



Kryo-Elektronenmikroskopie makromolekularer Maschinen:

Strukturaufklärung der Hepatitis C Virus "*internal ribosomal entry site*" und ihre Wechselwirkung mit dem Translationsapparat

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Marianne Collier aus Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian M. T. Spahn

Charité -Universitätsmedizin Berlin

Institut für Medizinische Physik und Biophysik

Ziegelstraße 5-9

10117 Berlin

Tel: (49) 30 450 524 131

(49) 30 450 524 102

Fax: (49) 30 450 524 931

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Freie Universität Berlin

Institut für Biologie - Angewandte Genetik

Albrecht-Thaer-Weg 6

14195 Berlin

Tel: (49) 30 8385 5808

(49) 30 8385 5801

Fax: (49) 30 8385 4345

Disputation am: 25. November 2011

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMME	NFASSUNG	7
SUMMARY		9
ABKÜRZUN	IGEN	10
1 EINLE	ITUNG	14
1.1 Das	Ribosom	14
1.2 Prot	einbiosynthese	18
	ongation	
1.2.2 Te	ermination und Ribosomen Recycling	20
1.2.3 D	e Initiation der Translation	21
1.2.3.1	Regulation der Translationsinitiation in Eukaryoten	25
1.2.3.2	Alternativer Weg der Translationsinitiation	26
1.2.3.3	Die HCV IRES	27
1.3 Kry	o-Elektronenmikroskopie	34
1.3.1 Pł	sysikalische Grundlagen der Bildentstehung am TEM	
1.3.1.1	Aufbau des TEM	35
1.3.1.2	Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Objekt und Kontrastentstehung	
1.3.1.3	Die Kontrasttransferfunktion	
1.3.2 Bi	ldanalyse, Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion	40
1.3.2.1	Verbesserung der Bildqualität	40
1.3.2.2	Einzelpartikel Rekonstruktion der 3D-Struktur	
1.3.2.3	Interpretation der finalen Struktur	45
1.4 Ziel	setzung	45
2 MATE	RIAL UND METHODEN	47
2.1 Bezu	ıgsquellen von Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	47
2.2 Bak	terienstämme und Plasmide	52
2.2.1 Ba	akterienstämme	52
2.2.1.1	INV110	52
2.2.1.2	TOP10	52
2.2.1.3	BL21 (DE3)	52

2.2.2	. Plas	mide	53
2.	2.2.1	pUC18-Derivate	53
2.	2.2.2	pBS-Derivate	56
2.	2.2.3	pGST-MS2	57
2.3	Puffer	, Lösungen und mikrobiologische Medien	58
2.3.1	Puff	er und Lösungen für molekulargenetische Methoden	58
2.3.2	Phys	siologische Puffer für 80S Ribosomen und ihre Untereinheiten	58
2.3.3	Puff	er für die Aufreinigung des GST-MS2 Fusionsproteins	61
2.3.4	Puff	er und Lösungen für Affinitätschromatographie	62
2.3.5	Elek	trophoresepuffer	63
2.	3.5.1	Agarosegele	63
2.	3.5.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA (PAGE)	63
2.	.3.5.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	64
2.	3.5.4	Native Kompositgel-Elektrophorese (NKGE)	65
2.3.6	Mik	robiologische Medien	65
2.4	Analy	tische Methoden	66
2.4.1	Phot	ometrische Konzentrationsbestimmungen	66
2.4.2	Elek	trophoresen	67
2.	4.2.1	Agarose-Gelektrophorese	67
2.	4.2.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA (PAGE)	68
2.	4.2.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	70
2.	4.2.4	Native Kompositgel-Elektrophorese (NKGE)	72
2.4.3	Prot	einbestimmung nach Bradford	73
2.4.4	Grac	lienten-Ultrazentrifugation	74
2.5	Mikro	biologische und molekulargenetische Methoden	76
2.5.1	' Anz	ucht und Konservierung von E. coli	76
2.5.2	Rest	riktionsverdau von DNA	76
2.5.3	Dep	hosphorylierung des Klonierungs-Vektors	76
2.5.4	Liga	tion von DNA-Fragmenten	77
2.5.5	Trar	sformation	77
2.5.6	Fluc	reszenzmarkierung von HCV IRES - RNA nach Wu et al. [200]	78
2.5.7	Poly	merase-Kettenreaktion (PCR)	79
2.5.8	3 Olig	oklonierung	82
2.6	Präpa	rative Methoden	83
2.6.1	Plas	midisolierung	83
2.6.2	. Reir	igung von DNA über Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	85
2.6.3	Phe	nol-Chloroform Extraktion	86
2.6.4			86

2.6.5	TCA-Fällung von Proteinen	87
2.6.6	RNA-Extraktion mit TRIZOL® LS	87
2.6.7	Überexpression und Aufreinigung des GST-MS2-Fusionsproteins	87
2.6.8	Isolierung von ribosomalen Untereinheiten aus RRL	88
2.6.9	In vitro Transkription (IVT) von IRES RNA mittels T7-Polymerase	91
2.6.10	Präparation von RRL80S • IRES Komplexen für die Kryo-EM	92
2.6.11	Affinitätschromatographie ribosomaler Komplexe	93
2.7	Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung	96
2.7.1	Grid- und Probenvorbereitung	97
2.7	.1.1 Probeneinbettung in Eis	97
2.7	.1.2 Negativkontrastierung	
2.7.2	Datensammlung	98
2.7.3	Qualitätsbeurteilung von Aufnahmen und Bestimmung von Defokus-Werten	
2.7.4	Einzelpartikel-Selektion	100
2.7.5	Rekonstruktion eines initialen 3D-Strukturmodells	101
2.7.6	Strukturverfeinerung und Multireferenz-Klassifizierung (3D-Sortierung)	102
2.7.7	Berechnung der Auflösung	104
2.7.8	Strukturinterpretation	106
3 EF	GEBNISSE	107
3.1	Präparation von 80S • IRES Komplexen für die Kryo-EM	107
3.1.1	Präparation von IRES RNA	107
3.1.2	Präparation ribosomaler Untereinheiten aus RRL	108
3.1.3	Optimierung der Pufferbedingungen für 80S • HCV IRES Komplexe	111
3.1.4	Darstellung von 80S • IRES Komplexen mit HCV IRES - ähnlichen IRES RNAs	122
3.1.5	Präparation von 80S • HCV IRES und 80S • CSFV IRES Komplexen	125
3.1.6	Affinitätschromatographie von 80S • IRES Komplexen	126
3.2	Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion von 80S • IRES Komplexen	137
3.2.1	Datenerhebung	
3.2.2	Multireferenz Klassifizierung und Auflösung	137
3.2.3	Rekonstruktion der RRL80S • HCV IRES Komplexe	140
3.2.4	Molekulare Struktur der HCV IRES RNA	142
3.2.5	Interaktion der HCV IRES RNA mit dem Ribosom	
3.2.6	Rekonstruktion der RRL80S • CSFV IRES Komplexe	150
4 DI	SKUSSION	153
4.1	Visualisierung von RRL80S • HCV IRES Komplexen mittels Kryo-EM	153
4.2	Tertiärstrukturmodell der HCV IRES in Interaktion mit dem eukaryotischen Ribosom	155

4.2.1	Wechselwirkungen der Domäne II in der ribosomalen E-Stelle	
4.2.2	Strukturelles Shine-Dalgarno-Mimikry des Stem1-Stem2-IIIef-Pseudoknotens	160
4.2.3	Domäne IIId und Helix 26 der 18S rRNA	163
4.2.4	Konformation und Funktion der IIIabc-4-Wege-Kreuzung	164
4.3 V	/isualisierung von RRL80S • CSFV IRES Komplexen mittels Kryo-EM	166
4.4 I	Pazit	166
DANKSA	AGUNG	169
LEBENS	LAUF	170
ABBILDI	UNGSVERZEICHNIS	171
TABELL	ENVERZEICHNIS	174
LITERAT	URVERZEICHNIS	175

Zusammenfassung

Die Proteinbiosynthese (Translation) ist ein komplexer Prozess, der in allen lebenden Zellen für die Genexpression notwendig ist. Ihr Hauptakteur ist das Ribosom, ein hochflexibler makromolekularer Ribonukleoproteinkomplex. Die Translation umfasst vier sequentielle Phasen, bezeichnet als Initiation, Elongation, Termination und Ribosomen Recycling. Als erster Schritt der Translation ist die Initiation die Phase, welche am häufigsten spezifischen Regulationsmechanismen unterworfen ist. Der Standardmechanismus in Eukaryoten, die kanonische Initiation, ist ein sehr komplexer Vorgang und beinhaltet eine Vielzahl von regulatorischen Faktoren (Initiationsfaktoren, eIFs). Rekrutierung, Positionierung und Aktivierung der Translationsmaschinerie die 5'-terminale "Cap"-Strukutur der mRNA und einen ATP-abhängigen "Scanning"-Mechanismus. Daneben existiert jedoch auch ein alternativer Weg der Translationsinitiation: die interne Initiation. Einige mRNAs können "Cap"-Bindung, "Scanning" und die Notwendigkeit einiger oder sogar aller eIFs durch spezielle strukturierte Sequenzen in ihrer 5'-UTR, interne Ribosomen Eintrittsstellen (IRESs), umgehen. Während zelluläre IRES-enthaltende mRNAs oft für wichtige regulatorische Proteine kodieren, stellen IRES-Elemente für Viren effiziente Werkzeuge zur Übernahme des Translationsapparates ihrer Wirtszellen dar. Sie funktionieren selbst dann noch, wenn die kanonische Translationsinitiation beeinträchtigt ist. Das IRES-Elemente des Hepatitis C Virus (HCV) und verwandter Viren der Flaviviridae Familie, wie dem Virus der klassischen Schweinepest (CSFV), bilden eine funktionell wichtige Tertiärstruktur aus, die das eukaryotische Ribosom aktiv beeinflussen kann.

Die HCV IRES erlaubt in Gegenwart von erhöhten Mg²⁺ und Ca²⁺ Konzentrationen eine vollständig Initiationsfaktor-unabhängige Translation. Dieser Umstand wird in der hier vorliegenden Promotionsarbeit genutzt, um für die Kryo-EM ausreichend stabile 80S • IRES Komplexe *in vitro* zu rekonstituieren und zu isolieren. Es wird eine Kryo-EM Dichtekarte des Säugetier 80S Ribosoms im Komplex mit der HCV IRES bei einer deutlich verbesserten Auflösung von 7,8 Å präsentiert, die erstmalig die Erstellung eines vollständigen molekularen Tertiärstrukturmodells der HCV IRES in der ribosomengebundenen Form ermöglicht. Dieses Modell offenbart eine komplexe dreidimensionale Faltung der IRES RNA und molekulare Details ihrer Wechselwirkungen mit dem Ribosom. Die Proteine rpS1e, rpS5e, rpS14e, rpS25, rpS26e, rpS27, rpS28e sowie die Helices h23 und h26 der 18S rRNA können als Interaktionspartner in Kopf- und Plattform-Domäne der ribosomalen 40S Untereinheit klar

identifiziert werden. Ein strukturelles Shine Dalgarno - anti Shine Dalgarno Mimicry durch die IRES wird vorgeschlagen. Zusätzlich konnte in dieser Studie zum ersten Mal eine Kryo-EM Dichtekarte des Säugetier 80S Ribosoms im Komplex mit der verwandten CSFV IRES bei einer Auflösung von 10 Å präsentiert werden. Der Vergleich mit den HCV IRES-Komplexen unterstreicht die hohe strukturelle Konservierung dieser mRNA Signalstrukturen.

Summary

Proteinbiosynthesis (translation) is a complex process, necessary for gene expression in all living cells. Translation involves four sequential phases, namely initiation, elongation, termination and ribosome recycling. As the first step of translation initiation is the phase which is most frequently subjected to specific regulation mechanisms. The standard mechanism in eucaryotes, canonical initiation, is a very complex pathway including a plethora of regulatory factors (initiation factors, eIFs). In addition recruitment, positioning and activation of the translation machinery needs the 5'-terminal cap structure of the mRNA and an ATP-dependent scanning mechanism. However, an alternative way of translation initiation exists, called internal initiation. Some mRNAs are able to bypass cap binding, scanning and the necessity of some or even all eIFs by special structured sequences in their 5'-UTR, the internal ribosomal entry sites (IRESs). While cellular IRES containing mRNAs often code for important regulatory proteins, IRES elements of viruses are efficient tools to hijack the translational apparatus of their host cells. They are still functional, even if canonical translation initiation is impaired. The IRES element of the Hepatitis C Virus (HCV) and related viruses from the *Flaviviridae* family, such as the Classical Swine Fever Virus (CSFV), adopts a functionally important tertiary structure, that actively manipulates the eucaryotic ribosome.

In this study we make use of the finding that in the presence of elevated Mg²⁺ and Ca²⁺ concentrations the HCV IRES allows total initiation factor-independent translation. This allows us to reconstitute and isolate eIF-free stable 80S • IRES complexes *in vitro*, suitable for cryo-EM. The cryo-EM map of a mammalian 80S ribosome in complex with the HCV IRES at significantly improved resolution of 7,8 Å is presented, enabling us for the first time to present a complete molecular tertiary structure model of the HCV IRES in its ribosome bound form. This model reveals a complex tertiary fold of the IRES RNA and molecular details of its interaction with the ribosome. The proteins rpS1e, rpS5e, rpS14e, rpS25, rpS26e, rpS27, rpS28e as well as Helices h23 and h26 of the 18S rRNA could be clearly identified as interaction partners in the head and platform region of the ribosomal 40S subunit. A structural Shine Dalgarno - anti Shine Dalgarno mimicry by the IRES is proposed. Aditionally, for the first time a cryo-EM map of a mammalian 80S ribosome in complex with the related CSFV IRES at a resolution of 10 Å is presented. Comparison with the HCV IRES complexes unterlines the high stuctural conservation of these mRNA signal structures.

Abkürzungen

70S prokaryotisches Ribosom (Sedimentationskoeffizient S = 70) 30S kleine prokaryotische ribosomale Untereinheit (S = 30) 50S große prokaryotische ribosomale Untereinheit (S = 50) eukaryotisches Ribosom (Sedimentationskoeffizient S = 80) 80S 40S kleine eukaryotische ribosomale Untereinheit (S = 40) 60S große eukaryotische ribosomale Untereinheit (S = 60) ATP Adenosin-5'-Triphosphat **BSA** bovine serum albumin (Rinderserumalbumin) CTP Cytosin-5'-Triphosphat dATP 2'-Desoxy-Adenosin-Triphosphat **dCTP** 2'-Desoxy-Cytosin-Triphosphat dGTP 2'-Desoxy-Guanosin-Triphosphat DNA Desoxyribonukleinsäure **DNase** Desoxyribonuklease dNTP 2'-Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphat dsDNA doppelsträngige DNA dTTP 2'-Desoxy-Thymidin-Triphosphat dUTP 2'-Desoxy-Uracyl-Triphosphat E. coli Escherichia coli EF prokaryotischer Elongationsfaktor eEF eukaryotischer Elongationsfaktor eIF eukaryotischer Initiationsfaktor eukaryotischer Terminationsfaktor eRF fMet-tRNA_f prokaryotische Formyl-Methionyl Initiator-tRNA **GEF** Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (engl.: *guanine nucleotide exchange factor*) **GTP** Guanosin-5'-Triphosphat **HP IRES** Hepaci- und Pestivirus IRES IF prokaryotischer Initiationsfaktor **IGR** integenische Region (einer mRNA) **IRES** interne Ribosomen Eintrittsstelle (engl.: internal ribosomal entry site) **ITAFs** IRES *trans*-aktive Faktoren

Met-tRNA_i Met eukaryotische Methionin-spezifische Initiator-tRNA

mRNA Boten-RNA

NKGE Native Polyacrylamid-Agarose-Kompositgel Elektrophorese

NTP Nukleosid-5'-Triphosphat

nt(s) Nukleotid(e)

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR Polymerase Kettenreaktion

POST Posttranslokationaler Zustand des Ribosomens
PRE Prätranslokationaler Zustand des Ribosomens

PTF Peptidyltransferase

PTC Peptidyltransferasezentrum

RNA Ribonukleinsäure

RNase Ribonuklease

RNP(s) Ribonukleoprotein-Partikel

rRNA ribosomale RNA

RF prokaryotischer Terminationsfaktor

RRL Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (engl.: rabbit reticulocyte lysate)

RRF prokaryotischer Ribosomen-Recycling Faktor

ssDNA einzelsträngige DNA ssRNA einzelsträngige RNA

tRNA Transfer-RNA

UTP Uridin-5'-Triphosphat

UTR nichttranslatierte Region auf einer mRNA (engl.: *untranslated region*)

Chemikalien

Amp Ampicillin

APS Ammoniumperoxodisulfat

BPB Bromphenolblau

DTT Dithiothreitol

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EtOH Ethanol

FTS Fluorescein-5-thiosemicarbazid

HCl Salzsäure

HEPES N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)

IPTG Isopropyl-thio-\(\beta\)-Galaktosidose

MeOH Methanol

MQ salzfreies, steriles, RNase freies Wasser (MilliQ Aufbereitungsanlage)

NaAc Natriumacetat
PAA Polyacrylamid

PM Puromycin

SDS Natriumdodecylsulfat

TCA Trichloressigsäure

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

XC Xylencyanol

LN₂ Flüssig-Stickstoff

Einheiten, Sonstiges

2D zweidimensional3D dreidimensional

Å Ångström – Längeneinheit, entspricht 0,1 nm bzw. 10^{-10} m

A Extinktion einer Substanzmenge in einem Lösungsvolumen von 1 ml und einer

Küvettenschichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von $\lambda = x$ nm

CrPV Cricket Paralysis Virus; Positivstrang ssRNA-Virus des Genus Cripavirus,

Familie *Dicistroviridae* (Picornavirus-ähnlicher Insektenvirus)

CSFV Classical Swine Fever Virus; Positivstrang ssRNA-Virus des Genus Pestivirus,

Familie Flaviviridae - Erreger der klassischen (europäischen) Schweinepest bei

Schweinen und Wiederkäuern

CTF (Phasen-)Kontrasttransferfunktion

Da Dalton – atomare Masseneinheit, entspricht 1/12 der Masse des Kohlenstoff-

Isotops ¹²C

EM Elektronenmikroskopie

f.c. Endkonzentration

FSC fourier shell correlation

x g Erdbeschleunigung [9,81 m/s]

h Stunde

HCV Hepatitis C Virus; Positivstrang ssRNA-Virus des Genus *Hepacivirus*, Familie

Flaviviridae

HFE Verstärkung hoher Ortsfrequenzen (engl.: high frequency enhancement)

kb(p) Kilobasen(paare)

Kryo-EM Kryo-Elektronenmikroskopie

min Minute n Anzahl

NMR Kernmagnetische Resonanz- / Kernspinresonanz- (Spektroskopie)

PTV Porcine Teschovirus; Positivstrang ssRNA-Virus des Genus Teschovirus,

Familie Picornaviridae - Erreger der Ansteckenden Schweinelähmung bei

Haus- und Wildschweinen

PDB Proteindatenbank

rpm Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)

RSR Ratschen-ähnliche Verdrehung der ribosomalen Untereinheiten gegeneinander

(engl.: ratchet-like subunit rotation)

RT Raumtemperatur

S Svedbergeinheit für den Sedimentationskoeffizient (1 S = 10^{-13} s)

s Sekunde

SPV Simian Picornavirus; Positivstrang ssRNA-Virus vermutlich des Genus

Enterovirus, Familie Picornaviridae

TIFF tagged image file format

TEM Transmissionselektronenmikroskop

TH Oberflächenkonturniveau bei der Darstellung von Elektronendichtekarten

(engl.: threshold level)

u unit - Einheit der Enzymaktivität; 1 u ist definiert ist als diejenige Menge

Enzym, welche unter angegebenen Bedingungen ein Mikromol Substrat pro

Minute umsetzt: 1 u = 1 μ mol/min

ÜN über Nacht, d.h. länger als 10 Stunden

v/v Konzentrationsangabe in ml pro 100 ml Lösungsmittel

Vol Volumen oder Volumina

w/v Konzentrationsangabe in g pro 100 ml Lösungsmittel

Weiterhin wurden allgemein übliche Abkürzungen verwendet.

1 Einleitung

1.1 Das Ribosom

Das Ribosom ist eine der größten und komplexesten heutzutage bekannten makromolekularen Maschinen. Es vollzieht die Translation des Genoms, konvertiert also, über die Zwischenstufe der Boten-RNA (mRNA), die genetische Information in eine neu synthetisierte Peptidkette. Alle Ribosomen, ob eukaryotischer oder prokaryotischer Herkunft, bestehen aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Diese setzen sich aus verschiedenen ribosomalen Proteinen und den ribosomalen RNAs (rRNAs) zusammen. Während die rRNAs in ihrer Tertiärstruktur den Kern der Ribosomen bilden, sind die ribosomalen Proteine an der Peripherie lokalisiert und dienen hauptsächlich der Stabilisation der rRNA-Faltung.

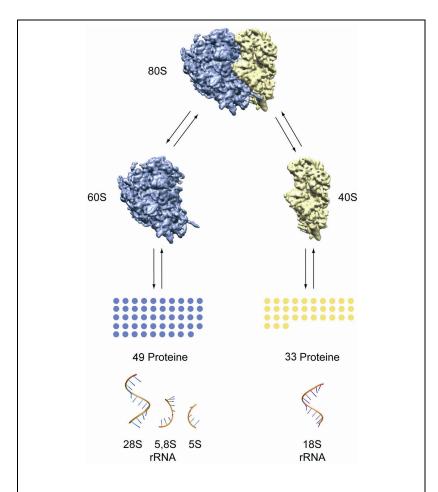


Abbildung 1.1 Kryoelektronenmikroskopische Darstellung eines 80S Ribosoms (Kaninchen) und seiner Untereinheiten, sowie schematische Darstellung der Protein- und rRNA-Bausteine der Untereinheiten.

Obwohl die Ribosomen von Organismen der drei Domänen des Lebens (Eukaryota, Bacteria und Archaea) strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten erkennen lassen, variieren sie in ihrer Größe und der Anzahl der Bausteine [10; 40; 147; 177].

Das Ribosom des Eubakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein Ribonukleoproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 2,7 MDa, bestehend aus drei verschiedenen rRNAs und 54 Proteinen. Es zeigt einen relativen Sedimentationskoeffizienten von 70S, die Untereinheiten werden entsprechend als 50S (große Untereinheit) und 30S (kleine Untereinheit) bezeichnet. Die große Untereinheit setzt sich aus zwei rRNAs (23S und 5S) sowie 33 Proteinen zusammen, die kleine Untereinheit besteht aus der 16S rRNA und 21 Proteinen. Zytosolische Ribosomen höherer Eukaryoten sind dagegen größer (ca. 4,2 MDa) - sie werden als 80S Ribosomen bezeichnet. Die Abbildung 1.1 zeigt schematisch den Aufbau des eukaryotischen Ribosoms. Die große 60S Untereinheit (2,8 MDa) besteht bei Mammaliern aus 49 Proteinen und drei rRNAs (28S, 5,8S und 5S); die kleine 40S Untereinheit (1,4 MDa) setzt sich aus einer rRNA (18S) und 33 Proteinen zusammen [185].

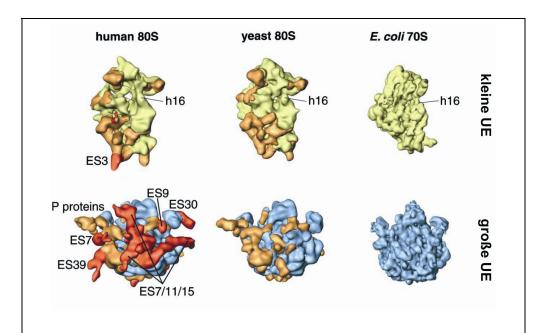


Abbildung 1.2 Vergleich der Architektur von Ribosomen des Menschen, aus Hefe und E. coli. Nach [177]. Der evolutionär konservierte Kern der kleinen 30S bzw. 40S Untereinheit ist in Gelb dargestellt, der Kern der großen 50S bzw. 60S Untereinheit in blau. Zusätzliche Protein- und RNA-Dichten in Hefe und humanen cytosolischen 80S Ribosomen sind orange; Dichten, welche nur in humanen 80S Ribosomen zu finden sind, wurden rot eingefärbt. Die Positionen einiger Expansionssegmente der 18S bzw. 25/28S rRNA wurden ebenfalls markiert.

Etwa ein Drittel der ribosomalen Proteine in Eukaryoten hat bakterielle Gegenstücke, ein weiteres Drittel weist Homologien zu ribosomalen Proteinen der Archaea auf. Das verbleibende Drittel ribosomaler Proteine ist spezifisch für Eukaryoten, ebenso wie einige Nund C-terminale Teile der evolutionär konservierten Proteine (Abbildung 1.2 und Abbildung 1.3 B, C). Die rRNA der 80S Ribosomen weist außerdem sogenannte Expansionssegmente (ES) auf - Verlängerungen, welche in den evolutionär konservierten rRNA Kern eingefügt sind [10; 145]. Die präzisen funktionellen Rollen der Eukaryoten-spezifischen Komponenten sind jedoch bisher größtenteils unbekannt. Die größere Komplexität eukaryotischer zytosolischer Ribosomen spiegelt sich nicht nur in der großen Anzahl an Proteinen wider, die mit ihm interagieren, sondern auch in der Vielfalt zellulärer Prozesse, in denen Ribosomen oder ihre Untereinheiten Hauptrollen spielen. Einige Beispiele hierfür sind verschiedenste Eukaryoten-spezifische Mechanismen der Translationskontrolle, z.B. "nonsense"-vermittelter mRNA-Abbau oder der sogenannten "unfolded protein response". Durch Kristallstrukturen [10; 145; 168], sowie kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen [5; 6; 10; 25; 145; 148; 164; 168; 178; 185], lassen sich dem Ribosom weitere molekulare Details der Proteinbiosynthese entnehmen. Das Ribosom hat drei verschiedene tRNA Bindungsstellen: A-Stelle, P-Stelle und E-Stelle [196]. Die Bindungsstellen der tRNAs werden gemeinsam von beiden Untereinheiten des Ribosoms gebildet (siehe Abbildung 1.3 A). Die A-Stelle ist die Bindungsstelle für die Aminoacyl-tRNA, die P-Stelle ist die Bindungsstelle der PeptidyltRNA und die E-Stelle ist die Bindungsstelle für Deacyl-tRNA. Alle tRNAs, mit Ausnahme der Initiator-tRNA, die in die P-Stelle des Ribosoms eintritt, durchwandern das Ribosom im Zuge von zwei Elongationszyklen in der Folge A → P → E. Dabei verbleiben sie stetig über Kodon-Antikodon Wechselwirkungen gebunden. Der Dekodierungsprozess, die Auswahl zwischen kognater, nah-kognater und nicht kognater Aminoacyl-tRNA, findet in der ribosomalen A-Stelle statt. Das Zentrum der Dekodierung ist auf der kleinen Untereinheit lokalisiert, wobei die Positionen A1492, A1493 und G530 der 16S rRNA von E. coli [22; 116; 146; 202] bzw. A1818, A1819 und C1696 der 18S rRNA bei Säugetieren [19; 36; 58] die ersten beiden Positionen der Kodon-Antikodon-Wechselwirkung überprüfen. Das Zentrum der Peptidylübertragungsreaktion, das katalytisch aktive Zentrum, ist innerhalb der großen Untereinheit in der 23S rRNA bzw. 28S rRNA zu finden (siehe Abbildung 1.3A) - das Ribosom ist ein Ribozym. Weitere funktionelle Zentren des Ribosoms sind der mRNA-Einund Austrittskanal, der auf der kleinen Untereinheit lokalisiert ist, ebenso der Peptidtunnel, der beginnend am Peptidyltransferasezentrum die große Untereinheit durchzieht und durch den die naszierende Polypeptidkette das Ribosom verlässt.

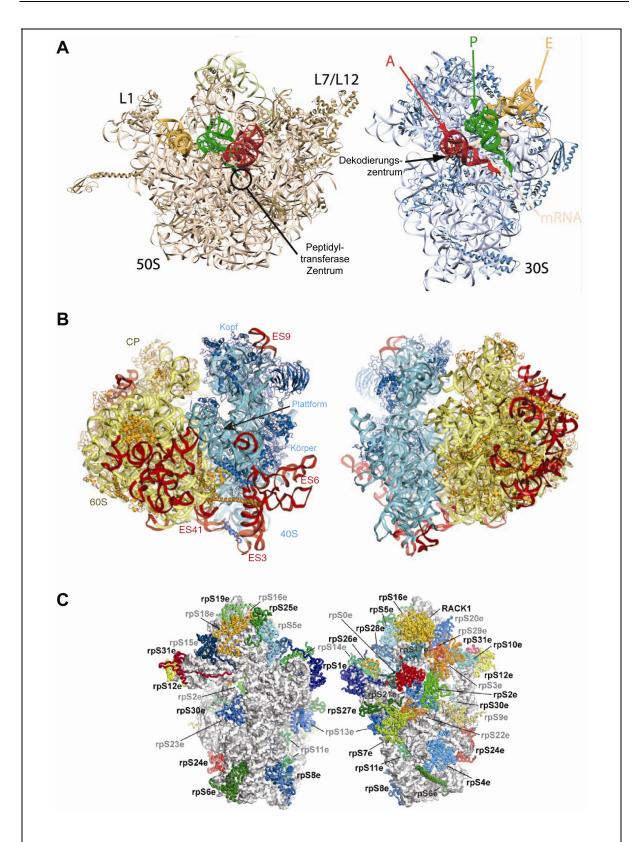
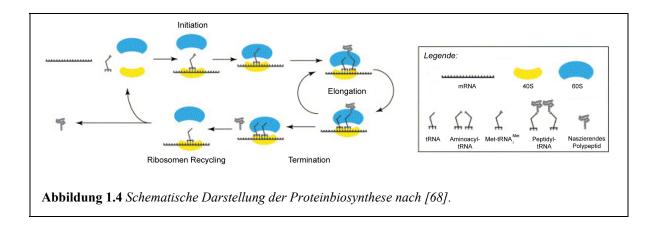


Abbildung 1.3 Röntgenkristallstrukturen des Ribosoms. (A) 50S und 30S Untereinheiten aus Thermus thermophilus mit wichtigen funktionellen Orten des Ribosoms [146]. (B) 80S Ribosom von Saccharomyces cerevisiae [10] (C) 40S Untereinheit aus Tetrahymena thermophila [145]; links: Blick auf die der 60S-Untereinheit zugewandten Seite, rechts: Blick auf die zytosolische Seite. Die rRNA ist hier in der Oberflächendarstellung abgebildet (grau), die Proteine sind farbig markiert.

1.2 Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese ist ein zyklischer Prozess und kann in vier funktionelle Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation, Termination und Recycling (siehe Abbildung 1.4). Als Translationsinitiation wird der Prozess bezeichnet, welcher zur Bildung elongationskompetenter 70S bzw. 80S Ribosomen führt. Die ribosomalen Untereinheiten werden an die mRNA angelagert und es wird durch Bindung einer Initiator-tRNA ein Startpunkt für die Polypeptidsynthese gesetzt. Das Ribosom ist jetzt für die Proteinsynthese programmiert. In der Elongationsphase erfolgt die schrittweise Übersetzung der Ribonukleinsäuresequenz der mRNA in die Proteinsequenz. Dieser Prozess läuft in Zyklen ab, wobei die entstehende Peptidkette in jedem Zyklus um eine Aminosäure verlängert wird und das Ribosom um eine Position an der mRNA weiter wandert. Die Proteinbiosynthese wird beendet, sobald das Ribosom ein Stoppsignal auf der mRNA erreicht. In dieser Terminationsphase wird die fertige Polypeptidkette vom Ribosom abgespalten. Eng verknüpft mit der Termination ist das Ribosomen Recycling, die vierte Phase der Translation. Hier erfolgt eine Dissoziation des Translationskomplexes in separate ribosomale Untereinheiten und freie mRNA.



Die Initiationsphase ist ein Schlüsselschritt der Proteinbiosynthese und daher komplexen Kontrollmechanismen unterworfen [73; 176]. Während die nachfolgenden Phasen sich in Pround Eukaryoten stark ähneln, bestehen in der Initiationsphase große Unterschiede und neben dem Standardmechanismus existiert in Eukaryoten zusätzlich ein alternativer Initiationsmechanismus. Die Translationsinitiation wird mit besonderem Augenmerk auf den alternativen Weg in dieser Arbeit daher genauer untersucht.

1.2.1 Elongation

Die Elongation ist ein zyklischer Prozess, an dem in Pro- und Eukaryoten drei Elongationsfaktoren (EF-Tu, EF-Ts und EF-G in Prokaryoten bzw. eEF-1α, eEF-1βγ und eEF-2 in Eukaryoten) beteiligt sind. EF-Tu bildet mit GTP und der Aminoacyl-tRNA einen ternären Komplex, der die Aminoacyl-tRNA in die freie A-Stelle des Ribosoms leitet. Nach erfolgter Dekodierung hydrolysiert EF-Tu GTP und verlässt als EF-Tu • GDP das Ribosom [4; 164; 180; 192]. Danach akkommodiert die Aminoacyl-tRNA in die A-Stelle und es findet der Peptidyltransfer von der Peptidyl-tRNA (oder der Initiator-Aminoacyl-tRNA) auf die Aminosäure der A-Stellen Aminoacyl-tRNA statt. Das Ribosom befindet sich im prätranslokationalen Zustand (PRE-Zustand), mit einer Peptidyl-tRNA in der A-Stelle und einer deacylierten tRNA in der P-Stelle. Der Peptidyltransferreaktion folgt die Translokation des mRNA • tRNA₂ Komplexes um ein Kodon unter Beteiligung von EF-G • GTP [31; 160; 161]. Die Peptidyl- und Deacyl- tRNA werden zusammen mit der gebundenen mRNA aus der Aund P-Stelle in die P- und E-Stelle transloziert, das Ribosom wird aus dem PRE-Zustand in den post-translokationalen Zustand (POST-Zustand) überführt. EF-G verlässt nach GTP-Hydrolyse das Ribosom in der GDP-Form. Beide G-Proteine (EF-Tu und EF-G) werden im Zytosol wieder zu ihrer GTP-Form regeneriert und stehen für den nächsten Elongationszyklus zur Verfügung. Die Regeneration des EF-Tu wird durch die Wirkung von EF-Ts unterstützt. Die Aktivität des EF-G sorgt für das sogenannte "ratchet-like subunit rearrangement" (RSR) [49], eine Verdrehung der kleinen Untereinheit entgegen dem Uhrzeigersinn gegen die große Untereinheit. Zusätzlich zum RSR kommt es zu einer Verdrehung der Kopfdomäne der kleinen Untereinheit [31; 148; 187]. Im hochflexiblen Ribosom erfolgt das RSR und die Verdrehung des Kopfes bis zu einem gewissen Grad auch spontan und es wechselt zwischen verschiedenen Konformationen, die miteinander im Gleichgewicht stehen [119]. Auch die tRNAs fluktuieren zwischen verschiedenen Stadien, den klassischen (A/A und P/P) und hybriden (z.B. A/P und P/E) tRNA-Bindestellen [13; 115; 148]. Der erste bzw. zweite Buchstabe indiziert die Kontaktstellen auf Ebene der kleinen bzw. großen ribosomalen Untereinheit. Auch eine Bewegung des Proteins rpL1e der großen ribosomalen Untereinheit konnte gezeigt werden. In der offenen Konformation ist dieses Protein dabei vom Spalt zwischen den beiden ribosomalen Untereinheiten weg orientiert, in der geschlossenen Konformation ist es dagegen in Richtung der E-Stelle eingeklappt und wurde in Kontakt mit der Ellbogen-Region der P/E-tRNA gefunden [1; 77]. Das Ribosom hat also die intrinsische Kapazität, reversibel verschiedene mögliche ähnlich stabile natürliche Konformationen anzunehmen. Der dynamische makromolekulare Partikel, reguliert durch Substrat, Translationsfaktoren und Umweltbedingungen, wird navigiert durch eine hochkomplexe, hierarchische und metastabile Energielandschaft [119]. Lokale Minima der freien Energie repräsentieren dabei makroskopische, mesoskopische und mikroskopische Teil-Stadien der Konformationen, abgegrenzt durch Änderungen in einem oder mehreren individuellen konformationellen Freiheitsgraden innerhalb des Partikels.

1.2.2 Termination und Ribosomen Recycling

Die Elongation schreitet solange voran, bis eines der Stoppkodons (UAA, UAG oder UGA) in die A-Stelle des Ribosoms eintritt und die Termination einleitet. Das initiierende Ereignis der Termination ist das Erkennen des Stoppkodons und die Freisetzung der Polypeptidkette. Es gibt kein tRNA-Molekül, dessen Antikodon mit einem der Stoppkodons eine Basenpaarung eingehen könnte. Die Termination der Translation wird über Proteine, sogenannte Terminationsfaktoren (engl.: release factors, RFs), vermittelt. Diese RFs können in zwei Klassen eingeteilt werden [104; 152]. Terminationsfaktoren der Klasse 1 erfüllen zwei Funktionen: (1) Erkennen (Dekodierung) der Stoppsignale und Bindung in die ribosomale A-Stelle, sowie (2) Freisetzung der Polypeptidkette. In den meisten Eubakterien gibt es zwei Terminationsfaktoren der Klasse 1, RF1 und RF2, die sich in der Dekodierungsmöglichkeit der Stoppkodone unterscheiden. RF1 erkennt UAA und UAG, während RF2 UAA und UGA dekodiert [24; 167]. Da die Polypeptidkette bei der Translokation nicht auf RF1 bzw. RF2 übertragen werden kann, wird diese dabei freigesetzt. Der eukaryotische Terminationsfaktor eRF1 (Klasse 1) ist dagegen omnipotent, er kann alle drei Terminationskodons erkennen [86]. Nach erfolgter Polypeptidfreisetzung durch hydrolytische Abspaltung der fertigen Peptidkette von der Peptidyl-tRNA wird der Terminationsfaktor der Klasse 1 durch die Wirkung eines Terminationsfaktors der Klasse 2 vom Ribosom entfernt. RF3 in Prokaryoten und eRF3 in Eukaryoten sind beides GTPasen, unterscheiden sich allerdings deutlich in ihrer Funktion im Terminationsprozess. Mit der Wirkung des RF3 beginnt der Prozess des Recyclings des eubakteriellen Ribosoms. RF3 ermöglicht die Dissoziation des RF1/RF2 vom Post-Terminationskomplex [57; 207]. Ein weiterer Terminationsfaktor der Klasse 2, Ribosomen Recycling Faktor (RRF), und EF-G sind an diesem Prozess beteiligt [65-67]. Nach Entfernung des Terminationsfaktors der Klasse 1 durch RF3 müssen die mRNA und die tRNAs freigesetzt werden. Außerdem muss das Ribosom in seine Untereinheiten dissoziieren, um für eine erneute Initiation der Proteinbiosynthese zur Verfügung zu stehen. Die Bindung des Initiationsfaktors IF3 an die 30S Untereinheit, welche immer noch mit mRNA und tRNA besetzt ist, fördert die Dissoziation der tRNA und destabilisiert die mRNA-Bindung. Die anschließende Dissoziation der mRNA bzw. der Austausch mit einer neuen mRNA erfolgt dann spontan [80; 131].

In Eukaryoten verknüpft die GTPase-Aktivität des Terminationsfaktors Klasse 2 (eRF3) die Erkennung des Stoppkodons und die eRF1-vermittelte Hydrolyse der Peptidyl-tRNA, um eine schnelle und effiziente Entlassung der Peptidkette sicherzustellen [2; 157]. Eukaryoten besitzen keinen dem bakteriellen RRF vergleichbaren Ribosomen Recycling Faktor. Die Dissoziation der 80S Ribosomen in 40S und 60S Untereinheiten erfolgt hier über ein Zusammenspiel der eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF3, eIF1, eIF1A und eIF3j [138]. Der Faktor eIF3 initiiert das Recycling und verhindert erneute Assoziation der Untereinheiten, eIF1 induziert die Ablösung der an die P-Stelle der 40S Untereinheit gebundenen tRNA; eIF3j ist für die Freisetzung der mRNA zuständig. ABCE1, ein wichtiges Mitglied der ABC (ATP-Bindekassette) Proteinfamilie, spielt ebenfalls eine Rolle beim Ribosomen Recycling [141]. Die genaue Funktion und Reihenfolge, in der diese und vielleicht andere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sind, ist bislang unbekannt.

1.2.3 Die Initiation der Translation

Die kanonische Translationsinitiation höherer Eukaryoten ist ein sehr komplexer Vorgang, der eine große Anzahl Initiationsfaktoren benötigt. Diese Faktoren interagieren nicht nur mit dem Ribosom, sondern auch miteinander und sind oftmals selbst aus mehreren Proteinuntereinheiten zusammengesetzt (siehe Tabelle 1.1).

Der gesamte Prozess der kanonischen Initiation wird nach Jackson et al. [73] in acht verschiedene Stadien aufgeteilt (vgl. Abbildung 1.5): Diese Stadien folgen auf das Recycling der sogenannten Post-Terminationskomplexe (post-TCs; (1)), das die separaten 40S und 60S Untereinheiten liefert. Zuerst kommt es zur Bildung des 43S Prä-Initiationskomplexes. Dieser besteht aus einer freien 40S Untereinheit, die durch elF3 stabilisiert wird, dem ternären Komplex (elF2 • GTP • Met-tRNA_i^{Met}) und den Faktoren elF1, elF1A und elF5 [7]. elF2 ist ein GTP-bindendes Protein und rekrutiert in seiner aktiven (GTP-)Form die Initiatior-tRNA. elF1 und elF1A induzieren eine Konformationsänderung in der 40S Untereinheit. Der mRNA-Eintrittskanal, genauer: die Lasche (engl.: *latch*), welche durch Interaktion von h18 und h34 geformt wird, öffnet sich und es wird eine neue Verbindung zwischen h16 und rpS3e auf der Rückseite der 40S Untereinheit hergestellt [124] (Abbildung 1.6). Als nächstes erfolgt die Anlagerung des 43S Prä-Initiationskomplexes an die mRNA. Dieser Schritt ist bei Eukaryoten abhängig von der 5'-UTR der mRNA. Da natürliche 5'-UTRs oft starke Sekundärstrukturen aufweisen, sorgen elF4F (bestehend aus elF4E, elF4A und elF4G) in Kooperation mit

elF4B/elF4H für eine Aufwindung dieser Region der mRNA. Dabei bindet elF4E an die 5′-terminale m⁷GpppG-,,Cap"-Strukutur der mRNA, elF4A übernimmt die Funktion einer ATP-abhängigen RNA-Helikase (verstärkt durch elF4B/H).

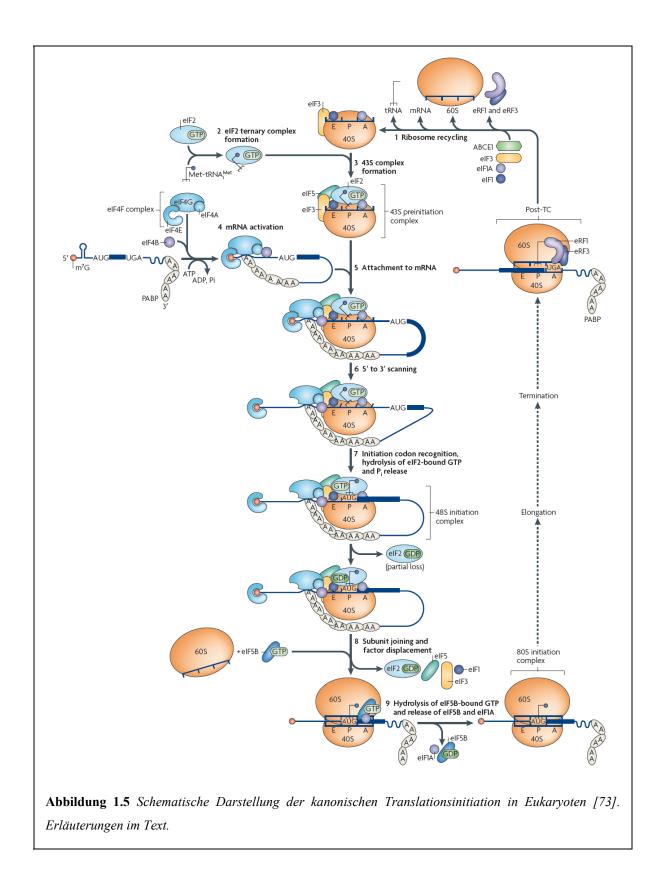
Tabelle 1.1 Eukaryotische Initiationsfaktoren. Entnommen aus [73].

Name	Number of subunits and their molecular mass (kDa)	Function
Core initiation factors		
elF2	3 (36.1, 38.4 and 51.1)	Forms an eIF2–GTP–Met-tRNA, ternary complex that binds to the 40S subunit, thus mediating ribosomal recruitment of Met-tRNA, $$
elF3	13 (800 total)	Binds 40S subunits, eIF1, eIF4G and eIF5; stimulates binding of eIF2–GTP–Met-tRNA, to 40S subunits; promotes attachment of 43S complexes to mRNA and subsequent scanning; and possesses ribosome dissociation and anti-association activities, preventing joining of 40S and 60S subunits
elF1	1 (12.7)	Ensures the fidelity of initiation codon selection; promotes ribosomal scanning; stimulates binding of eIF2–GTP–Met-tRNA, to 40S subunits; and prevents premature eIF5-induced hydrolysis of eIF2-bound GTP and $\rm P_i$ release
elF1A	1 (16.5)	Stimulates binding of eIF2-GTP-Met-tRNA, to 40S subunits and cooperates with eIF1 in promoting ribosomal scanning and initiation codon selection
elF4E	1 (24.5)	Binds to the m ⁷ GpppG 5' terminal 'cap' structure of mRNA
elF4A*	1 (46.1)	DEAD-box ATPase and ATP-dependent RNA helicase
elF4G [‡]	1 (175.5)	Binds eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP, SLIP1 and mRNA (see FIG. 3a) and enhances the helicase activity of eIF4A
elF4F	3 (246.1 total)	A cap-binding complex, comprising eIF4E, eIF4A and eIF4G; unwinds the 5' proximal region of mRNA and mediates the attachment of 43S complexes to it; and assists ribosomal complexes during scanning
elF4B	1 (69.3)	An RNA-binding protein that enhances the helicase activity of eIF4A
elF4H	1 (27.4)	An RNA-binding protein that enhances the helicase activity of eIF4A and is homologous to a fragment of eIF4B $$
elF5	1 (49.2)	A GTPase-activating protein, specific for GTP-bound eIF2, that induces hydrolysis of eIF2-bound GTP on recognition of the initiation codon
elF5B	1 (138.9)	A ribosome-dependent GTPase that mediates ribosomal subunit joining
elF2B	5 (33.7, 39.0, 50.2, 59.7 and 80.3)	A guanosine nucleotide exchange factor that promotes GDP–GTP exchange on $\mbox{elF2}$
Auxiliary factors		
DHX29	1 (155.3)	A DExH box-containing protein that binds 40S subunit and promotes ribosomal scanning on mRNAs with long, highly structured 5′ UTRs
Ded1	1 (65.6)	A DEAD box-containing NTPase and RNA helicase that potentially promotes scanning in Saccharomyces cerevisiae
elF6	1 (26.6)	An anti-association factor that binds 60S subunits and prevents them from joining to 40S subunits
p97	1 (102.4)	Closely related to the carboxy-terminal two-thirds of elF4G; binds elF4A and elF3; and promotes initiation in a potentially mRNA-specific manner
PABP	1 (70.7)	Binds to the 3' poly(A) tail of mRNA, eIF4G and eRF3; enhances binding of eIF4F to the cap; and might facilitate recruitment of recycled post-termination 40S subunits back to the 5' end of mRNA
		CLASS CON DARRO LANGE DE LA CONTRACTOR D

Ded1, DEAD box helicase 1; DHX29, DExH box protein 29; elF, eukaryotic initiation factor; PABP, poly(A)-binding protein. *Two paralogues (elF4Al and elF4All), encoded by different genes, are functionally indistinguishable, but elF4All has no activity as an elF. *Two paralogues (elF4Gl and elF4Gll), encoded by different genes, are functionally similar but show some selectivity towards different mRNAs. elF4Gl is generally the more abundant.

elF4G dient als eine Art Gerüst-Protein, welches nicht nur elF4E und elF4A bindet, sondern auch elF3 und PABP (Poly (A)-bindendes Protein). Das PABP bindet, wie der Name bereits verrät, an den 3'-terminalen Poly(A)-Schwanz der mRNA. Die Komplexierung von elF4G, PABP und mRNA resultiert daher in einer Zirkularisierung der mRNA [183]. Nach Anheftung des 43S Prä-Initiationskomplexes migriert dieser in 5'→3'-Richtung an der RNA

entlang bis zum ersten AUG-Startkodon. Dieser Vorgang, auch als "Scanning" bezeichnet, beinhaltet zwei verknüpfte Prozesse: das Aufwinden von Sekundärstrukturen und die Bewegung entlang der mRNA [133].



