

Analyse der intranukleären Dynamik und des Exports der ribosomalen 60S-Untereinheit

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jan Andreas Ruland

aus Troisdorf

Bonn, April 2021

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck

2. Gutachter: Prof. Dr. Olav Schiemann

Tag der Promotion: 24.08.2021

Erscheinungsjahr: 2021

Zusammenfassung

Die Proteinbiosynthese wird von Ribosomen - großen molekularen Maschinen - durchgeführt, die aus zahlreichen verschiedenen Proteinen und einem ribosomalen RNA-Rückgrat bestehen. Die Biogenese der ribosomalen Untereinheiten von Säugetieren beginnt im Nukleolus mit dem 90S-Vorläuferpartikel, das sukzessive in die prä-40S- und prä-60S-Untereinheiten gespalten wird. In weiteren Prozessierungsschritten werden die Untereinheiten mit Exportrezeptoren beladen, was ihre Durchquerung der Kernporenkomplexe ins Zytoplasma ermöglicht. Hier erfolgt die Freisetzung der Exportfaktoren und beide Untereinheiten können zusammen das finale Ribosom bilden.

Die ribosomale Biogenese ist bisher mit biochemischen, genetischen und elektronenmikroskopischen Methoden sehr detailliert untersucht worden, jedoch stellt die Bestimmung der *in vivo* Kinetik in lebenden Zellen immer noch eine große Herausforderung dar.

In dieser Arbeit wurde die Export-Kinetik der großen ribosomalen Untereinheiten ("prä-60S-Partikel") durch einzelne Kernporenkomplexe in lebenden menschlichen Zellen bestimmt. Zur Untersuchung dieses Prozesses *in vivo*, wurde eine stabile Zelllinie erstellt, welche HaloTag-markiertes eIF6 und GFP-gebundenes NTF2 ko-exprimiert, zur simultanen Beobachtung der großen 60S-Untereinheit (eIF6) und der Kernporen (NTF2). Durch eine Kombination von hochauflösender konfokaler Mikroskopie mit einer schnellen und sensitiven Einzelmolekülverfolgung in einem selbstentwickelten Mikroskop-Aufbau konnte die Dynamik einzelner prä-60S-Partikel während der Interaktion mit und des Exports durch einzelne Kernporen sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise ergaben sich bisher noch nie gezeigte Einblicke in die Kinetik und Dynamik dieses zellulären Schlüsselprozesses.

In dieser Studie zeigte sich, dass für Export-Ereignisse die prä-60S-Partikel vor allem im Zentrum der Kernpore akkumulieren, während nicht-erfolgreiche Exporte innerhalb des nukleären Korbs abbrechen. Der Exportvorgang erfolgt mit nur einem geschwindigkeitsbestimmendem Schritt und einer Translokationszeit von ~24 Millisekunden. Nur 1/3 der Exportvorgänge waren erfolgreich. Unter Berücksichtigung der molekularen Masse der prä-60S-Partikel folgte außerdem, dass der Massenfluss durch eine einzelne Kernpore *in vivo* bis zu ~125 MDa/s betragen kann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Kernporenkomplexe und nukleo-zytoplasmatischer Transport.....	10
1.2	Ribosombiogenese und ribosomaler Export.....	16
1.3	Motivation und Zielsetzung.....	23
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Material.....	25
2.1.1	Chemikalien.....	25
2.1.2	Spezielle Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3	Geräte und Bauteile.....	27
2.1.4	Medien und Puffer.....	28
2.1.5	Plasmide und Zelllinie.....	30
2.2	Zellkultur.....	30
2.2.1	Passagieren von Zellen.....	30
2.2.2	Kryokonservierung von Zellen.....	31
2.2.3	Transiente Expression.....	31
2.2.4	Fluoreszenzfärbung.....	31
2.3	Proteinaufreinigung und Immunoblot.....	31
2.4	Export-Hemmung der prä-60S Partikel mittels Leptomycin B (LMB).....	32
2.5	Hemmung der RNA-Transkription mittels Aktinomycin D.....	32
2.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	33
2.6.1	Superauflösende konfokale und Einzelmolekül-Mikroskopie der selben optischen Ebene	37
2.6.2	Referenzpartikel zur Anpassung der mikroskopischen Aufnahmen.....	38
2.6.3	Datenaufnahme.....	42
2.7	Datenanalyse.....	43
2.7.1	Bildverarbeitung der EMCCD-Kameraaufnahmen.....	43
2.7.2	Bildverarbeitung der konfokalen Aufnahmen.....	43
2.7.3	Bestimmung der Transformationsmatrix.....	44
2.7.4	Farbverschiebung.....	45

2.7.5	Einzelmolekülbeobachtung.....	45
2.7.6	Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision	47
2.7.7	Ko-Lokalisierungspräzision.....	47
2.7.8	Bestimmung der Porenposition.....	48
2.7.9	Isolation der Interaktionen mit einzelnen Kernporen	49
2.7.10	Bestimmung des Membranverlaufs	49
2.7.11	Kategorisierung der Interaktionen	50
2.8	Mobilitätsanalyse der prä-60S-Untereinheiten innerhalb des Nukleoplasmas mittels Spot-On	53
2.9	Modellierung der Verweilzeit und Bestimmung der kinetischen Parameter	54
2.10	Anordnung der Exportereignisse entlang der Transportachse.....	56
2.11	Bestimmung der Position von NTF2 innerhalb der Kernpore	57
3	Ergebnisse	59
3.1	eIF6-HaloTag wird funktional in prä-60S-Untereinheiten integriert	59
3.2	Lokalisation von NTF2	63
3.3	Kombination hochauflösender konfokaler und Einzelmolekül-Mikroskopie	65
3.4	Abbildung einzelner ribosomaler Untereinheiten im Zellkern und Mobilität im Nukleoplasma.....	69
3.5	Interaktion einzelner ribosomaler Untereinheiten mit Kernporen und Kategorisierung der Interaktionen.....	71
3.6	Nukleärer Export von prä-60S-Untereinheiten und Exportkinetik	73
3.7	"Gescheiterte" Exporte der prä-60S-Untereinheit	76
4	Diskussion	77
5	Fazit und Ausblick	85
	Literaturverzeichnis	87
	Abkürzungsverzeichnis.....	102
	Abbildungsverzeichnis.....	105
	Tabellenverzeichnis.....	107
	Anhang aller Export-Ereignisse	109
	Danksagung.....	111

1 Einleitung

Die Proteinbiosynthese wird in allen Säugetierzellen durch Ribosomen durchgeführt. Diese großen molekularen Maschinen bestehen aus zahlreichen verschiedenen Proteinen und einem ribosomalen Ribonukleinsäure-(*ribonucleic acid*, RNA)-Rückgrat. In eukaryotischen Zellen beginnt die Synthese der Ribosomen im Zellkern mit der Transkription der ribosomalen RNA und Formation eines 90S-Vorläuferpartikels, das sukzessive in eine prä-60S- und eine prä-40S-Untereinheit gespalten wird. Bei weiteren Prozessierungsschritten werden die Untereinheiten mit Exportrezeptoren beladen, was ihren Transport durch die Kernporenkomplexe in das Zytoplasma ermöglicht. Hier werden die Exportfaktoren abgelöst, die Untereinheiten finalisiert und letztendlich das Ribosom gebildet. Die Ribosombiogenese ist durch biochemische und genetische Ansätze sehr detailliert untersucht worden, jedoch basierten alle Untersuchungen auf statischen Methoden. So konnten viele Faktoren identifiziert werden, die in den verschiedenen Schritten Einfluss auf die Biogenese nehmen. Das genaue Zusammenspiel dieser Faktoren ist dabei oft aber noch unklar und die Dynamik der einzelnen Schritte ist experimentell immer noch schwer bestimmbar. Insbesondere der Exportschritt durch die Kernporenkomplexe konnte bisher nur einmalig experimentell durch Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden [1].

1.1 Kernporenkomplexe und nukleo-zytoplasmatischer Transport

Eukaryotische Zellen bestehen aus einer Vielzahl von Organellen, die viele unterschiedliche Funktionen ausführen. Das größte Organell ist hierbei der Zellkern, welcher durch eine eigene Doppelmembran vom Zytoplasma getrennt ist. Der Nukleus speichert die Erbinformation in Form von Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) und in ihm finden verschiedene Prozesse zur Verarbeitung der genetischen Information statt, wie z.B. die Transkription, die Prozessierung der durch die Transkription entstandenen mRNA (*messenger RNA*) und die Synthese der Ribosomen [2–4].

Für alle Funktionalitäten werden diverse Proteine benötigt, die im Zytoplasma synthetisiert und entsprechend in den Zellkern importiert werden. Die mRNA-Partikel und die Vorläufer der Ribosomen werden wiederum in das Zytoplasma exportiert. Für den Austausch zwischen den beiden Kompartimenten der Zelle sind die Kernporenkomplexe (*nuclear pore complex*, NPC) verantwortlich [5, 6]. Diese in Eukaryoten hoch konservierten, makromolekularen Protein-Komplexe zeichnen sich durch ihre immense Größe von 120 Megadalton (MDa) in menschlichen Zellen aus und bestehen aus ungefähr 30 verschiedenen Kernporenproteinen, die Nukleoporine (Nups) genannt werden [5]. In Abbildung 1-1 sind die Größenverhältnisse und der grobe Aufbau der Kernpore dargestellt. Die Nups sind in einer achtfachen Radialsymmetrie angeordnet und können entsprechend acht- bis 64-mal pro Kernpore vertreten sein [5].

Strukturell besteht die Kernpore aus verschiedenen Elementen. Im transmembranen Bereich liegt der innere Ring, welcher mit Phenylalanin-Glycin-Nups (FG-Nups) gefüllt ist. Diese bestehen aus multiplen, ungefalteten Phe-Gly-Einheiten und bilden so ein dichtes Netzwerk innerhalb der Pore [5, 6]. Während kleinere Proteine unter 40 kDa, Ionen, kleine Moleküle und Metaboliten frei passieren können, stellen diese FG-Nups eine Barriere für größere Makromoleküle dar. Diese müssen deshalb signalvermittelt durch den NPC transportiert werden [7, 8]. Auf der nukleoplasmatischen Seite befindet sich noch der nukleoplasmatische Ring und eine korbähnliche Ausstülpung, die in das Nukleoplasma reicht. Auf der zytoplasmatischen Seite hingegen befindet sich bei Säugetieren, neben dem zytoplasmatischen Ring, noch acht Filamente bestehend aus FG-Nups, welche in das Zytosol reichen [5, 6].

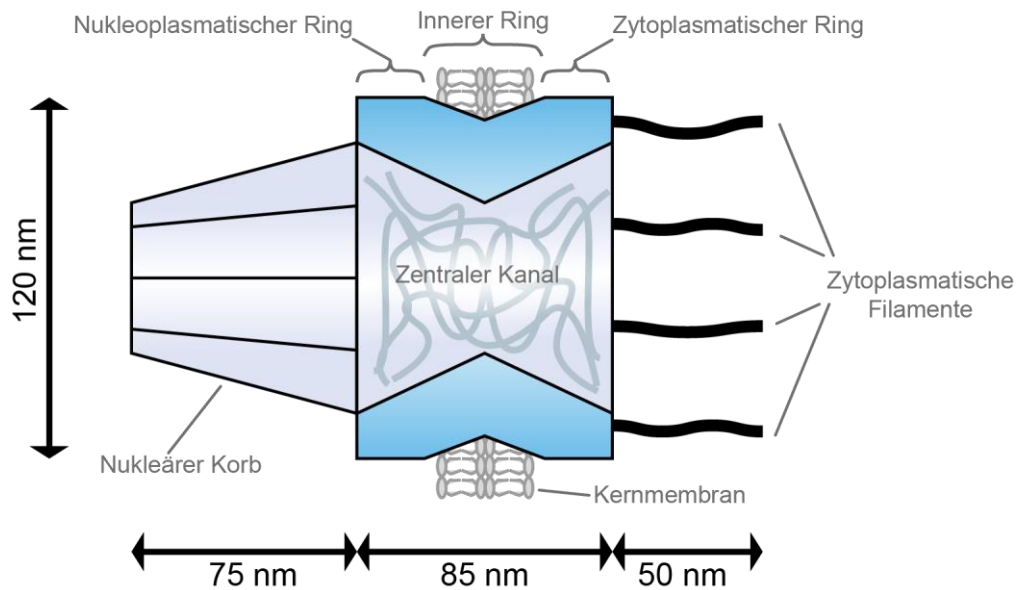


Abbildung 1-1 - Schematische Darstellung eines typischen Säugetier-Kernporenkomplexes mit den entsprechenden Größenverhältnissen basierend auf [9, 10].

Ein signalvermittelter nukleo-zytoplasmatischer Transport über die Kernporenkomplexe für größere Substrate findet in beide Richtungen statt, ist aber energieabhängig und benötigt verschiedene Hilfsfaktoren. Außerdem müssen sie entsprechende Proteine Signalsequenzen aufweisen, die die Bindung von Transportrezeptoren ermöglichen. Für den Proteinimport wird beispielsweise ein sogenanntes Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, abgekürzt NLS) benötigt [10], [11]. Dieses ermöglicht dann die Bindung von Transportrezeptoren (*nuclear transport receptors*, NTRs) der Importin β (Imp β) bzw. Importin α (Imp α)-Familie [11].

Für den Export müssen die Transportsubstrate eine Kernexportsequenz (*nuclear export sequence*, NES) aufweisen, welche dann die Bindung eines Exportins, wie zum Beispiel Crm1 (*chromosomal region maintenance 1*, alternativ *Exportin 1*, Xpo1), und RanGTP (*Ras-related Nuclear Protein* gebunden an Guanosintriphosphat) ermöglicht [13–15]. Nach dem Export wird der Komplex durch Hydrolyse des an Ran gebundenen GTPs zu Guanosindiphosphat (GDP) durch RanGAP getrennt und das exportierte Substrat freigesetzt [16] (Abbildung 1-2-A).

Das RanGDP selbst wird am nukleären Chromatin durch RCC1, RanGEF (*GTP exchange factor*) und GTP wieder zu RanGTP recycelt. Dafür wird es durch den nukleären Transportfaktor 2 (NTF2) in den Kern transportiert. Der so entstehende RanGTP-RanGDP-Gradient bewirkt die Richtungslosigkeit der Export- und Importprozesse [16, 17] (Abbildung 1-2-B).

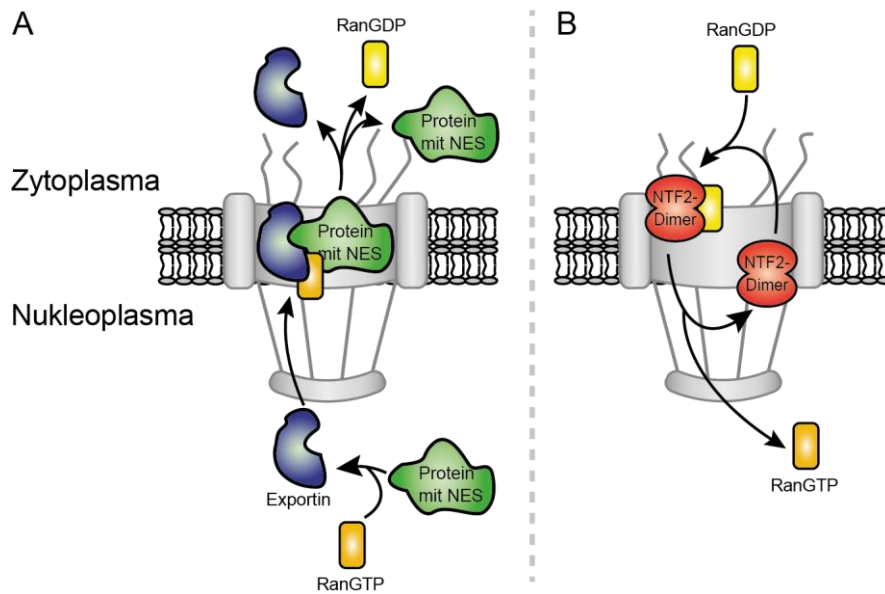


Abbildung 1-2 - Schematische Darstellung (A) des Protein-Exports und (B) des Re-Imports von RanGDP mittels NTF2. Details siehe Text.

Da sich NTF2 in hoher Frequenz in beide Richtungen durch die Kernpore bewegt [18], eignet es sich sehr gut, um Kernporen für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zu lokalisieren, wie Siebrasse *et al.* (2012) zeigten [19, 20]. Durch Fluoreszenzmarkierung der Strukturproteine der Kernpore ergeben sich pro Pore in der Regel nur maximal 8-16 immobile Fluorophore, während NTF2 mit einer Frequenz von ~ 60 NTF2-Molekülen $s^{-1} NPC^{-1}$ konstant erneuert wird [18].

Der Export von mRNA verläuft hingegen deutlich anders. mRNA entsteht durch den Prozess der Transkription eines definierten Genabschnitts, bei dem die doppelsträngige DNA in dem entsprechenden Abschnitt in einzelsträngige RNA umgeschrieben wird. Während dieses Prozesses wird eine Vielzahl von Proteinen an den RNA-Strang gekoppelt und dieser ständig weiter modifiziert, sodass er nicht als einfacher Strang vorliegt, sondern als *messenger* Ribonukleoprotein-Komplex (mRNP) [21].

Den wichtigsten mRNA-Export-Rezeptor stellt das Heterodimere Mex67-Mtr2 (Tap-NXT1 oder NXF1 in Säugetieren) dar. Dieser wird schon ko-transkriptional an das mRNP gebunden kann auch als ein mobiles Nucleopurin verstanden werden, da seine Funktion ausschließlich auf den NPC begrenzt ist [22–27]. Solange das mRNP-Partikel mit den Exportfaktoren beladen ist, kann es sich frei durch die Kernpore bewegen. Um zu verhindern, dass die Partikel nach dem Export wieder zurück in das Nukleoplasma diffundieren, werden die Exportfaktoren direkt auf der zytosolmatischen Seite der Kernporenkomplexe entfernt. Das geschieht Adenosintriphosphat-(ATP)-abhängig durch die DEAD-Box Helikase Dbp5 mit Gle1 und Inositol-Hexakisphosphat (IP_6)

als Hilfsfaktoren. Dies verhindert ein Wiedereindringen des mRNPs in den NPC und legt so die Direktionalität des mRNA-Exports fest [28–32].

Wie genau dieser Export durch die Pore dann abläuft und wie die Kinetik dieses Prozesses aussieht, wird seit Jahrzehnten intensiv untersucht. Erstmals wurde der Exportschritt einzelner mRNPs experimentell 1992 von Daneholdt und Mitarbeitern nachgewiesen. In Speicheldrüsenzellen von *Chiromomus tentans* zeigten sie mittels Elektronenmikroskopie wie einzelne, endogene mRNPs von Balbiani-Ringen, transkriptionsaktive Regionen in polytären Riesenchromosomen, durch Kernporen exportiert werden (Abbildung 1-3-A bis D). So identifizierten sie drei diskrete Schritte dieses Prozesses. Zuerst lagert sich das Partikel an der Pore an, wird dann durch die Pore transportiert und zuletzt in das Zytoplasma freigesetzt [33].

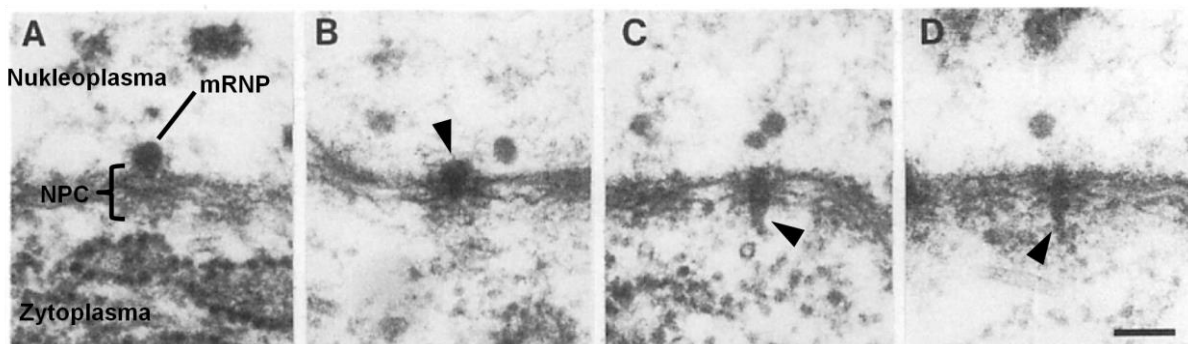


Abbildung 1-3 - Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Balbiani-Ring-mRNPs in verschiedenen Stadien während der Translokation durch Kernporenkomplexe. In der Mitte ist der dunkel gefärbte NPC zu erkennen. Das mRNP-Partikel ist zunächst oberhalb der Kernpore an den nukleoplasmatischen Korb gebunden (A). Anschließend wird das Partikel (schwarze Pfeile) durch die Kernpore transportiert und ändert seine Konformation zu einer stabförmigen Struktur (B-D). Die Maßstabsskala entspricht 100 nm. (aus [33])

Um auch die Dynamik dieses Prozesses aufzuschlüsseln, etablierten sich ab 2010 erste fluoreszenzmikroskopische Ansätze, die die Verfolgung einzelner mRNPs in lebenden Zellen möglich machten. Zur Fluoreszenzmarkierung einzelner RNA-Partikel wurde das MS2-System verwendet. Dabei wird die gewünschte mRNA mit 24 RNA-Haarnadel-Sequenzen aus einem Bakteriophagen, ein spezifisch Bakterien infizierender Virus, fusioniert (Abbildung 1-4-A). Bei diesen Haarnadelstrukturen bilden die einzelne RNA-Stränge Basenpaarungen mit sich selbst aus, was zu Stamm-Schleifen-Strukturen führt [34]. Diese Sequenzen können dann von einem MS2-Mantelprotein gebunden werden, welches selbst mit einem auto-fluoreszierenden Protein, wie dem grün fluoreszierende Protein (GFP) oder dem gelb fluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP), konjugiert ist [35, 36].

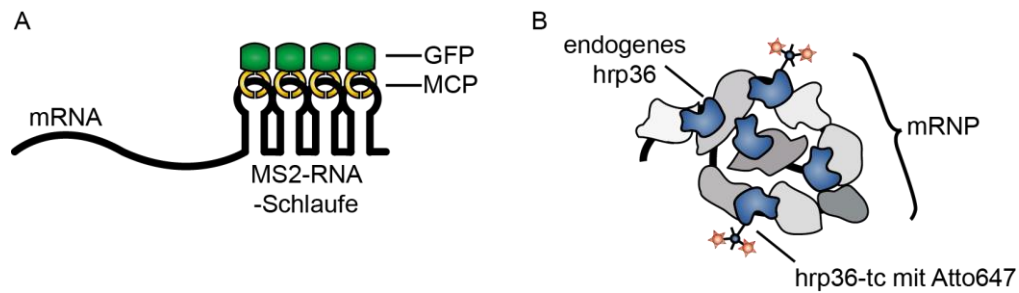


Abbildung 1-4 - Verschiedene Ansätze zur Markierung von RNPs. (A) Bei dem MS2-System bindet ein Mantelprotein (MCP), welches mit GFP fusioniert ist, eine spezifische RNA-Sequenz. Diese Sequenz wird wiederum mit der Ziel-RNA ko-transkribiert. [36] (B) Durch Mikroinjektion von aufgereinigtem und chemisch markiertem hrp36 können einzelne mRNPs fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden, ohne dass die RNA verändert werden muss [20].

Mit ähnlichen Ansätzen gelang verschiedenen Forschergruppen die Bestimmung diverser Translokationszeiten unterschiedlichster RNA-Konstrukte, die in Tabelle 1-1 gegenübergestellt sind. Besonders interessant sind die Beobachtungen von Grünwald und Singer, denen die Abbildung einzelner mRNA-Konstrukte während Interaktion mit einzelnen Kernporen gelang. Dabei wurde eine mit dem MS2-System markierte β -Aktin-mRNA verwendet und die Kernporen mittels des Kernporen-Strukturproteins POM121 sichtbar gemacht, welches mit tdTomato fusioniert war. In Maus-Embryonalfibroblasten (MEFs), mit einer Belichtungszeit von 20 ms und einer Lokalisationspräzision von 26 nm, konnten so einzelne Exporte gemessen werden. Es ergab sich eine Translokationszeit von ~ 180 ms für das verwendete RNA-Konstrukt. Außerdem beobachteten sie, dass die exportierten Partikel bi-modal über die Kernpore verteilt waren, also die mRNP-Partikel vor allem am nukleoplasmatischen und zytoplasmatischen Ring akkumulierten [37].

Die Markierung über das MS2-Haarnadel-System hat jedoch einige Nachteile. So wird zum einen eine systemfremde mRNA-Sequenz in die Zellen eingebracht, die dann exportiert werden muss. Außerdem wird das entsprechende mRNP-Partikel durch die zusätzlichen Haarnadel-Sequenzen und die daran gebundenen GFP- bzw. YFP-Mantelproteine deutlich vergrößert.

Um native mRNA während des Exports verfolgen zu können entwickelten Siebrasse et. al (2012) einen indirekten Weg zur Markierung der mRNPs. Anstatt direkt ein spezifisches RNA-Konstrukt mit einem fluoreszierenden Label zu versehen, wurde hier das Ribonukleoprotein hrp36 (Ortholog des menschlichen hnRNP A1) verwendet. Dieses Protein bindet naszente prä-mRNA und löst sich erst nach dem Export im Zytoplasma. Siebrasse et al. exprimierten dieses Protein in *Escherichia coli* und markierten es anschließend mit dem synthetischen Fluoreszenzfarbstoff Atto647. Durch Mikroinjektion wurde das Protein dann in *C. tentan*-Zellen eingebracht. Auf diese Weise wurde aber nicht eine mRNA spezifisch markiert, wie z.B. die Balbiani-Ring-RNA, sondern

unselektiv alle mRNPs. In Abbildung 1-4-B ist schematisch dargestellt, wie das entsprechende Partikel aussieht. Um die Translokationszeiten zu bestimmen, wurden die Kernporen bzw. die Kernmembran durch in *E. coli* exprimiertes und mit AlexaFluor 488 markiertes NTF2 angefärbt. Mit Hilfe eines Lichtscheibenmikroskops konnten so bei einer Belichtungszeit von 20 ms eine ganze Reihe an Translokationszeiten gemessen werden, die die verschieden großen mRNAs widerspiegeln [20].

Smith *et al.* gelang 2015 noch die spezifische RNA-Markierung in Hefe-Sphäroplasten, Hefezellen ohne Zellwand, mittels des PP7-Systems. Dieses basiert auf dem Bakteriophagen Protein PP7, das analog zum MS2-System funktioniert. Interessanterweise ergab sich im Vergleich zu den früheren Messungen mit dem MS2-System keine bi-modale Verteilung mehr und die Partikel wurden vor allem zentral in der Pore lokalisiert [38].

Tabelle 1-1 - Gegenüberstellung verschiedener, experimentell bestimmter Translokationszeiten unterschiedlicher Studien.			
Zellart	mRNA-Konstrukt	Export-Dauer [ms]	Autor/ Jahr
U2OS (menschlich)	Dystrophin	1000	Mor <i>et al.</i> (2010) [39]
MEF (Maus)	β -Aktin	180	Grünwald & Singer (2010) [40]
Salivary gland (<i>C. tentans</i>)	native mRNA	50-60000	Siebrasse <i>et al.</i> (2012) [20]
HeLa (menschlich)	β -Aktin/ Glühwürmchen Luciferase	~12	Ma <i>et al.</i> (2013) [41]
Spheroplast (<i>S. cerevisiae</i>)	GFA1	181-215	Smith <i>et al.</i> (2015) [38]

1.2 Ribosombiogenese und ribosomaler Export

In bisherigen Studien der Exportkinetik von mRNA-Partikeln schwankt die Größe der verwendeten Konstrukte und damit auch die entsprechenden Translokationszeiten sehr. Außerdem ist die spezifische Markierung einer nativen RNA experimentell herausfordernd. RNP-Partikel mit konstanter Größe stellen hingegen die beiden ribosomalen Untereinheiten dar.

Ribosomen sind in allen Zellen für den Prozess der Translation verantwortlich, also die Synthese der meisten Proteine. Dabei bestehen diese makromolekularen Komplexe selbst aus vielen verschiedenen Proteinen und spezieller ribosomaler RNA (rRNA). Grob lassen sie sich in zwei Untereinheiten teilen, eine größere 60S- und eine kleinere 40S-Untereinheit bilden zusammen das 80S-Ribosom. Die große Untereinheit besteht in menschlichen Zellen aus 47 Proteinen und drei rRNAs, die kleine aus 33 Proteinen und einer rRNA [2, 42, 43].

Während die Proteinsynthese im Zytoplasma stattfindet, beginnt die Biosynthese der Ribosomen im Zellkern mit der Transkription der rRNA [44]. Dabei findet die Transkription aber nicht im Nukleoplasma statt, sondern in einem speziellen Kompartiment, dem Nukleolus.

Nukleoli sind klar vom restlichen Kern getrennte Strukturen, die sich aber nicht durch eine Membran abgrenzen. Sie beinhalten ribosomale DNA, rRNA und verschiedene Proteine [45]. Durch elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass Nukleoli aus unterschiedlich dichten Bereichen bestehen [45, 46]. Im dichtesten Bereich, dem *fibrillar center* (FC), liegt die ribosomale DNA als Heterochromatin kondensiert vor. Die Gene in diesem stark verdichteten Chromatin sind für die Transkription inaktiv. In den weniger dichten Bereich, dem *dense fibrillar components* (DFC), findet die Transkription des 47S-rRNA-Präkursors durch die Polymerase I statt. Bereits währenddessen wird die rRNA modifiziert und bildet mit den ersten ribosomalen Proteinen und verschiedenen Biogenesefaktoren das 90S-Präkursor-Partikel. In weiteren Schritten wird die prä-rRNA in drei kleinere Stränge, die 18S-, 5.8S- und die 25/28S-rRNA, unterteilt. Die beiden Untereinheiten reifen anschließend unabhängig voneinander weiter [44, 47–49].

Eine weitere Maturierung der rRNA findet im Bereich der *granular components* (GC) statt. Hier wird die 5S-rRNA mit der 5.8S- und der 25/28S-rRNA zum Vorläuferpartikel der 60S-Untereinheit zusammengebaut. Die 5S-rRNA ist dabei die einzige ribosomale RNA, die nicht in den Nukleoli synthetisiert wird, sondern von der Polymerase III im Nukleoplasma [44].

Die Prä-40S-Untereinheit besteht aus der 18S-rRNA, den ribosomalen Proteinen und verschiedenen Biogenesefaktoren. Sie wird recht schnell nach der Prozessierung in den Nukleoli in das Zytoplasma exportiert [2, 50–52].

Die prä-60S-Untereinheit durchläuft in den Nukleoli noch weitere Reifungsschritte der rRNAs. Im Nukleoplasma folgt dann noch eine rRNA-Umlagerung und eine räumliche Umorganisation des Partikels, bevor letztendlich die Exportfaktoren rekrutiert werden können und der Export in das Zytosol stattfindet. Im Zytoplasma werden beide Untereinheiten finalisiert und vereinigt [2, 50–52]. Der ganze Prozess ist schematisch und vereinfacht in Abbildung 1-5 dargestellt.

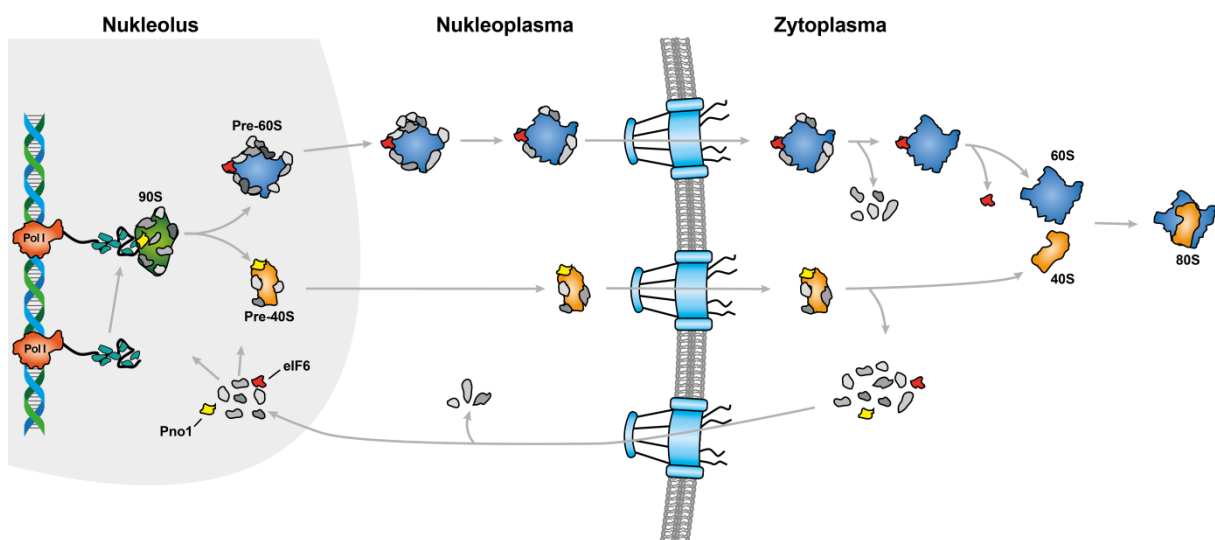


Abbildung 1-5 - Schematische Abbildung der Ribosombiogenese. Details siehe Text. (Basierend auf [51])

Besonders von Interesse für diese Arbeit ist der Exportschritt der prä-Ribosomen. Analysen dieses Schritts basieren bislang vor allem auf statischen Methoden, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen oder der biochemischen Isolation einzelner prä-ribosomaler Komplexe, während die Bestimmung der Dynamik und der detaillierten Mechanismen experimentell weiter schwierig ist.

