysiert werden. Gleichzeitig übersteigt  $\gamma(f)$  für Frequenzen  $f \leq 100$  den theoretischen Wertebereich  $\gamma(f) < \sqrt{2}$ , womit die Variationen der  $PSD_i(\omega)$  experimentell größer sind als für verschiedene Bewegungsmuster einer FBM erwartet wird. Allgemein

<sup>10</sup> Nicht gezeigte Daten von FBM-Simulationen (siehe Modellierungsparameter auf S. 90).



Abb. 5.10: Variationskoeffizient der (normierten) Leistungsdichte. (a) Der Variationskoeffizient  $\gamma(f) = \gamma(\omega T)$  der spektralen Leistungsdichten  $\text{PSD}_i(\omega)$  punktartiger Aktinfilamente einer Zelle oder des Gesamtzellensembles klingt frequenzabhängig ab und übersteigt den Grenzwert einer subdiffusiven  $\text{FBM}^9 \gamma_{\infty} = 1$  sowie von Brownscher Bewegung  $\gamma_{\infty} = \sqrt{5}/2$ . (b) Nach individueller Normierung der  $\text{PSD}_i^*(\omega)$  zum Ausgleich heterogener Teilchenmobilitäten wird eine subdiffusive FBM mit  $\gamma_{\infty}^* = 1.01 \pm 0.03$  nachgewiesen.

lässt ein frequenzabhängiges Abklingen des Variationskoeffizientens  $\gamma(f) \approx e^{-0.1 f}$  eine Subdiffusion nuklearen Aktins vermuten (siehe [74]), dem jedoch die experimentell erhöhten Variationen der  $\text{PSD}_i(\omega)$  mit  $\gamma_{\infty} \simeq 1.25$  widersprechen.

Ausgehend vom Variationskoeffizienten  $\gamma^*$  (2.20) [78] der normierten Trajektorien nuklearen Aktins lässt sich der Einfluss der heterogenen Teilchenmobilitäten reduzieren. Der aus den normierten  $PSD_i^*(\omega)$  einer oder aller Zellen gebildete Variationskoeffizient  $\gamma^*(f)$  ist in Abb. 5.10b mit vergleichenden FBM-Simulationen<sup>10</sup> aufgetragen. Dieser klingt frequenzabhängig ab und konvergiert gegen den Grenzwert  $\gamma_{\infty} = 1$  einer subdiffusiven FBM, was die Simulationen mit  $\gamma_{\infty}^* = 1.00 \pm 0.02$  bestätigen. Experimentell werden  $\gamma_{\infty}^* = 0.99 \pm 0.03$  für einzelne Zellen und  $\gamma_{\infty}^* = 1.06$  für das Gesamtteilchenensemble im Bereich  $f \geq 100$  bestimmt. Das asymptotische Verhalten von  $\gamma^*(f)$  belegt daher eine subdiffusive FBM nuklearen Aktins. Möglicherweise lassen sich frequenzabhängige Oszillationen in Abb. 5.10b registrieren, die dem analytischen Verlauf von  $\gamma(f)$  gleichkommen könnten [74]. Die experimentellen Werte von  $\gamma^*(f)$  sind jedoch weiterhin erhöht. Insgesamt kann mit dem Variationskoeffizient der (normierten) spektralen Leistungsdichte eine subdiffusive FBM der nuklearen Aktinfilamente dokumentiert werden.

# 5.4.5 Dynamik gebündelter Aktinfilamente

Außerdem wird die Dynamik von gebündelten nuklearen Aktinfilamenten (Phänotyp II aus Abschnitt 5.3) mit den eingeführten Kenngrößen anomaler Diffusion untersucht. Hierzu sind spezifische Eigenschaften einer anomalen und Gaußschen Diffusion der gebündelten Aktinfilamente in Abb. 5.11 und weitere Einzelteilchencharakteristika über deren Bewegungsverhalten in Abb. 5.12 zusammengestellt. Eine nähere Übersicht der Kenngrößen ist in Anhang F tabelliert.

### Diffusionseigenschaften: Subdiffusion, Transportkoeffizienten und Heterogenität

Das zeitgemittelte  $MSD(\tau)$  der gebündelten Aktinfilamente folgt einem klar subdiffusiven Potenzgesetz für den experimentell erfassten Zeitbereich von einigen Sekunden. Über Anpassungen im Intervall  $\tau = 0.2 - 2.5$  s wird ein Anomaliewert  $\alpha_{\langle MSD_i \rangle_g} = 0.56 \pm 0.05$ der zellmittleren MSD-Kurven bestimmt. Auch die  $MSD_i(\tau)$  individueller Aktinfilamente skalieren mit  $\alpha_i = 0.55 \pm 0.20$  stark subdiffusiv, deren Häufigkeitsverteilungen  $p(\alpha_i)$  über eine Zelle oder das Gesamtzellensemble weitgehend symmetrisch bei gewöhnlichen Werten  $\alpha_i \simeq 0.35 - 0.75$  sind (siehe Abb. 5.11a). Das Resampling-Verfahren [73] bestätigt den Anomaliewert  $\alpha = 0.53 \pm 0.06$  der Diffusion gebündelten Aktins.

Innerhalb einer Sekunde legen die gebündelten Aktinfilamente eine Wegstrecke weniger  $10^{-3} \,\mu\text{m}^2$  im Zellkern zurück, wobei der Transportkoeffizient aller Teilchen  $K_{\alpha,i}$  über eine Größenordnung variiert (siehe Abb. 5.11b). Hierbei werden die Häufigkeiten  $p(K_{\alpha,i})$  von einer logarithmischen Normalverteilung mit Mittelwert  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -2.64$  und Standardabweichung  $\sigma_{\log(K_{\alpha,i})} = 0.30$  wiedergegeben. Eine Exponentialverteilung der



Abb. 5.11: Diffusionseigenschaften gebündelter nuklearer Aktinfilamente. Wahrscheinlichkeitsverteilungen des (a) Anomalieparameters  $p(\alpha_i)$  und (b) Transportkoeffizientens  $p(K_{\alpha,i})$  einer Zelle und des Gesamtzellensembles. Die gebündelten Aktinfilamente bewegen sich stark subdiffusiv mit  $\langle \alpha_i \rangle = 0.56 \pm 0.05$  und  $\langle K_{\alpha,i} \rangle = (3.1 \pm 1.3) \cdot 10^{-3} \, \mu m^2 \, s^{-\alpha}$ . (c) Die Statistik normierter Schrittinkremente  $p(\chi)$  einer Zelle bildet eine Normalverteilung für alle Verschiebungszeiten  $\tau$ . Das Ensemble zeigt eine schwache Diffusionsheterogenität. (d) Die Autokorrelationsfunktion quadrierter Inkremente  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  ist signifikant unkorreliert und begründet zeitunabhängige Diffusion der gebündelten Aktinfilamente.

normierten Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  für  $K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle \leq 5$  verdeutlicht dabei heterogene Teilchenmobilitäten des Gesamtzellensembles. Infolgedessen zeigen gebündelte Aktinfilamente eine zu punktartigem Aktin vergleichbare Subdiffusion, verfügen aber über zehnfach geringere Beweglichkeiten in der Umgebung des Zellkerns.

Die Inkrementstatistik  $p(\chi)$  gebündelter Aktinfilamente einer Zelle (siehe Abb. 5.11c) entspricht einer Normalverteilung für Verschiebungszeiten  $\tau = 1 - 15 \Delta t$ . Erneut ist die Verteilung  $p(\chi)$  symmetrisch und richtungsunabhängig. Wie FBM-Simulationen unterstützen<sup>11</sup>, werden die Abweichungen von  $p(|\chi| \gtrsim 3)$  für Verschiebungszeiten  $\tau \ge 7 \Delta t$ durch die begrenzte Statistik der Einzelteilchentrajektorien hervorgerufen. Gleichsam zu Abb. 5.11c werden verminderte Häufigkeiten von  $p(\chi)$  für Zweizustandssimulationen einer alternierenden FBM [75, 184] oder einer viskoelastischen FBM in zellartigen Fluiden [78] berichtet. Somit weist die Inkrementstatistik  $p(\chi)$  eine Gaußsche Diffusion für gebündelte Aktinfilamente nach, die vom nicht-Gaußschen Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  (5.3)  $\langle \overline{\mathcal{G}}_i \rangle = 0.05 \pm 0.04$  im Zellmittel bestätigt wird. Dagegen dokumentiert die Statistik  $p(\chi)$  für  $\tau = 1 - 5 \Delta t$  über Trajektorien gebündelter Aktinfilamente aus allen Zellkernen leichte Anzeichen einer nicht-Gaußschen Diffusion und  $\overline{\mathcal{G}}_i = 0.06 \pm 0.16$  indiziert eine Heterogenität bei wenigen Trajektorien des Gesamtensembles. Diesbezüglich verschwinden die Abweichungen zu einer Normalverteilung von  $p(\chi)$  für  $\tau \geq 7 \Delta t$ . Ausgehend davon ist die Subdiffusion der gebündelten Aktinfilamente homogen bezüglich eines Zellkerns und leicht heterogen bezüglich aller Zellen des Ensembles.

Weiterhin begründet die Autokorrelationsfunktion quadrierter Inkremente  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  eine zeitunabhängige Diffusion von gebündeltem Aktin. Wie in Abb. 5.11d verdeutlicht wird, ist  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  im Mittel eines Zellkerns oder des Gesamtzellensembles zu allen Zeitpunkten unkorreliert, ohne ein exponentielles Abklingen zu zeigen. Hierbei gilt zu berücksichtigen, dass  $G_{\Delta r^2}(\Delta t)$  von Lokalisationsunsicherheiten verstärkt wird und so, bezüglich der experimentellen Schwankungen, signifikant von Null verschieden erscheint. Außerdem sind die Werte von  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  zeitlich unkorreliert, wenn Eigenkorrelationen der Inkremente mit einer Zeitabtastung  $\delta t = 2\Delta t$  umgangen werden. Daneben ist die Autokorrelationsfunktion des lokalen Diffusionskoeffizientens unkorreliert,  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau \leq 1 \,\mathrm{s}) \rangle < 0.01$  (für  $\delta t = 1 - 3\Delta t$ ). Somit unterliegen die Beweglichkeiten der gebündelten Aktinfilamente, im Gegensatz zu punktartigem Aktin, keinen zeitlichen Veränderungen im Zellkern.

#### Einzelteilchencharakteristika: Geschwindigkeitskorrelationen und Variationskoeffizient

Die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  weist ein zeitlich gegensätzliches Bewegungsverhalten der gebündelten Aktinfilamente nach. Der Kurvenverlauf von  $C_v(\tau)$ folgt im Zellmittel sehr gut der analytischen Vorhersage für FBM (2.13) und wird bei wiederholten Unterabtastungen der Geschwindigkeiten mit  $\delta t = 1 - 10 \Delta t$  bestätigt (siehe Abb. 5.12a). Die prägnante Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle \simeq -0.25$  begründet daher

11  $\alpha = 0.6, K_{\alpha} = 0.003 \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}, N_{\text{Traj.}} = 3000, T_{\text{Traj.}} = 5 - 20 \,\text{s}, \Delta t = 0.1 \,\text{s}, \varsigma = 15 \,\text{nm}.$ 



Abb. 5.12: Einzelteilchencharakteristika gebündelter nuklearer Aktinfilamente. (a) Die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  ist zeitlich negativ korreliert und folgt im Zellmittel der analytischen Vorhersage von FBM (2.13). Ebenso wird der Wert der Antikorrelation  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1} - 1$  individueller Trajektorien für Abtastintervalle  $\delta t = 1, 3, 5 \Delta t$  bestätigt. (b) Der Variationskoeffizient von normierten Trajektorien  $\gamma^*(f)$  einer Zelle oder des Gesamtzellensembles konvergiert gegen den Grenzwert einer viskoelastischen FBM  $\gamma_{\infty} = 1.00 \pm 0.02$ , wenngleich die Variationskoeffizienten  $\gamma(f)$  uneindeutig erhöht sind.

zeitlich gegensätzliche Bewegungen gebündelten Aktins nach dem Muster einer FBM. Da Lokalisationsunsicherheiten relevant zur instantanen Geschwindigkeit beitragen, ist  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle_{\delta t=1} \simeq -0.15$  etwas erhöht. Des Weiteren sind die Autokorrelationsfunktionen einzelner Trajektorien  $C_{v,i}(\tau)$  negativ korreliert, wenngleich diese stärker fluktuieren. Wie in Abb. 5.12a dargestellt, kann der Zusammenhang  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1} - 1$  zwischen den Anomaliewerten  $\alpha_i$  und den Antikorrelationen  $C_{v,i}(\xi=1)$  experimentell nachgewiesen werden. Diese Skalierung nach dem Modell einer FBM besteht für Filamenttrajektorien einer oder aller Zellen zu  $\delta t = 2 - 10 \Delta t$ , wobei die Lokalisationsunsicherheiten zu einem etwas horizontaleren Verlauf für  $\delta t = \Delta t$  beitragen. Zusammenfassend sind die Bewegungen von gebündelten Aktinfilamenten zeitlich antikorreliert und entsprechen der Vorhersage einer viskoelastischen FBM innerhalb des Zellkerns.

Darüber hinaus werden keine kollektiven Beweglichkeiten festgestellt. So bewegen sich benachbarte Aktinbündel weder aufeinander zu und deren Trajektorien verschmelzen, noch sind deren Zeitverläufe gleichartig orientiert. Generell scheinen die Aktinfilamente ihre relativen Abstände in der Umgebung des Zellkerns zueinander zu behalten. Die Kreuzkorrelationsfunktionen  $C_{v,ij}(\tau)$  sind mit  $\langle C_{v,ij}(\tau=2\Delta t)\rangle \simeq 0.06 \pm 0.13$  und starken Variationen zwischen verschiedenen Zellen zwar positiv, allerdings nicht signifikant korreliert. Hierbei sind die relativen Abstandsschwankungen [90] nicht miteinander gekoppelt. Es kann somit nicht eindeutig beurteilt werden, ob kollektive Bewegungen der gebündelten Aktinfilamente vorliegen oder nur Veränderungen der Zelle bzw. des Zellkerns aufgefasst werden. Ebenso wirken sich Lokalisationsunsicherheiten und ein potentieller Drift stärker bei den geringeren Teilchenmobilitäten von gebündeltem Aktin aus. Die spektrale Leistungsdichte  $PSD(\omega)$  von Trajektorien gebündelter Aktinfilamente klingt mit dem Potenzgesetz  $PSD(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$  für FBM zum Anomaliewert  $\alpha = 0.55$  ab. Dabei stimmen die mittleren Leistungsdichten beider Koordinatenrichtungen und die Ensemblemittel einer oder aller Zellen im Rahmen der experimentellen Schwankungen überein. Ebenso besteht das Skalierungsverhalten  $PSD(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$  für das arithmetische oder geometrische Mittel der  $PSD(\omega)$ . Jedoch unterscheiden sich deren Vorfaktoren infolge der Heterogenität aller  $PSD_i(\omega)$ . Diese Eigenschaften übertragen sich gleichsam auf die normierte Leistungsdichte  $PSD^*(\omega)$ , womit die spektrale Analyse die starke Subdiffusion gebündelter Aktinfilamente im Zeitraum weniger Sekunden bestätigt.

Weiter verdeutlichen die Variationen einzelner  $\text{PSD}_i^*(\omega)$  eine subdiffusive Dynamik im Zellkern. So klingt der normierte Variationskoeffizient  $\gamma^*$  frequenzabhängig ab und dieser konvergiert für große Frequenzen experimentell gegen den Grenzwert einer viskoelastischen FBM  $\gamma_{\infty} = 1.00 \pm 0.02$ . Das Abklingverhalten von  $\gamma^*(f)$  besteht gleichartig für die spektralen Leistungsdichten beider Koordinatenrichtungen sowie deren Vereinigung (siehe Abb. 5.12b). Im Ensemblemittel aller Zellen wird ein Skalenverhalten  $\gamma^*(f) \simeq \sqrt{2} e^{-0.025 f} + 1$  bestimmt. Hierbei befinden sich die experimentellen Werte stets im Intervall  $1 < \gamma^*(f) < \sqrt{2}$  und streben  $\gamma^*(f \to 0) = \sqrt{2}$  an. Dagegen offenbart der Variationskoeffizient  $\gamma$  (siehe Inset in Abb. 5.12b) keine konsistenten Aussagen über Art der stochastischen Teilchenbewegung, da dieser nicht eindeutig für große Frequenzen gegen einen Grenzwert konvergiert und zudem den theoretischen Wertebereich übersteigt. Somit sind die Variationen von  $\gamma(f)$  größer, als für alle Bewegungen einer gleichmäßigen FBM erwartet wird. Daher unterstützt nur der Variationskoeffizient der normierten spektralen Leistungsdichten eine viskoelastische FBM von gebündeltem Aktin im Zellkern.

#### 5.4.6 Dynamik zytoplasmischer Aktinfilamente

Weiterhin werden dynamische Eigenschaften von UTR230-GFP markiertem Aktin in zytoplasmischen Regionen (Phänotyp III aus Abschnitt 5.3, siehe Abb. 5.1c) analysiert. Diesbezüglich wird ein Gesamtteilchenensemble von 9 Zellen mit einer punktartigen Lokalisation bei einer vergleichbaren Statistik bezüglich der Anzahl  $N_{\text{Traj.}} \simeq 300$  und mittleren Länge  $\langle T_i \rangle \simeq 11$  s der Aktinfilamenttrajektorien untersucht, dessen statische Aggregationen an Stressfasern und dem Aktinkortex ausgeschlossen werden.

Die Teilchenbewegungen im Zytoplasma gleichen der Dynamik punktartigen Aktins im Zellkern. Innerhalb einer Sekunde überqueren die Aktinfilamente eine mittlere Fläche  $MSD_i \simeq 20 - 50 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2$ , bei einer subdiffusiven Skalierung  $\alpha_i \simeq 0.3 - 0.9$ . Im Zellmittel werden ein Anomalieparameter  $\langle \alpha_i \rangle = 0.56 \pm 0.05$  und generalisierter Transportkoeffizient  $\langle K_{\alpha,i} \rangle = (36 \pm 11) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  bestimmt. Längere Trajektorien weisen erneut geringere  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  auf. Alle Beweglichkeiten werden sehr gut von einer logarithmischen Normalverteilung mit  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -1.67 \pm 0.46$  beschrieben. Zwischen den Mobilitätsgrößen besteht das empirische Skalierungsverhalten  $K_{\alpha,i}(\alpha_i) \propto e^{2\alpha_i}$  [78,79]. Die heterogenen Beweglichkeiten der Aktinfilamente äußern sich zunächst durch eine exponentielle Häufigkeitsverteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  für  $K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle \leq 7$ . Darüber hinaus verdeutlicht die Statistik normierter Schrittinkremente  $p(\chi)$  eine nicht-Gaußsche Diffusion punktartigen Aktins im Zytoplasma. Die Abweichungen von einer Gaußschen Diffusion bestehen gleichermaßen für die Inkrementverteilungen  $p(\chi)$  einer oder aller Zellen und die Werte  $\Delta p(\chi) \neq 0$  stimmen mit der Heterogenität von punktartigen Aktinfilamenten im Zellkern überein. Auch begründet der nicht-Gaußsche Parameter  $\langle \overline{\mathcal{G}}_i \rangle = 0.27 \pm 0.09$ eine heterogene Diffusion zytoplasmischer Aktinfilamente. Des Weiteren begründen die Autokorrelationsfunktionen der quadrierten Inkremente  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=2\delta t)\rangle = 0.14 \pm 0.07$ und des lokalen Diffusionskoeffizientens  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau \leq 1 \text{ s}) \rangle = 0.04 \pm 0.01$  zeitveränderliche Beweglichkeiten der punktartigen Aktinfilamente im Zytoplasma.

Die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  weist gegensätzliche Bewegungen nach, deren Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1)\rangle = -0.22 \pm 0.04$  einer viskoelastischen FBM des Anomaliewerts  $\langle \alpha_i \rangle$  entspricht. Parallel dazu korrespondiert der Kurvenverlauf  $\langle C_{v,i}(\tau) \rangle$ für Unterabtastungen  $\delta t = 1 - 10 \Delta t$  mit der analytischen Vorhersage von FBM (2.13), wenngleich die experimentellen Werte geringfügig durch die Lokalisationsunsicherheiten erhöht werden. Zugleich wird die Skalierung aller Antikorrelationen  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1}-1$ zum Bewegungsmuster einer FBM für beliebige Unterabtastungen  $\delta t$  bestätigt.

Die spektrale Leistungsdichte  $PSD(\omega)$  klingt mit dem Potenzgesetz  $PSD(\omega) \propto \omega^{-2+\alpha}$ subdiffusiver Bewegungen zum Anomalieparameter  $\alpha \simeq 0.55$  ab. Hierbei besteht das Skalierungsverhalten für beide Koordinatenrichtungen und die mittleren  $\langle PSD_i(\omega) \rangle$  einer oder aller Zellen als auch für die normierten spektralen Leistungsdichten  $\langle PSD_i^*(\omega) \rangle$ . Erneut nimmt der normierte Variationskoeffizient  $\gamma^*(f)$  frequenzabhängig ab und konvergiert für Trajektorien einer Zelle oder des Gesamtzellensembles gegen den Grenzwert einer viskoelastischen FBM  $\gamma_{\infty} = 1.00 \pm 0.06$ , wobei die Variationen  $\gamma^*(f \to 0) = \sqrt{2}$  im Frequenzbereich  $f = \omega T \leq 50$  übersteigen. Daneben klingt der Variationskoeffizient  $\gamma(f)$ frequenzabhängig ab, erlaubt mit einer Konvergenz  $\langle \gamma(f \ge 100) \rangle = 1.4 \pm 0.2$  jedoch keine konsistenten Aussagen zur Subdiffusion punktartigen Aktins.

Insgesamt dokumentieren diese Untersuchungen eine nicht-Gaußsche Subdiffusion der punktartigen Aktinfilamente in zytoplasmischen Bereichen. Die Beweglichkeit von zytoplasmischem Aktin ist zwischen verschiedenen Filamenttrajektorien stark heterogen, aber auch innerhalb des zeitlichen Verlaufs einzelner Trajektorien. Weiterhin ist das Bewegungsmuster nach einer viskoelastischen FBM zeitlich gegensätzlich korreliert. Die spektrale Untersuchung verdeutlicht die stark subdiffusive und heterogene Dynamik der punktartigen Aktinfilamente, deren Bewegungen mit der Dynamik nuklearen Aktins vergleichbar sind. Nähere Einzelheiten über die dynamischen Eigenschaften der verschiedenen Phänotypen von UTR230-GFP markierten Aktinfilamenten bei den unbehandelten Zellen und Unterschiede zwischen der Dynamik punktartigen und gebündelten Aktins werden im folgenden Abschnitt erläutert.
#### 5.4.7 Gegenüberstellung der Dynamik nuklearen Aktins

Abschließend werden die dynamischen Eigenschaften von punktartigen Aktinfilamenten im Zellkern (Phänotyp I aus Abschnitt 5.3, Analyse in 5.4.1–5.4.4) mit gebündeltem nuklearen (Phänotyp II, siehe 5.4.5) und punktartigem zytoplasmischen Aktin (Phänotyp III, siehe 5.4.6) verglichen. Hierzu werden statistische Signifikanzen über eine Abfolge geeigneter Hypothesentests<sup>12</sup> beurteilt (siehe Anhang D.3).

#### Anomalieparameter der Diffusion und generalisierter Transportkoeffizient

Die Anomalieparameter  $\alpha$  und generalisierten Transportkoeffizienten  $K_{\alpha}$  werden für die verschiedenen Aktinphänotypen unbehandelter Zellen in Abb. 5.13 gegenübergestellt. Die zellmittleren Anomaliewerte  $\langle \alpha_i \rangle$  folgen über das jeweilige Ensemble von 9 – 20 Zellen einer Normalverteilung. Alle Phänotypen weisen einen statistisch gleichen Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.55$  auf. Über die Violinendarstellung wird zusätzlich eine Schätzung der Wahrscheinlichkeitsdichte  $p(\alpha_i)$  von allen Trajektorien nuklearen Aktins in Abb. 5.13a gegeben. Somit stimmt die Wahrscheinlichkeitsdichte  $p(\alpha_i)$  punktartiger Aktinfilamente im Zellkern und Zytoplasma überein. Sie unterscheidet sich jedoch für gebündelte Aktinfilamente, die eine stärker symmetrische Verteilung  $p(\alpha_i)$  mit kleineren Variationen aufweisen.

Die zellmittleren Transportkoeffizienten  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  sind logarithmisch normalverteilt. Diese stimmen mit  $\langle K_{\alpha,i} \rangle \simeq 35 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  für punktartige Aktinfilamente zwischen dem



Abb. 5.13: Gegenüberstellung der Aktindynamik unbehandelter Zellen. Streuung des mittleren Anomalieparameters  $\langle \alpha_i \rangle$  und generalisierten Transportkoeffizientens  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  der Zellen, mit Ensemblemittelwerten und Violinendarstellungen der Wahrscheinlichkeitsdichten aller Aktinfilamenttrajektorien. (a) Für jeden Phänotypen besteht gleiches Skalierungsverhalten  $\alpha \simeq 0.55$ . (b) Gebündelte Aktinstrukturen bewegen sich signifikant langsamer, bei identischen Mobilitäten punktartigen Aktins im Zellkern und Zytoplasma.

<sup>12</sup> Vorwiegend Zweistichproben-t- oder Kolmogorov-Smirnov-Tests zum Signifikanzniveau $\alpha=0.05$ 

Zellkern und dem Zytoplasma überein. Gebündelte nukleare Aktinstrukturen bewegen sich hingegen signifikant langsamer  $\langle K_{\alpha,i} \rangle \simeq 3 \cdot 10^{-3} \, \mu \text{m}^2 \, \text{s}^{-\alpha}$ . Hierbei verdeutlicht die Violinendarstellung die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(K_{\alpha,i})$ , die für einzelne Zellen eine logarithmische Normalverteilung bildet. Infolge der heterogenen Teilchenmobilitäten ist  $p(K_{\alpha,i})$  über alle Zellkerne geringfügig asymmetrisch (siehe Abb. 5.13b).

Die Aussagen über beide Mobilitätsgrößen verändern sich nicht, wenn statt der mittleren Werte einer Zelle die Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,\langle MSD_i \rangle_a}$  oder Anomaliewerte  $\alpha_{\langle MSD_i \rangle_g}$  der zellgemittelten MSD-Kurve  $\langle MSD_i(\tau) \rangle$  verglichen werden. Insgesamt unterscheidet sich die Subdiffusion punktartigen Aktins im Zellkern und Zytoplasma nicht. Gebündelte nukleare Aktinfilamente bewegen sich hingegen signifikant langsamer mit demselben subdiffusiven Skalierungsverhalten. Eine gewöhnliche Brownsche Bewegung oder räumlich eingeschränkte Diffusion der mit UTR230-GFP markierten nuklearen Aktinfilamente liegt, wie in [169] berichtet, bei keinem Zellphänotpyen vor. In dieser Hinsicht bestehen subdiffusive Bewegungen im Zellkern sowohl für kleine Moleküle bis mikrometergroße Strukturen [185–189] als auch für das Chromatin und dessen Untereinheiten [69,190–192]. Darüber hinaus ist eine Subdiffusion allgegenwärtig im Zytoplasma [41,55,56].

#### Heterogenität der Diffusion und antikorreliertes Bewegungsverhalten

Die Statistik normierter Inkremente  $p(\chi)$  wird in Abb. 5.14a für die unterschiedlichen Phänotypen verglichen. Die Dynamik gebündelten Aktins stimmt zu einer Gaußscher Diffusion im Zellkern signifikant überein, wogegen die Inkrementstatistiken punktartiger Aktinfilamente von einer Normalverteilung abweichen. Deren nicht-Gaußsche Diffusion äußert sich durch negative Werte für  $\chi = 1$  und positive Beiträge für  $\chi = 3$ . Zwischen der Heterogenität punktartigen Aktins im Zellkern und Zytoplasma besteht statistisch kein Unterschied. Allerdings schätzt der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  (5.3) die Subdiffusion punktartigen Aktins im Zytoplasma als stärker heterogen ein.

Die Autokorrelationsfunktion der lokalen Diffusivität  $G_{\Delta K}(\tau)$  wird in Abb. 5.14b gegenübergestellt. Die Diffusivität der punktartigen Aktinfilamente ist über den Zeitbereich einer Sekunde  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau \leq 1 \text{ s}) \rangle \simeq 0.03$  signifikant positiv korreliert. Die Korrelation besteht gleichermaßen für punktartiges Aktin im Zellkern oder Zytoplasma und ist unabhängig vom Abtastintervall  $\delta t$ . Hingegen ist  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau) \rangle$  für gebündelte Aktinfilamente unkorreliert, wobei zu berücksichtigen gilt, dass  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau) \rangle$  für  $\delta t = \Delta t$  durch Eigenkorrelationen der teilweise duplizierten Teilchenlokalisationen geringfügig erhöht wird. Folglich sind nur die Beweglichkeiten punktartiger Aktinfilamente zeitlich veränderlich.

Das antikorrelierte Bewegungsverhalten der Aktinfilamente wird mit der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  beurteilt (siehe Abb. 5.14c). Die zellmittlere Korrelation Aktins  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle$  ist zum Zeitpunkt  $\tau = \delta t$  für alle Unterabtastungen  $\delta t = n\Delta t$ der lokalen Geschwindigkeiten signifikant antikorreliert. Die Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle$ gleicht sich statistisch für punktartige und gebündelte Aktinfilamente ( $\delta t = 2 - 10\Delta t$ ) 5 Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik



Abb. 5.14: Gegenüberstellung unterschiedlicher Beweglichkeitscharakteristika. Streuung der zellmittleren Werte der Inkrementstatistik  $p(\chi)$ , Diffusivitäts- $G_{\Delta K}(\tau)$  und Geschwindigkeitsautokorrelation  $C_v(\tau)$ . (a) Signifikante Abweichungen  $\Delta p(\chi) \neq 0$  unterscheiden die Subdiffusion punktartiger Aktinfilamente von der Gaußschen Charakteristik gebündelten Aktins. (b) Die positive Korrelation  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau \leq 1 s) \rangle$  dokumentiert zeitveränderliche Beweglichkeiten der punktartigen Aktinfilamente. (c) Die Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle$ korrespondiert zu gleichartiger viskoelastischer FBM aller Phänotypen unbehandelter Zellen.

und korrespondiert zu viskoelastischer Subdiffusion nach FBM mit einem Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.6$ . Einzig wird die Antikorrelation  $C_v(\xi=1)_{\delta t=1} \simeq -0.15$  von gebündeltem Aktin durch Lokalisationsunsicherheiten vermindert. Die zellmittleren  $\langle C_{v,i}(\xi) \rangle$  sind auch zu größeren Verschiebungszeiten  $\tau = 1 - 5 \,\delta t$  signifikant negativ korreliert. In diesem Zusammenhang wird eine zeitlich antikorrelierte Subdiffusion der Telomere berichtet [69], die für größere Zeiten in Brownsche Bewegung übergeht [190]. Gleichzeitig existieren langreichweitig kohärente Bewegungen von Chromatin [192,193] oder der nuklearen Speckles [194]. Ebenfalls sind subdiffusive Bewegungen im viskoelastischen Zytoplasma häufig negativ korreliert [60,70,75,84].

Der Variationskoeffizient von normierten Trajektorien  $\langle \gamma^*(f) \rangle$  stimmt für alle Aktinphänotpyen unbehandelter Zellen mit dem analytischen Grenzwert einer subdiffusiven FBM  $\gamma_{\infty} = 1$  überein. Die frequenzgemittelten Werte  $\langle \gamma^*(f) \rangle$  des jeweiligen Gesamtzellensembles bilden eine Normalverteilung zu einem statistisch gleichwertigen Mittelwert und Median. Dies ist unabhängig, ob Frequenzbereiche  $f = \omega T \ge 100$  oder  $f \ge 150$  von  $\langle \gamma^*(f) \rangle$ einbezogen werden. Der Variationskoeffizient  $\langle \gamma(f) \rangle$  erlaubt keine konsistenten Aussagen bezüglich der subdiffusiven Bewegungen von Aktin.

### 5.5 Nukleares Aktin unter biochemischen Veränderungen

In diesem Abschnitt werden die Lokalisation und dynamischen Eigenschaften nuklearer Aktinfilamente bei biochemischen Veränderungen der U2OS-Zellen untersucht. Diese umfassen die Auflösung der Mikrotubuli durch Nocodazol, hypotonisches Schwellen durch wässriges Kulturmedium, hypertonische Wasserabgabe der Zellen durch Saccharose-Lösung, sowie Acetylierung der Histone und DNA-Schädigung durch Valproinsäure (VPA) oder Trichostatin A (TSA). Ausführlichere Informationen über zentrale Beweglichkeitscharakteristika nuklearen Aktins sind in Anhang F zusammengefasst.

#### 5.5.1 Aktinfilamentdynamik unter Nocodazol

Unter der Einwirkung von Nocodazol wird das Zytoskelett der Mikrotubuli zerstört und deren Polymerisation unterbunden. Das Lokalisationsmuster von UTR230-GFP (siehe Abb. 5.15a) deckt sich mit den unbehandelten Zellen (siehe Abb. 5.1a). In den Zellkernen existieren wenige hundert punktförmige Aktinfilamente mit einer typischen Länge von etwa 500 nm. Die Aktinfilamente lokalisieren unverändert im Interchromatinbereich und verstärkt in der oberen Hälfte des Zellkerns. Im Zytoplasma sind die Stressfasern und der Aktinkortex über eine höhere Fluoreszenz von UTR230-GFP hervorgehoben. Unter dem Einfluss von Nocodazol werden nur selten Zellkerne mit gebündeltem Aktin registriert.

Die Bewegungen der punktartigen, nuklearen Aktinfilamente unter der Einwirkung von Nocodazol sind zu den unbehandelten Zellen vergleichbar. Das zeitgemittelte  $MSD(\tau)$  folgt einem subdiffusiven Potenzgesetz mit einem Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle = \alpha_{\langle MSD_i \rangle_a} = 0.57 \pm 0.05$ 



Abb. 5.15: Lokalisation und Dynamik nuklearer Aktinfilamente bei Nocodazol. (a) Unter Nocodazol existieren hunderte punktförmige Aktinfilamente (UTR230-GFP), die in Regionen außerhalb von Chromatin (H2B-mCherry) und vermehrt in der oberen Hälfte des Zellkerns (siehe z-Maximumsprojektion,  $\Delta z = 2 \,\mu$ m) lokalisieren. (b) Bei unveränderten Anomaliewerten  $p(\alpha_i)$  verlangsamen sich die Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i})$  eineinhalbfach.

im Zeitbereich  $\tau = 0.2 - 2.5$  s. Ebenso skalieren die  $MSD_i(\tau)$  einzelner Filamenttrajektorien subdiffusiv mit  $\alpha_i = 0.57 \pm 0.30$ . Die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(\alpha_i)$  ist leicht asymmetrisch zu den häufigsten Werten und dokumentiert eine Subdiffusion für ca. 90 % der nuklearen Aktinfilamente (siehe Inset in Abb. 5.15b). Zur Verteilung  $p(\alpha_i)$ der unbehandelten Zellen besteht statistisch kein Unterschied.

Bei der Behandlung mit Nocodazol ist der generalisierte Transportkoeffizient nuklearen Aktins verringert. Im Zellmittel wird  $\langle K_{\alpha,i} \rangle = (21 \pm 4) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  bestimmt, wobei längere Trajektorien geringere  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  aufweisen. Verglichen zu den punktartigen Aktinfilamenten von unbehandelten Zellen sind die Beweglichkeiten eineinhalbfach geringer, unabhängig der Trajektorienlängen. Zwischen allen Trajektorien variiert  $K_{\alpha,i}$  über zwei Größenordnungen (siehe Abb. 5.15b) und wird sehr gut von einer logarithmischen Normalverteilung  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -1.80 \pm 0.33$  wiedergegeben. Hierbei beurteilen Signifikanztests den Transportkoeffizienten der mit Nocodazol behandelten Zellen, als auch die Zell- und Ensemblemittelwerte, als signifikant verschieden. Zwischen den Mobilitätsgrößen  $K_{\alpha,i}$ und  $\alpha_i$  besteht das empirische Skalierungsverhalten  $K_{\alpha,i} \propto e^{2\alpha_i}$  [78,79]. Insgesamt ist die eineinhalbfach verlangsamte Subdiffusion der nuklearen Aktinfilamente vergleichbar mit der zweifach geringeren Beweglichkeit der Telomere unter der Einwirkung von Nocodazol, deren Anomalieparameter  $\alpha = 0.5$  sich allerdings um  $\Delta \alpha = 0.1$  verringert [69].

Erneut kennzeichnet sich die Heterogenität aller Teilchenmobilitäten durch eine Exponentialverteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle \leq 5)$ . Weiter verdeutlicht die Statistik der normierten Inkremente  $p(\chi)$  Abweichungen von einer Gaußschen Diffusion, die gleichermaßen für die Trajektorien einer oder aller Zellen vorhanden sind. Hierbei stimmen die Abweichungen  $\Delta p(\chi) \neq 0$  und der nicht-Gaußsche Parameter  $\langle \overline{\mathcal{G}}_i \rangle = 0.18 \pm 0.04$  mit der Heterogenität der unbehandelten Zellen überein. Durch positive Korrelationen von  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau) \rangle$  und  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau) \rangle$  werden zeitveränderliche Mobilitäten nachgewiesen, die identisch zu den Werten der unbehandelten Zellen für unterschiedliche Verschiebungszeiten  $\tau$  sind. Dabei tragen dynamische Lokalisationsunsicherheiten weniger zu den Werten für  $\tau = \Delta t$  bei.

Die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  dokumentiert ein zeitlich gegensätzliches Bewegungsverhalten, das mit einer FBM (2.13) übereinstimmt. Hierbei sind sowohl die zellmittleren Antikorrelationen  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle = -0.24 \pm 0.03$  als auch die Skalierungen  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1} - 1$  für Unterabtastungen  $\delta t = 2 - 10 \Delta t$  konsistent zu einer viskoelastischen FBM, wenngleich Lokalisationsunsicherheiten die Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle = -0.18 \pm 0.04$  für  $\delta t = \Delta t$  etwas verringern. Erneut wird die Subdiffusion zum Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle$  von den spektralen Leistungsdichten  $\langle \text{PSD}_i(\omega) \rangle$  und  $\langle \text{PSD}_i^*(\omega) \rangle$ bestätigt und die Eigenschaften der Variationskoeffizienten  $\gamma(f)$  und  $\gamma^*(f)$  entsprechen den punktartigem Aktin von unbehandelten Zellen. So nimmt der Koeffizient  $\gamma^*(f)$ frequenzabhängig ab und konvergiert experimentell  $\gamma^*(f \ge 100) = 0.99 \pm 0.03$  gegen den Grenzwert von viskoelastischer FBM  $\gamma_{\infty} = 1$ . Demgegenüber ist  $\gamma(f \ge 100) = 1.2 \pm 0.1$ inkonsistent zur Subdiffusion nuklearen Aktins der mit Nocodazol behandelten Zellen. Zusammenfassend dokumentieren die Experimente mit Nocodazol eine subdiffusive Dynamik, die den punktartigen Aktinfilamenten unbehandelter Zellen ähnelt. Unter der Auflösung des Mikrotubuli-Zytoskeletts verlangsamt sich die Mobilität nuklearen Aktins etwa eineinhalbfach. Davon unberührt besteht die heterogene Beweglichkeit zwischen verschiedenen Trajektorien, aber auch innerhalb ihres zeitlichen Verlaufs. Zudem sind die Bewegungen, vergleichbar zu viskoelastischer FBM, zeitlich gegensätzlich korreliert. Die spektrale Untersuchung verdeutlicht die stark subdiffusive und heterogene Dynamik.

#### 5.5.2 Aktinfilamentdynamik unter hypotonischer Behandlung

Bei der hypotonischen Behandlung mit wässrigem Kulturmedium formen sich mikrometergroße intrazelluläre Vesikel vieler membrangebundener Organellen [39] und die Filamente des Zytoskeletts werden nahezu vollständig zerstört (siehe Abb. 4.8). Wie in Abb. 5.16a dargestellt ist, befindet sich mit UTR230-GFP markiertes Aktin weiterhin im Zellkern und Zytoplasma der Zellen. Das Lokalisationsmuster mit wenigen hundert kurzen Filamenten unterscheidet sich nicht von punktartigem Aktin der unbehandelten Zellen. Dabei lokalisieren die Aktinfilamente hauptsächlich im Interchromatinbereich und befinden sich vermehrt im oberen Abschnitt des Zellkerns oder nahe der Kernhülle. Die Filamente sind weiterhin mobil, allerdings stark verlangsamt. Im Zytoplasma der Zellen existieren punktartige Aktinstrukturen von UTR230-GFP bei einer vergleichsweise hohen Hintergrundfluoreszenz. Wahrscheinlich handelt es sich um UTR230-GFP Moleküle, die vor der hypotonischen Einwirkung an die zytoplasmischen Stressfasern gebunden waren. Gegenüber den unbehandelten Zellen (siehe Abb. 5.1a) wird der Aktinkortex allerdings nur über eine schwache Fluoreszenz von UTR230-GFP hervorgehoben.

Bei der Behandlung mit dem hypotonischen Kulturmedium verändert sich die Dynamik der nuklearen Aktinfilamente und deren Beweglichkeiten verringern sich stark. Hierbei reduziert sich die in einer Sekunde überquerte mittlere Fläche auf  $MSD_i \simeq 10 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2$ . Der Transportkoeffizient  $K_{\alpha,i}$  variiert über etwa zwei Größenordnungen unter den Aktinfilamenten aller Zellkerne (siehe Abb. 5.16b), wobei die experimentellen Häufigkeiten  $p(K_{\alpha,i})$  von einer logarithmischen Normalverteilung  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -2.12 \pm 0.26$  charakterisiert werden. Die zellmittlere Beweglichkeit beträgt  $\langle K_{\alpha,i} \rangle = (9 \pm 2) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$ , mit etwas kleineren  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  für längere Trajektorien. Hypothesentests bewerten die etwa dreifach verringerten Beweglichkeiten  $K_{\alpha,i}$  und  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  als signifikant verschieden von den Werten punktartiger Aktinfilamente der unbehandelten Zellen.

Gleichzeitig intensiviert sich die Subdiffusion individueller  $\text{MSD}_i(\tau)$  im Zeitbereich weniger Sekunden zu einem mittleren Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle = \alpha_{\langle \text{MSD}_i \rangle_g} = 0.23 \pm 0.03$  und  $\alpha_i = 0.24 \pm 0.15$ . Auch die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(\alpha_i)$  (siehe Inset in Abb. 5.16b) verdeutlicht mit den experimentell häufigsten Werten  $\alpha_i \simeq 0.10 - 0.40$  eine signifikant verstärkte Subdiffusion. Gegenwärtige Studien von Frau Rebecca Benelli [80] zeigen ein quantitativ gleiches Verhalten für die viskoelastische Subdiffusion der Telomere [69, 190]. 5 Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik



Abb. 5.16: Lokalisation und Dynamik Aktins bei hypotonischer Behandlung. (a) Im Zellkern und Zytoplasma lokalisieren hunderte punktartige Aktinfilamente (siehe z-Maximumsprojektion,  $\Delta z = 4 \,\mu\text{m}$ ) bei erhöhter Hintergrundfluoreszenz durch ungebundenes UTR230-GFP. (b) Die zeitabhängige Dynamik verlangsamt sich zu einer intensivierten Subdiffusion  $p(\alpha_i)$  und verringerten Mobilitäten  $p(K_{\alpha,i})$ . Dabei korrespondieren die Bewegungen mit (c) Normalverteilungen der Inkremente  $p(\chi)$ , bei geringfügiger Heterogenität unter allen Zellkernen, und (d) zeitlichen Antikorrelationen  $C_v(\tau)$  nach FBM erhöhter Viskoelastizität.

Diesbezüglich ist das veränderte Skalenverhalten nuklearen Aktins zu einer ATP-Depletion vergleichbar, bei der sich das mittlere Netzwerk-Verschiebungsquadrat von Chromatin von  $\langle \alpha \rangle = 0.7$  auf  $\langle \alpha \rangle = 0.3$  reduziert [192] als auch Subdiffusion der Telomere von  $\langle \alpha \rangle = 0.5$  zu  $\langle \alpha \rangle = 0.25$  verstärkt [191]. Zwischen beiden Mobilitätsgrößen  $K_{\alpha,i}$  und  $\alpha_i$  der Aktinbewegungen besteht weiter der empirische Zusammenhang  $K_{\alpha,i} = C e^{2\alpha_i}$  [78,79] dessen Vorfaktor unter dem hypotonischen Einfluss  $C = 4.5 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  etwa eineinhalbfach geringer ist. Folglich verlangsamt sich die Dynamik der Aktinfilamente, da kleinere  $\alpha_i$  mit geringeren  $K_{\alpha,i}$  assoziiert sind und zusätzlich der Skalierungsfaktor C verringert ist.

Die Inkrementstatistik  $p(\chi)$  der Aktinfilamente eines Zellkerns gleicht einer Normalverteilung für alle Verschiebungszeiten  $\tau$  (siehe Abb. 5.16c). Dagegen zeigt  $p(\chi)$  über Trajektorien des Gesamtzellensembles eine schwache nicht-Gaußsche Diffusion, deren Abweichungen für  $\tau \ge 7 \Delta t$  verschwinden. Gleichermaßen indiziert der nicht-Gaußsche Parameter (5.3) eine heterogene Diffusion für bestimmte Trajektorien nuklearer Aktinfilamente  $\overline{\mathcal{G}}_i = 0.08 \pm 0.14$  und die Autokorrelationen  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau \le 1 \text{ s}) \rangle = 0.010 \pm 0.004$  bzw.  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau = 2\delta t) \rangle = 0.002 \pm 0.002$  begründen eventuelle zeitveränderliche Mobilitäten. Hierbei folgt  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  keiner Exponentialverteilung. Somit besteht eine homogene Subdiffusion nuklearen Aktins unter hypotonischer Behandlung und wenige Filamente zeigen minimale Heterogenität.

Der Verlauf der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  (siehe Abb. 5.16d) weist zeitliche stark gegensätzliche Bewegungen mit einer prägnanten Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1)\rangle = -0.40 \pm 0.01$  nach. Hierbei stimmen das zellmittlere Verhalten  $\langle C_{v,i}(\xi)\rangle$  als auch die Antikorrelationen der Einzelteilchentrajektorien  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1} - 1$  exzellent mit viskoelastischer FBM überein und werden bei Unterabtastungen  $\delta t = 1 - 10 \Delta t$ bestätigt. Einzig sind die Werte  $C_{v,i}(\xi=1)_{\delta t=1} \simeq -0.35$  durch Lokalisationsunsicherheiten etwas erhöht. Weiter unterstützen die spektrale Analyse der  $\langle \text{PSD}_i(\omega) \rangle$  und  $\langle \text{PSD}_i^*(\omega) \rangle$ sowie der Variationskoeffizient  $\gamma^*(f)$  die Subdiffusion von Aktin im Zellkern.

Insgesamt besteht das punktartige Muster nuklearen Aktins unter der hypotonischen Behandlung der Zellen. Dabei intensiviert sich die subdiffusive Dynamik und die gleichmäßigen, eventuell geringfügig heterogenen, Diffusivitäten der Aktinfilamente verringern sich stark. Die Bewegungen sind zeitlich entgegengerichtet und entsprechen einer FBM mit erhöhter Viskoelastizität der Zellkernumgebung.

#### 5.5.3 Aktinfilamentdynamik unter hypertonischer Behandlung

Unter einer Wasserabgabe der U2OS-Zellen durch die Einwirkung einer hypertonischen Saccharose-Lösung, verbleibt ein ausgeprägtes Lokalisationsmuster von UTR230-GFP in den Zellkernen (siehe Abb. 5.17a). Dabei lokalisieren hunderte punktartige Filamente bis stärker gebündelte Aggregate von UTR230-GFP in den Regionen zwischen dem mit H2B-mCherry markierten Chromatin. Weitere Aktinfilamente befinden sich an der Kernhülle, vermutlich nahe der Kernporenkomplexe. Bei der hypertonischen Behandlung wird ebenfalls die räumliche Organisation von Chromatin beeinflusst. Hierbei werden nicht nur, wie bei der Mehrheit der unbehandelten Zellen, Zellkerne mit kondensiertem oder leicht dekondensiertem Chromatin, sondern auch räumliche Chromatinverdichtungen [180] der fluoreszenzmarkierten Histone beobachtet (siehe Abb. 5.17a). Im Gegensatz dazu ist die Lokalisation von UTR230-GFP an zytoplasmischen Stressfasern und dem aktinreichen Zellkortex unverändert zu den unbehandelten Zellen.

Unter dem Einfluss einer hypertonischen Saccharose-Lösung werden die Bewegungen Aktins im Zellkern vollständig unterbunden. So bildet das zellmittlere  $\langle \text{MSD}_i(\tau) \rangle$  über den experimentell erfassten Zeibereich zwischen  $\tau = 0.1 - 10$  s eine Horizontale, deren Achsenverschiebung  $\langle L_i \rangle = (7 \pm 2) \cdot 10^{-4} \, \text{µm}^2$  zu einer statischen Positionsunsicherheit  $\varsigma = \sqrt{L/2} \simeq 20 \,\text{nm}$  korrespondiert (siehe Abb. 5.2). Gleichsam bestätigen die Trajektorien einzelner Filamente, trotz stärkerer statistischer Fluktuationen zeitgemittelten  $\text{MSD}_i(\tau)$ , mit einem Anomalieparameter  $\langle \alpha_i \rangle = \alpha_{\langle \text{MSD}_i \rangle_g} = 0.05 \pm 0.03$  die fehlenden Bewegungen nuklearen Aktins. Die resultierenden Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i})$  (siehe Abb. 5.17b) befinden mit  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -3.21 \pm 0.23$  im Bereich statischer Positionsunsicherheiten.

