

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Präparation von Phe-tRNA<sup>Phe</sup>

Aminoacylierte tRNA<sup>Phe</sup> ist ein essentielles Ausgangsprodukt für die Synthese von Proteinen und damit ein Grundbestandteil für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Sie wurde durch eine *in vitro*-Reaktion aus der Aminosäure *Phenylalanin* mit der entsprechenden tRNA<sup>Phe</sup> erzeugt. Bei dieser Aminoacylierungsreaktion wird die Aminosäure *Phenylalanin* enzymatisch unter ATP-Verbrauch an das 3'-CCA-Ende der tRNA gebunden. Die für die Aminoacylierung der tRNA<sup>Phe</sup> notwendigen Synthetasen waren im Zentrifugationsüberstand "S100" aus der Hefe-Ribosomenpräparation enthalten (siehe 5.6.3). Mit diesen eukaryontischen Synthetasen konnte jedoch nur eine sehr geringe Aminoacylierungsrate von unter 2% erreicht werden (siehe Tab. 10). Die Aminoacylierung von eukaryontischer tRNA ist aufgrund ihrer hochkonservierten Struktur ebenfalls mit prokaryontischen Synthetasen möglich. Die Versuche wurden daher mit *E.coli*-S100 durchgeführt. Das Ziel der hier beschriebenen Experimente war eine möglichst effiziente Herstellung von aminoacylierter tRNA<sup>Phe</sup>. Durch eine Optimierung der Reaktionsparameter Synthetasekonzentration, Magnesiumionen-Konzentration, ATP-Konzentration, Inkubationstemperatur, Inkubationszeit und des pH-Wertes wurde die Aminoacylierungsrate der verwendeten tRNA<sup>Phe</sup> von <5 auf 30% gesteigert.

#### 6.1.1 Vergleich der Aminoacylierung mit pro- und eukaryotischen Synthetasen

Bei vergleichenden Untersuchungen der Aminoacylierung von Hefe-tRNA<sup>Phe</sup> wurde bei *E.coli*-S100 eine fünfmal höhere Effizienz als mit Hefe-S100 beobachtet (siehe Tab. 10). Die Ursache hierfür ist unbekannt. Beide S100 wurden nach identischem Protokoll (siehe 5.6.3) aufgereinigt. Möglicherweise sind die eukaryotischen Synthetasen unter den verwendeten Pufferbedingungen weniger stabil.

Die Kombination von prokaryotischem S100 mit prokaryotischer tRNA<sup>Phe</sup> zeigte eine 9x höhere Aminoacylierungseffizienz als das *E.coli* / Hefe-System (siehe Tab. 10). Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass die prokaryotischen Aminoacylsynthetasen evolutionär bedingt eine höhere Substratspezifität zur prokaryotischen tRNA aufweisen.

In den weiteren Versuchen wurde die Aminoacylierung von Hefe-tRNA<sup>Phe</sup> mit *E.coli*-S100 durchgeführt.

S100	tRNA <sup>Phe</sup>	Aminoacylierung [%]
Hefe	E.coli	1,6
E.coli	Hefe	5,5
Hefe	Hefe	1
E.coli	E.coli	44,3

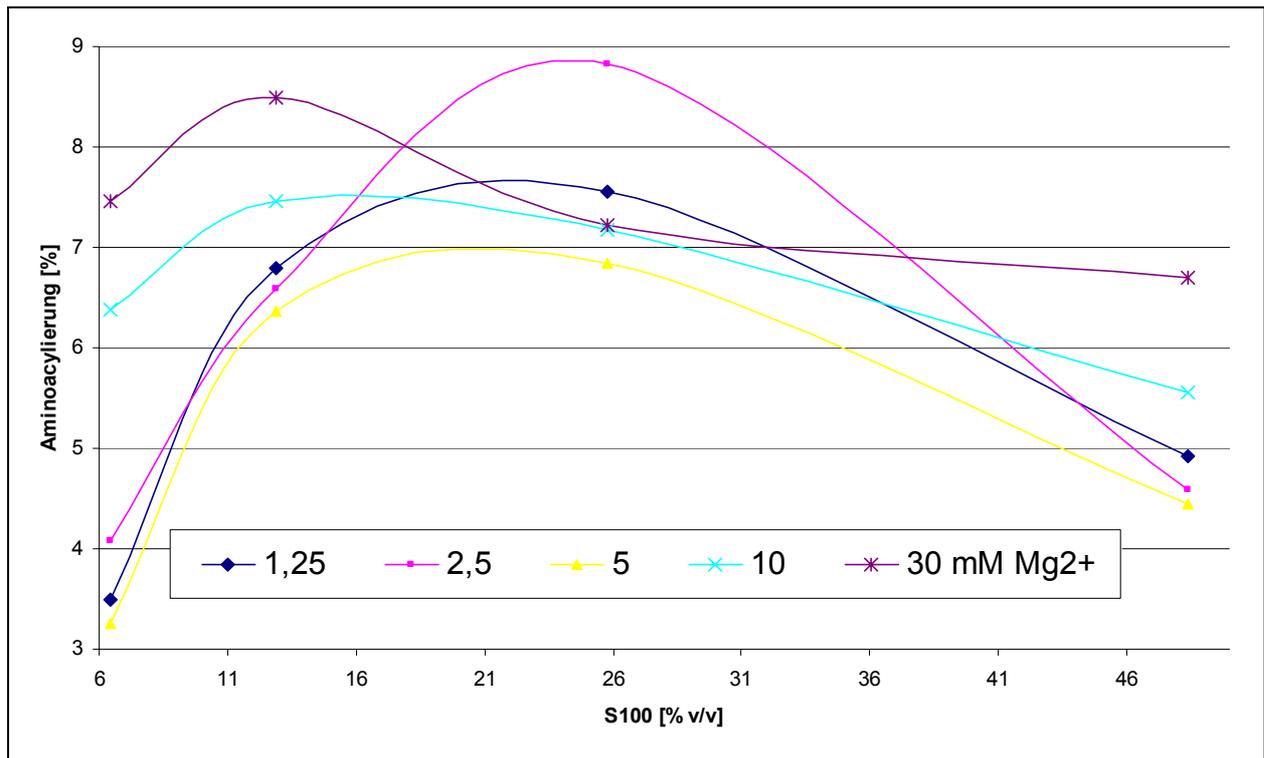
**Tab. 10: Vergleich Aminoacylierung Hefe / *E.coli***

In einem Gesamtvolumen von 31  $\mu$ l wurden 50 pmol tRNA<sup>Phe</sup> von *Hefe* (*S. cerevisiae*) bzw. *E.coli* mit jeweils 3 mM ATP, einem 3fachen Überschuss an <sup>14</sup>C-markiertem *Phenylalanin* (bezogen auf die tRNA<sup>Phe</sup>), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer mit je 13% v/v S100 von Hefe bzw. *E.coli* in Aminoacylierungspuffer für 15 min bei 37°C inkubiert.

## 6.1.2 Optimierung der Aminoacylierungsrate

### 6.1.2.1 Optimierung der Synthetase und der Magnesiumionen-Konzentration

Zur Optimierung der Synthetase-Konzentration und der die tRNA-Konformation beeinflussenden Magnesiumionen-Konzentration ( $Mg^{2+}$ ) wurde Hefe-tRNA<sup>Phe</sup> mit verschiedenen Volumina *E.coli*-S100 bei unterschiedlichen Magnesium-Konzentrationen inkubiert. Die Höhe der Aminoacylierungsrate wurde anschließend durch einen TCA-Fällungsassay (siehe 5.5.10) bestimmt. Bei allen Proben war zunächst ein Anstieg und bei höherer S100-Konzentration ein Abfall der Aminoacylierungsrate zu beobachten. Bei der Kombination der Werte 2,5 mM  $Mg^{2+}$  und 26% S100 konnte eine maximale Aminoacylierung von 8,8% beobachtet werden (siehe Abb. 22). Für die weiteren Versuche wurde eine Magnesiumionen-Konzentration von 2,5 mM und eine S100-Konzentration von 26% verwendet.



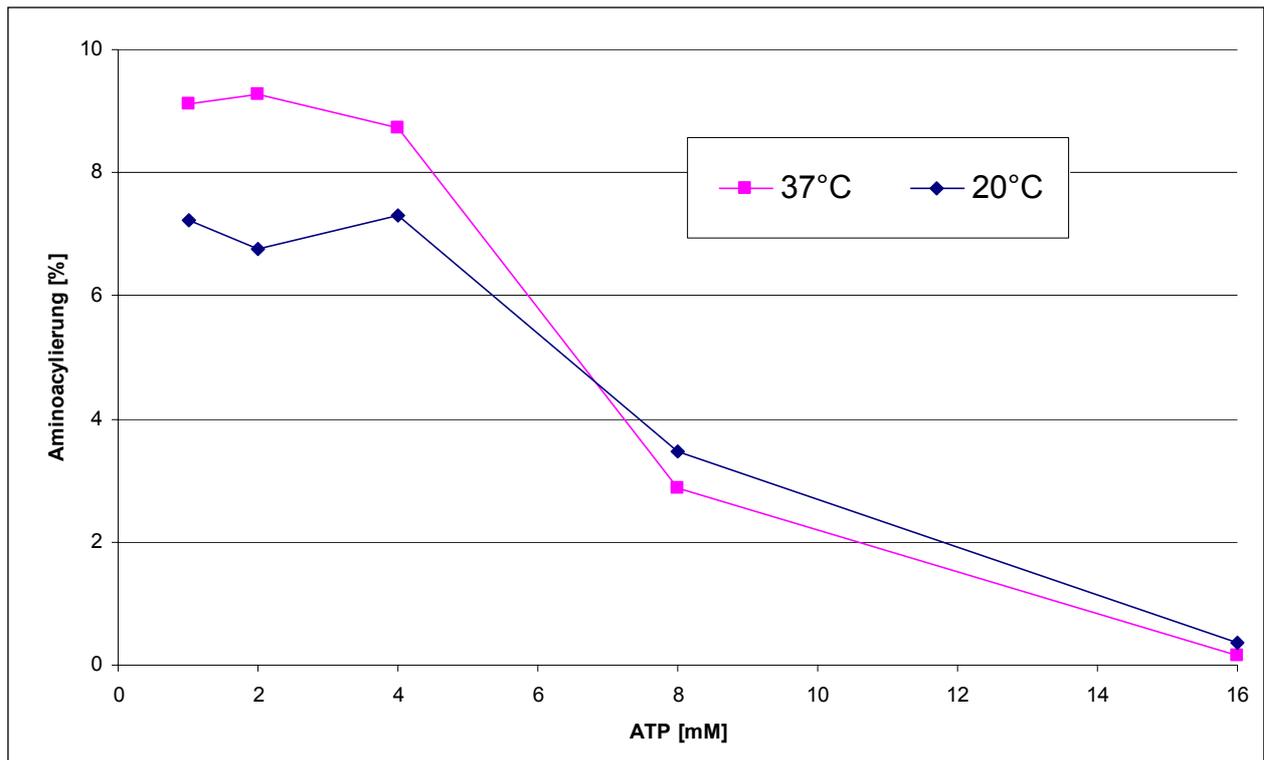
**Abb. 22: Abhängigkeit der Aminoacylierung von Mg<sup>2+</sup>-Konzentration und S100-Menge**

Versuchsbedingungen: Gesamtvolumen 31  $\mu$ l Aminoacylierungspuffer, 50 pmol tRNA<sup>Phe</sup> (Hefe), 3 mM ATP, ein 3facher Überschuss an <sup>14</sup>C-markiertem Phenylalanin (bezogen auf die tRNA<sup>Phe</sup>), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer, 2/4/8/15  $\mu$ l E.coli-S100, 1,25/2,5/5/10/30 mM MgAc, Inkubation 30 min bei 37°C

### 6.1.2.2 Optimierung der ATP-Konzentration und der Inkubationstemperatur

Zur Optimierung der Reaktionstemperatur sowie der ATP-Konzentration wurde Hefe-tRNA<sup>Phe</sup> bei 20°C bzw. 37°C mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen zwischen 1,0 und 16 mM inkubiert. Die Höhe der Aminoacylierungsrate wurde anschließend durch einen TCA-Fällungsassay (siehe 5.5.10) bestimmt. Bei einer Temperatur von 37°C blieb die Aminoacylierungsrate im Bereich von 1-4 mM ATP konstant bei etwa 9% und fiel dann bei 8-16 mM ATP auf ca. 0,4% ab. (siehe Abb. 23): Die Aminoacylierung bei 20°C war um durchschnittlich 2% niedriger.

Für weitere Experimente wurde eine ATP-Konzentration von 4 mM und eine Temperatur von 37°C genutzt.



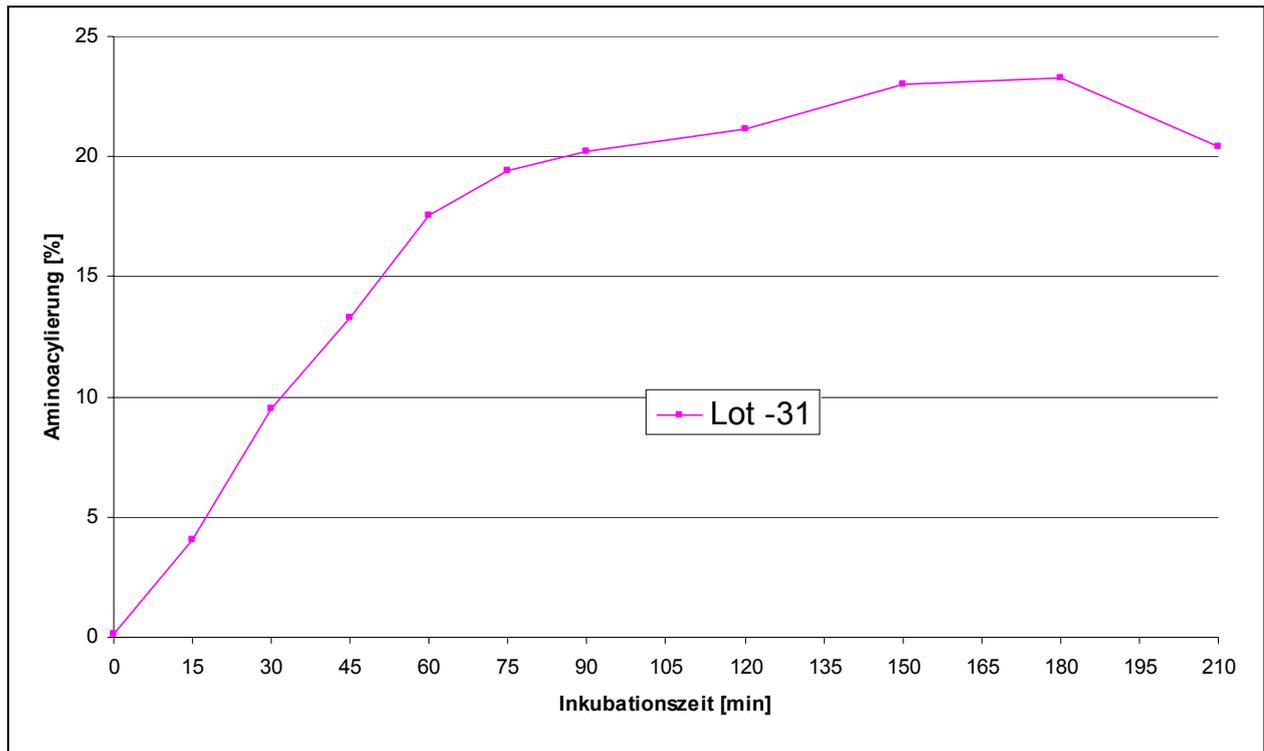
**Abb. 23 : Abhängigkeit der Aminoacylierung von der ATP-Konzentration und der Temperatur**

Versuchsbedingungen: Gesamtvolumen 31  $\mu$ l Aminoacylierungspuffer, 50 pmol tRNA<sup>Phe</sup> (Hefe), 1/2/4/8/16 mM ATP, ein 3facher Überschuss an <sup>14</sup>C-markiertem Phenylalanin (bezogen auf die tRNA<sup>Phe</sup>), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer, 8  $\mu$ l E.coli-S100, 15 mM MgAc, Inkubation 30 min bei 30°C/ 37°C

### 6.1.2.3 Optimierung der Inkubationszeit

Zur Optimierung der Inkubationszeit wurde ein Reaktionsansatz über einem Zeitraum von 3,5 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dem Ansatz eine Probe entnommen und die Aminoacylierungsrate durch einen TCA-Fällungsassay (siehe 5.5.10) bestimmt. Mit zunehmender Reaktionszeit war ein Anstieg der Aminoacylierung zu beobachten. Der Anstieg der Kurve flachte sich zum Ende des Versuchszeitraumes ab, nach 3 h Stunden war ein Maximalwert von ca. 23% erreicht (siehe Abb. 24).

Für die weiteren Versuche wurde eine Inkubationszeit von 3 h verwendet.

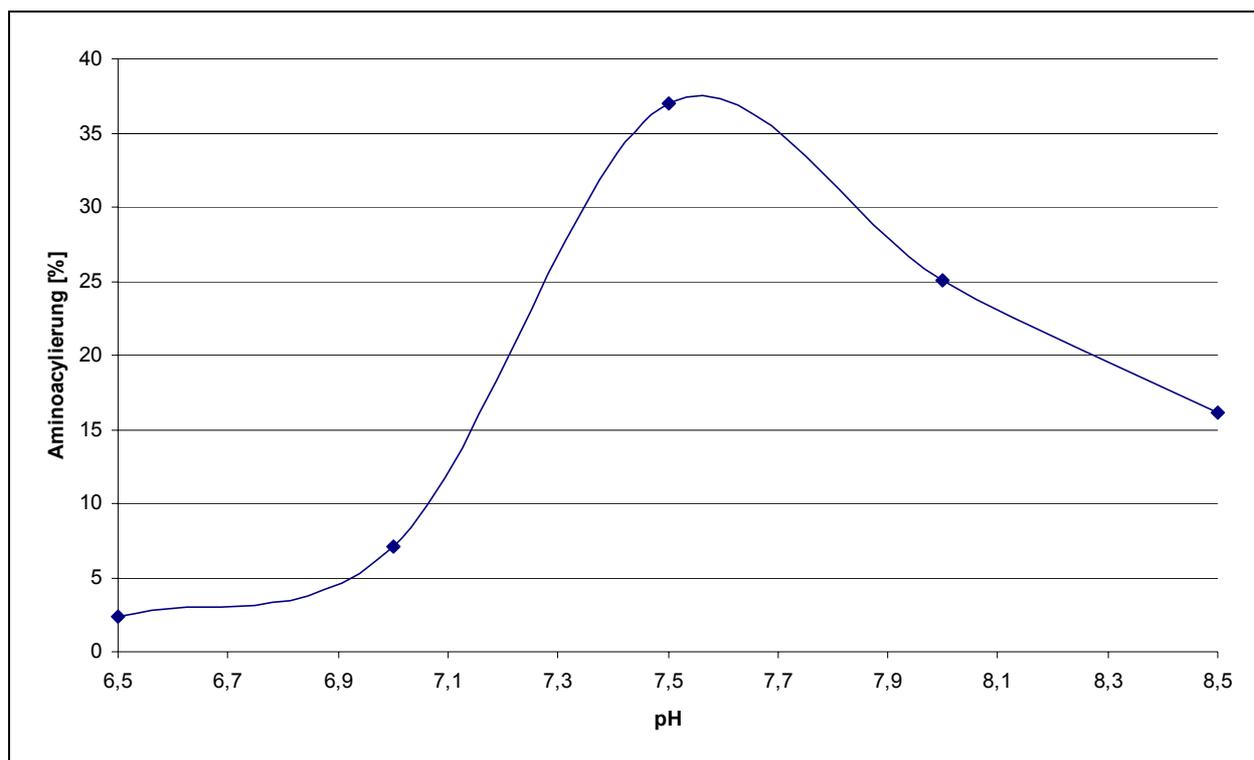


**Abb. 24: Abhängigkeit der Aminoacylierung von der Inkubationszeit**

Versuchsbedingungen: Gesamtvolumen 31  $\mu$ l Aminoacylierungspuffer, 50 pmol tRNA<sup>Phe</sup> (Hefe), 4 mM ATP, ein 3facher Überschuss an <sup>14</sup>C-markiertem Phenylalanin (bezogen auf die tRNA<sup>Phe</sup>), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer, 8  $\mu$ l E.coli-S100, 2,5 mM MgAc, Inkubation 0 -210 min bei 37°C

#### 6.1.2.4 Optimierung des pH-Wertes

Zur Optimierung des pH-Wertes wurden mit Hilfe von KOH bzw. HAc verschiedene Reaktionsansätze mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt und inkubiert. Die Höhe der jeweiligen Aminoacylierungsrate wurde durch einen TCA-Fällungsassay (siehe 5.5.10) bestimmt. Mit zunehmendem pH-Wert wurde ein Anstieg der Aminoacylierungsrate beobachtet, die bei einem pH-Wert von 7,5 ein Maximum von 37% erreichte. Bei höheren pH-Werten war eine Abnahme der Aminoacylierungsrate zu beobachten (siehe Abb. 25). Für weitere Versuche wurde pH 7,5 verwendet.



**Abb. 25: Optimierung des pH-Wertes der Aminoacylierung**

Versuchsbedingungen: Gesamtvolumen 31  $\mu$ l Aminoacylierungspuffer, 50 pmol tRNA<sup>Phe</sup> (Hefe), 4 mM ATP, ein 3facher Überschuss an <sup>14</sup>C-markiertem Phenylalanin (bezogen auf die tRNA<sup>Phe</sup>), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer, 8  $\mu$ l E.coli-S100, 2,5 mM MgAc, Inkubation 180 min bei 37°C

### 6.1.3 Aufreinigung aminoacylierter tRNA<sup>Phe</sup> durch HPLC

Zur Vorbereitung der präparativen Aufreinigung aminoacylierter tRNA<sup>Phe</sup> mittels HPLC (siehe 5.5.5) wurde in einem Gesamtvolumen von 310  $\mu$ l mit insgesamt 500 pmol Hefe-tRNA<sup>Phe</sup>, ein dreifacher Überschuss an <sup>14</sup>C-markiertem Phenylalanin (bezogen auf die tRNA<sup>Phe</sup>), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer mit 2,5% (v/v) S100 von Hefe in Aminoacylierungspuffer mit 4 mM ATP bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min / 16 min / 64 min wurde dem Ansatz eine Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 1/10 v/v 3 M NaAc (pH 5,2) gestoppt. Nach Durchführung einer Phenolextraktion zur Proteinentfernung wurde eine analytische HPLC durchgeführt. Neben der Aufzeichnung der A<sub>260</sub> während der Chromatographie erfolgte eine Radioaktivitätsmessung der einzelnen Fraktionen (siehe 5.5.2). Die Aminoacylierungsrate wurde durch einen TCA-Fällungsassay (siehe 5.5.10) bestimmt. Zu Beginn der Reaktion (siehe Abb. 27) konnte die dem nicht reagierten, <sup>14</sup>C-markierten Phenylalanin entsprechende Radioaktivität in dem Hauptpeak in den Fraktionen 5-8 nachgewiesen werden, im Bereich von Fraktion 40 ein der tRNA<sup>Phe</sup> entsprechender Peak. Nach 16 und 64 min Inkubation (siehe Abb. 28) wurde eine Abnahme der tRNA<sup>Phe</sup>-Peak-Höhe beobachtet, während in Höhe von Fraktion 52 ein zunehmender, zusätzlicher Peak zu beobachten

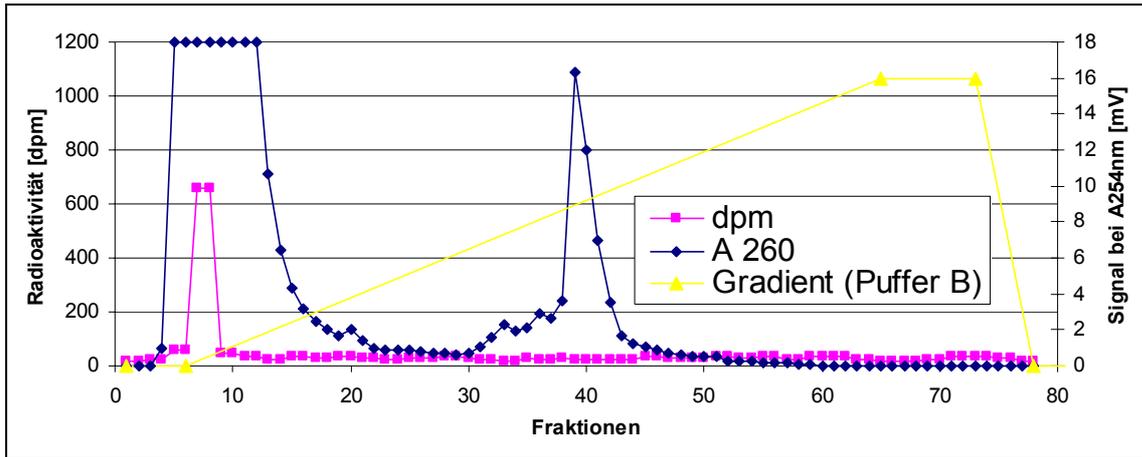


Abb. 26: Ergebnis der analytischen HPLC einer Probe nach 0 min Aminoacylierungsreaktion

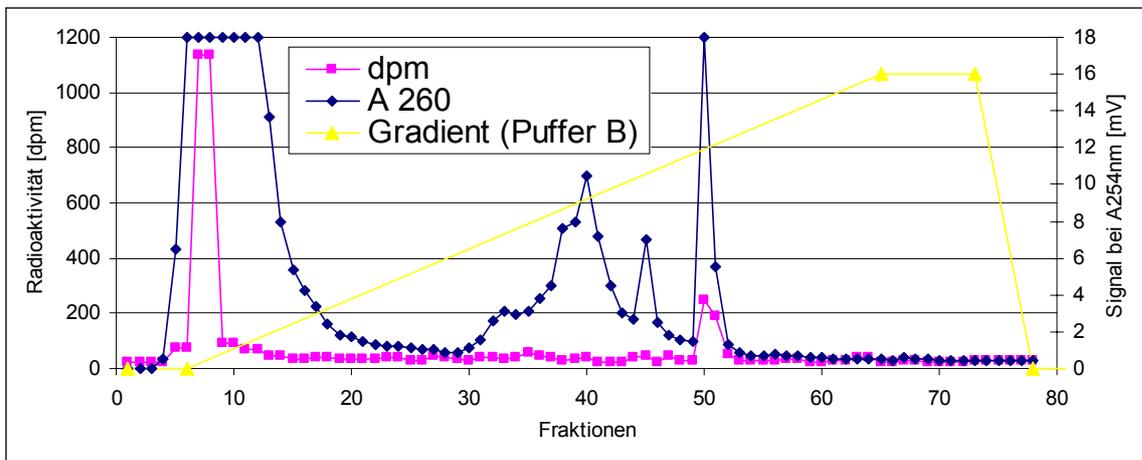


Abb. 27: Ergebnis der analytischen HPLC einer Probe nach 16 min Aminoacylierungsreaktion

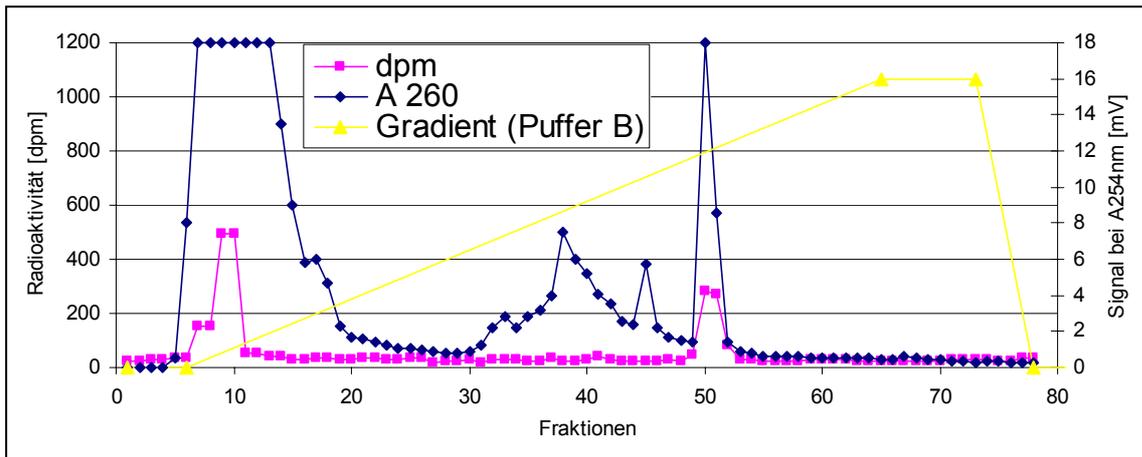


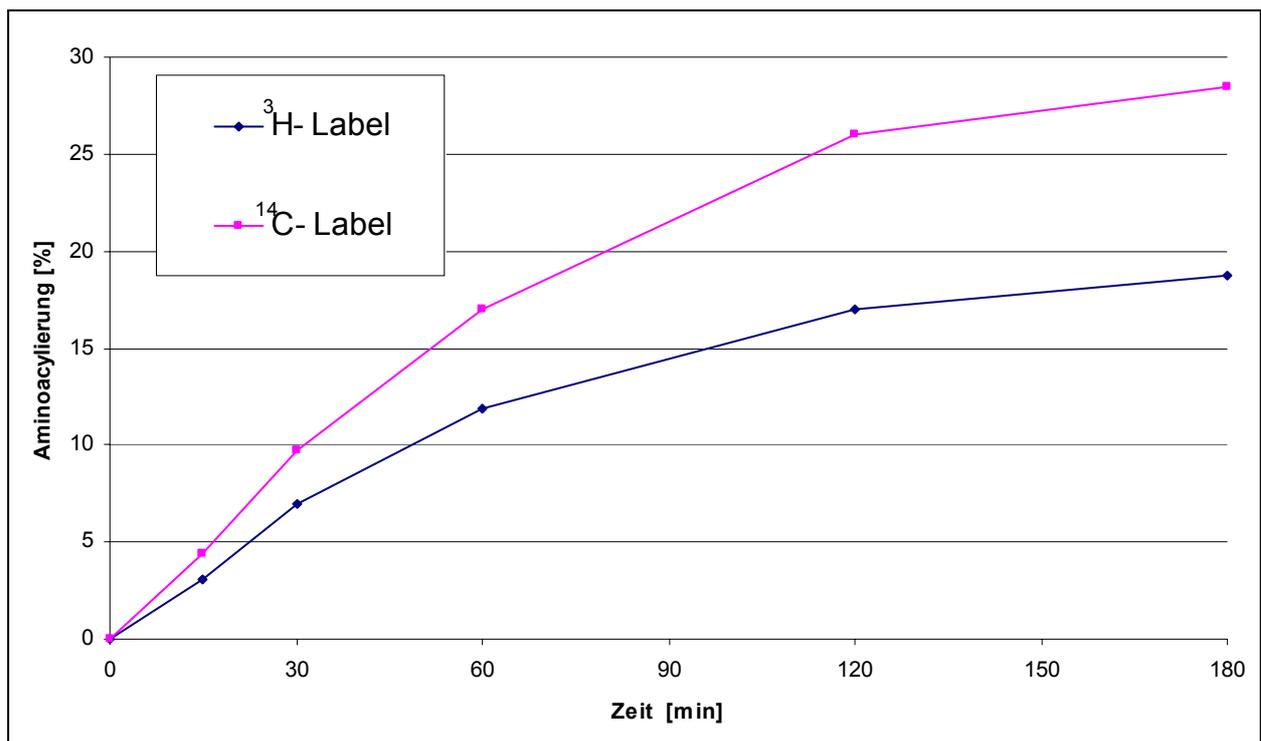
Abb. 28: Ergebnis der analytischen HPLC einer Probe nach 64 min Aminoacylierungsreaktion

war. Bei dem neuen Peak handelt es sich um Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, die durch Veränderungen der hydrophoben Eigenschaften der tRNA<sup>Phe</sup> durch die Bindung von Phenylalanin zu einem späteren Zeitpunkt eluierte. Sie konnte damit von der nicht-aminoacylierten tRNA<sup>Phe</sup> isoliert werden.