Für beide Untereinheiten wurden, besonders in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, diverse Export-relevante Faktoren identifiziert, die nahelegen, dass Ribosomen nicht den bereits beschriebenen kanonischen Exportwegen folgen. Da die Exportrate eines einfach Rezeptor-gebundenen Partikels negativ proportional zur Partikelgröße ist [53], ist es auch zu erwarten, dass eine größere Anzahl an Exportfaktoren existieren sollte [54].

Dabei gibt es sowohl Faktoren, die bei beiden Untereinheiten auftreten, als auch spezifische Faktoren, die nur in den Export der großen bzw. der kleinen Untereinheit involviert sind (Abbildung 1-6).

Beide Untereinheiten folgen generell dem Ran-abhängigen Proteinexportweg mittels Crm1, als wichtigstes Exportin [55]. Aber auch der mRNA-Exportfaktor Mex67-Mtr2 scheint den Export zu fördern [56–58]. Mechanistisch wirkt es aber anders als beim mRNA-Export, da es sowohl die rRNAs beider Untereinheiten direkt binden kann und gleichzeitig auch mit den FG-Nups interagiert, aber nach dem Export nicht durch den Dbp5-Zyklus von den ribosomalen Komplexen gelöst wird [59–62]. Ein weiterer Exportfaktor für beide Untereinheiten ist Rrp12, welches mit den FG-Einheiten innerhalb der Pore interagiert [56]. Die genaue mechanistische Funktionsweise ist aber noch unbekannt.

Für die prä-60S-Untereinheit kann zwischen essentiellen und nicht-essentiellen Exportfaktoren unterschieden werden. Der wichtigste essentielle Faktor, ohne den eine Translokation der Untereinheit nicht erfolgt, ist Nmd3. Da die ribosomalen Proteine der großen Untereinheit selbst keine NES besitzen, dient Nmd3 als Adapterprotein zu Crm1 [63, 64]. Zusätzlich kommen noch diverse nicht essentielle Faktoren vor, wie Arx1, Bud20, Ecm1, Npl3 und Gle2 [65–69]. Sowohl diese Faktoren, als auch Mex67-Mtr2, binden an die Oberfläche der prä-60S-Untereinheit und schirmen so die stark geladene Oberfläche dieser Partikel gegen das hydrophobe Innere der NPCs ab und ermöglichen die Ausbildung vieler Interaktionen mit den FG-Einheiten innerhalb der Pore [52]. Ein Fehlen dieser Faktoren führt nicht zwingend zu einem Verlust des Exportvermögens bzw. kann durch Überexpression der anderen Faktoren ausgeglichen werden [66, 67, 70]. Diese verschiedenen Transportwege könnten für Hefe-Zellen den Vorteil haben, auch unter schwierigen Wachstumsbedingungen den prä-60S Export aufrecht erhalten zu können [52].

Im Kontrast dazu wurden für die prä-40S-Untereinheit bisher keine essentiellen Exportfaktoren, wie Nmd3, identifiziert. Wichtige Faktoren, die entsprechende Exportsequenzen aufweisen sind Ltv1, Rio2 und Yrb2 [71–75]. Der prä-40S-Export scheint nicht auf einem einzelnen NES-Adapter zu basieren, sondern abhängig von mehreren Faktoren zu sein. [52].

Wie jedoch bei den verschiedenen Transportwegen zwischen Export-kompetenten und noch nicht fertiggestellte Partikeln unterschieden werden kann ist immer noch nicht ganz geklärt.

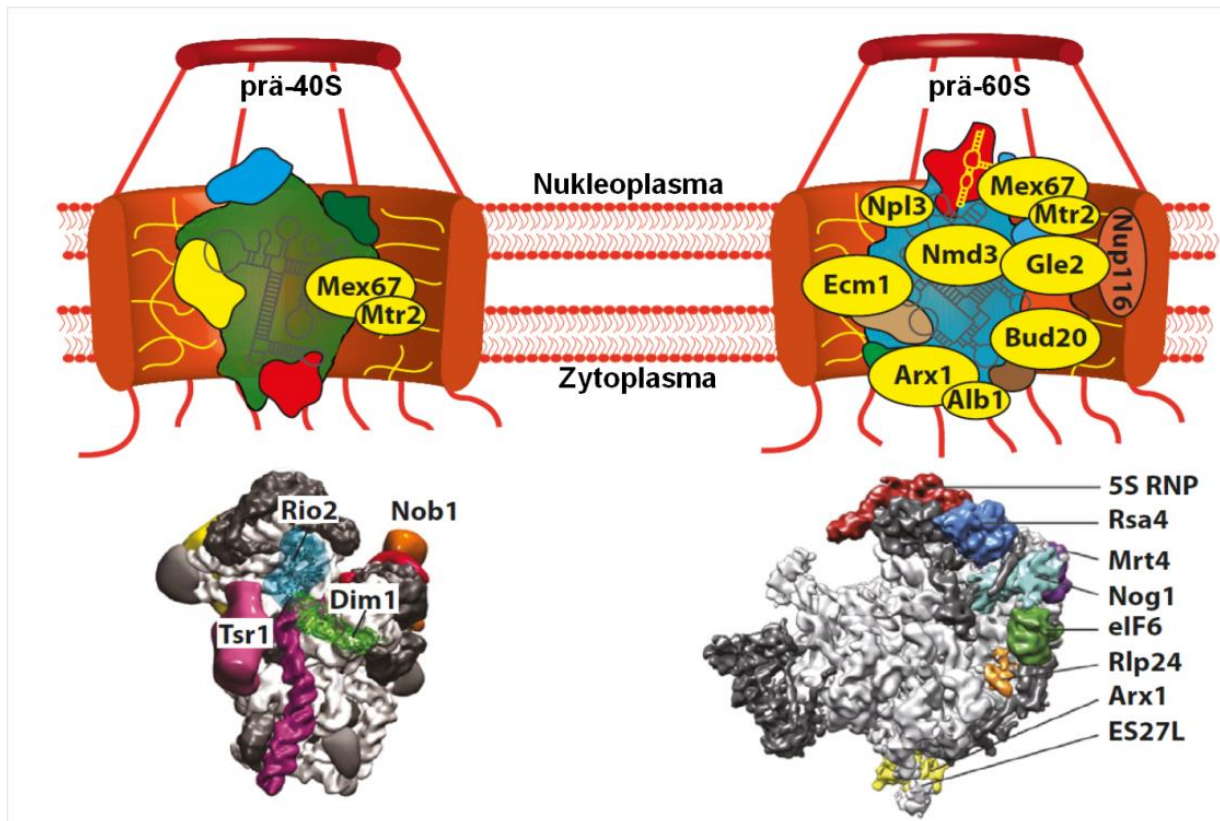


Abbildung 1-6 - Exportfaktoren der Ribosombiogenese. Oben: Schematische Darstellung der beiden ribosomalen Untereinheiten innerhalb der Kernpore mit den wichtigsten Exportfaktoren (gelb). Unten: Cryo-EM-Daten von exportfertigen prä-Ribosomen mit verschiedenen Exportfaktoren. (Modifiziert aus [52])

Während der Biogeneseweg in seinen grundlegenden Schritten über die meisten eukaryotischen Organismen hinweg konserviert ist, ist die humane Ribosombiogenese teilweise wesentlich komplexer, da menschliche Ribosomen deutlich größer als z.B. Hefe-Ribosomen sind [76]. Dies zeigt sich auch bei den involvierten Exportfaktoren.

Prinzipiell erfolgt auch der Export in humanen Zellen mittels Crm1 als Hauptexportrezeptor in Abhängigkeit von RanGTP. Nmd3 dient immer noch als Adapterprotein für die große Untereinheit [77].

Während in Hefe Mex67-Mtr2 sehr wichtig für den Export beider Untereinheiten ist, spielt das humane Gegenstück NXF1-NXT1 keine Rolle [78, 79]. Jedoch konnte für die 60S-Untereinheit der prä-Mikro-RNA und Transfer-RNA (tRNA) Exportfaktor Exp5 als Exportrezeptor identifiziert werden [79, 80]. Außerdem scheint das humane Homolog von Gle2, Rae1, auch im Export beider Untereinheiten mitzuwirken, während es in Hefe nur auf die 60S-Untereinheit beschränkt ist [79]. Für die kleine Untereinheit wurden auch noch diverse weitere nicht essentielle Biogenese-

faktoren identifiziert, die nur bei humanen Zellen zu finden sind, wie R1OK2, PDCD2L und RACK1 [81–84].

Wie der Exportprozess genau durch einzelne Poren abläuft wurde erstmalig 2019 von Delavoie *et al.* mittels Elektronentomographie gezeigt. In Hefe-Zellen identifizierten sie RNPs, die von ihrer Morphologie und Größe der prä-60S-Untereinheit entsprachen. Diese Partikel konnten dann innerhalb der einzelnen Kernporen lokalisiert werden. Durch Überlagerung mit Kryoelektronenmikroskopie-(Cryo-EM)-Daten eines Hefe-NPCs wurden so Rückschlüsse auf den Weg der Ribosomen durch die Pore mit einer Auflösung von 4 nm gezogen (Abbildung 1-7-A). Die prä-60S-Ribosomen bewegten sich entlang der zentralen Achse, nach einer kurzen transienten Interaktion mit dem nukleoplasmatischen Ring, in den inneren Ring der Kernpore. Diese Region scheint für das Partikel energetisch am günstigsten zu sein, da hier eine besonders hohe Dichte an Interaktionen mit den FG-Nups ausgebildet werden kann [85]. Am zytoplasmatischen Ring wichen sie von diesem Kurs seitlich ab, was eine Interaktion mit den asymmetrischen Nukleopurinen der Filamente dort nahelegt (Abbildung 1-7-B). Des Weiteren konnten Delavoie *et al.* zeigen, dass durchschnittlich 5-6% der Kernporen mit einem prä-Ribosom besetzt sind. Durch eine Wahrscheinlichkeitsanalyse, basierend auf der durchschnittlichen Besetzung der NPCs, der Frequenz der Ribosomenproduktion und weiteren Parametern wurde dann eine Exportzeit von ungefähr 90 ms abgeschätzt [1].

teine oder die rRNA direkt mit einem Marker zur Fluoreszenzverfolgung (engl. *Tag*) zu versehen, wurde ein Hilfsfaktor der Biogenese der kleinen Untereinheit Dim2/ PNO1 (*Defective In DNA Methylation 2/ Partner of NOB1*) gewählt. Dim2 bindet in einem frühem Stadium an die naszenten prä-40S-Partikel und bleibt während des ganzen Biogeneseprozesses bis nach dem Export in das Zytoplasma gebunden (Abbildung 1-5). Landvogt *et al.* erstellten eine stabile HeLa-Zelllinie bei der Dim2 mit einem SnapTag fusioniert wurde. Dieses autokatalytische Protein-Tag bindet spezifisch Substratanaloga (engl. *Linker*), wie Benzylcytosin-Derivate, und erlaubt durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen eines synthetischen, Linker-gebunden Farbstoffes, sowohl die gesamte Verteilung des Dim2, als auch, mit sehr geringen Konzentrationen, einzelne prä-40S-Moleküle anzufärben.

Auf diese Weise konnte die Dynamik der prä-40S-Untereinheit innerhalb des Nukleus und der Nukleoli untersucht werden. Der Exportschritt über die Kernmembran wurde jedoch nicht beobachtet [87].

Auf die gleiche Weise sollte in dieser Arbeit die große Untereinheit untersucht werden. Als Marker wurde hier das Protein eIF6 (*Eukaryotic translation initiation factor 6*) gewählt. Gallo *et al.* (2011) zeigten bereits, dass dieses Protein in die prä-60S-Partikel eingebaut wird und genutzt werden kann, um die große Untereinheit fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen [88]. eIF6 bindet schon in den Nukleoli an die naszenten prä-60S-Untereinheiten und verhindert die verfrühte Vereinigung der beiden Untereinheiten, indem die Bindungsstelle zur 40S-Untereinheit blockiert wird [89–91]. Erst im Zytoplasma wird es während der letzten Reifungsschritte von der großen Untereinheit abgespalten [92] (Abbildung 1-5). Eine Markierung von eIF6 mit einem autofluoreszenten Tag hätte, ähnlich wie bei Landvogt *et al.* (2019), verschiedene Vorteile gegenüber einer direkten Markierung ribosomaler Proteine. Zum einen ist das Protein mit 26,5 kDa recht klein und sitzt auf der Außenseite der prä-60S-Untereinheit [89, 93]. Des Weiteren ist es nur temporär Teil des prä-60S-Komplexes. Ein fluoreszenzmarkiertes eIF6-Protein wird wieder recycelt und kann theoretisch mehrfach zur Ribosomenbeobachtung genutzt werden.

1.3 Motivation und Zielsetzung

In den vergangenen Jahrzehnten wurde der nukleo-zytoplasmatische Transport intensiv untersucht. Dabei wurden bei der *in vivo* Beobachtung von mRNA-Partikeln in vielen verschiedenen Organismen diverse Translokationszeiten für unterschiedlichste Konstrukte bestimmt. Eine spezifische Markierung von mRNPs ist jedoch herausfordernd und nur mit einer intensiven Modifikation der Ziel-RNA möglich. Die Markierung der nativen mRNA, wie bei Siebrasse *et al.* (2012), hingegen ist eher unspezifisch.

Im Gegensatz dazu sind RNPs, die während des Exports eine gleichbleibende Größe aufweisen, die Vorläuferpartikel der ribosomalen Untereinheiten. Hier gelang Landvogt *et al.* (2019) bereits die Beobachtung nativer prä-40S-Untereinheiten innerhalb von menschlichen Zellen. Der Export-Schritt konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Außerdem zeigen alle bisherigen Untersuchungen des ribosomalen Exports, dass dieser im Vergleich zu kanonischen Export-Prozessen, anders abläuft. Besonders für *S. cerevisiae* wurden viele verschiedene Export-Rezeptoren identifiziert, die die Komplexität dieses Prozesses aufzeigen. So ist der Export zum einen Crm1-RanGTP-abhängig, zum anderen spielen aber auch Faktoren des mRNA- bzw. des tRNA-Exportes eine wichtige Rolle.

Die Bestimmung der Dynamik dieses Prozesses *in vivo* war bisher experimentell ebenfalls nicht möglich und ist herausfordernd, da sowohl eine hohe räumliche, als auch eine hohe zeitliche Auflösung benötigt wird.

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen eine fluoreszenzmikroskopische Markierung nativer prä-60S-Untereinheiten und die Lokalisierung einzelner Kernporen in menschlichen Zellen zu ermöglichen. Zum anderen sollte ein mikroskopischer Aufbau entwickelt werden, der die Aufnahme von einzelnen prä-60S-Untereinheiten während der Interaktion mit einzelnen Kernporenkomplexen mit der nötigen räumlichen und zeitlichen Auflösung ermöglicht.

Mithilfe dieser gewonnen Erkenntnisse, sollte die Dynamik des Exportprozesses analysiert werden und wichtige Schlüsselpunkte während des Exports, wie der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, identifiziert werden, um so Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus und die genaue Rolle der involvierten Faktoren ziehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2-1 - Auflistung aller verwendeter Chemikalien mit den entsprechenden Herstellern.	
Chemikalien	Hersteller
1-Step Ultra TMB Blotting Solution	Thermo Scientific, Schwerte
Agarose Broad Range	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aktinomycin D	Calbiochem/ Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenol Blau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dulbeccos MEM (DMEM)	Biochrom, Berlin
EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Essigsäure	VWR, Darmstadt
Ethanol	VWR, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
Fluoresbrite Carboxy BB .10 Micron Microspheres	Polysciences, Warrington, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES-Puffer (1M)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Hygromycin-Lösung (50mg/mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Immersionsöl Immersol 518 F für 37°C	Zeiss, Oberkochen
Janelia-Flour-549-HaloTag-Ligand	Janelia, Ashburn, USA [94]
Janelia-Flour-646-HaloTag-Ligand	Janelia, Ashburn, USA [94]
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Leptomycin B (LMB)	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2-1 - Fortsetzung

Chemikalien	Hersteller
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20%	AppliChem, Darmstadt
Neutralrot	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA) 32%	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Puromycin	Alfa Aesar, Ward Hill, USA
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SNAP-Cell® 647-SiR	New England Biolabs, Ipswich, USA
Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimid)	Sigma-Aldrich, Hamburg
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetraspeck (0.1 µm)	Life Siences/ Merck, Darmstadt
Tetraspeck (0.2 µm)	Life Siences/ Merck, Darmstadt
Tris buffer grade	AppliChem, Darmstadt
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsin/EDTA-Lösung 10x	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.2 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2 - Auflistung spezieller Verbrauchsmaterialien und der entsprechenden Hersteller

Name	Hersteller
35-mm-µ-Ibidi-Schalen	Ibidi, Gräfelfing
Amicon Ultra-4 Ultracel-100K Tube	Merck, Darmstadt
Cryo-Konservierungsröhrchen	Nalgene/ Thermo Scientific, Schwerte
Gateway System	Thermo Scientific, Schwerte
HaloTag Mammalian Pull-Down System	Promega, Madison, USA
Immune-Blot PVDF Membrane	Bio-Rad, Hercules, USA
jetPrime (Polyplus)	Polyplus, Illkirch, Frankreich
Retro-X™ Tet-One™ Inducible Expression System	Clontech, Mountain View, USA
Xfect Transfection Reagen (Clontech)	Clontech, Mountain View, USA
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	VWR, Darmstadt
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	VWR, Darmstadt

2.1.3 Geräte und Bauteile

Tabelle 2-3 - Auflistung der verwendeten Gerätschaften und der entsprechenden Hersteller	
Gerät	Hersteller
ibidi Heating System, Universal Fit	Ibidi, Gräfelfing
Axiovert 200 Mikroskopstativ	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
LSM 880 mit Airyscan	Zeiss, Oberkochen
nanoDrop 2000 c	Thermo Scientific, Schwerte
Pipetierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttelinkubator Ecotron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Sterilbank KS12	Heraus, Hanau
ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex, Berlin
Vortexmischer Genius 3	IKA, Staufen
Waage ALC-810.2 Acculab	Bradford, Massachusetts, USA
Wasserbad	GFL, Hannover
Zentrifuge Allegra X-22R	BeckmanCoulter, Krefeld

Tabelle 2-4 - Auflistung spezieller Gerätschaften und Bauteile, die zur Realisation der Einzelmolekül-Beleuchtung und -Detektion verwendet wurden	
Gerät/ Bauteil	Hersteller
5x Strahlerweiterer	Thorlabs, Newton, USA
iXon+ 897D EMCCD-Kamera	Andor, Belfast, UK
Kamera-Adapter 2.5x	Zeiss, Oberkochen
LDM-XT laser series - 405 nm	Lasos, Jena
Obis LS Laser - 561 nm	Coherent, Dieburg
Quad Line Strahlenteiler zt405/488/561/640rpc flat (F73-410)	AHF analysentechnik AG, Tübingen
TIRF-Quad Filterset 405/488/561/640 (F66-04TN)	AHF analysentechnik AG, Tübingen
α -Plan-Apochromat 63x/1.46 Oil Corr M27 Objektiv	Zeiss, Oberkochen

2.1.4 Medien und Puffer

Tabelle 2-5 - Zusammensetzung der Gele und Puffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE</i>)	
Name	Zusammensetzung
Trenngel (12%)	2,4 ml Wasser (reinst) 3,0 ml ROTIPHORESE®Gel 30 (37,5:1) 1,95 ml 1,5 M Tris (pH 8.8) 75 µl SDS (10%) 75 µl Ammoniumpersulfat (10%) 3 µl TEMED
Sammelgel (5%)	1,36 ml Wasser (reinst) 0,34 ml ROTIPHORESE®Gel 30 (37,5:1) 0,26 ml 1,5 M Tris (pH 8.8) 20 µl Ammoniumpersulfat (10%) 2 µL TEMED
Laufpuffer	1,92 M Glycin 0,25 M Tris 1% SDS
Probenpuffer 4x	40 % (v/v) Glycerol 8 % (v/v) SDS 240 mM Tris/ HCl (pH 6,8) 0,04 % Bromphenol Blau

Tabelle 2-6 - Zusammensetzung der Puffer für den <i>Westernblot</i>	
Name	Zusammensetzung
Transferpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin pH 8.3
<i>Tris-buffered saline</i> (TBS)	0,05 M Tris 0,15 M NaCl pH 7,6
TBS-T	TBS 0,1% Tween 20

Tabelle 2-7 - Zusammensetzung des verwendeten Zellmediums.

Name	Zusammensetzung
Zellmedium	10 % FBS superior 2 mM L-Glutamin 1x Pen/ Strep 0,5 µm/mL Puromycin 200 µg/mL Hygromycin

Tabelle 2-8 - Zusammensetzung von phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline, PBS*)

Name	Zusammensetzung
PBS	2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 140 mM Natriumchlorid 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,3

Tabelle 2-9 - Zusammensetzung des MES-Puffers

Name	Zusammensetzung
MES-Puffer	100 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) 500 mM NaCl pH6

2.1.5 Plasmide und Zelllinie

Die Zelllinie und die dafür benötigten Plasmide wurden durch Rohan Bhatia und Sabine Wirths erzeugt (siehe [95]). Die cDNA von eIF6 wurde aus dem Vektor EX-I0088-M50 (Genecopeia) amplifiziert und in den *Gateway* Vektor pQCXIH-Halo-GW mittels des *Gateway* Systems (Thermo Fisher) kloniert.

Die NTF2-cDNA (NM_005796.3) wurde in den *Gateway* Vektor pQCXIP-eGFP-GW (Clonotech) kloniert.

In dieser Arbeit wurden HeLa S3 Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Diese wurden mittels des *Retro-X™ Tet-One™ Inducible Expression System* (Clonotech) entsprechend der Herstellerangaben mit den eIF6- und NTF2-Konstrukten modifiziert. Zunächst wurde eine Zelllinie mit dem eGFP-NTF2-Konstrukt erzeugt und dann weiter mit dem eIF6-HaloTag-Konstrukt verändert. Die Transfektionen wurden mit dem *Xfect Transfection Reagen* (Clonotech) durchgeführt.

Die Verwendung des HaloTags, eine abgewandelte Form einer bakteriellen Haloalkan-Dehalogenase, hat den Vorteil, dass dieser spezifisch einen synthetischen Chloralkan-Liganden [96, 97] bindet und erlaubt so im Vergleich zu autofluoreszierenden Tags durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen synthetischer Farbstoffe die sichtbare Menge an markierten 60S-Partikeln zu steuern.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Passagieren von Zellen

Bei 70-80 %iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Das alte Medium wurde entfernt und die Zellen mit 10 mL PBS (Tabelle 2-8) vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde für eine 25 cm² Zellkulturflasche 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung (1x) zugegeben und für 3-5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Beendigung der Trypsinierung erfolgte mit 9 mL Medium (Tabelle 2-7) (auf 37 °C vorgewärmt). In einer neuen 25 cm² Zellkulturflasche wurden 9 mL Medium vorgelegt und 1 mL Zellsuspension zugefügt. Die Zellen inkubierten immer bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurden diese in einer 75 cm² Zellkulturflasche bis zur 90 %igen Konfluenz herangezogen, das alte Medium entfernt und die Zellen mit 2 mL Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden gelöst. Anschließend wurden 10 mL Medium zugegeben, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 200 rpm, 30 °C und *Deceleration* (Dec.) 1 zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 10 mL Einfriermedium (FBS mit 1 % DMSO) resuspendiert, dann in 1 mL Fraktionen auf Kryoröhrchen aufgeteilt und sofort in einen *Mr.-Frost*-Gefrierbehälter (ThermoFisher) überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei -80°C in dem Gefrierbehälter gelagert und anschließend in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.3 Transiente Expression

Für transiente Proteinexpression wurden entsprechende Hela Zellen zwei Tage vor dem Experiment in 35-mm- μ -Ibidi-Schalen ausgesät. Am Tag vor dem Experiment erfolgte eine Transfektion die Zellen mit 2 μ g Plasmid. Hierzu wurde das *jetPrime* (Polyplus) Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Zellen wurden anschließend für 16-24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.4 Fluoreszenzfärbung

24 h vor dem Experiment wurden die Zellen passagiert und in eine 35-mm- μ -Ibidi-Schale ausgesät. Jede Schale enthielt 500 μ L Zellsuspension und 500 μ L Medium. Am Tag des Experiments erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit Janelia-Flour-549-HaloTag-Ligand (JF546) oder Janelia-Flour-646-HaloTag-Ligand (JF646) [94]. Für Übersichtsaufnahmen wurden die Zellen mit einer finalen Konzentration von 0,1 μ M und für Einzelmolekülaufnahmen mit einer Konzentration von 0,3-1 nM angefärbt. Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C/ 5% CO₂ mit dem Farbstoff inkubiert, anschließend dreimal mit 2 mL PBS gewaschen und zum Schluss 1 mL Medium zugefügt.

2.3 Proteinaufreinigung und Immunoblot

Die Zellen wurden in zwei 75 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Zur Aufreinigung von eIF6-HaloTag wurde das *HaloTag Mammalian Pull-Down System* von Promega entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Die Proteine wurden anschließend durch Elektrophorese in einem 12% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) aufgetrennt (erst 10 min bei 120 V, dann 30 min bei 180 V, Tabelle 2-5) und auf eine *Immune-Blot* PDVF Membran von Bio-Rad in einem *Semi-Dry-Westernblot* bei 25 V und 0.3 A für 35 min übertragen.

Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit 3 % Milchpulver in TBS-T (Tabelle 2-6) blockiert. Anschließend wurde erst für 2 h mit einem anti-RPL10-Antikörper (1:500 in 3% Milchpulver in TBS-T, *RPL10 Monoclonal Antibody* (OTI6B11), #TA807662, Thermo Fisher) inkubiert, dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen und dann mit einem Meerrettichperoxidase- (*horseradish peroxidase*, HRP)-Antikörper (1:1000 in 3% Milchpulver in TBS-T, *anti-goat IgG-HRP*, #sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen und dann mit Hilfe der *1-Step Ultra TMB Blotting Solution* nach Herstellerangaben entwickelt.

2.4 Export-Hemmung der prä-60S Partikel mittels Leptomycin B (LMB)

Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben, in Ibidi-Schalen ausgesät und mit 100 mM HEPES gepuffert. Direkt vor der Messung erfolgte die Zugabe der LMB-Lösung (10 µM in Ethanol). Die finale Konzentration lag bei 50 nM bzw. 100 nM. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 h alle 10 min bei aktiver Fokusstabilisierung durch das *Definite Focus System* des Zeiss *Laser-Scanning*-Mikroskop (LSM) 880 bei einer Temperatur von 37 °C abgebildet.

2.5 Hemmung der RNA-Transkription mittels Aktinomycin D

Auch hier wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, in Ibidi-Schalen ausgesät und mit 100 mM HEPES gepuffert. 10 µL einer 1 mg/mL Aktinomycin-D-Lösung (finale Konzentration 10 µg/mL) wurde gegeben und die Messung sofort gestartet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h vermessen, während sie bei einer Temperatur von 37 °C inkubierten. Alle 10 min wurden die Zellen einmal abgebildet, während der Fokus die ganze Zeit stabilisiert war.

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

In dieser Arbeit wurde ein hochauflösendes konfokales *Laserscanning* Mikroskop 880 (LSM880, Zeiss) mit einem Airyscan-Detektor um eine *highly inclined and laminated optical sheet* (HILO)-Beleuchtung und eine *electron multiplying charge-coupled device* (EMCCD)-Kamera erweitert. Dies ermöglichte die quasi-simultane Abbildung von sich schnell bewegenden einzelnen Partikeln mittels der HILO-Mikroskopie und feiner zellulärer Strukturen durch das LSM880.

Die Auflösung herkömmlichen Weitfeldmikroskopie ist entsprechend dem Rayleigh-Kriterium beschränkt [98]. Dies gibt in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ und der numerischen Apertur (NA) eines Objektivs die minimale Distanz d zwischen zwei Punktobjekten an, um diese noch als zwei getrennte Objekte wahrnehmen zu können (Formel (2-1)):

$$d = 0,61 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (2-2)$$

Konfokale Mikroskopie erlaubt hingegen die Abbildung von Proben mit einem deutlich verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis und dadurch auch erhöhter Auflösung. Dabei wird ein kohärenter Laser mit einer spezifischen Wellenlänge in die fokale Ebene des Objektivs fokussiert. Das von den Fluorophoren emittierte Licht wird durch entsprechende dichroitische Spiegel von reflektiertem Anregungslicht getrennt und auf eine Lochblende fokussiert. Der Durchmesser dieser Lochblende wird in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge so gewählt, dass Licht außerhalb des Fokuspunktes (gestrichelte blaue und rote Linie in Abbildung 2-1) oder durch Streuung entstandenes Licht blockiert wird. Das verbleibende Emissionslicht aus dem Fokuspunkt wird auf einen Detektor, zum Beispiel ein *photomultiplier tube* (PMT), fokussiert (Abbildung 2-1). Da immer nur ein Punkt innerhalb der Probe detektiert wird, muss entweder die Probe oder der Laser verschoben werden, um größere Bereiche mikroskopisch abzubilden [99].

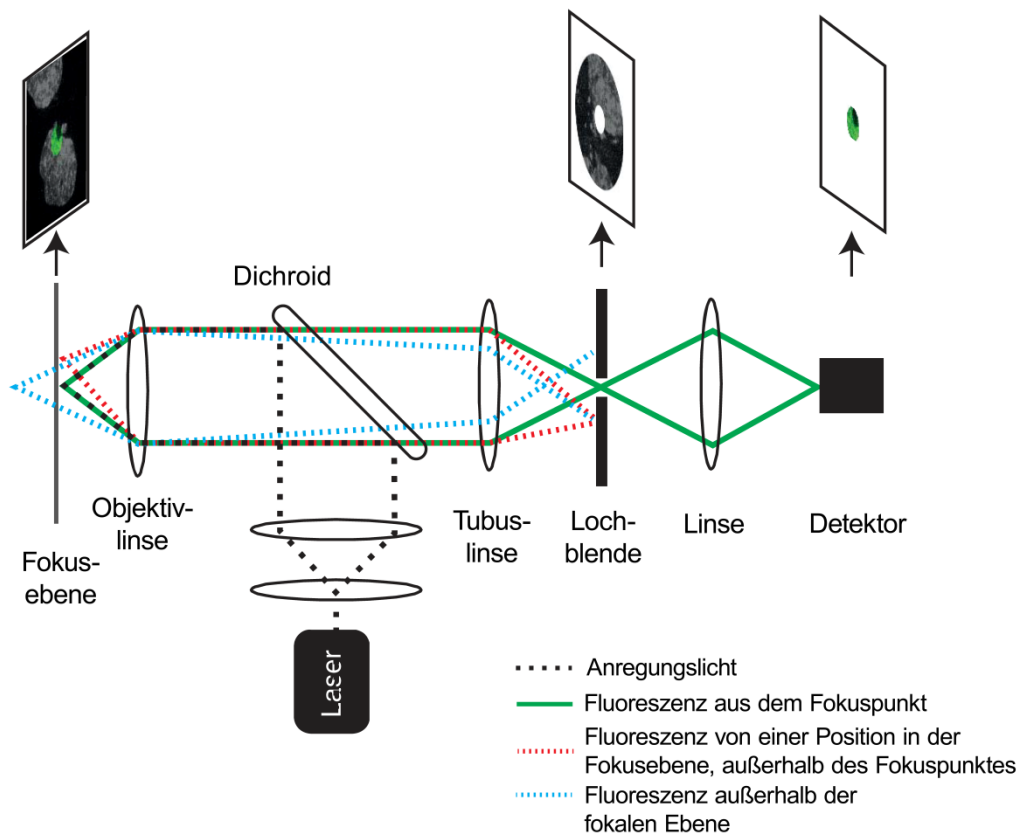


Abbildung 2-1 - Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Details siehe Text. (modifiziert aus [99])

Trotz des verbesserten Kontrasts hat auch die konfokale Mikroskopie Grenzen. Wenn ein infinitesimal kleiner Punkt durch eine Linse abgebildet wird, ist das entstehende Bild aufgrund von Beugungseffekten verbreitert. Das Intensitätsmuster wird als Airyscheibe oder Punktspreizfunktion (PSF) bezeichnet und ist in Abbildung 2-3 mit der blauen Kurve dargestellt [98]. Die laterale Ausdehnung der Airyscheibe wird üblicherweise in *Airyunits* (AU) angegeben. Dabei entspricht dann 1 AU der lateralen Ausdehnung des ersten Minimums. Der Abstand zweier Punkte, bei dem die resultierenden Airyscheiben immer noch als getrennte Strukturen wahrgenommen werden können, limitiert die Auflösung konfokaler Mikroskope.

Um auch unterhalb dieser Grenze Strukturen abbilden zu können, kann ein konfokales Mikroskop um einen Airyscan-Detektor erweitert werden. Dieser Detektor besteht nicht nur aus einem einzigen Detektorelement, sondern aus 32 radial angeordneten, hexagonalen Punktdetektoren (Abbildung 2-2). Das zentrale Element liegt dabei auf der optischen Achse und alle Elemente sind so klein (0,2 Airyunits), dass sie selbst als Lochblende dienen. Die Funktionsweise dieses Detektors basiert auf einer Änderungen der effektive PSF und der Auflösung des Mikroskops durch eine Verschiebung der Lochblende gegen die optische Achse.