#### 5 Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik

Nähere Analysen der Aktinfilamentdynamik unter der hypertonischen Behandlung charakterisieren daher die experimentellen Lokalisationsunsicherheiten. Diesbezüglich stimmt die Verteilung  $p(\chi)$  der normierten Schrittinkremente einer Zelle oder des Gesamtensembles für jede Verschiebungszeit exakt mit einer Gaußverteilung überein. Weiter sind die Autokorrelationsfunktionen  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau) \rangle$  und  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau) \rangle$ , mit Ausnahme ihrer Eigenkorrelationen zu  $\tau = \delta t$ , zeitlich unkorreliert. Demzufolge sind die Positionsunsicherheiten vom Aufnahmezeitpunkt und eventuellem Photobleichen der Bildgebung unabhängig. Die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  ist im Zellmittel  $\langle C_{v,i}(\tau) \rangle$  zu allen Verschiebungszeiten  $\tau = \xi \cdot \delta t$  unkorreliert (siehe Abb. 5.17c). Wiederholte Abtastungen  $\delta t$ weisen statische Lokalisationsunsicherheiten als Ursache der markanten Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle = -0.48 \pm 0.02$  nach. Zusammenfassend verursachen die experimentellen Unsicherheiten bei der Lokalisation nuklearen Aktins ein normalverteiltes sowie zeit- und richtungsunabhängiges Rauschen in Höhe von  $\varsigma = 20$  nm, das zu anderen Einzelteilchenverfolgungsexperimenten biologischer Systeme vergleichbar ist [60,69,84].



Abb. 5.17: Lokalisation und Dynamik Aktins bei hypertonischer Behandlung. (a) In den Zellkernen lokalisieren punktartige Filamente bis stärker gebündelte Aggregate von UTR230-GFP in den Regionen zwischen dekondensiertem bis räumlich verdichtetem Chromatin (H2B-mCherry). (b) Die verbliebenen Beweglichkeiten  $p(K_{\alpha,i})$  befinden sich im Bereich der statischen Lokalisationsunsicherheiten, die (c) eine ausgeprägte Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle = -0.48 \pm 0.02$  zum Anomalieparameter  $\langle \alpha_i \rangle = 0.05 \pm 0.03$  hervorrufen.

#### 5.5.4 Reorganisation und Dynamik unter Valproinsäure

Außerdem wird die Lokalisation und Dynamik nuklearen Aktins bezüglich der Reparaturmechanismen von Chromatin untersucht, indem DNA-Schädigungen biochemisch bei den Kulturzellen induziert werden. Dazu wird die Deacetylierung der Histone durch die Einwirkung von Valproinsäure (VPA) oder Trichostatin A (TSA) gehemmt, was nach einer Behandlungsdauer von 24 h in akkumulierten DNA-Doppelstrangbrüchen und räumlichen Umstrukturierungen von Chromatin resultiert [181,182,195]. In dieser Hinsicht können DNA-Schäden nicht nur über Acetylierung der Histone [195,196] sondern auch mit anderen biochemischen Substanzen oder physikalisch über UV-Strahlung bewirkt werden [163].

#### Charakterisierung der Expression von UTR230-GFP im Zellkern und Zytoplasma

Bei den mit VPA behandelten Zellen (siehe Abb. 5.18a,b für repräsentative Aufnahmen) besteht ein Lokalisationsmuster mit einer hohen Expression von UTR230-GFP im Zellkern und Zytoplasma. In den meisten Zellkernen bilden sich, wie in Abb. 5.18a veranschaulicht, Bündel mit einem typischen Durchmesser von etwa einem Mikrometer und verstärkter Fluoreszenz von UTR230-GFP. Die Aktinbündel sind vorwiegend sphärisch und seltener zu längeren Strukturen aufgebaut. Dabei lokalisieren die gebündelten Aktinfilamente ausschließlich in den Regionen zwischen den fluoreszenzmarkierten Histonen 2B und scheinen an das Chromatin, das durch die Einwirkung von VPA stark dekondensiert ist, angebunden zu sein. Innerhalb weniger Zellkerne bei denen das Chromatin nicht dekondensiert ist (siehe Abb. 5.18b), existiert ein Lokalisationsmuster von UTR230-GFP, das den unbehandelten Zellen mit hunderten kleineren und punktförmigen nuklearen Aktinfilamenten (siehe Abb. 5.1a) entspricht.

Im Zytoplasma lokalisiert UTR230-GFP unverändert an den Stressfasern und dem Aktinkortex der Zellen. Gleichzeitig bildet sich, unabhängig zur Lokalisation von Aktin im Zellkern, ein ausgeprägtes Muster zytoplasmischer Aggregationen von UTR230-GFP. Dieses erstreckt sich über die gesamte Zellumgebung. Die Flächen der Aktinstrukturen mit einer hohen Fluoreszenz von UTR230-GFP betragen gewöhnlich zwischen  $1 - 2 \,\mu\text{m}^2$ , wobei sehr große Aggregationen bis zu  $10 \,\mu\text{m}^2$  umfassen können. Mit den durch die Einwirkung von VPA akkumulierten DNA-Schädigungen ist somit eine erhöhte Expression von UTR230-GFP in den Zellen verbunden. Konsequenterweise intensivieren sich die zytoplasmischen Aggregationen von UTR230-GFP, wenn die Behandlungsdauer mit VPA von 24 h auf 48 h verlängert wird.

Mittels Referenzfärbungen über Phalloidin wird untersucht, ob die durch den Einfluss von VPA bedingten Aggregationen von UTR230-GFP auch einer Bündelung zellulären Aktins gleichkommen. Wie in Abb. 5.18c hervorgehoben, ähnelt das Lokalisationsmuster von UTR230-GFP an zytoplasmischen Stressfasern und dem Aktinkortex einer Phalloidinfärbung von untransfizierten, mit VPA behandelten, Zellen. Hierbei werden mit der Phalloidinmarkierung zwar sphärische Aktinbündel im Zytoplasma nachgewiesen (siehe Inset in Abb. 5.18c), jedoch finden sich bei den Phalloidinfärbungen deutlich kleinere und wenigere dieser Strukturen. Durch zusätzliche Phalloidinmarkierungen von UTR230-GFP transfizierten Zellen (siehe Abb. 5.18d) wird eindeutig bestätigt, dass die zytoplasmischen Aggregationen von UTR230-GFP Aktin beinhalten, wenngleich die Doppelfärbungen eine höhere Spezifität Phalloidins gegenüber allen Strukturen filamentösen Aktins in den U2OS-Zellen verdeutlichen. In diesem Kontext ist eine Färbung nuklearer Aktinfilamente mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin allerdings nicht ohne zusätzliche biochemische Veränderungen der Zellen möglich [16, 163, 169].

Ausgehend von diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass sich die Anzahl nuklearer Aktinfilamente durch die Acetylierungen der Histone über VPA und den

#### 5 Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik



Abb. 5.18: Lokalisationsmuster Aktins unter der Einwirkung von Valproinsäure. (a) In den U2OS-Zellen besteht nach starker Dekondensation von Chromatin durch die Acetylierung der Histone (H2B-mCherry) ein starkes Expressionsmuster von UTR230-GFP mit gebündeltem nuklearen Aktin und zytoplasmischen Aggregationen. (b) In wenigen Zellkernen ohne eine Dekondensation von Chromatin existieren punktartige Aktinfilamente. Referenzfärbungen mit Phalloidin (siehe Maximumsprojektionen,  $\Delta z=2 \,\mu$ m) verdeutlichen (c) die Bündelung von Aktin im Zytoplasma untransfizierter Zellen und (d) die Lokalisation von Phalloidin an zytoplasmischen Aggregationen von UTR230-GFP und zellulärem F-Aktin.

damit einhergehenden DNA-Schädigungen erhöht. Im Zuge dessen steigt die Menge von zytoplasmischem Aktin und es formen sich Aggregationen, die mit Phalloidin spezifisch nachgewiesen werden. In Zellen, die zusätzlich UTR230-GFP exprimieren, stabilisiert Utrophin das zelluläre Aktin und größere Bündel bilden sich im Zellkern als auch im Zytoplasma. Die zytoplasmischen Aggregationen von UTR230-GFP markieren daher nicht zwangsläufig exogene Strukturen von Aktin, werden aber von der erhöhten Expression beeinflusst. Möglicherweise betrifft dies auch größere Aktinbündel in den Zellkernen, die über ein stark dekondensiertes Chromatin verfügen.

#### Dynamik von gebündelten oder punktartigen nuklearen Aktinfilamenten

Weiterhin werden dynamische Eigenschaften nuklearen Aktins unter der Einwirkung von VPA untersucht, indem die Zellphänotypen mit gebündelten (siehe Abb. 5.18a) oder punktartigen Aktinfilamenten (siehe Abb. 5.18b) analysiert werden (siehe Tab. 5.2 für deren Häufigkeiten). Diesbezüglich erfolgt die Unterteilung über das Lokalisationsmuster von UTR230-GFP im Zellkern, das zur Ausprägung zytoplasmischer Aggregationen unabhängig ist. Insgesamt entspricht die Dynamik von gebündeltem nuklearen Aktin den unbehandelten Zellen. So skaliert das zeitgemittelte  $MSD(\tau)$  mit einem mittleren Anomalieparameter  $\langle \alpha_i \rangle = 0.57 \pm 0.04$  bzw.  $\alpha_i = 0.57 \pm 0.25$ . Dazu ist die Verteilung der generalisierten Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i})$  bzw.  $K_{\alpha,i} = (3 \pm 3) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$ unverändert, wenngleich die Mobilitätsgrößen  $K_{\alpha,i}$  und  $\alpha_i$  etwas stärker als beim Gesamtensemble unbehandelter Zellen variieren. Hierbei weisen die Statistiken von normierten Inkrementen  $p(\chi)$  eine symmetrische und richtungsunabhängige Gaußsche Diffusion der gebündelten Aktinfilamente nach. Für Statistiken  $p(\chi)$  über alle Zellkerne zeigen sich schwache Merkmale einer heterogenen Diffusion, die für Verschiebungszeiten  $\tau \geq 7 \Delta t$ verschwinden. Ebenfalls bestätigt der nicht-Gaußsche Parameter  $\langle \overline{\mathcal{G}}_i \rangle = 0.09 \pm 0.08$  eine heterogene Diffusion für wenige Trajektorien des Gesamtensembles und die Korrelationsfunktionen  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=2\delta t)\rangle = 0.05 \pm 0.06$  und  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau\leq 1\,\mathrm{s})\rangle = 0.01 \pm 0.01$  weisen eine zeitlich gleichmäßige Dynamik nach. Demzufolge bestehen keine Unterschiede zur homogenen Subdiffusion gebündelten Aktins in den Zellkernen unbehandelter Zellen.

Auch die Bewegungen punktartiger Aktinfilamente sind unter der Behandlung mit VPA weitgehend unverändert in den Zellkernen. Dabei besteht eine subdiffusive Dynamik zum mittleren Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle = 0.54 \pm 0.06$  mit einer identischen Verteilung  $p(\alpha_i)$ . Die Bewegungen einzelner Aktinfilamente sind zeitlich negativ korreliert, deren mittlere Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1)\rangle = -0.26 \pm 0.04$  und Skalierungen  $C_{v,i}(\xi=1) = 2^{\alpha_i-1}-1$ einer viskoelastischen FBM zum Anomalieparameter  $\langle \alpha_i \rangle$  entsprechen. Außerdem sind die Mobilitäten punktartigen Aktins stark heterogen zwischen verschiedenen Filamenten und auch zeitlich veränderlich innerhalb ihres Trajektorienverlaufs. In dieser Hinsicht stimmen die relativen Abweichungen  $\Delta p(\chi) \neq 0$  sowie die Werte  $\langle \overline{\mathcal{G}}_i \rangle = 0.16 \pm 0.06$ ,  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=2\delta t)\rangle = 0.09 \pm 0.05 \text{ und } \langle G_{\Delta K,i}(\tau\leq1\,\mathrm{s})\rangle = 0.02 \pm 0.01 \text{ mit der Heterogenität}$ von punktartigem Aktin der unbehandelten Zellen überein. Dagegen verringert sich der generalisierte Transportkoeffizient  $\langle K_{\alpha,i} \rangle = (19 \pm 5) \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  etwa eineinhalbfach unter dem Einfluss von VPA und die Verteilung  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -1.83 \pm 0.31$  verschiebt sich zu signifikant kleineren Werten. Die geringeren Teilchenmobilitäten unter dieser Behandlung könnten aus einer verstärkter Polymerisierung nuklearen Aktins hervorgehen. Somit erhöht sich zwar die Bindung von UTR230-GFP im Zellkern, jedoch bleiben die Charakteristika der heterogenen Subdiffusion punktartiger Aktinfilamente unverändert unter den Schädigungen und der begleiteten Dekondensation von Chromatin.

#### 5.5.5 Reorganisation unter Trichostatin A

Unter DNA-Schädigungen durch die Einwirkung von Trichostatin A (TSA) verstärken sich die Aggregationen von UTR230-GFP im Zellkern und Zytoplasma. Wie in Abb. 5.19a dargestellt ist, zeigen sich für etwa zwei Drittel aller Zellen Aktinstrukturen mit einer hohen Fluoreszenz und Flächen von etwa  $3-5 \,\mu\text{m}^2$  in den Zellkernen. Diese Aggregate von UTR230-GFP nehmen weitgehend den gesamten Interchromatinbereich zwischen den mit H2B-mCherry markierten Histonen ein und können bis zu  $10 \,\mu\text{m}^2$  umfassen. Ihre Formen sind weniger sphärisch und stärker elongiert als die gebündelten nuklearen Aktinfilamente. Daneben sind die Aggregationen von UTR230-GFP über den experimentellen Zeitraum von wenigen Minuten unbeweglich. Hierbei wirkt das Chromatin bei der Acetylierung durch TSA weniger stark dekondensiert als durch VPA. Wird die Behandlungsdauer von TSA von 24 h auf 48 h erhöht, sterben die meisten Zellen, da auch das *"Blebbing"* der Kernhülle als eine Vorstufe zur Apoptose [197] stark zunimmt.

Bei den übrigen ca. 30 % der Zellkerne existieren gebündelte Aktinfilamente mit einem Lokalisationsmuster von UTR230-GFP, das mit den häufigsten Phänotypen unter der Behandlung mit VPA übereinstimmt. Die im Zellkern gebündelten Aktinfilamente sind mit einem typischen Durchmesser von einem Mikrometer etwas kleiner und sphärischer als die aggregierten Aktinstrukturen, wobei diese beiden Phänotypen von nuklearem Aktin visuell nicht immer eindeutig unterschieden werden können. Vereinzelt besteht auch ein Lokalisationsmuster von UTR230-GFP mit hunderten punktförmigen Aktinfilamenten im Zellkern. Die experimentellen Häufigkeiten von punktartigen, gebündelten oder aggregierten nuklearen Aktinfilamenten unter der Einwirkung von TSA oder VPA sind in Tab. 5.2 zusammengefasst. Vergleichend sind auch die Phänotypen unbehandelter Zellen angegeben, bei denen jedoch keine Aggregationen von UTR230-GFP vorliegen.



Abb. 5.19: Lokalisationsmuster Aktins unter der Einwirkung von Trichostatin A. (a) In den meisten U2OS-Zellen besteht ein starkes Expressionsmuster von UTR230-GFP mit großen, zytoplasmischen Aggregationen sowie unveränderter Lokalisation am Zellkortex und den Stressfasern. Im Zellkern nehmen die ausgedehnten Aggregationen von UTR230-GFP weitgehend den gesamten Bereich außerhalb von Chromatin (H2B-mCherry) ein (siehe Maximumsprojektion,  $\Delta z=2 \,\mu$ m). (b) Phalloidinfärbungen untransfizierter Zellen dokumentieren eine Bündelung Aktins im Zytoplasma, jedoch keine großflächigen Aggregationen unter TSA.

	Punktartig (Nukl.)	Gebündelt (Nukl.)	Aggregiert (Nukl.)
unbehandelt	*70 % (s. Abb. 5.1a)	*15 % (s. Abb. 5.1b)	< 2 %
VPA $(24 h)$	15 % (s. Abb. 5.18b)	70 % (s. Abb. 5.18a)	15 %
TSA (24 h)	< 5 %	30~%	65 % (s. Abb. 5.19a)

\*keine zytoplasmischen Aggregationen

Tab. 5.2: Häufigkeiten verschiedener Phänotpyen nuklearen Aktins.

Angegeben sind die experimentellen Häufigkeiten von punktartigem, gebündeltem oder aggregiertem UTR230-GFP im Zellkern. Unter Einwirkung von VPA oder TSA bilden sich für alle Phänotypen größere Aggregationen von UTR230-GFP an zytoplasmischen Aktinstrukturen (siehe auch Phalloidinfärbungen Abb. 5.18 & 5.19). Andere 15 % der unbehandelten Zellen zeigen eine vorwiegend zytoplasmische Lokalisation punktartigen Aktins (siehe Abb. 5.1c).

Im Zytoplasma verstärkt sich die Aggregation von UTR230-GFP unabhängig zur Lokalisation nuklearen Aktins (siehe Abb. 5.19a). Dabei besteht, neben der vergleichsweise schwachen Bindung von UTR230-GFP an den Stressfasern und dem aktinreichen Zellkortex, ein ausgeprägtes Muster großer zytoplasmischer Aggregationen von UTR230-GFP, die gewöhnlich Flächen zwischen  $10 - 20 \,\mu\text{m}^2$  aufweisen. Diese statischen Strukturen mit einer hohen Fluoreszenz erstrecken sich über das gesamte Zytoplasma und formen häufig großflächige Aggregationen, die ringförmig um den Zellkern angelagert sind. Demnach verstärkt sich mit den durch TSA induzierten DNA-Schädigungen die Expression von UTR230-GFP, wobei kein direkter Zusammenhang zwischen dem Lokalisationsmuster von UTR230-GFP im Zytoplasma und den verschiedenen Zellphänotypen von nuklearem Aktin festgestellt wird. Wie z.B. in Abb. 5.19a veranschaulicht, korrelieren großflächige Aggregationen von UTR230-GFP tendenziell zu Akkumulationen im Zellkern.

Anhand von Referenzfärbungen mit Phalloidin wird untersucht, ob die durch TSA bedingte Aggregierung von UTR230-GFP eine Bündelung von Aktin bedeutet. Wie die Phalloidinfärbungen untransfizierter, mit TSA behandelter Zellen in Abb. 5.19b verdeutlichen, ähnelt das Lokalisationsmuster von UTR230-GFP den Phalloidinmarkierungen des Aktinkortex und der Stressfasern. Auch zeigen sich zytoplasmische Bündelungen der Aktinfilamente bei der Markierung mit Phalloidin (siehe Inset in Abb. 5.19b). Allerdings existieren weitaus weniger und deutlich kleinere Aktinbündel bei den Phalloidinfärbungen. Werden, vergleichbar zu Abb. 5.18d, mit UTR230-GFP transfizierte Zellen zusätzlich mit Phalloidin markiert, kann filamentöses Aktin bei den großflächigen zytoplasmischen Aggregationen von UTR230-GFP nachgewiesen werden. Die DNA-Schädigungen durch TSA bewirken folglich eine erhöhte Expression von UTR230-GFP, die zur Bündelung filamentösen Aktins im Zytoplasma führt und UTR230-GFP zu großflächigen Aggregationen stabilisiert. Die Auswirkungen von TSA auf das Erscheinungsbild von Aktin im Zellkern und Zytoplasma sind daher vergleichbar mit der Einwirkung von VPA. Gegenüber den Histonacetylierungen durch VPA führt die Behandlung mit TSA jedoch zu stärkeren DNA-Schädigungen und vermehrten Aggregationen filamentösen Aktins.

#### 5.5.6 Gegenüberstellung der Dynamik punktartiger Aktinfilamente

Im Folgenden werden die dynamischen Eigenschaften punktartiger Aktinfilamente im Zellkern zwischen den unbehandelten (siehe Abschnitte 5.4.1–5.4.4) und den biochemisch veränderten Zellen (siehe 5.5.1–5.5.3) verglichen. Die Bedingungen umfassen die Auflösung der Mikrotubuli durch Nocodazol, hypotonisches Schwellen durch die Einwirkung eines wässrigen Kulturmedium und eine Wasserabgabe durch hypertonische Saccharose-Lösung. Unter Vorbehalt wird die Dynamik punktartiger Aktinfilamente bei Acetylierung durch VPA (siehe 5.5.4) hinzugenommen. Statistische Signifikanzen werden mit Hypothesentests nachgewiesen. Für die überwiegend normalverteilten Daten sind dies Zweistichproben-toder Kolmogorov-Smirnov-Tests zum Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$  (siehe Anhang D.3).

#### Anomalieparameter und generalisierter Transportkoeffizient

Anhand des Anomaliewerts  $\alpha$  und des generalisierten Transportkoeffizientens  $K_{\alpha}$  wird die Dynamik punktartiger Aktinfilamente gegenübergestellt. Die zellmittleren Anomaliewerte  $\langle \alpha_i \rangle$  (siehe Abb. 5.20a) folgen über die jeweiligen Ensemble der 11 – 20 Zellen einer Normalverteilung. Der Anomalieparameter unbehandelter Zellen  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.55$  ist unter der Einwirkung von Nocodazol oder VPA unverändert und mit  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.25$  bzw.  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.05$ signifikant geringer für die hypo- bzw. hypertonische Behandlung. Hierbei verändert sich die charakteristisch asymmetrische Form der Wahrscheinlichkeitsverteilung  $p(\alpha_i)$  unter dem Einfluss der hypo- oder hypertonischen Kulturlösung.

Die mittleren generalisierten Transportkoeffizienten  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$  sowie deren Logarithmen  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle$  sind für alle Bedingungen normalverteilt und jeweils verschieden vom Wert



Abb. 5.20: Dynamik punktartigen Aktins unter biochemischen Veränderungen. Streuung des mittleren Anomaliewerts  $\langle \alpha_i \rangle$ , generalisierten Transportkoeffizientens  $\langle K_{\alpha,i} \rangle$ und der Inkrementstatistik  $p(\chi)$  nuklearen Aktins. (a) Die Subdiffusion  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.55$  ist bei Nocodazol oder VPA unverändert und signifikant geringer für die hypo- bzw. hypertonische Behandlung. (b) Die Beweglichkeiten verringern sich unter biochemischen Veränderungen. (c) Signifikante Abweichungen  $\Delta p(\chi=3) > 0$  dokumentieren eine nicht-Gaußsche Diffusion bei Nocodazol oder VPA, gegenüber einer geringfügigen Heterogenität unter dem hypotonischen Einfluss und einer Gaußschen Charakteristik statischen Aktins bei hypertonischer Behandlung.

 $\langle K_{\alpha,i} \rangle \simeq 35 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  der unbehandelten Zellen (siehe Abb. 5.20b). Dabei weisen die Transportkoeffizienten unter Nocodazol und VPA einen statistisch gleichen Mittelwert  $\langle K_{\alpha,i} \rangle \simeq 20 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  auf. Unter hypo- bzw. hypertonischer Behandlung verringern sich neben den Anomaliewerten auch die Mobilitäten  $\langle K_{\alpha,i} \rangle \simeq 10 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$ , bzw.  $\langle K_{\alpha,i} \rangle \simeq 1 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$ . Für jede Messbedingung ist die Verteilung  $p(K_{\alpha,i})$  aller Einzelteilchentrajektorien weitgehend symmetrisch. Die Aussagen über beide Mobilitätsgrößen verändern sich nicht, wenn statt der Zellmittelwerte die Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,\langle \text{MSD}_i \rangle_a}$ oder Anomalieparameter  $\alpha_{\langle \text{MSD}_i \rangle_a}$  der zellmittleren MSD-Kurven analysiert werden.

#### Heterogenität der Diffusion und antikorreliertes Bewegungsverhalten

Das Bewegungsverhalten punktartiger Aktinfilamente unter biochemischen Veränderungen wird über die Statistik normierter Schrittinkremente  $p(\chi)$  und die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  analysiert. Die Inkrementstatistik  $p(\chi)$  (siehe Abb. 5.20c) weist eine nicht-Gaußsche Diffusion unter Nocodazol sowie VPA nach, deren Diffusionsheterogenität  $\Delta p(\chi = 3) \simeq 3 \cdot 10^{-3}$  statistisch unverändert zur Dynamik Aktins bei unbehandelten Zellen ist. Bei der hypotonischen Einwirkung besteht eine schwache nicht-Gaußsche Diffusion, die aus der Heterogenität des Zellensembles hervorgeht. Hingegen korrespondiert  $p(\chi)$  unter der hypertonischen Behandlung zu einer Gaußschen Verteilung, was die richtungsunabhängigen Lokalisationsunsicherheiten nach einer Normalverteilung verdeutlicht. Die Aussagen zur Diffusionsheterogenität übertragen sich gleichermaßen auf die Inkrementstatistiken  $p(\chi=1)$  jeder biochemischen Veränderung. In diesem Falle werden signifikant negative Abweichungen  $\Delta p(\chi=1) \simeq 3 \cdot 10^{-2}$  für unbehandelte Zellen als auch die Behandlungen mit Nocodazol oder VPA bestimmt. Dazu gleichwertig wird die Diffusionsheterogenität mit dem nicht-Gaußschen Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  (5.3) analysiert.

Die Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  weist zeitlich gegensätzliche Bewegungen der nuklearen Aktinfilamente mit einer signifikanten Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle$ nach. Diese stimmt für die Einwirkung von Nocodazol oder VPA mit  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle \simeq -0.23$ zu den unbehandelten Zellen überein und der Verlauf von  $C_v(\tau)$  korrespondiert für alle Verschiebungszeiten zu einer viskoelastischen FBM mit  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.55$ . Dabei besteht die Übereinstimmung zwischen den Messbedingungen für alle Unterabtastungen  $\delta t = n\Delta t$ der lokalen Geschwindigkeiten. Bei der hypotonischen Einwirkung verstärkt sich die Antikorrelation  $\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle \simeq -0.4$  signifikant und stimmt mit einer intensivierten FBM zum Anomalieparameter  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.25$  überein. Für die statischen Aktinfilamente unter der hypertonischen Behandlung ist einzig  $C_v(\xi=1) = -0.48$  als Folge der Lokalisationsunsicherheiten negativ korreliert. Demzufolge entspricht das Bewegungsverhalten der nuklearen Aktinfilamente unter allen biochemischen Veränderungen dem zeitlichen Muster einer viskoelastischen FBM des zugehörigen Anomaliewerts  $\langle \alpha_i \rangle$ .

### 5.6 Zusammenfassung, Modellbildung und Diskussion

In diesem Kapitel wurden dynamische Eigenschaften filamentösen Aktins in der Umgebung des Zellkerns unter eventuellen biochemischen Veränderungen untersucht. Dazu wurden menschliche U2OS-Kulturzellen mit der Utrophin-Trunkierungsmutante UTR230-GFP von BELIN et al. [169] transfiziert. Die Bewegungen nuklearen Aktins wurden mittels Lebendzellaufnahmen konfokaler Lichtmikroskopie registriert, indem einzelne Filamente zeitabhängig lokalisiert und zu durchgängigen Trajektorien verbunden wurden. Deren Dynamik wurde mit verschiedenen Maßen anomaler Diffusion quantitativ beurteilt.

#### Charakterisierung filamentösen Aktins im Zellkern

In Abschnitt 5.3 wurde überprüft, ob das Lokalisationsmuster von UTR230-GFP bei den U2OS-Zellen mit den Phänotpyen nuklearen Aktins von [169] übereinstimmt. Für ca. 70% der Zellen zeigten sich hunderte punktartige, kurze Aktinfilamente im Zellkern mit einer typischen Länge von etwa 500 nm, bei einer gleichzeitigen Lokalisation von UTR230-GFP an zytoplasmischen Stressfasern und dem Aktinkortex. Bei weiteren ca. 15% der Zellen verstärkte sich die Lokalisation von UTR230-GFP im Interchromatinbereich zu sphärischen Aktinbündeln mit einem typischen Durchmesser von etwa 1 µm und einer erhöhten Fluoreszenz. Die übrigen Zellen wiesen überwiegend zytoplasmische Lokalisationen der punktartigen Aktinfilamente auf. Vereinzelt bestanden auch stärkere Bündel von UTR230-GFP an Aktin im Zytoplasma der Zellen. Insgesamt konnten nicht nur die Lokalisationsmuster von UTR230-GFP im Zellkern und Zytoplasma [169] sondern auch die experimentellen Häufigkeiten [163,169] bestätigt werden. Bei den folgenden Untersuchungen der Aktinfilamentdynamik kann somit davon ausgegangen werden, dass die als endogen nachgewiesenen Strukturen von UTR230-GFP nukleare Aktinfilamente markieren [169], ohne die biologisch herausfordernde Kolokalisation von Phalloidin und UTR230-GFP im Zellkern durchgeführt zu haben. Weiterhin können die Untersuchungen über die Polymerisation nuklearer Aktinfilamente bezüglich der Reparatur von DNA-Schädigungen genutzt werden [163], um die Aussagen zur veränderten Lokalisation und Dynamik von UTR230-GFP unter biochemischen Veränderungen zu unterstützen.

#### Zusammenfassung der Aktinfilamentdynamik unbehandelter Zellen

In Abschnitt 5.4 wurde die Aktinfilamentdynamik von unbehandelten Zellen untersucht. Die Analysen beruhten auf Kenngrößen, die spezifische Eigenschaften einer anomalen Diffusion charakterisieren: die mittlere quadratische Verschiebung  $MSD(\tau) = K_{\alpha} \tau^{\alpha}$  mit Anomalieparameter  $\alpha$  und Transportkoeffizient  $K_{\alpha}$ , die Verteilung normierter Inkremente  $p(\chi)$ , der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$ , die Autokorrelationsfunktionen der quadrierten Inkremente  $G_{\Delta r^2}(\tau)$ , der lokalen Diffusivität  $G_{\Delta K}(\tau)$  und der Geschwindigkeiten  $C_v(\tau)$ (mit ggf. wiederholten Unterabtastungen), sowie die spektrale Leistungsdichte  $PSD(\omega)$ mit Variationskoeffizient  $\gamma(f)$  der Trajektorien (siehe Abschnitt 2.3.5 und Anhang F). Die Bewegungen punktartiger Aktinfilamente folgten über den experimentellen Zeitbereich weniger Sekunden einer starken Subdiffusion mit einem Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.55$ , unabhängig zur Trajektorienlänge, und überquerten innerhalb einer Sekunde eine mittlere Fläche von MSD  $\simeq 30 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2$ . Das mittlere Skalierungsverhalten der Filamente einer oder aller Zellen existierte gleichsam für die zellmittleren MSD-Kurven, die über das Bootstrapping-Verfahren [76] gleichwertig nachgebildet wurden. Ebenso unverändert war die subdiffusive Skalierung, wenn  $\alpha$  parameterfrei über das Resampling-Verfahren [73] bestimmt oder Lokalisationsunsicherheiten bei der Anpassung berücksichtigt wurden.

Zwischen den Beweglichkeiten aller Aktinfilamente bestand eine große Heterogenität, die sich durch eine logarithmische Normalverteilung  $p(\log(K_{\alpha,i}))$  oder eine Exponentialverteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  äußerte. Hierbei verfügten längere Trajektorien über geringere Transportkoeffizienten. Mit der Statistik  $p(\chi)$  wurde die Diffusionsheterogenität näher charakterisiert und die Abweichungen von Gaußscher Diffusion gleichermaßen für die Dynamik punktartigen Aktins einzelner Zellen oder des Gesamtensembles nachgewiesen. Daneben wurden die heterogenen Mobilitäten mit dem nicht-Gaußschen Parameter  $\overline{G}_i$ quantitativ bestimmt. Die Autokorrelationsfunktionen  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  und  $G_{\Delta K}(\tau)$  begründeten zeitlich veränderliche Beweglichkeiten punktartigen Aktins im Zellkern.

Mit der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $C_v(\tau)$  wurde eine verstärkt gegensätzliche Abfolge der Filamentbewegungen nachgewiesen. Hierbei korrespondierten sowohl die Antikorrelationen aufeinanderfolgender Schritte  $C_v(\tau = \Delta t)$  als auch der zeitliche Verlauf  $C_v(\tau)$  mit dem Bewegungsverhalten viskoelastischer FBM. Die Übereinstimmung mit einer FBM (2.13) wurde durch wiederholte Unterabtastungen der Geschwindigkeiten und die Skalierungen individueller Antikorrelationen  $C_{v,i}(\tau = \Delta t) = 2^{\alpha_i - 1} - 1$  bestätigt.

Ebenso wurde die Subdiffusion Aktins zum Anomalieparameter  $\alpha \simeq 0.55$  von der Skalierung der spektralen Leistungsdichte  $\langle PSD_i(\omega) \rangle$  und der normierten  $\langle PSD_i^*(\omega) \rangle$  von Trajektorien einer oder aller Zellen nachgewiesen. Dabei dokumentierte der Variationskoeffizient  $\gamma_{\infty}^* = 1$  die subdiffusive Dynamik punktartiger Aktinfilamente, wobei die Variationen  $\gamma(f)$  infolge der stark heterogenen Teilchenmobilitäten erhöht waren.

Diese Eigenschaften bestätigten sich für die Bewegungen punktartiger Aktinfilamente im Zytoplasma. So existierte eine starke Subdiffusion mit einem Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.55$ und statistisch äquivalenten Transportkoeffizienten  $K_{\alpha}$ . Gleichzeitig war das zeitliche Bewegungsverhalten gegensätzlich korreliert und deckte sich mit viskoelastischer FBM. Die spektrale Untersuchung unterstützte weiter die subdiffusive und heterogene Dynamik punktartiger Aktinfilamente im Zytoplasma. Hierbei waren die Bewegungen zwischen verschiedenen Trajektorien, aber auch innerhalb ihres zeitlichen Verlaufs veränderlich. Zur Heterogenität punktartigen Aktins im Zellkern bestand mit der Inkrementstatistik  $p(\chi)$  kein signifikanter Unterschied, wenngleich der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$  die Subdiffusion im Zytoplasma als stärker heterogen einstufte.

#### 5 Fraktionelle Brownsche Bewegung als Triebfeder der Aktinfilamentdynamik

Gebündelte nukleare Aktinfilamente folgten einer stark subdiffusiven Dynamik mit einem Anomalieparameter  $\alpha \simeq 0.55$ . Diese Skalierung bestand für individuelle  $MSD_i(\tau)$ und die zellmittleren MSD-Kurven unabhängig von den Trajektorienlängen von 5 - 20 s. Weiter bestätigten das Bootstrapping-Verfahren [76] oder die Resampling-Methode [73] die Subdiffusion zum Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.55$ . Die gebündelten Aktinfilamente bewegten sich mit einer mittleren Wegstrecke MSD  $\simeq 3 \cdot 10^{-3} \,\mu\text{m}^2$  innerhalb einer Sekunde signifikant langsamer als punktartiges Aktin. Die Beweglichkeiten individueller Aktinfilamente  $K_{\alpha,i}$  waren unabhängig von  $\alpha_i$  etwa zehnfach verringert. Ebenso reduzierten sich deren Variationen und  $p(\log(K_{\alpha,i}))$  bildete eine annähernd symmetrische Verteilung über etwa eine Größenordnung mit einer weiteren Exponentialverteilung der normierten Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle$ . Die Statistik von normierten Inkrementen  $p(\chi)$  dokumentierte, ungeachtet der Verschiebungszeiten  $\tau$ , eine richtungsunabhängige Gaußsche Diffusion über gebündelte Aktinfilamente einzelner Zellen. Dabei belegten die Korrelationsfunktionen  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  und  $G_{\Delta K}(\tau)$  zeitlich unveränderliche Teilchenmobilitäten. Weiter zeigte  $p(\chi)$ über alle Zellkerne schwache Merkmale einer heterogenen Diffusion auf, die für größere Verschiebungszeiten jedoch verschwanden. Vergleichbar dazu bestätigte  $\overline{\mathcal{G}}$  eine geringfügig heterogene Diffusion für wenige Filamenttrajektorien des Gesamtzellensembles. Erneut waren die Bewegungen nuklearen Aktins zeitlich gegensätzlich korreliert. Der mittlere Verlauf von  $C_v(\tau)$  sowie deren Antikorrelation  $C_v(\tau = \Delta t)$  und die Skalierungen einzelner  $C_{v,i}(\tau = \Delta t) = 2^{\alpha_i - 1} - 1$  stimmten exzellent mit einer viskoelastischen FBM überein. Allerdings war die Antikorrelation  $C_v(\tau = \Delta t)$  ohne eine Unterabtastung etwas erhöht, da statische Lokalisationsunsicherheiten zur instantanen Geschwindigkeit gebündelten Aktins relevant beitrugen. Mit der spektralen Analyse der  $(\text{PSD}_i(\omega))$  bzw.  $(\text{PSD}_i^*(\omega))$ und den Variationskoeffizienten  $\gamma^*(f)$  wurde die starke Subdiffusion der gebündelten Aktinfilamente verdeutlicht. Diesbezüglich waren die experimentellen Variationen  $\gamma(f)$ größer als es verschiedene Bewegungsarten einer FBM ermöglichen.

Zusammenfassung der Aktinfilamenteigenschaften unter biochemischen Veränderungen In Abschnitt 5.5 wurde die Lokalisation und Dynamik nuklearer Aktinfilamente unter biochemischen Veränderungen der Zellen untersucht. Dies umfasste die Auflösung der Mikrotubuli durch Nocodazol, hypotonisches Schwellen durch wässriges Kulturmedium, hypertonische Wasserabgabe durch Saccharose-Lösung, sowie Acetylierung der Histone und DNA-Schädigung durch Valproinsäure (VPA) oder Trichostatin A (TSA). Insgesamt veränderte sich die Subdiffusion nuklearen Aktins bei jeder biochemischen Veränderung.

Mit Nocodazol bestand die Lokalisation an zytoplasmischen Stressfasern und dem Aktinkortex, als auch mit hunderten punktartigen Aktinfilamenten im Zellkern weiter. Dabei blieb die viskoelastische Subdiffusion nuklearer Aktinfilamente und deren räumliche wie zeitliche Heterogenität unverändert. Hingegen waren die Transportkoeffizienten  $K_{\alpha}$ unter der Auflösung des Mikrotubuli-Zytoskeletts etwa eineinhalbfach verringert. Bei der hypotonischen Behandlung existierten weiter punktartige Aktinfilamente im Zellkern, wobei ein ähnliches Lokalisationsmuster bei verhältnismäßig hoher Hintergrund-fluoreszenz im Zytoplasma nachgewiesen wurde. Die Subdiffusion intensivierte sich zu  $\alpha \simeq 0.25$  und die Beweglichkeiten nuklearen Aktins reduzierten sich etwa dreifach. Die Bewegungen waren nach FBM mit einer erhöhten Viskoelastizität zeitlich gegensätzlich gerichtet und zeigten eine weitgehend zeitunveränderliche Gaußsche Diffusion.

Unter hypertonischer Einwirkung durch Saccharose-Lösung bildeten sich punktartige bis stärker gebündelte Aktinfilamente im Interchromatinbereich der Zellkerne, deren Chromatin vermehrt dekondensiert war. Hierbei wurde die Dynamik nuklearen Aktins vollständig unterbunden. Die resultierenden Bewegungen charakterisierten richtungsunabhängige und unkorrelierte statische Lokalisationsunsicherheiten von  $\varsigma \simeq 20$  nm.

Bei den mit VPA behandelten Zellen verstärkte sich neben der Dekondensation von Chromatin auch die Expression von UTR230-GFP zu stärker gebündelten Strukturen im Zellkern und Zytoplasma, die filamentöses Aktin beinhalteten. Die Dynamik stimmte zur homogenen und viskoelastischen Subdiffusion gebündelten Aktins der unbehandelten Zellen überein. Bei den selteneren Zellphänotypen mit punktförmigen Aktinfilamenten kongruierten die dynamischen Eigenschaften zur heterogenen und viskoelastischen Subdiffusion der unbehandelten Zellen. Die Beweglichkeiten punktartigen Aktins waren, vermutlich durch die verstärkte Polymerisierung, etwa eineinhalbfach verringert.

Unter den akkumulierten DNA-Schäden durch TSA verstärkte sich die Aggregation von UTR230-GFP an zellulärem Aktin im Zellkern und Zytoplasma. Dabei wurde UTR230-GFP zu stärker elongierten, großflächigen und unbeweglichen Aggregationen mit Flächen einiger  $\mu m^2$  stabilisiert. Insgesamt ähnelten sich die verschiedenen Lokalisationsmuster unter den Histonacetylierungen durch die Einwirkungen von TSA bzw. VPA. Allerdings bedingten die DNA-Schädigungen eine stark erhöhte Expression von UTR230-GFP.

#### 5.6.1 Schematische Modellierung der Aktinfilamentdynamik

Ausgehend von den dynamischen Eigenschaften der Aktinfilamente und den Einflüssen biochemischer Veränderungen sollen die Ergebnisse genutzt werden, um die Bewegungen von Aktin im Zellkern schematisch nachbilden zu können. Die Modellierung strebt eine tiefergehende Einsicht in die Dynamik nuklearen Aktins an, indem die zuvor untersuchten Merkmale anomaler Diffusion aufgegriffen und an minimale physikalische Anforderungen für das Bewegungsverhalten von Aktin im Zellkern geknüpft werden.

Über den gesamten experimentellen Zeitraum existiert eine starke Subdiffusion der nuklearen Aktinfilamente mit zeitlich gegensätzlichen Bewegungen. Da das Bewegungsmuster unter allen Behandlungen exzellent mit den zeitabhängigen Antikorrelationen einer FBM korrespondiert, wird eine subdiffusive Dynamik nach dem Verhalten der FBM angenommen. Eine Subdiffusion besteht häufig in zellulären oder biomimetischen Umgebungen (siehe z.B. [69, 78, 84, 198]). Dabei sind die antipersistenten Bewegungen nuklearen Aktins physikalisch mit einer Viskoelastizität des umgebenden Nukleosols und Chromatins assoziiert [186,191,199,200]. Daneben könnte die Subdiffusion von anderen stochastischen Modellen beschrieben werden [54–56]. So bewirkt eine räumlich eingeschränkte Diffusion an der Perkolationsschwelle transiente Subdiffusion [201,202]. Ebenso rufen ein zeitkontinuierlicher Random Walk [61,190] sowie die verwandte skalierte Brownsche Bewegung mit zeitveränderlichen Diffusivitäten [203,204] eine sich stetig verlangsamende und ergodizitätsbrechende anomale Diffusion hervor. Diese Modellvorstellungen eignen sich daher, das subdiffusive Skalierungsverhalten nachzubilden. Jedoch berücksichtigen diese nicht unbedingt das antikorrelierte Bewegungsmuster und zeigen teilweise die ungewöhnliche Eigenschaft einer verschiedenen Skalierung der zeit- oder ensemblemittleren quadratischen Verschiebung. Demnach wird die Subdiffusion nuklearen Aktins mit einer FBM zum Anomalieparameter  $\alpha = 0.6$  modelliert.

Ausgehend von einer viskoelastischen FBM unterliegt die Bewegung eines punktartigen Aktinfilaments weiteren Veränderungen im Zellkern. So dokumentieren die Statistik  $p(\chi)$ und der Parameter  $\overline{\mathcal{G}}_i$  Abweichungen von einer Gaußschen Diffusion. Ebenfalls begründen die Autokorrelationen  $G_{\Delta r^2}(\tau)$  und  $G_{\Delta K}(\tau)$  zeitlich unterschiedliche Beweglichkeiten, die auch von räumlich verschiedenen Umgebungsbeschaffenheiten verursacht werden könnten. Somit ist es bei der Modellierung erforderlich, zeitveränderliche Mobilitäten von Aktin einzubeziehen. Am einfachsten wird dies mit einem Zweizustandsmodell der Diffusion ermöglicht. Beide Phasen könnten einen Wechsel zwischen ungebundenen, im Interchromatinbereich beweglichen, und zur Behebung von DNA-Doppelstrangbrüchen gebundenen Aktinfilamenten darstellen. Die Simulationseigenschaften sollten so gewählt werden, dass beide Zustände zur Subdiffusion von Aktin beitragen. Hierbei erweist sich eine beschleunigte Phase mit doppelten Beweglichkeiten  $K_{\alpha}$  für etwa 30 % der Zeitpunkte als zweckmäßig. Daneben ist es möglich, die Simulationen um weitere Zustände, graduelle Übergänge oder stochastisches Umschalten zu ergänzen (siehe z.B. [76,184]). Ebenso könnten sich die Anomaliewerte beider Zuständen unterscheiden, was aktiv gerichteten Transport verdeutlichen würde. Daher wird die FBM der punktartigen Aktinfilamente zum Anomalieparameter  $\alpha = 0.6$  um ein Zweizustandsmodell mit erhöhtem Transportkoeffizienten  $\tilde{K}_{\alpha}$  und konstanter Dauer der beschleunigten Phase  $T_{\text{bes.}}$  erweitert.

Allerdings erklärt diese Modellbildung nicht die stark heterogenen Beweglichkeiten der Filamenttrajektorien, die sich durch unterschiedliche Skalierungen des arithmetisch und geometrisch mittleren  $\langle MSD_i(\tau) \rangle$  oder die gegenüber einer FBM erhöhten Variationen von  $\gamma(f)$  äußerten. Wie in den Experimenten nachgewiesen, wird daher eine Exponentialverteilung von  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i} \rangle)$  angenommen. Dies unterstützt eine Subdiffusion nach dem Verhalten einer viskoelastischen FBM mit einer großen Heterogenität der Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,i}$ , die in experimentellen Systemen häufig vorhanden ist [60,62,63]. Damit stimmen auch die Transportkoeffizienten aus den Simulationen mit einer logarithmischen Normalverteilung von  $p(K_{\alpha,i})$  überein und entsprechen mit  $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -1.74 \pm 0.43$  weiter der Verteilung punktartiger Aktinfilamente ( $\langle \log(K_{\alpha,i}) \rangle = -1.63 \pm 0.37$ ). Auf diese Weise werden die statistischen Schwankungen der zeitlich begrenzten Trajektorien und die experimentell erhöhten Variationskoeffizienten  $\gamma(f) > 1$  durch die FBM-Simulationen wiedergegeben. Folglich werden bei der Modellierung heterogene Teilchenmobilitäten innerhalb der Zellkernumgebung berücksichtigt.

Außerdem werden Lokalisationsunsicherheiten der Einzelteilchendetektion nachgebildet, indem die modellierten Teilchenpositionen mit normalverteiltem Rauschen von  $\varsigma = 20$  nm überlagert werden. Hierbei unterstützen die resultierenden Bewegungen nuklearen Aktins bei der hypertonischen Einwirkung den Beitrag richtungsunabhängiger und unkorrelierter statischer Lokalisationsunsicherheiten. Diesbezüglich ist die aus Anpassungen der  $MSD_i(\tau)$ bestimmte Ortsauflösung mit anderen Einzelteilchenverfolgungsexperimenten biologischer Systeme vergleichbar [60, 69, 70, 82]. Mit der Lokalisationsunsicherheit gleicht sich  $p(K_{\alpha,i})$ der modellierten Trajektorien besser an die Verteilungen punktartigen Aktins an, da sich der Anteil experimentell schwer erfassbarer Beweglichkeiten ( $\log(K_{\alpha,i}) \lesssim -2.5$ ) reduziert. Darüber hinaus könnten dynamische Lokalisationsunsicherheiten berücksichtigt werden, welche die Antikorrelationen von  $C_v(\tau)$  experimentell zusätzlich abschwächen.

Insgesamt besteht die schematische Modellierung der Aktinfilamentdynamik aus einer Grundbewegung nach dem Bewegungsverhalten subdiffusiver und viskoelastischer FBM, deren Transportkoeffizienten stark verschieden im Zellkern sind. Hierbei werden zeitliche Veränderungen der Mobilitäten punktartiger Aktinfilamente durch ein Zweizustandsmodell der Aktinfilamentdynamik aufgefasst. Auch berücksichtigt die Modellbildung statische Lokalisationsunsicherheiten der experimentellen Einzelteilchendetektion.

#### Gegenüberstellung zwischen modellierter und experimenteller Aktinfilamentdynamik

Die auf diese Weise nachgebildete Dynamik der punktartigen Aktinfilamente wird mit den Experimenten verglichen, indem charakteristische Eigenschaften der Subdiffusion von nuklearem Aktin bei den unbehandelten Zellen kurz herausgestellt werden. Hierzu sind verschiedene Diffusionseigenschaften für eine Wahl der Modellierungsparameter<sup>13</sup> in Abb. 5.21 dargestellt. Um den Einfluss verschiedener Statistiken zu verringern, wird das Teilchenensemble mit Segmentlängen  $T_{Seg} = 10$  s verwendet.

Wie in Abb. 5.21a veranschaulicht, bilden die Simulationen die Subdiffusion punktartigen Aktins mit einem mittleren Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle \simeq 0.55$  ab. Dabei werden auch die Form und Schwankungen der experimentellen Häufigkeitsverteilung  $p(\alpha_i)$  beschrieben. Ebenso stimmen die Verteilungsfunktionen der Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i})$  überein. Die zeitlich gegensätzlichen Filamentbewegungen nach dem Verhalten einer FBM werden durch die Geschwindigkeitsautokorrelation  $C_v(\tau)$  bestätigt. Hierbei decken sich der mittlere Verlauf  $\langle C_{v,i}(\tau) \rangle$  sowie die Antikorrelationen  $C_{v,i}(\tau = \Delta t)$  und deren Skalierungen  $C_{v,i}(\tau = \Delta t) = 2^{\alpha_i - 1} - 1$  zwischen experimenteller und modellierter Dynamik.

<sup>13</sup>  $\alpha = 0.6$ ,  $\langle K_{\alpha,i} \rangle = 0.02 \,\mu\text{m}^2 \,\text{s}^{-\alpha}$  (mit Exponentialverteilung von  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i} \rangle)$ ),  $K_{\alpha,i} = 0.5 \,\widetilde{K}_{\alpha,i}$ ,  $N_{\text{Traj.}} = 2500$ ,  $T_{\text{Traj.}} = 10 \,\text{s}$ ,  $\widetilde{T}_{\text{bes.}} = 3 \,\text{s}$ ,  $\Delta t = 0.1 \,\text{s}$ ,  $\varsigma = 20 \,\text{nm}$ .