Der gesamte Vorgang ist ATP-abhängig und benötigt die Initiationsfaktoren elF1, elF1A (bzw. die durch sie induzierte "offene" "Scanning"-kompetente 40S Konformation), elF2, den elF4-Faktorkomplex und vermutlich auch elF3. Genaue Details über den Ablauf des "Scannings" sind jedoch bis heute weitgehend unbekannt. Zudem wurde auch die Notwendigkeit zusätzlicher Proteine (p97, DHX29, Ded1, DDX3) beschrieben [72; 73; 143; 182].

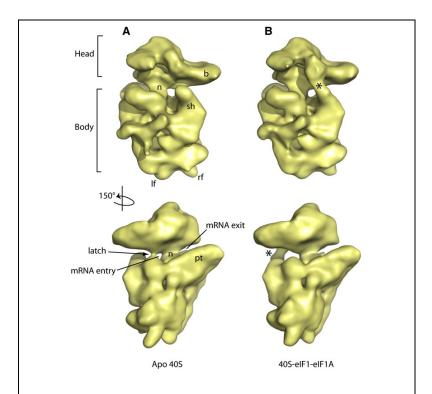


Abbildung 1.6 Struktur des Hefe 40S Prä-Initiationskomplexes. Merkmale der kleinen ribosomalen Untereinheit sind anhand der leeren 40S Untereinheit (Apo 40S) dargestellt (A). head = Kopfdomäne; body = Körperdomäne; b = Horn (beak); n = Hals (neck); sh = Schulter (shoulder); pt = Plattform; lf = linker Fuß; rf = rechter Fuß; latch = Lasche. Die Verbindung zwischen Kopf und Schulter, ausgelöst durch die Bindung von eIF1 und eIF1A ist durch einen Stern markiert (B). Entnommen aus [124].

Nach Auffinden des AUG-Startkodons kommt es zur Etablierung einer stabilen Kodon-Antikodon Basenpaarung zwischen der Initiator-tRNA und dem AUG-Startkodon der mRNA in der ribosomalen P-Stelle und somit zur Bildung des 48S Initiationskomplexes. Die Basenpaarung der Initiator-tRNA mit dem AUG löst nun eine weitere Konformationsänderung der 40S Untereinheit aus ("geschlossene" Konformation [109]) und

führt zur Ablösung von elF1. Außerdem kommt es nun zur elF5-vermittelten Hydrolyse des an elF2 gebundenen GTP [125; 134]. GTP-Hydrolyse führt zu einem Affinitätsverlust des elF2 zur Initiator-tRNA und somit zu einer teilweisen Dissoziation von elF2 • GDP vom 48S Initiationskomplex. Im letzten Schritt der Translationsinitiation kommt es zur Anlagerung der 60S UE und zur elF5B-vermittelten Dissoziation der restlichen Initiationsfaktoren nach GTP-Hydrolyse [134]. elF2 • GDP wird durch den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) elF2B wieder zu elF2 • GTP; elF5B • GDP erreicht den GTP-Zustand ohne die Hilfe eines GEF.

Die prokaryotische Initiation verläuft dagegen weniger komplex, insgesamt sind nur drei Initiationsfaktoren beteiligt. Die mRNA wird an die 30S Untereinheit gebunden und das Startkodon AUG wird über die *Shine-Dalgarno*-Wechselwirkung der mRNA mit der 16S rRNA positioniert. Die Initiator-Aminoacyl-tRNA (fMet-tRNA_f^{Met}) wird ausgewählt und bindet an das Startkodon. Die große 50S Untereinheit bindet an den 30S Initiationskomplex und die Initiator-Aminoacyl-tRNA besetzt die P-Stelle. Der Initiatorkomplex ist gebildet und das Leseraster gewählt. Die Aminoacyl-tRNA-Stelle (A-Stelle) des Ribosoms ist frei, ebenso die E-Stelle. Dieser Prozess wird durch die Initiationsfaktoren (IF) gesteuert: IF1 welcher der tRNA Antikodon Haarnadelstruktur ähnelt, bindet in die ribosomale A-Stelle und verhindert die vorzeitige Zusammenlagerung der großen und kleinen Untereinheit [23; 33]. IF2 ist ein G-Protein und sorgt zusammen mit IF3 für die spezifische Bindung der fMet-tRNA_f^{Met} in die P-Stelle [102; 111].

Das Ribosom liegt am Ende der Initiationsphase in beiden Fällen als Initiationskomplex vor und ist bereit für den Übergang in die Elongationsphase. Die exakte Rolle der Initiationsfaktoren in Pro- und Eukaryoten und der chronologische Ablauf der Initiation ist immer noch nicht vollständig geklärt [59; 73; 152; 174; 176].

1.2.3.1 Regulation der Translationsinitiation in Eukaryoten

Die Regulation der Genexpression einer Zelle erfolgt auf verschiedenen Stufen, einschließlich der Proteinbiosynthese. Verglichen mit Mechanismen zur Kontrolle der Transkription erlaubt die Translationskontrolle bereits existierender mRNAs weitaus schnellere Änderungen in den zellulären Konzentrationen der kodierten Proteine. Als erster Schritt der Translation ist die Initiation die Phase, die am häufigsten Kontrollmechanismen unterworfen ist [73; 176]. Die Initiations-Regulation kann dabei in zwei Kategorien eigeteilt werden: (1) Mechanismen, welche die Initiationsfaktoren bzw. das Ribosom und somit nahezu alle "Scanning"-abhängigen Initiationsereignisse in Eukaryoten beeinflussen und (2) Regulation auf Ebene der

mRNA, entweder durch sequenzspezifische RNA-bindende Proteine oder über Mikro-RNAs (miRNAs). Der überwiegende Teil betrifft das Stadium, an dem das AUG-Startkodon identifiziert wird und eine Dekodierung durch eine spezielle Initiator-tRNA stattfindet. Die Regulation kann dabei über eine Modulation der Aktivität der Initiationsfaktoren erfolgen oder über eine verbesserte oder verminderte Zugänglichkeit der mRNA in ihrer 5'-UTR.

1.2.3.2 Alternativer Weg der Translationsinitiation

Einige mRNAs können "Cap"-Bindung, ATP-abhängiges "Scanning" und die Notwendigkeit zumindest eines kleinen Teils der eIFs durch spezielle strukturierte Sequenzen in ihrer 5'-UTR, sogenannte interne Ribosomen Eintrittsstellen (IRESs), umgehen. Diese Sequenzen rekrutieren den Prä-Initiationskomplex ähnlich der Shine Dalgarno - anti Shine Dalgarno Interaktion in Bakterien, funktionieren aber meist viel komplizierter. Die Verwendung von IRES Elementen ist häufig bei viralen mRNAs anzutreffen [44; 159] und wurde zuerst bei Picornaviren entdeckt [74; 128]. Aber auch eine wachsende Anzahl zellulärer mRNAs mit IRES-Elementen wurde gefunden [45; 64; 91]. Tabelle 1.2 zeigt beispielhaft einige dieser Gene mit IRES Elementen:

Tabelle 1.2 Bespiele für Gene mit IRES Elementen.

Positivstrang ssRNA Viren	Picornaviridae	Humanes Poliovirus 1, Hepatitis A Virus, Virus der Maul und Klauenseuche, Encephalomyocarditis Virus (EMCV), Simian Picornavirus Typ 9 (SPV9), Porcines Teschovirus Typ 1 (PTV-1)
	Flaviviridae	Hepatitis C Virus (HCV), Virus der klassischen Schweinepest (CSFV)
Revers transkribierende RNA Viren	Retroviridae	gag RNA des HIV 1, Rous Sarcoma Virus
dsDNA Viren	Herpesviridae	Karposi's Sarcom-assoziiertes Herpesvirus
Zelluläre RNAs	Mammalier	c-myc, N-myc, c-jun, La Autoantigen
	Pflanzen	Mais HSP101, Arabidopsis RPS18C

Während zelluläre IRES-enthaltende mRNAs oft für wichtige regulatorische Proteine (wie Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder Apoptose-Proteine) kodieren, stellen diese

IRES-Elemente für Viren effiziente Werkzeuge zur Übernahme des Translationsapparates ihrer Wirtszellen dar. Sie funktionieren selbst dann noch, wenn die kanonische Translationsinitiation beeinträchtigt ist, z.B. während der Mitose, der Apoptose, aufgrund von Stress-Reaktionen oder der Immunantwort auf virale Infektionen. Diese *interne Initiation* benötigt, je nach Art der IRES, nur einen Teil der kanonischen Initiationsfaktoren (siehe Abbildung 1.7) und kann durch spezielle *trans*-aktive Faktoren (engl.: *IRES trans acting factors*, ITAFs) zusätzlich moduliert werden [64; 123].

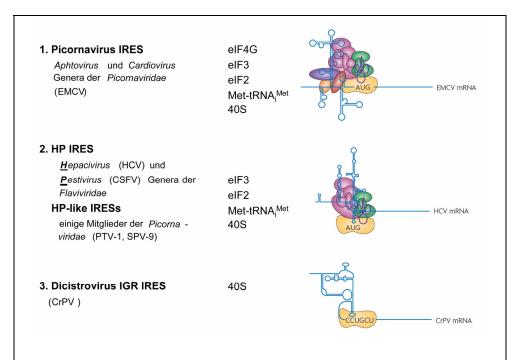


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung der drei IRES-Typen am Beispiel viraler IRESs. Die für die Bildung eines funktionellen 48S Prä-Initiationskomplexes benötigten Faktoren sind aufgelistet und grafisch dargestellt. Modifiziert nach [53].

1.2.3.3 Die HCV IRES

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört zum Genus der *Hepaciviren* der Familie der *Flaviviridae*. HCV ist eine der Hauptursachen von Leberkrankheiten. HCV-Infektionen sind pandemisch. Laut einer Schätzung der Weltgesundheits-Organisation (WHO) sind ungefähr 3% der Weltbevölkerung mit HCV infiziert. Mehr als 170 Million Menschen sind chronische Träger dieses Virus und auf lange Sicht von Leberzirrhose und/oder Leberkrebs bedroht.

Einleitung

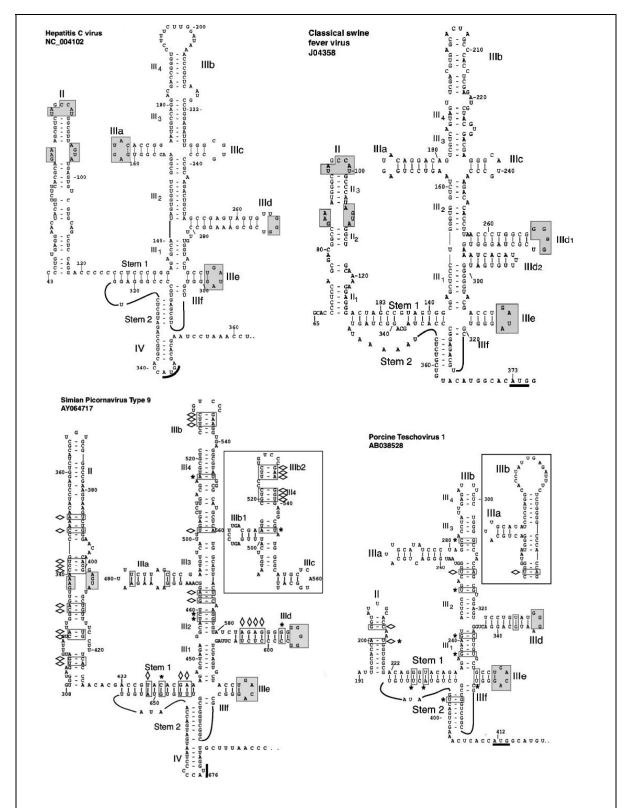
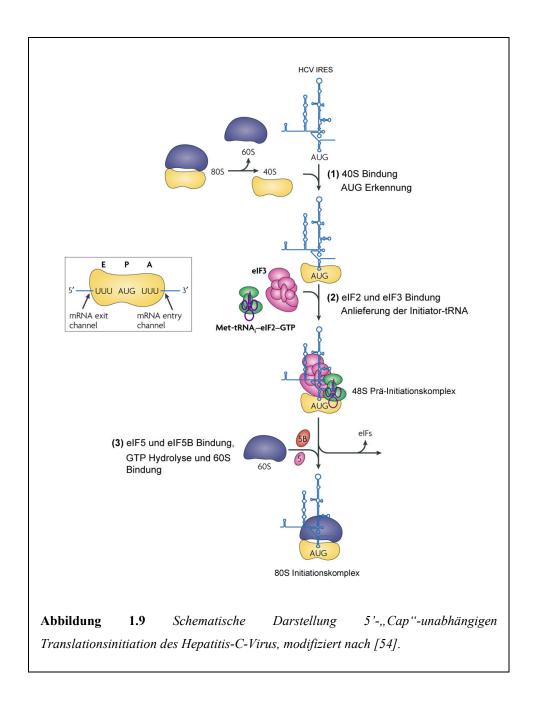


Abbildung 1.8 Sekundärstrukturdiagramme von HP und HP-ähnlichen IRES-Elementen [63]. Domäne I ist nicht abgebildet.

Wie auch die nahe verwandten Pestiviren, z.B das Virus der klassischen Schweinepest (CSFV), das wirtschaftlich bedeutsame Infektionskrankheiten beim Schwein und bei Wiederkäuern hervorruft, so trägt auch das Hepatitis C Virus eine hoch strukturierte IRES-Sequenz in der 5'-UTR seines linearen, einzelsträngigen Positivstrang RNA-Genoms [46, 47] 135; 149; 150]. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Struktur und Funktion werden die IRES-Strukturen der Hepaci- und Pestiviren auch als HP IRES bezeichnet [63]. Die HCV IRES umfasst nahezu die gesamte 5'-UTR des Virusgenoms (~nt 40 bis 372) und wird in die Domänen II, III und IV unterteilt [18; 83; 105]. Die ersten 40 Nukleotide (Domäne I) sind für die IRES Funktion nicht essentiell [70; 149]. Domäne III besteht aus mehreren funktionellen Subdomänen: einer 4-Wege-Kreuzung (IIIabc), dem IIIef-Stem1-Stem2 Pseudoknoten und den Haarnadelstrukturen IIId und IIIb (Abbildung 1.8, links oben). HP IRES-Strukturen kommen nicht nur in den beiden Genera der Flaviviridae vor. Eine HP-ähnliche IRES wurde auch bei einigen Mitgliedern der Picornaviridae gefunden (Abbildung 1.8), was darauf schließen lässt, dass zwischen diesen Virusfamilien ein Austausch jener Elemente durch Rekombination stattgefunden hat [34; 63; 137; 140]. Trotz genereller struktureller Übereinstimmungen unterscheiden sich diese IRES Elemente doch in einigen Regionen (Abbildung 1.8).

Der generelle Mechanismus der Translationsinitiation scheint in allen HP IRES jedoch ähnlich zu verlaufen (Abbildung 1.9). Der erste Schritt in der Translationsinitiation der HP IRES ist eine hoch affine, direkte Bindung an die 40S Untereinheit [82; 121], resultierend in einer Konformationsänderung der 40S Untereinheit in den "offenen" Zustand (Abbildung 1.10 A-C), ausgelöst durch die IRES Domäne II [178]. Für die Bindung an die 40S Untereinheit ist vor allem Domäne III zusammen mit Domäne IV essentiell, allerdings ohne Subdomäne IIIb [105]. Das AUG-Startkodon in Domäne IV wird dabei durch den IIIef-Stem1-Stem2 Pseudoknoten und Domäne II direkt in der ribosomalen P-Stelle platziert und die kodierende mRNA-Region ist im mRNA-bindenden Kanal der 40S Untereinheit fixiert [11; 135]. Die HCV IRES benötigt zur Bildung eines funktionellen 48S Komplexes weder ein 5'-,,Cap", noch das ATP-abhängige ,,Scanning". Es wird nur ein kleiner Teil der kanonischen Initiationsfaktoren, elF2 • GTP im Komplex mit der Initiator tRNA Met-tRNA_i met und eIF3, benötigt [64; 135; 156]. eIF3 interagiert dabei nicht nur mit der 40S Untereinheit, sondern auch mit den IRES Domänen IIIa und IIIb [105; 175]. Die Bildung eines 80S Initiationskomplexes entspricht dann wieder der kanonischen Initiation und benötigt eIF5 und eIF5B • GTP zur Anlagerung der 60S Untereinheiten [75; 100; 121]. Allerdings wird sowohl für die HCV IRES, als auch für die CSFV IRES eIF2-unabhängige und sogar vollständig Initiationsfaktor-freie Translationsinitiation beschrieben [88; 96; 132]. Domäne II wird dabei für die Bildung der 80S Partikel eine wichtige Rolle zugeschrieben [100; 105].



Die Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die IRES Funktion abhängig ist von ihrer Tertiärstruktur [11; 83]. Kryo-EM Rekonstruktionen der letzten Jahre von sowohl 40S • HCV IRES [178], als auch 80S • HCV IRES [15] Initiationskomplexen erlauben übereinstimmend mit biochemischen Studien [75; 82; 83] eine Lokalisation der IRES und ihrer Domänen in der ans Ribosom gebundenen Form (Abbildung 1.10 und Abbildung 1.11).

Einleitung

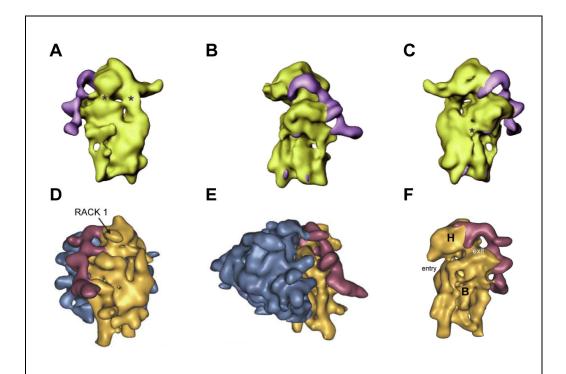


Abbildung 1.10 Kryo-EM Rekonstruktionen von Ribosom - HCV IRES Komplexen. (A-C) Die 40S Untereinheit aus Kaninchen in Komplex mit der HCV IRES RNA bei 20 Å Auflösung nach [178] (D-F) Humane 80S Ribosomen in Komplex mit der HCV IRES RNA bei 25 Å Auflösung nach [15]. Blick von der 40S-Seite (A, D), von der L1-Seite (B, E) und von der 60S-Seite (C, F); bei (F) wurde die 60S Untereinheit in silico entfernt. Die 40S Untereinheit ist jeweils in Gelb/Gold dargestellt, die 60S Untereinheit in blau und die HCV IRES in violett/pink. Einige Merkmale der kleinen ribosomalen Untereinheit sind dargestellt: H = Kopfdomäne (head); B = K"orperdom"ane (body); "exit" und "entry" markieren Ein- und Austrittsstelle des mRNA-Kanals. Konformations\"anderungen der 40S Untereinheit sind mit einem Stern markiert (vgl. Abbildung 1.6).

Sie schließt den mRNA Eintrittskanal der 40S Untereinheit und limitiert so die Bewegung der codierenden RNA innerhalb dieses Kanals [178]. Biochemische Studien zeigen, dass Kontakte der HCV IRES RNA mit dem Ribosom ausschließlich zu ribosomalen Proteinen (p40/rpS0e, rpS2e, rpS3e, rpS5e, rpS10e, rpS14e, rpS15e, rpS16e und rpS27e) zu bestehen scheinen, nicht aber zu ribosomaler RNA [8; 15; 55; 95; 120; 135]. Allerdings konnten diese Ergebnisse aufgrund der niedrigen Auflösung (20 - 25 Å) der bisherigen Kryo-EM Strukturen strukturell nicht eindeutig bestätigt werden.

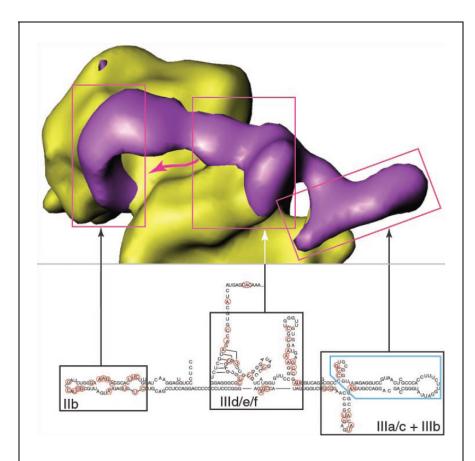


Abbildung 1.11 Lokalisation der strukturellen IRES Domänen im binären 40S • HCV IRES Komplex [178]. Die Sekundärstruktur ist zusätzlich auf eine Weise dargestellt, welche ihre Organisation an der 40S Untereinheit reflektiert. Die einzelnen Tertiärstrukturelemente (Kästchen) wurden über Pfeile mit den entsprechenden Elementen der Kryo-EM Dichte verbunden. Nukleotide, welche an der Bindung der 40S Untereinheit beteiligt sind, wurden mit roten Kreisen in der Sekundärstruktur markiert [82]. Der pinkfarbene Pfeil markiert die vermutete Position der codierenden RNA im mRNA-Kanal.

Unabhängig von den Kryo-EM Modellen sind mittlerweile 3D-Strukturen der meisten Subdomänen mit Hilfe der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie gelöst worden (Abbildung 1.12). Die Gesamtstruktur der HCV IRES und molekulare Details ihrer Interaktionen mit der Translationsmaschinerie sind bisher jedoch noch unbekannt [30; 81; 85; 87; 105-107; 208]. Auch ist nicht klar, inwieweit diese Teilstrukturen das jeweilige Element in der ribosomengebundenen Gesamtstruktur repräsentieren.

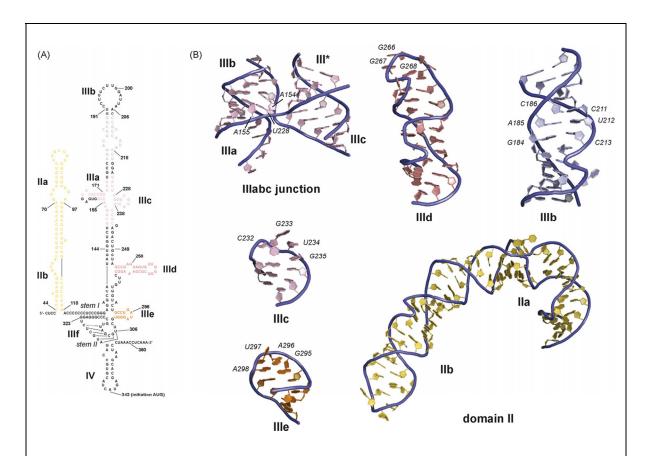


Abbildung 1.12 Strukturen funktioneller HCV IRES Domänen [105]. (A) Sekundärstruktur der HCV IRES. Nukleotide, welche zu bekannten Tertiärstrukturen gehören, wurden farbig markiert. (B) NMR- und Kristallstrukturen der HCV IRES Domänen. Die PDB-Kodes der Domänen sind 1P5P (II), 1F85 (IIIe), 1F84 (IIId), 1IDV (IIIc), 1KH6 (IIIabc-Kreuzung) und 1KP7 (IIIb). Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist als blaues Band dargestellt, Zucker und Basen sind entsprechend (A) farbig markiert.

Das Hepatitis C Virus hat eine hohe Mutationsrate und verändert sich im Laufe der Infektion beim Patienten. Die IRES am 5'-Ende des Genoms ist dabei jedoch am stärksten konserviert. Therapeutische Konzepte zur Bekämpfung dieser Infektionen sind daher ständiger Weiterentwicklung unterworfen und umfassen unter anderem Interferon bezogene Systeme, verschiedene Formen von Ribavirin (einem Nukleosid-Analogon), Inhibitoren der viralen Proteine NS3 und NS5a, Immunmodulatoren, Caspase-Hemmer, Anti-fibrotische Mittel, die Behandlung mit Antikörpern und Impfstoffe [118]. Aber auch Inhibitoren des HCV IRES Elementes werden zunehmend in Betracht gezogen [56; 84; 126; 153; 173]. Ein genaueres Verständnis vor allem der molekularen Struktur der HCV IRES ist dabei von großem Interesse.

1.3 Kryo-Elektronenmikroskopie

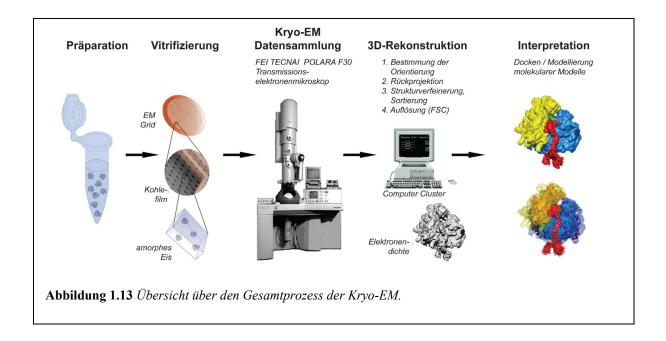
Mehr als jedes andere Gerät hat das Mikroskop die Naturwissenschaften und die Medizin beeinflusst. Heutzutage können mit mikroskopischen Techniken Bilder von (Organismen-) Oberflächen, Zellen, Zellorganellen, Membranen, Makromolekülen und sogar Atomen gewonnen werden.

Die Anfänge der Lichtmikroskopie gehen bis ins 17. Jahrhundert zu Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) zurück. Jedoch erst 300 Jahre später, genauer 1924, als Louis de Broglie (1892-1987) den Wellencharakter von Elektronenstrahlen erkannte, waren die Grundlagen für die Konstruktion eines Elektronenmikroskops geschaffen. Ernst Ruska (1906-1988) und Max Knoll (1897-1969) konnten 1932 an der Technischen Universität Berlin den Prototyp des ersten Transmissionselektronenmikroskopes (TEM) fertigstellen [155]

Bei strahlenresistenten Objekten ist mittels der Elektronenmikroskopie bereits die Visualisierung einzelner Atome möglich. Biologische Moleküle sind jedoch sehr strahlenempfindlich, was zu einem hohen präparativen und methodischen Aufwand bei ihrer elektronenmikroskopischen Erforschung führt. Die Entwicklung der Kryo-Präparation [41] in Einzelpartikel Rekonstruktion Kombination mit der (Kapitel 1.3.2.2), computergestützten Mittelungsverfahren zur Bildverarbeitung und dreidimensionalen Darstellung [51; 52; 188; 189], sowie die stetige Verbesserung der Mikroskope führten schließlich einer leistungsstarken Methode: der dreidimensionalen Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM).

Vor allem in den letzten 15 Jahren entwickelte sich die Kryo-EM vorteilhaft für die Strukturbiologie. Gegenüber klassischen strukturbiologischen Techniken, wie etwa der Röntgenkristallstrukturanalyse oder der Kernmagnetischen Resonanz- (engl.: nuclear magnetic resonance-, NMR-) Spektroskopie bietet die Kryo-EM einige Vorteile. Zum einen führt das blitzschnelle Einfrieren der Probe zu einer Reduzierung von Strahlenschäden und thermischen Schwingungen der Moleküle während der Aufnahme und es verhindert ein Verdampfen der wässrigen Bestandteile der Probe im Hochvakuum des Mikroskops. Zum anderen wird durch das Einfrieren der Probe die Kristallbildung des umgebenden Wassers verhindert, wodurch der native, hydrierte Zustand der Probe mit all ihrer Dynamik und ihren Struktur-Funktions-Beziehungen (Interaktion mit Liganden, verschiedene konformationelle Zustände) erhalten bleibt. Verglichen mit der Röntgenkristallstrukturanalyse oder der NMR-Spektroskopie werden für die Kryo-EM viel kleinere Proben-Mengen benötigt. Die zum Teil schwierige Kristallisation entfällt und es können Moleküle untersucht werden, wie zum Beispiel Ribosomen, die oft zu groß oder zu komplex für die herkömmlichen Methoden sind.

Einen Überblick über den Gesamtprozess der Kryo-EM von der Probenpräparation bis zur Interpretation der finalen dreidimensionalen Struktur gibt Abbildung 1.13.



1.3.1 Physikalische Grundlagen der Bildentstehung am TEM

1.3.1.1 Aufbau des TEM

Ein TEM arbeitet im Prinzip ähnlich einem Lichtmikroskop. Statt Glaslinsen werden magnetische Linsen verwendet und am oberen Ende der Säule befindet sich ein Hochspannungs-Elektronenemitter, welcher den Elektronenstrahl erzeugt Mikroskopsäule durchstrahlt. Die Elektronen passieren dabei die Probe und eine Reihe vergrößernder und fokussierender magnetischer Linsen, so dass das Bild am Ende entweder auf einem Fluoreszenzschirm abgebildet oder mittels einer empfindlichen Kamera aufgenommen werden kann. Um Interaktionen zwischen Elektronenstrahl und Luftmolekülen zu vermeiden, besteht im Inneren der Mikroskopsäule stets ein Hochvakuum. Die zwei am verbreiteten Elektronenquellen in einem Elektronenmikroskop meisten sind Haarnadelkathode, oder auch Filament, und die Feldemissions-Kathode (engl.: field emission gun, FEG), wobei mit der letzteren höhere Auflösung erreicht werden kann, da sie einen hochkohärenten Elektronenstrahl erzeugt.

1.3.1.2 Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Objekt und Kontrastentstehung

Der von der Elektronenquelle ausgesandte Elektronenstrahl interagiert mit der Probe und durchdringt diese in ihrer gesamten Dicke. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie tragen die absorbierten, transmittierten und gestreuten (gebeugten) Elektronen zur Bild- und Kontrastentstehung bei. Die Streuung der Elektronen kann dabei elastisch oder inelastisch sein. Der Kontrast eines Bildes ist determiniert durch die Natur und das Ausmaß der Interaktionen zwischen Elektronenstrahl und Probe. Kontrast wird hierbei definiert als relativer Unterschied in der Intensität zwischen einem Bildpunkt und seiner Umgebung. Es entsteht ein zweidimensionales Bild, das eine Projektion des gesamten Objektes einschließlich interner Strukturen darstellt. Je nach Orientierung der Partikel im Eis entstehen so Projektionen verschiedener Ansichten des Partikels (Abbildung 1.14).

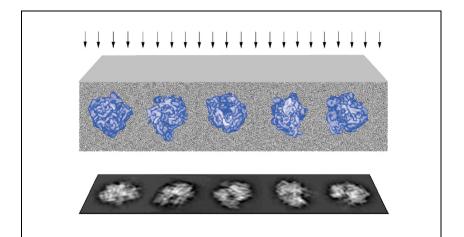


Abbildung 1.14 Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Objekt. Der Elektronenstrahl (Pfeile) durchdringt das in Eis eingebettete Objekt in seiner gesamten Dicke. Die dreidimensionalen Strukturinformationen der Objektebene werden dadurch zu zweidimensionalen Projektionen des Objektes in der Bildebene. [209]

Bei der *elastischen* Streuung an den Atomkernen der Probe ändern die Elektronen abhängig von der Geschwindigkeit und der Kernladungszahl des Atomkerns ihre Richtung, behalten aber ihre Energie. Je nach Verteilung schwerer Atome in der Probe können elastisch gestreute Elektronen sogenannten Streukontrast erzeugen - besonders stark abgelenkte Elektronen werden durch das optische System des Mikroskops (z.B. die Objektivblende) abgefangen und tragen nicht mehr zur Bildentstehung bei. Stark streuende Regionen der Probe erscheinen

daher im Bild dunkler. Allerdings wird durch das Ausblenden stark abgelenkter Elektronen die Auflösung des Bildes vermindert. Aber auch die Interferenz zwischen dem ungebeugten Primärstrahl (Nullstrahl) und den gebeugten Elektronenstrahlen trägt zum Bildkontrast bei (*Phasenkontrast*). Je höher dabei die Mikroskopvergrößerung bzw. je kleiner das zu untersuchende Objekt ist, desto größer ist die Bedeutung des Phasenkontrastes.

Die Streuwinkel der Elektronen steigen generell mit zunehmender Coulomb-Kraft. Abnehmende Distanz des Elektrons zum Atomkern, steigende Kernladungszahlen und sinkende Geschwindigkeit des Elektrons führen also zu größeren Streuwinkeln. Die Elektronen treten bei der gewählten Beschleunigungsspannung von 300 kV und der dadurch sehr hohen Geschwindigkeit der Messstrahlelektronen kaum in Wechselwirkung mit der Probe. Die biologischen Objekte, die in der Kryo-Elektronenmikroskopie untersucht werden, bestehen zudem hauptsächlich aus Atomen niedriger Kernladungszahlen (z.B. H, C, N, O, P). Sie werden für die Kryo-EM zudem auf einer Objektträgerfolie aus Kohlenstoff (C) präpariert und auch das die Probe umgebende vitrifizierte Eis (H, O) weist eine sehr ähnliche Dichte auf. Sie interagieren deswegen nur schwach mit den eintreffenden Elektronen und erzeugen kaum Streukontrast. Zu ihrer Abbildung macht man sich daher die Welleneigenschaften der Elektronen und den daraus resultierenden Phasenkontrast zunutze. Das für Elektronen transparente Objekt wird mit einer kohärenten Welle bestrahlt, der größte Teil der Elektronen durchstrahlt das Objekt dabei ungehindert (Transmission). Ein kleiner Teil der Elektronen wird dabei jedoch an dem im Objekt herrschenden elektrostatischen Potential gestreut (das Objektpotential entspricht dem Brechungsvermögen in der Lichtmikroskopie) und erfährt eine leichte Phasenverschiebung in Bezug auf den nichtgebeugten Elektronenstrahl (Nullstrahl). Die in der Kryo-EM untersuchten biologischen Proben werden daher auch als schwache Phasenobjekte bezeichnet. Die Phasenlage einer Welle kann jedoch nicht direkt detektiert werden, sondern nur Intensitäten (= Betragsquadrat der Amplituden). Die Amplitude der austretenden Elektronenwelle wird jedoch durch das Objekt nicht geändert. Dieser Effekt stellt eines der Hauptprobleme der Kryo-EM dar, da die Phasenvariationen den Großteil der Strukturinformationen der zu analysierenden Proben enthalten.

Damit also ein detektierbarer Phasenkontrast entsteht, muss bei biologischen Molekülen die Phaseninformation der austretenden Elektronenwelle in eine wahrnehmbare Amplitudenmodulation umgewandelt werden. Phasenkontrast entsteht, indem der ungebeugte Nullstrahl mit den vom Objekt gestreuten, phasenverschobenen Elektronenwellen in der Bildebene interferiert. Im Idealfall fallen die Amplituden des gebeugten und des ungebeugten Strahls wieder phasengleich aufeinander. Die Wellen interferieren dann mit einer als

Helligkeitsunterschied detektierbaren Amplitudenmodulation. In der Elektronenmikroskopie kann der nicht korrigierbare Öffnungsfehler (sphärische Aberration) der Objektivlinse in Kombination mit leichtem Unterfokus eine zusätzliche Phasenverschiebung der gebeugten Wellen hervorrufen und somit detektierbaren Phasenkontrast erzeugen [163].

Inelastisch gestreute Elektronen geben zusätzlich zur Richtungsänderung beim Auftreffen auf die Objektmoleküle einen Teil ihrer kinetischen Energie an die Elektronenhülle der Probe ab, ihre Wellenlänge wird größer. Die transferierte Energiemenge ist dabei variabel und zufällig, der Elektronenstahl zeigt nach Objektdurchgang ein Wellenlängenspektrum. Inelastisch gestreute Elektronen können nicht zum Phasenkontrast beitragen, da sie nicht mehr die geeignete Wellenlänge für die Interferenz mit dem Primärstrahl haben. Die Streuwinkel sind zudem sehr klein, sodass sie auch nicht zum Streukontrast beitragen können. Diese Elektronen sind somit zum einen verantwortlich für das Hintergrundrauschen im EM-Bild, zum anderen kann die transferierte Energie in der Probe akkumulieren, Molekülbindungen aufbrechen und so die Probe zerstören.

1.3.1.3 Die Kontrasttransferfunktion

Die Abbildungseigenschaften des Elektronenmikroskops werden durch die Kontrasttransferfunktion (engl.: contrast transfer function, CTF) beschrieben, welche die Bildinformation im Ortsfrequenzraum moduliert [193]. In der CTF werden verschiedene Abbildungsfehler (z.B. sphärische Aberration), sowie Defokuslagen des Objektes berücksichtigt. Die CTF hat für schwache Phasenobjekte immer sinusoide Form und stellt eine um den Nullpunkt oszillierende Kurve dar, deren Maxima und Minima den Höchstwert an Bildinformation liefern. Extrema bei hohen Ortsfrequenzen entsprechen dabei feinen Strukturdetails, niedrige Frequenzen repräsentieren dagegen grobe Objektstrukturen. Der Informationsgehalt, der aus der jeweiligen Ortsfrequenz gewonnen werden kann, ist umso geringer je weiter sich die CTF dem Nullpunkt nähert. An den Nullstellen der Funktion wird keine Information mehr übertragen, es entsteht eine Übertragungslücke. Die Position der ersten Nullstelle der CTF begrenzt somit die erreichbare Auflösung der EM-Aufnahmen (Punktauflösung). An diesem Punkt gewonnene Informationen können direkt interpretiert werden. In der Realität treten zusätzliche Effekte auf, wie z.B. die Energieverteilung der Elektronen, Inkohärenz des Elektronenstrahls, ein "schwimmen" (engl.: drift) der Probe und der begrenzende Einfluss der Objektivblende, die die CTF bei höheren Ortsfrequenzen dämpfen (siehe Abbildung 1.15). Die reale CTF kann nicht unendlich oszillieren. Der Punkt, an dem die einhüllende Funktion die Oszillation der CTF auf Null abgedämpft hat, wird als Informationsgrenze bezeichnet. Durch diesen Effekt sind vor allem feine Strukturdetails unterrepräsentiert. Die enthaltenen Bildinformation jenseits der Punktauflösung vor allem bei hohen Frequenzen werden erst nach einer CTF-Korrektur während der Bildverarbeitung (vgl. Kapitel 1.3.2.1) zugänglich.

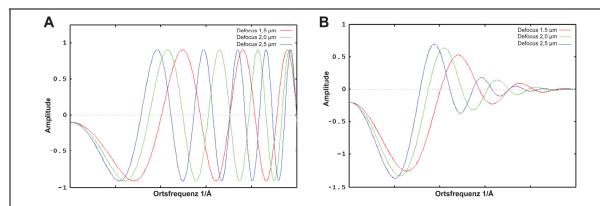


Abbildung 1.15 Vergleich der theoretischen (A) und der realen Kontrasttransferfunktion (B) in Abhängigkeit verschiedener Defokuswerte. Die reale CTF ist dabei einer Dämpfung unterworfen. Mit steigender Defokussierung werden die Oszillationen stärker und es ist eine Verschiebung der Nullstellen zu beobachten. Somit erhält man bei sich ergänzenden Defokuswerten Informationen auch bei den Nulldurchläufen der CTF. Der Punkt, an dem die CTF nicht mehr oszilliert, wird als Informationsgrenze bezeichnet. (http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/techs/ctf/ctf.html)

Das Arbeiten mit großen Defokuswerten zur Kontrastverstärkung in der Kryo-EM (zwischen -1 und -5 μm) führt dazu, dass die CTF sehr schnell oszilliert [189]. Je höher der Defokuswert, desto stärker oszilliert die Kurve. Die Funktion weist mehr Nullstellen auf und es geht mehr Information verloren. Die Position der ersten Nullstelle ist in Richtung niedriger Ortsfrequenzen verschoben. In der Kryo-EM werden deshalb Serien von Bildern bei unterschiedlichen Defokuswerten aufgenommen (vgl. Abbildung 1.15). Die aus einer bei einem bestimmten Defokuswert aufgenommenen elektronenmikroskopischen Aufnahme (dem Mikrographen) gewonnenen Einzelpartikelbilder werden als *Defokusgruppe* bezeichnet. Die verschiedenen Defokuswerte werden dabei so gewählt, dass die Nullstellen der zugehörigen Funktionen gegeneinander verschoben sind. Durch Mittelung vieler Einzelpartikelbilder mit unterschiedlichen Defokuswerten wird Information somit für den gesamten Ortsfrequenzbereich gewonnen und die Auflösung der Rekonstruktion verbessert.

1.3.2 Bildanalyse, Bildverarbeitung und 3D-Rekonstruktion

Für die Bildverarbeitung am Computer müssen die Kryo-EM-Aufnahmen digitalisiert vorliegen. *Digitalisierung* ist ein Prozess, bei dem analoge kontinuierliche (oder quasi-kontinuierliche) Signale in ein diskretes Raster umgewandelt werden. Ein diskretes Signal besteht dabei aus zeitlich und räumlich getrennten Teilen, wobei jeder Rasterpunkt eine bestimmte Amplitude des Originalsignals repräsentiert. Eine Pixelgrafik (auch Rastergrafik) speichert also die Information für jeden erfassten Punkt (Pixel) eines Bildes und jedem Pixel wird dabei ein bestimmter Helligkeitswert eines diskreten Punkts der Ebene im kartesischen Koordinatensystem zugeordnet.

Wesentliche Operationen der Verarbeitung von Kryo-EM-Bildern finden nicht mit den realen Bilddaten, sondern mit der Fourier-Transformierten der Bilder statt. Für die digitale Bildverarbeitung bedeutet die Fourier-Transformation, dass Bildsignale mathematisch als Serien von sinusförmigen Wellen dargestellt werden können. Funktionen mit kleiner Ortsfrequenz kennzeichnen grobe Objektstrukturen und Sinusfunktionen mit hoher Ortsfrequenz liefern Informationen über feine Strukturdetails.

1.3.2.1 Verbesserung der Bildqualität

Damit ein Bild mit hoher struktureller Auflösung analysiert werden kann, muss das überlagernde hochfrequente Rauschen (engl.: noise) unterdrückt werden. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: signal-to-noise ratio, SNR) ist laut Definition die Varianz des gewünschten Bildsignals gegenüber der Varianz des unerwünschten Rauschens [189]. Das bedeutet, dass das SNR sich proportional zur Belichtung (bzw. Bestrahlung mit Elektronen) verbessern würde. In der Kryo-EM biologischer Proben muss, um den Strahlenschaden möglichst gering zu halten, unter Niedrigdosis-Bedingungen (ca. 20e⁻/Å²) gearbeitet werden. Da also nur wenige Elektronen mit der Probe interagieren können, weisen die erzeugten Aufnahmen ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, welches zusätzlich durch das Abbildungssystem des Mikroskops erniedrigt wird [188]. Das Rauschen entsteht unter anderem durch inelastische Streuung der Elektronen, Variationen des FEG-Stromes, durch Strukturen des Probenträgers, Unregelmäßigkeiten im Filmmaterial und so weiter. Da sie nicht mit Molekülstrukturen korreliert sind, sollten sich die Rausch-Signale von einem Bildbereich zum nächsten zufällig unterscheiden. Das bietet den Vorteil, dass bei Addition vieler gleichartiger Bilder, also einer Mittelung, wie sie bei der Einzelpartikel Rekonstruktion zur Anwendung kommt, das gewünschte Signal verstärkt wird, der Anteil des Rauschens abnimmt und somit struktur- und informationslos wird.

Eine ergänzende Möglichkeit zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bietet die Filterung der Bilder im Fourier-Raum. Die Multiplikation einer Filterfunktion mit den Bildsignalen moduliert dabei deren Amplituden in einem bestimmten Frequenzbereich. Bei einem Tiefpassfilter bedeutet dies das Ausfiltern hoher Ortsfrequenzen und das Durchlassen niedriger Ortsfrequenzen. Im Idealfall wird so das störende Rauschen verringert, allerdings gehen in der Realität auch zunehmend die hochfrequenten feinen Strukturdetails verloren. Vorsichtiges Anwenden der Filterfunktionen in Kombination mit dem Mittelungsverfahren ist daher bei kryo-elektronenmikroskopischen Bildverarbeitungsprozessen zur Einzelpartikel Rekonstruktion essentiell.

Da außerdem die Kontrasttransferfunktion Amplitude und Phase der aufgenommenen Bilder verändert, muss eine CTF-Korrektur erfolgen. Die einfachste Methode um exakte Objektwerte zu erhalten wäre laut Penczek, et al. [130] die Multiplikation der modulierten Bildfunktion im Fourier-Raum mit dem Kehrwert der CTF. In der Praxis werden die Bilder jedoch durch Rauschen beeinträchtigt und es treten zusätzliche Effekte auf, die die CTF bei höheren Frequenzen dämpfen (vgl. Abbildung 1.15, Kapitel 1.3.1.3). An Stellen, wo die CTF also kleine Werte annimmt, würde durch eine solche inverse Filterung das Rauschen verstärkt. Die Nullstellen der CTF sind dabei besonders problematisch, da Null keinen Kehrwert hat. Unter der bereits bekannten Annahme, dass das Rauschen nicht mit dem Originalbild korreliert, kann dieses Problem durch die Verwendung des Wiener-Filters gelöst werden [130]. Der Wiener-Filter stellt einen Bandpassfilter dar, der abhängig vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis in den Regionen mit mittleren bis hohen CTF-Werten Ortsfrequenzen verstärkt und bei niedrigen CTF-Werten unterdrückt. An den Nullstellen der CTF werden die entsprechenden Bildfrequenzen allerdings ebenfalls auf Null gesetzt; für diese Bereiche existiert somit keine Bildinformation mehr. Die Anwendung des Wiener-Filters ist daher limitiert und muss durch die Aufnahme von Defokusserien komplementiert werden. Die CTF-Korrektur könnte im Prinzip bereits an den Originalbildern erfolgen. Da diese aber eben jenes schlechte Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen, erfolgt die Korrektur in der Praxis erst nachdem eine 3D-Rekonstruktion des Objektes für jede einzelne Defokusgruppe über das Mittelungsverfahren berechnet wurde.

1.3.2.2 Einzelpartikel Rekonstruktion der 3D-Struktur

Das generelle Ziel der gesamten Datenverarbeitung ist es, ein dreidimensionales Modell, eine *Elektronendichtekarte*, der Probe zu erstellen, ausgehend von ihren 2D-Projektionen auf den Mikrographen (den eigentlichen elektronenmikroskopischen Aufnahmen). Nach Kapitel

1.3.1.2 enthalten die an den Atomkernen der Probe elastisch gestreuten Elektronen die gewünschten Informationen über die Struktur der Probe. Wird ein dreidimensionales Abbild dieser Probe rekonstruiert, so repräsentiert diese demnach das wahre Coulomb-Potential (bzw. Streupotenzial) der Probe und gibt Auskunft über die Positionen der Atome und nicht über die Verteilung der Elektronen. Im Unterschied dazu tragen bei der Röntgenkristallographie die Elektronen des zu untersuchenden Kristalls, nicht aber die Atomkerne, zur Beugung des Röntgenstrahles bei. Der aus der Röntgenkristallographie stammende Begriff "Elekronendichtekarte" für die 3D-Rekonstruktionen in der Kryo-EM ist daher eigentlich ungenau, wird aber der Vergleichbarkeit halber auch hier verwendet.

Die Methode der Einzelpartikel Rekonstruktion ermöglicht es, durch Mittelung vieler 2D-Projektionen im Fourier-Raum und anschließender Rückprojektion im Real-Raum ein solches 3D-Modell des Objektes zu erstellen. Die finale Struktur repräsentiert also die durchschnittliche Struktur aller individuellen Komplexe einer Probenpräparation. Eine wichtige Voraussetzung für die Einzelpartikel Rekonstruktion ist somit nicht nur eine hohe Reinheit und Homogenität der Probe, sondern auch die zufällige Verteilung der Partikel (ein isotropes Muster) auf dem Objektträger, damit die entsprechenden 2D-Projektionen der verschiedenen Partikelorientierungen zu gleichen Teilen im Datensatz enthalten sind (vgl. Abbildung 1.14). Dies ist jedoch nicht immer exakt der Fall, was unter anderem zu einer undeutlichen, schlecht aufgelösten Rekonstruktion führen kann.