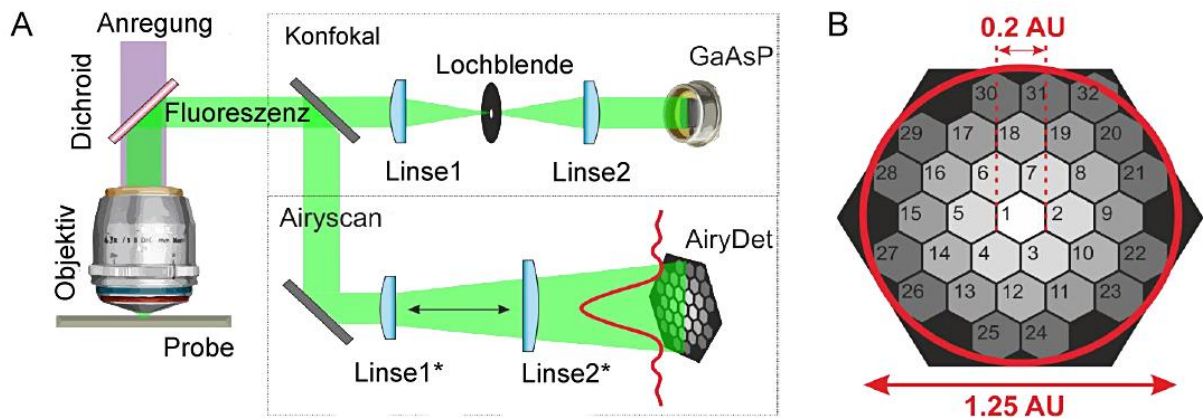


Abbildung 2-2 - (A) Das Airyscan-Prinzip (unten) im Vergleich zur konventionellen konfokalen Mikroskopie (oben). Für die Airy-Detektion wird das Fluoreszenzlicht durch die Linsen 1* und 2* aufgeweitet, bevor es auf den Detektor trifft. (B) Der Detektor besteht aus 32 radial angeordneten, hexagonalen Galliumarsenidphosphid (GaAsP)-Lawinenphotodioden. Jedes Element hat einen Durchmesser von 0,2 AU und der gesamte Detektor eine Breite von 1,25 AU [100].

Die resultierende effektive PSF eines konfokalen Mikroskops setzt sich dabei aus der PSF der Anregungsbeleuchtung und der PSF der Detektion zusammen, die miteinander multipliziert werden. Würde man nun in einem konfokalen Mikroskop die Detektions-Lochblende gegen die optische Achse verschieben, würde die effektive PSF als Produkt der Beleuchtungs- und Detektions-PSF schmaler werden und ebenfalls gegen die optische Achse verschoben sein (Abbildung 2-3-A und -C, rote Kurve). Da aber die exakte Verschiebung der effektiven PSF zur Detektions-PSF bekannt ist, kann das resultierende Signal in der Bildverarbeitung an die ursprüngliche Position "zurückgeschoben" werden (Abbildung 2-3-B). Dieser Prozess wird Pixel-Neuzuordnung (engl. *pixel reassignment*) genannt. Bei einer Verschiebung der Lochblende in nur eine Richtung, ist die Intensität und damit auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der effektiven PSF sehr klein. Wird jedoch die Lochblende in verschiedene Richtungen verschoben und werden alle dadurch entstehenden effektiven PSFs nach der Pixel-Neuzuordnung summiert, kann eine höhere Auflösung mit einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht werden [101, 102].

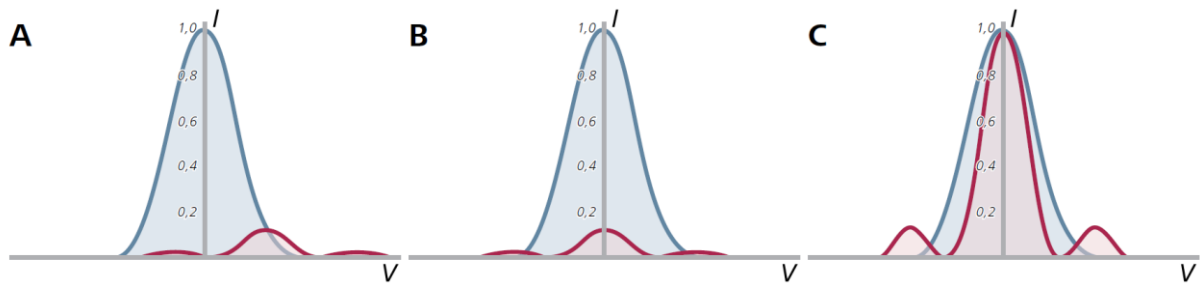


Abbildung 2-3 - Darstellung der PSF bei Verschiebung der Detektionslochblende. (A) Im Vergleich zu der effektiven PSF einer nicht verschobenen Lochblende (blau), ist die PSF bei Verschiebung der Lochblende ebenfalls versetzt (rot). (B) Bei bekannter Verschiebung kann die PSF rechnerisch wieder auf die optische Achse zurückverschoben werden. (C) Normalisierung beider PSFs, um die Verschmälerung zu zeigen. I , Intensität; V , transversale Richtung (modifiziert aus [102]).

Beim Airyscan-Detektor bilden die von der optischen Achse verschobenen Detektorelemente ebenso verschobene effektive PSFs ab. Diese können durch Pixel-Neuzuordnung genutzt werden, um eine höhere Auflösung zu erreichen. Die eigentliche Lochblende der konfokalen Mikroskopie wird nicht mehr benötigt [100, 102, 103].

Zur Einzelmolekülverfolgung wurde in dieser Arbeit die HILO-Mikroskopie verwendet. Trifft ein Laserstrahl auf eine Phasengrenze zwischen zwei Medien, wie z.B. zwischen Deckglas und dem Zell-Medium der Probe, wird der Strahl abhängig vom Einfallswinkel gebrochen. Der Brechungsindex-Unterschied zwischen dem Glas und der Probe bestimmt dann in Abhängigkeit vom Einfallswinkel die Stärke der Lichtbrechung. Ist der Brechungsindex des Mediums oberhalb der Oberfläche nun kleiner, als unterhalb, wird der Strahl vom Einfallslot weg gebrochen. Diesen Effekt macht man sich in der HILO-Mikroskopie zunutze. Hier wird ein Laser in die hintere fokale Ebene eines Objektivs fokussiert und dort gegen die optische Achse verschoben. Das führt dazu, dass der Laserstrahl in einem Winkel auf die Phasengrenze zwischen Deckglas und Probe trifft. Dort wird der Laser gebrochen und es entsteht ein Lichtblatt, das die Probe in einem leichten Winkel schneidet (Abbildung 2-4). Diese Methode hat den Vorteil, dass Fluorophore nicht innerhalb der ganzen Probe, sondern ausschließlich im Bereich des Lichtblatts angeregt werden, und so das resultierende Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Emission deutlich verbessert ist [104].

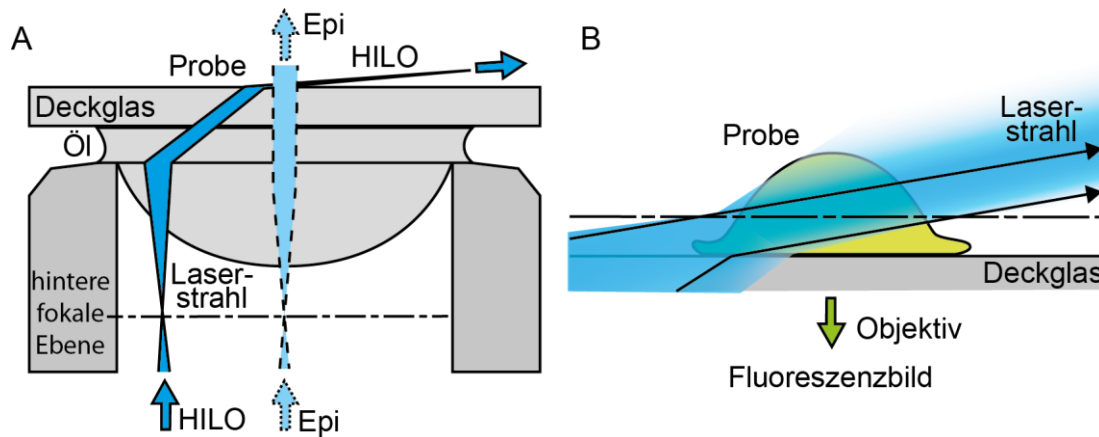


Abbildung 2-4 - HILO-Beleuchtung. Detaillierte Beschreibung siehe Text. (A) Das Laserlicht wird bei verschobenem Strahl an der Phasengrenze zwischen Deckglas und Probe gebrochen. Wird der Laser nicht verschoben, ergibt sich eine Epi-Weitfeld-Beleuchtung. (B) Ein Lichtblatt schneidet die Probe. (Basierend auf [104])

Bei einer weiteren Verschiebung des Lasers in der hinteren fokalen Ebene des Objektivs erhöht sich der Einfallswinkel, bis letztendlich ein Ausfallswinkel erreicht wird, bei dem der Lichtstrahl parallel zur Grenzfläche des Deckglases gebrochen wird. Der entsprechende Einfallswinkel wird dann als der kritische Winkel bezeichnet.

2.6.1 Superauflösende konfokale und Einzelmolekül-Mikroskopie der selben optischen Ebene

Um einzelne Kernporen auflösen zu können, wurden diese mit einem Zeiss LSM880, das mit einem Airyscan-Detektor ausgestattet ist, abgebildet. Die konfokalen Messungen wurden mit einem α -Plan-Apochromat 63x/1.46 Oil Corr M27 TIRF Objektiv (Zeiss) durchgeführt.

Für die Aufnahme von einzelnen ribosomalen prä-60S-Untereinheiten wurde das Zeiss LSM880 um eine Laser-Beleuchtung und eine EMCCD-Kamera erweitert (Bauteile siehe Tabelle 2-4). Hierzu wurde die Aperturblende und der Filterschieber des Mikroskopstativs direkt vor der Fluoreszenzlampe durch einen von Daniel Pöetes entwickelten Filterschieber ersetzt, der mit einem Bandsperrfilter für die Wellenlänge 405, 488, 561, 640 nm (F73-410, AHF) ausgestattet war. Für die Anregung kamen zwei fasergekoppelte Laser mit Wellenlängen von 561 nm und 640 nm und einer mit einer Wellenlänge von 405 nm zum Einsatz. Die Laserbeleuchtung wurde mit einem 5-fachen Strahlerweiterer aufgeweitet und durch eine Linse mit einer fokalen Länge von 200 mm in die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert. Diese Hilfslinse und ein Justierspiegel befanden sich auf einem beweglichen Schlitten, mit dem der Laserstrahl in der hinteren fokalen Ebene

des Objektivs verschoben werden konnte, um eine HILO-Beleuchtung zu erreichen. Die Laser wurden durch eine von Jan-Peter Siebrasse geschriebene Software angesteuert.

Die Einzelmoleküle wurden mit demselben Objektiv, wie für die konfokalen Aufnahmen, auf der Andor iXon+ 897D EMCCD-Kamera abgebildet. Zusätzlich war vor der Kamera eine 2,5-fachen Vorvergrößerung an den Kameraport des Mikroskopstativs Axiovert 200 angebracht.

Im Filterrad des Mikroskopstativs wurde ein Filter-Würfel mit entsprechenden Bandsperr- und Emissionsfilter für die verwendeten Laser und Fluorophore eingesetzt (F66-04TN, AHF).

Der Aufbau war mit einer Heizkammer ausgestattet. Alle *in vivo* Experimente wurden bei 37°C ausgeführt.

2.6.2 Referenzpartikel zur Anpassung der mikroskopischen Aufnahmen

Werden nun gleiche Strukturen sowohl konfokal, als auch mit der Einzelmolekülbeleuchtung und der EMCCD-Kamera abgebildet, zeigt sich, dass sich beide Aufnahmen in der Skalierung, Rotation, Verzerrung und Translation unterscheiden (Abbildung 2-5-A). Um diese Unterschiede auszugleichen, kann eine der beiden Aufnahmen durch eine affine Transformation auf die andere Aufnahme angepasst werden, sodass letztendlich die Signale richtig übereinander liegen (Abbildung 2-5-B und C). In dieser Arbeit wurde immer die konfokale Aufnahme an die Einzelmolekülaufnahme angepasst.

Vergleicht man nun die sich ergebenden Transformationsmatrizen aus verschiedenen Messungen von immobilisierten fluoreszierenden Mikropartikeln, zeigt sich, dass die verschiedenen Parameter der affinen Transformation unterschiedlich stabil sind. In Abbildung 2-5-D wurde an 19 verschiedenen Stellen innerhalb einer Probe Mikropartikel sowohl konfokal, als auch mit der Kamera abgebildet. Aus allen Transformationsmatrizen wurde ein Mittelwert gebildet und zu jedem Parameter die relative Abweichung zu diesem Mittelwert bestimmt. Dabei repräsentieren die Parameter a und e die Skalierung, b und d die Verzerrung und c und f die Translation. Die Rotation ergibt sich aus den Parametern a,b,d und e. Hier zeigt sich, dass sich die einzelnen Messungen besonders in der Translation unterscheiden, während die Rotation, Skalierung und Verzerrung konstant bleiben. Die Ursache dafür ist in Abbildung 2-5-E zu sehen. Hier wurden Mikropartikel in Agarose immobilisiert und für 15 min bei aktivierter Fokusstabilisierung in 10-s-Intervallen konfokal abgebildet. Über diese Zeit bewegen sich alle Mikropartikel in einer einheit-

lichen Bewegung um ca. 1,5 µm. Dies zeigt, dass der Mikroskopisch eine Drift aufweist und hat zur Folge, dass die Unterschiede in der Translation für jede Messung einzeln ausgeglichen werden muss, während die anderen Parameter als konstant für das Mikroskop angenommen werden können.

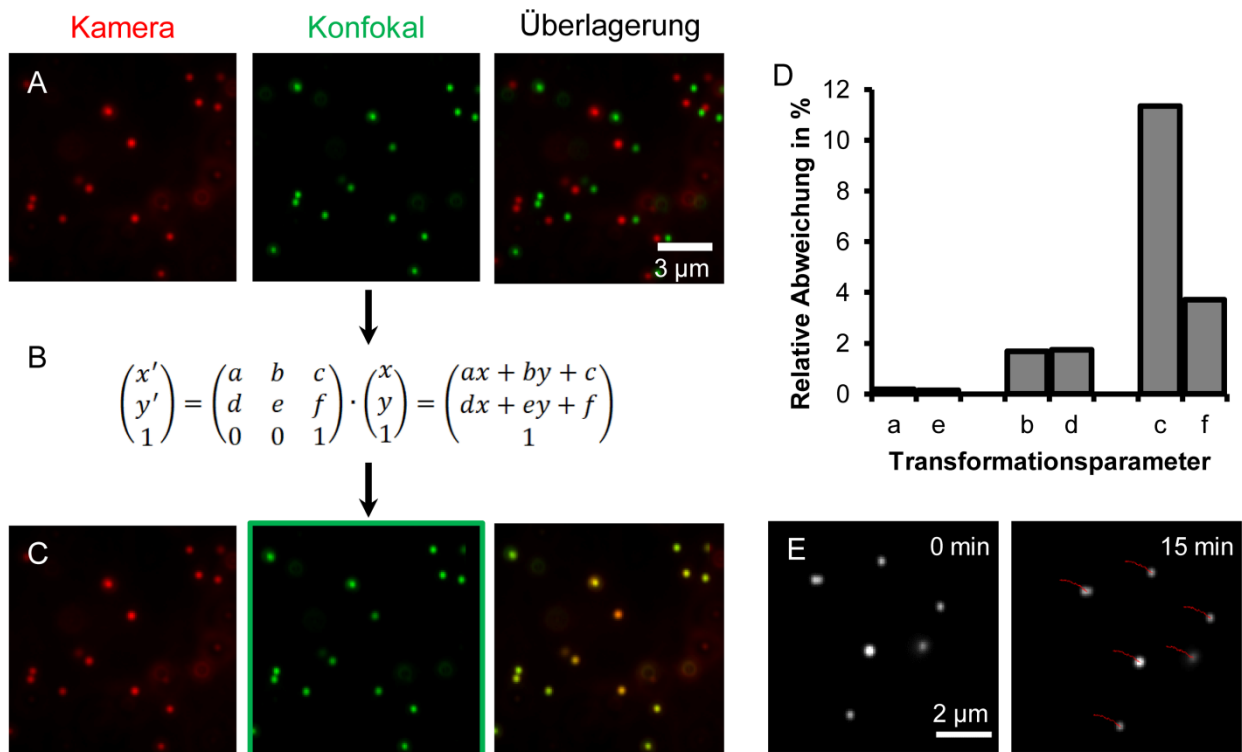


Abbildung 2-5 - (A) Abbildung von 0,2-µm-Tetraspeck Mikropartikeln immobilisiert in 2% Agarose, mit der HILO-Beleuchtung und der EMCCD-Kamera bei einer Anregung von 561 nm und Airyscan-konfokal mit einer Anregung bei 488 nm. In der Überlagerung wird deutlich, dass die aufgenommenen Signale beider Methoden gegeneinander verschoben, gedreht und verzerrt sind. (B) Allgemeine Formel einer affinen Transformationsmatrix. Die Parameter a und e entsprechen der Skalierung, b und d der Verzerrung und c und f der Translation. (C) Die konfokale Aufnahme aus (A) wurde durch eine affine Transformation an die Kamera-Aufnahme angepasst. Die Signale beider Messungen ko-lokalisieren nun. (D) Relative Abweichung der Transformationsparameter von den Durchschnittswerten für 19 Messungen innerhalb einer Probe. (E) Abbildung von fluoreszierenden Mikropartikeln immobilisiert in 2% Agarose zum Zeitpunkt 0 min und nach 15 min. Die roten Linien zeigen die Drift der Probe in über die Messzeit in 10s-Intervallen.

Die spezifischen Unterschiede der Translation müssen dementsprechend auch bei *in vivo* Messungen ausgeglichen werden. Dies führt zu der Notwendigkeit Referenzstrukturen bzw. -partikel in die Zellproben einzubringen. Diese sollten dabei verschiedene Kriterien erfüllen. Zum einen müssen sie für die Messzeit (mindesten 30 s) immobil sein, sie sollten sich auf der Messhöhe (ca. 5 µm über dem Deckglas) befinden und dürfen dabei weder die Zellen noch die Messung stören. Die erfolgreichste Anpassung der konfokalen Aufnahmen mit denen der Kamera gelang

durch eine Bindung von fluoreszierenden Mikropartikeln an die äußere Membran der HeLa Zellen. Hierzu wurden carboxylierte Mikropartikel erst durch EDAC mit einer NHS-Gruppe funktionalisiert und anschließend an die Amin-Gruppen von transmembranen Proteinen gebunden (Abbildung 2-6).

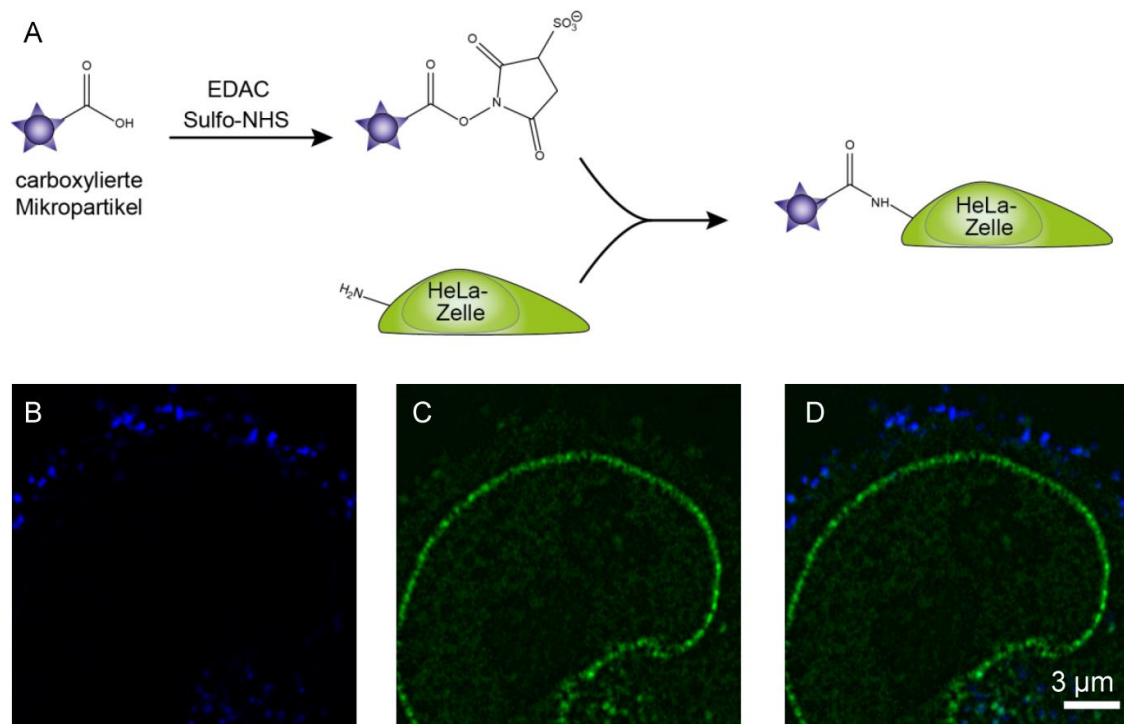


Abbildung 2-6 - (A) Schematische Abbildung der chemischen Modifikation carboxylierter, fluoreszierender Mikropartikel, um diese an die Amin-Gruppen von Transmembranproteinen zu binden. (B) Mikroskopische Abbildung der Membran gebundenen Mikropartikel bei einer Anregung von 405 nm. (C) eGFP-NTF2 derselben Zelle. (D) Überlagerung beider Kanäle.

2.6.2.1 Modifizierung von fluoreszierenden Mikropartikeln zur Anpassungen der mikroskopischen Aufnahmen

950 µL MES-Puffer (Tabelle 2-9) wurden mit 50 µL *Fluoresbrite Carboxy BB . 10 Micron* Mikropartikel (2,6% feste Lösung, Polysciences Inc.) durch kurzes Vortexen vermischt und für 5 min im Ultraschallbad behandelt. 7 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) und 14 mg N-hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) wurden hinzugefügt und für 15 min bei 1500 xg im ThermoMixer C geschüttelt.

Die Lösung wurde in ein Amicon Ultra-4 Ultraxel-100K Zentrifugenfilterröhrchen überführt, zweimal 3 mL PBS zugefügt und jeweils für 5-7 min bei 600 xg zentrifugiert. Zuletzt wurde so lange zentrifugiert, bis das finale Volumen bei 500 µL lag.

2.6.2.2 Bindung der modifizierte Mikropartikel an Zellen

Direkt vor der Messung wurden die modifizierten Mikropartikel für 3 min in einem Ultraschallbad behandelt und die Zellen mit 2 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden 950 µL PBS und 50 µL modifizierte Mikropartikel zugefügt, für 20 min bei 70 rpm und 37 °C schüttelnd inkubiert und dreimal mit 2 mL PBS gewaschen.

2.6.2.3 Zellviabilität-*Assays*

Um zu überprüfen, ob die Modifikationen durch Mikropartikel Einflüsse auf die Zellviabilität haben, wurden zwei *Assays* durchgeführt.

Etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in jedes *Well* von zwei 6-*Well*-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit 2 mL PBS gewaschen. Bei einer Platte wurden 900 µL PBS und 100 µL modifizierte Mikropartikel zugegeben und für 30 min bei 70 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden dreimal mit 2 mL PBS gewaschen und 1 mL Medium zugegeben. Die andere Platte dient als negativ Kontrolle mit unmodifizierten Zellen. Die Viabilitätstests wurden am ersten, dritten und siebten Tag nach der Inkubation mit den Mikropartikeln durchgeführt.

Neutralrot-Assay nach Repetto *et al.* (2008) [105]: Eine Stammlösung mit 4 mg/mL Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin-hydrochlorid) in PBS wurde angesetzt. Am Tag vor dem Versuch wurde eine 40 µg/mL Arbeitslösung in Zellmedium erstellt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde kurz bevor Verwendung für 10 min bei 600 x g zentrifugiert, um eventuell ungelöste Kristalle zu entfernen. Jeweils in einem *Well* der beiden Platten wurde das Medium entfernt, 1 mL Neutralrot-Lösung zugegeben und die Zellen für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Neutralrot wurde entfernt und die Zellen mit 2 mL PBS gewaschen. Die Extraktion des Farbstoffs erfolge mit 1 mL Neutralrot-Entfärberlösung (50% Ethanol (96%), 49% deionisiertes Wasser, 1% Essigsäure), während die 6-*Well*-Platte bei 37 °C und 100 rpm für 10 min geschüttelt wurden. Die Bestimmung der optische Dichte (OD) der Entfärberlösung erfolgte bei 540 nm mit Hilfe eines NanoDrop2000c.

Trypanblau-Assay nach Louis und Siegel (2011) [106]: Der Zellüberstand in je einem *Well* der beiden Platten wurde jeweils in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen. Auch die Waschlösung wurde in den Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden für 5 min mit 500 µL Trypsin/EDTA inkubiert und die Trypsinierung mit 500 µL Medi-

um gestoppt. Auch diese Lösung wurde in die Zentrifugenröhrchen transferiert und alles bei 200 x g für 5 min (Dec. 1) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 500 µL Medium resuspendiert. 500 µL Trypanblau-Lösung (0.4%) wurden zugegeben und die gefärbten und ungefärbten Zellen mittels einer Neubauer-Kammer gezählt.

2.6.3 Datenaufnahme

Zuerst wurden die prä-60S-Untereinheiten abgebildet. Hierfür wurde eine Sequenz von 1000 Bildern mit der EMCCD-Kamera aufgenommen, die ersten 900 Bilder mit einer Anregung von 561 nm und anschließend 100 Bilder bei 405 nm. Nur die zentralen 200x200 Pixel des 512x512-Kamerachips wurden ausgelesen, um die Bildwiederholrate zu maximieren. Die Belichtungszeit betrug 13 ms und die gesamte Integrationszeit lag bei 14 ms. Der *electron multiplying (EM) gain* wurde auf 300 eingestellt.

Direkt im Anschluss wurde die konfokale Messung gestartet. Hier erfolgte die Abbildung von 20-30 Zyklen alternierend mit einer Anregung bei 405 nm (1% Laserstärke) und 488 nm (1,5% Laserstärke) auf dem Airyscan-Detektor. Die Pixelgröße war auf 0.04 µm mit einem Zoom von 7 und das Pinhole auf 112,1 µm eingestellt. Der Airyscan-Detektor wurde immer optimal justiert und der Fokus konstant durch das *Definite Focus* System stabilisiert.

2.7 Datenanalyse

Um die große Menge an Daten möglichst effizient Auszuwerten und Interaktionen einzelner prä-60S-Untereinheiten unabhängig zu identifizieren und je nach Art der Interaktion zu kategorisieren, wurde für die Bildauswertungs-Software ImageJ [107, 108] in Form von Macros und Plug-Ins eine Datenanalyse entwickelt, welche die mikroskopischen Aufnahmen weitestgehend automatisiert verarbeitet und auswertet. Die detaillierten Schritte dieser Auswertung können den Abbildung 2-7 bis Abbildung 2-11 und den nachfolgenden Kapiteln entnommen werden.

2.7.1 Bildverarbeitung der EMCCD-Kameraaufnahmen

Die Aufnahmen der EMCCD-Kamera wurden vom 'Sif' Datenformat in das „Tagged Image File Format“ (Tif) mit 8-bit Graustufen konvertiert. Die Bildstapel wurden in die 100 Aufnahmen der Registrierungs-Mikropartikel und die 900 Aufnahmen der prä-60S-Untereinheit aufgeteilt. Bei beiden Aufnahmen wurde jeweils der Hintergrund mit der *'Rolling Ball'*-Methode abgezogen. Für die Mikropartikel erfolgte dies mit einem *'Rolling Ball'*-Radius von 10 Pixeln und für die Einzelmoleküle mit 50 Pixeln. Der Kontrast wurde für beide verbessert (0,3 % gesättigte Pixel) und die Kamera-Aufnahmen vertikal gespiegelt. Aus allen 100 Aufnahmen der Mikropartikel wurde eine Maximale-Intensitäts-Projektion erstellt und sowohl diese, als auch die Aufnahmen der prä-60S-Untereinheit auf die Größe der konfokalen Bilder skaliert.

2.7.2 Bildverarbeitung der konfokalen Aufnahmen

Konfokale Airyscan-Bilder wurden durch den Airyscan-Algorithmus mittels der Mikroskopsoftware ZEN Black (Zeiss) umgewandelt (die Stärke des Filters wurde auf 'auto' eingestellt) und in das 'Tif'-Format konvertiert. Die Aufnahmen wurden in die Kanäle der Membran und der Referenzmikropartikel aufgeteilt, der Hintergrund wurde subtrahiert (*'Rolling Ball'*-Radius von 10) und der Kontrast verbessert (0,3% gesättigte Pixel). Die ersten fünf Bilder der Mikropartikel wurden gemittelt und der Kontrast erneut verbessert (0,35% gesättigte Pixel). Die ersten fünf Aufnahmen der Membran wurden summiert und beide Projektionen in 8-Bit-Graustufen-Bilder konvertiert.

2.7.3 Bestimmung der Transformationsmatrix

Da die konfokalen und die Kamera-Aufnahmen über sehr unterschiedliche Lichtwege aufgenommen wurden, unterscheiden sich beide in ihrer Skalierung, Rotation, Verzerrung und Translation. Um letztendlich einzelne Interaktionen der prä-60S-Untereinheiten einzelnen Kernporen zuordnen zu können, ist es wichtig die mikroskopischen Aufnahmen sorgfältig zu registrieren und aufeinander anzupassen.

Während die Unterschiede der Skalierung, Rotation und Verzerrung bei gleichbleibenden Lichtwegen und gleicher Kameraposition unabhängig von den Proben sind, wird der Unterschied der Translation hauptsächlich durch eine geringe unkontrollierte Bewegung des Mikroskoptisches verursacht. Damit ist dieser stark abhängig von der Zeit, die zum Umschalten zwischen den beiden Aufnahmemöglichkeiten benötigt wird. Dies führt dazu, dass die Unterschiede in der Translation für jede Probe individuell bestimmt werden müssen.

Dafür erfolgte durch eine erste affine Transformation die grobe Anpassung der konfokalen Aufnahmen an die der Kamera. Anschließend wurde aus den Aufnahmen der Mikropartikel eine spezifische Translationsmatrix für jede einzelne Messung bestimmt und diese ebenfalls auf die konfokalen Membranaufnahmen angewandt. Zuletzt musste noch chromatische Abweichung korrigiert werden.

2.7.3.1 Affine prä-Transformation

Durch eine affine prä-Transformation wurde die Rotation, Skalierung und Verzerrung der konfokalen Aufnahmen im Vergleich zu den Kamerabildern angepasst. Die Translation wurde durch diese Transformation jedoch nur grob angeglichen.

Für die Bestimmung der prä-Transformationsmatrix wurden *Fluoresbrite Carboxy BB .10 Micron* Mikropartikel in 2 % Agarose immobilisiert. (1:100 v/v) und exakt wie die eigentlichen Proben abgebildet und verarbeitet. Die Summe der Kamera Aufnahmen und das gemittelte konfokale Bild wurden in einem Bildstapel zusammengefasst und mit einer modifizierten Version des StagReg-Plug-Ins für ImageJ [109] transformiert. Der Erfolg dieser Transformation wurde visuell überprüft und die sich durch die Transformation ergebenden Matrizen von mindesten 20 Messungen gemittelt. Diese Messung wurde jedes Mal wiederholt, wenn sich die Position der Kamera geändert hat.

2.7.3.2 Transformation der Translation

Als nächstes musste die verbleibende Verschiebung, die durch eine geringe unkontrollierte Bewegung des Mikroskopisches verursacht wurde, korrigiert werden.

Die Summe der Mikropartikel-Aufnahme der Kamera und das entsprechende vortransformierte konfokale Bild wurden in einem Bildstapel zusammengefasst und mittels StackReg transformiert. Die sich ergebende Transformationsmatrix entsprach der spezifischen Matrix für das jeweilige Datenpaar. Der Erfolg der Transformation wurde ebenfalls visuell überprüft.

2.7.4 Farbverschiebung

Die Registrierung der konfokalen und Kamera-Aufnahmen erfolgte durch fluoreszierende Mikropartikel mit einem Emissionsmaximum von 407 nm. Dies führte dazu, dass zwischen dem konfokalen Membran-Kanal (Anregung bei 488 nm) und dem Einzelmolekül-Kanal der Kamera (Anregung bei 561 nm) nach der zuvor beschriebenen Anpassung eine weitere Farbverschiebung verbleibt, die ebenfalls korrigiert werden muss.

2.7.4.1 Bestimmung der Farbverschiebung

Um die Farbverschiebung zu bestimmen, wurden *Fluoresbrite Carboxy BB .10 Micron* Mikropartikel und 0.2 μm *Tetraspeck* (Life Sciences) in 2% Agarose (1:100 v/v) immobilisiert, abgebildet, verarbeitet und registriert wie bei den Zellproben. Sowohl die 900 Bilder der EMCCD-Kamera bei einer Anregung mit 561 nm, als auch die ersten 5 Bilder des konfokalen Kanals bei Anregung mit 488 nm wurden gemittelt, in einem Bilderstapel zusammengefasst und mittels StackReg transformiert. Der Erfolg dieser Transformation wurde wieder visuell überprüft. Die entsprechenden Transformationsmatrizen von mindesten 20 Messungen wurden gemittelt und diese Messung jedes Mal wiederholt, wenn sich die Position der Kamera geändert hat. Die Matrix der Farbverschiebung wird zuletzt auf die bereits transformierten Membran-Aufnahmen angewandt.