Die Methode der Abtrennung aminoacylierter tRNA<sup>Phe</sup> mit der HPLC konnte für die präparative Herstellung von aminoacylierter tRNA<sup>Phe</sup> genutzt werden. Aus 50 A<sub>260</sub> / 75.000 pmol konnten nach durchschnittlich 22% Aminoacylierung ca. 9000 pmol / 12% Phe-tRNA<sup>Phe</sup> isoliert werden.

## 6.2 Präparation von AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup>

Da die Präparation von AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> weitgehend mit der Präparation von Phe-tRNA<sup>Phe</sup> übereinstimmt, wurden die dort optimierten Parameter ebenfalls für die AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> – Präparation verwendet. Zur Unterscheidbarkeit von AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> und Phe-tRNA<sup>Phe</sup> bei gleichzeitiger Verwendung in einem Versuchsansatz wurde AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> mit einem Tritium (<sup>3</sup>H)-Label markiert. Ein direkter Vergleich zweier gleichartiger Versuchsansätze mit <sup>14</sup>C und



**Abb. 29: Vergleich der Aminoacylierung unter Verwendung verschiedener radioaktiver Label**

Für den Vergleich der Aminoacylierung unter Verwendung verschiedener Label wurde in einem Gesamtvolumen von 310 µl je 50 pmol Hefe-tRNA<sup>Phe</sup>, ein 3facher Überschuss an <sup>14</sup>C bzw. <sup>3</sup>H-markiertem Phenylalanin (bezogen auf die tRNA<sup>Phe</sup>), ein halbes Gesamtvolumen an Tico-Puffer mit 2,5% (v/v) S100 von Hefe in Aminoacylierungspuffer mit 4 mM ATP bei 37°C inkubiert.

<sup>3</sup>H-markiertem Phenylalanin zeigte jedoch eine jeweils unterschiedliche Aminoacylierungsrate. Zum Versuchsende war bei der Probe mit <sup>3</sup>H-Label eine Aminoacylierungsrate von 25,2%, bei

der Probe mit  $^{14}\text{C}$ -Label von 31,4% zu beobachten. (siehe Abb. 29). Die Differenz von 6% musste bei der Versuchsplanung in Bezug auf zu erwartender Ausbeute berücksichtigt werden. Ursache für die Beobachtung war vermutlich die freiwerdende Energie beim radioaktiven Zerfall von Tritium, welche zu einer Destabilisierung der Bindung zwischen Aminosäure und tRNA führte.

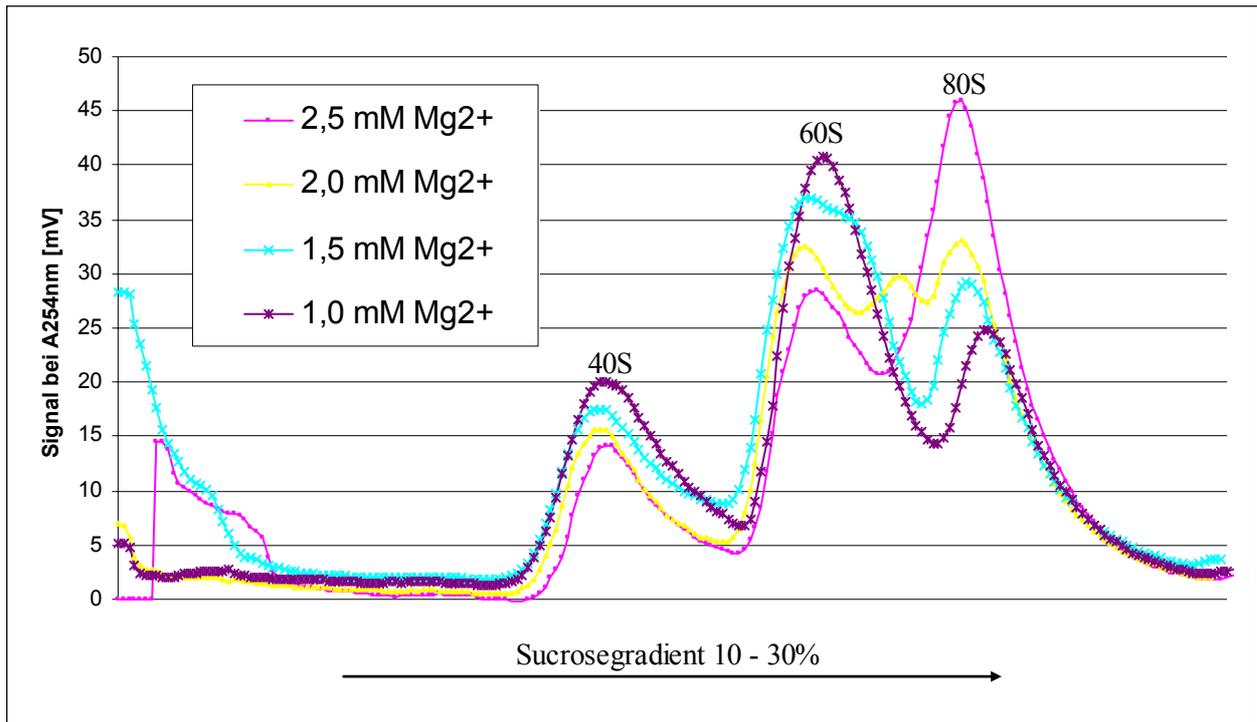
### **6.3 Präparation ribosomaler Untereinheiten**

Ein Ziel dieser Arbeit war die Herstellung möglichst reiner ribosomaler IRES-Komplexe. Bei einer Verwendung von 80S-Ribosomen ist es möglich, dass noch verunreinigende tRNAs oder andere Faktoren aus dem Ursprungsorganismus an das Ribosom gebunden sind. Daher wurden die Komplexe mit Hilfe aufgereinigter ribosomaler Untereinheiten hergestellt. Zu deren Gewinnung wurden 80S-Ribosomen isoliert, in Untereinheiten dissoziiert und mit Hilfe von Sucrosegradienten isoliert.

#### **6.3.1 Optimierung der Dissoziation von Heferibosomen**

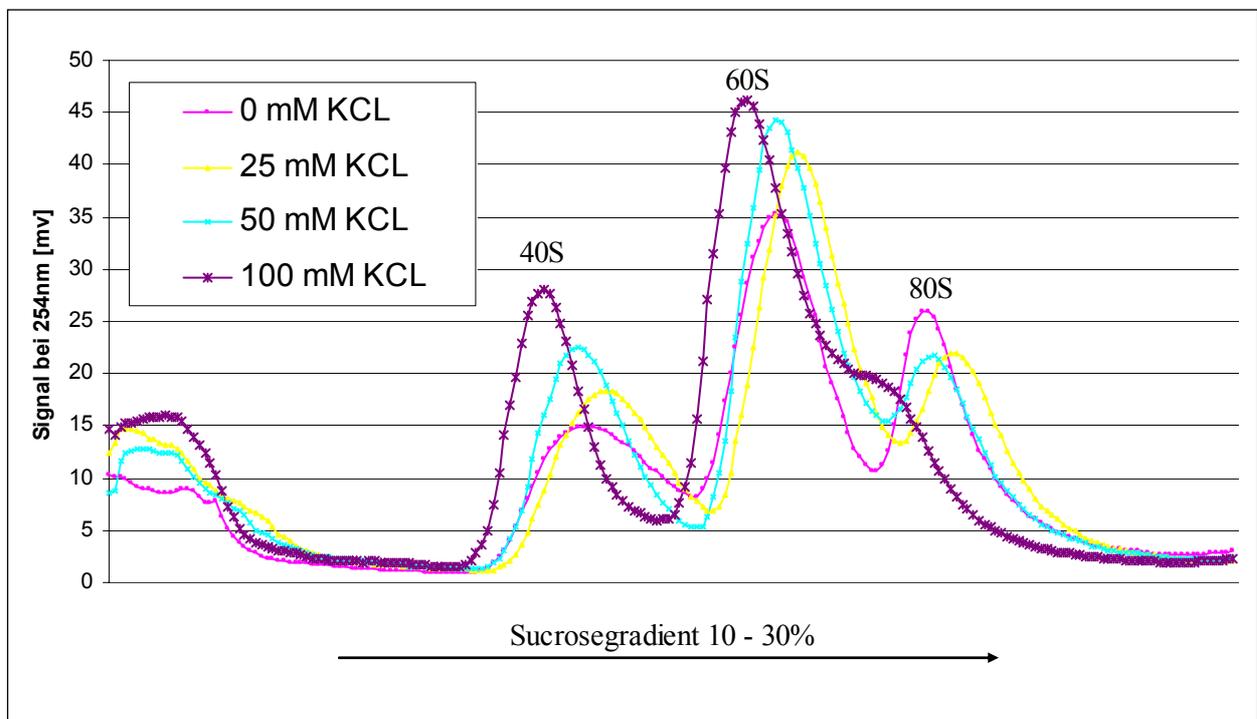
Bei der Dissoziation von 80S in 40S- und 60S-Untereinheiten spielen die Konzentrationen der RNA-stabilisierenden Mono- und bivalenten Kationen eine große Rolle. Durch Verringerung der jeweiligen Ionenkonzentration kommt es zur Dissoziation der 80S-Ribosomen in die Untereinheiten Y40S und Y60S. Zu geringe Werte führen zur Degradierung der ribosomalen Untereinheiten. Die Optimierung der Magnesiumionen-Konzentration erfolgte durch Inkubation von 80S bei verschiedenen Magnesiumacetat-(MgAc) Konzentrationen im Bereich zwischen 1-2,5 mM. Die Ansätze wurden mit Hilfe einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) untersucht. Dabei war bei abnehmender Magnesiumionen-Konzentration eine Zunahme von 40S bzw. 60S und eine Abnahme von 80S zu beobachten (siehe Abb. 30). Die höchste Dissoziation konnte bei 1 mM Magnesiumacetat beobachtet werden. Für weitere Dissoziationsexperimente wurde daher eine Konzentration von 1 mM MgAc verwendet. Die geeignete Konzentration an monovalenten Kationen wurde durch Inkubation von kruden 80S-Ribosomen bei verschiedenen Kaliumchlorid-(KCL) Konzentrationen im Bereich zwischen 0-100 mM und anschließender analytischer Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) ermittelt. Bei zunehmender KCL-Konzentration ist eine Zunahme der 40S- und 60S-Untereinheiten und eine Abnahme von 80S zu beobachten. Die höchste Dissoziation war bei einer Konzentration von 100 mM KCL zu beobachten (siehe Abb. 31). Für weitere Dissoziationsexperimente wurde daher eine Konzentration von 100 mM KCL verwendet. Bei

beiden Optimierungen war noch ein 80S-Peak sichtbar. Er diente als Kontrolle, da bei 100%iger Dissoziation von einer Degradierung der Untereinheiten auszugehen war.



**Abb. 30:** UV-Saccharosegradientenprofil der Dissoziationsuntersuchung mit MgAc

Versuchsbedingungen: Inkubation 1 min 4°C, 18 pmol Y80S, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 2 mM DTT, Magnesiumacetat (MgAc): 1,0 / 1,5 / 2,0 / 2,5 mM



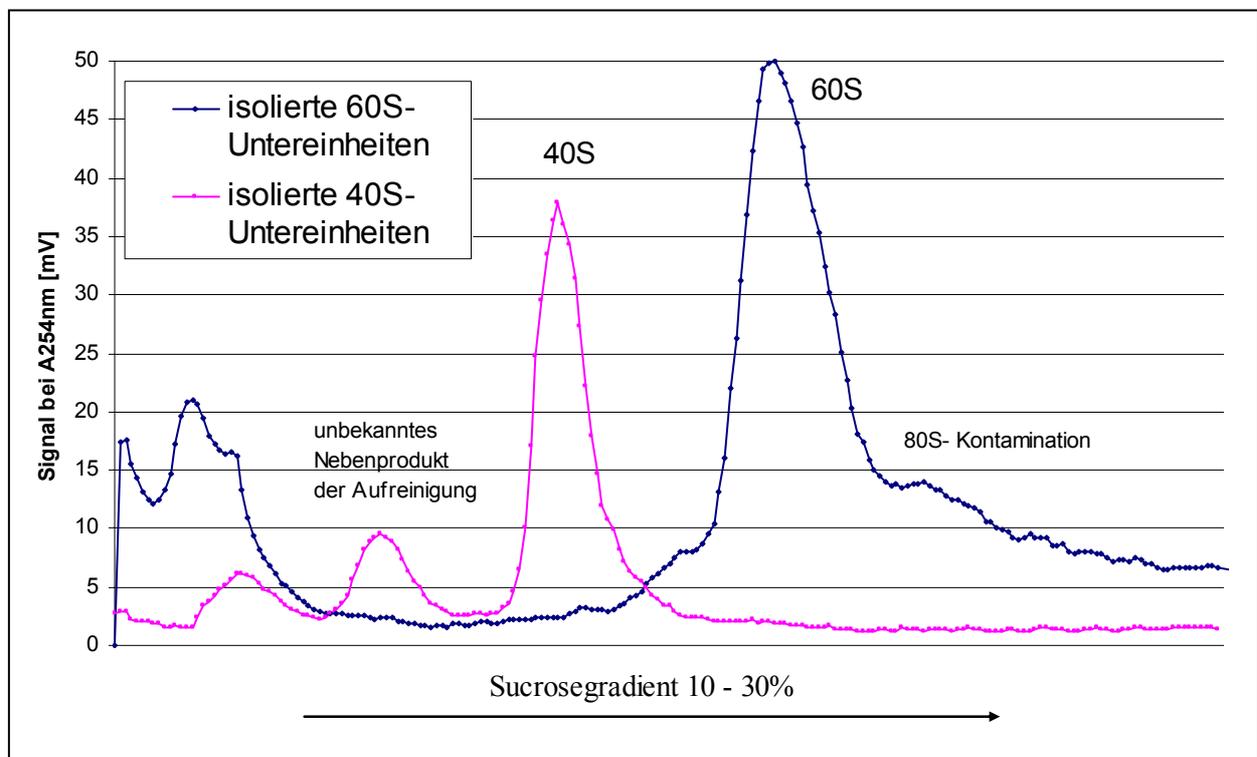
**Abb. 31:** UV-Saccharosegradientenprofil der Dissoziationsuntersuchung mit KCL

Versuchsbedingungen: Inkubation 1min 4°C, 18 pmol Y80S, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 1,0 mM MgAc, 2 mM DTT, KCL: 0 / 25 / 50 / 100 mM

### 6.3.2 Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten

Die Methode zur Aufreinigung ribosomaler Untereinheiten stammt ursprünglich von *Maag und Lorsch* (Maag et al., 2006). Dabei werden 80S-Ribosomen durch verschiedene Zentrifugationsschritte isoliert und in ribosomale Untereinheiten dissoziiert. Diese Untereinheiten können dann durch eine präparative Saccharosegradienten-Zentrifugation (siehe 5.5.4) isoliert werden. Die zur Dissoziation notwendigen Bedingungen wurden zur Verbesserung von Qualität und Ausbeute optimiert (siehe 6.3.1), es konnten jedoch keine signifikanten Verbesserungen im Vergleich zum Ursursprungsprotokoll festgestellt werden.

Im präparativen Maßstab wurden je 1800 pmol Y80S in Dissoziationspuffer (20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 1 mM MgAc, 2 mM DTT) aufgenommen und mittels Saccharosegradientenzentrifugation aufgereinigt.



**Abb. 32: UV-Saccharosegradientenprofil zur Reinheitsanalyse der isolierten ribosomalen Untereinheiten**

Pufferbedingungen: 25 pmol Y60S bzw. 50 pmol Y40S, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2,5 mM MgAc, 2 mM DTT

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Untereinheiten wurde je eine analytische Saccharosegradienten-Zentrifugation (siehe 5.5.4) durchgeführt. Bei beiden analytischen Gradienten konnte je ein entsprechender Produktpeak beobachtet werden (siehe Abb. 32). Beide Untereinheiten wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Die 40S-Untereinheit war mit einem unbekanntem Abbauprodukt kontaminiert, welches aber bei den nachfolgenden Zentrifugationen

im Zuge der Komplexaufreinigung leicht abzutrennen war. Dabei handelt es sich nach persönlicher Rücksprache mit Marianne Collier um 40S-Partikel mit reduziertem Proteingehalt. Die 60S-Untereinheit wies einen hohen Reinheitsgrad mit einer geringen 80S-Kontamination auf. Das Material wurde für die weiteren Versuche verwendet

### **6.3.3 Untersuchung der Ribosomenaktivität durch Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese**

Die Poly(U)-abhängige Poly(Phe)-Synthese wurde zur Charakterisierung der Translationsaktivität der Ribosomen und damit indirekt zur Beurteilung der Qualität der Ribosomen genutzt. Je höher die Poly-Phe-Syntheserate, desto aktiver die Ribosomen. Die Menge der Polyphenylalanine pro Ribosom wurde dabei durch einen TCA-Fällungsassay (siehe 5.5.10) bestimmt. Die Versuchsbedingungen waren dabei wie folgt: In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden je 5 pmol Y40S und Y60S, 4µg Poly(U)-mRNA zusammen mit dem Beladungsreaktionsansatz (siehe Kap.5.5.11.1) unter folgenden Pufferbedingungen für 60 min bei 37°C inkubiert: 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6 (0°C)), 4,5 mM Magnesiumacetat, 150 mM Ammoniumacetat, 4 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM Spermidin und 0,05 mM Spermin

Dabei wurde für die isolierten ribosomalen Untereinheiten folgende Aktivität festgestellt:

ribosomale Untereinheiten: 23,9 verknüpfte Phenylalanin pro Ribosom:

80S-Ribosomen: 14,1 Phenylalanin pro Ribosom:

Die isolierten ribosomalen Untereinheiten zeigten bedingt durch die höhere Reinheit eine höhere Aktivität als die zu Vergleichszwecken untersuchten kruden 80S-Ribosomen. Die Untereinheiten waren zur Translation fähig und wurden daher für die Herstellung ribosomaler IRES-Komplexe verwendet.

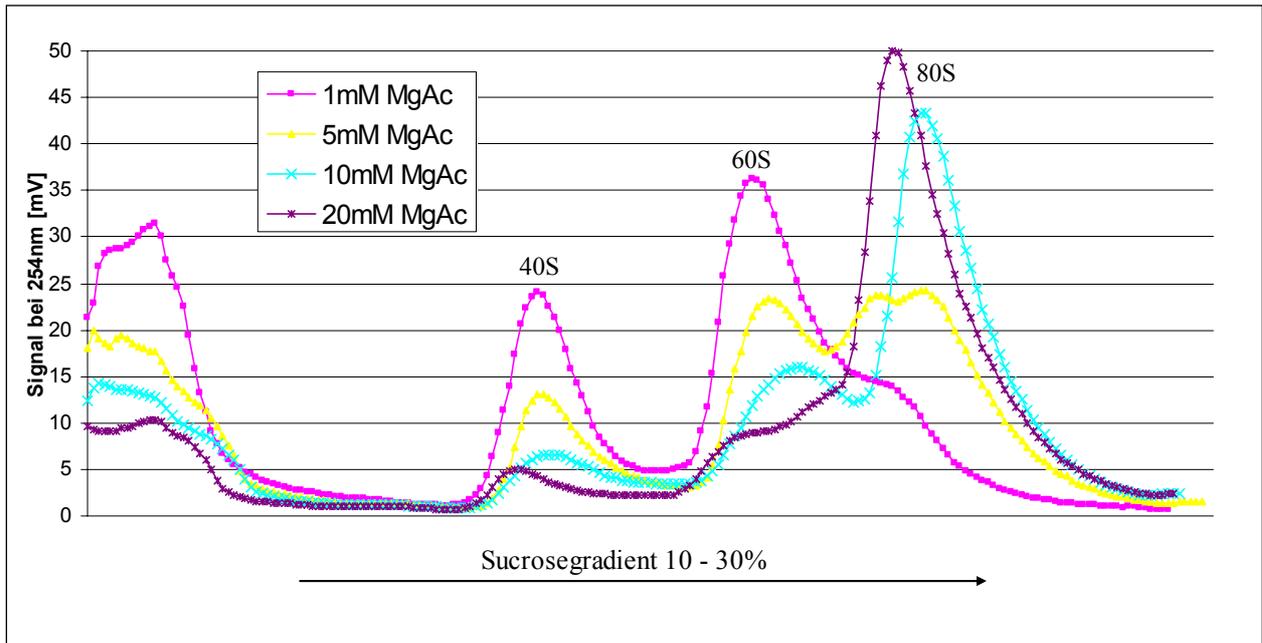
## 6.4 Präparation von Y80S-CrPV-IRES-Komplexen

### 6.4.1 Voruntersuchungen zur IRES-bedingten Reassoziaton

Ribosomale Hefeuntereinheiten können sowohl bei höheren Konzentrationen mono- und bivalenter Kationen als auch mit IRES-mRNA wieder zur 80S-Heferibosomen reassoziieren. Um zwischen IRES- und Ionenbedingter Reassoziaton unterscheiden zu können, wurde *in vitro* die Bildung von 80S aus ribosomalen Hefeuntereinheiten bei verschiedenen Ionenkonzentrationen in An- und Abwesenheit von CrPV-IRES-RNA untersucht.

Bei den Voruntersuchungen zur Ionenbedingten Reassoziaton wurden zunächst krude Y80S dissoziiert (siehe 6.3.1) und auf verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Ansätze wurden danach bei jeweils verschiedenen Magnesiumacetat-(MgAc) Konzentrationen im Bereich zwischen 1-20 mM inkubiert und anschließend mit Hilfe einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) untersucht. Dabei war bei zunehmender MgAc-Konzentration eine Abnahme von 40S / 60S und eine Zunahme von 80S zu beobachten (siehe Abb. 33). Die Ionenbedingte Reassoziaton war bei 20 mM MgAc am höchsten, bei 1 mM am geringsten. Magnesiumionen-Konzentrationen über 5 mM sind für weitere Reassoziationsversuche mit IRES-RNA ungeeignet, da bereits hier ein hoher Anteil an 80S vorliegt.

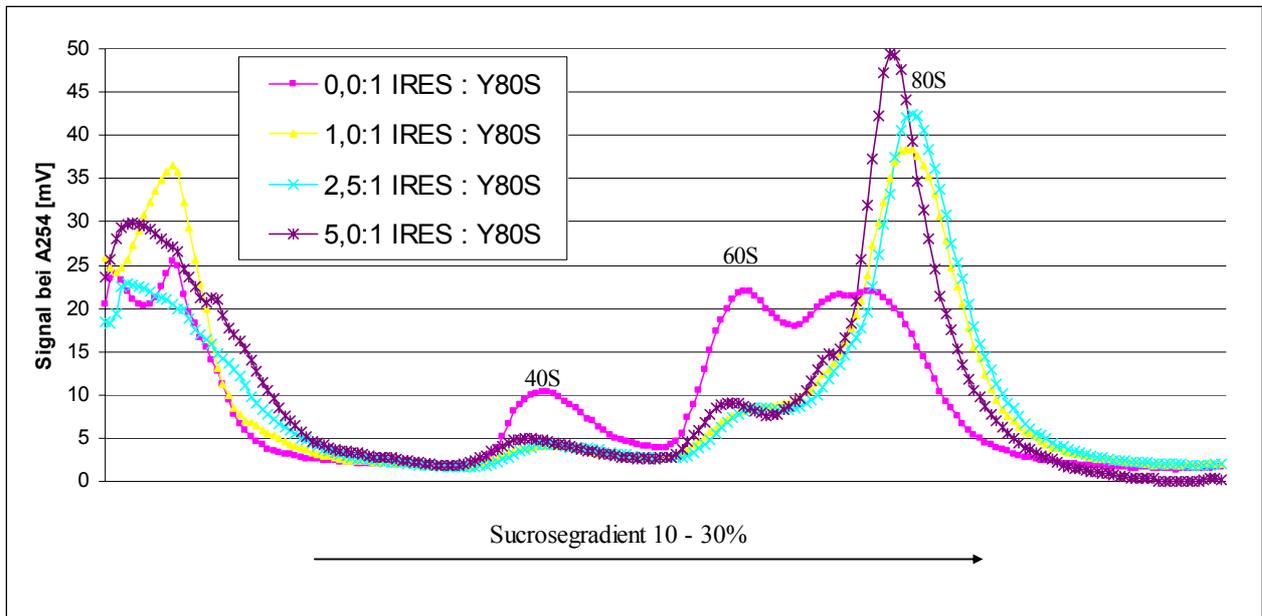
Nach dieser Voruntersuchung wurde nun die IRES-bedingte Reassoziaton untersucht. Dazu wurden zunächst krude Y80S dissoziiert (siehe 6.3.1) und auf verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Ansätze wurden danach mit jeweils verschiedenen Mengen CrPV-IRES (WT) inkubiert und anschließend mit Hilfe einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) untersucht. Hier war bei zunehmender IRES-Konzentration eine Abnahme von 40S / 60S und eine Zunahme von 80S zu beobachten (siehe Abb. 34). Ohne IRES konnte keine Reassoziaton beobachtet werden, die Daten stimmen hier weitgehend mit der entsprechenden Kurve aus der Ionenbedingten Reassoziaton überein (Vergleich Abb. 33+Abb. 34). Bei einem molaren Verhältnis von 5:1 (IRES : Y80S) war der höchste, bei 0:1 der geringste 80S-Anteil zu beobachten. Es konnten jedoch nur geringe Unterschiede zwischen den Ratio 1:1 bis 5:1 beobachtet werden.



**Abb. 33: UV-Saccharosegradientenprofil der ionenbedingten Reassoziationsuntersuchung mit MgAc**

Versuchsbedingungen der Dissoziation: Inkubation 1 min 4°C, 18 pmol Y80S, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 1,0 mM MgAc, 2 mM DTT

Versuchsbedingungen der Reassoziations: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, MgAc: 1 / 5 / 10 / 20 mM

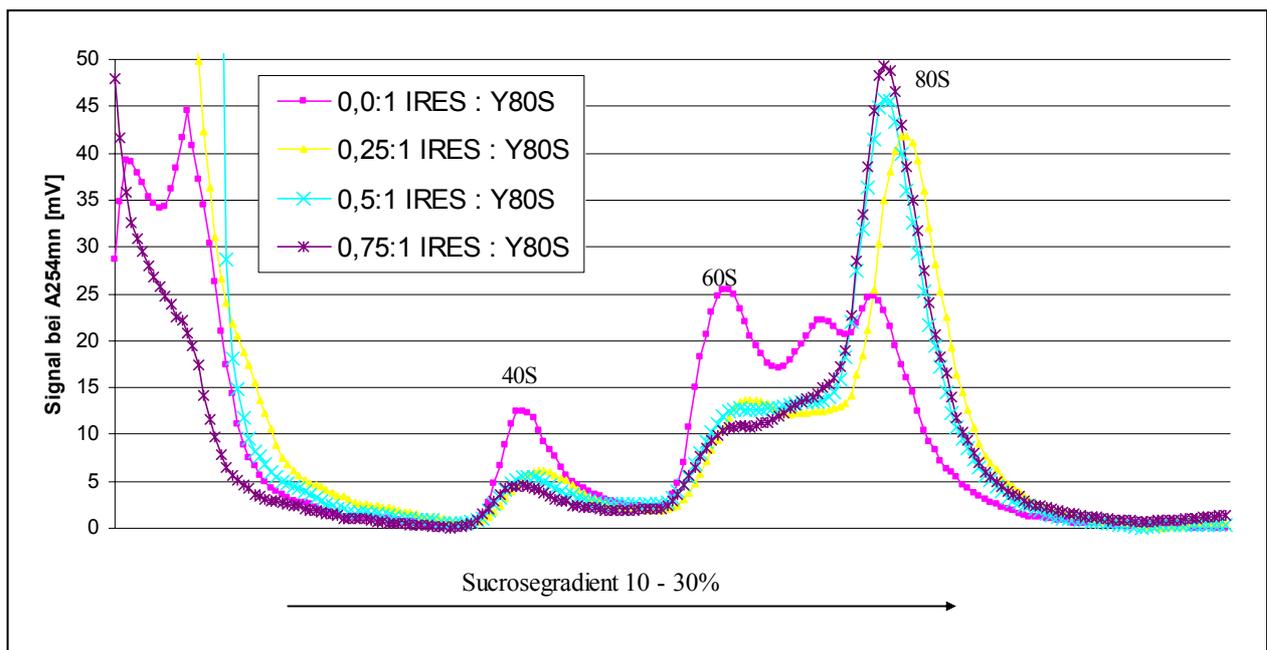


**Abb. 34: UV-Saccharosegradientenprofil der Reassoziationsoptimierung mit verschiedenen Mengenverhältnissen an CrPV-IRES-(WT)**

Versuchsbedingungen der Dissoziation: Inkubation 1 min 4°C, 18 pmol Y80S, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 1,0 mM MgAc, 2 mM DTT

Versuchsbedingungen der Reassoziations: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, 5 mM MgAc, 0 / 18 / 45 / 90 pmol CrPV-IRES-WT-mRNA

Da nur geringe Unterschiede zwischen den Ratio 1:1 bis 5:1 beobachtet werden konnten, war eine genauere Charakterisierung der Menge der für die Reassoziierung benötigten an IRES-mRNA notwendig. Übereinstimmend mit der obigen Versuchsdurchführung wurden Y80S dissoziiert, bei verschiedenen molaren Verhältnissen von CrPV-IRES (WT) zu Y80S inkubiert und mit Hilfe einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) analysiert. Erneut war bei zunehmender IRES-Konzentration eine Abnahme von 40S / 60S und eine Zunahme von 80S zu beobachten. (siehe Abb. 35). Trotz des IRES-Unterschusses von 0,75:1 (IRES: Y80S) wurde eine in etwa gleichstarke Reassoziierung im Vergleich zum Versuch mit dem bis zu fünffachen Überschuss beobachtet. Dies steht im Widerspruch zu den Erwartungen, da IRES-RNA im proportionalen Verhältnis an die ribosomalen Untereinheiten binden und diese zu 80S Reassoziieren sollte. Eine mögliche Ursache könnte der Restgehalt an 80S im Versuchsansatz sein, mit dem die tatsächlich verfügbare Menge an ungebundenen ribosomalen Untereinheiten reduziert wird. Aufgrund der beobachteten Sättigung wurden weitere Reassoziierungsexperimente bei einem molaren Verhältnis von 0,75 : 1 von IRES zu Y80S durchgeführt.