Die Bildverarbeitung im Computer folgt vielfältigen iterativen mathematischen Algorithmen bis zur letztendlichen Berechnung und Verfeinerung des dreidimensionalen Strukturmodells [28; 51; 103]. Die Einzelpartikel Rekonstruktion umfasst dabei zwei grundlegende Schritte:

(1) Nachdem die CTF- bzw. Defokuswerte für jede Defokusgruppe bestimmt wurden und Ausschneiden Einzelpartikelbilder ein der aus dem Mikrographen sowie eine Partikelbildauswahl erfolgt sind, muss als erstes die Orientierung der Partikel bestimmt werden. Die räumliche Orientierung der Partikel in der Eisschicht während der Aufnahme und somit auch die Orientierung ihrer Projektionen wird durch zwei Translationskoordinaten (x, y)und drei Rotationswinkel oder Eulerwinkel (ϕ , θ , ψ) beschrieben. Je nach Wahl der Drehachsen existieren verschiedene Definitionen für die Eulerwinkel. Die hier zur Bildverarbeitung genutzten Algorithmen nehmen Bezug auf ein rechtshändiges kartesisches Koordinatensystem im dreidimensionalen Raum. Die z-Achse entspricht dabei zunächst der Projektionsachse, für die in der zweidimensionalen Projektion des Partikels keine Strukturinformationen vorliegen. Die Rotation der Partikelbilder findet dabei immer im Uhrzeigersinn statt. Die erste Rotation (Winkel ϕ) erfolgt um die z-Achse herum, charakterisiert also die Drehung des Objektes in der Ebene des Mikrographen. Die zweite Rotation geschiehtum die y-Achse herum (Winkel θ), beschreibt also die Drehung des Partikels aus der Ebene hinaus. Der dritte Winkel (ψ) beschreibt dann eine dritte Rotation, wieder um die z-Achse des Partikels, also ebenfalls in der Ebene des Mikrographen.

Die Bestimmung der Partikelorientierung zur 3D-Rückprojektion in der Kryo-EM erfolgt mit Hilfe der sogenannten "projection matching" Methode [129]. Dabei wird eine neutrale 3D-Referenzstruktur zunächst in allen möglichen Orientierungen abgebildet, um einen Satz Referenzprojektionen mit zweidimensionaler bekannten Translationskoordinaten Eulerwinkeln zu erzeugen. Die experimentellen 2D-Projektionen der Probe werden dann mit den Referenzprojektionen abgeglichen. Die Orientierungsparameter der am besten übereinstimmenden Referenz können für die Rückprojektion der experimentellen 3D-Rekonstruktion verwendet werden. Für jede Defokusgruppe werden so individuell 3D-Rekonstruktionen des Objektes erstellt, durch Wiener-Filterung einer CTF-Korrektur unterzogen und anschließend zu einem 3D-Strukturmodell addiert. Dieses initiale 3D-Strukturmodell wird nun in mehreren Runden iterativ verfeinert. Die in jeder Runde auf diese Weise errechnete 3D-Rekonstruktion dient dabei jeweils wieder als neue Referenz für eine bessere Ausrichtung und Rückprojektion der Einzelmolekülprojektionen, was so nach und nach zu einer Verbesserung der Auflösung führt. Projektionen störender Partikel, z.B. degradierter Moleküle oder Schmutzpartikel, können (und müssen) an diesem Punkt aussortiert werden und es kann einer eventuellen Heterogenität der Probe bis zu einem gewissen Maße Rechnung getragen werden [103]. Dieser sich wiederholende Prozess wird so lange durchgeführt, bis keine Verbesserung des Rekonstruierten 3D-Modells mehr erreicht werden kann

(2) Mit Hilfe der bekannten Orientierungsparameter kann aus den zweidimensionalen Einzelpartikelprojektionen eine dreidimensionale Rekonstruktion des Objektes berechnet werden. Das *Projektionstheorem* [35] besagt, dass die 2D-Fourier-Transformation der zweidimensionalen Projektion eines dreidimensionalen Objektes einem Zentralschnitt durch die 3D-Fourier-Transformation des Objektes senkrecht zur Beobachtungsrichtung entspricht. Sind also die 2D-Fourier-Transformationen verschiedener Projektionen des dreidimensionalen Objektes und die Orientierungsparameter dieser Projektionen bekannt, lässt sich die 3D-Fourier-Transformation Schnitt für Schnitt aufbauen und eine inverse Fourier-Transformation der 3D-Fourier-Transformierten rekonstruiert somit das dreidimensionale Objekt (Abbildung 1.16).

Zweidimensionale Projektionen eines Objektes im Realraum entsprechen im Prinzip Schnittbildern des Objektes selbst, senkrecht zur optischen Achse. Sie können also mittels Rückprojektion zu einem dreidimensionalen Modell des Objektes zusammengesetzt werden. Die Rückprojektion findet auch bei der Tomographie Anwendung, bei der ein einzelnes Objekt zunächst in einer Serie von zweidimensionalen Querschnitten unter verschiedenen Winkeln abgebildet wird, welche dann zu einem dreidimensionalen Modell des Objektes zusammengesetzt werden.

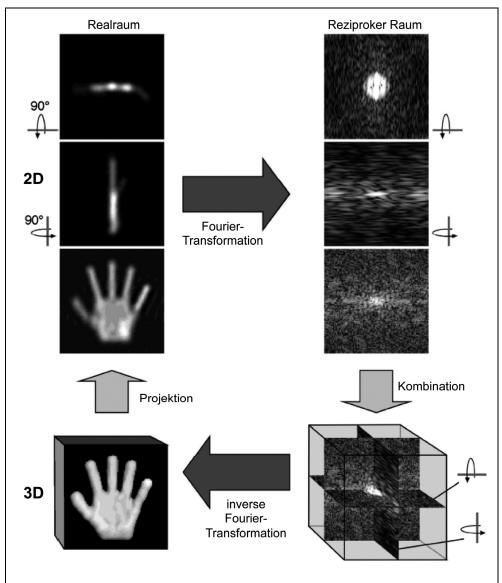


Abbildung 1.16 Schema der 3D-Rekonstruktion eines Objektes nach dem Projektionstheorem [181]. Die 2D-Fourier-Transformation einer Projektion entspricht dem zentralen Schnitt der 3D-Fourier-Transformation des Objektes und enthält alle zur Rückprojektion des Volumens benötigten Informationen.

1.3.2.3 Interpretation der finalen Struktur

Der wohl interessanteste Teil der 3D-Rekonstruktion liegt in der Interpretation der erhaltenen 3D-Strukturmodelle. Die verschiedenen Funktions- und Konformationsstadien sowie die vielfältigen Interaktionen makromolekularer Komplexe und ihrer Liganden können direkt beobachtet werden. Oft reicht schon eine niedrige Auflösung aus, um biologisch wichtige Rückschlüsse ziehen zu können. Bei guter Auflösung können dann eventuell schon vorhandene atomare Strukturmodelle aus der Röntgenkristallstrukturanalyse oder der NMR-Spektroskopie direkt in die Kryo-EM-Dichten eingepasst werden (rigid body docking) [164]. Diese mittlerweile standardmäßig verwendeten Hybrid-Methoden erlauben daher detaillierte und überprüfbare Aussagen über die molekularen Interaktionen der untersuchten Komplexe. Eine in den letzten Jahren immer häufiger verwendete Möglichkeit bietet die Homologie-Modellierung anhand von Tertiärstrukturen homologer Moleküle [5; 6; 98; 169]. Aber auch die vollständige de novo Modellierung des Zucker-Phosphat-Rückgrats einer RNA-Tertiärstruktur anhand von verfügbaren Sekundärstruktur-Vorschlägen konnte 2006 gezeigt werden [166]. Dies war möglich, da die Sekundärstrukturelemente von DNA und RNA, in diesem Fall RNA-Doppelhelices, wesentlich größer als α-Helices und β-Faltblätter von Proteinen und daher auch besser definiert sind.

Die Kryo-Elektronenmikroskopie in Verbindung mit verschiedenen Techniken der Modellierung und vor allem auch biochemischen Verfahren entwickelt sich somit zunehmend zur Methode der Wahl, wenn unbekannte makromolekularer Komplexe und Interaktionen auf molekularer Ebene aufgeklärt werden sollen. Ribosomen als komplexe, makromolekulare Maschinen haben sich dabei aufgrund ihrer Größe, ihrer kugelähnlichen Form und ihres gut zu erkennenden stabilen RNA-Kerns als ideale Proben zur Entwicklung neuer und Weiterentwicklung bestehender Kryo-EM-Methoden erwiesen.

1.4 Zielsetzung

Die Proteinbiosynthese (Translation) ist in allen Lebewesen ein zentraler und essentieller Schritt in der Genexpression. Bewerkstelligt wird sie durch Ribosomen, auf RNA basierenden, makromolekularen Maschinen. Die vier funktionellen Phasen der Translation, Initiation, Elongation, Termination und Recycling, werden durch Translationsfaktoren kontrolliert. Darüber hinaus können in *cis* wirkende Sequenzabschnitte der mRNA die Translation beeinflussen. Einige dieser mRNA-Signalstrukturen, sogenannte IRES Elemente (interne Ribosomen Eintrittsstellen), sind fähig, aktiv die Translationsmaschinerie zu beeinflussen. Diese IRES-Elemente finden sich nicht nur in wichtigen zellulären mRNAs. Für

Viren, wie das Hepatitis C Virus (HCV), stellen diese IRES-Elemente effiziente Werkzeuge zum "Kapern" des Translationsapparates ihrer Wirtszellen dar.

So induziert die HCV IRES konformationelle Veränderungen in der ribosomalen 40S Untereinheit, was für die Aktivierung, die Durchführung der Initiation oder der Translation zum Teil ohne die Hilfe von weiteren, essentiellen Translationsfaktoren bedeutsam ist. Dabei sind nicht die Primärsequenz, sondern die Sekundärstruktur und die dreidimensionale Faltung der IRES RNA von ausschlaggebender Bedeutung. Das Hepatitis C Virus hat eine hohe Mutationsrate und verändert sich im Laufe der Infektion beim Patienten. Die IRES am 5'-Ende des HCV Genoms ist dabei jedoch am stärksten konserviert. Strukturell ähnliche IRES-Elemente konnten sowohl in nahe verwandten tierpathogenen Pestiviren (z.B. CSFV), als auch in einigen nicht-verwandten Picornaviren (z.B. SPV-9, PTV-1) nachgewiesen werden. Therapeutische Konzepte zur Bekämpfung der HCV Infektionen ziehen daher zunehmend auch Inhibitoren des HCV IRES Elementes in Betracht. Ein genaueres Verständnis vor allem der molekularen Struktur der HCV und HCV-ähnlichen IRES-Elemente ist dabei von großem Interesse. Biochemische und strukturbiologische Untersuchungen der letzten Jahre konnten große Fortschritte zum Verständnis der HCV IRES abhängigen Translationsinitiation erzielen. Die Tertiärstrukturen der meisten HCV IRES Subdomänen sind mittlerweile bekannt. Unklar ist allerdings, inwieweit die Faltung dieser Teilstrukturen in der vollständigen IRES und in der ribosomengebundenen Form erhalten bleibt. Ebenfalls ist der genaue Mechanismus, mit dem die HCV IRES arbeitet, immer noch weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es daher, die Tertiärstruktur der HCV IRES in ihrer ribosomengebundenen Form, sowie die Interaktionen der HCV IRES mit dem eukaryotischen Translationsapparat aufzuklären. Optimierungen im Bereich der Probenpräparation, sowie die Technik der Kryo-EM in Verbindung mit der Einzelpartikel Rekonstruktion und der Multireferenz-Klassifizierung ermöglichen die Strukturbestimmung von 80S • IRES Komplexen bei einer Auflösung im Subnanometer-Bereich. Durch das Einpassen von atomaren Modellen der HCV IRES und ribosomaler Komponenten und durch Homologie-und *de novo*- Modellierung sollen die Computer-Rekonstruktionen auf molekularem Niveau interpretiert werden.

2 Material und Methoden

Agar

2.1 Bezugsquellen von Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie / Reagenz / Kit	Hersteller
Aceton	Roth
Acrylamid/Bis 19:1 (30%)	BioRad
Acrylamid/Bis 29:1 (40%)	BioRad
Acrylamid/Bis 37,5:1 (25%)	BioRad

Agarose Invitrogen, Serva

Bacto

Ammoniumperoxodisulfat (APS) Merck
Ampicillin, Natrium-Salz Roth
Biotin Fluka
Borsäure Merck

Bromphenolblau Sigma-Aldrich
BSA, acetyliert Sigma-Aldrich

BSA, ultrapure, nicht acetyliert Ambion

Calciumchlorid Sigma-Aldrich Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure) Roth, Merck

Complete Protease Inhibitor, EDTA-free Roche

CoomassieBrilliantBlue Sigma-Aldrich

Coomassie-Reagenz (Protein Assay)

Bio-Rad

DTT (1, 4-Dithio-DL-threitol)

Fluka

Dihydostreptomycin, Sulfat-Salz Sigma-Aldrich

Dinatriumhydrogenphosphat Merck
Essigsäure Merck
Ethanol Merck

Ethanol, vergällt Roth

Ethidiumbromid Invitrogen
Fluorescein-5-thiosemicarbazid (FTS) Invitrogen
Fotoentwickler KODAK
Fotofixierer KODAK

Glycerin Merck
Glycin Merck

Glutathion, reduziert GE Healthcare
Gluthathion Sepharose 4B GE Healthcare
Guanidin-Hydrochlorid Sigma-Aldrich

Hefeextrakt Bacto

HEPES Calbiochem
IPTG Sigma-Aldrich

Isopropanol Merck

Kaliumacetat Merck, Ambion Kaliumchlorid Fluka, Ambion

Kaliumdihydrogenphosphat Merck
Kaliumhydroxyd Merck
Lithiumchlorid Ambion

Magnesiumchlorid Merck, Ambion

 $MEGAclear^{TM} \ Kit \\ MEGAshortscript^{TM} \ High \ Yield \ Transcription \ Kit \\ β-Mercaptoethanol \\ Merck \\ Methanol \\ Roth$

Natriumazid Merck, Ambion
Natriumazid Sigma-Aldrich

 $\begin{tabular}{lll} Natriumchlorid & Merck \\ Natrium-dihydrogenphosphat \cdotH$_2O & Merck \\ Natriumdodecylsulfat (SDS) & Serva \\ Natriumhydroxid & Merck \\ \end{tabular}$

Natriumperiodat Sigma-Aldrich

Natriumsulfit Fluka
Nonidet-P40 (NP-40) Roche
NTPs Invitrogen

Pepton Bacto
Phenol Roth
Phenol/Chloroform Roth

Puromycin Calbiochem

QIAGEN Plasmid Midi oder Maxi Kit Qiagen

QIAprep Miniprep Kit Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen

RRL Green Hectares, USA

Saccharose Sigma-Aldrich
Sepharose 6B, Epoxy-activated GE Healthcare
Sepharose 4, NHS-activated, fast flow GE Healthcare

Silberfärbungskit Rothi Black P Roth

Streptavidin-Agarose GE Healthcare Streptomycin, Sulfat-Salz Sigma-Aldrich

SYBR-Safe Invitrogen
TBE Urea sample buffer BioRad
10x TBE-Puffer Invitrogen
TEMED Invitrogen
Titriplex III (EDTA) Merck

Toluidine Blue Sigma-Aldrich
Tobramycin Sigma-Aldrich

Trichloressigsäure (TCA) Roth
Trichlormethan Roth
Tris(hydroxymethylaminomethan) Merck
Tris(hydroxymethylaminomethan)-hydrochlorid Merck $TRI_{ZOL} LS^{@}$ Invitrogen $tRNA^{bulk}$, E. coli Roche
Trypton Bacto

Urea (ultrapure) Invitrogen

RNase-freies Wasser Gibco Ultrapure (UP)

Xylencyanol Sigma-Aldrich

Enzym Hersteller

CIP (calf intestine phosphatase)

Roche
DNase I (RNase-frei)

Ambion

Lysozym Sigma-Aldrich

Platinum® *Pfx* DNA-Polymerase Invitrogen

Restriktionsenzym *Eco*RI New England Biolabs

Hersteller

Restriktionsenzym *Hind*III New England Biolabs
Restriktionsenzym *Xho*I New England Biolabs
Restriktionsenzym *Xba*I New England Biolabs
Restriktionsenzym *Bam*HI New England Biolabs
T4 DNA-Ligase Gibco BRL, Eggenstein

Gerät / Verbrauchsmaterial

Allegra 25R (Zentrifuge)

Amicon-Filter

Millipore

Autoklav

H + P

ÄKTA FPLC System GE Healthcare

Brutschrank Memmert

Elektrophoresekammer SE 260 GE Healthcare

Electron Image Film SO-163 KODAK

Elektronenmikroskop Tecnai G² Polara F30 FEI Company Elektronenmikroskop Tecnai G² Spirit FEI Company

Feinwaagen Satorius, Aventurer

FPLC-Säulen, diverse GE Healthcare

Cool Pix 45000 Digitalkamera Nikon
Geltrocknungsrahmen Roth

Gradient Master 107 BioComp Instruments

Grids R 2/2 oder R 2/4 Quantifoil Micro Tools GmbH

Kryo-Station FEI Company

Laborbedarf, diverses Roth; Cotech; Eppendorf

Laborflaschen Schott

Magnetrührer KMO2, MR 3001 Heidolph, Kiker Labortechnik

Mikrowelle Microwave 800 Severin

Mini VE Vertical Electrophoresis System GE Healthcare

NanoDrop Spectrophotometer Thermo Fisher Scientific

Netzgeräte EPS 301 / EP 3501 GE Healthcare Pharmacia

Optima Max (Zentrifuge) Beckmann

PC, PC-Cluster SUN Microsystems

PCR Mastercycler Personal Eppendorf
pH-Meter 510 Cyberscan

Photometer DU 800 Beckmann Coulter

Pipetten Eppendorf
Piston Gradient Fractionator BioComp
Primscan D-8200 Drum Scanner Heidelberg
Primestation Heidelberg
Reinstwasseranlage Milli-Q Millipore

Rotoren: Beckman-Coulter

SW28, SW32 Ti, SW40 Ti, SW55 Ti,

15 Ti, 50.2 Ti, MLS-50, MLA-80

Schüttler Vortex-Genie Bender&Hobein
Spektralphotometer Uvicord™ SII GE Healthcare
Tischzentrifugen: 5415 D, 5415 R Eppendorf

TYPHOON Trio Imager GE Healthcare
Ultrazentrifugenbecher Beckmann

UV Handlampe 254/366nm Benda

UV-Transilluminator Ultra Violett Products

Vitobot FEI Company
Wasserbad DC 10 Thermo Haake

Zentrifugier-Säulen, diverse Pierce

Software Hersteller

Vector NTI® Invitrogen

CHIMERA UCSF University of California

COOT Miramar

CTFFIND3 HHMI, Brandeis

em2em Image Science Software, Berlin

IRIS Explorer Numerical Algorithms

Linux CentOS 5.2 CentOS.org

Microsoft Office Microsoft Corporation

SIGNATURE HHMI, Brandeis

SPIDER 9, SPIDER 14, WEB14 Wadsworth Center, Albany

MDFIT (GROMACS) http://smog.ucsd.edu/extension/

MDfit.html,

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

2.2.1 Bakterienstämme

2.2.1.1 INV110

E. coli INV110 Zellen sind dam / dcm defizient und produzieren unmethylierte Plasmid-DNA. Dies ermöglicht das Schneiden mit dam- oder dcm-sensitiven Restriktionsendonukleasen wie z.B. XbaI. Der Stamm INV110 enthält eine endA1 Mutation, die die nichtspezifische Endonuklease I eliminiert und somit die Qualität der Plasmid-DNA während der Präparation positiv beeinflusst.

Genotyp:

F' ($tra\Delta 36 \ proAB \ lacIq \ lacZ\Delta M15$) rpsL (StrR) $thr \ leu \ endA \ thi-1 \ lacY \ galK \ galT \ ara \ tonA$ $tsx \ dam \ dcm \ supE44 \ \Delta(lac-proAB) \ \Delta(mcrC-mrr)102::Tn10 \ (TetR)$

2.2.1.2 TOP10

TOP10 *E. coli* Zellen sind genetisch identisch mit dem Stamm DH10B und ideal für hoch effiziente Klonierungen, da sie eine stabile Replikation von "high-copy" Plasmiden erlauben. Die Mutation hsdR beispielsweise erlaubt eine effiziente Transformation unmethylierter DNA aus PCR-Amplifikationen, wohingegen mcrA eine effiziente Transformation methylierter DNA aus genomischen Präparationen ermöglicht. endA1 verbessert die Qualität der präparierten Plasmid-DNA und recA1 reduziert das Auftreten unspezifischer Rekombination in klonierter DNA.

Genotyp:

F- mcrA $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi80lacZ\DeltaM15$ $\Delta lacX74$ recA1 araD139 $\Delta(araleu)$ 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

2.2.1.3 BL21 (DE3)

E. coli BL21 (DE3) Zellen werden zur Expression rekombinanter Proteine eingesetzt. Um zu verhindern, dass die Wirtszellen durch eventuelle Toxizität der exprimierten Proteine absterben, enthalten die BL21-Zellen im Genom ein Fragment (DE3) des Bakteriophagen λ. DE3 kodiert dabei für ein T7 RNA-Polymerase-Gen unter Kontrolle des *lac*UV5-Promotors und *lac*I-Repressors. Nach Transformation mit einem T7-Expressionsplasmid wird somit

zunächst die Transkription der T7-RNA-Polymerase und somit auch des Zielgens durch *lac*I verhindert. Das *lac*-Repressor Protein sitzt auf der Operatorregion des *lac*UV5-Promotors und verhindert so eine Bindung der *E. coli* Polymerase, d.h. es wird keine T7 Polymerase synthetisiert. Erst durch Zugabe von Isopropyl-\(\beta\)-D-thiogalactopyranosid (IPTG) kann die Expression des rekombinanten Proteins induziert werden. IPTG bindet dabei an *lac*I und die T7 RNA-Polymerase wird nun transkribiert und translatiert. Diese bindet dann an den T7 spezifischen Promotor des Expressionsplasmides und führt so zu einer effizienten Transkription und Translation des rekombinanten Protein-Gens.

BL21(DE3) Zellen weisen außerdem Deletionen der *lon*-Protease und der *ompT*-Außenmembran-Protease auf, welche zu einer Degradation der exprimierten Proteine während der Aufreinigung führen könnten.

Genotyp:

B F ompT gal dcm lon $hsdS_B(r_B m_B) \lambda(DE3 [lac I lac UV5-T7 gene 1 ind 1 sam7 nin5])$

2.2.2 Plasmide

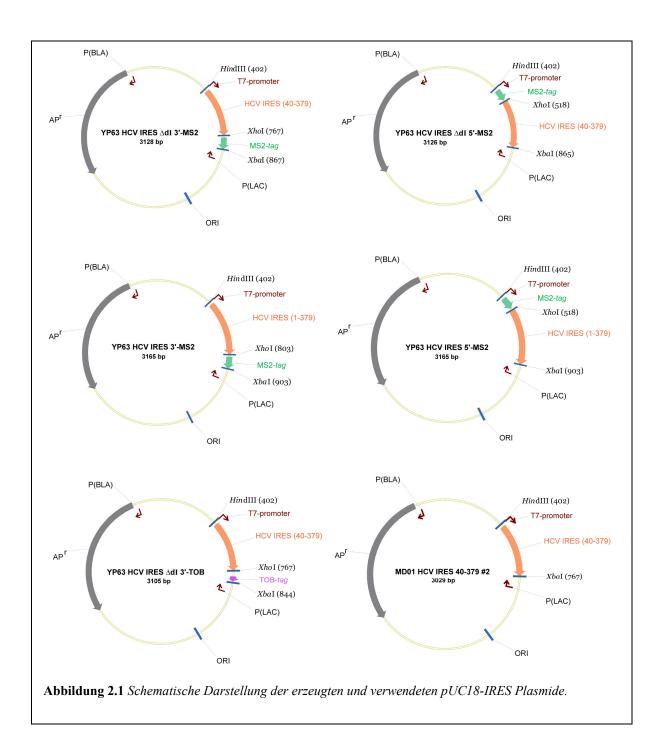
2.2.2.1 *pUC18-Derivate*

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide YP63, YP109 und YP115 sind pUC18/Ndel-Derivate. Die Vektoren pUC18 und pUC19 [201] sind kleine "high-copy" Plasmide aus *E. coli* und bis auf die gegensätzliche Orientierung ihrer MCS (engl.: multiple cloning site) identisch. Diese Vektoren enthalten das pMB1-Replicon rep, das verantwortlich für die Replikation des Plasmids ist. Des Weiteren ist eine Punktmutation in diesem Gen verantwortlich für die "high-copy" Fähigkeit der Vektoren. Das für β-Lactamase kodierende Gen bla ist verantwortlich für Ampicillin-Resistenz.

Die Plasmide YP115_CSFV IRES_3'-StM und YP109_PTV IRES_3'-StM wurden freundlicherweise von Peter J. Lukavsky und Mitarbeitern, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England, zur Verfügung gestellt [99; 101], ebenso das Plasmid YP63_HCV IRES (vgl. Abbildung 2.1 und Tabelle 2.1)

YP115_CSFV IRES_3'-StM enthält die IRES des Virus der klassischen Schweinepest (CSFV Stamm Alfort/Tübingen, nt 1-442, GenBank J04358) unter Kontrolle des T7-Promotors, gefolgt von einer kurzen nicht-kodierenden *linker*-Sequenz und einem Streptomycinbindendem Aptamer (StM-*tag* B) am 3'-Ende. Die gesamte IRES Region inklusive *tag* liegt

innerhalb der Restriktionsschnittstellen 5'-HindIII und 3'-EcoRI. YP109_PTV IRES_3'-StM enthält die IRES des Porcine Teschovirus 1 (PTV-1 nt 25-522, GenBank AB038528) und entspricht ansonsten YP115_CSFV IRES_3'-StM. Allerdings liegt die gesamte IRES Region mit *tag* hier innerhalb der Restriktionsschnittstellen 5'-*Hind*III und 3'-*Bam*HI. Die Sequenz des in beiden Plasmiden enthaltenen StM-*tags* ist wie bei Locker et al. [99] beschrieben.





YP63_HCV IRES 1-379 enthält die IRES des Hepatitis-C-Virus (HCV Stamm 1b, nt 1-379, GenBank AJ242654), ebenfalls unter der Kontrolle des T7-Promotors, flankiert von den Restriktionsschnittstellen 5'-HindIII und 3'-XbaI. MD01_HCV IRES 40-379 #2 und MD02_HCV IRES 40-379_StAv #5 sind Derivate dieses Plasmides mit der verkürzten Variante der HCV IRES (nt 40-379, core IRES, d.h. ohne Domäne I). Ersteres enthält dabei ein Streptavidin-bindendes Aptamer (StAv-tag) am 3'-Ende der IRES, dessen Sequenz aus Srisawat et al. [179] entnommen ist. MD01 HCV IRES 40-379 #2 und MD02 HCV IRES

40-379_StAv #5 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Marylena Dabrowski, Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, AG Prof. Spahn.

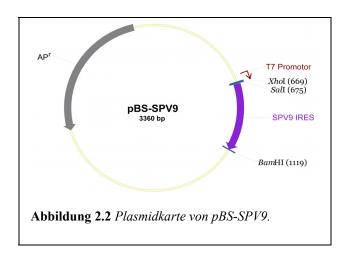
Das Plasmid YP63_HCV IRES 1-379 dient in dieser Arbeit als Ausgangsplasmid zur Erstellung weiterer HCV IRES Konstrukte mit *tag* (siehe Tabelle 2.1 und Abbildung 2.1).

Die IRES liegt dabei am Ende entweder als Wildtyp (nt 1-379) oder in der verkürzten Form ohne Domäne I (nt 40-379) immer unter der Kontrolle des T7-Promotors vor. Folgende RNAtags sind mittels PCR bzw. Oligoklonierung (siehe Kapitel 2.5.7 und 0) jeweils am 5'- oder
am 3'-Ende der IRES eingefügt worden: Ein Streptomycin-bindendes Aptamer (StM-tag A)
nach Bachler et al. [9], ein MS2-Protein-bindendes Aptamer (MS2-tag) nach Ji et al. [75] und
ein Tobramycin-bindendes Aptamer (TOB-tag), dessen Sequenz aus Hamasaki et al. [60]
entnommen ist. In all diesen Konstrukten befindet sich zwischen IRES-Sequenz und tag
jeweils eine nichtkodierende Linker-Region von 16 bis 30 Nukleotiden.

2.2.2.2 pBS-Derivate

pBluescript II Phagemide [3] enthalten, analog den pUC18 Plasmiden, das pMB1-Replicon *rep*, das Ampicillin-Resistenzgen *bla* und das *lacZ* Gen zusammen mit dem Promotor *Plac* und einer *lac*-Repressor Bindestelle. Ihre MCS liegt innerhalb des *lacZ* Gens und wird flankiert von einem T7- und einem T3-Promotor.

Das Plasmid pBS-SPV9 enthält unter Kontrolle des T7-Promoters in seiner MCS die IRES-Sequenz des Simian Picornavirus 9 (SPV-9 nt 289-726, GenBank AY064717), flankiert von den Restriktionsschnittstellen 5'-SalI und 3'-BamHI. Es wird freundlicherweise von Christopher U.T. Hellen und Mitarbeitern, Department of Microbiology and Immunology, SUNY Downstate Medical Center, New York, USA, zur Verfügung gestellt [34].



2.2.2.3 pGST-MS2

Das Plasmid pGST-MS2 wird freundlicherweise von Prof. Rachel Green, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA, zur Verfügung gestellt.

Es gehört zu den pET-Expressionsvektoren, weist ein Ampicillin-Resistenzgen auf und kodiert unter Kontrolle eines T7-Promotors für ein Fusionsprotein, welches aus einer Glutathion-S-Transferase (GST) Domäne und einer MS2-Phagen Hüllprotein Domäne besteht.

Tabelle 2.1 Übersicht über die in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Plasmide.

Plasmid	Beschreibung
YP63_HCV IRES 1-379	HCV IRES nt 1-379 (wt)
MD01_HCV IRES 40-379 #2	HCV IRES nt 40-379 (ohne Domäne I)
MD02_HCV IRES 40-379_StAv #5	HCV IRES nt 40-379 (ohne Domäne I) mit StAv-tag am 3'-Ende
YP63_HCV IRES ΔdI_5'-StM	HCV IRES nt 40-379 (ohne Domäne I) mit StM-tag A am 5'-Ende
YP63_HCV IRES ΔdI_3'-StM	HCV IRES nt 40-379 (ohne Domäne I) mit StM-tag A am 3'-Ende
YP63_HCV IRES ΔdI_5'-MS2	HCV IRES nt 40-379 (ohne Domäne I) mit MS2-tag am 5'-Ende
YP63_HCV IRES ΔdI_3'-MS2	HCV IRES nt 40-379 (ohne Domäne I) mit MS2-tag am 3'-Ende
YP63_HCV IRES_5'-MS2	HCV IRES nt 1-379 (wt) mit MS2-tag am 5'-Ende
YP63_HCV IRES_3'-MS2	HCV IRES nt 1-379 (wt) mit MS2-tag am 3'-Ende
YP63_HCV IRES ΔdI_3'-TOB	HCV IRES nt 40-379 (ohne Domäne I) mit TOB-tag am 3'-Ende
YP115_ CSFV IRES_3'-StM	CSFV IRES nt 1-442 mit StM-tag B am 3'-Ende
YP109_ PTV IRES_3'-StM	PTV-1 IRES nt 25-522 mit StM-tag B am 3'-Ende
pBS-SPV9	SPV-9 IRES nt 289-726
pGST-MS2	Expressionsvektor für das GST-MS2 Fusionsprotein

2.3 Puffer, Lösungen und mikrobiologische Medien

2.3.1 Puffer und Lösungen für molekulargenetische Methoden

Freeze&Squeeze Puffer A	NaAc; pH 7	300 mM
	EDTA	1 mM
Freeze&Squeeze Puffer B	$MgCl_2$	1 M
	НАс	10%
1x TE	Tris / HCl; pH 7,5	10 mM
	EDTA	0,1 mM

2.3.2 Physiologische Puffer für 80S Ribosomen und ihre Untereinheiten

Präparation ribosomaler Untereinheiten nach [16]:

Puffer 3	HEPES	5 mM
	$MgCl_2$	1,5 mM
	KCl	50 mM
	β-Mercaptoethanol	10 mM
Puffer 5	HEPES	20 mM
(Lagerpuffer für ribosomale Untereinheiten aus	$MgCl_2$	2 mM
RRL)	KCl	50 mM
	DTT	6 mM
	Saccharose	200 mM
Puffer 6	HEPES	5 mM
	$MgCl_2$	5 mM
	KCl	100 mM
	β -Mercaptoethanol	10 mM

Puffer 7 HE Mg KC	500 mM
	500 mM
KC	
	10 14
β-М	Mercaptoethanol 10 mM
PM-Stammlösung (f.c. 1mg/ml) Pur	omycin 2,5 mg
	sser (MQ) 1 ml
	fer 3 (0,5 M KCl) 1,5 ml
Präparation ribosomaler Untereinheiten abgewan	delt nach [142]:
10x Puffer A HE	PES 200 mM
DT	Γ 20 mM
Mg	Cl_2 60 mM
1x Puffer B HE	PES 20 mM
(Lagerpuffer für ribosomale Untereinheiten aus DT	Γ 2 mM
RRL) Mg	Cl_2 2 mM
KC	50 mM
$AS_{250}K_{150}$ Sac	charose 250 mM
KC	150 mM
	in 1x A
AK_{500} KC	500 mM
	in 1 x A
PM-Stammlösung Pur	omycin 54,44 mg
	Puffer A 1 ml

Puffer für 80S Ribosomen aus RRL und 80S • IRES Komplexe:

1x FBB (K)	HEPES / KOH; pH 7,5	20 mM
(Folding-Binding-Buffer für IRES RNAs, nach Kieft et al. [83] und Puffer für binäre 40S • IRES Komplexe)	$MgCl_2$	2,5 mM
	KCl	200 mM
	KOAc	100 m M
	DTT	1 mM
$1x R80S (Mg_5K_{150})$	HEPES	20 mM
	$MgCl_2$	5 mM
	KCl	100 mM
	KOAc	50 mM
	DTT	3 mM
$1x R80S-C (Mg_5Ca_{2,5}K_{150})$	HEPES	20 mM
(Puffer für die finalen 80S • IRES Komplexe)	$MgCl_2$	5 mM
	CaCl ₂	2,5 mM
	KCl	100 mM
	KOAc	50 mM
	DTT	3 mM
<u>1x Ausgleichspuffer:</u>		
AP-1 (Puffer $5 / B \rightarrow FBB(K)$)	HEPES	20 mM
All -1 (Tullet 37 B · TBB(R))	MgCl ₂	3 mM
	KCl	350 mM
	KOAc	200 mM
	KONC	200 1111
AP-2 (FBB(K) \rightarrow R80S-C)	HEPES	20 mM
	$MgCl_2$	7,5 mM
	CaCl ₂	5 mM
	DTT	3 mM

AP-3 (Puffer $5 / B \rightarrow R80S-C$)	HEPES	20 mM
	$MgCl_2$	8 mM
	CaCl ₂	5 mM
	KCl	150 mM
	KOAc	100 mM

Alle für Ribosomen verwendeten Puffer werden mit KOH [5M] auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, ebenso die PM-Stammlösungen. Bei der Herstellung ist unbedingt auf RNasefreies Arbeiten zu achten; die notwendigen Glaswaren, Metallspatel und Magnetrührer werden dazu zunächst gründlich gewaschen und dann bei 180°C für mindestens zwei Stunden ausgebacken.

2.3.3 Puffer für die Aufreinigung des GST-MS2 Fusionsproteins

Lysis-Puffer I; pH 7,5	Tris / HCl	20 mM
	KCl	150 mM
	Lysozym	1 mg/ml
	Glycerol	5%
	DTT	2 mM
Lysis Puffer II; pH 7,5	Tris / HCl	20 mM
	BugBuster TM Protein Extraction	
	Reagent (Novagen)	1x konz.
	Complete Protease Inhibitor,	
	EDTA-free (Roche)	1 Tabl./50 ml
	KCl	150 mM
	Lysozym	1 mg/ml
	Glycerol	5%
	DTT	2 mM
Puffer L	KCl	2,7 mM
	KH_2PO_4	1,8 mM
	NaCl	140 mM
	Na_2HPO_4	10 mM
	Glycerol	20%

1 DDC 1174	IV.OI	200
1x PBS, pH 7.4	KCl	200 mg
	KH ₂ PO ₄	200 mg
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	NaCl Wasser (MO)	8 g
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
Elutionspuffer; pH 8	Tris / HCl	50 mM
	reduziertes Glutathion	10 mM
2.3.4 Puffer und Lösungen für A	A ffinitätschromatographie	
_	Ammitatsem omatograpme	
StAv-Elutionspuffer	10x FBB (K)	1 ml
	Biotin	5 mM
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
GST-MS2 Elutionspuffer	10x FBB(K) bzw. R80S	1 ml
	reduziertes Glutathion	10 mM
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
StM-Elutionspuffer A	10x FBB(K)	1 ml
	Streptomycin	10 μΜ
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
StM-Elutionspuffer B	10x R80S-C	1 ml
2	Streptomycin	5.5 mM
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
TOB-Bindepuffer	10x R80S-C	1 ml
10B Bindepuner	tRNA	1 mg
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
TOB-Elutionspuffer	10x R80S-C	1 ml
	Tobramycin	5 mM
	Wasser (MQ)	ad 10 ml

Die Puffer und Lösungen zur Herstellung des StM-Resins nach Variante A werden beschrieben durch Windbichler et al. [197], nach Variante B durch Locker und Kollegen [101]. Puffer und Lösungen zur Herstellung des TOB-Resins werden beschrieben bei Hartmuth et al. [62]. Bei der Herstellung aller Puffer ist unbedingt auf RNase-freies Arbeiten zu achten; die notwendigen Glaswaren und Metallspatel und Magnetrührer werden dazu zunächst gründlich gewaschen und dann bei 180°C für mindestens zwei Stunden ausgebacken.

2.3.5 Elektrophoresepuffer

2.3.5.1 Agarosegele

10x TBE-Puffer	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	7,44 g
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
6x Probenpuffer (DNA, RNA)	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Glycerin	30%
	TAE	0,1x

2.3.5.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA (PAGE)

Acrylamidvorratslösung	Acrylamid	380 g
(40%; 19:1)	Bisacrylamid	20 g
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
2x Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Harnstoff	1,4 g
	10x TBE	2 ml
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
Elektrophoresepuffer (1x TBE)	10x TBE	100 ml
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml

Toluidinblau-Färbelösung	Toluidin-Blau	1 g
	Methanol	10 ml
	Essigsäure	35 ml
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
Entfärbelösung	Ethanol	100 ml
	Essigsäure	100 ml
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
SYBR-Safe Färbelösung	SYBR-Safe	5 μl
	Wasser (MQ)	ad 50 ml

2.3.5.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Acrylamidvorratslösung	Acrylamid	290 g
(30%; 29:1)	Bisacrylamid	10 g
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
5x Elektrophoresepuffer	Tris	15,1 g
	Glycin	94 g
	SDS [10%]	50 ml
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
2x SDS-Probenpuffer	1M Tris/HCl-Lösung; pH 6,8	1 ml
	SDS [10%]	4 ml
	Bromphenolblau	0,2% (w/v)
	80% Glycerol	2,5 ml
	β-Mercaptoethanol	2 ml
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R-250	2,5 g
	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml

Entfärber-Lösung	Methanol	300 ml
	Essigsäure	100 ml
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml

2.3.5.4 Native Kompositgel-Elektrophorese (NKGE)

Acrylamidvorratslösung	Acrylamid	375 g
(40%; 37,5:1)	Bisacrylamid	10 g
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml
5x FBB(K)-Probenpuffer	10x FBB (K)	1 ml
	Saccharose	50% (w/v)
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
5x R80S-Probenpuffer	10x R80S	1 ml
	Saccharose	50% (w/v)
	Wasser (MQ)	ad 10 ml
10x THEM-Elektrophoresepuffer	Tris	340 mM
	HEPES	660 mM
	$MgCl_2$	25 mM
	EDTA	1 mM

Bei der Herstellung aller Puffer ist unbedingt auf RNase-freies Arbeiten zu achten. Glaswaren, Metallspatel und Magnetrührer werden dazu zunächst gründlich gewaschen und dann bei 180°C für mindestens zwei Stunden ausgebacken.

2.3.6 Mikrobiologische Medien

LB (Luria-Bertani) Flüssigmedium	Bacto-Trypton	10 g
(low-salt)	Hefe-Extrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml

2YT Flüssigmedium	Bacto-Trypton	16 g
	Hefe-Extrakt	10 g
	NaCl	5 g
	Wasser (MQ)	ad 1.000 ml

Der pH-Wert der Medien wird mit NaOH [5M] auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend erfolgt die Sterilisation bei 120°C und 2 bar für 20 Minuten (Wasserdampfsterilisation) im Autoklaven.

Für die Herstellung von Agarplatten wird dem oben beschriebenen Flüssigmedium vor der Sterilisation 1,5 - 2% (w/v) Bacto-Agar zugegeben. Nach Sterilisation im Autoklaven und abkühlen auf ca. 50°C wird das noch flüssige Agar-Nährmedium ca. 1 cm dick in sterile Petrischalen gegossen und zum Aushärten bei Raumtemperatur abgekühlt.

Flüssigmedium und Agarplatten können zur Selektion mit sterilfiltriertem Antibiotikum versetzt werden.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgt für DNA, RNA und ribosomale Partikel (80S, 60S oder 40S) in geeigneter Verdünnung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die Bestimmung der Extinktion wird das DU800 Spectrophotometer der Firma Beckman Coulter und eine Quarz-Mikroküvette mit einem Volumen von 100 µl und einem Lichtweg von 1 cm verwendet. Dadurch vereinfacht sich das Lambert-Beer Gesetz:

$$A = -lg \left(\frac{E}{E_0}\right) = c \cdot \epsilon \cdot d$$
 zu: $A_{260} = c \cdot \epsilon_{260}$

Geeignete Verdünnungen liefern Absorptionen, die im Bereich von 0,1 - 0,8 liegen.

Für Nukleinsäuren werden folgende Vereinfachungen zur Konzentrationsbestimmung angenommen [158]:

1 A_{260} \triangleq 50 μg/ml doppelsträngige DNA

△ 40 μg/ml einzelsträngige DNA oder RNA

≙ 20 μg/ml Oligonukleodide.

Für ribosomale Partikel aus RRL und für tRNA wird wie folgt vereinfacht:

△ 18 pmol 60S Untereinheit

≜ 1500 pmol tRNA.

Für genauere Berechnungen können die molaren Extinktionskoeffizienten der Basen der Nukleotide oder Ribonukleotide verwendet werden.

Adenin: $\varepsilon_{260} [A] = 1.5 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

Guanin: $\varepsilon_{260} [G] = 1,2 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

Uridin : $\epsilon_{260} [U] = 1.0 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

Cytidin: $\epsilon_{260} [C] = 0.8 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

Thymidin: $\epsilon_{260} [T] = 1.0 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$

Die Berechnung erfolgt aus der Summe der molaren Extinktionskoeffizienten nach Multiplikation mit der jeweiligen Anzahl der Nukleotide. Um den Hyperchromie-Effekt (UV-Löschung durch Basen-*Stacking*) zu beachten, sollte der erhaltene Wert der Konzentration um 10% reduziert werden.

2.4.2 Elektrophoresen

2.4.2.1 Agarose-Gelektrophorese

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA und RNA (0,5 bis 25 kb). Die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode. Standardmäßig werden Agarosekonzentrationen zwischen 1% und 2% für die Trennung eingesetzt.

Für die Herstellung von Agarose-Gelen wird 1x TBE-Lösung mit der entsprechenden Menge Agarose vermischt und im Mikrowellenofen kurz aufgekocht. Die etwas abgekühlte Agaroselösung wird 1:10.000 mit Ethidiumbromid- oder SYBR-Safe-Lösung vermischt und in die Gelkammer gegossen. Durch Einsetzten eines Kunststoffkammes werden die Taschen

zum Probenauftrag erzeugt. Nach dem Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel mit 1x TBE Puffer überschichtet.

Tabelle 2.2 Herstellung eines Agarosegels mit der Agarose-Konzentration n%

Agarose	n g
10x TBE	5 ml
Ethidiumbromid oder SYBR-Safe	5 μ1
Wasser (MQ)	ad 50 ml

Die Probenvorbereitung erfolgt je nach Art der Probe. DNA wird mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Zur qualitativen Analyse von ribosomaler RNA wird diese zunächst mittels TRIzol® -Extraktion isoliert (siehe Kapitel 2.6.6). Die gereinigte RNA wird ebenfalls mit 1/6 Volumen 6x DNA-Probenpuffer versetzt, bei 70°C für 2 min denaturiert und aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgt in beiden Fällen bei 5-10 V / cm mit dem Gelelektrophoresesystem HE33 der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (jetzt GE Healthcare). Nach erfolgter Trennung kann die DNA mit Hilfe der Farbstoffe Ethidiumbromid oder SYBR Safe® detektiert werden. Ethidiumbromid wird durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt und die Emission kann mittels einer Digitalkamera dokumentiert werden. SYBR Safe kann über einen TYPHOON Trio Scanner der Firma GE Healthcare mittels eines Lasers bei 488 nm angeregt werden. Die Emission wird mit diesem Gerät dann bei 520 nm detektiert.

2.4.2.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA (PAGE)

Mit der denaturierenden Polyacrylamid Gelelektrophorese lassen sich bereits sehr kurze Nukleinsäuren auftrennen und analysieren. Einzelsträngige RNA neigt, genau wie Einzelstrang-DNA, zur Bildung von Sekundärstrukturen. Eine saubere Trennung nach Größe wäre durch das somit veränderte Laufverhalten oft nicht mehr möglich. Durch Zugabe großer Mengen Harnstoff kann allerdings eine Auftrennung einzelsträngiger Nukleinsäuren entsprechend ihrer Länge erreicht werden.

Zur Kontrolle der IRES-RNAs zwischen 100 und 500 Nukleotiden werden 6%ige Polyacrylamidgele im TBE-Puffersystem verwendet. Ein solches Gel setzt sich dabei aus folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 2.3 Denaturierendes Polyacrylamidgel, 10 ml

Gelkonzentration	6%	10%	15%	20%
Acrylamid/Bis (19:1) [40%]	1,5 ml	2,5 ml	3,75 ml	5 ml
10x TBE	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Harnstoff [f.c. 7M]	4,2 g	4,2 g	4,2 g	4,2 g
APS [10%]	55 µl	55 µl	55 µl	55 µl
TEMED	5,5 µl	5,5 µl	5,5 µl	5,5 μl
Wasser (MQ)	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml

Zum Gießen der Gele werden HoeferTM Dual Gel Caster der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (jetzt GE Healthcare) verwendet, für die Elektrophorese Gelelektrophorese-Apparatur SE260 derselben Firma. Der Harnstoff wird unter Rühren in der Gellösung gelöst, ein handwarmes Wasserbad beschleunigt diesen Vorgang. Die Lösung wird anschließend filtriert (Faltenfilter, Schleicher & Schuell, 595 ½, Ø 240 mm). Nach Abkühlen im Eisbad wird die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS [10%] initiiert und die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei vorher mit einem 0,75 mm dicken Abstandshalter montierte 10 x 10 cm Glasplatten gegossen. Nach dem Gießen wird ein Geltaschenformer (Kamm) eingesteckt. Das Gel polymerisiert dann in vertikaler Lage. Nach vollständiger Polymerisation wird der Kamm entfernt und das Gel zusammen mit den Glasplatten vorsichtig in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese Kammer wird nun mit 1x TBE-Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Vor Probenauftrag wird das Gel durch einen Vorlauf von 30 min bei 70 mA (~100 V) angewärmt, damit der Harnstoff seine denaturierende Wirkung besser entfaltet. Außerdem sollten die Geltaschen mit Puffer gespült werden, um eventuelle Verunreinigungen und abgesetzten Harnstoff zu entfernen.

Die RNA-Probe wird 1:1 mit 2x Probenpuffer versetzt und 2 min bei 70°C denaturiert. Bis zu 5 μl dieser Lösung wird nun in eine Tasche eingebracht und die Elektrophorese läuft bei 150 V solange, bis die beiden Farbstoffe im Gelmarker (Bromphenolblau, Xylencyanol) die gewünschte Position im Gel erreichen.