2.7.5 Einzelmolekülbeobachtung

Die Beobachtung einzelner prä-60S Untereinheiten zur Aufschlüsselung einzelner Trajektorien wurde mit Hilfe des ImageJ Plug-Ins *Trackmate* [110] durchgeführt. Für die Partikeldetektion wurde der '*LoG-based detector*' gewählt, der zu erwartende Signaldurchmesser auf 0.5 μm festgelegt und die '*Sub-Pixel*'-Lokalisierung aktiviert. Die sich ergebenden Detektionen wurden durch einen automatischen Schwellenwert gefiltert.

Für die Bestimmung der Trajektorien aus den Einzelmoleküldetektionen wurde der 'Simple LAP Tracker' genutzt. Der maximale Abstand zum Schließen der Lücken zwischen zwei Partikeldetektionen wurde auf 1 µm festgesetzt und eine maximale Bildlücke von drei Bildern erlaubt. Der maximale Verknüpfungsabstand wurde auf 1 µm festgelegt.

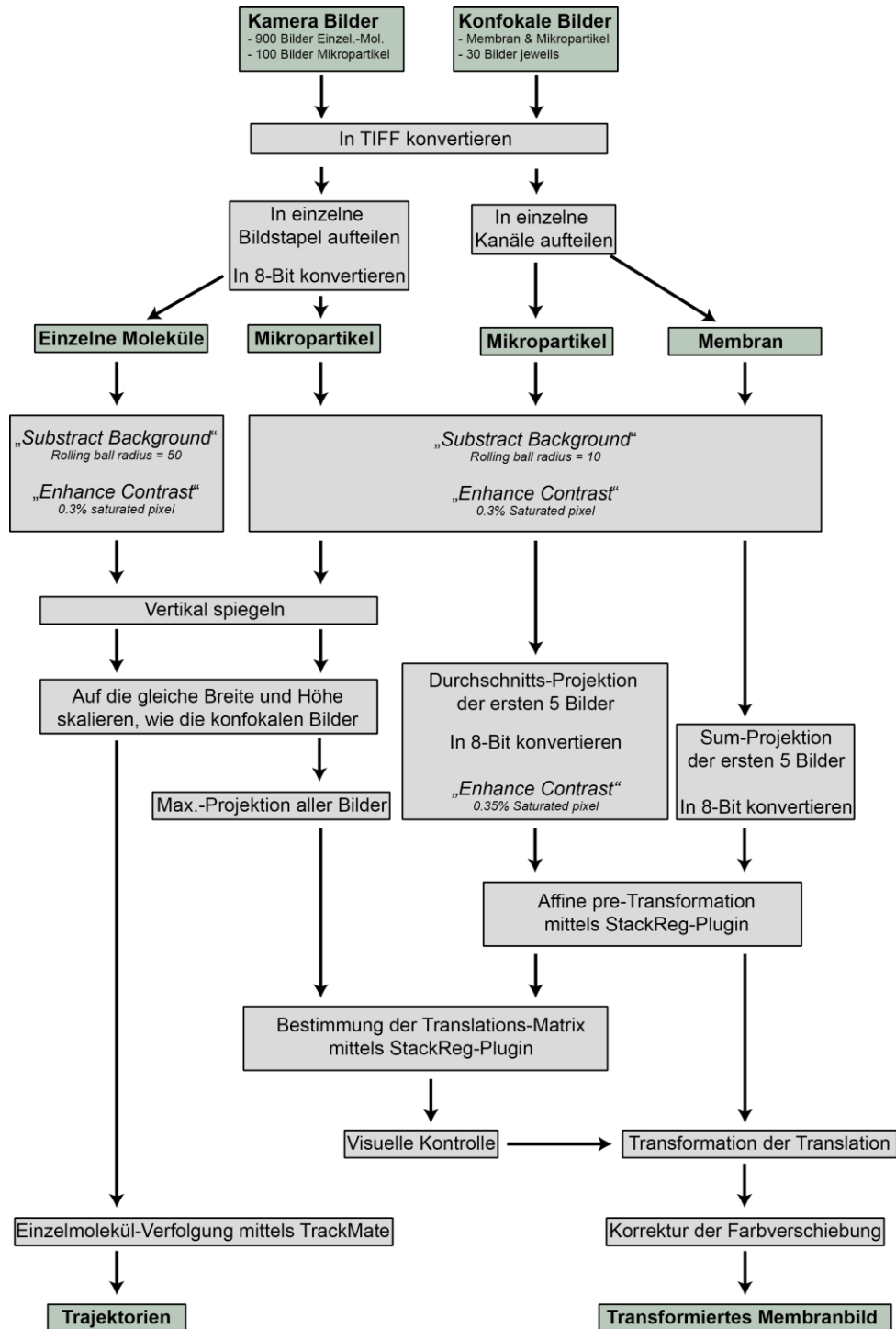


Abbildung 2-7 - Bildverarbeitung und Registrierung der EMCCD- und der Airyscan-Aufnahmen. Details siehe Text (aus [111]).

2.7.6 Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision

Die Lokalisierungspräzision der einzelnen Partikel, die mittels der EMCCD-Kamera aufgenommen wurden, wurde nach Mortensen *et al.* (2010) bestimmt [112].

$$\sigma = \sqrt{F \left[\left(\frac{4}{3}\right)^2 \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi b^2 \left(s^2 + \frac{a^2}{12}\right)}{a^2 N^2} \right]} \quad (2-3)$$

wobei F der Korrekturfaktor für die EMCCD-Kamera und gleich 2 ist. a entspricht der Pixelgröße (102 nm). s stellt die Breite des halben Maximums (388 ± 15 nm) dar und wurde mit 0,1- μm -*Tetraspeck* Mikropartikeln gemessen, welche in 2 % Agarose immobilisiert waren. N ist die Anzahl an Photonen pro Signal und wird auf für den hier verwendeten Farbstoff auf 100-300 Photonen geschätzt [94] und b ist der Hintergrund in Photonen pro Pixel, was etwa $N/100$ entspricht.

Für 100 Photonen führt dies zu einer Lokalisierungsgenauigkeit von 37 ± 6 nm. Deshalb wurde für diese Arbeit bei Einzelmolekülmessungen immer eine Lokalisationsgenauigkeit von 43 nm angenommen.

2.7.7 Ko-Lokalisierungspräzision

Um die verbleibende Abweichung zwischen den transformierten konfokalen Aufnahmen und den Kameraaufnahmen zu bestimmen, wurden *Fluoresbrite Carboxy BB .10 Micron* Mikropartikel und 0.2 μm *Tetraspeck* in 2% Agarose (1:100 v/v) immobilisiert, abgebildet, verarbeitet, registriert und farbkorrigiert, wie auch die Zellproben. Die 900 Bilder der EMCCD-Kamera bei 561 nm und die ersten 5 Bilder des konfokalen Kanals bei 488 nm wurden gemittelt und in einem Bilderstapel zusammengefasst.

Die verbleibende Verschiebung zwischen den Mikropartikelpositionen wurde mittels des *Track-Mate*-Plug-Ins, mit den gleichen Einstellungen wie für die Partikelverfolgung (Kapitel 2.7.5), gemessen. Hier ergab sich eine Ko-Lokalisierungspräzision von 35 ± 2 nm, weshalb für die weitere Analyse 37 nm verwendet wurde.

2.7.8 Bestimmung der Porenposition

Um die Positionen der einzelnen NPCs zu bestimmen, wurde der Kontrast des transformierten Membranbildes verbessert (0,35% gesättigte Pixel) und ein Graustufen-Schwellenwert auf (160, 255) festgesetzt. Um kleinere Lücken zu schließen, wurde die resultierende Maske fünfmal um einen Pixel erweitert und fünfmal um einen Pixel verkleinert. Verbleibende Artefakte wurden manuell entfernt, die Maske und das verbesserte Membranbild kombiniert (ImageJ *Image calculator*: 'AND') und lokale Maxima über die Funktion 'Find Maxima' bestimmt. Durch jedes gefundene Maximum wurden vier Gauß-Funktionen in 45°-Schritten mit einer Länge von 11 Pixeln angepasst. Wenn der R^2 -Wert für die Anpassungen über 0,95 liegt, werden die entsprechenden Maxima der Gaußanpassung gemittelt und ergaben die jeweilige Porenposition (Abbildung 2-8).

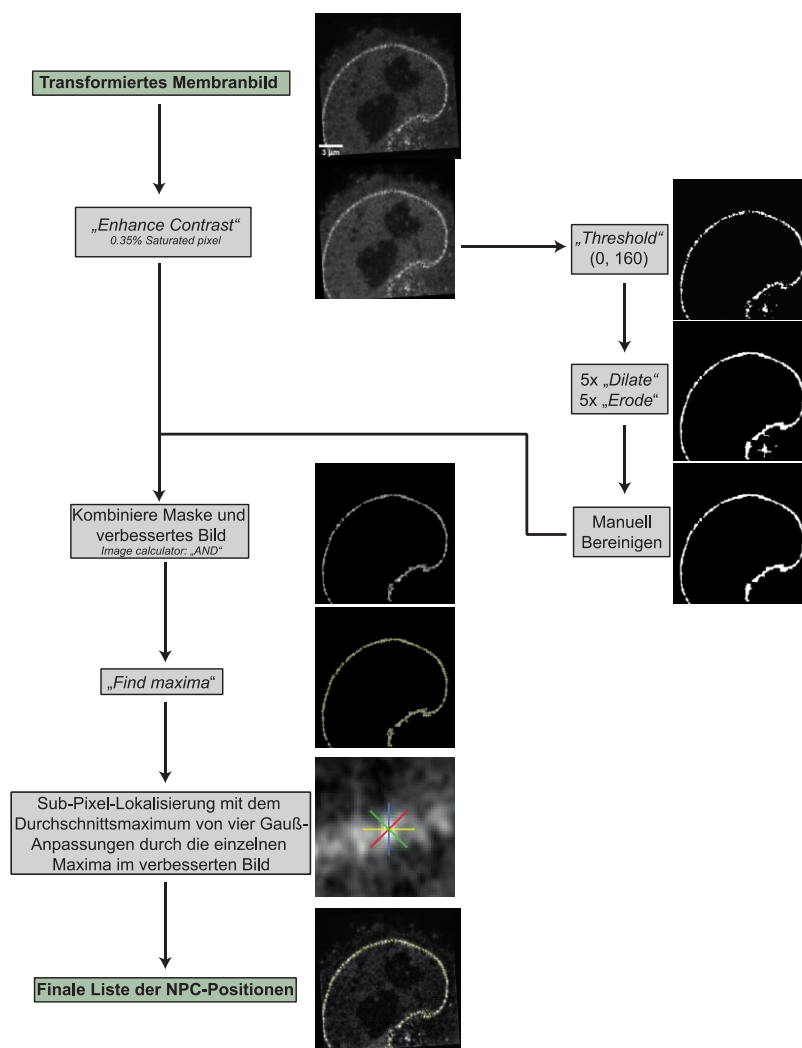


Abbildung 2-8 - Bestimmung der Positionen der einzelnen Kernporenkomplexe. Details siehe Text (aus [111]).

2.7.9 Isolation der Interaktionen mit einzelnen Kernporen

Um nun die Einzelmolekültrajektorien zu isolieren, die mit einzelnen NPCs interagieren, wurde um jede Einzelmoleküldetektion ein virtueller Kreis mit einem Radius von 43 nm (Einzelmolekül-Lokalisationspräzision) und um jede NPC-Position ein virtueller Kreis mit einem Radius $r = 86$ nm gelegt. Dieser Radius ergibt sich aus einem mittleren Kernporenradius ($r_p = 65$ nm), der Einzelmolekül-Lokalisationspräzision ($\sigma_p = 43$ nm) und der Ko-Lokalisationspräzision ($\sigma_c = 35$ nm).

$$r \geq \sqrt{r_p^2 + \sigma_l^2 + \sigma_c^2} \approx 86 \text{ nm} \quad (2-4)$$

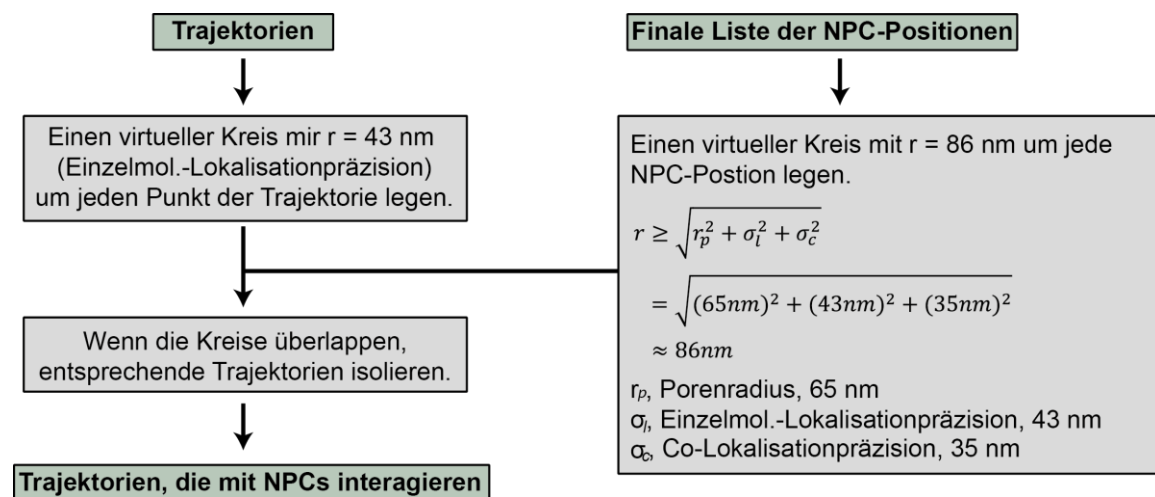


Abbildung 2-9 - Identifikation einzelner prä-60S-Trajektorien, welche mit einzelnen Kernporen interagieren. Details siehe Text (aus [111]).

2.7.10 Bestimmung des Membranverlaufs

Um den Verlauf der Kernhülle zu definieren, wurde ein Polygon aus allen NPC-Positionen erstellt. Zuerst wurde der Massenschwerpunkt aller NPC-Positionen berechnet, alle Koordinaten der Porenposition relativ zum Massenschwerpunkt transformiert und in Polarkoordinaten umgewandelt. Als nächstes wurden alle NPC-Positionen nach ihrem zunehmendem Polarwinkel (ϕ in Abbildung 2-10) sortiert. Für den Fall, dass verschiedene Positionen den gleichen Polarwinkel aufweisen, erfolgte die Sortierung nach dem kleineren Radius (r). So ergab sich ein Polygon, das den Verlauf der Kernmembran beschreibt (Abbildung 2-10).

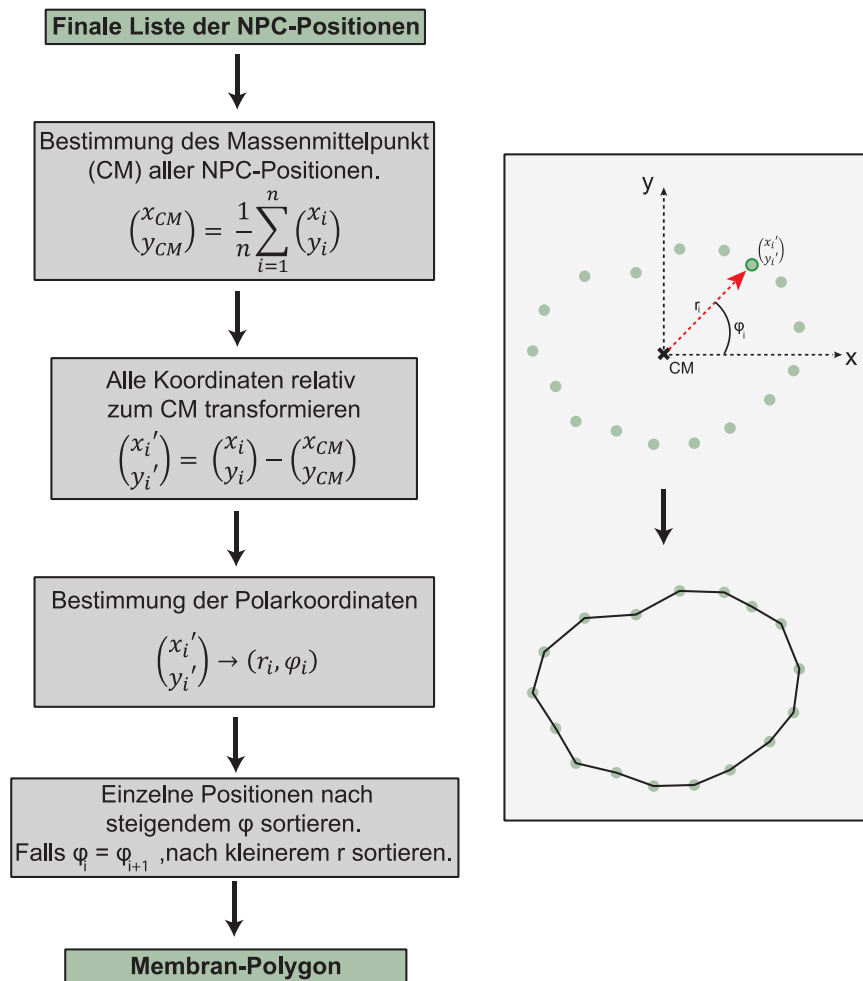


Abbildung 2-10 - Bestimmung eines Polygons aus den einzelnen NPC-Positionen, das ungefähr den Verlauf der Kernmembran beschreibt. Details siehe Text (aus [111]).

2.7.11 Kategorisierung der Interaktionen

Zuletzt wurden die einzelnen Interaktionen entsprechend ihrer Art in Kategorien sortiert (Tabelle 2-10 und Abbildung 2-11). Zunächst wurde geprüft, ob sich der Kreis um die erste oder letzte Einzelmolekül-Detektion mit dem Kreis um die Export-Kernpore überschneidet. Anschließend wurde geprüft, ob Start- oder Endpunkt jedes einzelnen Tracks innerhalb oder außerhalb des Membranpolygons liegen [113, 114]. Zuletzt wurde geprüft, ob zwischen Start und Ende das Partikel unerwartet zwischen Innen- und Außenseite des Polygons, also zwischen Nukleo- und Zytoplasma, wechselt. Die Tracks wurden dann anhand ihres Start- und Endpunktes und des Verhaltens dazwischen in entsprechende Kategorien eingeteilt. Die Summe der kontinuierlichen Überlappung des Einzelmolekül- und des NPC-Kreises wurde als eine "Verweilzeit" der jeweiligen prä-60S-Untereinheit in der Pore betrachtet.

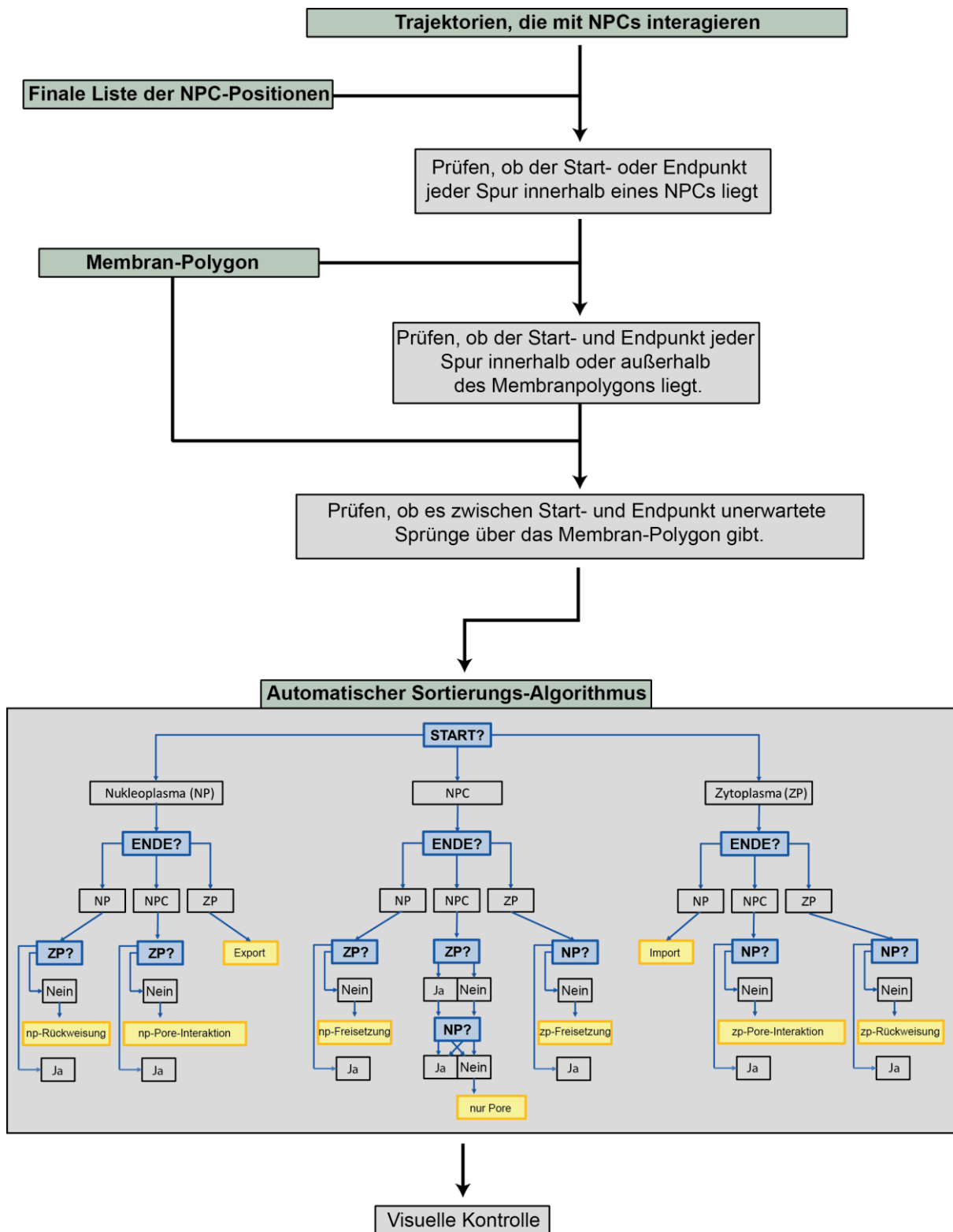


Abbildung 2-11 - Automatische Sortierung der Trajektorien in verschiedene Kategorien, abhängig von der Art der Interaktion mit der Kernpore. Details siehe Text (aus [111]).

Tabelle 2-10 - Definitionen der einzelnen Interaktionsmöglichkeiten der prä-60S Partikeln mit einzelnen Kernporen.

Kategorie	Erklärung
np-Rückweisung	Das Partikel wird im Nukleoplasma, während der Interaktion mit dem NPC und anschließend wieder im Nukleoplasma lokalisiert.
Export	Das Partikel wird im Nukleoplasma, während der Interaktion mit dem NPC und anschließend nach der Freisetzung ins Zytoplasma lokalisiert.
np-Pore-Interaktion	Das Partikel wird erst im Nukleoplasma und dann während der Interaktion mit der Pore lokalisiert, ist aber anschließend nicht weiter verfolgbar.
Import	Das Partikel wird erst im Zytoplasma, dann während der Interaktion mit dem NPC und anschließend nach der Freisetzung ins Zytoplasma beobachtet.
zp-Rückweisung	Das Partikel wird im Zytoplasma, während der Interaktion mit dem NPC und anschließend wieder im Zytoplasma lokalisiert.
zp-Pore-Interaktion	Das Partikel wird erst im Zytoplasma und dann während der Interaktion mit der Pore lokalisiert, ist aber anschließend nicht weiter verfolgbar.
np-Freisetzung	Das Partikel wird zuerst innerhalb eines NPCs und dann nach der Freisetzung ins Nukleoplasma lokalisiert.
zp-Freisetzung	Das Partikel wird zuerst innerhalb eines NPCs und dann nach der Freisetzung ins Zytoplasma lokalisiert.
nur Pore	Das Partikel wird ausschließlich innerhalb der Pore beobachtet.

2.8 Mobilitätsanalyse der prä-60S-Untereinheiten innerhalb des Nukleoplasmas mittels Spot-On

In 324 Zellen wurden prä-60S-Trajektorien isoliert, die innerhalb des Nukleoplasmas, aber nicht in den Nukleoli auftraten. In den konfokalen Aufnahmen des NTF2-Signals zeigten die Nukleoli eine geringere Fluoreszenzintensität im Vergleich zum restlichen Zellkern. Dieser Unterschied wurde genutzt, um die Nukleoli grob zu segmentieren.

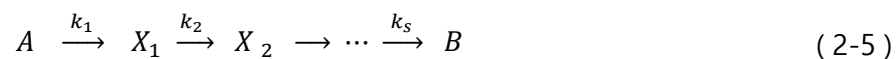
Zunächst wurde im transformierten Membranbild ein Graustufen-Schwellenwert mit der 'Otsu'-Methode [115] gesetzt. Diese Maskenbilder wurden invertiert, manuell korrigiert und der Bereich um die Nukleoli um 15 Pixel vergrößert. Alle Trajektorien, die sich innerhalb der Region dieser Maske oder außerhalb des Membranpolygons befanden, wurden für die weitere Analyse ausgeschlossen. So ergaben sich 7785 Trajektorien mit insgesamt 41457 Lokalisationen. Mittels des Webinterfaces Spot-On nach Hasen *et al.* (2018) [116] wurden die Diffusionskoeffizienten bestimmt.

Die Klassen-Breite der Sprungweiten-Histogramme wurde auf $0,02 \mu\text{m}$ und die Anzahl der Zeitpunkte auf 8 gesetzt. Nur die ersten 4 Sprünge wurden berücksichtigt und die maximale Sprungweite auf $1 \mu\text{m}$ gesetzt. Für die Modellanpassung wurde ein Drei-Zustands-Modell mit den folgenden Startparametern gewählt: $D_{bound} = 0,0005-0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_{slow} = 0,15-5 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_{fast} = 0,15-25 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $F_{bound} = F_{fast} = 0-1$, Lokalisierungsfehler = $0.043 \mu\text{m}$, *Model Fit* = *CDF*, Iterationen = 3.

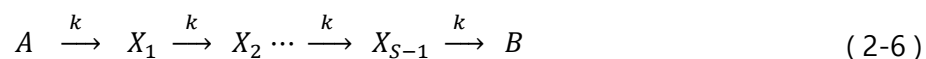
2.9 Modellierung der Verweilzeit und Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Kinetik der Export-Verweilzeit wurde durch Anpassung eines exponentiellen Abklingmodells entsprechend Floyd *et al.* (2010) [117] an die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Export-Verweilzeiten mit Hilfe von Mathematica (Wolfram) ermittelt.

Generell folgt die Kinetik biologischer Prozesse oft S uni-direktional verlaufenden, verschiedenen einzelnen Reaktionsschritten:



Für jeden dieser Schritte kann ein Poisson-Prozess mit einer Geschwindigkeitskonstante k angenommen werden. Da letztendlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die gesamte beobachtete Kinetik dieses Prozesses bestimmt, kann zusätzlich angenommen werden, dass die einzelnen Schritte die gleiche Geschwindigkeitskonstante aufweisen [117, 118].



Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion (*probability density functions*, PDF) dieser Reaktion entspricht einem exponentiellem Abklingmodell mit der Geschwindigkeitskonstante k und ist $S-1$ mal mit sich selbst gefaltet. Dies führt zu der folgenden Funktion mit $\Gamma(S)$ als Gammafunktion in Abhängigkeit der Anzahl der Reaktionsschritte S .

$$\text{pdf}(k, S) = \frac{k^S t^{S-1}}{\Gamma(S)} \cdot e^{-tk} \quad (2-7)$$

Um zu testen, ob M verschiedene Populationen von Partikeln existieren, wie z.B. ungebundene und ribosomal gebundene eIF6-Moleküle, wurden die Verweilzeitverteilungen durch einfach-, doppelt- oder dreifach-modale ($M \in [1,2,3]$) Funktionen modelliert [117, 118]. Zusätzlich wurde die PDF um einen Skalierungsfaktor a und einen Anpassungskonstante b erweitert

$$\text{pdf}(t; a, k, S, b) = \sum_{i=1}^M \left(a_i \cdot \frac{k_i^{S_i} t_i^{S_i-1}}{\Gamma(S_i)} \cdot e^{-t_i k_i} \right) + b \quad (2-8)$$

k_i , Geschwindigkeitskonstante

S_i , Anzahl der Reaktionsschritte

t , Verweilzeit

Γ , Gammafunktion

a_i , Skalierungsfaktor

b , Anpassungskonstante

M , Anzahl der Modalitäten ($M \in [1, 2, 3]$)

Um das Modell auszuwählen, das die Daten optimal beschreibt, wurde das korrigierte Akaike *Information Criterion* (AIC_c) nach Akaike (1974) und Burnham *et al.* (2002) berechnet [119, 120], welches die Residuen der Anpassung mit der Anzahl Beobachtungen und der Anpassungsparameter gewichtet.

$$AIC = n \ln \left(\frac{RSS}{n} \right) + 2k \quad (2-9)$$

$$AIC_c = AIC + \frac{2k(k+1)}{n-k-1} \quad (2-10)$$

n , Anzahl der Beobachtungen

RSS , Residuenquadratsumme

k , Anzahl der Anpassungsparameter

2.10 Anordnung der Exportereignisse entlang der Transportachse

Um auch Information über die Bewegung der prä-60S-Untereinheit innerhalb der Kernpore gewinnen zu können, wurden alle Export-Trajektorien so gedreht, dass der Export entlang der Transportachse einer Modellpore verläuft und die Position der Kernpore im Koordinatensprung liegt.

Um die Exporttrajektorien entlang der Transportachse auszurichten, wurde ein Drehwinkel mit Hilfe der zwei direkt benachbarten Kernporen zur Exportpore bestimmt (Abbildung 2-12). Im ersten Schritt wurden alle Koordinaten relativ zur zentralen Kernporen transformiert (Abbildung 2-12-Schritt-1). Die benachbarten NPCs wurden mit einer Linie verbunden und das Lot zwischen der zentralen Pore und dieser Linie bestimmt (Abbildung 2-12-Schritt-2 bis 4). Der Winkel zwischen dem Lot und der x-Achse repräsentiert den Drehwinkel φ . Um auch die Exportrichtung zu berücksichtigen, wurde die Lot-Linie um 10 Pixel verlängert. Wenn der Endpunkt dann innerhalb des Membranpolygons lag, wurde die Trajektorie und die benachbarten Kernporen um den Winkel φ gedreht. Lag der Endpunkt außerhalb des Polygons erfolgte die Drehung um $\varphi + 180^\circ$ (Abbildung 2-12-Schritt-6).

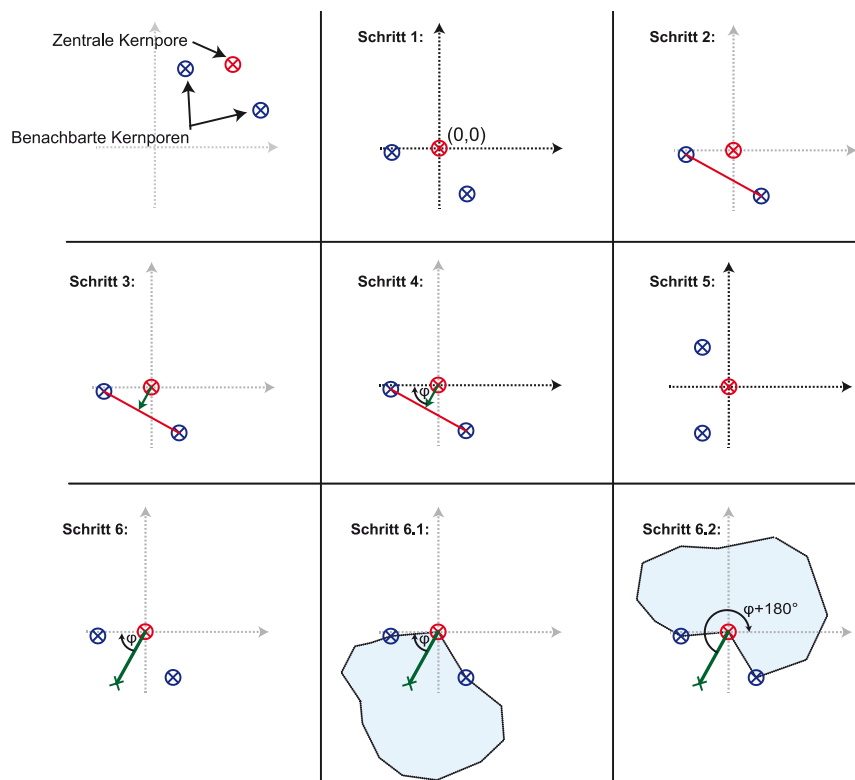


Abbildung 2-12 - Ausrichtung der Exporttrajektorien entlang der Exportrichtung auf die Abszisse. Details siehe Text (aus [111]).

2.11 Bestimmung der Position von NTF2 innerhalb der Kernpore

Zur Bestimmung der Position der NTF2-Akkumulation innerhalb einzelner NPCs, wurden HeLa S3 Zellen mit HaloTag-NTF2 transfiziert und mit JF549-HaloTag-Ligand angefärbt. Die Zellen wurden mit 4% PFA in PBS für 10 min bei 37 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen 5x für 10 min mit PBT-Puffer (0,5% (v/v) TritonX in PBS mit 3% (m/v) BSA) gewaschen und für 1 h mit einem mAb414 Antikörper (1:1000 verdünnt; Covance, MMS-120P) bei RT inkubiert. Die Zellen wurden wieder 3x mit PBT für jeweils 10 min gewaschen. Zuletzt wurde für 1 h mit einem polyklonalen anti-Maus-Sekundärantikörper, der mit AlexaFluor 488 markiert ist, (Rockland Inc, 610-152-121) inkubiert und im Anschluss wieder 3x für 10 min mit PBT gewaschen. Zuletzt wurde PBS zugegeben.