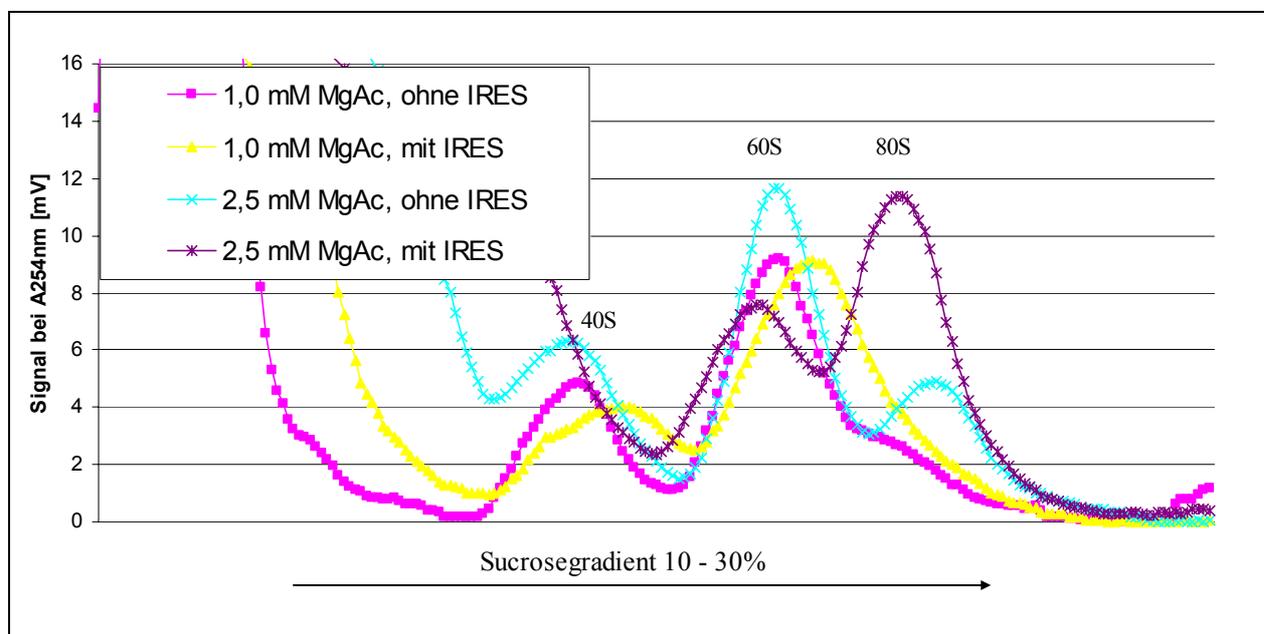


**Abb. 35: UV-Saccharosegradientenprofil der Reassoziierungsoptimierung mit verschiedenen Mengenverhältnissen an CrPV-IRES-(WT)**

Versuchsbedingungen der Dissoziation: Inkubation 1 min 4°C, 18 pmol Y80S, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 1,0 mM MgAc, 2 mM DTT

Versuchsbedingungen der Reassoziierung: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, 5 mM MgAc, 0 / 4,5 / 9 / 13,5 pmol CrPV-IRES-WT-mRNA

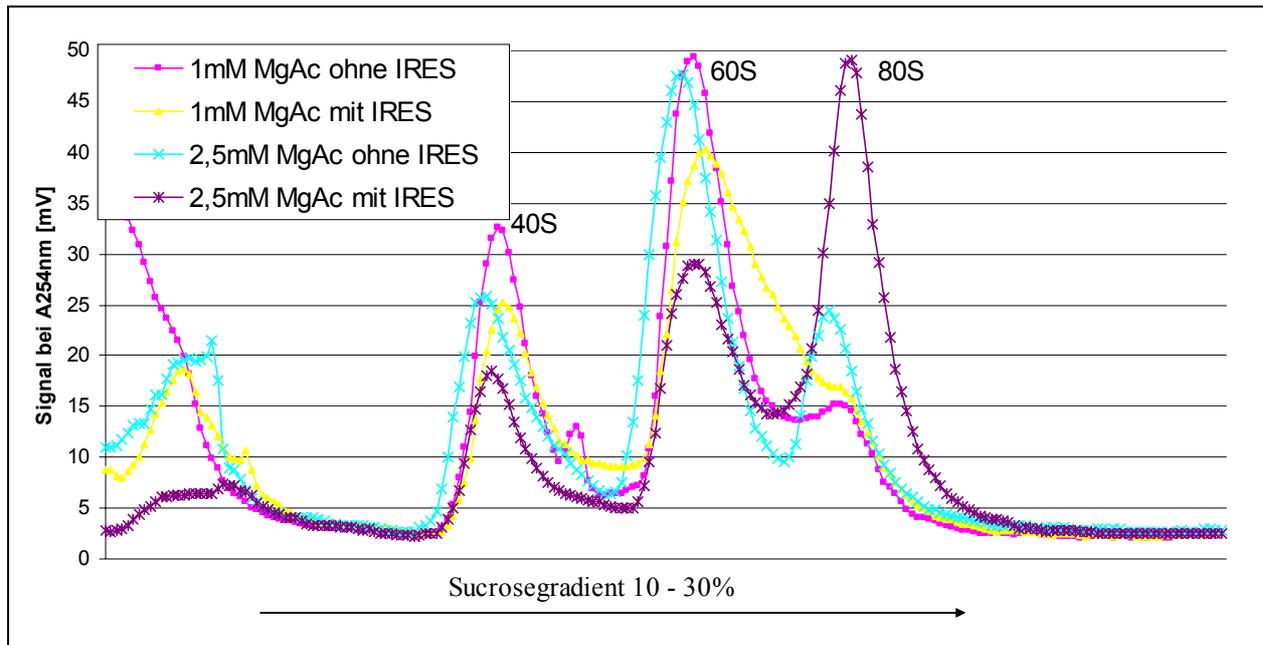
Die Konzentration bivalenter Kationen ist eine kritische Komponente für die Reaktion von IRES-RNA und Ribosom, da sie unmittelbare Auswirkungen auf die RNA-Faltung und damit auf deren Funktion hat. Daher wurde nun der Einfluss der Magnesiumionen-Konzentration auf die IRES-Bindung genauer untersucht. Dazu wurden krude Y80S dissoziiert und bei Magnesiumacetat-(MgAc) Konzentrationen von 1,0 und 2,5 mM in An- und Abwesenheit von 0,75fachem Überschuss an CrPV-IRES (WT) (bezogen auf Y80S) IRES-mRNA inkubiert. Zu Vergleichszwecken wurden die Versuche ebenfalls mit den zuvor isolierten ribosomalen Hefeuntereinheiten durchgeführt. Die Ansätze wurden mit Hilfe einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) untersucht. Bei einer MgAc-Konzentration von 1 mM war keine (Abb. 36) oder nur eine sehr geringe (Abb. 37) Zunahme des 80S-Peaks und damit der Reassoziations zu beobachten. Bei 2,5 mM MgAc konnte hingegen in beiden Fällen eine deutliche Zunahme des 80S-Peaks beobachtet werden (siehe Abb. 36+Abb. 37). Hervorzuheben ist, dass die Peaks bei den Versuchsansätzen mit isolierten ribosomalen Untereinheiten besser voneinander getrennt waren. Für weitere Reassoziationsversuche mit IRES-RNA ist eine MgAc-Konzentration von 2,5 mM am besten geeignet. Die Verwendung der isolierten Untereinheiten ist möglich und führt zu einer besseren Trennbarkeit der Peaks bzw. der Produkte. Da hierbei keine undissoziierten 80S-Ribosomen vorliegen, wird in weiteren Versuchen ein Verhältnis von 1:1 (80S zu IRES) verwendet.



**Abb. 36: UV-Saccharosegradientenprofil der Reassoziationsoptimierung mit mit CrPV-IRES-(WT) bei verschiedenen MgAc-Konzentrationen**

Versuchsbedingungen der Dissoziation: Inkubation 1 min 4°C, 9 pmol Y80S, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2,5 mM MgAc, 2 mM DTT

Versuchsbedingungen der Reassoziations: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, 6,75 pmol CrPV-IRES-WT-mRNA, 1,0 / 2,5 mM MgAc

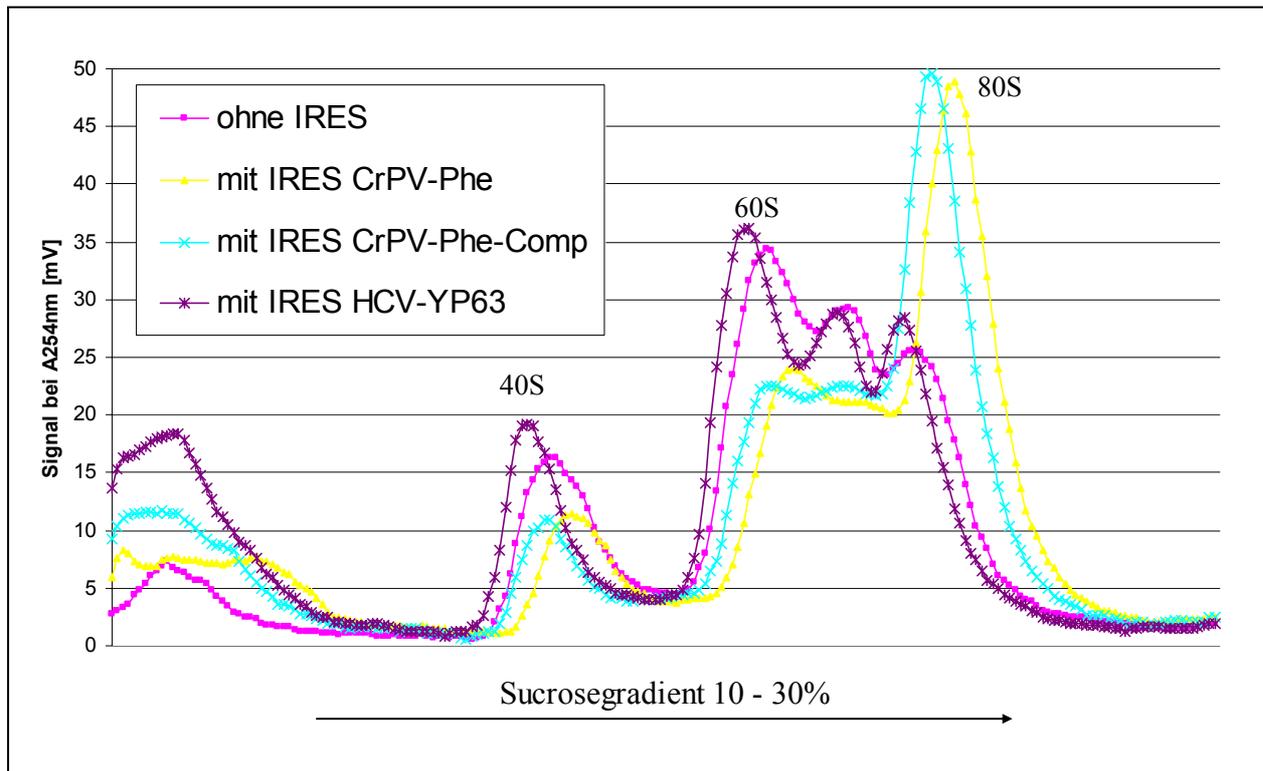


**Abb. 37: UV-Saccharosegradientenprofil der Reassoziationsoptimierung mit isolierten ribosomalen Untereinheiten mit CrPV-IRES (WT) bei verschiedenen MgAc-Konzentrationen**

Versuchsbedingungen der Reassoziations: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, 18,75 pmol CrPV-IRES-WT-mRNA, 50 pmol Y40S, 25 pmol Y60S, 1,0 / 2,5 mM MgAc

Zur Überprüfung auf Spezifität der IRES-basierten Reassoziations wurden krude Y80S dissoziiert und mit je einem molaren Verhältnis von 1:1 (IRES zu Y80S) mit den IRES-Elementen CrPV-IRES-Phe, CrPV-IRES-Comp, HCV-IRES YP63 inkubiert. Die jeweiligen Versuchsansätze wurden mit Hilfe einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) untersucht. Bei den Proben ohne IRES-mRNA und mit HCV-IRES-mRNA war keine Erhöhung des 80S-Peaks und damit keine 80S-Reassoziations zu beobachten (siehe Abb. 38). Diese konnte nur bei den Proben mit CrPV-IRES-mRNA beobachtet werden.

Beide CrPV-IRES-Konstrukte sind daher zur 80S-Reassoziations funktionell in der Lage. Die HCV-IRES benötigt dazu weitere Initiationsfaktoren (Sizova, Kolupaeva et al. 1998) und zeigt im Vergleich zur Probe ohne IRES keine Erhöhung der 80S-Konzentration. Aus den Ergebnissen ist abzuleiten, dass die Reassoziations durch die CrPV-IRES-mRNA bedingt wird.

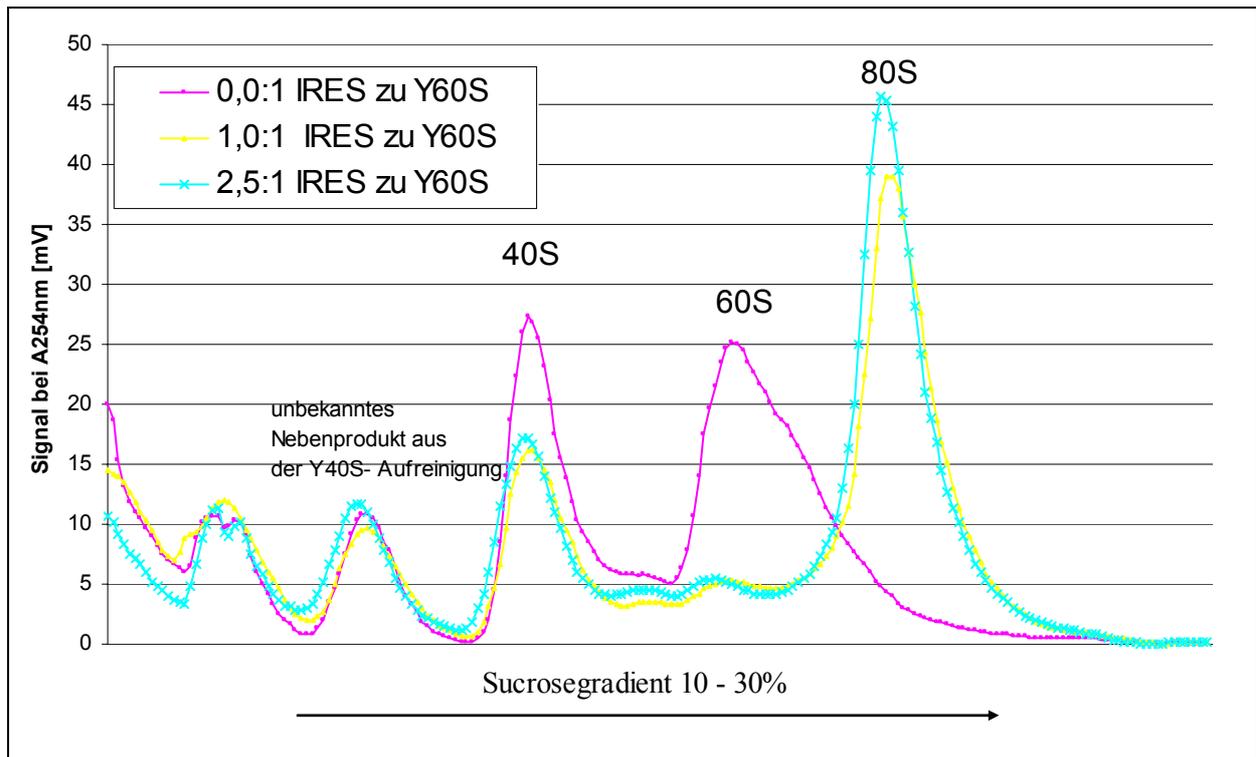


**Abb. 38: UV-Saccharosegradientenprofil der Reassoziationsversuche mit verschiedenen IRES-Elementen**

Versuchsbedingungen der Dissoziation: Inkubation 1 min 4°C, 18 pmol Y80S, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2,5 mM MgAc, 2 mM DTT

Versuchsbedingungen der Reassoziaton: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, je 18 pmol IRES-mRNA, 2,5 mM MgAc

Als Vorbereitung für die präparative Herstellung eines Y80S-CrPV-IRES-Komplexes wurden nun ribosomale Untereinheiten mit verschiedenen Ratio an CrPV-IRES (WT) (bezogen auf Y60S) inkubiert. Die Ansätze wurden mit Hilfe einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) untersucht. Bei einer Ratio von 2,5: 1 konnte nur ein geringfügig höherer 80S-Peak bzw. Reassoziaton beobachtet werden (siehe Abb. 39). Daher wurde für weitere Versuche ein 1:1 – Verhältnis zwischen IRES und Y60S gewählt.



**Abb. 39: UV-Saccharosegradientenprofil der Reassoziationsoptimierung mit verschiedenen molaren Ratio IRES zu Y60S**

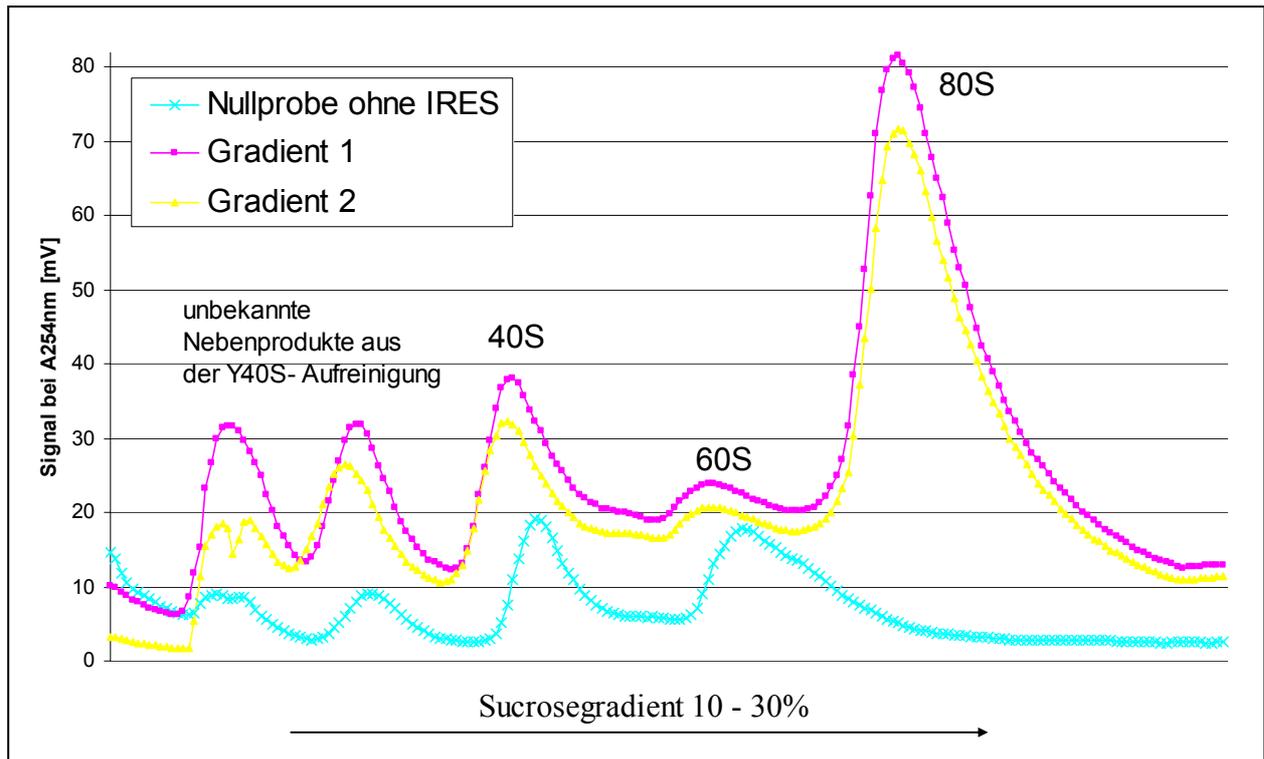
Versuchsbedingungen der Reassoziations: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, 2,5 mM MgAc, 18,75 pmol CrPV-IRES-WT-mRNA, 50 pmol Y40S, 25 pmol Y60S

#### 6.4.2 Präparation von Y80S-CrPV-IRES (WT)

Die Präparation von Y80S-CrPV-IRES-WT wurde unter den zuvor optimierten Versuchsbedingungen durch Inkubation von Y40S, Y60S und CrPV-IRES -mRNA(WT) durchgeführt. Das Produkt wurde mittels Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) und anschließender Fraktionierung von nicht-assoziierten Untereinheiten abgetrennt. Der Kontrollansatz ohne IRES zeigte im Gegensatz zu den Ansätzen mit IRES-mRNA keinen 80S-Peak. (siehe Abb. 40).

Durch den Vergleich mit dem Kontrollansatz ohne IRES konnte auf eine erfolgreiche Reassoziations geschlossen werden. Die kontaminierenden Bestandteile aus der 40S-Präparation sowie nicht assoziierte 40S- und 60S-Untereinheiten wurden durch die Saccharosegradientenzentrifugation weitgehend abgetrennt.

Wie beschrieben (siehe 5.5.4) wurden die dem Produkt entsprechenden Fraktionen gepoolt und das Produkt mittels Zentrifugation pelletiert.

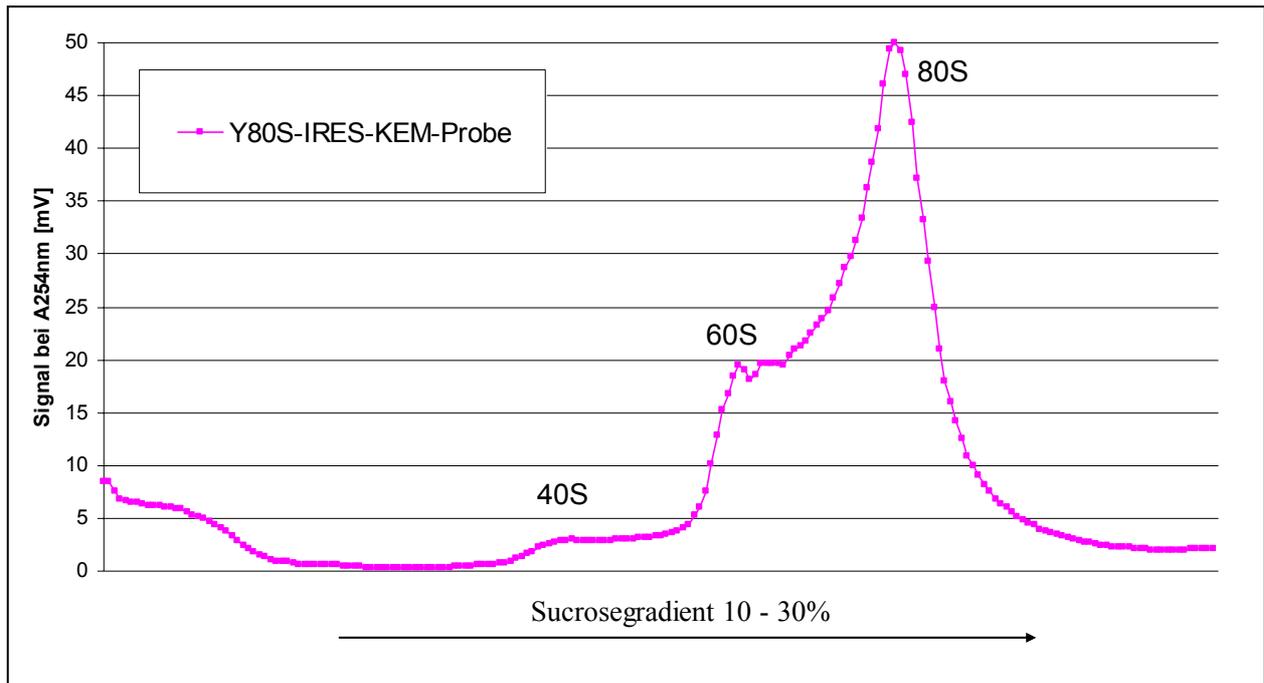


**Abb. 40: UV-Saccharosegradientenprofil der präparativen Reassoziationsanalyse mit CrPV-IRES-mRNA und ribosomalen Untereinheiten**

Versuchsbedingungen der Reassoziationsanalyse: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCL, 2 mM DTT, 2,5 mM MgAc, 0 bzw. 146 pmol CrPV-IRES-WT-mRNA, 292 pmol Y40S, 146 pmol Y60S

### 6.4.3 Analytische Untersuchungen des Y80S-CrPV-IRES-(WT) Komplexes

Die Homogenität des Y80S-CrPV-IRES-Komplexes wurde mit einer analytischen Saccharosegradienten-Zentrifugation (siehe) überprüft. Das isolierte Material wies einen hohen Anteil an Y80S-IRES-Komplex, jedoch ebenso einen signifikanten Anteil an 60S auf (siehe Abb. 41). Y60S und Y80S-IRES-Komplex werden vom Saccharosegradienten nicht vollständig voneinander getrennt, die Peaks gehen ineinander über. Dies muss bei zukünftigen Versuchen beachtet werden. Aufgrund der dennoch recht hohen Homogenität der Probe wurde diese durch KEM und Einzelpartikelrekonstruktion untersucht. Dabei konnten *in silicio* die 60S-Partikel vom Datensatz der CrPV-IRES-80S-Struktur entfernt werden.



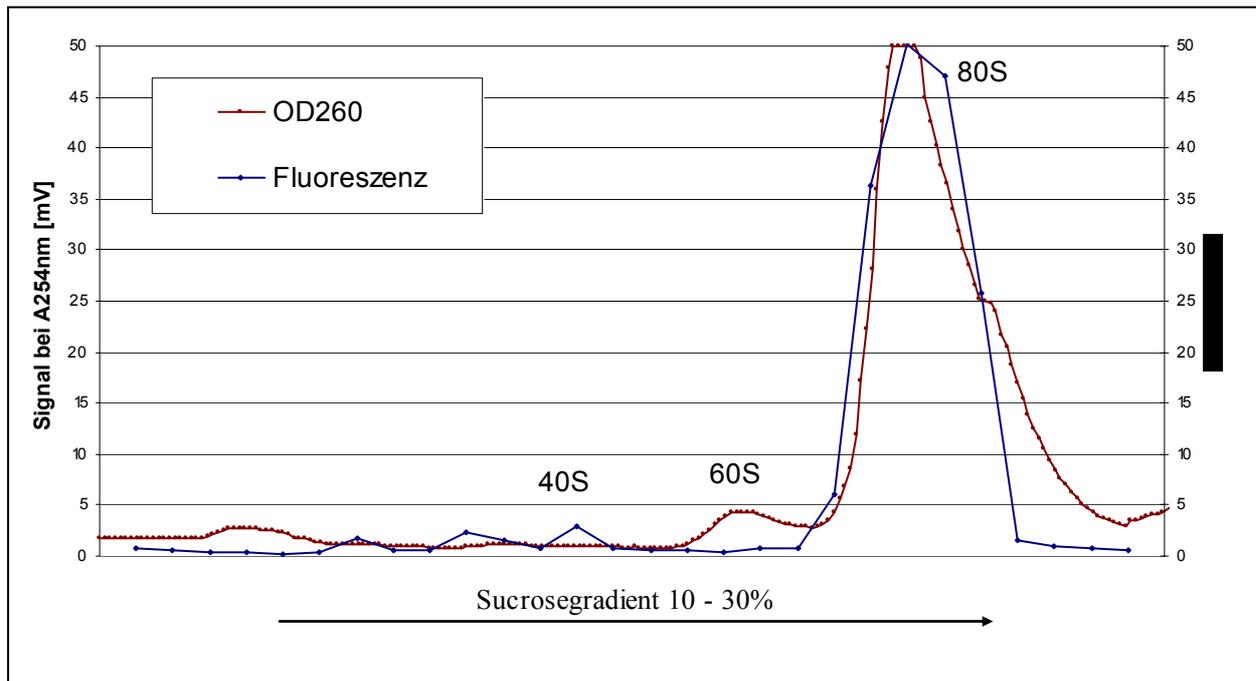
**Abb. 41:** UV-Saccharosegradientenprofil der Reinheitsanalyse der Y80S-CrPV-IRES-(WT)-KEM-Probe

Pufferbedingungen: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 2 mM DTT, 6 mM MgAc, 18 pmol Y80S-CrPV-IRES-WT-mRNA-Komplex

Das Vorhandensein der am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzlabel versehender IRES-mRNA in dem Y80S-CrPV-IRES-Komplex wurde mittels analytischer Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) und anschließender Fluoreszenzmessung (siehe 5.7.7.2) überprüft. Dabei wurden ca. 18 pmol des Komplexes auf den Saccharosegradienten aufgetragen und fraktioniert. Währenddessen wurde die  $A_{260}$  gemessen und aufgezeichnet. Anschließend wurden die Fraktionen mit den *Typhoon Imager* bei einer Anregungswellenlänge von 488nm und einer Emissionswellenlänge von 520nm auf ihren Fluoreszenzgehalt hin untersucht.

Das beobachtete Fluoreszenzsignal ist nahezu deckungsgleich mit dem entsprechenden 80S-Peak der  $A_{260}$ -Messung (siehe Abb. 42). Die fluoreszenzgelabelte IRES-RNA muss also einen Komplex mit Y80S bilden.

Das Material wurde für die kryoelektronenmikroskopische Untersuchung zur Bestimmung der IRES-Struktur genutzt.