Abb. 5.21: Charakteristika der modellierten und experimentellen Aktindynamik. (a) Die Anomaliewerte  $p(\alpha_i)$  verdeutlichen eine viskoelastische Subdiffusion mit heterogenen Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i})$ , die (b) den Frequenzverlauf des (normierten) Variationskoeffizientens punktartigen Aktins wiedergeben. (c) Die Experimente und Simulationen<sup>13</sup> bilden eine nicht-Gaußsche Diffusion mit zeitveränderlichen Beweglichkeiten ab.

Außerdem fasst die Modellbildung die heterogenen Mobilitäten nuklearen Aktins auf. Infolge der angenommenen Exponentialverteilung  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  unterscheiden sich der Anomalieparameter und der Transportkoeffizient zwischen dem arithmetisch oder geometrisch mittleren  $\langle MSD_i(\tau)\rangle$ . Vergleichbar zu den Experimenten übersteigt der Variationskoeffizient  $\gamma(f)$  der spektralen Leistungsdichten  $PSD_i(\omega)$  den Wertebereich einer subdiffusiven Dynamik (siehe Abb. 5.21b). Hingegen klingt  $\gamma^*(f)$  frequenzabhängig ab und konvergiert gegen den Grenzwert einer viskoelastischen FBM  $\gamma_{\infty} = 1$ , wenn die Einzelteilchentrajektorien bei der spektralen Analyse auf ihre mittleren Beweglichkeiten normiert werden. Somit dokumentieren diese Eigenschaften der Modellierung die stark heterogenen Mobilitäten von Aktin im Zellkern.

Die modellierte Aktinfilamentdynamik gibt die experimentell berichteten Merkmale einer nicht-Gaußschen Diffusion wieder. Wie in Abb. 5.21c dargestellt wird, weicht die Inkrementstatistik  $p(\chi)$  von einer Normalverteilung ab. Die Abweichungen von einer nicht-Gaußschen Diffusion stimmen gut mit dem Bewegungsverhalten punktartigen Aktins überein. Jedoch sind die experimentellen Bewegungen für größere Verschiebungszeiten  $\tau$ stärker heterogen. Entsprechend dokumentieren der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}} \simeq 0.13$ sowie die Autokorrelationen  $\langle G_{\Delta r^2}(2\delta t) \rangle = 0.11$  und  $\langle G_{\Delta K}(\tau \leq 1 \text{ s}) \rangle = 0.03$  zeitlich veränderliche Beweglichkeiten der modellierten Trajektorien. Ausgehend davon ist die nicht-Gaußsche Dynamik vergleichbar zur Diffusion punktartigen Aktins im Zellkern.

Zusammenfassend können mit dem Zweizustandsmodell der Aktinfilamentdynamik die Subdiffusion nach dem Verhalten einer viskoelastischen FBM als auch die heterogenen und zeitveränderlichen Beweglichkeiten nachgebildet werden. Anderweitig könnte ein zeitabhängiger Wechsel von gebundenem und zwischen dem Chromatin beweglichen Aktin über eine unterschiedliche Kopplung an getriebene Transportprozesse, und daher verschiedene Anomalieparameter beider Phasen, simuliert werden. Eine Modellierung der Gaußschen Subdiffusion von gebündelten Aktinfilamenten erfordert hingegen keine zeitlich veränderlichen Beweglichkeiten im Zellkern.

#### 5.6.2 Diskussion der Aktinfilamentdynamik im aktuellen Forschungsstand

#### I. Subdiffusion, molekulares Crowding und Viskoelastizität

Unabhängig zur Lokalisation von UTR230-GFP folgen die Bewegungen von nuklearem Aktin einer starken Subdiffusion mit einem Anomalieparameter  $\alpha \simeq 0.55$  im Zeitbereich weniger Sekunden. In diesem Kontext ist subdiffusiver Transport in der Zelle nicht nur auf der Skala von Molekülen [187,205], selbstorganisierten Proteinkomplexen [71,186] oder den Zellorganellen [94,190] gegenwärtig, sondern vermittelt auch vielfältiges Zusammenwirken innerhalb stark gedrängter zellartiger Umgebungen [185,206–208]. Das sogenannte molekulare "*Crowding"* [209,210] ist weiterhin für die Reaktionskinetik biochemischer Bindungen in lebender Materie [211–213] und biomimetischen Systemen [214–216] entscheidend. Darüber hinaus spiegelt die Umgebung des Nukleoplasmas mit dem Chromatin und weiteren aus RNA und Proteinen bestehenden, membranlosen Organellstrukturen wie den Nukleoli, Cajal- und PML-Körperchen eine räumlich stark unterschiedliche Beschaffenheit wider [12,13,217]. Für diese wird ein zum Zytoplasma vergleichbares molekulares "*Crowding"* berichtet [189,218–220].

Andererseits wird das molekulare "Crowding" vielfach mit einer Viskoelastizität des umgebenden Mediums assoziiert [189, 198, 200, 221]. In diesem Zusammenhang werden mechanische Eigenschaften des Zellkerns von der Organisation Lamins an der Kernhülle und Chromatins im Nukleoplasma diktiert [14,222–224], die von der Vitalität der Zelle abhängig sind [191,225–227]. Diesbezüglich lassen sich viskoelastische Eigenschaften von Chromatin explizit mit Einzelteilchenverfolgungsexperimenten untersuchen [186, 199, 228]. Im Einklang dazu stehen die zeitlich gegensätzlichen Bewegungen nuklearen Aktins nach einer FBM. Insbesondere stimmen die Anomaliewerte und Transportkoeffizienten der gebündelten Aktinfilamente mit der viskoelastischen und Gaußschen Subdiffusion der Telomere überein [69,190] und verändern sich gleichwertig bei einer hypo- oder hypertonischen Einwirkung [80]. Physikalisch kann die viskoelastische Subdiffusion der Telomere zum Anomaliewert  $\alpha = 0.5$  mit der Dynamik monomerischer Untereinheiten einer flexiblen Polymerkette erklärt werden [71]. Außerdem wird die Subdiffusion und Vergröberungsdynamik von mikrometergroßen Proteinkondensaten im Nukleosol mit dem Rouse-Modell von Chromatin in Verbindung gebracht [186], da vielfältige Interaktionen zu dessen gedrängtem Fasernetzwerk bestehen [186, 229].

#### II. Heterogenität und Aktivität der intrazellulären Umgebung

Weiterhin äußert sich die heterogene Umgebungsbeschaffenheit des Zellkerns [12, 13, 217] in den diffusiven Eigenschaften von nuklearem Aktin. Dabei variieren die Beweglichkeiten punktartiger Aktinfilamente stark zwischen verschiedenen Trajektorien, wenngleich die gebündelten Filamente Merkmale heterogener Teilchenmobilitäten unterhalb verschiedener Zellen aufweisen. Mit den Experimenten ungeklärt bleiben jedoch die Dynamik nuklearen Aktins im Zeitbereich einiger Minuten, wenn die viskoelastische Subdiffusion der Telomere in eine Brownsche Bewegung übergeht [69, 190], und Zusammenhänge zu langreichweitig, kohärenten Bewegungen innerhalb des Zellkerns [192–194]. Andererseits verändert sich die Polymerisation von nuklearem Aktin und dessen Zusammenwirken mit Chromatin während zellinterner Regulationen [161, 162, 165, 230] oder Anpassungen auf externe Stimulationen [166–168]. Hierbei könnte ein Zusammenhang zwischen der heterogenen Dynamik nuklearen Aktins und den räumlich voneinander abgegrenzten Chromosomenterritorien bestehen [231, 232].

In dieser Hinsicht ist hervorzuheben, dass eine kontinuierliche Energiezufuhr notwendig ist, um die räumliche Separation der Chromosomen aufrechtzuerhalten [231,232] und biochemisch unterschiedliche, flüssigartige Mikroumgebungen außerhalb von Chromatin zu organisieren [13,233,234]. Dazu könnte der zeitabhängige Wechsel der punktartigen Aktinfilamente zwischen verschiedenen Mobilitätszuständen im Zellkern korrespondieren. Wie im gegenwärtigen Forschungsstand berichtet wird [16, 17, 163, 235], ist die Polymerisation nuklearer Aktinfilamenten entscheidend in die Reparaturdynamik geschädigter DNA involviert. So wird die homologe Reparatur offener DNA-Doppelstrangbrüche in aufgelockertem Euchromatin durch Bewegungen der DNA-Reparaturstellen entlang filamentösen Aktins erleichtert [17,236]. Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in dichterem Heterochromatin ist mit einer zusätzlichen Relokalisation mittels eines Myosin-gesteuerten Transports der geschädigten DNA an die Kernhülle in die Nähe der Kernporen verbunden [17, 173, 235]. Bemerkenswerterweise wird ein gerichteter Transport der DNA-Reparaturstellen nur kurzzeitig festgestellt [17, 173, 237, 238], während stark subdiffusive Bewegungen mit einem Anomalieparameter  $\alpha \simeq 0.5$  und Wegstrecken von wenigen  $10^{-3}$  µm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> explizit nachgewiesen werden [174].

Die Experimente weisen auch ein unverändertes Bewegungsverhalten von UTR230-GFP im Zytoplasma der Zellen nach. Insbesondere stimmt die heterogene Subdiffusion der punktartigen Aktinfilamente mit einem Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.55$  zur Dynamik von Quantenpunkten überein [75, 76, 239]. Dabei wird das zeitveränderliche Bewegungsverhalten der Quantenpunkte im Zeitbereich weniger Sekunden von unspezifischen Wechselwirkungen mit den Elementen des Zytoplasmas [239], vermutlich über temporäre Interaktionen mit dem ER [75, 76], bestimmt. Eine alternierende FBM zwischen zwei Zuständen erklärt deren heterogene Subdiffusion und Variationen von Transportkoeffizienten [75, 184], die unverändert in Zellen während der Metaphase bestehen [240]. Diesbezüglich ist die tendenziell größere Heterogenität von Aktinfilamentmobilitäten im Zytoplasma der Zellen in Übereinstimmung mit einem eventuell größeren molekularen "Crowding" des Zytoplasmas [189, 219, 220]. Die im Vergleich zu den biologisch inaktiven Quantenpunkten erhöhten Transportkoeffizienten von UTR230-GFP markiertem Aktin verdeutlichen somit den Beitrag aktiver Zellvorgänge zu den Filamentbewegungen.

#### Interpretation der Aktinfilamenteigenschaften unter biochemischen Einflüssen

Abschließend werden mögliche Zusammenhänge zwischen der veränderten Aktinfilamentdynamik und den biochemischen Behandlungen der Zellen diskutiert als auch in den Kontext gegenwärtiger Forschungsarbeiten eingeordnet.

#### I. Zusammenwirken mit den Zytoskelettfilamenten

Die relativen Veränderungen der Beweglichkeiten unter der Auflösung der Mikrotubuli durch die Einwirkung von Nocodazol stimmen quantitativ zwischen nuklearem Aktin und den Telomeren überein [69]. Der Interpretation des Rouse-Modells von Chromatin folgend, verringert sich die effektive Temperatur des Zellkerns durch die geringeren Beweglichkeiten etwa zweieinhalbfach [69]. Vergleichbar dazu wird ein Rückgang der effektiven Kerntemperatur um 300 K anhand der Kernhüllenfluktuationen berichtet, die unter dem Einfluss von Nocodazol allerdings Stillstand gelangen [241]. Derzeitige Untersuchungen der Telomerbewegungen dokumentieren eine weitere Abhängigkeit der Umgebungstemperatur auf die Effektivtemperatur des Zellkerns [80].

Mit den Experimenten bleiben jedoch Zusammenhänge zwischen den dynamischen Eigenschaften nuklearer Aktinfilamente und der Beschaffenheit von Aktin in den Zellen ungeklärt. So heben gegenwärtige Untersuchungen die strukturierende und schützende Wirkung einer Aktinkappe um den Zellkern [242,243] oder unterstützende Eigenschaften der (nuklearen) Aktinfilamente bei vielen Zellvorgängen hervor [15,157,244,245]. Unter der Auflösung von Aktinfilamenten verstärken sich die Bewegungen der Telomere [246] und auch die Fluktuationen der Kernhülle [241]. In dieser Hinsicht werden mechanische Kräfte über Lamine an den Zellkern übertragen [14,224], unter deren Abnahme sich die Dynamik der Telomere erhöht [191,246]. Folglich könnten dynamische Eigenschaften nuklearer Aktinfilamente unter Anpassungen der Zellen [161,165–167] untersucht werden oder mechanische Veränderungen mit biophysikalischen Manipulationstechniken [41] wie Rasterkraftmikroskopie [247] und optischen Pinzetten [248] bewirkt werden.

#### II. Veränderungen unter der Einschränkung aktiver Transportprozesse

Die verringerte Beweglichkeit und intensivierte Subdiffusion nuklearen Aktins unter der hypotonischen Behandlung erscheinen zunächst widersprüchlich zur Einwirkung eines wässrigen Kulturmediums. Allerdings bedingt der starke osmotische Schock vielzählige Veränderungen der intrazellulären Organisation [39], die sich beispielsweise im Rückgang der Zyotskelettfilamente oder den strukturellen Umwandlungen der membrangebundenen Organellen äußern (siehe Abschnitt 4.8). Dabei bestätigen derzeitige Untersuchungen eine gleichwertig verlangsamte Dynamik der Telomere unter dem hypotonischen Eingriff [80]. Für die Telomere wird auch eine verstärkte Subdiffusion bei einem nicht näher spezifizierten osmotischen Schock berichtet [191]. Außerdem beeinflusst die hypotonische Behandlung auch die Wechselbeziehungen zwischen den Organellen [35,37,148], welche von der Organisation des Zytoskeletts weiter abhängig sind [93,94]. Auf diese Weise erhöht sich die Beweglichkeit von Quantenpunkten im Zytoplasma der Zellen und deren zeitlicher Wechsel zwischen verschiedenen Mobilitätszuständen verringert sich, da unspezifische Interaktionen der Quantenpunkte mit den Elementen des Zytoplasmas [239] bei der hypotonischen Einwirkung zurückgehen [75,76].

Es ist daher wahrscheinlich, dass aktive Transportprozesse innerhalb der Zelle unter dem hypoosmotischen Schock abnehmen und biochemische Eigenschaften der molekularen Motoren verändert werden. Der Modellbildung aus Abschnitt 5.6.1 folgend, begründet die experimentelle Dynamik von Aktin unter der hypotonischen Einflussnahme einen Rückgang aktiver Transportvorgänge, da die Subdiffusion ohne eine beschleunigte Phase zeitunveränderlich ist. Demnach verändern sich mit dem hypoosmotischen Schock nicht nur die effektive Temperatur des Zellkerns wie bei der Auflösung der Mikrotubuli [69,241], sondern auch mit der Polymerisation von Aktin assoziierte Zellvorgänge.

Jedoch mangelt es einer Erklärung für die höhere Viskoelastizität der Aktindynamik zum Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.25$  unter der hypotonischen Einwirkung. Einen Anhaltspunkt könnten die stark verlangsamten Bewegungen verschiedener Kernbestandteile unter einer Energiedepletion geben [191,192,241]. Diesbezüglich verstärkt sich die Subdiffusion der Telomere zum Anomaliewert  $\langle \alpha \rangle = 0.25$  [191] und die Skalierung des mittleren Netzwerk-Verschiebungsquadrats von Chromatin verringert sich auf  $\langle \alpha \rangle = 0.3$  [192]. Andererseits reduziert sich das Amplitudenquadrat langreichweitiger Kernhüllenfluktuationen etwa zweifach, wenngleich thermische Fluktuationen der Wellenlängen  $\lambda < 1.5$  µm unverändert vorliegen [241]. Künftige Experimente könnten daher die Dynamik nuklearen Aktins unter einer Energiedepletion untersuchen und in Bezug zu den verringerten, allerdings nicht vollständig unterbundenen Aktivitäten des Zellkerns setzen.

Dagegen kommt es unter der hypertonischen Einwirkung durch eine Saccharose-Lösung zum Stillstand der Aktinfilamentdynamik. Die resultierenden Bewegungen reflektieren zeit- und richtungsunabhängige statische Lokalisationsunsicherheiten in einer Höhe von  $\varsigma = 20$  nm. Diese sind zu anderen Einzelteilchenverfolgungsexperimenten biologischer Systeme vergleichbar [60,69,84], deren experimentelle Lokalisationsgenauigkeit grundsätzlich vom Signal-Rausch-Verhältnis vorgegeben wird [67,68]. Insbesondere könnten dynamische Lokalisationsunsicherheiten bei den modellierten Bewegungen der punktartigen Aktinfilamente berücksichtigt werden [82,249].

#### III. Dekondensation von Chromatin und rheologische Merkmale des Zellkerns

Vor dem Hintergrund der fixierten Aktinfilamentdynamik ist es vorstellbar, dass die Bewegungen nuklearen Aktins mechanische Eigenschaften von Chromatin widerspiegeln. Somit könnte die Fixierung nuklearen Aktins von Verdichtungen des Chromatins bewirkt werden [180,250], wenngleich sich die subdiffusive Dynamik der Telomere uneindeutig zur Konzentration der hypertonischen Saccharose-Lösung verlangsamt [80]. Weiterhin lässt sich Chromatin über externe Krafteinwirkungen physikalisch bei lebenden Zellen verdichten [251]. Diesbezüglich wird eine festkörperartige Beschaffenheit von kondensiertem Chromatin unter physiologischen wie biochemisch veränderten Zuständen berichtet [223]. Dessen Kondensate könnten als Grundgerüst für die Organisation des Zellkerns über lokale Phasenseparationen [13,233] fungieren [12,223].

Jedoch sind die rheologischen Merkmale des Zellkerns komplex [14,224,252] und werden von Wechselbeziehungen des Chromatins mit dem Laminnetzwerk geprägt [222,226]. Außerdem finden zahlreiche DNA-bezogene Vorgänge wie die Transkription, Replikation oder Reparatur in verschiedenen Regionen des Zellkerns statt [12,13,235]. Unter einer von DNA-Schädigungen bewirkten Dekondensation von Chromatin wird daher eine verringerte Viskosität der Zellkernumgebung nachgewiesen [197,225,253]. Hierbei werden die physikalischen Eigenschaften des Chromatins und der flüssigen Phasen des Zellkerns verändert [196,197,252]. Dies äußert sich beispielsweise in einer reduzierten Stabilität der Kernhülle [197] und abweichenden Eigenschaften der Nukleoli [196] oder vergrößerten Diffusionskoeffizienten der Bewegung von einzelnen Proteinen [225,253].

Obwohl die zunehmenden DNA-Schädigungen Chromatin dekondensieren [225] und die Polymerisation nuklearer Aktinfilamente [16,17] und Bündelung von UTR230-GFP [163] verstärken, ist das Bewegungsverhalten zum Anomaliewert  $\alpha \simeq 0.55$  der punktartigen und gebündelten Aktinfilamente erhalten. Möglicherweise könnte eine veränderte Subdiffusion auf größeren Zeitskalen beobachtet werden. In dieser Hinsicht werden längerfristig erhöhte Bewegungen der Telomere bei DNA-Schädigungen von Hefezellen [254] und menschlichen Zelllinien berichtet [237,255]. Ebenso ist deren Bewegungsverhalten zeitveränderlich [89,190] und wird von transienten Interaktionen mit den PML-Körperchen beeinflusst [256]. Nicht zuletzt verfügen andere Genloki, wie z.B. die Zentromere über eine vergleichbare Dynamik [191]. Dies könnte eine Schnittstelle zwischen den dynamischen Eigenschaften von Chromatin und nuklearem Aktin eröffnen.

# Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Musterbildungsaspekte und dynamische Eigenschaften selbstorganisierter Zellvorgänge untersucht. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Strukturen lebender Zellen mittels konfokaler Lichtmikroskopie abgebildet und deren orts- und zeitabhängige Beschaffenheit über moderne Bildsegmentierungsverfahren analysiert. Hierbei erlaubten die quantitativen Auswertungen tiefergehende Einsichten in die vielschichtigen Wechselbeziehungen zwischen der Organisation und Dynamik verschiedener Zellbestandteile, besonders wenn die Rückwirkungen biochemischer Einflussnahmen herausgestellt wurden. Im Zuge dessen ließen sich physikalische Kennzeichen dieser Selbstorganisationsprozesse generisch mit Modellbeschreibungen wiedergeben und die Beobachtungen so in einen übergeordneten Kontext einbinden.

In diesem Zusammenhang bilden die ERES wandlungsfähige Membrandomänen, deren Musterbildung bei Säugetierzellen entscheidend mit der tubulären Beschaffenheit des ERs verbunden ist. Insbesondere existieren größere Aggregationen von fluoreszenzgekoppelten Proteinen der ERES [118,119] auf zunehmend flächigen ER-Bereichen, wenn die Genexpression von strukturgebenden Proteinen des tubulären ERs gemindert wird. Dabei kann das Lokalisationsmuster der ERES, ungeachtet molekularer Einzelheiten ihrer Komplexbildung, mit einem diffusionsbestimmten Entmischungsphänomen physikalisch abgebildet werden. Diese Ergebnisse begründen neuartige Erkenntnisse der beständigen Selbstorganisation von ERES, deren dispergierte Anordnung aus einer Vergröberungsdynamik membrangebundener Proteindomänen hervorgehen könnte [136].

Eine selbstorganisierte Musterbildung der ERES, die sich über Rückwirkungen mit der Struktur des ERs koordinieren ließe, könnte dynamische Anpassungen der Proteinsekretion unter wechselnden Umgebungsbedingungen ermöglichen. Dies würde mit den Veränderungen der ERES während zellinterner Regulationen wie der Mitose [129] oder Differenzierung [155] übereinstimmen, die auch von strukturellen Umwandlungen des ERs begleitet sind. Allerdings kann sich das intrazelluläre Muster der ERES an die sekretorischen Exportmoleküle anpassen [118,127] und die Form der Transportstrukturen [28,29] von Vesikeln [27,121] hin zu gestreckten Tubuli [30,31] variieren. Möglicherweise spiegeln die Zellphänotypen unter dem hypoosmotischen Schock veränderte Membraneigenschaften und Kontakte zwischen den Zellorganellen [35,39] wider, wie sie bei der kontrastverstärkten und auflösungsverbesserten Bildgebung über den SRRF-Algorithmus [44] des überwiegend tubulären ERs veranschaulicht und quantifiziert werden können. Außerdem vermitteln die dynamischen Eigenschaften nuklearer Aktinfilamente und deren Anpassungen unter biochemischen Einwirkungen nähere Einblicke in die komplexen Vorgänge innerhalb des Zellkerns. So dokumentieren die mit dem Fluoreszenzreporter UTR230-GFP [169] markierten Aktinfilamente eine stark viskoelastische Subdiffusion im Interchromatinbereich und ein zugleich zeitveränderliches Bewegungsverhalten innerhalb der heterogenen Zellkernumgebung. Unterstützt durch die Analyse unterschiedlicher Bewegungscharakteristika, wurde eine Modellbeschreibung der Aktinfilamentdynamik entwickelt. Dieses Zweizustandsmodell der Beweglichkeiten lässt, neben den mathematisch interessanten Eigenschaften der subdiffusiven Dynamik, eine physikalische Sichtweise über die Polymerisation nuklearer Aktinfilamente ermöglichen.

In diesem Kontext bietet es sich an, die dynamische Regulation filamentösen Aktins im Zellkern während zellinterner wie externer Anpassungen [161,168] und den assoziierten Umstrukturierungen von Chromatin [15,162] weiterzuverfolgen. Insbesondere könnten die Bewegungen der Chromosomenenden [190,191] oder der DNA-Reparaturstellen [173–175] Bindeglieder zur biologischen Aktivität der nuklearen Aktinfilamente darstellen. Dabei ließe sich über die Rückwirkungen von nuklearem Aktin unter biochemischen Einflussnahmen [225,226] an die Reparaturmechanismen von geschädigter DNA [16,17] oder an die rheologischen Merkmale des Zellkerns [14,224] anknüpfen. In künftigen Experimenten könnten die viskoelastischen Eigenschaften der Aktinfilamentdynamik bei einer Energiedepletion (siehe auch [192,241]) untersucht oder temperaturabhängige Auswirkungen (siehe auch [80]) erfasst werden. Nicht zuletzt ließen sich mechanische Veränderungen des Zellkerns durch biophysikalische Manipulationstechniken hervorrufen [41,247].

Insgesamt gestatten die Ergebnisse dieser Arbeit physikalische Erkenntnisgewinne über Selbstorganisationsprozesse innerhalb der Zelle. In diesem Sinne bildet die biophysikalische Forschung ein interdisziplinäres Wissenschaftsgebiet, deren gegenwärtige Fortschritte nicht nur von einem umfassenden Verständnis biologischer und chemischer Zellvorgänge, sondern gerade von quantitativen Einsichten aus physikalischen Konzepten profitieren. Damit eröffnen die hier dargestellten Untersuchungen aussichtsreiche Perspektiven an der aktiven Schnittstelle von Physik, Chemie und Biologie.

# TEIL IV

# Anhang

A	Laborarbeit mit Kulturzellen			134		
A.1 Kultivierung adhärenter, menschlicher Zellen						
	A.2	2 Transiente Transfektion über Lipofektion oder Elektroporation $\ldots$ $\ldots$ $\ldots$				
	A.3 Fixierung, Antikörper- und Phalloidinfärbung					
	Izellbildgebungsexperimente	. 136				
	A.5	.5 Biochemische Veränderungen				
		A.5.1	Nocodazol: Auflösung der Mikrotubuli	. 137		
		A.5.2	Filipin: Fragmentierung des Endoplasmatischen Retikulums	. 137		
		A.5.3	Trichostatin A: Acetylierung und DNA-Schädigung	. 138		
		A.5.4	Valproinsäure: Acetylierung und DNA-Schädigung	. 138		
		A.5.5	Hypotonisches Kulturmedium: Bildung großer intrazellulärer Vesikel	. 138		
		A.5.6	Hypertonische Saccharose-Lösung: Chromatinverdichtungen	. 140		
		A.5.7	RNA-Interferenz: Selektives Gen-Silencing	. 140		
	A.6	Zelllysa	ate, Westernblot und Proteinmengenquantifizierung	. 141		
В	Licht	mikrosł	opaufbau und Bildgebungsdetails	143		
С	Ums	etzung (	der SRRF-Mikroskopiemethode	145		
D	Quantitative Analyse der Fluoreszenzaufnahmen			147		
	D.1	Segme	ntierung und Auswertung der ERES und ER-Strukturen	. 147		
	D.2	Lokalis	ation, Auswertung und Modellierung nuklearen Aktins	. 151		
	D.3	Schem	a zur Beurteilung statistischer Signifikanzen	. 153		
E	Zent	ntrale Kenngrößen der Musterbildung von ERES 154				
F	Zent	Zentrale Kenngrößen der Aktinfilamentdynamik 157				

# A Laborarbeit mit Kulturzellen

Die Untersuchungen an menschlichen Kulturzellen finden in den S1-Sicherheitslaboren des Lehrstuhls für Experimentalphysik I an der Universität Bayreuth statt. Verschiedene für die Kultivierung, Präparation und Untersuchung der Zellen erforderliche Substanzen werden von der technischen Assistentin des Lehrstuhls zur unmittelbaren Anwendung vorbereitet. Alle Arbeitsschritte sind wohl dokumentiert und erfolgen nach etablierten Protokollen, die teilweise auf die Eigenschaften der kultivierten Zellinien angepasst sind.

# A.1 Kultivierung adhärenter, menschlicher Zellen

Die Untersuchungen finden an menschlichen Epithelzellen statt. Hierzu werden Lagerbestände der Kulturzellen in flüssigem Stickstoff gehalten und anschließend aufgetaut. Menschliche Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa, DSMZ No. ACC-57) werden mit D10-Medium, das sich aus Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% fetalem Kälberserum, 1% Pyruvat und 1% L-Glutamat zusammensetzt, versorgt. Menschliche Knochenkrebszellen (U2OS, DSMZ No. ACC-832) werden in McCoy's 5A Medium, dem 10% fetales Kälberserum, 1% Pyruvat und 1% L-Glutamat zugesetzt sind, kultiviert.

Befinden sich die Zellen am Ende der logarithmischen Wachstumsphase bei einer Konfluenz zwischen 80 - 95 %, werden diese etwa zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Hierzu werden das alte Nährmedium entfernt, die Zellen in PBS gewaschen und durch Zugabe von vorgewärmten Trypsin-EDTA bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> von der Kulturflasche gelöst. Danach wird der Zellsuspension frisches Kulturmedium zugegeben, diese in ein konisches Zentrifugenröhrchen übertragen und für zwei Minuten bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in frisches Nährmedium aufgenommen und in einer neuen Flasche resuspendiert. In den Experimenten werden Zellen zwischen Passagen 5 – 18 verwendet, wobei deren Passagenzahl und Konfluenz zeitlich erfasst ist. Die Kulturzellen werden regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontaminationen getestet.

Bevor die Zellen ausgesät werden, wird die Zelldichte über Färbung mit einer Trypanblaulösung in einer Zählkammer bestimmt. Typischerweise sind etwa 500 Zellen in einem Mikroliter Suspension enthalten. Anschließend werden zwischen 20000 – 40000 Zellen in 650 µl Zellkulturmedium für eine Kammer der in den Experimenten genutzten Ibidi-Polymer  $\mu$ -Slides (4 well) ausgesät. Bereits über Elektroporation transfizierte Zellen werden mit einer doppelt so hohen Dichte ausgesät. Die Zellen adherieren über Nacht.

# A.2 Transiente Transfektion über Lipofektion oder Elektroporation

Über die Methode der Transfektion wird zellfremdes genetisches Material zeitweise in die Zellen eingebracht. Bei den Experimenten von Teil II dieser Arbeit (sowie bei den Doppelfärbungen in Teil III) erfolgt dies durch die Aufnahme kationischer Lipide von den Zellen, die über das Reagenz Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung eines leicht angepassten Herstellerprotokolls [257] gebildet werden. Dazu werden 1.5 µl Lipofectamine 3000 in 25 µl vorgewärmtes serumreduziertes Medium (Opti-MEM) gegeben und das Mikroreaktionsgefäß für drei Sekunden vortexiert. In ein zweites Gefäß werden zu 25 µl Opti-MEM zwischen 300 – 750 ng Plasmid-DNA (siehe Tab. A.1) und 1 µl P 3000 Reagenz hinzugegeben. Anschließend wird dieses Volumen mehrmals mit einer Mikropipette auf- und abgezogen und in das erste Gefäß übertragen. Nach einer Inkubationsdauer von 10 – 15 min bei Raumtemperatur werden 35 µl der DNA-Lipid-Komplexe tröpfchenweise in eine Kammer eines Ibidi  $\mu$ -Slides (4 well) hinzugegeben und kurz, aber schwungvoll vermischt.

Dagegen wird die Plasmid-DNA über die Methode der Elektroporation transfiziert, um Aktinfilamente innerhalb der Zellkerne bei Teil III dieser Arbeit fluoreszent zu markieren. Diesbezüglich wird das Herstellerprotokoll (Lonza Group) für die Nukleofektion von U2OS-Zellen [258] verwendet. Hierzu wird das Zellpellet erneut in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, für drei Minuten bei 200×g zentrifugiert und in 100 µl Transfektionslösung (82 µl Nukleofektorlösung und 18 µl Ergänzungslösung 1) resuspendiert. Die Suspension wird in eine Einzelnukleocuvette, in der sich 2 µg Plasmid-DNA befinden, übertragen. Die Transfektion erfolgt über die X-Einheit des Nukleofektors, indem die Membranen der U2OS-Zellen kurzzeitig durch elektrische Spannungssignale (Pulssequenz CM104 [258]) permeabilisiert werden. Die auf diese Weise transfizierten U2OS-Zellen werden in 500 µl Zellkulturmedium aufgenommen und ausgesät.

Plasmid	Struktur	Zielsequenz innerhalb der Zelle	Ursprung
Aktin-GFP/RFP	F-Aktin	LifeAct Peptid (p <sup>CAG</sup> -LifeAct-TagGFP2/-TagRFP, ibidi GmbH)	$[177] \\ [178] \\ [169] \\ 6) [169]$
Aktin-GFP/RFP	F-Aktin	LifeAct Peptid (p <sup>CMV</sup> -LifeAct-TagGFP2/-TagRFP, ibibi GmbH)	
LifeAct-GFP	nukl. F-Aktin	LifeAct Peptid (LifeAct-EGFP-2XNLS, Addgene 58467)	
UTR230-GFP	nukl. F-Aktin	Utrophin Trunkierungsmut. (UTR230-EGFP-3XNLS, Addgene 584667)	
H2B-mCherry	Chromatin	Histon 2B (Addgene 20972)	[176]
CNX-GFP	ER	mPA-GFP-Calnexin-N14 (Addgene 57122)	[259]
CRT-GFP	ER	ER-Retentionssignal von Calreticulin (Addgene 80978)	[260]
KDEL-RFP	ER	ER-Retentionssignal von KDEL	[137]
GFP-Sec16A	ERES	Essentielles Trägerprotein der ERES [27] (Addgene 36155)	[118,142]
YFP-Sec23A	ERES	COPII-Vesikel, inneres Mantelprotein (Addgene 66611)	[119,120]
YFP-Sec24D	ERES	COPII-Vesikel, inneres Mantelprotein (Addgene 66614)	[119,120]
YFP-Sec31A	ERES	COPII-Vesikel, äußeres Mantelprotein (Addgene 66612)	[119,120]
ARF1-GFP	Golgi-Apparat	Adenosyl-Ribosylierungs-Faktor 1 (Addgene 39554)	[261]
Mito-GFP	Mitochondrien	$\alpha\text{-Dehydrogenase E1-Sequenz}$	[262]
Tubulin-GFP	Mikrotubuli	$\alpha$ -Tubulin (Addgene 12298)	[263]

Tab. A.1: Informationen zu den genutzen Plasmidvektoren und deren Referenz. Angegeben sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Markierung zellspezifischer Strukturen über fluoreszenzgekoppelte Markierungsproteine. Sofern verfügbar, finden sich nähere Informationen zum jeweiligen Plasmidvektor in der Datenbank ADDGENE [264]. Somit exprimieren die Zellen fluoreszenzgekoppelte Proteine, die zur spezifischen Markierung von Organellen und anderen Zellstrukturen genutzt werden. Die Zellen werden 16-24 h nach der Transfektion mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die für die Transfektionen genutzten Plasmidvektoren werden von anderen Forschungsgruppen, üblicherweise über die Datenbank ADDGENE [264], zur Verfügung gestellt und von der technischen Assistentin des Lehrstuhls für die Anwendung präpariert. Eine Übersicht der in dieser Arbeit genutzten Plasmidvektoren ist in Tab. A.1 gegeben.

# A.3 Fixierung, Antikörper- und Phalloidinfärbung

Die Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und anschließender Färbung beruht auf dem am Lehrstuhl angewandten Protokoll von Herrn Steve Keller [265]. Hierzu werden die auf den Probenkammern adhärenten Zellen dreimal in PBS gewaschen, für 15 min in frisch angesetztem 4%igen PFA fixiert, dreimal in PBS gewaschen, für 5 min in 0.1%igem Triton X-100-PBS permeabilisiert und wiederum dreimal in PBS gewaschen. Anschließend erfolgt eine Färbung über die Inkubation mit primären Antikörpern für 24 h bei 4 °C (etwa 1:200 in Lösungspuffer (0.3%iges Triton X-100-PBS mit 1% BSA)) und sekundären Antikörpern für 1 – 2 h, abgedunkelt bei Raumtemperatur (etwa 1:1000 in Lösungspuffer). Alternativ findet eine Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (ATTO 550-Phalloidin [266], gelöst in 1 ml Methanol) für 60 min bei Raumtemperatur (etwa 1:2500 in PBS) statt. Nach den Färbungen werden ungebundene Fluorophore durch dreimaliges Waschen in 0.1%igem Tween 20-PBS entfernt, die Proben dreimal in PBS gewaschen und innerhalb weniger Tage im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

# A.4 Lebendzellbildgebungsexperimente

Vor Beginn eines Lebendzellexperiments werden die Zellen aus dem Inkubator genommen, das Kulturmedium entfernt und zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wird den Zellen Imaging-Medium (Minimum Essential Medium mit 10 % HEPES und 1 % Penicillin-Streptomycin) zugegeben, das während der Experimente auf den Zellen verbleibt. Die Lebendzellexperimente finden ohne CO<sub>2</sub>-Umgebung bei einer Temperatur von  $(37 \pm 1)$  °C statt. Der pH-Wert des Kulturmediums kann mit dem Puffersystem des Imaging-Mediums für etwa 1 – 2 h stabil gehalten werden.

# A.5 Biochemische Veränderungen

Im Folgenden wird eine Übersicht über die genutzten biochemischen Behandlungen gegeben. Generell handelt es sich um verbreitete Veränderungen spezifischer Zellstrukturen, die allgemeine Anwendung in zellbiologischen Experimenten finden. Eine gute Übersicht über die Funktionsweisen und Anwendungsprotokolle wird z.B. in [267] gegeben.

#### A.5.1 Nocodazol: Auflösung der Mikrotubuli

Nocodazol ist ein krebsbekämpfendes Medikament, welches das dynamische Wachstum der Mikrotubuli beeinträchtigt, indem es an  $\beta$ -Tubulin bindet und Disulfidbindungen entscheidend verhindert [268]. In zellbiologischen Experimenten werden Konzentrationen von 5 – 50 µM zur gezielten Depolymerisation der Mikrotubuli eingesetzt [267]. Hingegen sind Konzentrationen weniger 10 nM verbreitet, um eine Synchronisierung im Zellzyklus und einen mitotischen Stillstand zu bewirken [152].

Zur Anwendung von Nocodazol ( $\geq 99\%$  HPLC, Sigma Aldrich) in den Zellexperimenten wird eine Stammlösung mit einer Konzentration von 20  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  in DMSO hergestellt, die auf eine Arbeitskonzentration von 10 µM in Imaging-Medium verdünnt wird. Vor den Experimenten werden die Zellen zweimal in vorgewärmtem PBS gewaschen und daraufhin mit der Nocodazollösung versetzt, die auf den Zellen verbleibt. Die Zellen werden, vor Licht geschützt, für 10 min auf Eis inkubiert, um vorhandene Mikrotubuli zu zerstören. Danach werden die Zellen für 20 min bei 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>-Umgebung inkubiert und im Mikroskop bei 37 °C untersucht. Das Protokoll für die Behandlung mit Nocodazol unterbindet die Polymerisation der Mikrotubuli zuverlässig und zerstört deren Zytoskelett vollständig. Dies wurde von Herrn Lorenz Stadler mittels Antikörperfärbungen von  $\alpha$ -Tubulin für verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten der Nocodazollösung bei HeLa-Zellen nachgewiesen [71,72]. In den Experimenten verbleiben die Kulturzellen für einen Zeitraum von 2h stabil und gehen danach vermehrt in Apoptose über.

#### A.5.2 Filipin: Fragmentierung des Endoplasmatischen Retikulums

Die Behandlung der Zellen mit Filipin III wurde von [75, 138] übernommen. Filipin ist eine Substanz der Polyen-Makrolide, die aus dem Myzel des Bakteriums *Streptomyces filipinensis* gewonnen wird und das ER bei lebenden Zellen in hunderte Fragmente degradiert [269]. Die Wirkungsweise ist noch immer ungeklärt, vermutlich folgt eine Destabilisierung der ER-Membranen durch Bindung von Filipin an Cholesterol [138].

Der Gebrauch von Filipin zum Abbau des ERs an lebenden Zellen wurde von Herrn Adal Sabri [76] im Labor etabliert. Hierzu wird eine Stammlösung von Filipin III ( $\geq 85\%$  HPLC, Sigma Aldrich) mit einer Konzentration von 10  $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$  in Methanol hergestellt, dessen Arbeitskonzentration 15  $\frac{\text{ug}}{\text{ml}}$  in Imaging-Medium beträgt. Die Zellen werden 30 min vor den Experimenten zweimal in PBS gewaschen und mit der Filipinlösung versetzt, die anschließend auf den Zellen verbleibt. Alle Arbeitsvorgänge und die Bildgebung erfolgen bei Raumtemperatur. Unter dem Einfluss von Filipin wird das ER für etwa 80% der Hela-Zellen vollständig degradiert. Die entstandenen ER-Fragmente unterschiedlicher Größen sind weitgehend statisch. Vereinzelt unterliegen diese jedoch, meist in peripheren Zellregionen, kontinuierlichen Bewegungen. Bei einer Behandlung mit 5  $\frac{\text{ug}}{\text{ml}}$  Filipin wird das ER von HeLa-Zellen nur teilweise aufgelöst (Experimente mit Herrn Adal Sabri).
#### A.5.3 Trichostatin A: Acetylierung und DNA-Schädigung

Trichostatin A (TSA) ist eine organische Verbindung aus dem Bakterium *Streptomyces platensis*, die als Antimykotikum dient [270]. Mit TSA werden die Enzymfamilien der Klasse I- und II-Histon-Deacetylasen bei Säugetierzellen gehemmt. Im biologischen Kontext verursacht die Hyperacetylierung der Histone durch TSA verstärkte Schädigungen der DNA und weitere Auflockerungen von Chromatin [182, 195]. Darüber hinaus können mit nano- bis mikromolaren Konzentrationen von TSA die Genexpression moduliert, das Zellwachstum zum Stillstand gebracht, oder Apoptose ausgelöst werden [271].

Die Applikation von TSA zur DNA-Schädigung menschlicher Kulturzellen orientiert sich an den Arbeiten [195, 196, 225], die Konzentrationen zwischen 165 - 624 nM für eine Behandlungsdauer von 24 h verwenden. Für die Experimente wird eine Stammlösung von TSA ( $\geq 98\%$  HPLC, Sigma Aldrich) mit einer Konzentration von 5 mM in DMSO erworben, welche, zehnfach in PBS verdünnt, bei -20 °C aufbewahrt wird. Dem Kulturmedium wird die TSA-Lösung zu einer Endkonzentration von 500 nM zugegeben und 24 h mit den Zellen bei 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>-Umgebung inkubiert. Anschließend werden die Kulturzellen in Imaging-Medium mit 500 nM TSA mikroskopiert. Wird die Behandlungsdauer von TSA auf 48 h erhöht, sterben die meisten Zellen, da auch das *"Blebbing"* der Kernhülle als eine Vorstufe zur Apoptose stark zunimmt [197].

#### A.5.4 Valproinsäure: Acetylierung und DNA-Schädigung

Valproinsäure (VPA) ist eine nicht natürlich vorkommende Carbonsäure, die über ihre inhibitorische Wirkung der Histon-Deacetylasen oder als Verstärker synaptischer Neurotransmitter auch pharmakologische Anwendungen erfährt [181]. Allerdings gibt es keinen Wirkungsmechanismus, der die zahlreichen Effekte von VPA umfassend erklärt [272]. Unter der Einwirkung von VPA akkumulieren sich DNA-Doppelstrangbrüche und die Chromatinfasern dekondensieren zunehmend bei den Lebendzellexperimenten [181,195].

Zur Anwendung wird eine Stammlösung aus dem Natriumsalz von VPA ( $\geq 98\%$  HPLC, Sigma Aldrich) mit einer Konzentration von 1 M in PBS hergestellt, die bei -20 °C aufbewahrt wird. Vergleichbar zu den Experimenten aus [181,195] werden die Zellen für 24 h in Kulturmedium mit 1 mM VPA behandelt (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Umgebung). Danach werden die Kulturzellen in Imaging-Medium mit 1 mM VPA mikroskopiert.

#### A.5.5 Hypotonisches Kulturmedium: Bildung großer intrazellulärer Vesikel

Die Reaktionen verschiedenster Zellstrukturen auf die Wasseraufnahme durch einen hypoosmotischen Schock wurde erst bekannt und sind noch nicht eingehend erforscht [39,145]. Im Zuge dessen wandeln die meisten membrangebundenen Zellorganellen, wie z.B. das ER, die Mitochondrien, Endosomen oder Lysosomen, ihre Gestalt und formen intrazelluläre Vesikel mit einem gewöhnlichen Durchmesser von wenigen Mikrometern. Die Ausbildung der großen intrazellulären Vesikel des ERs kann durch die Zugabe des ursprünglichen Zellkulturmediums umgekehrt werden. Parallel dazu zeigt sich eine temperaturabhängige und reversible Phasenseparation der Lipiddomänen auf den ER-Vesikeln. Obwohl die hypotonische Behandlung das gesamte Innenleben der Zelle umstrukturiert, bleiben die Organellkontaktstellen stellenweise erhalten und diese lokalisieren zudem mit Bereichen, an denen die Phasenseparation der ER-Membranen einsetzen [39].

Für die Experimente wird die Vorgehensweise aus [39] geringfügig angepasst. Hierzu wird eine hypotonische Lösung aus 5% Kulturmedium in UltraPure-Wasser hergestellt, mit der die Zellen gewaschen, für 15 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und auch mikroskopiert werden. Vergleichbar zu den Zelllinien aus [39] bilden sich für etwa 70% der untersuchten HeLa-Zellen intrazelluläre ER-Vesikel mit Durchmessern im Mikrometerbereich. Nähere Eigenschaften der intrazellulären Vesikel werden in Tab. E.2 angegeben. Hingegen werden bei der Einwirkung einer wässrigen Lösung aus gepuffertem Imaging-Medium keine intrazellulären Vesikel beobachtet. Die große Mehrheit der Vesikel ist immobil, da durch die hypotonische Einwirkung das Zytoskelett der Mikrotubuli und Aktinfilamente (siehe Abb. A.1) sowie der Intermediärfilamente [149] zerstört werden. In diesem Kontext untersuchte Herr Adal Sabri die veränderten Transporteigenschaften nanoskopischer Objekte im Zytoplasma dieser Zellen [75,76]. Analog zu [39] wird die Gesamtintegrität des ERs vor und nach der hypotonischen Behandlung über Zweikanalaufnahmen der ER-Membranen (CNX-GFP) und des ER-Lumens (CRT-GFP oder



Abb. A.1: Übersichtsaufnahmen der Zellen unter hypotonischer Behandlung. Unter der Einwirkung eines hypotonischen Mediums bilden sich bei etwa 70 % der HeLa-Zellen große intrazelluläre Vesikel des ERs (KDEL-RFP). Gleichzeitig wird das Zytoskelett der (a) Mikrotubuli (Tubulin-GFP) und (b) Aktinfilamente (Aktin-GFP) weitgehend zerstört.

KDEL-RFP) abgebildet (siehe Abb. 4.8). Die Generation großer intrazellulärer ER-Vesikel setzt bereits 10 s nach der Zugabe des hypotonischen Mediums ein. Nach etwa 5 min sättigen die Umstrukturierungen der intrazellulären Vesikel und bleiben danach bestehen. Die Zellen verbleiben in den Experimenten weitgehend unverändert über den Zeitraum einer Stunde. Diese sterben unter der Zugabe des ursprünglichen Kulturmediums, wahrscheinlich, da die Mitochondrien irreversibel geschädigt werden [39, 149].

#### A.5.6 Hypertonische Saccharose-Lösung: Chromatinverdichtungen

Unter dem Wasserverlust der Zellen durch eine hypertonische Einwirkung verändert sich die räumliche Organisation des Zellkerns und die Chromatinfasern verdichten sich [180]. Die Verdichtungen von Chromatin setzen nach einigen Sekunden ein, sättigen innerhalb weniger Minuten und können durch die Zugabe des ursprünglichen Kulturmediums reversibel umgekehrt werden. Ferner adaptieren sich die Zellen nach einigen Tagen an hypertonische Kulturbedingungen [180].

Der Einsatz einer hypertonischen Saccharose-Lösung wurde von Frau Rebecca Benelli gestaltet [80] und orientiert sich an den Experimenten von [180]. Unter Erwärmen wird hierzu D<sup>(+)</sup>-Saccharose ( $\geq 99.5\%$ , Roth) zu einer Konzentration von 1 M in Imaging-Medium gelöst und steril gefiltert. Die tatsächliche Osmolarität der Kulturlösung ist nicht bekannt. Die Zellen inkubieren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zwischen 15 – 30 min mit der hypertonischen Kulturlösung und werden anschließend in dieser mikroskopiert. Etwa 80 % der U2OS-Zellen reagieren auf die hypertonische Behandlung und verbleiben für eine Stunde in den Experimenten stabil. Dies umfasst Konzentrationen zwischen 0.25 – 1 M der Saccharose-Lösung [80]. Vergleichend dazu werden Chromatinverdichtungen unter den hypertonischen Einwirkungen einer Natriumchlorid- oder Sorbitol-Lösung sowie, nach Permeabilisierung der Zellmembranen, auch mit gelöstem Dextran berichtet [180].

### A.5.7 RNA-Interferenz: Selektives Gen-Silencing

Zum Gen-Knockdown durch RNA-Interferenz wird eine Spezialanfertigung von Invitrogen Ambion (Thermo Fisher Scientific) genutzt. Die vorkonzipierte und validierte siRNA (AM16099 Ambion Silencer Select siRNA) des LNP-Gens (Gen-ID: 80856, *Homo sapiens*) ist an ihrem 5'–Ende zusätzlich mit einem Alexa-Fluorophor 633 modifiziert. Ebenfalls wird eine Negativkontrolle (4390820 Silencer Select Custom siRNA) mit denselben Eigenschaften (HPLC, in vivo fähig) und der Modifikation eines Alexa-Fluorophors 647 erworben. Eine Negativkontrolle beinhaltet nicht-zielgerichtete siRNA-Moleküle, um unspezifische Effekte, die mit der Abgabe der siRNA zusammenhängen, feststellen zu können [144]. Die Gesamtmenge von 50 nmol der siRNA wird in 10 ml DNase- und RNase-freiem UltraPure-Wasser aufgenommen und zu Aliquots von 50 µl bei -80 °C eingefroren. Nach einem halben Jahr waren 66 % (Reinheit > 1.75) der ursprünglichen, für RNA-Moleküle spezifischen Absorption bei 260 nm vorhanden.



Abb. A.2: Bildgebung der fluoreszenzmarkierten siRNA-Moleküle. Dargestellt sind Maximumsprojektionen ( $\Delta z=2.5 \,\mu$ m) konfokaler Lichtmikroskopie von Sec16-GFP transfizierten HeLa-Zellen. Die mit Alexa-Fluorophoren markierten siRNA-Moleküle der RNA-Interferenz (a) Lunaparks und (b) der Negativkontrolle lokalisieren als Agglomerate fluoreszenter Sphären in Regionen nahe des Zellkerns und Golgi-Apparats. (c) Der Crosstalk und die Autofluoreszenz ( $\lambda_{Anr.} = 561 \,\mathrm{nm}$ ,  $\lambda_{Det.} = 575 - 625 \,\mathrm{nm}$ ) sind vernachlässigbar.