Die Glasplatten werden anschließend vorsichtig auseinander genommen, das Gel ausgelöst und in Färbelösung überführt. Im Falle einer Färbung mit Toluidin-Blau wird das Gel ca. 10 min bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schwenken gefärbt. Durch mehrmaliges Waschen für 2 bis 10 min bei RT in Entfärbelösung wird das Gel anschließend entfärbt, bis alle RNA-Banden im Gel deutlich sichtbar sind. Alternativ kann eine Färbung des Gels für

15 min bei RT in SYBR Safe Farbelösung durchgeführt werden. Ein Entfärben des Gels ist dann nicht notwendig. Nach Waschen des Gels durch Schwenken in Wasser kann das Gel dann durch Fotografieren (Toluidin-Blau) oder mittels des TYPHOON Trio Scanners (SYBR Safe) wie in Kapitel 2.4.2.1 dokumentiert werden.

2.4.2.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [93] wird zur Auftrennung von Proteingemischen unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt. Die Trennung der Proteine nach dem diskontinuierlichen Verfahren erfolgt im zweiphasigen Gelsystem. Im Sammelgel werden die SDS-Proteinkomplexe aufkonzentriert. Dies ermöglicht eine scharfe Trennung der Proteine im nachfolgenden Trenngel. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach ihrer molekularen Masse; die Anlagerung von SDS überdeckt die Eigenladung und die Gestalt wird aufgrund der Denaturierung für alle Proteine vergleichbar. Die Anzahl der gebundenen SDS-Moleküle ist dabei abhängig von der Anzahl der Aminosäuren, die resultierende Ladung der SDS-Proteinkomplexe ist somit abhängig vom Molekulargewicht des Proteins.

Für die SDS-PAGE wird die Gelelektrophorese-Anlage MiniVe der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (jetzt GE Healthcare) genutzt. Zur Herstellung der Gele werden die Lösungen nach Tabelle 2.4 zusammengegeben.

Tabelle 2.4 Trenngel, Gelvolumen 20 ml

Acrylamid-Konzentration	10%	12%	15%
Acrylamid / Bis (29:1) [30%]	6,7 ml	8 ml	10 ml
1,5 M Tris / HCl; pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml
SDS [10%]	200 µl	200 µl	200 µl
APS [10%]	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl
Wasser (MQ)	7,9 ml	6,6 ml	4,6 ml

Die Polymerisation des Gels wird durch Zugabe von TEMED und APS [10%] initiiert. Dann wird die Lösung luftblasenfrei in den Hohlraum zwischen zwei vorher zusammen mit einem 1mm-Abstandshalter montierte 10 x 10 cm Glasplatten gegossen, bis dieser zu ca. 2/3 mit Trenngel gefüllt ist. Bis zur vollständigen Polymerisation wird das Gel mit Isopropanol

überschichtet. Dies führt zum Einen zu einer Glättung der Gelgrenze, zum Anderen wird so der Kontakt mit Sauerstoff ausgeschlossen, da dieser die zur Polymerisation notwendigen Radikale abfangen und somit die Polymerisation des Gels stören könnte. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird der Alkohol abgegossen und das Sammelgel nach folgendem Rezept hergestellt.

Tabelle 2.5 Sammelgel, Acrylamid-Konzentration 5%

Gelvolumen	2 ml	4 ml
Acrylamid / Bis (29:1) [30%]	330 µl	670 µl
1 M Tris / HCl; pH 6,8	250 µl	500 μl
SDS [10%]	20 µl	40 µl
APS [10%]	20 µl	40 µl
TEMED	2 μl	4 µl
Wasser (MQ)	1,4 ml	2,7 ml

Auch hier wird die Polymerisation der Lösung wieder durch Zugabe von TEMED und APS [10%] initiiert. Der restliche Hohlraum zwischen den Glasplatten wird nun vollständig mit dieser Sammelgellösung aufgefüllt und ein Geltaschenformer (Kamm) eingesetzt.

Nach vollständiger Polymerisation wird der Kamm entfernt und das Gel mit den Glasplatten vorsichtig in die vertikale Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Kammer wird nun mit Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Geltaschen werden vor dem Probenauftrag mit Puffer gespült, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen.

Vor der eigentlichen Elektrophorese wird zur Einstellung der optimalen Ionenbedingungen ein Vorlauf von 20 min bei 70 V durchgeführt. Für die eigentliche Elektrophorese wird die Probe nun 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und vorsichtig in die Taschen des Gels eingebracht. Die Elektrophorese erfolgt dann für ca. 1 bis 1,5 h bei 150 V.

Nach erfolgter Auftrennung der Probe wird das Gel mit Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schwenken für ca. 3 h gefärbt. Nach Entfernung der Farblösung erfolgt ein Entfärben des Gels durch Schwenken in Entfärbelösung bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind. Alternativ kann eine Silberfärbung mit dem Roti[®]-Black P Silberfärbungskit für Proteine der Firma Carl Roth durchgeführt werden. Nach Waschen des Gels durch Schwenken in Wasser erfolgt die Dokumentation durch Fotografieren des Gels.

2.4.2.4 Native Kompositgel-Elektrophorese (NKGE)

Ribosomen und ribosomale Untereinheiten weisen nach Dahlberg et al. [32] charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit in Polyacrylamid-Agarose-Kompositgelen auf. Diese native Kompositgelelektrophorese (NKGE) wurde entwickelt, um große Proteinkomplexe (>500 kDa) auftrennen zu können und dynamische Protein-Protein Interaktionen in ihrem nativen Zustand analysieren zu können. Dabei wird die große Porengröße der Agarosegele genutzt und mit der höheren mechanischen Festigkeit der Polyacrylamidgele kombiniert. Neben der in Kapitel 2.4.4 beschriebenen Gradienten-Ultrazentrifugation ist die NKGE somit eine weitere Methode zur Analyse von ribosomalen 80S • IRES Komplexen.

Das Gießen des Geles und die anschließende Elektrophorese erfolgen mit denselben Apparaturen, wie für die denaturierende PAGE (Kapitel 2.4.2.3), allerdings befindet sich hier ein 1,5 mm dicker Abstandshalter zwischen den Glasplatten. Ein solches Kompositgel setzt sich dabei aus den in Tabelle 2.6 aufgelisteten Komponenten zusammen. Zur Herstellung des Gels wird zunächst eine 1%ige Agaroselösung in MilliQ-Wasser angesetzt, zum Schmelzen im Mikrowellenofen aufgekocht und leicht abgekühlt.

Tabelle 2.6 Herstellung eines Kompositgels aus 2,5% Polyacrylamid und 0,5% Agarose, Gelvolumen 10 ml

Acrylamid/Bis (37,5:1) [40%]	625 µl
10x THEM	1 ml
Agarose in H ₂ O [1% w/v]	5 ml
APS [10%]	50 μl
TEMED	5 μl
Wasser (MQ)	3,375 ml

Um ein Gelieren der Lösung bis zur endgültigen Verarbeitung im Kompositgel zu verhindern, kann sie auch in einem 45°C-Wasserbad warm gehalten werden. Separat dazu wird die Acrylamidgellösung angesetzt. Nach Zugabe von APS [10%] und TEMED zum Initiieren der Polymerisation kann jetzt der entsprechende Anteil warmer Agaroselösung unter vorsichtigem Rühren zugegeben werden. Das luftblasenfreie Gießen des Gels und das Einstecken des Geltaschenformers (Kamm) müssen jetzt sehr zügig erfolgen, da die Wärme der Agarose die Polymerisation des Acrylamidgel-Anteils beschleunigt. Umgekehrt führt natürlich die Abkühlung der Agarose durch Zugabe zur wesentlich kühleren Acrylamidlösung zum

schnelleren Gelieren des Agarosegel-Anteils.

Nach vollständiger Polymerisation des Kompositgels wird der Kamm vorsichtig entfernt und die Glasplatten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Diese Kammer wird nun mit 1x THEM-Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Vor Probenauftrag erfolgt zur Einstellung der optimalen Ionenbedingungen ein Vorlauf des Gels unter Kühlung (~4°C oder auf Eis) für 30 min bei 300 V. Außerdem müssen die Geltaschen mit Puffer gespült werden, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Nun wird die Probe mit dem entsprechenden 5x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen eingebracht. Die Elektrophorese findet dann ebenfalls unter Kühlung (~4°C oder auf Eis) für ca. 1 h bei 300 V statt. Für die analysierten 80S • IRES Komplexe erfolgt zunächst eine Dokumentation des ungefärbten Gels über einen TYPHOON Trio Scanner der Firma GE Healthcare oder mittels Digitalkamera über einem UV-Tisch. Die in den Komplexen enthaltene IRES-RNA ist Fluoreszenz-markiert (siehe Kap.2.5.6). Die Emission des Fluoreszenzlichtes kann somit auf dem UV-Tisch oder im TYPHOON Trio Scanner (Anregung bei 488 nm) bei 520 nm sichtbar gemacht werden. Anschließend erfolgt die Färbung mit Toluidinblau (siehe auch Kap. 2.4.2.2), um auch den ribosomalen Anteil der Komplexe sichtbar zu machen. Hierfür erfolgt eine zweite Dokumentation des Gels durch Fotografieren.

2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung nach Bradford ist eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Analyse von Proteinen. Sie basiert auf der Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie-Blau mit basischen und aromatischen Aminosäuren des Proteins. In der ungebundenen Form hatt der Farbstoff eine rötliche Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 595 nm und die Protein-Coomassie-Lösung weist jetzt die charakteristische blaue Farbe auf. Außerdem ist der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes viel höher, als der des freien Farbstoffes, wodurch die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Komplexbildung mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagens photometrisch gemessen werden kann. Die Farbreaktion ist dabei allerdings vom Protein abhängig, weshalb eine Kalibrierung mit einem Standard, z.B. BSA (engl. bovine serum albumin) notwendig ist.

Jeweils 800 μl Proteinlösung der entsprechenden BSA-Konzentration (Verdünnungen von 16 bis 1 μg/ml) oder der Probe (ebenfalls mehrere Verdünnungen) werden mit 200 μl unverdünntem Coomassie-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay) versetzt und gründlich gemischt.

Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration der Probe kann anhand der Kalibrierkurve abgelesen werden. Die Konzentration der Probe sollte dabei im linearen Bereich der Kalibrierkurve liegen.

2.4.4 Gradienten-Ultrazentrifugation

Zur Aufreinigung und Analyse ribosomaler Komplexe und deren Untereinheiten wird die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation eingesetzt. Für den Saccharose-Gradienten werden dazu zunächst 10%ige (w/v) und 30%ige (w/v) Saccharose-Lösungen RNase-frei in dem entsprechenden Ribosomenpuffer (R80S bzw. R80S-C für 80S und 80S • IRES-Komplexe, FBB(K) für ribosomale Untereinheiten) angesetzt. Diese können kurzzeitig (max. vier Wochen) bei -20°C oder über einen längeren Zeitraum bei -80°C gelagert werden. In die Zentrifugen-Röhrchen wird luftblasenfrei die 10%ige Lösung etwa bis zur Hälfte eingefüllt und dann mit 30%iger Lösung unterschichtet. Der lineare Gradient wird mit Hilfe des Gradientenmischers Gradient Master der Firma BioComp Instruments, Inc. fertiggestellt.

Die Auftrennung der Proben erfolgt in Ultrazentrifugen der Firma Beckman Coulter in geeigneten Rotoren, hierbei wird die Laufzeit und Drehzahl bzw. Beschleunigungskraft so gewählt, dass eine geeignete Trennung der ribosomalen Partikel erfolgt. Dabei können die Werte für die Zentrifugationszeiten und Drehzahlen der einzelnen Rotoren ineinander umgerechnet werden. Informationen dazu sowie zur Berechnung der Beschleunigungskraft sind auf der Internetseite der Firma Beckman Coulter (http://www.beckmancoulter.com/resourcecenter/labresources/resource_centrif.asp) zu finden. Einige Beispiele der verwendeten Werte sind nachfolgend aufgelistet.

präparativ (ribosomale Untereinheiten):

Rotor SW28: $14 \text{ h} / 21.000 \text{ rpm} (\triangleq 58.000 \text{ x g}) / 4^{\circ}\text{C}$

Rotor SW32: $14 \text{ h} / 22.000 \text{ rpm} (\triangleq 59.000 \text{ x g}) / 4^{\circ}\text{C}$

Rotor 15-Ti: 17 h / 20.000 rpm / 4°C (ZONAL)

präparativ & analytisch (80S • IRES Komplexe):

Rotor SW28: 13 h / 18.500 rpm ($\triangleq 45.000 \text{ x g}$) / 4°C

Rotor SW32: 13 h / 19.000 rpm (≙44.000 x g) / 4°C

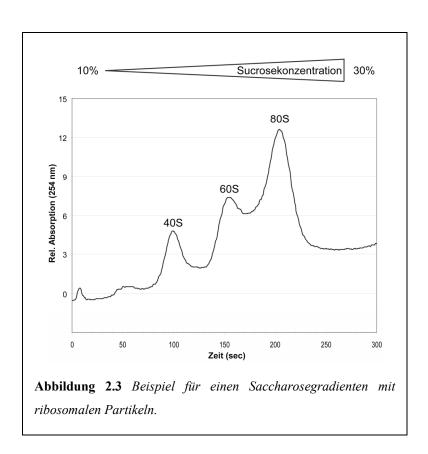
Rotor SW40: 17 h / 17.000 rpm (\triangleq 36.500 x g) / 4°C

analytisch (80S und ribosomale Untereinheiten):

Rotor MLS-50: $2 \text{ h} / 44.000 \text{ rpm} (\triangleq 155.000 \text{ x g}) / 4^{\circ}\text{C}$

Rotor SW55: $2 \text{ h} / 39.000 \text{ rpm} (\triangleq 144.000 \text{ x g}) / 4^{\circ}\text{C}$

Nach der Ultrazentrifugation werden die Gradienten mit dem Piston Gradient Fractionator der Firma BioComp Instruments, Inc. ausgepumpt und die gewünschten Fraktionen mit dem RediFrac Fraktionssammler der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (jetzt GE Healthcare) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Gleichzeitig werden die Gradientenprofile mittels eines Spektralphotometers mit Durchflussküvette (Uvicord™ SII der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH, jetzt GE Healthcare) bei 254 nm aufgezeichnet. Abbildung 2.3 zeigt ein solches Gradientenprofil. Im Falle von 40S • IRES oder 80S • IRES Komplexen erfolgt außerdem eine Messung der FTS-Emission (siehe Kapitel 2.5.6) der einzelnen Fraktionen mittels des TYPHOON Trio Scanners der Firma GE Healthcare.



2.5 Mikrobiologische und molekulargenetische Methoden

2.5.1 Anzucht und Konservierung von E. coli

LB-Medium dient als Standardnährmedium zur Anzucht von *E. coli*-Stämmen. Da alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide ein Ampicillin Resistenzgen aufweisen, wird den LB-Medien jeweils 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt, um plasmidtragende Stämme zu selektionieren. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Wärmeschrank, flüssige LB-Kulturen werden im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien können auf festen Nährmedien erhalten werden (LB-Agarplatten). LB-Agarplatten dienen auch der kurzfristigen Konservierung der *E. coli* Stämme (mehrere Wochen bei 4°C) und der Reaktivierung von Glycerinkulturen.

Glycerinkulturen dienen der Dauerkonservierung. Hierfür werden 700 μ l einer Übernacht-Kultur (LB-Medium) mit 300 μ l einer sterilen 50%igen (v/v) Glycerinlösung versetzt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgt das Schockgefrieren in LN₂ und die anschließende Lagerung bei -80°C.

2.5.2 Restriktionsverdau von DNA

Unter Restriktionsverdau versteht man die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen. Durch Restriktionsendonukleasen können je nach verwendetem Enzym 3'- oder 5'-Überhänge (*sticky ends*) bzw. glatte Enden (*blunt ends*) erzeugt werden. Die Wahl der Restriktionsenzyme hängt von der Aufgabenstellung ab.

Für Klonierungen werden bevorzugt Restriktionsendonukleasen verwendet, die Überhänge erzeugen, da diese eine orientierungsspezifische Ligation des zu klonierenden Fragments (*Insert*) mit dem Zielplasmid (Vektor) erleichtern. Für Restriktionen wird die folgende Faustregel verwendet: Je 1µg Plasmid DNA wird 1 u Restriktionsenzym eingesetzt. Die Reaktion erfolgt bei 37°C im vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer für 1-2 Stunden oder auch über Nacht.

2.5.3 Dephosphorylierung des Klonierungs-Vektors

Um Genfragmente mit hoher Effizienz in geeignete Plasmid-Vektoren zu klonieren, muss eine Religation des Vektors verhindert werden. Zu diesem Zweck wird die Vektor-DNA nach Linearisierung mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dieses Enzym hydrolysiert endständige 5'-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren und unterbindet dadurch eine Re-Ligation des Vektors. Die in dieser Arbeit verwendete Phosphatase aus Kälberdärmen (CIP) wird von der

Firma Roche bezogen. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgt nach Herstellerangaben. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms wird eine Phenol-Chlorophorm Extraktion (siehe Kapitel 2.6.3) mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt, um das denaturierte Enzym zu entfernen.

2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten

T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, NEB) kann DNA-Fragmente, die durch Restriktionsspaltung entstanden sind, wieder miteinander verknüpfen, wenn die Enden der linearen DNA-Fragmente glatt oder komplementär vorliegen. Das Enzym katalysiert dabei die Veresterung eines 5'-Phosphorsäureesters mit einer 3-Hydroxylgruppe. Da die Vektoren in der vorliegenden Arbeit zuvor mit alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert werden, besitzt das rekombinierte DNA-Molekül in beiden Strängen je einen Einzelstrangbruch, an dem eine 3'-Hydroxylgruppe des *Inserts* auf eine 5'-Hydroxylgruppe des Vektors trifft. Dennoch ist das DNA-Molekül stabil genug für eine Transformation in eine Bakterienzelle, in der Reparaturenzyme den Einzelstrangbruch beheben können.

Für die Ligationsreaktion werden die gereinigten DNA-Fragmente (*Insert* und Vektor) in einem molaren Verhältnis von 5:1 (*Insert* zu Vektor) eingesetzt.

Berechnung der DNA-Menge:
$$ng_{lnsert} = 5 \times ng_{vector} \times \frac{bp_{lnsert}}{bp_{vector}}$$

Der gesamte Ligationsansatz enthält 1/10 Volumen 10x T4-Ligase-Puffer (NEB) und 1/10 Volumen T4-DNA-Ligase (NEB). Nach Inkubation der Reaktionsansätze bei 14°C für ca. 1 Stunde können diese in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert werden.

2.5.5 Transformation

Die Transformation wird genutzt, um rekombinante DNA, nach Ligation von DNA-Abschnitten in einen Vektor, in Bakterien einzubringen.

Jeweils 50 µl der zur Transformation bestimmten chemokompetenten *E. coli*-Zellen (TOP10 oder INV110) werden auf Eis aufgetaut, vorsichtig mit 20 µl eines Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C, nachdem die Bakterien kurz auf Eis abgekühlt sind. Nun werden 500 µl des auf 37°C vorgewärmten, antibiotikafreien LB-Mediums zugegeben und der gesamte Ansatz wird für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In dieser Zeit können die transformierten Bakterien die jeweilige Antibiotikaresistenz ausbilden, bevor sie auf einer LB-Agarplatte ausplattiert

werden, die das für die Selektion notwendige Antibiotikum enthält. Die transformierten Zellen wachsen auf den Agarplatten bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht zu Kolonien heran.

2.5.6 Fluoreszenzmarkierung von HCV IRES - RNA nach Wu et al. [200]

Die Fluoreszenzmarkierung ist ein Prozess, bei dem ein Fluorophor kovalent an ein anderes Molekül (Proteine oder Nukleinsäuren) gebunden wird. Gewöhnlich wird dazu ein reaktionsfähiges Derivat des Fluorophores verwendet, das selektiv an eine funktionelle Gruppe des Zielmoleküls verknüpft wird.

In der vorliegenden Arbeit wird Fluorescein-5-thiosemicarbazid (FTS; siehe Abbildung 2.4) verwendet, um IRES RNA am 3'-Ende zu markieren. Die bei den herkömmlichen Methoden zur radioaktiven Markierung entstehenden Risiken können so vermieden werden.

3.000 pmol IRES RNA aus der *in vitro*-Transkription (vgl. Kapitel 2.6.9) liegen in Wasser gelöst vor und werden mit Natriumacetat-Puffer (f.c. 0,25 M; pH 5,5) versetzt. Natriumperiodat wird verwendet, um das 3'-Ende der RNA zu Dialdehyd zu oxidieren. Das molare Verhältnis von Natriumperiodat zu RNA beträgt dabei 10:1. Die Oxidation erfolgt für 90 min bei 25°C. Die Zugabe eines 2-fachen Überschusses von Natriumsulfit über Natriumperiodat sorgt für die Entfernung von überschüssigem Oxidans. Der Ansatz wird dazu für weitere 15 min bei 25°C inkubiert. Nun wird der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-5-thiosemicarbazid (FTS) zugegeben und das 3'-Ende der RNA somit durch eine Kondensationsreaktion zwischen Carbazid und Aldehyd markiert; das molare Verhältnis von

FTS zu RNA beträgt 30:1. Nach Inkubation der Markierungsreaktion für 3 h bei 37°C im Dunkeln wird die markierte HCV IRES - RNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 8 M Lithiumchlorid und 2,5 Vol. Ethanol bei -20°C über Nacht ausgefällt. Die RNA wird für 30 min bei 16.000 x g und 4°C pelletiert und dreimal mit 75% Ethanol gewaschen, um freien Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen. Die RNA wird nun wieder in Wasser gelöst. Zum Schluss erfolgt eine photometrische Messung der RNA (A_{260}) und der FTS-Fluoreszenz (A_{450}) zur Konzentrationsbestimmung und Berechnung der Markierungsausbeute.

Berechnung der Markierungsausbeute:

Extinktionskoeffizient RNA:
$$\varepsilon_{260} = \frac{1,125 \cdot 10^4}{\text{M} \cdot \text{cm}} \cdot \text{Anzahl nt}$$

Extinktionskoeffizient FTS (Max. 492 nm): 78.500 cm⁻¹ • M⁻¹

$$\frac{\epsilon_{260}RNA}{\epsilon_{492}FTS} = Faktor A$$

$$\frac{A_{260}RNA}{A_{450}FTS} \ = \ Faktor \ B$$

$$\frac{\text{Faktor A}}{\text{Faktor B}} \bullet 100 = \text{Markierungsausbeute } \%$$

Das Absorptionsmaximum des an die RNA gebundenen FTS ist hierbei von 492 nm (ungebunden) auf 450 nm verschoben!

2.5.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifikation von DNA durch mehrfache Zyklen einer *in vitro* DNA-Replikation. Für eine Standard-PCR werden neben geringen Mengen der zu vervielfältigenden DNA (Matrize) noch Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTP's), zwei unterschiedliche zur Template-DNA komplementäre Oligonukleotide (Primer) und eine thermostabile DNA-Polymerase als synthetisierendes Enzym, in diesem Fall die Platinum® Pfx DNA-Polymerase der Firma Invitrogen, benötigt. Eine typische PCR-Reaktion besteht aus drei Schritten, die insgesamt 30-mal zyklisch wiederholt werden (Tabelle 2.7).

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]
(Denaturierung	94	500)
Denaturierung	94	15
Annealing	55	30
Elongation	68	30
Endsynthese	68	600
Kühlung	4	

Die sogenannte *Annealing*-Temperatur (T_m) variiert je nach Länge und GC-Gehalt der Primer. Für alle verwendeten und in Tabelle 2.8 aufgelisteten Primer wird die T_m nur für den komplementären Bereich benötigt, daher ist eine näherungsweise Berechnung (für kurze Primer mit einer Länge um 20 Basen) der T_m des Primers aus dessen GC-Gehalt ausreichend (2+4 Regel):

$$T_m = 2 \cdot (Anzahl \ A \ bzw. \ T) + 4 \cdot (Anzahl \ G \ bzw. \ C)$$

Zum Teil werden in der Reaktion Primer mit sehr unterschiedlichen Annealing-Temperaturen verwendet. Die gesamte PCR-Reaktion wird dann zunächst 10 Zyklen mit der niedrigeren Annealing-Temperatur durchgeführt, gefolgt von weiteren 20 Zyklen mit der höheren T_m. Für die in dieser Arbeit verwendete Platinum[®] Pfx DNA-Polymerase der Firma Invitrogen beträgt die ideale Elongationstemperatur T = 68°C. Der Vorteil dieser Polymerase gegenüber der herkömmlichen Taq-Polymerase besteht in ihrer zusätzlichen 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (proofreading) und somit deutlich verminderter Fehlerrate während der Amplifikation. Ein Reaktionsansatz enthält immer 50 ng Matrizen-DNA und 1 u Pfx DNA-Polymerase. Die Konzentration der entsprechenden dNTPs ist jeweils 0,3 mM, die der Primer jeweils 0,3 µM und die MgSO₄ Konzentration liegt bei 1 mM. Zur Verbesserung der PCR-Effektivität wird zusätzlich die Konzentration des Polymerase-Reaktionspuffers getestet. Eine 2-fach Pufferkonzentration in Kombination mit dem mitgelieferten PCR-Enhancer erweist sich hier als am besten geeignet. Alle PCR-Produkte werden mit dem Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt. Das Ergebnis wird zusammen mit einer Negativ-Kontrolle ohne Primer auf einem 1,5% TBE-Agarosegel überprüft.

Tabelle 2.8 PCR-Primer zur Erstellung getaggter HCV IRES ΔdI - Konstrukte. Die komplementären Bereiche sind fett-kursiv gedruckt, T7-Promotorsequenzen sind unterstrichen, eingefügte Restriktionsschnittstellen und tag-Sequenzen wurden farbig markiert. HindIII = violett, XbaI = orange, XhoI = blau, StM-tag A = rot, MS2-tag = grün.

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
HCV-F1	CCCAAGCT <u>TAATACGACTCACTATA</u> GGA <i>CTCCCCTGTGAGGAACTAC</i>	60
StreptoFwd	CGAAGCT <u>TAATACGACTCACTATA</u> GGATCGCATTTGGACTTCTGCCC AGGGTGGCACCACGGTCGGATCCTAGACTGGTACTCGAGACTCCCCT GTGAGGAACTACTGT	60
MS2Fwd1	ATCAGGGTACGACTAGATCTCGTACACCATCAGGGTACGTCGA GTGGTACCGATCCTCGAGACTCCCCTGTGAGGAACTACTGT	60
MS2Fwd2 (komplementär zu MS2Fwd1)	CGAAGCT <u>TAATACGACTCACTATA</u> GCGTACACCATCAGGGTACGAG CTAGCCCATGGCGTACACC <i>ATCAGGGTACGACTAGC</i>	52
HCV-R1	CTAGTCTAGACGTTTGGTTTTTCTTTG	46
StreptoRev	CTAGTCTAGAGGATCCGACCGTGGTGCCACCCTGGGCAGAAGTCCA AATGCGATCCTGAACTGCATCTCGAGCGTTTGGTTTTTCTTTGAGG	56
MS2Rev1	GCTAGTCGTACCCTGATGGTGTACGCCATGGGCTAGCTCGTACCCTG ATGGTGTACGCGATCGGTACATCGAATCTCGAGCGTTTTGTTTTTT TGAGG	56
MS2Rev2 (komplementär zu MS2Rev1)	CTAGTCTAGACGTACCCTGATGGTGTACGAGATCTAGCTAG	52

Die Herstellung der unter Kapitel 2.2.2.1 und in Abbildung 2.1 beschriebenen getaggten HCV IRES ΔdI - Konstrukte erfolgt mit den in Abbildung 2.5 schematisch dargestellten Primern. Als Matrize dient das Plasmid MD01_HCV IRES 40-379 #2. Die Sequenz der Primer ist zusätzlich in Tabelle 2.8 angegeben, ebenso die T_m der Primer für den komplementären Bereich.

Zur Klonierung der ge*tag*gten Wildtyp(wt)-HCV IRES-Konstrukte wird zunächst mittels PCR eine *Xho*I-Schnittstelle in das Plasmid YP63_HCV IRES eingeführt. Für die 5'-ge*tag*gten Konstrukte befindet sich diese Schnittstelle direkt am 5'-Ende der wt-IRES Sequenz, für die 3'-ge*tag*gten Konstrukte direkt am 3'-Ende der wt-IRES Sequenz. Die Sequenz und T_m dieser Primer ist in Tabelle 2.9 angegeben. Die ge*tag*gten wt-HCV IRES-Konstrukte werden dann allerdings mittels Oligoklonierung (siehe Kapitel 0) fertiggestellt, die PCR-Primersequenzen sind daher hier nicht aufgelistet.

Tabelle 2.9 *PCR-Primer zur Erstellung von wt-HCV IRES-Konstrukten mit Xho*I-Schnittstelle. Die komplementären Bereiche sind fett-kursiv gedruckt, T7-Promotorsequenzen sind unterstrichen, eingefügte Restriktionsschnittstellen wurden farbig markiert. HindIII = violett, XbaI = orange, XhoI = blau.

Name	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
HCV XhoI-F1 (für 5'-XhoI)	CGAAGCT <u>TAATACGACTCACTATA</u> CTCGAGGCCAGCCCCCTGATGGG GGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGT	60
HCV-R1	siehe Tabelle 2.8	46
HCV-F2	CCCAAGCT <u>TAATACGACTCACTATA</u> GCCAGCCCCCTGATGGGGGCGA CACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTAC	60
HCV XhoI-R2 (für 3'-XhoI)	CTAGTCTAGATCGAATCTCGAGCGTTTGGTTTTTCTTTGAGG	56

2.5.8 Oligoklonierung

Alternativ zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Methode, mittels PCR längere Sequenzen in ein Plasmid einzufügen, wird in dieser Arbeit ebenfalls die Oligoklonierung verwendet. Vor allem das Problem der Sekundärstrukturbildung des MS2-Aptamers (3 Haarnadelschleifen) während der PCR und der daraus resultierenden Sequenzlücken im PCR-Produkt kann so umgangen werden. Aber auch für die nachfolgende Herstellung der MS2-getaggten Vollänge-HCV IRES-Konstrukte und des TOB-tag HCV IRES-Konstruktes erweist sich dieses Vorgehen als einfach und effizient.

Extralange komplementäre DNA-Oligonucleotide bis 200 Basen werden von der Firma Biomers (http://www.biomers.net) bezogen. Die Sequenzen dieser Oligos sind in

Tabelle 2.10 aufgelistet. Die 5'-Oligos enthalten dabei neben der Aptamer-Sequenz den T7-Promotor, eine *Hind*III sowie eine *Xho*I Schnittstelle, die 3'-Oligos enthalten alle die jeweilige Aptamer-Sequenz, eine *Xho*I sowie eine *Xba*I Schnittstelle. Die jeweils komplementären Oligopaare (sense und antisense) werden 1:1 gemischt und bei ihrer jeweiligen T_m (ca. 95°C) für 5 min denaturiert. Das Hybridisieren findet dann für 10 min bei 37°C und langsamem Abkühlen auf Raumtemperatur für 15-30 min statt. Die nun doppelsträngigen Oligonukleotide können mit den entsprechenden Restriktionsenzymen analog zum Klonierungsvektor geschnitten und in diesen eingefügt werden.

Tabelle 2.10 Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide zur Erstellung MS2- bzw. TOB-getaggter HCV IRES ∆dI - Konstrukte. T7-Promotorsequenzen sind unterstrichen, eingefügte Restriktionsschnittstellen und tag-Sequenzen wurden farbig markiert. HindIII = violett, XbaI = orange, XhoI = blau, TOB-tag = dunkelblau, MS2-tag = grün.

Name	Sequenz (5' → 3')
5'-MS2sense	CGAAGCT <u>TAATACGACTCACTATA</u> GCGTACACCATCAGGGTACGAGCTAGCCC ATGGCGTACACCATCAGGGTACGACTAGCTAGATCTCGTACACCATCAGGGTA CGTCGAGTGGTACCGATCCTCGAGACT
5'-MS2antisense	AGTCTCGAGGATCGGTACCACTCGACGTACCCTGATGGTGTACGAGATCTAGC TAGTCGTACCCTGATGGTGTACGCCATGGGCTAGCTCGTACCCTGATGGTGTAC GCTATAGTGAGTCGTATTAAGCTTCG
3'-MS2sense	AACGCTCGAGATTCGATGTACCGATCGCGTACACCATCAGGGTACGAGCTAGC CCATGGCGTACACCATCAGGGTACGACTAGCTAGATCTCGTACACCATCAGGG TACGTCTAGACTAG
3'-MS2antisense	CTAGTCTAGACGTACCCTGATGGTGTACGAGATCTAGCTAG
3'-TOBsense	AACGCTCGAGATTCGATGTACCGATCTATGGATACGATTGATGGGGCTTAGTG CGAGGTTTAGCTACACTCGTGCTGAGCCTCTAGACTAG
3'-TOBantisense	CTAGTCTAGAGGCTCAGCACGAGTGTAGCTAAACCTCGCACTAAGCCCCATCA ATCGTATCCATAGATCGGTACATCGAATCTCGAGCGTT

2.6 Präparative Methoden

2.6.1 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* kann mittels Plasmidisolierungs-Kits der Firma Qiagen erfolgen. Dabei werden je nach benötigter Plasmidmenge das Qiaprep Miniprep Kit bzw. Qiagen Midi oder Maxi Plasmid Kit verwendet. Die Isolierung der Plasmide basiert auf einer modifizierten Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly [12]. Nach Aufschluss der Bakterienzellen erfolgt die Adsorption der Plasmid-DNA an Silikagel-Säulen (Miniprep) oder Anionentauscher-Säulen (Midi und Maxi prep). Die Reinigung der Plasmid-DNA wird durch Waschen der Säulen erzielt. Bei der Miniprep erfolgt die Elution mit geringer Salzkonzentration (Wasser oder 10 mM Tris / HCl; pH 8,5); das erhaltene Eluat enthält das gereinigte Plasmid. Bei Verwendung der Anionentauschersäulen (Midi und Maxi prep) erfolgt die Elution unter Hochsalzbedingungen.

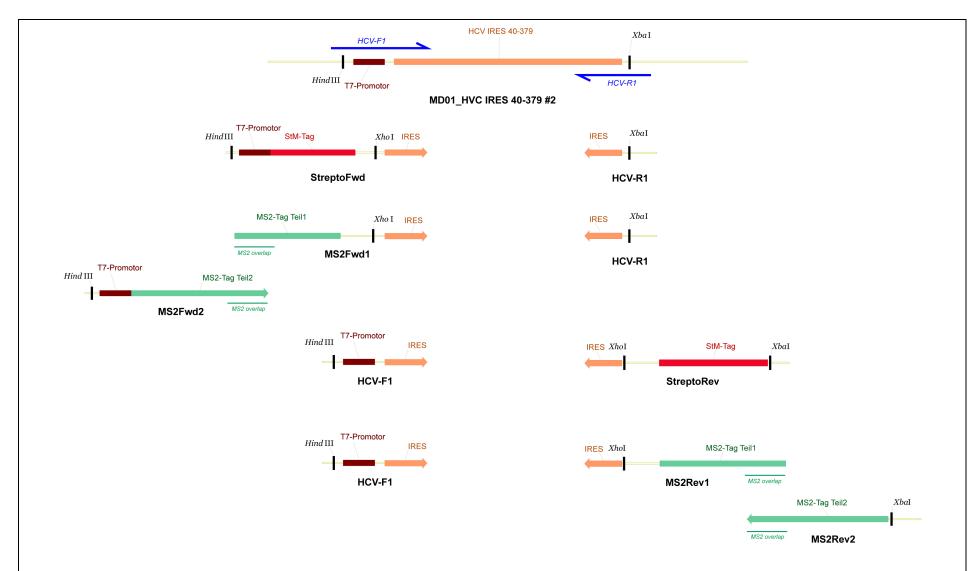


Abbildung 2.5 Schematische Übersicht über die Matrize MD01_HCV IRES 40-379#2 und die verwendeten PCR-Primer. Die Positionen der vollständig komplementären Primer HCV-F1 (forward) und HCV-R1 (reverse) sind stellvertretend für alle anderen Primer in Blau angegeben. Für die StM- oder MS2-tag enthaltenden Primer sind jeweils nur die orangen IRES Bereiche komplementär zur Matrize.

Die Plasmid-DNA kann mit Isopropanol aus dem Eluat präzipitiert werden. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben. Abweichend von den Herstellerangaben wird auf die Inkubation mit RNase A verzichtet, um Laborkontamination mit RNase zu vermeiden. 2 ml einer 5 ml LB-Übernachtkultur werden für die Plasmid-Minipräparation verwendet. Eine 50 ml LB-Übernachtkultur wird für die Midipräparation und eine 200 ml Übernachtkultur für die Maxipräparation verwendet.

2.6.2 Reinigung von DNA über Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Isolierung und Reinigung kleiner Mengen DNA-Fragmente kann nach Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese direkt aus dem Agarosegel erfolgen. Unter UV-Licht sichtbar gemachte DNA (Ethidiumbromid-Methode) kann mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Die Isolierung und Reinigung der DNA aus diesem Gelstück erfolgt mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

Alternativ kann eine solche Gelextraktion auch mit der optimierten Freeze & Squeeze-Methode nach Tautz & Renz [184] durchgeführt werden. Das aus einem Agarosegel gewonnene Gelstück wird dafür zunächst für 15 bis 45 min (je nach Gelkonzentration und Größe des Gelstückes) in 10 Vol. Freeze & Squeeze-Puffer A in einem Überkopfschwenker bei Raumtemperatur äquilibriert. Während dieser Zeit werden die für die Extraktion benötigten Säulen hergestellt. Dazu wird in den Boden eines 0,5 ml Reaktionsgefäßes mit einer heißen Nadel eine Öffnung gestochen und anschließend diese Öffnung mit silanisierter Glaswolle gestopft. Das äquilibrierte Gelfragment (max. 150 µl) wird in das präparierte Reaktionsgefäß überführt, das wiederum in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt wird. In dieser Konstruktion wird das Gelfragment in LN₂, Trockeneis oder -80°C (mindestens für 30 min oder über Nacht) eingefroren, was zur Zerstörung der Gelmatrix führt. Noch im gefrorenen Zustand wird das Gelstück bei Raumtemperatur zentrifugiert (12.000 x g, 10 min). Das Eluat enthält die DNA, welche zur Aufreinigung und Konzentrierung einer modifizierten Ethanolfällung unterzogen wird. Dazu wurde das Eluat mit 1/100 Vol. Freeze & Squeeze-Puffer B sowie 2,5 Vol. abs. Ethanol versetzt, für 10 min bei -80°C oder für mindestens 30 min bis über Nacht bei -20°C inkubiert und dann bei RT abzentrifugiert (16.000 x g, 15 min). Eine Zugabe von NaAc erfolgt nicht, da es bereits im Äquilibrierungspuffer enthalten ist. Das Präzipitat wird dann zweimal, erst mit 70% Ethanol / 100 mM NaAc (pH 6), dann nur mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in H₂O oder 1xTE gelöst.

2.6.3 Phenol-Chloroform Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Die Nukleinsäure-haltige Lösung wird mit 1 Volumen Phenol-Chlorophorm Lösung versetzt und kräftig durchmischt. Die anschließende Phasentrennung wird durch Zentrifugation (10 min, 10.000 x g) beschleunigt. Das Phenol denaturiert die anwesenden Proteine, die ausfallen und sich in der Interphase zwischen oberer hydrophiler und unterer hydrophober (organischer) Phase ansammeln. In der hydrophilen (wässrigen) Phase verbleibt die Nukleinsäure und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine zweimalige Wiederholung dieses Vorgangs erhöht die Reinheit des Endproduktes. Die wässrige Phase wird dann mit 1 Vol. Chloroform versetzt, wieder kräftig durchmischt und zentrifugiert (10 min, 10.000 x g). Die obere wässrige Phase wird abermals in ein neues Gefäß überführt und die DNA aus dieser durch Ethanolfällung isoliert. Da sich Phenol viel besser in Chloroform löst als in Wasser, wird durch eine gleichzeitige Extraktion mit Phenol und Chloroform verhindert, dass Phenolreste in der wässrigen (nukleinsäurehaltigen) Phase zurückbleiben und nachfolgende Reaktionen stören.

2.6.4 Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Ethanol-Präzipitation wird eingesetzt, um Nukleinsäuren zu konzentrieren oder niedermolekulare Bestandteile, Phenol- und Chloroformrückstände zu entfernen. In Anwesenheit relativ hoher (0,1 - 0,5 M) Konzentrationen monovalenter Kationen induziert Ethanol eine Dehydratisierung und Konformationsänderung der Nukleinsäuremoleküle, was zu deren Aggregation und Präzipitation aus wässrigen Lösungen führte.

Durch Zugabe von 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5) wird eine geeignete Kationenkonzentration eingestellt. Für die RNA-Präzipitation kann auch 8 M Lithiumchlorid Lösung verwendet werden, da diese nicht in der Lage ist DNA, Proteine oder Kohlenhydrate zu präzipitieren. Durch Zugabe von 2,5 Vol. absolutem Ethanol (-20°C), unterstützt durch Zentrifugation (30 min, 10.000 x g, 4°C) erfolgt die Fällung der Nukleinsäure. Der Überstand wird dekantiert und das erhaltene Präzipitat mit 70%igem (v/v) Ethanol (-20°C) gewaschen, um Salz und kleine organische Moleküle zu entfernen. Zentrifugation (15 min, 10.000 x g, 4°C) stabilisiert das Präzipitat während des Waschens. Der Überstand wird dekantiert und das Präzipitat bei Raumtemperatur oder 37°C getrocknet. Anschließend wird das Präzipitat in einem geeignetem Volumen Pufferlösung oder destilliertem Wasser aufgenommen.

2.6.5 TCA-Fällung von Proteinen

Proteine fallen in Gegenwart von 5-10 % Trichloressigsäure (TCA) irreversibel aus. Diese schnelle, einfache und quantitative Methode wird bei der Analyse kleiner Proteinmengen verwendet.

Es werden zu 4 Volumina Protein-Lösung 1 Volumen 50% (w/v) TCA gegeben (f.c. 10%) und 20 min bei 60°C inkubiert. Die gefällten Proteine werden dann 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Präzipitat kann nun direkt in SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE resuspendiert werden. Das Bromphenolblau im Probenpuffer dient dabei als pH-Indikator; ist der pH Wert zu niedrig, kann dieser mit Ammoniakdampf nachjustiert werden.

2.6.6 RNA-Extraktion mit TRIzoL® LS

Die selektive RNA-Extraktion aus Lösungen mittels TRIzoL[®] LS (Invitrogen) basiert auf der sogenannten *single-step* Methode von Chomczynski & Sacchi [29]. Das TRIzoL[®] LS Reagenz ist eine einphasige Denaturierungslösung von saurem Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC). GTC ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine denaturiert und inaktiviert. Saures Phenol entfernt nicht nur Proteine, sondern durch die Absenkung des pH-Wertes auch DNA.

Für die Isolierung von RNA aus Ribosomen werden 750 μl TRIzol.® LS Reagenz je 250 μl Probe (3:1) mit der Probenlösung vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform je 750 μl TRIzol.® LS Reagenz und gründlichem Mischen wird wieder für 2 bis 15 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die entstandene obere wässrige Phase (ca. 50 bis 70% des Gesamtvolumens) enthält die gewünschte RNA und wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Ausfällen und Reinigen der RNA erfolgt durch Zugabe und gründliches Vermischen von 1/10 Vol. 3M NaAc (pH 5,5) und 500 μl Isopropanol je 750 μl TRIzol.® LS Reagenz. Das Ganze wird abermals bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und dann 15 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Präzipitat wird mit 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen, getrocknet und in H₂O gelöst.

2.6.7 Überexpression und Aufreinigung des GST-MS2-Fusionsproteins

Die Affinitätschromatographie MS2-ge*tag*gter 80S • IRES Komplexe (siehe Kapitel 2.6.11) benötigt ein GST-MS2-Fusionsprotein. Überexpression und Aufreinigung erfolgen dabei weitestgehend nach Youngman et al. [203]. *E.coli* BL21(D3) Zellen mit dem Plasmid pGST-

MS2 werden in Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD $_{600}$ von ~0,6 inkubiert. Sobald dieser Wert erreicht ist, wird die Kultur im Wasserbad auf 20°C abgekühlt und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (f.c. 0,1 mM) induziert. Es folgt eine weitere Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Die Zellernte geschieht dann durch Zentrifugation für 10 min bei 4.000 x g. Das entstandene Zellpellet wird daraufhin in 25 ml Lysis-Puffer I je Liter Kultur resuspendiert, die Zellen werden durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (5 min, 4.000 x g) erneut pelletiert und das Pellet in LN $_2$ schockgefroren. Diese Zellpellets werden dann vor ihrem Aufschluss innerhalb von 10 min im Wasserbad aufgetaut und in 25 ml Lysis-Puffer II je Liter Kultur wieder resuspendiert. Es folgt die Zugabe von 125 μ l DNase I [2 u/ μ l] (Ambion) je Liter Kultur, Inkubation der Zellsuspension für 25 min bei Raumtemperatur und Klärung des Lysates durch wiederholte Zentrifugation bei 9.600 x g und 25°C. Die vollständige Klärung des daraus resultierenden Überstandes geschieht mittels Ultrazentrifugation für 3 min bei 25.000 rpm und 25°C im MLA-80-Rotor (Beckman Coulter) und anschließender Filtration durch Filter mit der Porengröße 1,2 μ m und 0,45 μ m.

Die Durchführung einer Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose 4B der Firma GE Healtcare isoliert das GST-MS2-Fusionsprotein aus dem Zelllysat. Das Resin wird dazu zunächst mit 1x PBS äquilibriert, dann mit dem Lysat gemischt und 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Suspension wird anschließend in eine PD10-Säule (GE Healthcare) überführt und der Durchfluss aufgefangen. Es folgt ein Waschen der Säule mit 100 ml 1 x PBS je Liter Kultur und Elution des Fusionsproteins mit 20 ml Elutionspuffer je Liter Kultur. Bei beiden Schritten, Waschen und Elution, wird der Durchfluss gesammelt. Nach dreimaliger Dialyse des Eluates gegen Puffer L zum Entfernen des Glutathions wird die Konzentration des Proteins nach Bradford (Kapitel 2.4.3) bestimmt, das Protein aliquotiert und nach Schockgefrieren in LN2 bei -80°C gelagert.

2.6.8 Isolierung von ribosomalen Untereinheiten aus RRL

Beide nachfolgend beschriebenen Methoden zur Isolierung ribosomaler Untereinheiten aus Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (RRL) sind in dieser Arbeit verwendet worden, wobei letzterer aufgrund höherer Reinheit der 60S-Untereinheiten der Vorzug gegeben wurde. Beide Protokolle starten mit vorsichtigem Auftauen von 50 ml RRL (Green Hectares, USA) bei 4°C unter Zugabe einer Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail (ohne EDTA; Roche Applied Science) je 50 ml RRL und Pelletieren des RRLs durch Ultrazentrifugation bei 4°C, 40.000 rpm (≜ 145.000 x g) für 3 h in einem 50.2-Ti-Rotor (Beckman Coulter), resultierend

in einem kruden RRL-Pellet. Die Zugabe von Puromycin, einem A-Stellen-Analogon (siehe Abbildung 2.6) und die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in Hochsalzpuffer (500 mM KCl) sind in beiden Protokollen wesentliche Bestandteile zur Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten [14].

Um eine Kreuz-Kontamination der 40S und 60S Untereinheiten zu vermeiden, muss bei beiden Protokollen darauf geachtet werden, nur die *Peak*-Fraktionen zu sammeln und "Schultern" zu verwerfen. Laut Pisarev et al. führen Aufkonzentrieren der Untereinheiten und Pufferaustausch durch Pelletieren am Ende beider Protokolle zu einem teilweisen Verlust der Aktivität der Untereinheiten. Sie schlagen daher die schnellere und sanftere Aufkonzentrierung der ribosomalen Untereinheiten mittels Amicon Ultra-15 YM-100 Zentrifugen-Filtern (Millipore corporation) mit gleichzeitigem Pufferaustausch zu Puffer B bzw. Puffer 5 vor. Aufgrund des hohen Materialverlustes (Ribosomen) dieser Methode werden die Millipore-Filter in dieser Arbeit jedoch nicht eingesetzt.