**Abb. 42: UV- und Fluoreszenz-Saccharosegradientenprofil der Reinheitsanalyse der Y80S-CrPV-IRES-(WT)-KEM-Probe**

Pufferbedingungen: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 2 mM DTT, 6 mM MgAc, 18 pmol Y80S-CrPV-IRES-WT-mRNA-Komplex

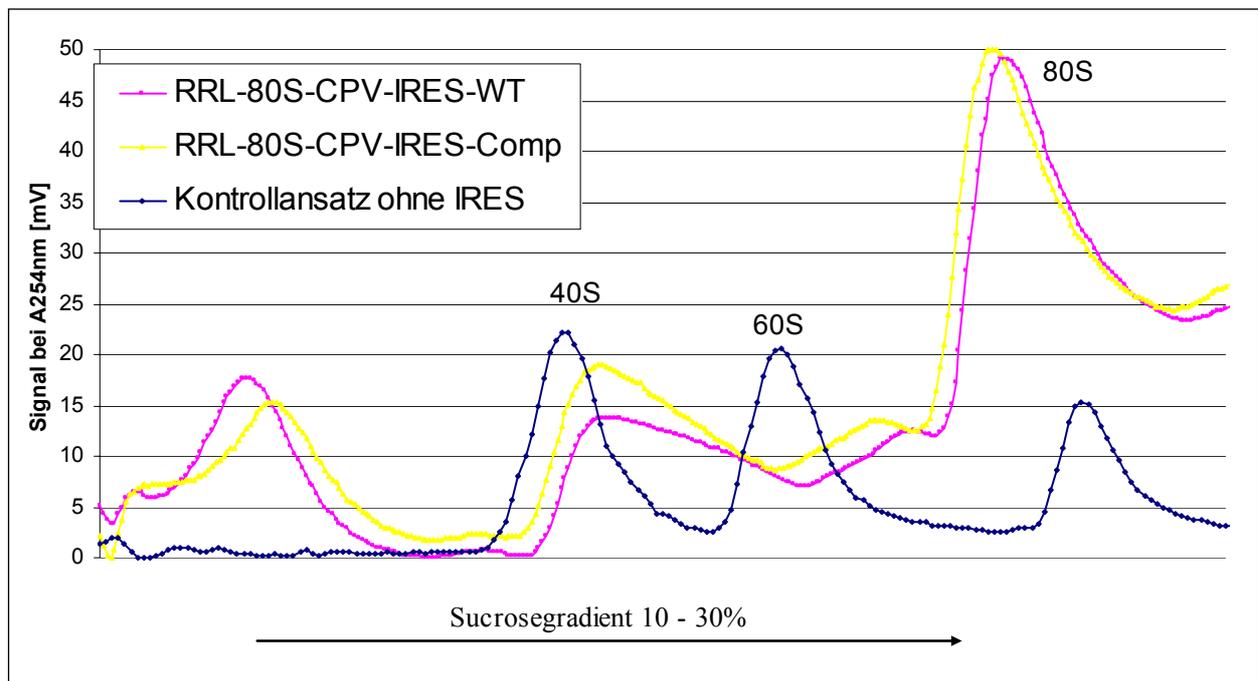
## 6.5 Präparation von RRL80S-CrPV-IRES-Komplexen

Da die isolierten Komplexes aus Hefe-Ribosomen und CrPV-IRES-RNA bei Experimenten zur Untersuchung der Translationsinitiation unter Verwendung von ternärem Komplex keine entsprechende Aktivität zeigte (siehe 6.7.2.1), wurden die Versuche zusätzlich mit ribosomalen Untereinheiten aus lysiertem Kaninchenblut (engl. *rabbit reticulocyte lysate*, RRL) durchgeführt. Diese Untereinheiten wurden durch eine für diese Art der Ribosomen optimierte Methode (siehe 5.6.5) isoliert.

### 6.5.1 Präparation von RRL80S-CrPV-IRES-(Phe) und -(Comp)-Komplexen

Die Präparation von RRL80S-CrPV-IRES-WT wurde wie in Kapitel 5.6.10 beschrieben durch Inkubation von RRL40S, RRL60S und CrPV-IRES-RNA (WT) bzw. CrPV-IRES-RNA (Comp) durchgeführt. Die Produkte wurden mittels präparativer Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) und anschließender Fraktionierung von nicht-assoziierten Untereinheiten abgetrennt. Durch den Vergleich mit dem Kontrollansatz ohne IRES (siehe Abb. 43) konnte auf

eine erfolgreiche Reassoziation geschlossen werden. Wie beschrieben (siehe 5.6.8) wurden die dem Produkt entsprechenden Peakfraktionen gepoolt und das Produkt pellettiert.



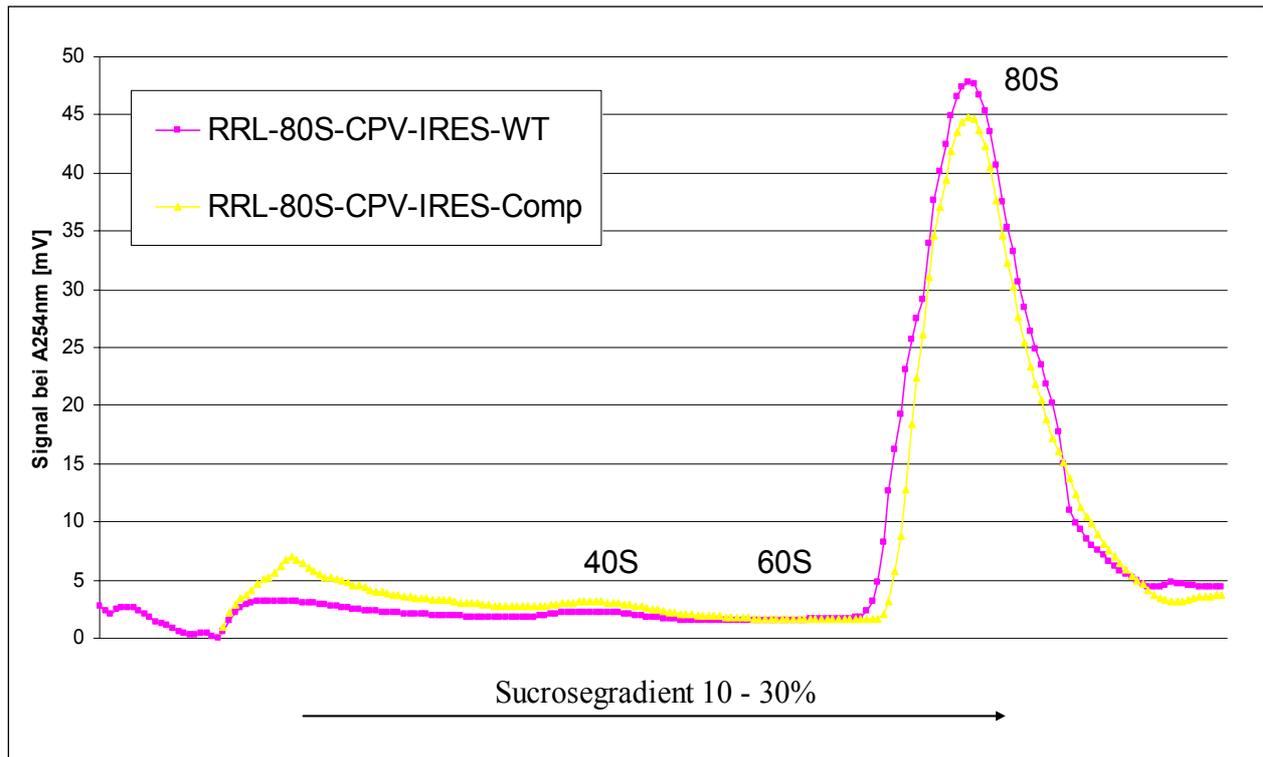
**Abb. 43: UV-Saccharosegradientenprofil der präparativen Reassoziationsanalyse mit CrPV-IRES-mRNA und ribosomalen Untereinheiten**

Versuchsbedingungen der Reassoziationsanalyse: Inkubation 5 min / 30°C / 400 rpm im Thermoschüttler, 20 mM HEPES-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 100 mM KCl, 2 mM DTT, 2,5 mM MgAc, 1250 pmol CrPV-IRES-mRNA, 4500 pmol Y40S, 1250 pmol Y60S, Kontrollansatz ohne IRES-mRNA, 25 pmol RRL60S, 50 pmol RRL40S

### 6.5.2 Analytische Untersuchungen der RRL80S-CrPV-IRES-Komplexe

Die Homogenität des Materials wurde mit einer analytischen Saccharosegradientenzentrifugation (siehe 5.5.4) überprüft (siehe Abb. 41). Die Probe zeigt einen 80S-Peak sowie sehr kleine 40S und 60S-Peaks.

Das isolierte Material wies einen hohen Anteil an RRL80S-IRES-Komplex auf (siehe Abb. 44). Das Material wurde für die weiteren Untersuchungen genutzt.



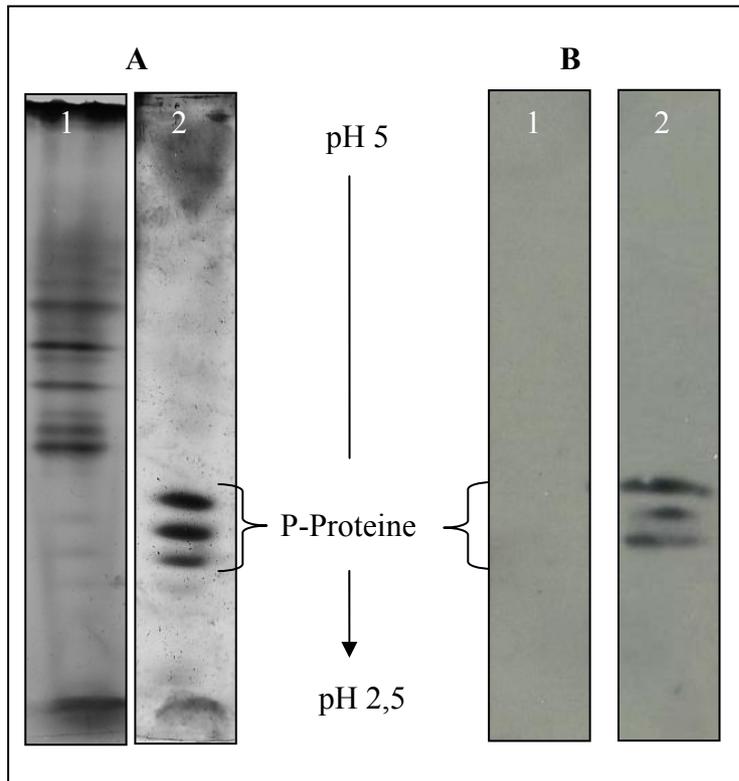
**Abb. 44:** UV-Saccharosegradientenprofil der Reinheitsanalyse der RRL80S-CrPV-IRES-Komplexe

Pufferbedingungen: 20 mM Hepes-KOH (pH 7,6), 100 mM KAc, 2 mM DTT, 6 mM MgAc, 18 pmol Y80S-CrPV-IRES-mRNA-Komplex

## 6.6 Untersuchung der ribosomalen IRES-Komplexe auf Anwesenheit von P-Proteinen

In der 3D-Rekonstruktion des Y80S-CrPV-IRES-Komplexes waren keine den ribosomalen P-Proteinen entsprechenden Dichten erkennbar (siehe Abb. 51 + Abb. 52). Diese wurden möglicherweise durch die wiederholte Aufreinigung der Ribosomen mit Saccharosekissen (siehe 5.6.4.1) abgewaschen. Das Vorhandensein dieser Proteine ist jedoch für die Funktionsfähigkeit der Ribosomen von entscheidender Bedeutung, da hier die ribosomale Interaktion mit Translationsfaktoren erfolgt (Vidales et al., 1984). Eine weitere mögliche Ursache für die nicht zu beobachtenden P-Proteine kann darin liegen, dass sie aufgrund ihrer Flexibilität mit der Technik der Kryo-EM nicht erfassbar sind.

Ribosomale P-Proteine weisen pI-Werte zwischen 3,0 und 3,5 auf (Vidales et al., 1984) und können aufgrund dieser Eigenschaften durch Isoelektrische Fokussierung isoliert (siehe 5.5.3.4) und mit einem Immunoassay (siehe 5.5.6) nachgewiesen werden (siehe Abb. 45).



**Abb. 45: P-Protein-Nachweis beim Y80S-CrPV-IRES-WT-Komplex**

A) Nachweis mit Isoelektrischer Fokussierung mit pH-Gradient pH 5-2,5 und Silberfärbung

B) Nachweis mit Immunoblot (Antikörper P<sub>2</sub>- $\alpha$  IBE3) des pH-Gradientengels

Spur 1: ribosomale core-Proteine\*

Spur 2: P-Proteine

\*Probenvorbereitung (Bailey-Serres et al., 1997): Resuspendierung der Probe in Puffer mit 600 mM NH<sub>4</sub>Cl, 80 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, langsame Zugabe von 50% (v/v) EtOH bei 4°C, pellettieren der "core-Proteine" durch Zentrifugation für 15 min bei 16.000g; Präzipitation der P-Proteine mit 3,5 Vol. Aceton und Zentrifugation 15 min / 16.000g, Resuspendierung in 5 mM NaPO<sub>4</sub> bei pH 7,0. Es konnten den P-Proteinen entsprechenden Banden beobachtet werden. Der Westernblot der core-Proteine zeigte ein nur sehr schwaches Signal

Die P-Proteine konnten sowohl bei dem nach 5.6.9 isolierten Y80S-CrPV-IRES-Phe-Komplex (siehe Abb. 45) als auch den nach 5.6.10 isolierten RRL80S-CrPV-IRES-Komplexen (-Phe, -Comp) (ohne Abb.) nachgewiesen werden. Daher sind die zur Isolierung der ribosomalen Komponenten genutzten Prozeduren als geeignet anzusehen.

## 6.7 Untersuchungen funktioneller Zustände ribosomaler CrPV-IRES-Komplexe

### 6.7.1 Bindung von AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup>

Von den drei ribosomalen Bindungsstellen hat die ribosomale P-Stelle die höchste Bindungsaffinität für tRNAs. Phe-tRNA<sup>Phe</sup> kann auf nicht-enzymatische Weise in die ribosomale P-Stelle gebunden werden. Dabei kann es leicht zu einer spontanen Deaminoacylierung der tRNA kommen. Die AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> ist durch eine chemische Modifikation stabilisiert. Die Modifikation sorgt zusätzlich für eine peptidyl-tRNA-Analogie. Eine Bindung von AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> an die ribosomale P-Stelle resultiert im sog. P<sub>i</sub>-Zustand (i= Initiation). Er ist ein essentieller Schritt und ist ein Merkmal für eine funktionierende Translationsinitiation. Im Falle des 80S-IRES-Komplexes ist die ribosomale P-Stelle durch die IRES-Domäne 3 besetzt. Es ist also eine Pseudotranslokation dieser Domäne notwendig, um eine tRNA in die ribosomale P-

Stelle binden zu können. Bleibt die Domäne dort gebunden, kann die tRNA theoretisch in die ribosomale A-Stelle binden. Die Versuche sollen darüber Auskunft geben ob I) der Translokationsfaktor eEF2 fähig ist eine Pseudotranslokationsreaktion von IRES-Domäne 3 auszulösen und II) ob trotz besetzter P-Stelle die Bindung von AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> möglich ist.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde der Y80S-IRES-Komplex *Y80S-CrPV-IRES (Comp)* zusammen mit [<sup>3</sup>H]AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> inkubiert und mit Hilfe verschiedener Nachweisreaktionen nach *Watanabe* (Watanabe, 1972; Watanabe and Tanaka, 1972) untersucht.

Für die Versuche wurden zwei Ansätze mit je 110 pmol [<sup>3</sup>H]AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> und 55 pmol Y80S bzw. Y80S-CrPV-IRES (Comp)-Komplex hergestellt. Dem Kontrollansatz ohne IRES-RNA wurde 440µg Poly(U)-mRNA zugesetzt. Die Ansätze wurden anschließend unter folgenden Ionenbedingungen für 10 min bei 30°C inkubiert: 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6 (0°C)), 6 mM Magnesiumacetat, 150 mM Ammoniumacetat, 4 mM β-Mercaptoethanol. Die Reaktionsansätze wurden anschließend aufgeteilt und mit Hilfe eines Filterbindungstest sowie einer Puromycinreaktion untersucht. Dabei wurde ebenfalls jeweils die eEF2-vermittelte Translokationsreaktion untersucht. Als Kontrollen zur Bestimmung der unspezifischen Signale dienten Ansätze ohne Puromycin und ohne eEF2. Die entsprechenden Messwerte wurden vom Messsignal der Proben abgezogen. In den Tabellen 11 und 12 sind die Ergebnisse dargestellt:

**Tab. 11: Ergebnisse des Filterbindungstests nach AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> Bindung an Y80S -CrPV-IRES (Comp)**

Filterbindungstest			
Poly(U)	IRES	eEF2	tRNA / Y80S [%]
+	-	-	82
+	-	+	86
-	+	-	6
-	+	+	6

Bei dem Kontrollansatz mit Poly(U)-mRNA konnte eine 82%igen tRNA-Bindung beobachtet werden. In Anwesenheit von eEF2 stieg dieser Wert auf 86% (siehe Tab. 11). eEF2 vermittelt die Translokation der tRNA von der A-zur P-Stelle. Der höhere Wert lässt den Schluss zu, dass ein geringer Anteil an AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> lose in die ribosomale A-Stelle gebunden wurde. Diese tRNAs wurden bei der Filtrierung vom Ribosom abgelöst und wurden somit nicht gemessen. Erst nach der Translokation in die ribosomale P-Stelle (mit höherer Bindungsaffinität für tRNA)

durch eEF2 konnten diese mit dem Filterassay nachgewiesen werden. Die 80S-IRES-Ansätze zeigten nur eine sehr geringe Bindung von ca. 6%, die im Bereich des Messfehlers lag.

**Tab. 12: Ergebnisse der Puromycinreaktion nach AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup>-Bindung an Y80S-CrPV-IRES (Comp)**

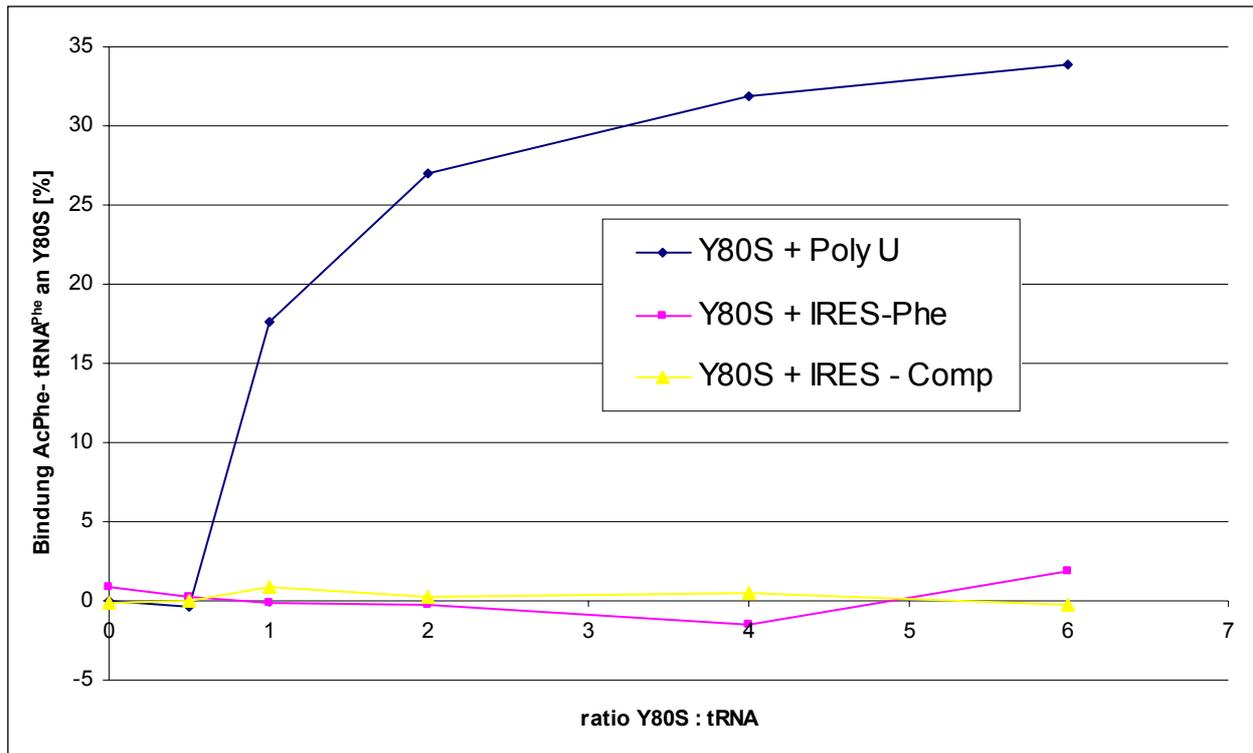
Puromycinreaktion				
Poly(U)	IRES	Puromycin	eEF2	tRNA / Y80S [%]
+	-	+	-	36,5
+	-	+	+	43,7
-	+	+	-	1,1
-	+	+	+	0,8

Die Puromycinreaktion des Poly(U)-mRNA-haltigen Ansatzes (siehe Tab. 11) bestätigte die Beobachtung des Filterbindungstests. Ein geringer Anteil an AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> ist lose in die ribosomale A-Stelle gebunden, da nach der A-P-Stellen-Translokation mit eEF2 eine um 7% stärkere Bindung zu beobachten war. Theoretisch sollte auch entsprechend dem Filterbindungsassay eine ca. 82%ige Bindung zu beobachten sein und nicht nur eine ca. 36,5%ige. Ursache dafür ist wahrscheinlich eine unvollständige Puromycinreaktion, bei der die gebundene AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> nicht quantitativ mit dem Puromycin reagierte.

Die Puromycinreaktion der CrPV-IRES-mRNA-haltigen Probe zeigte wieder nur Messwerte im Bereich des Hintergrundes. Mit diesen Versuchen konnte keine nicht-enzymatische AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup>-Bindung an den Y80S-CrPV-IRES (Comp)-Komplex nachgewiesen werden. Der Translationsfaktor eEF2 ist nicht zur Pseudotranslokation der IRES-Domäne 3 in der Lage, AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> kann nicht in die ribosomale A-Stelle binden.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die Y80S-Komplexe beider IRES-Mutanten mit verschiedenen Mengen an AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mit Hilfe eines Filterbindungstests (siehe 5.5.11.2.4) untersucht.

Bei der Probe mit Poly(U)-mRNA konnte ein Anstieg der tRNA-Bindung bis zu einem Maximum von 34% beobachtet werden (siehe Abb. 46). Bei den Proben mit IRES-RNA konnte keine Bindung beobachtet werden.



**Abb. 46:** Ergebnisse des Bindungstests mit AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> an Y80S mit Poly(U)- und CrPV-IRES-mRNA

Versuchsbedingungen: [<sup>3</sup>H]AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> wurde in jeweils 0(0,5/1/2/4/6 fachem Überschuss zusammen mit je 2,5 pmol Y80S-Poly(U)-mRNA, Y80S-CrPV-IRES (Comp)-Komplex, Y80S-CrPV-IRES (Phe)-Komplex unter folgenden Ionenbedingungen für 10 min bei 30°C inkubiert: 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6 (0°C)), 6 mM Magnesiumacetat, 150 mM Ammoniumacetat, 4 mM β-Mercaptoethanol. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Filterbindungstests. Aus unbekanntem Grund wurde die Bindungsrate von ca.82% des *in-vitro*-Assays nicht erreicht (siehe Tab. 11), möglicherweise hat der bei den Versuchen verwendete neue AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup>-Batch einen Einfluss auf die Bindung. Der absolute Wert hat jedoch keinen Einfluss auf die gewonnene Information.

## 6.7.2 Bindung von ternärem Translationskomplex

### 6.7.2.1 Bindung von ternärem Translationskomplex an Y80S-CrPV-IRES-Komplexe

Da keine Bindung von AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> in die ribosomale A-Bindungsstellen von Y80S-CrPV-IRES-Komplexen zu beobachten war, wurde aus dem Translationsfaktor eEF1A, GTP und Phe-tRNA<sup>Phe</sup> ein ternärer Komplex erzeugt, der *in-vivo*-ähnlich die Bindung der tRNA an die ribosomale A-Stelle unterstützt. Möglicherweise sind die *in-vivo* vorkommenden Faktoren für die Bindung in die ribosomale A-Stelle essentiell notwendig.

Für die Versuche wurde zunächst der ternäre Translationskomplex aus 2,5fachem Überschuss an Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (bezogen auf Y80S) und einem 2fachem Überschuss an eEF1A (bezogen auf Phe-tRNA<sup>Phe</sup>) mit 200 μM GTP in Bindungspuffer durch Inkubation für 5 min bei 30°C erzeugt. Dieser Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von je 2x12,5 μl mit je 0,125 pmol/μl Y80S-

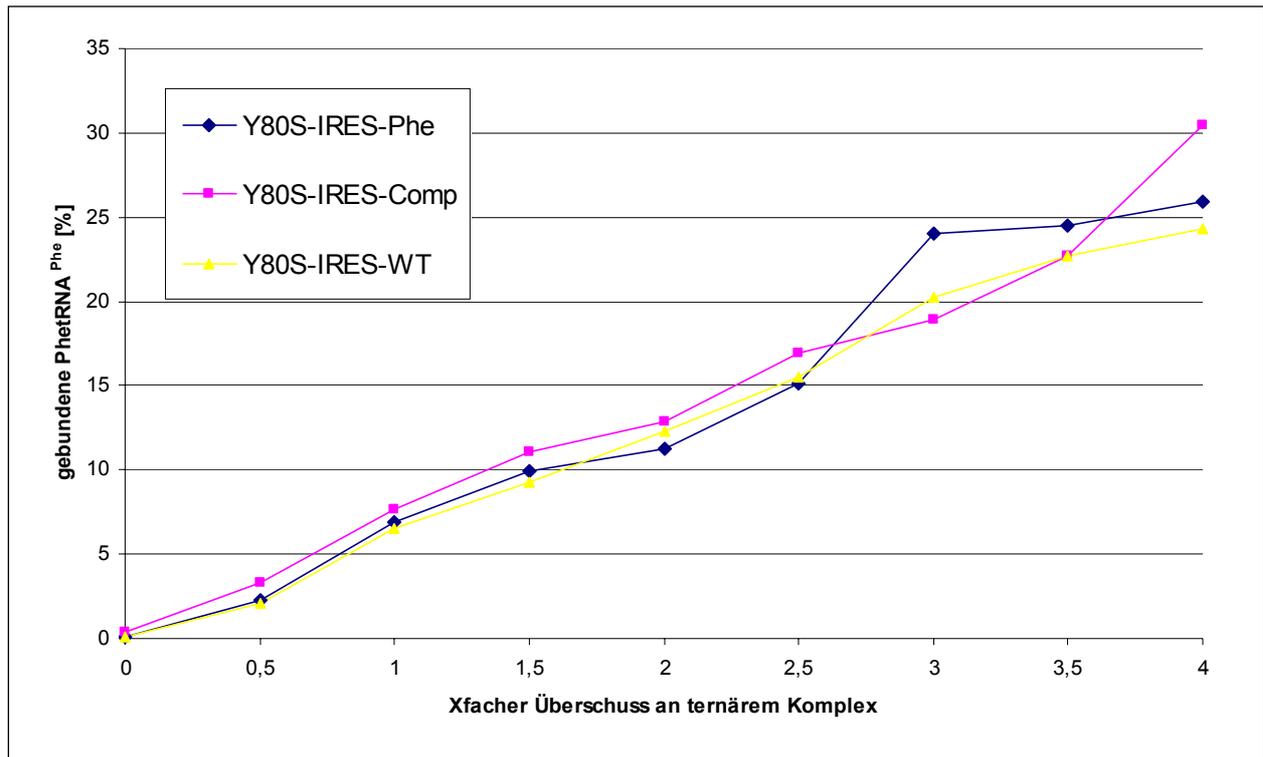
CrPV-IRES-Komplex für 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit einem Filterassay analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengefasst:

**Tab. 13: Ergebnisse der Bindung von ternärem Komplex an Y80S -CrPV-IRES (Comp)-Komplex**

Probe	an Y80S gebundene Phe-tRNA <sup>Phe</sup> [%]
Y80S-IRES-Phe + ternärer Komplex	11,6
Y80S-IRES-Comp + ternärer Komplex	13,8
Y80S-IRES-WT + ternärer Komplex	13,5
Y80S + Poly(U)-mRNA + ternärer Komplex	109
Poly(U)-mRNA + ternärer Komplex	0

Bei den Proben mit IRES wurde ein dem Hintergrund entsprechendes Bindungssignal zwischen 12-14% beobachtet. Eine kodonspezifische Bindung konnte nicht nachgewiesen werden, die zur kodonspezifischen Bindung unfähige Wildtyp-Probe (hier ist keine cognate Bindungsstelle vorhanden) zeigt ein ähnliches Bindungsverhalten. Die Kontrolle mit Poly(U)-mRNA ergab eine vollständige Bindung des ternären Komplexes an Y80S. Der erzeugte ternäre Komplex kann also an die ribosomale A-Stelle binden. Diese Bindung wird aus unbekanntem Gründen bei den IRES-Komplexen verhindert.

Zur Überprüfung dieser Versuchsergebnisse wurde der ternäre Translationskomplex in verschiedenen Mengenverhältnissen von 0,0 / 0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 / 4,0x mit dem jeweiligen Y80S-CrPV-IRES-Komplex inkubiert und anschließend mit einem Filterassay (siehe 5.5.11.2.4) analysiert. Auch hier konnte keine kodonspezifische Bindung von ternärem Komplex an das Ribosom erkannt werden, da die zur spezifischen Bindung unfähige WT-Probe ein ähnliches Bindungsverhalten zeigt (Abb. 47). Es war lediglich ein Anstieg der unspezifischen Bindung erkennbar.



**Abb. 47: Ergebnisse des Bindungstests mit verschiedenen Mengenverhältnissen Y80S-CrPV-IRES zu ternärem Komplex**

Versuchsbedingungen: Eine Stammlösung aus einem 2,5fachen Überschuss an Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (bezogen auf Y80S) und einem 2fachen Überschuss an eEF1A (bezogen auf Phe-tRNA<sup>Phe</sup>) mit 200 µM GTP in Bindungspuffer durch Inkubation für 5 min bei 30°C erzeugt. Dieser Ansatz wurde in einem Überschuss von 0,0 / 0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 / 4,0 mit je 0,125 pmol/µl Y80S-CrPV-IRES-Komplex in einem Gesamtvolumen von je 2x12,5 µl für 15 min bei 30°C inkubiert.

### 6.7.2.2 Bindung von ternärem Translationskomplex an RRL80S-CrPV-IRES-Komplexe

Da die Versuche, den prä-translationalen Zustand mit Komplexen aus Y80S-IRES zu erzeugen nicht erfolgreich waren, wurden weitere Versuche mit Komplexen aus RRL80S-IRES durchgeführt. Möglicherweise ist die Methode zur Ribosomenpräparation für die Erzeugung funktionsfähiger 80S-IRES-Komplexe ungeeignet. Daher wurden weitere Versuche mit ribosomalen Untereinheiten aus Kaninchenblut-Lysat (RRL) durchgeführt, die unter anderen Versuchsbedingungen isoliert wurden. Die erfolgreiche Durchführung von Translationsversuchen mit Ribosomen dieser Spezies wurde bereits in der Literatur beschrieben (z.B. (Cevallos and Sarnow, 2005; Jan and Sarnow, 2002; Pestova and Hellen, 2003; Wilson et al., 2000a; Wilson et al., 2000b)).