Die Proben wurden mit einem Zeiss LSM 880 mit Airyscan-Detektor abgebildet, die Aufnahmen Airyscan-prozessiert (Filterstärke „auto“) und die Farbverschiebung korrigiert.

Um die Positionen der maximalen NTF2- und Nup62-Akkumulation zu bestimmen, wurde in beiden Kanälen die Position der selben Kernpore manuell ausgewählt und durch vier Gaußsche Kurvenanpassungen in 45°-Grad-Winkeln genauer lokalisiert. Die Maxima der Anpassungen wurden gemittelt und der Abstand zwischen den Maxima von NTF2 und Nup62 berechnet.

Um herauszufinden, welches Maximum auf der nukleoplasmatischen Seite liegt, wurden die Positionen aller NPCs, wie zuvor in Kapitel 0 beschrieben, bestimmt und die Schwerpunkte dieser Positionen berechnet. Das Maximum, das näher am Massenschwerpunkt lag, wurde als auf der nukleoplasmatischen Seite befindlich betrachtet.

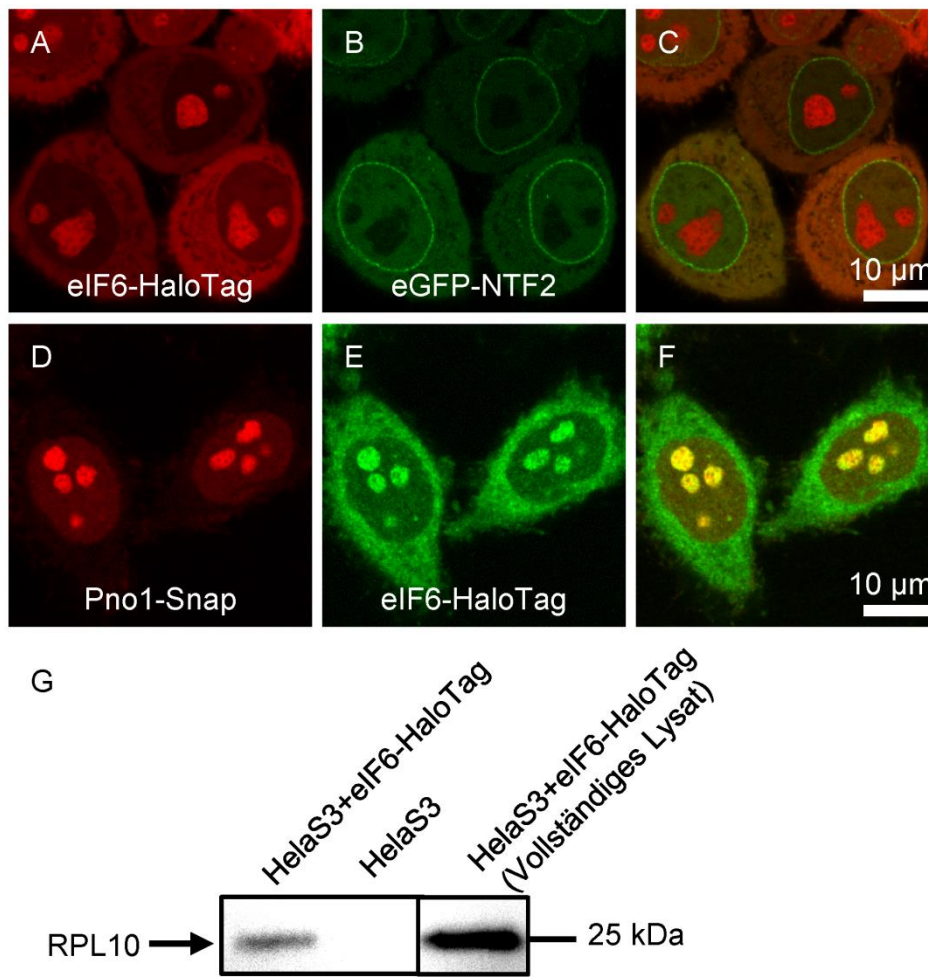
3 Ergebnisse

In dieser Arbeit soll die Exportkinetik der ribosomalen prä-60S-Untereinheiten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine stabile HeLa-Zelllinie erstellt, die HaloTag gebundenes eIF6 zur Beobachtung der großen ribosomalen Untereinheit und eGFP-NTF2 für die Markierung der Kernpore exprimiert. Darüber hinaus wurde ein kommerzielles konfokales Mikroskop mit Airyscan-Detektor um die Möglichkeit der Einzelmolekülbeobachtung mittels einer HILO-Beleuchtung und einer EMCCD-Kamera erweitert. Mit diesem Versuchsaufbau ist die Verfolgung einzelner prä-60S-Untereinheiten und die Beobachtung der Interaktion mit einzelnen Kernporen möglich.

3.1 eIF6-HaloTag wird funktional in prä-60S-Untereinheiten integriert

Um einzelne ribosomale prä-60S-Untereinheiten in lebenden Zellen verfolgen zu können, müssen diese fluoreszenzmarkiert werden. Hierfür wurde ein indirekter Ansatz gewählt bei dem nicht eins der ribosomalen Proteine selbst, sondern ein Hilfsfaktor der Ribosombiogenese als Marker eingesetzt wird. Der gewählte Hilfsfaktor ist eIF6, welches eine zu frühe Vereinigung der beiden ribosomalen Untereinheiten durch Blockade der Bindungsstelle an der 60S-Untereinheit verhindert [89, 91, 121]. eIF6 bindet bereits im frühem Stadium der Ribosombiogenese in den Nukleoli an die prä-60S-Untereinheit und wird erst während der Finalisierung im Zytoplasma abgespalten [90, 92]. Zur Fluoreszenzverfolgung wurde eIF6 mit einem HaloTag als Fusionsprotein ko-exprimiert und stabil durch retrovirale Transduktion in HeLa S3 Zellen integriert (siehe Kapitel 2.1.5).

Eine Färbung mit 0,1 μ M JF549-HaloTag-Ligand zeigt die typische Akkumulation der eIF6-Partikel in den Nukleoli (Abbildung 3-1-A) und legte nahe, dass das HaloTag-markierte eIF6 bevorzugt an prä-60S-Partikel gebunden ist, wie bereits von Gallo *et al.* (2011) gezeigt. Dass sich diese Akkumulationen wirklich innerhalb der Nukleoli befinden, kann zusätzlich durch eine Ko-Markierung von eIF6-HaloTag mit SnapTag markiertem Pno1 (auch Dim2 genannt), ein etablierter Hilfsfaktor der kleinen Untereinheit [122], gezeigt werden (Abbildung 3-1-D bis F).



[123]

Abbildung 3-1 - (A-C) HeLa S3-Zellen exprimieren eGFP-NTF2 und eIF6-HaloTag. (A) eIF6-HaloTag-JF549-Färbung. (B) eGFP-NTF2. (C) Überlagerung der beiden Kanäle. (D-F) eIF6-HaloTag-JF549 zeigt die gleiche nukleolare Verteilung wie Pno1-Snap-SiR647 ([88, 124]). (D) HeLa-Zellen, die Snap-Pno1 exprimieren, gefärbt mit 647-SiR. (E) Transient exprimiertes eIF6-HaloTag angefärbt mit JF549. (F) Überlagerung der beiden Kanäle. (G) Immunoblot gegen Rpl10 nach einem *Pull-Down* von eIF6-HaloTag in HeLa S3 Zellen, die eIF6-HaloTag stabil exprimieren und in unveränderten HeLa S3 Zellen. Das vollständige Lysat ist als Antikörperkontrolle gezeigt (aus [111]).

Diese Bindung wurde weiter durch einen *Pull-Down*-Versuch von Annika Krüger gezeigt, bei dem HaloTag gebundenes eIF6 aus dem Zelllysat auf *HaloLink*-Resin immobilisiert wurde. Anschließend konnte durch einen Immunoblot an eIF6 gebundene Proteine nachgewiesen werden. Hier zeigt sich, dass eIF6-HaloTag an das ribosomale Protein RPL10 der 60S-Untereinheit gebunden ist (Abbildung 3-1-G) und eine erfolgreiche Integration von eIF6-HaloTag in die prä-60S-Untereinheiten stattgefunden hat. Bei HeLa S3 Zellen ohne eIF6-HaloTag kann kein RPL10 auf dem Resin nachgewiesen werden.

Zur weiteren Funktionskontrolle wurden zu HeLa Zellen, die eIF6-HaloTag stabil exprimieren, 10 µg/mL Actinomycin D zugegeben, welches in die DNA interkaliert und so die RNA Synthese blockiert [123]. Die Zellen wurden für 24 h in regelmäßigen Intervallen abgebildet. Nach 10 h ist

die nukleoläre Akkumulation von eIF6 nahezu vollständig aufgelöst (Abbildung 3-2-A bis C). Dies zeigt, dass die Transkription neuer Ribosomen gestoppt wurde und eIF6-HaloTag in den Nukleoli hauptsächlich ko-transkriptional zu der 60S-rRNA vorliegt.

Als Kontrolle für den Exportvorgang wurde in einem Experiment von Annika Krüger die Bindung des wichtigsten Exportrezeptors Crm1 an NMD3 durch Zugabe von LMB gehemmt [55, 125]. Dadurch sollten eIF6-HaloTag gebundene Ribosomen nicht mehr exportiert werden. Hier kam es zu einem deutlichen, aber nicht besonders umfangreichen Anstieg der nukleären Intensität (Abbildung 3-2-D bis F) über einen Zeitraum von 3 h. Dies zeigt, dass ribosomal gebundene eIF6-HaloTag-Moleküle nicht exportiert werden. Der Fluoreszenzanstieg ist jedoch nicht besonders stark. Dies ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass freie eIF6-HaloTag-JF549-Moleküle mit einer Größe von ~59 kDa immer noch Crm1-unabhängig zwischen Kern und Zytoplasma diffundieren können, wie es auch für GFP-Dimere dieser Größe noch möglich ist [126, 127].

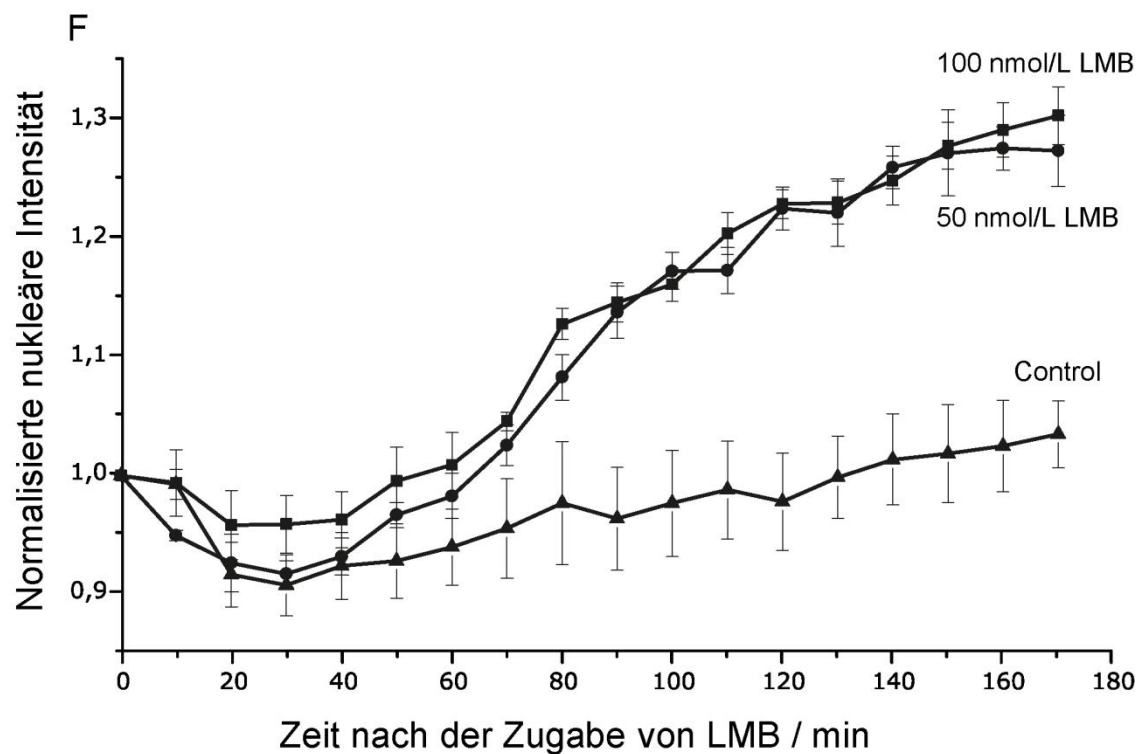
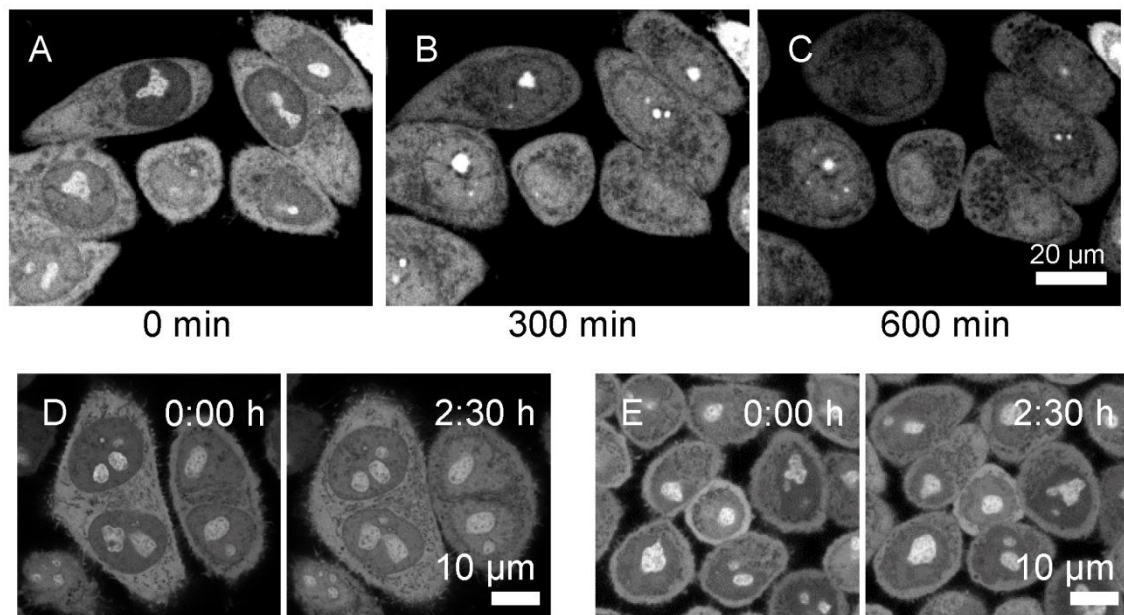


Abbildung 3-2 - (Oben) Actinomycin D hemmt die Synthese neuer Transkripte und führt zu einem Verlust der nukleolären Färbung, was bedeutet, dass keine weiteren Untereinheiten gebildet wurden. Konfokale Schnitte von HeLa S3-Zellen, die eIF6-HaloTag stabil exprimieren, markiert mit JF549 nach Zugabe von 10 mM Actinomycin D bei (A) 0 min, (B) 300min, (C) 600 min. (Unten) LMB verhindert die Crm1-Bindung und damit den Kernexport der prä-60S-Untereinheit, was zu einem Anstieg der intranukleären Fluoreszenz führt. (D) eIF6-HaloTag-JF549 bei 0:00 h und nach 2:30 h Inkubation mit 100 nmol/L LMB. (E) eIF6-HaloTag-JF549 bei 0:00 h und nach 2:30 h Inkubation mit 10 μL Ethanol als Kontrolle (F) Normalisierte Fluoreszenzintensität im Zellkern als Funktion der Zeit bei einer Konzentration von 50 nmol/L LMB (N=7, Kreise), 100 nmol/L (N=9, Quadrate) und einer Kontrollmessung mit Ethanol (N=4, Dreiecke). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar (aus [111]).

3.2 Lokalisation von NTF2

Zur Identifikation der einzelnen Kernporen wurde der Ran-Transportfaktor NTF2, fusioniert mit dem autofluoreszierenden Protein GFP, als Marker verwendet und neben eIF6-HaloTag stabil in die HeLa-S3-Zellen integriert. In Airyscan Aufnahmen können einzelne NPCs, welche einen minimalen Abstand von 130 nm zu benachbarten Kernporen aufweisen [128], als diskrete Fluoreszenzmaxima identifiziert werden (Abbildung 3-1-B und Abbildung 3-3-C).

Die Position dieser Maxima innerhalb einer Pore wurde mit dem Antikörper mAb414, der das Nukleopurin p62 (Nup62) bindet, genauer bestimmt. Die Position dieses Antikörpers innerhalb einzelner NPCs konnte von Schwarz-Herion *et al.* (2007) mittels Elektronenmikroskopie bestimmt werden und dient somit als gute Referenz der Kernporenposition [129, 130].

HeLa S3-Zellen wurden mit HaloTag-NTF2 transfiziert, mit JF549 angefärbt und im Anschluss mit dem primären Antikörper mAb414 und einem AlexaFluor488-markiertem Anti-Maus-Sekundäntikörper inkubiert (Abbildung 3-3-B bis E). Die Bestimmung der genauen Position beider Markierungen innerhalb eines Kernporenkomplexes erfolgte mittels einer Gauß-Anpassung an die klar sichtbaren Maxima (Details siehe Kapitel 2.11). Die Distanz zwischen zwei Maxima derselben Kernpore gibt nun die Position des NTF2s in Relation zu Nup62 an. In Abbildung 3-3-A ist die Distanzverteilung der NTF2-Maxima zur mittleren NTF2-Akkumulation (Position 0 auf der x-Achse) dargestellt. Der Vergleich mit dem Model einer durchschnittlichen Kernpore (Abbildung 3-3-A oben) zeigt, dass das Maximum der Verteilung des NTF2s zwischen -40 bis 20 nm liegt. NTF2 akkumuliert also auf der nukleoplasmatischen Seite und im inneren Ring der Kernpore. Aber auch ein deutlich kleineres Maximum zwischen 40 bis 80 nm auf der zytoplasmatischen Seite ist zu erkennen. Der durchschnittliche Abstand von NTF2 von der zentralen Ebene der Pore beträgt etwa -24 nm.

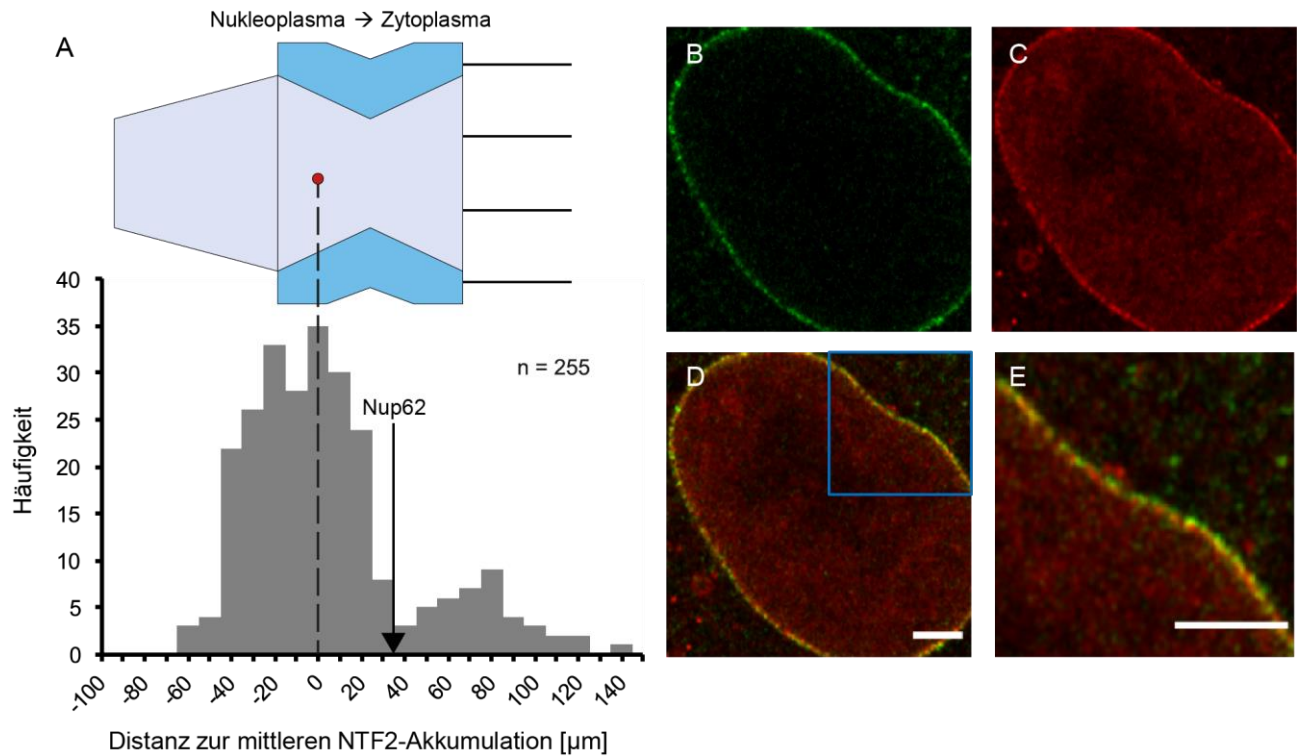


Abbildung 3-3 - (A) Die maximale NTF2-Fluoreszenzintensität wurde als Indikator für die Position des NPC-Zentrums verwendet, welche mit dem Anti-Nukleoporin p62 (Nup62)-Antikörper mAb414 als Referenz kalibriert wurde. Für 255 NPCs in 33 Zellen wurden die Positionen der HaloTag-NTF2-JF549- und Nup62-Maxima durch das Anpassen von vier Gaußfunktionen in 45°-Winkeln bestimmt. Die vier Maxima, welche sich aus den Kurvenanpassungen ergaben, wurden gemittelt und der Abstand zwischen den gemittelten Maxima von Nup62 und NTF2 berechnet. Die endgültigen Abstände wurden um 10 nm korrigiert, um die Position des Nup62-Signals in Bezug auf die zentrale Ebene des NPC zu berücksichtigen, entsprechend [129, 130]. Das gesamte Histogramm wurde so verschoben, dass das mittlere NTF2-Maximum auf der Position 0 nm liegt (aus [111]). (B) mAb414 mit einem polyklonalen Anti-Maus-Sekundärantikörper, markiert mit AlexaFluor488. (C) HaloTag-NTF2 gefärbt mit JF549 (D) Überlagerung der beiden Kanäle (E) Vergrößerung des in (D) markierten Bereichs. Die Maßstabsbalken entsprechen 3 µm .

3.3 Kombination hochauflösender konfokaler und Einzelmolekül-Mikroskopie

Um sowohl einzelne ribosomale Untereinheiten, als auch ihre Wechselwirkung mit einzelnen Kernporen abbilden zu können, ist es nötig die Bewegung der Partikel möglichst schnell aufzunehmen, während aber zeitgleich für eine Zuordnung der Interaktion, die Kernmembran hochauflöst abgebildet werden muss.

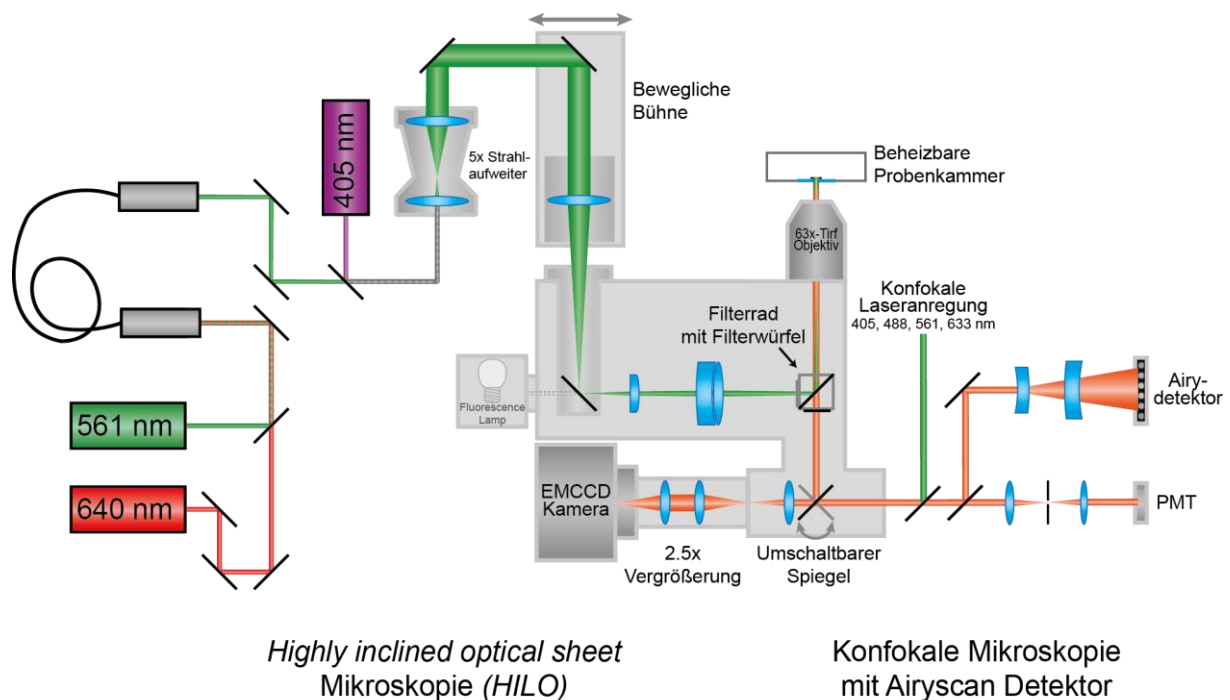


Abbildung 3-4 - Das Zeiss LSM880 mit Airyscan-Detektor wurde um einen zusätzlichen HILO-Beleuchtung und eine hochempfindliche EMCCD-Kamera erweitert. Diese ermöglicht die Abbildung einzelner, mit eIF6-HaloTag-JF549 markierter prä-60S-Partikel. Durch Umschalten des vollautomatischen Mikroskops in den supraauflösenden konfokalen Modus konnte die gleiche Probenregion mit Airyscan-Mikroskopie aufgenommen werden, was die Abbildung einzelner eGFP-NTF2-markierter NPCs an der Kernmembran ermöglichte. Zur Bildregistrierung wurden an die Zelloberfläche gekoppelte UV-fluoreszierende Mikropartikel verwendet, die in beiden Modi zu sehen waren (aus [111]). Details zum Aufbau siehe Kapitel 2.6.1.

Um dies zu erreichen wurde das kommerzielle Zeiss LSM880, das mit einem Airyscan-Detektor mit einer optische Auflösung von ca. 150 nm ausgestattet ist, um zusätzliche Laser zur HILO-Einzelmolekülbeleuchtung und eine EMCCD-Kamera erweitert (Abbildung 3-4). Für Details zu den theoretischen Hintergründen der beschriebenen mikroskopischen Methoden und dem Aufbau siehe Kapitel 2.6. In Abbildung 3-5 sind die Laserprofile in Fluoreszenzfarbstoffproben der

verschiedenen Beleuchtungsmodi der zusätzlichen Laser in der lateralen Ebene dargestellt. Für die Epi-Weitfeldmikroskopie zeigt sich hier ein rundlicher Beleuchtungsfleck, für die HILO-Beleuchtung ergibt sich ein länglicheres Laserprofil.

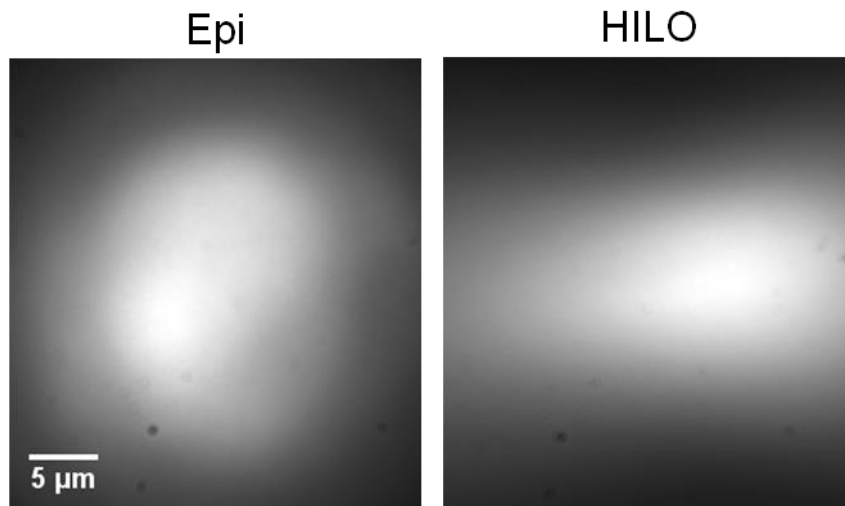


Abbildung 3-5 - Die in das LSM880 eingebaute zusätzliche Laser-Beleuchtung ermöglicht verschiedene Beleuchtungs-Modi. Dargestellt sind die Laserprofile, sichtbar gemacht durch eine Probe bestehen aus einer Fluoreszenzfarbstoffmischung und 2% Agarose. Neben einer konventionellen Epi-Weitfeldbeleuchtung ist auch eine HILO-Beleuchtung möglich.

Die Kombination der verschiedenen mikroskopischen Methoden bedarf aufgrund der sehr unterschiedlichen Lichtwege einer sehr genauen Anpassung der resultierenden Aufnahmen zueinander. Dies wurde erreicht, indem fluoreszierende Mikropartikel an die äußere Membran der HeLa-Zellen gebunden und mit beiden Methoden abgebildet wurden (siehe Kapitel 2.6.2). Diese Marker ermöglichen dann in der Datenauswertung eine Registrierung beider Bilder.

Um zu überprüfen, ob die an die Zellmembran gebundenen Mikropartikel negative Einflüsse auf die Zellen haben, wurden zwei Viabilitätstests durchgeführt. Zum einen wurde ein Neutralrot-Assay nach Repetto *et al.* (2008) genutzt, um die Zellviabilität und Zytotoxizität der Modifikation zu überprüfen [105]. Dabei hängt die Aufnahme des Farbstoffes Neutralrot davon ab, wie gut die Zellen einen pH-Gradienten innerhalb der Lysosomen durch ATP-Produktion aufrecht erhalten können. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 beträgt die Nettoladung des Farbstoffs Null und er kann somit in die Zellen diffundieren. Bei niedrigeren pH innerhalb der Lysosomen ändert sich die Nettoladung und das Neutralrot kann nicht mehr herausdiffundieren. Der von den Zellen aufgenommene Farbstoff wurde extrahiert und die Menge mittels Absorptionsspektroskopie bei 540 nm analysiert. Der Vergleich zwischen einer Kontrollprobe und einer Probe mit

Mikropartikeln zeigt über den Zeitraum von sieben Tagen keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität zwischen beiden (Abbildung 3-6-A).

Als zweiter Vitalitäts-Test wurde ein Trypanblau-Assay durchgeführt. Der Farbstoff Trypanblau färbt dabei alle Zellen mit nicht intakter Zellmembran an [106]. Diese angefärbten Zellen werden als tot betrachtet. Sowohl die Anzahl der lebenden, als auch der toten Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt. In Abbildung 3-6-B ist das Verhältnis der toten Zellen zu den Lebenden gezeigt. Auch hier ergaben sich kein bedeutender Unterschied zwischen der Kontrolle und der Probe mit Mikropartikeln nach einem bzw. drei Tagen. Nach sieben Tagen zeigt die Probe mit den Mikropartikeln sogar ein minimal besseres Tod/Lebend-Verhältnis der Zellen.

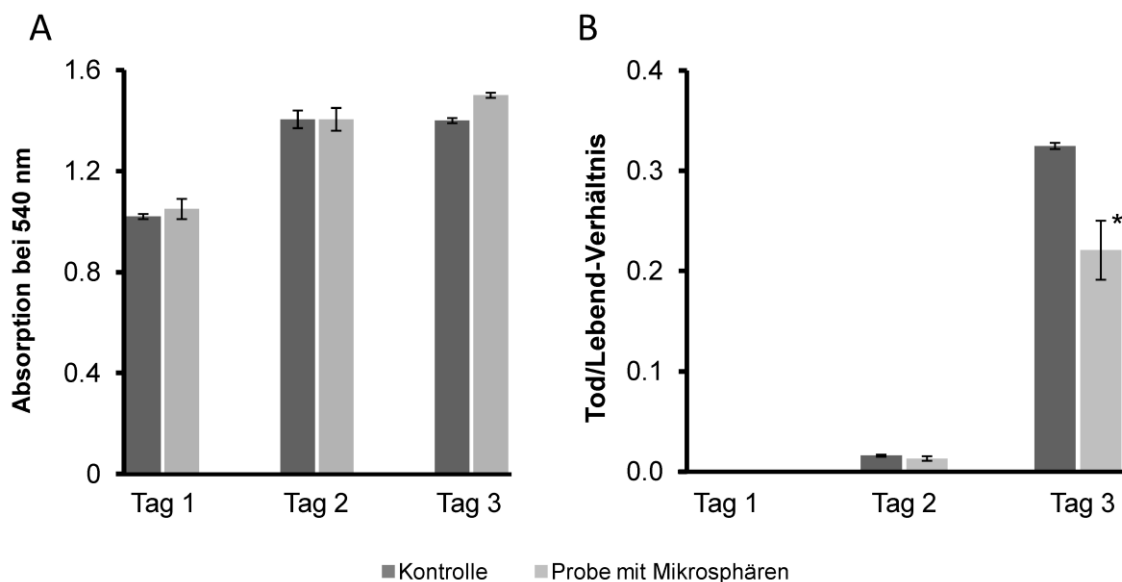


Abbildung 3-6 - Viabilitätstests zeigen keine wesentlichen Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen und Zellen, die mit modifizierten Mikropartikel inkubiert wurden. (A) Neutralrot-Assay (B) Tod/Lebend-Verhältnis bestimmt durch ein Trypanblau-Assay. (Das Signifikanzniveau wurde mittels eines T-Tests ermittelt. * entspricht $p < 0,05$) Details siehe Text und Kapitel 2.6.2.3.