Abbildung 2.6 Strukturformel von Puromycin. Das Nucleosid-Antibiotikum ist ein Translations-Inhibitor, der an die ribosomale A-Stelle bindet. Ein Teil des Moleküls ähnelt dem 3'-Ende (CCA) von Aminoacyl-tRNAs. Die sich in der Elongation befindliche Polypeptidkette kann somit auf den Pseudoaminosäurearm des Puromycins übertragen werden und es kommt zu einer verfrühten Termination der Translation.

Protokoll 1, modifiziert nach Pisarev et al. [142]:

Krude RRL-Pellets und Zentrifugenröhrchen werden 3- bis 4-mal kurz mit je 1 ml AS₂₅₀K₁₅₀ gewaschen und innen vorsichtig mit Kleenex getrocknet. Erst jetzt werden die Pellets in Puffer AS₂₅₀K₁₅₀ für ca. 1 bis 2 Stunden bei 4°C vorsichtig resuspendiert (dabei wird mit 1 ml Puffer je Röhrchen begonnen). Nach photometrischer die Konzentrationsbestimmung dieser Polysomen-Suspension bei 260 nm wird die Lösung auf 50 bis 150 A₂₆₀/ml eingestellt. (Eventuell kann hier bis auf 500 A₂₆₀/ml eingestellt werden, da nur ca. 20% der gemessenen A₂₆₀ auf Ribosomen zurückzuführen sind.) Frisch angesetztes Puromycin in Puffer A (f.c. 1 mM; pH 7,5) wird zugegeben und nach 10minütiger Inkubation auf Eis (0°C) für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Salzkonzentration wird mit 1/10 Vol. 4 M KCl in Puffer A unter vorsichtigem Rühren auf Eis auf eine Endkonzentration von 500 mM justiert.

In der Zwischenzeit können sechs Gradienten (10-30% Saccharose in Puffer AK_{500}) wie unter Kapitel 2.4.4 beschrieben hergestellt und auf 4°C gekühlt werden. Je Gradient werden dann 700 µl der Puromycin-behandelten Ribosomen (max. 300 A_{260} /Gradient) vorsichtig durch Überschichten aufgetragen und im SW28- bzw. SW32-Rotor (Beckman Coulter) bei 4°C und 21.000 rpm bzw. 22.000 rpm ($\triangleq \sim 58.000 \text{ x g}$) zentrifugiert. Nach der Ultrazentrifugation werden die Gradienten ausgepumpt und 600 µl-Fraktionen möglichst auf Eis gesammelt. Gleichzeitig erfolgt die Aufzeichnung der Gradientenprofile mittels eines Spektralphotometers mit Durchflussküvette bei 254 nm. Die Fraktionen mit den 40S- bzw. 60S-Untereinheiten werden jeweils vereinigt und 1:1 mit 1x Puffer A verdünnt. Zum Pufferaustausch und um die ribosomalen Untereinheiten zu konzentrieren werden diese bei 4°C und 45.000 rpm ($\triangleq 184.000 \text{ x g}$) für 18 bis 20 h im 50.2-Ti-Rotor pelletiert. Die Pellets werden zuletzt in Puffer B gelöst, aliquotiert, nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei 260 nm in LN₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Protokoll 2, modifiziert nach Bommer et al. [16]:

Die kruden RRL-Pellets und Zentrifugenröhrchen werden kurz mit je 1 ml Puffer 3 gewaschen, die Röhrchen innen mit Kleenex getrocknet und die Pellets dann vorsichtig in 1 bis 2 ml Puffer 3 bei 4°C resuspendiert. Die Polysomen-Suspension wirde auf eine Endkonzentration von 20 mg Ribosomen je ml eingestellt. Laut Bommer et al. entsprechen dabei 13 A₂₆₀/ml einer Ribosomen-Konzentration von 1 mg/ml. Die Salzkonzentration wird nun mit 250 μl 2 M KCl je ml Polysomen-Suspension auf 500 mM eingestellt. Die gesamte Lösung muss nun mit frisch angesetzter Puromycin-Lösung (f.c. 1 mg je 100 mg Ribosomen) versetzt und mit Puffer 3 (0,5 M KCl !) auf 10 mg Ribosomen je ml weiterverdünnt werden.

Es folgt eine Inkubation für 30 min auf Eis (0°C) und anschließend für 15 min bei 37°C. Zum Klären der Suspension wird eine kurze Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm in der Tischzentrifuge durchgeführt. Der Überstand wird, analog zu Protokoll 1, auf sechs Gradienten (10-30% Saccharose in Puffer 6) aufgetragen und im SW28- bzw. SW32-Rotor zentrifugiert. Die Gradienten werden ausgepumpt, fraktioniert und die 40S- bzw. 60S-Fraktionen jeweils vereinigt. Diese Suspensionen werden dann mit 0,6 Vol. Puffer 7 verdünnt und bei 4°C, 45.000 rpm (≜ 184.000 x g) für 18 bis 20 h im 50.2-Ti-Rotor pelletiert. Die Pellets werden zuletzt in Puffer 5 gelöst, aliquotiert, nach photometrischer Konzentrationsbestimmung in LN₂ schockgefroren bei -80°C gelagert.

Beide Protokolle sind ebenso für die Isolierung ribosomaler Untereinheiten im großen Maßstab geeignet. Ausgehend von einem Anfangsvolumen von bis zu 300 ml RRL werden alle weiteren Schritte werden entsprechend dem größeren Volumen angepasst. Die Saccharosedichtegradienten-Trennung der Untereinheiten erfolgt durch Zonal-Ultrazentrifugation bei 4°C für 17 h bei 22.000 rpm in einem 15-Ti-Rotor der Firma Beckman Coulter. Der Probenauftrag geschieht hierbei durch Einpumpen von bis zu 6.000 A₂₆₀ Puromycin-behandelter Polysomensuspension in den bei 2.000 rpm laufenden Rotor. Das Auspumpen und Fraktionieren des Gradienten findet ebenfalls aus dem bei 2.000 rpm laufenden Rotor statt. Aufkonzentrieren und Pufferaustausch der isolierten 40S und 60S Untereinheiten werden durch Pelletieren im 45-Ti-Rotor (Beckman Coulter) bei 4°C und 39.000 rpm (≜ 119.000 x g) für 20 h erreicht.

2.6.9 In vitro Transkription (IVT) von IRES RNA mittels T7-Polymerase

Grundsätzlich kann jede DNA, die eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle besitzt, transkribiert werden. Als Matrize können daher PCR Produkte und Plasmide mit einem entsprechenden Promotor eingesetzt werden.

In den durchgeführten Versuchen wird linearisierte Plasmid-DNA in der sogenannten *run-off*-Transkription verwendet [17]. Dafür wird das Plasmid vor der Transkription dort mit Restriktionsenzym geschnitten, wo das künftige 3'-Ende der RNA sein soll. Somit wird RNA definierter Länge erhalten und ausgeschlossen, dass die RNA Vektorsequenzen enthält. Die Transkription erfolgt durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen (Transkriptasen). Die verwendete Transkriptase aus dem Phagen T7 eignet sich besonders für eine *in vitro* Transkription, da sie sich durch eine hohe Prozessivität auszeichnet; die T7-RNA-Polymerase synthetisiert etwa 200 Nucleotide pro Sekunde bei 37°C. Alle im Rahmen dieser Arbeit

verwendeten Transkripte werden mittels des T7-MEGAshortscriptTM High Yield Transcription Kits der Firma Ambion[®] nach Herstellerangaben synthetisiert. Mit diesem Kit ist es möglich, kurze Transkripte im Bereich von 20 bis 500 Nucleotiden mit hoher Ausbeute zu synthetisieren. Für einen 1x Ansatz wird dazu 1 μg Template-DNA eingesetzt; präparativ wird standardmäßig mit 10x Ansätzen gearbeitet. Als Matrize dient linearisierte und mittels Phenol-Chlorophorm-Extraktion gereinigte Plasmid-DNA, die die gewünschte IRES Sequenz unter Kontrolle des T7-Promotors enthält. Die Linearisierung erfolgt dabei für alle HCV IRES-Konstrukte mit *Xba*I, für CSFV IRES mittels *Eco*RI, für PTV und SPV9 IRES mit *Bam*HI. Die IVT erfolgt für 3 bis 4 h bei 37°C, nur im Fall der CSFV IRES wird über Nacht bei 40°C inkubiert. Nach Entfernung der Matrizen-DNA durch Zugabe RNase-freier *DNase*I und erneuter Inkubation bei 37°C wird die Isolierung und Reinigung der IRES RNA mit dem MEGAclearTM Kit (Ambion[®]) laut Herstellerangaben erzielt. Typische Ausbeuten liegen zwischen 500 und 800 μg IRES-RNA nach einem 10x IVT-Ansatz.

2.6.10 Präparation von RRL80S • IRES Komplexen für die Kryo-EM

Nach Kieft et al. [83] nimmt die HCV IRES RNA unter entsprechenden Ionenbedingungen eine für die Translationsinitiation essentielle Tertiärstruktur an. Daher wird die HCV IRES, später auch die anderen HCV-ähnlichen IRES', zunächst in 1x FBB (K)-Puffer für 1 min bei 70°C inkubiert. Ein anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur ermöglicht der RNA dann die Ausbildung der typischen Tertiärstruktur. Als nächstes erfolgt die Bindung an 40S Untereinheiten des Ribosoms. Dazu werden 40S Partikel (10 pmol für analytische bzw. bis zu 300 pmol für präparative Ansätze) zunächst 1:1 (Volumen) mit Ausgleichspuffer AP-1 auf FBB (K)-Bedingungen eingestellt. Nach Zugabe von IRES RNA im 1,5-fachen molaren Überschuss über die 40S Untereinheiten wird der Reaktionsansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgt ein weiterer Pufferausgleich zu R80S-C-Bedingungen durch 1:1 (Volumen) Zugabe von Ausgleichspuffer zum 40S • IRES Ansatz (Puffer AP-2) und zu den 60S Untereinheiten (Puffer AP-3). Die Zugabe der eingestellten 60S zum Gesamtansatz erfolgt äquimolar (oder im leichten Überschuss 1,5-fach) zu den 40S Untereinheiten und es wird wieder für 15 min bei 37°C inkubiert. Von den so erzeugten 80S • IRES Komplexen können dann zur qualitativen Analyse ca. 5 pmol auf ein natives Kompositgel (NKGE, siehe Kapitel 2.4.2.4) oder 0,5 bis 5 A₂₆₀ auf einen analytischen Saccharose-Dichtegradienten (siehe dazu Kapitel 2.4.4) aufgetragen werden. Die Fluoreszenz der IRES wird mit Hilfe des TYPHOON Trio Scanners (GE Healthcare) für jede Fraktion des Gradienten nachgewiesen. Zur Ermittlung der Struktur eines ribosomalen Komplexes mittels Kryo-EM ist neben Stabilität auch eine höchstmögliche Reinheit der Probe anzustreben. Die potenziellen 80S • IRES Komplexe aus präparativen Ansätzen werden daher mittels präparativer Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (10-30% Saccharose in R80S-C) und anschließender Fraktionierung isoliert. Die Ko-Sedimentation der IRES ist über ihre Fluoreszenzmarkierung mit Hilfe des TYPHOON Trio Scanners (GE Healthcare) nachweisbar. Die entsprechenden 80S-*Peak*-Fraktionen des Gradienten (wobei darauf geachtet werden muss, nur die *Peak*-Fraktionen zu sammeln und "Schultern" zu verwerfen), werden vereinigt, durch weitere Ultrazentrifugation im SW55-Rotor für 4 bis 5 h bei 45.000 rpm (≜ 190.000 x g) und 4°C pelletiert und in R80S-C-Puffer vorsichtig gelöst. Es folgt die photometrische Konzentrationsbestimmung und eine Quantifizierung der IRES-Besetzung in den Komplexen durch Abgleich mit einem IRES-Fluoreszenz-Standard. Etwa 40 bis 60 pmol 80S • IRES Komplexe können aus einem präparativen Ansatz erhalten werden. Je 10 μl Aliquots werden in LN₂ schockgefroren und bis zur Durchführung der kryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei -80°C gelagert.

2.6.11 Affinitätschromatographie ribosomaler Komplexe

Streptavidin-bindendes Aptamer:

Die Sequenz des RNA-Aptamers (StAv-*tag*) ist aus Srisawat & Engelke [179] entnommen, die nachfolgend kurz beschriebene Methode zur Affinitätschromatographie stammt ebenfalls aus dieser Veröffentlichung.

Der Bindungstest für zunächst nur getaggte und ungetaggte HCV IRES RNA findet im *Batch*-Verfahren statt. Als Matrix dienen hierbei Streptavidin-Agarose-*Beads*, laut Protokoll sollen dabei etwa 5 nmol Streptavidin je 1 nmol RNA vorhanden sein. Für den Bindungstest wird die IRES RNA im 1-fachen (50 pmol), 3-fachen (150 pmol) und 10-fachen (500 pmol) Überschuss über die Streptavidin-Agarose-*Beads* eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen der Matrix durch Abzentrifugieren (1 min, 3.000 rpm, 4°C) der *Beads* und Resuspendieren in 1x FBB (K) erfolgt die Bindung der RNA bei 4°C in 1x FBB (K)-Puffer für 1 h unter kontinuierlichem Schwenken. Nach Abzentrifugieren der *Beads* und Sammeln des Überstandes wird der Ansatz 3x mit 1x FBB (K) für jeweils 15 min bei 4°C durch Schwenken gewaschen. Auch hier wird jeweils der Überstand gesammelt. Die Elution erfolgt nun mit StAv-Elutionspuffer durch Schwenken für 1 h bei 4°C, anschließender Zentrifugation und Sammeln des Überstandes. Jeweils 5 μl aller drei Überstände werden dann zur Kontrolle auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

Streptomycin-bindendes Aptamer (Variante A):

Die Sequenz des Streptomycin-Aptamers (StM-*tag* oder Strepto*tag*) ist aus Bachler et al. [9] entnommen. Die Herstellung der Streptomycin-Matrix (Sepharose) erfolgt exakt nach Windbichler & Schroeder [197], für die Aufreinigung wird dann entsprechend 1x FBB (K)-Puffer verwendet unter Einhaltung einen konstanten Temperatur von 4°C. 300 μl der Sepharose werden in Pierce Spin Columns – Screw Cap (0,9 ml) der Firma Thermo Scientific überführt und mit 1x FBB (K) äquilibriert. Zentrifugiert wird hierbei und in allen nachfolgenden Schritten für 2 min bei 1.800 x g. Nach Faltung der HCV IRES RNA für 1 min bei 70°C und Abkühlen auf Raumtemperatur (siehe Kapitel 2.6.10) werden 50 pmol dieser RNA durch Inkubation mit der Sepharose für 1 h im Schwenker unter 1x FBB (K)-Bedingungen an das Säulenmaterial gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit 1x FBB (K) wird die RNA ein- bis zweimal mit je 100 μl StM-Elutionspuffer A eluiert. Durchfluss, Waschfraktion und Eluat werden jeweils gesammelt, die enthaltene IRES RNA wird, wie unter Kapitel 2.6.4 beschrieben, präzipitiert und zur Analyse auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

Streptomycin-bindendes Aptamer (Variante B):

Die Sequenz des getesteten StM-*tag*s und die Methode zur Herstellung des Streptomycin-Resins sind bei Locker und Lukavsky [99; 101] beschrieben. Zur Aufreinigung der Ribosom-CSFV IRES-Komplexe werden nach persönlicher Kommunikation mit Peter J. Lukavsky, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England, einige Änderungen vorgenommen.

Resin mit einem Gelbett-Volumen von 200 µl wird in Spin Columns – Screw Cap (0,9 ml) mit Luer-Lok Adapter (Thermo Scientific) gepackt und mit 1x R80S-C äquilibriert. 100 bis 150 pmol vorgefaltete CSFV IRES RNA, 40S • CSFV IRES bzw. 80S • CSFV IRES Komplexe werden durch Inkubation für 30 min bei 4°C im Überkopf-Schwenker an die Matrix gebunden. Gewaschen werden die Säulen zweimal bei 4°C und dreimal bei Raumtemperatur mit jeweils 500 µl 1x R80S-C. Die Elution der gebundenen RNA bzw. Komplexe erfolgt danach 10x mit 200 µl StM-Elutionspuffer B. Anstelle der Zentrifugation erfolgt in den einzelnen Aufreinigungsschritten ein Ausblasen der Säulen mit Hilfe einer Spritze, wobei stets darauf zu achten ist, die Matrix nicht trocken laufen zu lassen. Durchfluss, Waschfraktion und Eluat werden wiederum gesammelt. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung und Fluoreszenz-Detektion der markierten RNA im TYPHOON Trio Scanner (GE Healthcare) folgt zusätzlich eine Untersuchung der Ribosom-CSFV IRES-

Komplexe auf einem analytischen Saccharosedichtegradienten

MS2-bindendes Aptamer:

Die Sequenz des verwendeten MS2-tags ist aus Ji et al. [75] entnommen und die Aufreinigung der getagten RNA bzw. der Ribosom-HCV IRES-Komplexe erfolgt im Wesentlichen nach Youngman et al. [203]. Die Methode wird zunächst nur mit HCV IRES RNA im kleinen Maßstab unter 1x FBB (K)-Bedingungen getestet, später auch mit potentiellen 80S • HCV IRES Komplexen unter 1x R80S-Bedingungen im größeren Maßstab. Für den kleinen Maßstab werden wieder die Pierce Spin Columns – Screw Cap (0,9 ml) der Firma Thermo Scientific verwendet, die diesmal mit Gluthathion Sepharose 4B der Firma GE Healthcare gepackt wurden, resultierend in einem Gelbett-Volumen von 50 µl. Für alle nachfolgenden Schritte erfolgt die Inkubation jeweils im Schwenker und Zentrifugation für 1 min bei ca. 500 x g. Das Säulenmaterial wird zunächst mit 2 Säulenvolumen 1x FBB (K) äquilibriert, dann erfolgt zunächst die Bindung des GST-MS2 Fusionsproteins (siehe Kapitel 2.6.7). Dieses Protein soll dabei laut Youngman und Kollegen [203] im 5- bis 8-fachen molaren Überschuss über den getaggten Ribosomen bzw. RNAs vorliegen. Es werden hier also 800 pmol (~32 μg) Protein in 1x FBB (K) auf die Säule aufgetragen und für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Auftragen von 100 pmol vorgefalteter HCV IRES RNA wird nicht gebundenes Fusionsprotein mit 3 bis 5 Säulenvolumen 1x FBB (K)-Puffer bei Raumtemperatur von der Säule gewaschen und die Säule anschließend auf 4°C herunter gekühlt. IRES-Bindung und alle weiteren Schritte folgen nun bei 4°C. Ungebundene IRES wird mit 3 bis 5 Säulenvolumen FBB (K) von der Säule gewaschen und mit MS2-Elutionspuffer für ca. 1 h eluiert. Durchfluss, Waschfraktion und Eluat werden gesammelt, die RNA präzipitiert und auf ein analytisches denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

Der Test auf Bindung potentieller Ribosom-HCV IRES-Komplexe erfolgt analog, allerdings unter R80S-Bedingungen. Zur Bindung der ribosomalen Komplexe wird hier für 30 min im Schwenker inkubiert. Die Analyse von Durchfluss, Waschfraktion und Eluat geschieht nach RNA Extraktion mittels TRIzol[®] LS durch Auftrag der erhaltenen RNA auf ein Agarosegel. Zusätzlich erfolgt eine Saccharosedichtegradienten-Ultrazenrifugation und die Fluoreszenz-Detektion der markierten IRES-RNA.

Die Aufreinigung von Ribosom-HCV IRES-Komplexen im großen Maßstab erfolgt über GSTrap FF 1 ml Säulen der Firma GE Healthcare mittels des ÄKTA FPLC Systems, ebenfalls unter R80S-Bedingungen durchgehend bei 4°C. Die Flussrate wird auf 0,1 bis 0,3 ml/min eingestellt. Zur Analyse dient neben der Messung der A₂₅₄ im FPLC-System die

Fluoreszenz-Detektion der markierten IRES RNA und eine anschließende elektronenmikroskopische Untersuchung mittels Negativ-Kontrastierung.

Die Tendenz des GST-MS2-Fusionsproteins zur Homodimerisierung und seine niedrige Löslichkeit führte zu einigen Problemen, z.B. können potentielle Ribosom-IRES Komplexe im Eluat nicht durch Pelletieren aufkonzentriert werden, da sie sonst nicht mehr zu lösen sind. So wurde daher teilweise versucht, das Eluat mit Amicon Ultra-15 YM-100 oder Amicon Ultra-4 YM-100 Zentrifugen-Filtern (Millipore corporation) nach dem Protokoll des Herstellers aufzukonzentrieren. Eine Alternative ist auch die Aufreinigung per MS2-tag über ein MS2-MBP-Fusionsprotein, wie es bei Ji et al. [75] beschrieben. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr getestet.

Tobramycin-bindendes Aptamer:

Die Sequenz des Tobramycin-RNA-Aptamers (TOB-*tag*) ist aus Hamasaki et al. [60] entnommen. Herstellung und Absättigen der Tobramycin-Matrix erfolgen exakt nach Hartmuth et al. [62], die Aufreinigung geschieht dann entsprechend unter R80S-C-Bedingungen, allerdings durchgehend bei pH 8,1 und 4°C. Statt Zentrifugation wird auch hier die Flüssigkeit jeweils mit einer Spritze aus den Säulen ausgeblasen, wobei stets darauf zu achten ist, die Matrix nicht trocken laufen zu lassen. Resin mit einem Gelbett-Volumen von 20 μl wird in Spin Columns – Screw Cap (0,9 ml) mit Luer-Lok Adapter (Thermo Scientific) gepackt und mit 1 ml 1x R80S-C äquilibriert. 400 μl (100 pmol) vorgefaltete IRES RNA werden auf die Matrix aufgetragen und für 1 h im Überkopf-Schwenker inkubiert. Zur Entfernung ungebundener RNA wird dreimal mit je 400 μl 1x R80S-C-Puffer gewaschen. Zum Eluieren gebundener RNA wird die Säule für 10 min mit 50 μl TOB-Elutionspuffer im Überkopf-Schwenker inkubiert. Durchfluss, Waschfraktion und Eluat werden gesammelt und mittels photometrischer Konzentrationsbestimmung und Fluoreszenz-Detektion der markierten RNA im TYPHOON Trio Scanner (GE Healthcare) analysiert.

2.7 Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung

Die Probe wird in amorphem Eis auf dem Objektträger eingefroren und dann im Elektronenmikroskop zweidimensional abgebildet. Mit Hilfe sehr rechenintensiver Methoden wird daraus eine dreidimensionale Elektronendichtekarte erstellt, die dann molekular interpretiert werden kann. Die Bildverarbeitung während dieser Arbeit erfolgt unter Nutzung des SPIDER (*System for Processing Image Data from Electron microscopy and Related fields*) und WEB Softwarepaketes [51; 170].

2.7.1 Grid- und Probenvorbereitung

Als Objektträger für biologische Proben dienen sogenannte Grids, wenige Millimeter durchmessende Kupfer-Scheiben. Diese Kupfer-Scheiben sind ähnlich einem sehr feinen Sieb netzartig strukturiert. Auf der Oberfläche eines solchen Grids befindet sich ein ~10 nm dicker, mit Löchern durchsetzter Kohlenstoff-Film. Die verwendeten "holey carbon" Grids stammen alle von der Firma Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, und weisen einen definierten Lochdurchmesser von 2 μm und einen Lochabstand von 2 oder 4 μm auf (siehe Abbildung 2.7). Alle Grids müssen zunächst mit Chloroform gewaschen werden, um den herstellungsbedingten Kunststoff-Film zu entfernen. Nach dem Trocknen kann manuell (durch flotieren) ein zweiter, dünnerer (~2 nm) Kohlefilm aufgebracht werden, der die Löcher des ersten dickeren Kohlefilms überspannt. Um eine hydrophile Oberfläche zur Anlagerung der wässrigen Probe zu schaffen, müssen die Grids 30 Sekunden im Plasmaofen (Plasma Cleaner PDC002, Harrick) bei 0,3 mbar ionisiert werden.

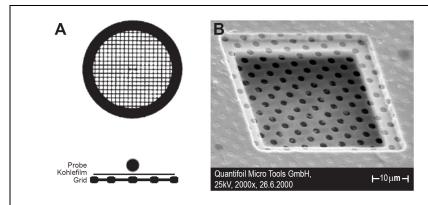


Abbildung 2.7 Grids für die Kryo-EM (A) Oben: Schematische Draufsicht eines EM-Grids. Unten: Schematische Seitenansicht eines Karbonbeschichteten Grids. Die relative Position des Kohlefilms zu Grid und Probe ist gezeigt. (http://www.snaggledworks.com/em_for_dummies/grids.html) (B) Abbildung eines industriell gefertigten "holey carbon" Grids der Firma Quantifoil. Über einer einzelnen Netzmasche liegt ein löchriger Kohlenstoff-Film. (http://www.quantifoil.com/)

2.7.1.1 Probeneinbettung in Eis

Der Probenauftrag von 3,5 µl wässriger Probe auf ein ionisiertes Grid erfolgt mit Hilfe eines Vitrobots (FEI) unter kontrollierten Bedingungen bei 4°C und 100% Luftfeuchtigkeit. Die

Probenkonzentration soll dabei für 80S-Ribosomen bei 30 pmol/ml liegen. Nach 30 s wird das überschüssige Probenvolumen automatisch durch Blotten mit Filterpapier (10 s) entfernt und das Grid rasch in flüssiges Ethan bei LN₂-Temperatur eingetaucht [41]. Auf diese Weise wird garantiert, dass die Probe in amorphem (glasartigem) Eis eingebettet vorliegt. Die Bildung störender Eiskristalle kann so verhindert werden und die Probe bleibt intakt. Die fertigen Grids können bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff (LN₂) bei -196°C aufbewahrt werden.

Mit Hilfe einer FEI-Kryo-Workstation werden die Proben-Grids in Mikroskopkartuschen eingespannt und danach über einen portablen gekühlten Probenhalter in die Probenkammer des Transmissionselektronenmikroskops überführt. Diese Handhabung garantiert eine konstant kalte Stickstoff Atmosphäre um ein Auftauen der Probe zu vermeiden.

2.7.1.2 Negativkontrastierung

Die Negativkontrastierung ist eine Methode zur Kontraststeigerung durch Behandlung der Probe mit schwermetallhaltigen Salzen. Das Objekt ist dabei vom elektronenabsorbierenden Kontrastierungsmittel umgeben und erscheint dadurch heller im Vergleich zum Hintergrund. Die Negativkontrastierung dient in dieser Arbeit hauptsächlich der Beurteilung einer Probe hinsichtlich Konzentration und Zusammenlagerung des Probenmaterials. Der Vorteil der Methode liegt im hohen Kontrast, verglichen mit der Einbettung in Eis. Allerdings lassen sich mit der Negativkontrastierung keine Informationen über den inneren Aufbau des Probenmaterials gewinnen. Lediglich die äußere Form, die durch die angelagerten Schwermetallionen artifiziell verformt sein kann, ist erkennbar.

Auf ein ionisiertes Grid werden 3,5 µl einer wässrigen Probe aufgetragen. Nach dem Entfernen überschüssiger Flüssigkeit erfolgt die Kontrastierung mit 3,5 µl einer wässrigen Uranylacetat-Lösung (2 %). Überschüssige Lösung wird abgenommen und das Grid an der Luft getrocknet. Die so erhaltene Probe ist für mehrere Wochen haltbar.

2.7.2 Datensammlung

Kryo-EM-Daten werden an einem TECNAI G2 POLARA F30 Transmissionselektronenmikroskop der Firma FEI bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV und 39000-facher Vergrößerung unter "low-dose"-Bedingungen gesammelt: die Probe ist dabei während einer Belichtungszeit von 1 s einer Elektronendosis von 20-22 e/Ų ausgesetzt. Mit Hilfe einer analogen Plattenkamera werden ausgewählte Bereiche des Grids auf einem Kodak electron image film SO-163 aufgenommen. Diese Aufnahmen entstehen dabei ausschließlich über den Löchern der Grids im Unterfokusbereich bei Werten zwischen -1 und -5 μm.

Die EM-Aufnahmen (Mikrographen) müssen für die Bildverarbeitung im Computer digitalisiert vorliegen. Nach der Entwicklung werden die analogen Mikrographen daher mit Hilfe eines Scanners (HEIDELBERG PRIMSCAN D-8200 DRUM SCANNER) mit einer Schrittweite von 4,76 μm digitalisiert. Die Größe der Silberkristalle auf dem Mikrographen beträgt ca. 0,5 μm und beeinflusst bei der gewählten Schrittweite die Auflösung nicht. Die theoretische Pixelgröße des Scanners beträgt 1,26 Å/Pixel auf der Objektskala (5334 dpi).

Die digitalisierten Mikrographen liegen danach im TIF-Format, d.h. als Raster- oder Pixelgrafik vor. Für die weitere Bildverarbeitung müssen die Mikrographen daher in das SPIDER-Format konvertiert werden.

2.7.3 Qualitätsbeurteilung von Aufnahmen und Bestimmung von Defokus-Werten

Das sogenannte Powerspektrum [114] enthält die Information über die Qualität der Kryo-EM-Aufnahme. Die berechneten 2D-Powerspektren können mit dem Programm WEB einer visuellen Kontrolle unterzogen werden (siehe Abbildung 2.8).

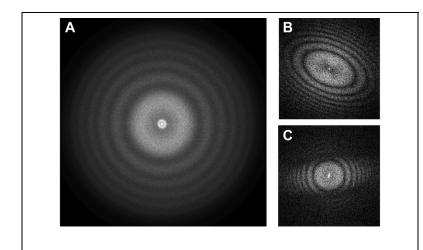


Abbildung 2.8 Darstellung von 2D-Powerspektren. (A) Ein während dieser Arbeit aufgenommenes unverzerrtes Powerspektrum, (B) Powerspektrum bei Astigmatismus und (C) bei Probendrift.

Die im Bild zu erkennenden Ringe werden auch Thon-Ringe genannt und können als Effekt der CTF (siehe auch Kapitel 1.3.1.3) erklärt werden, die die Fourier-Transformierte des Objektes defokusabhängig moduliert. Die hellen Ringe kennzeichnen die quadrierten Intensitäten (CTF-Maxima² = I^2) der übertragenen Ortsfrequenzen, die dunklen Bereiche sind

die Übertragungslücken (CTF-Nullstellen), in denen die entsprechenden Ortsfrequenzen ausgeblendet sind.

Form und Anzahl der Thon-Ringe geben direkt Aufschluss über die Bildqualität einer Kryo-EM-Aufnahme. Zwei häufig auftretende Abbildungsfehler, der Astigmatismus und die Proben*drift* während der Aufnahme, können leicht anhand der 2D-Powerspektren identifiziert werden (siehe Abbildung 2.8 B und C). Während bei Astigmatismus die Thon-Ringe zu Ellipsen werden, äußert sich *Drift* in unvollständig ausgebildeten Ringen, also stark gedämpfter Information in einer Bildrichtung. Mangelhafte Mikrographen werden sofort aus dem Datensatz entfernt, im Falle einer nicht eindeutigen Qualitätsbeurteilung können zusätzlich die auf die entsprechende Pixelgröße normalisierten 1D-Powerspektren herangezogen werden. Insgesamt verblieben ca. 60-70% aller aufgenommenen Mikrographen im Datensatz. Für den hier untersuchten 80S • HCV IRES Datensatz sind das 2.239 Aufnahmen, der 80S • CSFV IRES Datensatz besteht aus 1.082 Aufnahmen.

Bereits an dieser Stelle kann die für die spätere 3D-Strukturberechnung notwendige Bestimmung der CTF-Werte (Defokus-Werte) erfolgen. CTFFIND3 [114] führt durch Vergleich mit einem modellierten Powerspektrum im Prinzip eine Hintergrundkorrektur der experimentellen Powerspektren durch und berechnet dann die CTF. Dazu notwendige Informationen, wie Wellenlänge der Elektronen, prozentualer Anteil an Amplitudenkontrast und Aberationskonstante werden dem Programm vorgegeben. Durch Regression der Minima der berechneten CTF an die experimentelle nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate können dann die Defokuswerte bestimmt werden. Da die CTF für jeden Mikrographen spezifisch ist, werden alle Partikelbilder eines Mikrographen zur späteren CTF-Korrektur in Defokusgruppen zusammengefasst

2.7.4 Einzelpartikel-Selektion

Das Programm SIGNATURE [28] ermöglicht es, anhand von Referenzstrukturen mögliche Partikel-Kandidaten auf den Mikrographen zu selektieren. Damit SIGNATURE die Mikrographen einlesen kann, werden sie mittels des Programms em2em (http://www.imagescience.de/em2em/) in das MRC-Format überführt. Um durch Eiskristalle, Schmutz oder Filmkanten u.s.w. kontaminierte Bereiche von der auszuschließen, werden nun zunächst alle Mikrographen maskiert. Als Referenz zur anschließenden initialen Partikelsuche werden hier, wie auch später zur Strukturberechnung, generierte 2D-Projektionen eines vakanten Kaninchen-80S Ribosoms verwendet. Der SIGNATURE-Algorithmus vergleicht die Intensitäten (Grauwerte) der Bildpixel mit der

Referenz und findet so auf einem Mikrographen Bereiche mit erhöhter Pixel-Dichte. Durch Vergleich der Pixel-Verteilung in den gefundenen lokalen Maxima macht das Programm dann eine Aussage darüber, ob diese Bereiche ähnliche Form wie die Referenz besitzen. Da ein Partikel einzeln vorliegen soll, überprüft das Programm außerdem den Abstand zwischen den potenziellen Partikeln. Ist dieser kleiner als der vorgegebene werden die entsprechenden Partikelkandidaten verworfen. Im Schnitt können mit SIGNATURE so für jeden Mikrographen ca. 2.500 initiale Partikel gefunden werden. Die Koordinaten der gefundenen Partikelkandidaten werden für jeden Mikrographen manuell im SPIDER-Format gespeichert. Da diese initiale Partikelselektion mit SIGNATURE nur eine beschränkte Genauigkeit in Bezug auf die Unterscheidung von gewünschten Ribosomen und falsch positiven Partikeln mit ähnlich geformten Strukturen (Eis, Schmutzpartikel,...) aufweist, ist eine weitere Partikelauslese notwendig. Für beide in dieser Arbeit untersuchte Datensätze wird dazu zunächst eine manuelle, und später eine automatische Partikelselektion durchgeführt. Die einzelnen Partikel werden dazu aus den entsprechenden Mikrographen ausgeschnitten, zentriert und fortlaufend durchnummeriert. Die Grauwerte aller Partikelbilder werden außerdem für die weitere Bildverarbeitung gegen ein Referenz-Histogramm des Hintergrundrauschens normalisiert. Für die manuelle Partikelauswahl wird durch Anwendung des Butterworth-Tiefpassfilters der Kontrast der Partikelbilder erhöht, um eine visuelle Kontrolle der ausgeschnittenen Partikel zu erleichtern. Unter Verwendung des Programms WEB [51] kann nun visuell selektiert und die Nummern der für gut befundenen Partikel in Textdateien gespeichert werden. Auf diese Weise erfolgte für jeden Datensatz die Verifizierung der ersten 80.000 bis 100.000 Einzelpartikel. Die manuelle übertrifft qualitativ die automatische Partikelauslese, da die verfügbaren Computeralgorithmen nicht an die Fähigkeit des menschlichen Gehirns zur Mustererkennung und Unterscheidung von Bildsignal und Hintergrundrauschen heranreichen. Allerdings ist diese Technik extrem zeitintensiv, weshalb mit zunehmender Größe der Datensätze auf die automatische Partikelselektion anhand einer Referenzstruktur zurückgegriffen werden muss.

Nachdem eine Verifizierung der Partikelkandidaten erfolgt ist, werden die Partikel für die weitere Bildverarbeitung aus den undezimierten Originalmikrographen ausgeschnitten, Hochpass gefültert und defokusgruppenweise zu Stapel-Dateien zusammengefasst.

2.7.5 Rekonstruktion eines initialen 3D-Strukturmodells

Kryo-Elektronenmikroskopische Aufnahmen, wie sie während dieser Arbeit entstanden sind, entsprechen 2D-Projektionen von zufällig orientierten ribosomalen Partikeln. Wie in Kapitel

1.3.2.2 beschrieben kann aus ihnen daher durch Mittelung ein dreidimensionales Strukturmodell des Ribosoms berechnet werden.

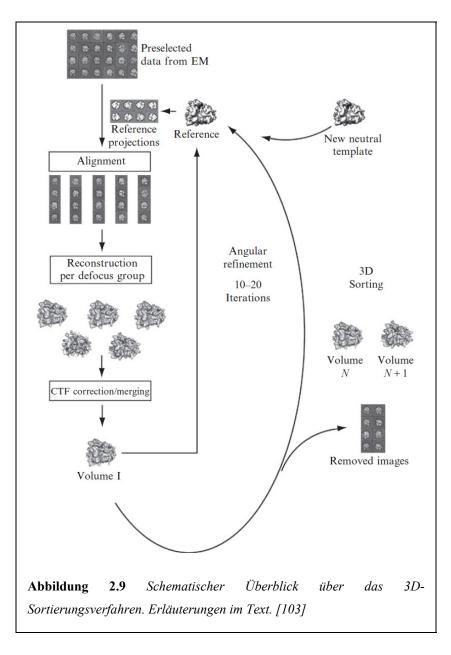
Um die Orientierung der Einzelpartikel zu bestimmen, wird eine initiale Alignierung nach der "projection matching"-Methode [129] mit vierfach dezimierten Daten bei einer Pixelgröße von 5,04 Å durchgeführt. Als Referenz dient ein bereits vorhandenes grobes 3D-Strukturmodell eines vakanten Kaninchen-80S Ribosoms. Der zentrale SPIDER-Algorithmus für das "projection matching" ist ein Suchalgorithmus, der rotationale und translationale Alignierung durch Berechnen der Kreuzkorrelation zwischen Partikel-Referenzprojektionen erlaubt. Jedem Partikel können so die Verschiebungen in x-/y-Richtung und die Eulerwinkel zugeordnet werden. Mit Hilfe der gefundenen Parameter wird durch Rückprojektion ein erstes 3D-Volumen erstellt, das zentriert und Tiefpass gefiltert wird und in der nächsten Runde nun seinerseits wieder zur Erzeugung von Referenzprojektionen dient. Die so erstellten Volumina setzen sich dabei aus mehreren Untervolumina zusammen, die für jede Defokusgruppe individuell erstellt und durch Wiener-Filterung CTF-korrigiert werden [130]. Die Zentrierung der Partikelprojektionen und somit die gesamte initiale Alignierung ist äußerst wichtig für die folgende Strukturverfeinerung, da vor allem die Algorithmen der Multireferenz-Klassifizierung sehr empfindlich auf verschobene Partikel reagieren.

2.7.6 Strukturverfeinerung und Multireferenz-Klassifizierung (3D-Sortierung)

Die Strukturverfeinerung der Initialstruktur ist ein komplexer iterativer Prozess, bei dem die Partikel mit immer mehr Referenzprojektionen nach verschiedenen Suchalgorithmen aligniert und hinterher rückprojiziert werden. Analog dem initialen Alignment dient dabei das jeweils erzeugte Volumen wieder als Referenz für die neue Berechnungsrunde.

Während der Arbeiten der letzten Jahre zur Strukturaufklärung des Translationsapparates in Bakterien, Hefen und Säugetieren wurde klar, dass alle Präparationen ribosomaler Komplexe immer mit vakanten und zum Teil sogar degradierten Partikeln vermischt waren. Die hier verwendete *Multireferenz-Klassifizierung*, oder auch 3D-Sortierung, ist eine effektive Möglichkeit, störende Partikel auszusondern und funktionelle Stadien *in silico* zu separieren [103]. Die verwendete 3D-Sortierung ist eine sogenannte "*unsupervised*" Klassifizierung, dass heißt, sie beruht auf der Konkurrenz zwischen mehreren Referenzen um die Partikel. Der schrittweise Algorithmus sucht eine Aufteilung der Daten ohne *a priori* Wissen oder Einmischung des Nutzers herbeizuführen (siehe Abbildung 2.9). Im ersten Schritt konkurrieren mehrere Projektionen einer neutralen Referenz um die experimentellen Partikelprojektionen. Die Partikelprojektionen werden dabei mit in einem immer kleineren

Winkelbereich gedreht ("Angular Refinement") und den Referenzprojektionen per Kreuzkorrelation zugeordnet. Diese innere Schleife der Multireferenz-Klassifizierung entspricht der "projection matching"-Methode des initialen Alignments und wird iterativ mit abnehmender Schrittweite solange wiederholt, bis eine Stabilität der generierten Volumen in Bezug auf die räumliche Orientierung der Partikel und deren Klassifikation erreicht ist. Ist dieser Punkt erreicht, kann dem durch Rückprojektion erzeugten 3D-Volumen eine weitere neutrale Referenz hinzugefügt werden. Die Winkelsuche beginnt nun mit zwei Sets an Referenzprojektionen (denen des erstellten 3D-Volumens und denen der neutralen Referenz) von neuem und der Datensatz teilt sich letztendlich in zwei stabile Partikelpopulationen auf, aus denen ebenfalls wieder 3D-Volumina erstellt werden.



In dieser äußeren Schleife (welche die innere Schleife für jedes Set an Referenzprojektionen einschließt) können auf diese Weise sukzessive weitere neutrale Referenzen hinzugefügt werden und der Datensatz kann so in immer mehr unterschiedliche Partikel-Populationen und daraus rekonstruierte 3D-Volumen aufgetrennt werden. Es können außerdem unerwünschte Partikel entfernt werden.

Bei Hinzufügen jeder neuen Referenz erfolgt immer zunächst ein Wechsel zu kleineren Rotationswinkeln. Kleinere Rotationswinkel verfeinern die Suche, jedoch erhöht sich dadurch die Anzahl der jeweiligen Referenzprojektionen (z.B. bei 15° ≜ 83 Referenzprojektionen, bei 2° ≜ 5.088 Projektionen). Daher wird zunächst durch das Rechnen mit höherer Pixelgröße (5,04 Å), also nur groben Strukturinformationen, die Berechnungsgeschwindigkeit erhöht. Schrittweise wird die Pixelgröße dann auf 3,78 Å und 2,52 Å und letztendlich für größtmögliche Details auf 1,26 Å verringert.

Für die 80S • IRES-Komplexe ist das Ziel der Sortierung, zunächst Eis- und Schmutzpartikel, danach degradierte und leere Ribosomen, die keinen Liganden gebunden hatten, auszusortieren. Der Anteil der aussortierten Daten ist mit insgesamt 80-90% sehr hoch, allerdings kann so im Endeffekt eine hoch aufgelöste Struktur der HCV IRES erstellt werden, die eine Modellierung ihrer Tertiärstruktur auf molekularem Niveau erlaubt. Als Referenz zur Sortierung werden sukzessiv mehrere Kopien einer 3D-Struktur eines vakanten Kaninchen-80S Ribosoms genutzt. Durch die beschriebene iterative Alignierung auf mehrere neutrale Referenzen summieren sich dann die Partikelbilder bestimmter Partikelklassen zu mehreren Volumen (siehe Abbildung 3.21, Kapitel 3.2.2).

Ab einem bestimmten Punkt während der Strukturverfeinerung kann die Abschwächung hochfrequenter Informationen (während der Aufnahmen am Mikroskop oder der anschließenden Bildverarbeitung) weitere Unterscheidungen zwischen den einzelnen Partikeln erschweren. Daher findet eine Verstärkung hoher Bildfrequenzen durch Anpassungen der Powerspektren mit Hilfe hochaufgelöster Daten aus der Röntgenkristallstrukturanalyse statt. Kleinste Strukturdetails und Unterschiede können so herausgearbeitet werden.

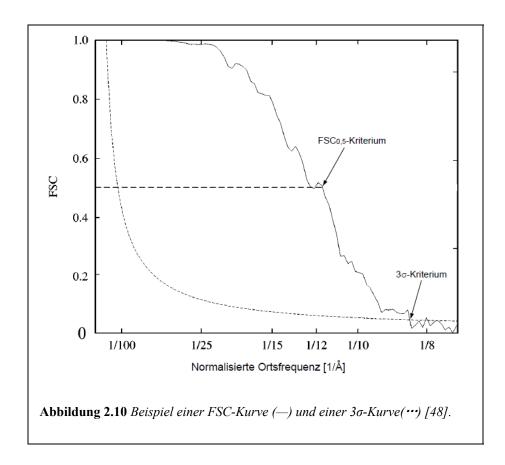
2.7.7 Berechnung der Auflösung

Um die Auflösung des finalen dreidimensionalen Strukturmodells zu bestimmen, wird im dreidimensionalen Raum die *Fourier-Shell-Korrelation* (FSC) verwendet [48; 190]. Dazu wird durch den für die Rückprojektion verwendeten Algorithmus der gesamte Datensatz zufällig halbiert und von jeder Hälfte ein 3D-Volumen errechnet. Die FSC misst den Grad an

Übereinstimmung zwischen beiden Rekonstruktionen in Abhängigkeit vom Radius, d.h. der Ortsfrequenz, im Fourierraum. Die Funktion hat ihren größten Wert (eins) bei niedrigen Frequenzen, was einer hohen Übereinstimmung der groben Bilddetails entspricht, und fällt mit steigender Frequenz ab, ein Zeichen für zunehmende Inkonsistenz der feineren Bilddetails. Die Übereinstimmungen verschiedener Ortsfrequenzen können in einer Auflösungskurve dargestellt werden (siehe Abbildung 2.10 und Abbildung 3.23). Die Auflösung wird in dieser Arbeit mit dem FSC-Wert, bei dem die FSC-Kurve unter 0,5 fällt berechnet, da hier das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei 1 lag (FSC_{0,5}-Kriterium).

$$Aufl\"{o}sung = \frac{Pixelgr\"{o}\beta e}{FSC_{0,5}}$$

Alternativ kann die Auflösung mit dem aus der Röntgenkristallographie stammenden sogenannten 3-σ-Kriterium berechnet werden [190]. Der Schnittpunkt der 3-σ-Kurve mit der FSC-Kurve gibt an, ab welcher Ortsfrequenz Daten gesammelt wurden, die signifikant, also mindestens drei Standardabweichungen, über dem Hintergrundrauschen liegen.



Der mit diesem Kriterium berechnete Auflösungswert ist besser, als mit dem FSC_{0,5}-Kriterium, allerdings ist hier das Signal-zu-Rausch-Verhältnis viel kleiner als 1 und es würden daher zwangsläufg die stark verrauschten Frequenzen mit berücksichtigt [48].

2.7.8 Strukturinterpretation

Im Anschluss an die Berechnung der 3D-Volumen erfolgt die computergestützte Trennung in 40S und 60S Untereinheiten, sowie die IRES-Dichte mit der SPIDER Software [51]. Die Visualisierung der 3D-Volumen erfolgt mit Hilfe von CHIMERA [136] und des IRIS Explorers [194]. Zur Interpretation der IRES Kontaktstellen mit dem Ribosom sind 40S- und 80S-Kristallstrukturen [10; 145] in die 3D-Rekonstruktion des 80S • HCV IRES Komplexes mit CHIMERA eingepasst worden. Für ein atomares Modell der HCV IRES RNA sind NMR- und Kristallstrukturen der HCV IRES Subdomänen [105], soweit vorhanden, mit CHIMERA in die Kryo-EM Dichte eingepasst worden. Für die fehlenden Bereiche sind atomare Modelle von Helices und Haarnadelschleifen der HCV IRES stückweise mittels COOT [43] erstellt und mit COOT und CHIMERA in die Dichte eingepasst worden.

Die nachfolgende verfeinerte Anpassung des molekularen Modells wurde mit Hilfe von Jochen Ismer (Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, AG Hildebrandt) durch einen Algorithmus (MDFIT, http://smog.ucsd.edu/extension/MDfit.html, [148; 195]) durchgeführt, der molekulare Simulationen mit der experimentell erstellten Kryo-EM Dichte verknüpft.

3 Ergebnisse

3.1 Präparation von 80S • IRES Komplexen für die Kryo-EM

Damit IRES-Ribosomen-Komplexe *in vitro* rekonstituiert werden können, müssen zunächst alle Komponenten, IRES RNA und ribosomale 40S und 60S Untereinheiten aus Kaninchen Retikulozyten-Lysat (RRL), einzeln aufgereinigt werden.