Die Aufnahme der siRNA von den Zellen erfolgt über eine Transfektion 40 - 48 h vor den Experimenten, indem das Reagenz RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) nach dem Herstellerprotokoll [273] verwendet wird. Hierzu werden 3 µl Lipofectamine RNAiMAX in 25 µl vorgewärmtes Opti-MEM gegeben und mehrmals mit einer Mikropipette auf- und abgezogen. In ein zweites Gefäß mit 25 µl Opti-MEM wird 1 µl der siRNA-Arbeitslösung hinzugefügt, sodass die Gesamtmenge der siRNA 5 pmol beträgt. Anschließend wird das Volumen mehrmals auf- und abgezogen und in das erste Reaktionsgefäß übertragen. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min bei Raumtemperatur werden 35 µl der siRNA-Lipid-Komplexe tröpfchenweise in eine Kammer eines Ibidi  $\mu$ -Slides (4 well) gegeben und kurz, aber schwungvoll vermischt. In den Experimenten (siehe Abb. A.2) zeigt der Golgi-Apparat der siRNA-behandelten Zellen keine augenscheinliche Fragmentierung.

# A.6 Zelllysate, Westernblot und Proteinmengenquantifizierung

#### Herstellung der Zelllysate

Die für den Westernblot verwendeten Zelllysate wurden von Herrn Lorenz Stadler nach dem Protokoll von ABCAM [274] im Februar 2019 hergestellt. Hierzu werden zwischen  $200\,000-400\,000$  Zellen auf 35 mm Kulturplatten ausgesät und mit den siRNA-Molekülen transient transfiziert. Die Zellen werden nach 24 h, 48 h oder 72 h lysiert. Dazu werden diese dreimal in PBS gewaschen, mit einem NP-40 Puffer (150 mM NaCl, 1 % NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA) lysiert und durch vorsichtiges Abschaben in ein Zentrifugenröhrchen übertragen. Alle Arbeitsschritte erfolgen eisgekühlt. Anschließend wird die Lösung für 30 min unter konstantem Rühren bei 4 °C inkubiert und für 20 min bei 12 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird bei -80 °C aufbewahrt.

#### Gelelektrophorese und Westernblot

Die Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot wurde von Herrn Philipp Braaker vom Lehrstuhl Entwicklungsbiologie im August 2019 durchgeführt, nachdem Versuche von Frau Christina Gräbner wiederholt misslangen. Ein voriger Test der Antikörper und des Westernblots erfolgte von Herrn Lorenz Stadler im Februar 2019.

Zunächst werden die Proteine über eine Gelelektrophorese (0.75 mm, 8% Bis-Tris-SDS-PAGE) getrennt, wobei pro Kammer 8 µl geladen werden und das Gel für 1 h bei 150 V läuft. Anschließend werden die Proteine über Wet-Westernblotting auf eine Immun-Blot PVDF-Membran (Bio-Rad Laboratories) übertragen und für 45 min in eisgekühltem 20 % igen Methanol geblottet. Die Membran wird in drei Teile, knapp oberhalb der Proteinbanden von 20 kDa und 40 kDa, geschnitten. Der Blot wird in 5% igem Milchpulver, gelöst in TBST-Puffer mit Polysorbat 20, blockiert. Primäre Antikörper (LNP PA5-53133 (1:1000), Thermo Fisher Scientific: GAPDH G8795 (1:5000), Sigma-Aldrich und H3 ab18521 (1:5000), Abcam) werden in TBST über Nacht bei 4°C inkubiert und dreimal mit TBST für jeweils 5 min abgewaschen. Danach werden sekundäre Antikörper (LNP (1:10000, Maus), GAPDH (1:5000, Maus) und H3 (1:20000, Hase), Thermo Fisher Scientific) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und gleichsam mit TBST abgewaschen. Abschließend wird das Proteinsignal über Chemilumineszenz auf einem SuperSignal West Dura Extended Duration Chemilumineszenz Substrat (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung eines Fujifilm LAS-4000 Bildanalysegeräts (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) für 15 min nachgewiesen.

#### Quantitative Auswertung des Proteinsignals

Zur quantitativen Untersuchung der Proteinsignale unter der RNA-Interferenz (siehe Abschnitt 4.6.1) wird das Chemilumineszenzbild in Matlab [140] importiert, horizontal ausgerichtet und ein konstanter Hintergrund von 1000 Grauwerten abgezogen. Für die beiden Messbedingungen (m = 24 h und 48 h) werden Bildbereiche mit einer horizontalen Breite von 100 Bildpunkten, die das Intensitätsprofil der jeweiligen Bande (LNP oder GAPDH) repräsentativ abbilden, gewählt und zur Intensität  $I_m$ , relativ zur Kontrollbande, gemittelt. Bei der Mittelung wird ein vertikaler Bereich über 10 Bildpunkte der Proteinbanden berücksichtigt. Die tatsächliche Reduktion R des Lunapark-Proteinsignals unter RNA-Interferenz ergibt sich aus  $R_m = I_{\text{LNP},m}/I_{\text{GAPDH},m} - 1$  und beträgt  $R_{24\text{h}} = 45$ %, bzw.  $R_{48\text{h}} = 66$ %. Das Signal der H3-Kontrollbanden wird von der quantitativen Analyse ausgeschlossen, da es ungleichmäßig ausfällt. Für dieses bestätigt sich jedoch, wie für die GAPDH-Referenzbanden, eine Tendenz von  $I_{\text{Kontrolle}} < I_{24\text{h}} < I_{48\text{h}}$ .

# B Lichtmikroskopaufbau und Bildgebungsdetails

Die Fluoreszenzaufnahmen werden mit konfokaler Spinning-Disk Lichtmikroskopie am Laser-Ablations Aufbau des Lehrstuhls Experimentalphysik I an der Universität Bayreuth aufgezeichnet (siehe [96] für detaillierte Informationen). Der Laser-Ablations Aufbau besteht aus einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems DMI 4000 B), das auch einen Epifluoreszenzbetrieb mit Anregung über eine Quecksilberdampflampe (Leica Microsystems EL6000) und Detektion mittels verschiedener Filterwürfel (L5 und TX2, Leica Microsystems) ermöglicht. Der gesamte Aufbau befindet sich auf einem schwingungsgedämpften optischen Tisch (Thorlabs Nexus). Dabei wird der Probenhalter (Eigenanfertigung) in xy-Richtung mit einem Linearpositionierer (Märzhäuser Wetzlar Tango Desktop) gesteuert, der eine minimale Separation von  $\Delta z = 0.1$  µm erlaubt (Leica Microsystems Super Z Control Unit).

An das Mikroskop ist eine konfokale Spinning-Disk Einheit (Yokogawa CSU-X1) mit einer sCMOS-Kamera (Hamamatsu ORCA-Flash 4.0) angebracht, die eine Auflösung von 2048 × 2048 Bildpunkten bietet. Zusammen mit dem verwendeten Ölimmersionsobjektiv (Leica HCX PL APO  $63 \times /1.40 - 0.60$  OIL CS) bestimmt sich die effektive Seitenlänge eines Pixels zu  $\Delta x = 56.2$  nm. Die teilbeschränkte Ausleuchtung des Kamerasensors erlaubt einen gleichmäßigen Aufnahmebereich von  $1500 \times 2048$  Bildpunkten unter Verwendung einer horizontalen Bildverschiebung von 148 Bildpunkten. Die Spinning-Disk Einheit wird für eine optimale Synchronisation mit der Kamera bei 5000 rpm betrieben. Zur Detektion des Fluoreszenzsignals stehen, realisiert über dichroitische Filterwürfel (Semrock und Visitron), Wellenlängenbereiche von 500 - 550 nm und 575 - 625 nm zur Verfügung. Zur Anregung dienen die ( $491.5 \pm 0.3$ ) nm bzw. ( $561.2 \pm 0.3$ ) nm Emissionslinien eines dualen DPSS-Lasersystems (Cobolt Calypso 100 im Cobolt Dual Combiner), die mit 80 mW bzw. 90 mW Ausgangsleistung betrieben werden.

Die Anregungsleistung in der Probe wird mit einem akustooptisch abstimmbaren Modulator (AA Opto-Electric AOTFnC-400.650-TN) geregelt und beträgt circa 2 mW bei maximaler Spannung des AOTFs. Für die quantitative Fluoreszenzbildgebung aus Teil II wird die Spannung auf 8 V und für die Einzelteilchenverfolgungsexperimente nuklearer Aktinfilamente in Teil III auf 5 V fixiert. In anderen Bildgebungsexperimenten wird eine Spannung zwischen 3-6 V angestrebt, um einen bestmöglichen Kompromiss aus zwischen dem Signal-Rausch Verhältnis und einer größtmöglichen Anzahl an Einzelbildern unter möglichst vernachlässigbarem Photobleichen zu gestatten. Ein Teil des Strahls wird zur optionalen Anwendung von FRAP-Experimenten ausgekoppelt. Der restliche Anteil wird über eine optische Faser in die Spinning-Disk Einheit eingekoppelt. Hierbei wird eine bestmögliche Einkopplung der grünen Laserlinie angestrebt. Die Leistung am Faserausgang wird regelmäßig überprüft und beträgt  $(20 \pm 1)$  mW für die Fluoreszenzbildgebung

aus Teil II. Für die Experimente mit Filipin ab November 2019 wurden  $(27 \pm 1)$  mW eingekoppelt. Nachdem die FRAP-Einheit im Mai 2020 zugunsten höherer Anregungsleistungen der Bildgebungsexperimente demontiert wurde, erhöhte sich die eingekoppelte Leistung auf  $(31 \pm 1)$  mW. Dies umfasst Messungen der siRNA-Negativkontrolle und alle SRRF-Experimente. Für die Bildgebungs- und Einzelteilchenverfolgungsexperimente von Teil III wurden im März 2021  $(26 \pm 1)$  mW eingekoppelt. Die Leistung des roten Laserkanals blieb mit  $(28 \pm 2)$  mW im gesamten Zeitraum nahezu konstant.

Die adhärenten Zellen werden auf unbeschichteten, gekammerten Polymer-Deckgläsern (Ibidi  $\mu$ -Slide, 4 well) mit kompatiblem Immersionsöl (Leica Immersion Oil, NA = 1.52) untersucht. Die Temperatur wird mit einer selbstgefertigten Klimatisierungskammer auf  $(37 \pm 1)$  °C reguliert, die vom optischen Tisch entkoppelt montiert ist. Um die verbliebenen Vibrationen zu minimieren, ruht die Lüftung der vorgewärmten Klimatisierungskammer während der Zeitserienaufnahmen der SRRF-Messungen und der Einzelteilchenverfolgungsexperimente nuklearer Aktinfilamente. In den anderen Bildgebungsexperimenten wird die Lüftung bei der Anlaufdrehzahl betrieben. Das Mikroskop wird mit einem von Herrn Philipp Struntz erstellten Labview-Programm [96] (V. 120f3 unter Windows 7) angesteuert, dessen Bildakquisition über die Kamerasoftware (Hokawo Image Suite V. 2.10) erfolgt. Hierbei wird der Kamerahintergrund während der Bildgebung ausgeglichen, indem das aus 100 Einzelbildern gemittelte Hintergrundsignal (geschlossener Kameraverschluss) der jeweiligen Belichtungszeit in der Kamerasoftware subtrahiert wird.



#### Abb. B.1: Darstellung des Laser-Ablations Aufbaus mit Strahlengang.

Die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen werden am Laser-Ablations Aufbau des Lehrstuhls Experimentalphysik I aufgezeichnet. Dessen Grundlage bildet ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop, das um eine Spinning-Disk Einheit und die erforderlichen Strahlengänge erweitert wurde. Bei den Experimenten dieser Arbeit wird die Bildgebung über konfokale Fluoreszenzmikroskopie des Aufbaus genutzt, der weitere lasergestützte Ablations- oder Bleichexperimente ermöglicht. Der Laser-Ablations Aufbau wurde mit der Doktorarbeit von Herrn Philipp Struntz [96] konstruiert und charakterisiert (Photographie übernommen von [96]).

# C Umsetzung der SRRF-Mikroskopiemethode

Die SRRF-Aufnahmen ("Super Resolution by Radial Fluctuations" [44,45]) werden mit der von GUSTAFSSON et al. bereitgestellten Open Source Softwareplattform NanoJ [53] erstellt. Diese ist als eine Erweiterungsbibliothek von ImageJ-Fiji [141] frei verfügbar. Seit 2017 wird die SRRF-Methode unter der Bezeichnung SRRF-Stream [50] als eine Mikroskopieplattform für höchstauflösende Lichtmikroskopie in Echtzeit kommerziell von ANDOR TECHNOLOGY vertrieben. Eine Weiterentwicklung des SRRF-Algorithmus im Jahre 2020 wird seitdem unter der Bezeichnung SRRF-Stream<sup>(+)</sup> [51] vermarktet.

## Vorgehensweise zur Erstellung von SRRF-Aufnahmen

In dieser Arbeit werden SRRF-Bilder aus Serienaufnahmen konfokaler Spinning-Disk Lichtmikroskopie berechnet, die am Ablationsaufbau erstellt werden (siehe Anhang B und [96]). Für eine SRRF-Aufnahmenreihe werden zwischen 100 - 1000 Einzelbilder mit einer typischen Belichtungszeit von  $10 - 100 \,\mathrm{ms}$  bei einer Anregungsleistung im Bereich von 20-50 Prozent aufgezeichnet. Eine Korrektur des Hintergrundsignals erfolgt während der Bilderfassung (siehe Anhang B). Um den Bildrauschen der sCMOS-Kamera entgegenzuwirken, werden die Aufnahmen zunächst mit einem Medianfilter über einen Radius von zwei Pixeln geglättet. Dabei werden eventuelle Translationen und Rotationen der Zeitserienaufnahmen über die ImageJ-Fiji-Erweiterung StackReg [275], welche eine Subpixel-Genauigkeit erlaubt, ausgeglichen. Anschließend werden die Bilder auf eine für SRRF-Mikroskopie empfohlene Pixelgröße von  $90 \,\mathrm{nm}$  [50, 51] skaliert und daraus die SRRF-Einzelbilder berechnet. Als geeigneter Parameter des SRRF-Algorithmus (siehe Abschnitt 2.2.4) haben sich ein Ringradius  $R_{\rm ring} = 0.8$  Pixel für Aufnahmen des ERs sowie der Zytoskelettfilamente von Aktin und Tubulin, bzw.  $R_{ring} = 1$  Pixel für ERES und Mitochondrien erwiesen. Hierbei werden alle verfügbaren Richtungsachsen  $(N_{\text{axes}} = 8)$  bei einer sechsfachen Unterteilung der ursprünglichen Bildpunkte (Radialitätsvergrößerung  $V_{\rm rad} = 6$  Pixel) berücksichtigt. Typischerweise wird ein SRRF-Bild aus 5-100 konfokalen Einzelbildern erstellt. Abschließend werden die Abmessungen der SRRF-Aufnahmen um einen Faktor Zwei verkleinert (bikubische Interpolation), sodass die resultierende Länge eines Bildpunkts 30 nm beträgt. Unter Verwendung einer dedizierten Nvidia Geforce GTX 1650 Grafikkarte (Treiber: 431.86, Hardware OpenCL) dauert die Berechnung eines Radialitätbilds nicht länger als eine Minute. Wird auf die prozessorinterne Grafikeinheit zurückgegriffen, verlängert sich die Rechenzeit um etwa einen Faktor Zweihundert. Der Algorithmus zur Berechnung der Radialitätsbilder wird in Abschnitt 2.2.4 erklärt. Die SRRF-Mikroskopiemethode wird in Kapitel 3 an konfokalen Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Referenzobjekte als auch Strukturelementen lebender Zellen angewandt als auch ihr experimentelles Abbildungs- wie Auflösungsvermögen charakterisiert.

## Software-Implementation eines SRRF-Aufnahmemodus

Um die Zeitserienaufnahmen für die SRRF-Mikroskopiemethode benutzerfreundlich umzusetzen und die Anwendungen der SRRF-Technik längerfristig in den Laboralltag einzugliedern, wurde die von Herrn Philipp Struntz gestaltete Labview Ansteuerung des Mikroskops [96] von Herrn Vincent Borne um einen SRRF-Aufnahmemodus (*"time-zchannel-timestacks"*) erweitert (siehe Abb. C.1). Diese Implementation ist so gestaltet, dass die Wiederholungsrate zwischen den Einzelbildern einer Bildebene nur durch die Auslesezeit der Kamera beschränkt wird und gleichzeitig der Zeitversatz zwischen den verschiedenen Detektionskanälen (für z.B. Mehrkanalfluoreszenz- oder Durchlichtaufnahmen) minimiert wird. Der SRRF-Aufnahmemodus übernimmt die technisch größtmögliche Zeitauflösung der bisher verfügbaren *"time-channel-timestacks"* Option und ermöglicht Aufnahmen unterschiedlicher z-Ebenen, die in der bisherigen *"z-channel-timestacks"* Implementation durch einen Zeitversatz von etwa  $\Delta t \simeq 750 \,\mathrm{ms}$  (für Vollbildaufnahmen) systembedingt beschränkt waren.

Zunächst wird im *"time-z-channel-timestacks"* Aufnahmemodus (siehe Abb. C.1) eine Zeitserienaufnahme einer Bildebene über die Einstellung *"images per step"* aufgezeichnet. Anschließend wird die nächste konfokale Ebene einer Separation von  $\Delta z$  angesteuert und erneut eine Serienaufnahme aufgenommen. Hierbei beträgt der Zeitversatz durch die Bewegung des z-Positionierers etwa 200 ms. Daraufhin wird auf den nächsten Anregungsund Detektionskanal gewechselt. Hierbei ist zum Schutz des Kamerasensors eine Wartezeit von 400 ms erforderlich. Weiterhin kann die gesamte *"time-z-channel"*-Aufnahmeserie zu einem wiederkehrenden Zeitintervall *"timestacks"* fortgesetzt werden.



#### Abb. C.1: Softwareseitige Implementation eines SRRF-Aufnahmemodus.

Im neugestalteten *"time-z-channel-timestacks"* Aufnahmemodus werden der Zeitversatz zwischen den Einzelbildern einer Bildebene minimiert und konsekutive Serienaufnahmen in unterschiedlichen Probenebenen ermöglicht. Mit den gezeigten Einstellungen werden 100 konfokale Einzelbilder im roten Anregungs- und Detektionskanal aufgezeichnet (*"time"*) und die Serienaufnahmen in vier weiteren konfokalen z-Ebenen der Separationen  $\Delta z = 0.5 \,\mu\text{m}$ fortgesetzt (*"z"*). Anschließend wird auf den grünen Kanal gewechselt (*"channel"*) und jeweils 100 Serienaufnahmen in den fünf konfokalen Bildebenen erstellt. Die Zweikanalbildgebung wird nach  $\Delta t = 5 \,\text{min}$  wiederholt (*"timestacks"*).

# D Quantitative Analyse der Fluoreszenzaufnahmen

Die Fluoreszenzaufnahmen werden mit verschiedenen Programmen verarbeitet. So werden diese über die Kamerasoftware Hokawo Image Suite 2.10 als Tiff-Aufnahmen exportiert und mit ImageJ-Fiji 1.53c zugeschnitten sowie den Farbtabellen zugewiesen. Danach werden die Bilder und Diagramme mit Inkscape 1.1 zu den Abbildungen zusammengesetzt.

## D.1 Segmentierung und Auswertung der ERES und ER-Strukturen

Die Fluoreszenzaufnahmen der ERES und ER-Strukturen werden mit der frei verfügbaren Software maschinellen Lernens Ilastik [139,276] segmentiert und strukturelle Eigenschaften dieser Zellbestandteile werden mit eigenen Matlab-Skripten [140] berechnet. Hierbei dient ImageJ-Fiji [141] als Schnittstelle zwischen den Fluoreszenzbildern, Ilastik und Matlab.

#### Bildvorverarbeitung der ERES-Fluoreszenzaufnahmen

Zunächst werden die 16-bit HIS-Rohbildaufnahmen als Multipage-Tiff exportiert und in ImageJ-Fiji auf den Bereich einer Zelle zugeschnitten. Die Fluoreszenzaufnahmen werden in Matlab importiert und für die Segmentierung vorbereitet. Hierzu wird die konfokale Bildebene mit der höchsten Gesamtfluoreszenz und, für eine spätere Segmentierung der Zelle und der Golgi-Region, eine Maximumsprojekton aller z-Ebenen abgespeichert. Mit einem schnellen, lokalen Laplace-Filter ( $\sigma = 0.01$ ,  $\alpha = 2$ ,  $\beta = 3$ ) wird der Hintergrund geglättet und der dynamische Bereich erhöht, ohne den Schärfegrad der Bilddetails zu verändern [277]. Anschließend wird weiteres Bildrauschen mit einem Bandpassfilter [278] (Längenskala des Rauschens  $l_{lo} = 0.5$ , maximale Objektgröße  $l_{up} = 69$ ) reduziert.

#### Segmentierung der ERES

In ImageJ-Fiji werden die verarbeiteten Aufnahmen der hellsten konfokalen z-Ebenen zu einem gemeinsamen Stapel über alle Zellen und Messbedingungen (etwa 5 × 50 Zellen) kombiniert und als Hdf5-Datei (Format tzyxc) exportiert. In Ilastik [139,276] importiert, wird eine interaktive Pixelklassifikation der ERES-Fluoreszenz (Sec16-GFP [118]) gegenüber dem Hintergrundsignal durchgeführt. Dabei werden alle 25 verfügbaren Merkmale der Standardabweichung  $\sigma \leq 3.5$  Pixel einbezogen. Für eine erfolgreiche Segmentierung aller Einzelbilder genügen dem maschinelles Lernen Algorithmus etwa 50 handgezeichnete Anmerkungen. Hierzu werden ca. 25 Kennzeichnungen der ERES und des Hintergrunds in einer unbehandelten Zelle markiert. Anschließend wird die Klassifikation um ca. 25 weitere Anmerkungen aus den Aufnahmen der übrigen Messbedingungen ergänzt. Der Bilderstapel wird als Wahrscheinlichkeitskarte im Hdf5-Format abgespeichert. In ImageJ-Fiji importiert, werden die ERES binärisiert (Methode *Minimum Threshold*) und etwaige Löcher aufgefüllt. Die Segmentierung der ERES wird in Abb. D.1 am Beispiel einer unbehandelten und einer Zelle unter der RNA-Interferenz von Lunapark veranschaulicht.

#### Segmentierung der Zellen

Alle weiteren Segmentierungen und quantitativen Analysen der Fluoreszenzaufnahmen erfolgen mit eigenen Matlab-Skripten. Zunächst wird die Zelle segmentiert, indem die Maximumsprojektion aller Bildebenen mit einem Gauß-Filter ( $\sigma = 5$ ) aufgeweitet und über einen vom Anwender festgelegten Schwellwert binärisiert wird. Danach werden Objekte außerhalb der Zelle entfernt. Mit den strukturellen Informationen der Zelle können deren Einhüllende (siehe Abb. D.1) und Fläche sowie die Abstände der Objekte zur Plasmamembran und innerhalb der Zelle bestimmt werden. Die Zellfläche wird über rekursive Erosionen in sieben Schalen gleicher Dicke untergliedert.

### Segmentierung der ERES in Golgi-Regionen

Ebenfalls werden Aggregationen der ERES mit einer hohen Fluoreszenz in der Region des Golgi-Apparats identifiziert. Dazu wird die Maximumsprojektion der Fluoreszenz mit einem lokalen Laplace-Filter stark geglättet ( $\sigma = 0.05$ ,  $\alpha = 5$ ,  $\beta = 3$ ). Anschließend werden die Strukturen des Golgi-Apparats über einen vom Anwender definierten Schwellwert binärisiert, wobei Objekte mit weniger als 256 Bildpunkten entfernt und etwaige Löcher aufgefüllt werden. Alle ERES, die mit den verbliebenen Objekten verbunden sind, werden dem Gebiet des Golgi-Apparats zugeordnet (siehe Abb. D.1). Da deren dichte Aggregationen nicht mithilfe konventioneller Lichtmikroskopie separiert werden können, werden diese in der Auswertung getrennt behandelt und deren Fluoreszenzbeitrag nicht weiter berücksichtigt. Für die Zellen bei der RNA-Interferenz von Lunapark wird keine verstärkte Fluoreszenz der Golgi-Region festgestellt.

#### Quantitative Auswertung der ERES- und Zellcharakteristika

Zusammen mit den Fluoreszenzwerten der Konfokalaufnahmen von Sec16-GFP ermöglichen es die Segmentierungen, die strukturelle Organisation der ERES quantitativ bei den Zellen zu erfassen. Abhängig von der Fläche der ERES wird zwischen punktartigen ERES-Singletts und größeren ERES-Clustern unterschieden, sofern diese einen Schwellwert  $A_{\rm ERES} = 150$  Pixel  $\simeq 0.47 \,\mu {\rm m}^2$  übersteigen. Zudem besteht die vorherige Differenzierung von ERES der Golgi-Region. Es ist denkbar, die Klassifikation der ERES mit strukturellen Merkmalen wie z.B. der Helligkeit und Form sowie Umgebungseigenschaften zu verfeinern oder weitere Objektklassifizierungen durchzuführen (z.B. mit Ilastik).

Anschließend werden strukturelle Kenngrößen der ERES (siehe Tab. E.1) wie z.B. die Anzahl, Fläche, Objektdichte oder der Flächenanteil berechnet und in Bezug zu den Klassifizierungen der Zelle gesetzt. Aus der Fluoreszenz von Sec16-GFP werden die (mittleren) Helligkeiten aller ERES, der Singlett-, Cluster- und Golgi-ERES und deren relative Verhältnisse bestimmt. Ebenso wird die *"Brightness"* als Produkt der Helligkeit und Fläche, in Anlehnung an die molekulare Helligkeit [279–281], analysiert. Weitere Informationen über die Form der ERES, wie z.B. das Aspekteverhältnis, die Exzentrizität,



Abb. D.1: Segmentierung der ERES und Klassifizierung innerhalb der Zellen. Die Konfokalaufnahmen der ERES (Sec16-GFP) werden mit der Software für maschinelles Lernen Ilastik und Matlab-Skripten segmentiert. Die Klassifikation unterscheidet zwischen punktartigen ERES-Singletts (weiß) und größeren ERES-Clustern (blau) sowie ERES der Golgi-Regionen (rot, siehe z-Maximumsprojektion,  $\Delta z = 2.5 \,\mu\text{m}$ ). Die Segmentierung wird an (a) einer unbehandelten und (b) einer Zelle der RNA-Interferenz veranschaulicht.

Solidität oder Zirkularität werden von den Regionseigenschaften (*"regionprops"*) bereitgestellt [282]. Aus den Eigenvektoren des Gyrationstensors werden die Asphärizität [283], logarithmische Asphärizität [284] und Asymmetrie [285] berechnet. Ausgehend von der Asphärizität nach [283] wird die Sphärizität über S = 1 - Asph. definiert. Daneben sind die Rundheit [286] und weitere Maße traditioneller Bodenphysik [287] implementiert.

Der fluoreszente Hintergrund des Zytoplasmas wird über das Bildkomplement der ERES und den Objekten des Golgi-Apparats bestimmt. Um Artefakte an den Rändern der fluoreszenten Objekte zu vermeiden, werden die ERES zehnfach und die konvexe Hülle aller Golgi-Objekte fünfzehnfach dilatiert. Alle komplementären Bildpunkte innerhalb der Zelleinhüllenden werden dem Zytoplasma zugeordnet und daraus die gesamte sowie die mittlere Fluoreszenz des Zytoplasmas gebildet. Der zytoplasmische Hintergrund kann zur optionalen Korrektur der Fluoreszenzwerte genutzt werden.

Diese Kenngrößen der ERES sind in Tab. E.1 als Mittelwert mit Standardabweichung für die Messbedingungen von 43 – 54 Zellen zusammengefasst. Die Eigenschaften der ERES und intrazellulären Vesikel unter dem Rückgang des tubulären ERs werden in Tab. E.2 dargestellt. Die statistische Signifikanz der Häufigkeitsverteilungen wird über eine Abfolge geeigneter Hypothesentests (überwiegend Zweistichproben-t- oder Kolmogorov-Smirnov-Tests) beurteilt, deren Signifikanzniveaus  $\alpha = 0.05$  betragen (siehe Anhang D.3).

#### Segmentierung und quantitative Auswertung der ER-Vesikel und ER-Fragmente

Mit einer ähnlichen Vorgehensweise werden die Fluoreszenzaufnahmen der intrazellulären Vesikel, die sich unter der Behandlung mit hypotonischem Kulturmedium formen, sowie die degradierten Fragmente des ERs unter der Einwirkung von Filipin, segmentiert. Dies umfasst die Segmentierung der Strukturen über die Fluoreszenz von KDEL-RFP [137] bzw. Mito-GFP [262] in Ilastik, die Binärisierung in ImageJ-Fiji und die Zellsegmentierung in Matlab. Hierbei entspricht die Analyse struktureller Eigenschaften (siehe Tab. E.2) der quantitativen Auswertung der ERES, wobei eine Klassifizierung zwischen Singlettund Cluster-ERES bzw. Identifizierung des Golgi-Apparats entfällt. Aufgrund der dreidimensionalen Beschaffenheit werden jeweils 10 konfokale Bildebenen bei insgesamt 10 - 15 Zellen analysiert. Auf die Vorverarbeitung mit einem lokalen Laplace-Filter und eine räumliche Kategorisierung der intrazellulären Vesikel wird hierbei verzichtet.

Segmentierung und quantitative Auswertung von ER und ERES in SRRF-Aufnahmen

Auch werden das ER (KDEL-RFP) und die ERES (Sec16-GFP) in den Radialitätsbildern der SRRF-Methode (siehe Anhang C) segmentiert, lokalisiert und analysiert. Hierzu werden deren Bildkanäle getrennt verarbeitet. Die SRRF-Aufnahmen der ERES werden mit einem Medianfilter über einen Radius von einem Pixel geglättet, mittels Ilastik segmentiert und in ImageJ-Fiji binärisiert. Für das ER werden drei aufeinanderfolgende Radialitätsbilder gemittelt, mit einem Medianfilter über einen Radius von zwei Pixeln geglättet und wie zuvor segmentiert als auch binärisiert. Die auf diese Weise erstellten Binärmasken werden mit den ursprünglichen SRRF-Aufnahmen multipliziert.

Zusammen mit den Radialitätsbildern ermöglichen die Segmentierungen quantitative Untersuchungen über die Beschaffenheit des ERs und der ERES. Wie in der Masterarbeit des Autors [81] erläutert, werden planare ER-Netzwerkgraphen über eine markierungsbestimmte Wasserscheiden-Transformation extrahiert. Ausgehend von den individuellen Segmenten sowie den Knoten- und Endpunkten der ER-Graphen können verschiedene Merkmale räumlicher als auch komplexer Netzwerke [288, 289] bestimmt werden, wenngleich auf eine Lokalisation der Filamente und Knotenpunkte innerhalb eines Bildpunkts der SRRF-Aufnahmen (Seitenlänge  $\Delta x_{\text{SRRF}} = 30 \text{ nm}$ ) verzichtet wird.

Die Analyse struktureller Eigenschaften der ERES und ihres intrazellulären Musters wird von der hypotonischen Auswertung übernommen. Somit können unterschiedliche Merkmale bezüglich der Form und Fluoreszenz der ERES quantitativ, jedoch ohne deren größenabhängige und räumliche Klassifikation, angegeben werden. Die Positionen der ERES werden mit einer Subpixel-Genauigkeit erfasst, indem die mit den Radialitätswerten gewichteten Schwerpunkte der dreifach verdickten Binärbilder berechnet werden.

Im Zuge dessen erlauben die gleichzeitigen Segmentierungen des ERs und der ERES Kolokalisationsuntersuchungen. Diesbezüglich werden die euklidischen Abstände und Orientierungen zwischen den ER-Knotenpunkten, den ERES als auch den ERES zum nächstliegenden ER-Filament bestimmt. Begründet durch die teilweise unvollständigen Segmentierungen und das räumliche wie zeitliche Auflösungsvermögen, werden ERES mit Entfernungen  $d_{\text{ER,ES}} > 0.5 \,\mu\text{m}$  und ER-Filamente mit Segmentlängen  $l_{\text{ER}} < 0.25 \,\mu\text{m}$  bzw.  $l_{\text{ER}} > 7.5 \,\mu\text{m}$  nicht bei den Kolokalisationsanalysen der insgesamt 10 Zellen berücksichtigt.

## D.2 Lokalisation, Auswertung und Modellierung nuklearen Aktins

Die Fluoreszenzaufnahmen von UTR230-GFP [169] zur Einzelteilchenverfolgung nuklearer Aktinfilamente werden mit ImageJ-Fiji [141] verarbeitet und dabei mit der Erweiterung TrackMate [179] detektiert wie zu Einzelteilchentrajektorien verknüpft. Anhand eigener Matlab-Skripte werden dynamische Eigenschaften von Aktin im Zellkern mit verschiedenen Maßen anomaler Diffusion analysiert sowie mit Simulationen verglichen und nachgebildet.

#### Bildverarbeitung der Zeitserienaufnahmen

Zunächst werden die HIS-Rohbildaufnahmen als Multipage-Tiff exportiert. Diese werden in ImageJ-Fiji importiert, auf den Bereich der Zelle zugeschnitten und der verbleibende Hintergrund von 4 Grauwerten abgezogen. Anschließend wird der Kontrast nuklearen Aktins erhöht, indem die Fluoreszenzaufnahmen vierfach vergrößert werden (bikubische Interpolation) und Bildrauschen mit einem Bandpassfilter (Längenskala des Rauschens  $l_{\min} = 2$ , maximale Objektgröße  $l_{\max} = 2000$ ) reduziert wird. Die 16-bit Aufnahmen werden um einen Faktor Zwei verkleinert (Länge eines Bildpunkts  $\Delta x = 56.2 \text{ nm}$ ) und deren Helligkeitswerte linear normiert (0.01 % gesättigte Pixel).

#### Einzelteilchenverfolgung nuklearer Aktinfilamente

Die Zeitreihenaufnahmen werden gegenüber eventuellen Translationen und Rotationen über die ImageJ-Fiji-Erweiterung StackReg [275] korrigiert, um etwaige Bewegungen der Zelle oder des Zellkerns und potentiellen Mikroskopdrift auszugleichen. Die Anpassung basiert auf einer pyramidalen Intensitätsregistrierung, die eine Subpixel-Genauigkeit ermöglicht [275]. Danach werden die Aufnahmen auf den Bereich aller Aktinfilamente zugeschnitten und die Zellkerne für die Lokalisation temporär von Hand maskiert.

Die Lokalisation und Verfolgung von nuklearen Aktinfilamenten erfolgt über die ImageJ-Fiji-Erweiterung TrackMate [179]. Hierzu werden die zeitabhängigen Positionen der Aktinfilamente mit einem "Laplacian of Gaussian" Filter, unter Verwendung eines Durchmessers von  $(350 \pm 50)$  nm und eines Schwellwerts von  $2000 \pm 500$  Grauwerten, mit einer Subpixel-Genauigkeit detektiert. Die genutzten Einstellungen variieren zwischen den einzelnen Experimenten und sind im Laborbuch des Autors für alle Messbedingungen dokumentiert (siehe auch Tab. F.1). Dabei werden alle Lokalisationen nuklearen Aktins im Kontakt zur maskierten Kernhülle entfernt (Filter: *minimale Intensität*). Optional werden Detektionen mit schwachem Signal-Rausch-Verhältnis (Filter: *Qualität*), niedriger Intensität (Filter: *mittlere Helligkeit*) oder erhöhtem Durchmesser (Filter: geschätzer Durchmesser) aus der Lokalisationstabelle entfernt.

Die detektierten Partikelpositionen werden mit dem vereinfachten Tracking-Algorithmus von [290] zu kontinuierlichen Trajektorien verbunden. Hierbei beträgt die Verbindungsdistanz 225 - 300 nm, wobei bis zu drei Lücken in nachfolgenden Einzelbildern, insgesamt jedoch nicht mehr als fünf Prozent fehlende Detektionen, erlaubt sind. Die minimale Länge einer Trajektorie beträgt 50 Zeitschritte. Im Mittel finden sich ca. 50 Lokalisationen in einem Einzelbild und ca. 250 Aktinfilamenttrajektorien in einer Zeitserienaufnahme eines Zellkerns. Weitere Eigenschaften über die Gesamtteilchenensemble der Trajektorien nuklearen Aktins werden in Tab. F.1 für alle Messbedingungen zusammengefasst.

#### Quantitative Auswertung der Aktinfilamentdynamik

Die quantitativen Auswertungen der Einzelteilchentrajektorien nuklearen Aktins erfolgen mit eigenen Matlab-Skripten, deren Funktionen teilweise aus der Doktorarbeit von Herrn Adal Sabri [76] oder der Masterarbeit des Autors [81] übernommen wurden. Zunächst werden die von der ImageJ-Fiji-Erweiterung TrackMate [179] im XML-Format generierten Lokalisationstabellen mit der hierfür bereitgestellten Hilfsfunktion [179] in Matlab [140] importiert und auf ihre tatsächlichen Dimensionen skaliert (Zeitauflösung  $\Delta t = 0.1$  s, Seitenlänge eines Bildpunkts  $\Delta x = 56.2$  nm).

Aus den Einzelteilchentrajektorien werden Ensemble mit einer Trajektorienlänge  $T_i$  zwischen  $T_i = 5-20$  s gebildet, indem die Trajektorien wiederholt in Segmente der maximalen Länge  $T_{i,\max} = 20$  s unterteilt und verbliebene Segmente mit einer Länge  $T_{i,\min} \ge 5$  s einbezogen werden. Hiermit werden die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) mit dem generalisierten Transportkoeffizienten  $K_{\alpha}$  und Anomalieparameter  $\alpha$  sowie daraus abgeleitete Kenngrößen für die Zellen individuell, oder für alle Zellkerne gemeinsam, bestimmt. Diese sind für alle Messbedingungen in Tab. F.1 zusammengefasst. Zudem werden verschiedene Einzelteilchencharakteristika anomaler Diffusion (siehe Abschnitt 2.3.5), wie die Statistik normierter Schrittinkremente  $p(\chi)$ , der nicht-Gaußsche Parameter  $\overline{\mathcal{G}}$ und die Autokorrelationsfunktionen der quadrierten Inkremente  $G_{\Delta r^2}(\tau)$ , lokalen Diffusivitäten  $G_{\Delta K}(\tau)$  oder Geschwindigkeiten  $C_v(\tau)$ , als auch die spektrale Leistungsdichte PSD( $\omega$ ) mit dem Variationskoeffizienten  $\gamma(f)$ , aus Trajektorien  $T_i \ge 10$  s bestimmt. Ebenfalls sind charakteristische Zahlenwerte dieser Beweglichkeitsmaße, als Mittelwert mit Standardabweichung über alle Zellen, in Tab. F.1 dargestellt. Ferner sind die diffusiven Kenngrößen für Trajektoriensegmente der Längen  $T_{\text{Seg}} = 5,10$  und 20 s angegeben.

#### Simulationen fraktioneller Brownscher Bewegung

Weiterhin werden Einzelteilchentrajektorien fraktioneller Brownscher Bewegung (FBM) mit der spektralen Zirkulantenmethode [183] generiert, die als schnelles und zuverlässiges Simulationsverfahren der anspruchsvollen Modellierung von FBM anerkannt ist [291]. Dabei zeigte sich die von KROESE et al. [183] bereitgestellte Matlab-Funktion gegenüber der internen Implementation als überlegen, um Trajektorien des gegebenen Anomalieparameters  $\alpha$  präzise nachzubilden. Hiermit werden eindimensionale FBM-Trajektorien zum Anomaliewert  $\alpha$  erstellt, zu  $N_{\text{Traj.}}$  zweidimensionalen Trajektorien zusammengesetzt und deren Raum- wie Zeitkoordinaten über den generalisierten Transportkoeffizienten  $K_{\alpha}$ und den Zeitschritt  $\Delta t$  reskaliert. Die statistischen Auswertungen werden mit Trajektorien dieser Simulationen einer FBM als auch experimentellen Einzelteilchentrajektorien der Diffusion von fluoreszierenden Nanopartikeln in verschiedenen Wasser-Glycerinmischungen oder zellartigen Fluiden [78] verifiziert.

Zur Modellierung der Bewegungen von Aktin im Zellkern (siehe Abschnitt 5.6.1) wird die Dynamik nach einer subdiffusiven FBM um zusätzliche Eigenschaften erweitert. So werden heterogene Teilchenmobilitäten von Aktin  $K_{\alpha,i}$  mit einer Exponentialverteilung der normierten Transportkoeffizienten  $p(K_{\alpha,i}/\langle K_{\alpha,i}\rangle)$  beschrieben (mit  $\langle K_{\alpha,i}\rangle = \mu, \sigma$ ). Ebenfalls werden zeitveränderliche Beweglichkeiten über ein Zweizustandsmodell nachgebildet, indem die Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,i}$  für eine konstante Zeitspanne  $\tilde{T}_{\text{bes.}}$  der Gesamttrajektoriendauer  $T_{\text{Traj.}}$  mit  $\tilde{K}_{\alpha,i} = s \cdot K_{\alpha,i}$  erhöht sind. Abschließend werden die modellierten Teilchenpositionen mit einem normalverteilten Rauschen der Standardabweichung  $\varsigma$  überlagert, um statische Lokalisationsunsicherheiten der experimentellen Einzelteilchendetektion wiederzugeben.

## D.3 Schema zur Beurteilung statistischer Signifikanzen

Die statistische Signifikanz der Messwerte innerhalb der experimentellen Häufigkeitsverteilungen wird über eine Abfolge mehrerer Signifikanztests, welche von der Matlab Statistik-Toolbox [292] bereitgestellt werden, beurteilt. Zunächst werden die Messwerte über einen Lilliefors-Test auf eine Normalverteilung mit unbekanntem Erwartungswert und unbekannter Varianz überprüft. Außerdem werden die Schiefe und Kurtosis mittels eines Jarque-Bera-Tests bewertet. Eine Normalverteilung der Messwerte wird angenommen, sofern die Nullhypothese für einen der beiden Signifikanztests nicht zurückgewiesen wird. Für normalverteilte Daten wird die paarweise Gleichheit der Mittelwerte mit einem Zweistichproben-t-Test unter der Annahme ungleicher Varianzen festgestellt. Auch wird die Verschiedenheit der Mediane mit einem Wilcoxon-Rangsummentest bewertet. Sind die zu untersuchenden Messwerte nicht normalverteilt, wird deren paarweise Verschiedenheit über einen parameterfreien Kolmogorov-Smirnov-Test beurteilt. Mit einem anschließenden Kruskal-Wallis-Test wird über eine Varianzanalyse festgestellt, ob die Datenpaare und Datengesamtheit aus einer gemeinsamen Population entstammen. Die experimentellen Wahrscheinlichkeitsverteilungen werden als gleichartig angesehen, wenn die Nullhypothese für beide Signifikanztests angenommen wird. Das Signifikanzniveau beträgt  $\alpha = 0.05$ für alle Signifikanztests. Es sei darauf hingewiesen, dass anschließende Post-hoc-Tests erforderlich sind, um die statistische Signifikanz gruppenweiser Vergleiche zu beurteilen.

# E Zentrale Kenngrößen der Musterbildung von ERES

#### Tab. E.1: Zentrale Kenngrößen zur Charakterisierung der Musterbildung von ERES.

In dieser Tabelle sind zentrale Eigenschaften der ERES, berechnet aus konfokalen Fluoreszenzaufnahmen von Sec16-GFP markierten HeLa-Zellen, für unbehandelte, mit Nocodazol oder Filipin behandelte Zellen, sowie für RNA-Interferenz Experimente zum Knockdown von Lunapark-Proteinen (mit Negativkontrolle der siRNA) zusammengefasst. Diese Daten bilden die Grundlage für die Ergebnisse und Diskussionen von Teil II dieser Arbeit (siehe Kapitel 4, S. 42–76). Die Zahlenwerte stellen den Mittelwert über das untersuchte Gesamtzellensemble mit dessen Standardabweichung dar. Weitere Mittelwertsklammern  $\langle \cdot \rangle$  kennzeichnen den Mittelwert der respektiven Größe, gebildet aus den Objekten einer Zelle, der gleichsam als Mittelwert mit Standardabweichung über das Ensemble aller Zellen angegeben wird.

Untersuchte Größen: Anzahl der Zellen  $N_{\text{Zellen}}$ , Anzahl untersuchter konfokaler Ebenen  $N_{z-\text{Ebenen}}$ , Zellfläche  $A_{\text{Zelle}}$ , Länge der Hauptachse  $L_{\text{Hauptachse}}$ , Länge der Nebenachse  $L_{\text{Nebenachse}}$  und Umfang der Zelle  $U_{\text{Zelle}}$ . Gesamtanzahl der untersuchten ERES  $N_{\text{ERES}}$ , Anzahl der ERES-Singletts  $N_{\text{ERES}, \text{Sing.}}$ , ERES-Cluster  $N_{\text{ERES}, \text{Clust.}}$  und ERES in der Region des Golgi-Apparats  $N_{\text{ERES, Golgi}}$ . Relative Häufigkeitsdichte der ERES  $\tilde{N}_{\text{ERES}}$ , ERES-Singletts  $\tilde{N}_{\text{ERES, Sing.}}$ , ERES-Cluster  $\tilde{N}_{\text{ERES, Clust.}}$  und ERES der Golgi-Region  $\tilde{N}_{\text{ERES, Golgi}}$  bezogen auf die Gesamtfläche der Zelle. Mittlere Fläche der ERES  $\langle A_{\text{ERES}} \rangle$ , ERES-Singletts  $\langle A_{\text{ERES}, \text{Sing.}} \rangle$ , ERES-Cluster  $\langle A_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle$  und ERES der Golgi-Region  $\langle A_{\text{ERES}, \text{Golgi}} \rangle$ . Relativer Flächenanteil der ERES  $A_{\text{ERES}}$ , ERES-Singletts  $A_{\text{ERES}, \text{Sing.}}$ , ERES-Cluster  $A_{\text{ERES}, \text{Clust.}}$ , ERES der Golgi-Region  $\hat{A}_{\text{ERES, Golgi}}$ , der Region des Golgi-Apparats  $\hat{A}_{\text{Golgi}}$  und des Zytoplasmas  $\hat{A}_{\text{Zyto.}}$  an der Gesamtfläche der Zelle. Absolutwerte der Fluoreszenz der Zelle  $F_{\text{Zelle}}$ , z-Maximumsprojektion aller 25 konfokalen Ebenen  $F_{\text{Zelle},z-\text{Proj.}}$ , ERES  $F_{\text{ERES}}$ , ERES-Singletts  $F_{\text{ERES}, \text{Sing.}}$ , ERES-Cluster  $F_{\text{ERES}, \text{Clust.}}$ , ERES der Golgi-Region  $F_{\text{ERES}, \text{Golgi}}$ , der Golgi-Region  $F_{\text{Golgi}}$  und des Zytoplasmas  $F_{\text{Zyto.}}$ . Mittlere Fluoreszenz der ERES  $\langle F_{\text{ERES}} \rangle$ , ERES-Singletts  $\langle F_{\text{ERES}, \text{Sing.}} \rangle$ , ERES-Cluster  $\langle F_{\text{ERES, Clust.}} \rangle$  und ERES der Golgi-Region  $\langle F_{\text{ERES, Golgi}} \rangle$ . Relativer Beitrag der ERES-Singletts, ERES-Cluster und ERES der Golgi-Region zur Fluoreszenz  $f_{\text{ERES}}$ , Fläche  $\tilde{a}_{\text{ERES}}$ , Anzahl  $\tilde{n}_{\text{ERES}}$  und Brightness  $\tilde{b}_{\text{ERES}}$  der insgesamt untersuchten ERES. Mittlere Fluoreszenz eines Bildpunkts der Zelle  $\langle \mathcal{F}_{\text{Zelle}} \rangle$ , des Zytoplasmas  $\langle \mathcal{F}_{\text{Zyto.}} \rangle$ , der ERES  $\langle \mathcal{F}_{\text{ERES}} \rangle$ , ERES-Singletts  $\langle \mathcal{F}_{\text{ERES}, \text{Sing.}} \rangle$ , ERES-Cluster  $\langle \mathcal{F}_{\text{ERES}, \text{Clust.}} \rangle$  und ERES der Golgi-Region  $\langle \mathcal{F}_{\text{ERES}, \text{Golgi}} \rangle$ . Mittlerer Abstand zwischen ERES und Plasmamembran  $\langle d_{\text{ERES, PM}} \rangle$ , mittlerer Abstand zwischen ERES und nächstgelegenem ERES  $\langle d_{\text{ERES, NN}} \rangle$  und Abständen zu nähsten fünf  $\langle d_{\text{ERES, 5-NN}} \rangle$  bzw. zehn Nachbarn  $\langle d_{\text{ERES, 10-NN}} \rangle$ . Mittlere Asphärizität der ERES (Asph.<sub>ERES</sub>), ERES-Singletts (Asph.<sub>ERES, Sing.</sub>) und ERES-Cluster (Asph.<sub>ERES, Clust.</sub>) einer Zelle. Mittleres Aspekteverhältnis der ERES  $\langle Aspr._{ERES} \rangle$ , ERES-Singletts  $\langle Aspr._{ERES, Sing.} \rangle$  und ERES-Cluster  $\langle Aspr._{ERES, Clust.} \rangle$  einer Zelle. Mittlere Ausdehnung  $\langle Ext._{ERES} \rangle$ , Rundheit  $\langle Rou._{ERES} \rangle$ , Solidität  $\langle Sol._{ERES} \rangle$ , Symmetrie  $\langle Sym._{ERES} \rangle$  und Zirkularität (Zir.<sub>ERES</sub>) der ERES einer Zelle.