Die Bindung der fluoreszierenden Mikropartikel an die Zellmembran erlaubt die quasi-simultane Abbildung der ribosomalen Untereinheiten und der Kernporen. Um die Interaktion einzelner prä-60S-Untereinheiten mit einzelnen Kernporen quantitativ und effektiv zu verarbeiten, wurde eine Datenanalyse in der Bildbearbeitungssoftware ImageJ entwickelt, die die Daten weitestgehend automatisiert und unabhängig auswertet. Zuerst wurden die mikroskopischen Aufnahmen aufeinander angeglichen und transformiert. In den Einzelmolekülaufnahmen wurden die Trajektorien der einzelnen Partikel durch das ImageJ Plug-In 'TrackMate' [110] bestimmt und in den

konfokalen Membran-Aufnahmen die Position der einzelnen Poren identifiziert. Der Vergleich aller Trajektorien mit diesen Positionen ermöglicht die Isolation einzelner prä-60S-Partikel, die mit Poren interagieren. Aus der Liste der einzelnen Kernporen wurde ein Polygon erstellt, das den Verlauf der Kernmembran beschreibt, um unterscheiden zu können, ob ein Partikel sich innerhalb oder außerhalb des Kerns aufhält. So konnten die einzelnen Interaktionen durch einen selbstentwickelten Algorithmus in verschiedene Kategorien unterteilt werden. Dieses Vorgehen ist schematisiert in Abbildung 3-7 dargestellt (Details, siehe Kapitel 0).

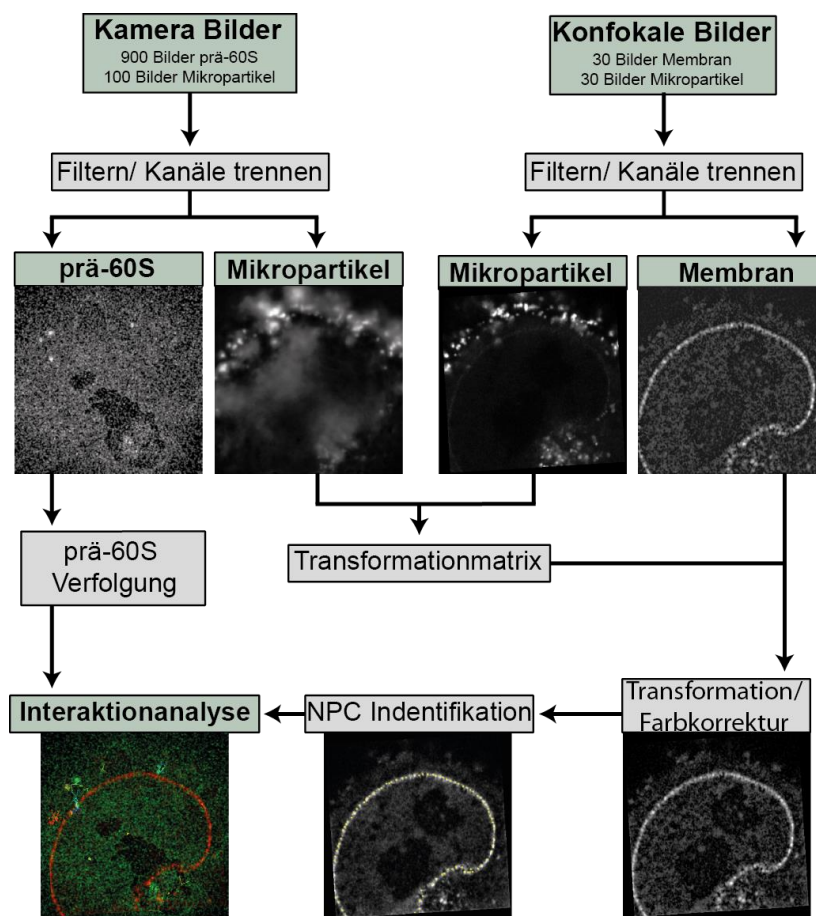


Abbildung 3-7 - Schematische Darstellung des Messprinzips. Bei einer Anregung von 561 nm wurde eine Bildfolge von einzelnen eIF6-HaloTag-JF549-Molekülen innerhalb eines Zellkerns mit einer hohen Rate von 70 Hz aufgenommen. Direkt im Anschluss wurden bei einer Anregung von 405 nm die Referenzmikropartikel abgebildet. Anschließend erfolgte mittels Airyscan-Mikroskopie bei 488 bzw. 405 nm alternierend die Aufnahme von eGFP-NTF2 und den Referenzmikropartikel. Aus der Aufnahme der EMCCD-Kamera ergaben sich die einzelnen prä-60S-Trajektorien. Die supraauflösenden Bilder der NTF2-markierten NPCs ermöglichten die Bestimmung der einzelnen NPC-Positionen entlang der Kernmembran. Aus den beiden Sätzen der Referenzmikropartikel-Bilder wurde eine Transformationsmatrix berechnet, die zur Abbildung der prä-60S-Trajektorien auf die NPC-Positionen benötigt wird (aus [111]).

Das Angleichen der konfokalen Aufnahmen mit den Kamera-Aufnahmen konnte bei ca. 60% der Messungen erfolgreich durchgeführt werden. Insgesamt ergaben sich so 407 einzelne Messun-

gen in 231 unterschiedlichen Zellen. Dabei wurden die ribosomalen Partikel zusammengenommen für eine Zeit von ca. 90 min abgebildet und es konnten 4349 einzelne Interaktionen der prä-60S-Partikeln mit einzelnen NPCs identifiziert werden.

3.4 Abbildung einzelner ribosomaler Untereinheiten im Zellkern und Mobilität im Nukleoplasma

Der hier entwickelte Mikroskop-Aufbau ermöglicht die Abbildung einzelner ribosomaler Partikeln innerhalb des Zellkerns. Es ist zu erkennen, dass die prä-60S-Untereinheiten innerhalb des Zellkerns überwiegend immobil vorliegen (Abbildung 3-8).

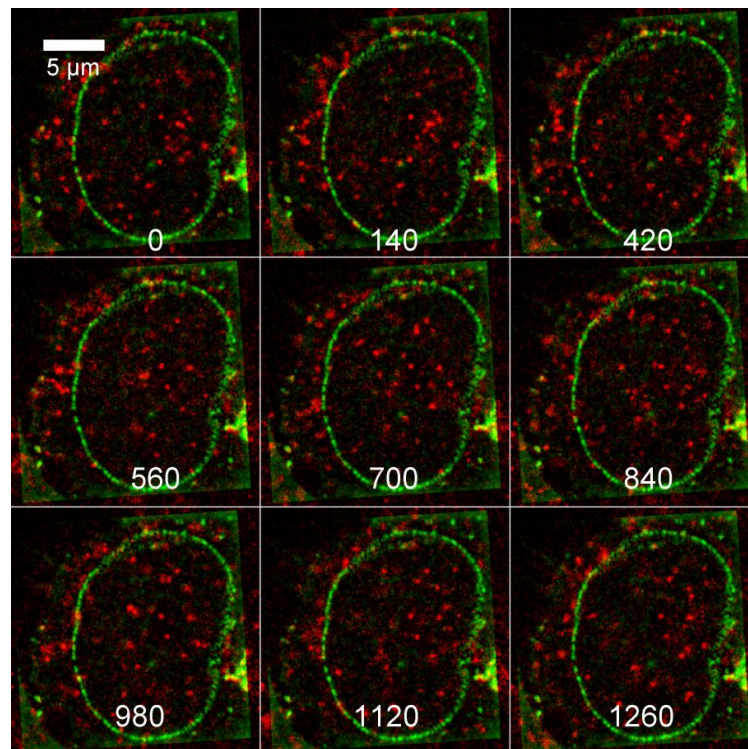


Abbildung 3-8 - HeLa-Zellen, die eGFP-NTF2 (grün) und JF549 markiertes eIF6-HaloTag (rot) stabil exprimieren, nach der Bildregistrierung. Einzelne prä-60S-Partikeln können klar unterschieden werden. Die Zahlen stellen die Zeit in Millisekunden dar (aus [111]).

Um die Mobilität im Nukleoplasma genauer analysieren zu können, wurden aus allen Filmen 7785 Trajektorien mit insgesamt 41457 einzelnen Lokalisierungen isoliert, die sich ausschließlich innerhalb des Nukleoplasmas und nicht innerhalb der Nukleoli befanden (Siehe Kapitel 2.8). Diese Trajektorien wurden mittels des Webinterfaces Spot-On [116] weiter analysiert. Spot-On er-

stellt aus den Trajektorien eine Sprungweitenverteilung, welche sich durch ein dreistufiges Diffusionsmodell beschreiben lässt.

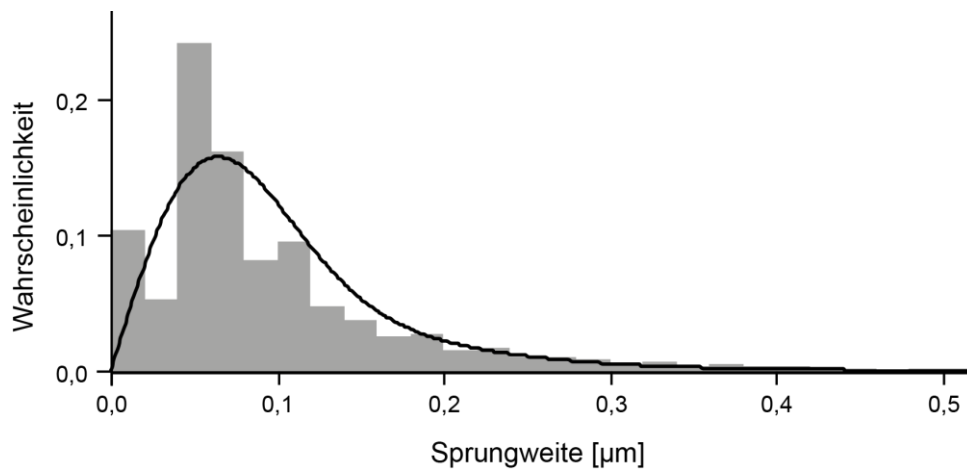


Abbildung 3-9 - Sprungweitenhistogramm der Sprünge im Nukleoplasma. Gezeigt ist zusätzlich die Dreikomponentenanpassung (schwarze Kurve).

Hieraus ergab sich, dass die Partikeln in drei Fraktionen vorliegen, die in Tabelle 3-1 mit den entsprechenden Diffusionskoeffizienten und der jeweiligen Fraktionsgröße dargestellt sind. Es zeigt sich, dass der Großteil der Partikeln immobil ($68 \pm 2\%$) vorliegt und nur ein kleiner Teil frei diffundiert ($6 \pm 2\%$). Der schnellste Diffusionskoeffizient ist mit $1,72 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ leicht niedriger als der von Landvogt et. al gemessene Wert von $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die kleine Untereinheit [87].

Tabelle 3-1 - Diffusionskoeffizienten und Größe der einzelnen Fraktionen der Dreikomponenten-Anpassung an die Sprungweiterverteilung.			
	Immobil	Retardiert	Mobil
Diffusionskoeffizient [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	$0,01 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	$1,72 \pm 0,1$
Fraktionsgröße [%]	68 ± 2	26 ± 2	6 ± 2

Für freies eIF6-HaloTag (mit einer Molmasse von 60 kDa) kann die Mobilität im Nukleoplasma abgeschätzt werden. Dazu wurde die Proteindichte entsprechend Fisher *et al.* (2004) [131] zu $1,41 \text{ g/cm}^3$ abgeschätzt und angenommen, dass das Protein annähernd sphärisch ist. So ergibt sich ein Proteinradius von $R_0 = 2,56 \text{ nm}$. Mittels der Stokes-Einstein-Gleichung berechnet sich dann ein Diffusionskoeffizient von $19,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$:

$$D_{eIF6-Halo} = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta R_0} = 19,7 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \quad (3-1)$$

Die Viskosität (η) im Nukleoplasma wurde dabei zu 4,8 cP [132] angenommen und die Temperatur (T) auf 310 K gesetzt. k_B stellt die Boltzmann-Konstante dar.

Der resultierende Wert ist deutlich größer als alle drei gemessenen Diffusionskoeffizienten und zeigt, dass die detektierten Signale ribosomal gebundenes eIF6 darstellen.

3.5 Interaktion einzelner ribosomaler Untereinheiten mit Kernporen und Kategorisierung der Interaktionen

Durch Kombination der hochaufgelösten Abbildungen der Kernporen und den entsprechenden Einzelmolekülbeobachtungen, ist es möglich die Interaktion ribosomaler Untereinheiten mit den NPCs zu studieren. Hierbei konnte beobachtet werden, wie einzelne Untereinheiten sich den Kernporen annähern und exportiert werden. Auch ein "Testen" entlang verschiedener Kernporen, manchmal auch mit anschließendem erfolgreichen Export, war zu erkennen (Abbildung 3-11-B). Um die Vielzahl an Interaktionen effektiv zu verarbeiten, wurde eine automatisierte Datenanalyse entwickelt, die die Wechselwirkungen identifiziert und diese in entsprechende Kategorien sortiert. (Siehe Kapitel 0 und Abbildung 3-10)

Eine Interaktion zwischen den Partikeln und den Poren wurde erkannt, wenn die Distanz zwischen der Position des Partikels und der Pore unter einem Grenzwert von 129 nm lag. Dieser Wert setzte sich aus der Einzelmolekül-Lokalisierungsgenauigkeit, der Ko-Lokalisierungsgenauigkeit und der Größe einer durchschnittlichen Kernpore zusammen (Siehe Kapitel 0).

Die durch den Analyse-Algorithmus gefundenen Interaktionen der prä-60S-Untereinheiten mit den Kernporen wurden je nach ihrer Art in eine von neun verschiedenen Kategorien unterteilt (Abbildung 3-10, detaillierte Legende siehe Tabelle 2-10). Kann eine Interaktion nicht klar einer Pore zugeordnet werden oder ist die Trajektorie fehlerbehaftet, wurden sie in die Kategorie 'unbestimmt' eingeordnet. Insgesamt identifizierte der Algorithmus 4349 Interaktionen (Abbildung 3-10). Davon zeigten 78 Ereignisse einen klaren Export-Prozess (Siehe die Darstellung aller Export-Ereignisse auf S. 109). Dies wirkt erst mal wenig, aber damit ein Ereignis als Export zählt, muss zum einen die Untereinheit erst klar im Nukleoplasma, während der Interaktion mit der Pore und letztendlich nach der Freisetzung in das Zytoplasma lokalisiert werden. Zum anderen

muss auch die Kernpore selbst klar identifizierbar sein. Da die Bewegung der prä-60S-Ribosomen jedoch nur in einer zwei dimensional Ebene gemessen wurde, aber die Partikel sich im gesamten dreidimensionalen Zellraum ausbreiten, zeigen auch viele Interaktionen nur Teilschritte.

Die Kategorie zp-Rückweisung (n=532) zeigt die Freisetzung von Partikeln aus der Pore, aber ohne dass hier der erste Interaktionsschritt mit dem NPC zu sehen ist. Diese Ereignisse werden wahrscheinlich auch überwiegend durch Exporte verursacht. Auch wurden 552 Ereignisse beobachtet, bei denen eine Untereinheit aus dem Nukleoplasma mit einer Kernpore interagiert, ohne dass die Freisetzung beobachtet werden konnte (np-Pore-Interaktion). Auch in dieser Kategorie könnten zu einem Großteil Exporte vorliegen. Ebenfalls wurde das Partikel in 799 Fällen auch nur innerhalb der Pore lokalisiert, ohne dass eine erste Interaktion aus nukleo- oder zytoplasmatischer Richtung oder die Freisetzung beobachtet wurde. Möglicherweise befinden sich darunter auch weitere Exportereignisse.

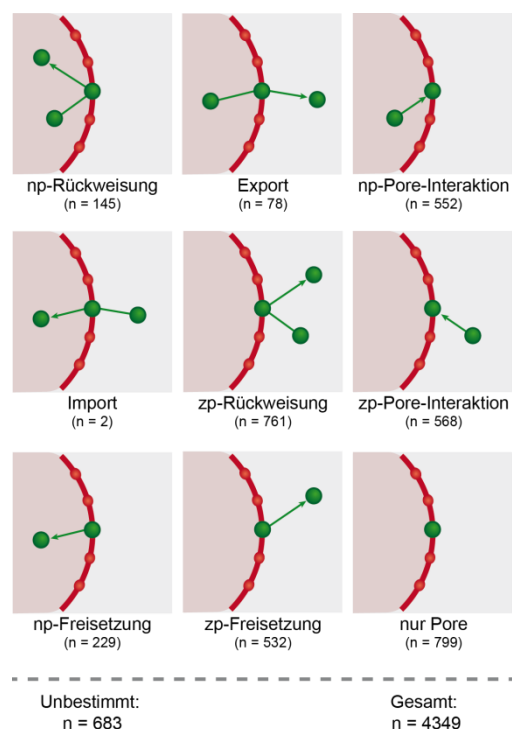


Abbildung 3-10 - Alle Möglichkeiten, wie die prä-60S-Partikel mit den NPCs interagieren können und die Häufigkeit (n), wie oft die jeweiligen Fälle auftraten (Modifiziert aus [111]).

3.6 Nukleärer Export von prä-60S-Untereinheiten und Exportkinetik

Besonders von Interesse sind die hier gefundenen 78 Export-Ereignisse, bei denen die Partikel deutlich im Nukleoplasma, während der Interaktion mit der Kernpore und beim Verlassen der Pore in das Zytoplasma lokalisiert werden konnten. In Abbildung 3-11 sind drei Exporte exemplarisch dargestellt. Die Verweilzeiten an der Pore ergaben sich aus der Anzahl an Bildern in denen der Abstand des Partikel und der Pore unter dem Grenzwert von 129 nm lag (siehe Kapitel 0). Abbildung 3-12 zeigt die Verteilung der Export-Zeiten, dabei ergibt sich eine mittlere Export-Zeit von 35 ± 20 ms.

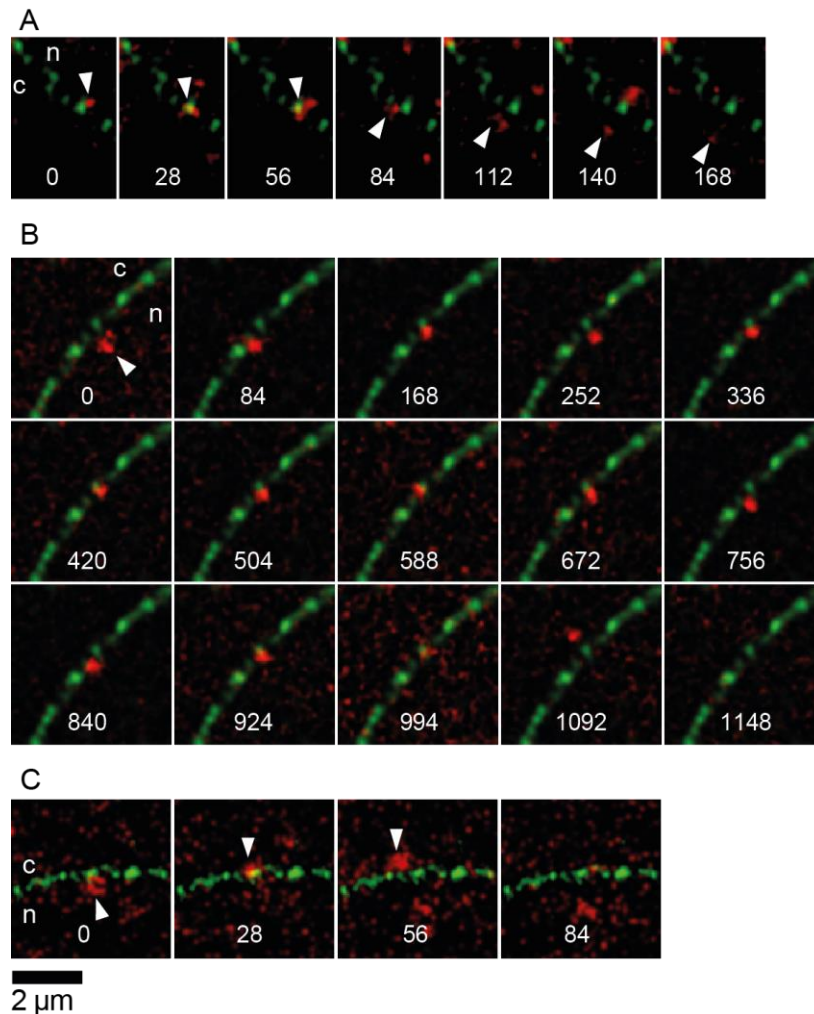


Abbildung 3-11 - Einzelne prä-60S-Partikel, die eine einzelne Kernpore passieren. (A, B, C) Bildsequenzen, die Export-Ereignisse zeigen. Die Zahlen stellen die Zeit in ms dar. Die Pfeile markieren das exportierte Partikel. n = Nukleoplasma; c = Zytoplasma (aus [111]).

Die Export-Kinetik wurde durch Anpassung eines exponentiellen Abkling-Modells an die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweilzeiten bestimmt. Um zu überprüfen, ob verschiedene Populationen von Partikeln, wie ribosomal gebundenes und freies eIF6, mit verschiedenen Exportzeiten existieren, wurde ein einfach, zweifach und dreifach modales Model getestet (siehe Kapitel 0). In Abbildung 3-12 wird deutlich, dass eine Modalität von 3 die Daten sehr unzureichend beschreibt, während sich für die Kurvenanpassung zwischen einer Modalität von 1 und 2 kein Unterschied ergibt. Die weitere Auswahl des geeignetsten Modells wurde mit Hilfe des korrigierten *Akaike Information Criterion* (AIC_c , [119, 120]) getroffen. Hierbei ergab sich, dass nur eine Spezies an Partikeln mit nur einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und so auch nur mit einer Translokationszeit vorliegt. Der Erwartungswert der Exportdauer liegt bei $\tau = 24 \pm 4$ ms.

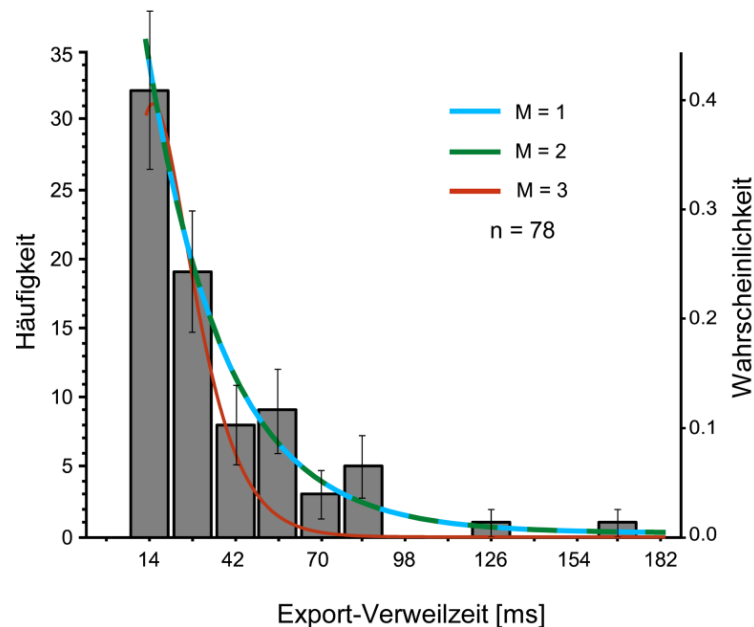


Abbildung 3-12 - Verteilung der Exportzeiten. Die gezeigten Fehlerbalken entsprechen der Abweichung unter der Annahme eines Poisson-Prozesses. Die verschieden farbigen Linien zeigen die Anpassungen eines exponentiellen Abklingmodells mit einer Modalität von $M \in [1, 2, 3]$ an die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Exportzeiten (aus [111]).

Um auch räumliche Informationen innerhalb der Kernpore, wie die Lage des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts, untersuchen zu können, wurden alle Export-Trajektorien gedreht, so dass die Exportrichtung parallel zur Transportachse eines Modell-NPCs verläuft. In Abbildung 3-13 sind die gedrehten Trajektorien der Exporte aus Abbildung 3-11 dargestellt (Details siehe Kapitel 0).

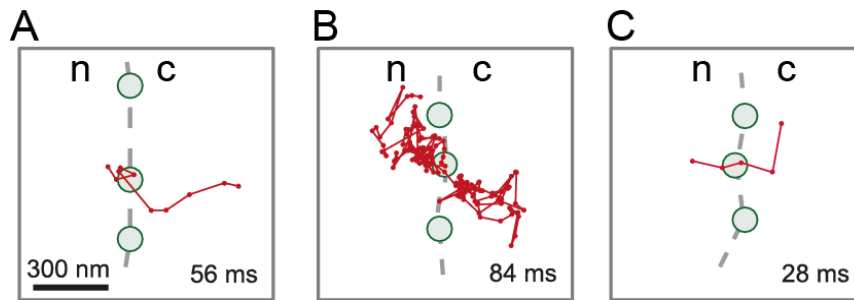


Abbildung 3-13 - Trajektorien (rote Linien) der in Abbildung 3-11 dargestellten Partikeln so gedreht, dass die Transportrichtung parallel zur x-Achse verläuft. Zusätzlich wurde die Position des zentralen und zweier benachbarter NPCs gezeigt (grüne Kreise). Die angegebenen Zeiten entsprechen der jeweiligen Exportdauer. n = Nukleoplasma; c = Zytoplasma (aus [111]).

Die Position der zentralen Pore, durch welche der Export abläuft, diente dann dazu alle Export-Trajektorien zu überlagern. Zusätzlich wurden die einzelnen Positionen aller Partikeln, die innerhalb eines Bereichs von ± 100 nm in der y-Richtung der Porenachse beobachtet wurden, mit einem Modell einer Kernpore überlagert (Abbildung 3-14-Oben).

Die Einteilung der Transportachse in 50 nm Intervalle ermöglicht so die histogrammierte Auftragung der Häufigkeit der einzelnen Lokalisationen entlang der x-Achse (Abbildung 3-14-Unten). Dabei zeigt sich ein deutliches Maximum bei 0-50 nm und legt nahe, dass sich in der Region des inneren und des zytoplasmatischen Rings der geschwindigkeitsbestimmende Schritt befindet.

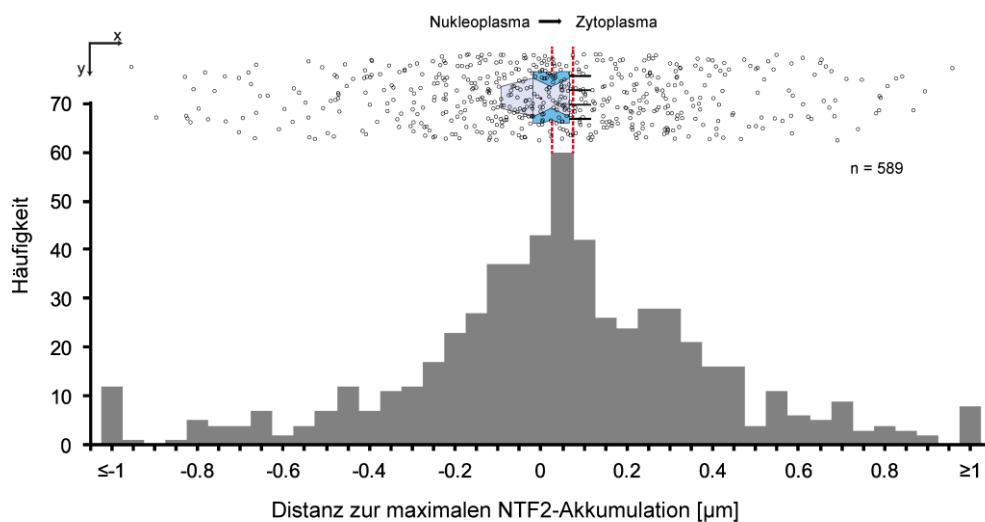


Abbildung 3-14 - (Oben) Alle Exporttrajektorien wurden erst so gedreht, dass die Exportrichtung der positiven x-Achse folgt und dann mit Hilfe der Position der Kernpore, durch welche der Export abläuft, überlagert. (Unten) Die Häufigkeit der prä-60S-Partikelpositionen in einer y-Achsen-Region von ± 100 nm wurde in Abhängigkeit von der Lage der durchschnittlichen NTF2-Akkumulation aus Kapitel 3.2 aufgetragen. Am zytoplasmatischen Ring des NPCs trat ein Maximum auf (rote Linien) (aus [111]).

3.7 "Gescheiterte" Exporte der prä-60S-Untereinheit

Des Weiteren wurden verschiedene Ereignisse beobachtet, bei denen Partikel mit einzelnen Kernporen interagierten, aber dann in das Nukleoplasma zurückkehrten, also der Export nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dies betrifft sowohl Ereignisse der Kategorie „np-Rückweisung“, als auch „np-Freisetzung“. Auch die Trajektorien dieser Partikel wurden, wie in Kapitel 0 gezeigt, gedreht, sodass der Export entlang der x-Achse verläuft. Die einzelnen Positionen der Trajektorien wurden wieder in einem y-Achsenbereich von ± 100 nm über das Modell einer Pore gelegt. Hier wird deutlich, dass bei der Mehrheit dieser Ereignisse der Exportprozess schon im nukleären Korb abbricht (Abbildung 3-15-A).

Die Verweilzeit der Partikel in der Kategorie „np-Rückweisung“ wurde ebenfalls analysiert. Nur bei dieser Kategorie ist die vollständige Interaktion der gescheiterten Exporte mit der Kernpore abgebildet. Durch Anpassung eines exponentiellen Abklingmodells an die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweilzeiten, ergibt sich ein Erwartungswert von 13 ± 3 ms (Abbildung 3-15-B). Dieser Wert ist, wie erwartet, deutlich kleiner als für vollständige Exporte.

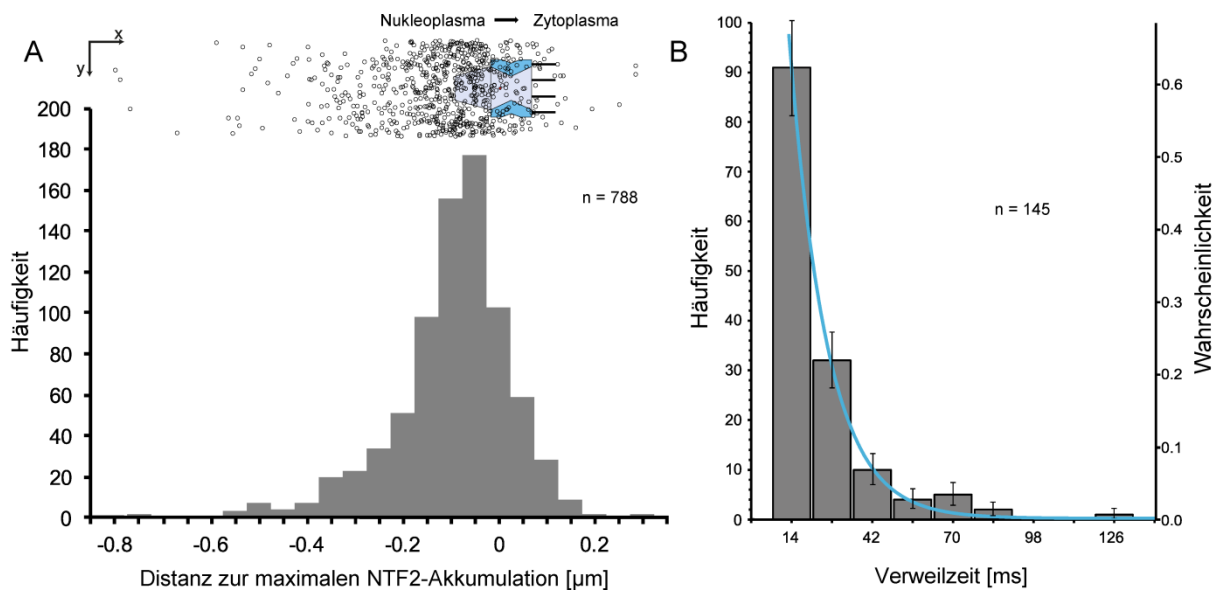


Abbildung 3-15 - "Gescheiterte" Kernexporte von prä-60S-Partikeln. (A) Die Häufigkeit der prä-60S-Partikelpositionen in einer y-Achsen-Region von ± 100 nm wurde in Abhängigkeit von der Lage der durchschnittlichen NTF2-Akkumulation aus Kapitel 3.2 für die Kategorien "np-Rückweisung" und "np-Freisetzung" aufgetragen. (B) Häufigkeitsverteilung der Interaktionszeiten der Kategorie "np-Rückweisung". Die gezeigten Fehlerbalken entsprechen der Abweichung unter der Annahme eines Poisson-Prozesses. Die blaue Linie zeigt die beste Anpassung einer einfachen exponentiellen Abklingfunktion an die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweilzeiten (aus [111]).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Dynamik der intranukleären Mobilität und Kinetik der Export-Prozesses der großen ribosomalen untersucht. So konnten bisher unbeobachtete Erkenntnisse, wie z.B. die Anzahl und Lage der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte des Exportprozesses, ermittelt werden.