Zur Bindung von ternärem Translationskomplex wurde dieser zunächst aus 6fachem Überschuss an Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (bezogen auf RRL80S) und einem 2fachem Überschuss an eEF1A (bezogen auf Phe-tRNA<sup>Phe</sup>) mit 200 µM GTP in Bindungspuffer durch Inkubation für 5 min bei 30°C erzeugt. Dieser Ansatz wurde mit je 0,125 pmol/µl RRL40S und 0,125 pmol/µl RRL60S sowie 0,625 pmol/µl CrPV-IRES in einem Gesamtvolumen von 11x12,5 µl für 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit einem Filterassay (siehe 5.5.11.2) analysiert. Zur Bestimmung des unspezifischen Messsignals wurde ein Ansatz ohne ribosomale Untereinheiten genutzt. Die entsprechenden Werte wurden von denen der Proben abgezogen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 14 zusammengefasst:

**Tab. 14: Ergebnisse der Bindung von ternärem Komplex an RRL80S -CrPV-IRES -Komplexen\***

	aatRNA <sup>Phe</sup> / RRL80S [% ]
RRL-40S + RRL-60S + CPV-IRES-Phe + ternärer Komplex	42,9
RRL-40S + RRL-60S + CPV-IRES-Comp + ternärer Komplex	44,0
RRL-40S + RRL-60S + CPV-IRES-WT + ternärer Komplex	45,7
RRL-40S + RRL-60S + Poly(U)-mRNA + ternärer Komplex	74,7
Poly(U)-mRNA + ternärer Komplex	0,0

\*Komplex mit Hilfe von ribosomalen Untereinheiten im gleichen Assay gebildet

Die Ergebnisse zeigen für die Bindung von ternärem Komplex an den aus den ribosomalen Untereinheiten und dem jeweiligen CrPV-IRES gebildeten Komplexen Werte von durchschnittlich 44%. Es war jedoch kein Unterschied zwischen den kodonhaltigen IRES-Phe /-Comp und dem kodonlosen Wildtyp erkennbar, wie er bei der Positivkontrolle mit Poly(U)-mRNA beobachtet wurde. Eine spezifische Bindung konnte daher nicht nachgewiesen werden.

"Ist die erst im Bindungsansatz stattfindende 80S-IRES-Komplexbildung Ursache für die Beobachtungen?" Zur Beantwortung dieser Frage wurden weitere Versuche mit vorgereinigten, extra isolierten (siehe 5.6.10) RRL80S-IRES-Komplexen durchgeführt. Zusätzlich wurde ein nicht-spaltbares GTP-Analogon, GMP-PNP, für die Versuche genutzt. Dieser Stoff ersetzt das GTP im ternären Komplex. Das führt dazu, dass dieser nach Bindung an das Ribosom nicht gespalten werden kann und am Ribosom verbleibt. Möglicherweise führt die Spaltung des ternären Komplexes zu unbekanntem Prozessen, die eine stabile Bindung verhindern.

Für die Versuche zunächst der jeweilige ternäre Komplex mit GTP und GMP-PNP aus 6fachem Überschuss an Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (bezogen auf RRL80S) und einem 2fachem Überschuss an eEF1A (bezogen auf Phe-tRNA<sup>Phe</sup>) mit 200 µM GTP bzw. GMP-PNP in Bindungspuffer durch

Inkubation für 5 min bei 30°C erzeugt. Dieser Ansatz wurde mit je 0,125 pmol/µl vorgereinigtem RRL80S-CrPV-IRES-Komplex in einem Gesamtvolumen von 11x12,5 µl für 15 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit einem Filterassay (siehe 5.5.11.2.4) analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengefasst:

**Tab. 15: Ergebnisse der Bindung von ternärem Komplex mit GTP und dem nicht-spaltbaren GTP-Analogen GMP-PNP an RRL80S -CrPV-IRES (Comp)-Komplex\***

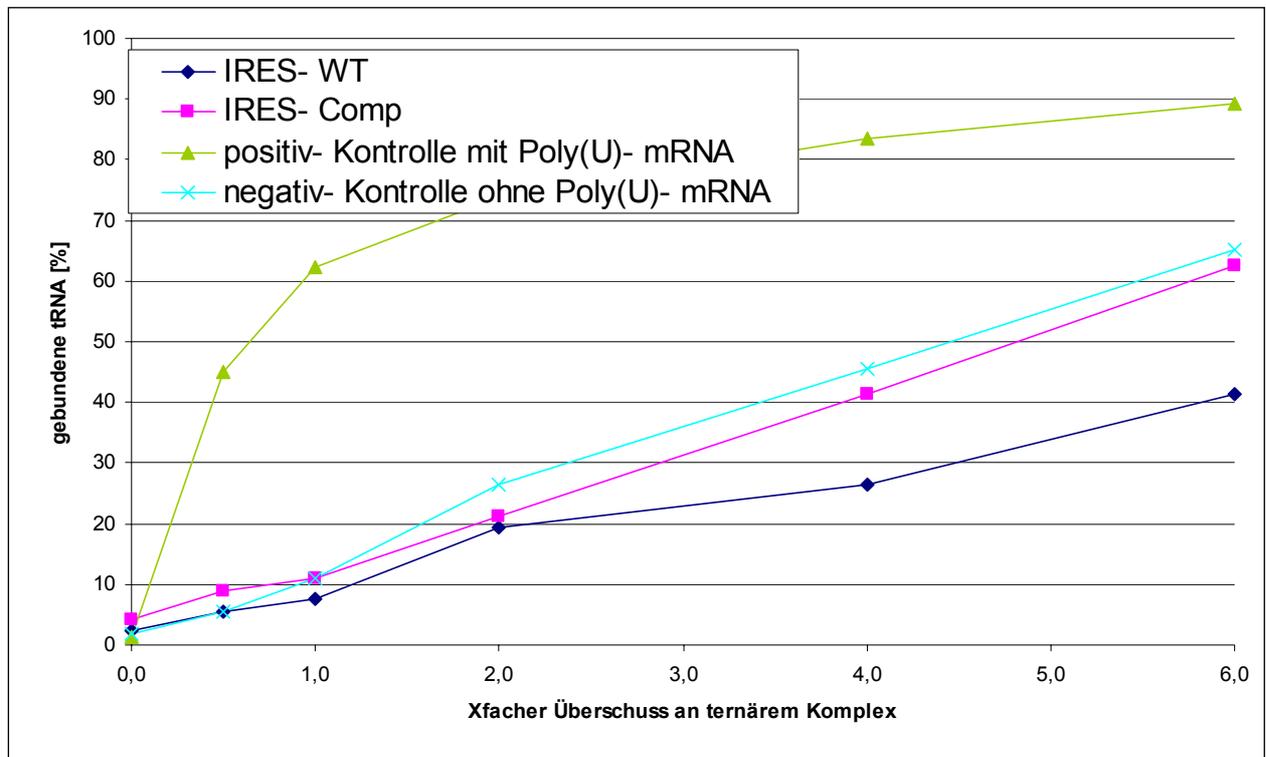
Beschreibung	aatRNA <sup>Phe</sup> / RRL80S [% ]
RRL-80S-IRES-COMP + TC (GTP)	47,7
RRL-80S-IRES-WT + TC (GTP)	10,3
RRL-80S-IRES-COMP + TC (GMP-PNP)	65,9
RRL-80S-IRES-WT + TC (GMP-PNP)	15,6
RRL-40S + RRL-60S + Poly(U) + TC (GTP)	110,7
Poly(U) + TC (GTP)	0,0
Poly(U) + TC (GMP-PNP)	0,0

\*Komplex vor dem Assay isoliert

Die Ergebnisse aus der Tab. 15 lassen auf eine kodonspezifische Bindung von ternärem Komplex an den RRL-80S-CrPV-IRES (Comp)-Komplex schließen. Sie ist im Vergleich zum Wildtyp um ca. 40% höher. Die Proben mit GMP-PNP zeigen ein ähnliches Verhalten, die Bindung ist im Vergleich zur GTP-haltigen Probe um ca. 50% erhöht. Von diesen Materialien wurden Proben für die Untersuchung mit der Kryo-Elektronenmikroskopie und anschließender Einzelpartikelrekonstruktion genutzt. Die Positivkontrolle mit Poly(U)-mRNA zeigt eine 110%ige Bindung. Dies ist möglich, da Phe-tRNA<sup>Phe</sup> nicht quantitativ in den ternären Komplex eingebunden wurde und die freie aa-tRNA in die ribosomale P-Stelle binden kann, wodurch sich das Messsignal erhöht.

Zur Überprüfung dieser Versuchsergebnisse wurden verschiedene Mengenverhältnisse an ternärem Translationskomplex mit dem jeweiligen RRL-80S -CrPV-IRES-Komplex inkubiert. Der ternäre Komplex wurde dabei in einem Überschuss von 0,0 / 0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 / 4,0 / 6,0x bezogen auf den RRL80S-CrPV-IRES-Komplex verwendet. Die Ansätze wurden mit einem Filterassay (siehe 5.5.11.2.4) analysiert. Auch hier war ein Unterschied in der tRNA-Bindung zwischen RRL-80S-CrPV-IRES (Comp) und Wildtyp von ca. 20% festzustellen (siehe Abb. 48). Allerdings zeigt auch die Negativkontrolle mit RRL-80S ohne Poly(U)-mRNA ein hohes

Bindungssignal, was möglicherweise auf ein hohes Maß an unspezifischer Bindung hindeutet. Die Positiv-Kontrolle mit RRL-80S + Poly(U)-mRNA kann hier nur als funktionelle Kontrolle angesehen werden, da hier keine tRNA-artige Struktur (wie die IRES-Domäne 3) die P-Bindungsstelle besetzt.



**Abb. 48: Ergebnisse des Bindungstests mit verschiedenen Mengenverhältnissen RRL80S-CrPV-IRES zu ternärem Komplex**

Versuchsbedingungen: Eine Stammlösung aus einem 2,5fachen Überschuss an Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (bezogen auf Y80S) und einem 2fachen Überschuss an eEF1A (bezogen auf Phe-tRNA<sup>Phe</sup>) mit 200 µM GTP in Bindungspuffer durch Inkubation für 5 min bei 30°C erzeugt. Dieser Ansatz wurde in einem Überschuss von 0,0 / 0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 / 4,0 / 6,0 mit je 0,125 pmol/ µl RRL80S-CrPV-IRES-Komplex in einem Gesamtvolumen von je 2x12,5 µl für 15 min bei 30°C inkubiert.

Zur endgültigen Bestätigung der Versuchsergebnisse wurde die Bindungsreaktion mit Hilfe verschiedener Nachweisreaktionen nach *Watanabe* (Watanabe, 1972; Watanabe and Tanaka, 1972) untersucht. Dazu wurde zunächst der ternäre Translationskomplex aus 6fachem Überschuss an Phe-tRNA<sup>Phe</sup> (bezogen auf RRL80S) und einem 2fachen Überschuss an eEF1A (bezogen auf Phe-tRNA<sup>Phe</sup>) mit 200 µM GTP in Bindungspuffer durch Inkubation für 5 min bei 30°C erzeugt. Dieser Ansatz wurde mit je 0,125 pmol/ µl vorgereinigtem RRL80S-CrPV-IRES-Komplex für 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden aufgeteilt und mit Hilfe einer eEF2-vermittelten Translokationsreaktion sowie einer Puromycinreaktion untersucht. Als Kontrollansatz zur Bestimmung der unspezifischen Signale diente im Unterschied zu früheren Experimenten ein Ansatz mit RRL80S ohne mRNA und die Analyse von Ansätzen ohne

Puromycin und ohne eEF2. Diese Hintergrundwerte wurden vom Messsignal abgezogen. In der Tab. 16 sind die Ergebnisse dargestellt:

**Tab. 16: Analyse funktioneller Zustände von RRL80S -CrPV-IRES mit ternärem Komplex-Filterbindungstest**

<b>Filterbindungstest</b>		
<b>Probe</b>	<b>eEF2</b>	<b>tRNA / RRL80S [%]</b>
<b>RRL-80S-Poly(U)-mRNA + ternärer Komplex</b>	-	48
	+	160
<b>RRL-80S-CPV-IRES (Comp) + ternärer Komplex</b>	-	15
	+	24
<b>RRL-80S-CPV-IRES (Wt) + ternärer Komplex</b>	-	13
	+	33

Bei dem Kontrollansatz mit Poly(U)-mRNA konnte eine 48%ige tRNA-Bindung beobachtet werden. In Anwesenheit von eEF2 stieg dieser Wert auf 160% (siehe Tab. 11). eEF2 vermittelt die Translokation der tRNA von der A-zur P-Stelle. Zunächst erfolgte die Bindung der tRNA bzw. des ternären Komplexes in die ribosomale A-Stelle. Nach eEF2-vermittelter Translokation der tRNA von der A-in die P-Stelle kann eine weitere tRNA in die A-Stelle binden, was durch den Messwert bestätigt wurde.

Die Ergebnisse aus der Tab. 16 zeigen eine vergleichbare Bindung von ternärem Komplex sowohl an den RRL-80S-CrPV-IRES (Wt)-Komplex (13%) als auch am RRL-80S-CrPV-IRES (Comp)-Komplex (15%). Sie ist im Vergleich zu vorhergehenden Versuchen (siehe Tab. 15) aufgrund der geänderten Art und Weise der Hintergrundsignalbestimmung geringer. Die Gleichartigkeit des Bindungssignals deutet auf eine unspezifische Bindung hin, da beim Wildtyp kein entsprechendes Codon zur Bindung des ternären Komplexes bzw. der tRNA existiert. Die Beobachtungen aus den vorherigen Bindungsexperimenten konnten nicht bestätigt werden.

**Tab. 17: Analyse funktioneller Zustände von RRL80S -CrPV-IRES mit ternärem Komplex-  
Puromycinreaktion**

<b>Puromycinreaktion</b>			
<b>Probe</b>	<b>Puromycin</b>	<b>eEF2</b>	<b>tRNA / RRL80S [%]</b>
<b>RRL-80S-Poly(U)-mRNA + ternärer Komplex</b>	+	-	-0,01
	+	+	70
<b>RRL-80S-CPV-IRES (Comp) + ternärer Komplex</b>	+	-	0,001
	+	+	0,1
<b>RRL-80S-CPV-IRES (Wt) + ternärer Komplex</b>	+	-	-0,01
	+	+	0,2

Die Ergebnisse der Puromycinreaktion der Poly(U)-mRNA-haltigen Probe (siehe Tab. 17) zeigen, dass vor der Translokation 0%, nach der Translokation mit eEF2 70% der tRNA in der P-Stelle von RRL80S gebunden sind.

Die Puromycinreaktion der IRES-Komplexe ist bei beiden Proben negativ, d.h. es konnte keine tRNA vor und nach der Translokation in der P-Stelle nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass keine die Bindung der tRNA stabilisierende Translokation einer z.B. nur lose gebundener A-Stellen-tRNA in die P-Stelle stattfindet.

Mit diesen Experimenten konnte in Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten mit Hefe-80S-Ribosomen keine Bindung von aa-tRNA an ribosomale IRES-Komplexe nachgewiesen werden. Die Art und Weise der Ribosomenpräparation hat keinen Einfluss auf die Versuchsergebnisse. Die Kontrollversuche mit Poly(U)-mRNA zeigen, dass die Pufferbedingungen für die Versuche geeignet sowie die verwendeten Ribosomen und Faktoren funktionsfähig sind.

## 6.8 Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelrekonstruktion

### 6.8.1 Untersuchung des Y80S-CrPV-IRES (WT)-Komplexes

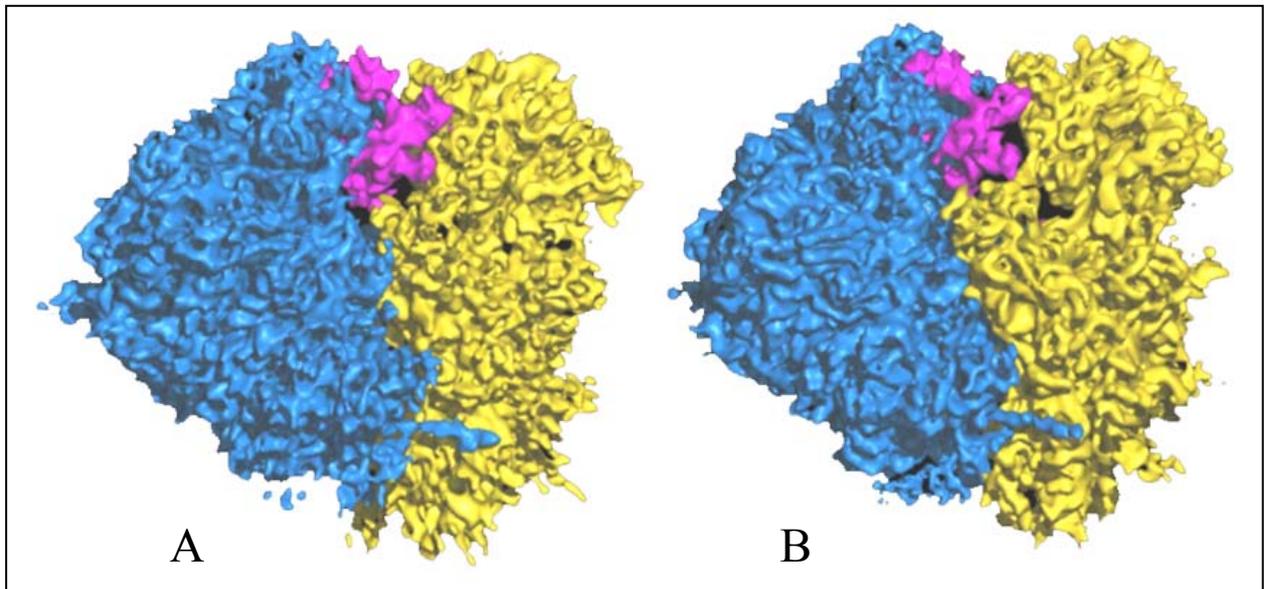
Die Bestimmung der dreidimensionalen, nativen Struktur des Y80S-CrPV-IRES-Komplexes erfolgte mit Hilfe der Kryo-EM bei einer 39.000fachen Vergrößerung mit einer Extraktionsspannung von 300keV. Dabei wurden insgesamt 364 Mikrographen gewonnen. Nach Auswertung der rotationsgemittelten Powerspektren wurden 341 dieser Mikrographen als für die Datenverarbeitung geeignet ausgewählt. Die Dimension der Partikelbilder betrug 360 x 360 Pixel mit einer Pixelgröße von 1,26Å auf der Objektskala.

Von dem Datensatz wurden 56 Mikrographen als sog. Defokuspaare aufgenommen. Dabei wurde jeweils zwei Mikrographen mit und mit vom gleichen Areal aufgenommen. Ziel war es, durch Kombination von höherem Defokusswert mit hohem Kontrast, aber niedrigeren Bildfrequenzen und sehr geringem Defokusswert mit geringem Kontrast, aber höheren Bildfrequenzen die Auflösung zu erhöhen. Dabei wurden die jeweiligen Mikrographen aufeinander aligniert, so dass die vom Mikrographen mit höherem Kontrast ermittelten Partikelkoordinaten ebenfalls für den mit geringem Kontrast zur Partikelgewinnung genutzt werden konnten. Es konnte jedoch keine wesentliche Steigerung der Auflösung beobachtet werden, so dass die restlichen Mikrographen auf konventionellem Weg erstellt wurden.

Durch automatische und manuelle Partikelselektion konnte ein Gesamtdatensatz von ca. 350.000 Einzelpartikeln in 341 Defokusgruppen erzeugt werden. Mit diesem Datensatz wurde durch Partikelalignierung und Rückprojektion eine initiale dreidimensionale Rekonstruktion der Elektronendichte erstellt. Diese diente als Referenz, um 5% der Partikel mit der schlechtesten Korrelation auszusortieren. Während des nachfolgenden iterativen Alignments wurden ca. 150 Berechnungsrunden bei verschiedenen Dezimierungsstufen durchgeführt.

Bei Erreichen einer höherer Auflösung im Bereich  $< 10\text{\AA}$  wurde in bestimmten Bereichen der 3D-Struktur Hinweise auf eine Heterogenität des Komplexes beobachtet. So wurden z.B. bei der Struktur der ribosomalen 40S-Untereinheit das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Konformationen beobachtet (siehe Abb. 49). Ähnliche Konformationsänderungen wurden bereits in der Literatur beschrieben (Spahn et al., 2001b). Daher wurden zur Trennung der einzelnen Datensätze Multireferenz-Klassifikations-Techniken verwendet. Dies führte zu einer Aufspaltung des Datensatzes von insgesamt 291.117 Partikeln in mehrere Untergruppen. So

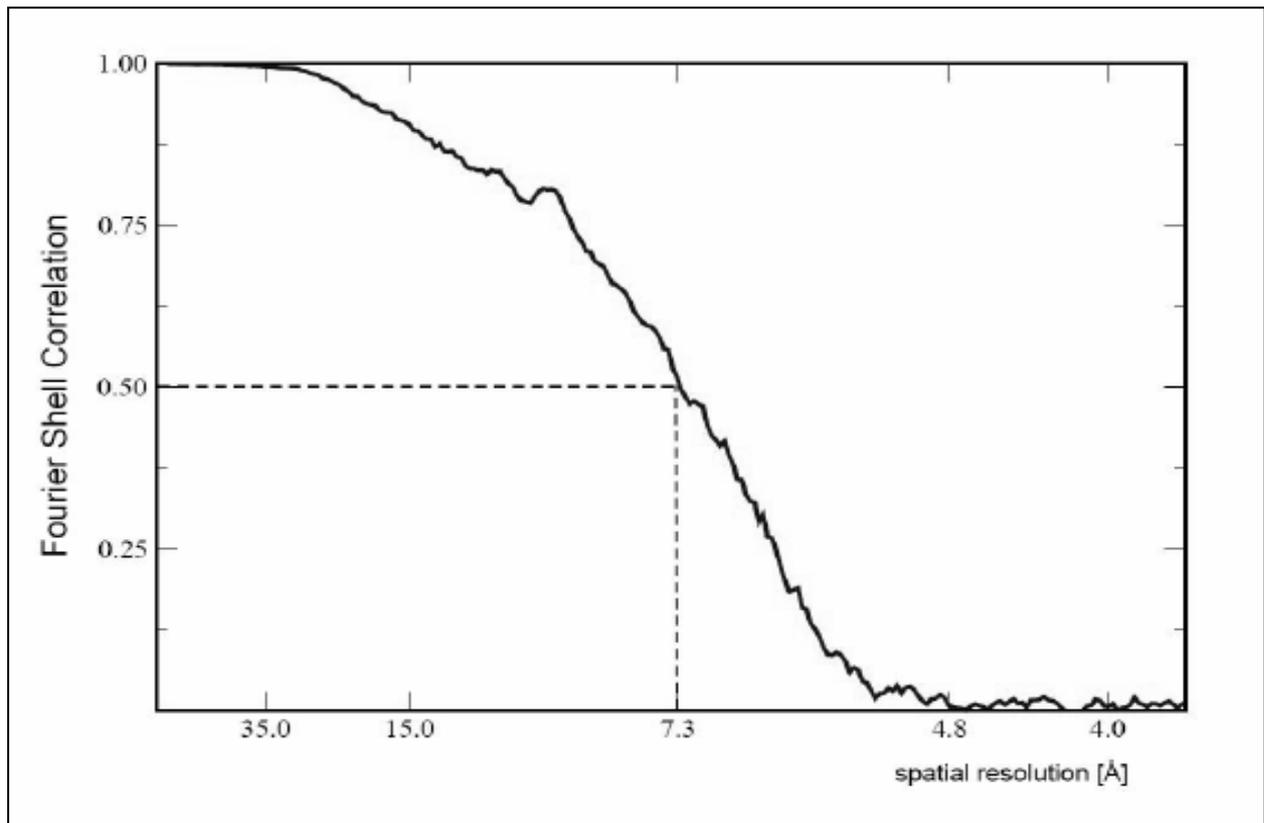
konnten zwei Hauptpopulationen mit je 125.377 und 63.168 Partikeln ermittelt werden. Bei dem Vergleich der Populationen konnte eine Drehung der ribosomalen 40S-Untereinheit beobachtet werden.



**Abb. 49: verschiedene Konformation des Y80S-CrPV-IRES (WT)-Komplexes**

Die ermittelte Struktur des Y80S-CrPV-IRES (WT)-Komplexes zeigte bei einer Auflösung von 7,3Å verschiedene Konformationen.

Die größte Teilmenge mit 125.377 Partikeln wurde für die hochauflösende Rekonstruktion genutzt. Wiederum 73.313 Partikel wurden mit Hilfe von interner Krosskorrelation ausgewählt. Die erreichte Auflösung hatte nach der Fourier Shell-Korrelation von 0,5 einen Wert von 7,3Å. In Übereinstimmung mit diesem Wert waren Details mit entsprechender Größe erkennbar, so z.B. die Windungen der RNA oder  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturelemente ribosomaler Proteine.



**Abb. 50:** Die Fourier Shell-Korrelation (FSC) für die Kryo-EM-Dichte des Y80S-CrPV-IRES (WT)-Komplexes.

Die FSC = 0.5 zeigt die 7.3Å-Auflösung mit einem signifikanten Signal bis 4.8 Å.

Die detaillierte dreidimensionale Darstellung der rekonstruierten Elektronendichte zeigt den Y80S-CrPV-IRES (WT)-Komplex. Dabei kann eindeutig zwischen der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit unterschieden werden (siehe Abb. 51, Abb. 52). In Übereinstimmung mit vorhergehenden Kryo-EM-Strukturen (Spahn et al., 2004) konnte eine dem CrPV-IRES entsprechende Elektronendichte im intra-ribosomalen Raum beobachtet werden (siehe Abb. 51, Abb. 52). In verschiedenen Bereichen wie z.B. Teilen der PKI-Region (siehe Abb. 52 d) wurden heterogene Bereiche beobachtet. Die Struktur kann dort nur unvollständig visualisiert werden. Dies deutet auf eine Flexibilität der Struktur in diesen Regionen hin. Die meisten IRES-Bereiche waren jedoch gut aufgelöst, an einigen Stellen gelang die Beobachtung des Zucker-Phosphat-Gerüsts einzelsträngiger RNA.

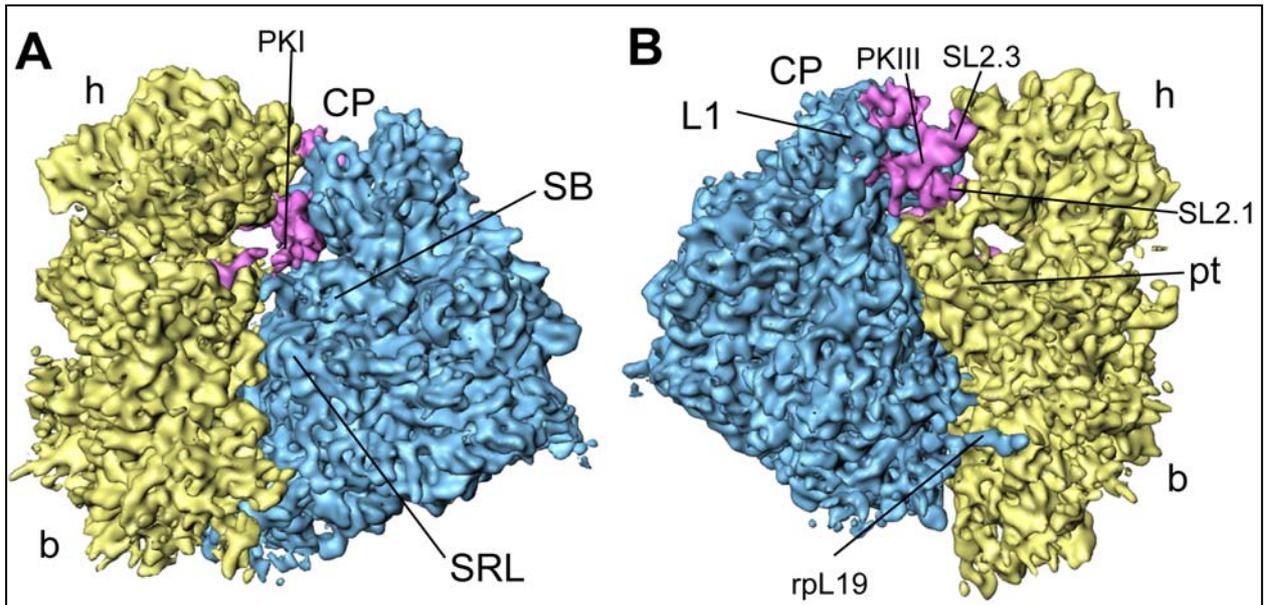


Abb. 51: dreidimensionale Darstellung des Y80S-CrPV-IRES-Komplexes

gelb: 60S-Untereinheit, blau: 40S-Untereinheit, violett: CrPV-IRES im ribosomalen Zwischenraum, h= kopf, b= Schnabel, CP= Zentrale Protuberanz, weitere markante RNAs

A): Ansicht von der A-Stelle,

B): Ansicht aus Richtung der L1-Protuberanz

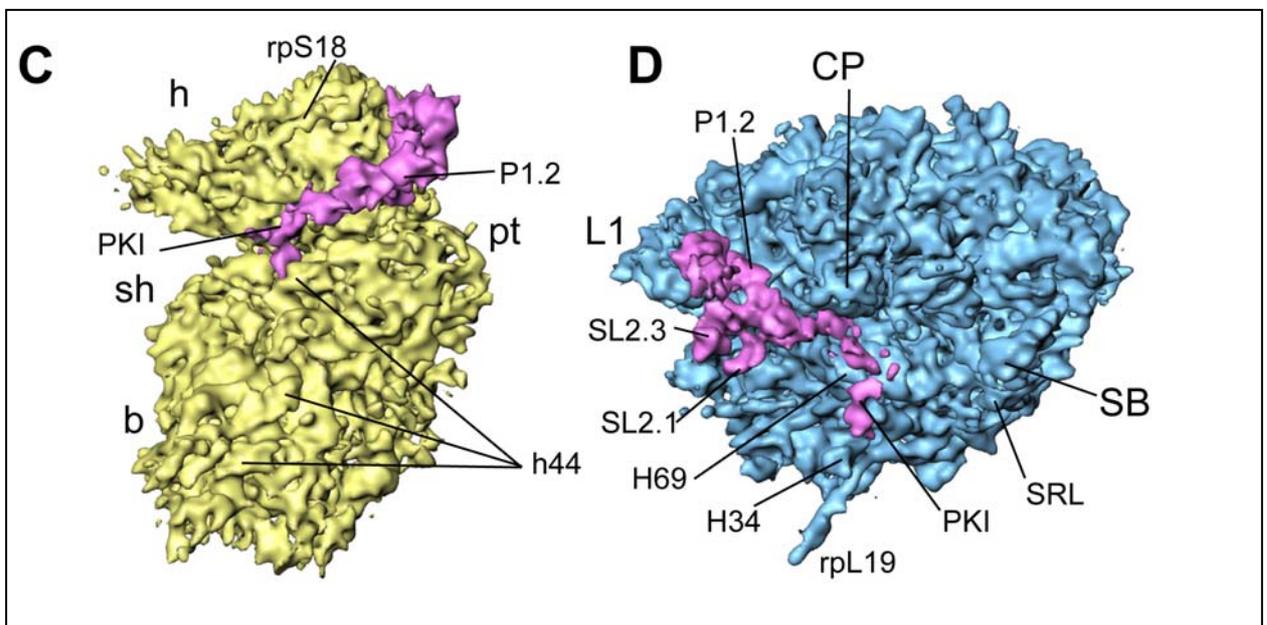


Abb. 52: dreidimensionale Darstellung der Y80S-CrPV-IRES-Struktur

gelb: 60S-Untereinheit, blau: 40S-Untereinheit, violett: CrPV-IRES im ribosomalen Zwischenraum, h= kopf, b= Schnabel, CP= Zentrale Protuberanz, weitere markante RNAs

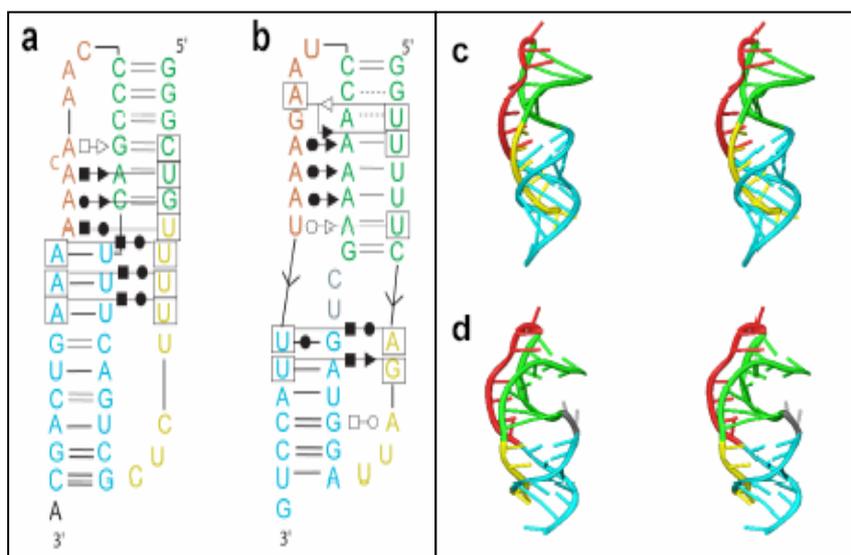
C): Ansicht aus Richtung der 60S-ohne 60S,

D): Ansicht von oben ohne 40S

## 6.8.2 Molekulare Struktur der CrPV-IRES-RNA

Die Abb. 54 zeigt die ermittelte Elektronendichte für das CrPV-IRES bei einer Auflösung von 7,3Å. Mit dieser Auflösung ist ein direkter Nachweis der RNA nicht möglich. Dies wäre erst ab einer Auflösung von < 4Å möglich (Ganghöhe der RNA: ~2,8nm). Die ermittelte Struktur erlaubte jedoch erstmals die Erstellung eines molekularen Modells der IRES. Dieses Modell wurde im Rahmen röntgenkristallographischer Untersuchungen des *Plautia stali intestine virus* (PCIV)-IGR-IRES (Pfungsten et al., 2006) und der PKI-Region der *CrPV-IRES* (Costantino et al., 2008) im Nachhinein bestätigt.