	ERES (Sec16-GFP)				
	Unbehandelt	Kontroll-RNAi	RNAi (LNP)	Nocodazol	Filipin
$N_{ m Zellen}$	43	43	48	54	49
$N_{z-\text{Ebenen}}$	1	1	1	1	1
$A_{\rm Zelle} \left[ \mu {\rm m}^2 \right]$	$1631\pm 620$	$1499 \pm 427$	$1476\pm558$	$1409 \pm 482$	$1637\pm407$
$L_{\rm Hauptachse}$ [µm]	$64.5 \pm 13.4$	$60.7 \pm 10.9$	$64.4 \pm 13.1$	$60.1 \pm 12.1$	$65.8 \pm 11.6$
$L_{\rm Nebenachse}$ [µm]	$36.6\pm9.9$	$34.0\pm7.3$	$31.6\pm9.5$	$32.9\pm7.5$	$35.3\pm6.8$
$U_{\rm Zelle}$ [µm]	$193.7\pm45.4$	$171.2\pm25.2$	$175.9\pm36.0$	$179.1\pm40.4$	$195.8\pm34.5$
$N_{ m ERES}$	$729\pm328$	$717\pm231$	$292 \pm 146$	$435 \pm 170$	$574\pm348$
$N_{\rm ERES, Sing.}$	$712\pm321$	$704\pm231$	$228 \pm 128$	$425\pm167$	$563\pm342$
$N_{\rm ERES, Clust.}$	$16.3\pm13.5$	$12.2\pm7.3$	$64.0\pm26.7$	$10.1\pm8.4$	$12.3\pm10.7$
$N_{ m ERES,Golgi}$	$56.2\pm54.0$	$47.8\pm29.4$	/	$34.9\pm24.3$	$54.1\pm36.5$
$\widetilde{N}_{\rm ERES} \left[ \mu m^{-2} \right]$	$0.445 \pm 0.091$	$0.483 \pm 0.095$	$0.198 \pm 0.065$	$0.311 \pm 0.070$	$0.353 \pm 0.181$
$\widetilde{N}_{\text{ERES, Sing.}}$ [µm <sup>-2</sup> ]	$0.435 \pm 0.090$	$0.474 \pm 0.094$	$0.154 \pm 0.062$	$0.304 \pm 0.069$	$0.345\pm0.178$
$\widetilde{N}_{\text{ERES, Clust.}} \left[ \mu \text{m}^{-2} \right]$	$0.010\pm0.007$	$0.009 \pm 0.006$	$0.044 \pm 0.011$	$0.007\pm0.006$	$0.008 \pm 0.006$
$\widetilde{N}_{\mathrm{ERES, Golgi}} \left[ \mu \mathrm{m}^{-2} \right]$	$0.074 \pm 0.052$	$0.065 \pm 0.041$	/	$0.075\pm0.042$	$0.107 \pm 0.087$
$\langle A_{\rm ERES} \rangle \left[ \mu {\rm m}^2 \right]$	$0.114 \pm 0.025$	$0.109 \pm 0.019$	$0.650 \pm 0.360$	$0.113 \pm 0.024$	$0.106 \pm 0.032$
$\langle A_{\rm ERES, Sing.} \rangle \ \left[ \mu m^2 \right]$	$0.103 \pm 0.017$	$0.100\pm0.016$	$0.123 \pm 0.018$	$0.099 \pm 0.016$	$0.091 \pm 0.023$
$\langle A_{\rm ERES, Clust.} \rangle \left[ \mu m^2 \right]$	$0.658 \pm 0.065$	$0.606 \pm 0.048$	$2.187 \pm 1.016$	$0.669 \pm 0.103$	$0.666 \pm 0.161$
$\langle A_{\rm ERES,  Golgi} \rangle  \left[ \mu {\rm m}^2 \right]$	$0.916 \pm 0.615$	$0.321 \pm 0.229$	/	$0.795 \pm 0.441$	$0.773 \pm 0.626$

Е	Zentrale	Kenngrößen	der Musterbi	ildung von	ERES
---	----------	------------	--------------	------------	------

			ERES (Sec16-GFP)		
	Unbehandelt	Kontroll-RNAi	RNAi (LNP)	Nocodazol	Filipin
λ [07]	F 00   1 00		11 19 1 9 40	9.40   1.00	2.02   0.10
$A_{\text{ERES}}$ [%]	$5.08 \pm 1.22$	$5.25 \pm 1.28$	$11.13 \pm 3.48$	$3.49 \pm 1.00$	$3.83 \pm 2.18$
$A_{\text{ERES, Sing.}}$ [%]	$4.39 \pm 0.80$	$4.71 \pm 1.07$	$1.85 \pm 0.70$	$2.99 \pm 0.75$	$3.29 \pm 1.88$
$A_{\text{ERES, Clust.}}$ [%]	$0.69 \pm 0.54$	$0.54 \pm 0.38$	$9.28 \pm 3.71$	$0.50 \pm 0.40$	$0.54 \pm 0.48$
$A_{\mathrm{ERES, Golgi}}$ [%]	$2.22 \pm 1.06$	$1.01 \pm 0.72$	/	$1.62 \pm 0.79$	$1.60 \pm 0.94$
$A_{\text{Golgi}}$ [%]	$11.01 \pm 5.85$	$5.53 \pm 3.38$	/	$10.57 \pm 5.95$	$10.60 \pm 5.72$
$A_{\mathrm{Zyto.}}$ [%]	$36.9 \pm 13.5$	$40.6 \pm 12.1$	$58.0 \pm 11.3$	$56.8 \pm 9.3$	$50.9\pm22.9$
$F_{\text{Zelle}}$	$(1.09 \pm 1.15) \cdot 10^8$	$(8.18 \pm 5.16) \cdot 10^7$	$(7.80 \pm 4.25) \cdot 10^8$	$(1.03 \pm 0.89) \cdot 10^8$	$(1.03 \pm 0.61) \cdot 10^8$
$F_{\text{Zelle},z-\text{Proj.}}$	$(1.66 \pm 1.67) \cdot 10^8$	$(1.26 \pm 0.69) \cdot 10^8$	$(9.76 \pm 5.37) \cdot 10^8$	$(1.53 \pm 1.33) \cdot 10^8$	$(1.65 \pm 0.86) \cdot 10^8$
$F_{\rm ERES}$	$(1.94 \pm 2.21) \cdot 10^7$	$(1.94 \pm 1.13) \cdot 10^7$	$(3.81 \pm 2.52) \cdot 10^8$	$(1.93 \pm 2.22) \cdot 10^7$	$(1.93 \pm 1.62) \cdot 10^7$
$F_{\rm ERES, Sing.}$	$(1.60 \pm 1.79) \cdot 10^7$	$(1.60 \pm 0.85) \cdot 10^7$	$(3.05 \pm 1.75) \cdot 10^7$	$(1.56 \pm 1.80) \cdot 10^7$	$(1.46 \pm 1.17) \cdot 10^7$
$F_{\rm ERES, Clust.}$	$(3.43 \pm 4.93) \cdot 10^6$	$(3.40 \pm 3.87) \cdot 10^6$	$(3.50 \pm 2.45) \cdot 10^8$	$(3.70 \pm 4.98) \cdot 10^6$	$(4.71 \pm 6.69) \cdot 10^6$
$F_{\rm ERES,Golgi}$	$(1.18 \pm 1.08) \cdot 10^7$	$(4.59 \pm 2.94) \cdot 10^6$	/	$(1.33 \pm 1.03) \cdot 10^7$	$(1.38 \pm 0.96) \cdot 10^7$
$F_{ m Golgi}$	$(2.62 \pm 2.52) \cdot 10^7$	$(9.95 \pm 5.69) \cdot 10^6$	/	$(2.71 \pm 2.07) \cdot 10^7$	$(2.70 \pm 1.65) \cdot 10^7$
$F_{\rm Zyto.}$	$(1.46 \pm 1.61) \cdot 10^7$	$(1.35 \pm 1.37) \cdot 10^7$	$(1.82 \pm 1.21) \cdot 10^8$	$(2.53 \pm 2.31) \cdot 10^7$	$(2.43 \pm 2.91) \cdot 10^7$
$\langle F_{\rm ERES} \rangle$	$(2.34 \pm 2.02) \cdot 10^4$	$(2.76 \pm 1.68) \cdot 10^4$	$(1.67 \pm 1.36) \cdot 10^6$	$(3.79 \pm 2.91) \cdot 10^4$	$(3.44 \pm 3.54) \cdot 10^4$
$\langle F_{\rm ERES, Sing.} \rangle$	$(1.97 \pm 1.70) \cdot 10^4$	$(2.30 \pm 1.17) \cdot 10^4$	$(1.45 \pm 0.58) \cdot 10^5$	$(3.14 \pm 2.36) \cdot 10^4$	$(2.47 \pm 1.38) \cdot 10^4$
$\langle F_{\rm ERES, Clust.} \rangle$	$(2.07 \pm 2.86) \cdot 10^5$	$(2.52 \pm 1.56) \cdot 10^5$	$(5.94 \pm 4.31) \cdot 10^6$	$(3.51 \pm 3.11) \cdot 10^5$	$(3.51 \pm 4.34) \cdot 10^5$
$\langle F_{\rm ERES,  Golgi} \rangle$	$(3.55 \pm 4.30) \cdot 10^5$	$(1.12 \pm 0.78) \cdot 10^5$	/	$(4.37 \pm 2.84) \cdot 10^5$	$(0.47 \pm 1.11) \cdot 10^6$
$\tilde{f}_{\text{ERES, Sing.}}$ [%]	$46.4 \pm 11.4$	$65.5 \pm 11.9$	$10.1 \pm 6.0$	$42.6 \pm 14.1$	$41.3 \pm 15.9$
$\tilde{f}_{\text{ERES, Clust.}}$ [%]	$9.45 \pm 7.23$	$12.1 \pm 8.3$	$89.9\pm6.0$	$10.6 \pm 7.7$	$12.9 \pm 14.6$
$\tilde{f}_{\text{ERES, Golgi}}$ [%]	$44.1 \pm 16.0$	$22.4 \pm 14.2$	/	$46.8 \pm 18.9$	$45.8\pm23.5$
$\tilde{a}_{\text{ERES, Sing.}}$ [%]	$61.3 \pm 8.2$	$76.2 \pm 8.6$	$18.7\pm9.3$	$59.3 \pm 11.0$	$57.5 \pm 14.6$
$\tilde{a}_{\mathrm{ERES, Clust.}}$ [%]	$9.04 \pm 6.26$	$8.47 \pm 5.40$	$81.5\pm9.3$	$9.26 \pm 6.26$	$10.2\pm10.5$
$\tilde{a}_{\mathrm{ERES,Golgi}}$ [%]	$29.7 \pm 10.7$	$15.3\pm9.0$	/	$31.4 \pm 12.7$	$32.4 \pm 18.7$
$\tilde{n}_{\text{ERES, Sing.}}$ [%]	$97.7 \pm 1.6$	$98.2 \pm 1.3$	$76.0\pm8.0$	$97.6 \pm 1.8$	$97.8 \pm 1.9$
$\tilde{n}_{\mathrm{ERES, Clust.}}[\%]$	$2.33 \pm 1.61$	$1.84 \pm 1.26$	$24.0\pm8.0$	$2.37 \pm 1.84$	$2.25 \pm 1.94$
$b_{\mathrm{ERES, Sing.}}$	$0.860 \pm 0.081$	$0.875 \pm 0.072$	$0.137 \pm 0.074$	$0.841 \pm 0.087$	$0.834 \pm 0.134$
$b_{\rm ERES,  Clust.}$	$0.139 \pm 0.081$	$0.122 \pm 0.070$	$0.854 \pm 0.077$	$0.155 \pm 0.087$	$0.161 \pm 0.130$
$\langle \mathcal{F}_{ m Zelle}  angle$	$(1.91 \pm 1.64) \cdot 10^2$	$(1.78 \pm 1.14) \cdot 10^2$	$(1.73 \pm 0.77) \cdot 10^3$	$(2.25 \pm 1.64) \cdot 10^2$	$(2.05 \pm 1.24) \cdot 10^2$
$\langle \mathcal{F}_{\mathrm{Zyto.}}  angle$	$(7.52 \pm 7.37) \cdot 10^1$	$(7.53 \pm 6.92) \cdot 10^1$	$(6.78 \pm 2.85) \cdot 10^2$	$(1.04 \pm 0.97) \cdot 10^2$	$(8.97 \pm 8.18) \cdot 10^{1}$
$\langle \mathcal{F}_{ ext{ERES}}  angle$	$(6.55 \pm 6.00) \cdot 10^2$	$(8.07 \pm 4.45) \cdot 10^2$	$(7.21 \pm 2.54) \cdot 10^3$	$(1.08 \pm 0.82) \cdot 10^3$	$(9.68 \pm 7.37) \cdot 10^2$
$\langle \mathcal{F}_{\mathrm{ERES,Sing.}}  angle$	$(6.24 \pm 5.68) \cdot 10^2$	$(7.46 \pm 3.81) \cdot 10^2$	$(3.63 \pm 1.13) \cdot 10^3$	$(1.00 \pm 0.75) \cdot 10^3$	$(8.51 \pm 4.79) \cdot 10^2$
$\langle \mathcal{F}_{\mathrm{ERES,Clust.}}  angle$	$(0.97 \pm 1.31) \cdot 10^3$	$(1.31 \pm 0.80) \cdot 10^3$	$(7.93 \pm 2.58) \cdot 10^3$	$(1.64 \pm 1.38) \cdot 10^3$	$(1.50 \pm 1.15) \cdot 10^3$
$\langle \mathcal{F}_{\mathrm{ERES,Golgi}}  angle$	$(1.18 \pm 0.96) \cdot 10^3$	$(1.14 \pm 0.44) \cdot 10^3$	/	$(1.97 \pm 1.31) \cdot 10^{3}$	$(1.73 \pm 0.63) \cdot 10^3$
$\langle d_{\rm ERES, PM} \rangle \ [\mu m]$	$5.212 \pm 1.656$	$5.150 \pm 2.101$	$5.370 \pm 1.991$	$4.738 \pm 1.779$	$4.136 \pm 2.442$
$\langle d_{\rm ERES, NN} \rangle$ [µm]	$0.860 \pm 0.078$	$0.863 \pm 0.075$	$1.335\pm0.207$	$1.018\pm0.097$	$0.992 \pm 0.265$
$\langle d_{\rm ERES, 5-NN} \rangle$ [µm]	$1.395\pm0.142$	$1.328 \pm 0.144$	$2.169 \pm 0.365$	$1.686\pm0.170$	$1.702\pm0.537$
$\langle d_{\rm ERES, 10-NN} \rangle [\mu m]$	$1.879 \pm 0.199$	$1.790 \pm 0.201$	$2.949 \pm 0.518$	$2.284 \pm 0.239$	$2.333 \pm 0.774$
$\langle Asph{ERES} \rangle$	$0.089 \pm 0.013$	$0.089 \pm 0.018$	$0.122 \pm 0.029$	$0.073\pm0.017$	$0.089 \pm 0.017$
$\langle Asph{ERES, Sing.} \rangle$	$0.083 \pm 0.012$	$0.086 \pm 0.019$	$0.081 \pm 0.021$	$0.071\pm0.017$	$0.084 \pm 0.017$
$\left< \mathrm{Asph.}_{\mathrm{ERES,Clust.}} \right>$	$0.255\pm0.077$	$0.195 \pm 0.093$	$0.217 \pm 0.051$	$0.190 \pm 0.083$	$0.248 \pm 0.107$
$\langle Aspr{ERES} \rangle$	$0.793 \pm 0.016$	$0.799 \pm 0.022$	$0.752 \pm 0.033$	$0.807 \pm 0.023$	$0.798 \pm 0.020$
$\langle Aspr{ERES, Sing.} \rangle$	$0.803 \pm 0.013$	$0.798 \pm 0.016$	$0.768 \pm 0.028$	$0.815 \pm 0.018$	$0.799 \pm 0.015$
$\langle Aspr{ERES, Clust.} \rangle$	$0.797 \pm 0.037$	$0.790 \pm 0.062$	$0.761 \pm 0.044$	$0.809 \pm 0.060$	$0.794 \pm 0.056$
$\langle \text{Ext.}_{\text{ERES}} \rangle$	$0.765\pm0.007$	$0.757 \pm 0.008$	$0.740 \pm 0.019$	$0.773 \pm 0.008$	$0.762 \pm 0.009$
$\langle \mathrm{Rou.}_\mathrm{ERES} \rangle$	$0.768 \pm 0.017$	$0.770 \pm 0.024$	$0.725 \pm 0.037$	$0.784 \pm 0.025$	$0.770 \pm 0.021$
$\langle \text{Sol.}_{\text{ERES}} \rangle$	$0.980 \pm 0.005$	$0.964 \pm 0.005$	$0.962 \pm 0.014$	$0.984 \pm 0.005$	$0.966 \pm 0.006$
$\langle \text{Sym.}_{\text{ERES}} \rangle$	$0.640 \pm 0.024$	$0.652 \pm 0.033$	$0.585 \pm 0.045$	$0.659 \pm 0.035$	$0.651 \pm 0.030$
$\langle \text{Zir.}_{\text{ERES}} \rangle$	$0.815\pm0.025$	$0.810 \pm 0.031$	$0.785 \pm 0.046$	$0.850 \pm 0.031$	$0.808 \pm 0.038$

# E Zentrale Kenngrößen unter hypotonischer Behandlung

Tab. E.2: Zentrale Kenngrößen zur Charakterisierung intrazellulärer Vesikel und Fragmente. In dieser Tabelle sind zentrale Eigenschaften der intrazellulären Vesikel von ER und Mitochondrien, bestimmt aus konfokalen Fluoreszenzbildaufnahmen von KDEL-RFP oder Mito-GFP markierten HeLa-Zellen, und der mit Sec16-GFP markierten ERES für unbehandelte und mit hypotonischem Kulturmedium behandelten Zellen, gegenübergestellt. Ebenfalls sind Eigenschaften der mit Filipin degradierten Fragmente des ERs (KDEL-RFP) angegeben. Diese Daten bilden die Grundlage für die Ergebnisse und Diskussionen über die Veränderungen des ERs und der ERES unter der durch einen hypoosmotischen Schock bedingten Wasseraufnahme der Zellen (siehe Abschnitt 4.8, S. 60–67) Die Zahlenwerte stellen den Mittelwert über alle konfokalen Bildebenen des untersuchten Gesamtzellensembles mit dessen Standardabweichung dar. Weitere Mittelwertsklammern  $\langle \cdot \rangle$  kennzeichnen den Mittelwert der respektiven Größe, gebildet aus den Objekten einer Bildebene, der gleichsam als Mittelwert mit Standardabweichung über das Ensemble aller Konfokalaufnahmen angegeben wird.

**Untersuchte Größen:** Anzahl der Zellen  $N_{\text{Zellen}}$ , Anzahl untersuchter konfokaler Ebenen  $N_{z-\text{Ebenen}}$ , Zellfläche  $A_{\text{Zelle}}$  und Länge der Hauptachse  $L_{\text{Zelle}}$ . Anzahl der Vesikel bzw. ERES  $N_{\text{Obj.}}$ , und deren mittlere Fläche  $\langle A_{\text{Obj.}} \rangle$ , mittlere Länge der Hauptachse  $\langle d_{\text{Obj.}} \rangle$ , mittlere Fluoreszenz  $\langle F_{\text{Obj.}} \rangle$ , mittleres Aspekteverhältnis  $\langle \text{Aspr.}_{\text{Obj.}} \rangle$  und mittlere Asphärizität  $\langle \text{Asph.}_{\text{Obj.}} \rangle$ . Absolutwerte der Fluoreszenz der Vesikel bzw. ERES  $F_{\text{Obj.}}$ , des Hintergrunds  $F_{\text{Hint.}}$  und der Zelle  $F_{\text{Zelle}}$ . Mittlere Fluoreszenz eines Bildpunkts der Vesikel bzw. ERES  $\langle \mathcal{F}_{\text{Obj.}} \rangle$ , des Hintergrunds  $\langle \mathcal{F}_{\text{Hint.}} \rangle$  und der Zelle  $\langle \mathcal{F}_{\text{Zelle}} \rangle$ . Relativer Flächenanteil der Vesikel bzw. ERES  $\tilde{A}_{\text{Obj.}}$  und des Hintergrunds  $\tilde{A}_{\text{Hint.}}$  an der Gesamtfläche der Zelle. Relativer Fluoreszenzbeitrag der Vesikel bzw. ERES  $\tilde{F}_{\text{Obj.}}$  und Hintergrunds  $\tilde{A}_{\text{Hint.}}$  an der Fluoreszenz der Zelle.

		ER (KDEL-RFP)	ER (KDEL-RFP)	Mitoch. (Mito-GFP)	ERES (Se	ec16-GFP)
		Filipin	Hypotonisch		Hypotonisch	Unbehandelt
	$N_{\rm Zellen}$	15	15	10	10	43
	$N_{z-\text{Ebenen}}$	10	10	10	10	1
	$A_{\rm Zelle} \ [\mu m^2]$	$1811 \pm 456$	$1800\pm701$	$1568\pm670$	$1505\pm469$	$1631\pm 620$
	$L_{\rm Zelle}$ [µm]	$60.4\pm8.7$	$62.8 \pm 13.2$	$60.8 \pm 16.6$	$57.8 \pm 11.9$	$64.5 \pm 13.4$
_	$N_{\rm Obj.}$	$706 \pm 226$	$311 \pm 127$	$148\pm87$	$172\pm130$	$785\pm341$
	$\langle A_{\rm Obj.} \rangle \ [\mu m^2]$	$0.562 \pm 0.151$	$1.171\pm0.317$	$0.938 \pm 0.196$	$0.123 \pm 0.022$	$0.114 \pm 0.025$
	$\langle d_{\rm Obj.} \rangle ~[\mu m]$	$1.087\pm0.112$	$1.251\pm0.125$	$1.034\pm0.082$	$0.429 \pm 0.042$	$0.477 \pm 0.039$
	$\langle F_{\rm Obj.} \rangle$	$(6.85 \pm 4.28) \cdot 10^5$	$(1.19 \pm 0.91) \cdot 10^6$	$(4.17 \pm 3.20) \cdot 10^5$	$(4.35 \pm 2.94) \cdot 10^3$	$(3.54 \pm 2.02) \cdot 10^4$
	$\langle Aspr{Obj.} \rangle$	$0.794 \pm 0.172$	$0.860 \pm 0.134$	$0.907 \pm 0.094$	$0.823 \pm 0.029$	$0.793 \pm 0.016$
	$\langle Asph{Obj.} \rangle$	$0.099 \pm 0.150$	$0.053 \pm 0.109$	$0.040 \pm 0.089$	$0.066\pm0.020$	$0.089 \pm 0.013$
	$F_{\rm Obj.}$	$(4.32 \pm 2.23) \cdot 10^8$	$(3.40 \pm 3.25) \cdot 10^8$	$(4.51 \pm 2.37) \cdot 10^7$	$(1.29 \pm 1.19) \cdot 10^6$	$(3.12 \pm 1.78) \cdot 10^7$
	$F_{\rm Hint.}$	$(2.37 \pm 1.06) \cdot 10^8$	$(2.65 \pm 3.01) \cdot 10^8$	$(1.31 \pm 1.17) \cdot 10^7$	$(2.21 \pm 1.37) \cdot 10^7$	$(7.78 \pm 6.23) \cdot 10^7$
	$F_{\rm Zelle}$	$(6.70 \pm 3.20) \cdot 10^8$	$(6.04 \pm 6.13) \cdot 10^8$	$(5.81 \pm 3.49) \cdot 10^7$	$(2.33 \pm 1.48) \cdot 10^7$	$(1.09 \pm 1.15) \cdot 10^8$
	$\langle \mathcal{F}_{\mathrm{Obj.}}  angle$	$(3.86 \pm 2.03) \cdot 10^3$	$(3.52 \pm 3.47) \cdot 10^3$	$(1.28 \pm 1.07) \cdot 10^3$	$(1.06 \pm 0.58) \cdot 10^2$	$(7.24 \pm 4.62) \cdot 10^2$
	$\langle \mathcal{F}_{\mathrm{Hint.}}  angle$	$(2.46 \pm 1.59) \cdot 10^2$	$(2.37 \pm 1.61) \cdot 10^2$	$(4.71 \pm 5.52) \cdot 10^1$	$(4.73 \pm 2.80) \cdot 10^1$	$(7.52 \pm 7.37) \cdot 10^{1}$
	$\langle \mathcal{F}_{ m Zelle}  angle$	$(1.32 \pm 0.76) \cdot 10^3$	$(9.59 \pm 7.25) \cdot 10^2$	$(1.67 \pm 1.62) \cdot 10^2$	$(4.90 \pm 2.94) \cdot 10^1$	$(1.91 \pm 1.64) \cdot 10^2$
	$\widetilde{A}_{\mathrm{Obj.}}$	$0.215\pm0.044$	$0.178 \pm 0.043$	$0.090 \pm 0.033$	$0.022\pm0.018$	$0.073 \pm 0.016$
	$\widetilde{A}_{\mathrm{Hint.}}$	$0.885\pm0.092$	$0.822\pm0.099$	$0.910 \pm 0.087$	$0.978 \pm 0.043$	$0.927 \pm 0.078$
	$\widetilde{F}_{ ext{Obj.}}$	$0.643 \pm 0.070$	$0.601\pm0.088$	$0.845 \pm 0.133$	$0.049 \pm 0.039$	$0.309 \pm 0.058$
	$\widetilde{F}_{\mathrm{Hint.}}$	$0.357 \pm 0.095$	$0.398 \pm 0.086$	$0.156 \pm 0.109$	$0.952 \pm 0.137$	$0.690 \pm 0.091$

# F Zentrale Kenngrößen der Aktinfilamentdynamik

Tab. F.1: Zentrale Kenngrößen zur Charakterisierung der Aktinfilamentdynamik. In dieser Tabelle sind zentrale Kenngrößen der Aktinfilamentdynamik, bestimmt aus Serienaufnahmen konfokaler Fluoreszenzmikroskopie von UTR230-GFP markierten U2OS-Zellen, für punktartig nukleares, punktartig zytoplasmisches und gebündeltes nukleares Aktin bei unbehandelten Zellen als auch mit Nocodazol, hypotonischem Kulturmedium, hypertonischer Saccharose-Lösung und Valproinsäure behandelten Zellen, zusammengefasst. Diese Daten bilden die Grundlage für die Ergebnisse und Diskussionen von Teil III dieser Arbeit (siehe Kapitel 5, S. 78–129). Die nachfolgenden Zahlenwerte stellen den Mittelwert über alle Einzelteilchentrajektorien des jeweiligen Gesamtzellensembles mit Standardabweichung dar. Weitere Mittelwertsklammern  $\langle \cdot \rangle$  kennzeichnen den Mittelwert der respektiven Größe, gebildet aus den Aktinfilamenttrajektorien eines Zellkerns, der gleichsam als Mittelwert mit Standardabweichung über alle Experimente angegeben wird.

Untersuchte Größen: Anzahl der Zellen NZellen, mittlere Zahl von Lokalisationen pro Einzelbild  $\langle N_{\rm Spots} \rangle$ , mittlerer Durchmesser der Teilchenlokalisationen  $\langle d_{\rm Spots} \rangle$ , Schwellwert  $I_{\rm min}$ , gesamte Aufnahmedauer  $T_{\text{Aufn.}}$ , minimale  $T_{\text{min}}$  und mittlere Trajektorienlänge  $\langle T_i \rangle$ , Trajektorienanzahl  $N_{\text{Ens.}}$  und Trajektorienzahl  $N_{\text{Traj.}}$ . Aus Anpassung individueller  $\text{MSD}_i(\tau) = K_{\alpha,i} \tau^{\alpha_i}$ im Zeitbereich  $\tau = 0.2 - 2.5 \,\mathrm{s}$  bestimmter Anomaliewert des Gesamtteilchenensembles  $\alpha_i$ , mittlerer Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle$ , Anomaliewert der arithmetisch  $\alpha_{\langle MSD_i \rangle_a}$  oder geometrisch  $\alpha_{\langle MSD_i \rangle_a}$ zellmittleren MSD-Kurve  $\langle MSD_i(\tau) \rangle$  und verallgemeinerte Transportkoeffizienten  $K_{\alpha,i}, \langle K_{\alpha,i} \rangle$ ,  $K_{\alpha,\langle \mathrm{MSD}i\rangle_a}$  und  $K_{\alpha,\langle \mathrm{MSD}i\rangle_g}$ . Segmentanzahl $N_{\mathrm{Seg.}}$ , Anomaliewert  $\alpha_{i,\,T_{\mathrm{Seg}}}$  und verallgemeinerter Transportkoeffizient  $K_{\alpha,i,\,T_{\mathrm{Seg}}}$  bei segmentweiser Untersuchung der Trajektorien zu Segmentlängen  $T_{\text{Seg}} = 5 \text{ s}, 10 \text{ s}, 20 \text{ s}$ . Mittlerer Anomaliewert  $\langle \alpha_i \rangle_{\text{Res.}}$  des Resampling-Verfahrens und Anomaliewerte der arithmetisch  $\alpha_{\langle MSD_i \rangle_{a,Res.}}$  oder geometrisch  $\alpha_{\langle MSD_i \rangle_{g,Res.}}$  gemittelten MSD-Kurve. Abweichung  $\Delta p(\chi)$  zu einer Normalverteilung der Statistik normierter Schrittinkremente  $p(\chi)$  für unterschiedliche Verschiebungszeiten  $\tau$ . Nicht-Gaußscher Parameter des Gesamtteilchenensembles  $\mathcal{G}_i$  und mittleres  $\langle \mathcal{G}_i \rangle$ . Mittlere Autokorrelationsfunktion quadrierter Inkremente  $\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau) \rangle$  und zeitgemittelte Autokorrelationsfunktion des lokalen Diffusionskoeffizientens  $\langle G_{\Delta K,i}(\tau \leq 1 \,\mathrm{s}) \rangle$  für verschiedene Abtastintervalle  $\delta t$ . Mittlere Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion  $\langle C_{v,i}(\xi) \rangle$  unterschiedlicher  $\xi = \tau / \delta t$  und Abtastintervalle  $\delta t$ . Frequenzgemittelter Variationskoeffizient  $\langle \gamma(f = \omega T) \rangle$  der eindimensionalen  $PSD_i(\omega)$  und normierten Leistungsdichten  $PSD_i^*(\omega)$ .

	1			
		Unbehandelt		Nocodazol
	Punktartig (Nukl.)	Punktartig (Zyto.)	Gebündelt (Nukl.)	Punktartig (Nukl.)
$N_{ m Zellen}$	20	9	16	15
$\langle N_{\rm Spots} \rangle$	$33 \pm 13$	$42 \pm 21$	$44 \pm 12$	$29\pm 8$
$\langle d_{\rm Spots} \rangle$ [nm]	$302 \pm 16$	$299 \pm 40$	$425 \pm 45$	$301 \pm 20$
	$1700 \pm 610$	$435 \pm 350$	$445 \pm 215$	$2060 \pm 490$
$T_{\text{Aufp}}[s]$	91 + 21	$72 \pm 26$	$89 \pm 20$	$100 \pm 13$
$T_{min}$ [8]	$5.6 \pm 0.6$	$5.2 \pm 0.7$	$6.4 \pm 1.3$	$5.5 \pm 0.2$
$\langle T_i \rangle$ [s]	$10.5 \pm 1.3$	$10.6 \pm 0.9$	$17.0 \pm 1.4$	$10.0 \pm 0.2$
$N_{\rm Enc}$	4670	3136	4666	3735
N <sub>Troi</sub>	$233 \pm 119$	$345 \pm 177$	$292 \pm 133$	$249 \pm 49$
- · 11aJ.		0 505 - 0.001	0 550 + 0 100	
$\alpha_i$	$0.568 \pm 0.308$	$0.565 \pm 0.331$	$0.553 \pm 0.196$	$0.571 \pm 0.299$
$\langle lpha_i  angle$	$0.588 \pm 0.063$	$0.558 \pm 0.053$	$0.561 \pm 0.046$	$0.573 \pm 0.048$
$lpha_{\langle { m MSD}_i  angle_a}$	$0.694 \pm 0.083$	$0.707 \pm 0.056$	$0.565 \pm 0.062$	$0.652 \pm 0.054$
$\alpha_{\langle MSD_i \rangle_g}$	$0.572 \pm 0.065$	$0.545 \pm 0.052$	$0.558 \pm 0.051$	$0.554 \pm 0.045$
$K_{\alpha,i} \left[ \mu m^2 s^{-\alpha} \right]$	$(32.5 \pm 28.1) \cdot 10^{-3}$	$(35.2 \pm 37.8) \cdot 10^{-3}$	$(3.03 \pm 2.85) \cdot 10^{-3}$	$(20.7 \pm 15.1) \cdot 10^{-3}$
$\langle K_{\alpha,i} \rangle \left[ \mu \mathrm{m}^2  \mathrm{s}^{-\alpha} \right]$	$(37.1 \pm 12.1) \cdot 10^{-3}$	$(36.1 \pm 10.8) \cdot 10^{-3}$	$(3.14 \pm 1.29) \cdot 10^{-3}$	$(21.1 \pm 4.0) \cdot 10^{-3}$
$K_{\alpha,\langle MSD_i \rangle_a} \left[ \mu m^2 s^{-\alpha} \right]$	$(33.0 \pm 9.7) \cdot 10^{-3}$	$(31.2 \pm 9.8) \cdot 10^{-3}$	$(2.96 \pm 1.18) \cdot 10^{-3}$	$(19.5 \pm 3.8) \cdot 10^{-3}$
$K_{\alpha,\langle MSD_i \rangle_a} \left[ \mu m^2 s^{-\alpha} \right]$	$(27.2 \pm 7.5) \cdot 10^{-3}$	$(22.6 \pm \ 6.5 \ ) \cdot 10^{-3}$	$(2.57 \pm 0.99) \cdot 10^{-3}$	$(16.9 \pm \ 3.7) \cdot 10^{-3}$
No. The State	8018	5553	15232	5999
$N_{\text{Seg.}} = \frac{10}{2}$	2452	1728	7120	1672
$N_{\text{Seg.}} = 10 \text{ s}$	502	450	3063	311
$\Omega$ : $\pi$ > 20 s	$0.533 \pm 0.361$	$0.545 \pm 0.387$	$0.534 \pm 0.317$	$0.542 \pm 0.356$
$\alpha_i, I_{\text{Seg.}} > 5 \text{ s}$	$0.538 \pm 0.200$	$0.510 \pm 0.301$ $0.559 \pm 0.327$	$0.551 \pm 0.011$ $0.558 \pm 0.230$	$0.540 \pm 0.264$
$\alpha_i, T_{\text{Seg.}} > 10 \text{ s}$	$0.500 \pm 0.200$ $0.514 \pm 0.243$	$0.585 \pm 0.221$	$0.500 \pm 0.200$ $0.577 \pm 0.176$	$0.540 \pm 0.204$ $0.527 \pm 0.203$
$K \to \pi  \text{in } r_{\text{Seg.}} > 20 \text{ s}$	$(26.8 \pm 28.5) \cdot 10^{-3}$	$(28.0 \pm 37.3) \cdot 10^{-3}$	$(2.67 \pm 2.88) \cdot 10^{-3}$	$(17.8 \pm 15.9) \cdot 10^{-3}$
$K_{\alpha,i}, T_{\text{Seg.}} > 5 \text{ s}  [\mu \text{m} \ \text{s} ]$	$(20.0 \pm 20.0) \times 10^{-3}$	$(20.0 \pm 07.0) \times 10^{-3}$	$(2.01 \pm 2.00) \cdot 10^{-3}$	$(11.0 \pm 10.0) \times 10^{-3}$
$K_{\alpha,i}, T_{\text{Seg.}} > 10 \text{ s}$ µm <sup>2</sup> s <sup>-<math>\alpha</math></sup>	$(21.0 \pm 20.7) \cdot 10$ $(14.3 \pm 12.5) \cdot 10^{-3}$	$(21.4 \pm 21.2) \cdot 10$ $(14.5 \pm 18.0) \cdot 10^{-3}$	$(2.33 \pm 2.44) \cdot 10$ $(2.30 \pm 1.80) \cdot 10^{-3}$	$(14.4 \pm 11.4) \cdot 10$ $(0.05 \pm 7.08) \cdot 10^{-3}$
$M_{\alpha,i}, T_{\text{Seg.}} > 20 \text{ s} \text{ [} \text{µm S } \text{]}$	$(14.0 \pm 12.0) \cdot 10$	$(14.0 \pm 10.0) \cdot 10$	$(2.33 \pm 1.03)$ · 10	$(9.35 \pm 1.36) \cdot 10$
$\langle \alpha_i \rangle_{\text{Res.}}$	$0.625\pm0.085$	$0.630 \pm 0.016$	$0.531 \pm 0.055$	$0.581 \pm 0.043$
$lpha_{\langle { m MSD}_i  angle_a}$ Bes	$0.672 \pm 0.111$	$0.677 \pm 0.047$	$0.523 \pm 0.068$	$0.612\pm0.062$
$\alpha_{\langle MSD_i \rangle_{g,Res.}}$	$0.531 \pm 0.084$	$0.465 \pm 0.066$	$0.490 \pm 0.051$	$0.491 \pm 0.053$
$\Delta n(\chi = 1)$ 1.44	$(-314+133)\cdot 10^{-3}$	$(-34.0 \pm 12.0) \cdot 10^{-3}$	$(-5.0 \pm 6.8) \cdot 10^{-3}$	$(-29.1 + 9.2) \cdot 10^{-3}$
$\frac{\Delta p(\chi = 1)_{\tau = 1\Delta t}}{\Delta p(\chi = 1)_{\tau = -\tau \Delta t}}$	$(-28.2 \pm 11.2) \cdot 10^{-3}$	$(-28.6 \pm 9.7) \cdot 10^{-3}$	$(-0.6 \pm 5.2) \cdot 10^{-3}$	$(-21.0 \pm 8.9) \cdot 10^{-3}$
$\frac{\Delta p(\chi = 1)}{\Delta p(\chi = 3)} = 1 \Delta t$	$(38+16) \cdot 10^{-3}$	$(45+12) \cdot 10^{-3}$	$(0.8 \pm 0.2)$ 10 $(0.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-3}$	$(37 \pm 1.5) \cdot 10^{-3}$
$\frac{\Delta p(\chi = 0)}{\Delta p(\chi = 3)} = 1 \Delta t$	$(2.7 \pm 1.5) \cdot 10^{-3}$	$(3.2 \pm 1.2)^{-10}$ $(3.2 \pm 1.6) \cdot 10^{-3}$	$(0.0 \pm 0.0)^{-10}$ $(0.0 \pm 0.7) \cdot 10^{-3}$	$(3.1 \pm 1.0)^{-10}$ $(2.8 \pm 2.3) \cdot 10^{-3}$
$\frac{\Delta p(n-0)\tau=5\Delta t}{\bar{\sigma}}$				
$G_i$	$0.188 \pm 0.231$	$0.285 \pm 0.272$	$0.064 \pm 0.159$	$0.187 \pm 0.212$
$\langle {\cal G}_i \rangle$	$0.177 \pm 0.044$	$0.274 \pm 0.091$	$0.053 \pm 0.037$	$0.182 \pm 0.043$
$\left\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=1\delta t) \right\rangle_{\delta t=2\Delta t}$	$0.243 \pm 0.060$	$0.339 \pm 0.087$	$0.100 \pm 0.043$	$0.189 \pm 0.048$
$\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau = 2\delta t) \rangle_{\delta t = 2\Delta t}$	$0.084 \pm 0.038$	$0.137 \pm 0.072$	$0.021 \pm 0.021$	$0.079 \pm 0.032$
$\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=1\delta t) \rangle_{\delta t=1\Delta t}$	$0.337 \pm 0.089$	$0.441 \pm 0.121$	$0.132 \pm 0.067$	$0.276 \pm 0.080$
$\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=10\delta t) \rangle_{\delta t=1\Delta t}^{\delta t=1\Delta t}$	$0.029 \pm 0.036$	$0.056 \pm 0.054$	$0.014 \pm 0.015$	$0.029 \pm 0.029$
$\langle G_{AK}; (\tau < 18) \rangle_{a}$	$0.028 \pm 0.007$	$0.035 \pm 0.014$	$0.007 \pm 0.009$	$0.029 \pm 0.007$
$\langle G_{\Delta K,i}(\tau \leq 1.8) \rangle_{\delta t=1\Delta t}$	$0.025 \pm 0.008$	$0.035 \pm 0.014$	$0.001 \pm 0.005$	$0.021 \pm 0.008$
$\frac{(-\Delta n, t)}{(\partial t - t)} \partial t = 2\Delta t$				
$\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle_{\delta t=1\Delta t}$	$-0.204 \pm 0.039$	$-0.169 \pm 0.058$	$-0.145 \pm 0.064$	$-0.179 \pm 0.038$
$\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle_{\delta t=5\Delta t}$	$-0.225 \pm 0.035$	$-0.218 \pm 0.035$	$-0.239 \pm 0.029$	$-0.237 \pm 0.026$
$\langle C_{v,i}(\xi=2) \rangle_{\delta t=1\Delta t}$	$-0.020 \pm 0.011$	$-0.024 \pm 0.020$	$-0.037 \pm 0.007$	$-0.035 \pm 0.009$
$\left\langle C_{v,i}(\xi=2)\right\rangle_{\delta t=5\Delta t}$	$-0.016 \pm 0.012$	$-0.025 \pm 0.030$	$-0.021 \pm 0.010$	$-0.016 \pm 0.013$
$\langle \gamma(\omega T \ge 100) \rangle$	$1.216 \pm 0.092$	$1.547 \pm 0.195$	$1.600\pm0.242$	$1.195\pm0.103$
$\langle \gamma(\omega T \ge 150) \rangle$	$1.205 \pm 0.088$	$1.408\pm0.179$	$1.621\pm0.257$	$1.191\pm0.097$
$\langle \gamma^*(\omega T \ge 100) \rangle$	$0.994 \pm 0.030$	$0.997 \pm 0.063$	$1.004\pm0.017$	$0.988 \pm 0.028$
$\langle \gamma^*(\omega T \ge 150) \rangle$	$0.985\pm0.029$	$0.988 \pm 0.062$	$1.000\pm0.016$	$0.982\pm0.026$

	Hypotonisch	Saccharose	Valproinsäure	Valproinsäure
	Punktartig (Nukl.)	Punktartig (Nukl.)	Punktartig (Nukl.)	Gebündelt (Nukl.)
λ7	15	15	11	7
/VZellen	15	10		1
$\langle N_{\rm Spots} \rangle$	$31 \pm 9$	$35 \pm 24$	$33 \pm 12$	$30 \pm 13$
$\langle d_{\rm Spots} \rangle$ [nm]	$285 \pm 22$	$286 \pm 29$	$292 \pm 24$	$459 \pm 65$
$I_{\min}$	$1950 \pm 300$	$2775 \pm 400$	$2025 \pm 700$	$280 \pm 230$
$T_{\rm Aufn.}$ [s]	$69 \pm 13$	$81 \pm 21$	$106 \pm 11$	$109 \pm 6$
$T_{\min}$ [s]	$5.5 \pm 0.2$	$5.7 \pm 0.4$	$5.4 \pm 0.3$	$5.4 \pm 0.2$
$\langle T_i \rangle$ [s]	$11.7 \pm 1.0$	$13.5\pm2.7$	$9.6\pm0.8$	$15.5\pm1.2$
$N_{ m Ens.}$	3364	4858	3969	2029
$N_{\mathrm{Trai.}}$	$224 \pm 78$	$324 \pm 189$	$361 \pm 140$	$290\pm109$
	$0.237 \pm 0.154$	$0.044 \pm 0.053$	$0.541 \pm 0.288$	$0.566 \pm 0.250$
$\langle \alpha_i \rangle$	$0.237 \pm 0.134$ $0.238 \pm 0.025$	$0.044 \pm 0.000$	$0.541 \pm 0.200$ $0.541 \pm 0.050$	$0.565 \pm 0.041$
$\langle \alpha_i \rangle$	$0.258 \pm 0.025$	$0.034 \pm 0.031$	$0.541 \pm 0.059$	$0.505 \pm 0.041$ 0.664 $\pm$ 0.111
$\left. lpha \left< \mathrm{MSD}_i \right>_a  ight.$	$0.238 \pm 0.020$	$0.043 \pm 0.013$	$0.024 \pm 0.010$	$0.004 \pm 0.111$
$\alpha_{\langle MSD_i \rangle_g}$	$0.232 \pm 0.026$	$0.044 \pm 0.014$	$0.524 \pm 0.058$	$0.586 \pm 0.048$
$K_{\alpha,i} \left[ \mu m^2 s^{-\alpha} \right]$	$(8.97 \pm 5.21) \cdot 10^{-3}$	$(0.71 \pm 0.44) \cdot 10^{-3}$	$(19.1 \pm 14.9) \cdot 10^{-3}$	$(3.13 \pm 3.81) \cdot 10^{-3}$
$\langle K_{\alpha,i} \rangle \left  \mu \mathrm{m}^2 \mathrm{s}^{-\alpha} \right $	$(9.16 \pm 2.03) \cdot 10^{-3}$	$(0.73 \pm 0.24) \cdot 10^{-3}$	$(19.0 \pm 5.2) \cdot 10^{-3}$	$(3.24 \pm 2.88) \cdot 10^{-3}$
$K_{\alpha, (MSD_i)}$ $[\mu m^2 s^{-\alpha}]$	$(8.34 \pm 1.81) \cdot 10^{-3}$	$(0.68 \pm 0.22) \cdot 10^{-3}$	$(18.1 \pm 4.9) \cdot 10^{-3}$	$(3.00 \pm 2.71) \cdot 10^{-3}$
$K_{\alpha (MSD)}$ $[\mu m^2 s^{-\alpha}]$	$(7.86 \pm 1.83) \cdot 10^{-3}$	$(0.65 \pm 0.22) \cdot 10^{-3}$	$(15.6 \pm 4.5) \cdot 10^{-3}$	$(2.56 \pm 2.35) \cdot 10^{-3}$
	, ,	, ,		· /
$N_{ m Seg.,}T_{ m Seg.}>5 m s$	6613	12808	5965	5798
$N_{\mathrm{Seg.},T_{\mathrm{Seg.}}} > 10\mathrm{s}$	2289	5411	1528	2551
$N_{{ m Seg.},T_{{ m Seg.}}>20{ m s}}$	576	2055	192	1027
$\alpha_{i, T_{\text{Seg.}}} > 5  \text{s}$	$0.238 \pm 0.195$	$0.042\pm0.062$	$0.522 \pm 0.345$	$0.537 \pm 0.350$
$\alpha_{i, T_{\text{Seg}}} > 10  \text{s}$	$0.232 \pm 0.147$	$0.037 \pm 0.048$	$0.520 \pm 0.271$	$0.566 \pm 0.273$
$\alpha_i T_{\text{Sec}} > 20 \text{s}$	$0.229 \pm 0.123$	$0.034 \pm 0.035$	$0.523 \pm 0.213$	$0.592 \pm 0.227$
$K_{\alpha i} T_{\alpha} > 5s \left[ \text{um}^2 \text{s}^{-\alpha} \right]$	$(7.78 \pm 5.23) \cdot 10^{-3}$	$(0.63 \pm 0.39) \cdot 10^{-3}$	$(16.6 \pm 15.4) \cdot 10^{-3}$	$(2.70 \pm 3.97) \cdot 10^{-3}$
$K_{\alpha,i}, T_{\text{seg.}} > 03$ $[1^{n}]$	$(6.89 \pm 4.15) \cdot 10^{-3}$	$(0.59 \pm 0.34) \cdot 10^{-3}$	$(13.9 \pm 10.4) \cdot 10^{-3}$	$(2.53 \pm 3.25) \cdot 10^{-3}$
K $T$	$(5.83 \pm 3.42) \cdot 10^{-3}$	$(0.55 \pm 0.28) \cdot 10^{-3}$	$(10.0 \pm 10.1)$ 10 $(10.0 \pm 7.0) \cdot 10^{-3}$	$(2.00 \pm 0.20)^{-10}$ $(2.27 \pm 2.39) \cdot 10^{-3}$
$\Pi_{\alpha,i}, T_{\text{Seg.}} > 20 \text{s}$ [µm 5]		(0.00 ± 0.20) 10		$(2.21 \pm 2.00)$ 10
$\langle \alpha_i \rangle_{\text{Res.}}$	$0.400\pm0.048$	$1.896\pm0.180$	$0.572\pm0.036$	$0.590 \pm 0.107$
$\alpha_{\langle MSD_i \rangle}$ ,	$0.068 \pm 0.061$	$-0.188 \pm 0.463$	$0.592 \pm 0.076$	$0.642\pm0.179$
$\alpha$ (MSD <sub>i</sub> ) -	$0.004\pm0.069$	$-0.054 \pm 0.373$	$0.460\pm0.068$	$0.562 \pm 0.110$
(1.1.5-i/g, Res.)	(105+70) $10-3$	(47+70) 10-3	$(200 + 100) + 10^{-3}$	$(0.0 + 0.5) = 10^{-3}$
$\Delta p(\chi = 1)_{\tau = 1\Delta t}$	$(-16.5 \pm 7.0) \cdot 10^{-3}$	$(-4.7 \pm 7.2) \cdot 10^{-3}$	$(-36.3 \pm 10.0) \cdot 10^{-3}$	$(-8.2 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$
$\Delta p(\chi = 1)_{\tau = 5\Delta t}$	$(-4.4 \pm 8.7) \cdot 10^{-3}$	$(-7.5 \pm 5.2) \cdot 10^{-3}$	$(-20.3 \pm 9.0) \cdot 10^{-3}$	$(-4.3 \pm 8.7) \cdot 10^{-3}$
$\Delta p(\chi = 3)_{\tau = 1\Delta t}$	$(1.5 \pm 1.4) \cdot 10^{-3}$	$(0.2 \pm 1.4) \cdot 10^{-3}$	$(5.6 \pm 1.6) \cdot 10^{-3}$	$(0.9 \pm 0.9) \cdot 10^{-3}$
$\Delta p(\chi = 3)_{\tau = 5\Delta t}$	$(0.5 \pm 1.4) \cdot 10^{-3}$	$(0.0 \pm 0.9) \cdot 10^{-3}$	$(3.0 \pm 1.3) \cdot 10^{-3}$	$(0.0 \pm 1.0) \cdot 10^{-3}$
$\overline{\mathcal{G}}_i$	$0.078 \pm 0.135$	$0.028 \pm 0.081$	$0.174 \pm 0.225$	$0.104 \pm 0.189$
$\langle \overline{\mathcal{G}}_i \rangle$	$0.078 \pm 0.038$	$0.034 \pm 0.034$	$0.161 \pm 0.058$	$0.092\pm0.077$
$\langle C , a \rangle \langle (\tau - 1 \delta t) \rangle$	$0.202 \pm 0.028$	$0.263 \pm 0.024$	$0.265 \pm 0.083$	$0.140 \pm 0.080$
$\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau = 10t) / \delta t = 2\Delta t$	$0.202 \pm 0.020$	$0.205 \pm 0.024$	$0.205 \pm 0.005$	$0.140 \pm 0.000$
$\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=20t)\rangle_{\delta t=2\Delta t}$	$0.002 \pm 0.017$	$-0.020 \pm 0.010$	$0.089 \pm 0.031$	$0.053 \pm 0.059$
$\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau=1\delta t) \rangle_{\delta t=1\Delta t}$	$0.220 \pm 0.037$	$0.293 \pm 0.030$	$0.364 \pm 0.129$	$0.186 \pm 0.142$
$\left\langle G_{\Delta r^2,i}(\tau = 10\delta t) \right\rangle_{\delta t = 1\Delta t}$	$-0.002 \pm 0.019$	$-0.012 \pm 0.018$	$0.019 \pm 0.035$	$0.019 \pm 0.018$
$\langle G_{\Delta K i}(\tau < 1 \mathrm{s}) \rangle_{\mathrm{st} = 1 \mathrm{st}}$	$0.013 \pm 0.007$	$0.014 \pm 0.007$	$0.027 \pm 0.009$	$0.013 \pm 0.010$
$\langle G_{\Lambda K,i}(\tau < 1 s) \rangle_{st=1\Delta t}$	$0.010 \pm 0.004$	$0.016 \pm 0.007$	$0.022 \pm 0.010$	$0.000 \pm 0.009$
$\frac{1}{\left(\frac{1}{2}\Delta t\right)} = \frac{1}{\left(\frac{1}{2}\Delta t\right)}$				0.1.10.1.0.0.10
$\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle_{\delta t=1\Delta t}$	$-0.352 \pm 0.018$	$-0.476 \pm 0.013$	$-0.204 \pm 0.036$	$-0.148 \pm 0.048$
$\langle C_{v,i}(\xi=1) \rangle_{\delta t=5\Delta t}$	$-0.401 \pm 0.010$	$-0.473 \pm 0.021$	$-0.243 \pm 0.035$	$-0.203 \pm 0.044$
$\langle C_{v,i}(\xi=2) \rangle_{\delta t=1\Delta t}$	$-0.030 \pm 0.008$	$-0.001 \pm 0.007$	$-0.034 \pm 0.004$	$-0.033 \pm 0.022$
$\langle C_{v,i}(\xi=2) \rangle_{\delta t=5\Delta t}$	$-0.008 \pm 0.007$	$0.000 \pm 0.009$	$-0.013 \pm 0.013$	$-0.016 \pm 0.012$
$\langle \gamma(\omega T > 100) \rangle$	$1.118 \pm 0.057$	$1.341\pm0.216$	$1.194\pm0.105$	$1.524 \pm 0.231$
$\langle \gamma(\omega T > 150) \rangle$	$1.110\pm0.055$	$1.337 \pm 0.222$	$1.190 \pm 0.100$	$1.525 \pm 0.230$
$\langle \gamma^*(\omega T > 100) \rangle$	$0.972 \pm 0.012$	$0.964 \pm 0.011$	$0.974 \pm 0.037$	$1.002 \pm 0.015$
$\langle \gamma^*(\omega T > 150) \rangle$	$0.968 \pm 0.012$	$0.957 \pm 0.013$	$0.966 \pm 0.038$	$1.000 \pm 0.009$
	0.000 - 0.010	0.000 0.010	0.000 - 0.000	