3.1.1 Präparation von IRES RNA

Die Herstellung von HCV, CSFV, PTV-1 und SPV-9 IRES RNA erfolgt über eine *in vitro* Transkription mit dem T7-MEGAshortscript™ High Yield Transcription Kit (Ambion) nach Herstellerangaben (Kapitel 2.6.9). Transkribierte IRES RNA wird zur Kontrolle auf ein denaturierendes Gel aufgetragen (vgl. Abbildung 3.1), mittels des MEGAclear Kits (Ambion) nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend mit Fluorescein-5-thiosemicarbazid (FTS) am 3'-Ende fluoreszenzmarkiert (Kapitel 2.5.6). Alle so hergestellten IRES RNAs weisen die korrekte Länge zwischen 300 und 500 Basen und keinerlei Degradation auf.

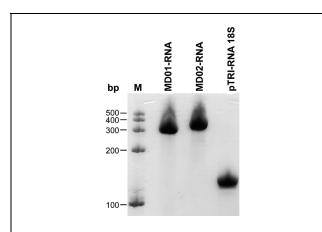


Abbildung 3.1 In vitro Transkription von IRES RNA. Aufgetragen wurden hier beispielhaft die Transkripte der Plasmide MD01 (enthält HCV IRES nt 40-379) und MD02 (enthält HCV IRES nt 40-379 mit StAv-tag am 3'-Ende) gegenüber der im T7-MEGAshortscriptTM High Yield Transcription Kit enthaltenen Kontroll-RNA. 6% PAA/Urea-Gel, Färbung mit Toluidin-Blau.

3.1.2 Präparation ribosomaler Untereinheiten aus RRL

Translationskompetente Zellysate, wie zum Beispiel das in dieser Arbeit Ausgangsmaterial verwendete RRL, sind eine Mischung aus aktiven translatierenden Ribosomen und zum Teil daran gebundenen tRNAs, Fragmenten von mRNAs und verschiedenen anderen Faktoren des Ursprungsorganismus. Zur Erstellung hochreiner, definierter ribosomaler IRES-Komplexe für die Strukturanalyse mussten diese Faktoren zunächst von den Ribosomen abgetrennt werden. Methoden zur Isolierung von Ribosomen und Aufreinigung ihrer Untereinheiten sind seit vielen Jahrzehnten Teil der experimentellen Routine vieler Labore. Dabei werden diese Methoden bis heute kontinuierlich weiterentwickelt, verbessert und angepasst. Zur Optimierung von Qualität und Ausbeute der ribosomalen Untereinheiten werden während dieser Arbeit zwei präparative Methoden gegeneinander getestet.

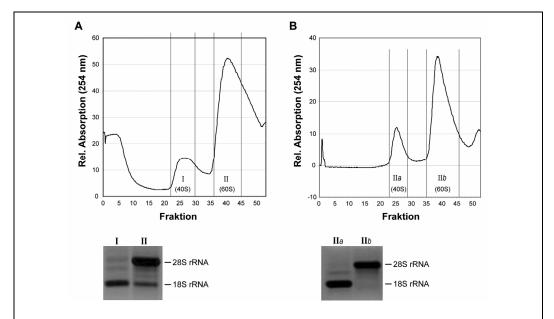


Abbildung 3.2 Gradientenprofile (A und B, oben, 10-30% Saccharose) und RNA-Agarose-Gelelektrophorese daraus isolierter ribosomaler Untereinheiten (A und B, unten, 1% Agarose), präpariert nach dem modifizierten Protokoll von Pisarev et al. [142]. (B) Ergebnisse der zusätzlichen Aufreinigung von 60S Untereinheiten aus (A).

Zunächst werden ribosomale Untereinheiten ähnlich der bei Pisarev und Kollegen [142] beschriebenen Methode aufgereinigt (Kapitel 2.6.8, Protokoll 1). Aus RRL werden dafür zunächst krude Ribosomen per Ultrazentrifugation isoliert und anschließend durch Inkubation mit Puromycin und Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (Kapitel 2.4.4) in Hochsalzpuffer (500 mM KCl) in ihre Untereinheiten dissoziiert. Während der

Dichtegradienten-Ultrazentrifugation wandern ribosomale Untereinheiten im Schwerefeld und trennen sich entsprechend ihrer Größe und Form auf. Bei einer Wellenlänge von 254 nm können sie anschließend als *Peaks* in einem Profil sichtbar gemacht werden. Durch pelletieren werden die entsprechenden Untereinheiten dann isoliert. Mit Hilfe der RNA-Agarose-Gelelektrophorese wird die RNA der isolierten ribosomalen Untereinheiten aus RRL nach TRIZOL-Extraktion zusätzlich qualitativ auf Degradation untersucht werden. Die Abbildung 3.2 zeigt Ergebnisse dieser ersten Methode. Der dissoziative Saccharose-Gradient (Abbildung 3.2 A, oben) zeigt deutliche *Peaks* sowohl für ribosomale 40S (I), als auch für 60S (II) Untereinheiten. Eine Kontrolle der ribosomalen RNA der aus diesen Gradienten isolierten Untereinheiten weist nahezu keine Degradation der rRNA auf, zeigt jedoch eine leichte Kreuzkontamination der 60S Partikel mit 40S Untereinheiten (Abbildung 3.2 A, unten). Zusätzlich zur 28S rRNA der 60S Untereinheiten ist eine für 18S rRNA typische Bande im Gel zu erkennen. Diese Verunreinigung tritt selbst bei sehr strenger Trennung der 40S und 60S Peakfraktionen weiterhin auf. Da diese Kreuzkontamination die Ergebnisse bei Experimenten zur 80S • IRES Rekonstitution verfälschen könnte, sind diese 60S Partikel zusätzlich durch eine weitere Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation unter dissoziierenden Pufferbedingungen gereinigt worden (Abbildung 3.2 B, oben). Tatsächlich trennt sich die 60S-Probe (II) noch einmal in klar voneinander abgegrenzte 40S (IIa)- und 60S-Peaks (IIb) auf. Nach Isolierung der ribosomalen Untereinheiten aus diesen Gradienten zeigt die Analyse der RNA (Abbildung 3.2 B, unten) jetzt eine hohe Reinheit der erhaltenen ribosomalen Untereinheiten und vorwiegend intakte, kaum degradierte rRNA. Allerdings hatt die doppelte Reinigung der 60S Untereinheiten einen erhöhten Materialverlust (verringerte Ausbeute der 60S) zur Folge, weshalb eine weitere Variante zur Aufreinigung ribosomaler Partikel aus RRL getestet wird.

Diese zweite Methode beruht auf dem Protokoll von Bommer et al. [16] (Kapitel 2.6.8, Protokoll 2). Der Hauptunterschied zur ersten Variante liegt in den Magnesium- und KCl-Konzentrationen der zu Beginn und gegen Ende der Präparation verwendeten Puffer. So werden die anfänglichen kruden Ribososmenpellets in einem Puffer gelöst, der eine deutlich geringere Magnesium- und KCl-Konzentration aufweist als der entsprechende Puffer der ersten Methode. Puromycin-Behandlung und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgen im Prinzip analog der Pisarev-Methode, der Puffer zum Pelletieren der Untereinheiten weist dagegen eine deutlich höhere Konzentration an Magnesium- und Kaliumionen auf. Ergebnisse der zweiten Methode sind in Abbildung 3.3 beispielhaft dargestellt.

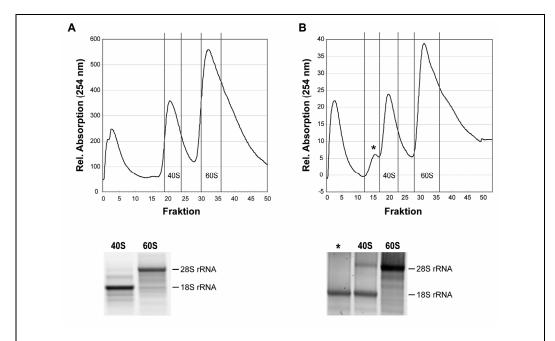
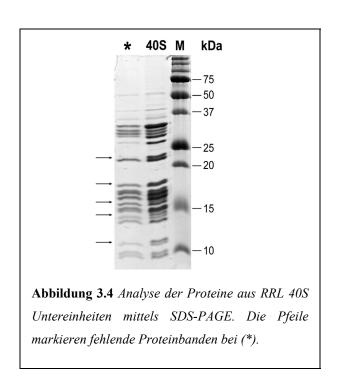


Abbildung 3.3 Gradientenprofile (A und B, oben, 10-30% Saccharose) und RNA-Agarose-Gelelektrophorese daraus isolierter ribosomaler Untereinheiten (A und B, unten, 1% Agarose), präpariert nach dem modifizierten Protokoll von Bommer et al. [16]. (A) und (B) zeigen Ergebnisse derselben Methode, allerdings mit unterschiedlichen Chargen des verwendeten Kaninchen-Retikulozyten-Lysates.

Auch hier zeigt der Gradient (Abbildung 3.3 A, oben) zunächst deutlich getrennte *Peaks* für 40S und 60S Untereinheiten. Die Kontrolle der rRNA der isolierten Partikel nach TRI_{ZOL}-Extraktion zeigt diesmal bereits nach diesem ersten Gradienten eine hohe Reinheit und überwiegend intakte rRNA (Abbildung 3.3 A, unten). Aus diesem Grunde wird dieser Methode zur Präparation ribosomaler Untereinheiten im weiteren Verlauf der Vorzug gegeben.

Während der laufenden Arbeit mit eukaryotischen Ribosomen aus RRL trat allerdings ein weiteres Problem der Qualität der Untereinheiten auf. Einige Chargen des für die Präparation verwendeten Lysates weisen im Gradientenprofil eine Schulter auf (in der Abbildung mit * gekennzeichnet), etwas vor dem herkömmlichen 40S *Peak* und in diesen übergehend (Abbildung 3.3 B, oben). Die RNA-Analyse dieser Schulter (Abbildung 3.3 B, unten) zeigt deutlich das Vorhandensein von nicht degradierter 18S rRNA. Es handelt sich hierbei also ebenfalls um 40S Partikel mit zumindest intakter rRNA. Eine Analyse der ribosomalen Proteine mittels TCA-Fällung (Kapitel 2.6.5) und SDS-PAGE beider 40S-*Peaks* (Abbildung 3.4) zeigt letztendlich das Fehlen von mindestens fünf nicht näher charakterisierten Proteinen der kleinen Untereinheit. Wie sich herausstellte, sind bei

Präparationen von ribosomalen Untereinheiten aus RRL auch bei striktem Abtrennen der 40S-Abbau-Schulter während der Aufreinigung diese Partikel zum Teil auch weiterhin in der finalen 80S-Probe vorhanden. Kryo-EM Rekonstruktionen von ribosomalen Komplexen aus Kaninchen zeigen nach rechnergestützter 3D-Sortierung unter anderem Populationen von Ribosomen mit fehlenden 40S-Proteinen (vgl. Kapitel 3.2.2, Abbildung 3.21, Phase II, Population 3 sowie persönliche Rücksprache mit Dr. Tetyana Budkevych, Charité Universitätsmedizin Berlin, Institut für Medizinische Physik und Biophysik, AG Prof. Spahn).



3.1.3 Optimierung der Pufferbedingungen für 80S • HCV IRES Komplexe

Zur Bildung eines funktionellen 80S-Initiationskomplexes benötigt die Hepatitis C Virus IRES RNA, wie unter Kapitel 1.2.3.3 beschrieben, nur einen kleinen Teil der kanonischen Initiationsfaktoren [100; 135]. Allerdings ist nach Lancaster und Kollegen [96] auch eine vollständig von Initiationsfaktoren unabhängige Translationsinitiation der HCV IRES in Anwesenheit von Calzium und erhöhter Magnesiumkonzentrationen möglich. Diesem Umstand wird während dieser Arbeit Rechnung getragen. Die entsprechenden Bindungsbedingungen für die ribosomalen Untereinheiten und die HCV IRES RNA werden dazu durch Veränderung der Ionenkonzentration (Mg²⁺, K⁺ und am Ende auch Ca²⁺) so optimiert, dass für die Kryo-EM ausreichend stabile Komplexe entstehen. Für alle Versuche

in diesem Abschnitt wird HCV IRES RNA nt 40-379 (d.h. IRES ohne Domäne I) verwendet. Gradientenprofile werden immer mit 10-30% Saccharose im entsprechenden Puffer durchgeführt und die Anwesenheit der IRES RNA in den binären 40S • IRES bzw. in den 80S • IRES Komplexen wird mit Hilfe ihrer fluoreszierenden Markierung (FTS) in einer nativen Kompositgelelektrophorese und später durch direkte Messung der FTS-Fluoreszenz in den einzelnen Fraktionen der Gradienten überprüft (siehe Kapitel 2.4.4 und 2.5.6).

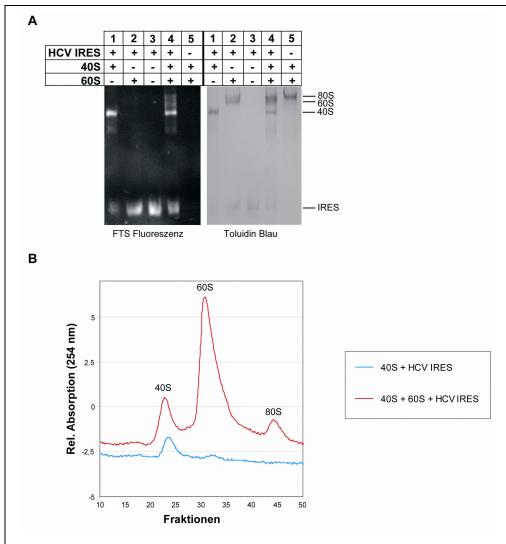


Abbildung 3.5 Ribosomen-Bindungstest der HCV IRES RNA unter FBB(K)-Bedingungen. (A) Natives Gel; links Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA, rechts dasselbe Gel gefärbt mit Toluidin-Blau (angefärbt wird hierbei gleichermaßen rRNA und IRES). (B) Typisches Gradientenprofil von binären 40S • IRES Komplexen mit und ohne Zugabe von 60S Untereinheiten.

Laut Kieft et al. [83] nimmt die HCV IRES RNA unter entsprechenden Ionenbedingungen eine für die Translationsinitiation essentielle Tertiärstruktur an. Daher werden die ersten Versuche zur Erstellung von Initiationsfaktor-freien 80S • HCV IRES Komplexen zunächst unter den von ihm beschriebenen Pufferbedingungen durchgeführt. Der "Folding-Binding-Buffer" nach Kieft hatt dabei folgende Ionenkonzentrationen (FBB(K)-Bedingungen): 2,5 mM Mg²⁺ und 300 mM K⁺. Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse dieser initialen Versuche. Das native Kompositgel (Abbildung 3.5 A) zeigt deutlich eine Ko-Migration der IRES RNA (Bahn 1 links, FTS-Fluoreszenz) mit 40S-Partikeln (Bahn 1 rechts) und somit die Bildung von binären 40S • IRES Komplexen. Die Komplexierung von IRES RNA mit 60S Untereinheiten (Bahn 2 links, FTS-Fluoreszenz und Bahn 2 rechts) ist dagegen nicht zu beobachten. Eine unspezifische Bindung der IRES an 60S Untereinheiten kann somit ausgeschlossen werden. Eine deutliche Bildung von 80S • IRES Partikeln kann unter FBB(K)-Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Bahn 4). Die HCV IRES RNA ko-migriert weiterhin fast ausschließlich mit 40S Untereinheiten (vgl. Bahn 1 und 4 links, FTS-Fluoreszenz mit Bahn 1 und 4 rechts). Die Bildung von 80S-Partikeln ist möglich (vgl. Bahn 4 rechts, obere Bande und Bahn 5 rechts), diese enthalten jedoch keine HCV IRES. Die Bildung IRES-freier 80S-Partikel scheint unter diesen Ionenbedingungen bevorzugt zu werden. Der analytische Gradient (Abbildung 3.5 B, rot) zeigt ebenfalls nur einen sehr geringen Anteil an 80S-Partikeln in Anwesenheit der HCV IRES RNA.

Der Einfluss von monovalenten und divalenten Kationen (besonders K⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺) auf die Komplexierung oder Dissoziation von ribosomalen Partikeln ist bereits bei Chao, sowie Hapke & Noll untersucht worden [26; 61]. Lancaster et al. [96] haben einen Einfluss von Magnesium- und Calciumionen auf die HCV IRES gesteuerte Initiation der Proteinbiosynthese beobachtet. Es liegt daher nahe, die Ionenbedingungen für die Bildung stabiler 80S • IRES Komplexe zu überprüfen und schrittweise anzupassen.

Da eine hohe Magnesiumkonzentration der Bildung von 80S Ribosomen förderlich sein soll, werden die Pufferbedingungen für die 60S Assoziation zunächst dahingehend angepasst; Mg²⁺ wird auf 10 mM erhöht, die K⁺-Konzentration wird bei 300 mM belassen. Obwohl die Struktur der HCV IRES RNA sich in einem Bereich von 2,5 bis 10 mM Mg²⁺ nicht signifikant ändert [83], wird die Bindung der IRES RNA an 40S Untereinheiten hier und in allen folgenden Versuchen weiterhin unter FBB(K)-Bedingungen (2,5 mM Mg²⁺ und 300 mM K⁺) durchgeführt, da die durch die IRES ausgelösten Konformationsänderungen der 40S Untereinheit [178] erhalten werden sollten - ribosomale Untereinheiten werden bei veränderten Magnesiumkonzentrationen konformationell zunehmend unflexibel [171]. Die

erstellten ribosomalen Komplexe werden jeweils mittels analytischer Dichtegradienten-Zentrifugation analysiert (Abbildung 3.6) und durch Veränderung der Zentrifugationsbedingungen auch bezüglich ihrer Stabilität untersucht. Verglichen mit Abbildung 3.5 B, zeigt sich auch tatsächlich eine deutliche Zunahme der 80S Partikel, mit (Abbildung 3.6 A, rotes Profil) und ohne IRES RNA (Abbildung 3.6 A, grünes Profil).

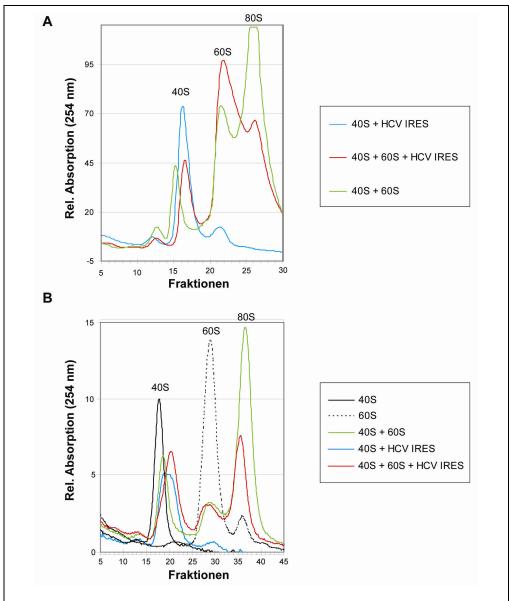


Abbildung 3.6 Ribosomen-Bindungstest der HCV IRES RNA bei erhöhter Mg²⁺-Konzentration (10 mM) unter verschiedenen Zentrifugationsbedingungen. (A) Gradientenprofil bei schneller Zentrifugation mit hoher g-Zahl. (B) Gradientenprofil bei sanfter Zentrifugation mit niedriger g-Zahl.

Allerdings fällt auf, dass die HCV IRES RNA einer Bildung von 80S Ribosomen trotz hohem Magnesiumgehalt im Puffer entgegen wirkt. Es werden deutlich 80S-Partikel in Anwesenheit der HCV IRES gebildet (Abbildung 3.6 A, rotes Profil), jedoch in deutlich geringerem Maße als ohne IRES (Abbildung 3.6 A, grünes Profil). Der überwiegende Teil der ribosomalen Untereinheiten komplexiert nicht zu 80S Ribosomen. Dies steht im Gegensatz zu der bei Schüler untersuchten CrPV IGR IRES [165], welche die Bildung von 80S-Partikeln fördert. Zudem scheinen die in Anwesenheit von HCV IRES gebildeten 80S-Partikel instabil zu sein.

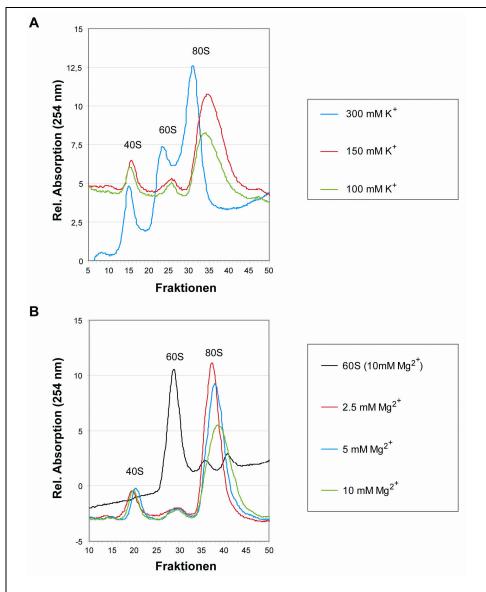


Abbildung 3.7 Ribosomen-Bindungstest der HCV IRES RNA unter verschiedenen Ionenbedingungen bei sanfter Zentrifugation mit niedriger g-Zahl. (A) Gradientenprofil bei 10 mM Mg^{2+} und abnehmender K^+ -Konzentration. (B) Gradientenprofil bei $150 \text{ mM } K^+$ und abnehmender Mg^{2+-} Konzentration.

Unter sehr milden Zentrifugationsbedingungen bilden sich deutlich mehr 80S-Partikel in Anwesenheit der HCV IRES als unter Standard-Zentrifugationsbedingungen (vgl. rote Profile Abbildung 3.6 A und Abbildung 3.6 B). Ohne HCV IRES gebildete 80S-Partikel sind dagegen wesentlich stabiler (vgl. Abbildung 3.6 A mit Abbildung 3.6 B, jeweils grünes Profil). Dies lässt darauf schließen, dass die gebildeten 80S-Partikel trotz hoher Magnesiumkonzentration unter Zentrifugationsbedingungen mit hoher Beschleunigung und den verwendeten Pufferbedingungen instabil sind und aufgrund des hohen auf die Partikel einwirkenden Druckes stärker wieder in 60S und 40S Untereinheiten (bzw. 40S • HCV IRES) langsamen Gradienten. zerfallen, im Aber nicht nur eine Magnesiumkonzentration und zu hohe Scherkräfte während der Zentrifugation, sondern auch eine zu hohe Kaliumkonzentration kann für die Dissoziation der 80S-Partikel verantwortlich sein. Daher wird als nächstes der K⁺-Ionen Anteil im Rekonstitutionspuffer verringert, die hohe Mg²⁺-Konzentration aber zunächst beibehalten (10 mM). Die Bildung von 80S-Partikeln in Anwesenheit von HCV IRES ist mittels analytischer Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bei niedriger g-Zahl überprüft (Abbildung 3.7 A) worden. Der Anteil an freien ribosomalen Untereinheiten nimmt im Vergleich zum 80S-Peak mit sinkender K⁺-Konzentration ab. Bei einer Konzentration von ≤ 150 mM K⁺ liegen überwiegend 80S-Partikel vor (Abbildung 3.7 A, rotes und grünes Profil), bei 300 mM K⁺ ist der Anteil freier 40S und 60S Untereinheiten größer (Abbildung 3.7 A, blaues Profil). Eine K⁺-Konzentration von maximal 150 mM wird daher im weiteren Verlauf beibehalten. Da, wie bereits erwähnt, erhöhtes Magnesium die Struktur der ribosomalen Untereinheiten verändern kann, wird der Anteil an Mg²⁺-Ionen während der 60S Assoziation nun wieder abgesenkt. Die Profile nach analytischer Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bei niedriger g-Zahl zur Überprüfung der Bildung von 80S-Partikeln in Anwesenheit von HCV IRES sind in dargestellt. Tatsächlich ist bereits eine Abbildung 3.7 В nahe-physiologische Magnesiumkonzentration von 2,5 mM für die Bildung von überwiegend 80S-Partikeln in Anwesenheit von HCV IRES RNA ausreichend (Abbildung 3.7 B, rotes Profil). Um ein Mindestmaß an Stabilität in den gewünschten 80S • IRES Komplexen zu erhalten, wird jedoch für alle weiteren Versuche eine mittlere Magnesium-Konzentration gewählt (5 mM) und die sanften Zentrifugationsbedingungen werdenb zunächst beibehalten.

Die Ionenbedingungen zur Bildung von RRL-80S-Partikeln in Anwesenheit von HCV IRES (R80S-Puffer) sind somit 5 mM Mg²⁺ und 150 mM K⁺. Die direkte Überprüfung einer Ko-Sedimentation (und somit Bindung) der HCV IRES RNA mit den 40S Untereinheiten und 80S Ribosomen im Saccharosegradienten wird durch Messung der FTS-Fluoreszenz der IRES

RNA in den einzelnen Fraktionen des Gradienten möglich (Abbildung 3.8 A, gepunktete Linien). Die Bindung von IRES RNA an 40S-Partikel ist deutlich erkennbar (vgl. blaues Gradientenprofil und blaue gepunktete Linie), ebenso ko-sedimentiert HCV IRES RNA mit den 80S-Partikeln (vgl. Abbildung 3.8 A, roter Gradient und rote gepunktete Linie).

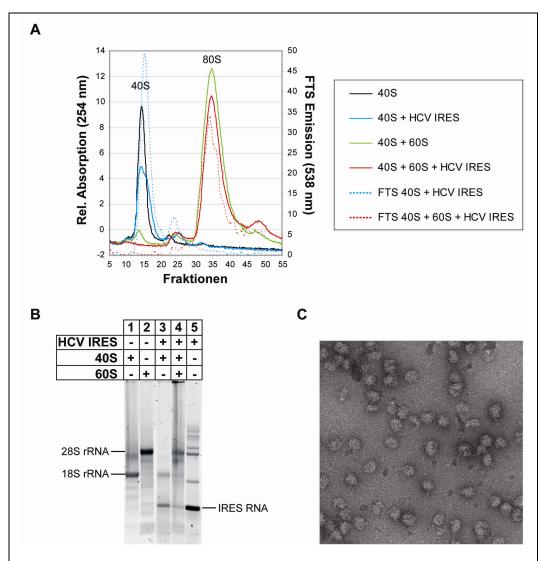


Abbildung 3.8 Erste Präparation von 80S • HCV IRES Komplexen für die Kryo-EM. (A) Typisches Gradientenprofil nach sanfter Zentrifugation unter R80S-Bedingungen. Die gepunktete Linie markiert die Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA in den einzelnen Fraktionen des Gradienten. (B) RNA-Agarose-Gelelektrophorese (1% Agarose) von isolierten 40S • HCV IRES und 80S • HCV IRES Komplexen. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten 80S • IRES Komplexen nach Negativkontrastierung. Überwiegend 80S Ribosomen sind deutlich als helle Partikel vor dem dunklen Hintergrund zu erkennen.

Es sind unter diesen Puffer- und Zentrifugationsbedingungen nahezu keine freien Untereinheiten in den 80S-Proben mehr vorhanden, weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von HCV IRES im Rekonstitutionsansatz (vgl Abbildung 3.8 A, rotes und grünes Profil). Sämtliche 40S • IRES Komplexe sind nach Assoziation von 60S Untereinheiten in 80S Ribosomen gebunden, die erstellten 80S-Partikel schienen somit vollständig mit HCV IRES besetzt zu sein.

Eine erste Präparation von 80S • HCV IRES Komplexen für die Kryo-EM erfolgt daher aus einem ähnlichen Gradienten. Nach Isolierung der Komplexe durch sanftes Pelletieren der 80S-*Peak*fraktionen werden diese mittels TRI_{ZOL}-Extraktion und RNA-Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Abbildung 3.8 B). HCV IRES RNA ist deutlich in binären 40S • IRES Komplexen enthalten (Bahn 3), die für 40S Untereinheiten charakteristische 18S rRNA und IRES RNA können beide in der Probe nachgewiesen werden. Die 80S • HCV IRES Probe enthält nach Pelletieren ebenfalls noch IRES RNA, zusammen mit 18S rRNA und der 28S rRNA der 60S Untereinheit (Bahn 4). Eine elektronenmikroskopische Voruntersuchung nach Negativkontrastierung (Abbildung 3.8 C) ergibt das Vorhandensein von überwiegend 80S Partikeln und nur wenig ribosomalen Untereinheiten in der durch Pelletieren isolierten 80S • IRES Probe. Qualität und Stabilität der erhaltenen 80S • HCV IRES Komplexe scheinen für eine weitere strukturbiologische Untersuchung ausreichend. Die ebenfalls kryo-elektronenmikroskopisch untersucht worden. Probe ist daher computergestützte Analyse und 3D-Rekonstruktion ergab jedoch ein leeres 80S Ribosom (ohne Abbildung). Die erstellten 80S • HCV IRES Komplexe sind also immer noch zu instabil für eine erfolgreiche Präparation; die IRES RNA dissoziiert entweder während des Pelletierens der Komplexe von den 80S-Partikeln oder im Zuge des Wiederauftauens gelagerter Probe und anschließendem einfrieren auf das Kryo-EM Grid. Eine weitere Optimierung der Pufferbedingungen ist daher notwendig.

Bei Lancaster et al. [96] ist beschrieben, dass die Zugabe von Calcium die Bildung von Initiationsfaktor-freien 80S • HCV IRES Partikeln unterstützt. Allerdings wird dort mit einem System gearbeitet, in dem Elongationsfaktoren und Aminoacyl-tRNAs vorhanden sind. Der beschriebene positive Effekt des Ca²⁺ wird daher für das hier verwendete rekonstituierte System ohne zusätzliche Translationsfaktoren überprüft; die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Eine Überprüfung der HCV IRES Bindung an die 80S Ribosomen erfolgt auch hier über direkte Messung der FTS-Fluoreszenz der IRES RNA in den einzelnen Fraktionen des Gradienten (Abbildung 3.9 B, gepunktete Linien).

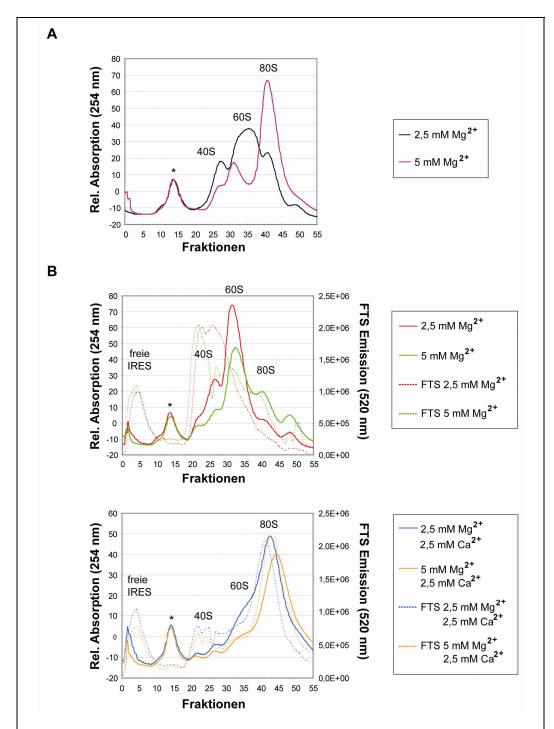


Abbildung 3.9 Einfluss von Ca²⁺ auf Bildung von 80S • HCV IRES Komplexen. Zentrifugation mit hoher g-Zahl. Puffer mit 150 mM K⁺. (A) Gradientenprofil von 80S Partikeln ohne HCV IRES. (B) Gradientenprofile von 80S-Partikeln in Anwesenheit von HCV IRES. Die gepunktete Linie markiert jeweils die Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA in den einzelnen Fraktionen der Gradienten. Der mit einem Stern (*) gekennzeichnete Peak in allen Profilen stellt die unter 3.1.2 beschriebenen unvollständigen 40S Untereinheiten dar.

Bei Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation mit hoher Beschleunigung zeigen die erhaltenen Profile erwartungsgemäß sowohl Dissoziation IRES-freier 80S Ribosomen in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration (vgl. Abbildung 3.9 A, schwarzer Gradient bei hoher g-Zahl und Abbildung 3.7 B, roter Gradient bei niedriger g-Zahl), als auch instabile, in freie Untereinheiten und IRES RNA zerfallende, 80S • HCV IRES Partikel (vgl. Abbildung 3.9 B, oben, grüner Gradient bei hoher g-Zahl und Abbildung 3.8 A, roter Gradient bei niedriger g-Zahl). Erst die Zugabe von 2,5 mM Ca²⁺ während der 80S-Bildung sorgt für einen deutlichen 80S-*Peak* (Abbildung 3.9 B, unten). Es sind nahezu keine freien Untereinheiten und dissoziierende IRES RNA zu erkennen, auch bei höherer Beschleunigung während der Zentrifugation und nahezu unabhängig von der Magnesiumkonzentration.

Die Ionenbedingungen des modifizierten R80S-Puffers sind also 5 mM Mg²⁺, 150 mM K⁺ und 2,5 mM Ca²⁺ (R80S-C Puffers) und werden ab diesem Zeitpunkt beibehalten. Auf die langsamen, aber sanften Zentrifugationsbedingungen wird nun wieder verzichtet. Neben den herkömmlichen *Peaks* für Ribosomen und IRES ist in allen Sedimentationsprofilen aus Abbildung 3.9 ein zusätzlicher *Peak* zu erkennen (*). Eine RNA- und Protein-Analyse der darin enthaltenen Partikel mittels Agarose-Gelelektrophorese nach TRIZOL-Extraktion und SDS-PAGE nach TCA-Fällung ergab, dass es sich dabei um 40S Untereinheiten mit unvollständigem Proteingehalt handelt (ohne Abbildung). Auf die unterschiedliche Qualität von Kaninchen Retikulozyten-Lysat und auch der daraus isolierten ribosomalen Untereinheiten wurde bereits in Kapitel 3.1.2 eingegangen (Abbildung 3.3 B und Abbildung 3.4). Interessant ist dabei auch, dass keine Ko-Sedimentation von IRES RNA mit diesen Partikeln erkennbar ist (vgl. Abbildung 3.9 B, gepunktete Linien und *). Sie scheinen also nicht in der Lage zu sein die HCV IRES RNA zu binden.

Um die Stabilität der unter R80S-C Bedingungen hergestellten 80S • HCV IRES Komplexe weiter zu überprüfen, wurden 80S-*Peak* Fraktionen aus einem Saccharosegradienten mit hoher Beschleunigung pelletiert, in R80S-C gelöst und auf weiteren Saccharosegradienten analysiert (Abbildung 3.10). Die Ko-Sedimentation der HCV IRES RNA mit den ribosomalen Partikeln wurde wieder über FTS-Fluoreszenz-Detektion in den einzelnen Fraktionen der Gradienten nachgewiesen. Auch nach Pelletieren sind fast ausschließlich 80S • HCV IRES Komplexe zu erkennen (Abbildung 3.10 A, roter Gradient und rote gepunktete Linie). Schockgefrieren einer solchen pelletierten Probe in Flüssigstickstoff (LN₂) und anschließendes Auftauen auf Eis führte zu einem ähnlichen Gradientenprofil (ohne Abbildung). Zentrifugation mit hoher Beschleunigung, Pelletieren, Schockgefrieren und Auftauen unter R80S-C-Bedingungen beeinträchtigt die Stabilität von in R80S-C

hergestellten 80S • HCV IRES Komplexen also nicht. Allerdings ist der positive Effekt des Calciums reversibel; Zentrifugation unter R80S-Bedingungen, also ohne Calcium im Gradientenpuffer, führt zu einer Dissoziation der 80S • HCV IRES Partikel obwohl sie in Anwesenheit von Calcium hergestellt wurden (Abbildung 3.10 B, grüner Gradient und grüne gepunktete Linie).

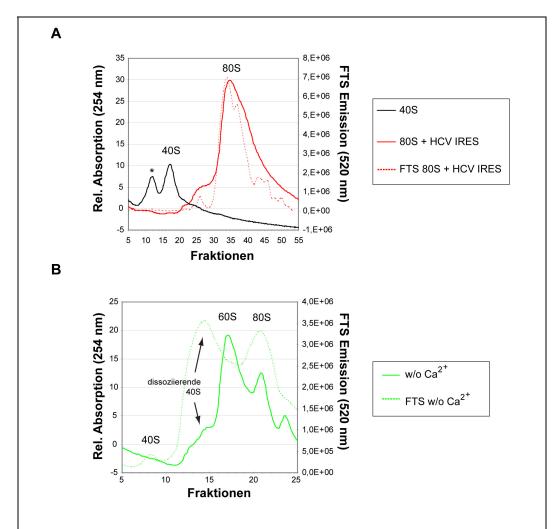


Abbildung 3.10 Stabilität der unter R80S-C-Bedingungen hergestellten und isolierten 80S • HCV IRES Komplexe. (A) Gradientenprofil nach Pelletieren und Resuspendieren in R80S-C. Einfrieren (LN₂) und Auftauen von analog präparierten Komplexen führte zu einem ähnlichen Gradientenprofil (hier nicht gezeigt). Der mit einem Stern (*) gekennzeichnete Peak stellt die unter 3.1.2 beschriebenen unvollständigen 40S Untereinheiten dar. (B) Gradientenprofil in Abwesenheit von Ca2+ im Gradientenpuffer. Die gepunktete Linie markiert in allen Profilen die Fluoreszenz derFTS-markierten IRES RNA in den einzelnen Fraktionen des Gradienten.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass im Gegensatz zu der durch Martin Schüler [165] untersuchten CrPV IGR IRES RNA die IRES des Hepatitis C Virus einer Komplexbildung von IRES und 80S Ribosomen ohne die Anwesenheit von Initiationsfaktoren entgegenwirkt. Die Erhöhung von Magnesium während der 80S Komplexierung und die Zugabe von Calcium können diesen Effekt allerdings teilweise kompensieren, es können ausreichend stabile ribosomale HCV IRES Komplexe erstellt werden. Bereits Lancaster et al. konnten zeigen, dass die HCV IRES bei erhöhter Magnesium- und Calciumkonzentration eine höhere Affinität für Initiationsfaktor-freie 80S Ribosomen aufweist und eine Funktion in der Aufrechterhaltung der Translationsinitiation dieser IRES bei erhöhtem zellulärem Mg²⁺- und Ca²⁺-Spiegel wird von ihnen diskutiert [96]. Ein Anstieg des Calciumspiegels in der Zelle hat wichtige Signalwirkung für diese, beispielsweise während der Immunabwehr [127]. Allerdings ist bei Lancaster und Kollegen auch beschrieben, dass die Translation dieser 80S • IRES Komplexe im Anschluss an die Initiationsphase inhibiert wird.

3.1.4 Darstellung von 80S • IRES Komplexen mit HCV IRES - ähnlichen IRES RNAs

Studien der letzten Jahre haben Homologien zwischen der HCV IRES und den 5'-UTRs nahe verwandter Pestiviren, (z.B dem Classical Swine Fever Virus, CSFV) aber auch einigen nicht verwandten Picornaviren (z.B. dem Porcine Teschovirus, PTV, und dem Simian Picornavirus, SPV) aufgezeigt [34; 47; 63]. Diese Homologien sind nicht nur sequenzbasiert, sondern betreffen vor allem deren Sekundärstruktur-Modelle und auch den Bedarf an Initiationsfaktoren und den Mechanismus der Translationsinitiation (vgl. Kapitel 1.2.3.3, Abbildung 1.8).

Für eine vergleichende Strukturuntersuchung dieser IRES-Elemente ist es daher notwendig, die Anwendbarkeit des optimierten R80S-C Puffers auch zur Komplexbildung von 80S Ribosomen mit diesen IRES RNAs zu testen. Die Komplexbildung erfolgt analog der für HCV IRES Komplexe verwendeten Methode (siehe Kapitel 2.6.10). Die IRES RNAs werden jeweils in FBB(K)-Puffer an 40S Untereinheiten gebunden, auf R80S-C-Bedingungen eingestellt und mit 60S Untereinheiten zu 80S • IRES Komplexen assoziiert. Abbildung 3.11 zeigt analytische Saccharose-Dichtegradientenprofile der erstellten 80S • IRES Komplexe. Auch hier sind alle IRES RNAs am 3'-Ende FTS-fluoreszenzmarkiert, um ihre Bindung an 80S-Partikel im Saccharosegradienten verfolgen zu können (Abbildung 3.11, gepunktete Linien). Alle Profile sind vergleichbar mit den für die HCV IRES beobachteten Gradientenprofilen (vgl. Abbildung 3.11 mit Abbildung 3.9 B, unten und Abbildung 3.10 A);

die Bildung von 80S Partikeln ist deutlich erkennbar. Die IRES RNAs ko-sedimentieren mit den 80S-Partikeln; die Bildung von 80S • IRES Komplexen findet demnach statt.

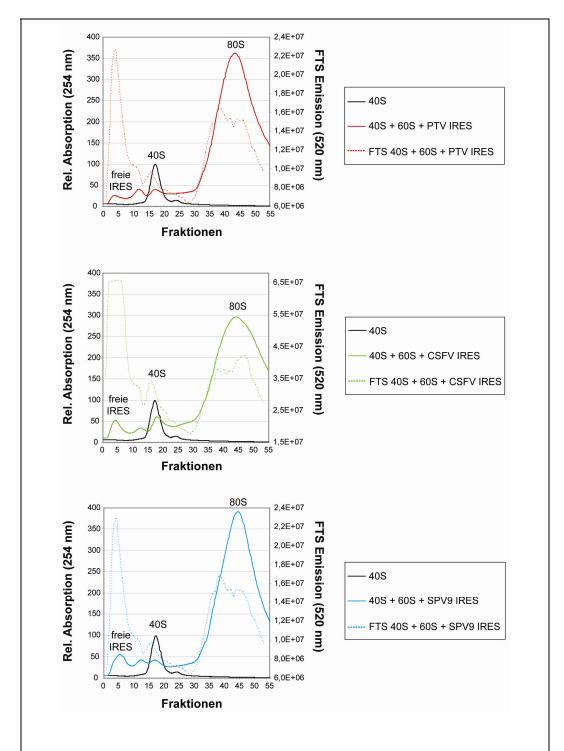


Abbildung 3.11 Darstellung von 80S • IRES Komplexen mit HCV IRES - ähnlichen RNAs unter R80S-C Bedingungen. Die gepunktete Linie markiert in allen Gradientenprofilen die Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA in den einzelnen Fraktionen des Gradienten.

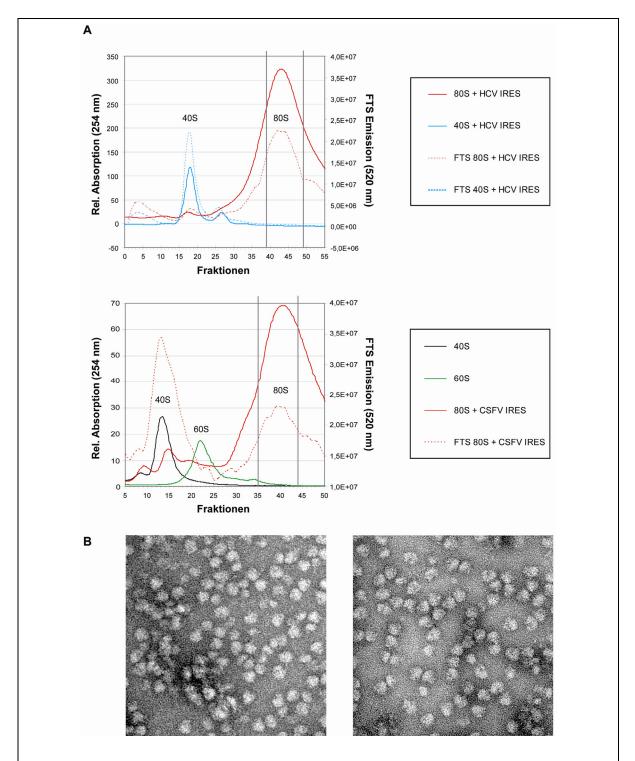


Abbildung 3.12 Präparation von 80S • HCV IRES und 80S • CSFV IRES Komplexen für die Kryo-EM. (A) Beispiele von Gradientenprofilen zur Präparation der Komplexe unter R80S-C Bedingungen. Die gepunktete Linie markiert die Fluoreszenz derFTS-markierten IRES RNA in den einzelnen Fraktionen der Gradienten. Die markierten 80S-Peak Fraktionen wurden isoliert, die Komplexe pelletiert und resuspendiert. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten 80S • IRES Komplexen nach Negativkontrastierung; links 80S • HCV IRES, rechts 80S • CSFV IRES. 80S Ribosomen sind deutlich als helle Partikel vor dem dunklen Hintergrund zu erkennen.

3.1.5 Präparation von 80S • HCV IRES und 80S • CSFV IRES Komplexen

Da aufgrund der Vorversuche von ausreichend stabilen 80S • IRES Komplexen ausgegangen werden konnte, erfolgte nun die Präparation von 80S • HCV IRES und 80S • CSFV IRES Komplexen für die Kryo-EM unter den zuvor optimierten R80S-C Pufferbedingungen. Die Erstellung binärer 40S • HCV bzw. CSFV IRES Komplexe erfolgt zunächst in FBB(K)-Puffer, die Assoziation von 60S Untereinheiten an diese Komplexe erfolgt dann unter R80S-C-Bedingungen. Um möglichst reine 80S • IRES Komplexe zu erhalten, werden diese nach Assemblierung von ungebundener IRES RNA, sowie nicht assoziierten 40S und 60S Untereinheiten mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation abgetrennt (vgl. Abbildung 3.12 A und B). Die 80S Peak-Fraktionen werden gesammelt, vereinigt und die Komplexe daraus pelletiert. Beide IRES RNAs sind dabei wieder am 3'-Ende FTSfluoreszenzmarkiert, um ihre Bindung an 80S-Partikel im Saccharosegradienten zu verfolgen (Abbildung 3.12 A, gepunktete Linien) und eine Quantifizierung der IRES-Besetzung in den finalen Kryo-EM Proben durchführen zu können (Abbildung 3.13 und Tabelle 3.1). Zusätzlich sind alle Proben zu Bestimmung der idealen Verdünnung für die Kryo-EM und um Vorhandensein intakter 80S-Partikel auf dem Grid zu Negativkontrastierung elektronenmikroskopisch analysiert worden (Abbildung 3.12 B).

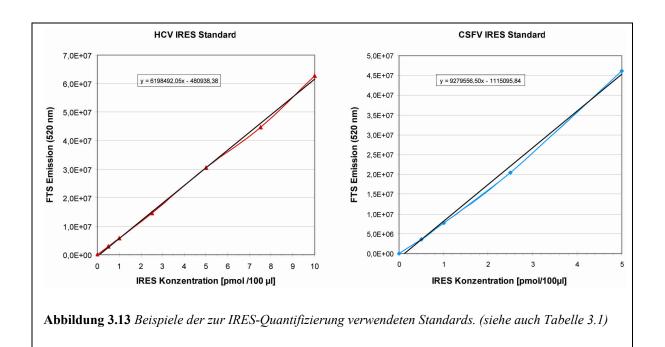


Tabelle 3.1 Beispiele zur Quantifizierung der IRES-Besetzung der isolierten Komplexe mittels FTS-Fluoreszenz. (Für die hierzu verwendeten IRES Standards siehe Abbildung 3.13)

Komplex	pmol / 100 μl (A260)	pmol / 100 µl (FTS)	Besetzung (%)
80S • HCV IRES	0,54	0,49	90,74
80S • CSFV IRES	0,96	0,45	47,11

Die Quantifizierung der IRES-Besetzung ergibt für die isolierte 80S • HCV IRES Probe ca. 91% und ist somit nahezu ideal zur kryoelektronenmikroskopischen Untersuchung, die 80S • CSFV IRES Probe weist eine Besetzung von rund 47% auf.

Die Quantifizierung mittels FTS-Fluoreszenz der IRES RNAs erwies sich im Nachhinein jedoch für beide IRES-Elemente als ungenau, der Anteil an IRES-besetzten 80S Ribosomen im Datensatz war viel geringer. Allerdings können die leeren 80S-Partikel *in silico* aus den Datensätzen der HCV IRES und CSFV IRES 80S-Strukturen entfernt werden. Dieser Umstand wird in Kapitel 3.2.2 und Abbildung 3.21 noch genauer beschrieben. Eine Besetzungsbestimmung mittels radioaktiver Markierung der IRES RNA oder durch eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) sollte jedoch getestet werden, um die Verlässlichkeit der Quantifizierung sicherzustellen.