Hierfür wurde zunächst eIF6 entsprechend Gallo *et al.* (2011) als Marker für die prä-60S-Untereinheit [88] eingeführt, um diese innerhalb einzelner HeLa-Zellen und während der Interaktion mit einzelnen Kernporen zu verfolgen. Diese indirekte Markierung ähnelt dem Ansatz von Siebrasse *et al.* (2012) [20], die hrp36 verwendeten, um native mRNPs während des Exports zu verfolgen. In ähnlicher Weise gelang Landvogt *et al.* (2019) die Markierung nativer prä-40S-Einheiten unter Verwendung von Pno1-Snap, welches stabil in HeLa-Zellen integriert wurde, um die Kinetik innerhalb des Zellkerns zu untersuchen [87].

In dieser Studie wurde eine HeLa-Zelllinie generiert, die einerseits HaloTag-gebundenes eIF6 und andererseits eGFP-NTF2 für die Kernporenmarkierung entsprechend Kubitscheck *et al.* (2005) [19] stabil exprimiert. eIF6-HaloTag wurde in vivo mit dem synthetischen Farbstoff JF549 fluoreszenzmarkiert. Über die Konzentration des Farbstoffs kann gesteuert werden, ob die gesamten eIF6-Moleküle angefärbt werden oder nur eine sehr kleine Anzahl, was die Abbildung von Ribosomen als einzelne, bewegliche, beugungsbegrenzte Fluoreszenzpunkte ermöglicht.

In fünf verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass eIF6-HaloTag funktionell an die große ribosomale Untereinheit bindet. Sowohl die große als auch die kleine Untereinheit akkumulieren deutlich in Nukleoli [48, 91], wie auch durch Pno1, welches Teil der 40S-Untereinheit ist [87], oder durch ribosomale Proteine, wie Rpl29 in prä-60S-Reporter-Zelllinien [79] gezeigt werden kann. Diese Akkumulation lässt sich ebenso für eIF6-HaloTag beobachten. Die deutlichen Fluoreszenzsignale innerhalb der Nukleoli können durch den Transkriptionsblocker Actinomycin D aufgelöst werden, wodurch die Produktion neuer Ribosomen gestoppt wird. Durch die Isolierung von eIF6 über den HaloTag konnte in einem Immunoblot gezeigt werden, dass es Teil von makromolekularen Komplexen ist, die auch das ribosomale Protein Rpl10 enthalten. Rpl10 ist dabei ein wichtiger Bestandteil der großen Untereinheit [133]. Nach Hemmung des Hauptex-

portfaktors des prä-60S-Exports Crm1 durch LMB [55, 125] nahm die Intensität des Fluoreszenzsignals im Nukleoplasma entsprechend zu. Somit konnten die eIF6-HaloTag-gebundenen Ribosomen nicht mehr exportiert werden.

Zur Lokalisation der Kernporen wurde eGFP-NTF2 verwendet. Dies erlaubte durch hochauflösende konfokale *Laser-Scanning*-Mikroskopie die klare Identifikation einzelner Kernporenkomplexe als Fluoreszenzmaxima entlang der Kernmembran. Mit Hilfe von Nup62 konnte genaue die Position des NTF2s innerhalb der Kernpore bestimmt werden. Der durchschnittliche Abstand zur zentralen Ebene des NPCs beträgt etwa -24 nm. Interessanterweise zeigten sich gelegentlich zwei Maxima in der NTF2-Verteilung über die Kernpore, wie sie auch schon früher beobachtet wurden [134–136]. Ein sehr klares Maximum befindet sich auf der nukleoplasmatischen Seite. Auf der zytoplasmatischen Seite hingegen zeigt sich eine deutlich geringere Akkumulation. Ma *et al.* (2016) beobachteten, dass NTF2 auf der nukleoplasmatischen Seite starke Wechselwirkungen im Bereich zwischen -70 nm bis -40 nm und -20 nm bis 20 nm von der zentralen Ebene aus bilden kann, während auf der zytoplasmatischen Seite schwache Wechselwirkungen überwiegen [134].

Schließlich wurde die Dynamik der Ribosomen innerhalb des Nukleoplasmas bestimmt. Der Diffusionsprozess konnte durch ein dreistufiges Modell beschrieben werden, das zeigte, dass ein großer Teil der Partikel immobil war. Etwa ein Viertel der Partikel lag retardiert vor. Dies kann sowohl durch sterische Hinderungen durch Kernstrukturen, als auch durch Bindungsprozesse verursacht werden. Der Diffusionskoeffizient ($0,32 \pm 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$) dieser Fraktion entspricht dem von Landvogt *et al.* (2019) gemessenen Wert für die retardierte Komponente der kleinen Untereinheit ($0,31 \pm 0,03 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Als größter Koeffizient für die freie Diffusion wurde ein Wert von $1,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gemessen. Somit bewegt sich die deutlich größere prä-60S-Untereinheit erwartungsgemäß etwas langsamer als die frei diffundierende kleine Untereinheit ($2,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$), wie von Landvogt *et al.* (2019) ermittelt [122]. Außerdem ist dieser Diffusionskoeffizient deutlich niedriger als er für freie eIF6-Proteine theoretisch zu erwarten gewesen wäre. Speil und Kubitscheck (2010) zeigten das die meisten "freien" Proteine einen Diffusionskoeffizienten im Zellkern $>10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ aufweisen müssten [137]. Dies belegt, dass tatsächlich die prä-60S-Untereinheit und nicht nur freies eIF6 beobachtet wurde.

Um die Interaktion einzelner eIF6-Moleküle mit einzelnen Kernporen zu analysieren, wurde ein kommerzielles konfokales LSM um eine zusätzliche HILO-Beleuchtung und eine EMCCD-Kamera erweitert, die eine Einzelmolekülbeobachtung mit einer Frequenz von etwa 70 Hz ermöglicht. So gelang eine quasi-simultane Abbildung der Bewegung einzelner prä-60S-Untereinheiten, direkt gefolgt von einer hochauflösenden Aufnahme der Kernporen innerhalb desselben Zellkerns.

Da die konfokalen Aufnahmen über einen deutlich anderen Lichtweg als die Kamerabilder gewonnen wurden, mussten die mikroskopischen Aufnahmen vor der Analyse zunächst angeglichen werden. Fluoreszierende Mikropartikel, die als Referenzmarker an die äußere Zellmembran gebunden wurden, ermöglichten die Bestimmung einer Transformationsmatrix zur Anpassung der mikroskopischen Aufnahmen. Diese Marker zeigten keine negativen Einflüsse auf die Zellviabilität und ermöglichen ein Angleichen der konfokalen Aufnahmen mit den Kamerabildern mit einer Effizienz von 60%.

Damit die großen Datenmengen möglichst effizient und unabhängig ausgewertet werden können, wurde eine weitgehend automatisierte Datenanalyse entwickelt, um die Bilder der verschiedenen Mikroskopiemethoden zu registrieren, Trajektorien der Bewegung der prä-60S-Untereinheiten zu erstellen, die Position der NPCs zu identifizieren und schließlich alle Interaktionen zu isolieren und zu kategorisieren.

Auf diese Weise wurden insgesamt 78 eindeutige Exportvorgänge identifiziert, bei denen die prä-60S-Untereinheit zunächst klar auf der nukleoplasmatischen Seite, dann während der Interaktion mit der Kernpore und schließlich nach der Freisetzung auf der zytoplasmatischen Seite beobachtet wurde. Die Trajektorien dieser Ereignisse erlaubten die Bestimmung der Translokationszeiten, sowie die Zuordnung von Bindungsstellen innerhalb der Kernpore. Die Verteilung der Verweilzeiten konnte durch eine einfache exponentielle Abklingfunktion beschrieben werden und legt nahe, dass es nur ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt für diesen Prozess existiert. Als Erwartungswert der Translokation ergab sich 24 ± 4 ms.

Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die von Delavoie *et al.* (2019) geschätzte Translokationszeit in Hefezellen. Hier beobachteten sie mittels Elektronentomographie prä-60S-Partikel bei der Translokation durch einzelne Kernporen. Basierend auf diesen Daten und verschiedenen Annahmen ermittelten sie durch ein statistisches Warteschlangenmodell eine Exportzeit von 90 ± 50 ms [1]. Dieser Wert ist etwas höher als die in dieser Arbeit für menschliche

Zellen gemessene Exportdauer. Eine mögliche Erklärung dieses Unterschieds ergibt sich aus der Annahme von Delavoie *et al.* (2019) wie viele NPCs für den Exportprozess zur Verfügung stehen. Ein durchschnittlicher Hefe-Nukleus weist im Mittel 80-120 Kernporen auf. Delavoie *et al.* zeigten, dass eine Kernpore maximal ein ribosomales Partikel zeitgleich exportiert und nahmen für ihre Schätzung 110 NPCs an, die für den Export der prä-60S-Untereinheit zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass es auch eine große Anzahl von Ereignissen gibt, bei denen der Export fehlschlägt. Da für Ribosomen keine Kontrollmechanismen für exportbereite Partikel, wie sie z.B. für mRNA beobachtet werden [138, 139], bekannt sind, kann dies bedeuten, dass entsprechende Kernporen bereits von Ribosomen besetzt sind und vorübergehend für den Export nicht zur Verfügung stehen. Dies würde die effektive Anzahl der exportbereiten NPCs deutlich reduzieren und in der Wahrscheinlichkeitsbestimmung zu einer schnelleren Exportzeit führen. Auch die anderen Annahmen von Delavoie *et al.* sind eher grob, so dass der Unterschied zwischen der hier gemessenen und der geschätzten Verweilzeit als eher gering angesehen werden kann.

Die Translokationszeit 24 ± 4 ms stimmt auch gut mit Abschätzungen der maximalen Transportrate von größeren Molekülen durch menschliche NPCs nach Ribbeck und Görlich (2001, 2002) überein. Sie analysierten den Transport verschiedener Substrate in permeabilisierten HeLa-Zellen und ermittelten einen theoretischen maximalen Massenfluss von 80-100 MDa/s pro Kernpore [140, 141]. Bei der in dieser Arbeit gemessenen Exportzeit werden ~ 35 bis 50 prä-60S-Untereinheiten pro Sekunde exportiert. Bei einer durchschnittlichen molaren Masse von $\sim 2,5$ MDa der menschlichen großen Untereinheit [142, 143] ergibt sich ein Massenfluss von 87,5 bis 125 MDa/s pro NPC. Damit wird der maximal mögliche Massenfluss *in vivo* erreicht. Außerdem ist dieser Wert höher als der geschätzte minimal erforderliche Fluss von 10-40 MDa/s für wachsende Zellen [141, 144].

Ribbeck und Görlich (2002) zeigten ebenfalls, dass die Transportrate eines Substrats mit zunehmender Anzahl von Transportrezeptoren steigt [141]. Diese Beobachtung wurde auch von Lowe *et al.* (2010) bestätigt. Als Transportsubstrat wurden dort *Quantum Dots* (QD), fluoreszierende Mikropartikel mit einem hydrodynamischen Radius von $\sim 18 \pm 4$ nm, verwendet. Diese *Quantum Dots* waren mit Importin- β -Bindungsdomänen funktionalisiert. Je geringer nun die Anzahl der Importin- β -Moleküle war, desto länger war die Verweilzeit des Substrats im zentralen Kanal

der Kernporenkomplexe [145]. Dies deutet an, dass für die große ribosomale Untereinheit definitiv eine Vielzahl von Exportfaktoren existieren oder ein Rezeptor in mehreren Kopien an die Untereinheit bindet. Sonst könnte die hier gemessene Translokationszeit nicht erreicht werden.

Dieser Zusammenhang konnte auch für mRNA beobachtet werden. Eine durchschnittliche eukaryotische mRNA hat eine Größe von etwa 2,2 kB [146] und Azimzi *et al.* (2014) zeigten durch Molekulardynamiksimulationen, dass mindestens neun Transportrezeptoren für einen erfolgreichen Export benötigt werden [147].

Für den Export der großen Untereinheit wurden insbesondere in Hefe verschiedene essentielle und nicht-essentielle Transporterrezeptoren identifiziert, wie Mex67/Mtr2, Rrp12p, Arx1, Ecm1, Bud20, Npl3, Gle2 und Xpo1 (siehe Kapitel 0). Für menschliche Zellen stellt auch Xpo1/Crm1 den wichtigsten Exportfaktor dar, der über eine einfache NES von NMD3 an die Untereinheit gebunden ist. Da jedoch nur ein einziger Crm1-Nmd3-Komplex pro prä-60S-Partikel vorhanden ist, lässt sich vermuten, dass aufgrund der Größe der Untereinheit und der hier gemessenen Exportrate weitere Faktoren für eine schnelle und effektive Translokation vorhanden sein müssen.

Zum einen scheint das Säugetier-Homolog von Gle2, RAE1, als nicht-FG-bindendes mobiles Nukleopurin für den Export beider Untereinheiten erforderlich zu sein [69, 76, 79, 148]. Darüber hinaus ist der prä-miRNA- und tRNA-Exportfaktor Exp5 essentiell für den Export der großen ribosomalen Untereinheiten [79]. Exp5 erkennt t/miRNAs-Substrate über Haarnadelstrukturen der jeweiligen RNAs [76, 79, 149]. Über diesen Mechanismus wirkt er wahrscheinlich auch beim ribosomalen Export, wobei die genaue Bindungsstelle noch unbekannt ist. Hier wäre es auch möglich, dass mehr als ein Exp5 pro prä-60S-Partikel gebunden wird.

Delavoie *et al.* (2019) spekulierten auf Basis ihrer Daten für Hefe, dass die prä-60S-Untereinheit zunächst transient mit dem nukleären Korb interagiert, bevor sie in den zentralen Kanal des NPCs über geht. Dieser Mechanismus könnte von Mex67/Mtr2 (und/oder anderen Rezeptoren) abhängig sein, aber der Transport in den inneren Ring, die energetisch günstigste Region der Kernpore, könnte hauptsächlich durch Crm1 bestimmt sein. Die Freisetzung in das Zytoplasma erfordert dann ein "Herausfischen" des ribosomalen Substrats durch Nukleoporine, wie Nup159 (bzw. Nup214 bei Säugetieren) [1]. Dieser Mechanismus ist in Abbildung 4-1-B für Hefe gezeigt.

Die Terminierung des Exports erfolgt normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore oder im Zytosol durch Trennung der Rezeptor-Cargo-Komplexe. Bei mRNA geschieht dies z.B. ATP-abhängig durch die Helikase Dbp5, welche die Exportfaktoren, wie Mex67/Mtr2, entfernt [150]. Beim ribosomalen Export ist dies nicht der Fall und Mex67/Mtr2 wird nicht durch Dbp5 abgespalten [59]. Für die anderen nicht-kanonischen Exportfaktoren, wie z.B. Arx1, ist der Mechanismus der Ablösung von der 60S-Untereinheit ebenfalls unbekannt. RanGTP-abhängige Rezeptoren, wie Exp5 und Crm1, werden nach erfolgreichem Export durch Hydrolyse von GTP durch RanBP1/RanGAP1 von der großen Untereinheit getrennt [144].

Besonders für den ribosomalen Export ist die Rolle von Nup214 kritisch, sowohl bei Säugetieren [79], als auch in Hefe [151, 152]. Nup214 (Nup159 in Hefe) stabilisiert die Bindung zwischen Crm1, RanGTP und dem Transportsubstrat durch mehrere FG-Bindungsstellen [153, 154]. Damit RanGAP die Exportfaktoren abspalten kann, muss dieses selbst über die Ran-bindenden Domänen von Nup358 und RanBP1 an die Kernpore rekrutiert werden [144]. Nup214 im Komplex mit Nup88 vermittelt die Bindung von Nup358 an den NPC und ermöglicht so ein Zusammenkommen der Transportfracht mit RanGAP1 (Abbildung 4-1-A).

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten in lebenden menschlichen Zellen unterstützen das ribosomale Export-Modell der Hefe von Delavoie *et al.* und erweitern es für den menschlichen Export der großen Untereinheit. Am nukleären Korb wurden nur kurze transiente Bindungsereignisse beobachtet, die möglicherweise durch die transiente Interaktion von RAE1 mit Nup98 verursacht werden. Der Eintritt der Partikel in den zentralen Kanal könnte durch Exp5 vermittelt werden, ähnlich wie Mex67/Mtr2 in Hefe. Anschließend erfolgt der Transport in den inneren Ring. Dieser Bereich scheint auch hier eine energetisch günstige Region darzustellen, da dort eine hohe Akkumulation an prä-60S-Partikeln lokalisiert wurde. Dies ist vermutlich durch die Vielzahl an Interaktionsmöglichkeiten der Partikel mit den dichtverteilten FG-Nups in dieser Region zu erklären [85, 155]. Die endgültige Freisetzung in das Zytosol würde zunächst die Interaktion des prä-60S-Crm1-Komplexes mit Nup214 am zytoplasmatischen Rand und dann die Abspaltung von Crm1 über den RanGAP-RanBP1-Nup358-Komplex erfordern. Der Schritt des "Herausholens" aus dem Zentrum der Pore würde dann die Exportrate maßgeblich bestimmen. Dieses Modell erklärt, warum es trotz der Beteiligung von verschiedenen bekannten und möglicherweise noch unbekanntem Exportfaktoren nur einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt gibt. Das auf Basis der

Daten dieser Arbeit abgeleitete Exportmodell für den humanen Export der großen ribosomalen Untereinheit ist schematisch in Abbildung 4-1 im Vergleich zum Hefe-Modell dargestellt.

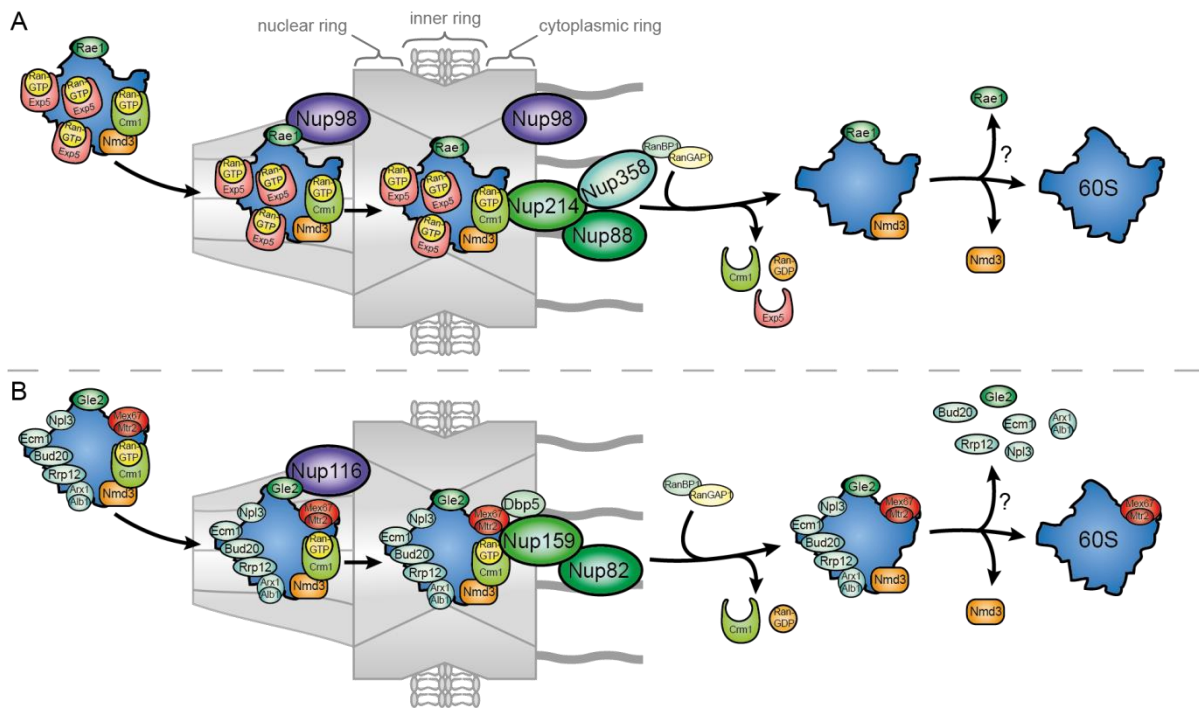


Abbildung 4-1 - Vorgeschlagener Mechanismus für den Export von prä-60S-Partikeln in (A) menschlichen Zellen. Der humane prä-60S-Export beginnt mit der FG-unabhängigen Interaktion von RAE1 mit Nup98. Der Eintritt in die FG-Domänen des NPC-Kanals wird durch Exp5 und Crm1 vermittelt. Die Freisetzung aus diesem erfordert die prä-60S/CRM1/Nup214 Interaktion an der zytoplasmatischen Seite des NPCs, die das Partikel aus der zentralen NPC-Domäne "herausholt". Anschließend wird das prä-60S-Partikel in das Zytosol freigesetzt, nachdem CRM1 durch RanBP1/RanGAP1 abgespalten wurde. RanBP1/RanGAP1 wird durch Nup358 an den NPC rekrutiert. (B) In Hefe interagiert das rezeptorbeladene prä-60S-Partikel zunächst transient mit Nup116 am Kernkorb über Gle2, bevor es Mex67/Mtr2-abhängig in den inneren Ring transportiert wird. Die Freisetzung aus diesem energetisch günstigen NPC-Kompartiment würde dann ebenfalls das "Herausholen" der Crm1/prä-60S-Partikel durch starke Wechselwirkungen mit dem asymmetrischen Nup159, das Teil des Nup82-Subkomplexes ist, und die anschließende Entfernung von Crm1 durch RanBP1/RanGAP1 erfordern (aus [111]).

Die Analyse der Verteilung der Bindungsstellen der prä-60S-Partikel entlang der Transportachse innerhalb der Kernpore bestätigt ebenfalls die Ergebnisse von Delavoie *et al.* (2019). Die Autoren beobachteten nur eine relativ geringe Anzahl an Partikeln im Bereich des nukleoplasmatischen Rings, dafür aber eine deutliche Akkumulation im zentralen und eine leicht geringere im zytoplasmatischen Ring. Bei der hier gemessenen Verteilung der Trajektorienpositionen zeigt sich auch ein leicht zur zytoplasmatischen Seite verschobenes Maximum und keinerlei Akkumulation in der Region des nukleären Korbs. Delavoie *et al.* (2019) schlussfolgerten, dass die ribosomalen Untereinheiten nur transient mit dem Kernkorb interagieren. Diese Beobachtung wird auch durch die hier gemessene Verweilzeit von 13 ± 3 ms der abgebrochenen Exporte bestätigt, wel-

che deutlich kürzer ist, als die vollständige Exportdauer. Dies könnte durch eine fehlende Qualitätskontrolle am nukleären Korb erklärt werden [1, 156, 157], die z.B. beim mRNP-Export existiert [138, 139].

Der Vergleich mit dem mRNP-Export zeigt auch, dass es bei der Verteilung der Exporttrajektorien der prä-60S-Untereinheit entlang der Exportrichtung nur ein Maximum zentral innerhalb der Kernpore gibt, während für mRNP-Partikel mitunter zwei beobachtet wurden, eines an der nukleoplasmatischen und eines an der zytoplasmatischen Seite [41, 50]. Für die mRNP-Partikel wurde angenommen, dass das Maximum auf der nukleoplasmatischen Seite durch eine Qualitätskontrolle und eine RNP-Reorganisation verursacht wird, während auf der zytoplasmatischen Seite die Export-Rezeptoren entfernt werden. Derartige Prozesse scheinen jedoch für die ribosomalen Untereinheit nicht zu existieren.

Die hier gezeigten Daten erlauben eine Unterscheidung zwischen erfolgreichen und fehlgeschlagenen Exportprozessen. Auch das "Scannen" entlang verschiedener Kernporen wurde sowohl vor erfolgreichen, als auch für "gescheiterte" Exporte beobachtet. Dieser Vorgang wurde bereits für mRNPs gezeigt [138]. Ereignisse, bei denen der Export abbricht, traten deutlich häufiger auf ($n=145$) als erfolgreiche Translokationen ($n=78$). Somit waren nur 35% der Export-Ereignisse erfolgreich. Ähnliche Raten finden sich auch für mRNPs [20]. Daher kann angenommen werden, dass allgemein etwa 1/3 der Exporte von großen Substraten erfolgreich ist. Die Bindungsstellenverteilung der fehlgeschlagenen Exporte zeigt ebenfalls ein deutliches Maximum in der Region des Kernkorbes, knapp außerhalb des nukleoplasmatischen Ringes. Diese Ereignisse zeigten auch eine deutlich kürzere Verweilzeit an der Pore, als vollständige Exporte und legen nahe, dass die entsprechenden prä-60S-Partikel nicht in das hydrophobe Innere der Kernpore eindringen konnten. Dies kann zwei verschiedene Ursachen haben. Entweder ist der jeweilige NPC durch ein größeres Substrat blockiert oder dem Partikel selbst fehlen noch wichtige Exportfaktoren, wie Crm1. Eine Aussage, ob generell einige Kernporenkomplexe temporär für den Export geblockt sind oder ob verschiedene Arten von NPCs für unterschiedliche Substrate existieren, kann an dieser Stelle nicht getroffen werden.

5 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es die Dynamik des Exports der großen ribosomalen Untereinheit zu entschlüsseln. Dazu wurde erfolgreich eine HeLa-Zelllinie erstellt, die zum einen eIF6-HaloTag exprimiert, das zur Einzelmolekülverfolgung von prä-60S-Partikeln genutzt werden kann, zum anderen ermöglicht eGFP-NTF2 die genaue Lokalisation einzelner Kernporenkomplexe innerhalb der nuklären Hülle. Um die Interaktion der großen Untereinheit mit den NPCs studieren zu können, wurde ein bisher einmaliger Mikroskop-Aufbau entwickelt, der quasi-simultan sowohl die schnelle Abbildung einzelner Partikel, als auch die Aufnahme hochaufgelöster zellulärer Strukturen *in vivo* ermöglicht. Durch eine Überlagerung beider Aufnahmen, können Interaktionsprozesse untersucht werden. Diese neuartige Messmethode bietet, auch wenn sie arbeitsintensiv ist, über diese Arbeit hinaus ein großes Potential in der Untersuchung von biologischen Prozessen, wie z.B. auch beim mRNA-Export. Dennoch ist es für die Zukunft wichtig den experimentellen Durchsatz zu erhöhen.

Zur effizienten und unabhängigen Auswertung und Verarbeitung der sich ergebenden Messdaten wurde zusätzlich eine automatisierte Datenanalyse entwickelt. So konnten insgesamt 78 deutliche Exporte identifiziert werden. Die Analyse der Kinetik zeigte klar, dass nur ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt mit einer Translokationszeit von 24 ± 4 ms existiert. Dies zeigt zum einen, dass einzelne NPCs einen Massenfluss von bis zu ~ 125 MDa/s erreichen können und lässt außerdem Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden humanen Export-Mechanismus der Ribosomen zu. Die Exportrate scheint vor allem durch die Freisetzung des ribosomalen Partikels aus dem energetisch günstigen inneren Ring in das Zytosol bestimmt zu sein. Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Exportmechanismus könnte durch weitere Experimente in Zukunft erweitert und verfeinert werden. So könnte beispielsweise durch einen gezielten und systematischen Knockout der verschiedenen beteiligten (Export)-Faktoren, wie Rae1, Exp5 oder Crm1, überprüft werden, an welchen Positionen innerhalb des Kernporenkomplexes die Exportprozesse abbrechen. Dies würde die genaue Funktion der einzelnen Faktoren noch detaillierter aufzeigen.

Neben der großen Untereinheit, wäre auch eine Untersuchung des Exports der kleinen prä-40S-Partikel in gleicher Weise von großem Interesse, besonders im Hinblick auf die Frage, wie sich der Export beider Partikel unterscheidet. Ebenso würde auch die Kombination dieser Messmethode mit Mutations- oder RNA-Interferenz-Analysen unser Verständnis des nukleären Transports verschiedener, großer Substraten, wie z.B. auch mRNPs, erweitern.

Literaturverzeichnis

1. Delavoie, F., V. Soldan, D. Rinaldi, J.-Y. Dauxois, and P.-E. Gleizes. 2019. The path of pre-ribosomes through the nuclear pore complex revealed by electron tomography. *Nat. Commun.* 10:497.
2. Baßler, J., and E. Hurt. 2019. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 88:281–306.
3. Luna, R., H. Gaillard, C. González-Aguilera, and A. Aguilera. 2008. Biogenesis of mRNPs: Integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma.* 117:319–331.
4. Spector, D. 1993. Macromolecular Domains Within the Cell Nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 9:265–315.
5. Beck, M., and E. Hurt. 2016. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18:73–89.
6. Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, and M.P. Rout. 2010. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:490–501.
7. Tu, L.C., G. Fu, A. Zilman, and S.M. Musser. 2013. Large cargo transport by nuclear pores: Implications for the spatial organization of FG-nucleoporins. *EMBO J.* 32:3220–3230.
8. Mohr, D., S. Frey, T. Fischer, T. Güttler, and D. Görlich. 2009. Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J.* 28:2541–2553.
9. Maimon, T., N. Elad, I. Dahan, and O. Medalia. 2012. The human nuclear pore complex as revealed by cryo-electron tomography. *Structure.* 20:998–1006.
10. Goryaynov, A., J. Ma, and W. Yang. 2012. Single-molecule studies of nucleocytoplasmic transport: From one dimension to three dimensions. *Integr. Biol.* 4:10–21.
11. Görlich, D. 1997. Nuclear protein import. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:412–419.
12. Gorlich, D., and I.W. Mattaj. 1996. Nucleocytoplasmic Transport. *Science (80-.).* 271:1513–

1519.

13. Nakielny, S., and G. Dreyfuss. 1997. Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:420–429.
14. Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, and E. Nishida. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature.* 390:308–311.
15. Ossareh-Nazari, B., C. Gwizdek, and C. Dargemont. 2001. Protein export from the nucleus. *Traffic.* 2:684–689.
16. Becskei, A., and I.W. Mattaj. 2003. The strategy for coupling the RanGTP gradient to nuclear protein export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:1717–1722.
17. Ribbeck, K., G. Lipowsky, H.M. Kent, M. Stewart, and D. Görlich. 1998. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 17:6587–98.
18. Siebrasse, J.P., and R. Peters. 2002. Rapid translocation of NTF2 through the nuclear pore of isolated nuclei and nuclear envelopes. *EMBO Rep.* 3:887–892.
19. Kubitscheck, U., D. Grünwald, A. Hoekstra, D. Rohleder, T. Kues, J.P. Siebrasse, and R. Peters. 2005. Nuclear transport of single molecules. *J. Cell Biol.* 168:233–243.
20. Siebrasse, J.P., T. Kaminski, and U. Kubitscheck. 2012. Nuclear export of single native mRNA molecules observed by light sheet fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:9426–9431.
21. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer. 2007. Biochemistry. 6th ed. Wiesbaden, Germany: Spektrum Akademischer Verlag.
22. Derrer, C.P., R. Mancini, P. Vallotton, S. Huet, K. Weis, and E. Dultz. 2019. The RNA export factor Mex67 functions as a mobile nucleoporin. *J. Cell Biol.* 218:3967–3976.
23. Strässer, K., and E. Hurt. 2001. Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p. *Nature.* 413:648–652.
24. Katahira, J. 2012. mRNA export and the TREX complex. *Biochim. Biophys. Acta - Gene*

- Regul. Mech.* 1819:507–513.
25. Linder, P., and F. Stutz. 2001. mRNA export: Travelling with DEAD box proteins. *Curr. Biol.* 11:961–963.
 26. Katahira, J. 2015. Nuclear export of messenger RNA. *Genes (Basel)*. 6:163–184.
 27. Björk, P., and L. Wieslander. 2011. Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis. *Chromosoma*. 120:23–38.
 28. von Moeller, H., C. Basquin, and E. Conti. 2009. The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:247–254.
 29. Ling, S.H.M., and H. Song. 2010. Mechanistic insights into mRNA export through structures of Dbp5. *RNA Biol.* 7:23–7.
 30. Montpetit, B., N.D. Thomsen, K.J. Helmke, M. a Seeliger, J.M. Berger, and K. Weis. 2011. A conserved mechanism of DEAD-box ATPase activation by nucleoporins and InsP6 in mRNA export. *Nature*. 472:238–242.
 31. Hodge, C.A., E.J. Tran, K.N. Noble, A.R. Alcazar-Roman, R. Ben-Yishay, J.J. Scarcelli, A.W. Folkmann, Y. Shav-Tal, S.R. Wentz, and C.N. Cole. 2011. The Dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mRNA export I: Dbp5 mutants with defects in RNA binding and ATP hydrolysis define key steps for Nup159 and Gle1. *Genes Dev.* 25:1052–1064.
 32. Folkmann, A.W., K.N. Noble, C.N. Cole, and S.R. Wentz. 2011. Dbp5, Gle1-IP6, and Nup159: A working model for mRNP export. *Nucleus*. 2:540–548.
 33. Mehlin, H., B. Daneholt, and U. Skoglund. 1992. Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography. *Cell*. 69:605–613.
 34. Groebe, D.R., and O.C. Uhlenbeck. 1988. Characterization of RNA hairpin loop stability. *Nucleic Acids Res.* 16:11725–11735.
 35. Ibragimov, A.N., E.N. Kozlov, A.S. Kurbidaeva, S.S. Ryabichko, and Y. V. Shidlovskii. 2017.