F Zentrale Kenngrößen der Aktinfilamentdynamik

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1	Bestandteile der strukturellen Organisation einer eukaryontischen Zelle	7
Abb. 2.2	Konstruktionsmechanismus der SRRF-Mikroskopiemethode $\ .$	11
Abb. 3.1	Charakterisierung von SRRF-Aufnahmen fluoreszenter Nanopartikel $\ .$ .	23
Abb. 3.2	Konfokal- und SRRF-Mikroskopieaufnahmen von fixierten Mikrotubuli	26
Abb. 3.3	Experimentelle Eigenschaften der SRRF-Mikroskopie	27
Abb. 3.4	Experimentelles Hintergrundrauschen der SRRF-Mikroskopie	28
Abb. 3.5	Konfokal- und SRRF-Mikroskopieaufnahmen von lebenden Kulturzellen	30
Abb. 3.6	Anwendungsbeispiele der SRRF-Mikroskopie am ER lebender Zellen $\ .$ .	32
Abb. 3.7	Konfokal- und SRRF-Mikroskopie aufnahmen von ER-Phänotypen $\ .$	33
Abb. 3.8	Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters in SRRF-Aufnahmen	34
Abb. 3.9	Konfokal- und SRRF-Mikroskopie von biochemisch veränderten Zellen $% \mathcal{A}$ .	37
Abb. 4.1	Schematisches Bewegungsmodell mit Aggregationshypothese der ERES	44
Abb. 4.2	Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unbehandelter HeLa-Zellen	49
Abb. 4.3	Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unter Nocodazol $\ \ .\ .\ .$ .	51
Abb. 4.4	Nachweis des Gen-Knockdowns von Lunapark über einen Westernblot $% \mathcal{A}$ .	54
Abb. 4.5	Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unter RNA-Interferenz	56
Abb. 4.6	Charakterisierung der ERES-Aggregationen unter RNA-Interferenz	57
Abb. 4.7	Beschaffenheit des ERs und ERES-Musters unter Filipin	59
Abb. 4.8	Ausbildung intrazellulärer Vesikel unter hypotonischer Behandlung	61
Abb. 4.9	Eigenschaften der intrazellulären ER- und Mitochondrien-Vesikel	63
Abb. 4.10	Beschaffenheit punktartiger ERES-Strukturen auf den ER-Vesikeln $\ldots$	65
Abb. 4.11	Existenz punktartiger sowie flächig ausgedehnter ERES-Strukturen	67
Abb. 4.12	Eigenschaften der ERES unter den biochemischen Veränderungen	69
Abb. 5.1	Lokalisations muster nuklearen Aktins von unbehandelten U2OS-Zellen .	82
Abb. 5.2	Subdiffusives Skalierungsverhalten des MSDs	84
Abb. 5.3	Anomalie parameter und generalisierter Transportkoeffizient $\hdots$ . $\hdots$ .	86
Abb. 5.4	Wahrscheinlichkeitsverteilung normierter Schrittinkremente	89
Abb. 5.5	Verteilung normierter Transportkoeffizienten	90
Abb. 5.6	Autokorrelations funktionen zur Untersuchung heterogener Diffusion $\ . \ .$	91
Abb. 5.7	Geschwindigkeits autokorrelations funktion mit Abtastungsverfahren	92
Abb. 5.8	Streuung der Geschwindigkeitsautokorrelationsfunktion $\ldots \ldots \ldots$	93
Abb. 5.9	Spektrale Leistungsdichte der (normierten) Einzelteilchentrajektorien $\ .$	94
Abb. 5.10	Variationskoeffizient der (normierten) Leistungsdichte	96

Abb. 5.11	Diffusionseigenschaften gebündelter nuklearer Aktinfilamente 97
Abb. 5.12	Einzelteilchencharakteristika gebündelter nuklearer Aktinfilamente $\ . \ . \ . \ 99$
Abb. 5.13	Gegenüberstellung der Aktindynamik von unbehandelten Zellen $\  \   .\   .\   .\   .$ 102
Abb. 5.14	Gegenüberstellung unterschiedlicher Beweglichkeitscharakteristika $\ .\ .\ .\ 104$
Abb. 5.15	Lokalisation und Dynamik nuklearer Aktinfilamente bei Nocodazol $.$ $105$
Abb. 5.16	Lokalisation und Dynamik Aktins bei hypotonischer Behandlung $108$
Abb. 5.17	Lokalisation und Dynamik Aktins bei hypertonischer Behandlung $~$ 110
Abb. 5.18	Lokalisationsmuster Aktins unter der Einwirkung von Valproinsäure $\ . \ . \ 112$
Abb. 5.19	Lokalisations muster Aktins unter der Einwirkung von Trichostatin A $_{\cdot}$ . 114
Abb. 5.20	Dynamik punktartigen Aktins unter biochemischen Veränderungen $116$
Abb. 5.21	Charakteristika der modellierten und experimentellen Aktindynamik $\ .$ . 124
ALL A 1	Ülensiehten fashen under Zellen under hemstersiehter Deber dienen (120
ADD. A.1	Obersichtsaumanmen der Zeiten unter hypotonischer Benandlung 139
Abb. A.2	Bildgebung der fluoreszenzmarkierten siRNA-Moleküle
Abb.B.1	Darstellung des Laser-Ablations Aufbaus mit Strahlengang $\ \ldots \ \ldots \ \ldots \ 144$
Abb. C.1	Softwareseitige Implementation eines SRRF-Aufnahmemodus $\ . \ . \ . \ .$ 146
Abb.D.1	Segmentierung der ERES und Klassifizierung innerhalb der Zellen 149

# Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1	Experimentelles Auflösungsvermögen von Konfokal- und SRRF-Aufnahmen 24
Tab. 3.2	Experimentelles Auflösungsvermögen an fixierten Mikrotubuli 26
Tab. 3.3	Experimentelles Auflösungsvermögen an zellulären Strukturen $\ \ldots \ \ldots \ 31$
Tab. 3.4	Typische Kennwerte des konfokalen Lichtmikroskopaufbaus $39$
1ab. 5.1	Diffusionscharakteristika punktartiger Aktinfiamente im Zelikern 85
Tab. 5.2	Häufigkeiten verschiedener Phänotpyen nuklearen Aktins
TT 1 A 1	
Tab. A.1	Informationen zu den genutzen Plasmidvektoren und deren Referenzen . 135
Tab. E.1	Zentrale Kenngrößen der Musterbildung von ERES
Tab. E.2	Zentrale Kenngrößen intrazellulärer Vesikel und ER-Fragmente $\ .\ .\ .\ .$ . 156
Tab. F.1	Zentrale Kenngrößen der Aktinfilamentdynamik

# Literaturverzeichnis

## Literatur in der Einleitung

- JACOPO WERTHER: Ballon à col sinueux employé par M. Pasteur dans ses expériences contre la génération spontanée: Les merveilles de l'industrie - ou Description des principales industries modernes: Louis Figuier (1873). https://www.flickr.com/photos/fdctsevilla/4305572261/: Wikimedia Commons, 2010 (siehe S. 1).
- [2] BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, DAVID MORGAN, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS und PETER WALTER: Molekularbiologie der Zelle (6. Auflage). 2017 (siehe S. 1, 4–7).
- [3] ANTHONY A. HYMAN, CHRISTOPH A. WEBER und FRANK JÜLICHER: "Liquid-Liquid Phase Separation in Biology". Annual Review of Cell and Developmental Biology 30, S. 39–58 (2014) (siehe S. 1, 4).
- [4] JOEL BERRY, CLIFFORD P BRANGWYNNE und MIKKO HAATAJA: "Physical principles of intracellular organization via active and passive phase transitions". *Reports on Progress in Physics* 81(4), S. 046601 (2018) (siehe S. 1, 4, 8).
- [5] RICHARD J. WHEELER und ANTHONY A. HYMAN: "Controlling compartmentalization by nonmembrane-bound organelles". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373(1747), S. 20170193 (2018) (siehe S. 1, 4).
- [6] ERIC KARSENTI: "Self-organization in cell biology: a brief history". Nature Reviews Molecular Cell Biology 9(3), S. 255–262 (2008) (siehe S. 1, 4).
- [7] TOM MISTELI: "The concept of self-organization in cellular architecture". The Journal of cell biology 155(2), S. 181 (2001) (siehe S. 1, 4).
- [8] FRANÇOIS SCHWEISGUTH und FRANCIS CORSON: "Self-Organization in Pattern Formation". Developmental Cell 49(5), S. 659–677 (2019) (siehe S. 1, 8).
- [9] ROGER Y. TSIEN: "The Green Fluorescent Protein". Annual Review of Biochemistry 67(1), S. 509–544 (1998) (siehe S. 2, 8).
- [10] STEFFEN J. SAHL, STEFAN W. HELL und STEFAN JAKOBS: "Fluorescence nanoscopy in cell biology". Nature Reviews Molecular Cell Biology 18(11), S. 685–701 (2017) (siehe S. 2, 22, 40, 41).
- [11] YICONG WU und HARI SHROFF: "Faster, sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging". *Nature Methods* 15(12), S. 1011–1019 (2018) (siehe S. 2, 41).

## Literaturverzeichnis von Teil I: Biophysikalische Hintergründe

- [2] BRUCE ALBERTS, ALEXANDER JOHNSON, JULIAN LEWIS, DAVID MORGAN, MARTIN RAFF, KEITH ROBERTS und PETER WALTER: Molekularbiologie der Zelle (6. Auflage). 2017 (siehe S. 1, 4–7).
- [3] ANTHONY A. HYMAN, CHRISTOPH A. WEBER und FRANK JÜLICHER: "Liquid-Liquid Phase Separation in Biology". Annual Review of Cell and Developmental Biology 30, S. 39–58 (2014) (siehe S. 1, 4).
- [4] JOEL BERRY, CLIFFORD P BRANGWYNNE und MIKKO HAATAJA: "Physical principles of intracellular organization via active and passive phase transitions". *Reports on Progress in Physics* 81(4), S. 046601 (2018) (siehe S. 1, 4, 8).
- [5] RICHARD J. WHEELER und ANTHONY A. HYMAN: "Controlling compartmentalization by nonmembrane-bound organelles". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373(1747), S. 20170193 (2018) (siehe S. 1, 4).
- [6] ERIC KARSENTI: "Self-organization in cell biology: a brief history". Nature Reviews Molecular Cell Biology 9(3), S. 255–262 (2008) (siehe S. 1, 4).
- [7] TOM MISTELI: "The concept of self-organization in cellular architecture". The Journal of cell biology 155(2), S. 181 (2001) (siehe S. 1, 4).
- [8] FRANÇOIS SCHWEISGUTH und FRANCIS CORSON: "Self-Organization in Pattern Formation". Developmental Cell 49(5), S. 659–677 (2019) (siehe S. 1, 8).
- [9] ROGER Y. TSIEN: "The Green Fluorescent Protein". Annual Review of Biochemistry 67(1), S. 509-544 (1998) (siehe S. 2, 8).
- [12] ALEXANDRA ZIDOVSKA: "The rich inner life of the cell nucleus: dynamic organization, active flows, and emergent rheology". *Biophysical Reviews*, S. 1–14 (2020) (siehe S. 5, 125, 129).
- [13] SALMAN F. BANANI, HYUN O. LEE, ANTHONY A. HYMAN und MICHAEL K. ROSEN: "Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(5), S. 285–298 (2017) (siehe S. 5, 125, 126, 129).
- [14] JAN LAMMERDING: "Mechanics of the Nucleus". Comprehensive Physiology 1(2), S. 783 (2011) (siehe S. 5, 125, 127, 129, 132).
- [15] SVENJA ULFERTS, BINA PRAJAPATI, ROBERT GROSSE und MARIA K. VARTIAINEN: "Emerging Properties and Functions of Actin and Actin Filaments Inside the Nucleus". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13(3), a040121 (2021) (siehe S. 5, 78, 127, 132).
- [16] VERENA HURST, KENJI SHIMADA und SUSAN M. GASSER: "Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair". Trends in Cell Biology 29(6), S. 462–476 (2019) (siehe S. 5, 78, 81, 111, 126, 129, 132).
- [17] CHRISTOPHER PATRICK CARIDI, MATTHIAS PLESSNER, ROBERT GROSSE und IRENE CHIOLO: "Nuclear actin filaments in DNA repair dynamics". *Nature Cell Biology* 21(9), S. 1068–1077 (2019) (siehe S. 5, 78, 79, 126, 129, 132).
- [18] GIA K. VOELTZ, MELISSA M. ROLLS und TOM A. RAPOPORT: "Structural organization of the endoplasmic reticulum". *EMBO reports* 3(10), S. 944–950 (2002) (siehe S. 5, 32, 43, 48).

- [19] DIANNE S. SCHWARZ und MICHAEL D. BLOWER: "The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling". *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(1), S. 79–94 (2016) (siehe S. 5, 32, 43, 45, 48, 76).
- [20] LAURA M. WESTRATE, JASON E. LEE, WILLIAM A. PRINZ und GIA K. VOELTZ: "Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape". Annual Review of Biochemistry 84, S. 791–811 (2015) (siehe S. 6, 22, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 53, 73).
- [21] UMA GOYAL und CRAIG BLACKSTONE: "Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2492–2498 (2013) (siehe S. 6, 22, 32, 36, 39, 45, 50, 53).
- [22] HANNAH T. PERKINS und VIKI ALLAN: "Intertwined and Finely Balanced: Endoplasmic Reticulum Morphology, Dynamics, Function, and Diseases". *Cells* 10(9), S. 2341 (2021) (siehe S. 6, 22, 29, 32, 35, 39, 43).
- [23] LARS ELLGAARD und ARI HELENIUS: "Quality control in the endoplasmic reticulum". Nature Reviews Molecular Cell Biology 4(3), S. 181–191 (2003) (siehe S. 6, 48).
- [24] ANNIKA BUDNIK und DAVID J. STEPHENS: "ER exit sites Localization and control of COPII vesicle formation". FEBS Letters 583(23), S. 3796–3803 (2009) (siehe S. 6, 42, 48, 72, 75).
- [25] KAZUO KUROKAWA und AKIHIKO NAKANO: "The ER exit sites are specialized ER zones for the transport of cargo proteins from the ER to the Golgi apparatus". *The Journal of Biochemistry* 165(2), S. 109–114 (2019) (siehe S. 6, 42, 74).
- [26] HELEN HUGHES und DAVID J. STEPHENS: "Assembly, organization, and function of the COPII coat". *Histochemistry and Cell Biology* 129(2), S. 129–151 (2008) (siehe S. 6, 42, 48).
- [27] JENNIFER G. D'ARCANGELO, KYLE R. STAHMER und ELIZABETH A. MILLER: "Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2464–2472 (2013) (siehe S. 6, 42, 48, 72, 75, 131, 135).
- [28] JANINE MCCAUGHEY und DAVID J. STEPHENS: "COPII-dependent ER export in animal cells: adaptation and control for diverse cargo". *Histochemistry and Cell Biology* 150(2), S. 119–131 (2018) (siehe S. 6, 43, 74, 131).
- [29] ISHIER RAOTE und VIVEK MALHOTRA: "Tunnels for Protein Export from the Endoplasmic Reticulum". Annual Review of Biochemistry 90 (2021) (siehe S. 6, 42, 43, 74, 131).
- [30] AUBREY V. WEIGEL, CHI-LUN CHANG, GLEB SHTENGEL, C. SHAN XU, DAVID P. HOFFMAN, MELANIE FREEMAN, NIRMALA IYER, JESSE AARON, SATYA KHUON, JOHN BOGOVIC, WEI QIU, HARALD F. HESS und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER". *Cell* 184(9), S. 2412–2429 (2021) (siehe S. 6, 7, 35, 38, 43, 74, 131).
- [31] OLGA SHOMRON, INBAR NEVO-YASSAF, TAMAR AVIAD, YAKEY YAFFE, EITAN EREZ ZAHAVI, ANNA DUKHOVNY, ERAN PERLSON, ILYA BRODSKY, ADVA YEHESKEL, METSADA PASMANIK-CHOR, ANNA MIRONOV, GALINA V. BEZNOUSSENKO, ALEXANDER A. MIRONOV, ELLA H. SKLAN, GEORGE H. PATTERSON, YOJI YONEMURA, MARA SANNAI, CHRISTOPH KAETHER und KORET HIRSCHBERG: "COPII collar defines the boundary between ER and ER exit site and does not coat cargo containers". Journal of Cell Biology 220(6), e201907224 (2021) (siehe S. 6, 7, 131).

- [32] AMBER R. ENGLISH und GIA K. VOELTZ: "Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(4), a013227 (2013) (siehe S. 6, 7, 22, 32, 39, 60, 66).
- [33] SEBASTIAN C. J. HELLE, GIL KANFER, KATJA KOLAR, ALEXANDER LANG, AGNÈS H. MICHEL und BENOÎT KORNMANN: "Organization and function of membrane contact sites". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2526–2541 (2013) (siehe S. 6, 7, 60).
- [34] WILLIAM A. PRINZ, ALEXANDRE TOULMAY und TAMAS BALLA: "The functional universe of membrane contact sites". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(1), S. 7–24 (2020) (siehe S. 6, 7, 60, 66).
- [35] HAOXI WU, PEDRO CARVALHO und GIA K. VOELTZ: "Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites". *Science* 361(6401) (2018) (siehe S. 7, 22, 39, 43, 60, 61, 66, 128, 131).
- [36] ASHLEY A. ROWLAND und GIA K. VOELTZ: "Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(10), S. 607–615 (2012) (siehe S. 7, 66).
- [37] JASON E. LEE, PETER I. CATHEY, HAOXI WU, ROY PARKER und GIA K. VOELTZ: "Endoplasmic reticulum contact sites regulate the dynamics of membraneless organelles". *Science* 367(6477) (2020) (siehe S. 7, 22, 39, 43, 61, 66, 128).
- [38] YASUNORI SAHEKI und PIETRO DE CAMILLI: "Endoplasmic Reticulum–Plasma Membrane Contact Sites". Annual Review of Biochemistry 86, S. 659–684 (2017) (siehe S. 7).
- [39] CHRISTOPHER KING, PRABUDDHA SENGUPTA, ARNOLD Y. SEO und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". Proceedings of the National Academy of Sciences 117(13), S. 7225–7235 (2020) (siehe S. 7, 47, 60–63, 65–67, 74, 75, 80, 107, 127, 131, 138–140).
- [40] SAURABH S. MOGRE, AIDAN I. BROWN und ELENA F. KOSLOVER: "Getting around the cell: physical transport in the intracellular world". *Physical Biology* 17(6), S. 061003 (2020) (siehe S. 8, 15, 19).
- [41] KAMILLA NORREGAARD, RALF METZLER, CHRISTINE M. RITTER, KIRSTINE BERG-SØRENSEN und LENE B. ODDERSHEDE: "Manipulation and Motion of Organelles and Single Molecules in Living Cells". *Chemical Reviews* 117(5), S. 4342–4375 (2017) (siehe S. 8, 15, 19, 84, 103, 127, 132).
- [42] JOSEPH R. LAKOWICZ: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science (Berlin), 2006 (siehe S. 8).
- [43] JAMES R. PAWLEY: Handbook Of Biological Confocal Microscopy. Bd. 236. Springer Science (Berlin), 2006 (siehe S. 8, 9, 22).
- [44] NILS GUSTAFSSON, SIÂN CULLEY, GEORGE ASHDOWN, DYLAN M. OWEN, PEDRO MATOS PEREIRA und RICARDO HENRIQUES: "Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations". *Nature Communications* 7(1), S. 1–9 (2016) (siehe S. 9–11, 22, 26–28, 39–41, 131, 145).

- [45] SIÂN CULLEY, KALINA L. TOSHEVA, PEDRO MATOS PEREIRA und RICARDO HENRIQUES: "SRRF: Universal live-cell super-resolution microscopy". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 101, S. 74–79 (2018) (siehe S. 9, 10, 22, 25–27, 39, 41, 145).
- [46] THOMAS DERTINGER, RYAN COLYER, GOPAL IYER, SHIMON WEISS und JÖRG ENDERLEIN:
   "Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)". Proceedings of the National Academy of Sciences 106(52), S. 22287–22292 (2009) (siehe S. 9, 11, 41).
- [47] MICKAËL LELEK, MELINA T. GYPARAKI, GERTI BELIU, FLORIAN SCHUEDER, JULIETTE GRIFFIÉ, SULIANA MANLEY, RALF JUNGMANN, MARKUS SAUER, MELIKE LAKADAMYALI und CHRISTOPHE ZIMMER: "Single-molecule localization microscopy". Nature Reviews Methods Primers 1(1), S. 1– 27 (2021) (siehe S. 10, 41).
- [48] JAGADISH SANKARAN, HARIKRUSHNAN BALASUBRAMANIAN, WAI HOH TANG, XUE WEN NG, ADRIAN RÖLLIN und THORSTEN WOHLAND: "Simultaneous spatiotemporal super-resolution and multi-parametric fluorescence microscopy". *Nature Communications* 12(1), S. 1–14 (2021) (siehe S. 10, 22, 25–27, 39, 41).
- [49] RONI EHRLICH, VERENA WULF, ADI HENDLER-NEUMARK, BARAK KAGAN und GILI BISKER: "Super-Resolution Radial Fluctuations (SRRF) nanoscopy in the near infrared". *Optics Express* 30(2), S. 1130–1142 (2022) (siehe S. 10, 22, 25, 27, 39, 41).
- [50] COLLIN COATES: 'SRRF-Stream': Real-Time Super-Resolution in a Camera. Belfast (Irland): Technical Note (Andor Technology Ltd), 2017 (siehe S. 10, 11, 22, 27, 145).
- [51] CLAUDIA FLORINDO: SRRF-Stream<sup>(+)</sup>: Super-Resolution Microscopy Accessible to All: Fast, reliable & live-cell compatible Super-Resolution. Belfast (Irland): Technical Note (Andor Technology Ltd), 2020 (siehe S. 10, 11, 22, 26–28, 145).
- [52] HONGQIANG MA, FAN LONG, SHAOQUN ZENG und ZHEN-LI HUANG: "Fast and precise algorithm based on maximum radial symmetry for single molecule localization". Optics Letters 37(13), S. 2481–2483 (2012) (siehe S. 10, 11).
- [53] ROMAIN F. LAINE, KALINA L. TOSHEVA, NILS GUSTAFSSON, ROBERT D. M. GRAY, PEDRO ALMADA, DAVID ALBRECHT, GABRIEL T. RISA, FREDRIK HURTIG, ANN-CHRISTIN LINDÅS, BUZZ BAUM, JASON MERCER, CHRISTOPHE LETERRIER, PEDRO M. PEREIRA, SIÂN CULLEY und RICARDO HENRIQUES: "NanoJ: a high-performance open-source super-resolution microscopy toolbox". Journal of Physics D: Applied Physics 52(16), S. 163001 (2019) (siehe S. 11, 22, 24, 27, 145).
- [54] IGOR M. SOKOLOV: "Models of anomalous diffusion in crowded environments". Soft Matter 8(35), S. 9043–9052 (2012) (siehe S. 12, 13, 122).
- [55] FELIX HÖFLING und THOMAS FRANOSCH: "Anomalous transport in the crowded world of biological cells". *Reports on Progress in Physics* 76(4), S. 046602 (2013) (siehe S. 12–15, 18, 19, 84, 103, 122).
- [56] RALF METZLER, JAE-HYUNG JEON, ANDREY G. CHERSTVY und ELI BARKAI: "Anomalous diffusion models and their properties: non-stationarity, non-ergodicity, and ageing at the centenary of single particle tracking". *Physical Chemistry Chemical Physics* 16(44), S. 24128–24164 (2014) (siehe S. 12–16, 84, 103, 122).

- [57] MICHAEL J. SAXTON und KEN JACOBSON: "Single-Particle Tracking: Applications to Membrane Dynamics". Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 26(1), S. 373–399 (1997) (siehe S. 13, 14, 84).
- [58] BO WANG, JAMES KUO, SUNG CHUL BAE und STEVE GRANICK: "When Brownian diffusion is not Gaussian". Nature Materials 11(6), S. 481–485 (2012) (siehe S. 14, 17, 88, 90).
- [59] RALF METZLER: "Gaussianity Fair: The Riddle of Anomalous yet Non-Gaussian Diffusion". Biophysical Journal 112(3), S. 413 (2017) (siehe S. 14, 17, 88, 90).
- [60] THOMAS J. LAMPO, STELLA STYLIANIDOU, MIKAEL P. BACKLUND, PAUL A. WIGGINS und ANDREW J. SPAKOWITZ: "Cytoplasmic RNA-Protein Particles Exhibit Non-Gaussian Subdiffusive Behavior". *Biophysical Journal* 112(3), S. 532–542 (2017) (siehe S. 14, 17, 18, 88–92, 104, 110, 122, 123, 128).
- [61] AUBREY V. WEIGEL, BLAIR SIMON, MICHAEL M. TAMKUN und DIEGO KRAPF: "Ergodic and nonergodic processes coexist in the plasma membrane as observed by single-molecule tracking". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(16), S. 6438–6443 (2011) (siehe S. 14, 86, 122).
- [62] WEI HE, HAO SONG, YUN SU, LING GENG, BRUCE J. ACKERSON, H. B. PENG und PENGER TONG: "Dynamic heterogeneity and non-Gaussian statistics for acetylcholine receptors on live cell membrane". *Nature Communications* 7(1), S. 1–8 (2016) (siehe S. 14, 88, 90, 122).
- [63] ASMAA A. SADOON und YONG WANG: "Anomalous, non-Gaussian, viscoelastic, and agedependent dynamics of histonelike nucleoid-structuring proteins in live *Escherichia coli*". *Physical Review E* 98(4), S. 042411 (2018) (siehe S. 14, 88, 122).
- [64] PATRICK WITZEL, MARIA GÖTZ, YANN LANOISELÉE, THOMAS FRANOSCH, DENIS S. GREBENKOV und DORIS HEINRICH: "Heterogeneities Shape Passive Intracellular Transport". *Biophysical Journal* 117(2), S. 203–213 (2019) (siehe S. 14, 19, 88, 92).
- [65] MYKYTA V. CHUBYNSKY und GARY W. SLATER: "Diffusing Diffusivity: A Model for Anomalous, yet Brownian, Diffusion". *Physical Review Letters* 113(9), S. 098302 (2014) (siehe S. 14, 17, 88).
- [66] ALEKSEI V. CHECHKIN, FLAVIO SENO, RALF METZLER und IGOR M. SOKOLOV: "Brownian yet Non-Gaussian Diffusion: From Superstatistics to Subordination of Diffusing Diffusivities". *Physical Review X* 7(2), S. 021002 (2017) (siehe S. 14, 17, 88).
- [67] CARLO MANZO und MARIA F. GARCIA-PARAJO: "A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights". *Reports on Progress in Physics* 78(12), S. 124601 (2015) (siehe S. 14, 19, 84, 128).
- [68] HAO SHEN, LAWRENCE J. TAUZIN, RASHAD BAIYASI, WENXIAO WANG, NICHOLAS MORINGO, BO SHUANG und CHRISTY F. LANDES: "Single Particle Tracking: From Theory to Biophysical Applications". *Chemical Reviews* 117(11), S. 7331–7376 (2017) (siehe S. 14, 19, 84, 128).
- [69] LORENZ STADLER und MATTHIAS WEISS: "Non-equilibrium forces drive the anomalous diffusion of telomeres in the nucleus of mammalian cells". New Journal of Physics 19(11), S. 113048 (2017) (siehe S. 15, 19, 86, 103, 104, 106, 107, 110, 121, 123, 125–128).
- [70] KONSTANTIN SPECKNER, LORENZ STADLER und MATTHIAS WEISS: "Anomalous dynamics of the endoplasmic reticulum network". *Physical Review E* 98(1), S. 012406 (2018) (siehe S. 15, 19, 22, 29, 33, 35, 38, 43–45, 48, 92, 104, 123).

- [71] LORENZ STADLER, KONSTANTIN SPECKNER und MATTHIAS WEISS: "Diffusion of Exit Sites on the Endoplasmic Reticulum: A Random Walk on a Shivering Backbone". *Biophysical Journal* 115(8), S. 1552–1560 (2018) (siehe S. 15, 17, 19, 22, 29, 34, 35, 38, 43–46, 48, 73, 80, 86, 89, 125, 137).
- [72] LORENZ STADLER: Persönliche Kommunikation unpublizierter Daten. Universität Bayreuth, 2019 (siehe S. 15, 19, 43, 44, 48, 50, 51, 54, 73, 137, 201).
- [73] MATTHIAS WEISS: "Resampling single-particle tracking data eliminates localization errors and reveals proper diffusion anomalies". *Physical Review E* 100(4), S. 042125 (2019) (siehe S. 15, 19, 87, 97, 119, 120).
- [74] DIEGO KRAPF, NILS LUKAT, ENZO MARINARI, RALF METZLER, GLEB OSHANIN, CHRISTINE SELHUBER-UNKEL, ALESSIO SQUARCINI, LORENZ STADLER, MATTHIAS WEISS und XINRAN XU: "Spectral Content of a Single non-Brownian Trajectory". *Physical Review X* 9(1), S. 011019 (2019) (siehe S. 15, 18, 19, 94–96).
- [75] ADAL SABRI, XINRAN XU, DIEGO KRAPF und MATTHIAS WEISS: "Elucidating the origin of heterogeneous anomalous diffusion in the cytoplasm of mammalian cells". *Physical Review Letters* 125(5), S. 058101 (2020) (siehe S. 15, 16, 18, 19, 85, 87, 88, 91, 98, 104, 126, 128, 137, 139).
- [76] ADAL SABRI: Elucidating the emergence of heterogeneous motion in living matter from the microto the nanoscale. Universität Bayreuth: Dissertation, 2021 (siehe S. 15, 16, 18, 19, 85, 87, 91, 119, 120, 122, 126, 128, 137, 139, 152).
- [77] JANA JENTZSCH, ADAL SABRI, KONSTANTIN SPECKNER, GERTRUD LALLINGER-KUBE, MATT-HIAS WEISS und KLAUS ERSFELD: "Microtubule polyglutamylation is important for regulating cytoskeletal architecture and motility in Trypanosoma brucei". *Journal of Cell Science* 133(18), jcs248047 (2020) (siehe S. 15, 19).
- [78] KONSTANTIN SPECKNER und MATTHIAS WEISS: "Single-Particle Tracking Reveals Anti-Persistent Subdiffusion in Cell Extracts". *Entropy* 23(7), S. 892 (2021) (siehe S. 15, 16, 19, 80, 85, 86, 95, 96, 98, 100, 106, 108, 121, 153).
- [79] REBECCA BENELLI und MATTHIAS WEISS: "From sub-to superdiffusion: fractional Brownian motion of membraneless organelles in early *C. elegans* embryos". *New Journal of Physics* 23(6), S. 063072 (2021) (siehe S. 15, 16, 19, 86, 92, 93, 100, 106, 108).
- [80] REBECCA BENELLI und MATTHIAS WEISS: "Probing local chromatin dynamics by tracking telomeres". *Biophysical Journal* 121(14), S. 2684–2692 (2022) (siehe S. 15, 16, 19, 107, 125, 127, 129, 132, 140).
- [81] KONSTANTIN SPECKNER: Dynamische und Topologische Netzwerkeigenschaften des Endoplasmatischen Retikulums. Universität Bayreuth: Masterarbeit, 2017 (siehe S. 15, 16, 19, 22, 34, 35, 38, 39, 44, 49, 75, 150, 152, 201).
- [82] MIKAEL P. BACKLUND, RYAN JOYNER und W. E. MOERNER: "Chromosomal locus tracking with proper accounting of static and dynamic errors". *Physical Review E* 91(6), S. 062716 (2015) (siehe S. 15, 16, 92, 123, 128).

- [83] STEPHANIE C. WEBER, MICHAEL A. THOMPSON, W. E. MOERNER, ANDREW J. SPAKOWITZ und JULIE A. THERIOT: "Analytical Tools to Distinguish the Effects of Localization Error, Confinement, and Medium Elasticity on the Velocity Autocorrelation Function". *Biophysical Journal* 102(11), S. 2443–2450 (2012) (siehe S. 16, 92, 93).
- [84] STEPHANIE C. WEBER, ANDREW J. SPAKOWITZ und JULIE A. THERIOT: "Bacterial Chromosomal Loci Move Subdiffusively through a Viscoelastic Cytoplasm". *Physical Review Letters* 104(23), S. 238102 (2010) (siehe S. 16, 92, 104, 110, 121, 128).
- [85] JIANSHU CAO: "Single molecule tracking of heterogeneous diffusion". *Physical Review E* 63(4),
   S. 041101 (2001) (siehe S. 17, 18, 90, 91).
- [86] MICHAEL H. G. DUITS, YIXUAN LI, SIVA A. VANAPALLI und FRIEDER MUGELE: "Mapping of spatiotemporal heterogeneous particle dynamics in living cells". *Physical Review E* 79(5), S. 051910 (2009) (siehe S. 17, 18, 91).
- [87] DIEGO KRAPF, ENZO MARINARI, RALF METZLER, GLEB OSHANIN, XINRAN XU und ALESSIO SQUARCINI: "Power spectral density of a single Brownian trajectory: what one can and cannot learn from it". New Journal of Physics 20(2), S. 023029 (2018) (siehe S. 18, 19, 94, 95).
- [88] PATRICK FLANDRIN: "On the Spectrum of Fractional Brownian Motions". IEEE Transactions on Information Theory 35(1), S. 197–199 (1989) (siehe S. 18, 94).
- [89] ELDAD KEPTEN, IRENA BRONSHTEIN und YUVAL GARINI: "Ergodicity convergence test suggests telomere motion obeys fractional dynamics". *Physical Review E* 83(4), S. 041919 (2011) (siehe S. 19, 129).
- [90] RONY GRANEK und JOSEPH KLAFTER: "Fractons in Proteins: Can They Lead to Anomalously Decaying Time Autocorrelations?" *Physical Review Letters* 95(9), S. 098106 (2005) (siehe S. 19, 94, 99).

#### Literaturverzeichnis von Teil II: Strukturelle Organisation von ER & ERES

- [10] STEFFEN J. SAHL, STEFAN W. HELL und STEFAN JAKOBS: "Fluorescence nanoscopy in cell biology". Nature Reviews Molecular Cell Biology 18(11), S. 685–701 (2017) (siehe S. 2, 22, 40, 41).
- [11] YICONG WU und HARI SHROFF: "Faster, sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging". *Nature Methods* 15(12), S. 1011–1019 (2018) (siehe S. 2, 41).
- [18] GIA K. VOELTZ, MELISSA M. ROLLS und TOM A. RAPOPORT: "Structural organization of the endoplasmic reticulum". *EMBO reports* 3(10), S. 944–950 (2002) (siehe S. 5, 32, 43, 48).
- [19] DIANNE S. SCHWARZ und MICHAEL D. BLOWER: "The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling". *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(1), S. 79–94 (2016) (siehe S. 5, 32, 43, 45, 48, 76).
- [20] LAURA M. WESTRATE, JASON E. LEE, WILLIAM A. PRINZ und GIA K. VOELTZ: "Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape". Annual Review of Biochemistry 84, S. 791–811 (2015) (siehe S. 6, 22, 32, 35, 36, 39, 43, 45, 53, 73).
- [21] UMA GOYAL und CRAIG BLACKSTONE: "Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2492–2498 (2013) (siehe S. 6, 22, 32, 36, 39, 45, 50, 53).
- [22] HANNAH T. PERKINS und VIKI ALLAN: "Intertwined and Finely Balanced: Endoplasmic Reticulum Morphology, Dynamics, Function, and Diseases". *Cells* 10(9), S. 2341 (2021) (siehe S. 6, 22, 29, 32, 35, 39, 43).
- [23] LARS ELLGAARD und ARI HELENIUS: "Quality control in the endoplasmic reticulum". Nature Reviews Molecular Cell Biology 4(3), S. 181–191 (2003) (siehe S. 6, 48).
- [24] ANNIKA BUDNIK und DAVID J. STEPHENS: "ER exit sites Localization and control of COPII vesicle formation". FEBS Letters 583(23), S. 3796–3803 (2009) (siehe S. 6, 42, 48, 72, 75).
- [25] KAZUO KUROKAWA und AKIHIKO NAKANO: "The ER exit sites are specialized ER zones for the transport of cargo proteins from the ER to the Golgi apparatus". *The Journal of Biochemistry* 165(2), S. 109–114 (2019) (siehe S. 6, 42, 74).
- [26] HELEN HUGHES und DAVID J. STEPHENS: "Assembly, organization, and function of the COPII coat". *Histochemistry and Cell Biology* 129(2), S. 129–151 (2008) (siehe S. 6, 42, 48).
- [27] JENNIFER G. D'ARCANGELO, KYLE R. STAHMER und ELIZABETH A. MILLER: "Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2464–2472 (2013) (siehe S. 6, 42, 48, 72, 75, 131, 135).
- [28] JANINE MCCAUGHEY und DAVID J. STEPHENS: "COPII-dependent ER export in animal cells: adaptation and control for diverse cargo". *Histochemistry and Cell Biology* 150(2), S. 119–131 (2018) (siehe S. 6, 43, 74, 131).
- [29] ISHIER RAOTE und VIVEK MALHOTRA: "Tunnels for Protein Export from the Endoplasmic Reticulum". Annual Review of Biochemistry 90 (2021) (siehe S. 6, 42, 43, 74, 131).

- [30] AUBREY V. WEIGEL, CHI-LUN CHANG, GLEB SHTENGEL, C. SHAN XU, DAVID P. HOFFMAN, MELANIE FREEMAN, NIRMALA IYER, JESSE AARON, SATYA KHUON, JOHN BOGOVIC, WEI QIU, HARALD F. HESS und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER". *Cell* 184(9), S. 2412–2429 (2021) (siehe S. 6, 7, 35, 38, 43, 74, 131).
- [32] AMBER R. ENGLISH und GIA K. VOELTZ: "Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(4), a013227 (2013) (siehe S. 6, 7, 22, 32, 39, 60, 66).
- [33] SEBASTIAN C. J. HELLE, GIL KANFER, KATJA KOLAR, ALEXANDER LANG, AGNÈS H. MICHEL und BENOÎT KORNMANN: "Organization and function of membrane contact sites". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2526–2541 (2013) (siehe S. 6, 7, 60).
- [34] WILLIAM A. PRINZ, ALEXANDRE TOULMAY und TAMAS BALLA: "The functional universe of membrane contact sites". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(1), S. 7–24 (2020) (siehe S. 6, 7, 60, 66).
- [35] HAOXI WU, PEDRO CARVALHO und GIA K. VOELTZ: "Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites". *Science* 361(6401) (2018) (siehe S. 7, 22, 39, 43, 60, 61, 66, 128, 131).
- [36] ASHLEY A. ROWLAND und GIA K. VOELTZ: "Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13(10), S. 607–615 (2012) (siehe S. 7, 66).
- [37] JASON E. LEE, PETER I. CATHEY, HAOXI WU, ROY PARKER und GIA K. VOELTZ: "Endoplasmic reticulum contact sites regulate the dynamics of membraneless organelles". *Science* 367(6477) (2020) (siehe S. 7, 22, 39, 43, 61, 66, 128).
- [39] CHRISTOPHER KING, PRABUDDHA SENGUPTA, ARNOLD Y. SEO und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". Proceedings of the National Academy of Sciences 117(13), S. 7225–7235 (2020) (siehe S. 7, 47, 60–63, 65–67, 74, 75, 80, 107, 127, 131, 138–140).
- [43] JAMES R. PAWLEY: Handbook Of Biological Confocal Microscopy. Bd. 236. Springer Science (Berlin), 2006 (siehe S. 8, 9, 22).
- [44] NILS GUSTAFSSON, SIÂN CULLEY, GEORGE ASHDOWN, DYLAN M. OWEN, PEDRO MATOS PEREIRA und RICARDO HENRIQUES: "Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations". *Nature Communications* 7(1), S. 1–9 (2016) (siehe S. 9–11, 22, 26–28, 39–41, 131, 145).
- [45] SIÂN CULLEY, KALINA L. TOSHEVA, PEDRO MATOS PEREIRA und RICARDO HENRIQUES: "SRRF: Universal live-cell super-resolution microscopy". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 101, S. 74–79 (2018) (siehe S. 9, 10, 22, 25–27, 39, 41, 145).
- [46] THOMAS DERTINGER, RYAN COLYER, GOPAL IYER, SHIMON WEISS und JÖRG ENDERLEIN:
   "Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)". Proceedings of the National Academy of Sciences 106(52), S. 22287–22292 (2009) (siehe S. 9, 11, 41).

- [47] MICKAËL LELEK, MELINA T. GYPARAKI, GERTI BELIU, FLORIAN SCHUEDER, JULIETTE GRIFFIÉ, SULIANA MANLEY, RALF JUNGMANN, MARKUS SAUER, MELIKE LAKADAMYALI und CHRISTOPHE ZIMMER: "Single-molecule localization microscopy". Nature Reviews Methods Primers 1(1), S. 1– 27 (2021) (siehe S. 10, 41).
- [48] JAGADISH SANKARAN, HARIKRUSHNAN BALASUBRAMANIAN, WAI HOH TANG, XUE WEN NG, ADRIAN RÖLLIN und THORSTEN WOHLAND: "Simultaneous spatiotemporal super-resolution and multi-parametric fluorescence microscopy". *Nature Communications* 12(1), S. 1–14 (2021) (siehe S. 10, 22, 25–27, 39, 41).
- [49] RONI EHRLICH, VERENA WULF, ADI HENDLER-NEUMARK, BARAK KAGAN und GILI BISKER: "Super-Resolution Radial Fluctuations (SRRF) nanoscopy in the near infrared". Optics Express 30(2), S. 1130–1142 (2022) (siehe S. 10, 22, 25, 27, 39, 41).
- [50] COLLIN COATES: 'SRRF-Stream': Real-Time Super-Resolution in a Camera. Belfast (Irland): Technical Note (Andor Technology Ltd), 2017 (siehe S. 10, 11, 22, 27, 145).
- [51] CLAUDIA FLORINDO: SRRF-Stream<sup>(+)</sup>: Super-Resolution Microscopy Accessible to All: Fast, reliable & live-cell compatible Super-Resolution. Belfast (Irland): Technical Note (Andor Technology Ltd), 2020 (siehe S. 10, 11, 22, 26–28, 145).
- [53] ROMAIN F. LAINE, KALINA L. TOSHEVA, NILS GUSTAFSSON, ROBERT D. M. GRAY, PEDRO ALMADA, DAVID ALBRECHT, GABRIEL T. RISA, FREDRIK HURTIG, ANN-CHRISTIN LINDÅS, BUZZ BAUM, JASON MERCER, CHRISTOPHE LETERRIER, PEDRO M. PEREIRA, SIÂN CULLEY und RICARDO HENRIQUES: "NanoJ: a high-performance open-source super-resolution microscopy toolbox". Journal of Physics D: Applied Physics 52(16), S. 163001 (2019) (siehe S. 11, 22, 24, 27, 145).
- [70] KONSTANTIN SPECKNER, LORENZ STADLER und MATTHIAS WEISS: "Anomalous dynamics of the endoplasmic reticulum network". *Physical Review E* 98(1), S. 012406 (2018) (siehe S. 15, 19, 22, 29, 33, 35, 38, 43–45, 48, 92, 104, 123).
- [71] LORENZ STADLER, KONSTANTIN SPECKNER und MATTHIAS WEISS: "Diffusion of Exit Sites on the Endoplasmic Reticulum: A Random Walk on a Shivering Backbone". *Biophysical Journal* 115(8), S. 1552–1560 (2018) (siehe S. 15, 17, 19, 22, 29, 34, 35, 38, 43–46, 48, 73, 80, 86, 89, 125, 137).
- [72] LORENZ STADLER: Persönliche Kommunikation unpublizierter Daten. Universität Bayreuth, 2019 (siehe S. 15, 19, 43, 44, 48, 50, 51, 54, 73, 137, 201).
- [81] KONSTANTIN SPECKNER: Dynamische und Topologische Netzwerkeigenschaften des Endoplasmatischen Retikulums. Universität Bayreuth: Masterarbeit, 2017 (siehe S. 15, 16, 19, 22, 34, 35, 38, 39, 44, 49, 75, 150, 152, 201).
- [91] LOTHAR SCHERMELLEH, ALEXIA FERRAND, THOMAS HUSER, CHRISTIAN EGGELING, MARKUS SAUER, OLIVER BIEHLMAIER und GREGOR P. C. DRUMMEN: "Super-resolution microscopy demystified". *Nature Cell Biology* 21(1), S. 72–84 (2019) (siehe S. 22, 40, 41).
- [92] GUILLAUME JACQUEMET, ALEXANDRE F. CARISEY, HELLYEH HAMIDI, RICARDO HENRIQUES und CHRISTOPHE LETERRIER: "The cell biologist's guide to super-resolution microscopy". *Journal* of Cell Science 133(11), jcs240713 (2020) (siehe S. 22, 40, 41).