3.1.6 Affinitätschromatographie von 80S • IRES Komplexen

Die Bestimmung der 3D-Struktur eines Ribosoms mittels Kryo-EM ist im Prinzip ein Mittelungsverfahren vieler einzelner 2D-Projektionen von Ribosomen. Zur Berechnung einer hochauflösenden 3D-Struktur ist deshalb immer auch eine höchstmögliche Reinheit und größtmögliche Beladung der ribosomalen Partikel mit ihren Liganden nötig [50]. Ribosomen sind aber hochdynamische makromolekulare Partikel. Proben ribosomaler Komplexe sind somit oft recht heterogen, was zu verminderter Auflösung der Kryo-EM-Struktur führen kann. Wie später in Kapitel 3.2.2 ausführlich erläutert, trifft dies auch auf die in dieser Arbeit vorgestellten 80S • HCV und CSFV IRES Komplexe zu. Deshalb wurde eine weitere biochemische Aufreinigung im Vorfeld der Kryo-EM in Betracht gezogen.

Gerade in den letzten Jahren sind von verschiedenen Arbeitsgruppen Methoden vorgestellt worden, Ribosomen und andere große RNA-Protein-Komplexe mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen. Prinzipiell beruhen alle Methoden darauf, dass kurze RNA-

Haarnadelstrukturen (RNA-tags), die Liganden für an einer Matrix immobilisierte Antibiotika oder Fusionsproteine bilden, in den Komplex eingebracht werden. Fünf dieser RNA-tags, ein Streptavidin-bindendes tag, ein MS2-Hüllprotein-bindendes tag, ein Tobramycin-bindendes tag und zwei Varianten eines Streptomycin-bindenden RNA-tags, werden während dieser sollen nachfolgend vorgestellt Arbeit getestet und werden. Eine genaue Methodenbeschreibung für alle RNA-tags ist unter Kapitel 2.6.11 zu finden. Das RNA-tag befindet sich dabei am 5'- oder am 3'-Ende der IRES RNA, zwischen IRES und tag ist dabei jeweils (mit Ausnahme des StAv-tag Konstrukte) eine 10 bis 16 Nukleotide lange Platzhalter-Sequenz (engl.: spacer; siehe Kapitel 2.2.2.1). Alle IRES RNAs sind an ihrem 3'-Ende FTSfluoreszenzmarkiert. Das Ausbilden der korrekten IRES-Tertiärstruktur wurde zu Beginn eines jeden Versuches durch Inkubation der RNAs in FBB(K)-Puffer sichergestellt. Alle Methoden werden zunächst ausschließlich mit getaggter IRES-RNA getestet und zum Teil später auch mit 40S • IRES und 80S • IRES Komplexen. Da die Versuche zur Affinitätschromatographie bereits parallel zur Optimierung der Pufferbedingungen (Kapitel 3.1.3 und 3.1.4) begonnen wurden, erfolgen sie zunächst unter FBB(K)-Bedingungen, später auch mit R80S und zuletzt mit R80S-C Puffer. Die Ergebnisse sind nachfolgend chronologisch dargestellt.

Als erstes wird das Streptavidin-bindende RNA-Aptamer (StAv-tag) nach Srisawat und Engelke [179] im sogenannten "Batch"-Verfahren getestet. Der gesamte Versuch erfolgt unter FBB(K)-Bedingungen, bei einem pH-Wert von 7,5 und 4°C. HCV IRES RNA mit und ohne StAv-tag wird dazu mit Streptavidin-Agarose inkubiert, mit Puffer gewaschen und durch Biotin eluiert. Überstand, Waschfraktionen und Eluat werden dann auf einem denaturierenden PAA-Gel analysiert (Abbildung 3.14).

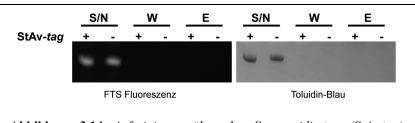


Abbildung 3.14 Aufreinigung über das Streptavidin-tag (StAv-tag). Bindungstest von getaggter und ungetaggter HCV IRES RNA unter FBB(K)-Bedingungen (6% PAA/Urea); links Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA, rechts dasselbe Gel gefärbt mit Toluidin Blau. $S/N = \ddot{U}$ berstand, W = vereinigte Waschfraktionen, E = Eluat

Aus der Abbildung wird deutlich, dass keinerlei Bindung der IRES an die Matrix erfolgt, die gesamte RNA ist im Überstand. Gründe für die ausbleibende Bindung des StAv-tags könnten eine inkorrekte Tertiärstruktur des tags sein bzw. eine "Maskierung" der tag-Bindestelle durch die komplexe Tertiärstruktur der HCV IRES. Das Einfügen einer spacer -Sequenz zwischen IRES und tag könnte dieses Problem beheben. Versuche zum StAv-tag wurden jedoch in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Als nächstes wird HCV IRES mit dem Streptomycin-bindenden RNA-Aptamer (StM-*tag* A) nach Bachler [9] mittels kleiner Zentrifugier-Säulchen auf Bindung untersucht. Das Säulenmaterial wird hierzu frisch hergestellt [197]. Auch dieser Test erfolgt unter FBB(K)-Bedingungen, bei einem pH-Wert von 7,5 und durchgängig 4°C. HCV IRES RNA ohne und mit StM-*tag* A am 5'- bzw. 3'-Ende wird dazu mit Streptomycin-gekoppelter Sepharose inkubiert, mit Puffer gewaschen und durch 10 μM Steptomycin eluiert. Überstand, Waschfraktionen und Eluat werden dann auf einem denaturierenden PAA-Gel analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

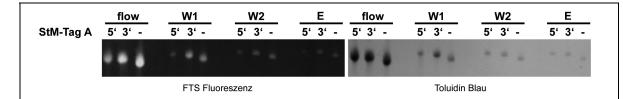


Abbildung 3.15 Aufreinigung über das Streptomycin-tag Variante A (StM-tag A). Bindungstest von getaggter und ungetaggter HCV IRES RNA unter FBB(K)-Bedingungen (6% PAA/Urea); links Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA, rechts dasselbe Gel gefärbt mit Toluidin-Blau. flow = Durchfluss, W1 - W2 = Waschfraktionen, E = Eluat.

Die meiste RNA ist ungebunden im Säulendurchfluss, ein kleiner Teil kann eluiert werden. Durch das Vorhandensein unge*tag*gter HCV IRES RNA im Eluat kann unspezifische Bindung an das Säulenmaterial nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Der hohe Anteil an RNA in allen Waschfraktionen läßt die Elution der IRES ebenfalls fragwürdig erscheinen. Alternativ ist der Versuch mit dem bei Windbichler & Schroeder verwendeten Säulenpuffer durchgeführt worden, die Ergebnisse sind allerdings ebenfalls unklar (ohne Abbildung). Auch dieses RNA-*tag* wurde während der weiteren Arbeit nicht mehr verwendet.

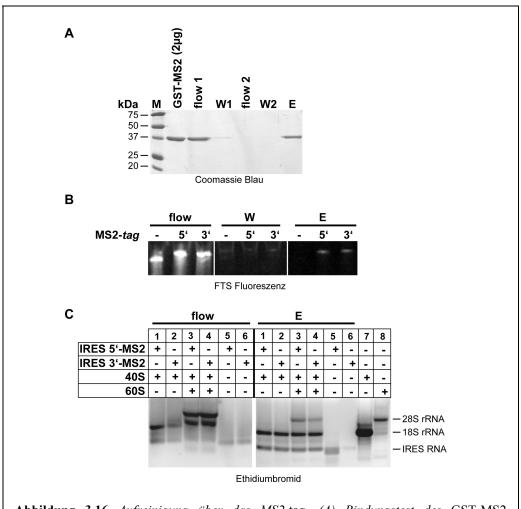


Abbildung 3.16 Aufreinigung über das MS2-tag. (A) Bindungstest des GST-MS2 Fusionsproteins (12% SDS-PAGE) unter FBB(K)-Bedingungen. flow 2 = simulierter Probenauftrag (B) Bindungstest von getaggter und ungetaggter HCV IRES RNA unter FBB(K)-Bedingungen (6% PAA/Urea), Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA. (C) Bindungstest von HCV IRES, 40S • IRES und 80S • IRES Komplexen unter FBB(K)-Bedingungen. Analyse der RNA nach $\text{TRI}_{\text{ZOL}}\text{-Extraktion}$ (1% Agarose). flow = Durchfluss, W = Waschfraktionen, E = Eluat.

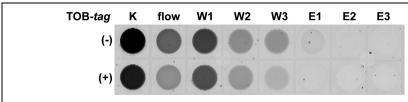
Der dritte Test zur Affinitätschromatographie zeigt das bei Ji und Kollegen [75] beschriebene MS2-bindenden RNA-tag (MS2-tag). Das MS2-tag stellt einen Sonderfall unter den in dieser Arbeit untersuchten RNA-tags dar. Die Bindung getaggter HCV IRES RNA an das Säulenmaterial kann nicht direkt erfolgen, sondern nur unter Zuhilfenahme eines Vermittlers, in diesem Fall des GST-MS2 Fusionsproteins. Das Fusionsprotein muss dabei zunächst alleine über den GST-Anteil an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gebunden werden. Die Anlagerung von getaggter RNA erfolgt mittels des tags an den MS2-Teil des Fusionsproteins. Eluiert werden können die RNA-Proteinkomplexe dann mit reduziertem Glutathion. Das

GST-MS2 Fusionsprotein wird zunächst allein auf Bindung an die Matrix und Elution getestet (Abbildung 3.16 A). Der Versuch verläuft in FBB(K)-Puffer und mittels kleiner Zentrifugier-Säulchen. Dabei wird nach dem eigentlichen Waschen der Säule zusätzlich ein IRES-Probenauftrag mit reinem Puffer simuliert (flow 2) und ein weiterer Waschschritt angeschlossen (W2), um eine Stabilität des gebundenen Proteins während der Aufreinigung von IRES-RNA bzw. Ribosom-IRES-Komplexen zu garantieren. Das GST-MS2 Fusionsprotein zeigt zufrieden stellende Stabilität und kann deutlich eluiert werden.

Erste Experimente zur GST-MS2-vermittelten Aufreinigung von HCV IRES RNA finden nun ebenfalls in FBB(K)-Puffer bei einem pH-Wert von 7,5 und durchgehend 4°C mittels kleiner Zentrifugier-Säulchen statt. Getaggte und ungetaggte HCV IRES RNA wird auf ihre Bindung an die mit GST-MS2 Fusionsprotein abgesättigte Matrix untersucht (Abbildung 3.16 B). Säulendurchfluss, Waschfraktionen und Eluat werden auf einem denaturierenden PAA-Gel analysiert. Der Großteil an getaggter IRES RNA ist im Säulendurchfluss, ein kleiner Teil kann jedoch eluiert werden. In allen Waschfraktionen und auch im Eluat der ungetaggten Kontrolle läßt sich keine IRES RNA nachweisen. Eine unspezifische Bindung und Elution kann somit ausgeschlossen werden.

Weiterhin wird die Anwendbarkeit dieses tags für 40S • HCV IRES und 80S • HCV IRES Komplexe im Vergleich zu freier IRES RNA unter FBB(K)-Bedingungen untersucht (Abbildung 3.16 C). Die Komplexe werden dazu direkt nach Assemblierung ohne Reinigung durch Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation auf die mit GST-MS2 Fusionsprotein abgesättigten Säulchen gegeben, gewaschen und eluiert. Säulendurchfluss und Eluat aller Proben werden dann zusammen mit freien 40S und 60S Untereinheiten nach TRIzoL-Extraktion mittels RNA-Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Der meiste Teil der in Anwesenheit von IRES gebildeten 80S-Partikel (Abbildung 3.16 C, flow Bahn 3 und 4) bzw. der 40S • IRES Komplexe (Abbildung 3.16 C, flow Bahn 1 und 2) und der freien IRES (Abbildung 3.16 C, flow Bahn 5 und 6) ist im Säulendurchfluss. 40S • IRES Komplexe scheinen mit dieser Methode aufgereinigt werden zu können denn es läßt sich sowohl 18S rRNA als auch IRES RNA in der Probe nachweisen (Abbildung 3.16 C, Eluat Bahn 1 und 2). Auch IRES-haltige 80S-Partikel werden eluiert. In den entsprechenden Proben findet sich vor allem 18S rRNA und IRES RNA, aber auch 28S rRNA ist vorhanden (Abbildung 3.16 C, Eluat Bahn 3 und 4). Der Vergleich mit Kapitel 3.1.3 und Abbildung 3.5 legt nahe, dass es sich bei den 80S • IRES Komplexen im Eluat aber eher um 40S • IRES Partikel mit einigen wenigen lose assoziierten 60S Untereinheiten handelt. Weitere Versuche zum MS2-tag sind erst unter R80S-Bedingungen, alternativ auch mit dem bei Youngman et al. [203] beschriebenen Bindepuffer, mittels ÄKTA-FPLC und kleinen Zentrifugier-Säulchen, wieder unternommen worden. Die Resultate geben weitere Hinweise auf die Anwendbarkeit der Methode für 40S • IRES Partikel, sind jedoch, vermutlich aufgrund der immer noch hohen Instabilität der 80S • IRES-Komplexe, insgesamt nicht aussagekräftig (ohne Abbildung).

Das folgende untersuchte tag ist das Tobramycin-bindende RNA-Aptamer (TOB-tag) nach Hamasaki et al. [60]. Das Säulenmaterial (Tobramycin-gekoppelte Sepharose) wird dazu frisch hergestellt [62], Bindung und Elution von getaggter und ungetaggter HCV IRES RNA werden in R80S-C Puffer und zusätzlich unter den bei Hartmuth et al. [62] verwendeten Pufferbedingungen bei 4°C untersucht. Die Elution erfolgt jeweils mit Tobramycin, der pH-Wert bei dieser Methode ist 8,1. In beiden Puffersystemen sind die Ergebnisse analog Abbildung 3.17. Eine Bindung und Elution der getaggten RNA an die Matrix ist nicht zu beobachten. Nach Hartmuth et al. ist ein kritischer Parameter dieser Methode der pH-Wert [62]. Tobramycin ist bei neutralem pH positiv geladen und erst bei einem pH-Wert um 9 neutral. Der basische pH-Wert, welcher zur Bindung des RNA-tags an die Matrix somit notwendig ist, ist jedoch nicht ideal für Ribosomen. Es wird daher ein pH-Wert von 8,1 gewählt, welcher aber immer noch zu niedrig für eine ausreichende Funktionalität des tags sein könnte. Weitere Gründe für die mangelnde Bindung könnten auch hier inkorrekte Tertiärstruktur des tags oder eine "Maskierung" des strukturell sehr kleinen TOB-tags durch die komplexe Tertiärstruktur der HCV IRES sein. Im Gegensatz dazu steht allerdings die Verwendung dieses tags zur Aufreinigung von 80S • HCV IRES Komplexen aus HeLa-Zellysat bei Boehringer et al. [15].



FTS Fluoreszenz

Abbildung 3.17 Aufreinigung über das Tobramycin-tag (TOB-tag). Bindungstest der HCV IRES RNA unter R80S-C Bedingungen, Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA (Mikrotiterplatte, TYPHOON Trio). K = Kontrolle vor Auftrag auf die Säule, flow = Durchfluss, W1 - W3 = Waschfraktionen, E1 - E3 = Eluate.

Das letzte untersuchte RNA-tag ist die von Locker und Kollegen [99; 101] vorgestellte Variante des Streptomycin-bindenden RNA-Aptamers (StM-tag B). Die Funktion des StM-tags B wird sowohl für freie CSFV IRES RNA, als auch für 40S • IRES und 80S • IRES Komplexe in R80S-C Puffer bei einem pH-Wert von 7,5 untersucht. Inkubation der IRES bzw. ribosomalen Komplexe mit frisch hergestellter Streptomycin-gekoppelter Sepharose und die Waschschritte erfolgen bei 4°C, die Elution mit Streptomycin erfolgt allerdings bei Raumtemperatur und mit einer viel höheren Konzentration (5,5 mM) des Antibiotikums. Zudem zeigt das hier verwendete StM-tag B leichte Sequenzunterschiede zu dem zuvor verwendeten StM-tag A (vgl. Abbildung 3.18) Diese Unterschiede sind ausschließlich in der Schleifen-Region der Sekundärstruktur des Aptamers zu finden.

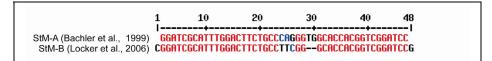


Abbildung 3.18 Vergleich der verwendeten Streptomycin-tags. Dargestellt sind die Sequenzen der Streptomycin-bindenden RNA-Aptamere StM-A und StM-B nach Analyse mittels MultAlin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/).

Abbildung 3.19 zeigt die Ergebnisse der Affinitätschromatographie, direkt nach Assemblierung der Komplexe ohne vorherige Reinigung über einen Saccharose-Dichtegradienten. Die Anwesenheit von CSFV IRES RNA wird anhand ihrer FTS-Fluoreszenzmarkierung überprüft (Darstellung als gepunktete Linien Gradientenprofilen). IRES RNA und ribosomale IRES Komplexe sind zum größten Teil im Säulendurchfluss (vgl. Abbildung 3.19 A, flow und Abbildung 3.19 B), aber auch eine deutliche Elution von IRES RNA und 40S • IRES Komplexen kann nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.19 A, E1 bis E10 und Abbildung 3.19 C, pinkfarbenes Profil und gepunktete Linie). Bindung und Elution ist spezifisch, da in den letzten Waschfraktionen keine Fluoreszenz und somit IRES RNA detektierbar ist (Abbildung 3.19 A, W1 bis W5). Auch 80S • CSFV IRES Komplexe scheinen eluiert werden zu können (Abbildung 3.19 A, E1 bis E10), allerdings zeigt die Analyse des Eluates kaum 80S-Partikel und die Anwesenheit der IRES RNA in diesen konnte nicht eindeutig bestätigt werden (Abbildung 3.19 C, blaues Profil und gepunktete Linie).

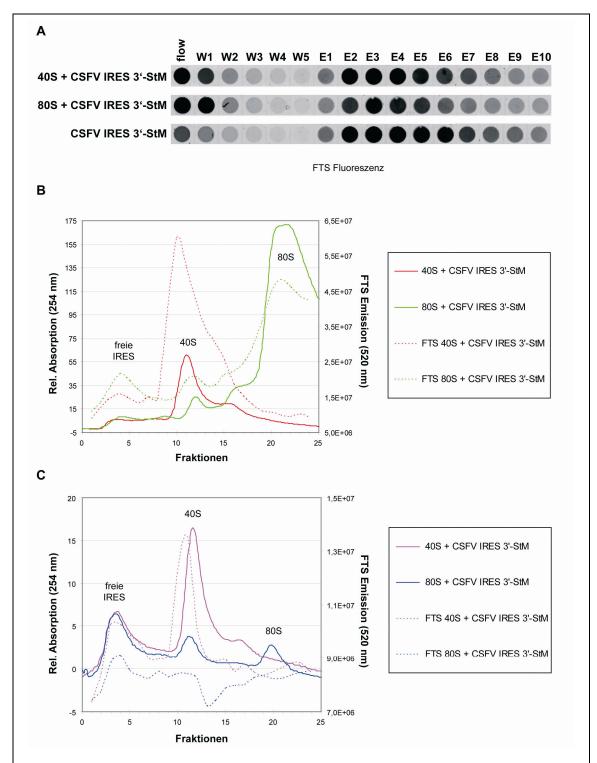


Abbildung 3.19 Aufreinigung über das Streptomycin-tag (StM-B). (A) Bindungstest der CSFV IRES RNA, 40S • IRES und 80S • IRES Komplexe unter R80S-C Bedingungen; Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA (Mikrotiterplatte, TYPHOON Trio). (B) Gradientenprofil der Durchfluss-Fraktion der ribosomalen IRES Komplexe. (C) Gradientenprofil der Eluate E2+E3 der ribosomalen IRES Komplexe. Die gepunktete Linie markiert in allen Gradientenprofilen die Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA in den einzelnen Fraktionen des Gradienten. flow = Durchfluss, W1 - W5 = Waschfraktionen, E1 - E10 = Eluate.

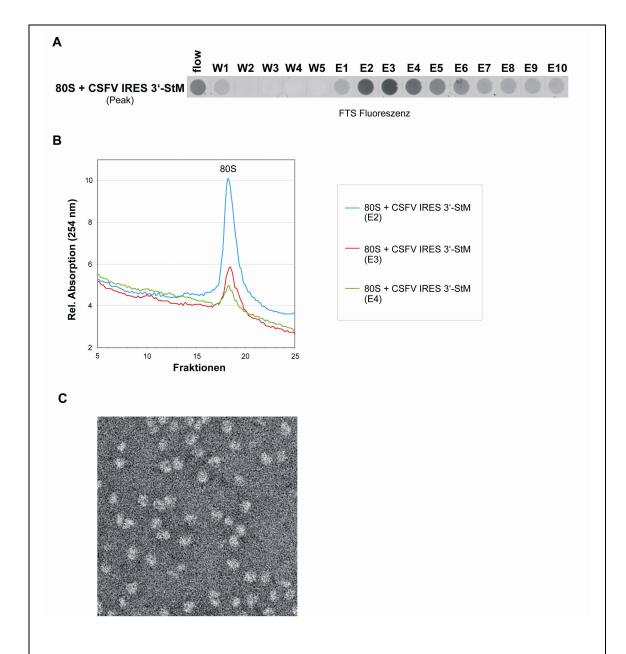


Abbildung 3.20 Aufreinigung über das Streptomycin-tag (StM-B), nach vorheriger Aufreinigung über einen Saccharose-Gradienten. (A) Bindungstest der isolierten 80S • IRES Komplexe unter R80S-C Bedingungen; Fluoreszenz der FTS-markierten IRES RNA (Mikrotiterplatte, TYPHOON Trio). (B) Gradientenprofil der Eluate. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines 80S • CSFV IRES Eluates nach Negativkontrastierung. 80S Ribosomen sind deutlich als helle Partikel vor dem dunklen Hintergrund zu erkennen. flow = Durchfluss, W1 - W5 = Waschfraktionen, E1 - E10 = Eluate.

Als nächstes folgen Versuche zur *tag*-Aufreinigung von 80S • CSFV IRES Komplexen nach vorhergehender Isolierung des 80S-*Peaks* aus einem Saccharose-Dichtegradienten durch pelletieren und lösen des Pellets in R80S-C-Puffer (Abbildung 3.20). Auch hier kann eine deutliche Elution von IRES RNA anhand ihrer FTS-Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen

werden (Abbildung 3.20 A, E1 bis E10), ein Teil verbleibt ungebunden im Säulendurchfluss, die Waschfraktionen enthalten keine RNA. Eine Analyse der Eluate (Abbildung 3.20 B) lässt erkennen, dass zwar 80S-Partikel im Eluat vorhanden sind, die Detektion von CSFV IRES RNA anhand ihrer Fluoreszenzmarkierung schlägt jedoch vermutlich aufgrund der geringen Konzentration des Eluates fehl. Die Anwesenheit von 80S Ribosomen in einem solchen Eluat bestätigt sich ebenfalls elektronenmikroskopisch mittels Negativkontrastierung (vgl. Abbildung 3.20 C). Eine anschließende kryo-elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Probe ergab jedoch leere 80S Partikel.

Die fünf in dieser Arbeit getesteten Methoden sind zusammenfassend und vergleichend hinsichlich ihres Funktionsprizipes, der verwendeten Puffersysteme und der erzielten Resultate noch einmal in Tabelle 3.2 dargestellt. Zwei Versuche, die Aufreinigung mit dem bei Ji et al. [75] beschriebenen MS2-bindenden RNA-tag (MS2-tag) und vor allem die von Locker und Kollegen [99; 101] vorgestellte Variante des Streptomycin-bindenden RNA-Aptamers (StM-tag B) sind vielversprechend für getaggte IRES RNA alleine. Mittels des StM-tag B können sogar 40S • IRES Komplexe aufgereinigt werden. Keine dieser Methoden funktioniert jedoch zufriedenstellend für 80S • IRES Komplexe. Die recht schwache Matrix-Bindung des MS2-tags (vgl. Abbildung 3.16 B) könnte durch eine zu geringe Absättigung des Säulenmaterials mit GST-MS2-Fusionsprotein bedingt sein. Die alternative Verwendung des MS2-MBP-Fusionsproteins, das im Gegensatz zu GST-MS2 ohne Prä-Bindung an eine Säule direkt zur Probe gegeben werden kann, könnte ebenfalls einen positiven Effekt auf diese Aufreinigungsmethode haben. Bei beiden Methoden könnte die Bindung der IRES an die Ribosomen, trotz optimierter Pufferbedingungen im Falle des StM-tags B, immer noch zu sein; Scherkräfte bzw. die Reibung des Säulenmaterials während der Aufreinigungsprozedur würde die Ribosomen in dem Fall sozusagen von der gebundenen IRES abstreifen. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass nur ein kleiner Teil der hergestellten 80S • IRES Komplexe überhaupt IRES enthält (nach in silico-Sortierung verbleiben weniger als ein Zehntel der Gesamtpartikel im finalen Datensatz). Anzumerken ist auch, dass alle in der Literatur beschriebenen 48S- bzw. 80S-IRES Komplexe direkt aus Retikulozyten- oder HeLa-Zell-Lysat im großen Maßstab aufgereinigt worden sind, während hier ein in vitro System mit einzeln aufgereinigten Komponenten im kleinen Maßstab verwendet wird. Ein eventueller positiver Einfluss von Initiations- oder anderen Faktoren des Lysates auf die Bindung der Komplexe an die Säule oder auf die IRES-Besetzung der Ribosomen kann daher nicht ausgeschlossen werden.

 Tabelle 3.2 Vergleichende Übersicht der getesteten Methoden zur Affinitätschromatographie.

RNA-tag	Funktionsprinzip	verwendetes Puffersystem	Ergebnis
StAv- <i>tag</i> [179]	einzelne RNA-Haarnadelstruktur bindet an Streptavidin-Agarose und kann mit Biotin eluiert werden; alles bei pH 7,5 und 4°C	FBB(K)-Puffer: 2,5 mM Mg ²⁺ , 300 mM K ⁺	keine Bindung getaggter HCV IRES RNA
StM- <i>tag</i> A [9; 197]	einzelne RNA-Haarnadelstruktur bindet an Streptomycin-gekoppelte Sepharose und kann durch Strepto- mycin eluiert werden; alles bei pH 7,5 und 4°C	FBB(K)-Puffer: 2,5 mM Mg ²⁺ , 300 mM K ⁺	schwache Bindung und Elution getaggter HCV IRES RNA Bindung eventuell unspezifisch
MS2-tag [75; 203]	dreifache RNA-Haarnadelstruktur bindet an Hüllprotein des Bakteriophagen MS2 1. GST-MS2 Fusionsprotein wird an Glutathion-Sepharose gebunden, RNA-tag kann dann an das Fusionsprotein binden und mit diesem zusammen durch reduziertes Glutathion eluiert werden 2. MBP-MS2 Fusionsprotein bindet an RNA-tag, der RNA-Protein-Komplex kann dann an Amylose binden und durch Maltose eluiert werden (diese Variante wurde jedoch nicht getestet) alles bei pH 7,5 und 4°C	FBB(K)-Puffer: 2,5 mM Mg ²⁺ , 300 mM K ⁺ R80S-Puffer: 5 mM Mg ²⁺ , 150 mM K ⁺	 gute Bindung und Elution des GST-MS2 Fusionsproteins schwache Bindung und Elution getaggter HCV IRES RNA Aufreinigung von 40S • und 80S • HCV IRES Komplexen unklar
TOB- <i>tag</i> [60; 62]	einzelne RNA-Haarnadelstruktur bindet an Tobramycin-gekoppelte Sepharose und kann durch Tobramycin eluiert werden; alles bei pH 8,1 und 4°C	R80S-C-Puffer: 5 mM Mg ²⁺ , 2,5 mM Ca ²⁺ und 150 mM K ⁺	keine Bindung getaggter HCV IRES RNA
StM- <i>tag</i> B [99; 101]	siehe StM-tag A; <i>Unterschiede:</i> 1. veränderte Sequenz des <i>tags</i> im Bereich der Haarnadelschleife 2. Elution bei Raumtemperatur und mit höherer Konzentration an Streptomycin	R80S-C-Puffer: 5 mM Mg ²⁺ , 2,5 mM Ca ²⁺ und 150 mM K ⁺	 gute Bindung und Elution getaggter CSFV IRES RNA schwache Bindung und Elution von 40S • CSFV IRES Komplexen möglich Bindung und Elution von 80S • CSFV IRES Komplexen unklar; Kryo-EM ergab leere Partikel

3.2 Kryo-EM und 3D-Rekonstruktion von 80S • IRES Komplexen

3.2.1 Datenerhebung

Für die Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur der RRL80S • HCV IRES Komplexe werden Daten an einem TECNAI POLARA F30 Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV und 39.000-facher Vergrößerung unter Niedrigdosis-Bedingungen gesammelt (20-22 e/Ų, vgl. Kapitel 2.7.2). 2.239 der aufgenommenen Mikrographen mit 2.948.823 manuell und automatisch selektierten Einzelbildern (Projektionen von Einzelpartikeln) sind insgesamt in die Rekonstruktion der 3D-Struktur eingegangen, der Datensatz ist dazu nach und nach durch Hinzufügen neuer Einzelpartikel erweitert worden.

Datensammlung und Rekonstruktion der dreidimensionalen Struktur der RRL80S-CSFV IRES Komplexe erfolgt analog dem 80S • HCV IRES Datensatz. 1.082 der aufgenommenen Mikrographen mit insgesamt 1.514.759 manuell und automatisch selektierten Einzelpartikeln gingen in die Rekonstruktion dieser 3D-Struktur ein.

3.2.2 Multireferenz Klassifizierung und Auflösung

Eine Initialstruktur der 80S • HCV IRES Komplexe ist mit den ersten 246.859 verifizierten ribosomalen Partikeln erstellt worden. Dieses wird dann einer Multireferenz-Klassifizierung in mehreren Phasen mit einem vakanten Kaninchen-80S Ribosom als neutrale Referenz unterzogen (Abbildung 3.21). Diese Multireferenz-Klassifizierung (vgl. Kapitel 2.7.6), oder auch 3D-Sortierung, ist eine effektive Möglichkeit unerwünschte Partikel auszusondern und IRES-tragende Partikel in silico zu separieren [103]. Mit Hilfe dieser Methode konnten bereits einige interessante ribosomale Komplexe hochauflösend visualisiert werden [148; 164; 166]. In Phase 1 besteht dabei ein großer Anteil der Daten aus undefinierbaren Partikeln oder Eis (Phase 1, Population 1, 3 und 4). Das IRES enthaltende Volumen (Phase 1, Population 2) wird von diesen separiert und weiterer Sortierung unterzogen (Phase 2). Hier zeigt sich die hohe Heterogenität der 80S • IRES Präparation. Die 80S • IRES Dichte trennt sich in zwei IRES enthaltende Volumen (Phase 2, Population 1 und 2), vakante 80S-Partikel mit unterschiedlicher Konformation (Phase 2, Population 5 und 6) auf. Auch zum Teil degradierte Partikeln mit unvollständiger 40S Untereinheit (Phase 2, Population 3; siehe auch Kapitel 3.1.2, 40S UE mit unvollständigem Proteingehalt) und 60S Untereinheiten (Phase 2, Population 4) sind zu finden.

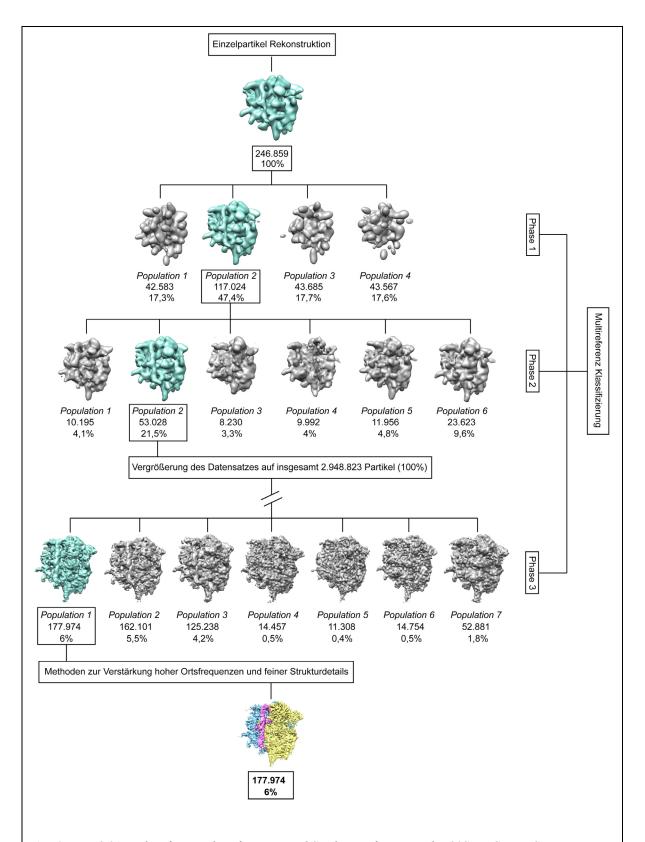


Abbildung 3.21 Multireferenz Klassifizierung und Strukturverfeinerung des 80S • HCV IRES Datensatzes. Die Umrahmungen indizieren jeweils die IRES enthaltenden Subpopulationen (grün), mit denen die Strukturverfeinerung fortgesetzt wurde. Die absoluten Zahlen der zugeordneten Partikelbilder bzw. ihr prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation sind angegeben.

Eine Mittelung dieser unerwünschen Projektionen mit Projektionen des Zielkomplexes limitiert die Auflösung der Rekonstruktionen für den sub-nanometer Bereich (<10Å). Durch das Aussortieren dieser leeren oder degradierten Partikel und wiederholtes Separieren des IRES enthaltenden Komplexes mit der höchsten Partikelanzahl (Population 2) ist daher die Auflösung bereits hier beträchtlich verbessert worden. Eine Vergrößerung des Datensatzes durch schrittweises Hinzufügen weiterer Einzelpartikel und weitere umfassendes 3D-Sortierung (Phase 3) führt schließlich zu einem hochauflösenden 80S • HCV IRES 3D-Strukturmodell. Während dieser Phase zeigt sich die konformationelle Heterogenität der 80S • IRES Partikel; der Datensatz teilt sich in sechs IRES enthaltende Teilvolumen (Phase 3, Population 1-3, sowie Population 5-6 mit IRES Fragmenten) und weitere leere 80S-Partikel (Phase 3, Population 4) auf. Die Aufteilung der Einzelpartikel in diese Populationen ist bedingt durch die hohe Flexibilität des 80S Ribosoms bzw. der 80S • IRES Partikel.

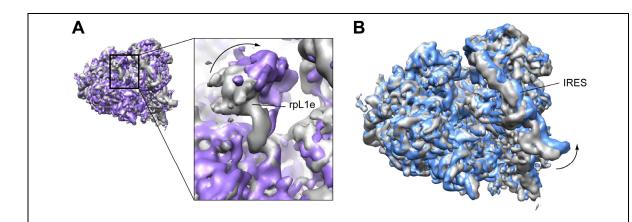


Abbildung 3.22 Flexibilität der 80S • HCV IRES Komplexe. Volumenvergleich einiger duch Multireferenz Klassifizierung entstandener IRES-enthaltender Subpopulationen aus Phase 3. Die 3D-Elektronendichtekarten sind jeweils mit Blick von der L1-Seite bei einem Oberflächenkontourniveau von 3,5 abgebildet. Unterschiedliche Konformationen wurden jeweils durch Pfeile gekennzeichnet. (A) Population 1 (grau) wurde mit Population 3 (violett) überlagert; der Bereich um das Protein rpL1e wurde vergrößert dargestellt (rechts). (B) Überlagerung von Population 1 (grau) und Population 2 (blau).

Die Untereinheiten befinden sich in verschiedenen Positionen zueinander und das charakteristische Protein rpL1e der 60S Untereinheit ist in verschiedenen konformationellen Zuständen zu beobachten. So ist z.B. rpL1e entweder in einer offenen, von der ribosomalen E-Stelle weggeklappten Konformation (Abbildung 3.22 A, Population 1, grau), oder in einer zur E-Stelle eingeklappten Konformation zu sehen (Abbildung 3.22 A, Population 3, violett).

Die hohe Flexibilität von rpL1e und dem Ribosom ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden [119; 186]. Aber auch die IRES RNA selbst ist in ihrer Bindung an das Ribosom flexibel (vgl. Abbildung 3.22 B, Population 1, grau mit Population 2, blau). Zum Herausarbeiten feiner Strukturdetails durch Verstärkung hoher Ortsfrequenzen (engl.: *high frequency enhancement*, HFE) wird daher nur das IRES enthaltende Teilvolumen mit der höchsten Einzelpartikelanzahl verwendet. In der finalen Rekonstruktion sind noch 177.974 (6%) der ursprünglichen Partikel enthalten. Allerdings kann so eine Auflösung von 7,8 Å (FSC_{0.5}) erreicht werden (vgl. Abbildung 3.23 A, rote Kurve).

Auch die 80S • CSFV IRES Komplexe erweisen sich als sehr heterogen. Die Auflösung der 3D-Rekonstruktion wird daher ebenfalls per *in silico*-Sortierung und HFE verbessert (ohne Abbildung). Die hier vorgestellte Struktur enthält noch 73.860 Partikel (5%) und erreicht eine Auflösung von 10 Å (Abbildung 3.23, helle blaue Kurve).

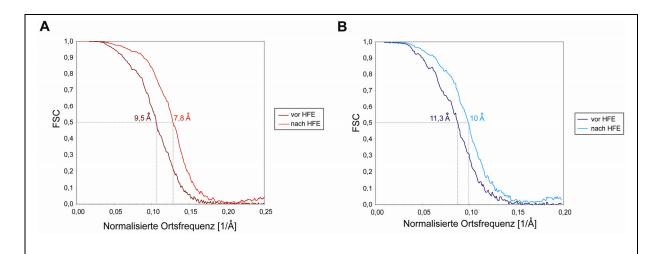


Abbildung 3.23 FSC-Kurven zur Aulösungsbestimmung mit und ohne Maskierung zur Verstärkung hochfrequenter Strukturinformationen. HFE = high frequency enhancement. Die 80S • HCV IRES Rekonstruktion (A) erreichte nach HFE eine Auflösung von 7,8 Å bei einer Pixelgröße von 1,26 Å/Pixel, die 80S • CSFV IRES (B) erreichte bei einer Pixelgröße von 2,52 Å/Pixel eine Auflösung von 10 Å nach HFE.

3.2.3 Rekonstruktion der RRL80S • HCV IRES Komplexe

Die dreidimensionale Darstellung in Abbildung 3.24 zeigt die finalen Elektronendichtekarten des RRL80S • HCV IRES Komplexes. Das Oberflächenkonturniveau (engl.: *treshold*, TH) der Elektronendichten ist in der Abbildung angegeben.

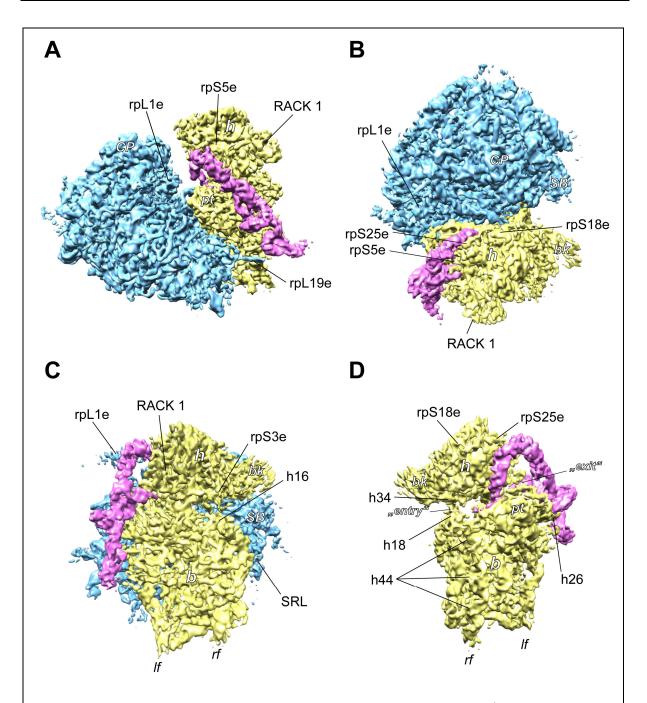


Abbildung 3.24 3D-Elektronendichtekarte des 80S • HCV IRES Komplexes bei 7,8 Å Auflösung. Blick von der L1-Seite (A), von oben (B), von der 40S-Seite (C) und von der 60S-Seite (D); bei (D) wurde die 60S Untereinheit in silico entfernt. Die Elektronendichten sind bei einem Oberflächenkonturniveau von 4 abgebildet. Die 40S Untereinheit ist jeweils in Gelb dargestellt, die 60S Untereinheit in Blau und die HCV IRES in Violett. Einige Merkmale der ribosomalen Untereinheiten sind markiert: h = Kopfdomäne (head); b = Körperdomäne (body); bk = "beak"; sh = Schulter (shoulder); pt = Plattform; lf = linker Fuβ; rf = rechter Fuβ; CP = Zentrale Protuberanz; SRL = "sarcin-ricin-loop"; SB = "stalk base". "exit" und "entry" markieren Ein- und Austrittsstelle des mRNA-Kanals. Einige Helices der 18S rRNA (h16, h18, h26, h34, h44), sowie einige ribosomale Proteine (rpS3e, rpS5e, rpS18e, rpS25e, rpL1e, rpL19e, RACK1) sind ebenfalls gekennzeichnet.

Die kleine 40S (gelb) und große 60S Untereinheit (blau) des Ribosoms können klar voneinander unterschieden werden, ebenso die als zusätzliche Elektronendichte erkennbare HCV IRES (violett). In Übereinstimmung mit dem erzielten Wert der Auflösungsbestimmung können rRNA-Helices deutlich unterschieden werden und auch α-Helikale Strukturen von Proteinen sind bereits sichtbar. Die HCV IRES befindet sich in Kontakt mit der 40S Untereinheit auf der Rückseite der 40S-Kopf- und Körperdomäne und an der Außenseite der kleinen Untereinheit, in direkter Nähe der E-Stelle. Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit vorangegangenen strukturbiologischen Untersuchungen ribosomaler IRES Komplexe [15; 178]. Eine Bindung der IRES an rpL1e der 60S Untereinheit ist im Gegensatz zu Boehringer et al. [15] in den hier gezeigten Strukturen jedoch nicht vorhanden. Die bei Spahn und Kollegen [178] beschriebenen Konformationsänderungen der 40S Untereinheit, welche durch Domäne II der IRES RNA ausgelöst werden, sind auch in dieser 80S-IRES Rekonstruktion deutlich sichtbar (vgl. Abbildung 3.24 mit Abbildung 1.6 B und Abbildung 1.10 in Kapitel 1.2.3). Helix 16 (h16) der 18S rRNA in der Schulterregion der 40S Untereinheit interagiert mit dem ribosomalen Protein rpS3e im 40S-Kopf. Gleichzeitig sind die Helices h18 und h34 in Schulter und Kopf der 40S Untereinheit voneinander weg orientiert - die sogenannte Lasche, welche ein Teil des mRNA Eintrittskanals ist, ist also geöffnet.

3.2.4 Molekulare Struktur der HCV IRES RNA

Abbildung 3.25 zeigt die separierte dreidimensionale Elektronendichtekarte der HCV IRES RNA (violett, oben), sowie die Tertiärstrukturmodellierung wichtiger Subdomänen im Detail (Kästchen). Die Gesamtstruktur ist klar definiert: RNA-Helices sind gut zu erkennen und sogar einzelsträngige RNA-Bereiche (mRNA) sind an einigen Stellen zu beobachten. Zwar ist ein direkter Nachweis der RNA bei der erreichten Auflösung von 7,8 Å nicht möglich, jedoch erlauben die deutlich definierten strukturellen Bereiche der IRES-Elektronendichte eine Zuordnung der funktionellen IRES Domänen und sogar die Erstellung eines molekularen Modells der HCV IRES anhand biochemischer Daten und Sekundärstruktur-Vorschlägen. Eine ähnliche Methode fand bereits für die in der intergenischen Region der mRNA des Heuschrecken-Lähmungsvirus ("Cricket Paralysis Virus") befindlichen IRES (CrPV IGR IRES) eine erfolgreiche Anwendung [166]. Die stark gebogene, helikale Domäne der IRES im Bereich des 40S-Kopfes kann anhand biochemischer und strukturbiologischer Untersuchungen [15; 38; 106; 178; 208] als IRES Domäne II zugeordnet werden. Der apikale Teil dieser Struktur ist direkt in der ribosomalen E-Stelle der 40S Untereinheit lokalisiert (vgl.

Abbildung 3.24 D). Die verbleibende Dichte kann somit den Domänen III und IV zugeordnet werden. Domäne IV, welche das AUG-Startkodon enthält, ist in der ans Ribosom gebundenen Form unstrukturiert [69] und zusammen mit dem kodierenden mRNA-Bereich der IRES im mRNA-Kanal zwischen Kopf- und Körperdomäne der 40S Untereinheit lokalisiert (Abbildung 3.24 D). Domäne III weist dagegen eine stark gefaltete Raumstruktur auf und kann in weitere funktionelle Subdomänen unterteilt werden. Die Dichte im Bereich des mRNA-Austrittskanals, direkt anschließend an Domäne II und IV, zeigt einen aus zwei Schleifen und einem helikalen Bereich bestehenden Pseudoknoten. Die vorangegangenen biochemischen und strukturbiologischen Untersuchungen der HCV IRES und HCV-ähnlicher IRES-Elemente [11; 15; 42; 178] machen eine Zuordnung dieser Schleifenregionen zu den Domänen IIIe und IIIf wahrscheinlich, wobei IIIf direkt in die einzelsträngige Domäne IV überzugehen scheint. Der helikale Bereich dieses Pseudoknotens verbindet Domäne II mit einem globulären, stark gefalteten Bereich, der als Domäne IIId identifiziert werden kann [178]. Domäne IIId wiederum geht, ebenfalls über ein helikales Zwischenelement, in einen weiteren globulären Bereich über. Dieser kann der sogenannten Domäne IIIabc-4-Wege-Kreuzung zugeordnet werden [178]. Dieser Pseudoknoten beinhaltet die beiden Haarnadelstrukturen Domäne IIIa und IIIc und geht in einen nicht sehr gut definierten, scheinbar ebenfalls helikalen, Bereich über: Domäne IIIb. Nicht definierbare Elektronendichte bzw. die Abwesenheit von Dichte in diesem Bereich deutet auf eine hohe Flexibilität der IRES in dieser Region hin. Querschnitt und Gesamtform der IRES-Dichte weisen auf eine überwiegend A-Form helikale Struktur der IRES RNA hin, ausgehend von Regionen dichterer Faltung. In den letzten Jahren veröffentlichte NMR und Kristallstrukturen [30; 81; 87; 105-107], sowie biochemische Daten [11; 76; 78; 89; 112; 122; 135] liefern weitere wichtige strukturelle Informationen und ermöglichen es, die gesamte Kryo-EM-Dichte der HCV IRES RNA mit einem molekularen Modell zu interpretieren (vgl. Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26). Alle Teildomänen werden dazu zunächst unabhängig voneinander modelliert und manuell, sowie mit Hilfe einer "Molecular Dynamics"-Simulation (MD-Fit) [148; 195] eingepasst. Nach Verknüpfung aller Domänen optimiert der MD-Fit Algorithmus nocheinmal das gesamte IRES-Strukturmodell.

Ein direktes Einpassen der vorhandenen NMR- bzw. Kristallstrukturen von Domäne II (Abbildung 3.25, dunkelblau, PDB-Code 1P5P), IIId (Abbildung 3.25, hellblau, PDB-Code 1F84) und der IIIabc-4-Wege-Kreuzung (Abbildung 3.25, dunkelgrün-orange, PDB-Code 1KH6) ist nicht möglich; die Domänen II und IIId weisen in der ans Ribosom gebundenen Form eine stärkere Biegung auf, als in Lösung.