Die in vorangegangenen Untersuchungen ermittelte Sekundärstruktur der IRES (Spahn et al., 2004) zeigte das Vorhandensein von drei Pseudoknoten (PKI, PKII and PKIII). Anhand biochemischer Daten konnte auf die Lage und Orientierung der PKI-Region geschlossen werden: Das Alanin-Startkodon befindet sich im Dekodierungszentrum der 40S-Untereinheit (Hellen and Sarnow, 2001; Sonenberg and Dever, 2003; Vagner et al., 2001). Diese Informationen dienten als Startpunkt zur schrittweisen Ermittlung von Lage und Orientierung der Sekundärstrukturelemente sowie der Modellierung dieser Strukturelemente. Durch die Position am Alanin-Startkodon wurde die Orientierung der PKI-Region der IRES definiert. Für die Homologie-Modellierung von PKI wurde der Pseudoknoten der humanen Telomerase als Template ausgewählt (Theimer et al., 2005). Dieser enthält dem Pseudoknoten PK1 in Länge und Struktur ähnliche Helices und Linker (siehe Abb. 53 ).

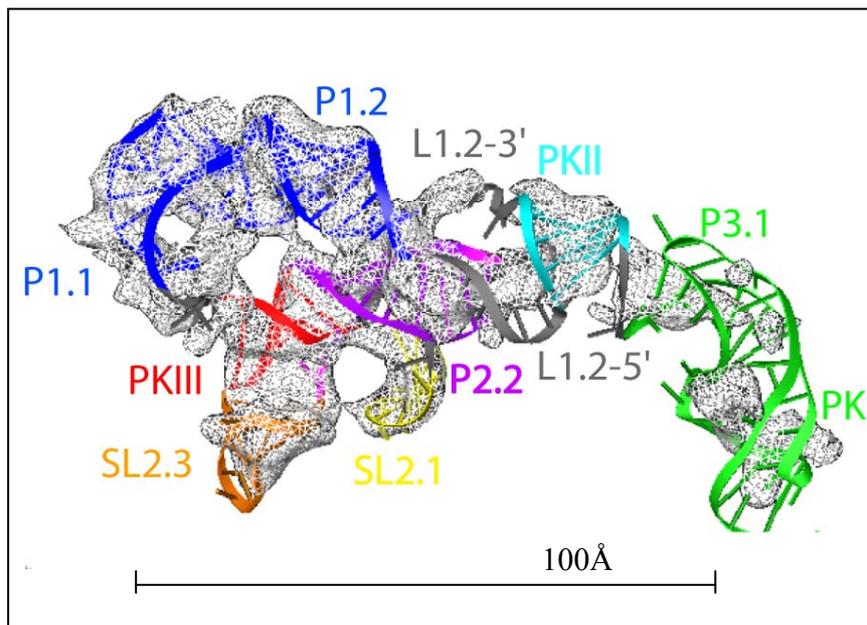


**Abb. 53: Vergleich Pseudoknotens der humanen Telomerase mit dem PKI des CrPV-IRES**

a) die mittels NMR ermittelte Struktur des humanen-Telomerase-Pseudoknotens (2, PDB 1YMO) im Vergleich zur

(b) modellierten Struktur des PKI-Pseudoknotens der CrPV IRES (c, d) Stereobilder der molekularen Strukturen, c): Pseudoknoten der humanen Telomerase; d): CrPV-IRES-Pseudoknoten PKI., (Leontis and Westhof, 2001; Theimer et al., 2005)

In der Kryo-EM-Dichte ist eine helikal geformte Struktur am 5'-Ende des PKI-Modells sichtbar. Ihre Größe erlaubte die Zuordnung als PKII-Helix. Unterstützend dazu kam hinzu, dass ein Nukleotid-Linker aus drei Nukleotiden (U145-C147) das 3'-Ende der Helix PKII mit dem 5'-Ende des PKI-Pseudoknoten verbindet. Mit dem in die helikale Struktur positionierten PKII betrug der Abstand der Phosphatgruppen von C144 und G148 ca. 19 Å. Dieser Abstand kann durch den Linker aus drei Nukleotiden überbrückt werden.

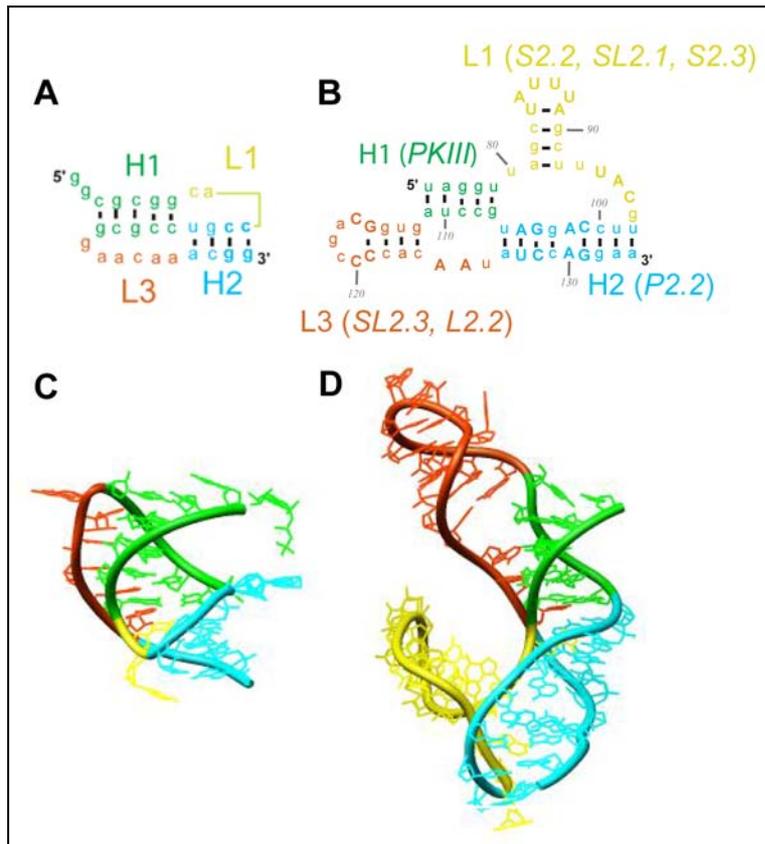


**Abb. 54: Elektronendichte der ermittelten CrPV-IRES-RNA-Struktur**

Das molekulare IRES-Modell als farbige Bandstruktur gedockt in die Kryo-EM-Struktur (graue Maschen), markiert sind die Pseudoknoten (PKI-PKIII), die Haarnadelstrukturen (SL), Helices (P), Loops (L),

(Nomenklatur nach Constantino, Kieft 2005)

Die verbleibende Dichte zwischen der PKII-Helix und der L1-Protuberanz kann in zwei der IRES-Sekundärstruktur entsprechenden Teile geteilt werden. Eine Struktur mit zwei Haarnadelstrukturen berührt die 40S-Untereinheit. Mit diesen Merkmalen entspricht die Struktur daher einem Teil der Domäne 2 mit dem Pseudoknoten PKIII. Der andere, L-förmige Teil der Dichte ist der 60S-Untereinheit zugewandt. Sie entspricht den Helices P1.1 und P1.2 der Domäne I. Beide Teile der Dichte sind im Bereich der L1 Protuberanz verbunden. Diese Verbindung definiert die Position des Einzelstrangs S2.1. Dieser verbindet die PKIII-Helix und Helix P1.1. Die lange Helix P1.2 erscheint in der Kryo-EM-Dichte gut definiert. Sie ist durch einen internen Loop, der durch seine Struktur für die L-Form der Domäne 1 verantwortlich ist, mit Helix P1.1 verbunden. Dieser interne Loop wurde ähnlich dem Einzelstrang S2.1 in die Dichte eingepasst, jedoch ist die genaue Faltung nicht erkennbar. Die Modellierung vom Pseudoknoten PKIII orientierte sich an der Röntgenkristallstruktur des BWYV (*Beet Western Yellow Virus*) Pseudoknoten VI (siehe Abb. 55).



**Abb. 55: Vergleich der Pseudoknoten PKIII mit dem des BWYV (*Beet Western Yellow Virus*)**

(A) Die Sekundärstruktur des BWYV-Pseudoknotens

(B) Die Sekundärstruktur des PKIII Pseudoknotens der CrPV-IRES,

Die Helix PKIII der CrPV entspricht der Helix H1; Helix P2.2 entspricht Helix H2; S2.2, SL2.1 und S2.3 entsprechen dem Loop L1; SL2.3 und L2.2 entsprechen Loop L3.

(C) BWYV-PDB 437D

(D) Die Struktur des PKIII in Banddarstellung Farbgebung entsprechend der Sekundärstruktur in a) + b)

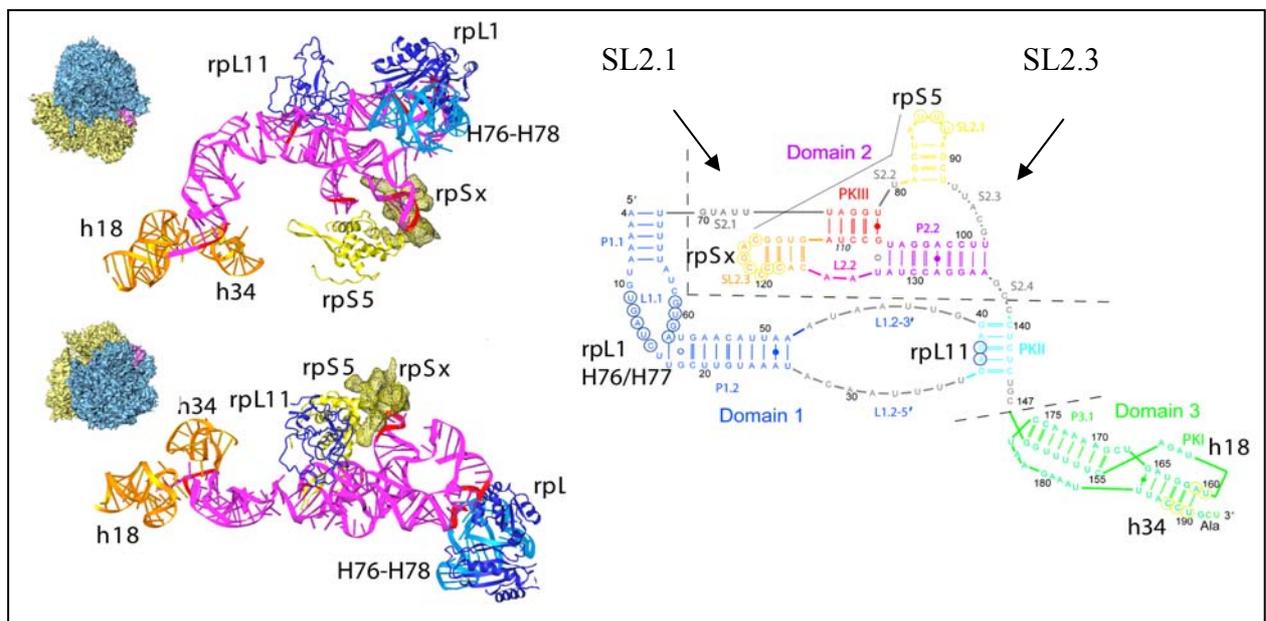
(Hilbers et al., 1998; Su et al., 1999)

Die CrPV-IRES-Helices PKIII und P2.2 sind ineinander verschachtelt. Die Haarnadelstrukturen (Stemloops) SL2.1, S2.2 und S2.3 befinden sich in der Major/ Deep Groove von P2.2, die zwei freien Adenine von L2.2 in der Minor/ Shallow Groove von Helix PKIII. Das Modell erlaubt weiterhin die Platzierung von Stemloop SL2.3 in die an Helix PKIII und an die Zwei Adenine von L2.2 angrenzende Kryo-EM-Dichte. Der Pentaloop L2.3 wurde mit Hilfe von Helix H52 (Position 1468) aus der 23S rRNA Röntgenkristallstruktur modelliert. Wie durch chemische Untersuchungen belegt, Basenpaar G107 möglicherweise eher mit U79 als mit U127. Ein Hinweis auf die Anwesenheit dieser Basenpaarung sind Dichtevarianzen an dieser Position. In dem vorgeschlagenen Modell besteht Helix PKIII aus fünf Basenpaaren, während L2.2 aus zwei nicht-variablen freien Adeninen und einem Uracil oder Purin besteht.

Die Dichte der Kryo-EM-Dichte erlaubt eine plausible Lokalisierung der IRES-Einzelstrang-Regionen und damit deren dreidimensionale Modellierung (siehe Abb. 54). Die mögliche Verbindung der helikalen Bereiche durch Einzelstränge auf stereochemisch korrekter Art und Weise war ein wichtiger Hinweis auf die Richtigkeit des Modells. So war die komplette Interpretation der CrPV-IRES-RNA-Dichte mit 187 Nukleotiden möglich (siehe Abb. 54).

### 6.8.3 Wechselwirkungen zwischen der CrPV-IRES und dem 80S-Ribosom

Die IRES interagiert im intra-ribosomalen Zwischenraum sowohl mit der 40S-als auch mit der 60S-Untereinheit (Spahn et al., 2004). Diese Wechselwirkungen können nun durch die detaillierte Kenntnis der IRES-Struktur auf molekularer Grundlage interpretiert werden. Ein besonderes Merkmal der CrPV-IRES-Struktur sind die zwei Haarnadelstrukturen SL2.1 und SL2.3 der Domäne 2. Mit ihren Loops interagieren sie mit der 40S-Untereinheit (siehe Abb. 56). SL2.1 interagiert mit dem ribosomalen Protein S5 (rpS5 oder auch S7p) (Yusupov et al., 2001) in der Nähe der ribosomalen E-Stelle sowie dem Proteinaustrittskanal. Der Stemloop SL2.3 interagiert hauptsächlich mit einem unbekanntem ribosomalen Protein rpSx. Für dieses Protein konnte kein Homolog in der Röntgenkristallstruktur des prokaryontischen Ribosoms (Spahn et al., 2001a) gefunden werden. Etwas weiter von der E-Stelle entfernt finden sich bei dem ribosomalen Protein rpS5 zusätzliche Kontaktstellen. Durch biochemische Experimente zur Bindung an 40S konnte gezeigt werden, dass die Domäne 2 allein an die 40S-Untereinheit binden kann (Nishiyama et al., 2003). Deletionen in den zwei Haarnadelstrukturen reduzierten die IRES-Funktion sehr stark (Jan and Sarnow, 2002). Die Nukleotide in den Haarnadelstrukturen sind durch die 40S-Untereinheit vor chemischer Modifikation geschützt.



**Abb. 56: Molekulare Interaktionen des CrPV-IRES mit dem 80S-Ribosom**

(a) IRES-Modell (rosa) mit den mit dem IRES interagierenden ribosomalen Bestandteilen:

40S: gelbe und orange Bänder, gelb: Kryo-EM-Dichte von rpSx, einem unbekanntem ribosomalen Protein,

60S: blaue Bänder, die an der Interaktion mit dem Ribosom beteiligten IRES-Nukleotide in rot, KEM-Dichte des 80S-IRES-Komplexes als Orientierungshilfe

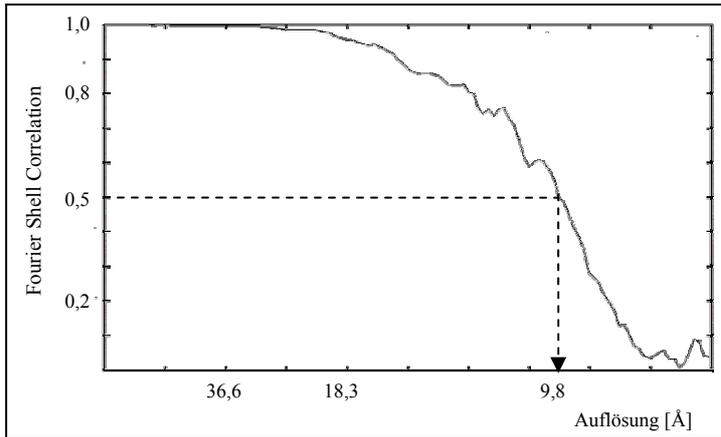
(b) Die Sekundärstruktur des CrPV-IRES

mögliche Interaktionsstellen mit dem Ribosom sind mit einem Kreis gekennzeichnet, andere Farben wie in a)

Die Wechselwirkungen zwischen Domäne 1 der CrPV-IRES und dem Ribosom sind auf die 60S-Untereinheit beschränkt (Abb. 56). Die Helix PKII interagiert mit dem ribosomalen Protein rpL11. Der interne Loop L1.1 interagiert mit rpL1 und den Helices H76 und H77 der 25S rRNA. Beide ribosomalen Komponenten interagieren mit dem T-Lopp der tRNAs, rpL11 in der P-Site und rpL1 –H76-H77 in der E-Stelle. Bei Domäne 3 konnte keine ribosomale Kontaktstelle beobachtet werden, sie trägt somit nicht zur Bindung an das Ribosom bei. Nahe dem Alanin-Codon der IRES konnten Interaktionen mit den Helices h18 in der Schulter-Region und der Helix h34 im Kopf der 40S-Untereinheit beobachtet werden (Abb. 56). Hervorzuheben ist, dass diese beiden Helices an der Interaktion mit der Antikodon-Haarnadelstruktur der A-Stellen-tRNA beteiligt sind (Yusupov et al., 2001).

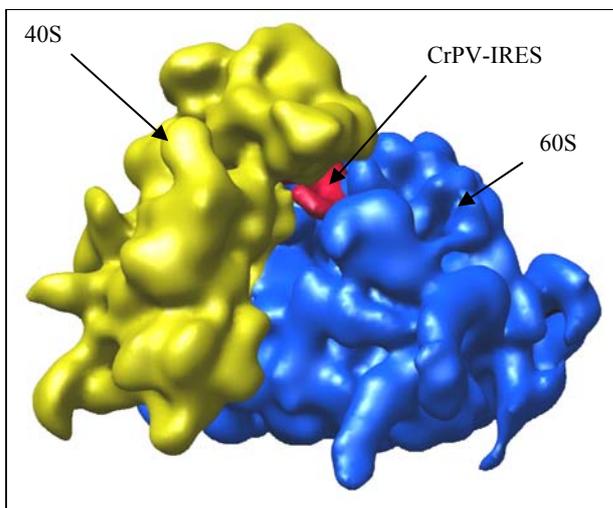
#### **6.8.4 Untersuchung der RRL80S-CrPV-IRES-Komplexe**

Für die Kryo-EM -Rekonstruktion des Y80S-CrPV-IRES-Komplexes wurde mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie bei 39.000facher Vergrößerung mit einer Extraktionsspannung von 300  $\mu\text{m}$  insgesamt 224 Mikrographen gesammelt. Nach Auswertung der rotationsgemittelten Powerspektren wurden 208 dieser Mikrographen als für die Datenverarbeitung geeignet ausgewählt. Durch automatische und manuelle Partikelselektion konnte ein Gesamtdatensatz von ca. 187.296 Einzelpartikeln erzeugt werden. Aufgrund der zu erwartenden Heterogenität des Komplexes wurden Multireferenz-Klassifikations-Techniken verwendet. Dies führte zu einer Aufspaltung des Datensatzes in mehrere Untergruppen. Es konnten aus insgesamt sechs Populationen mit je 131.497, 19.267, 13562, 13013 und 9957 Partikeln ermittelt werden. Die finale Rekonstruktion der Hauptpopulation unter Verwendung eines BPRP-Rückprojektionsalgorithmus erreichte bei einer Pixelsize von 3.66 nach der Fourier Shell-Korrelation bei einem cutoff von 0,5 eine Auflösung von 9,8Å (siehe Abb. 57). In Übereinstimmung mit diesem Wert waren Details wie z.B. RNA-Helices mit entsprechender Größe erkennbar.



**Abb. 57: Die Fourier Shell-Korrelation (FSC) für die Kryo-EM-Dichte des RRL80S-CrPV-IRES-Komplexes**

Die Fourier Shell-Korrelation (FSC) für die Kryo-EM-Dichte des RRL80S-CrPV-IRES-Komplexes zeigt bei 0,5 einen Wert für die Auflösung 9,8Å.

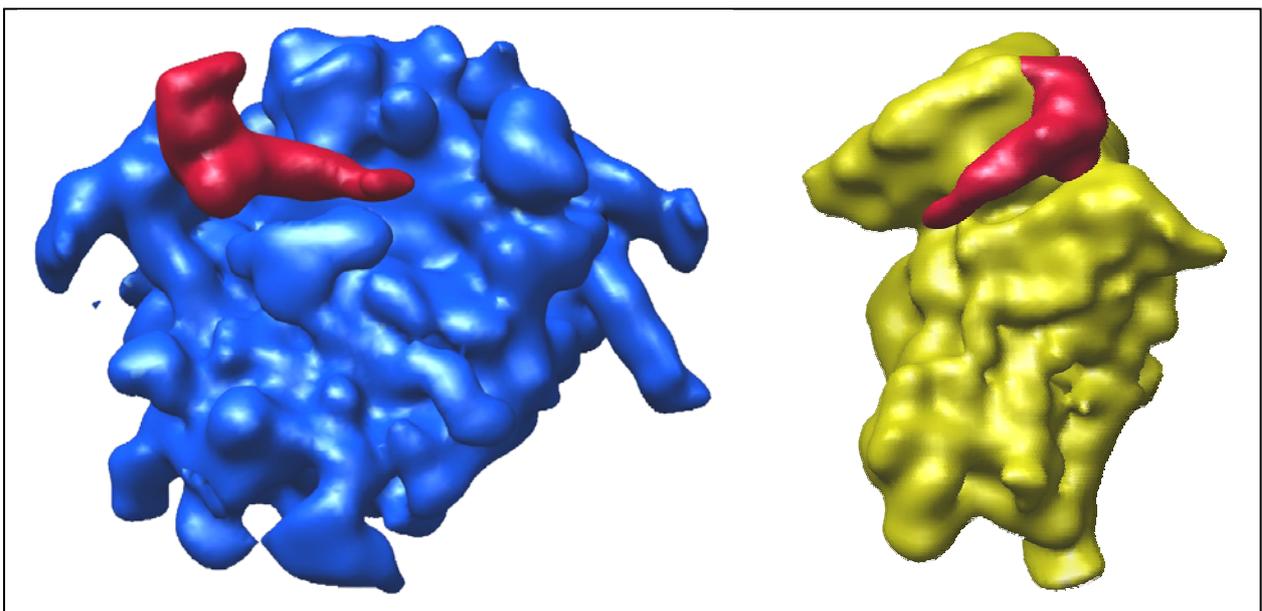


**Abb. 58: dreidimensionale Darstellung der RRL80S-CrPV-IRES-Struktur**

gelb: 40S-Untereinheit

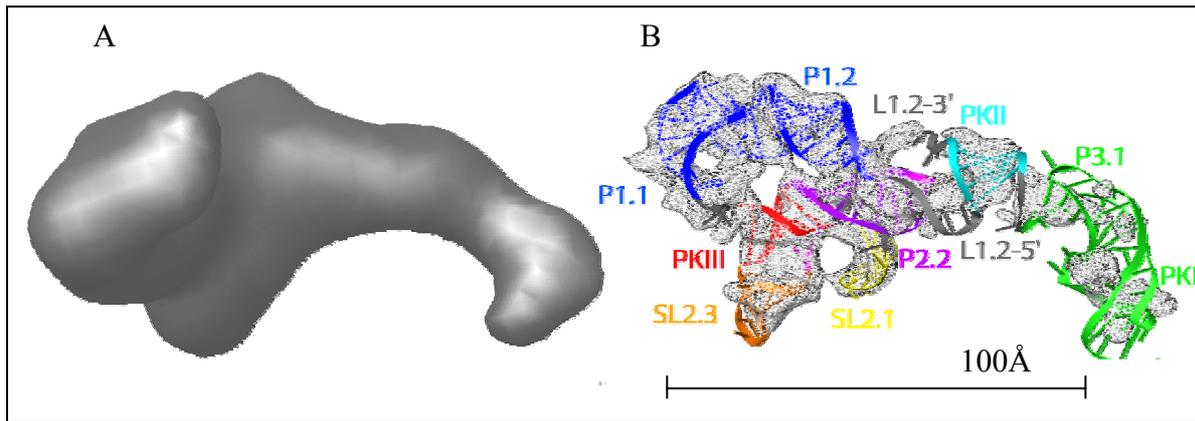
blau: 60S-Untereinheit

rot: CrPV-IRES im ribosomalen Zwischenraum



**Abb. 59: dreidimensionale Darstellung der RRL80S-CrPV-IRES am RRL-Ribosom**

gelb: 40S-Untereinheit, blau: 60S-Untereinheit, rot: CrPV-IRES im ribosomalen Zwischenraum (Abb. aus der 80S-IRES-Struktur, die jeweilige ribosomale Untereinheit wurde *in silicio* entfernt)



**Abb. 60: Vergleich der dreidimensionalen Darstellungen der CrPV-IRES-Strukturen**

A) CrPV-IRES aus dem RRL-80S-Komplex, B) CrPV-IRES aus dem Hefe-80S-Komplex

Die Auflösung der Struktur des RRL-80S-Komplexes von 9,8Å ließ (noch) keine molekulare Interpretation der IRES zu, dies wird jedoch in Kürze möglich sein. Im Vergleich der IRES-Strukturen kann jedoch schon bei der gegenwärtigen Auflösung eine hohe Übereinstimmung beobachtet werden.

Bei dem Vergleich der entsprechenden dreidimensionalen Strukturen der Subpopulationen konnte auch hier eine Drehung der ribosomalen 40S-Untereinheit beobachtet werden. Die Hauptpopulation zeigte eine der CrPV-IRES entsprechende Dichte im intra-ribosomalen Bereich, die in der zweiten Hauptpopulation nicht vorhanden bzw. deutlich geringer ausgeprägt war. Bei dieser Nebenpopulation könnte es sich um 80S-Ribosomen handeln, die nicht mit einer IRES besetzt sind. Der Rest der Populationen mit jeweils ca. 13.000 Partikeln zeigte nur unvollständige ribosomale Strukturen.

Bei keiner der Strukturen konnte eine einer tRNA oder einem ternären Komplex entsprechende Dichte beobachtet werden. Sollten diese an das Ribosom gebunden haben, müssten die bei der erreichten Auflösung erkennbar sein. Dies bestätigt die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung (siehe Kapitel 6.7.2.2). Die gewonnenen Daten können jedoch zur Untersuchung der Interaktion von CrPV-IRES und Ribosomen aus Säugetierzellen sowie zur Erstellung einer hochaufgelösten ribosomalen Kryo-EM-Struktur genutzt werden.

Die Auflösung der Struktur des RRL-80S-Komplexes von 9,8Å ließ noch keine molekulare Interpretation der IRES zu, dies wird jedoch in Kürze möglich sein. Im Vergleich der beiden IRES-Strukturen kann jedoch schon bei der gegenwärtigen Auflösung eine hohe Übereinstimmung beobachtet werden.

---

## 7 Diskussion

### 7.1 Struktur der ribosomal gebundenen IRES

Bestimmte RNA-Strukturelemente, sog. IRES (*internal ribosomal entry sites*), ermöglichen einen alternativen, cap-unabhängigen Weg der Translationsinitiation (Hellen and Sarnow, 2001; Vagner et al., 2001). IRES-Elemente wurden in einigen viralen und zellulären RNAs gefunden. Sie sind bei der Übernahme des Translationsapparates während einer viralen Infektion oder in Phasen reduzierter zelleigener Translationsaktivität aktiv. (Hellen and Sarnow, 2001; Sachs et al., 1997; Vagner et al., 2001). Dabei kann zwischen verschiedenen IRES-Typen mit jeweils unterschiedlichem Bedarf an Initiationsfaktoren unterschieden werden. (Hellen and Sarnow, 2001). Das IRES-Element aus dem Polio-Virus z.B. benötigt zur Bildung des 43S-Preinitiationskomplexes außer dem Capstruktur-bindenden Protein eIF4E alle weiteren Initiationsfaktoren (Pestova et al., 1996), während das IRES aus dem Hepatitis C Virus dazu nur die Faktoren eIF3, eIF2 und Initiator-tRNA (Met-tRNA<sup>Met</sup>) benötigt (Pestova et al., 1998). Eine weitere IRES-Familie ist die der *Cricket Paralysis Virus*-artigen (CrPV), die einen elongationsfähigen ribosomalen Komplex ohne Initiationsfaktoren oder Initiator-tRNA bilden kann (Pestova and Hellen, 2003; Sasaki and Nakashima, 1999; Wilson et al., 2000a).