- [93] YUTING GUO, DI LI, SIWEI ZHANG, YANRUI YANG, JIA-JIA LIU, XINYU WANG, CHONG LIU, DANIEL E. MILKIE, REGAN P. MOORE, U. SERDAR TULU, DANIEL P. KIEHART, JUNJIE HU, JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ, ERIC BETZIG und DONG LI: "Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales". *Cell* 175(5), S. 1430–1442 (2018) (siehe S. 22, 29, 31, 33, 43, 47, 128).
- [94] JONATHON NIXON-ABELL, CHRISTOPHER J. OBARA, AUBREY V. WEIGEL, DONG LI, WESLEY R. LEGANT, C. SHAN XU, H. AMALIA PASOLLI, KIRSTEN HARVEY, HARALD F. HESS, ERIC BETZIG, CRAIG BLACKSTONE und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER". *Science* 354(6311) (2016) (siehe S. 22, 31, 33, 35, 38, 43, 47, 55, 71, 125, 128).
- [95] LENA K. SCHROEDER, ANDREW E. S. BARENTINE, HOLLY MERTA, SARAH SCHWEIGHOFER, YONGDENG ZHANG, DAVID BADDELEY, JOERG BEWERSDORF und SHIRIN BAHMANYAR: "Dynamic nanoscale morphology of the ER surveyed by STED microscopy". *Journal of Cell Biology* 218(1), S. 83–96 (2019) (siehe S. 22, 31, 33, 43, 47, 55, 71).
- [96] PHILIPP STRUNTZ: Quantitative Beobachtung dynamischer Prozesse im frühen C. elegans Embryo. Universität Bayreuth: Dissertation, 2018 (siehe S. 23, 39, 40, 143–146).
- [97] ROBERT P. J. NIEUWENHUIZEN, KEITH A. LIDKE, MARK BATES, DANIELA LEYTON PUIG, DAVID GRÜNWALD, SJOERD STALLINGA und BERND RIEGER: "Measuring image resolution in optical nanoscopy". *Nature Methods* 10(6), S. 557–562 (2013) (siehe S. 24, 25, 30).
- [98] NICCOLO BANTERLE, KHANH HUY BUI, EDWARD A. LEMKE und MARTIN BECK: "Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy". *Journal of Structural Biology* 183(3), S. 363–367 (2013) (siehe S. 24).
- [99] JOSEPH HUFF: "The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution". *Nature Methods* 12(12), S. i–ii (2015) (siehe S. 35, 41).
- [100] SERGEI I. BANNYKH, TONY ROWE und WILLIAM E. BALCH: "The Organization of Endoplasmic Reticulum Export Complexes". *The Journal of Cell Biology* 135(1), S. 19–35 (1996) (siehe S. 35, 42).
- [101] SHULIANG CHEN, PETER NOVICK und SUSAN FERRO-NOVICK: "ER structure and function". Current Opinion in Cell Biology 25(4), S. 428–433 (2013) (siehe S. 36, 45, 53, 73).
- [102] SHULIANG CHEN, TANVI DESAI, JAMES A. MCNEW, PATRICK GERARD, PETER J. NOVICK und SUSAN FERRO-NOVICK: "Lunapark stabilizes nascent three-way junctions in the endoplasmic reticulum". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(2), S. 418–423 (2015) (siehe S. 36–38, 45, 47, 53, 55, 73).
- [103] SONGYU WANG, HANNA TUKACHINSKY, FABIAN B. ROMANO und TOM A. RAPOPORT: "Cooperation of the ER-shaping proteins atlastin, lunapark, and reticulons to generate a tubular membrane network". *eLife* 5, e18605 (2016) (siehe S. 36, 37, 45, 53, 55, 73).
- [104] TOM SHEMESH, ROBIN W. KLEMM, FABIAN B. ROMANO, SONGYU WANG, JOSHUA VAUGHAN, XIAOWEI ZHUANG, HANNA TUKACHINSKY, MICHAEL M. KOZLOV und TOM A. RAPOPORT: "A model for the generation and interconversion of ER morphologies". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(49), E5243–E5251 (2014) (siehe S. 36–38, 45, 55, 73).
- [105] MARK TERASAKI, LAN BO CHEN und KEIGI FUJIWARA: "Microtubules and the Endoplasmic Reticulum are Highly Interdependent Structures". Journal of Cell Biology 103(4), S. 1557–1568 (1986) (siehe S. 36, 51).
- [106] LEI LU, MARK S. LADINSKY und TOM KIRCHHAUSEN: "Cisternal Organization of the Endoplasmic Reticulum during Mitosis". *Molecular Biology of the Cell* 20(15), S. 3471–3480 (2009) (siehe S. 36, 43, 51, 76).
- [107] COLIN. J. R. SHEPPARD: "Super-Resolution in Confocal Imaging". Optik (Stuttgart) 80(2), S. 53-54 (1988) (siehe S. 40, 41).
- [108] CLAUS B. MÜLLER und JÖRG ENDERLEIN: "Image Scanning Microscopy". Physical Review Letters 104(19), S. 198101 (2010) (siehe S. 40).
- [109] OLAF SCHULZ, CHRISTOPH PIEPER, MICHAELA CLEVER, JANINE PFAFF, AIKE RUHLANDT, RALPH H. KEHLENBACH, FRED S. WOUTERS, JÖRG GROSSHANS, GERTRUDE BUNT und JÖRG ENDERLEIN: "Resolution doubling in fluorescence microscopy with confocal spinning-disk image scanning microscopy". Proceedings of the National Academy of Sciences 110(52), S. 21000–21005 (2013) (siehe S. 40).
- [110] SUSAN COX, EDWARD ROSTEN, JAMES MONYPENNY, TIJANA JOVANOVIC-TALISMAN, DYLAN T. BURNETTE, JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ, GARETH E. JONES und RAINER HEINTZMANN:
  "Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics". Nature Methods 9(2), S. 195–200 (2012) (siehe S. 41).
- [111] ERAN A. MUKAMEL, HAZEN BABCOCK und XIAOWEI ZHUANG: "Statistical Deconvolution for Superresolution Fluorescence Microscopy". *Biophysical Journal* 102(10), S. 2391–2400 (2012) (siehe S. 41).
- [112] BENJAMIN S. GLICK: "Integrated self-organization of transitional ER and early Golgi compartments". *Bioessays* 36(2), S. 129–133 (2013) (siehe S. 42, 75).
- [113] MICHIYO OKAMOTO, KAZUO KUROKAWA, KUMI MATSUURA-TOKITA, CHIEKO SAITO, RYOGO HIRATA und AKIHIKO NAKANO: "High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of Cell Science* 125(14), S. 3412–3420 (2012) (siehe S. 42, 71, 74).
- [114] ADAM T. HAMMOND und BENJAMIN S. GLICK: "Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells". *Molecular Biology of the Cell* 11(9), S. 3013–3030 (2000) (siehe S. 42, 43, 48, 50, 52, 73).
- [115] DAGMAR ZEUSCHNER, WILLIE J. C. GEERTS, ELLY VAN DONSELAAR, BRUNO M. HUMBEL, JAN W. SLOT, ABRAHAM J. KOSTER und JUDITH KLUMPERMAN: "Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers". *Nature Cell Biology* 8(4), S. 377–383 (2006) (siehe S. 42, 43).
- [116] KEN SATO: "Sec16 at transitional ER sites: Still a model". *BioEssays* 38(10), S. 940 (2016) (siehe S. 42, 75).

- [117] HELEN HUGHES, ANNIKA BUDNIK, KATY SCHMIDT, KRYSTEN J. PALMER, JUDITH MANTELL, CHRIS NOAKES, ANDREW JOHNSON, DEBORAH A. CARTER, PAUL VERKADE, PETER WATSON und DAVID J. STEPHENS: "Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER". Journal of Cell Science 122(16), S. 2924–2934 (2009) (siehe S. 42, 48, 72).
- [118] KERSTIN D. TILLMANN, VERONIKA REITERER, FRANCESCO BASCHIERI, JULIA HOFFMANN, VALENTINA MILLARTE, MARK A. HAUSER, ARNON MAZZA, NIR ATIAS, DANIEL F. LEGLER, RODED SHARAN, MATTHIAS WEISS und HESSO FARHAN: "Regulation of Sec16 levels and dynamics links proliferation and secretion". *Journal of Cell Science* 128(4), S. 670–682 (2015) (siehe S. 42, 46, 50, 72, 74, 75, 131, 135, 147).
- [119] REBECCA FORSTER, MATTHIAS WEISS, TIMO ZIMMERMANN, EMMANUEL G. REYNAUD, FATIMA VERISSIMO, DAVID J. STEPHENS und RAINER PEPPERKOK: "Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites". *Current Biology* 16(2), S. 173–179 (2006) (siehe S. 42, 46, 50, 72, 74, 131, 135).
- [120] DAVID J. STEPHENS, NATHALIE LIN-MARQ, ALESSANDRA PAGANO, RAINER PEPPERKOK und JEAN-PIERRE PACCAUD: "COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites". *Journal of Cell Science* 113(12), S. 2177–2185 (2000) (siehe S. 42, 50, 72, 135).
- [121] DEVON JENSEN und RANDY SCHEKMAN: "COPII-mediated vesicle formation at a glance". Journal of Cell Science 124(1), S. 1–4 (2011) (siehe S. 42, 48, 131).
- [122] ROSSELLA VENDITTI, CATHAL WILSON und MARIA ANTONIETTA DE MATTEIS: "Exiting the ER: what we know and what we don't". *Trends in Cell Biology* 24(1), S. 9–18 (2014) (siehe S. 42).
- [123] SANTOSH PHUYAL und HESSO FARHAN: "Want to leave the ER? We offer vesicles, tubules, and tunnels". Journal of Cell Biology 220(6), e202104062 (2021) (siehe S. 42).
- [124] JENNIFER PEOTTER, WILLIAM KASBERG, IRYNA PUSTOVA und ANJON AUDHYA: "COPIImediated trafficking at the ER/ERGIC interface". *Traffic* 20(7), S. 491–503 (2019) (siehe S. 42).
- [125] BROOKE J. BEVIS, ADAM T. HAMMOND, CATHERINE A. REINKE und BENJAMIN S. GLICK:
  "De novo formation of transitional ER sites and Golgi structures in *Pichia pastoris*". *Nature Cell Biology* 4(10), S. 750–756 (2002) (siehe S. 42, 45, 71).
- [126] DAVID J. STEPHENS: "De novo formation, fusion and fission of mammalian COPII-coated endoplasmic reticulum exit sites". EMBO reports 4(2), S. 210–217 (2003) (siehe S. 42).
- [127] HESSO FARHAN, MATTHIAS WEISS, KATSUKO TANI, RANDAL J. KAUFMAN und HANS-PETER HAURI: "Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load". *The EMBO Journal* 27(15), S. 2043–2054 (2008) (siehe S. 42, 74, 75, 131).
- [128] ISHIER RAOTE, SONASHREE SAXENA, FELIX CAMPELO und VIVEK MALHOTRA: "TANGO1 marshals the early secretory pathway for cargo export". *Biochimica et Biophysica Acta* 1863(11), S. 183700 (2021) (siehe S. 43, 74).
- [129] MIHARU MAEDA, YUKIE KOMATSU und KOTA SAITO: "Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1". *Developmental Cell* 55(2), S. 237–250 (2020) (siehe S. 43, 75, 76, 131).

- [130] PETER WATSON, REBECCA FORSTER, KRYSTEN J. PALMER, RAINER PEPPERKOK und DAVID J. STEPHENS: "Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin". *Nature Cell Biology* 7(1), S. 48–55 (2005) (siehe S. 43, 52, 73).
- [131] FATIMA VERISSIMO, ALIAKSANDR HALAVATYI, RAINER PEPPERKOK und MATTHIAS WEISS:
   "A microtubule-independent role of p150<sup>glued</sup> in secretory cargo concentration at endoplasmic reticulum exit sites". Journal of Cell Science 128(22), S. 4160–4170 (2015) (siehe S. 43).
- [132] VIJAY GUPTA, KRYSTEN J. PALMER, PETER SPENCE, ANDREW HUDSON und DAVID J. STE-PHENS: "Kinesin-1 (uKHC/KIF5B) is Required for Bidirectional Motility of ER Exit Sites and Efficient ER-to-Golgi Transport". *Traffic* 9(11), S. 1850–1866 (2008) (siehe S. 43, 73).
- [133] NELSON B. COLE, N. SCIAKY, ALEX MAROTTA, JIA SONG und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "Golgi Dispersal during Microtubule Disruption: Regeneration of Golgi Stacks at Peripheral Endoplasmic Reticulum Exit Sites." *Molecular Biology of the Cell* 7(4), S. 631–650 (1996) (siehe S. 43, 50, 73).
- [134] HANNAH T. PERKINS, VICTORIA J. ALLAN und THOMAS A. WAIGH: "Network organisation and the dynamics of tubules in the endoplasmic reticulum". *Scientific Reports* 11(1), S. 1–13 (2021) (siehe S. 43, 75).
- [135] STEPHAN HEINZER, STEFAN WÖRZ, CLAUDIA KALLA, KARL ROHR und MATTHIAS WEISS: "A model for the self-organization of exit sites in the endoplasmic reticulum". *Journal of Cell Science* 121(1), S. 55–64 (2008) (siehe S. 45).
- [136] KONSTANTIN SPECKNER, LORENZ STADLER und MATTHIAS WEISS: "Unscrambling exit site patterns on the endoplasmic reticulum as a quenched demixing process". *Biophysical Journal* 120(12), S. 2532–2542 (2021) (siehe S. 46, 70–72, 75, 131).
- [137] NIHAL ALTAN-BONNET, RACHID SOUGRAT, WEI LIU, ERIK L. SNAPP, THERESA WARD und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "Golgi inheritance in mammalian cells is mediated through endoplasmic reticulum export activities". *Molecular Biology of the Cell* 17(2), S. 990–1005 (2006) (siehe S. 46, 135, 150).
- [138] MAGNUS A. B. AXELSSON und GRAHAM WARREN: "Rapid, endoplasmic reticulum-independent diffusion of the mitotic Golgi haze". *Molecular Biology of the Cell* 15(4), S. 1843–1852 (2004) (siehe S. 47, 59, 137).
- [139] STUART BERG, DOMINIK KUTRA, THORBEN KROEGER, CHRISTOPH N. STRAEHLE, BERNHARD X. KAUSLER, CARSTEN HAUBOLD, MARTIN SCHIEGG, JANEZ ALES, THORSTEN BEIER, MARKUS RUDY, KEMAL EREN, JAIME I. CERVANTES, BUOTE XU, FYNN BEUTTENMUELLER, ADRIAN WOLNY, CHONG ZHANG, ULLRICH KOETHE, FRED A. HAMPRECHT und ANNA KRESHUK: "Ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis". Nature Methods, S. 1–7 (Sep. 2019) (siehe S. 47, 147).
- [140] MATLAB: Version 9.5.0.1298439 (R2018b Update 7). Natick (MA): The MathWorks Inc., 2018 (siehe S. 47, 142, 147, 152).

- [141] JOHANNES SCHINDELIN, IGNACIO ARGANDA-CARRERAS, ERWIN FRISE, VERENA KAYNIG, MARK LONGAIR, TOBIAS PIETZSCH, STEPHAN PREIBISCH, CURTIS RUEDEN, STEPHAN SAALFELD, BENJAMIN SCHMID, JEAN-YVES TINEVEZ, DANIEL JAMES WHITE, VOLKER HARTENSTEIN, KEVIN ELICEIRI, PAVEL TOMANCAK und ALBERT CARDONA: "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis". Nature Methods 9(7), S. 676–682 (2012) (siehe S. 47, 79, 145, 147, 151).
- [142] PETER WATSON, ANNA K. TOWNLEY, PRATYUSHA KOKA, KRYSTEN J. PALMER und DAVID J. STEPHENS: "Sec16 Defines Endoplasmic Reticulum Exit Sites and is Required for Secretory Cargo Export in Mammalian Cells". *Traffic* 7(12), S. 1678–1687 (2006) (siehe S. 48, 72, 135).
- [143] XIN ZHOU, YU HE, XIAOFANG HUANG, YUTING GUO, DONG LI und JUNJIE HU: "Reciprocal regulation between lunapark and atlastin facilitates ER three-way junction formation". Protein & Cell 10(7), S. 510–525 (2019) (siehe S. 53).
- [144] HORIZON<sup>TM</sup> INSPIRED CELL SOLUTIONS: Effective controls for RNA interference (RNAi) experiments using siRNA. Cambridge (United Kingdom): Technical Note (Horizon Discovery), 2017 (siehe S. 54, 140).
- [145] CHRISTOPHER KING, PRABUDDHA SENGUPTA, ARNOLD SEO und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". *bioRxiv*, S. 707505 (2019) (siehe S. 60, 62, 138).
- [146] KANDICE R. LEVENTAL und ILYA LEVENTAL: "Giant Plasma Membrane Vesicles: Models for Understanding Membrane Organization". *Current Topics in Membranes* 75, S. 25–57 (2015) (siehe S. 60).
- [147] BERRAK UGUR und DRAGOMIR MILOVANOVIC: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". *preLights: Preprint highlights for biology* (2019) (siehe S. 60).
- [148] NIRMALYA BAG, MERAJ RAMEZANI, DAVID A. HOLOWKA und BARBARA A. BAIRD: "Bringing light to ER contacts and a new phase in organelle communication". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(18), S. 9668–9670 (2020) (siehe S. 60, 65, 128).
- [149] JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: Persönliche Kommunikation (Quantitative BioImaging Conference). University of Oxford, 2020 (siehe S. 62, 139, 140).
- [150] MATTHEW S. TURNER, PIERRE SENS und NICHOLAS D. SOCCI: "Nonequilibrium Raftlike Membrane Domains under Continuous Recycling". *Physical Review Letters* 95(16), S. 168301 (2005) (siehe S. 70).
- [151] ANNIKA BUDNIK, KATE J. HEESOM und DAVID J. STEPHENS: "Characterization of human Sec16B: indications of specialized, non-redundant functions". *Scientific Reports* 1(1), S. 1–10 (2011) (siehe S. 72).
- [152] PENNY K. DAVIS, ALAN HO und STEVEN F. DOWDY: "Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells". *Biotechniques* 30(6), S. 1322–1331 (2001) (siehe S. 73, 137).
- [153] FREDERIQUE QUIGNON, LORENE ROZIER, ANNE-MARIE LACHAGES, ANNE BIETH, MARCELLA SIMILI und MICHELLE DEBATISSE: "Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells". Oncogene 26(2), S. 165–172 (2007) (siehe S. 73).

- [154] MIHARU MAEDA, TOSHIAKI KATADA und KOTA SAITO: "TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion". *Journal of Cell Biology* 216(6), S. 1731–1743 (2017) (siehe S. 75).
- [155] ZHUOMEI LU, DONALD JOSEPH, ELISABETH BUGNARD, KRISTIEN JM ZAAL und EVELYN RALSTON: "Golgi Complex Reorganization during Muscle Differentiation: Visualization in Living Cells and Mechanism". *Molecular Biology of the Cell* 12(4), S. 795–808 (2001) (siehe S. 76, 131).

#### Literaturverzeichnis von Teil III: Dynamik nuklearer Aktinfilamente

- [12] ALEXANDRA ZIDOVSKA: "The rich inner life of the cell nucleus: dynamic organization, active flows, and emergent rheology". *Biophysical Reviews*, S. 1–14 (2020) (siehe S. 5, 125, 129).
- [13] SALMAN F. BANANI, HYUN O. LEE, ANTHONY A. HYMAN und MICHAEL K. ROSEN: "Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(5), S. 285–298 (2017) (siehe S. 5, 125, 126, 129).
- [14] JAN LAMMERDING: "Mechanics of the Nucleus". Comprehensive Physiology 1(2), S. 783 (2011) (siehe S. 5, 125, 127, 129, 132).
- [15] SVENJA ULFERTS, BINA PRAJAPATI, ROBERT GROSSE und MARIA K. VARTIAINEN: "Emerging Properties and Functions of Actin and Actin Filaments Inside the Nucleus". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13(3), a040121 (2021) (siehe S. 5, 78, 127, 132).
- [16] VERENA HURST, KENJI SHIMADA und SUSAN M. GASSER: "Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair". Trends in Cell Biology 29(6), S. 462–476 (2019) (siehe S. 5, 78, 81, 111, 126, 129, 132).
- [17] CHRISTOPHER PATRICK CARIDI, MATTHIAS PLESSNER, ROBERT GROSSE und IRENE CHIOLO: "Nuclear actin filaments in DNA repair dynamics". *Nature Cell Biology* 21(9), S. 1068–1077 (2019) (siehe S. 5, 78, 79, 126, 129, 132).
- [35] HAOXI WU, PEDRO CARVALHO und GIA K. VOELTZ: "Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites". *Science* 361(6401) (2018) (siehe S. 7, 22, 39, 43, 60, 61, 66, 128, 131).
- [37] JASON E. LEE, PETER I. CATHEY, HAOXI WU, ROY PARKER und GIA K. VOELTZ: "Endoplasmic reticulum contact sites regulate the dynamics of membraneless organelles". *Science* 367(6477) (2020) (siehe S. 7, 22, 39, 43, 61, 66, 128).
- [39] CHRISTOPHER KING, PRABUDDHA SENGUPTA, ARNOLD Y. SEO und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". Proceedings of the National Academy of Sciences 117(13), S. 7225–7235 (2020) (siehe S. 7, 47, 60–63, 65–67, 74, 75, 80, 107, 127, 131, 138–140).
- [41] KAMILLA NORREGAARD, RALF METZLER, CHRISTINE M. RITTER, KIRSTINE BERG-SØRENSEN und LENE B. ODDERSHEDE: "Manipulation and Motion of Organelles and Single Molecules in Living Cells". *Chemical Reviews* 117(5), S. 4342–4375 (2017) (siehe S. 8, 15, 19, 84, 103, 127, 132).
- [54] IGOR M. SOKOLOV: "Models of anomalous diffusion in crowded environments". Soft Matter 8(35), S. 9043–9052 (2012) (siehe S. 12, 13, 122).
- [55] FELIX HÖFLING und THOMAS FRANOSCH: "Anomalous transport in the crowded world of biological cells". *Reports on Progress in Physics* 76(4), S. 046602 (2013) (siehe S. 12–15, 18, 19, 84, 103, 122).
- [56] RALF METZLER, JAE-HYUNG JEON, ANDREY G. CHERSTVY und ELI BARKAI: "Anomalous diffusion models and their properties: non-stationarity, non-ergodicity, and ageing at the centenary of single particle tracking". *Physical Chemistry Chemical Physics* 16(44), S. 24128–24164 (2014) (siehe S. 12–16, 84, 103, 122).

- [57] MICHAEL J. SAXTON und KEN JACOBSON: "Single-Particle Tracking: Applications to Membrane Dynamics". Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 26(1), S. 373–399 (1997) (siehe S. 13, 14, 84).
- [58] BO WANG, JAMES KUO, SUNG CHUL BAE und STEVE GRANICK: "When Brownian diffusion is not Gaussian". Nature Materials 11(6), S. 481–485 (2012) (siehe S. 14, 17, 88, 90).
- [59] RALF METZLER: "Gaussianity Fair: The Riddle of Anomalous yet Non-Gaussian Diffusion". Biophysical Journal 112(3), S. 413 (2017) (siehe S. 14, 17, 88, 90).
- [60] THOMAS J. LAMPO, STELLA STYLIANIDOU, MIKAEL P. BACKLUND, PAUL A. WIGGINS und ANDREW J. SPAKOWITZ: "Cytoplasmic RNA-Protein Particles Exhibit Non-Gaussian Subdiffusive Behavior". *Biophysical Journal* 112(3), S. 532–542 (2017) (siehe S. 14, 17, 18, 88–92, 104, 110, 122, 123, 128).
- [61] AUBREY V. WEIGEL, BLAIR SIMON, MICHAEL M. TAMKUN und DIEGO KRAPF: "Ergodic and nonergodic processes coexist in the plasma membrane as observed by single-molecule tracking". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(16), S. 6438–6443 (2011) (siehe S. 14, 86, 122).
- [62] WEI HE, HAO SONG, YUN SU, LING GENG, BRUCE J. ACKERSON, H. B. PENG und PENGER TONG: "Dynamic heterogeneity and non-Gaussian statistics for acetylcholine receptors on live cell membrane". *Nature Communications* 7(1), S. 1–8 (2016) (siehe S. 14, 88, 90, 122).
- [63] ASMAA A. SADOON und YONG WANG: "Anomalous, non-Gaussian, viscoelastic, and agedependent dynamics of histonelike nucleoid-structuring proteins in live *Escherichia coli*". *Physical Review E* 98(4), S. 042411 (2018) (siehe S. 14, 88, 122).
- [64] PATRICK WITZEL, MARIA GÖTZ, YANN LANOISELÉE, THOMAS FRANOSCH, DENIS S. GREBENKOV und DORIS HEINRICH: "Heterogeneities Shape Passive Intracellular Transport". *Biophysical Journal* 117(2), S. 203–213 (2019) (siehe S. 14, 19, 88, 92).
- [65] MYKYTA V. CHUBYNSKY und GARY W. SLATER: "Diffusing Diffusivity: A Model for Anomalous, yet Brownian, Diffusion". *Physical Review Letters* 113(9), S. 098302 (2014) (siehe S. 14, 17, 88).
- [66] ALEKSEI V. CHECHKIN, FLAVIO SENO, RALF METZLER und IGOR M. SOKOLOV: "Brownian yet Non-Gaussian Diffusion: From Superstatistics to Subordination of Diffusing Diffusivities". *Physical Review X* 7(2), S. 021002 (2017) (siehe S. 14, 17, 88).
- [67] CARLO MANZO und MARIA F. GARCIA-PARAJO: "A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights". *Reports on Progress in Physics* 78(12), S. 124601 (2015) (siehe S. 14, 19, 84, 128).
- [68] HAO SHEN, LAWRENCE J. TAUZIN, RASHAD BAIYASI, WENXIAO WANG, NICHOLAS MORINGO, BO SHUANG und CHRISTY F. LANDES: "Single Particle Tracking: From Theory to Biophysical Applications". *Chemical Reviews* 117(11), S. 7331–7376 (2017) (siehe S. 14, 19, 84, 128).
- [69] LORENZ STADLER und MATTHIAS WEISS: "Non-equilibrium forces drive the anomalous diffusion of telomeres in the nucleus of mammalian cells". New Journal of Physics 19(11), S. 113048 (2017) (siehe S. 15, 19, 86, 103, 104, 106, 107, 110, 121, 123, 125–128).
- [70] KONSTANTIN SPECKNER, LORENZ STADLER und MATTHIAS WEISS: "Anomalous dynamics of the endoplasmic reticulum network". *Physical Review E* 98(1), S. 012406 (2018) (siehe S. 15, 19, 22, 29, 33, 35, 38, 43–45, 48, 92, 104, 123).

- [71] LORENZ STADLER, KONSTANTIN SPECKNER und MATTHIAS WEISS: "Diffusion of Exit Sites on the Endoplasmic Reticulum: A Random Walk on a Shivering Backbone". *Biophysical Journal* 115(8), S. 1552–1560 (2018) (siehe S. 15, 17, 19, 22, 29, 34, 35, 38, 43–46, 48, 73, 80, 86, 89, 125, 137).
- [73] MATTHIAS WEISS: "Resampling single-particle tracking data eliminates localization errors and reveals proper diffusion anomalies". *Physical Review E* 100(4), S. 042125 (2019) (siehe S. 15, 19, 87, 97, 119, 120).
- [74] DIEGO KRAPF, NILS LUKAT, ENZO MARINARI, RALF METZLER, GLEB OSHANIN, CHRISTINE SELHUBER-UNKEL, ALESSIO SQUARCINI, LORENZ STADLER, MATTHIAS WEISS und XINRAN XU: "Spectral Content of a Single non-Brownian Trajectory". *Physical Review X* 9(1), S. 011019 (2019) (siehe S. 15, 18, 19, 94–96).
- [75] ADAL SABRI, XINRAN XU, DIEGO KRAPF und MATTHIAS WEISS: "Elucidating the origin of heterogeneous anomalous diffusion in the cytoplasm of mammalian cells". *Physical Review Letters* 125(5), S. 058101 (2020) (siehe S. 15, 16, 18, 19, 85, 87, 88, 91, 98, 104, 126, 128, 137, 139).
- [76] ADAL SABRI: Elucidating the emergence of heterogeneous motion in living matter from the microto the nanoscale. Universität Bayreuth: Dissertation, 2021 (siehe S. 15, 16, 18, 19, 85, 87, 91, 119, 120, 122, 126, 128, 137, 139, 152).
- [78] KONSTANTIN SPECKNER und MATTHIAS WEISS: "Single-Particle Tracking Reveals Anti-Persistent Subdiffusion in Cell Extracts". *Entropy* 23(7), S. 892 (2021) (siehe S. 15, 16, 19, 80, 85, 86, 95, 96, 98, 100, 106, 108, 121, 153).
- [79] REBECCA BENELLI und MATTHIAS WEISS: "From sub-to superdiffusion: fractional Brownian motion of membraneless organelles in early *C. elegans* embryos". *New Journal of Physics* 23(6), S. 063072 (2021) (siehe S. 15, 16, 19, 86, 92, 93, 100, 106, 108).
- [80] REBECCA BENELLI und MATTHIAS WEISS: "Probing local chromatin dynamics by tracking telomeres". *Biophysical Journal* 121(14), S. 2684–2692 (2022) (siehe S. 15, 16, 19, 107, 125, 127, 129, 132, 140).
- [82] MIKAEL P. BACKLUND, RYAN JOYNER und W. E. MOERNER: "Chromosomal locus tracking with proper accounting of static and dynamic errors". *Physical Review E* 91(6), S. 062716 (2015) (siehe S. 15, 16, 92, 123, 128).
- [83] STEPHANIE C. WEBER, MICHAEL A. THOMPSON, W. E. MOERNER, ANDREW J. SPAKOWITZ und JULIE A. THERIOT: "Analytical Tools to Distinguish the Effects of Localization Error, Confinement, and Medium Elasticity on the Velocity Autocorrelation Function". *Biophysical Journal* 102(11), S. 2443–2450 (2012) (siehe S. 16, 92, 93).
- [84] STEPHANIE C. WEBER, ANDREW J. SPAKOWITZ und JULIE A. THERIOT: "Bacterial Chromosomal Loci Move Subdiffusively through a Viscoelastic Cytoplasm". *Physical Review Letters* 104(23), S. 238102 (2010) (siehe S. 16, 92, 104, 110, 121, 128).
- [85] JIANSHU CAO: "Single molecule tracking of heterogeneous diffusion". *Physical Review E* 63(4),
   S. 041101 (2001) (siehe S. 17, 18, 90, 91).
- [86] MICHAEL H. G. DUITS, YIXUAN LI, SIVA A. VANAPALLI und FRIEDER MUGELE: "Mapping of spatiotemporal heterogeneous particle dynamics in living cells". *Physical Review E* 79(5), S. 051910 (2009) (siehe S. 17, 18, 91).

- [87] DIEGO KRAPF, ENZO MARINARI, RALF METZLER, GLEB OSHANIN, XINRAN XU und ALESSIO SQUARCINI: "Power spectral density of a single Brownian trajectory: what one can and cannot learn from it". New Journal of Physics 20(2), S. 023029 (2018) (siehe S. 18, 19, 94, 95).
- [88] PATRICK FLANDRIN: "On the Spectrum of Fractional Brownian Motions". IEEE Transactions on Information Theory 35(1), S. 197–199 (1989) (siehe S. 18, 94).
- [89] ELDAD KEPTEN, IRENA BRONSHTEIN und YUVAL GARINI: "Ergodicity convergence test suggests telomere motion obeys fractional dynamics". *Physical Review E* 83(4), S. 041919 (2011) (siehe S. 19, 129).
- [90] RONY GRANEK und JOSEPH KLAFTER: "Fractons in Proteins: Can They Lead to Anomalously Decaying Time Autocorrelations?" *Physical Review Letters* 95(9), S. 098106 (2005) (siehe S. 19, 94, 99).
- [93] YUTING GUO, DI LI, SIWEI ZHANG, YANRUI YANG, JIA-JIA LIU, XINYU WANG, CHONG LIU, DANIEL E. MILKIE, REGAN P. MOORE, U. SERDAR TULU, DANIEL P. KIEHART, JUNJIE HU, JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ, ERIC BETZIG und DONG LI: "Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales". *Cell* 175(5), S. 1430–1442 (2018) (siehe S. 22, 29, 31, 33, 43, 47, 128).
- [94] JONATHON NIXON-ABELL, CHRISTOPHER J. OBARA, AUBREY V. WEIGEL, DONG LI, WESLEY R. LEGANT, C. SHAN XU, H. AMALIA PASOLLI, KIRSTEN HARVEY, HARALD F. HESS, ERIC BETZIG, CRAIG BLACKSTONE und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER". *Science* 354(6311) (2016) (siehe S. 22, 31, 33, 35, 38, 43, 47, 55, 71, 125, 128).
- [141] JOHANNES SCHINDELIN, IGNACIO ARGANDA-CARRERAS, ERWIN FRISE, VERENA KAYNIG, MARK LONGAIR, TOBIAS PIETZSCH, STEPHAN PREIBISCH, CURTIS RUEDEN, STEPHAN SAALFELD, BENJAMIN SCHMID, JEAN-YVES TINEVEZ, DANIEL JAMES WHITE, VOLKER HARTENSTEIN, KEVIN ELICEIRI, PAVEL TOMANCAK und ALBERT CARDONA: "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis". Nature Methods 9(7), S. 676–682 (2012) (siehe S. 47, 79, 145, 147, 151).
- [148] NIRMALYA BAG, MERAJ RAMEZANI, DAVID A. HOLOWKA und BARBARA A. BAIRD: "Bringing light to ER contacts and a new phase in organelle communication". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(18), S. 9668–9670 (2020) (siehe S. 60, 65, 128).
- [156] ROBERT GROSSE und MARIA K. VARTIAINEN: "To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(11), S. 693–697 (2013) (siehe S. 78).
- [157] ROBERT INSALL: "Actin in 2021". Current Biology 31(10), R496–R498 (2021) (siehe S. 78, 127).
- [158] DANIEL J. KELPSCH und TINA L. TOOTLE: "Nuclear Actin: From Discovery to Function". The Anatomical Record 301(12), S. 1999–2013 (2018) (siehe S. 78).
- [159] LEONID SEREBRYANNYY und PRIMAL de LANEROLLE: "Nuclear actin: The new normal". Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 821, S. 111714 (2020) (siehe S. 78).
- [160] THNA VIITA und MARIA K. VARTIAINEN: "From Cytoskeleton to Gene Expression: Actin in the Nucleus". The Actin Cytoskeleton, S. 311–329 (2016) (siehe S. 78).

- [161] MATTHIAS PLESSNER und ROBERT GROSSE: "Dynamizing nuclear actin filaments". Current Opinion in Cell Biology 56, S. 1–6 (2019) (siehe S. 78, 126, 127, 132).
- [162] IVAN A. OLAVE, SAMARA L. RECK-PETERSON und GERALD R. CRABTREE: "Nuclear Actin and Actin-Related Proteins in Chromatin Remodeling". Annual Review of Biochemistry 71(1), S. 755–781 (2002) (siehe S. 78, 126, 132).
- [163] BRITTANY J. BELIN, TERRI LEE und R. DYCHE MULLINS: "DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair". *eLife* 4, e07735 (2015) (siehe S. 78, 81–83, 110, 111, 118, 126, 129).
- [164] CHETAN C. RAWAL, CHRISTOPHER P. CARIDI und IRENE CHIOLO: "Actin' between phase separated domains for heterochromatin repair". DNA Repair 81, S. 102646 (2019) (siehe S. 78, 79).
- [165] CHRISTIAN BAARLINK, MATTHIAS PLESSNER, ALICE SHERRARD, KOHTARO MORITA, SHINJI MISU, DAVID VIRANT, EVA-MARIA KLEINSCHNITZ, ROBERT HARNIMAN, DOMINIC ALIBHAI, STEFAN BAUMEISTER, KEI MIYAMOTO, ULRIKE ENDESFELDER, ABDERRAHMANE KAIDI und ROBERT GROSSE: "A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization". Nature Cell Biology 19(12), S. 1389–1399 (2017) (siehe S. 78, 126, 127).
- [166] MATTHIAS PLESSNER, MICHAEL MELAK, PILAR CHINCHILLA, CHRISTIAN BAARLINK und ROBERT GROSSE: "Nuclear F-actin Formation and Reorganization upon Cell Spreading". Journal of Biological Chemistry 290(18), S. 11209–11216 (2015) (siehe S. 78, 126, 127).
- [167] CHRISTIAN BAARLINK, HAICUI WANG und ROBERT GROSSE: "Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL". *Science* 340(6134), S. 864–867 (2013) (siehe S. 78, 126, 127).
- [168] MARIA K. VARTIAINEN, SEBASTIAN GUETTLER, BANAFSHE LARIJANI und RICHARD TREISMAN: "Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL". Science 316(5832), S. 1749–1752 (2007) (siehe S. 78, 126, 132).
- [169] BRITTANY J. BELIN, BETH A. CIMINI, ELIZABETH H. BLACKBURN und R. DYCHE MULLINS:
   "Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei". *Molecular Biology of the Cell* 24(7), S. 982–994 (2013) (siehe S. 78, 79, 81–83, 103, 111, 118, 132, 135, 151).
- [170] CHRISTIAN BAARLINK, HAICUI WANG und ROBERT GROSSE: "Nuclear Actin Network Assembly by Formins Regulates the SRF Coactivator MAL". *Science* 340(6134), S. 864–867 (2013) (siehe S. 78, 81).
- [171] MATTHIAS PLESSNER, MICHAEL MELAK, PILAR CHINCHILLA, CHRISTIAN BAARLINK und ROBERT GROSSE: "Nuclear F-actin Formation and Reorganization upon Cell Spreading". Journal of Biological Chemistry 290(18), S. 11209–11216 (2015) (siehe S. 78, 81).
- [172] MICHAEL MELAK, MATTHIAS PLESSNER und ROBERT GROSSE: "Actin Visualization at a Glance". Journal of Cell Science 130(3), S. 525–530 (2017) (siehe S. 78, 81).
- [173] CHRISTOPHER P. CARIDI, CARLA D'AGOSTINO, TAEHYUN RYU, GRZEGORZ ZAPOTOCZNY, LAETITIA DELABAERE, XIAO LI, VARANDT Y. KHODAVERDIAN, NUNO AMARAL, EMILY LIN, ALESANDRA R. RAU und IRENE CHIOLO: "Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks". *Nature* 559(7712), S. 54–60 (2018) (siehe S. 78, 126, 132).

- [174] ASSAF AMITAI, ANDREW SEEBER, SUSAN M. GASSER und DAVID HOLCMAN: "Visualization of Chromatin Decompaction and Break Site Extrusion as Predicted by Statistical Polymer Modeling of Single-Locus Trajectories". *Cell Reports* 18(5), S. 1200–1214 (2017) (siehe S. 78, 126, 132).
- [175] JONAH A. EATON und ALEXANDRA ZIDOVSKA: "Structural and Dynamical Signatures of Local DNA Damage in Live Cells". *Biophysical Journal* 118(9), S. 2168–2180 (2020) (siehe S. 78, 132).
- [176] HYUNG-SONG NAM und ROBERT BENEZRA: "High Levels of Id1 Expression Define B1 Type Adult Neural Stem Cells". Cell Stem Cell 5(5), S. 515–526 (2009) (siehe S. 79, 135).
- [177] IBIDI GMBH: p<sup>CAG</sup>-LifeAct<sup>®</sup>-TagGFP2 / -TagRFP Protein: Actin Visualization in Living Cells, Version 3.0 (2016-06-08). Martinsried (DE), 2016 (siehe S. 79, 135).
- [178] IBIDI GMBH: p<sup>CMV</sup>-LifeAct<sup>®</sup>-TagGFP2 / -TagRFP Protein: Actin Visualization in Living Cells, Version 3.0 (2016-06-08). Martinsried (DE), 2016 (siehe S. 79, 135).
- [179] JEAN-YVES TINEVEZ, NICK PERRY, JOHANNES SCHINDELIN, GENEVIEVE M. HOOPES, GREGORY D. REYNOLDS, EMMANUEL LAPLANTINE, SEBASTIAN Y. BEDNAREK, SPENCER L. SHORTE und KEVIN W. ELICEIRI: "TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking". *Methods* 115, S. 80–90 (2017) (siehe S. 79, 151, 152).
- [180] KARSTEN RICHTER, MICHELLE NESSLING und PETER LICHTER: "Experimental evidence for the influence of molecular crowding on nuclear architecture". *Journal of Cell Science* 120(9), S. 1673–1680 (2007) (siehe S. 80, 109, 129, 140).
- [181] DOUGLAS C. MARCHION, ELONA BICAKU, ADIL I. DAUD, DANIEL M. SULLIVAN und PAMELA N. MUNSTER: "Valproic Acid Alters Chromatin Structure by Regulation of Chromatin Modulation Proteins". *Cancer research* 65(9), S. 3815–3822 (2005) (siehe S. 80, 110, 138).
- [182] KATALIN FEJES TÓTH, TOBIAS A. KNOCH, MALTE WACHSMUTH, MONIKA FRANK-STÖHR, MI-CHAEL STÖHR, CHRISTIAN P. BACHER, GABRIELE MÜLLER und KARSTEN RIPPE: "Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin". Journal of Cell Science 117(18), S. 4277–4287 (2004) (siehe S. 80, 110, 138).
- [183] DIRK P. KROESE und ZDRAVKO I. BOTEV: "Spatial process simulation". Stochastic Geometry, Spatial Statistics and Random Fields. Springer, 2015, S. 369–404 (siehe S. 80, 152).
- [184] JOANNA JANCZURA, MICHAŁ BALCEREK, KRZYSZTOF BURNECKI, ADAL SABRI, MATTHIAS WEISS und DIEGO KRAPF: "Identifying heterogeneous diffusion states in the cytoplasm by a hidden Markov model". New Journal of Physics 23(5), S. 053018 (2021) (siehe S. 98, 122, 126).
- [185] AURÉLIEN BANCAUD, SÉBASTIEN HUET, NATHALIE DAIGLE, JULIEN MOZZICONACCI, JOËL BEAUDOUIN und JAN ELLENBERG: "Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin". *The EMBO Journal* 28(24), S. 3785–3798 (2009) (siehe S. 103, 125).
- [186] DANIEL S. W. LEE, NED S. WINGREEN und CLIFFORD P. BRANGWYNNE: "Chromatin mechanics dictates subdiffusion and coarsening dynamics of embedded condensates". *Nature Physics* 17(4), S. 531–538 (2021) (siehe S. 103, 122, 125).
- [187] MALTE WACHSMUTH, WALDEMAR WALDECK und JÖRG LANGOWSKI: "Anomalous Diffusion of Fluorescent Probes Inside Living Cell Nuclei Investigated by Spatially-Resolved Fluorescence Correlation Spectroscopy". Journal of Molecular Biology 298(4), S. 677–689 (2000) (siehe S. 103, 125).

- [188] CHAD M. HOBSON, E. TIMOTHY O'BRIEN III, MICHAEL R. FALVO und RICHARD SUPERFINE: "Combined Selective Plane Illumination Microscopy and FRAP Maps Intranuclear Diffusion of NLS-GFP". *Biophysical Journal* 119(3), S. 514–524 (2020) (siehe S. 103).
- [189] GERNOT GUIGAS, CLAUDIA KALLA und MATTHIAS WEISS: "Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells". *Biophysical Journal* 93(1), S. 316–323 (2007) (siehe S. 103, 125, 126).
- [190] IRENA BRONSHTEIN, YONATAN ISRAEL, ELDAD KEPTEN, SABINE MAI, YARON SHAV-TAL, ELI BARKAI und YUVAL GARINI: "Transient Anomalous Diffusion of Telomeres in the Nucleus of Mammalian Cells". *Physical Review Letters* 103(1), S. 018102 (2009) (siehe S. 103, 104, 107, 122, 125, 126, 129, 132).
- [191] IRENA BRONSHTEIN, ELDAD KEPTEN, ITAMAR KANTER, SHIRLEY BEREZIN, MOSHE LINDNER, ABENA B. REDWOOD, SABINE MAI, SUSANA GONZALO, ROLAND FOISNER, YARON SHAV-TAL und YUVAL GARINI: "Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior". Nature Communications 6(1), S. 1–9 (2015) (siehe S. 103, 108, 122, 125, 127–129, 132).
- [192] ALEXANDRA ZIDOVSKA, DAVID A. WEITZ und TIMOTHY J. MITCHISON: "Micron-scale coherence in interphase chromatin dynamics". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(39), S. 15555–15560 (2013) (siehe S. 103, 104, 108, 126, 128, 132).
- [193] CHIEN-HUI CHUANG, ANNE E. CARPENTER, BEATA FUCHSOVA, TEREZINA JOHNSON, PRIMAL de LANEROLLE und ANDREW S. BELMONT: "Long-range directional movement of an interphase chromosome site". *Current Biology* 16(8), S. 825–831 (2006) (siehe S. 104, 126).
- [194] JIAH KIM, KYU YOUNG HAN, NIMISH KHANNA, TAEKJIP HA und ANDREW S. BELMONT: "Nuclear speckle fusion via long-range directional motion regulates speckle morphology after transcriptional inhibition". *Journal of Cell Science* 132(8), jcs226563 (2019) (siehe S. 104, 126).
- [195] MARINA BARRETO FELISBINO, WIRLA M. S. C. TAMASHIRO und MARIA LUIZA S. MELLO: "Chromatin Remodeling, Cell Proliferation and Cell Death in Valproic Acid-Treated HeLa Cells". *PLOS ONE* 6(12), e29144 (2011) (siehe S. 110, 138).
- [196] CHRISTINA M. CARAGINE, SHANNON C. HALEY und ALEXANDRA ZIDOVSKA: "Nucleolar dynamics and interactions with nucleoplasm in living cells". *eLife* 8, e47533 (2019) (siehe S. 110, 129, 138).
- [197] ANDREW D. STEPHENS, PATRICK Z. LIU, EDWARD J. BANIGAN, LUAY M. ALMASSALHA, VADIM BACKMAN, STEPHEN A. ADAM, ROBERT D. GOLDMAN und JOHN F. MARKO: "Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins". *Molecular Biology of the Cell* 29(2), S. 220–233 (2018) (siehe S. 114, 129, 138).
- [198] DOMINIQUE ERNST, MARCEL HELLMANN, JÜRGEN KÖHLER und MATTHIAS WEISS: "Fractional Brownian motion in crowded fluids". Soft Matter 8(18), S. 4886–4889 (2012) (siehe S. 121, 125).
- [199] ANAT VIVANTE, IRENA BRONSHTEIN und YUVAL GARINI: "Chromatin Viscoelasticity Measured by Local Dynamic Analysis". *Biophysical Journal* 118(9), S. 2258–2267 (2020) (siehe S. 122, 125).
- [200] FRANCISCO J. IBORRA: "Can visco-elastic phase separation, macromolecular crowding and colloidal physics explain nuclear organisation?" *Theoretical Biology and Medical Modelling* 4(1), S. 1–11 (2007) (siehe S. 122, 125).

- [201] MICHAEL J. SAXTON: "A Biological Interpretation of Transient Anomalous Subdiffusion: I. Qualitative Model". *Biophysical Journal* 92(4), S. 1178–1191 (2007) (siehe S. 122).
- [202] MICHAEL J. SAXTON: "Diffusion of DNA-binding Species in the Nucleus: A Transient Anomalous Subdiffusion Model". *Biophysical Journal* 118(9), S. 2151–2167 (2020) (siehe S. 122).
- [203] JAE-HYUNG JEON, ALEKSEI V. CHECHKIN und RALF METZLER: "Scaled Brownian motion: a paradoxical process with a time dependent diffusivity for the description of anomalous diffusion". *Physical Chemistry Chemical Physics* 16(30), S. 15811–15817 (2014) (siehe S. 122).
- [204] FELIX THIEL und IGOR M. SOKOLOV: "Scaled Brownian motion as a mean-field model for continuous-time random walks". *Physical Review E* 89(1), S. 012115 (2014) (siehe S. 122).
- [205] MATTHIAS WEISS, HITOSHI HASHIMOTO und TOMMY NILSSON: "Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy". *Biophysical Journal* 84(6), S. 4043–4052 (2003) (siehe S. 125).
- [206] MATTHIAS WEISS, MARKUS ELSNER, FREDRIK KARTBERG und TOMMY NILSSON: "Anomalous Subdiffusion is a Measure for Cytoplasmic Crowding in Living Cells". *Biophysical Journal* 87(5), S. 3518–3524 (2004) (siehe S. 125).
- [207] DANIEL S. BANKS und CÉCILE FRADIN: "Anomalous Diffusion of Proteins Due to Molecular Crowding". Biophysical Journal 89(5), S. 2960–2971 (2005) (siehe S. 125).
- [208] JAMES A. DIX und A. S. VERKMAN: "Crowding Effects on Diffusion in Solutions and Cells". Annual Review of Biophysics 37, S. 247–263 (2008) (siehe S. 125).
- [209] KATHERINE LUBY-PHELPS: "Cytoarchitecture and Physical Properties of Cytoplasm: Volume, Viscosity, Diffusion, Intracellular Surface Area". International Review of Cytology 192, S. 189–221 (1999) (siehe S. 125).
- [210] R. JOHN ELLIS: "Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment". Current Opinion in Structural Biology 11(1), S. 114–119 (2001) (siehe S. 125).
- [211] ALLEN P. MINTON: "The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media". *Journal of Biological Chemistry* 276(14), S. 10577–10580 (2001) (siehe S. 125).
- [212] MATTHIAS WEISS: "Crowding, Diffusion, and Biochemical Reactions". International Review of Cell and Molecular Biology 307, S. 383–417 (2014) (siehe S. 125).
- [213] GIDEON SCHREIBER, GILAD HARAN und H.-X. ZHOU: "Fundamental Aspects of Protein-Protein Association Kinetics". Chemical Reviews 109(3), S. 839–860 (2009) (siehe S. 125).
- [214] HUAN-XIANG ZHOU, GERMÁN RIVAS und ALLEN P. MINTON: "Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences". Annual Review of Biophysics 37, S. 375–397 (2008) (siehe S. 125).
- [215] R. JOHN ELLIS: "Macromolecular crowding: obvious but underappreciated". Trends in Biochemical Sciences 26(10), S. 597–604 (2001) (siehe S. 125).
- [216] OLIVIA STIEHL: On the crowding state of cellular and biomimetic fluids. Universität Bayreuth: Dissertation, 2017 (siehe S. 125).