- Current technics for visualizing RNA in a cell. *Russ. J. Genet.* 53:1080–1090.
36. Buxbaum, A.R., G. Haimovich, and R.H. Singer. 2015. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:95–109.
 37. Grünwald, D., and R.H. Singer. 2010. In vivo imaging of labelled endogenous β -actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature.* 467:604–607.
 38. Smith, C., A. Lari, C.P. Derrer, A. Ouwehand, A. Rossouw, M. Huisman, T. Dange, M. Hopman, A. Joseph, D. Zenklusen, K. Weis, D. Grunwald, and B. Montpetit. 2015. In vivo single-particle imaging of nuclear mRNA export in budding yeast demonstrates an essential role for Mex67p. *J. Cell Biol.* 211:1121–1130.
 39. Mor, A., S. Suliman, R. Ben-Yishay, S. Yunger, Y. Brody, and Y. Shav-Tal. 2010. Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells. *Nat. Cell Biol.* 12:543–552.
 40. Grünwald, D., and R.H. Singer. 2011. In Vivo Imaging of Labelled Endogenous β -actin mRNA During Nucleocytoplasmic Transport. *Nature.* 467:604–607.
 41. Ma, J., Z. Liu, N. Michelotti, S. Pitchiaya, R. Veerapaneni, J.R. Androsavich, N.G. Walter, and W. Yang. 2013. High-resolution three-dimensional mapping of mRNA export through the nuclear pore. *Nat. Commun.* 4:2414.
 42. Melnikov, S., A. Ben-Shem, N. Garreau De Loubresse, L. Jenner, G. Yusupova, and M. Yusupov. 2012. One core, two shells: Bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19:560–567.
 43. Ban, N., R. Beckmann, J.H. Cate, J.D. Dinman, F. Dragon, S.R. Ellis, D.L. Lafontaine, L. Lindahl, A. Liljas, J.M. Lipton, M.A. McAlear, P.B. Moore, H.F. Noller, J. Ortega, V.G. Panse, V. Ramakrishnan, C.M. Spahn, T.A. Steitz, M. Tchorzewski, D. Tollervey, A.J. Warren, J.R. Williamson, D. Wilson, A. Yonath, and M. Yusupov. 2014. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24:165–169.
 44. Henras, A.K., C. Plisson-Chastang, M.F. O'Donohue, A. Chakraborty, and P.E. Gleizes. 2015. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.*

6:225–242.

45. Shaw, P.J. 2005. Nucleolus. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
46. Thiry, M., and D.L.J. Lafontaine. 2005. Birth of a nucleolus: The evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15:194–199.
47. Sirri, V., S. Urcuqui-Inchima, P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun. 2008. Nucleolus: The fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129:13–31.
48. Boisvert, F.-M., S. van Koningsbruggen, J. Navascués, and A.I. Lamond. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:574–85.
49. Phipps, K.R., J.M. Charette, and S.J. Baserga. 2011. The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2:1–21.
50. Grünwald, D., and R.H. Singer. 2010. In vivo imaging of labelled endogenous β -actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature.* 467:604–7.
51. Kressler, D., E. Hurt, and J. Baßler. 2017. A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends Biochem. Sci.* 42:640–654.
52. Nerurkar, P., M. Altvater, S. Gerhardy, S. Schütz, U. Fischer, C. Weirich, and V.G. Panse. 2015. Eukaryotic Ribosome Assembly and Nuclear Export. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 319:107–140.
53. Ribbeck, K., G. Lipowsky, H.M. Kent, M. Stewart, and D. Görlich. 1998. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 17:6587–6598.
54. Gerhardy, S., A.M. Menet, C. Peña, J.J. Petkowski, and V.G. Panse. 2014. Assembly and nuclear export of pre-ribosomal particles in budding yeast. *Chromosoma.* 123:327–344.
55. Thomas, F., and U. Kutay. 2003. Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *J. Cell Sci.* 116:2409–19.
56. Oeffinger, M. 2004. A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev.* 18:196–209.

57. Faza, M.B., Y. Chang, L. Occhipinti, S. Kemmler, and V.G. Panse. 2012. Role of Mex67-Mtr2 in the Nuclear Export of 40S Pre-Ribosomes. *PLoS Genet.* 8:16–21.
58. Yao, W., M. Lutzmann, and E. Hurt. 2008. A versatile interaction platform on the Mex67-Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export. *EMBO J.* 27:6–16.
59. Neumann, B., H. Wu, A. Hackmann, and H. Krebber. 2016. Nuclear Export of Pre-Ribosomal Subunits Requires Dbp5, but Not as an RNA-Helicase as for mRNA Export. *PLoS One.* 11:e0149571.
60. Tuck, A.C., and D. Tollervey. 2013. A Transcriptome-wide Atlas of RNP Composition Reveals Diverse Classes of mRNAs and lncRNAs. *Cell.* 154:996–1009.
61. Fribourg, S., and E. Conti. 2003. Structural similarity in the absence of sequence homology of the messenger RNA export factors Mtr2 and p15. *EMBO Rep.* 4:699–703.
62. Senay, C., P. Ferrari, C. Rocher, K.-J. Rieger, J. Winter, D. Platel, and Y. Bourne. 2003. The Mtr2-Mex67 NTF2-like Domain Complex. *J. Biol. Chem.* 278:48395–48403.
63. Trotta, C.R., E. Lund, L. Kahan, A.W. Johnson, and J.E. Dahlberg. 2003. Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO J.* 22:2841–51.
64. Ho, J.H.N., G. Kallstrom, and A.W. Johnson. 2000. Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p. *Rna.* 6:1625–1634.
65. Hackmann, A., T. Gross, C. Baierlein, and H. Krebber. 2011. The mRNA export factor Npl3 mediates the nuclear export of large ribosomal subunits. *EMBO Rep.* 12:1024–1031.
66. Bassler, J., I. Klein, C. Schmidt, M. Kallas, E. Thomson, M.A. Wagner, B. Bradatsch, G. Rechberger, H. Strohmaier, E. Hurt, and H. Bergler. 2012. The Conserved Bud20 Zinc Finger Protein Is a New Component of the Ribosomal 60S Subunit Export Machinery. *Mol. Cell. Biol.* 32:4898–4912.
67. Bradatsch, B., J. Katahira, E. Kowalinski, G. Bange, W. Yao, T. Sekimoto, V. Baumgärtel, G. Boese, J. Bassler, K. Wild, R. Peters, Y. Yoneda, I. Sinning, and E. Hurt. 2007. Arx1 Functions as an Unorthodox Nuclear Export Receptor for the 60S Preribosomal Subunit. *Mol. Cell.* 27:767–779.

68. Yao, Y., E. Demoinet, C. Saveanu, P. Lenormand, A. Jacquier, and M. Fromont-Racine. 2010. Ecm1 is a new pre-ribosomal factor involved in pre-60S particle export. *RNA*. 16:1007–1017.
69. Occhipinti, L., Y. Chang, M. Altvater, A.M. Menet, S. Kemmler, and V.G. Panse. 2013. Non-FG mediated transport of the large pre-ribosomal subunit through the nuclear pore complex by the mRNA export factor Gle2. *Nucleic Acids Res.* 41:8266–8279.
70. Altvater, M., Y. Chang, A. Melnik, L. Occhipinti, S. Schütz, U. Rothenbusch, P. Picotti, and V.G. Panse. 2012. Targeted proteomics reveals compositional dynamics of 60S pre-ribosomes after nuclear export. *Mol. Syst. Biol.* 8:1–15.
71. Seiser, R.M., A.E. Sundberg, B.J. Wollam, P. Zobel-Thropp, K. Baldwin, M.D. Spector, and D.E. Lycan. 2006. Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 174:679–691.
72. Merwin, J.R., L.B. Bogar, S.B. Poggi, R.M. Fitch, A.W. Johnson, and D.E. Lycan. 2014. Genetic analysis of the ribosome biogenesis factor Ltv1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 198:1071–1085.
73. Zemp, I., and U. Kutay. 2007. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett.* 581:2783–2793.
74. Taura, T., H. Krebber, and P.A. Silver. 1998. A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:7427–7432.
75. Ferreira-Cerca, S., V. Sagar, T. Schäfer, M. Diop, A.-M. Wesseling, H. Lu, E. Chai, E. Hurt, and N. LaRonde-LeBlanc. 2012. ATPase-dependent role of the atypical kinase Rio2 on the evolving pre-40S ribosomal subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19:1316–1323.
76. Bohnsack, K.E., and M.T. Bohnsack. 2019. Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *EMBO J.* 38:1–20.
77. Bai, B., H.M. Moore, and M. Laiho. 2013. CRM1 and its ribosome export adaptor NMD3 localize to the nucleolus and affect rRNA synthesis. *Nucleus*. 4:315–325.
78. Yao, W., D. Roser, A. Köhler, B. Bradatsch, J. Baßler, and E. Hurt. 2007. Nuclear Export of

- Ribosomal 60S Subunits by the General mRNA Export Receptor Mex67-Mtr2. *Mol. Cell.* 26:51–62.
79. Wild, T., P. Horvath, E. Wyler, B. Widmann, L. Badertscher, I. Zemp, K. Kozak, G. Csucs, E. Lund, and U. Kutay. 2010. A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS Biol.* 8:e1000522.
80. Leisegang, M.S., R. Martin, A.S. Ramírez, and M.T. Bohnsack. 2012. Exportin T and Exportin 5: tRNA and miRNA biogenesis-and beyond. *Biol. Chem.* 393:599–604.
81. Zemp, I., T. Wild, M.F. O'Donohue, F. Wandrey, B. Widmann, P.E. Gleizes, and U. Kutay. 2009. Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *J. Cell Biol.* 185:1167–1180.
82. Ameismeier, M., J. Cheng, O. Berninghausen, and R. Beckmann. 2018. Visualizing late states of human 40S ribosomal subunit maturation. *Nature.* 558:249–253.
83. Larburu, N., C. Montellese, M.F. O'Donohue, U. Kutay, P.E. Gleizes, and C. Plisson-Chastang. 2016. Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing. *Nucleic Acids Res.* 44:8465–8478.
84. Landry-Voyer, A.-M., S. Bilodeau, D. Bergeron, K.L. Dionne, S.A. Port, C. Rouleau, F.-M. Boisvert, R.H. Kehlenbach, and F. Bachand. 2016. Human PDCD2L Is an Export Substrate of CRM1 That Associates with 40S Ribosomal Subunit Precursors. *Mol. Cell. Biol.* 36:3019–3032.
85. Terry, L.J., and S.R. Wente. 2009. Flexible gates: Dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryot. Cell.* 8:1814–1827.
86. Spille, J.-H. 2014. Three-dimensional single particle tracking in a light sheet microscope
Jan-Hendrik Spille. .
87. Landvogt, L., J.A. Ruland, C. Montellese, J.P. Siebrasse, U. Kutay, and U. Kubitscheck. 2019. Observing and tracking single small ribosomal subunits in vivo. *Methods.* 153:63–70.
88. Gallo, S., A. Beugnet, and S. Biffo. 2011. Tagging of functional ribosomes in living cells by HaloTag® technology. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 47:132–138.

89. Gartmann, M., M. Blau, J.P. Armache, T. Mielke, M. Topf, and R. Beckmann. 2010. Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *J. Biol. Chem.* 285:14848–14851.
90. Ceci, M., C. Gaviraghi, C. Gorrini, P.C. Marchisio, L.A. Sala, N. Offenha, and S. Biffo. 2003. Release of eIF6 (p27 BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Lett. to Nat.* 8:579–584.
91. Sanvito, F., S. Piatti, A. Villa, M. Bossi, G. Lucchini, P.C. Marchisio, and S. Biffo. 1999. The beta4 integrin interactor p27(BBP/eIF6) is an essential nuclear matrix protein involved in 60S ribosomal subunit assembly. *J. Cell Biol.* 144:823–37.
92. Plisson-Chastang, C., N. Larburu, and P.E. Gleizes. 2015. Ribosomal 60S-subunit production: The final scene. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22:837–838.
93. Greber, B.J. 2016. Mechanistic insight into eukaryotic 60S ribosomal subunit biogenesis by cryo-electron microscopy. *RNA.* 22:1643–1662.
94. Grimm, J.B., B.P. English, J. Chen, J.P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J.J. Macklin, D. Normanno, R.H. Singer, T. Lionnet, and L.D. Lavis. 2015. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods.* 12:244–250.
95. Bhatia, R. 2018. Visualization of the nuclear membrane in HeLa cells for ribosomal transport kinetic measurements. Masterarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. .
96. Los, G. V., L.P. Encell, M.G. McDougall, D.D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M.G. Wood, R. Learish, R.F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D.H. Klaubert, R.F. Balleit, and K. V. Wood. 2008. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.* 3:373–382.
97. England, C.G., H. Luo, and W. Cai. 2015. HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications. *Bioconjug. Chem.* 26:975–986.
98. Kubitscheck, U. 2017. Principles of Light Microscopy. In: Kubitscheck U, editor.

- Fluorescence Microscopy - From Principles to Biological Applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. pp. 23–83.
99. Naredi-Rainer, N., J. Prescher, A. Hartschuh, and D.C. Lamb. 2017. Confocal Microscopy. In: Kubitscheck U, editor. Fluorescence Microscopy - From Principles to Biological Applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. pp. 165–200.
 100. Korobchevskaya, K., B. Lagerholm, H. Colin-York, and M. Fritzsche. 2017. Exploring the Potential of Airyscan Microscopy for Live Cell Imaging. *Photonics*. 4:41.
 101. Sheppard, C.J.R., S.B. Mehta, and R. Heintzmann. 2013. Superresolution by image scanning microscopy using pixel reassignment. *Opt. Lett.* 38:2889.
 102. Weisshart, K. 2014. The Basic Principle of Airyscanning. https://www.embl.de/services/core_facilities/almf/events_ext/2017/EN_wp_LSM-880_Basic-Principle-Airyscan.pdf (Letzter Zugriff 2021-02-09). .
 103. Huff, J. 2015. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution. *Nat. Methods*. 12:i–ii.
 104. Tokunaga, M., N. Imamoto, and K. Sakata-Sogawa. 2008. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nat. Methods*. 5:159–161.
 105. Repetto, G., A. del Peso, and J.L. Zurita. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3:1125–1131.
 106. Louis, K.S., and A.C. Siegel. 2011. Mammalian Cell Viability. 740:7–12.
 107. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nat. Methods*. 9:671–675.
 108. Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 9:676–82.
 109. Thevenaz, P., U.E. Ruttimann, and M. Unser. 1998. A pyramid approach to subpixel

- registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7:27–41.
110. Tinevez, J.-Y., N. Perry, J. Schindelin, G.M. Hoopes, G.D. Reynolds, E. Laplantine, S.Y. Bednarek, S.L. Shorte, and K.W. Eliceiri. 2017. TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods.* 115:80–90.
 111. Ruland, J.A., A.M. Krüger, K. Dörner, R. Bhatia, S. Wirths, D. Pòetes, U. Kutay, J.P. Siebrasse, and U. Kubitscheck. 2021. Nuclear export of the pre-60S ribosomal subunit through single nuclear pores observed in real time. *bioRxiv.*
 112. Mortensen, K.I., L.S. Churchman, J.A. Spudich, and H. Flyvbjerg. 2010. Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nat. Methods.* 7:377–381.
 113. Haines, E. 1994. Point in polygon strategies. In: Heckbert P, editor. *Graphic Gems IV.* Boston, MA: Academic Press. pp. 24–46.
 114. Hormann, K., and A. Agathos. 2001. The point in polygon problem for arbitrary polygons. *Comput. Geom.* 20:131–144.
 115. Otsu, N. 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.* 9:62–66.
 116. Hansen, A.S., M. Woringer, J.B. Grimm, L.D. Lavis, R. Tjian, and X. Darzacq. 2018. Robust model-based analysis of single-particle tracking experiments with Spot-On. *Elife.* 7:1–33.
 117. Floyd, D.L., S.C. Harrison, and A.M. Van Oijen. 2010. Analysis of kinetic intermediates in single-particle dwell-Time distributions. *Biophys. J.* 99:360–366.
 118. Kaminski, T.P. 2014. Nuclear export of single native mRNA molecules observed via light sheet fluorescence microscopy and transcriptional regulation of BR2.1 during heat-shock. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. .
 119. Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Automat. Contr.* 19:716–723.
 120. Burnham, K.P., and D.R. Anderson. 2002. *Model Selection and Multimodel Inference.* New

York, NY: Springer New York.

121. Basu, U., K. Si, J.R. Warner, and U. Maitra. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21:1453–62.
122. Landvogt, L., J.A. Ruland, C. Montellese, J.P. Siebrasse, U. Kutay, and U. Kubitscheck. 2019. Observing and tracking single small ribosomal subunits in vivo. *Methods.* 153:63–70.
123. Perry, R.P., and D.E. Kelley. 1970. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J. Cell. Physiol.* 76:127–39.
124. Landvogt, L. 2018. Intranukleäre Mobilität und Export der kleinen Untereinheit in humanen Zellen. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. .
125. Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E.P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9112–9117.
126. Seibel, N.M., J. Eljouni, M.M. Nalaskowski, and W. Hampe. 2007. Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* 368:95–99.
127. Wang, R., and M.G. Brattain. 2007. The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60 kDa. *FEBS Lett.* 581:3164–3170.
128. Kubitscheck, U., P. Wedekind, O. Zeidler, M. Grote, and R. Peters. 1996. Single nuclear pores visualized by confocal microscopy and image processing. *Biophys. J.* 70:2067–77.
129. Schwarz-Herion, K., B. Maco, U. Sauder, and B. Fahrenkrog. 2007. Domain topology of the p62 complex within the 3-D architecture of the nuclear pore complex. *J. Mol. Biol.* 370:796–806.
130. Chatel, G., and B. Fahrenkrog. 2012. Dynamics and diverse functions of nuclear pore complex proteins. *Nucleus.* 3:162–171.
131. Fischer, H., I. Polikarpov, and A.F. Craievich. 2004. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci.* 13:2825–8.

132. Veith, R., T. Sorkalla, E. Baumgart, J. Anzt, H. Häberlein, S. Tyagi, J.P. Siebrasse, and U. Kubitscheck. 2010. Balbiani Ring mRNPs Diffuse through and Bind to Clusters of Large Intranuclear Molecular Structures. *Biophys. J.* 99:2676–2685.
133. Pollutri, D., and M. Penzo. 2020. Ribosomal Protein L10: From Function to Dysfunction. *Cells.* 9:1–15.
134. Ma, J., A. Goryaynov, and W. Yang. 2016. Super-resolution 3D tomography of interactions and competition in the nuclear pore complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23:239–47.
135. Iborra, F.J., D.A. Jackson, and P.R. Cook. 2000. The path of RNA through nuclear pores: apparent entry from the sides into specialized pores. *J. Cell Sci.* 113 Pt 2:291–302.
136. Bayliss, R., K. Ribbeck, D. Akin, H.M. Kent, C.M. Feldherr, D. Görlich, and M. Stewart. 1999. Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *J. Mol. Biol.* 293:579–93.
137. Speil, J., and U. Kubitscheck. 2010. Single ovalbumin molecules exploring nucleoplasm and nucleoli of living cell nuclei. *Biochim. Biophys. Acta.* 1803:396–404.
138. Saroufim, M.-A., P. Bensidoun, P. Raymond, S. Rahman, M.R. Krause, M. Oeffinger, and D. Zenklusen. 2015. The nuclear basket mediates perinuclear mRNA scanning in budding yeast. *J. Cell Biol.* 211:1131–40.
139. Soheilypour, M., and M.R.K. Mofrad. 2016. Regulation of RNA-binding proteins affinity to export receptors enables the nuclear basket proteins to distinguish and retain aberrant mRNAs. *Sci. Rep.* 6:35380.
140. Ribbeck, K., and D. Görlich. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* 20:1320–1330.
141. Ribbeck, K., and D. Görlich. 2002. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* 21:2664–71.
142. Cox, R.A., and H.R.V. Arnstein. 2003. Translation of RNA to Protein. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of Physical Science and Technology.* New York, USA: Elsevier. pp. 31–51.

143. Liang, X., M.-Q. Zuo, Y. Zhang, N. Li, C. Ma, M.-Q. Dong, and N. Gao. 2020. Structural snapshots of human pre-60S ribosomal particles before and after nuclear export. *Nat. Commun.* 11:3542.
144. Güttler, T., and D. Görlich. 2011. Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *EMBO J.* 30:3457–74.
145. Lowe, A.R., J.J. Siegel, P. Kalab, M. Siu, K. Weis, and J.T. Liphardt. 2010. Selectivity mechanism of the nuclear pore complex characterized by single cargo tracking. *Nature.* 467:600–3.
146. Lewin, B. 2008. Genes IX. Sudbury, MA, USA: Jones and Bartlett Publishers.
147. Azimi, M., E. Bulat, K. Weis, and M.R.K. Mofrad. 2014. An agent-based model for mRNA export through the nuclear pore complex. *Mol. Biol. Cell.* 25:3643–53.
148. Pritchard, C.E.J., M. Fornerod, L.H. Kasper, and J.M. van Deursen. 1999. RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J. Cell Biol.* 145:237–54.
149. Sloan, K.E., P.-E. Gleizes, and M.T. Bohnsack. 2016. Nucleocytoplasmic Transport of RNAs and RNA–Protein Complexes. *J. Mol. Biol.* 428:2040–2059.
150. Tieg, B., and H. Krebber. 2013. Dbp5 - from nuclear export to translation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1829:791–8.
151. Gleizes, P.E., J. Noaillac-Depeyre, I. Léger-Silvestre, F. Teulières, J.Y. Dauxois, D. Pommet, M.C. Azum-Gelade, and N. Gas. 2001. Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J. Cell Biol.* 155:923–36.
152. Kim, S.J., J. Fernandez-Martinez, I. Nudelman, Y. Shi, W. Zhang, B. Raveh, T. Herricks, B.D. Slaughter, J.A. Hogan, P. Upla, I.E. Chemmama, R. Pellarin, I. Echeverria, M. Shivaraju, A.S. Chaudhury, J. Wang, R. Williams, J.R. Unruh, C.H. Greenberg, E.Y. Jacobs, Z. Yu, M.J. de la Cruz, R. Mironska, D.L. Stokes, J.D. Aitchison, M.F. Jarrold, J.L. Gerton, S.J. Ludtke, C.W. Akey, B.T. Chait, A. Sali, and M.P. Rout. 2018. Integrative structure and functional anatomy

- of a nuclear pore complex. *Nature*. 555:475–482.
153. Roloff, S., C. Spillner, and R.H. Kehlenbach. 2013. Several phenylalanine-glycine motives in the nucleoporin Nup214 are essential for binding of the nuclear export receptor CRM1. *J. Biol. Chem.* 288:3952–63.
 154. Port, S.A., T. Monecke, A. Dickmanns, C. Spillner, R. Hofele, H. Urlaub, R. Ficner, and R.H. Kehlenbach. 2015. Structural and Functional Characterization of CRM1-Nup214 Interactions Reveals Multiple FG-Binding Sites Involved in Nuclear Export. *Cell Rep.* 13:690–702.
 155. Huang, K., M. Tagliacruzchi, S.H. Park, Y. Rabin, and I. Szleifer. 2019. Molecular model of the nuclear pore complex reveals a thermoreversible FG-network with distinct territories occupied by different FG motifs. *bioRxiv*.
 156. Karbstein, K. 2013. Quality control mechanisms during ribosome maturation. *Trends Cell Biol.* 23:242–50.
 157. Peña, C., E. Hurt, and V.G. Panse. 2017. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24:689–699.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
AIC _c	korrigiertes Akaike Information Criterion
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Airyunit
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>C. tentans</i>	<i>Chiromomus tentans</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Crm1	<i>chromosomal region maintenance 1</i> /alternativ Xpo1
Cryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
Da	Dalton
Dbp5	<i>dead box protein 5</i>
Dec.	<i>decceleration</i>
DFC	<i>dense fibrillar components</i>
Dim2/ PNO1	<i>Defective In DNA Methylation 2/ Partner of NOB1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF6	<i>Eukaryotic translation initiation factor 6</i>
EMCCD	<i>Electron multiplying charge-coupled device</i>
Epi	Auflicht-Mikroskopi
et al.	und andere
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FC	<i>fibrillar center</i>
FG	Phenylalanin-Glycin
FG-Nups	mit Phenylalanin-Glycin-Nups
g	Erdanziehungskraft
GC	<i>granular components</i>
GDP	Guanosindiphosphat

GFP	grün fluoreszierende Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HILO	<i>highly inclined and laminated optical sheet</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase/ Meerrettichperoxidase</i>
Hz	Hertz
Imp α	Importin α
Imp β	Importin β
JF549	Janelia-Flour-549-HaloTag-Ligand
JF646	Janelia-Flour-646-HaloTag-Ligand
kB	Kilopasenpaare
kDa	Kilodalton
LMB	Leptomycin B
LSM	<i>Laserscanning</i>
M	Molar
MDa	Megadalton
MEF	Embryonalfibroblasten
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mex67-Mtr2	mRNA Export Rezeptor 67
mg	Miligramm
min	Minuten
miRNA	Mikro-RNA
mL	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Milisekunde
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NES	<i>nuclear export sequence/ Kernexportsequenz</i>
NHS	N-hydroxysuccinimid
NLS	<i>nuclear localization signal/ Kernlokalisierungssignal</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPC	<i>nuclear pore complex/ Kernporenkomplex</i>
NTF2	<i>Nuclear transport factor 2</i>
NTR	<i>nuclear transport receptors</i>
Nup	Nukleoporin
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>

PDF	<i>probability density functions</i> /Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion
PDVF	Polyvinylidenfluorid
PFA	Paraformaldehyd
PMT	<i>photon multiplier tube</i>
Pol I & II	Polymerase I & II
PSF	Punktspreizfunktion
RanGAP	<i>Ran GTPase-activating protein</i>
RanGEF	<i>Ran GTP exchange factor</i>
RanGTP	<i>Ras-related Nuclear Protein</i> gebunden an GTP
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
Rpl10	ribosomales 60S-Protein L10
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA
RSS	<i>residual sum of squares</i>
s	Sekunde
S. Cerevisiae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> / Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sif	<i>Andor image file format</i>
Sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tif	<i>Tagged Image File Format</i>
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TREX	<i>TRanscription-EXport</i>
tRNA	transfer-RNA
Xpo1	Exportin 1/ alternativ Crm1
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> / gelb fluoreszierende Protein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	11
Abbildung 1-2	12
Abbildung 1-3	13
Abbildung 1-4	14
Abbildung 1-5	17
Abbildung 1-6	19
Abbildung 1-7	21
Abbildung 2-1	34
Abbildung 2-2	35
Abbildung 2-3	36
Abbildung 2-4	37
Abbildung 2-5	39
Abbildung 2-6	40
Abbildung 2-7	46
Abbildung 2-8	48
Abbildung 2-9	49
Abbildung 2-10	50
Abbildung 2-11	51
Abbildung 2-12	56
Abbildung 3-1	60
Abbildung 3-2	62
Abbildung 3-3	64
Abbildung 3-4	65
Abbildung 3-5	66
Abbildung 3-6	67
Abbildung 3-7	68
Abbildung 3-8	69
Abbildung 3-9	70
Abbildung 3-10	72
Abbildung 3-11	73
Abbildung 3-12	74

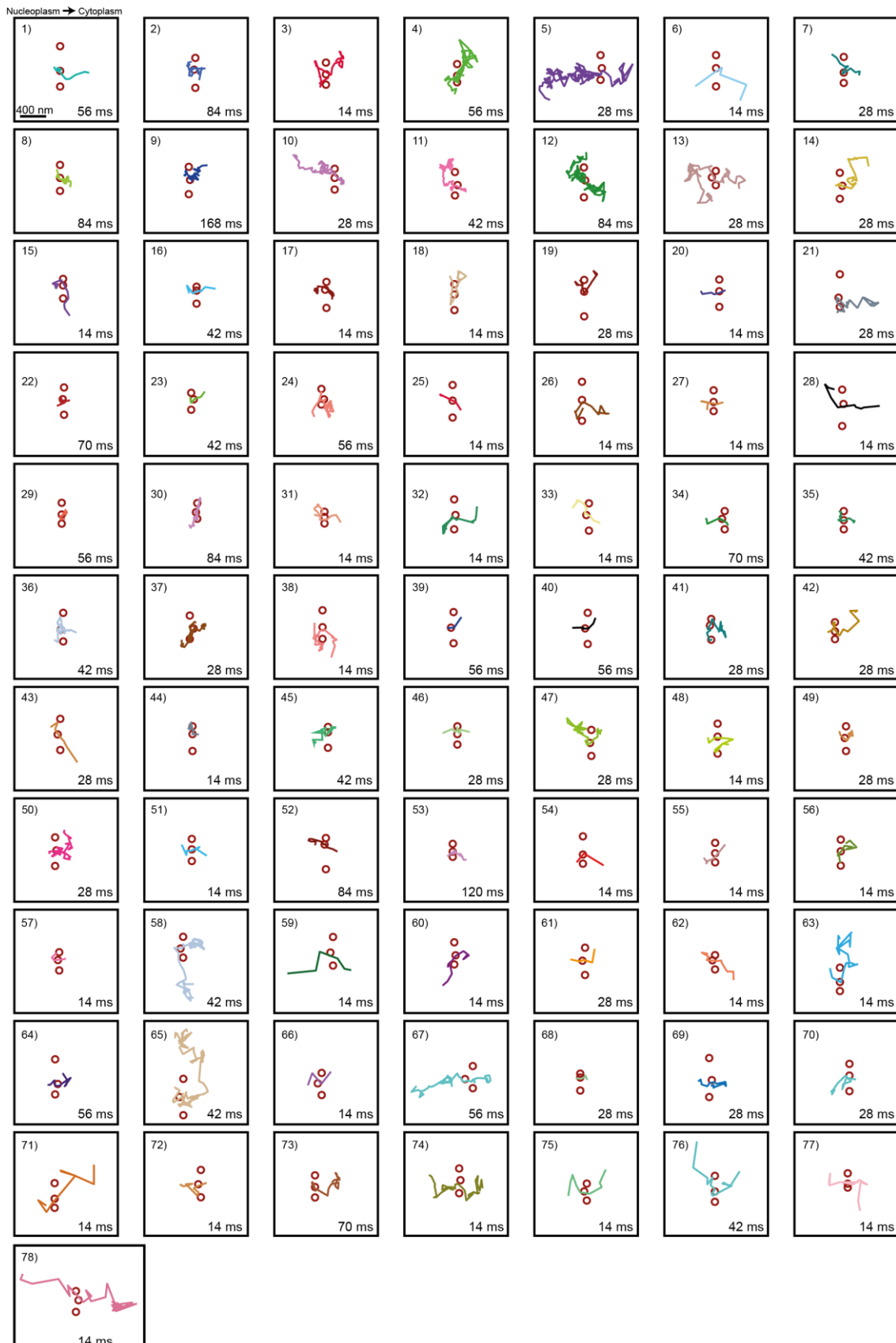
Abbildung 3-13	75
Abbildung 3-14	75
Abbildung 3-15	76
Abbildung 4-1	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 - Gegenüberstellung verschiedener, experimentell bestimmter Translokationszeiten verschiedener Studien.....	15
Tabelle 2-1 - Auflistung aller verwendeter Chemikalien mit den entsprechenden Herstellern.....	25
Tabelle 2-2 - Auflistung spezieller Verbrauchsmaterialien und der entsprechenden Hersteller.....	26
Tabelle 2-3 - Auflistung der verwendeten Gerätschaften und der entsprechenden Hersteller.....	27
Tabelle 2-4 - Auflistung spezieller Gerätschaften und Bauteile, die zur Realisation der Einzelmolekül- Beleuchtung und -Detektion verwendet wurden.....	27
Tabelle 2-5 - Zusammensetzung der Gele und Puffer für die Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-PAGE)	28
Tabelle 2-6 - Zusammensetzung der Puffer für den <i>Westernblot</i>	28
Tabelle 2-7 - Zusammensetzung des verwendeten Zellmediums.....	29
Tabelle 2-8 - Zusammensetzung von phosphatgepufferter Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i> , PBS)	29
Tabelle 2-9 - Zusammensetzung des MES-Puffers.....	29
Tabelle 2-10 - Definitionen der einzelnen Interaktionsmöglichkeiten der pre-60S Partikeln mit einzelnen Kernporen.....	52
Tabelle 3-1 - Diffusionskoeffizienten und Größe der einzelnen Fraktionen der Dreikomponenten- Anpassung an die Sprungweiterverteilung.....	70

Anhang aller Export-Ereignisse

Auflistung aller 78 Export-Ereignisse, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden. Alle Ereignisse wurden entsprechend Kapitel 0 so gedreht, dass der Export von links (Nukleoplasma) nach rechts (Zytoplasma) verläuft. Dargestellt ist die Export Trajektorie (bunte Linien) mit der jeweiligen Exportdauer und die zentrale, so wie die direkt benachbarten Kernporen (rote Kreise).



Danksagung

An dieser Stelle danke ich Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck zum einen für das interessante Thema, zum anderen für die zahlreichen Anregungen und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, ebenso auch für die Freiheit bei der Bearbeitung der Fragestellung.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Olav Schiemann für die Zweitbetreuung und die Übernahme des Koreferats. Auch Herrn Prof. Dr. Arne Lützen und Herrn Prof. Dr. Ben Odermatt danke ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Jan-Peter Siebrasse, der mir bei allen Problemen und Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand und freundlicherweise meine Arbeit Korrektur gelesen hat.

Ich danke beiden Werkstätten im Haus für eine immer unkomplizierte Zusammenarbeit und schnelle Hilfe.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle, die sich bereit erklärt haben, die Arbeit Korrektur zu lesen. Vielen Dank für eure Zeit!

Mein Dank gilt ebenfalls dem coolsten Büro der Welt und der ganzen Arbeitsgruppe für das angenehme Arbeitsklima, die vielen Fachdiskussionen, kleineren Hilfestellungen, die seelisch-moralische Unterstützung, die viele lustigen Mittagspausen (mit ganz viel Eis) und die gemeinsamen Feierabende.

Schließlich möchte ich mich noch besonders bei meinen Geschwistern Timm und Laura für ihre Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Von besonderem, unschätzbaren Wert für mich war die Unterstützung meiner Eltern. Vielen Dank, dass Ihr immer an mich geglaubt habt und ich immer auf euch zählen kann. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen!