

Aus dem Institut für medizinische Physik und Biophysik
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Struktur der IRES-RNA von Dicistroviren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Martin Schüler

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Chr. Spahn
2. Prof. Dr. R. Beckmann
3. Prof. Dr. A. Herrmann

Datum der Promotion: 15.05.2009

1 Zusammenfassung

Der zentrale Prozess der Realisierung der Erbinformation in Form von Proteinen wird Translation genannt. Sie wird durch auf RNA basierenden, makromolekularen "Maschinen" bewerkstelligt, den Ribosomen. Die Translation wird durch sog. Translationsfaktoren initiiert und kontrolliert. Bei Eukaryonten beinhaltet der Standardmechanismus der Translationsinitiation die Bindung eines ribosomalen Initiationskomplex an die 5'-Capstruktur der mRNA sowie einen Scanning-Mechanismus, bei dem sich der ribosomale Initiationskomplex entlang der mRNA zum ersten Startkodon bewegt. Danach kommt es zur Anlagerung der großen ribosomalen Untereinheit und die Translation des Proteins beginnt.

Zusätzlich zu diesem konventionellen Weg der Translationsinitiation gibt es einen alternativen Weg. Nicht die 5' Cap-Struktur wird erkannt, sondern ein strukturelles Element in der 5'-untranslatierten Region der mRNA. Diese Elemente werden IRES (engl., "*internal ribosomal entry sites*") genannt. Bei ihnen wird zwischen verschiedenen Familien unterschieden, die je nach Art eine interne Translationsinitiation unter teilweiser oder vollständiger Umgehung des konventionellen Mechanismus ermöglichen.

Die IRES-RNA scheint dabei die Funktion von RNA-basierenden Translationsfaktoren zu übernehmen. Über den molekularen Aufbau der IRES-Elemente, die diese Funktion ermöglichen, ist bisher wenig bekannt. IRES zeigen eine große Bandbreite verschiedener Strukturen, bei denen jedoch bestimmte statische und flexible Elemente für die verschiedenen Funktionen verantwortlich sind. Eine besondere IRES ist die des *cricket paralysis virus* (CrPV). Es besitzt die ungewöhnliche Eigenschaft, die Initiation ohne weitere Initiationsfaktoren oder Initiator-tRNA durchzuführen zu können. Die hier ermittelte Information über dessen Struktur auch für die Untersuchung und das Verständnis der IRES-kontrollierten Translationsinitiation im Allgemeinen genutzt werden.

Zur Ermittlung der CrPV-IRES-Struktur wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene ribosomale Komplexe hergestellt und mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelrekonstruktion untersucht. Durch umfangreiche Verbesserungen im Bereich der Probenpräparation sowie der Datenverarbeitung war es möglich, die Struktur ribosomal gebundener IRES mit einer Auflösung von 7,3Å zu ermitteln. Diese Auflösung erlaubte erstmals die *de novo* Modellierung der vollständigen CrPV-IRES-RNA mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie. Das Modell erlaubte sowohl die Zuordnung der verschiedenen zur Translationsinitiation notwendigen Funktionen zu den IRES-Strukturelementen als auch die molekulare Interpretation der Interaktionen der IRES mit den ribosomalen Komponenten an den tRNA-Bindungsstellen A-, P- und E.

Mit dieser Arbeit konnte eine strukturelle Grundlage für das Verständnis der IRES-kontrollierten Translationsinitiation erarbeitet werden. Diese Kenntnisse können genutzt werden, um z.B. speziell gegen diesen Mechanismus gerichtete Medikamente zu entwickeln und so wirksame antivirale Therapien zu ermöglichen. Die zur Aufklärung der Struktur entwickelten Techniken eröffnen den Weg zur Untersuchung einer größeren Anzahl biologisch relevanter Komplexe, die mit bisherigen Untersuchungsmethoden wie z.B. der Röntgenstrukturanalyse nicht zugänglich waren.

Summary

The central process of realizing the genetic information of proteins is called translation. It is executed by ribosomes, RNA based, macromolecular "machines". The translation is initiated and controlled by translation factors. The standard mechanism of eukaryotic translation initiation includes the binding of a ribosomal initiation-complex to the 5'-cap-structure of the mRNA and a scanning mechanism, in which the ribosomal initiation complex is moving to the first start-codon. After these events the large ribosomal subunit joins the complex and translation of proteins can occur.

In addition to this canonical way of translation initiation an alternative pathway exists. It is driven by IRES ("*internal ribosomal entry sites*"), a structural element at the 5'-untranslated region from the RNA. There are three different IRES families, which allow the internal translation initiation among partially or complete bypassing of the canonical mechanism.

It seems that the IRES-RNA assumes the function of an RNA-based translation factor. The molecular structure which allows this function is mostly unknown. IRES elements show a wide band of different structures, in which different static or flexible elements are responsible for different functions. A special form is the IRES of *cricket paralysis virus* (CrPV). It has the uncommon ability to perform the initiation without initiation factors or initiator tRNA. Therefore the ascertained information about its structure can also be used for the examination and understanding of the IRES-based translation in general.

To determine the structure of the CrPV-IRES, different ribosomal complexes were assembled during this study which has been analysed by cryo-electronmicroscopy and single particle reconstruction. As a result, it was possible to determine the structure of the ribosome-bound IRES at a 7,3Å resolution. This resolution allows for the first time ever both the *de novo* modelling of the complete CrPV-IRES-RNA and by cryo-electronmicroscopy. This model allows the allocation of the different structural elements involved in translation initiation as well as the interpretation of the interactions between IRES and ribosomes at A-, P- and E-tRNA-binding sites.

This study achieved a structural base for the understanding of how IRES-based translation initiation could be acquired. This knowledge can be used to affect this mechanism by pharmaceuticals to develop effective antiviral treatments.

The developed techniques used to determine the structure will open the way to analyse a huge number of biological components which are difficult to access by X-ray-crystallography.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
2	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	8
3	EINLEITUNG	10
3.1	DAS RIBOSOM.....	10
3.2	DIE TRANSLATION	13
3.2.1	<i>Die kanonische Initiation</i>	13
3.2.2	<i>Elongation</i>	14
3.2.3	<i>Termination</i>	15
3.2.4	<i>Post-terminale Phase – Ribosomenrecycling</i>	15
3.2.5	<i>Regulation der Translation</i>	15
3.3	ALTERNATIVER WEG DER TRANSLATIONSINITIATION	16
3.3.1	<i>CrPV-IRES</i>	18
3.4	KRYO-ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND EINZELPARTIKELREKONSTRUKTION	22
4	AUFGABENSTELLUNG: STRUKTUR UND EIGENSCHAFTEN DER CRPV-IRES	26
5	MATERIAL UND METHODEN	27
5.1	GERÄTE	27
5.2	CHEMIKALIEN.....	28
5.3	PUFFER, LÖSUNGEN, MIKROBIOLOGISCHE MEDIEN.....	30
5.3.1	<i>Puffer für Elektrophorese</i>	30
5.3.2	<i>Mikrobiologische Medien</i>	32
5.3.3	<i>Puffer für Immunoassay</i>	32
5.3.4	<i>Puffer für In Vitro-Systeme</i>	33
5.3.5	<i>Puffer für Ribosomenisolierung</i>	34
5.3.6	<i>Puffer für die HPLC</i>	35
5.3.7	<i>Puffer für die Aminoacylierung</i>	35
5.4	MIKROBIOLOGISCHE ORGANISMEN	35
5.5	ANALYTISCHE METHODEN	36
5.5.1	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmungen</i>	36
5.5.2	<i>Radioaktivitätsmessung</i>	37
5.5.3	<i>Elektrophorese</i>	37
5.5.4	<i>Dichtegradientenzentrifugation</i>	40
5.5.5	<i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	42
5.5.6	<i>Immunoassay-Westernblot</i>	42
5.5.7	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i>	43
5.5.8	<i>Untersuchung der ribosomalen RNA</i>	43
5.5.9	<i>Präzipitation von Nukleinsäuren</i>	44
5.5.10	<i>TCA-Fällungsassay</i>	44

5.5.11	<i>funktionelle invitro-Analysen des Ribosoms</i>	45
5.6	PRÄPRATIVE METHODEN	52
5.6.1	<i>Kultivierung und Konservierung von E. coli</i>	52
5.6.2	<i>Kultivierung und Konservierung von S. cerevisiae (Hefe)</i>	52
5.6.3	<i>Präparation von Ribosomen aus S. cerevisiae (Hefe)</i>	53
5.6.4	<i>Präparation von ribosomalen Untereinheiten aus S. cerevisiae (Hefe)</i>	54
5.6.5	<i>Präparation von Ribosomen aus Leporidae (Kaninchen)</i>	55
5.6.6	<i>Präparation von Phe-tRNA^{Phe}</i>	55
5.6.7	<i>Präparation von AcPhe-tRNA^{Phe}</i>	57
5.6.8	<i>Präparation von ribosomalem Hefe-80S-Wildtyp-CrPV-IRES-Komplex</i>	58
5.6.9	<i>Präparation von ribosomalem Hefe-80S-Komplexen mit mutierten CrPV-IRES-Konstrukten</i>	59
5.6.10	<i>Präparation von ribosomalen Kaninchen-80S-Komplexen mit mutierten CrPV-IRES-Konstrukten</i> 59	
5.7	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	60
5.7.1	<i>IRES-Konstrukte</i>	60
5.7.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	61
5.7.3	<i>Restriktionsverdau von DNA</i>	64
5.7.4	<i>Ligation</i>	65
5.7.5	<i>Transformation</i>	66
5.7.6	<i>Plasmidpräparation</i>	66
5.7.7	<i>Herstellung von CrPV-IRES-mRNA</i>	67
5.8	KRYO-ELEKTRONENMIKROSKOPIE	69
5.9	DATENPROZESSIERUNG	73
5.10	DIGITALISIERUNG	73
5.10.1	<i>Dichteverteilung</i>	73
5.10.2	<i>Fourier-Transformation</i>	74
5.10.3	<i>Powerspektrum</i>	74
5.10.4	<i>Kontrasttransferfunktion</i>	75
5.10.5	<i>Partikelselektion</i>	76
5.10.6	<i>3D-Partikelrekonstruktion</i>	77
5.10.7	<i>Bestimmung der graphischen Auflösung der Elektronendichten</i>	80
5.10.8	<i>Sortierung des Datensatzes-Multipartikelrefinement</i>	82
5.10.9	<i>Datenbankeinträge</i>	83
5.10.10	<i>Molekulare Modellierung und Interpretation</i>	83
6	ERGEBNISSE	84
6.1	PRÄPARATION VON PHE-TRNA ^{PHE}	84
6.1.1	<i>Vergleich der Aminoacylierung mit pro- und eukaryotischen Synthetasen</i>	84
6.1.2	<i>Optimierung der Amioacylierungsrate</i>	85
6.1.3	<i>Aufreinigung aminoacylierter tRNA^{Phe} durch HPLC</i>	89
6.2	PRÄPARATION VON ACPHE-TRNA ^{PHE}	91

6.3	PRÄPARATION RIBOSOMALER UNTEREINHEITEN	92
6.3.1	<i>Optimierung der Dissoziation von Heferibosomen</i>	92
6.3.2	<i>Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten</i>	94
6.3.3	<i>Untersuchung der Ribosomenaktivität durch Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese</i>	95
6.4	PRÄPARATION VON Y80S-CrPV-IRES-KOMPLEXEN.....	96
6.4.1	<i>Voruntersuchungen zur IRES-bedingten Reassoziaton</i>	96
6.4.2	<i>Präparation von Y80S-CrPV-IRES (WT)</i>	102
6.4.3	<i>Analytische Untersuchungen des Y80S-CrPV-IRES-(WT) Komplexes</i>	103
6.5	PRÄPARATION VON RRL80S-CrPV-IRES-KOMPLEXEN.....	105
6.5.1	<i>Präparation von RRL80S-CrPV-IRES-(Phe) und -(Comp)-Komplexen</i>	105
6.5.2	<i>Analytische Untersuchungen der RRL80S-CrPV-IRES-Komplexe</i>	106
6.6	UNTERSUCHUNG DER RIBOSOMALEN IRES-KOMPLEXE AUF ANWESENHEIT VON P-PROTEINEN	107
6.7	UNTERSUCHUNGEN FUNKTIONELLER ZUSTÄNDE RIBOSOMALER CrPV-IRES-KOMPLEXE	108
6.7.1	<i>Bindung von AcPhe-tRNA^{Phe}</i>	108
6.7.2	<i>Bindung von ternärem Translationskomplex</i>	111
6.8	KRYO-ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND EINZELPARTIKELREKONSTRUKTION	119
6.8.1	<i>Untersuchung des Y80S-CrPV-IRES (WT)-Komplexes</i>	119
6.8.2	<i>Molekulare Struktur der CrPV-IRES-RNA</i>	123
6.8.3	<i>Wechselwirkungen zwischen der CrPV-IRES und dem 80S-Ribosom</i>	126
6.8.4	<i>Untersuchung der RRL80S-CrPV-IRES-Komplexe</i>	127
7	DISKUSSION	130
7.1	STRUKTUR DER RIBOSOMAL GEBUNDENEN IRES.....	130
7.2	DIE IRES WÄHREND DER TRANSLATION	135
8	LITERATURVERZEICHNIS	140
1	TABELLENVERZEICHNIS	145
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	146
3	DANKSAGUNG	149
4	LEBENS LAUF	150
5	ERKLÄRUNG	151

2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ribosomen	80S	eukaryontisches Ribosom (S = 80)
	60S	große eukaryontische ribosomale Untereinheit (S = 60)
	40S	kleine eukaryontische ribosomale Untereinheit (S = 40)
	S30	Zellysat nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer bei 30.000g
	S100	Überstand nach Zentrifugation von Zellysat bei 100.000 g
Proteine	BSA	Rinderserumalbumin
	DNAse	Desoxyribonuklease
Nukleinsäuren,	RNA	Ribonukleinsäure
Nukleotide,	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Aminosäuren	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
	tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
	Phe	Phenylalanin, Phenylalanyl-
	aatRNA	Aminoacyl-tRNA
	tRNA ^{Phe}	Phenylalanin-spezifische tRNA
	ATP	Adenosin-5'-triphosphat
	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
	CTP	Cytosin -5'-Triphosphat
	UTP	Uridin-5'-Triphosphat
	dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-triphosphat
Mikrobiologische	E. coli	Escherichia coli
Organismen	Y	Hefe (engl. "Yeast")
	RRL	rabbit reticulocyte lysate – Kaninchen-Retikulocyten-Lysat
Puffer und	AA	Acrylamid
Chemikalien	Amp	Ampicillin
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	Bis	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
	BPB	Bromphenolblau
	DTT	Dithiothreitol
	EtOH	Ethanol
	HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2 ethansulfonsäure
	NaAc	Natriumacetat
	PEP	Phosphoenolpyruvat
	PM	Puromycin
	PPi	Pyrophosphat
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	Sp	Spermin
	Spd	Spermidin
	TCA	Trichloressigsäure
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
	Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

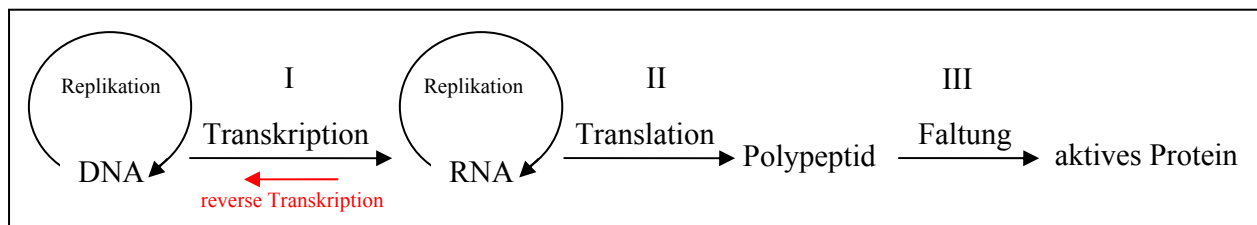
Abkürzungsverzeichnis

Physikalische	HPLC	engl High-Performance Liquid Chromatography
Begriffe	IEF	Isoelektrische Fokussierung
	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
	PCR	engl polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
	pH	lat Pondus hydrogenii
	pI	isoelektrischer Punkt
	kb(p)	Kilobasen(paare)
	Da	Dalton
	Å	Ångström
	λ	Wellenlänge in nm
	dpm	engl. <i>desintegrations per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
	f.c.	Endkonzentration
	* g	Erdbeschleunigung
	h	Stunde
	min	Minute
	rpm	Umdrehungen pro Minute
	RT	Raumtemperatur
	S	Svedbergeinheit für den Sedimentationskoeffizient (1 S = 10 ⁻¹³ s)
	s	Sekunde
	üN	über Nacht, d.h. länger als 10 Stunden
	% v/v	Konzentrationsangabe in ml pro 100 ml Lösungsmittel
	Vol	Volumen oder Volumina
	% w/v	Konzentrationsangabe in g pro 100 ml Lösungsmittel
	3D	dreidimensional
	KEM	Kryo-Elektronenmikroskopie
	EPR	Einzelpartikelrekonstruktion
	CTF	Phasenkontrasttransferfunktion
	FSC	fourier shell correlation
	FTT	Fast Fourier Transformation
	PDB	Proteindatenbank
	TIF	Tagged Image File Format

Weiterhin wurden allgemein übliche Abkürzungen verwendet.

3 Einleitung

Die Genexpression ist ein zentraler Prozess in allen lebenden Zellen. Dabei wird im ersten Schritt die in der Nukleotidsequenz der DNA gespeicherte Erbinformation mit Hilfe von Transkriptasen auf mRNA übertragen (Transkription). Diese Information wird danach durch Kodon-Antikodon-Interaktionen zwischen tRNA und mRNA dekodiert und dient zur selektiven Verknüpfung der an den tRNA gebundenen Aminosäuren zu Polypeptidketten (Translation). Nach Beendigung des Vorgangs faltet sich das Protein aufgrund der Aminosäuresequenz und der Art ihrer hydrophoben und hydrophilen Seitenketten in seine aktive Struktur. Dabei sind weitere Modifikationen, z.B. Abspaltung des N-terminalen Formylrestes durch Deformylase,



Phosphorylierungen, Glykosylierungen usw. möglich.

Abb. 1: zentrales Dogma der Molekularbiologie

Die Informationsübertragung von DNA über RNA auf das Protein (siehe Abb. 1) wird als *zentrales Dogma* der Molekularbiologie bezeichnet und erfolgt universell in allen Lebewesen sowohl bei Pro- wie auch bei Eukaryonten. Darüber hinaus findet man sie bei einigen DNA-Viren. Bei RNA-Viren wird die RNA direkt repliziert.

3.1 Das Ribosom

Ribosomen (von griech. *arabinos*, "Traube" und *soma*, "Körper") sind makromolekulare Maschinen aus Ribonukleinsäuren und Proteinen, die im Cytoplasma der Zellen lebender Organismen vorkommen (Spirin, 2002; Steitz, 2008). An ihnen findet die Proteinbiosynthese statt. Ribosomen setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen (siehe Abb. 2). Die große Untereinheit besitzt Peptidyltransferaseaktivität und verknüpft während der Proteinbiosynthese die Aminosäuren zur Peptidkette. Die kleine Untereinheit ist für die mRNA-Erkennung verantwortlich. Beide Untereinheiten bestehen vorwiegend aus rRNA sowie zum kleineren Teil aus Proteinen. Die rRNA sorgt für die katalytische Aktivität, während die Proteine für den Zusammenhalt und die richtige Positionierung der Untereinheiten zuständig sind.

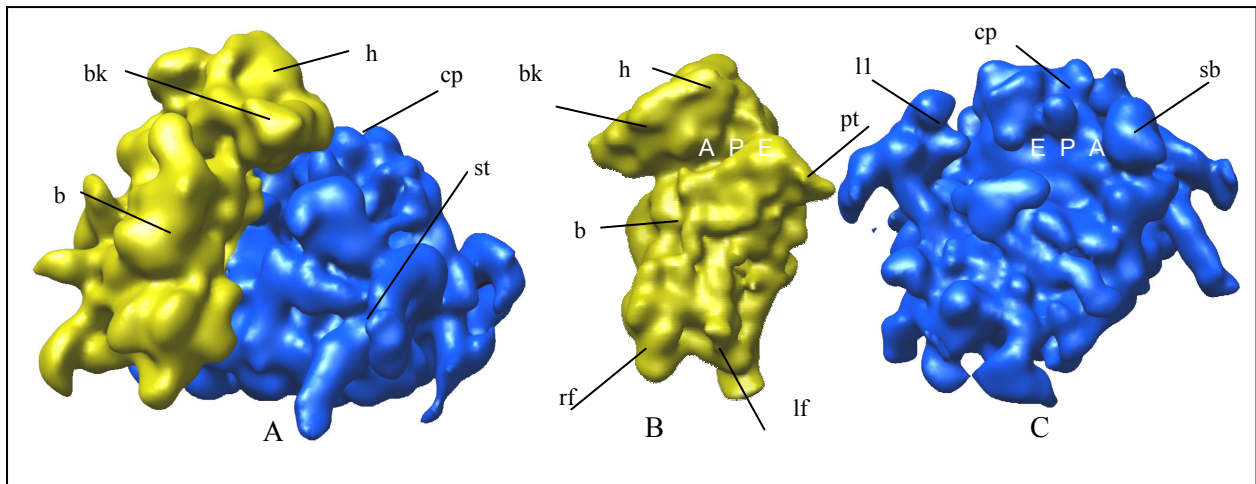


Abb. 2: Eine Kryo-EM-Struktur des 80S-Kaninchenribosoms bei einer Auflösung von 9,8Å

A: 80S-Ribosom in Seitenansicht, B: die 40S-Untereinheit aus 60S-Richtung mit entfernter 60S, C: die 60S-Untereinheit aus 40S-Richtung mit entfernter 40S; gelb: 40S-Untereinheit, blau: 60S-Untereinheit, A/ P/ E: Bindungsstellen für tRNA, b-body, bk-beak, h-head, lf-left foot, rf-right foot, cp-central protuberance, L1-L1-protuberance, sb-stalk base, pt-platform (noch unveröffentlichte Struktur)

Im Bereich zwischen den ribosomalen Untereinheiten befinden sich die A-, P- und E-Bindungsstellen (Rheinberger et al., 1981) für die tRNAs (siehe Abb. 2). Transfer-RNA (tRNA) tritt in verschiedenen Formen mit jeweils unterschiedlicher Sequenz, aber eine einheitlicher molekularer Masse, Sekundärstruktur und Tertiärstruktur auf (*Genes VIII*, Lewin 2004). Die reaktiven Zentren der tRNAs sind das Antikodon sowie das 3'-CCA-Ende. Durch Kodon-Antikodon-Wechselwirkungen kommt es in Abhängigkeit von der mRNA-Sequenz zur Anlagerung der korrekten Aminoacyl-tRNA an das Ribosom (Kurland et al., 1975). Das 3'-CCA-Ende ist der Träger der Aminosäure. Jede tRNA wird abhängig von ihrer Sequenz spezifisch mit der zugehörigen Aminosäure beladen. Die Beladung der tRNAs mit den jeweiligen Aminosäuren erfolgt in einer zweistufigen Reaktion durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen: Zuerst aktiviert die tRNA Synthetase mit Hilfe von ATP die Aminosäure in Form eines Aminoacyladenylat – Übergangszustandes. Einer der beiden Hydroxylsauerstoffe des 3'-terminalen A76 der tRNA attackiert dann den Carbonyl-Kohlenstoff des Adenylats, was in der Aminoacyl-tRNA und AMP resultiert (Loftfield, 1972).

Die Anticodon-Loops der tRNAs interagieren mit den Codons auf der mRNA sowie mit dem Dekodierungszentrum auf der kleinen ribosomalen Untereinheit. Das 3'-CCA-Ende bindet an das Peptidyl-Transferasezentrum auf der großen Untereinheit (Noller, 2006). Nahe der ribosomalen A-Stelle interagieren mit beiden Untereinheiten weitere, den Prozess der Translation beeinflussende Faktoren (*Genes VIII* / Lewin 2004).

Die Anzahl der Ribosomen in einer Zelle ist von der Proteinsyntheserate der Zelle abhängig und ist in schnell wachsenden Zellen besonders hoch. Eine eukaryontische Zelle besitzt je nach Wachstumsphase zwischen 100.000 – 200.000 Ribosomen (Warner, 1999) mit durchschnittlichen Abmessungen von ca. 22 x 32nm. Die Größe der Ribosomen wird durch ihr Sedimentationsverhalten charakterisiert, das in Svedberg-Einheiten [10^{-13} s] angegeben wird. Das eukaryontische Ribosom (molare Masse etwa 4,2 MDa) liegt bei 80S, seine große Untereinheit bei 60S (2,8 MDa) und seine kleine Untereinheit bei 40S (1,4 MDa). In der folgenden Zusammenstellung werden die entsprechenden Werte von pro- und eukaryontischen Ribosomen verglichen:

Tab. 1: Kenngrößen eukaryontischer Ribosomen (*S. cerevisiae*) (Morgan et al., 2000)

	pmol/A ₂₆₀	MG [kDa]	rRNA (Anzahl der Nukleotide)	Proteine
80S	18	3117,9	25S (3392nt), 18S (1798nt), 5.8S (158nt), 5S (121nt)	78
60S	25	1994,7	25S (3392nt), 5,8S (158nt), 5S (121nt)	45
40S	50	1123,2	18S (1798nt)	33

Tab. 2: Kenngrößen eukaryontischer Ribosomen (*Leporidae*) (Morgan et al., 2000)

	pmol/A ₂₆₀	MG [kDa]	rRNA (Anzahl der Nukleotide)	Proteine
80S	13	3544,1	28S (4712nt), 18S (1863nt), 5.8S (158nt), 5S (120nt)	66
60S	18	2424,3	28S (4712nt), 5,8S (158nt), 5S (120nt)	38
40S	50	1119,8	18S (1863nt)	28

Tab. 3: Kenngrößen prokaryontischer Ribosomen (*E. coli*) (Nierhaus et al., 2004)

	pmol/A ₂₆₀	MG [kDa]	rRNA (Anzahl der Nukleotide)	Proteine
70S	24	2500	23S (2904nt), 5S (120nt), 16S (1542nt)	55
50S	36	1700	23S (2904nt), 5S (120nt)	34
30S	72	800	16S (1542nt)	21

Es kann eine hohe Übereinstimmung in den Eigenschaften der Ribosomen der Spezies beobachtet werden, jedoch sind auch evolutionär bedingte Unterschiede wie z.B. in der Anzahl der Nukleotide in den entsprechenden rRNAs vorhanden (siehe Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3).

Vor einigen Jahren wurden die Strukturen der kleinen 30S-Untereinheit aus dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* (Schlünzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000) und die große 50S-Untereinheit aus dem halophilen Archea *Haloarcula marismortui* durch Röntgenstruktur-

analyse ermittelt (Ban et al., 2000; Schuwirth et al., 2005; Yusupov et al., 2001). Dies gelang bei eukaryontischen Ribosomen bisher nicht.

3.2 Die Translation

Der zentrale Prozess der Umsetzung der in der Nukleinsäuresequenz kodierten Erbinformation in eine Aminosäuresequenz (Translation) lässt sich in vier Abschnitte gliedern: Bei der Translationsinitiation binden Ribosomen an das Startcodon auf der mRNA und selektieren die kognaten tRNAs (I), katalysieren die Bildung der Peptidbindungen in der Elongationsphase (II), terminieren die Proteinbiosynthese am Stopcodon (III) und werden in der postterminalen Phase nach dem Abschluss des Vorgangs recycelt (IV) (Hofmann et al., 2006).

3.2.1 Die kanonische Initiation

Der Standardmechanismus der Translationsinitiation in Eukaryonten beinhaltet einen Erkennungsvorgang einer 5'-terminalen *m7GpppN*-Cap-Struktur an der mRNA. Diese Cap-Struktur wird in Eukaryonten posttranskriptional eingeführt (Sachs et al., 1997). Nach der Erkennung dieser Struktur bewegt sich die 40S-Untereinheit durch einen Scanning-Mechanismus entlang der mRNA zum ersten AUG-Startcodon.

Dazu besetzt der große, aus 8-10 Untereinheiten bestehende Faktor eIF3 die kleine ribosomale Untereinheit und verhindert ein frühzeitiges Anlagern der 60S-Untereinheit. Der Faktor eIF2 bindet die Initiator-tRNA (Met-tRNA_i) und GTP und bildet so einen ternären Komplex. Nach Bindung an die kleine ribosomalen 40S-Untereinheit bilden diese den 43S Prä-Initiationskomplex (Hershey et al., 1996).

An das 5'-Ende der mRNA lagert sich der Cap-Bindungskomplex eIF4F an. Er besteht aus dem Cap-Struktur bindenden-Protein eIF4E und dem als molekularen Gerüst dienenden Polypeptid eIF4G. An diesen Komplex lagern sich die Faktoren eIF4B und RNA-Helicase eIF4A an, die die mRNA-Sekundärstruktur aufwinden (Gingras et al., 1999). Das am 3' Poly(A)-Schwanz gebundene Poly(A)-bindende Protein (PABP) verstärkt die Bindung des 43S-Komplexes an das 5'-Ende der mRNA (Sachs and Varani, 2000). Die Bindung des Initiationskomplexes an die 5'-mRNA-Cap-Struktur ist ein wichtiger regulatorische Schritt bei der Kontrolle der Translation.

Der Komplex scannt unter ATP-Verbrauch in 5' nach 3'-Richtung von der initialen Bindungsstelle nach dem ersten Initiationscodon (Kozak, 1989). Der Vorgang wird durch die Faktoren eIF1 und eIF1A katalysiert, der Komplex wird in diesem Stadium als 48S-Komplex

bezeichnet (Pestova et al., 1998). Der Vorgang wird fortgesetzt, bis ein AUG-Initiationscodon erreicht wird.

Ausgelöst durch die Bindung der Initiator-tRNA an das AUG-Startcodon wird unter Kontrolle von eIF5 das GTP im ternären Komplex durch eIF2 hydrolysiert, was zur Abspaltung der Initiationsfaktoren und zur eIF5B-kontrollierten Anlagerung der 60S-Untereinheit führt (Hershey, 2000).

Die Anlagerung einer 60S-Untereinheit führt zu einem 80S-Initiationskomplex, in welchem die Initiator-tRNA in die ribosomale P-Stelle gebunden ist. Dieser Komplex ist nun in der Lage in die Elongationsphase einzutreten (Gingras et al., 1999; Hershey et al., 1996; Pestova and Hellen, 2000).

3.2.2 Elongation

Die Elongationsphase der Translation läuft in Zyklen ab (Spahn and Nierhaus, 1998). In jedem Elongationszyklus wird das entstehende Peptid um eine Aminosäure verlängert. Der erste Schritt des Elongationszyklus ist die Besetzung der ribosomalen A-Stelle durch einen ternären Komplex aus Aminoacyl-tRNA, eEF1A und GTP. Dies ist nur möglich, wenn die ribosomale P-Stelle bereits entweder durch die Initiator-tRNA bzw. durch eine andere Aminoacyl-tRNA besetzt ist. Die Bindung einer cognaten Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle bzw. die dabei stattfindende Kondon-Antikodonreaktion löst eine Konformationsänderung im Ribosom aus. Diese stabilisiert die tRNA-Bindung und stimuliert eEF1A zur GTP-Hydrolyse. Nun bewegt sich das 3'CCA-Ende der tRNA in die P-Stelle, der eEF1A•GDP-Komplex wird freigesetzt. Danach findet der Peptidyltransfer statt, bei dem das naszierende Polypeptid von der Aminosäure der P-Stellen-tRNA auf die Aminosäure der an die A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA übertragen wird. Die Bildung einer Peptidbindung resultiert in einem Ribosom in einem prä-translationalen Stadium mit Peptidyl-tRNA an der A-Stelle und deacylierter tRNA an der P-Stelle. Der Elongationsfaktor eEF2 katalysiert die Translokation der in A- und P-Stelle gebundenen tRNAs in die P-bzw. E-Stelle des Ribosoms. Gleichzeitig bewegt sich die mRNA um ein Basentriplett weiter, so dass das nächste Codon in der A-Stelle platziert wird. Der Translokationsschritt beinhaltet die Hydrolyse von GTP an EF-2. Diese chemische Energie wird vermutlich in mechanische Energie umgewandelt und für die Bewegung der tRNAs genutzt (Rodnina et al., 1997; Rodnina et al., 1999). Bei der Translokation erfährt auch das Ribosom einen Konformationswechsel von einem prä-translokationalen zu einem post-translokationalen Zustand. Als letzter Schritt muss das Ribosom wieder in den prä-translokationalen Zustand

gebracht werden. Dies geschieht durch die Bindung des nächsten eEF1A-aatRNA-GTP-Komplexes an die A-Stelle, gleichzeitig wird die E-Stellen-gebundene tRNA entlassen.

3.2.3 Termination

Der finale Schritt der Proteinsynthese wird durch ein mRNA-Stopcodon (UAG, UAA, UGA) in der A-Stelle signalisiert und durch die Releasefaktoren eRF1 und eRF3 (*eukaryotic release factor*) realisiert. Der Faktor eRF1 kann alle drei Terminations-Codons erkennen (Kisselev and Frolova, 1995). Er bewirkt, dass die fertige Peptidkette hydrolytisch von der Peptidyl-tRNA abgespalten und damit freigesetzt wird. Der Faktor eRF3 ist eine GTPase und hat eine regulatorisch-stimulierende Funktion. Der genaue Mechanismus der Termination der Proteinbiosynthese in Eukaryonten ist jedoch noch unbekannt (Kisselev et al., 2003).

3.2.4 Post-terminale Phase – Ribosomenrecycling

Das Ribosomenrecycling wird als vierte Phase der Proteinbiosynthese angesehen. Wie bei der Termination ist der genaue Mechanismus noch nicht abschließend geklärt. In dem gegenwärtigen Modell dieses Vorgangs geht man von einem Recycling der Ribosomen durch eine erneute Translationsinitiation nach der Freisetzung des Peptids aus (Pisarev et al., 2007). Dabei bleibt ein oder beide eRFs an dem Post-terminalen Komplex gebunden. Im Zusammenspiel der eukaryontischen Initiationsfaktoren eEF3, eEF1, eEF1A, und eEF3j kommt es zur Dissoziation dieser Post-terminalen Komplexe in eine freie 60S-Untereinheit, in mRNA und in eine mit tRNA besetzten 40S-Untereinheit. Dabei vermittelt der Faktor eIF1 die Dissoziation der an die ribosomale P-Stelle gebundenen deacyl-tRNA, der Faktor eIF3j die Freisetzung der mRNA. Der Faktor eIF3 initiiert das Recycling, jedoch ist die Reihenfolge, in welcher andere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sind, unbekannt.

3.2.5 Regulation der Translation

Die Kontrolle von komplexen biochemischen Stoffwechselwegen erfolgt aus Effizienzgründen vorwiegend in den einleitenden Schritten, um die Anhäufung von Zwischenprodukten zu vermeiden. Die umfassendste Kontrolle der Genexpression ist daher auf der Ebene der Transkription, bei der mRNA-Synthese zu finden.

Die Kontrolle der Genexpression auf der Translationsebene kann jedoch in besonderen Fällen verschiedene Vorteile aufweisen, welche die Nachteile der Downstream-Regulation längerer Reaktionsabläufe aufheben können. Ein Hauptgrund für die Kontrolle auf Translationsebene ist die Schnelligkeit, da Zeitverluste bei Upstream-Prozessen (Transkription, Splicing,

Transportabläufe u.a.) vermieden werden können. (Mathews et al., 2000). Es gibt weiterhin auch Beispiele für Gene, bei denen die Translationskontrolle zusätzlich zur Transkriptionskontrolle für die Feinabstimmung der Genexpression genutzt wird. Außerdem bietet die Kontrolle der Genexpression auf Translationsebene dank der Vielzahl der Mechanismen eine große Flexibilität.

3.3 Alternativer Weg der Translationsinitiation

Zusätzlich zu dem vorgestellten, konventionellen Weg der Translationsinitiation (siehe 3.2.1) gibt es einen alternativen Weg. Nicht die 5' Cap-Struktur wird durch den 43S-Prä-Initiationskomplex erkannt, sondern ein strukturelles Element der mRNA *upstream* der zu translatierenden Sequenz in der 5'-UTR (UTR = untranslatierte Region). Diese Elemente werden IRES (engl., "internal ribosomal entry sites") genannt.

Die ersten IRES-Elemente wurden in Picornaviren (Jang et al., 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988) entdeckt. Sie wurden in weiteren viralen und zellulären RNAs wie z.B. im Hepatitis C Virus (Wang et al., 1993), im "Immunoglobulin heavy chain-binding protein" (Macejak and Sarnow, 1991) sowie dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (Vagner et al., 1995) gefunden.

Abhängig von der Art der IRES benötigt die interne Initiation nur einen Teil der kanonischen Initiationsfaktoren. Spezielle *trans-acting*-Faktoren (*IRES-transacting factors*, ITAF) können mit Teilen der IRES interagieren und deren Wirksamkeit beeinflussen, was zu verschiedenen Wirkungen der IRES-kontrollierten Translationsinitiation in den verschiedenen Organismen oder Zelltypen führt (Hellen and Sarnow, 2001; Vagner et al., 2001). Die interne Initiation kommt in vielen viralen RNAs, aber auch in zellulären eukaryontischen mRNAs vor (siehe Tab. 4):

Tab. 4 Eine Auswahl an mRNAs, die durch ein IRES-Element reguliert werden

regulierte RNA	Vorkommen	Virusfamilie	Beispiele für Vertreter
virale RNAs	Positive-stranded ssRNA viruses	Picornaviridae	Human poliovirus 1, Hepatitis A -Virus, Encephalomyocarditis Virus (EMCV) Foot-and-mouth disease Virus
		Dicistroviridae	<i>Cricket paralysis Virus</i> , Plautia stali intestine virus (PSIV),
		Flaviviridae	Hepatitis C Virus (HCV), GB Virus B
	RNA-reverse Transkription-Viren	Retroviridae	SIV, HIV 1 (gag RNA) Rous sarcoma Virus
	dsDNA Viren	Herpesviridae	Karposi's sarcoma-associated herpesvirus

zelluläre RNAs	c-myc, N-myc, c-jun, La-Autoantigene
----------------	--------------------------------------

Es ist hierbei zu beachten, dass kein universelles IRES-System existiert. Nach dem heutigen Kenntnisstand kann man zwischen folgenden IRES-Familien unterscheiden: Picorna-Virus-artige-, Hepatitis C -Virus-artige- und Cricket paralysis Virus-artige. Die Unterschiede ergeben sich durch ihre Struktur sowie durch einen unterschiedlichen Bedarf an Initiationsfaktoren (siehe Tab. 5):

Tab. 5 Übersicht über die benötigten Initiationsfaktoren der verschiedenen Initiationsarten

Initiationsart notwendige Initiationsfaktoren	konventionell	Picorna- Virus-IRES	Hepatitis C- Virus-IRES	Cricket Paralysis Virus -IRES
eIF4E	+	-	-	-
eIF4G	+	+	-	-
eIF3	+	+	+	-
eIF2	+	+	+	-
Met-tRNA _{iMet}	+	+	+	-

Die IRES-Elemente viraler RNAs sind effiziente Werkzeuge zur feindlichen Übernahme der Translationsmaschinerie der Wirtszelle (Sarnow and Hellen, 2001; Vagner et al., 2001). Einige Viren deaktivieren den normalen Cap-abhängigen Syntheseweg durch proteolytische Spaltung von eIF4G (z.B. durch Picornaviren) oder durch Störung der Signalwege, die die Zusammenlagerung des Cap-bindenden Komplexes kontrollieren (z.B. Verhinderung der Phosphorylierung von eIF4E durch die Blockierung des diesen Vorgang kontrollierenden Faktors 4E-BP1). Die hypophosphorylierte Form von 4E-BP1 wiederum verhindert die Anlagerung des Cap-bindenden Komplexes. Die negative Beeinflussung des Cap-abhängigen Syntheseweges beeinträchtigt die IRES-vermittelte Initiation der Translation nicht, sie wird im Gegenteil durch die Freisetzung zellulärer Ressourcen sogar noch gesteigert.

Die im Jahr 2000 entdeckten zellulären IRES-Elemente sind möglicherweise an der Translationskontrolle der Genexpression beteiligt (Sachs, 2000). Sie scheinen vorzugsweise dann zu funktionieren, wenn der Cap-abhängige Syntheseweg beeinträchtigt ist, z.B. während der Mitose, als Antwort auf die Dephosphorylierung von 4E-BP1 oder während der Apoptose durch Spaltung von eIF4G. Zelluläre Gene, welche eine IRES enthalten, exprimieren oft regulatorische Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder Apoptose-Proteine (Sarnow

and Hellen, 2001; Vagner et al., 2001). Weiterhin ist die IRES-abhängige Translationsinitiation wichtig für die Zelldifferenzierung.

Da IRES-Elemente die Expression regulatorischer Proteine kontrollieren, hat eine abweichende IRES-vermittelte Translationsinitiation, z.B. durch Mutationen in der IRES, weitreichende Konsequenzen. In zwei Fällen konnte bisher eine IRES-Mutation in Verbindung mit einer menschlichen Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Im Fall der "Charcot-Marie-Tooth"-Erkrankung, einer neurodegenerativen Erkrankung, konnte eine Mutation im Connexin-32-Gen für eine beeinträchtigte IRES-Funktion verantwortlich gemacht werden (Hudder and Werner, 2000). Der umgekehrte Fall einer überregulierenden Mutation einer IRES des Proto-Oncogens *c-myc* trat bei Krebspatienten auf (Chappell et al., 2000). Aus diesem Grund sind IRES-Elemente potentielle Ansatzpunkte zur Bekämpfung von viralen Erkrankungen sowie von Erkrankungen, die von einer Fehlfunktion der zellulären IRES-Elemente ausgelöst werden.

3.3.1 CrPV-IRES

Der einfachste Mechanismus der Translationsinitiation ist der der intergenomischen IRESs aus dem *Cricket paralysis Virus* (CrPV) (dt.: Heuschrecken-Lähmungsvirus). CrPV-artige Viren sind eine Gruppe von RNA-Viren, die Insektenzellen infizieren. Diese Viren sind morphologisch identisch mit Picornaviren, jedoch zeigen neue Untersuchungen, dass sie im Gegensatz zu Picornaviren ein dicistronisches RNA-Genom mit zwei *open reading frames* (ORFs) aufweisen (siehe Abb. 3).

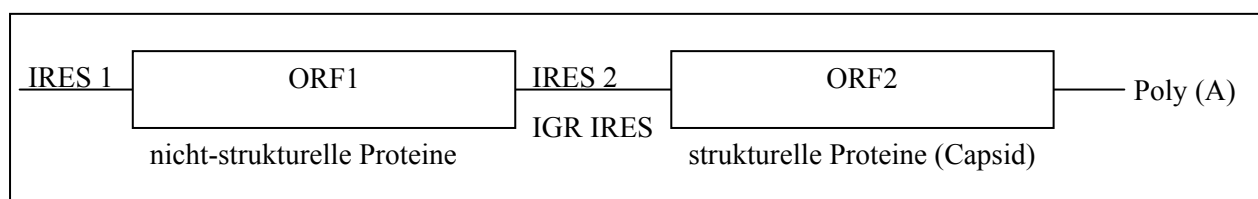


Abb. 3: schematische Darstellung des dicistronischen CrPV-Genoms

Das erste ORF kodiert für ein nicht-strukturelles Protein, der zweite ORF für das Capsid-Protein. Beide ORFs werden je durch ein IRES-Element kontrolliert (Wilson et al., 2000b). Die IRES des zweiten ORFs ist in der Lage, elongationsfähige ribosomale 80S-Komplexe ohne zusätzliche Initiationsfaktoren oder Initiator-tRNA zu bilden (siehe Tab. 5).

Die CrPV-IRES besteht aus 190 Basen (Costantino and Kieft, 2005), die eine Sekundärstruktur mit drei Pseudoknoten ausbilden (Kanamori and Nakashima, 2001) (siehe Abb. 4).

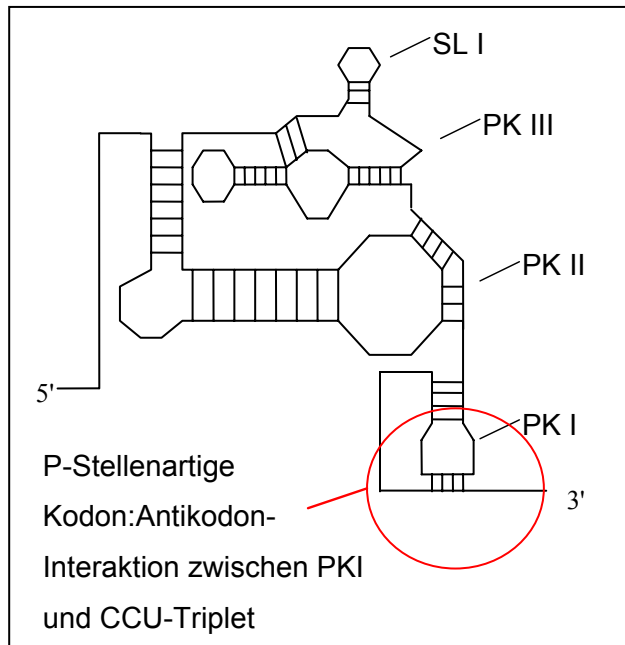


Abb. 4: Sekundärstruktur des CrPV-IRES

Durch interne Basenpaarung kommt es zur Bildung von Pseudoknoten in der Sekundärstruktur.

Schematische Darstellung der IRES-mRNA

PK: Pseudoknoten

SL: Superloop

Wie aus biochemischen Untersuchungen hervorgeht, bindet das IRES direkt an die 40S-Untereinheit und positioniert das erste Codon in die ribosomale A-Stelle (Wilson et al., 2000a). Dies ist sehr ungewöhnlich, da die herkömmliche Initiation von der P-Stelle ausgeht. Ein weiterer wichtiger Unterschied zur kanonischen Translationsinitiation besteht in der Nutzung eines alternativen Start-Codons. Die CrPV-IRES vermittelte Initiation beginnt bei einem GCU-Codon, welches nicht für die Initiator-tRNA-Met_i codiert (Codon AUG), sondern für die Aminosäure Alanin. Die CrPV-IRES ist daher in der Lage, die Initiation ohne Initiator-tRNA durchzuführen. In Abb. 5 ist der kanonische und der CrPV-IRES-basierte Initiationsmechanismus vergleichend gegenübergestellt:

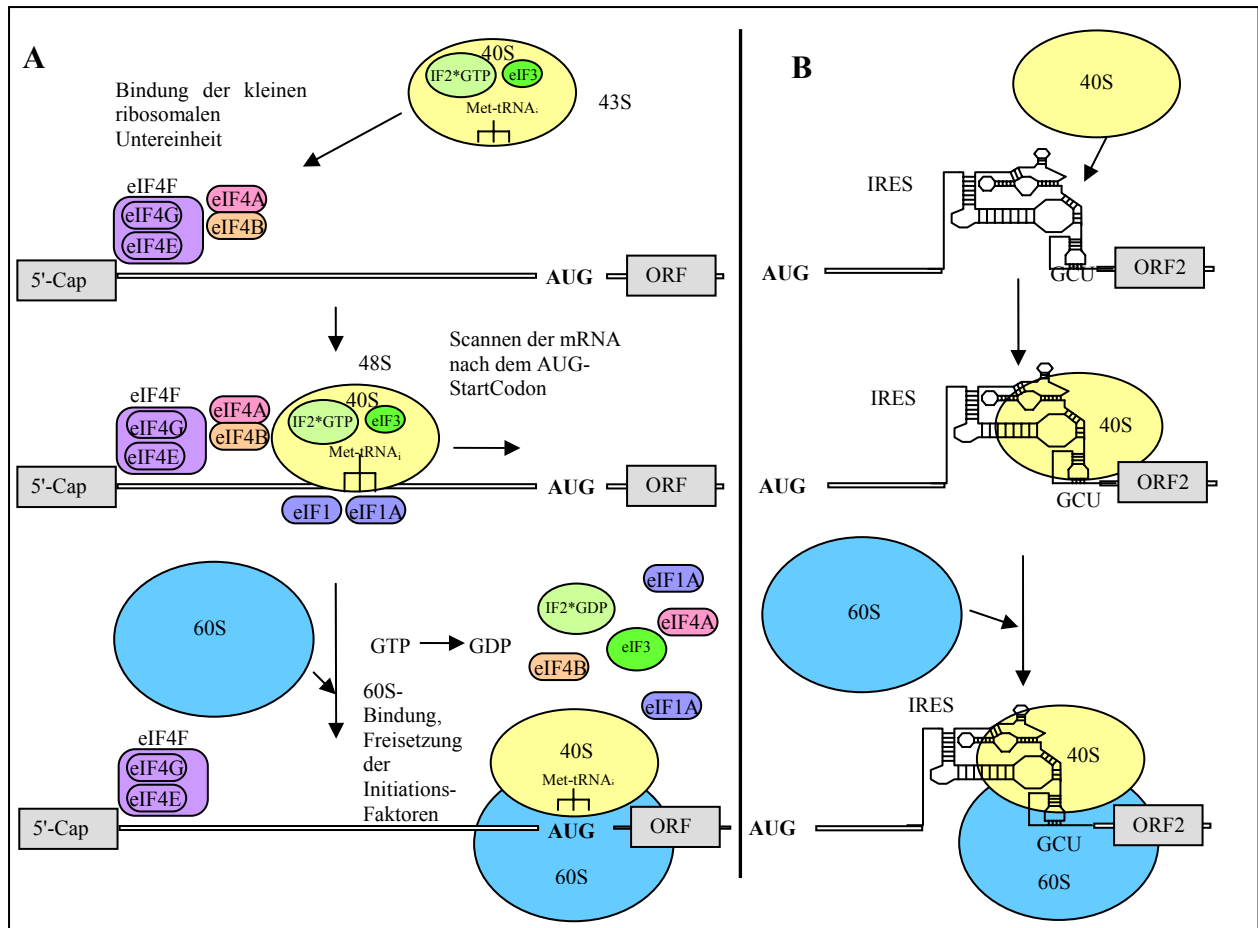


Abb. 5: Vergleich des konventionellen, Cap-abhängigem Initiationsmechanismus (A) mit Cap-unabhängigem, IRES-basiertem Initiationsmechanismus (B) (Erläuterungen siehe Text)

Über die molekulare Struktur und die Funktionsweise der CrPV-IRES ist bisher wenig bekannt. Aus den bisherigen biochemischen Studien geht hervor, dass die IRES nach der Besetzung der ribosomalen P-Stelle und der Positionierung des ersten Codons in die ribosomale A-Stelle eine Pseudotranslokationsreaktion ohne eine initiale Peptidierungsreaktion ermöglicht. Dieses Translokationsereignis benötigt die Faktoren eEF1A und eEF2. eEF1A positioniert die erste aminoacylierte tRNA in die A-Stelle, während eEF2 die Translokation der aminoacylierten tRNA von der A- in die P-Stelle katalysiert. (Jan and Sarnow, 2002; Pestova and Hellen, 2003). Dieser Funktionszustand mit einer aminoacylierten tRNA in der P-Stelle ähnelt dem Elongationskomplex direkt nach der kanonischen Initiation und kann in einem normalen Elongationszyklus fortgeführt werden.

Erste strukturelle Analysen des molekularen Mechanismus, mit dem die CrPV-IRES das Ribosom beeinflusst, wurde bereits 2004 mit Hilfe kryoelektronenmikroskopischer Verfahren untersucht (Spahn et al., 2004). Dabei wurde eine dreidimensionale Rekonstruktion der Elektronendichte einer CrPV-IRES an einem humanen 80S-Ribosom erstellt. Die CrPV-IRES

konnte dabei im intra-ribosomalen Bereich zwischen den Untereinheiten lokalisiert werden (siehe Abb. 6).

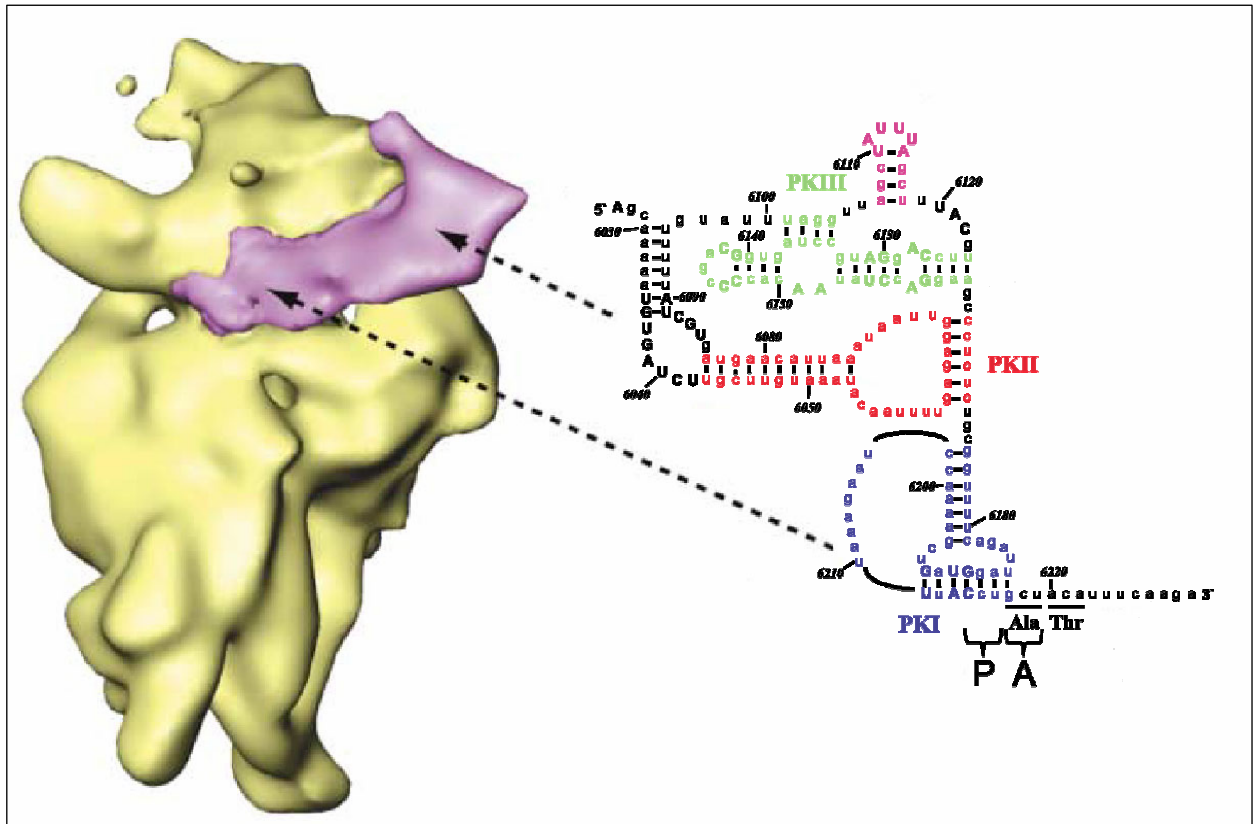


Abb. 6: humane 40S-Untereinheit (gelb) im Komplex mit 40S-CrPV-IRES (violett) sowie die IRES-Sekundärstruktur, (Spahn et al., 2004)

In diesen Versuchen wurden ebenfalls spezifische Kontaktstellen mit der 40S- und 60S-Untereinheit sowie eine aktive Beeinflussung des Ribosoms in Form von Konformationsänderungen beobachtet (siehe Abb. 7):

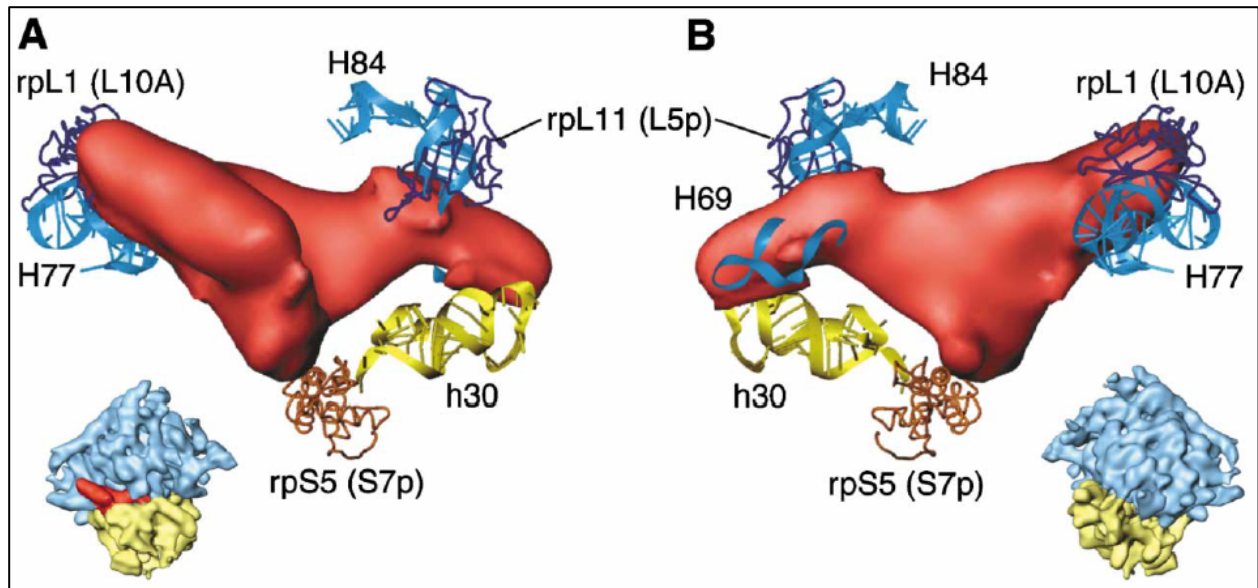


Abb. 7: Interaktion der CrPV IRES mit ribosomalen Komponenten

Kryo-EM-Dichte der CrPV IRES im 80S•CrPV IRES-Komplex in rot, zusätzlich atomare Modelle ribosomaler Komponenten in Position der beobachteten Kontaktstellen.

Ansicht: von der Spitze des 80S-Ribosoms (A) und vertikal um 180° gedreht (B)), zusätzlich verkleinerte Ribosomendarstellungen als Orientierungshilfe (verkürzt aus: (Spahn et al., 2004))

Konformationsänderungen fanden sich auch in der Struktur der IRES selbst. Durch Vergleich mit ähnlichen Beobachtungen bei Proteintranslationsfaktoren wurde auf eine RNA-basierende Translationsfaktor-Funktion der CrPV-artigen IRES-Elemente geschlossen.

Die Struktur der IRES selbst sowie der molekulare Wirkungsmechanismus konnte durch die erzielte Auflösung von 20Å nicht ermittelt werden. Dazu ist eine höhere Auflösung notwendig.

3.4 Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelrekonstruktion

In lebenden Zellen finden viele zentrale Prozesse wie z.B. DNA-Replikation, Transkription, Proteinbiosynthese oder Proteinabbau an großen, makromolekularen Komplexen statt. Diese sind jedoch für die klassischen Methoden zur Strukturuntersuchung wie Kernresonanzspektroskopie (Größe) oder Röntgenkristallographie (Flexibilität) nur eingeschränkt oder gar nicht geeignet. Die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) in Kombination mit Einzelpartikelrekonstruktion erwies sich in den letzten Jahren jedoch als sehr erfolgreiche Methode bei der Ermittlung von Strukturen dieser so genannten molekularen Maschinen.

Eine Voraussetzung für eine aussagekräftige Kryo-EM Struktur ist das Vorliegen einer homogenen Probe sowie die überwiegende Gleichartigkeit der Konformationen der einzelnen

Komplexe. Dies kann durch experimentelle Verfahren wie eine hohe Reinheit der Probe, die Nutzung bestimmter Antibiotika oder nicht-spaltbarer Substrate erreicht werden.