Die genauen molekularen Mechanismen der IRES-vermittelten Translationsinitiation sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Die Grundlage für das Verständnis der internen Initiation ohne Initiationsfaktoren ist die genaue Kenntnis speziell der Ribosomen-gebundenen IRES-Struktur. Das CrPV-IRES ist für derartige Untersuchungen besonders geeignet, da es die zur Translationsinitiation notwendigen Strukturen in einem Molekül vereinigt. Die Ermittlung seiner Struktur hat daher einen modellhaften Charakter, mit der Aussagen über die Struktur und Funktion auch der anderen IRES-Familien möglich sind.

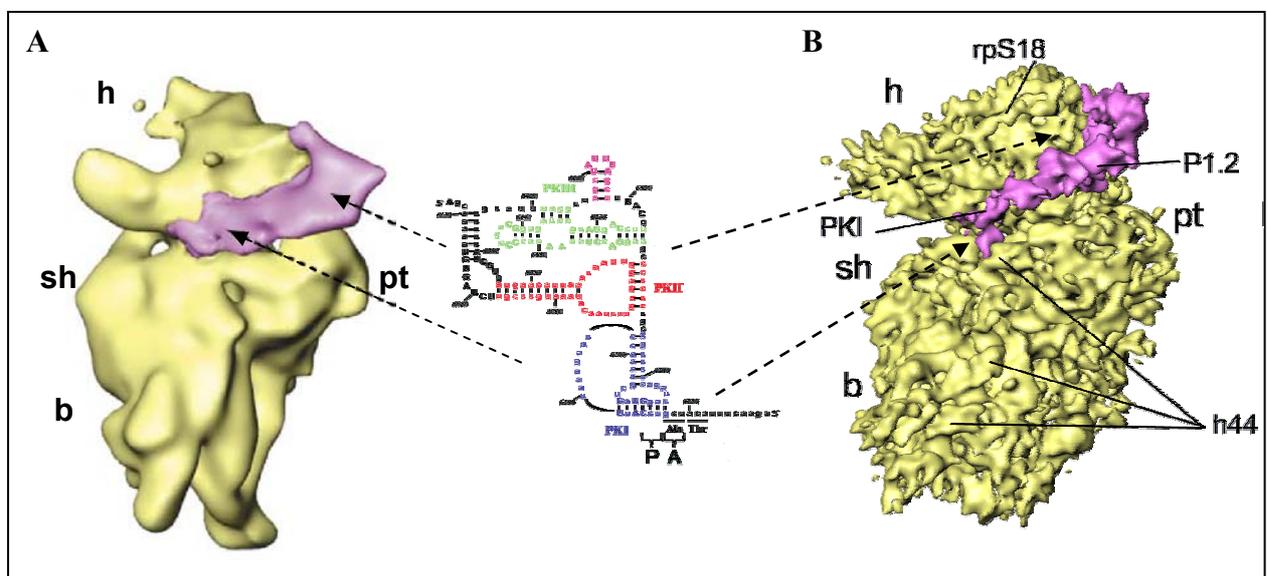
Die geringe Auflösung früherer Kryo-EM-Rekonstruktionen verhindert eine genaue Analyse der IRES-Struktur sowie der genauen Interaktion mit dem Ribosom. Mit einer Auflösung von 17,3Å von CrPV an HeLa-80S-Ribosomen durch (Spahn et al., 2004) gelang noch keine molekulare Interpretation der IRES-Struktur.

Die RNA eukaryontischer Ribosomen besitzt zusätzliche Strukturelemente (sog. *expansion elements*), was durch die dadurch bedingte höhere Flexibilität eine hochauflösende Kryo-EM-Rekonstruktion erschwert. Um die zur detaillierten Analyse notwendige hohe Auflösung der Kryo-EM-Struktur zu erhöhen und damit die molekulare Interpretation der IRES zu

ermöglichen, muss daher ein anderer ribosomaler IRES-Komplex untersucht werden. Die CrPV-IRES ist nicht nur in höheren Eukaryonten, sondern auch in Hefezellen aktiv (Thompson et al., 2001). Hefe (*S. cerevisiae*) gehört ebenfalls zur den Eukaryoten, jedoch sind ihre Ribosomen im Vergleich zu humanen Ribosomen etwas einfacher aufgebaut (siehe (Spahn et al., 2004). Bedingt durch eine damit geringere Flexibilität der ribosomalen Komponenten kann mit ihnen eine höhere Auflösung erreicht werden.

Für die Versuche wurde daher zunächst ein CrPV-IRES-Komplex mit Heferi-bosomen hergestellt und kryoelektronenmikroskopisch untersucht. Durch umfangreiche Verbesserungen und Optimierungen im Bereich der Biochemie konnte ein entsprechender ribosomaler Komplex mit hoher Reinheit hergestellt werden. Dies bildete die Grundlage für die Gewinnung eines hochradig homogenen Datensatzes. Zusammen mit der Weiterentwicklung bestehender Datenverarbeitungstechniken wie z.B. der Reduzierung des Rauschsignals, die Anwendung von Klassifikations- bzw. Sortieralgorithmen sowie der Verstärkung hoher Bildfrequenzen bildete dies die grundlegende Voraussetzung zur Ermittlung einer hochaufgelösten Struktur.

Es konnte eine Kryo-EM-Rekonstruktion einer an ein 80S-Ribosom gebundenen dicistroviralen CrPV-IRES mit einer Auflösung von 7,3Å erstellt werden. Die Abb. 61 zeigt die 40S-IRES-Struktur früherer Arbeitsgruppen (Spahn et al., 2004) mit der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Struktur im Vergleich:



**Abb. 61: Kryo-EM-Rekonstruktionen der 40S-CrPV-IRES-RNA-Komplexe**

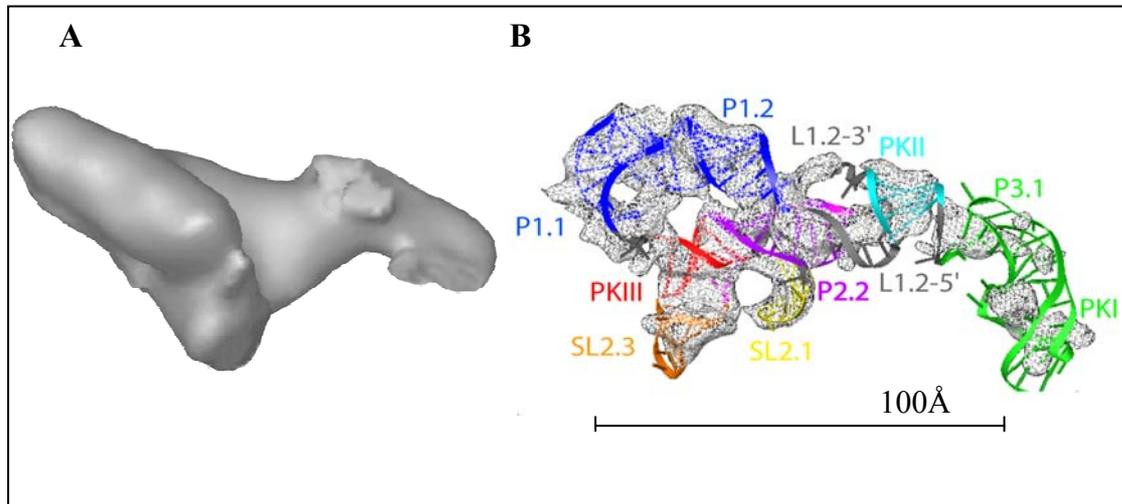
(A) die in früheren Arbeiten ermittelte Struktur der an HeLa-40S gebundenen IRES mit einer Auflösung von 17,3 Å (Spahn et al., 2004)

(B) die in dieser Arbeit durch Kombination verschiedener, verbesserter Methoden im Bereich der Biochemie und der Kryo-EM ermittelte Struktur der an Hefe-40S gebundenen IRES mit einer Auflösung von 7,3 Å

(gelb: ribosomale 40S-Untereinheit, violett: IRES-RNA, h= head, sh= shoulder, b= body, pt= Protuberanz, P= helix, PK= Pseudoknoten, rp= ribosomales Protein)

Die Auflösung der Kryo-EM-Rekonstruktion im Subnanometer-Bereich erlaubte die *de novo*-Modellierung der vollständigen CrPV-IRES-RNA-Molekularstruktur mit den Positionen der Helikalen- und Haarnadelstrukturen in einer aktiven, am Ribosom gebundenen Form.

Die RNA-Struktur beinhaltet eine zentrale Struktur sowie drei Pseudoknoten mit je einer spezifischen Funktion.



**Abb. 62: Kryo-EM-Rekonstruktionen der CrPV-IRES-RNA im Vergleich**

(A) CrPV-IRES mit einer Auflösung von 17,3 Å (Spahn et al., 2004; Spahn et al., 2001b)

(B) CrPV-IRES mit einer Auflösung von 7,3 Å mit atomarem Modell der RNA (Schuler et al., 2006)

(PK= Pseudoknoten, P: RNA-Helix, SL: Stemloop /Haarnadelstruktur)

Diese Pseudoknoten (oder auch Domänen) interagieren mit den ribosomalen A-, P- und E-Stellen. Diese Interaktionen sind für die interne Initiation der IRES notwendig. Domäne 1 interagiert dabei mit der 60S-Untereinheit im Bereich der E- und P-Stellen, die Domäne 2 interagiert mit der 40S-Untereinheit in der E-Stellen-Region. Auch Domäne 3 ist funktionell bedeutend, sie platziert das Alanin-Startkodon in das Dekodierungszentrum der A-Stelle.

In früheren Kryo-EM-Strukturen eines CrPV-40S-Komplexes wurde gezeigt, dass die Domäne 3 stark mit der Position der A-Stellen-tRNA überlappt und so einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von einem 80S-Ribosom hat (Spahn et al., 2004; Spahn et al., 2001b). In der ermittelten Kryo-EM-Struktur des Y80S befindet sich die Domäne 2 zwischen der A- und P-Stelle, und nur der Teil mit dem Alanin-Kodon überlappt mit dem Haarnadelstruktur der A-Stellen-tRNA.

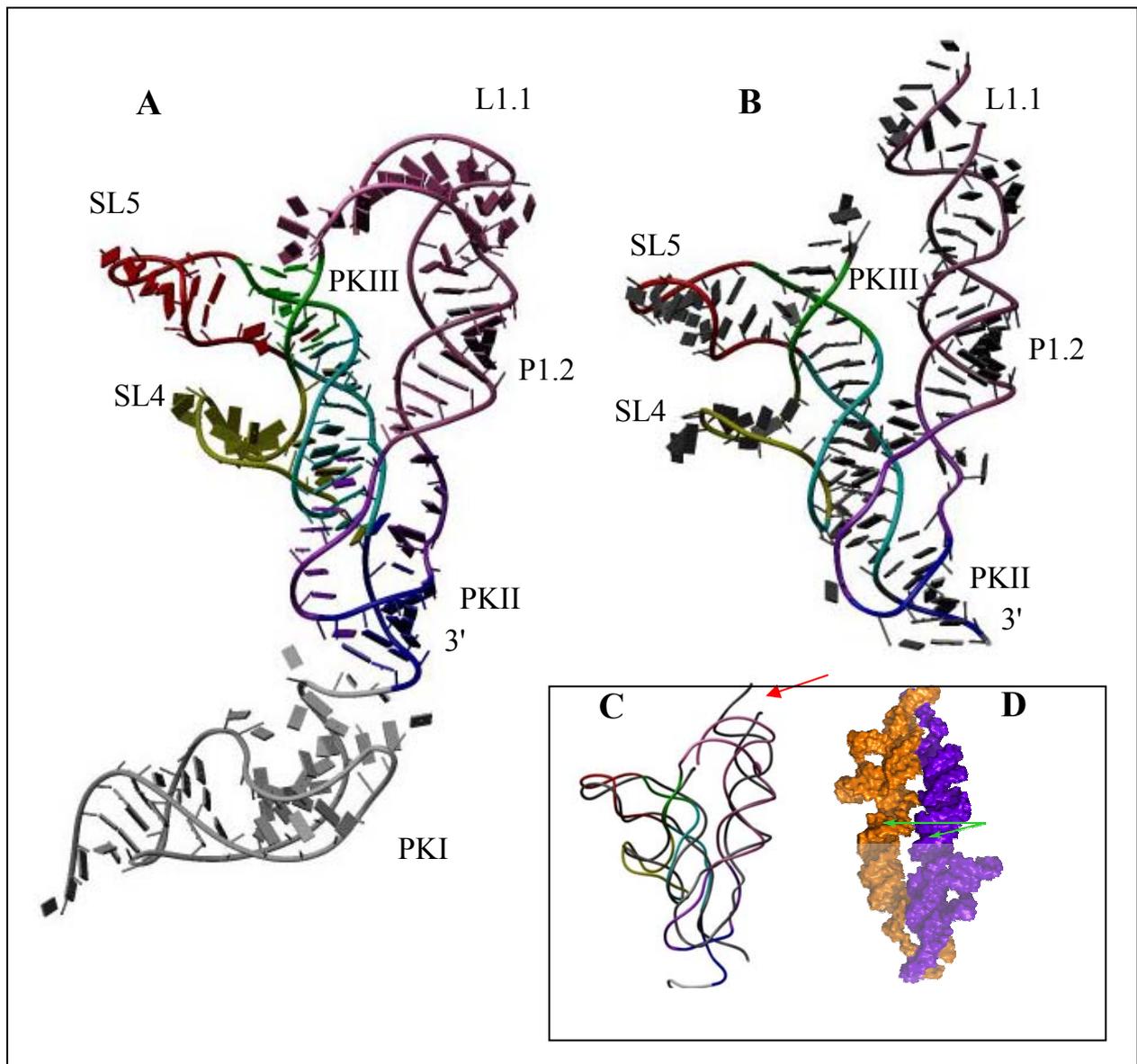
Die fragmentierte Kryo-EM-Dichte der IRES-Domäne 3-Helix P1.1 in Position der ribosomalen L1-Protuberanz indiziert eine Flexibilität der Struktur in dieser Region. Diese Flexibilität ist von

Bedeutung, da es P1.1 ermöglicht, mit der L1-Protuberanz zu interagieren. Die Theorie über die Funktion von Domäne 3 wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nur wenige Kontakte mit dem Ribosom und den anderen beiden Domänen der IRES gebildet werden. Während der Dekodierung der Alanin-Kodons muss sich die Domäne 3 vollständig aus der A-Stelle entfernen. Dieses ist durch die Flexibilität der Domäne 3 möglich, ohne die Kontakte mit den Domänen 2 und 3 zu zerstören.

Das dynamische Verhalten der IRES mit verschiedenen Konformationen ist für die Steuerung der internen Initiationsreaktion notwendig. Der Aufbau der IRES zeigt einen Kompromiss zwischen der notwendigen Kompaktheit (um in den intra-ribosomalen Raum hineinzupassen) und der Notwendigkeit von Konformationsänderungen um die Funktion zu gewährleisten.

Bei dem Vergleich der Strukturen des ribosomalen IRES-Komplexes mit der eines leeren Ribosoms konnte eine Konformationsänderung in der 40S-Untereinheit beobachtet werden. Der Kopf der 40S-Untereinheit rotiert relativ zum Körper der 40S-Untereinheit. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass das Ribosom auf die IRES-Bindung mit einer Konformationsänderung reagiert. Diese Konformationsänderung wurde auch bei einer konservativen, cap-abhängigen Translationinitiation beobachtet (Passmore et al., 2007) und scheint eine Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des ribosomalen Komplexes zu sein. Diese aktive Manipulation des Translationsapparates konnte bereits bei früheren Experimenten mit dem CrPV-IRES beobachtet werden (Spahn et al., 2004), ebenso wie bei Experimenten mit dem HCV-IRES (Spahn et al., 2001b). Die IRES-RNA scheint die Funktion eines RNA-basierenden Translationsfaktors zu übernehmen. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer biochemischer Studien (Jan and Sarnow, 2002; Nishiyama et al., 2003; Pestova and Hellen, 2003; Pestova and Hellen, 2005; Wilson et al., 2000a)

Die Ergebnisse der kryo-elektronenmikroskopischen Untersuchung bzw. das Modell der IRES-RNA wurden durch röntgenkristallographische Untersuchungen (Pfingsten et al., 2006) bestätigt. Bei diesen Versuchen wurde das *Plautia stali intestine virus* (PSIV)-IRES, einem IRES aus der CrPV-IRES-Familie untersucht. Dabei gelang eine mit einer Auflösung von 3,1Å eine atomare Interpretation der Pseudoknoten I- und II-haltigen Regionen. Infolge von Flexibilität in bestimmten Bereichen der IRES RNA konnte diese nur als Dimer kristallisiert und untersucht werden. So gelang die Modellierung der L1.1-RNA nicht, die Struktur dieser flexiblen Region war nur unzureichend mit der Technik der Röntgenkristallographie ermittelbar.

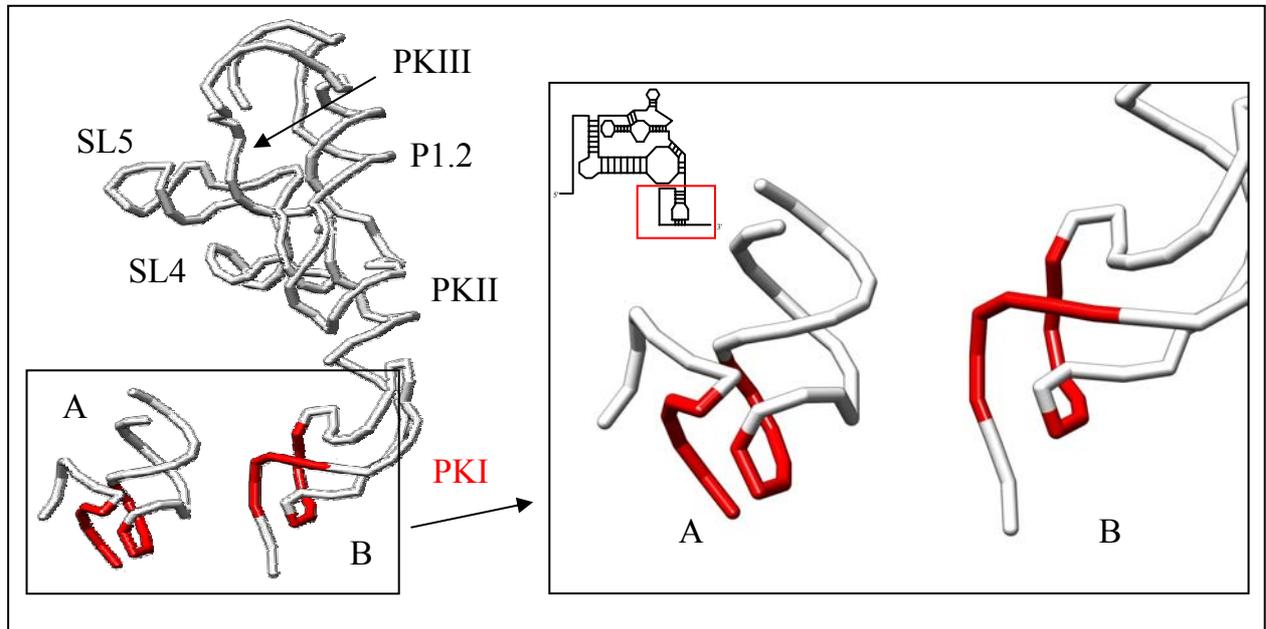


**Abb. 63:**Die Röntgenkristallstruktur eines *Plautia stali* intestine virus (PSIV)-IRES (Pfungsten et al., 2006) im Vergleich zur der mit Hilfe der Kryo-EM ermittelten Struktur von CrPV-IGR-IRES

- A) Die mit Hilfe der Kryo-EM ermittelte Struktur der vollständigen CrPV-IGR-IRES einschließlich der PKI-Region sowie der L1.1-Struktur
- B) Röntgenkristallstruktur vom PSIV-IGR-IRES bei einer Auflösung von 3,1Å, hier gelang die Kristallisation der ribosomen-bindenden Domäne
- C) Überlagerung von beiden IRES-Strukturen, der rote Pfeil zeigt die Unterschiede im Bereich L1.1, die durch die Dimerisierung des PSIV-IRES während der röntgenkristallographischen Untersuchung hervorgerufen wurden
- D) die Struktur des (PSIV)-IRES-Dimers (Pfungsten et al., 2006), grüne Pfeile: Position der Dimere

Erst kürzlich im Jahre 2008 gelang die röntgenkristallographische Untersuchung dieser PKI-Struktur der CrPV-IRES. Diese Struktur konnte bei einer Auflösung von 2,4Å ermittelt werden. Auch bei diesen Versuchen kam es zu Störungen der Kristallstruktur im Bereich der Nukleotide 6203-6209, die daraufhin aus der Abbildung entfernt wurden (Costantino et al., 2008).

Im Vergleich konnte eine Ähnlichkeit der Strukturen beobachtet werden (siehe Abb. 64). Aufgrund der Unvollständigkeit der Kristallstruktur ist jedoch eine endgültige Aussage über die tatsächliche Struktur der PKI-Region schwierig.



**Abb. 64:**Die Röntgenkristallstruktur der PKI-Region der CrPV-IRES im Vergleich zu der mit Hilfe der Kryo-EM ermittelten Struktur von CrPV-IGR-IRES

A) Die Röntgenkristallstruktur der PKI-Region bei einer Auflösung von 2,4Å (Costantino et al., 2008)

B) Das mit Hilfe der Kryo-EM ermittelte atomare Modell der CrPV-IRES RNA (Schuler et al., 2006)

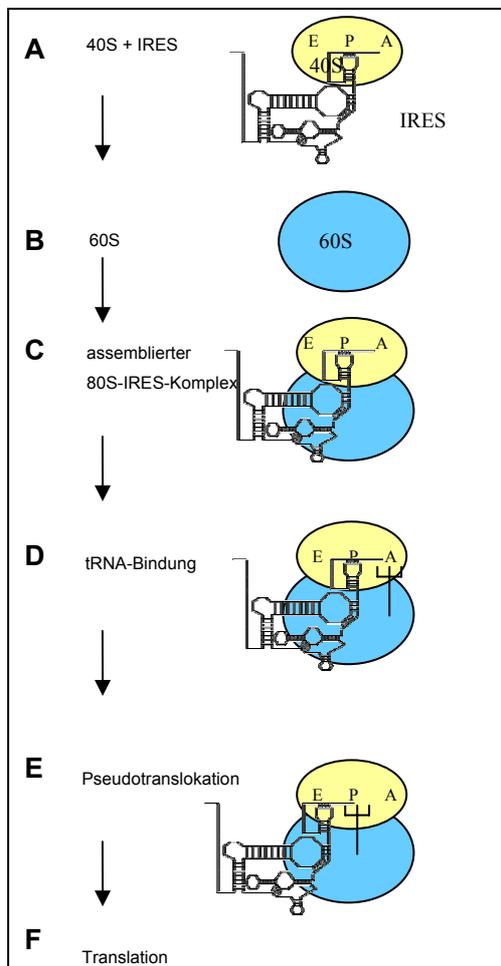
C) Die vergrößerte Darstellung der jeweiligen PKI-Struktur, rot markiert ist der Bereich des PKI-Stemloops sowie die entsprechende RNA-Region im Bereich vor dem GCU-Kodon; siehe im Vergleich dazu die Darstellung der IRES-Sekundärstruktur

## 7.2 Die IRES während der Translation

Noch offen war die Frage, in wie weit sich die Struktur des CrPV-IRES während der weiteren Schritte wie A-Stellenbesetzung und Translokation verändert. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Komplexe aus eukaryontischen 80S und verschiedener CrPV-IRES-Mutanten hergestellt. Dabei wurde die IRES-RNA-Sequenz verändert, so dass das Alanin-spezifischen Startkodons mit einem Phenylalanin-spezifischen Kodon ersetzt wurde. Dann wurden, dem aktuellen Modell der IRES-basierenden Translationsinitiation folgend (Wilson et al., 2000a), die ribosomalen IRES-Komplexe auf ihre Translationsfähigkeit hin untersucht. Dazu erfolgten *in vitro*-Experimente zur nicht-enzymatischen Bindung von N-Acetylphenylalanyl-tRNA<sup>Phe</sup>, zur enzymatischen Aminoacyl-tRNA-Bindung mit ternärem Komplex sowie zur eEF2-vermittelten Translokation. Dabei konnte sowohl bei dem Hefe-80S-wie auch dem RRL-IRES-Komplex keine spezifische Bindung von N-Acetylphenylalanyl-tRNA<sup>Phe</sup> in die A-Stelle des ribosomalen

IRES-Komplexes nachgewiesen werden. Die Versuche zur IRES-vermittelten, kodonspezifischen Bindung von ternärem 43S-Prä-Initiationskomplex an den IRES-Ribosomen-Komplex mit anschließender eEF2-vermittelter Translokationsreaktion blieben ohne Ergebnis.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand sollte die Translokationsreaktion unter den hier gewählten Versuchsbedingungen zu beobachten sein. Dem gegenwärtige Modell der IRES-kontrollierten Translokation folgend (Wilson et al., 2000a), geht man von dem Vorhandensein eines transienten 80S-IRES-Komplexes dem mit Pseudoknoten PKI der P-Stelle und  $\text{aatRNA}^{\text{Ala}}$  in der A-Stelle aus (siehe Abb. 65). Durch Toeprintversuche konnte dabei gezeigt werden, dass es bei tRNA-besetzter A-Stelle zu einer Pseudotranslokationsreaktion kommt. Dabei bindet der ternäre  $\text{EF1} \cdot \text{tRNA} \cdot \text{GTP}$ -Komplex und hinterlässt nach der GTP-Hydrolyse und Freisetzung von  $\text{EF1} \cdot \text{GDP}$  die tRNA in der ribosomalen A-Stelle.



**Abb. 65: Modell für die CrPV-IRES-vermittelte Translationsinitiation nach (Wilson et al., 2000a)**

A-C) CrPV-IRES unterstützt die 80S-Bildung ohne weitere Initiationsfaktoren

IRES-PKI interagiert mit der ribosomalen P-Stelle, die Interaktionen zwischen dem CCU-Triplet und der IRES sind vergleichbar mit denen der Met-tRNA<sub>i</sub> und dem Initiatorcodon

D) Aminoacylierte tRNA<sup>Phe</sup> soll durch Kodon-Antikodon-Wechselwirkungen an die A-Stelle gebunden werden. Es konnte jedoch keine derartige Bindung beobachtet werden.

E) Pseudotranslokation ohne die Bildung von Peptidbindungen. Hierbei soll IRES-PKI von P-nach E-Stelle, die  $\text{aatRNA}^{\text{Phe}}$  von der A-in die P-Stelle verschoben werden

Die in dieser Arbeit ermittelte IRES-Struktur lässt eine teilweise Überlappung mit der A-Stelle erkennen. Für die Bindung des ternären Komplexes muss dieses Codon für die Bindung des 3'-CCA-terminalen Endes der tRNA frei zugänglich sein. Dazu ist eine Pseudotranslokation

notwendig, die P-Stellen gebundene IRES-Domäne 3 mit PKI muss ohne die Bildung einer Peptidbindung in die E-Stelle bewegt werden. Nach den gegenwärtigen Modellen geschieht das entweder spontan, induziert durch die Bindung des ternären Komplexes an die ribosomale A-Stelle oder vermittelt durch den Elongationsfaktor eEF2.

Die Beteiligung von EF2 an diesem Schritt wurde in früheren Experimenten durch die Verwendung von Cycloheximid, einem EF2 blockierenden Agenz, ausgeschlossen (Wilson et al., 2000a). Es konnte auch eine schwächere Translokationsreaktion bei der Verwendung von GMP-PNP beobachtet werden. Daraus wurde geschlossen, dass die initiale Pseudotranslokation andere Voraussetzungen benötigt als die nachfolgenden Translokationsereignisse.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Pseudotranslokation dennoch durch eEF2 vermittelt wird (Pestova and Hellen, 2003).

Spätere Ergebnisse lassen eine Kombination der Effekte vermuten (Costantino et al., 2008). Die IRES-Struktur imitiert einen P/E-tRNA Hybridzustand, der es der A-Stellen-tRNA erlaubt, in den A/P-Hybridzustand überzugehen. eEF2 "erkennt" tRNAs im Hybridzustand und vermittelt die Translokation.

Der Faktor eEF2 wurde in den hier vorgestellten Versuchen verwendet, das beschriebene Ergebnis konnte jedoch nicht reproduziert werden.

In der Literatur wurde bei ähnlichen Versuchen unter Verwendung von eEF1H, eEF2 sowie einer IRES mit kurzer protein-kodierender Sequenz eine erfolgreiche Translokationsreaktion beschrieben (Pestova and Hellen, 2003). Der Faktor eEF1H besteht aus einem binären Komplex aus eEF1A und eEF1B.

Eine mögliche Ursache für die ausbleibende tRNA-Bindung bzw. Translokationsreaktion in den eigenen Versuchen liegt in der natürlichen Unstabilität von eEF1A in der Abwesenheit von eEF1B (Pestova and Hellen, 2003). Wenn der Faktor und somit der ternäre Komplex unter den gewählten Versuchsbedingungen zerfällt, kann keine Bindung von tRNA in die A-Stelle erfolgen. Da jedoch bei der Verwendung von Poly(U)-mRNA eine positive Translokationsreaktion nachgewiesen werden konnte, kann nicht von einem vollständigen Zerfall von eEF1A ausgegangen werden. Daher ist anzunehmen, dass der Faktor eEF1B eine entscheidende Rolle der der IRES-bedingten Translationsinitiation spielt.

Ist der Translationsfaktor eEF1B für die IRES-Funktion notwendig?

Zur endgültigen Beantwortung dieser Fragen über die IRES-vermittelte Translokation können gleichartige Versuche in der Anwesenheit des isolierten Faktors eEF1B durchgeführt werden. Zu den Vorversuchen gehören dann die Verwendung von Reticulocyten-Lysat als Enzymquelle sowie die Nutzung eines Luciferase-RNA-Reporter-Konstruktes.

Die hier angewandten Techniken der Einzelpartikelrekonstruktion können darüber hinaus auch zur Untersuchung ähnlicher ribosomaler Komplexe verwendet werden. In Zusammenarbeit mit Tanja Budkevitch könnte die Struktur eines Kaninchenleber-Ribosoms mit gebundenem ternärem Komplex ohne und ggf. mit CrPV-IRES ermittelt werden, um Hinweise auf den Mechanismus von dessen Bindung an das Ribosom zu erlangen. Diese Informationen könnten möglicherweise zusätzliche Informationen über die Art und Weise der Bindung ternärer Komplexe an ribosomale CrPV-IRES-Komplexe geben.

Zusätzlich zu den biochemischen Versuchen wurden die RRL-80S-IRES-Komplexe kryoelektronenmikroskopisch untersucht. In Übereinstimmung mit den biochemischen Versuchen konnte dabei kein an den ribosomalen IRES-Komplex gebundener ternärer Komplex oder eine gebundene tRNA beobachtet werden. Die entsprechenden Partikelbilder wurden dazu bei dreifacher Dezimierung anhand von fünf Referenzstrukturen sortiert bzw. klassifiziert. Schon auf dieser Stufe der Datenprozessierung konnte ohne weitere Maßnahmen zur Reduzierung des Rauschsignals eine Auflösung von  $9,8\text{\AA}$  erreicht werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass bei der Anwendung der im Falle des Hefe-80S-CrPV-IRES-Komplexes erfolgreichen Techniken (siehe 5.9) noch eine deutliche Steigerung dieser Auflösung möglich ist. Damit sind vergleichende Untersuchungen der IRES-Struktur und -Interaktion bei verschiedenen Spezies möglich. Zusätzlich dazu können hochaufgelöste Details der Struktur des RRL-Ribosoms untersucht werden. Diese sind bis heute noch nicht verfügbar, da noch keine Röntgenkristallstruktur des eukaryontischen Ribosoms erstellt werden konnte.

IRES-Strukturen zeigen eine große Bandbreite, bei denen statische und flexible Elemente für die verschiedenen Funktionen verantwortlich sind. Die Struktur und die Funktion dieser Elemente war bisher weitgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Struktur einer vollständigen IRES ermittelt und auf molekularer Ebene interpretiert werden. Dies gelang dabei mit Hilfe der Kryo-

Elektronenmikroskopie sowie der hier weiterentwickelten Einzelpartikelrekonstruktion. Den einzelnen Strukturelementen der CrPV-IRES-RNA konnten eindeutig die zur Translationsinitiation notwendigen Funktionen zugeordnet werden. Diese strukturellen Elemente finden sich auch in anderen IRES-Elementen wie z.B. dem HCV-IRES. Daher können die hier ermittelten Informationen für die Untersuchung und das Verständnis der IRES-kontrollierte Translationsinitiation allgemein genutzt werden.

Dieses hier vorgestellte erste Beispiel der Erstellung eines molekularen RNA-Modells mit Hilfe der KEM zeigt den großen Fortschritt, den diese Technik in den letzten Jahren gemacht hat. Zukünftig ist zu erwarten, dass weitere Strukturen mit Hilfe dieser Technik gelöst werden können, die für die bisherigen Untersuchungsmethoden wie z.B. Röntgenkristallographie nicht zugänglich waren. Theoretisch ist mit der Kryo-EM-Technik eine nahezu atomare Auflösung möglich, die gegenwärtig aus praktischen Gegebenheiten jedoch noch nicht erreicht werden konnte. Durch die fortschreitende technische Entwicklung auf dem Gebiet der Elektronenmikroskopie, z.B. durch die Entwicklung von Phasenkontrastmikroskopen werden die bestehenden Grenzen weiter verschoben werden können. Einem großen Einfluss hat ebenfalls die fortschreitende Entwicklung der Computertechnologie. Mit Hilfe automatisierter und rechenintensiver Verfahren kann die in einem proportionalen Verhältnis zur erreichbaren Auflösung stehende Datenmenge um ein Vielfaches erhöht werden.

Diese Weiterentwicklungen werden es ermöglichen, auch bis dato nicht- oder nur indirekt nachweisbare dynamische Prozesse auf molekularer Ebene zu visualisieren. Dazu stellt diese Arbeit einen ersten Beitrag dar. Die methodischen Grundlagen können zur Untersuchung einer Vielzahl weiterer biologischer Komplexe verwendet werden, die mit den bisherigen Analysemethoden nicht zugänglich waren.

---

## 8 Literaturverzeichnis

1. Allen, D. W., and Zamecnik, P. C. (1962). The effect of puromycin on rabbit reticulocyte ribosomes. *Biochim Biophys Acta* *55*, 865-874.
2. Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K., and Lee, C. H. (1997). Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiol* *114*, 1293-1305.
3. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* *289*, 905-920.
4. Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* *100*, 243-255.
5. Blaha, G., Stelzl, U., Spahn, C. M., Agrawal, R. K., Frank, J., and Nierhaus, K. H. (2000). Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol* *317*, 292-309.
6. Bommer, U., Burkhardt, N., Jünemann, R., Spahn, C. M. T., Triana-Alonso, F. J., and Nierhaus, K. H. (1996). Ribosomes and polysomes. In *Subcellular fractionation. A practical approach.*, J. Graham, and D. Rickwoods, eds (Oxford, IRL Press at Oxford University Press), pp. 271-301.
7. Bommer, U., Burkhardt, N., Jünemann, R., Spahn, C. M. T., Triana-Alonso, F. J., and Nierhaus, K. H. (1997). Ribosomes and polysomes. In *Subcellular fractionation. A practical approach.*, J. Graham, and D. Rickwoods, eds (Oxford, IRL Press at Oxford University Press), pp. 271-301.
8. Carson, M. (1997). Ribbons. *Methods Enzymol* *277*, 493-505.
9. Cevallos, R. C., and Sarnow, P. (2005). Factor-independent assembly of elongation-competent ribosomes by an internal ribosome entry site located in an RNA virus that infects penaeid shrimp. *J Virol* *79*, 677-683.
10. Chappell, S. A., LeQuesne, J. P., Paulin, F. E., deSchoolmeester, M. L., Stoneley, M., Soutar, R. L., Ralston, S. H., Helfrich, M. H., and Willis, A. E. (2000). A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* *19*, 4437-4440.
11. Costantino, D., and Kieft, J. S. (2005). A preformed compact ribosome-binding domain in the cricket paralysis-like virus IRES RNAs. *Rna* *11*, 332-343.
12. Costantino, D. A., Pflingsten, J. S., Rambo, R. P., and Kieft, J. S. (2008). tRNA-mRNA mimicry drives translation initiation from a viral IRES. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 57-64.
13. Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W., and Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* *21*, 129-228.
14. Frank, J., Penczek, P., Agrawal, R. K., Grassucci, R. A., and Heagle, A. B. (2000). Three-dimensional cryoelectron microscopy of ribosomes. *Methods Enzymol* *317*, 276-291.
15. Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., and Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* *116*, 190-199.
16. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* *68*, 913-963.
17. Haenni, A. L., and Chapeville, F. (1966). The behaviour of acetylphenylalanyl soluble ribonucleic acid in polyphenylalanine synthesis. *Biochim Biophys Acta* *114*, 135-148.
18. Hellen, C. U., and Sarnow, P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* *15*, 1593-1612.

## Literaturverzeichnis

---

19. Hershey, J. W., Asano, K., Naranda, T., Vornlocher, H. P., Hanachi, P., and Merrick, W. C. (1996). Conservation and diversity in the structure of translation initiation factor EIF3 from humans and yeast. *Biochimie* 78, 903-907.
20. Hershey, J. W. B. (2000). Pathway and Mechanism of Initiation of Protein Synthesis. In *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 33-88.
21. Hilbers, C. W., Michiels, P. J., and Heus, H. A. (1998). New developments in structure determination of pseudoknots. *Biopolymers* 48, 137-153.
22. Hofmann, K. P., Spahn, C. M., Heinrich, R., and Heinemann, U. (2006). Building functional modules from molecular interactions. *Trends Biochem Sci* 31, 497-508.
23. Hudder, A., and Werner, R. (2000). Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene. *J Biol Chem* 275, 34586-34591.
24. Jan, E., and Sarnow, P. (2002). Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* 324, 889-902.
25. Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62, 2636-2643.
26. Jones, T. A., and Kjeldgaard, M. (1997). Electron-density map interpretation. *Methods Enzymol* 277, 173-208.
27. Kanamori, Y., and Nakashima, N. (2001). A tertiary structure model of the internal ribosome entry site (IRES) for methionine-independent initiation of translation. *Rna* 7, 266-274.
28. Kisselev, L., Ehrenberg, M., and Frolova, L. (2003). Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *Embo J* 22, 175-182.
29. Kisselev, L. L., and Frolova, L. (1995). Termination of translation in eukaryotes. *Biochem Cell Biol* 73, 1079-1086.
30. Kurland, C. G., Rigler, R., Ehrenberg, M., and Blomberg, C. (1975). Allosteric mechanism for codon-dependent tRNA selection on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4248-4251.
31. Leontis, N. B., and Westhof, E. (2001). Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *Rna* 7, 499-512.
32. Loftfield, R. B. (1972). The mechanism of aminoacylation of transfer RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 12, 87-128.
33. Maag, D., Algire, M. A., and Lorsch, J. R. (2006). Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *J Mol Biol* 356, 724-737.
34. Macejak, D. G., and Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353, 90-94.
35. Malhotra, A., Penczek, P., Agrawal, R. K., Gabashvili, I. S., Grassucci, R. A., Junemann, R., Burkhardt, N., Nierhaus, K. H., and Frank, J. (1998). Escherichia coli 70 S ribosome at 15 Å resolution by cryo-electron microscopy: localization of fMet-tRNA<sup>fMet</sup> and fitting of L1 protein. *J Mol Biol* 280, 103-116.
36. Massire, C., and Westhof, E. (1998). MANIP: an interactive tool for modelling RNA. *J Mol Graph Model* 16, 197-205, 255-197.
37. Mindell, J. A., and Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol* 142, 334-347.

## Literaturverzeichnis

---

38. Morgan, D. G., Menetret, J. F., Radermacher, M., Neuhof, A., Akey, I. V., Rapoport, T. A., and Akey, C. W. (2000). A comparison of the yeast and rabbit 80 S ribosome reveals the topology of the nascent chain exit tunnel, inter-subunit bridges and mammalian rRNA expansion segments. *J Mol Biol* *301*, 301-321.
39. Neidhardt, F. C. (1987). Chemical composition of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology *American Society for Microbiology*, 3-6.
40. Nishiyama, T., Yamamoto, H., Shibuya, N., Hatakeyama, Y., Hachimori, A., Uchiumi, T., and Nakashima, N. (2003). Structural elements in the internal ribosome entry site of *Plautia stali* intestine virus responsible for binding with ribosomes. *Nucleic Acids Res* *31*, 2434-2442.
41. Noller, H. F. (2006). Biochemical characterization of the ribosomal decoding site. *Biochimie* *88*, 935-941.
42. Orlova, E. V., Dube, P., Harris, J. R., Beckman, E., Zemlin, F., Markl, J., and van Heel, M. (1997). Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *J Mol Biol* *271*, 417-437.
43. Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R., and Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* *26*, 41-50.
44. Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* *334*, 320-325.
45. Penczek, P. A., Frank, J., and Spahn, C. M. (2006). A method of focused classification, based on the bootstrap 3D variance analysis, and its application to EF-G-dependent translocation. *J Struct Biol* *154*, 184-194.
46. Penczek, P. A., Grassucci, R. A., and Frank, J. (1994). The ribosome at improved resolution: new techniques for merging and orientation refinement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles. *Ultramicroscopy* *53*, 251-270.
47. Pestova, T. V., Borukhov, S. I., and Hellen, C. U. (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* *394*, 854-859.
48. Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* *57*, 651-674.
49. Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2003). Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev* *17*, 181-186.
50. Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2005). Reconstitution of eukaryotic translation elongation in vitro following initiation by internal ribosomal entry. *Methods* *36*, 261-269.
51. Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Shatsky, I. N. (1996). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* *16*, 6859-6869.
52. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* *25*, 1605-1612.
53. Pfingsten, J. S., Costantino, D. A., and Kieft, J. S. (2006). Structural basis for ribosome recruitment and manipulation by a viral IRES RNA. *Science* *314*, 1450-1454.
54. Pisarev, A. V., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* *131*, 286-299.
55. Radermacher, M. (1988). Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. *J Electron Microscop Tech* *9*, 359-394.

## Literaturverzeichnis

---

56. Rheinberger, H. J., Sternbach, H., and Nierhaus, K. H. (1981). Three tRNA binding sites on Escherichia coli ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5310-5314.
57. Rossmann, M. G. (2000). Fitting atomic models into electron-microscopy maps. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* D56, 1341-1349.
58. Sachs, A. B., Sarnow, P., and Hentze, M. W. (1997). Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89, 831-838.
59. Sasaki, J., and Nakashima, N. (1999). Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus in vitro. *J Virol* 73, 1219-1226.
60. Schuler, M., Connell, S. R., Lescoute, A., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Schroeder, B., Mielke, T., Penczek, P. A., Westhof, E., and Spahn, C. M. (2006). Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1092-1096.
61. Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., and Cate, J. H. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310, 827-834.
62. Shannon, C. E. (1949). "Communication in the presence of noise". *Proc Institute of Radio Engineers* vol. 37, pp. 10-21.
63. Sonenberg, N., and Dever, T. E. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* 13, 56-63.
64. Spahn, C. M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G., and Frank, J. (2001a). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107, 373-386.
65. Spahn, C. M., Jan, E., Mulder, A., Grassucci, R. A., Sarnow, P., and Frank, J. (2004). Cryo-EM visualization of a viral internal ribosome entry site bound to human ribosomes: the IRES functions as an RNA-based translation factor. *Cell* 118, 465-475.
66. Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., Penczek, P. A., Zhou, K., Doudna, J. A., and Frank, J. (2001b). Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. *Science* 291, 1959-1962.
67. Spahn, C. M., and Nierhaus, K. H. (1998). Models of the elongation cycle: an evaluation. *Biol Chem* 379, 753-772.
68. Spirin, A. S. (2002). Ribosome as a molecular machine. *FEBS Lett* 514, 2-10.
69. Steitz, T. A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 242-253.
70. Su, L., Chen, L., Egli, M., Berger, J. M., and Rich, A. (1999). Minor groove RNA triplex in the crystal structure of a ribosomal frameshifting viral pseudoknot. *Nat Struct Biol* 6, 285-292.
71. Theimer, C. A., Blois, C. A., and Feigon, J. (2005). Structure of the human telomerase RNA pseudoknot reveals conserved tertiary interactions essential for function. *Mol Cell* 17, 671-682.
72. Thompson, S. R., Gulyas, K. D., and Sarnow, P. (2001). Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12972-12977.
73. Traub, P., and Nomura, M. (1968). Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59, 777-784.
74. Traut, R. R., and Monro, R. E. (1964). The Puromycin Reaction and Its Relation to Protein Synthesis. *J Mol Biol* 10, 63-72.

## Literaturverzeichnis

---

75. Triana-Alonso, F. J., Spahn, C. M., Burkhardt, N., Rohrdanz, B., and Nierhaus, K. H. (2000). Experimental prerequisites for determination of tRNA binding to ribosomes from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* *317*, 261-276.
76. Vagner, S., Galy, B., and Pyronnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* *2*, 893-898.
77. Vagner, S., Waysbort, A., Marena, M., Gensac, M. C., Amalric, F., and Prats, A. C. (1995). Alternative translation initiation of the Moloney murine leukemia virus mRNA controlled by internal ribosome entry involving the p57/PTB splicing factor. *J Biol Chem* *270*, 20376-20383.
78. van Heel, M., and Harauz, G. (1988). Biological macromolecules explored by pattern recognition. *Scanning Microsc Suppl* *2*, 295-301.
79. Vidales, F. J., Robles, M. T., and Ballesta, J. P. (1984). Acidic proteins of the large ribosomal subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of phosphorylation. *Biochemistry* *23*, 390-396.
80. Wang, C., Sarnow, P., and Siddiqui, A. (1993). Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* *67*, 3338-3344.
81. Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* *24*, 437-440.
82. Watanabe, S. (1972). Interaction of siomycin with the acceptor site of *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* *67*, 443-457.
83. Watanabe, S., and Tanaka, K. (1972). Studies on release of N-acetylphenylalanyl-tRNA from its ribosomal complex: effects of monovalent cations and antibiotics. *Biochim Biophys Acta* *281*, 564-570.
84. Whittaker, E. T. (1915). "On the Functions Which are Represented by the Expansions of the Interpolation Theory". *Proc Royal Soc Edinburgh* *vol.35*, pp.181-194.
85. Wilson, J. E., Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Sarnow, P. (2000a). Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* *102*, 511-520.
86. Wilson, J. E., Powell, M. J., Hoover, S. E., and Sarnow, P. (2000b). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol* *20*, 4990-4999.
87. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* *292*, 883-896.
88. Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dormitzer, P. R., Bellamy, R., Harrison, S. C., and Grigorieff, N. (2008). Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 1867-1872.
89. Zhou, Z. H. (2008). Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol* *18*, 218-228.

## 1 Tabellenverzeichnis

TAB. 1: KENNGRÖßEN EUKARYONTISCHER RIBOSOMEN ( <i>S. CEREVISIAE</i> ) (MORGAN ET AL., 2000).....	12
TAB. 2: KENNGRÖßEN EUKARYONTISCHER RIBOSOMEN ( <i>LEPORIDAE</i> ) (MORGAN ET AL., 2000) .....	12
TAB. 3: KENNGRÖßEN PROKARYONTISCHER RIBOSOMEN ( <i>E. COLI</i> ) (NIERHAUS ET AL., 2004).....	12
TAB. 4 EINE AUSWAHL AN MRNAS, DIE DURCH EIN IRES-ELEMENT REGULIERT WERDEN .....	16
TAB. 5 ÜBERSICHT ÜBER DIE BENÖTIGTEN INITIATIONSFAKTOREN DER VERSCHIEDENEN INITIATIONSARTEN.....	17
TAB. 6: GRADIENTENPROFIL HPLC.....	42
TAB. 7:SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER UNTERSUCHUNG DER FUNKTIONELLEN ZUSTÄNDE DES RIBOSOMS.....	46
TAB. 8 VERWENDUNG DER EINZELNEN PRIMER / FRAGMENTE BEI DER KLONIERUNG DER VERSCHIEDENEN CPV-IRES .....	64
TAB. 9: PARAMETER DER EINZELPARTIKELREKONSTRUKTION .....	78
TAB. 10: VERGLEICH AMINOACYLIERUNG HEFE / <i>E. COLI</i> .....	85
TAB. 11: ERGEBNISSE DES FILTERBINDUNGSTESTS NACH ACPHE-TRNA <sup>PHE</sup> BINDUNG AN Y80S -CrPV-IRES (COMP) .....	109
TAB. 12: ERGEBNISSE DER PUROMYCINREAKTION NACH ACPHE-TRNA <sup>PHE</sup> -BINDUNG AN Y80S -CrPV-IRES (COMP) .....	110
TAB. 13: ERGEBNISSE DER BINDUNG VON TERNÄREM KOMPLEX AN Y80S -CrPV-IRES (COMP)-KOMPLEX .....	112
TAB. 14: ERGEBNISSE DER BINDUNG VON TERNÄREM KOMPLEX AN RRL80S -CrPV-IRES –KOMPLEXEN*.....	114
TAB. 15: ERGEBNISSE DER BINDUNG VON TERNÄREM KOMPLEX MIT GTP UND DEM NICHT-SPALTBAREN GTP- ANALOGON GMP-PNP AN RRL80S -CrPV-IRES (COMP)-KOMPLEX* .....	115
TAB. 16: ANALYSE FUNKTIONELLER ZUSTÄNDE VON RRL80S -CrPV-IRES MIT TERNÄREM KOMPLEX- FILTERBINDUNGSTEST.....	117
TAB. 17: ANALYSE FUNKTIONELLER ZUSTÄNDE VON RRL80S -CrPV-IRES MIT TERNÄREM KOMPLEX- PUROMYCINREAKTION .....	118

## 2 Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: ZENTRALES DOGMA DER MOLEKULARBIOLOGIE.....	10
ABB. 2: EINE KRYO-EM-STRUKTUR DES 80S-KANINCHENRIBOSOMS BEI EINER AUFLÖSUNG VON 9,8Å.....	11
ABB. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES DICISTRONISCHEN CrPV-GENOMS.....	18
ABB. 4: SEKUNDÄRSTRUKTUR DES CrPV-IRES.....	19
ABB. 5: VERGLEICH DES KONVENTIONELLEN, CAP-ABHÄNGIGEM INITIATIONSMECHANISMUS (A) MIT CAP-UNABHÄNGIGEM, IRES-BASIERTEM INITIATIONSMECHANISMUS (B) (ERLÄUTERUNGEN SIEHE TEXT) .....	20
ABB. 6: HUMANE 40S-UNTEREINHEIT (GELB) IM KOMPLEX MIT 40S-CrPV-IRES (VIOLETT) SOWIE DIE IRES-SEKUNDÄRSTRUKTUR, (SPAHN ET AL., 2004).....	21
ABB. 7: INTERAKTION DER CrPV IRES MIT RIBOSOMALEN KOMPONENTEN.....	22
ABB. 8: BILDGEWINNUNG IN DER KRYO-EM.....	23
ABB. 9: VEREINFACHTES PRINZIP DER 3D-RÜCKPROJEKTION BEI BEKANNTER REFERENZSTRUKTUR.....	24
ABB. 10: BEISPIEL FÜR EINEN ANALYTISCHEN SACCHAROSEGRADIENTEN MIT RIBOSOMALEN PARTIKELN .....	41
ABB. 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES STELLENSPEZIFISCHEN tRNA-BINDUNGS-ASSAYS MIT TERNÄREM KOMPLEX.....	47
ABB. 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES STELLENSPEZIFISCHEN tRNA-BINDUNGS-ASSAYS MIT ACPHE-tRNA <sup>PHE</sup> .....	48
ABB. 13: VERGLEICH DER PUROMYCIN- UND AMINOACYL-tRNA-STRUKTUR.....	51
ABB. 14: DIE CrPV-IGR-IRES SEKUNDÄRSTRUKTUR.....	61
ABB. 15: DIE PRIMÄRSTRUKTUR DES CPV-IRES-WT-DNA-KONSTRUKTES, MARKIERT SIND RELEVANTE STRUKTURELEMENTE QUELLE: DATENBANK NCBI NR. BD177018.....	62
ABB. 16: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DER HERSTELLUNG DER CrPV-IGR-IRES-KONSTRUKTE MIT HILFE DER PCR.....	62
ABB. 17: PLASMIDKARTE "pUC18NdeI-/CrPV-IRES" MIT RESTRIKTIONSSCHNITTSTELLEN UND DEN POSITIONEN DER PCR-PRIMER.....	65
ABB. 18: A) SCHEMATISCHER AUFBAU DES TEM; B) PRINZIP DER ELEKTRONENSTRAHLERZEUGUNG.....	69
ABB. 19: POWERSPEKTREN DER MIKROGRAPHEN.....	75
ABB. 20: BEISPIEL FÜR EINE KONTRASTTRANSFERFUNKTION.....	76
ABB. 21: DIE BESTIMMUNG DER GRAPHISCHEN AUFLÖSUNG .....	80
ABB. 22: ABHÄNGIGKEIT DER AMINOACYLIERUNG VON Mg <sup>2+</sup> -KONZENTRATION UND S100-MENGE .....	86
ABB. 23 : ABHÄNGIGKEIT DER AMINOACYLIERUNG VON DER ATP-KONZENTRATION UND DER TEMPERATUR .....	87
ABB. 24: ABHÄNGIGKEIT DER AMINOACYLIERUNG VON DER INKUBATIONSZEIT.....	88
ABB. 25: OPTIMIERUNG DES PH-WERTES DER AMINOACYLIERUNG .....	89
ABB. 26: ERGEBNIS DER ANALYTISCHEN HPLC EINER PROBE NACH 0 MIN AMINOACYLIERUNGSREAKTION .....	90
ABB. 27: ERGEBNIS DER ANALYTISCHEN HPLC EINER PROBE NACH 16 MIN AMINOACYLIERUNGSREAKTION .....	90
ABB. 28: ERGEBNIS DER ANALYTISCHEN HPLC EINER PROBE NACH 64 MIN AMINOACYLIERUNGSREAKTION .....	90
ABB. 29: VERGLEICH DER AMINOACYLIERUNG UNTER VERWENDUNG VERSCHIEDENER RADIOAKTIVER LABEL .....	91
ABB. 30: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER DISSOZIATIONSUNTERSUCHUNG MIT MgAc .....	93
ABB. 31: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER DISSOZIATIONSUNTERSUCHUNG MIT KCl .....	93
ABB. 32: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL ZUR REINHEITSANALYSE DER ISOLIERTEN RIBOSOMALEN UNTEREINHEITEN.....	94

## Abbildungsverzeichnis

---

ABB. 33: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER IONENBEDINGTEN REASSOZIATIONSUNTERSUCHUNG MIT MGAC .....	97
ABB. 34: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REASSOZIATIONSOPTIMIERUNG MIT VERSCHIEDENEN MENGENVERHÄLTNISSEN AN CRPV-IRES-(WT).....	97
ABB. 35: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REASSOZIATIONSOPTIMIERUNG MIT VERSCHIEDENEN MENGENVERHÄLTNISSEN AN CRPV-IRES-(WT).....	98
ABB. 36: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REASSOZIATIONSOPTIMIERUNG MIT MIT CRPV-IRES-(WT) BEI VERSCHIEDENEN MGAC-KONZENTRATIONEN .....	99
ABB. 37: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REASSOZIATIONSOPTIMIERUNG MIT ISOLIERTEN RIBOSOMALEN UNTEREINHEITEN MIT CRPV-IRES (WT) BEI VERSCHIEDENEN MGAC-KONZENTRATIONEN .....	100
ABB. 38: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REASSOZIATIONSVERSUCHE MIT VERSCHIEDENEN IRES-ELEMENTEN .....	101
ABB. 39: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REASSOZIATIONSOPTIMIERUNG MIT VERSCHIEDENEN MOLAREN RATIO IRESZU Y60S .....	102
ABB. 40: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER PRÄPARATIVEN REASSOZIATION MIT CRPV-IRES-mRNA UND RIBOSOMALEN UNTEREINHEITEN .....	103
ABB. 41: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REINHEITSANALYSE DER Y80S-CRPV-IRES-(WT)-KEM-PROBE .....	104
ABB. 42: UV- UND FLUORESCENZ-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REINHEITSANALYSE DER Y80S-CRPV-IRES-(WT)-KEM-PROBE .....	105
ABB. 43: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER PRÄPARATIVEN REASSOZIATION MIT CRPV-IRES-mRNA UND RIBOSOMALEN UNTEREINHEITEN .....	106
ABB. 44: UV-SACCHAROSEGRADIENTENPROFIL DER REINHEITSANALYSE DER RRL80S-CRPV-IRES-KOMPLEXE ..	107
ABB. 45: P-PROTEIN-NACHWEIS BEIM Y80S-CRPV-IRES-WT-KOMPLEX .....	108
ABB. 46: ERGEBNISSE DES BINDUNGSTESTS MIT ACPHE-TRNA <sup>PHE</sup> AN Y80S MIT POLY(U)- UND CRPV-IRES-mRNA .....	111
ABB. 47: ERGEBNISSE DES BINDUNGSTESTS MIT VERSCHIEDENEN MENGENVERHÄLTNISSEN Y80S-CRPV-IRES ZU TERNÄREM KOMPLEX .....	113
ABB. 48: ERGEBNISSE DES BINDUNGSTESTS MIT VERSCHIEDENEN MENGENVERHÄLTNISSEN RRL80S-CRPV-IRES ZU TERNÄREM KOMPLEX .....	116
ABB. 49: VERSCHIEDENE KONFORMATION DES Y80S-CRPV-IRES (WT)-KOMPLEXES .....	120
ABB. 50: DIE FOURIER SHELL-KORRELATION (FSC) FÜR DIE KRYO-EM-DICHTE DES Y80S-CRPV-IRES (WT)-KOMPLEXES .....	121
ABB. 51: DREIDIMENSIONALE DARSTELLUNG DES Y80S-CRPV-IRES-KOMPLEXES .....	122
ABB. 52: DREIDIMENSIONALE DARSTELLUNG DER Y80S-CRPV-IRES-STRUKTUR .....	122
ABB. 53: VERGLEICH PSEUDOKNOTENS DER HUMANEN TELOMERASE MIT DEM PKI DES CRPV-IRES .....	123
ABB. 54: ELEKTRONDICHTE DER ERMITTELTEN CRPV-IRES-RNA-STRUKTUR .....	124
ABB. 55: VERGLEICH DER PSEUDOKNOTEN PKIII MIT DEM DES BWYV ( <i>BEE T WESTERN YELLOW VIRUS</i> ) .....	125
ABB. 56: MOLEKULARE INTERAKTIONEN DES CRPV-IRES MIT DEM 80S-RIBOSOM .....	126

## Abbildungsverzeichnis

---

ABB. 57: DIE FOURIER SHELL-KORRELATION (FSC) FÜR DIE KRYO-EM-DICHTE DES RRL80S-CrPV-IRES-KOMPLEXES .....	128
ABB. 58: DREIDIMENSIONALE DARSTELLUNG DER RRL80S-CrPV-IRES-STRUKTUR .....	128
ABB. 59: DREIDIMENSIONALE DARSTELLUNG DER RRL80S-CrPV-IRES AM RRL-RIBOSOM .....	128
ABB. 60: VERGLEICH DER DREIDIMENSIONALE DARSTELLUNGEN DER CrPV-IRES-STRUKTUREN.....	129
ABB. 61: KRYO-EM-REKONSTRUKTIONEN DER 40S-CrPV-IRES-RNA-KOMPLEXE.....	131
ABB. 62: KRYO-EM-REKONSTRUKTIONEN DER CrPV-IRES-RNA IM VERGLEICH .....	132
ABB. 63: DIE RÖNTGENKRISTALLSTRUKTUR EINES <i>PLAUTIA STALI</i> INTESTINE VIRUS (PSIV)-IRES (PFINGSTEN ET AL., 2006) IM VERGLEICH ZUR DER MIT HILFE DER KRYO-EM ERMITTELTEN STRUKTUR VON CrPV-IGR-IRES...	134
ABB. 64: DIE RÖNTGENKRISTALLSTRUKTUR DER PKI-REGION DER CrPV-IRES IM VERGLEICH ZU DER MIT HILFE DER KRYO-EM ERMITTELTEN STRUKTUR VON CrPV-IGR-IRES .....	135
ABB. 65: MODEL FÜR DIE CrPV-IRES-VERMITTELTE TRANSLATIONSINITIATION NACH (WILSON ET AL., 2000A) ...	136

### **3 Danksagung**

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Christian Spahn für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen. Durch sein stets offenes Ohr sowie seine stete Bereitschaft für wertvolle Tipps trug er wesentlich zum Gelingen dieser interessanten und abwechslungsreichen Arbeit bei.

Großer Dank geht auch vor allem an Dr. Marylena Dabrowski, Dr. Tatyana Budkevitch und Dr. Sean Connell für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön für die Arbeit in einer freundschaftliche Atmosphäre geht ebenfalls an alle Kollegen der Arbeitsgruppe, Dr. Jan Giesebrecht, Marianne Collier, Birgit Schroeer, Rita Wackenhut, Jan-Christian Schütte, Max Rost, Matthias Brünner; Uta Berndt, Christine Gotthold und Andreas Ratje.

Prof. Dr. Knut Nierhaus vom Max-Planck-Institut für molekulare Genetik gebührt ein herzlicher Dank für die hervorragende Kooperation sowie für wertvolle wissenschaftliche Diskussionen. Ein großes Dankeschön auch an dieser Stelle an Edda Einfeldt!

Des Weiteren geht ein herzlicher Dank an Dr. Thorsten Mielke und Justus Loerke vom Ultra-Struktur-Netzwerk am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik für die praktische Hilfe im Umgang mit Mikroskop und Computer-Cluster sowie Dr. Rudi Lurz und Gerhild Lüders für die herzliche Gastfreundschaft.

## **4 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **5 Erklärung**

„Ich, Martin Schüler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Die Struktur der IRES von Dicistroviren" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 10.10.2008

Martin Schüler