- [217] RONALD HANCOCK: "Internal organisation of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model". *Biology of the Cell* 96(8), S. 595–601 (2004) (siehe S. 125).
- [218] GERNOT GUIGAS, CLAUDIA KALLA und MATTHIAS WEISS: "The degree of macromolecular crowding in the cytoplasm and nucleoplasm of mammalian cells is conserved". *FEBS Letters* 581(26), S. 5094–5098 (2007) (siehe S. 125).
- [219] CLAUDIA DONTH und MATTHIAS WEISS: "Quantitative assessment of the spatial crowding heterogeneity in cellular fluids". *Physical Review E* 99(5), S. 052415 (2019) (siehe S. 125, 126).
- [220] CHANDRASHEKHAR U. MURADE und GEORGE T. SHUBEITA: "A Molecular Sensor Reveals Differences in Macromolecular Crowding Between the Cytoplasm and Nucleoplasm". ACS Sensors 4(7), S. 1835–1843 (2019) (siehe S. 125, 126).
- [221] WEICHUN PAN, LUIS FILOBELO, NGOC D. Q. PHAM, OLEG GALKIN, VESELINA V. UZUNOVA und PETER G. VEKILOV: "Viscoelasticity in Homogeneous Protein Solutions". *Physical Review Letters* 102(5), S. 058101 (2009) (siehe S. 125).
- [222] ANDREW D. STEPHENS, EDWARD J. BANIGAN und JOHN F. MARKO: "Chromatin's physical properties shape the nucleus and its functions". *Current Opinion in Cell Biology* 58, S. 76–84 (2019) (siehe S. 125, 129).
- [223] HILMAR STRICKFADEN, THOMAS O. TOLSMA, AJIT SHARMA, D. ALAN UNDERHILL, JEFFREY C. HANSEN und MICHAEL J. HENDZEL: "Condensed Chromatin Behaves like a Solid on the Mesoscale *in Vitro* and in Living Cells". *Cell* 183(7), S. 1772–1784 (2020) (siehe S. 125, 129).
- [224] AMY C. ROWAT, JAN LAMMERDING, HARALD HERRMANN und UELI AEBI: "Towards an integrated understanding of the structure and mechanics of the cell nucleus". *Bioessays* 30(3), S. 226–236 (2008) (siehe S. 125, 127, 129, 132).
- [225] ÁLIA DOS SANTOS, ALEXANDER W. COOK, ROSEMARIE E. GOUGH, MARTIN SCHILLING, NORA A. OLSZOK, IAN BROWN, LIN WANG, JESSE AARON, MARISA L. MARTIN-FERNANDEZ, FLORIAN REHFELDT und CHRISTOPHER P. TOSELAND: "DNA damage alters nuclear mechanics through chromatin reorganization". Nucleic Acids Research 49(1), S. 340–353 (2021) (siehe S. 125, 129, 132, 138).
- [226] ANDREW D. STEPHENS, EDWARD J. BANIGAN, STEPHEN A. ADAM, ROBERT D. GOLDMAN und JOHN F. MARKO: "Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus". *Molecular Biology of the Cell* 28(14), S. 1984–1996 (2017) (siehe S. 125, 129, 132).
- [227] CHAD M. HOBSON, MEGAN KERN, E. TIMOTHY O'BRIEN III, ANDREW D. STEPHENS, MICHAEL R. FALVO und RICHARD SUPERFINE: "Correlating nuclear morphology and external force with combined atomic force microscopy and light sheet imaging separates roles of chromatin and lamin A/C in nuclear mechanics". *Molecular Biology of the Cell* 31(16), S. 1788–1801 (2020) (siehe S. 125).
- [228] OFIR SHUKRON, ANDREW SEEBER, ASSAF AMITAI und DAVID HOLCMAN: "Advances Using Single-Particle Trajectories to Reconstruct Chromatin Organization and Dynamics". Trends in Genetics 35(9), S. 685–705 (2019) (siehe S. 125).

- [229] YAOJUN ZHANG, DANIEL S. W. LEE, YIGAL MEIR, CLIFFORD P. BRANGWYNNE und NED S. WINGREEN: "Mechanical Frustration of Phase Separation in the Cell Nucleus by Chromatin". *Physical Review Letters* 126(25), S. 258102 (2021) (siehe S. 125).
- [230] IRAJ ESHGHI, JONAH A. EATON und ALEXANDRA ZIDOVSKA: "Interphase Chromatin Undergoes a Local Sol-Gel Transition upon Cell Differentiation". *Physical Review Letters* 126(22), S. 228101 (2021) (siehe S. 126).
- [231] THOMAS CREMER und CHRISTOPH CREMER: "Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells". *Nature Reviews Genetics* 2(4), S. 292–301 (2001) (siehe S. 126).
- [232] KAREN J. MEABURN und TOM MISTELI: "Chromosome Territories". Nature 445(7126), S. 379–381 (2007) (siehe S. 126).
- [233] ANTHONY A. HYMAN, CHRISTOPH A. WEBER und FRANK JÜLICHER: "Liquid-Liquid Phase Separation in Biology". Annual Review of Cell and Developmental Biology 30, S. 39–58 (2014) (siehe S. 126, 129).
- [234] YONGDAE SHIN und CLIFFORD P. BRANGWYNNE: "Liquid phase condensation in cell physiology and disease". Science 357(6357) (2017) (siehe S. 126).
- [235] NOA LAMM, SAMUEL ROGERS und ANTHONY J. CESARE: "Chromatin mobility and relocation in DNA repair". Trends in Cell Biology (2021) (siehe S. 126, 129).
- [236] BENJAMIN R. SCHRANK, TOMAS APARICIO, YINYIN LI, WAKAM CHANG, BRIAN T. CHAIT, GREGG G. GUNDERSEN, MAX E. GOTTESMAN und JEAN GAUTIER: "Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair". *Nature* 559(7712), S. 61–66 (2018) (siehe S. 126).
- [237] NAM WOO CHO, ROBERT L. DILLEY, MICHAEL A. LAMPSON und ROGER A. GREENBERG: "Interchromosomal Homology Searches Drive Directional ALT Telomere Movement and Synapsis". *Cell* 159(1), S. 108–121 (2014) (siehe S. 126, 129).
- [238] TAEHYUN RYU, BRETT SPATOLA, LAETITIA DELABAERE, KATHERINE BOWLIN, HANNAH HOPP, RYAN KUNITAKE, GARY H. KARPEN und IRENE CHIOLO: "Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair". *Nature Cell Biology* 17(11), S. 1401–1411 (2015) (siehe S. 126).
- [239] FRED ETOC, ELIE BALLOUL, CHIARA VICARIO, DAVIDE NORMANNO, DOMENIK LISSE, ASSA SITTNER, JACOB PIEHLER, MAXIME DAHAN und MATHIEU COPPEY: "Non-specific interactions govern cytosolic diffusion of nanosized objects in mammalian cells". *Nature Materials* 17(8), S. 740–746 (2018) (siehe S. 126, 128).
- [240] ADAL SABRI: Unveröffentlichte Daten zur Dynamik von Quantenpunkten in Metaphase-Zellen.
   Universität Bayreuth, 2020 (siehe S. 126).
- [241] FANG-YI CHU, SHANNON C. HALEY und ALEXANDRA ZIDOVSKA: "On the origin of shape fluctuations of the cell nucleus". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(39), S. 10338–10343 (2017) (siehe S. 127, 128, 132).

- [242] SHYAM B. KHATAU, CHRISTOPHER M. HALE, P.J. STEWART-HUTCHINSON, MEET S. PATEL, COLIN L. STEWART, PETER C. SEARSON, DIDIER HODZIC und DENIS WIRTZ: "A perinuclear actin cap regulates nuclear shape". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(45), S. 19017–19022 (2009) (siehe S. 127).
- [243] JEONG-KI KIM, ARGHAVAN LOUHGHALAM, GEONHUI LEE, BENJAMIN W. SCHAFER, DENIS WIRTZ und DONG-HWEE KIM: "Nuclear lamin A/C harnesses the perinuclear apical actin cables to protect nuclear morphology". *Nature Communications* 8(1), S. 1–13 (2017) (siehe S. 127).
- [244] PATRICIA M. DAVIDSON und BRUNO CADOT: "Actin on and around the Nucleus". Trends in Cell Biology (2020) (siehe S. 127).
- [245] KLEMENS ROTTNER, JAN FAIX, SVEN BOGDAN, STEFAN LINDER und EUGEN KERKHOFF: "Actin assembly mechanisms at a glance". *Journal of Cell Science* 130(20), S. 3427–3435 (2017) (siehe S. 127).
- [246] DOORGESH SHARMA JOKHUN, YUQING SHANG und G. V. SHIVASHANKAR: "Actin Dynamics Couples Extracellular Signals to the Mobility and Molecular Stability of Telomeres". *Biophysical Journal* 115(7), S. 1166–1179 (2018) (siehe S. 127).
- [247] MANFRED RADMACHER: "Studying the Mechanics of Cellular Processes by Atomic Force Microscopy". Methods in Cell Biology 83, S. 347–372 (2007) (siehe S. 127, 132).
- [248] ARTHUR ASHKIN und JOSEPH M. DZIEDZIC: "Internal cell manipulation using infrared laser traps". Proceedings of the National Academy of Sciences 86(20), S. 7914–7918 (1989) (siehe S. 127).
- [249] ANDREW J. BERGLUND: "Statistics of camera-based single-particle tracking". Physical Review E 82(1), S. 011917 (2010) (siehe S. 128).
- [250] JEROME IRIANTO, JOE SWIFT, RUI P. MARTINS, GRAHAM D. MCPHAIL, MARTIN M. KNIGHT, DENNIS E. DISCHER und DAVID A. LEE: "Osmotic Challenge Drives Rapid and Reversible Chromatin Condensation in Chondrocytes". *Biophysical Journal* 104(4), S. 759–769 (2013) (siehe S. 129).
- [251] KARTHIK DAMODARAN, SARADHA VENKATACHALAPATHY, FARID ALISAFAEI, A. V. RADHAKRIS-HNAN, DOORGESH SHARMA JOKHUN, VIVEK B. SHENOY und G. V. SHIVASHANKAR: "Compressive force induces reversible chromatin condensation and cell geometry-dependent transcriptional response". *Molecular Biology of the Cell* 29(25), S. 3039–3051 (2018) (siehe S. 129).
- [252] YUTA SHIMAMOTO, SACHIKO TAMURA, HIROSHI MASUMOTO und KAZUHIRO MAESHIMA: "Nucleosome-nucleosome interactions via histone tails and linker DNA regulate nuclear rigidity". *Molecular Biology of the Cell* 28(11), S. 1580–1589 (2017) (siehe S. 129).
- [253] FABIAN ERDEL, MICHAEL BAUM und KARSTEN RIPPE: "The viscoelastic properties of chromatin and the nucleoplasm revealed by scale-dependent protein mobility". *Journal of Physics: Condensed Matter* 27(6), S. 064115 (2015) (siehe S. 129).
- [254] JUDITH MINÉ-HATTAB, VINCENT RECAMIER, IGNACIO IZEDDIN, RODNEY ROTHSTEIN und XAVIER DARZACQ: "Multi-scale tracking reveals scale-dependent chromatin dynamics after DNA damage". Molecular Biology of the Cell 28(23), S. 3323–3332 (2017) (siehe S. 129).

- [255] YING GAO, JUN TAN, JINGYI JIN, HONGQIANG MA, XIUKAI CHEN, BRITTANY LEGER, JIANQUAN XU, STEPHEN T. SPAGNOL, KRIS NOEL DAHL, ARTHUR S. LEVINE, YANG LIU und LI LAN:
  "SIRT6 facilitates directional telomere movement upon oxidative damage". Scientific Reports 8(1), S. 1–12 (2018) (siehe S. 129).
- [256] THIBAUD JEGOU, INN CHUNG, GERRIT HEUVELMAN, MALTE WACHSMUTH, SABINE M. GÖ-RISCH, KARIN M. GREULICH-BODE, PETRA BOUKAMP, PETER LICHTER und KARSTEN RIPPE:
  "Dynamics of Telomeres and Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies in a Telomerase-negative Human Cell Line". *Molecular Biology of the Cell* 20(7), S. 2070–2082 (2009) (siehe S. 129).

### Literatur in der Zusammenfassung

- [14] JAN LAMMERDING: "Mechanics of the Nucleus". Comprehensive Physiology 1(2), S. 783 (2011) (siehe S. 5, 125, 127, 129, 132).
- [15] SVENJA ULFERTS, BINA PRAJAPATI, ROBERT GROSSE und MARIA K. VARTIAINEN: "Emerging Properties and Functions of Actin and Actin Filaments Inside the Nucleus". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13(3), a040121 (2021) (siehe S. 5, 78, 127, 132).
- [16] VERENA HURST, KENJI SHIMADA und SUSAN M. GASSER: "Nuclear Actin and Actin-Binding Proteins in DNA Repair". Trends in Cell Biology 29(6), S. 462–476 (2019) (siehe S. 5, 78, 81, 111, 126, 129, 132).
- [17] CHRISTOPHER PATRICK CARIDI, MATTHIAS PLESSNER, ROBERT GROSSE und IRENE CHIOLO: "Nuclear actin filaments in DNA repair dynamics". *Nature Cell Biology* 21(9), S. 1068–1077 (2019) (siehe S. 5, 78, 79, 126, 129, 132).
- [27] JENNIFER G. D'ARCANGELO, KYLE R. STAHMER und ELIZABETH A. MILLER: "Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2464–2472 (2013) (siehe S. 6, 42, 48, 72, 75, 131, 135).
- [28] JANINE MCCAUGHEY und DAVID J. STEPHENS: "COPII-dependent ER export in animal cells: adaptation and control for diverse cargo". *Histochemistry and Cell Biology* 150(2), S. 119–131 (2018) (siehe S. 6, 43, 74, 131).
- [29] ISHIER RAOTE und VIVEK MALHOTRA: "Tunnels for Protein Export from the Endoplasmic Reticulum". Annual Review of Biochemistry 90 (2021) (siehe S. 6, 42, 43, 74, 131).
- [30] AUBREY V. WEIGEL, CHI-LUN CHANG, GLEB SHTENGEL, C. SHAN XU, DAVID P. HOFFMAN, MELANIE FREEMAN, NIRMALA IYER, JESSE AARON, SATYA KHUON, JOHN BOGOVIC, WEI QIU, HARALD F. HESS und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER". *Cell* 184(9), S. 2412–2429 (2021) (siehe S. 6, 7, 35, 38, 43, 74, 131).
- [31] OLGA SHOMRON, INBAR NEVO-YASSAF, TAMAR AVIAD, YAKEY YAFFE, EITAN EREZ ZAHAVI, ANNA DUKHOVNY, ERAN PERLSON, ILYA BRODSKY, ADVA YEHESKEL, METSADA PASMANIK-CHOR, ANNA MIRONOV, GALINA V. BEZNOUSSENKO, ALEXANDER A. MIRONOV, ELLA H. SKLAN, GEORGE H. PATTERSON, YOJI YONEMURA, MARA SANNAI, CHRISTOPH KAETHER und KORET HIRSCHBERG: "COPII collar defines the boundary between ER and ER exit site and does not coat cargo containers". Journal of Cell Biology 220(6), e201907224 (2021) (siehe S. 6, 7, 131).
- [35] HAOXI WU, PEDRO CARVALHO und GIA K. VOELTZ: "Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites". *Science* 361(6401) (2018) (siehe S. 7, 22, 39, 43, 60, 61, 66, 128, 131).
- [39] CHRISTOPHER KING, PRABUDDHA SENGUPTA, ARNOLD Y. SEO und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". Proceedings of the National Academy of Sciences 117(13), S. 7225–7235 (2020) (siehe S. 7, 47, 60–63, 65–67, 74, 75, 80, 107, 127, 131, 138–140).

- [41] KAMILLA NORREGAARD, RALF METZLER, CHRISTINE M. RITTER, KIRSTINE BERG-SØRENSEN und LENE B. ODDERSHEDE: "Manipulation and Motion of Organelles and Single Molecules in Living Cells". *Chemical Reviews* 117(5), S. 4342–4375 (2017) (siehe S. 8, 15, 19, 84, 103, 127, 132).
- [44] NILS GUSTAFSSON, SIÂN CULLEY, GEORGE ASHDOWN, DYLAN M. OWEN, PEDRO MATOS PEREIRA und RICARDO HENRIQUES: "Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations". *Nature Communications* 7(1), S. 1–9 (2016) (siehe S. 9–11, 22, 26–28, 39–41, 131, 145).
- [80] REBECCA BENELLI und MATTHIAS WEISS: "Probing local chromatin dynamics by tracking telomeres". *Biophysical Journal* 121(14), S. 2684–2692 (2022) (siehe S. 15, 16, 19, 107, 125, 127, 129, 132, 140).
- [118] KERSTIN D. TILLMANN, VERONIKA REITERER, FRANCESCO BASCHIERI, JULIA HOFFMANN, VALENTINA MILLARTE, MARK A. HAUSER, ARNON MAZZA, NIR ATIAS, DANIEL F. LEGLER, RODED SHARAN, MATTHIAS WEISS und HESSO FARHAN: "Regulation of Sec16 levels and dynamics links proliferation and secretion". *Journal of Cell Science* 128(4), S. 670–682 (2015) (siehe S. 42, 46, 50, 72, 74, 75, 131, 135, 147).
- [119] REBECCA FORSTER, MATTHIAS WEISS, TIMO ZIMMERMANN, EMMANUEL G. REYNAUD, FATIMA VERISSIMO, DAVID J. STEPHENS und RAINER PEPPERKOK: "Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites". *Current Biology* 16(2), S. 173–179 (2006) (siehe S. 42, 46, 50, 72, 74, 131, 135).
- [121] DEVON JENSEN und RANDY SCHEKMAN: "COPII-mediated vesicle formation at a glance". Journal of Cell Science 124(1), S. 1–4 (2011) (siehe S. 42, 48, 131).
- [127] HESSO FARHAN, MATTHIAS WEISS, KATSUKO TANI, RANDAL J. KAUFMAN und HANS-PETER HAURI: "Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load". *The EMBO Journal* 27(15), S. 2043–2054 (2008) (siehe S. 42, 74, 75, 131).
- [129] MIHARU MAEDA, YUKIE KOMATSU und KOTA SAITO: "Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1". *Developmental Cell* 55(2), S. 237–250 (2020) (siehe S. 43, 75, 76, 131).
- [136] KONSTANTIN SPECKNER, LORENZ STADLER und MATTHIAS WEISS: "Unscrambling exit site patterns on the endoplasmic reticulum as a quenched demixing process". *Biophysical Journal* 120(12), S. 2532–2542 (2021) (siehe S. 46, 70–72, 75, 131).
- [155] ZHUOMEI LU, DONALD JOSEPH, ELISABETH BUGNARD, KRISTIEN JM ZAAL und EVELYN RALSTON: "Golgi Complex Reorganization during Muscle Differentiation: Visualization in Living Cells and Mechanism". *Molecular Biology of the Cell* 12(4), S. 795–808 (2001) (siehe S. 76, 131).
- [161] MATTHIAS PLESSNER und ROBERT GROSSE: "Dynamizing nuclear actin filaments". Current Opinion in Cell Biology 56, S. 1–6 (2019) (siehe S. 78, 126, 127, 132).
- [162] IVAN A. OLAVE, SAMARA L. RECK-PETERSON und GERALD R. CRABTREE: "Nuclear Actin and Actin-Related Proteins in Chromatin Remodeling". Annual Review of Biochemistry 71(1), S. 755–781 (2002) (siehe S. 78, 126, 132).

- [168] MARIA K. VARTIAINEN, SEBASTIAN GUETTLER, BANAFSHE LARIJANI und RICHARD TREISMAN: "Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL". Science 316(5832), S. 1749–1752 (2007) (siehe S. 78, 126, 132).
- [169] BRITTANY J. BELIN, BETH A. CIMINI, ELIZABETH H. BLACKBURN und R. DYCHE MULLINS: "Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei". *Molecular Biology of the Cell* 24(7), S. 982–994 (2013) (siehe S. 78, 79, 81–83, 103, 111, 118, 132, 135, 151).
- [173] CHRISTOPHER P. CARIDI, CARLA D'AGOSTINO, TAEHYUN RYU, GRZEGORZ ZAPOTOCZNY, LAETITIA DELABAERE, XIAO LI, VARANDT Y. KHODAVERDIAN, NUNO AMARAL, EMILY LIN, ALESANDRA R. RAU und IRENE CHIOLO: "Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks". Nature 559(7712), S. 54–60 (2018) (siehe S. 78, 126, 132).
- [174] ASSAF AMITAI, ANDREW SEEBER, SUSAN M. GASSER und DAVID HOLCMAN: "Visualization of Chromatin Decompaction and Break Site Extrusion as Predicted by Statistical Polymer Modeling of Single-Locus Trajectories". *Cell Reports* 18(5), S. 1200–1214 (2017) (siehe S. 78, 126, 132).
- [175] JONAH A. EATON und ALEXANDRA ZIDOVSKA: "Structural and Dynamical Signatures of Local DNA Damage in Live Cells". *Biophysical Journal* 118(9), S. 2168–2180 (2020) (siehe S. 78, 132).
- [190] IRENA BRONSHTEIN, YONATAN ISRAEL, ELDAD KEPTEN, SABINE MAI, YARON SHAV-TAL, ELI BARKAI und YUVAL GARINI: "Transient Anomalous Diffusion of Telomeres in the Nucleus of Mammalian Cells". *Physical Review Letters* 103(1), S. 018102 (2009) (siehe S. 103, 104, 107, 122, 125, 126, 129, 132).
- [191] IRENA BRONSHTEIN, ELDAD KEPTEN, ITAMAR KANTER, SHIRLEY BEREZIN, MOSHE LINDNER, ABENA B. REDWOOD, SABINE MAI, SUSANA GONZALO, ROLAND FOISNER, YARON SHAV-TAL und YUVAL GARINI: "Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior". Nature Communications 6(1), S. 1–9 (2015) (siehe S. 103, 108, 122, 125, 127–129, 132).
- [192] ALEXANDRA ZIDOVSKA, DAVID A. WEITZ und TIMOTHY J. MITCHISON: "Micron-scale coherence in interphase chromatin dynamics". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(39), S. 15555–15560 (2013) (siehe S. 103, 104, 108, 126, 128, 132).
- [224] AMY C. ROWAT, JAN LAMMERDING, HARALD HERRMANN und UELI AEBI: "Towards an integrated understanding of the structure and mechanics of the cell nucleus". *Bioessays* 30(3), S. 226–236 (2008) (siehe S. 125, 127, 129, 132).
- [225] ÁLIA DOS SANTOS, ALEXANDER W. COOK, ROSEMARIE E. GOUGH, MARTIN SCHILLING, NORA A. OLSZOK, IAN BROWN, LIN WANG, JESSE AARON, MARISA L. MARTIN-FERNANDEZ, FLORIAN REHFELDT und CHRISTOPHER P. TOSELAND: "DNA damage alters nuclear mechanics through chromatin reorganization". Nucleic Acids Research 49(1), S. 340–353 (2021) (siehe S. 125, 129, 132, 138).
- [226] ANDREW D. STEPHENS, EDWARD J. BANIGAN, STEPHEN A. ADAM, ROBERT D. GOLDMAN und JOHN F. MARKO: "Chromatin and lamin A determine two different mechanical response regimes of the cell nucleus". *Molecular Biology of the Cell* 28(14), S. 1984–1996 (2017) (siehe S. 125, 129, 132).
- [241] FANG-YI CHU, SHANNON C. HALEY und ALEXANDRA ZIDOVSKA: "On the origin of shape fluctuations of the cell nucleus". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(39), S. 10338–10343 (2017) (siehe S. 127, 128, 132).

[247] MANFRED RADMACHER: "Studying the Mechanics of Cellular Processes by Atomic Force Microscopy". Methods in Cell Biology 83, S. 347–372 (2007) (siehe S. 127, 132).

### Literaturverzeichnis von Teil IV: Anhang

- [27] JENNIFER G. D'ARCANGELO, KYLE R. STAHMER und ELIZABETH A. MILLER: "Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation". *Biochimica et Biophysica Acta* 1833(11), S. 2464–2472 (2013) (siehe S. 6, 42, 48, 72, 75, 131, 135).
- [39] CHRISTOPHER KING, PRABUDDHA SENGUPTA, ARNOLD Y. SEO und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". Proceedings of the National Academy of Sciences 117(13), S. 7225–7235 (2020) (siehe S. 7, 47, 60–63, 65–67, 74, 75, 80, 107, 127, 131, 138–140).
- [44] NILS GUSTAFSSON, SIÂN CULLEY, GEORGE ASHDOWN, DYLAN M. OWEN, PEDRO MATOS PEREIRA und RICARDO HENRIQUES: "Fast live-cell conventional fluorophore nanoscopy with ImageJ through super-resolution radial fluctuations". *Nature Communications* 7(1), S. 1–9 (2016) (siehe S. 9–11, 22, 26–28, 39–41, 131, 145).
- [45] SIÂN CULLEY, KALINA L. TOSHEVA, PEDRO MATOS PEREIRA und RICARDO HENRIQUES: "SRRF: Universal live-cell super-resolution microscopy". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 101, S. 74–79 (2018) (siehe S. 9, 10, 22, 25–27, 39, 41, 145).
- [50] COLLIN COATES: 'SRRF-Stream': Real-Time Super-Resolution in a Camera. Belfast (Irland): Technical Note (Andor Technology Ltd), 2017 (siehe S. 10, 11, 22, 27, 145).
- [51] CLAUDIA FLORINDO: SRRF-Stream<sup>(+)</sup>: Super-Resolution Microscopy Accessible to All: Fast, reliable & live-cell compatible Super-Resolution. Belfast (Irland): Technical Note (Andor Technology Ltd), 2020 (siehe S. 10, 11, 22, 26–28, 145).
- [53] ROMAIN F. LAINE, KALINA L. TOSHEVA, NILS GUSTAFSSON, ROBERT D. M. GRAY, PEDRO ALMADA, DAVID ALBRECHT, GABRIEL T. RISA, FREDRIK HURTIG, ANN-CHRISTIN LINDÅS, BUZZ BAUM, JASON MERCER, CHRISTOPHE LETERRIER, PEDRO M. PEREIRA, SIÂN CULLEY und RICARDO HENRIQUES: "NanoJ: a high-performance open-source super-resolution microscopy toolbox". Journal of Physics D: Applied Physics 52(16), S. 163001 (2019) (siehe S. 11, 22, 24, 27, 145).
- [71] LORENZ STADLER, KONSTANTIN SPECKNER und MATTHIAS WEISS: "Diffusion of Exit Sites on the Endoplasmic Reticulum: A Random Walk on a Shivering Backbone". *Biophysical Journal* 115(8), S. 1552–1560 (2018) (siehe S. 15, 17, 19, 22, 29, 34, 35, 38, 43–46, 48, 73, 80, 86, 89, 125, 137).
- [72] LORENZ STADLER: Persönliche Kommunikation unpublizierter Daten. Universität Bayreuth, 2019 (siehe S. 15, 19, 43, 44, 48, 50, 51, 54, 73, 137, 201).
- [75] ADAL SABRI, XINRAN XU, DIEGO KRAPF und MATTHIAS WEISS: "Elucidating the origin of heterogeneous anomalous diffusion in the cytoplasm of mammalian cells". *Physical Review Letters* 125(5), S. 058101 (2020) (siehe S. 15, 16, 18, 19, 85, 87, 88, 91, 98, 104, 126, 128, 137, 139).
- [76] ADAL SABRI: Elucidating the emergence of heterogeneous motion in living matter from the microto the nanoscale. Universität Bayreuth: Dissertation, 2021 (siehe S. 15, 16, 18, 19, 85, 87, 91, 119, 120, 122, 126, 128, 137, 139, 152).
- [78] KONSTANTIN SPECKNER und MATTHIAS WEISS: "Single-Particle Tracking Reveals Anti-Persistent Subdiffusion in Cell Extracts". *Entropy* 23(7), S. 892 (2021) (siehe S. 15, 16, 19, 80, 85, 86, 95, 96, 98, 100, 106, 108, 121, 153).

- [80] REBECCA BENELLI und MATTHIAS WEISS: "Probing local chromatin dynamics by tracking telomeres". *Biophysical Journal* 121(14), S. 2684–2692 (2022) (siehe S. 15, 16, 19, 107, 125, 127, 129, 132, 140).
- [81] KONSTANTIN SPECKNER: Dynamische und Topologische Netzwerkeigenschaften des Endoplasmatischen Retikulums. Universität Bayreuth: Masterarbeit, 2017 (siehe S. 15, 16, 19, 22, 34, 35, 38, 39, 44, 49, 75, 150, 152, 201).
- [96] PHILIPP STRUNTZ: Quantitative Beobachtung dynamischer Prozesse im frühen C. elegans Embryo. Universität Bayreuth: Dissertation, 2018 (siehe S. 23, 39, 40, 143–146).
- [118] KERSTIN D. TILLMANN, VERONIKA REITERER, FRANCESCO BASCHIERI, JULIA HOFFMANN, VALENTINA MILLARTE, MARK A. HAUSER, ARNON MAZZA, NIR ATIAS, DANIEL F. LEGLER, RODED SHARAN, MATTHIAS WEISS und HESSO FARHAN: "Regulation of Sec16 levels and dynamics links proliferation and secretion". *Journal of Cell Science* 128(4), S. 670–682 (2015) (siehe S. 42, 46, 50, 72, 74, 75, 131, 135, 147).
- [119] REBECCA FORSTER, MATTHIAS WEISS, TIMO ZIMMERMANN, EMMANUEL G. REYNAUD, FATIMA VERISSIMO, DAVID J. STEPHENS und RAINER PEPPERKOK: "Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites". *Current Biology* 16(2), S. 173–179 (2006) (siehe S. 42, 46, 50, 72, 74, 131, 135).
- [120] DAVID J. STEPHENS, NATHALIE LIN-MARQ, ALESSANDRA PAGANO, RAINER PEPPERKOK und JEAN-PIERRE PACCAUD: "COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites". *Journal of Cell Science* 113(12), S. 2177–2185 (2000) (siehe S. 42, 50, 72, 135).
- [137] NIHAL ALTAN-BONNET, RACHID SOUGRAT, WEI LIU, ERIK L. SNAPP, THERESA WARD und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "Golgi inheritance in mammalian cells is mediated through endoplasmic reticulum export activities". *Molecular Biology of the Cell* 17(2), S. 990–1005 (2006) (siehe S. 46, 135, 150).
- [138] MAGNUS A. B. AXELSSON und GRAHAM WARREN: "Rapid, endoplasmic reticulum-independent diffusion of the mitotic Golgi haze". *Molecular Biology of the Cell* 15(4), S. 1843–1852 (2004) (siehe S. 47, 59, 137).
- [139] STUART BERG, DOMINIK KUTRA, THORBEN KROEGER, CHRISTOPH N. STRAEHLE, BERNHARD X. KAUSLER, CARSTEN HAUBOLD, MARTIN SCHIEGG, JANEZ ALES, THORSTEN BEIER, MARKUS RUDY, KEMAL EREN, JAIME I. CERVANTES, BUOTE XU, FYNN BEUTTENMUELLER, ADRIAN WOLNY, CHONG ZHANG, ULLRICH KOETHE, FRED A. HAMPRECHT und ANNA KRESHUK: "Ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis". Nature Methods, S. 1–7 (Sep. 2019) (siehe S. 47, 147).
- [140] MATLAB: Version 9.5.0.1298439 (R2018b Update 7). Natick (MA): The MathWorks Inc., 2018 (siehe S. 47, 142, 147, 152).
- [141] JOHANNES SCHINDELIN, IGNACIO ARGANDA-CARRERAS, ERWIN FRISE, VERENA KAYNIG, MARK LONGAIR, TOBIAS PIETZSCH, STEPHAN PREIBISCH, CURTIS RUEDEN, STEPHAN SAALFELD, BENJAMIN SCHMID, JEAN-YVES TINEVEZ, DANIEL JAMES WHITE, VOLKER HARTENSTEIN, KEVIN ELICEIRI, PAVEL TOMANCAK und ALBERT CARDONA: "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis". Nature Methods 9(7), S. 676–682 (2012) (siehe S. 47, 79, 145, 147, 151).

- [142] PETER WATSON, ANNA K. TOWNLEY, PRATYUSHA KOKA, KRYSTEN J. PALMER und DAVID J. STEPHENS: "Sec16 Defines Endoplasmic Reticulum Exit Sites and is Required for Secretory Cargo Export in Mammalian Cells". *Traffic* 7(12), S. 1678–1687 (2006) (siehe S. 48, 72, 135).
- [144] HORIZON<sup>TM</sup> INSPIRED CELL SOLUTIONS: Effective controls for RNA interference (RNAi) experiments using siRNA. Cambridge (United Kingdom): Technical Note (Horizon Discovery), 2017 (siehe S. 54, 140).
- [145] CHRISTOPHER KING, PRABUDDHA SENGUPTA, ARNOLD SEO und JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: "ER membranes exhibit phase behavior at sites of organelle contact". *bioRxiv*, S. 707505 (2019) (siehe S. 60, 62, 138).
- [149] JENNIFER LIPPINCOTT-SCHWARTZ: Persönliche Kommunikation (Quantitative BioImaging Conference). University of Oxford, 2020 (siehe S. 62, 139, 140).
- [152] PENNY K. DAVIS, ALAN HO und STEVEN F. DOWDY: "Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells". *Biotechniques* 30(6), S. 1322–1331 (2001) (siehe S. 73, 137).
- [169] BRITTANY J. BELIN, BETH A. CIMINI, ELIZABETH H. BLACKBURN und R. DYCHE MULLINS: "Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei". *Molecular Biology of the Cell* 24(7), S. 982–994 (2013) (siehe S. 78, 79, 81–83, 103, 111, 118, 132, 135, 151).
- [176] HYUNG-SONG NAM und ROBERT BENEZRA: "High Levels of Id1 Expression Define B1 Type Adult Neural Stem Cells". Cell Stem Cell 5(5), S. 515–526 (2009) (siehe S. 79, 135).
- [177] IBIDI GMBH: p<sup>CAG</sup>-LifeAct<sup>®</sup>-TagGFP2 / -TagRFP Protein: Actin Visualization in Living Cells, Version 3.0 (2016-06-08). Martinsried (DE), 2016 (siehe S. 79, 135).
- [178] IBIDI GMBH: p<sup>CMV</sup>-LifeAct<sup>®</sup>-TagGFP2 / -TagRFP Protein: Actin Visualization in Living Cells, Version 3.0 (2016-06-08). Martinsried (DE), 2016 (siehe S. 79, 135).
- [179] JEAN-YVES TINEVEZ, NICK PERRY, JOHANNES SCHINDELIN, GENEVIEVE M. HOOPES, GREGORY D. REYNOLDS, EMMANUEL LAPLANTINE, SEBASTIAN Y. BEDNAREK, SPENCER L. SHORTE und KEVIN W. ELICEIRI: "TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking". *Methods* 115, S. 80–90 (2017) (siehe S. 79, 151, 152).
- [180] KARSTEN RICHTER, MICHELLE NESSLING und PETER LICHTER: "Experimental evidence for the influence of molecular crowding on nuclear architecture". *Journal of Cell Science* 120(9), S. 1673–1680 (2007) (siehe S. 80, 109, 129, 140).
- [181] DOUGLAS C. MARCHION, ELONA BICAKU, ADIL I. DAUD, DANIEL M. SULLIVAN und PAMELA N. MUNSTER: "Valproic Acid Alters Chromatin Structure by Regulation of Chromatin Modulation Proteins". *Cancer research* 65(9), S. 3815–3822 (2005) (siehe S. 80, 110, 138).
- [182] KATALIN FEJES TÓTH, TOBIAS A. KNOCH, MALTE WACHSMUTH, MONIKA FRANK-STÖHR, MI-CHAEL STÖHR, CHRISTIAN P. BACHER, GABRIELE MÜLLER und KARSTEN RIPPE: "Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin". *Journal of Cell Science* 117(18), S. 4277–4287 (2004) (siehe S. 80, 110, 138).
- [183] DIRK P. KROESE und ZDRAVKO I. BOTEV: "Spatial process simulation". Stochastic Geometry, Spatial Statistics and Random Fields. Springer, 2015, S. 369–404 (siehe S. 80, 152).

- [195] MARINA BARRETO FELISBINO, WIRLA M. S. C. TAMASHIRO und MARIA LUIZA S. MELLO: "Chromatin Remodeling, Cell Proliferation and Cell Death in Valproic Acid-Treated HeLa Cells". PLOS ONE 6(12), e29144 (2011) (siehe S. 110, 138).
- [196] CHRISTINA M. CARAGINE, SHANNON C. HALEY und ALEXANDRA ZIDOVSKA: "Nucleolar dynamics and interactions with nucleoplasm in living cells". *eLife* 8, e47533 (2019) (siehe S. 110, 129, 138).
- [197] ANDREW D. STEPHENS, PATRICK Z. LIU, EDWARD J. BANIGAN, LUAY M. ALMASSALHA, VADIM BACKMAN, STEPHEN A. ADAM, ROBERT D. GOLDMAN und JOHN F. MARKO: "Chromatin histone modifications and rigidity affect nuclear morphology independent of lamins". *Molecular Biology of the Cell* 29(2), S. 220–233 (2018) (siehe S. 114, 129, 138).
- [225] ÁLIA DOS SANTOS, ALEXANDER W. COOK, ROSEMARIE E. GOUGH, MARTIN SCHILLING, NORA A. OLSZOK, IAN BROWN, LIN WANG, JESSE AARON, MARISA L. MARTIN-FERNANDEZ, FLORIAN REHFELDT und CHRISTOPHER P. TOSELAND: "DNA damage alters nuclear mechanics through chromatin reorganization". Nucleic Acids Research 49(1), S. 340–353 (2021) (siehe S. 125, 129, 132, 138).
- [257] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.: Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 Reagent User Guide: Pub. No. MAN0009872 Rev C.0. Waltham (MA), 2016 (siehe S. 135).
- [258] LONZA COLOGNE GMBH: 4D-Nucleofector<sup>™</sup> Protocol for U2OS Cells: D4XC-1018 2017-04. Köln (DE), 2017 (siehe S. 135).
- [259] SUSANA GRANELL, GIOVANNA BALDINI, SAMEER MOHAMMAD, VANESSA NICOLIN, PAOLA NARDUCCI, BRIAN STORRIE und GIULIA BALDINI: "Sequestration of mutated α1-antitrypsin into inclusion bodies is a cell-protective mechanism to maintain endoplasmic reticulum function". *Molecular Biology of the Cell* 19(2), S. 572–586 (2008) (siehe S. 135).
- [260] TAKATOSHI KARASAWA, QI WANG, LARRY L. DAVID und PETER S. STEYGER: "Calreticulin binds to gentamicin and reduces drug-induced ototoxicity". *Toxicological Sciences* 124(2), S. 378– 387 (2011) (siehe S. 135).
- [261] JUSTIN CHUN, ZOYA SHAPOVALOVA, SELMA Y. DEJGAARD, JOHN F. PRESLEY und PAUL MELANÇON: "Characterization of Class I and II ADP-Ribosylation Factors (Arfs) in Live Cells: GDP-bound Class II Arfs Associate with the ER-Golgi Intermediate Compartment Independently of GBF1". Molecular Biology of the Cell 19(8), S. 3488–3500 (2008) (siehe S. 135).
- [262] BENEDIKT WESTERMANN und WALTER NEUPERT: "Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in Saccharomyces cerevisiae". Yeast 16(15), S. 1421–1427 (2000) (siehe S. 135, 150).
- [263] NASSER M. RUSAN, CAREY J. FAGERSTROM, ANNE-MARIE C. YVON und PATRICIA WADS-WORTH: "Cell Cycle-Dependent Changes in Microtubule Dynamics in Living Cells Expressing Green Fluorescent Protein-α Tubulin". *Molecular Biology of the Cell* 12(4), S. 971–980 (2001) (siehe S. 135).
- [264] ADDGENE: The nonprofit plasmid repositry. Watertown (MA), 2004 (siehe S. 135, 136).
- [265] STEVE KELLER: Abhängigkeit des phagosomalen Transportes von der Größe des Phagosoms. Universität Bayreuth: Dissertation, 2019 (siehe S. 136).

- [266] ATTO-TEC GMBH: Product Information: ATTO 550, V. 2021-02-08. Siegen (DE), 2021 (siehe S. 136).
- [267] NELSON H. COLE: "Compendium of drugs commonly used in cell biology research". Current Protocols in Cell Biology (1), A–1B (1998) (siehe S. 136, 137).
- [268] J. HOEBEKE, G. VAN NIJEN und M. DE BRABANDER: "Interaction of Oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 69(2), S. 319–324 (1976) (siehe S. 137).
- [269] BRUCE F. MCEWEN, JOHN N. TELFORD, CARYL T. HANDELMAN und WILLIAM J. ARION: "A critical evaluation of the use of filipin-permeabilized rat hepatocytes to study functions of the endoplasmic reticulum in situ". *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its* modulation by active agents or disease 5(4), S. 263–272 (1987) (siehe S. 137).
- [270] NAOKI TSUJI, MASAAKI KOBAYASHI, KAZUO NAGASHIMA, YOSHIHARU WAKISAKA und KENZO KOIZUMI: "A New Antifungal Antibiotic, Trichostatin". *The Journal of Antibiotics* 29(1), S. 1–6 (1976) (siehe S. 138).
- [271] TAMARA VANHAECKE, PEGGY PAPELEU, GREETJE ELAUT und VERA ROGIERS: "Trichostatin A – like Hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Agents: Toxicological Point of View". Current Medicinal Chemistry 11(12), S. 1629–1643 (2004) (siehe S. 138).
- [272] WOLFGANG LÖSCHER: "Basic Pharmacology of Valproate: A Review After 35 Years of Clinical Use for the Treatment of Epilepsy". CNS Drugs 16(10), S. 669–694 (2002) (siehe S. 138).
- [273] THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. (LIFE TECHNOLOGIES): Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMAX Reagent Protocol: Pub. No. MAN0007825 Rev.1.0. Carlsbad (CA), 2013 (siehe S. 141).
- [274] ABCAM PLC: General western blot protocol: Guidance for running an efficient and accurate experiment. Cambridge (UK), 2018 (siehe S. 141).
- [275] PHILIPPE THÊVENAZ, URS E. RUTTIMANN und MICHAEL UNSER: "A Pyramid Approach to Subpixel Registration Based on Intensity". *IEEE Transactions on Image Processing* 7(1), S. 27–41 (1998) (siehe S. 145, 151).
- [276] CHRISTOPH SOMMER, CHRISTOPH STRAEHLE, ULLRICH KOETHE und FRED A. HAMPRECHT: "Ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit". 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro. IEEE. 2011, S. 230–233 (siehe S. 147).
- [277] MATLAB: Image Processing Toolbox (R2018b): locallapfilt. Natick (MA): The MathWorks Inc., 2018 (siehe S. 147).
- [278] DANIEL BLAIR und ERIC DUFRESNE: "The matlab particle tracking code repository". Particletracking code available at http://physics.georgetown.edu/matlab (2013) (siehe S. 147).
- [279] HONG QIAN und ELLIOT L. ELSON: "On the analysis of high order moments of fluorescence fluctuations". *Biophysical Journal* 57(2), S. 375–380 (1990) (siehe S. 148).
- [280] YAN CHEN, JOACHIM D. MÜLLER, QIAOQIAO RUAN und ENRICO GRATTON: "Molecular Brightness Characterization of EGFP In Vivo by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy". *Biophysical Journal* 82(1), S. 133–144 (2002) (siehe S. 148).
- [281] MICHELLE A. DIGMAN, ROOSHIN DALAL, ALAN F. HORWITZ und ENRICO GRATTON: "Mapping the Number of Molecules and Brightness in the Laser Scanning Microscope". *Biophysical Journal* 94(6), S. 2320–2332 (2008) (siehe S. 148).

- [282] MATLAB: Image Processing Toolbox (R2018b): regionprops. Natick (MA): The MathWorks Inc., 2018 (siehe S. 149).
- [283] JOSEPH RUDNICK und GEORGE GASPARI: "The Shapes of Random Walks". Science 237, S. 384– 390 (1987) (siehe S. 149).
- [284] SÉBASTIEN HUET, ERDEM KARATEKIN, VIET SAMUEL TRAN, ISABELLE FANGET, SOPHIE CRIBIER und JEAN-PIERRE HENRY: "Analysis of Transient Behavior in Complex Trajectories: Application to Secretory Vesicle Dynamics". *Biophysical Journal* 91(9), S. 3542–3559 (2006) (siehe S. 149).
- [285] MICHAEL J. SAXTON: "Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion". Biophysical Journal 64(6), S. 1766–1780 (1993) (siehe S. 149).
- [286] HAKON WADELL: "Sphericity and Roundness of Rock Particles". The Journal of Geology 41(3), S. 310–331 (1933) (siehe S. 149).
- [287] JUNXING ZHENG und ROMAN D. HRYCIW: "Traditional soil particle sphericity, roundness and surface roughness by computational geometry". *Géotechnique* 65(6), S. 494–506 (2015) (siehe S. 149).
- [288] MARC BARTHÉLEMY: "Spatial Networks". Physics Reports 499(1-3), S. 1–101 (2011) (siehe S. 150).
- [289] STEFANO BOCCALETTI, VITO LATORA, YAMIR MORENO, MARTIN CHAVEZ und DONG-UK HWANG: "Complex networks: Structure and dynamics". *Physics Reports* 424(4-5), S. 175–308 (2006) (siehe S. 150).
- [290] KHULOUD JAQAMAN, DINAH LOERKE, MARCEL METTLEN, HIROTAKA KUWATA, SERGIO GRIN-STEIN, SANDRA L. SCHMID und GAUDENZ DANUSER: "Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences". *Nature Methods* 5(8), S. 695–702 (2008) (siehe S. 151).
- [291] TON DIEKER: Simulation of fractional Brownian motion. University of Twente: Masters Thesis, 2004 (siehe S. 152).
- [292] MATLAB: Statistics and Machine Learning Toolbox. Natick (MA): The MathWorks Inc., 2018 (siehe S. 153).

### Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Mit den Tätigkeiten am Lehrstuhl für Experimentalphysik I der Universität Bayreuth zwischen November 2017 bis Dezember 2021 wurde zu verschiedenen wissenschaftlichen Veröffentlichungen beigetragen:

- [Pub 1] Konstantin Speckner, Lorenz Stadler und Matthias Weiss Anomalous dynamics of the endoplasmic reticulum network Physical Review E 98(1), S. 012406 (2018).
- [Pub 2] Lorenz Stadler, <u>Konstantin Speckner</u> und Matthias Weiss Diffusion of Exit Sites on the Endoplasmic Reticulum: A Random Walk on a Shivering Backbone Biophysical Journal 115(8), S. 1552–1560 (2018).
- [Pub 3] Konstantin Speckner, Lorenz Stadler und Matthias Weiss Unscrambling exit site patterns on the endoplasmic reticulum as a quenched demixing process
   Biophysical Journal 120(12), S. 2532–2542 (2021).
- [Pub 4] Konstantin Speckner, Florian Rehfeldt und Matthias Weiss The random walkers Swiss army knife for analyzing and interpreting singleparticle tracking data Manuskript eingereicht (2022).
- [Pub 5] Jana Jentzsch, Adal Sabri, Konstantin Speckner, Gertrud Lallinger-Kube, Matthias Weiss und Klaus Ersfeld Microtubule polyglutamylation is important for regulating cytoskeletal architecture and motility in Trypanosoma brucei Journal of Cell Science 133(18), jcs248047 (2020).
- [Pub 6] Konstantin Speckner und Matthias Weiss Single-Particle Tracking Reveals Antipersistent Subdiffusion in Cell Extracts Entropy 23(7), S. 892 (2021).

Die weitgehend in der Masterarbeit des Autors [81] dargelegten Ergebnisse zu dynamischen Eigenschaften des tubulären ER-Netzwerks sind in [Pub 1] veröffentlicht. Anschließende Untersuchungen über die Bewegung der ERES, die einen wesentlichen Bestandteil der Dissertation von Herrn Lorenz Stadler [72] darstellen, sind in Bezug zur Dynamik des ERs in [Pub 2] dargestellt. Beide Veröffentlichungen bilden die Grundlage für [Pub 3], zu physikalischen Hintergründen der Musterbildung von ERES bei Säugetierzellen. Diese Ergebnisse werden in Teil II dargelegt. Ein Manuskript [Pub 4] über dynamische Eigenschaften nuklearen Aktins basierend auf Einzelteilchentrajektorien (siehe Teil III) ist in Vorbereitung. Ferner wurde zu Experimenten von [Pub 5] beigetragen und Untersuchungen der viskoelastischen Subdiffusion in Zellextrakten wurden in [Pub 6] veröffentlicht.

## Auswahl von Konferenzbeiträgen

- <u>Konstantin Speckner</u>, Lorenz Stadler und Matthias Weiss *Tracking the dynamics of the endoplasmic reticulum* Poster auf der 2018 Quantitative BioImaging Conference in Göttingen, Januar 2018.
- <u>Konstantin Speckner</u>, Lorenz Stadler und Matthias Weiss *Tracking network dynamics and topology of the endoplasmic reticulum* Poster auf der DPG-Frühjahrstagung (Sektion kondensierte Materie) in Berlin, März 2018.
- <u>Konstantin Speckner</u>, Lorenz Stadler und Matthias Weiss *Anomalous diffusion of endoplasmic reticulum constituents*  Poster auf dem 63<sup>rd</sup> Annual Meeting der Biophysical Society in Baltimore (USA), März 2019.
- <u>Konstantin Speckner</u>, Lorenz Stadler und Matthias Weiss Non-equilibrium dynamics of endoplasmic reticulum structures
   Vortrag auf der DPG-Frühjahrstagung (Sektion kondensierte Materie) in Regensburg, April 2019.
- <u>Konstantin Speckner</u>, Lorenz Stadler und Matthias Weiss Diffusion and condensation of endoplasmic reticulum constituents
   Poster auf der Arnold Sommerfeld School on "The Physics of Life" in München, Oktober 2019.
- <u>Konstantin Speckner</u>, Lorenz Stadler und Matthias Weiss *Condensation of endoplasmic reticulum membrane domains*  Vortrag auf der 2020 Quantitative BioImaging Conference in Oxford (UK), Januar 2020.
- <u>Konstantin Speckner</u>, Lorenz Stadler und Matthias Weiss Self-organization of endoplasmic reticulum exit sites
   Vortrag auf der virtuellen DPG-Frühjahrstagung, März 2021.

# Danke!

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen herzlich danken, die mich während der letzten Jahre in Bayreuth begleitet und stets unterstützt haben. Ohne euch wäre die Promotion nicht möglich und auch nur halb so schön gewesen! Eine namentliche Nennung möchte ich jedoch der Druckfassung vorbehalten.

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Des Weiteren versichere ich, dass die digitale und die gedruckte Version inhaltlich identisch sind.

Weiterhin erkläre ich, dass ich die Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern beziehungsweise Promotionsvermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Zusätzlich erkläre ich hiermit, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe.

Bayreuth, den 01. Mai 2022

Konstantin S. A. Speckner