In der Kryo-EM wird Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) genutzt, um bei sehr niedrigen Temperaturen (80°K) Bilder makromolekularer Partikel in amorphem Eis aufzunehmen (Dubochet et al., 1988). Dazu wird die Probe auf einen mit einem Kohlefilm bedeckten, löchrigen Probenträger (EM-Grid) aufgebracht. Mit Hilfe eines semi-automatisierten Prozesses wird durch Blotten mit Filterpapier und Schockgefrierung in flüssigem Ethan die Probe in amorphem, (nicht-kristallinem) Eis definierter Schichtdicke (50-100nm) fixiert. Der native, hydratisierte Zustand der Strukturen bleibt dabei erhalten, die Untersuchung ist im chemisch unfixierten, ungefärbten Zustand möglich. Nach Überführung des gefrorenen Grids in das tiefgekühlte Transmissions-Elektronenmikroskop werden analoge Bilddaten zur Verringerung von Strahlungsschäden bei Niedrigdosis-Bedingungen ($20e^-/s \cdot \text{Å}^2$) gesammelt. Die Bilder entsprechen den wahren Projektionen der Elektronendichten des Objektes (siehe Abb. 8):

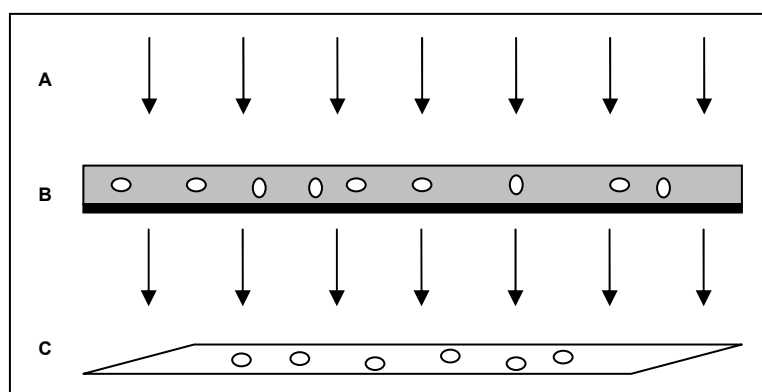


Abb. 8: Bildgewinnung in der Kryo-EM

Der Elektronenstrahl (A) trifft auf die in einer dünnen Schicht amorphem Eis eingebetteten makromolekularen Partikel. (B)

Abhängig von der zufälligen Orientierung der Partikel können verschiedene Projektionen gewonnen werden. (C)

Da biologische Objekte meist aus Atomen niedriger Ordnungszahl bestehen (C, O, N, H), ist die Ablenkung der Elektronen und somit der Kontrast sehr gering. Zur Kontraststeigerung erfolgen die Aufnahmen daher im Unterfokusbereich. Die dabei verursachten Bildverzerrungen werden später bei der 3D-Datenrekonstruktion im reziproken Raum mit Hilfe der Kontrasttransferfunktion (CTF, *contrast transfer function*) korrigiert. Da das Signal-Rausch-Verhältnis sehr ungünstig ist, muss zur Verbesserung die Bildinformation vieler Daten akkumuliert werden. Um eine Auflösung von unter 10 Å zu erreichen, müssen in der Regel mehrere einhundert Mikrographen mit insgesamt mehreren einhunderttausend Einzelpartikelbildern gesammelt werden. Die mit dem Mikroskop erstellten Mikrographen werden hochauflösend digitalisiert (ca. 5334 dpi, entspricht $1,26 \text{ Å/Pixel}$ auf der Objektskala) und der Datenprozessierung zugeführt.

Mit der sog. Einzelpartikelrekonstruktion kann eine 3D-Abbildung des makromolekularen Komplexes gewonnen werden, der die durchschnittliche Struktur der individuellen Komplexe

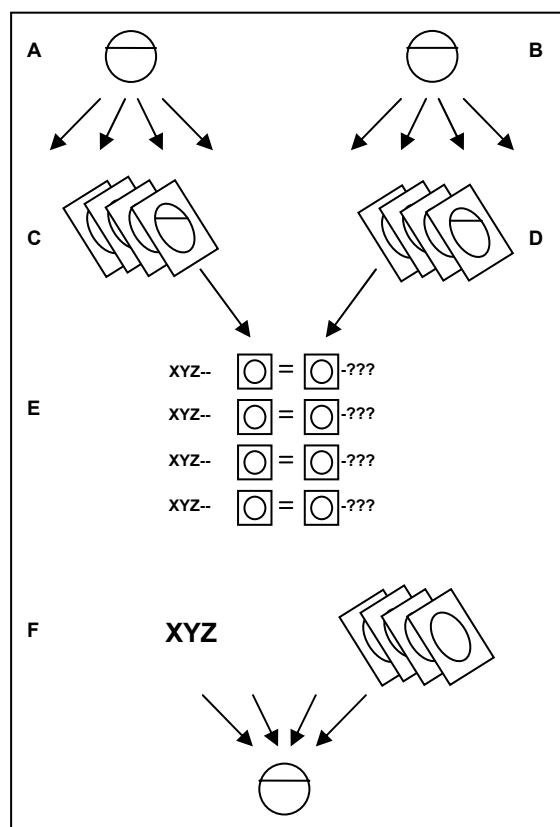
repräsentiert. Die selektierten Bilder der Einzelpartikel entsprechen zweidimensionalen (2D-) Projektionen, welche jedoch die aufsummierte 3D-Strukturinformationen des Partikels enthalten. Gemäß dem Projektionstheorem ist die zweidimensionale Fouriertransformation einer Projektion gleich einer zentralen Ebene der 3D Fouriertransformation des Objektes (Frank et al., 1996). Das bedeutet, dass -ausgehend von einer zufälligen Verteilung der Partikel auf dem Grid- aus den zweidimensionalen Projektionen der Probe von allen Ansichten des Objektes ein 3D- Objekt berechnet werden kann.

Einer der wichtigsten Schritte bei der 3D-Rekonstruktion ist die Bestimmung der relativen Orientierung der Partikel, die Alignierung genannt wird. Dabei werden die Projektionswinkel (Euler'sche Winkel) und die Orientierung der Projektion in der Ebene bestimmt. (siehe Abb. 9)

Bei der Rückprojektion wird aus den alignierten Partikeln eine 3D-Struktur (Volumen) erzeugt. Diese Struktur kann dann wieder als Referenz für eine weitere Runde des Alignierung verwendet werden. Die iterative Wiederholung von Alignierung und Rückprojektionen wird so lange durchgeführt, bis sich die Auflösung der Struktur nicht mehr verbessert. Um die Auflösung zu bestimmen, wird der Datensatz halbiert und die Korrelation zwischen den beiden Halbvolumina im reziproken Raum in Abhängigkeit von der Ortsfrequenz bestimmt (FSC, *Fourier Shell Correlation*). Die Auflösungsberechnung notwendige Ortsfrequenz wird dabei bei einem FSC-

Wert von 0,5 bzw. einem Signal-Rausch-Verhältnis von 1:1 abgelesen.

Abb. 9: vereinfachtes Prinzip der 3D-Rückprojektion bei bekannter Referenzstruktur



3D-Projektionen (C) einer bekannten Referenzstruktur (A) werden mit Hilfe von Crosskorrelationswerten experimentellen 2D-Mikroskop-Daten (D) einer unbekannt Probe (B) zugeordnet .

Jedes Partikel wird dann mit der Projektionsrichtung der ähnlichsten Referenzprojektion in Verbindung gebracht

Da die Eulerschen Winkel der Referenzprojektionen bekannt sind, können sie den experimentellen Bildern mit der höchsten Korrelation zugeordnet werden (E). Zwei Eulersche Winkel werden durch die Ausrichtung der ähnlichsten Referenzprojektionen bestimmt. Der dritte, in der Ebene rotierende Winkel und die zwei Translationsparameter der Ebene werden aus der Position des Maximums der Cross-Korrelationsfunktion berechnet. Die so erhaltenen Orientierungsparameter können für die Berechnung der 3D-Struktur verwendet werden (F). (Penczek et al., 1994).

Am Ende des Prozesses erfolgt die Interpretation der nach dem Refinement erhaltenen Elektronendichte. Makromolekulare Komplexe können in verschiedenen Funktionsstadien untersucht werden. Sowohl der gebundene Ligand als auch mögliche Konformationsänderungen, wie sie in vielen makromolekularen Maschinen vorkommen, können direkt beobachtet werden. Die so erhaltene 3D-Abbildung kann mit den Strukturabbildungen aus der Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie ergänzt werden. Bei diesen in letzter Zeit immer häufiger verwendeten Hybridmethoden werden atomare Modelle in die Kryo-EM - Abbildungen angepasst (Rossmann, 2000). Die Genauigkeit dieses Dockens ist vielfach besser als die Auflösung in der Kryo-EM -Abbildung und erlaubt überprüfbare Aussagen über die molekularen Interaktionen zwischen den Komponenten der einzelnen Komplexe.

Kryo-EM-Strukturen weisen *noch* nicht die gleiche hohe atomare Auflösung auf wie sie in der Röntgenkristallographie erreicht wird. Typische Auflösungen bei asymmetrischen Partikeln liegen heute im Bereich zwischen 7 bis 15 Å. In jüngster Zeit konnten jedoch bei kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen des (symmetrischen) GroEL-Proteins (GroEL: eine Klasse der 60-kDa Hitzeschockproteine, auch Chaperonine genannt) Auflösungen von 3,8 – 4,5 Å erreicht werden (Zhou, 2008). Weiterhin konnte in jüngster Zeit die Struktur des Rotavirus DLP mit einer Auflösung von 3,8 Å bestimmt werden (Zhang et al., 2008). Theoretisch ist eine atomare Auflösung mit dieser Technik möglich, ein Fortschritt in dieser Richtung kann erwartet werden.

4 Aufgabenstellung: Struktur und Eigenschaften der CrPV-IRES

Der zentrale Prozess der Realisierung der Erbinformation in Form von Proteinen wird Translation genannt. Neben dem konventionellen Weg der Translationsinitiation gibt es einen alternativen Weg. Nicht die 5' Cap-Struktur wird erkannt, sondern ein strukturelles Element der mRNA. Diese Elemente werden IRES (engl., "*internal ribosomal entry sites*") genannt. Je nach Art der IRES ermöglichen sie eine interne Translationsinitiation unter teilweiser oder vollständiger Umgehung des konventionellen Mechanismus.

Die IRES-RNA hat dabei eine Funktion wie ein RNA-basierender Translationsfaktor. Über den molekularen Aufbau der IRES-Elemente, die diese Funktion ermöglichen, ist bisher wenig bekannt. IRES zeigen eine große Bandbreite verschiedener Strukturen, bei denen bestimmte statische und flexible Elemente für die verschiedenen Funktionen verantwortlich sind.

Eine IRES, die diese Elemente in sich vereinigt, ist das des *cricket paralysis virus* (CrPV). Sie besitzt die ungewöhnliche Eigenschaft, die Initiation ohne weitere Initiationsfaktoren oder Initiator-tRNA durchzuführen zu können. Die Kenntnis ihrer Struktur trägt daher wesentlich zum Verständnis der auf RNA-basierten, IRES-kontrollierten Translationsinitiation bei. Da IRES-Strukturen auch in der RNA medizinisch relevanter Viren wie dem Hepatitis-C-Virus zu finden sind, sind Kenntnisse über diese Art der Initiation auch von großem medizinischen Interesse.

In bisherigen Untersuchungen gelang aufgrund zu geringer Auflösungen von Kryo-EM-Abbildungen keine detaillierte Analyse der CrPV-IRES-Struktur. Auch durch andere Strukturbestimmungsmethoden wie z.B. der Röntgenkristallographie gelang bisher keine Erstellung eines molekularen Strukturmodells.

Um dieses Ziel zu erreichen, sind umfangreiche Optimierungen im Bereich der Probenpräparation sowie der bisherigen Datenverarbeitungstechniken erforderlich. Durch Kombination dieser Ansatzpunkte soll eine hochaufgelöste Kryo-EM-Struktur erstellt werden, die es erlaubt, Informationen über die genaue molekulare Struktur der IRES zu gewinnen. Diese Informationen würden erstmals Rückschlüsse auf die Vorgänge während der IRES-basierten Translationsinitiation erlauben. Darüber hinaus soll das bestehende Modell der CrPV-IRES-kontrollierten Translationsinitiation mit Hilfe verschiedener *in vitro*-Versuche überprüft werden.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Allegra 25R	Beckman
Amicon-Filter	Millipore
Autoklav Varioklav	H + P
Brutschränke, Ofen	Memmert
Electron image film	KAAK
Elektrophoresekammer SE 260	Amersham
Feinwaagen	Satorius, Adventurer
Feldspat Glimmerplättchen	
Fraktionator Redifrac	Amersham
Gasprofi 1 micro	WLD TEC
Cool Pix 45000 Digitalkamera	Nikon
Geltrocknungsrahmen	Roth
Glasfilter GF/C	Whatman
Glass Fibre Filters	Schleicher & Schüll
Gradientmaster 107	BioComp
Grids Quantifoil R 2/4	Quantifoil Micro Tools GmbH
Heizblock UBD	Grant
HPLC-analytisch	Knauer
HPLC-präparativ	Pharmacia LKB
Inkubationsschüttler Centonal LS	B.Braun Biotech International
Inkubationsschüttler Thermomixer Comfort	Eppendorf
InVitrobot	FEI Company
Kryo-Station	FEI Company
Kryoelektronenmikroskop <i>Tecna Polara F30 Helium</i>	FEI Company
Laborbedarf, div. Verbrauchsmaterialien	Roth, Cotech
Laborbehälter	Roth
Laborflaschen	Schott
Liquid Scintillation Counter LKB 1209 Rackbeta	Wallac
Magnetrührer KMO2, MR 3001	Heidolph, Kiker Labortechnik
Membranfilter ME 24	Schleicher & Schuell
Mikrowelle Microwave 800	Severin
Mini VE Vertical Electrophoresis System	Amersham
NAP-5 Säulen	Pharmacia
Netzgeräte EPS 301 / EP 3501	Amersham Pharmacia
Nitrozellulosefilter	Sartorius
Optima Max,	Beckman
PC, PC-Cluster,	SUN Microsystems
PCR Mastercycler Personal	Eppendorf
pH-Meter 510	Cyberscan

Gerät	Hersteller
Photometer DU 800	Beckman Coulter
Photometer DU-600	Beckman
Pipetten	Eppendorf
Piston Gradient Fractionator	BioComp
Primescan D-8200 Drum Scanner	Heidelberg
Primestation + Drumscanner	Heidelberg
Reinstwasseranlage	Milli-Q Millipore
Rotoren SW28, SW40 Ti, 50.2 Ti, TA-10-250, MLS- 50, MLA-80, TLA-100, HB-4	Beckman-Coulter
RP-HPLC-Säule, Säulenmaterial: Nucleosil 300-5 / C8 + C18	Knauer
Schüttler Vortex-Genie	Bender & Hobein
Spektra Max Gemini EM	Molecular Devices
Szintillationsvials Minis 2000	Zinsser Analytik
Szintillationszähler Wallac 1409	Perkin Elmer
Tischzentrifuge, 5415 D	Eppendorf
Tischzentrifugen 5415 D, 5415 R	Eppendorf
Typhoon Imager	Amersham
Ultrazentrifugenbecher	Beckman
UV Cord S II	Amersham
UV Handlampe 254 / 366nm	Benda
UV-Transilluminator	Ultra Violett Products
Vacuum Bedampfer	Denton
Wasserbäder DC 10	Thermo Haake
Whatman-Folie Cellophane Support	Biorad

Software	Hersteller
Chimera, UCSF	University of California
ctffind.com	Mindel, Gregorief, Brandeis
em2em	Image Science Software
Linux CentOS 4.3	CentOS.org
IRIS Explorer	Numerical Algorithms
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Signature	Rosenstiel Center, Brandeis
Spider 9.03 + Web	Wadsworth Center, Albany
Vektor NTI	Invitrogen

5.2 Chemikalien

Chemikalie / Reagenz / Kit	Hersteller	Chemikalie / Reagenz / Kit	Hersteller
5-Sulfosalicylsäuredihydrat	Roth	Ethanol, vergällt	Roth
Acethylphosphat	Roche	Ether	Roth
Aceton	Roth	Ethidiumbromid	Invitrogen
Acetonitril	Roth	Ethylenglykol	Roth
Acrylamid/Bis 19:1 (30%)	BioRad	Fluorescein / FTS	Invitrogen
Acrylamid/Bis 29:1 (40%)	BioRad	Formaldehyd	Roth
Acrylamid/Bis 37,5:1 (25%)	BioRad	Formamid	Roth
Adenosinmonophosphat (AMP)	Ambion	Fotoentwickler	KODAK
Agar	Bacto	Fotofixierer	KODAK
Agarose	Invitrogen, Serva	Galactose	Sigma-Aldrich
Aminoacyl-tRNA-Synthetase	Sigma-Aldrich	Glasbeads	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Merck	Glycerin	Merck
Ammoniumchlorid	Roth	Glycin	Merck
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck	GTP-NaSalt	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich	GuanidinHydrochlorid	Sigma-Aldrich
Ampholyt-Lösung (pI 3-10, 40% w/v)	BioRad	Hefeextrakt	Bacto
Ampicillin, Na-Salz	Roth	Heparin, Na-Salz	Sigma-Aldrich
Antikörper P2- α IBE3	Prof. J.P.G. Ballesta,	HEPES, (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure) freie Säure	Calbiochem
ATP-TrisSalt	Sigma-Aldrich	HighPure PCR Product Purification Kit	Roche
Aurum Plasmid Maxi Kit	Biorad	Imidazol	Sigma-Aldrich
Benzyl DEAE Cellulose	Sigma-Aldrich	Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Invitex
Borsäure	Merck	Isopropanol	Merck
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Kaliumacetat	Merck
BSA	Sigma-Aldrich	Kaliumchlorid	Fluka
Bulk-tRNA(Yeast)	Roche	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Chloramphenicol	Calbiochem	Kaliumhydroxyd	Merck
Chlorwasserstoffsäure 37%	Roth, Merck	Kanamycinmonosulfat	Sigma-Aldrich
CoomassieBrilliantBlue	Sigma-Aldrich	Lithiumacetat x 2 H ₂ O	Sigma-Aldrich
Cytidine-5'-triphosphat (CTP)	Ambion	Lithiumchlorid	Ambion
D(+)-Glukose	Fluka	Magnesiumacetat-tetrahydrat	Merck
DDT (1, 4-Dithio-DL-threitol)	Fluka	Magnesiumchlorid	Merck
DEAE Sepharose Fast Flow	GE Healthcare	Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Roth
Diethylaminoethylcellulose DE-52	Whatman BioSystems	Megaclear-Kit	Ambion
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Membrane Blocking Agent	GE Healthcare UK
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	Mercaptoethanol, β -	Merck
DNA: Quick load, Marker X	DU Labs, Roche	Methanol	Roth
Dnase I (RNase frei)	Roche	Methionin, L-	Sigma-Aldrich
ECL Plus Detektionssystem	Amersham	MicroSpin Columns	Amersham, Biorad
EDTA	Merck	NADH x 2 Na	Roche
Essigsäure	Merck	NAP-25 Säule	Pharmacia Biotech
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich	Natriumacetat	Merck
Ethanol	Merck		

Material und Methoden

Chemikalie / Reagenz / Kit	Hersteller	Chemikalie / Reagenz / Kit	Hersteller
Natriumchlorid	Merck	Saccharose (ultrapure)	Sigma-Aldrich
Natrium-dihydrogenphosphat x 1 H ₂ O	Merck	Saline, phosphatgepuffert	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva	Schwefelsäure, 95%	Roth
Natriumhydroxyd	Merck	Silberfärbungskit "Rothi Black P"	Roth
Natriumperjodat	Sigma-Aldrich	Spermidintetrahydrochlorid	Fluka
Natriumpyrophosphat (PPi)	MPI MOLGEN Berlin, AG Nierhaus	Spermidintrihydrochlorid	Fluka
		S-Sulfosalicylsäure	Roth
Natriumpyrophosphat-Tetrabasic-Decahydrat	MPI MOLGEN Berlin, AG Nierhaus	Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich
		Szintillationscocktail	Roth
Natriumsulfit	Fluka	T7 Megashortscript / Transkription	Ambion
Nickel(II)Sulfat*6H ₂ O	Aldrich	TBE Urea sample buffer	BioRad
Nodinet P40	Roche	TBE-Puffer, 10x	Invitrogen
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich	TEMED (N,N,N',N'-	Invitrogen
PCR Core Kit	Roche	Tetramethylethyldiamin)	
PefaBlock AEBSF	Roche	Tetracyclin	Invitrogen
Pepton	Bacto	Titriplex III (EDTA)	Merck
PET Directional TOPO Expression Kit	Invitrogen	ToluidineBlue	Sigma-Aldrich
Phenol	Roth	Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Phenol/Chloroform	Roth	Trichlormethan	Roth
Phenylalanin (L-[4-3H]Phenylalanin)	Amersham	Tris(hydroxymethylaminomethan)	Merck
Phenylalanin, (L-)	Merck	Tris(hydroxymethylaminomethan)hydroc	Merck
Phenylalanin, (L-) mit 14C	Amersham	hlorid	
Phosphoenolpyruvat	MPI MOLGEN Berlin, AG Nierhaus	TritonX-100	Sigma-Aldrich
		Trizol	Invitrogen
Phosphorsäure, O-	Roth	Trizol LS	Invitrogen
Plasmid Präp (Mini-, Midi-und Maxi-)	BioRad	tRNAPhe	Sigma-Aldrich
Poly(U)-mRNA	Amersham	Trypton	Bacto
Polyethylenglykol	Fluka	Tween-20	Sigma-Aldrich
Ponceau	Sigma-Aldrich	Urea (ultrapure)	Invitrogen
Proteaseblocker, complete	Roche	Vektor pUC 18 NdeI	Roche
Protein Assay	Biorad	Vektorplasmid pUC18 NdeI	NewEngland Biolabs
Protein-100 bp-Leiter	Gibco, Roche	Wasser	Gibco Ultrapure (UP)
Pyruvatkinase	Roche	Wasserstoffperoxyd	Roth
Qiaquick Gel Extraction Kit	Quiagen	Xylencyanol	Sigma-Aldrich
Qiaquick PCR-Purification Kit	Quiagen		
Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease Treated	Promega		
Restriktionsenzyme Hind III, Bam HI, Xba I	Roche		
Ribonuklease-Inhibitor aus humaner Plazenta	Promega		
RNA: Century, Millenium	Ambion		

5.3 Puffer, Lösungen, mikrobiologische Medien

5.3.1 Puffer für Elektrophorese

Agarosegele			
	10x TBE-Puffer	Tris	108g
		Borsäure	55g
		EDTA	9,6g
		Wasser (UP)	ad 1000 ml
	Agarosegellösung (n%)	10x Puffer	10 ml
		Agarose	n * g
		Ethidiumbromid (1%)	5 µl
		Wasser (UP)	ad 100 ml
	6x Probenpuffer	10x Puffer	6 ml
		Bromphenolblau	0,25 (w/v)
		Xylencyanol	0,25 (w/v)
		Wasser (UP)	4 ml
	Elektrophoresepuffer	1x TBE-Puffer	
Protein-SDS- Polyacrylamidgele	Sammelgel	40%Acrylamid/Bis	
		Sammelgelpuffer	
		APS	
		TEMED	
	Trenngel	40%Acrylamid/Bis	
		Trenngelpuffer	
		APS	
		TEMED	
	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCL pH 6,8)	Tris	60g
		Wasser (UP)	800 ml
		HCL (30%)	ad pH 6,8
		Wasser (UP)	ad 1000 ml
	Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCL pH 8,8)	Tris	180g
		Wasser (UP)	800 ml
		HCL (30%)	ad pH 8,8
		Wasser (UP)	ad 1000 ml
	6x Probenpuffer	SDS	0,2g
		0,5M Tris-HCL pH 6,8	1,8 ml
		Glycerin	1 ml
		β-Mercaptoethanol	20 µl
		0,2% (w/v) Bromphenolblau	50 µl
		Wasser (UP)	ad 10 ml
	Elektrophoresepuffer	Tris	30g
		Glycin	144g
		SDS	5g
		Wasser (UP)	ad 1000 ml
	Färbelösung CoomassieBlue	Coomassie-Blue	5g
		Essigsäure	10 ml
		Methanol	35 ml
		Wasser(UP)	ad 1000 ml

Material und Methoden

	Entfärbelösung	Essigsäure	10 ml
		Methanol	35 ml
		Wasser	ad 1000 ml
RNA-Urea-	Polyacrylamidgel	40% Acrylamid/Bis. (19:1)	3,5
Polyacrylamidgele		Harnstoff	6,3
		10X TBE-Puffer	1,5 ml
		APS	120 µl
		TEMED	12 µl
		Wasser (UP)	ad 15 ml
	6x Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25 (w/v)
		Xylencyanol	0,25 (w/v)
		Harnstoff (7M)	4,2g
		10x TBE-Puffer	6 ml
		Wasser (UP)	ad 10 ml
	Elektrophoresepuffer	1x TBE	
	Färbelösung	Toluidinblau	
		Essigsäure	10 ml
		Methanol	35 ml
		Wasser(UP)	ad 1000 ml
	Entfärbelösung	Essigsäure	10 ml
		Methanol	35 ml
		Wasser	ad 1000 ml
Isoelektrische	Polyacrylamidgel	30% Polyacrylamid (29:1)	5%
Fokussierung	mit pH-Gradient	Harnstoff	6M
		Ampholyt (pI 2,5-5, 40% w/v)	2%
		Wasser (UP)	ad 10 ml
		TEMED	10 µl
		APS	100 µl
	Laufpuffer Kathode	NaOH	30 mM
	Laufpuffer Anode	H ₂ SO ₄	180 mM
	Probenpuffer	Harnstoff	8M
		Ampholyt (pI 2,5-5, 40% w/v)	6%
		Bromphenolblau	Spatelspitze
		Wasser (UP)	ad 5 ml
Geltrocknung		Glycerin	50 ml
		Ethanol	100 ml
		Wasser (UP)	350 ml

5.3.2 Mikrobiologische Medien

Transformation	SOC (Invitrogen): (=SOB(super optimal broth) + Glukose)	Trypton (mittels Hydrolyse durch das Enzym Trypsin "verdaute" Proteine)	2%
		Hefeextrakt	0,5%
		NaCl	10 mM
		KCl	2,5 mM
		MgCl ₂	10 mM
		MgSO ₄	10 mM
		Wasser (UP)	
		Glucose (extra autoklaviert)	20 mM
E.coli-Anzucht	LB (Luria-Bertani) (l)	Pepton	10g
		Hefeextrakt	5g
		NaCl	10g
		Wasser (UP)	ad 1000 ml
	LB (Luria-Bertani) (s)	Pepton	10g
		Hefeextrakt	5g
		NaCl	10g
		Agar (1,5-2% (w/v))	15-20g
		Wasser (UP)	ad 1000 ml
Hefe-Medium	YPD (l)	Hefeextrakt	10g
		Pepton	20g
		Glucose	20g
		Wasser (UP)	ad 1000 ml
	YPD (s)	Hefeextrakt	10g
		Pepton	20g
		Glucose	20g
		Agar (1,5-2% (w/v))	15-20g
		Wasser (UP)	ad 1000 ml

Nach dem vollständigen Lösen der Komponenten erfolgte das Einstellen des pH 7,5 mit NaOH, danach die Sterilisation durch Autoklavieren.

5.3.3 Puffer für Immunoassay

Westernblot	Towbin-Transferpuffer	Tris	25 mM
	pH 8,2 / 4°C	Glycin	192 mM
		SDS	mM
		Wasser (UP)	ad 800 ml
		MeOH	200 ml
	PBS-Tween 20	PBS	1 Tablette
		Tween 20	100 µl
		Wasser (UP)	200 ml
	Blockierlösung	PBS-Tween	100 ml
		ECL Membrane Blocking Agent	5g / 5%w/v

5.3.4 Puffer für In Vitro-Systeme

Assay zur	TICO	Hepes-KOH, pH 7,5	20 mM
Untersuchung		Magnesiumacetat	6 mM
funktioneller		Ammoniumacetat	30 mM
Zustände des		β -Mercaptoethanol	4 mM
Ribosoms			
	HMK	Hepes-KOH, pH 7,5	20 mM
		Magnesiumacetat	5 mM
		Kaliumchlorid	150 mM
		β -Mercaptoethanol	4 mM
		Glycerin	20%
	Mix I (E.coli)	Hepes-KOH, pH 7,5	60 mM
		Magnesiumacetat	10,5 mM
		Ammoniumacetat	690 mM
		β -Mercaptoethanol	12 mM
		Spermin	0,25 mM
		Spermidin	10 mM
	Mix I (Hefe + RRL)	Hepes-KOH, pH 7,5	20 mM
		Magnesiumacetat	6 mM
		Ammoniumacetat	150 mM
		β -Mercaptoethanol	4 mM
		Spermin	0,25 mM
		Spermidin	10 mM
	Mix II (E.coli)	Hepes-KOH, pH 7,5	100 mM
		Magnesiumacetat	22,5 mM
		Ammoniumacetat	750 mM
		β -Mercaptoethanol	20 mM
		Spermin	0,25 mM
		Spermidin	10 mM
	Mix III (E.coli)	Hepes-KOH, pH 7,5	66,7 mM
		Magnesiumacetat	12,6 mM
		Ammoniumacetat	500 mM
		β -Mercaptoethanol	13,4M
		Spermin	0,25 mM
		Spermidin	10 mM
	Bindungspuffer (E.coli)	Hepes-KOH, pH 7,5	20 mM
		Magnesiumacetat	6 mM
		Ammoniumacetat	150 mM
		β -Mercaptoethanol	4 mM
		Spermin	0,05 mM
		Spermidin	2 mM
	Bindungspuffer (Hefe + RRL)	Hepes-KOH, pH 7,5	20 mM
		Magnesiumacetat	5 mM
		Ammoniumacetat	100 mM
		β -Mercaptoethanol	6 mM
		Spermin	0,06 mM
		Spermidin	0,6 mM
Poly(U)-Assay	Mix I	Hepes-KOH, pH 7,6	100 mM
		Mg(Ac) ₂	21 mM
		KAc	870 mM
		β MeOH	4 mM
		Spermidin	12 mM

		Spermin	0,3 mM
	Mix II	Hepes-KOH, pH 7,6	80 mM
		Mg(Ac)2	15 mM
		KAc	840 mM
		βMeOH	4 mM
		Spermidin	12 mM
		Spermin	0,3 mM
	Mix E	ATP	270 mM
		GTP	100 mM
		Acetylphosphat	300 mM
		KOH	ad pH 7,6
	Mix F	Phenylalanin	40nm
		14C-Phenylalanin	ad 10dpm/pmol
	Tico	Hepes-KOH, pH 7,6	20 mM
		Mg(Ac)2	6 mM
		KAc	30 mM
		βMeOH	4 mM

Nach dem vollständigen Lösen der Komponenten erfolgte das Einstellen des pH 7,5 mit NaOH, danach die Sterilisation mit 0,2 µm Filter.

5.3.5 Puffer für Ribosomenisolierung

	Y80S-Puffer	Hepes-KOH, pH 7,5	20 mM
		Magnesiumacetat	6 mM
		Kaliumacetat	100 mM
		DTT	2 mM
	Y80S-Dissoziationspuffer	Hepes-KOH, pH 7,5	20 mM
		MgCl ₂	1 mM
		Kaliumacetat	100 mM
		Kaliumchlorid	100 mM
		DTT	2 mM
	Lysepuffer	Hepes-KOH, pH 7,5	50 mM
		Magnesiumacetat	6 mM
		Kaliumacetat	100 mM
		DTT	2 mM
		Complete Protease Blocker	1 Tab. / 50 ml
		AEBSF	0,2 mg/ ml
	Hochsalzpuffer	Hepes-KOH, pH 7,6	20 mM
		Magnesiumacetat	2,5 mM
		Kaliumchlorid	500 mM
		Kaliumacetat	100 mM
		DTT	2 mM
		Saccharose	1 mM
	Bindungspuffer	Hepes-KOH, pH 7,6	20 mM
		Magnesiumchlorid	5 mM
		Kaliumchlorid	100 mM
		Kaliumacetat	100 mM
		DTT	2 mM

Nach dem vollständigen Lösen der Komponenten erfolgte das Einstellen des pH 7,5 mit NaOH, danach die Sterilisation mit 0,2 µm Filter.

5.3.6 Puffer für die HPLC

Laufpuffer	Puffer A	NaCl	400 mM
		MgAc	10 mM
		NH ₄ Ac	20 mM
		HAc	ad pH 5,0
	Puffer B	NaCl	400 mM
		MgAc	10 mM
		NH ₄ Ac	20 mM
		HAc	ad pH 5,0
		Methanol	60%

5.3.7 Puffer für die Aminoacylierung

Phe-tRNA ^{Phe}	Aminoacylierungspuffer	Hepes, pH= 7,5	10
		MgAc	1,25
		NH ₄ Ac	135
		β-MeOH	2
		Spermidin	2
		Spermin	0,05

Nach dem vollständigen Lösen der Komponenten erfolgte das Einstellen des pH 7,5 mit NaOH, danach die Sterilisation mit 0,2 µm Filter.

5.4 Mikrobiologische Organismen

Bezeichnung:	E.coli Top 10	E.coli INV110	YA-2488
Zweck:	Erzeugung der IRES-Konstrukte	Erzeugung der IRES-Konstrukte	Quelle für Ribosomen, ribosomaler Untereinheiten
Quelle:	Invitrogen OneShot-Top10 Transformation Kit	Invitrogen OneShot-INV110 Transformation Kit	MPI MOLGEN Berlin, AG Fucini
Genotyp:	F-mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) ö80lacZM15 lacX74 recA1 araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	F' [tra Δ36 proAB lacIq lacZ ΔM15] rpsL (StrR) thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) Δ(mcrC-mrr)102::Tn10 (TetR)	---
Kultivierung:	LB-Medium mit 100 µg/ ml Ampicillin, 37°C	LB-Medium mit 10 µg/ ml Tetracyclin, 37°C	YPD-Medium, 30°C

5.5 Analytische Methoden

5.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Die photometrische Konzentrationsbestimmung kann für DNA, RNA und ribosomale Partikel (70S, 50S oder 30S) in geeigneter Verdünnung bei einer Wellenlänge von 260nm erfolgen. Für die Bestimmung der Extinktion wurde eine Mikroküvette (Beckman Coulter) mit einem Volumen von 100 µl und einem Lichtweg von einem Zentimeter verwendet. Die mathematische Grundlage bildete das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$A = -\lg(E/E_0) = c * \epsilon * d \quad \text{Formel 1}$$

Geeignete Verdünnungen lieferten Absorptionswerte im Bereich von 0,1 – 1,0.

Es wurden folgende Werte zur Konzentrationsbestimmung genutzt:

$$\begin{aligned} 1 A_{260} &= 50 \mu\text{g/ ml doppelsträngige DNA} \\ &= 40 \mu\text{g/ ml einzelsträngige DNA oder RNA} \\ &= 20 \mu\text{g/ ml Oligonukleotide} \end{aligned}$$

und für ribosomale Partikel und tRNA:

$$\begin{aligned} 1 A_{260} &= 18 \text{ pmol 80S Ribosomen} \\ &= 25 \text{ pmol 60S Untereinheit} \\ &= 50 \text{ pmol 40S Untereinheit} \\ &= 1500 \text{ pmol tRNA} \end{aligned}$$

Für genauere Berechnungen wurden die molaren Extinktionskoeffizienten der Basen der Nukleotide oder Ribonukleotide verwendet:

$$\begin{aligned} \text{Adenin: } \epsilon_{260} [\text{A}] &= 1,5 * 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \text{Guanin: } \epsilon_{260} [\text{G}] &= 1,2 * 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \text{Uridin : } \epsilon_{260} [\text{U}] &= 1,0 * 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \text{Cytidin: } \epsilon_{260} [\text{C}] &= 0,8 * 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \text{Thymidin: } \epsilon_{260} [\text{T}] &= 1,0 * 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

Die Berechnung erfolgte aus der Summe der molekularen Extinktionskoeffizienten unter Berücksichtigung des jeweiligen Anteils der Nukleotide.

5.5.2 Radioaktivitätsmessung

Die Messung der Radioaktivität der Proben erfolgte im Szintillationscounter "*Wallac Liquid Scintillation Counter LKB 1209 Rackbeta*". Proben mit ^{14}C -oder ^3H -Markierung wiesen eine Aktivität von 100-1000dpm/ pmol auf und wurden mit dem entsprechenden Zählprogramm für 1 min gemessen.

5.5.3 Elektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von verschiedenen Arten von Molekülen. Dabei wandert eine Mischung aus zu trennenden Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Felds durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Dabei wandern negativ geladene Moleküle (Anionen) in Richtung der positiv geladenen Anode und positiv geladene Moleküle (Kationen) in Richtung der negativ geladenen Kathode. Die Bestandteile des Gels, beispielsweise Agarose oder polymerisiertes Acrylamid, bilden ein engmaschiges Netzwerk, das die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Agarose-Gele sind relativ großporig (150nm bei 1%igen, 500nm bei 0,16%igen Gelen) und eignen sich gut zur Trennung von DNA und hochmolekularen Proteinen. Polyacrylamid-Gele weisen wesentlich kleinere Poren auf (3-6nm). Die Porengröße hängt von der Acrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad ab. Je nach Anwendung werden dem Gel verschiedene Stoffe zugesetzt, beispielsweise SDS bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) oder Ampholyte bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF).

Gleiche Moleküle laufen in diskreten Zonen -umgangssprachlich als Banden bezeichnet -durch das Gel. Mehrere Proben können parallel nebeneinander gleichzeitig durch dasselbe Gel laufen. Anhand von Molekulargewichtsstandards mit bekannten Molekülgrößen kann man durch Vergleich von deren Banden mit den restlichen Banden die Größe der anderen Moleküle abschätzen.

Eine Bestimmung der Menge einer Substanz in einer Bande beziehungsweise der relative Anteil einer Bande ist nach der Färbung des Gels und einer anschließenden densitometrischen Auswertung möglich.

5.5.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese kann zur Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA und RNA genutzt werden. Dabei wandern negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle im elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Auftrennung erfolgt nach dem Molekulargewicht, die Konformation der Nukleinsäure kann dabei eine Rolle spielen. Zur Trennung werden dabei Agarosekonzentrationen zwischen 0,3% und 4% genutzt. Für die Herstellung von Agarose-Gelen werden 100 ml 1x TBE-Lösung mit der entsprechenden Menge Agarose (z.B. 1g für 1%) vermischt und im Mikrowellengerät bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Um eine thermische Zersetzung der Ethidiumbromid-Lösung zu verhindern, wird vor deren Zugabe bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml die Gellösung auf ca. 40°C abgekühlt. Anschließend wird sie in die Gelkammer gegossen und ein Geltaschenformer (Kamm) eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel mit 1X TBE Puffer überschichtet. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 5-10V/cm. Nach erfolgter Trennung kann die DNA unter UV-Licht detektiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA oder RNA und wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die Detektion erfolgt auf einem UV-Leuchttisch, das Ergebnis wird zur Dokumentation photographisch festgehalten.

5.5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli kann zur Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt werden. Die Trennung der Proteine erfolgt nach dem diskontinuierlichen Verfahren im zweiphasigen Gelsystem. Im Sammelgel werden die SDS-Proteinkomplexe zunächst aufkonzentriert, dies ermöglicht eine scharfe Trennung der Proteine im Trenngel. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrer molekularen Masse, da die Eigenladung der Probenmoleküle durch die Anlagerung von SDS überdeckt wird. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist abhängig von der Anzahl der Aminosäuren, die resultierende Ladung der SDS-Proteinkomplexe ist somit abhängig vom Molekulargewicht des Proteins.

Für die SDS-PAGE wurde eine Amersham Elektrophoresekammer "SE260" genutzt. Zur Herstellung der Gele wurde zunächst der durch die Glasplatten und 1mm-Spacer gebildete Hohlraum zu ca. 2/3 mit Trenngel gefüllt und dieses bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Dadurch wurde zum einen eine Glättung der Gelgrenze erreicht, zum anderen der Kontakt mit Sauerstoff ausgeschlossen, da dieser die zur Polymerisation

notwendigen Radikale abfangen und somit eine korrekte Polymerisation des Gels stören würde. Nach etwa 45 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert und der Alkohol wurde abgegossen. Danach erfolgte das Einsetzen des Geltaschenformers (Kamm) und das Auffüllen mit Sammelgellösung. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel-Glasplatten-Sandwich in die vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt. Nach dem Auffüllen der Kammer mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer wurden die Geltaschen vor dem Probenauftrag mit Puffer gespült, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen.

Vor der eigentlichen Elektrophorese wurde zur Einstellung der optimalen Ionenbedingungen ein Vorlauf von 20 min bei 70V durchgeführt. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte für ca. 1-1,5 h bei 150V.

Nach erfolgter Auftrennung der Probe wurde das Gel durch Überschichtung des Gels mit Coomassie Blue-Färbelösung unter leichtem Schwenken für ca. 3 h gefärbt. Nach Entfernung der Färbelösung erfolgte die Entfärbung durch Schwenken in Entfärbelösung bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Dokumentation erfolgte durch Photographieren oder durch Inkubation des Gels in Gelrocknerlösung und anschließender Trocknung zwischen zwei *Whatman*-Folien im Gelrocknungsrahmen.

5.5.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Zur RNA-Kontrolle wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt. Für Transkripte zwischen 40 und 100 Nukleotiden wurden 10%ige Polyacrylamidgele im TBE-Puffersystem verwendet. Diese Gele enthalten zur Denaturierung der RNA 7M Harnstoff. Die Detektion der RNA erfolgt durch Anfärbung mit Toluidinblau.

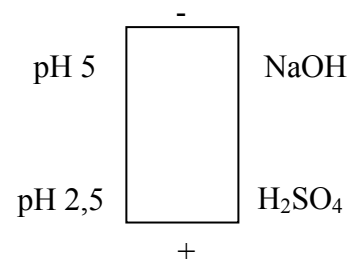
5.5.3.4 Isoelektrische Fokussierung

Zur qualitativen Bestimmung der ribosomalen P-Proteine wurde die Methode der isoelektrischen Fokussierung "IEF" genutzt. Dabei werden die Proteine in einem Gel aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Aminosäureresten elektrophoretisch aufgetrennt.

Je nach pH-Wert des umgebenden Mediums tragen die basischen und sauren Aminosäuren eines Proteins unterschiedliche Ladungen (Ampholyte). Am so genannten isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins beträgt seine Nettoladung, also die Summe aller Ladungen der einzelnen Aminosäuren, null. Bei diesem definierten pH-Wert ist die elektrophoretische Beweglichkeit ebenfalls null. An das mit pH-Gradienten hergestellte Gel wird eine Spannung angelegt. Jedes Protein wandert im elektrischen Feld so weit, bis der umgebende pH-Wert seinem pI entspricht.

Ein Protein, welches von seinem isoelektrischen Punkt wegdiffundiert, erhält durch die Veränderung des pH-Wertes wieder eine Nettoladung und wird erneut zu dem pH-Wert transportiert der seinem pI entspricht. Das elektrische Feld konzentriert also die einzelnen Proteine an ihrem spezifischen pI. Aus diesem Grund spricht man von einer Fokussierung.

Vor der Durchführung wurden Anoden- und Kathodenpuffer jeweils frisch angesetzt und auf 4°C vorgekühlt. Das polymerisierte Polyacrylamid-Minigel (10 * 10,5cm, mit festen Spacern 1,5mm, Kamm 1,5mm/10 Slots) wurde in die Elektrophoresekammer *BioRad Miniprotean III* eingesetzt. Die Geltaschen wurden mit Wasser gespült und mit Papier getrocknet. Nach dem Probenauftrag



erfolgte eine Überschichtung mit 2M Harnstoff, um eine Vermischung mit dem Kathodenpuffer (30 mM NaOH) zu vermeiden. Als Kathodenpuffer wurde eine 180 mM H₂SO₄-Lösung verwendet. Die zu untersuchenden ribosomalen Proteine in einem neutralen/ leicht basischen Puffer mit geringer Salzkonzentration entsprach der Menge aus 7A₂₆₀ Ribosomen. Die Elektrophorese wurde bei 6mA und 100V gestartet. Bei zunehmender Ausformung des pH-Gradienten stieg die elektrische Spannung auf 600V, während der Stromfluss auf 2mA zurückging. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt. Als Standards dienten der BioRad IEF Marker Broad Range (pI-Range 4,45 – 9,6) sowie BSA mit einem pI von 5,5. Die Analyse erfolgte durch Silberfärbung, durch Coomassie-Blue-Färbung sowie durch einen Immunoassay (Western Blot) zur Identifizierung der ribosomalen P-Proteine.

5.5.4 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Analyse von ribosomalen Komplexen und deren Untereinheiten wurde die analytische Dichtegradienten-Zentrifugation eingesetzt. Es wurden lineare Saccharose-Gradienten von 10%-30% [w/v], die im Gradientenmischer *Gradient Master* hergestellt werden, verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgt in der Ultrazentrifuge in geeigneten Rotoren, hierbei wird die Laufzeit, Temperatur und Drehzahl (bzw. Erdbeschleunigung) so gewählt, dass eine geeignete Trennung der ribosomalen Partikel erfolgt.

Folgende Bedingungen wurden für die Untersuchungen verwendet:

analytisch:

Rotor MLS-50: 2 h / 44.000 rpm / 155.000g / 4°C / ca. 1 A₂₆₀ Ribosom pro Gradient

Rotor MLS-50: 3 h / 35.000 rpm / 98.000g / 4°C / ca. 1 A₂₆₀ Ribosom pro Gradient

präparativ:

Rotor SW28: 6,5 h / 27.000 rpm / 96.000g / 4°C / ca. 75 A₂₆₀ Ribosom pro Gradient

Zur Analyse wurden die Gradienten mit Hilfe eines Gradientenfraktionators *Gradient Fractionator* fraktioniert. Mit einer UV-Durchlaufmesszelle wurde kontinuierlich die Extinktion bei 254nm gemessen und aufgezeichnet (siehe Abb. 10). Die Fraktionsgröße betrug zwischen 100 µl (analytisch) und 700 µl (präparativ).

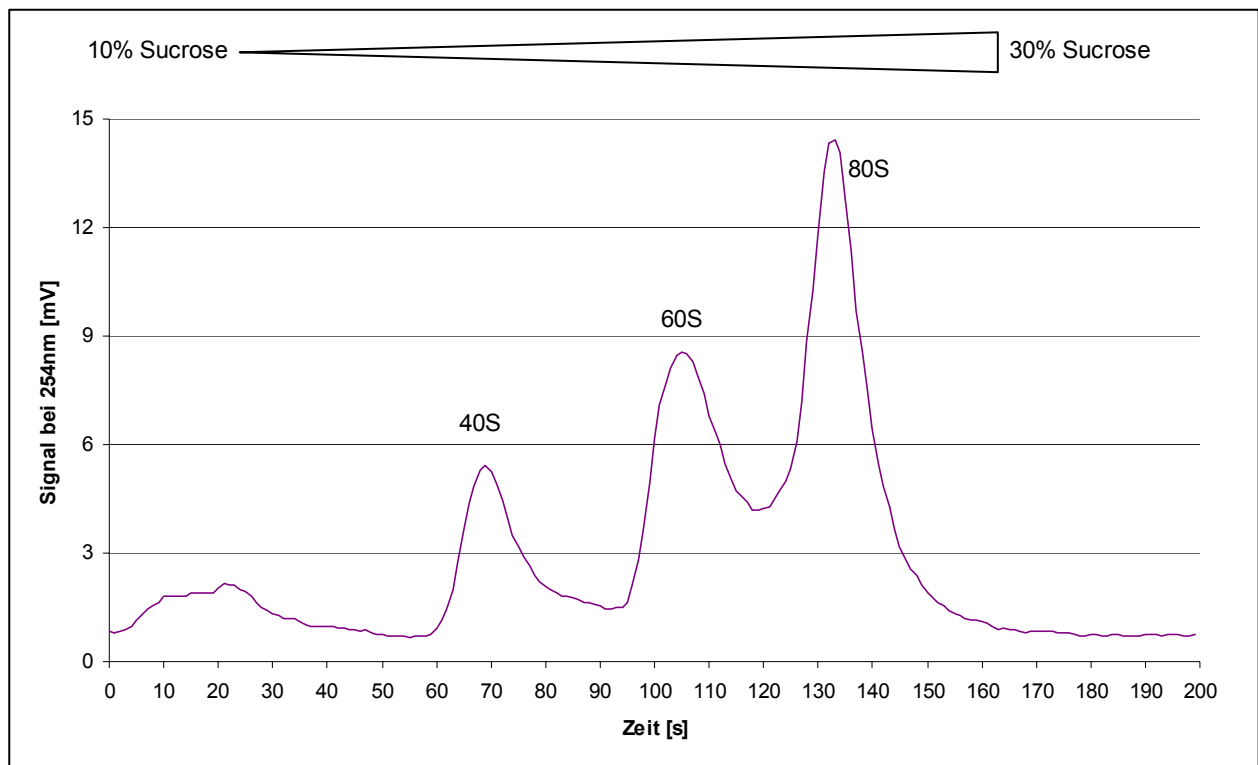


Abb. 10: Beispiel für einen analytischen Saccharosegradienten mit ribosomalen Partikeln

Auftrag: Messsignal gegen die Zeit, Saccharosegradient: 10% (links) – 30% (rechts), Peaks entsprechen den ribosomalen Partikeln 40S / 60S / 80S

5.5.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zur Analyse und zur Präparation von tRNA^{Phe}, Phe-tRNA^{Phe} bzw. AcPhe-tRNA^{Phe} wurde die HPLC genutzt. Dabei handelt es sich um ein chromatografisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase (auch "Eluent" genannt) durch eine so genannte Trennsäule, die die stationäre Phase enthält, gepumpt wird.

Wechselwirkt ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz stark mit der stationären Phase, verbleibt er relativ lange in der Säule. Wechselwirkt er hingegen schwach mit der stationären Phase, verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Zeiten am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten UV-Detektor nachgewiesen werden können.

Bei der hier verwendeten Reversed Phase-HPLC wurde eine unpolare stationäre Phase *Nucleosil C18* verwendet, deren Elutionskraft mit steigender Polarität sinkt. Als mobile Phase diente ein Gradient aus HPLC-Puffer A und HPLC-Puffer B (siehe Tab. 6):

Tab. 6: Gradientenprofil HPLC

t [min]	Puffer B [%]
0	0
10	0
130	60
145	60
155	0
165	0

Die Flussrate betrug 0,5 ml/ min bei einem Druck von 4 MPa. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$. Analytische Versuche wurden mit einer Anlage der Firma Knauer, präparative Versuche mit einer Anlage von Pharmacia durchgeführt. Die Fraktionsgröße betrug hierbei 1 ml/2 min.

5.5.6 Immunoassay-Westernblot

Der Nachweis der ribosomalen P-Proteine wurde mit einem Immunoassay (Westernblot) durchgeführt. Dazu wurden die zu analysierenden Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt. Der anschließende Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einem *Amersham Mini VE Blottingmodul* in Transferbuffer bei 400mA und 25-40V für eine Stunde. Der Transfererfolg wurde durch Färben mit *Ponceau Rot* auf der Membran und Coomassie Färbung des Gels geprüft. Die Membran wurde im Anschluss mit Transferpuffer gespült, zur

Reduzierung unspezifischer Bindung der Antikörper an die Membran mit ca. 50 ml Blockierlösung überschichtet und Ü/N unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 50 ml PBS-T erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:5000 in PBS-T) für 1 Stunde unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur. Dazu wurde ein P-Protein-spezifischer, monoklonaler Antikörper P2- α IBE3 verwendet. Nach Abdekantierung wurde die Membran dreimalig mit PBS-T gewaschen und mit dem sekundären Antikörper α -mouse HRP aus dem ECL-Kit für 1 Stunde unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis erfolgte durch das ECL-Detektionssystem (Enhanced Chemiluminescence Lösung): Eine an den sekundären Antikörper gebundene Peroxydase (*Meerrettichperoxydase/horseradish peroxidase*-HRP) oxydiert das der ECL enthaltene Luminol. Das durch die Oxydation angeregte Luminol ist zur Lichtemission fähig. Das ausgesandte Licht wird durch Belichtung eines lichtempfindlichen Films registriert.

5.5.7 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem *Biorad Proteinassay* nach den Herstellervorgaben. Die Probenextinktion von $\lambda = 280\text{nm}$ nach Reaktion der Probe mit einer Coomassie Blue-Lösung wird durch Vergleich mit denen mehrerer Proteinstandards bekannter Konzentration ermittelt.

5.5.8 Untersuchung der ribosomalen RNA

Zur Beurteilung der Qualität ribosomaler Partikel wurde die ribosomalen RNA auf Degradation untersucht. Dazu erfolgte eine Extraktion der Proteine mit Phenol und einer anschließenden Untersuchung der so aufgereinigten rRNA mittels Agarosegelelektrophorese. Dazu wurde ca. 20 μl einer 0,5 pmol/ μl Probe mit 500 μl phenolhaltiger Agenz *Trizol* vermischt. Proteine werden dabei denaturiert, sie reichern sich selektiv in der organischen Phase an und können so von der rRNA getrennt werden. Nach der Zugabe von 100 μl Chloroform erfolgte ein kurzes Vortexen und zur Phasentrennung eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000g und 15°C. Zur Fällung der rRNA in der wässrigen Phase wurden 30 μl (1/10 v/v) 1M NaAc, pH 5,6 sowie 250 μl Isopropanol (0,6 v/v) hinzugefügt. Nach Mischung und Inkubation erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 16.000g und 15°C. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% EtOH (-20°C) gewaschen und erneut für 5 min, 16.000g bei 15°C abzentrifugiert. Reste des EtOH wurden durch trocknen bei 37°C entfernt, danach das Pellet in 10-20 μl Wasser (UP) resuspendiert. Der

rRNA-Gehalt und die Zusammensetzung wurden durch Elektrophorese mit einem 1%igen TAE-Agarosegel analysiert.

5.5.9 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Aufkonzentrierung, Aufreinigung und Entsalzung von Nukleinsäuren wurden diese in Gegenwart von monovalenten Kationen durch Zugabe von Ethanol durch Veränderung der Molekülhydrathülle aus wässrigen Lösungen gefällt. Durch Zugabe von 1/10 v/v Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung mit pH 5,6 wurde eine geeignete Kationenkonzentration eingestellt. Durch Zugabe von 2,5 Volumen eiskaltem 96%igem (v/v) Ethanol erfolgte die Fällung der DNA / RNA. Die Fällung wurde durch Zentrifugation (15 min, 16.000g, 4°C) unterstützt. Der Überstand wurde dekantiert und das erhaltene Pellet mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Dabei lösten sich eventuell enthaltene Verunreinigungen und Salze in dem in der Ethanollösung enthaltenen Wasser. Durch Zentrifugation (15 min, 10.000 * g, 4°C) sollte das Pellet während des Waschens stabilisiert werden. Der Überstand wurde wiederum abdekantiert und das Pellet danach bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in einem geeignetem Volumen Pufferlösung oder destilliertem Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Die Konzentrationsbestimmung am Photometer erfolgte anhand folgender Umrechnungen:

$$1 A_{260} = 40 \mu\text{g RNA} / \text{ml}$$

$$1 A_{260} = 50 \mu\text{g Doppelstrang- / ds- / DNA} / \text{ml}$$

$$1 A_{260} = 33 \mu\text{g Einzelstrang- DNA} / \text{ml}$$

5.5.10 TCA-Fällungsassay

Zur Bestimmung des Anteils an aminoacylierter, radioaktiv markierter (^{14}C , ^3H) tRNA^{Phe} einer Lösung wurde diese durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) durch Veränderung der Molekülhydrathülle aus wässrigen Lösungen gefällt. Dazu wurden je 5 μl Probe mit 2 ml 10% Trichloressigsäure mit 25 μl Fällhilfe (2 mg/ml RNA-Bulk Hefe + EDTA) für 1 h auf Eis inkubiert und durch einen Schleicher & Schüll Glasfilter mit $d = 23\text{mm}$ filtriert. Die Filter wurden zweimal mit 2 ml 5% TCA gewaschen. Da TCA als organische Säure signal-reduzierende (quenchende) Eigenschaften aufweist, wurde diese durch Waschen mit ca. 3 ml Ether/Ethanolgemisch (1:1) entfernt. Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Filter in Szintillationsfläschchen überführt, mit 5 ml FilterCount überschichtet und im Flüssigszintillationszähler mit dem entsprechenden Zählprogramm gemessen.

5.5.11 funktionelle *in vitro*-Analysen des Ribosoms

5.5.11.1 Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese

Die *in vitro* Proteinbiosynthese ist ein Standardexperiment, um die biologische Aktivität einzelner Komponenten wie Ribosomen, tRNA, S100-Enzymfraktion zu untersuchen. Zur Beurteilung der Translationsaktivität der isolierten Ribosomen wurde die Elongationsfähigkeit der präparierten Ribosomen durch ein modifiziertes Poly(U)-mRNA abhängiges Poly(Phe)-Synthese System genutzt (Traub and Nomura, 1968). Dazu wurde für diese Arbeit der bekannte Polyuridin-mRNA-abhängige Polyphenylalanin-Assay aus dem prokaryontischen auf das eukaryontische System adaptiert und optimiert. Unter Standardbedingungen (15 µl Reaktionsmix) betrug die finale Ionenkonzentration 20 mM HEPES-KOH pH 7.6 (0°C), 20 mM Magnesiumacetat, 150 mM Ammoniumacetat, 4 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM Spermidin und 0,05 mM Spermin. In dem Bindungsreaktionsansatz (gesamt 7,5 µl) wurden zunächst 5 pmol 80S Ribosomen durch Inkubation für 10 min bei 37°C faktorunabhängig an 40 µg Poly(U)-RNA gebunden. Der Beladungsreaktionsansatz (gesamt 10 µl) enthielt 7nmol [¹⁴C]-markiertes Phenylalanin mit einer spezifischen Aktivität von 10 dpm/pmol, 40 pmol tRNA^{Phe} aus Hefe, einen Energiemix aus 3 mM ATP, 1.5 mM GTP und 5 mM Acetylphosphat sowie eine optimierte Menge S100 mit den für die Proteinbiosynthese notwendigen löslichen Proteinen wie z.B. Translationsfaktoren und aa-tRNA-Synthetasen. Der Beladungsreaktionsansatz wurde zunächst 2 min bei 37°C prä-inkubiert, bevor er mit 5 µl des Bindungsreaktionsansatzes vermischt wurde (gesamt 15 µl Reaktionsmix, s.o.). Die Mischung wurde für 60 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch schnelles Abkühlen in einem Eisbad gestoppt. Während der Reaktion erfolgte eine enzymatische Aminoacylierung der tRNA mit radioaktiv markierter Aminosäure, die anteilig in die Peptidketten eingebaut wurde. Das synthetisierte Poly-Phenylalaninpeptid wurde quantitativ unter Zugabe von 3 Tropfen 1% (s/v) BSA als Fällhilfe mit 2 ml 5 % TCA ausgefällt. Ungebundene Phe-tRNA^{Phe} würde jedoch das Messergebnis verfälschen. Daher wurde durch Erhitzen (15 min. bei 90°C) die Esterbindung zwischen [¹⁴C]-Phenylalanin und der tRNA^{Phe} hydrolysiert. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurden die Proben über Glasfaserfilter (Schleicher & Schuell, d= 23 mm) filtriert. Lange Poly-¹⁴C-Phenylalanin-Peptide wurden dabei zurückgehalten, kurze ¹⁴C-Phenylalanine nicht. Die Menge an ¹⁴C-markiertem Phenylalanin wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen und so die Ausbeute an synthetisiertem Polypeptid bestimmt. Die Menge der synthetisierten Poly-Phe-Peptide pro Zeiteinheit wurde als Maß für die Aktivität der Ribosomen genutzt. Bei der Durchführung wurde mit Master-Mixen gearbeitet, weiterhin wurde für jeden Messpunkt eine Doppelbestimmung durchgeführt.

5.5.11.2 Untersuchung funktioneller Zustände des Ribosoms

Zur Untersuchung der funktionellen Zustände des Ribosoms wurden ein *in vitro*-System nach Watanabe (Watanabe, 1972; Watanabe and Tanaka, 1972) genutzt. Dieses System ermöglichte die Untersuchung einzelner Teilschritte des Translationsinitiation wie z.B. die stellenspezifische Bindung von tRNA in A- und P-Stelle sowie der eEF2 abhängigen Translokation. Die Pufferbedingungen konnten durch ein modulares Puffersystem in allen Teilschritten konstant bei $H_20M_{4.5}N_{150}SH_4Spd_2Spm_{0.05}$ (Bindungspuffer) gehalten werden. Diese Ionenkonzentrationen liegen nahe den *in vivo* Verhältnissen (Neidhardt, 1987) und werden als *in vivo*-nahes Puffersystem bezeichnet.

Ein Standardexperiment des Assays bestand aus 11 Einzelansätzen (10 + 1 Pipettierreserve): Jeweils zwei Ansätze (siehe Tab. 7: 7-8, 9-10) wurden für den Filterbindungstest vor- und nach der Translokation eingesetzt, sechs Ansätze (siehe Tab. 7: 1-2, 3-4, 5-6) wurden für die Puromycinreaktion verwendet und ein Ansatz diente als Pipettierreserve. Zusätzlich zu den Standardansätzen dienten als Negativkontrolle des Filterbindungstests zwei Ansätze ohne Ribosomen (siehe Tab. 7: 11-12).

Tab. 7: schematische Darstellung der Untersuchung der funktionellen Zustände des Ribosoms

Ansätze (doppelt)	ribosomaler Komplex	eEF2	Puromycin-Reaktion	Filter-bindungs-Test	Funktion	mögliche Schlußfolgerung
1+2	+	-	-	-	Hintergrundbestimmung Puromycinreaktion	-
3+4	+	-	+	-	Puromycinreaktion vor Translokation	negativ: A-Stelle besetzt positiv: A-Stelle frei
5+6	+	+	+	-	Puromycinreaktion nach Translokation	negativ: keine Translokation positiv: A-Stelle frei
7+8	+	-	-	+	Filterbindungstest vor Translokation	Menge an ribosomal gebundener tRNA
9+10	+	+	-	+	Filterbindungstest nach Translokation	Menge an ribosomal gebundener tRNA
11+12	-	-	-	+	Hintergrundbestimmung Filterbindungstest	-

Die stellenspezifische Untersuchung der tRNA-Bindung an das Ribosoms gliederte sich in vier Teilschritte (siehe Abb. 11 + Abb. 12).

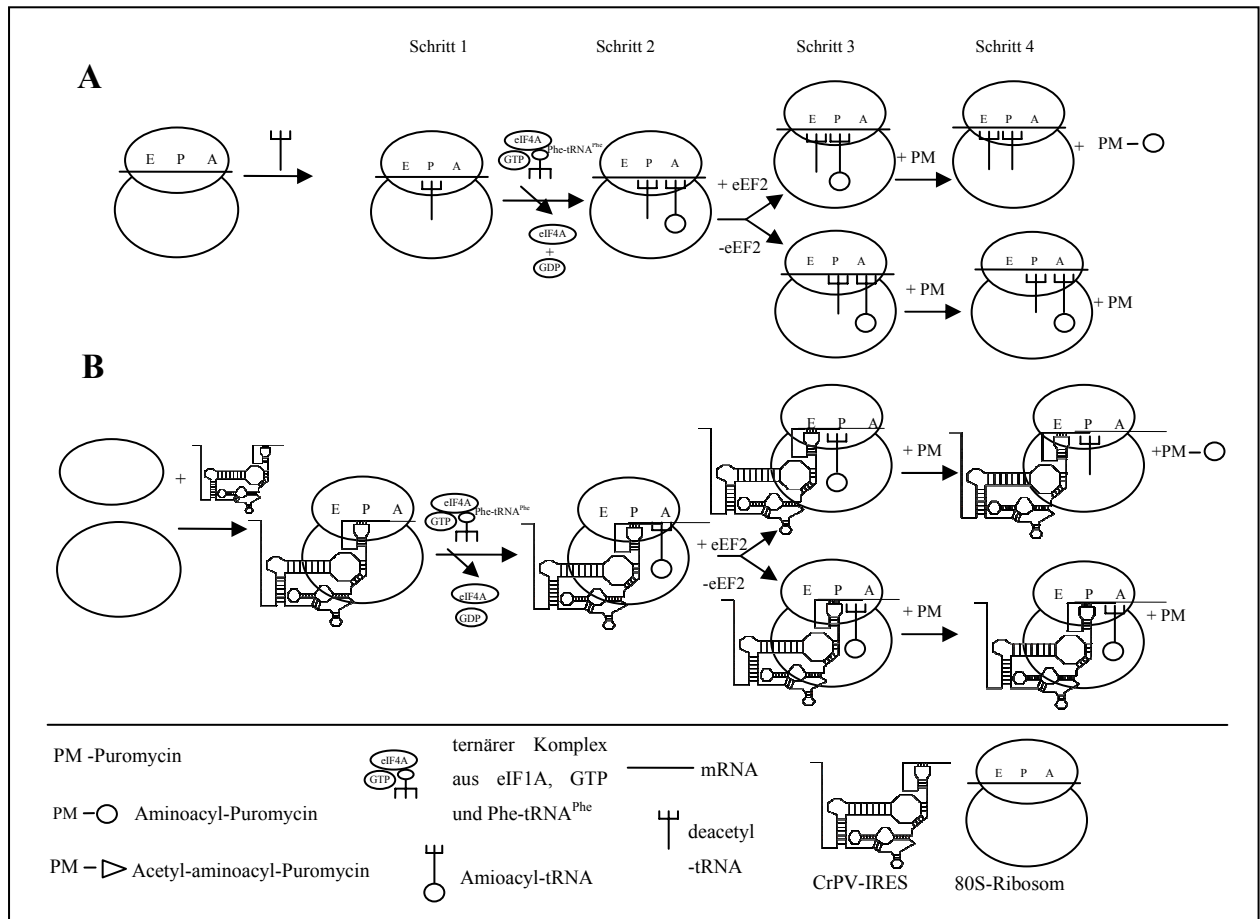


Abb. 11: schematische Darstellung des stellenspezifischen tRNA-Bindungs-Assays mit ternärem Komplex

A): Bindung mit Polyuridin-mRNA und ternärem Komplex

B): Bindung mit CrPV-IRES-mRNA und ternärem Komplex, (Erläuterungen siehe Text)

5.5.11.2.1 Programmierung und Besetzung der P-Stelle

Der erste Schritt der Untersuchung bestand aus der Programmierung des Ribosoms mit einer mRNA (Poly(U) oder CrPV-IRES). Im Falle der Poly(U)-mRNA erfolgte anschließend die Besetzung der P-Stelle mit kognater deacyl-tRNA (P-Stelle: höchste Affinität für tRNAs, es folgen A- und E-Stelle). Bei der Initiation der konventionellen Translation bindet hier die Initiator-tRNA N-Formylmethionyl-tRNA^{Met}. Bei der CrPV-IRES-mRNA erfolgt die für die Translation notwendige Besetzung der P-Stelle durch den Pseudoknoten I. Dies erklärt die Fähigkeit zur Initiation ohne Initiator-tRNA. Die Bildung eines konventionellen Pi-Initiationskomplexes (i= Initiation) erfolgt in diesem Fall nicht.

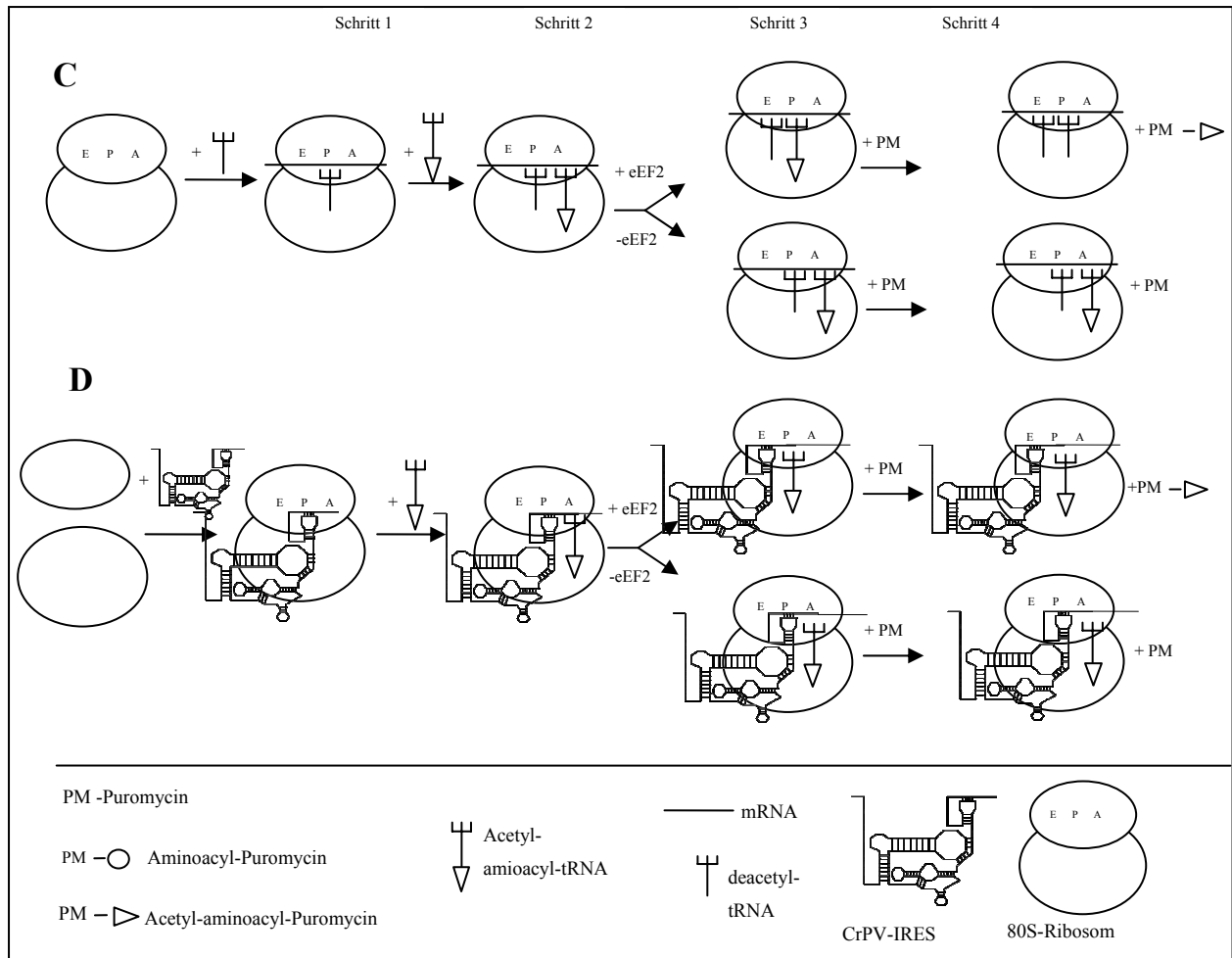


Abb. 12: schematische Darstellung des stellenspezifischen tRNA-Bindungs-Assays mit AcPhe-tRNA^{Phe}

C): Bindung mit Polyuridin-mRNA und N-Acetylphenylalanyl-tRNA^{Phe}

D): Bindung mit CrPV-IRES-mRNA und N-Acetylphenylalanyl-tRNA^{Phe}, (Erläuterungen siehe Text)

Für die 11 Standardreaktionen eines Assays (siehe Tab. 7) wurden 55 pmol Y80S-CrPV-IRES-Komplex in 37 µl Y80S-Puffer eingesetzt. Als Kontrolle ohne IRES diente ein Ansatz mit 50 µg Poly(U)-mRNA pro 4 pmol 80S. Die Einstellung der Pufferbedingungen erfolgte mit einem 2fach konzentrierten Bindungspuffer. Das Gesamtvolumen des Pre-Inkubationsansatzes betrug 11x 6,7 µl. Zusätzlich wurden zwei Ansätze ohne 80S Ribosomen als Negativkontrolle pipettiert. Das fehlende Volumen wurde durch Y80S-Puffer aufgefüllt. Es erfolgte ein Inkubationsschritt für 5 Minuten bei 37°C. Zu den Ansätzen mit Poly(U)-mRNA wurde anschließend ein zehnfacher Überschuss an deacetylierter tRNA^{Phe} (bezogen auf 80S, in Bindungspuffer) hinzugefügt. Damit sollte die wie bei den IRES-Komplexen durch den PKI-Pseudoknoten besetzte P-Stelle mit tRNA^{Phe} abgesättigt werden, um eine höhere Vergleichbarkeit von Kontrollansatz und Proben zu erreichen. Das fehlende Volumen in den übrigen Proben ohne Poly(U)-mRNA wurde durch Bindungspuffer ersetzt. Das Gesamtvolumen betrug nun 148 µl. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 5 Minuten bei 37°C.

5.5.11.2.2 A-Stellenbesetzung

Im zweiten Schritt kann nun die vakante A-Stelle des mRNA-Komplexes durch die Bindung einer zweiten, cognaten tRNA besetzt werden. Dabei bestimmt die verwendete mRNA und die tRNA durch Kodon-Antikodon-Interaktionen das Besetzungsmuster des Ribosoms.

Die A-Stellenbesetzung kann auf verschiedene Arten erfolgen: Sie kann enzymatisch durch den ternären Komplex Aminoacyl-tRNA•eEF1A•GTP bzw. den nicht-spaltbaren ternären Komplex Aminoacyl-tRNA•eEF1A•GMP-PNP erfolgen. GTP-PNP (Guanosin 5' [β, γ-imido]-triphosphatrinatrium) ist ein nicht hydrolysierbares GTP-Analogon, bei dem der Phosphatrest durch eine Aldehyd- und nicht durch eine Esterbindung an das Molekül gebunden ist. Diese Modifizierung bewirkt, dass der ternäre Komplex zwar an das Ribosom gebunden wird, dieser jedoch nicht durch die GTPase-Aktivität des Ribosoms hydrolysiert werden kann. Der Translationskomplex wird so in einem intermediaten Zustand fixiert. Bei einer erfolgreichen Bindung müsste eine 3D-Einzelpartikelrekonstruktion eine dem ternären Komplex entsprechende Elektronendichte zeigen. Bei Verwendung von GTP im ternären Komplex kommt es zur Hydrolyse, woraufhin GMP + PP_i sowie eEF1A wieder abdissoziieren. In einer entsprechenden 3D-Einzelpartikelrekonstruktion müsste eine der aminoacyl-tRNA entsprechende Dichte in der A-Stelle des Ribosoms zu sehen sein.

Für die Versuche wurde ein 2facher Überschuss (bezogen auf aa-tRNA^{Phe}) an eEF1A in Bindungspuffer mit 200 μM GTP in einem Gesamtvolumen von 75 μl für 5 min bei 30°C inkubiert. Der eukaryontische Elongationsfaktor eEF1A aus Hefe wurde freundlicherweise von Dr. Sean Connell zur Verfügung gestellt, eEF1A aus RRL von Dr. Tanya Budkevitch. Der Ansatz wurde danach in einem Volumen von 75 μl mit ¹⁴C-markierte Aminoacyl-tRNA mit 2,5fachen Überschuss (bezogen auf 80S) in Bindungspuffer mit 800 μM GTP vermischt. Diese Mischung wurde erneut für 3 min bei 30°C inkubiert und auf den Pre-Inkubationsansatzes (11 Standardreaktionen) aus Schritt 1 gegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 15 min bei 30°C. Zur Herstellung des nicht spaltbaren ternären Komplexes Aminoacyl-tRNA•eEF1A•GMP-PNP wurde das GTP durch GMP-PNP ersetzt.

Die A-Stelle kann ebenfalls durch N-Acetylphenylalanyl-tRNA^{Phe} (AcPhe-tRNA^{Phe}), einer modifizierten aa-tRNA^{Phe} besetzt werden. Es kann als Struktur analogon einer Peptidyl-tRNA ohne eEF1A in der P-Stelle des Ribosoms binden. Durch eine chemische Modifikation ist die 3'-

Esterbindung zwischen Aminosäure und tRNA im Vergleich zu einer unmodifizierten, spontan deaminoacylierenden aa-tRNA stabiler, die Messungen mit dieser AcPhe-tRNA^{Phe} damit weniger anfällig für diese Fehlerquelle.

Für die analytischen Untersuchungen wurde der zuvor hergestellte Preinkubationsansatz verwendet (siehe 5.5.11.2.1). Für 11 Einzelansätze wurden ja 10 pmol AcPhe-tRNA^{Phe} mit 5 pmol Y80S-Poly(U)-mRNA / Y80S-CrPV-IRES-Komplex in Mix I-Puffer auf ein Volumen von 11*12,5 µl eingestellt. Nach 10minütiger Inkubation bei 30°C erfolgte die Zugabe von GTP-Mix (f.c. GTP= 0,6 mM). Für die Translokation wurde zu 4 von 10 Ansätzen eEF2 (Hefe) im Verhältnis 1:1 (bezogen auf 80S) hinzugefügt. Das Volumen der verbliebenen Ansätze wurde mit HMK-Puffer angeglichen. Für die Reaktion wurden die Ansätze für 60 min bei 30°C inkubiert. Der Erfolg der Bindung und der Translokation wurde durch einen Puromycin-Assay sowie einen Filterbindungstest untersucht (siehe Tab. 7).

5.5.11.2.3 Translokation

Im dritten Schritt kann nach Zugabe von Elongationsfaktor 2 (eEF2) der post-translokationale Zustand etabliert werden. Bei den Proben mit Poly(U)-mRNA erfolgte die Translokation der tRNA^{Phe} durch eEF2 aus der P-Stelle in die E-Stelle und der N-Acetyl-Aminoacyl-tRNA^{Phe} (siehe A) bzw. Aminoacyl-tRNA^{Phe} (siehe C) aus der A-Stelle in die P-Stelle. Das entspricht der Umwandlung des prä-translokationalen in den post-translokationalen Zustand des Ribosoms.

Dem Reaktionsansatz aus dem 2. Schritt (A-Stellenbesetzung) wurde ein frisch hergestellter GTP-Mix zugegeben. Der GTP-Mix bestand aus 30 µl Watanabe-Mix III, 40 µl destilliertem Wasser und 30 µl 2,5 mM GTP. Für die 11 Standardreaktionen wurden 55 µl verwendet. Nach Zugabe des GTP-Mixes erfolgte die Aufteilung der Reaktionen in 10 Einzelreaktionen. Zu 4 Einzelansätzen wurden je 2,5 µl einer eEF2 Lösung (0,5fache der 80S Konzentration) zugegeben. Allen anderen Ansätzen wurden zum Ausgleich je 2,5 µl HMK-Puffer zugesetzt. Die Inkubation für die Translokation erfolgte für 15 Minuten bei 30°C.

5.5.11.2.4 Puromycinreaktion und Filterbindungstest

Der vierte Schritt des Assays diente dem Nachweis der funktionellen Zustände des Ribosoms und der Translokationseffizienz. Der Nachweis erfolgte durch Vergleich der Ergebnisse des Bindungstests mit dem Ergebnis der Puromycinreaktion. Im Bindungstest erfolgte die Detektion der radioaktiven Aminosäure, die über tRNA an das Ribosom gebunden ist, durch Adsorption

der Ribosomen an Nitrozellulosefiltern und anschließender Szintillationsmessung. In der Puromycinreaktion konnte die Besetzung der A-bzw. P-Stelle des Ribosoms nachgewiesen werden. Puromycin ist ein Antibiotikum, welches den Akzeptorarm einer Aminoacyl-tRNA nachahmt und somit ein A-Stellen-Substrat ist (siehe Abb. 13).

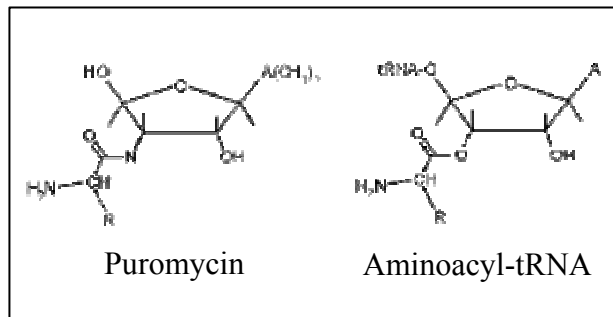


Abb. 13: Vergleich der Puromycin- und Aminoacyl-tRNA-Struktur

Die Peptidyltransferase kann, analog zur Peptidylübertragung im Elongationsschritt, die Peptidylgruppe der Peptidyl-tRNA (P-Stelle) auf Puromycin übertragen (Allen and Zamecnik, 1962). Dabei wird ein Peptidyl-Puromycinderivat gebildet, welches durch die fehlende tRNA-Haltefunktion schnell vom Ribosom dissoziiert. Hingegen kann eine A-Stellen-tRNA nicht mit Puromycin reagieren. Nur in einer freien A-Stelle kann Puromycin binden und mit der Peptidyl-tRNA reagieren. (Traut and Monro, 1964). Somit sind P- und A-Stelle in Bezug auf ihre Reaktivität gegenüber Puromycin operational definiert.

Jeweils 30 μ l aus je 2 Reaktionsansätzen mit und ohne eEF2 (siehe 5.5.11.2.3), sowie die beiden Negativkontrollen wurden mit jeweils 2 ml Bindungspuffer versetzt und durch einen Nitrozellulosefilter filtriert (Filterbindungstest). Die Filter wurden zweimal mit je 2 ml Bindungspuffer gewaschen und anschließend in einem Szintillationsgefäß mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Die Messung erfolgte nach Auflösung der Nitrozellulosefilter im Szintillationszähler mit dem entsprechenden Zählprogramm.

Die verbleibenden 6 Reaktionsansätze des modifizierten Watanabe-Assays (siehe 5.5.11.2.3) wurden für die Puromycinreaktion eingesetzt. Zwei Ansätze dienten als Negativkontrolle (ohne Zugabe von Puromycin). Die anderen 4 Ansätze (2 mit und 2 ohne eEF2) wurden mit 2,5 μ l einer frisch präparierten Puromycinlösung (5,8 mg/ml, pH=7,4 bei 0°C, eingestellt mit KOH) bei 0°C versetzt. (siehe Tab. 7) Nach Inkubation für 5 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 32,5 μ l mit MgSO₄-gesättigter 0,3 M Natriumacetatlösung (pH=5,5) gestoppt und das Puromycinderivat mit 1 ml Essigsäureethylester extrahiert (1 min kräftig gemischt). Die

Phasentrennung erfolgte durch Inkubation von 10 min bei 0°C und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 10.000g. Von der organischen Phase wurden 800 µl abgenommen und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Messung erfolgte nach kräftiger Durchmischung im Szintillationszähler mit dem entsprechenden Zählprogramm.

5.6 Präparative Methoden

5.6.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Die zur Plasmidpräparation genutzten *E.coli*-Bakterien (siehe 5.4) wurden in LB-Medium kultiviert. Die Plasmid-tragende Stämme wurden durch Zugabe verschiedener Antibiotika selektioniert. Die plasmidkodierte Resistenz ermöglichte das Wachstum der Plasmid-tragenden Stämme. Die Gewinnung von Reinkulturen erfolgte durch die Bildung von Einzelkolonien auf LB-Agarplatten mit Inkubation bei 37°C Ü/N. Flüssige LB-Kulturen zur Gewinnung größerer Zellmengen wurden im Schüttelinkubator bei 37°C Ü/N inkubiert. Für die Herstellung von Glycerinkulturen zur Dauerkonservierung wurde 1 ml einer Übernacht-Kultur (LB-Medium) mit 333 µl einer sterilen 50%igen (v/v) Glycerinlösung versetzt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgten das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und die anschließende Lagerung bei -80°C.

5.6.2 Kultivierung und Konservierung von *S. cerevisiae* (Hefe)

Die zur Ribosomenpräparation genutzten Hefezellen (*S. cerevisiae*) YA2488 wurden in YPD-Medium kultiviert.. Die Gewinnung von Reinkulturen erfolgte durch Überführung einer Probe aus dem mit Trockeneis gekühlten Glycerin-Stock mit einer sterilen Impföse auf eine YPD-Agarplatte. Diese wurde für 48 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde eine einzelne Kolonie mit steriler Impföse in 1,5 ml YPD-Nährmedium überführt (VK-I) und bis $A_{600} = 2,0$ für ca. 7 h im Inkubationsschüttler bei 30°C (bzw. in 5 ml bei 25°C Ü/N und 200 rpm inkubiert. Nun erfolgte das Animpfen zweier 200 ml Vorkulturen mit 0,6 ml (1:300) bzw. 0,4 ml (1:500) der Vorkultur VK-I und erneute Inkubation Ü/N bei 30°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler. Die A_{600} betrug dann ca. 2,0. Am Morgen wurden 4 * 1.000 ml Kulturen mit entsprechender Menge an Vorkultur VK-2 angeimpft, so dass Start- A_{600} zwischen 0,1-0,15 lag. Die Inkubation für 6-8 h bei 30°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler bis $A_{600} = 1,0$ wurde mit einer Wachstumskurve mit stündlichen A_{600} -Messungen verfolgt.

Die Zellernte erfolgte mittels Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation für 10 min / 4°C / 4.000g / 5.000 rpm im Rotor JLA 9.1000. Nach Abdekantieren des Überstandes wurden die

Zellen zum Waschen in 1/25 Kultur-Volumen vorgekühltem 1%iger KCL-Lösung resuspendiert und erneut für 10 min / 4°C / 4.000g / 6.400 rpm / TA-10-250 zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes erfolgte das Einfrieren des Zellpellets in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei -80°C. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 20g Zellen.

Für die Herstellung von Glycerinkulturen zur Dauerkonservierung wurde 1 ml einer Übernacht-Kultur mit 333 µl einer sterilen 50%igen (v/v) Glycerinlösung versetzt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgten das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und die anschließende Lagerung bei -80°C.

5.6.3 Präparation von Ribosomen aus *S. cerevisiae* (Hefe)

Die für die Untersuchungen notwendigen eukaryontischen Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten wurden durch die konventionelle Methode der Saccharosegradienten-Zentrifugation gewonnen (Blaha et al., 2000; Bommer, 1997). Ein Nebenprodukt dieser Aufarbeitung war eine S100-Zytosol-Fraktion. Diese wurde als Quelle diverser Translationsfaktoren für die *in vitro*-Experimente genutzt.

Nach der Anzucht von YA2488-Hefezellen in YPD-Medium wurden die Zellen für den Aufschluss in Portionen à 5g Zellpellet mit je einem Zellvolumen (= Zellfrischgewicht in ml, z.B. 5g => 5 ml) mit Lysepuffer vermischt und in gerührtem Eiswasser aufgetaut. Die Zellen wurden zu je 2,5g/5 ml aufgeteilt und je 5 * Zellfrischgewicht (z.B.12,5g) feuchte Glasperlen (0,45-0,55mm, HCl-gewaschen, bei 180°C < 4 h gebacken, mit 0,4 Vol. H₂O und Lysepuffer gewaschen) hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 10 * 1 min vortexen bei höchster Stufe. Zur Verringerung der thermischen Belastung wurden die Zellen zwischen jedem Schritt je 1 min auf Eis abgekühlt. Nach der fünften Wiederholung erfolgte zur pH-Korrektur die Zugabe von 1/30 Vol. ungepuffertem 1M Tris. Durch Abdekantieren und zweimaligem Waschen mit je 1 ml Lysepuffer wurden die Glasperlen abgetrennt. Das Hefezelllysate wurde zur Entfernung verbliebener Glasperlen und grober Zellbestandteile für 5 min bei 4°C, 9.400g, 7.916 rpm im Rotor TA-10-250 zentrifugiert. Die restlichen Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C, 30.000g, 25.000 rpm im MLA-80-Rotor entfernt. Dieser ribosomenhaltige Überstand ("S30") wurde mittels Pipette in ein neues Reagenzgefäß überführt. Durch Zentrifugation über 1/5 Vol. 30% Saccharosekissen (15g/50 ml in Lysepuffer) für 16 h, 4°C, 70.000g, 37.000 rpm im Rotor MLA-80 wurden die ribosomalen Partikel pelletiert. Die 80S-Ribosomen wurden je nach Verwendungszweck in Y80S-Puffer (siehe 5.6.4.1) bzw. in

Dissoziations-Puffer (siehe 5.6.4.2) resuspendiert. Nach der anschließenden Konzentrationsbestimmung durch Messung der A_{260} wurde das Material in geeignete Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.6.4 Präparation von ribosomalen Untereinheiten aus *S. cerevisiae* (Hefe)

Die Gewinnung ribosomaler Hefeuntereinheiten erfolgte durch Dissoziation von 80S-Heferibosomen unter geeigneten Ionenbedingungen. Die Untereinheiten konnten danach mit Hilfe einer präparativen Sucrosegradientenzentrifugation isoliert und anschließend aufkonzentriert werden. Zur Durchführung der Experimente wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet, da in der 3D-Partikelrekonstruktion des ribosomalen IRES-Wildtyp-Komplexes keine den ribosomalen P-Proteinen entsprechende Elektronendichte gefunden werden konnte. Die Ursache hierfür war wahrscheinlich die Behandlung mit mehreren Saccharosekissen sowie die damit verbundene längere Inkubation mit 500 mM KCL. Zwar wurde dadurch eine hohe Aufreinigung erzielt, jedoch wurden dadurch vermutlich die P-Proteine von der Ribosomenkernstruktur abgelöst. Daher wurde, um eine vollständige Ribosomenstruktur zu erhalten, das verwendete Protokoll (siehe 5.6.4.1) zur Gewinnung ribosomaler Hefeuntereinheiten für die Versuche mit den IRES-Mutanten "Phe" und Comp" modifiziert (siehe 5.6.4.2).

5.6.4.1 Präparation von ribosomalen Untereinheiten aus *S. cerevisiae* für den CrPV-IRES (Wildtyp)-Komplex

Als Ausgangsmaterial für die Präparation des Y80S-CrPV-IRES-WT – Komplexes dienten die ribosomalen Untereinheiten, die aus dem Hefestamm "YA2488" nach der Methode *Maag und Lorsch* (Maag et al., 2006) isoliert wurden. Dabei erfolgte der Zellaufschluss abweichend durch mehrmalige Einfrier- und Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff in Kombination mit mechanischem Zellaufschluss durch Mörsern des gefrorenen Materials. Die anschließende Puromycinbehandlung (Freisetzung von noch evtl. gebundenen Faktoren oder tRNA), unterstützung der Dissoziation in Untereinheiten) erfolgte mit 1 mM Puromycin und 1 mM GTP in Y80S-Puffer für 30 min bei 30°C . Nach der Einstellung von 500 mM KCL wurden die Ribosomen durch ein weiteres Saccharosekissen (30% Saccharose, 500 mM KCL, Y80S-Puffer) im MLS-50-Rotor für 17 h bei 70.000g und 4°C pelletiert. Dieses Pellet wurde erneut in Y80S-Puffer resuspendiert und ein weiteres Mal durch ein gleichartiges Saccharosekissen pelletiert. Nun wurde das Material in Y80S-Dissoziationspuffer aufgenommen. Zur Isolierung der

Untereinheiten wurden je 1800 pmol des Materials auf einen 10-30%igen Saccharosegradienten (in Dissoziationspuffer) aufgetragen und in einem SW28-Rotor bei 43.000g für 18 h und 4°C zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert, die Fraktionen mit den entsprechenden Untereinheiten jeweils vereinigt und im SW28-Rotor bei 90.000g für 44,5 h und 4°C pellettiert. Die Untereinheiten wurden in Y80S-Puffer resuspendiert.

5.6.4.2 Präparation von ribosomalen Untereinheiten aus *S. cerevisiae* für den Einfach-bzw. Doppelmутanten-CrPV-IRES-Komplex

Die pellettierten 80S-Ribosomen wurden in Dissoziationspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte wie in Abschnitt 5.6.3 beschrieben mit Glasperlen. Die anschließende Puromycinbehandlung erfolgte mit 1 mM Puromycin und 1 mM GTP in Y80S-Puffer für 15 min auf Eis und 10 min bei 37°C. Zur Isolierung der Untereinheiten wurden je 1350 pmol des Materials auf einen 10-30%igen Saccharosegradienten (in Dissoziationspuffer) aufgetragen und in einem SW28-Rotor bei 103.745g für 7 h und 4°C zentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert, die Fraktionen mit den entsprechenden Untereinheiten jeweils vereinigt. Zum Pufferaustausch und zur Aufkonzentrierung wurden je 4 ml der vereinigten Untereinheiten mit "Amicon Ultracentrifugal filtration device" YM-100-Ultrafiltrationssäulen auf 1 ml eingengt (~15 min / 5000g / 4°C), mit je 3x 3 ml Y80S-Puffer aufgefüllt und erneut filtriert. Am Ende der Prozedur wurde das Material auf 500 µl eingengt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Qualität der ribosomalen Untereinheiten wurde durch analytische Saccharosegradienten (siehe 5.5.4), durch Untersuchung der rRNA (siehe 5.5.8), durch Westernblot (siehe 5.5.3.4) und Immunoassay (siehe 5.5.6) sowie die Aktivität durch eine Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese (siehe 5.5.11.1) bestimmt.

5.6.5 Präparation von Ribosomen aus *Leporidae* (Kaninchen)

Die nach der Methode von *Bommer* (Bommer, 1997) isolierten und für die Versuche ausreichend stabilen Untereinheiten wurden freundlicherweise von Dr. Tanya Budkevitch zur Verfügung gestellt.

5.6.6 Präparation von Phe-tRNA^{Phe}

Ein wichtiger Bestandteil der untersuchten ribosomalen Komplexe ist ein Substrat des Ribosoms: die Aminoacyl-tRNA. Die Anlagerung an das Ribosom erfolgt als ternärer Komplex mit

aatRNA•eEF1A•GTP. Eine dauerhafte Anlagerung erfolgt nur bei Bindung einer kognaten tRNA. In dem Fall kommt es zur GTP Hydrolyse und zur Freisetzung von eEF1A•GDP+PPi.

Einzelne tRNAs wurden mit Hilfe eines Ansatzes aus ATP und der Synthetasen aus tRNA-freien S100-Fraktion aminoacyliert (Bommer, 1997; Triana-Alonso et al., 2000). Aminoacylierte tRNAs wurden von den deacylierten tRNAs mit Hilfe der Reversed-Phase-HPLC getrennt. Nur die gewünschte tRNA wird aminoacyliert und hat daher andere Elutionseigenschaften. So ist die Entfernung der kontaminierenden tRNAs möglich

Zur Präparation von Phe-tRNA^{Phe} wurde tRNA^{Phe} der Firma Sigma, Lot Nr. 124K12231, verwendet. Als Quelle für tRNA-Synthetasen diente E.coli-S100. Als S100 bezeichnet man den Überstand, der während der Ribosomenpräparation nach der Pelletierung der Ribosomen bei 100.000g gewonnen wurde. Zu dessen Aufreinigung wurden zunächst niedermolekulare Komponenten wie z.B. Aminosäuren durch 3x 45 min Dialyse (Spectra/Por Membran mit MGCO= 3500Da) gegen 100 Volumen Y80S-Puffer entfernt. In einem Batchverfahren mit steigendem Salzgehalt wurden mit Hilfe einer Whatman DE-52 Anionenaustauscher-Zellulose die bei einem pH-Wert von 7,6 negativ geladene Bestandteile, vorwiegend RNA einschließlich tRNA, aus der Lösung entfernt. Die S100-Aktivität wurde mit einer analytischen Aminoacylierung überprüft.

Zur präparativen Aminoacylierung wurden in einem Gesamtvolumen von 4,25 ml 75.000 pmol tRNA^{Phe}, 3 mM ATP, ein 3facher Überschuss an ¹⁴C-markiertem Phenylalanin (bezogen auf die tRNA^{Phe}), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer und 16%(v/v) S100 (E.coli) in Aminoacylierungspuffer verwendet.

Nachdem der Ansatz für 3 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/10 v/v 3 M NaAc (pH 5,2) gestoppt. Zur Entfernung der Proteine wurde eine dreimalige Phenolextraktion mit 1 v/v Phenol für eine Minute bei 4°C durchgeführt. Restspuren des Phenols in der Lösung wurden durch zweimalige Extraktion mit 1 v/v Chloroform entfernt. Das Material wurde mit Hilfe von 2,5fach v/v 100% EtOH bei -20°C Ü/N gefällt und am Morgen durch Zentrifugation für 1,5 h, 4°C und 10.000g im HB4-Rotor pelletiert. Nach Resuspendierung des Pellets in einem geeigneten Volumen an Wasser (UP) wurde die Konzentration mit Hilfe der Gleichung $1A_{260} = 1500 \text{ pmol/ml}$ photometrisch bestimmt. Der Gehalt an aminoacylierter tRNA^{Phe} wurde mit Hilfe einer kalten TCA-Fällung und anschließendem Glasfilterassay bestimmt. Aus 50 A_{260} (=75.000 pmol) tRNA^{Phe} konnten nach durchschnittlich 22% Aminoacylierung ca. 9000 pmol (=12%) Phe-tRNA^{Phe} hergestellt werden.

5.6.7 Präparation von AcPhe-tRNA^{Phe}

Die Aminogruppe der Aminosäure (Phenylalanin) an der Phe-tRNA^{Phe} kann mit Essigsäureanhydrid acetyliert werden (Haenni and Chapeville, 1966). Diese Modifikation entspricht der Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren und ist die Ursache dafür, das N-Acetylphenylalanyl-tRNA^{Phe} als Peptid-Strukturanalogon zur nicht-enzymatischen Bindung an die A-Stelle des Ribosoms fähig ist.

Als Ausgangsmaterial für die Präparation von [³H]AcPhe-tRNA^{Phe} diente [³H]Phe-tRNA^{Phe}, die entsprechend dem in Abschnitt 5.6.6 beschriebenen Vorgehen hergestellt wurde. Abweichend dazu wurde zur besseren Unterscheidbarkeit ein Tritium-(³H) Markierung genutzt. Aminoacylierte tRNA^{Phe} mit einer Konzentration von 9000 pmol/ml wurde mit 1/10 (v/v) 3 M NaAc (pH 5,2) vermischt. Im Abstand von 15 min wurde zu dem Ansatz 4x je 1/33 (v/v) Essigsäureanhydrid hinzugefügt und insgesamt für 60 min inkubiert. Das noch vorhandene Essigsäureanhydrid wurde durch Präzipitation der tRNA mit 2,5 (v/v) 100% EtOH bei -20°C Ü/N und anschließender Resuspendierung der tRNA in Wasser (UP) abgetrennt. Nicht-acetylierte, aminoacylierte tRNA^{Phe} war noch zu einem gewissen Anteil enthalten, konnte jedoch aufgrund ähnlicher Elutionseigenschaften nicht durch HPLC von acetylierten Aminoacyl-tRNA^{Phe} abgetrennt werden. Daher wurde sie durch eine umgekehrte Aminoacylierung enzymatisch deaminoacyliert. Die Aminoacyl-tRNA^{Phe} ist durch die chemische Modifikation vor der enzymatischen Deaminoacylierung geschützt. Für die Reaktion wurden in Aminoacylierungspuffer, 6 mM AMP, 6 mM PPI, ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer mit 20 µl pro 1500 pmol tRNA^{Phe} und 16% (v/v) S100 (E.coli) für 5 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der Proteine wurde eine dreimalige Phenolextraktion mit 1 v/v Phenol für eine Minute bei 4°C durchgeführt. Restspuren des Phenols in der Lösung wurden durch zweimalige Extraktion mit 1 v/v Chloroform entfernt. Nach Zugabe von 1/10 v/v 3 M NaAc (pH 5,2) erfolgte eine Präzipitation der tRNA mit Hilfe von 2,5fach v/v 100% EtOH bei -20°C Ü/N. Nach erfolgter Präzipitation wurde das Material durch Zentrifugation für 1,5 h, 4°C und 10.000g im HB4-Rotor pellettiert und in einem geeigneten Volumen an Wasser (UP) resuspendiert. Der Restgehalt an Essigsäureanhydrid sowie von Salzen wurde mit einer NAP-25 Gelfiltrationssäule nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Abtrennung von der Acetylaminoacyl-tRNA^{Phe} von der Deaminoacyl-tRNA^{Phe} erfolgte mittels HPLC. Die gewonnenen Fraktionen wurden auf ³H-Aktivität untersucht, die Fraktionen mit der höchsten Konzentration an Acetylaminoacyl-tRNA^{Phe} vereinigt und durch Ethanolpräzipitation aufkonzentriert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Der Gehalt an acetylaminoacylierter tRNA^{Phe} wurde mit Hilfe eines

TCA-Fällungsassays bestimmt. Aus 75.000 pmol tRNA^{Phe} konnten nach durchschnittlich 10% Aminoacylierung ca. 500 pmol / 6% AcPhe-tRNA^{Phe} isoliert werden.

5.6.8 Präparation von ribosomalem Hefe-80S-Wildtyp-CrPV-IRES-Komplex

Bei der Ermittlung der nativen Struktur eines ribosomalen Komplexes mit der Kryo-EM ist die höchstmögliche Beladung der ribosomalen Partikel mit ihren Liganden von größter Wichtigkeit (Blaha et al., 2000; Frank et al., 2000). Daher mussten die entsprechenden Bindungsbedingungen, z.B. durch systematische Veränderung der Ionenkonzentration, optimiert werden. Die Hauptionen dabei waren Mg²⁺, K⁺ und die Polyamine Spermin und Spermidin. Die Anwesenheit der Liganden (IRES + aa-tRNA^{Phe}) wurde mit Hilfe ihrer radioaktiven bzw. fluoreszierenden Markierung überprüft.

Die Komplexbildung aus ribosomalen Hefeuntereinheiten und CrPV-IRES-WT ist ohne die Anwesenheit von Initiationsfaktoren möglich. Dazu wurden Ionenbedingungen optimiert, bei denen die Untereinheiten ohne die Anwesenheit von IRES-RNA nur in geringem Maße spontan zu Y80S assoziieren, während in Anwesenheit von IRES-mRNA ein hoher Anteil an 80S zu beobachten war. Daher wurden die Magnesium-, die Kaliumacetat-, die Kaliumchloridkonzentration sowie die Menge der eingesetzten CrPV-IRES-RNA optimiert. Zur Komplexbildung wurden 146 pmol der CrPV-IRES-RNA zusammen mit 292 pmol Y40S und 146 pmol Y60S in Bindungspuffer bei leichtem Schwenken für 5 min bei 30°C inkubiert.

Der Komplex wurde mittels Saccharosegradientenzentrifugation (10-30% Saccharose in Bindungspuffer) im MLS-50-Rotor bei 155.000g und 4°C für 2 h und anschließender Fraktionierung isoliert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Zentrifugation im MLA-80-Rotor für 17 h bei 122.000g und 4°C pellettiert. Das Material wurde in Y80S-Puffer resuspendiert, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Durchführung der kryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei -80°C gelagert. Die Qualität des Komplexes wurde durch einen analytische Saccharosegradienten (siehe 5.5.4) sowie durch Untersuchung der rRNA (siehe 5.5.8) bestimmt. Die Endkonzentration des Komplexes betrug 1µM.

5.6.9 Präparation von ribosomalem Hefe-80S-Komplexen mit mutierten CrPV-IRES-Konstrukten

Die Präparation der Komplexe Y80S-CrPV-IRES-Phe (Einfachmutante) /-Comp (Doppelmutanten) (siehe Kapitel 5.7.1) erfolgte aufgrund der Instabilität der isolierten ribosomalen Hefeuntereinheiten bei den nachfolgenden Untersuchungen zur Translation nicht mit isolierten Untereinheiten, sondern wurde durch ionenbedingte Dissoziation von Y80S und anschließende IRES-vermittelte Reassoziierung der ribosomalen Untereinheiten im gleichen Reaktionsansatz durchgeführt. Dadurch wurde die Zahl der notwendigen, aber die Stabilität der Ribosomen negativ beeinflussende Arbeitsschritte reduziert. Die Dissoziation von 80S-Heferibosomen erfolgte bei einer Konzentration von 90-180nM in Y80S-Dissoziationspuffer bei einer Magnesiumkonzentration von 1 mM und einer Inkubation von 5 min bei 4°C auf Eis. Sie wurde durch eine analytische Saccharosegradientenzentrifugation einer Probe vor IRES-Zugabe kontrolliert. Die Reassoziierung von 80S-Heferibosomen erfolgte bei einer Konzentration von 90-180nM in Y80S-Dissoziationspuffer bei einer Magnesiumkonzentration von 3 mM, einer IRES-Konzentration von 720nM und einer Inkubation von 1 min bei 30°C im Inkubationsschüttler bei 700 rpm. Der Komplex wurde mittels Saccharosegradientenzentrifugation (10-30% Saccharose in Bindungspuffer) im MLS-50-Rotor bei 155.000g und 4°C für 2 h und anschließender Fraktionierung isoliert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Zentrifugation im MLA-80-Rotor für 17 h bei 122.000g und 4°C pellettiert. Das Material wurde in Y80S-Puffer resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Qualität des Komplexes wurde durch einen analytischen Saccharosegradienten (siehe 5.5.4) sowie durch Untersuchung der rRNA (siehe 5.5.8) bestimmt. Die Endkonzentration der Komplexe betrug ca. 1,6µM.

5.6.10 Präparation von ribosomalen Kaninchen-80S-Komplexen mit mutierten CrPV-IRES-Konstrukten

Die Eigenschaft der CrPV-IRES, an evolutionär konservierte Regionen des Ribosoms zu binden erlaubt nicht nur die Bindung an Heferibosomen, sondern auch an Ribosomen höherer Organismen wie Mammalia (Thompson et al., 2001). Für die Experimente konnten daher ribosomale Untereinheiten aus Kaninchen verwendet werden. Die Präparation der RRL-CrPV-IRES-Phe /-Comp-Komplexe erfolgte analog der Präparation von Y80S-CrPV-IRES-WT (siehe 5.6.8). Die nach der Methode von (Bommer, 1996) isolierten und für die Versuche ausreichend stabilen Untereinheiten wurden freundlicherweise von Dr. Tanya Budkevitch zur Verfügung

gestellt. Im Unterschied zum genannten Vorgehen wurden je 900 pmol RRL-60S und 1350 pmol RRL-40S mit 3600 pmol CrPV-IRES reassoziert. Das Material wurde über einen präparativen Saccharosegradienten (10-30% in Bindungspuffer) im SW28-Rotor bei 90.000g für 7 h bei 4°C von nicht-komplexierten Bestandteilen getrennt und mit anschließender Fraktionierung isoliert. Die Komplexhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch Zentrifugation im MLA-80-Rotor für 17 h bei 122.000g und 4°C pellettiert. Das Material wurde in Y80S-Puffer resuspendiert, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Qualität des Komplexes wurde durch einen analytische Saccharosegradienten (siehe 5.5.4) sowie durch Untersuchung der rRNA (siehe 5.5.8) bestimmt. Die Endkonzentration der Komplexe betrug ca. 0,7µM.

5.7 Molekularbiologische Methoden

5.7.1 IRES-Konstrukte

Zur Untersuchung der Codon-spezifischen Bindung am CrPV-IRES wurden neben dem Wildtyp auch mutierte Formen der CrPV-IRES-mRNA *de novo* synthetisiert. Für die Versuche wurden folgende CrPV-IRES hergestellt: CrPV-IRES-WT (Wildtyp), CrPV-IRES-Phe (Einfachmutante), CrPV-IRES-Comp (Doppelmutante). Alle Elemente wurden auf die gleiche Art und Weise erzeugt, es wurden jedoch jeweils unterschiedliche Primerkonstrukte verwendet.

Dabei wurde bei der mutierten CrPV-IRES-Phe das für die Aminosäure Alanin spezifische Codon "GCU" (Position 6217-6219, Abb. 14 A) gegen ein Phenylalanin-spezifisches Codon "UUU" getauscht (siehe Abb. 14 B). Durch diese Mutation wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Uracil (Pos. 6186, Abb. 14 A) und Guanosin (Pos. 217, Abb. 14 B) beeinflusst und damit möglicherweise die Sekundärstruktur und damit die Funktionsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp verändert (Kanamori and Nakashima, 2001). Daher wurde bei zweiten Mutante (CrPV-IRES-Comp) zusätzlich das Nukleotid Uracil an Pos. 6186 gegen Guanosin getauscht, um diese Brückenbindung zu ermöglichen (siehe Abb. 14 C). Das Phenylalanin-spezifische Codon wurde gewählt, um eine Vergleichbarkeit mit etablierten Verfahren wie z.B. der Poly(U)- Synthese (Traub and Nomura, 1968) zu ermöglichen. Das Vorhandensein der Mutationen in den Plasmidkonstrukten wurde durch Sequenzierung bestätigt.

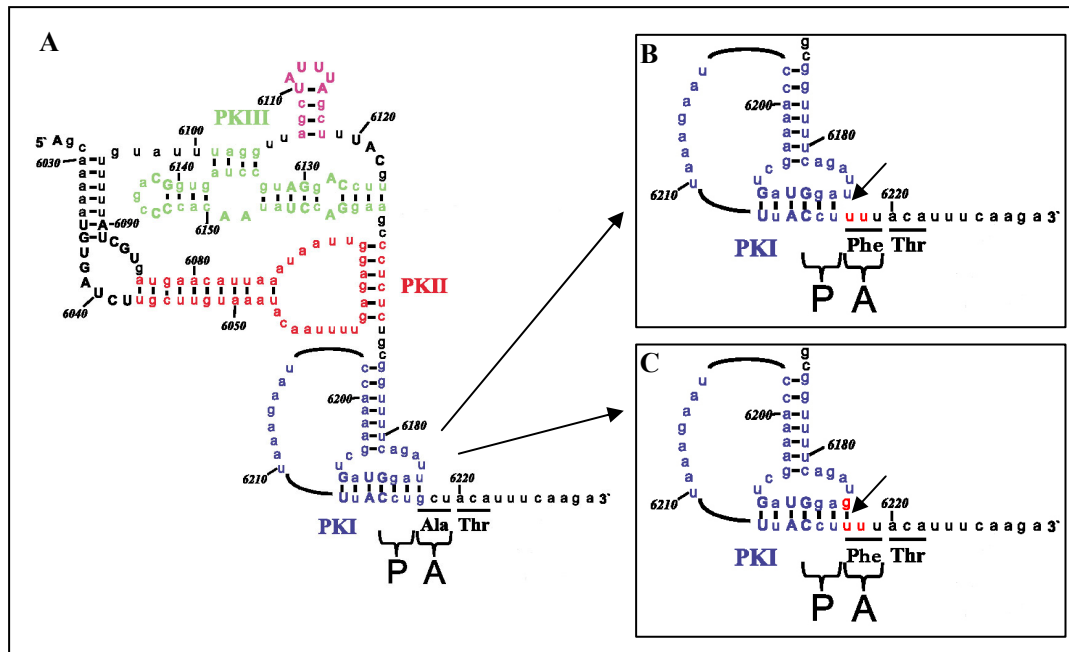


Abb. 14: Die CrPV-IGR-IRES Sekundärstruktur

A) die Sekundärstruktur von CrPV-IRES – Wildtyps; blau: Pseudoknoten I (PK I); rot: Pseudoknoten II (PKII); grün: Pseudoknoten III (PKIII); magenta: Haarnadelstruktur I (SL1); schwarz: helikale Regionen; P und A : Triplet-Sequenzen, welche die ribosomalen P und A-Bindungsstellen am 40S + 60S besetzen, unterstrichen: die ersten zwei Aminosäure-spezifischen Codons für die Aminosäuren des viralen capsid-Proteins (Alanin und Thyrosin)

B) vergrößerte Darstellung des Pseudoknoten I mit mutiertem Codon (GCU bzw. Alanin gegen UUU bzw. Phenylalanin) und daraus resultierender fehlender Brückenbindung (Pfeil)

C) vergrößerte Darstellung des Pseudoknoten I mit mutiertem Codon (GCU bzw. Alanin gegen UUU bzw. Phenylalanin) sowie zweitem Mutationsort zur Wiederherstellung der nativen Brückenbindung (Pfeil)

Zur Herstellung der benötigten mRNA-Konstrukte wurden spezielle PCR-Primer verwendet. Das der IRES entsprechende PCR-Produkt wurde unter Verwendung von Endonukleasen in ein *pUC18NdeI* -Plasmid (Abb. 17) eingefügt. Bei diesem speziellen Plasmid unterliegt die Genkontrolle einem speziell für die *in vitro* Transkription optimierten Promotor (T7). Die *in vitro* Synthese der RNA wurde mit Hilfe einer "run-off"-Transkription mit einer T7 RNA Polymerase durchgeführt. Das Transkriptionsprodukt wurde danach Aufgereinigt und zur leichteren Detektierbarkeit mit einer 3'-Fluoreszenzmarkierung versehen.

5.7.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Erzeugung des DNA-Konstruktes wurde die Methode der PCR genutzt. Die Polymerase-Kettenreaktion PCR (*polymerase chain reaction*) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Im Reaktionsansatz werden geringe Mengen Matrizen DNA (*Template*), Desoxyribonukleotid-Triphosphate, komplementäre Oligonukleotide (*Primer*) und eine thermostabile DNA-Polymerase als synthetisierendes Enzym, z.B. Taq-Polymerase oder Pwo-Polymerase, gemischt. Die PCR-Reaktion beginnt mit einer initialen Denaturierung des

Templates, gefolgt von einer zyklischen Reaktionsfolge. Jeder Zyklus beginnt mit einer erneuten Denaturierung, gefolgt von der Anlagerung der Oligonukleotid-Primer (Annealing) an das Template und der Synthesephase. In der Synthesephase erfolgt die sequenzspezifische Synthese des neuen DNA Stranges. Nach Abschluss der vorgesehenen Anzahl von Zyklen wird eine verlängerte Synthesephase eingeschoben, um unvollständige Produkte zu vervollständigen. Durch Kühlung auf vier Grad Celsius wird die Reaktion beendet.

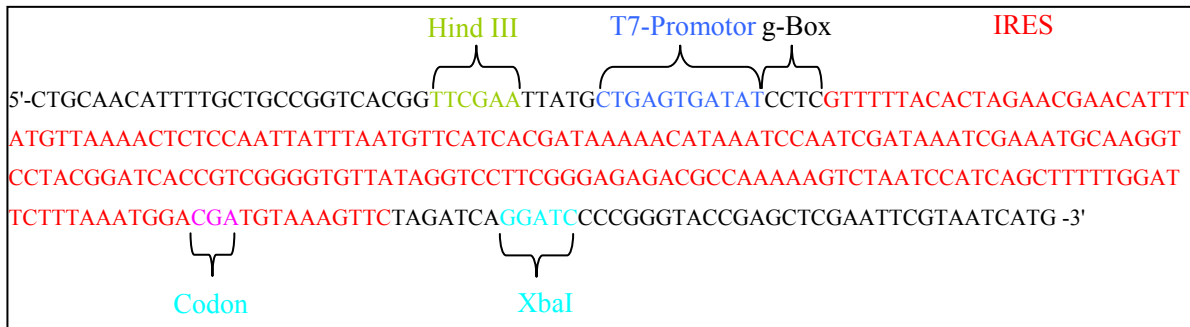


Abb. 15: Die Primärstruktur des CPV-IRES-WT-DNA-Konstruktes, markiert sind relevante Strukturelemente

Quelle: Datenbank NCBI Nr. BD177018

Für die Herstellung der CPV-IRES-Konstrukte mit 244bp wurde die folgende PCR-Strategie verwendet:

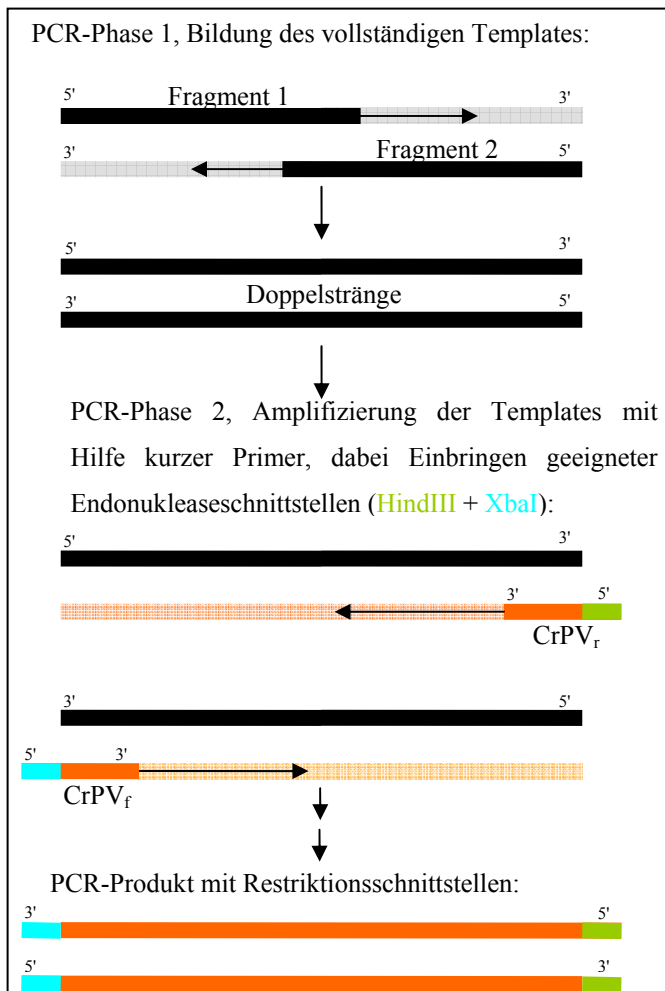


Abb. 16: Schematische Übersicht der Herstellung der CrPV-IGR-IRES-Konstrukte mit Hilfe der PCR

Bei der Klonierung der genannten Konstrukte wurde eine ineinander "verschachtelte" PCR-Methode angewandt, bei der zunächst der Doppelstrang der längeren Primer (CPVfragx) komplettiert wurde, damit aus diesen nach erneutem Aufschmelzen der DNA mit Hilfe kleinerer Primer (CPVf und CPVr) das vollständige Konstrukt inklusive Restriktionsschnittstellen gebildet werden konnte.

Für die Versuche wurde das "*Expand High Fidelity PCR-System*" genutzt. Es wurde zunächst die Fragment und Primer-Konzentration in einem Bereich zwischen 6 und 60nM optimiert. Der Reaktionsansatz Mix I bestand aus 18 µl Wasser (UP), 1 µl (10mm) dntp-Mix und je 1,5 µl der jeweiligen Fragmente und Primer. Mix II bestand aus 19,25 µl Wasser (UP), 5 µl 10x Puffer und 0,75 µl Taq-PFX-Polymerase. Das PCR-Programm war wie folgt: 2 min / 94°C, 25x 15s/94°C + 30S 60°C + 45S 72°C, 7 min 72°C, hold 4°C. Das Ergebnis wurde mit einem 2% TBE-Agarosegel bestimmt. Die weiteren Versuche wurden mit einer Konzentration von 6 mM durchgeführt. Weiterhin wurde die 10fach Pufferkonzentration in einem Bereich zwischen 1fach – 2,5fach untersucht. Eine 1,5fache Pufferkonzentration war für weitere Versuche am besten geeignet. Dabei wurde das PCR-Programm modifiziert: 2 min / 94°C, 5x 15s/94°C + 30S 65°C + 45S 68°C, 15x 15s/94°C + 30S 60°C + 45S 68°C, 7 min 72°C, hold 4°C. Nun wurde eine präparative PCR durchgeführt. Die Produkte wurden mit dem "*Quiaquick PCR Purification Kit*" entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Das Ergebnis wurde zusammen mit einer Negativ-Kontrolle ohne Primer mit einem 2% TBE-Agarosegel überprüft.

Die Herstellung der IRES-Konstrukte erfolgte sowohl für den Wildtyp "CrPV-IRES-WT" als auch für die Mutanten "CrPV-IRES-Phe" bzw. "CrPV-IRES-Comp" mit den unten genannten Primern (Tab. 8).

Für die Amplifikation der IRES-kodierenden Bereichs aus CrPV mittels PCR und anschließender Klonierung des PCR Produkts in den Expressionsvektor pUC18NdeI wurden auf der Basis der Gensequenz des CrPV folgende Primer ausgewählt (rote Farbmarkierung zeigt die Orte der Sequenzänderungen, in grün bzw. türkis die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen):

CrPV-Frag. 1:

5'-atacactactatagagcaaaaatgtgatcttgcctgttaaatacaatcttgagaggtaataaattacaagt
agtgcattttgtatttaggttagctatttagctttacgttccaggatgcctagtgccagccccac

CrPV-Frag. 2:

5'-tcttgaaatgtagcaggtaaatttcttaggttttcgactacctaactgaaaaaccgcagagagggcttctg
gatattgtggggctgccactaggcatcctggaacgtaaagc

CrPV-Frag. 3:

5'-tcttgaaatgtaaaggtaaatttcttaggttttcgactacctaactgaaaaaccgcagagagggcttctg
gatattgtggggctgccactaggcatcctggaacgtaaagc

CrPV-Frag. 4:

5'-tcttgaaatgtaaaggtaaatttcttaggttttcgactacctcactgaaaaaccgcagagagggcttctg
gatattgtggggctgccactaggcatcctggaacgtaaagc

CrPV _f :	5'-ccc agctt aatacgactcactataggagcaaaaatgtgatcttgc
CrPV _r :	5'-tcc ctagat cttgaatatag cg aggtaaattcttaggttttcg
CrPV _{Fr} :	5'-tcc ctagat cttgaatatata aa aggtaaattcttaggttttcg
CrPV _{FCr} :	5'-tcc ctagat cttgaatatata aa aggtaaattcttaggttttcg

Tab. 8 Verwendung der einzelnen Primer / Fragmente bei der Klonierung der verschiedenen CPV-IRES

	CrPV-IRES-WT	CrPV-IRES-Phe	CrPV-IRES-Comp
CrPV-Fragment 1	X	X	X
CrPV-Fragment 2	X	-	-
CrPV-Fragment 3	-	X	-
CrPV-Fragment 4	-	-	X
CrPV _f	X	X	X
CrPV _r	X	-	-
CrPV _{Fr}	-	X	-
CrPV _{FCr}	-	-	X

5.7.3 Restriktionsverdau von DNA

Unter Restriktionsverdau versteht man die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen. Durch Restriktionsendonukleasen können je nach verwendetem Enzym 3' oder 5' Überhänge (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends) erzeugt werden. Für Klonierungen werden bevorzugt Restriktionsendonukleasen verwendet, die Überhänge erzeugen, da diese eine orientierungsspezifische Ligation des zu klonierenden Fragments (Insert) mit dem Zielplasmid (Vektor) erleichtern. Die Aktivität der Restriktionsendonukleasen ist in Unit (U) angegeben. Ein U ist definiert als die Menge Enzym die innerhalb einer Stunde 1 µg Standard-DNA (z.B.: Genom des Phagen Lambda (λ)) unter Standardbedingungen (37°C, Reaktionspuffer) vollständig verdaut.

Für die Versuche wurden die Restriktionsenzyme *Hind III* und *XbaI* verwendet. Um passende "sticky end" Schnittstellen zu erzeugen, wurde der Plasmidvektor *pUC18 NdeI* ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten.

Als Vorbereitung für die Restriktion wurden sowohl die Plasmidvektoren als auch die DNA-Konstrukte mit einer 0,8% TAE-Agarosegelelektrophorese isoliert und aufgereinigt. Die unter UV-Licht sichtbaren Produktbanden wurden ausgeschnitten und mit dem "Quiaquick Gel Extraction Kit" dem Herstellerprotokoll folgend aufgereinigt.

5.7.4 Ligation

Unter Ligation versteht man ein Verfahren, bei dem das 3'-Hydroxy und das 5'-Phosphat-Ende einer Nukleinsäure mit Hilfe eines Enzyms, einer Ligase, verbunden werden. Hierbei werden das zu klonierende DNA-Fragment (Insert) und das Plasmid (Vektor) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen vorbereitet und über präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt. Die gereinigten Produkte (Insert und Vektor) werden in einem molekularen Verhältnis von 1:1 bis 4:1 (Insert zu Vektor) eingesetzt.

Die Ligation der DNA-Konstrukte mit dem Plasmidvektor pUC18 erfolgte mit ca. 250ng Vektor, ca. 200ng Konstrukt, 200U Ligase, 2 µl 10x Puffer, 9,5 µl Wasser (UP) in einem Volumen von 20 µl und wurde für 1 h bei 14°C inkubiert. Zur Kontrolle des Ligationserfolges wurde zusätzlich ein Ansatz ohne DNA-Konstrukt pipettiert. Bei erfolgter Ligation geht eine plasmidkodierte Resistenz verloren, was bei transformierten Zellen mit einem Selektivmedium überprüft werden kann. Es ist in diesem Fall kein Wachstum erkennbar. Ein weiterer Test auf Insert-Anwesenheit erfolgte mittels 2%-TBE-Agarosegelelektrophorese eines Plasmid-PCR mit den Primern CPV_f bzw. CPV_{Fr} (siehe 5.7.1).

Für die Klonierung der CrPV-IRES im E.coli-Stamm *INV1* wurde der Plasmidvektor *pUC18NdeI* verwendet:

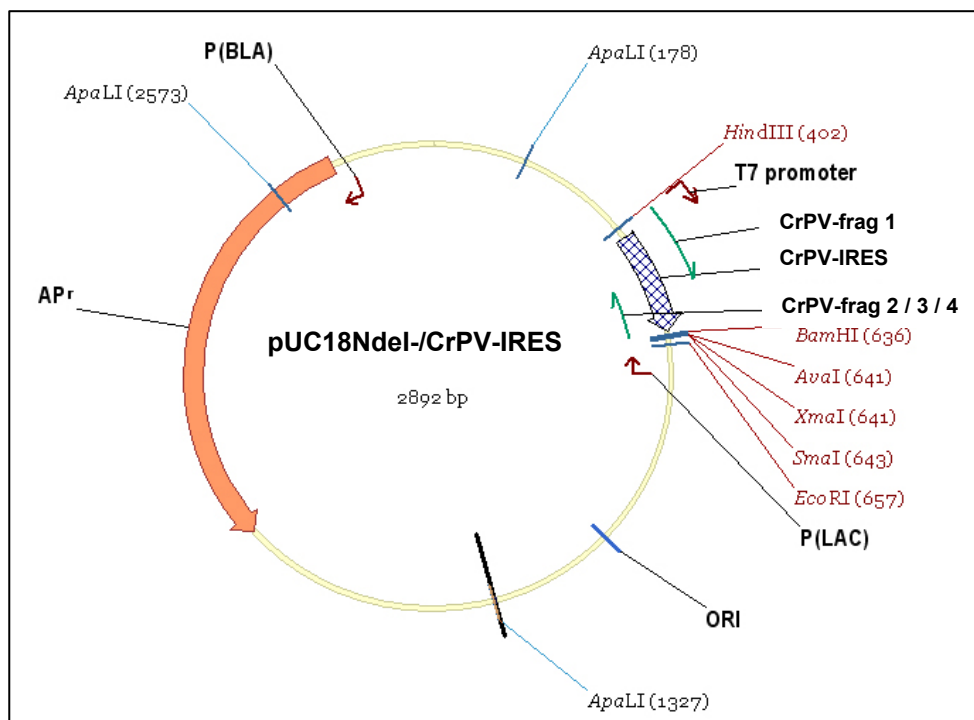


Abb. 17:
Plasmidkarte
"pUC18NdeI-CrPV-
IRES" mit
 Restriktions-
 schnittstellen und den
 Positionen der PCR-
 Primer

5.7.5 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von freier Plasmid-DNA in Bakterien. Ziel ist es, eine größere Menge an Plasmid-DNA zu erzeugen. Die Transformation erfolgte durch eine 30 min Inkubation von 20 µL Ligationsansatz mit ca. 100 µl transformationskompetenter *INVI-E.coli*-Zellen auf Eis. Anschließend folgte eine genau 60sekündige Inkubation bei 42°C und die sofortige Zugabe von 250 µl SOC-Medium. Der Ansatz wurde danach für ca. 45 min im Horizontalschüttler bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

5.7.5.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte mit Hilfe des *Invitrogen pet Directional TOPO Expression Kits*. Dazu wurde mit einer sterilen Impföse Material aus einem *INVI*-Glycerinstocks in 5 ml flüssiges LB-Medium überführt und Ü/N bei 37°C inkubiert. 100 ml einer 1:100-Verdünnung wurden bei 37°C inkubiert und nach Erreichen einer $A_{600} = 0,35$ für 10 min in Eiswasser abgekühlt. Nach Zentrifugation für 7 min/1700g/4°C wurde das Pellet in 30 ml 80 mM $MgCl_2$ / 20 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1100g/10 min/4°C, hier wurden die Zellen in 4 ml 100 mM $CaCl_2$ / 15% Glycerin resuspendiert und in je 50 µl aliquotiert. Dem schnellen Einfrieren in flüssigem Stickstoff folgte die Lagerung bei -80°C.

5.7.6 Plasmidpräparation

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde je nach benötigter Plasmidmenge der *Invisorb Spin Plasmid Mini Kit*, der *BioRad Plasmid Midi Kit* oder der *Qiagen Plasmid Maxi Kit* verwendet. Die Isolierung der Plasmide basiert auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim, 1983). Nach Aufschluss der Bakterienzellen erfolgt die Adsorption der Plasmid-DNA an Silikagel-Säulen (Miniprep) oder Anionentauscher-Säulen (Midi und Maxi prep). Die Reinigung der Plasmid-DNA wird durch Waschen der Säulen erzielt. Bei der Miniprep erfolgt die Elution unter geringer Salzkonzentration (Wasser oder 10 mM Tris-HCl, pH 8,5), das erhaltene Eluat enthält das gereinigte Plasmid. Bei Verwendung der Anionentauschersäulen (Midi und Maxi prep) erfolgt die Elution unter Hochsalzbedingungen (Puffer QF). Die Plasmid-DNA wurde durch Isopropanolfällung aus dem Eluat gefällt. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. 2 ml einer 5 ml LB-Übernachtskultur wurden für die Plasmid-Minipräp, 50 ml LB-Übernachtskultur für die Midipräp und 200 ml Übernachtskultur mit einer $A_{600} \sim 2,0$ für die Maxipräparation verwendet.

5.7.7 Herstellung von CrPV-IRES-mRNA

5.7.7.1 *In vitro*-Transkription von CrPV-IRES mittels T7-Polymerase

Die Transkription erfolgt durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen (Transkriptasen). Die Transkriptasen aus Phagen, wie T7, T3 oder SP6 eignen sich besonders für *in vitro* Transkription, da sie nur aus einer Untereinheit bestehen und somit leichter zu Isolieren und Reinigen sind. Phagen-Transkriptasen zeichnen sich außerdem durch eine hohe Prozessivität aus. Als Template können PCR Produkte und Plasmide, die mit einem entsprechenden Promotor versehen wurden, eingesetzt werden. In den durchgeführten Versuchen wird linearisierte Plasmid-DNA in der so genannten run-off-Transkription verwendet (Bommer, 1996). Das Plasmid wird durch Verwendung eines Restriktionsenzym direkt hinter dem zu transkribierenden Bereich geöffnet. Die T7-Polymerase bindet an den T7-Promotor und transkribiert die dahinter liegende Sequenz. Da das Plasmid hinter der Zielsequenz zerschnitten wurde, fällt die Polymerase vom DNA-Strang ab und kann wieder mit der Polymerase-Reaktion beginnen (*run off*-Transkription).

Zur Präparativen Isolierung von CrPV-IRES wurden je 7 µg des jeweiligen Plasmids mit Restriktionsenzymen BamHI bzw. XbaI geschnitten. Der Erfolg der Restriktion wurde mit einem 2 % Agarose-TAE-Gel untersucht. Mit einem T7-Megashort-Kit wurde nach Herstellerprotokoll die sogenannte *Runoff* – Transkription durchgeführt. Dazu wurden je 40 µl 10x-Puffer und ATP-, GTP-, CTP-, UTP-Nukleotidlösung, 7 µg (=160 µl) des jeweiligen Plasmids sowie 40 µl T7-Enzymmix für 3 h bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden dem Ansatz nach 1 h 3 µl Probe entnommen und mit einem 4% PAA-7M Harnstoffgel in TBE-Puffer untersucht. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA durch eine 15minütige Inkubation bei 37°C mit DNase abgebaut. Zur Aufreinigung des Ansatzes wurde das Ambion MegaClear-Kit nach Herstellerangaben genutzt. Die Ausbeute betrug ca. 8000 pmol.

Das CrPV-IRES-WT-RNA-Konstrukt wies die folgende Primärstruktur auf:

```
CCCAGCUUAAUACGACUCACUAUAGGAGCAAAAUGUGAUCUUGCUUGUAAAUAUAAUUUUGAG
AGGUUAAUAAAUUACAAGUAGUGCUAUUUUUGUAUUUAGGUUAGCUAUUUAGCUUUACGUUCCAG
GAUGCCUAGUGGCAGCCCCACAAUAUCCAGGAAGCCUCUCUGCGGUUUUCAGAUUAGGUAGUCG
AAAACCUAAGAAAUUUACCUUUACAUUUCAAGAUCUAGAGGAUCC
```

Das CrPV-IRES-Phe-RNA-Konstrukt wies die folgende Primärstruktur auf:

```
CCCAGCUUAAUACGACUCACUAUAGGAGCAAAAUGUGAUCUUGCUUGUAAAUAUAAUUUUGAG
AGGUUAAUAAAUUACAAGUAGUGCUAUUUUUGUAUUUAGGUUAGCUAUUUAGCUUUACGUUCCAG
GAUGCCUAGUGGCAGCCCCACAAUAUCCAGGAAGCCUCUCUGCGGUUUUCAGAUUAGGUAGUCG
AAAACCUAAGAAAUUUACCUUUACAUUUCAAGAUCUAGAGGAUCC
```

Das CrPV-IRES-Comp RNA-Konstrukt wies die folgende Primärstruktur auf:

CCCAGCUUAAUACGACUCACUAUAGGAGCAAAAUGUGAUCUUGCUUGUAAAUAACAUUUUGAG
 AGGUUAAUAAAUAACAAGUAGUGCUAUUUUUGUAUUUAGGUUAGCUUUUAGCUUUACGUUCCAG
 GAUGCCUAGUGGCAGCCCCACAAUAUCCAGGAAGCCUCUCUGCGGUUUUCAGAUAGGUAGUCG
 AAAAACCUAAGAAAUUUACCUUUACAUUUCAAGAUCUAGAGGAUCC

5.7.7.2 3'-Fluoreszenzmarkierung von CrPV-IRES

Zum Nachweis der IRES-Anwesenheit im ribosomalen Komplex wurde das 3'-Ende der mRNA mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen. Dabei wurde das 3'-Ende mit Natriumperjodat zu einem Dialdehyd oxydiert. Der Überschuss des Oxydationsmittels wurde durch Zugabe von Natriumsulfit reduziert. Durch eine Kondensationsreaktion von Carbacid und dem Dialdehyd wurde Fluorescein-5-thiosemicarbacid kovalent gebunden. Durch Kombination von photometrischer Konzentrationsbestimmung und Fluoreszenzmessung konnte die Effizienz der Markierung ermittelt werden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Zu der mRNA wurden in einer 100 mM NaAc-Lösung mit pH 5,5 ein 10facher Volumenüberschuss an Natriumperjodat hinzugegeben und bei 25°C für 90 min im Dunkeln inkubiert. Nach erfolgter Oxydation wurde das Oxydationsmittel durch Zugabe von 20fachem Überschuss Natriumsulfit während einer 15minütigen Inkubation bei 25°C reduziert. Die Bindung des Fluorescein-5-thiosemicarbacids (100 mM in HEPES, pH 8,0) erfolgte bei einem 30fachen Volumenüberschuss (bezogen auf mRNA), einer Temperatur von 37°C innerhalb von 3 h im Dunkeln.

Die mRNA wurde anschließend durch Zugabe von 1/10 v/v 8M LiCl und 2,5 v/v 100% EtOH bei -20°C Ü/N gefällt und durch Zentrifugation bei 4°C / 13.000g für 20 min pelletiert. Das Pellet wurde dreimal mit 70% EtOH gewaschen und anschließend in Wasser (UP) resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Messung der A_{260} mit Hilfe folgender Umrechnung: $1A_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$, $1 \text{ pmol} = 0,083 \mu\text{g}$.

Die Bestimmung der Markierungseffizienz erfolgte zusätzlich photometrisch durch Vergleich des Quotienten aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der Nukleotide ($252,54 \cdot 10^4 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) und der des FTS ($78.500 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) mit dem Quotienten aus der Absorbionsmessung bei 260 nm (Absorbionsmaximum Nukleotide) und 448/480 nm (Absorbionsmaximum Chromophore). Es konnte eine Markierungseffizienz von durchschnittlich 50 % erreicht werden.

5.8 Kryo-Elektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist eine Betriebsart für Elektronenmikroskope, die eine direkte Abbildung von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen ermöglicht. Dabei wird mittels einer stromdurchflossenen Kathode und einer gelochten Anode ein Elektronenstrahl erzeugt, der das zu untersuchende Objekt durchdringt. Typische Beschleunigungsspannungen von TEM sind 80 kV bis 300 kV. Der Elektronenstrahl wird wie in der Lichtmikroskopie gebündelt, anstelle optischer Linsen kommen hierfür elektromagnetische Spulen zum Einsatz (siehe Abb. 18):

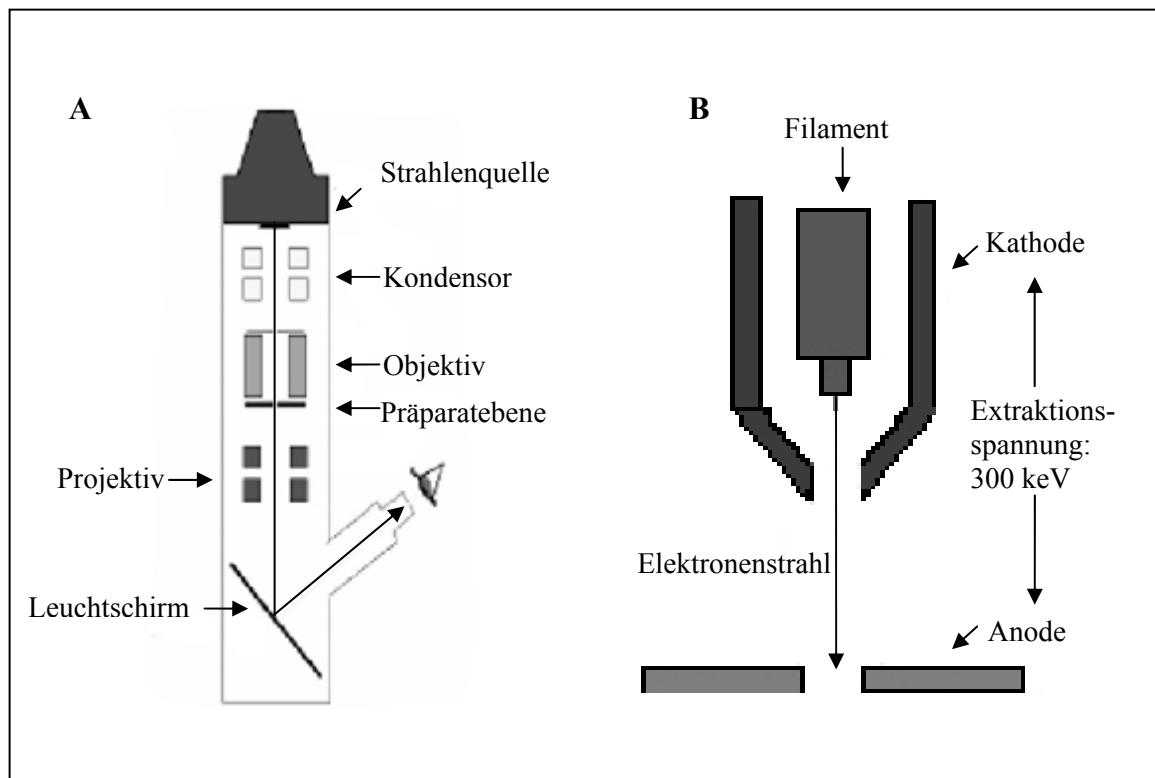


Abb. 18: A) schematischer Aufbau des TEM; B) Prinzip der Elektronenstrahlerzeugung

Nach Durchtritt durch das Präparat werden die gestreuten Elektronen durch ein Linsensystem (Projektiv) vergrößert und auf einen fluoreszierenden Schirm oder einen Photofilm gelenkt. Die elektronenmikroskopischen Bilder (Mikrographen) sind schwarzweiß, der Schwärzungsgrad zeigt den Grad der Elektronenabsorption an.

Beim Durchtritt durch das Präparat werden die Elektronen, abhängig von der Elektronendichte der Atome im Präparat, abgelenkt. Da biologische Objekte meist aus Atomen niedriger Ordnungszahl bestehen (C, O, N, H) ist die Ablenkung und somit der Kontrast gering.

Beim Auftreffen der Elektronen auf die Probenatome kann es bei der TEM zu folgenden Wechselwirkungen kommen:

- a. unelastische Streuung: Elektronen sind durch einen Verlust an kinetischer Energie und einer geringen Abweichung aus ihrer Bahn charakterisiert. Diese können nicht zur Gewinnung von Bildinformationen genutzt werden.
- b. elastische Streuung: die Elektronen verlieren nur wenig oder keine Energie und werden durch elektromagnetische Interaktion aufgrund des Coulomb'schen Potentials der Probenatome von ihrer Bahn abgelenkt. Typische Beugungswinkel liegen im Bereich von ca. 0,1 rad.

Die meisten der Elektronen, die für das hochauflösende Signal sorgen, entstehen durch elastische Streuung, bei der nur die Richtung und nicht die Energie der Elektronen verändert wird. Ein kleiner Teil der Elektronen überträgt jedoch ihre Energie durch unelastische Streuung an die Probe. Diese Energie summiert sich auf und führt durch die Zerstörung molekularer Bindungen zu einer irreversiblen Beschädigung der Probe. So kann bei einer Dosis von $20\text{e}^-/\text{\AA}^2\cdot\text{s}$ der zur Datengewinnung genutzte Bereich eines Grids nicht für eine zweite Aufnahme genutzt werden. Die Kalibrierung des Elektronenstrahls sowie das Fokussieren vor der Aufnahme erfolgt daher in einem Bereich neben dem eigentlichen Messpunkt. Zur Aufnahme hochauflösender Bildinformationen bei 300 keV können daher als Kompromiss zwischen Informationsgewinn und gleichzeitiger Zerstörung der Probe nur "low dose"-Bedingungen mit nur ca. 20 Elektronen / $\text{\AA}^2\cdot\text{s}$ verwendet werden. Eine Folge dieser geringen Dosis ist ein geringes Signal-zu Rausch-Verhältnis.

Die Kryo-Elektronenmikroskopie (KEM) ist eine Spezialform der Transmissions-elektronenmikroskopie, bei der sowohl die Probe als auch Teile des Mikroskops mit Hilfe von flüssigem Stickstoff bei ca. -192°C tiefgekühlt werden.

Um für die Einzelpartikelrekonstruktion mit der KEM geeignet zu sein, muss die Probe folgende Eigenschaften aufweisen:

- eine möglichst hohe Homogenität
- in wässriger Lösung, frei von den Kontrast negativ beeinflussenden Stoffen wie z.B. Saccharose oder Glycerin
- ein Molekulargewicht von min. 200kDa
- eine Maximale Abmessung von 1 μm
- eine Mindestmaterialmenge von $1\mu\text{g}$
- eine Mindestkonzentration von $0,03\text{ pmol} / \mu\text{l}$
- ein Mindestvolumen von $3,5\ \mu\text{l} / \text{Grid}$
- eine Mindesthaltbarkeit der Probe nach dem Auftauen bei 4°C von 5-10 min

Die native Struktur biologischer Moleküle kann nur im vollständig hydratisierten Zustand untersucht werden. Da im EM-Vakuum eine störende Evaporation des Wassers auftritt, muss die Probe getrocknet oder eingefroren werden. Ein Einfrieren hat neben dem Erhalt der Hydrathülle folgende Vorteile: Schutz der Probe vor Strahlungsschäden, Minimierung der Drift, Fixierung definierter Probenzustände, und Schutz vor Kontamination der Probe.

Das Einfrieren der Probe erfolgt durch schnelles Eintauchen in ein Kühlmittel. Dabei muss die Eiskristallbildung durch schnelle Abkühlung vermieden werden, da Eiskristalle den Elektronenstrahl des Mikroskops reflektieren und die Probe durch starken Kontrast verdecken.

Bei genügend schneller Abkühlung von ca. 40.000°C/s auf ca. -188°C / 85°K erstarrt Eis in amorphem Zustand ohne Kristallbildung. Flüssiger Stickstoff (N₂(l)) als Kühlmittel wäre kalt genug (Sp = -195 °C), hat aber eine zu geringe Wärmekapazität (c = 1,042 kJ/kg * K).

Durch die im Probenträger (Grid) enthaltene Wärmemenge käme es zur Verdampfung von N₂(l), zur Verzögerung der Abkühlung und damit zur Bildung von kristallinem Eis. N₂(l) ist daher als Kühlmittel ungeeignet. Flüssiges Ethan ist ähnlich kalt (Sp = -188°C), hat aber eine höhere Wärmekapazität (c = 1,757 kJ/kg * K). Es verdampft nicht und ist somit ein geeignetes Kühlmittel. Durch das Ausbleiben des Leidenfrost-Effekts (Ausbildung einer isolierenden Dampfschicht durch zeitlich gedehnte Änderung des Aggregatzustands) war der Umgang mit diesem Material nicht ungefährlich.

Als Objektträger für das Kryo-Elektronenmikroskop wurden *Quantifoil 2/4 Holey Carbon Films* ("Grids") genutzt. Diese haben einen Durchmesser von ca. 3 mm und bestehen aus einem Träger aus einem Kupfernetz mit einer Maschenweite von ca. 60 µm sowie einem Kohlenstofffilm mit Löchern mit einem Durchmesser von ca. 2 µm. Über das Grid wurde zur Vermeidung einer selektiven Partikelorientierung eine dünne, kontinuierliche Kohlenstoffschicht mit gleichmäßiger Ladungsverteilung aufgebracht. Dazu wurde mit Hilfe eines *Denton Bench Top Turbo IV Coating Vacuum Bedampfers* bei einem Vakuum von 5x 10⁻⁶ Torr durch Evaporation einer Kohlenstoffelektrode eine dünne Kohlenstoffschicht auf ein Glimmerplättchen ("*Meica*", *Plano GmbH, Wetzlar*) aufgebracht, anschließend in einem Uhrglas an der Wasseroberfläche vom Glimmer abflotiert und danach auf die zuvor mit Chloroform gereinigten Grids übertragen. Nach gründlicher Trocknung erfolgte eine Behandlung der Grids in einer Plasmareinigungskammer (*Plasma Cleaner PDC002, Harrick, UK*) für 30s bei 0,3 * 10⁻¹mbar, um durch Aufbringung partieller Ladungen eine für ca. 15 min wirksame Hydrophilizität des normalerweise hydrophoben Kohlenstoffgrids zu induzieren. Dadurch wurde die Anhaftung der wässrigen Probe auf dem Grid verbessert.

Je 3,5 µl Probe verschiedener Verdünnungsstufen (0,03 – 0,06 pmol/ µl) des zu untersuchenden makromolekularen Komplexes wurde in einem semi-automatisierten Prozess mit Hilfe eines *FEI Vitrobots* bei 4°C und 100% Luftfeuchtigkeit auf ein Grid aufgetragen. Nach 30s Inkubation wurde das Grid schnell in flüssiges Ethan "eingeschossen" (Dubochet et al., 1988). Anschließend wurde das Grid in einer sehr kalten N₂-Atmosphäre in einen Probencontainer überführt. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Grids mit verschiedenen Probenverdünnungsstufen wurden unter Einhaltung der Kühlkette mit Hilfe einer *FEI-Kryo-Workstation* in die Mikroskopkartuschen eingespannt. Die Kartuschen mit den Grids konnten danach mit Hilfe des portablen gekühlten Probenhalters in das *Tecnai Polara F30 Transmissionselektronenmikroskop* überführt werden.

Zur Erlangung der notwendigen Auflösung von ~0,1nm wurde die notwendige Vergrößerung des Elektronenmikroskops nach dem so genannten Samplingtheorem von Whittaker und Shannon folgend (Shannon, 1949; Whittaker, 1915) bestimmt. Danach kann ein Strukturelement als aufgelöst gelten, wenn es durch mindestens zwei Bildpunkte erfasst wird. Es gelten folgende Zusammenhänge:

P_c = Pixelgröße mit der das Bild digitalisiert wird

V = Primärvergrößerung des Mikroskops

P_0 = Größe des Pixels auf Objektebene = P_c / V

d = maximal erreichbare Auflösung = $2 \times P_0$.

Für die Versuche wurde eine Primärvergrößerung von 39.000fach als ausreichend angesehen.

Nach der Justierung des Mikroskops wurden zunächst digitale Bildaufnahmen bei 39.000facher Vergrößerung erstellt. Anhand dieser erfolgte die Beurteilung des Grids nach den Kriterien Eisdicke, Partikeldichte, Integrität des Kohlefilms sowie dem Vorhandensein von Kontaminationen wie z.B. Eis-oder Ethankristallen. Geeignete Bereiche der Grids wurden für die Datengewinnung unter *low dose*-Bedingungen ($20e^- / \text{Å}^2$), einer Belichtungszeit von 1s, einer Extraktionsbeschleunigungsspannung von 300 µm mit Defokuswerten zwischen -1 bis -5 µm genutzt. Mit Hilfe einer analogen Plattenkamera wurden die ausgewählten Bereiche des Grids auf einem *Kodak electron image film SO-163* aufgenommen. Diese Aufnahmen werden als Mikrographen bezeichnet.

5.9 Datenprozessierung

Die elektronenmikroskopische Aufnahme enthält Informationen oder auch Bildsignale über das Untersuchungsobjekt. Diese sind jedoch zum Teil durch ein unstrukturiertes Rauschsignal überlagert. Je kleiner die Objekte bzw. die zu untersuchenden molekularen Details, desto störender wirken sich die Rauschsignale aus. Signal und Rauschen müssen also analysiert und wenn möglich getrennt werden. Das ist eine wichtige Aufgabe der digitalen Bildverarbeitung von EM-Bildern. Aus dem Bildsignal kann dann durch Rückprojektion dreidimensionale Strukturinformation über das zu untersuchende Objekt gewonnen werden.

5.10 Digitalisierung

Die EM-Aufnahmen müssen für die Bildverarbeitung im Computer digitalisiert vorliegen. Daher wurden die Mikrographen nach dem Entwickeln (12 min in Entwicklungslösung, 6 min in Fixierlösung, 20 min Wasser) und anschließendem Trocknen mit einem *Primescan D8200 Drumscanner* mit einer Pixelsize von 1,26Å (auf der Objektskala) und einer Auflösung von 5334dpi digitalisiert.

Die Größe der Silberkristalle auf dem Mikrographen betrug ca. 0,5 µm (persönliche Auskunft von Dr. Rudi Lurz, MPI MOLGEN Berlin). Sie war damit ca. 10x höher als die Pixelsize der digitalisierten Bilder. Es war daher anzunehmen, dass Körnung der Mikrographen die digitalisierten Bilder in nur geringem Maße beeinflussen würde.

5.10.1 Dichteverteilung

Die digitalisierten Daten in Form von *Tif*-Dateien wurden in ein für die *SPIDER* lesbares Datenformat konvertiert. Zur Qualitätsbeurteilung erfolgte zunächst die Berechnung der eindimensionalen Dichteverteilung in den einzelnen Bildern mit dem Programm *SPIDER*.

Diese Verteilung kann als Summe reiner Sinusfunktionen mit unterschiedlichen Amplituden und Frequenzen aufgefasst werden. Die dargestellten Schwingungen pro Längeneinheit werden als Raum- oder Ortsfrequenz bezeichnet. Das Reziproke der Raumfrequenz, die "Wellenlänge", kennzeichnet eine bestimmte Strecke im realen Bild, und die Amplitude entspricht der maximalen Dichteschwankung genau über diese Strecke. Da die Amplitude die Dichte (den Grauwert des Bildes) einer Objektstruktur beschreibt, bezeichnet man sie auch als Strukturfaktor. Mit diesem ist die reine Sinusfunktion zu multiplizieren, um die geeigneten Dichtewerte im Bild

zu erhalten. Funktionen mit kleiner Ortsfrequenz kennzeichnen also die grobe Objektstruktur und Sinusfunktionen mit hoher Ortsfrequenz feine Strukturdetails. Anhand dieser Darstellungen konnte die zu erwartende Bildauflösung der jeweiligen Mikrographen beurteilt werden. Mikrographen mit nur geringem Informationsgehalt wurden aus dem Datensatz entfernt.

5.10.2 Fourier-Transformation

Ein Großteil der Datenverarbeitung von EM-Bildern findet nicht mit den realen Daten, sondern mit der Fourier-Transformierten der Bilder statt. Sie wird für die Beurteilung der Kontrastübertragungsfunktion von EM-Aufnahmen und die Analyse von Struktureigenschaften des Objekts benötigt. Die Fourier-Transformation wird auch bei der Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses kontrastarmer Abbildungen biologischer Präparate und bei der 3D-Rekonstruktion von Objekten angewendet.

Die Fourier-Analyse eines Bildes ist die Aufstellung bzw. Berechnung aller Strukturfaktoren und Phasenverschiebungen die erforderlich sind, um die Sinusfunktionen der unterschiedlichen Frequenzen so zu wichten und anzuordnen, dass ihre Überlagerung genau die Dichteverteilung des untersuchten Bildes ergibt. Fourier-transformierte EM-Aufnahmen sind also zweiteilige Bilder. Sie enthalten die Amplituden (Strukturfaktoren) und Phasenverschiebungen (Phasen) der einzelnen Sinusfunktionen. Für die Darstellung eines Bildes sind zweidimensionale Sinusfunktionen notwendig.

5.10.3 Powerspektrum

Für die Analyse der Bildqualität muss die Größe und die Verteilung der Strukturfaktoren als Funktion der Raumfrequenz bekannt sein. Dazu wird das Powerspektrum berechnet, das im Prinzip das Quadrat der Fourier-Transformierten darstellt. Bei dieser Operation geht die Phaseninformation verloren, das Powerspektrum enthält allein die Quadrate der Strukturfaktoren. Die entsprechenden graphischen Darstellungen wurden mit dem Programm *WEB* gesichtet. Elliptische Thonringe (Übertragungslücken in der Darstellung der Quadrate der Amplituden übertragener Ortsfrequenzen,) statt kreisrunder deuten auf einen Astigmatismus und / oder eine Probendrift während der Aufnahme hin (siehe Abb. 19).

Mangelhafte Mikrographen wurden aus dem Datensatz entfernt, die verbliebenen Daten wurden für die Partikelrekonstruktion genutzt.

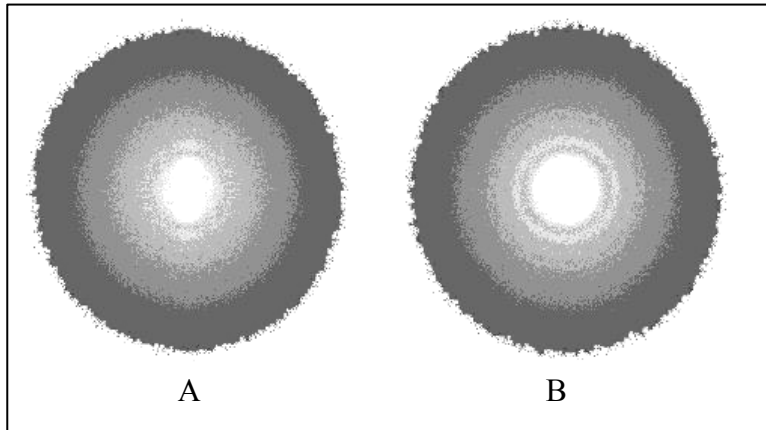


Abb. 19: Powerspektren der Mikrographen

A) durch Bewegung der Probe während der Aufnahme (Drift) verzerrtes Powerspektrum

B) unverzerrtes Powerspektrum

5.10.4 Kontrasttransferfunktion

Die Lokalisation der einzelnen Partikel auf dem Mikrographen ist aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses schwierig. Zur Kontraststeigerung erfolgten die Bildaufnahmen im Unterfokusbereich (Defokussierung), wobei durch Auslöschung und Verstärkung höhere Bildfrequenzen in niedrigere Frequenzen umgewandelt wurden. Die Partikel konnten nun identifiziert werden, jedoch kam es dabei zu einer Bildverzerrung: Die Partikelbilder waren quasi "unscharf".

Diese Verzerrung kann aber im Fourier-Raum mit Hilfe der Phasenkontrasttransferfunktion (engl. *Contrast Transfer Funktion*, CTF) entfernt werden.

Die Berechnung der CTF erfolgte mit Hilfe des Defokuswertes. Der Defokuswert eines Mikrographen wurde bei zweifacher Datendehimierung mit Hilfe der *CTFFIND.com*-Software (Mindell and Grigorieff, 2003) bestimmt. Diese nutzt zur genauen Bestimmung einen Vergleich rotationsgemittelter 2D-Powerspektren mit Referenzspektren. Die nachträgliche Berechnung des Defokuswertes war notwendig, da die Defokuseinstellungen am Mikroskop von den tatsächlichen Werten abwichen.

Die CTF ist für jeden Mikrographen spezifisch. Zur Phasenkorrektur der aus diesem Mikrographen ausgeschnittenen Partikelbilder wurde der jeweilige Defokuswert des Mikrographen verwendet, die entsprechenden Partikel wurden daher zu so genannten Defokusgruppen zusammengefasst.

In der Anfangsphase ist CTF eine semi-periodische Funktion im reziproken Raum. Sie weist Minima- und Maxima auf, das da Elektronenmikroskop konstruktionsbedingt nicht alle Raumfrequenzen übertragen kann. Die Anzahl der Nulldurchläufe ist hauptsächlich von den

(neben anderen Faktoren) Defokus-Einstellungen des Elektronenmikroskops abhängig. Von größter Bedeutung ist der Mangel an Informationen bei den Nullstellen der CTF, was zu fehlenden Informationen im dargestellten Objekt führt. Zur Umgehung dieser Limitierung wurde der Umstand genutzt, dass die Positionen der CTF-Nullwerte abhängig vom Defokuswert sind. Die Bilder wurden daher mit verschiedenen sich ergänzenden Defokus Einstellungen über einen Bereich von Defokuswerten (z.B. -1 bis -5 μm im Unterfokusbereich) aufgenommen (siehe Abb. 20):

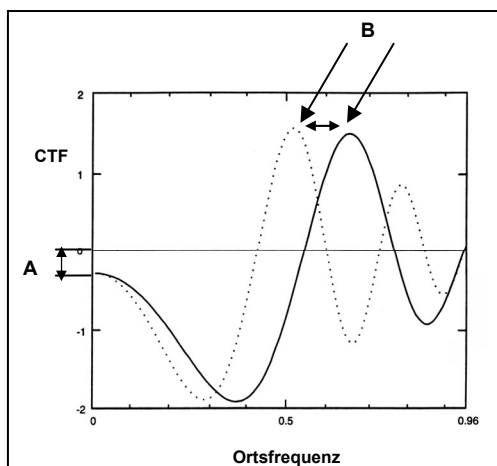


Abb. 20: Beispiel für eine Kontrasttransferfunktion

Die zwei Kurven (durchgezogen und gestrichelt) sind das Ergebnis verschiedener Defokuswerte.

A) Die CTF beginnt zur Berücksichtigung des Amplitudenkontrastes nicht bei Null, sondern im negativen Bereich

Per Konvention werden daher die Aufnahmen bei der Elektronenmikroskopie immer im Unterfokusbereich gemacht, die Einstellungen der jew. Kondensorblenden am Elektronenmikroskop sind dahingehend optimiert.

B) Es ist eine Verschiebung der Maxima zu beobachten, somit erhält man Informationen auch bei den Nulldurchläufen der CTF

Die Korrektur des CTF-Einflusses und die Mischung der Daten mit verschiedenen Defokuswerten ist Teil der nachfolgenden Bilderstellung.

5.10.5 Partikelselektion

Eine spezielle Software ermöglicht es anhand von Referenzstrukturen Bereiche des Mikrographen, die mögliche 2D-Projektionen enthalten, zu selektieren. Diese Bereiche werden vom Mikrographen ausgeschnitten und als einzelne Bilddateien gespeichert.

Zur Identifizierung der Partikel auf dem Mikrographen wurde die *SIGNATURE 1.0*-Software genutzt. Die Mikrographen wurden dazu mit Hilfe des Programms *em2em* in das für die *Signature*-Software lesbare *MRC*-Format konvertiert. Nach Maskierung der zur Partikelsuche ungeeigneten Bereiche wurde eine Partikelgröße von 220 \AA , ein Abstand von 5 \AA mit einer *Rezise*= 6 für die Suche mit vier Referenzprojektionen eines leeren 80S Ribosoms gewählt. Die Berechnung der Daten erfolgte im Batchverfahren. Zur Ermittlung der Partikelkoordinaten wurde anhand eines Testmikrographen durch Sichtung der Einzelpartikelbilder eine geeignete *local correlation function (LCF)* bestimmt und für die weiteren Mikrographen verwendet. Diese lag im Bereich zwischen 0,18 und 0,22. Die *spectrum correlation function (SCF)* wurde nicht

verändert und betrug den Wert 0,5. Pro Mikrograph wurden so je nach Defokuswert zwischen 500 und 2000 Partikelkoordinaten ermittelt.

Da die automatisierte Partikelselektion nur eine beschränkte Genauigkeit in Bezug auf Unterscheidung zwischen "echten" Partikeln und ähnlich geformten Strukturen wie z.B. Eis aufwies, war zur Erhöhung der Qualität eine manuelle Partikelselektion notwendig. Durch Anwendung eines *buter low pass*-Filters wurde eine Steigerung des Bildkontrastes erreicht und die Partikelselektion mit dem Programm *WEB* erleichtert. Mit den so gewonnenen Informationen wurden nun nicht-dezimierte Einzelpartikelbilder mit einer Dimension von 300 * 300 Pixel sowie einer Pixelgröße von 1,26 Å ausgeschnitten und nach dem Ursprungsmikrographen sortiert in Stackfiles zusammengefasst. Um die Rechengeschwindigkeit zu erhöhen, wurden die Partikelbilder anfänglich um den Faktor vier dezimiert. Mit zunehmender Genauigkeit der Rekonstruktion wurde wieder mit zunehmend weniger dezimierten Daten, am Ende mit undezimierten Daten gearbeitet.

Eine wichtige Voraussetzung für die Methode der Einzelpartikelrekonstruktion ist die zufällige Verteilung der Partikel auf dem Grid. Die entsprechenden 2D-Projektionen der verschiedenen Partikelorientierungen sollten daher zu gleichen Teilen im Datensatz enthalten sein. Durch Ladungseffekte kann es jedoch zu einer Bevorzugung bestimmter Partikelorientierungen auf dem Grid kommen. Durch eine genügend hohe Partikelanzahl und durch experimentelle Vorgehensweisen (siehe 5.8) konnte diesem Umstand entgegengewirkt werden.

5.10.6 3D-Partikelrekonstruktion

Gemäß dem Projektionstheorem ist die zweidimensionale Fouriertransformation einer Projektion gleich dem zentralen Bereich der 3D Fouriertransformation des Objektes (Frank et al., 1996). Das bedeutet, dass aus den 2D-Einzelpartikelprojektionen (= Bildern) ein 3D-Objekt berechnet werden kann. Zur Durchführung der hochkomplexen, computergestützten Datenverarbeitung wurde hauptsächlich die Software *System for Processing Image Data from Electron microscopy and Related fields* (SPIDER) (Frank et al., 1996). genutzt. Zu den Eigenschaften dieser Software gehört eine flexible Skript-Sprache mit den für die Datenrekonstruktion benötigten Algorithmen.

Für die Rückprojektion benötigt man Informationen über die Lage des Partikels in der Ebene sowie die drei Eulerschen Winkel, die die Partikelorientierung im Raum beschreiben. Diese

unbekannten Informationen lassen sich durch einen Vergleich mit Referenzprojektionen ermitteln (siehe Abb. 9).

Steht keine Referenzstruktur zur Verfügung, müssen die Anfangsparameter der Orientierungen von den Daten selbst abgeleitet werden. Ein Beispiel für dieses Vorgehen ist die "*Random Conical Tilt*"-Methode (Radermacher, 1988). Dabei werden Neigungspaare ("*tilt pairs*") desselben Grid-Bereiches gesammelt. Die Partikel der Mikrographen dann ausgerichtet und klassifiziert. Die Ausrichtung sorgt für den scheinwinkligen Eulerschen Winkel des Partikels, während die Klassifizierung die Daten in gleichartige Partikelklassen einteilt, die vermutlich verschiedene Orientierungen auf dem Grid aufweisen. Die zwei verbleibenden Eulerschen Winkel werden aus den geometrischen Zusammenhängen zwischen den gekippten und ungekippten Mikrographen ermittelt. Die Winkel werden dann den entsprechenden gekippten Partikelbildern zugeordnet.

Für das Alignment wurden folgende Parameter verwendet:

Tab. 9: Parameter der Einzelpartikelrekonstruktion

Rotationswinkel [°]	X/Y-Shift [Pixel-Step]	Pixelsize [Å]	Algorithmus	WindowSize
15	6-3	5,04	APMQ	90
8	6-3	5,04	APMQ	90
4	4-2	5,04	APRQ	90
2	3-1	5,04	APRQ	90
0,5	3-1	5,04	APMD	90
15	6-3	2,52	APMQ	180
8	6-3	2,52	APMQ	180
4	4-2	2,52	APRQ	180
2	3-1	2,52	APRQ	180
0,5	3-1	2,52	APMD	180
15	6-3	1,26	APMQ	360
8	6-3	1,26	APMQ	360
4	4-2	1,26	APRQ	360
2	3-1	1,26	APRQ	360
0,5	3-1	1,26	APMD	360

Am Ende einer Alignierungsrunde wurden die Einzelvolumen der jeweiligen Defokusgruppen zu einem Gesamtvolumen kombiniert. Dieses Volumen diente dann der jeweils nächsten Runde als Referenzstruktur. Referenzprojektionen. Als Startreferenz diente die Strukturen eines leeren Heferibosoms (Auflösung 19Å) bzw. eines Kaninchenribosoms mit gebundenem eEF1A (Auflösung 17,9Å).

Der iterative Prozess wurde mit relativ großen Suchwinkeln und Shifts gestartet, um die Möglichkeit falscher Alignierung in lokalen Maxima zu verringern. In Kombination mit zu Beginn größerer Pixelsize und damit kleiner Datenmenge wurde die Berechnungsgeschwindigkeit erhöht. Kleinere Rotationswinkel verfeinern die Suche nach der höchsten Übereinstimmung, jedoch erhöht sich dadurch die Anzahl der jeweiligen Referenzprojektionen (Bsp. 15°: 84 Referenzprojektionen, 2°: 5088 Projektionen).

Der Wechsel zu kleineren Rotationswinkeln bzw. Pixelsize erfolgte nach Erreichen eines Korrelationsmaximums, bei dem keine weitere Erhöhung der Auflösung zu Beobachten war.

Im Refinementprozess wurde die Qualität sowie die Geschwindigkeit der Rekonstruktion durch die Nutzung von verschiedenen Algorithmen erhöht. Es wurden folgende Algorithmen verwendet:

AP MQ Vergleicht eine Serie von experimentellen Bildern mit einer Serie von Referenzbildern. Damit lässt sich der Drehwinkel in der Ebene sowie die x/y-Shifts bestimmen, mit denen die größtmögliche Übereinstimmung zwischen Experimentellen und Referenzbildern erreicht wird. Die Anzahl der benötigten Referenzbilder steigt mit kleinerem Suchwinkel stark an, so dass dieser Algorithmus für Suchwinkel kleiner als 8° aufgrund der hierfür benötigten höheren Rechenkapazität nur bedingt geeignet ist.

APRQ Vergleichbar mit *APMQ*, aber das experimentelle Bild wird nur mit einer eingeschränkten Anzahl an Referenzbildern in einem bestimmten Suchwinkel verglichen. Dieser Algorithmus wird für Suchwinkel zwischen 4°-2° genutzt.

Small angles / AP MD Bestimmung von Rotationsunterschieden zwischen experimentellen und Referenzprojektionen. Berechnet den Eulerschen Drehwinkel bei einer größtmöglichen Übereinstimmung zwischen Referenz und Experimentellen Bild. Die Daten werden ebenfalls auf Spiegelung untersucht. Der Algorithmus wird bei Suchwinkeln kleiner gleich 1° genutzt.

BP RP Ein Rückprojektionsalgorithmus mit dem die 3D-Rückprojektion berechnet wird. Er "schmiert" die 2D-Projektion durch den 3D-Raum, wobei es durch Akkumulierung und Auslöschung zur 3D-Darstellung der experimentellen Elektronendichte führt.

5.10.7 Bestimmung der graphischen Auflösung der Elektronendichten

Zur Bestimmung der Auflösung wurde die *Fourier Shell Correlation* (FSC) (van Heel and Harauz, 1988) genutzt. Die FSC ist ein Maß für die Übereinstimmung zweier 3D-Volumina im Fourier-Raum. Dazu wurde der experimentelle Datensatz zufällig in zwei Hälften geteilt und aus den Hälften unabhängig voneinander je ein 3D-Volumen berechnet. Diese Rekonstruktionen wurden dann im Fourier-Raum durch Erstellung der "*Fourier-Shell Korrelation*" (FSC) verglichen. Die Übereinstimmungen verschiedener Ortsfrequenzen kann in einer Auflösungskurve mit $Y = \text{FSC}$ (*Fourier Shell Correlation*) und $X = \text{Ortsfrequenz}$ dargestellt werden. (siehe Abb. 21):

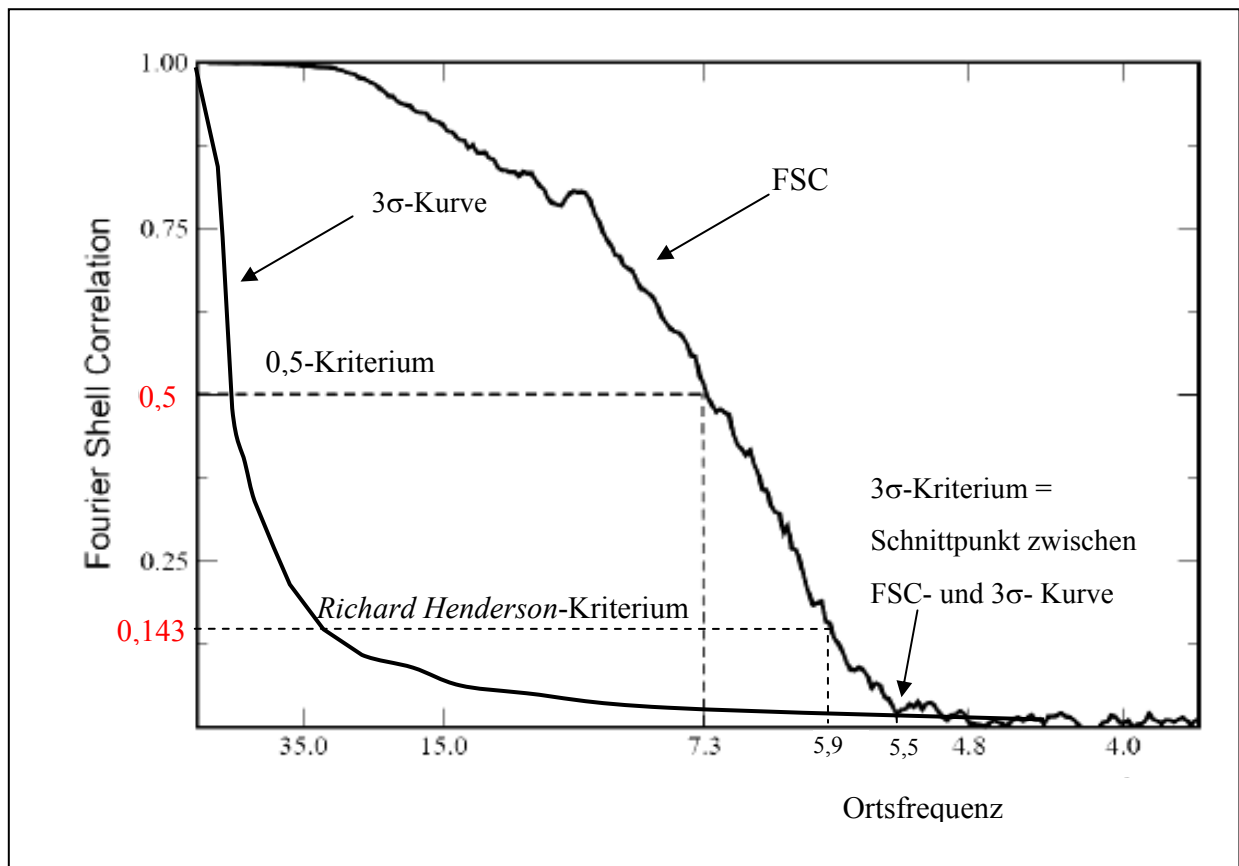


Abb. 21: Die Bestimmung der graphischen Auflösung

Rot: die zur Bestimmung der Auflösung genutzten Kriterien $\text{FSC}=0.5$, $\text{FSC}=3\sigma$ und das nach Richard Henderson benannte im Vergleich; Die Kurve beginnt mit dem Wert eins, niedrige Bildfrequenzen entsprechend den groben Bilddetails stimmen in hohem Maße überein. Die Kurve fällt bei zunehmend hohen Bildfrequenzen ab, ein Zeichen für eine zunehmende Inhomogenität der feineren Bilddetails

Zur Berechnung der Auflösung wurde die entsprechende Ortsfrequenz bei einem FSC-Wert von 0,5 genutzt (Malhotra et al., 1998) (siehe Formel 2). Bei einer FSC von 0,5 liegt ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 1 vor. Es ist das am verbreitetsten und allgemein anerkannteste Kriterium zur Auflösungsbestimmung.

$$\text{Auflösung} = \frac{\text{Pixelsize}}{\text{FSC}(0,5)} \quad \text{Formel 2: Berechnung der Auflösung mit Hilfe der Fourier-Shell-Korrelation}$$

Das weniger konservative 3- σ -Kriterium (Orlova et al., 1997; van Heel and Harauz, 1988) aus der Röntgenkristallographie sowie die Berechnung der Auflösung bei einem FSC-Wert von 0,143 nach Richard Henderson (*MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 0QH, England*) vorsieht, wurde nicht angewandt. Die mit Hilfe dieser Methoden errechneten nominalen Werte für die Auflösung sind höher als beim "FSC_{0,5}"-Kriterium.

5.10.7.1 Reduzierung des Bildrauschsignals

Jede elektronenmikroskopische Aufnahme weist neben dem gewünschten Signal auch ein unerwünschtes Rauschsignal auf. Dazu gehören statistisches Rauschen der Elektronenquelle, Gridstrukturen, Unregelmäßigkeiten im Filmmaterial usw. Diese Signale sind nicht mit der Molekülstruktur korreliert und sollten sich von einem Bildbereich zum nächsten zufällig unterscheiden.

Werden viele gleichartige Bilder addiert, so wird sich das Signal verstärken und das Rauschen zu einem konstanten und damit Struktur- und informationslosen Betrag mitteln. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, S/N) steigt mit der Quadratwurzel aus der Anzahl der aufaddierten Bilder (siehe Formel 3).

$$S/N \sim \sqrt{n} \quad \text{Formel 3}$$

In der Praxis bedeutet das, dass aufgrund der kontrastschwachen Aufnahmen einige hundert Mikrographen mit vielen tausend Projektionen einzelner Partikel verwendet werden müssen, um das gewünschte Bildsignal von dem Rauschen zu trennen.

Die Genauigkeit, mit der die einzelnen Moleküle für die Mittelung aufeinander ausgerichtet werden können, ist ein wesentlicher, limitierender Schritt. Die Präzision der Alignierung ist abhängig vom Kontrastes, der gerade bei kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen vergleichsweise gering ist. Darin liegt der wesentliche Grund, warum Rekonstruktionen aus Einzelmolekülen bislang noch nicht bis zur quasi atomaren Auflösung getrieben werden können.

5.10.7.2 Low Pass-Filter

Hohe Frequenzen im Fourier-Raum entsprechen kleinen Details im Realraum. Es ist anzunehmen, dass alle hohen Bildfrequenzen unterhalb der Auflösungsgrenze nur Rauschsignale enthalten. Die Qualität der Bilder konnte also durch die Anwendung eines *Low-Pass-Butterworth-Exponentialfilters*, welche diese Bildfrequenzen entfernte, verbessert werden.

5.10.7.3 Matched Filter

Durch die Anwendung so genannter *matched filter*, d.h. individuell für jede der Defokusgruppen berechnete mathematische Funktionen wurde die Bildinformation im Bereich hoher Ortsfrequenzen verstärkt. Dadurch wurde zwar das Signal-zu Rausch-Verhältnis verschlechtert, jedoch durch die höhere Wichtung der hohen Bildfrequenzen die Alignierung von Referenz- und experimentellen Projektionen weiter verbessert. Dazu wurden von jedem Mikrographen 16fach dezimierten Kopien manuell die Koordinaten von jeweils 50 Bildausschnitten selektiert, die keine Partikel und somit kein Signal enthielten. Das jeweilige durchschnittliche 1D-Powerspektrum dieser Bildausschnitte wurde gemittelt und zur Erstellung einer Filterfunktion invertiert. Diese Filterfunktion wurde für die Fourierfiltration während des Refinments genutzt. Dies führte zu einer weiteren Steigerung der Auflösung der 3D-Volumen.

5.10.7.4 Maskierung

Für das 3D-Volumen aus dem Alignment wurde eine eng anliegende 3D-Maske mit einer Cosinusfunktion folgenden ("weichen") Kante berechnet. Dadurch konnte das Rauschsignal außerhalb der Hauptstruktur entfernt werden, was einen weiteren Anstieg der Auflösung zur Folge hatte.

5.10.8 Sortierung des Datensatzes-Multipartikelrefinement

Bei der Analyse experimenteller Daten wurde festgestellt, dass bestimmte Bereiche der 3D-Rekonstruktion eine höhere Auflösung aufwiesen als andere. Da diese 3D-Struktur aus der gemittelten Information vieler verschiedener Partikel errechnet wurde, konnte man auf eine Heterogenität der entsprechenden Partikel schließen. Ausgehend von dem Vorhandensein eines dynamischen Gleichgewichtes verschiedener Funktionszustände der Probe, welche unter anderem die weitere Erhöhung der Auflösung behindert, wurde der Datensatz anhand mehrerer Referenzen sortiert (Penczek et al., 2006). Als Referenz zur Sortierung wurden sukzessiv

mehrere Kopien einer 3D-Struktur eines translitierenden Ribosoms als zusätzliche Referenzstruktur genutzt. Durch iterative Alignierung auf mehrere Referenzen kumulierten sich Partikelbilder bestimmter Partikelkonformationen, so dass aus einem Datensatz mehrere 3D-Volumen, die verschiedene Gleichgewichtszustände repräsentierten, gewonnen werden konnten. Auch Partikelbilder von leeren Ribosomen ohne Ligand sowie von unvollständigen Ribosomen konnten so identifiziert werden.

5.10.9 Datenbankeinträge

Protein Data Bank-Dateien: Die Koordinaten der Rekonstruktion von CrPV-IRES (WT) wurden unter dem Zugriffscode 2NOQ hinterlegt.

Electron Microscopy Database: Die Kryo EM-Dichte wurde unter dem Zugriffscode EMD-1285 hinterlegt.

5.10.10 Molekulare Modellierung und Interpretation

Im Anschluss an die Berechnung des hochauflösenden 3D-Volumens erfolgte die computergestützte Trennung der EM-Dichten mit der *SPIDER*-Software (Frank et al., 1996). Die so erzeugten Dichten der ribosomalen Untereinheiten sowie der IRES wurden mit *IRIS Explorer* (Numerical Algorithms Group), *UCSF Chimera* (Pettersen et al., 2004) und *Ribbons* (Carson, 1997) visualisiert.

Für ein initiales Modell wurden atomare Modelle von Helices und Stem-Loops der CrPV IRES mit der Software *ERNA 3-D* (R. Brimacombe, Science-Pentaflium-Soft) erstellt und stückweise mit der Software *O 10.0.2* (Jones and Kjeldgaard, 1997) und einer krosskorrelations-basierende Suche mit Hilfe von *SPIDER* in die Kryo-EM-Dichte eingepasst.

Die nachfolgende verfeinerte Anpassung des molekularen Modells wurde durch Aurelie Lescoute und Eric Westhof durchgeführt. Dabei wurde das IRES-RNA-Modell manuell und automatisch in einem mehrmaligen iterativen Prozess mit *MANIP 3.4* (Massire and Westhof, 1998) verbessert. Dieses Programm ermöglicht die Erstellung von RNA-Modellen *ad initio* oder durch Homologien auf der Basis von experimentell ermittelten Kristallstrukturen sowie ein stereochemisches Refinement der konstruierten RNA-Modelle.