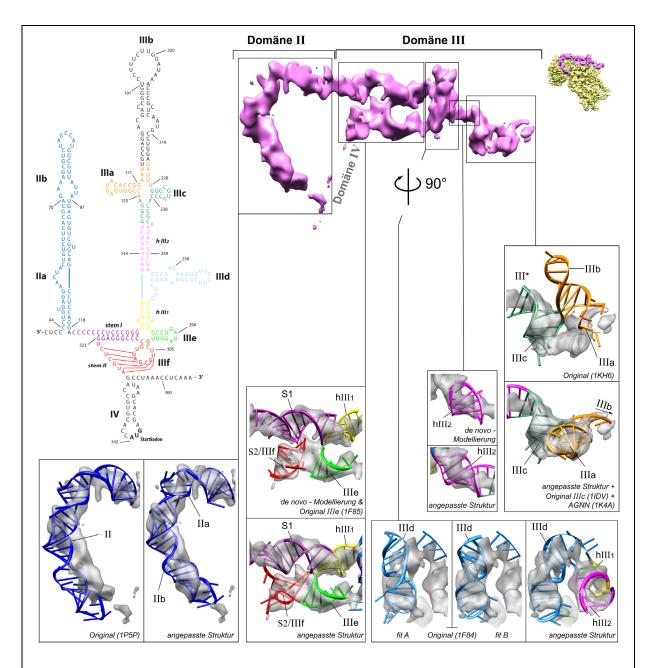


Abbildung 3.25 Tertiärstrukturmodellierung der HCV IRES RNA. Oben, mitte: separierte Elektronendichtekarte der HCV IRES (violett) bei hohem Oberflächenkonturniveau von 5,7 mit grober Einteilung in Domäne II und III. Die Kästchen markieren einzelne Subdomänen der IRES Struktur. Oben, links: Sekundärstrukturvorschlag der HCV IRES. Die Farbmarkierungen entsprechen den Farben der IRES Strukturmodelle. Rechts und unten: Vergrößerung wichtiger Subdomänen der HCV IRES (grau transparent) und Einpassen vorhandener bzw. Modellierung neuer Strukturmodelle (farbige Bandmodelle). Die PDB-Codes der Originalstrukturen sind in Klammern angegeben.

Die Modellierung der Domänen II und IIId erfolgt daher über das Einpassen der NMR-Strukturen mittels MD-Simulation und führt zu einer nahezu vollständigen Übereinstimmung mit der IRES Elektronendichte. Für Domäne IIId scheinen dabei zunächst zwei Orientierungen möglich (vgl. Abbildung 3.25, hellblau, fit A und fit B), nach Verknüpfen mit dem gesamten Strukturmodell ist die vom MD-Fit Algorithmus bevorzugte Orientierung jedoch fit B. Domäne IIIabc zeigt in der Kryo-EM Dichte eine andere Konformation, als in der Kristallstruktur (vgl. Abbildung 3.25, orange). Die IIIabc-Kristallstruktur ist ebenfalls mittels MD-Fit eingepasst worden; das IIIa/IIIb-Teilstück zeigt jetzt gegenüber der Kristallstruktur eine Drehung um ca. 180°. Die IIIc/III*-Region der Kristallstruktur wird durch die NMR-Struktur der IIIc-Schleife (PDB-Code 1IDV) komplettiert. Die Schleife IIIa stellt laut Sekundärstruktur einen AGNN-Tetraloop dar. Die in der Kristallstruktur fehlenden Strukturinformationen für diesen Bereich sind daher über eine Homologie-Modellierung anhand der AGAA-Schleife des Hefe RNase III dsRNA-Substrates (PDB-Code 1K4A, [199]) vervollständigt worden. Die kleine Haarnadelstruktur Domäne IIIe (Abbildung 3.25, hellgrün, PDB-Code 1F85) passt hervorragend in die HCV IRES Dichte. Auf ein Einpassen von Domäne IIIb (PDB-Code 1KP7) wird aufgrund fehlender Dichte in diesem Bereich verzichtet. Für die restlichen Bereiche der HCV IRES RNA, welche strukturbiologisch noch nicht weiter charakterisiert wurden, erfolgt eine de novo-Modellierung der RNA Struktur (vgl. Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26 A). Diejenigen IRES Regionen, die Domäne II und Pseudoknoten IIIe/f bzw. IIIe/f und Domäne IIId (Stem 1 bzw. Helix III₁) verbinden, zeigen ebenso wie die Dichte zwischen Domäne IIId und der IIIabc-Kreuzung (Helix III₂, hIII₂) deutlich helikale Form und sind deshalb als Standard A-Form Helices dargestellt (Abbildung 3.25; S1 magenta, hIII₁ gelb und hIII₂ pink). Stem 1 (S1) ist mit Domäne II noch über einen einzelsträngigen RNA-Bereich verbunden, ebenso Domäne IIId und Helix III₁ (hIII₁). Die Haarnadel-Domäne IIIf bildet, laut Sekundärstrukturvorschlag, zusammen mit der (einzelsträngigen) Domäne IV einen basenpaarenden Bereich - Stem 2 (S2). Berry und Kollegen [11] konnten zeigen, dass Stem 2 eine wichtige Funktion bei der Positionierung des AUG-Startkodons in der ribosomalen P-Stelle besitzt. Sie schlagen weiterhin eine SD-ähnliche Rolle für Stem 2 und eine Positionierung nahe der ribosomalen E-Stelle vor. Der Stem 2/IIIf-Bereich ist daher als kurzer, helikaler Bereich in die Dichte eingepasst und über eine einzelsträngige Schleife (IIIf) mit Domäne IIIe verbunden (Abbildung 3.25, rot).

Bei genauerer Betrachtung der dreidimensionalen Faltung der HCV IRES fallen auch einige intramolekulare Interaktionen der IRES Subdomänen untereinander auf (vgl. Abbildung 3.26 B, Pfeile): die apikale Schleife von Domäne II steht in Interaktion mit dem mRNA-Einzelstrang (Domäne IV), Domäne IIIe kontaktiert Helix III₁, ebenfalls über die Schleifenregion, und auch die Domänen IIIa und IIIc der IIIabc-4-Wege-Kreuzung weisen eine ausgeprägte Interaktion miteinander auf.

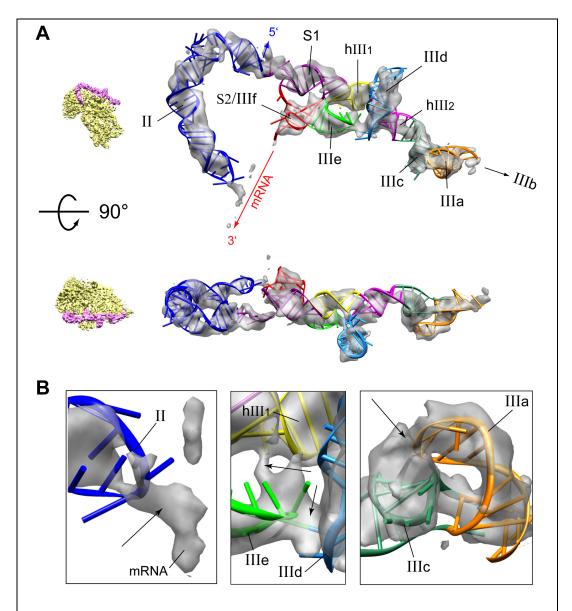


Abbildung 3.26 Tertiärstruktur der HCV IRES RNA. (A) Molekulares Modell der HCV IRES. Die einzelnen IRES-Domänen sind farbig dargestellt, eingepasst in die separierte 3D-Elektronendichtekarte der HCV IRES RNA (grau, transparent) bei hohem Oberflächenkonturniveau (TH) von 5,7. (B) Intramolekulare Interaktionen der HCV IRES Subdomänen im Detail (TH 5).

3.2.5 Interaktion der HCV IRES RNA mit dem Ribosom

Die HCV IRES in den hier vorgestellten 80S-IRES Komplexen interagiert ausschließlich mit der kleinen 40S Untereinheit des Ribosoms, nicht aber mit der 60S Untereinheit. Diese Bindung ist dabei spezifisch für höhere Eukaryoten; die HCV IRES bindet nicht an bakterielle oder pflanzliche Ribosomen [120; 135], eine Bindung an Hefe-80S ist noch umstritten [110; 120; 154].

Das Einpassen kürzlich veröffentlichter Kristallstrukturen des Hefe-80S-Ribosoms [10] und der 40S Untereinheit aus *Tetrahymena thermophila* [145] erlaubt die genaue Zuordnung von Kontaktpunkten der HCV IRES zu ribosomalen Proteinen und erstmalig auch zu individuellen rRNA-Helices der 40S Untereinheit. Die am stärksten ausgeprägte Verbindung besteht zwischen der terminalen Schleife der IRES Domäne IIId und der terminalen Schleife im Expansionssegment 7 (ES7) der ribosomalen Helix 26 (h26) der 40S Untereinheit (Abbildung 3.27 A).

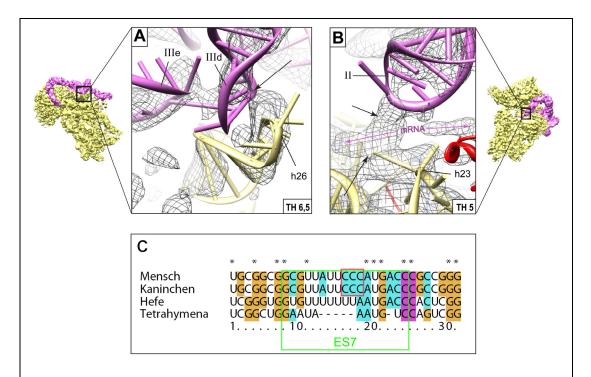


Abbildung 3.27 Interaktionen der HCV IRES RNA mit Helices der 18S rRNA. (A) Domäne IIId (Violett) interagiert mit der ribosomalen h26 (Hellgelb, Modell des humanen h26/ES7). (B) Domäne II (Violett) interagiert in der ribosomalen E-Stelle mit der IRES mRNA (schematisch dargestellt), und diese wiederum steht in Kontakt mit h23 der 18S rRNA (Hellgelb). Die schwarzen Pfeile markieren jeweils die Kontaktpunkte. Das HCV IRES Strukturmodell und die 40S Kristallstruktur [145] sind als farbige Bandmodelle in die Elektronendichtekarte des 80S • HCV IRES Komplexes (graues Netz) eingepasst. Das Oberflächenkonturniveau (TH) der Elektronendichte ist jeweils angegeben. (C) Sequenzvergleich der h26. Das ES7 ist Grün markiert, die drei Cytosine in der Schleifenregion bei Kaninchen und Menschen sind Rot markiert.

Biochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Domäne IIId eine essentielle Funktion in der Bindung an die 40 Untereinheit hat [83]. Den herausgedrehten apikalen Guanosinen GG

266-267 und dem flexiblen G268 scheint dabei eine besondere Rolle zuzukommen [83; 107]. Beim Vergleich der 40S-Kristallstrukturen [10; 145] in dieser Region zeigt sich die h26 / ES7 von *Tetrahymena thermophila* als zu kurz für eine Interaktion mit der HCV IRES, das ES7 der h26 aus Hefe dagegen passt genau in die Kryo-EM Dichte. Ein Vergleich der Primärsequenzen (und Sekundärstrukturen) von h26 aus *Tetrahymena*, Hefe, Kaninchen und Mensch zeigte identische Längen des ES7 bei Hefe, Kaninchen und Mensch, allerdings auch Unterschiede in der terminalen Schleife (Abbildung 3.27 C). Bei Kaninchen und Mensch sind in diesem Bereich drei Cytosine zu finden. Helix 26 ist daher als Homologiemodell, basierend auf der Hefe-Kristallstruktur, mit der humanen Nukleotidsequenz in die Kryo-EM Dichte eingepasst worden. Weitere stark ausgeprägte RNA-RNA Interaktionen sind im Bereich der apikalen Schleife der IRES-Domäne II zu erkennen (Abbildung 3.27 B). Zum einen ist deutlich ein Kontakt der Domäne II-Schleife zum kodierenden mRNA-Einzelstrang der IRES in der ribosomalen E-Stelle zu erkennen, zum anderen kontaktiert die ribosomale Helix 23 (h23) innerhalb der E-Stelle in der Plattform-Region der 40S Untereinheit die einzelsträngige HCV IRES mRNA.

Zusätzlich zu den beschriebenen rRNA-Kontakten zeigt die HCV IRES mehrere Interaktionen mit zumeist eukaryoten-spezifischen ribosomalen Proteinen der 40S Untereinheit. Die IRES-Domäne II beispielsweise zeigt zwei Kontaktstellen mit dem Protein rpS5e; eine im oberen Bereich des 40S Kopfes, die andere bei niedrigerem Oberflächenkonturniveau erkennbare Verbindung besteht an der Basis des 40S-Kopfes nahe des mRNA-Austrittskanals (Abbildung 3.28 A und B). Die apikale Schleife der HCV IRES Domäne II interagiert noch mit einem weiteren Protein im Bereich der 40S Plattform, rpS14e (Abbildung 3.28 B). Ganz in der Nähe dieser Proteine befinden sich weiter Kontaktstellen der IRES RNA zur 40S Untereinheit. Die Proteine rpS26e und rpS28e vermitteln beide Interaktionen mit dem einzelsträngigen mRNA-Bereich der HCV IRES. rpS28e zeigt außerdem starke Interaktionen seiner β-Faltblattstruktur zur Stem II / Domäne IIIf-Region der IRES (Abbildung 3.28 G und H). Direkt neben rpS26e und rpS14e in der 40S Plattformregion befindet sich das Protein rpS1e. Dieses Protein bildet eine weitere Kontaktstelle für die HCV IRES, genauer den Stamm der Haarnadelstruktur Domäne IIIe (Abbildung 3.28 F). rpS1e ist ein positionelles Analogon der prokaryotischen Proteine rpS6p und rpS18p [145]. rpS27e zeigt in der hier untersuchten Struktur eine Verbindung zur Haarnadelstruktur Domäne IIIc der IIIabc-4-Wege-Kreuzung der HCV IRES (Abbildung 3.28 E). Bei niedrigem Konturniveau ist außerdem noch eine Verbindung der Haarnadelstruktur Domäne IIIa zum ribosomalen Protein rpS7e zu beobachten (Abbildung 3.28 I).

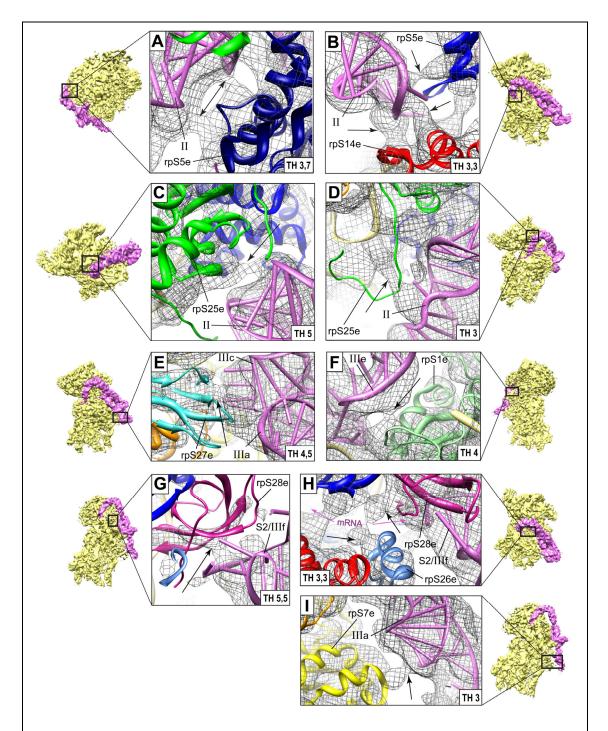


Abbildung 3.28 Interaktionen der HCV IRES RNA mit ribosomalen Proteinen der 40S Untereinheit. Das HCV IRES Strukturmodell und die 40S Kristallstruktur [145] sind als farbige Bandmodelle in die Elektronendichtekarte des 80S • HCV IRES Komplexes (graues Netz) eingepasst. Die IRES RNA ist jeweils in Violett dargestellt, die schwarzen Pfeile markieren die Kontaktpunkte. Das Oberflächenkonturniveau (TH) der Elektronendichte ist jeweils angegeben. (A) Domäne II und rpS5e (Blau), (B) Domäne II und rpS5e, sowie rpS14e (Rot), (C, D) Domäne II und rpS25e (Grün), (E) die IIIabc-4-Wege-Kreuzung (Domäne IIIc) und rpS27e (Türkis), (F) Domäne IIIe und rpS1e (Hellgrün), (G) Stem 2 und rpS28e (Magenta), (H) die mRNA (schematisch dargestellt) und rpS28e, sowie rpS26e (hellblau), (I) Domäne IIIa und rpS7e (gelb).

Die flexible HCV IRES Domäne IIIb zeigt von der 40S Untereinheit weg in Lösung und weist keine erkennbaren Kontakte zu ribosomalen Proteinen oder der rRNA auf.

3.2.6 Rekonstruktion der RRL80S • CSFV IRES Komplexe

Abbildung 3.29 zeigt die rekonstruierten Elektronendichtekarten des RRL80S • CSFV IRES Komplexes. Wie die HCV IRES ist auch die CSFV IRES in Kontakt mit der 40S Untereinheit auf der Rückseite der 40S-Kopf- und Körperdomäne und an der Außenseite der kleinen Untereinheit, in direkter Nähe der E-Stelle lokalisiert. Kontakte der IRES zur 60S Untereinheit sind auch hier nicht zu finden. Die Konformation der 40S Untereinheit in diesem Komplex ist dieselbe, wie im 80S • HCV IRES und 40S • HCV IRES Komplex (vgl. Abbildung 3.24 und [178]). Kryo-elektronenmikroskopische Voruntersuchungen an binären 40S • CSFV IRES Komplexen zeigten ebenfalls diese 40S-Konformation (ohne Abbildung). Bei der gegenwärtigen Auflösung der Struktur des 80S • CSFV IRES Komplexes von 10 Å ist eine direkte molekulare Interpretation der CSFV IRES nicht möglich. Im Vergleich zur 3D-Rekonstruktion der HCV IRES ist jedoch eine hohe Übereinstimmung zu erkennen (Abbildung 3.30). Eine Zuordnung der einzelnen CSFV IRES Domänen ist somit ebenfalls möglich (Abbildung 3.30 A).

Domäne II zeigt analog der HCV IRES ein gebogenes, helikales Erscheinungsbild. Im Vergleich mit der HCV IRES ist dieser Bereich jedoch kürzer (vgl. Abbildung 3.30 A und C). Die apikale Schleife der CSFV IRES Domäne II befindet sich auch hier in Kontakt mit dem einzelsträngigen, kodierenden mRNA-Bereich in der ribosomalen E-Stelle. Das Einpassen der einzigen für diese IRES RNA bisher verfügbaren molekularen Struktur - Subdomäne IIa (PDB-Code 2HUA, [100]) kann durch Vergleich mit der HCV IRES direkt erfolgen und zeigt übereinstimmende Biegungswinkel zwischen NMR-Struktur und der Elektronendichte (Abbildung 3.30 D). Der Bereich des Stem 2-IIIe/f-Pseudoknotens, der IIIabc-4-Wege-Kreuzung und der verbindenden Helices (Stem 1, Helix 1, Helix 2) spiegeln ebenfalls das Erscheinungsbild der HCV IRES wieder (Abbildung 3.30 A und B). Die Domäne IIId ist in CSFV IRES laut Sekundärstrukturvorschlag (Abbildung 3.30 E) in zwei Haarnadelstrukturen aufgeteilt: Subdomäne IIId₁, die analog der HCV IRES Domäne IIId die drei terminalen hochkonservierten Guanosine enthält und die zusätzliche Domäne IIId₂. Tatsächlich ist der globuläre IIId-Bereich der CSFV IRES Elektronendichte größer als in der HCV IRES Struktur (Abbildung 3.30 A und B, Pfeil) Eine genaue Unterscheidung von IIId₁ und IIId₂ ist bei der aktuellen Auflösung jedoch noch nicht möglich.

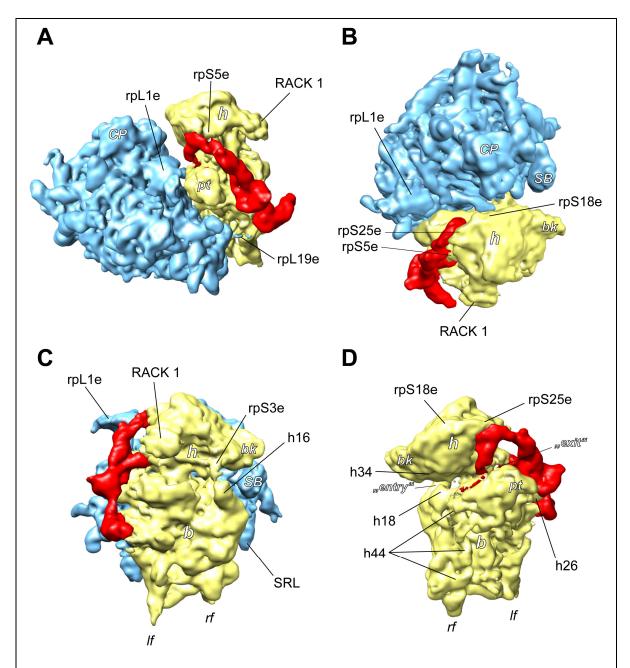


Abbildung 3.29 3D-Elektronendichtekarte des 80S • CSFV IRES Komplexes bei 10 Å Auflösung (TH 2). Blick von der L1-Seite (A), von oben (B), von der 40S-Seite (C) und von der 60S-Seite (D); bei (D) wurde die 60S Untereinheit in silico entfernt. Die 40S Untereinheit ist jeweils in Gelb dargestellt, die 60S Untereinheit in Blau und die CSFV IRES in Rot. Merkmale der ribosomalen Untereinheiten und Konformationsänderungen wie in Abbildung 3.24.

Domäne IIIb ist auch in dieser Elektronendichte nicht vollständig definiert, scheint aber relativ zur 40S Untereinheit stärker abgewinkelt zu sein (vgl. Abbildung 3.30 B, Pfeil). Dies ist ein weiteres Indiz für die hohe Flexibilität von IIIb.

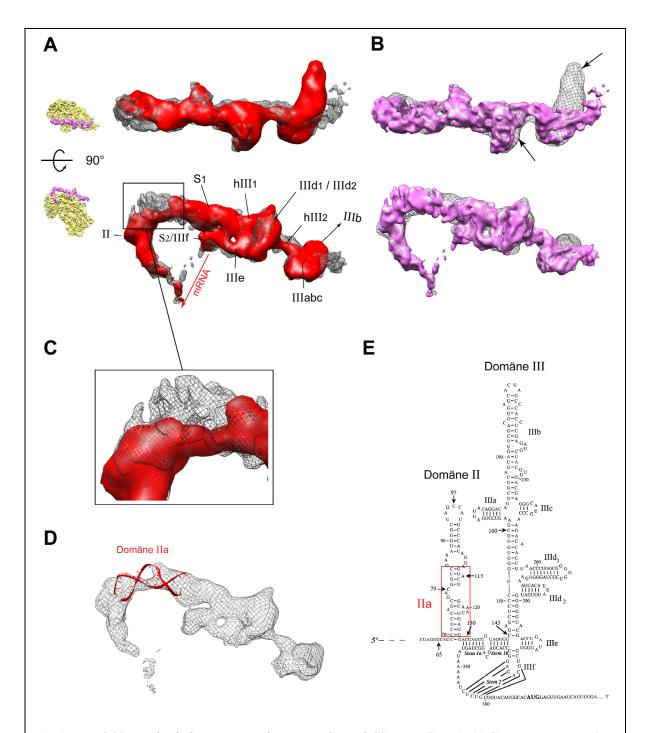


Abbildung 3.30 Vergleich der Tertiärstruktur von HCV und CSFV IRES RNA. (A-C) Die separierten 3D-Elektronendichtekarteen beider IRESs wurden übereinander gelegt. Die CSFV IRES ist in Rot, die HCV IRES als graues Netz dargestellt (A, C). Die HCV IRES ist in Violett, die CSFV IRES als graues Netz dargestellt(B). Das Oberflächenkonturniveau der Elektronendichten ist TH 4 für die HCV IRES und TH 2 für die CSFV IRES. Die Zuordnung der CSFV IRES Domänen erfolgte analog Abbildung 3.26. Pfeile markieren Unterschiede zwischen den Strukturen. (C) Vergrößerung eines Abschnittes der Domäne II. (D) Einpassen der NMR-Struktur der CSFV IRES Domäne IIa (rotes Bandmodell, [100]) in die Elektronendichte der CSFV IRES (graues Netz, TH 2,2). (E) Sekundärstruktur der CSFV IRES [47].

4 Diskussion

Die Initiation der Translation ist eine essentielle Phase der Proteinbiosynthese und ein wichtiger Punkt bei der Regulation der Genexpression [37; 176]. RNAs, wie mRNA, rRNA oder tRNA, können dabei wichtige regulatorische Funktionen übernehmen. Nicht selten weisen diese RNAs komplexe Tertiärstrukturen auf, oft stabilisiert durch Interaktionen mit Proteinen. Die HCV IRES ist ebenfalls eine dieser hochkomplexen regulatorischen RNAs und dient der "Cap"- und "Scanning"-unabhängigen Translationsinitiation des Hepatitis-C-Virus Polyproteins, einem Schlüsselschritt während der HCV Infektion nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle. Die Tertiärstruktur der HCV IRES ist dabei von größter Wichtigkeit für ihre Funktion. Sie manipuliert aktiv das eukaryotische Ribosom, interagiert mit kanonischen Initiationsfaktoren und kontrolliert so die Bildung funktioneller 48S und 80S Initiationskomplexe.

4.1 Visualisierung von RRL80S • HCV IRES Komplexen mittels Kryo-EM

Position und Gesamtstruktur der hier bestimmten IRES sind generell konsistent mit früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von binären 40S • IRES [178] und 80S • IRES Komplexen [15] bei niedrigerer Auflösung (Abbildung 1.10). Die HCV IRES Domänen II und III kontaktieren die 40S Untereinheit auf der Rückseite der 40S-Kopf- und Körperdomäne und an der Außenseite der kleinen Untereinheit. Domäne II überlappt teilweise mit der ribosomalen E-Stelle. Die ihr zugeschriebene Konformationsänderung der 40S Untereinheit [178] ist ebenfalls erhalten. Diese Konformation der 40S Untereinheit stimmt mit dem Effekt der kanonischen Initiationsfaktoren eIF1 und eIF1A überein, die die 40S Untereinheit in eine "offene", "Scanning"-kompetente Konformation überführen [124]. Die verbesserte Auflösung von 7,8 Å ermöglicht sogar die Visualisierung zusätzlicher Elektronendichte im Bereich des mRNA-Kanals der 40S Untereinheit (Abbildung 3.24 D). Die HCV IRES orientiert ihr AUG-Startcodon direkt in der ribosomalen P-Stelle [135]; die zusätzliche Elektronendichte wird daher eindeutig der IRES Domäne IV, welche das Startkodon enthält, zugeordnet. Die in der Sekundärstruktur (Abbildung 1.8) vorgeschlagene Domäne IV-Haarnadelstruktur ist in der ribosomengebundenen Form der HCV IRES unstrukturiert und liegt als RNA-Einzelstrang vor. Dieses Ergebnis wird ebenfalls unterstützt durch biochemische Untersuchungen [69]: nach Honda et al. ist die Aufwindung von Domäne IV notwendig für eine funktionierende Initiation der HCV IRES.

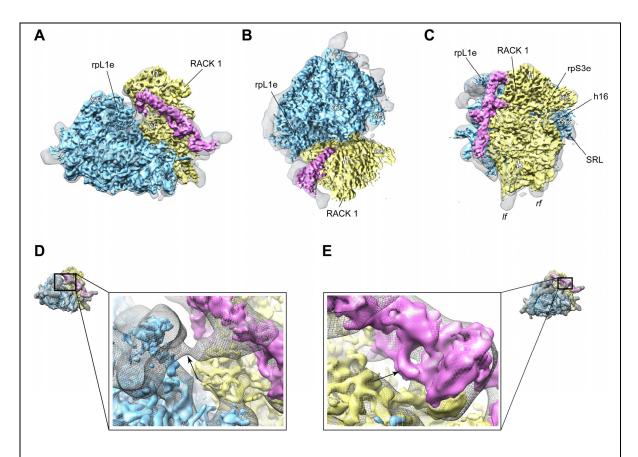


Abbildung 4.1 3D-Rekonstruktionen von 80S • HCV IRES Komplexen im Vergleich. Die Elektronendichten dieser Arbeit sind bei einem Oberflächenkonturniveau von 4 abgebildet (farbig) und mit der Struktur von Boehringer et al. [15] überlagert (graues Netz, TH 0,065). Die 40S Untereinheit ist jeweils in Gelb dargestellt, die 60S Untereinheit in Blau und die HCV IRES in Violett. Einige Merkmale der ribosomalen Untereinheiten sind markiert: h = Kopfdomäne (head); b = Körperdomäne (body); bk = "beak"; sh = Schulter (shoulder); pt = Plattform; lf = linker Fuß; rf = rechter Fuß; CP = Zentrale Protuberanz; SRL = "sarcin-ricin-loop"; SB = "stalk base", h16 = Helix 16 der 18S rRNA; rpL1e, RACK1 und rpS3e = ribosomale Proteine. Blick von der L1-Seite (A), von oben (B) und von der 40S-Seite (C). Die Hauptunterschiede zwischen beiden Strukturen sind in (D) und (E) vergrößert dargestellt und durch Pfeile markiert. (D) Interaktionsbereich der HCV IRES mit rpL1e. (E) Struktur des IIIef-S1-S2-Pseudoknotens.

Ein Vergleich der hier vorgestellten 80S • HCV IRES Rekonstruktion mit der bei Boehringer et al. [15] vorgestellten 80S • HCV IRES Struktur macht jedoch auch einige Unterschiede deutlich (Abbildung 4.1). Eine Interaktion der IRES RNA mit dem Protein rpL1e der großen 60S Untereinheit ist in den hier untersuchten Komplexen nicht zu erkennen (Abbildung 4.1 D). Dieser Kontakt wird nach Boehringer und Kollegen durch Domäne I der HCV IRES vermittelt, die in der hier gezeigten IRES nicht vorhanden ist. Nach Rijnbrand und Honda [70; 149] ist diese Domäne für eine Bindung ans Ribosom und eine effiziente Translation in vitro und in vivo jedoch nicht essentiell. Der Stem1-Stem2-IIIef-Pseudoknoten zeigt eine unterschiedliche Struktur der bei Boehringer Kollegen vorgestellten und

(Abbildung 4.1 E): Die kleine Haarnadelschleife Domäne IIIe ist bei Boehringer et al. aufgrund der geringen Auflösung von nur 25 Å nicht sichtbar.

4.2 Tertiärstrukturmodell der HCV IRES in Interaktion mit dem eukaryotischen Ribosom

Die Tertiärstruktur der HCV IRES und ihre Interaktion mit dem Ribosom ist seit langem Gegenstand der Forschung. Einige hochauflösende Teilstrukturen der IRES konnten bisher strukturbiologisch aufgeklärt werden und auch Kryo-EM Strukturen von 40S • und 80S • HCV IRES Komplexen bei niedriger Auflösung konnten Einblicke in die Manipulation des Ribosoms durch die IRES Tertiärstruktur liefern. Jedoch gelang es bisher nicht, ein vollständiges HCV IRES Tertiärstrukturmodell in der ribosomengebundenen Form zu erstellen. Interaktionen der IRES mit dem eukaryotischen Translationsapparat sind daher hauptsächlich biochemisch analysiert und mit der kanonischen Translationsinitiation verglichen worden (Tabelle 4.2 und Abbildung 4.2). Die in dieser Arbeit vorgestellte 3D-Struktur der HCV IRES in Komplex mit dem Kaninchen 80S Ribosom bei einer deutlich verbesserten Auflösung von 7,8 Å ermöglicht erstmalig eine Modellierung der gesamten IRES Tertiärstruktur (Abbildung 3.26).

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen Nachbarschaftsbeziehungen zwischen kanonischer mRNA bzw. HCV IRES RNA und dem Ribosom.

kanonische 48S / 80S Initiationskomplexe (E-Stelle)	40S • HCV IRES Komplexe		
Pisarev et al., 2008 [139]	Pestova et al., 1998 [135]	Otto et al., 2002 [120]	Laletina et al., 2006 [95]
Proteine: • rpS5, rpS14, rpS26, rpS28 18S rRNA:	Proteine: rpS9 (später zu rpS5 korrigiert) 18S rRNA: keine	Proteine: • 2 unbekannte Proteine (Domäne II) • rpS2, rpS3 (Domäne III) • rpS15, rpS16 oder 18,	Proteine:
• h26, h23, 3'-terminale nt 1857-1863	Fukushi et al., 2001 [55]	rpS10, rpS27	Babaylova et al., 2009 [8]
	Proteine:	18S rRNA: • keine	Proteine: • rpS14, rpS16 (Domäne II) • rpS14, rpS16, rpS3a (Domäne IIId)
			18S rRNA: • keine

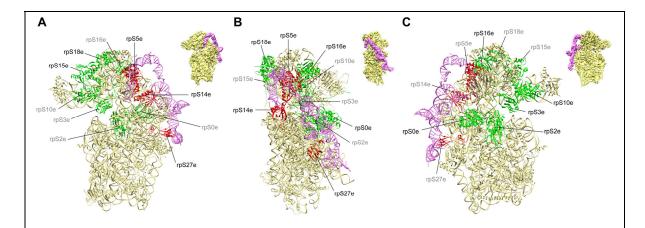


Abbildung 4.2 Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen Nachbarschaftsbeziehungen zwischen HCV IRES RNA und dem Ribosom. Das HCV IRES Strukturmodell und die 40S Kristallstruktur [145] sind als farbige Bandmodelle in die 3D-Rekonstruktion des 80S • HCV IRES Komplexes eingepasst worden. Die IRES RNA ist in Violett dargestellt, die 40S Untereinheit in Gelb. Die 60S Untereinheit wurde in silico entfernt. Proteine, welche durch crosslinking- und footprinting-Studien (siehe Tabelle 4.1) in potenzieller Nachbarschaft zur HCV IRES gefunden wurden, sind farbig markiert: Rot sind Proteine, welche in dieser Arbeit bestätigt werden konnten; nicht bestätigte Proteine sind Grün. (A) Blick von der 60S-Seite, (B) Blick von der LI-Seite, (C) Blick von der cytosolischen Seite.

Boehringer et al. [15] haben vor einigen Jahren einen ersten Vorschlag zur Konformation der HCV IRES in der ribosomengebundenen Form durch Einpassen der vorhandenen Teilstrukturen [30; 81; 87; 105-107] in ihre Kryo-EM Dichte gemacht (Abbildung 4.3).

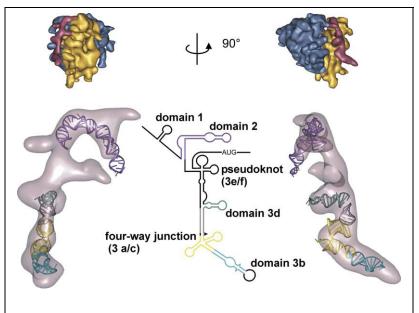


Abbildung 4.3 Einpassen bekannter NMR- und Kristallstrukturen durch Boehringer et al., Abbildung entnommen aus [15].

Die Auflösung ihrer 3D-Rekonstruktion ist mit 25 Å jedoch zu niedrig, um große und kleine Furche helikaler RNA-Strukturelemente zu unterscheiden. Die anhand dieser Rekonstruktion vorgestellte Struktureinpassung kann deshalb nicht als verlässlich angesehen werden. Während der hier vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass ein direktes Einpassen der vorhandenen NMR- bzw. Kristallstrukturen von Domäne II, IIId und der IIIabc-4-Wege-Kreuzung nicht eindeutig möglich ist (Abbildung 3.25). Form und Faltung der HCV IRES Domänen II und IIId spiegeln sich zwar in ihrer NMR- und Kristallstruktur wieder [38; 87; 106; 107; 208], allerdings sind sie in der ans Ribosom gebundenen Form stärker gebogen, als in Lösung. Während der Bindung ans Ribosom muß also eine Konformationsänderung innerhalb der IRES RNA Domänen II und IIId stattgefunden haben. Dieser Umstand konnte aufgrund der niedrigen Auflösung der bisher veröffentlichten Kryo-EM Rekonstruktionen bisher nicht entdeckt werden und auch die korrekte Konformation der IIIabc-4-Wege-Kreuzung ist erstmals in der hier gezeigten Struktur zu erkennen (vgl. Abbildung 4.7, Kapitel 4.2.4). Eine detailierte Analyse der hier dargestellten 80S • IRES Komplexe deckt vielfältige Wechselwirkungen zwischen der HCV IRES und dem eukaryotischen Translationsapparat auf (Tabelle 4.2 und Abbildung 4.4).

Tabelle 4.2 Interaktionen der HCV IRES RNA mit der 40S Untereinheit.

HCV IRES Komponente	Komponente der 40S Untereinheit		
Domäne II	rpS5e, rpS14, rpS25e		
Domäne IIIa	rpS7e		
Domäne IIIc	rpS27e		
Domäne IIId	h26		
Domäne IIIe	rpS1e		
Stem 2/Domäne IIIf	rpS28e		
mRNA (Domäne IV)	rpS14e, rpS26, rpS28e, h23		
weitere Interaktionen (intramolekular)			
Domäne II ↔mRNA (Domäne IV)			
Domäne IIIe ↔Helix III ₁ (A288-U297 [42])			
Domäne IIIe ↔Domäne IIId			
Domäne IIIa ↔Domäne IIIc			

Einige der zuvor biochemisch gefundenen Nachbarschaftsbeziehungen werden bestätigt. Andere, wie zum Beispiel die bei Otto et al. [120] geschilderten Kontakte der HCV IRES zu den ribosomalen Proteinen rpS2e, rpS3e, rpS15e, rpS16e/rpS18e und rpS10e sind dagegen nicht vorhanden. Zur Übersicht sind alle in diesen Studien gefundenen potenziellen Proteininteraktionspartner in Tabelle 4.1 und Abbildung 4.2 zusammenfassend dargestellt.

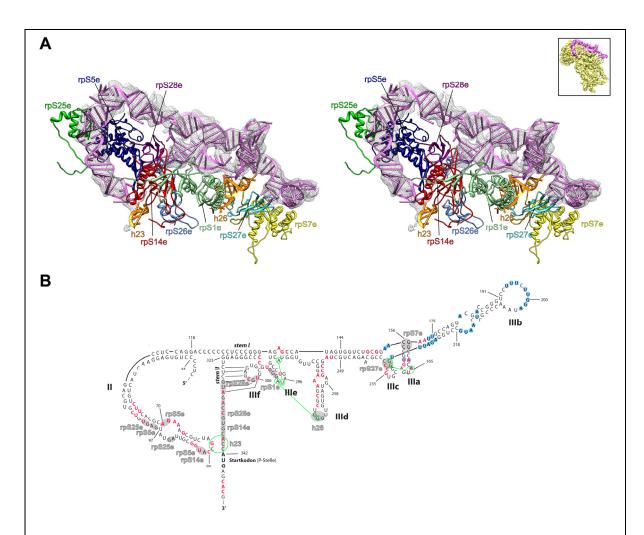


Abbildung 4.4 Molekulare Interaktionen der HCV IRES mit dem Ribosom. (A) Stereo-Ansicht der HCV IRES Tertiärstruktur (graues Netz und violettes Bandmodell) zusammen mit Komponenten der 40S Untereinheit (farbige Bandmodelle). (B) Sekundärstrukturdiagramm der HCV IRES (ohne Domäne I) in einer Form, welche die ribosomengebundene IRES-Struktur reflektiert. Nukleotide, welche in vorangegangenen Schutzexperimenten [82] nach Bindung der 40S Untereinheit unzugänglich waren, sind Rot markiert; blaue Punkte markieren geschützte Nukleotide nach Bindung von eIF3. Grau unterlegt sind Bereiche, welche in dieser Arbeit in Wechselwirkung mit dem Ribosom gefunden wurden; grüne Kreise markieren Bereiche intramolekularer IRES Interaktionen (vgl. Tabelle 5.2).

Alle in der vorliegenden Arbeit gefundenen und bestätigten Wechselwirkungen sollen nachfolgend ausführlicher diskutiert werden.

4.2.1 Wechselwirkungen der Domäne II in der ribosomalen E-Stelle

Untersuchungen der letzten Jahre wiesen nach, dass die IRES-Domäne II nicht essentiell für die Bindung an die 40S Untereinheit ist. Allerdings ist sie verantwortlich für eine Konformationsänderung der 40S Untereinheit in den "offenen" Zustand [178]. Zudem wird Domäne II eine Rolle bei der korrekten Positionierung des AUG-Startkodons zugeschrieben. Ohne Domäne II ist die IRES mRNA nur instabil im ribosomalen mRNA-Kanal gebunden, außerdem ist die eIF5-vermittelte Hydrolyse des eIF2-gebundenen GTP zur Bindung von 60S Untereinheiten beeinträchtigt [75; 100; 121; 132; 135]. Die apikale Haarnadelstruktur der IRES Domäne II ist in der ribosomalen E-Stelle gebunden, einem Platz, der normalerweise der E-Stellen tRNA (Deacyl-tRNA) vorbehalten ist. Sie interagiert hier direkt mit dem kodierenden mRNA-Einzelstrang der IRES im mRNA-Kanal der 40S Untereinheit; die ribosomale P-Stelle mit dem AUG-Starkodon ist für eine Initiator-tRNA frei zugänglich. Domäne II zeigt in der hier vorgestellten Struktur deutliche Kontakte zu den Proteinen rpS5e und rpS25e, sowie rpS14e. Im Bereich der ribosomalen E-Stelle ist auch eine Interaktion der einzelsträngigen IRES-Domäne IV mit rpS14 und sogar h23 der 18S rRNA vorhanden (Abbildung 4.4). Das Protein rpS5e hat ein prokaryotisches Homolog – rpS7p [204], weist aber für Eukaryoten spezifische N-terminale Verlängerungen auf. Die Kontakte zur IRES RNA werden jedoch über den konservierten Kern des Proteins vermittelt. Interaktionen des Proteins rpS5e mit der HCV IRES sind bereits biochemisch von Pestova et al. und Fukushi et al. beschrieben worden [55; 135], wobei erstere das Protein fälschlicherweise als rpS9e identifizierten. Das Protein rpS5e (bzw. sein bakterielles Gegenstück rpS7p) ist außerdem in Interaktion mit Deacyl-tRNA beschrieben [39; 198; 204]. Zusammen mit rpS25e, wird rpS5e auch in Kontakt mit der in der intergenischen Region (IGR) der mRNA des Heuschrecken-Lähmungsvirus ("Cricket Paralysis Virus", CrPV) befindlichen IRES gezeigt, die bei Bindung ans Ribosom identische Konformationsänderungen der 40S Untereinheit auslöst. Beide Proteine scheinen zudem für die Funktion dieser und auch der HCV IRES essentiell zu sein [97; 117; 166]. Die Vermutung liegt nahe, dass für die Konformationsänderung der 40S Untereinheit in den "offenen" Zustand die Interaktion der IRESs mit den Proteinen rpS5e und rpS25e ausschlaggebend ist. Die Wechselwirkung mit h23 ist in guter Übereinstimmung mit Resultaten, die anhand von isolierten kanonischen 48S- bzw. 80S-Initiationskomplexen erzielt wurden [139]. Für Initiationskomplexe mit der HCV IRES RNA wird diese rRNA-

Interaktionen erstmalig in dieser Arbeit nachgewiesen. Der Proteinkontakt der IRES Domäne II / IV zu rpS14e ist konsistent mit E-Stellen-Kontakten kanonischer mRNA in 48S- bzw. 80S-Initiationskomplexen [139] und wird durch Babaylova et al. [8] ebenfalls für 40S • IRES-Komplexe beschrieben. Das Protein rpS14e ist hoch konserviert, sein prokaryotisches Homolog ist rpS11p [145; 204]. In der bakteriellen Translationsinitiation spielen rpS7p und rpS11p zusammen mit den Helices h23 und h26 und dem Shine Dalgarno - anti Shine Dalgarno (SD-antiSD) Mechanismus eine wichtige Rolle bei der Positionierung der mRNA [79; 92; 205] (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5). Eine Domäne II – rpS16e Interaktion, wie von Babaylova et al. [8] vorgeschlagen, wird durch die vorliegende Arbeit ausgeschlossen.

4.2.2 Strukturelles Shine-Dalgarno-Mimikry des Stem1-Stem2-IIIef-Pseudoknotens

Ein weiterer funktionell sehr wichtiger Bereich der HCV IRES ist der Stem 1 - Stem 2 - IIIe/f Pseudoknoten, der in der hier gezeigten 3D-Struktur erstmalig strukturell beschrieben ist. Mutationen, die die Basenpaarung innerhalb von Stem 2 (also zwischen der einzelsträngigen mRNA und Domäne IIIf) zerstören, führen zu Aktivitätsverlust der IRES [11; 82]. Die Distanz zwischen Stem 2 und dem AUG-Startkodon ist mit 9-13 Nukleotiden bei HCV- und HCV-ähnlichen IRESs gut konserviert [63] und entspricht der Distanz zwischen Shine Dalgarno (SD)-Sequenz und AUG-Startkodon in E. coli (4-12 Nukleotide) [151]. Die SD-Sequenz ist eine purinreiche Sequenz in der nichttranslatierten Region (UTR) vieler bakterieller mRNAs, oberhalb des Initiationskodons. Sie ist komplementär zum 3'-Ende der 16S rRNA (anti SD-Sequenz) und spielt eine wichtige Rolle bei der Translationsinitiation. Durch SD-antiSD-Interaktion entsteht eine helikale Struktur oberhalb der 30S Plattform, in der Nähe des 30S Kopfes und der ribosomalen E-Stelle. Diese Helix passt sich genau in eine Höhlung der 30S Untereinheit ein (SD-Kammer), welche strukturell durch die ribosomalen Proteine rpS2p, rpS7p, rpS11p, rpS18p und die rRNA Helices h23a, h26, h28, h37 definiert ist (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5). Sie positioniert das AUG-Startkodon der einzelsträngigen mRNA direkt in der ribosomalen P-Stelle [79; 92; 172; 206]. Diese Aufgabe übernimmt in der HCV IRES-vermittelten Translationsinitiation der Stem 1 - Stem 2 - IIIe/f Pseudoknoten [11; 135]. Das hier vorgestellte helikale Tertiärstrukturmodell der HCV IRES Stem2-IIIf-Region passt hervorragend in die Kryo-EM Dichte an der 40S-Plattform, nahe des mRNA-Austrittskanals und der ribosomalen E-Stelle. Dies führt in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Studien zu der Vermutung, dass die HCV IRES mit ihrer Stem2-IIIf-Domäne die bakterielle SD-antiSD-Interaktion imitiert. Die mannigfaltigen Wechselwirkungen der HCV IRES zu definierten Komponenten der 40S Untereinheit

unterstützen diese Hypothese des strukturellen und funktionellen SD-antiSD Mimikry der HCV IRES. Wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben und aus Abbildung 4.4 ersichtlich, interagieren die eukaryotischen Homologe der Proteine rpS7p (rpS5e) und rpS11p (rpS14e) und h23 mit den HCV IRES Domänen II und IV in der E-Stelle. Weiter in Richtung mRNA-Austrittskanal steht die einzelsträngige Domäne IV noch in Kontakt mit rpS26e. Aber auch der Stem 1 - Stem 2 - IIIe/f Pseudoknoten kontaktiert ribosomale Proteine: rpS28e über die Stem 2-IIIf-Region und rpS1e über die IIIe-Haarnadelstruktur (Abbildung 4.4). Die rpS26eund rpS28e-Kontakte wurden ebenfalls für kanonische mRNA gefunden [139]. Eine Interaktion der HCV IRES Domäne IIIe zu den Proteinen rpS5e, rpS16e, rpS3a und p40 (rpS0e), wie bei Laletina et al. [95] geschildert, ist nicht zu erkennen. Das Protein rpS1e ist nach Rabl et al. [145] ein positionelles Analogon der prokaryotischen Proteine rpS6p und rpS18p, von denen letzteres am Aufbau der SD-Kammer in Prokaryoten beteiligt ist. Rabl und Kollegen konnten weiterhin zeigen, dass die Proteine rpS26e und rpS28e ebenfalls den SD-Kammer-Bereich teilweise besetzen (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5). Das Protein rpS28e besitzt zwar kein prokaryotisches Homolog, jedoch zeigt seine β-Faltblattstruktur Ähnlichkeiten zur Struktur der RNA-bindenden Domäne (RBD) des bakteriellen Proteins rpS1p [20], rpS26e hält dagegen das 3'-Ende der 18S rRNA in Position [145]. Zusätzlich zu den Wechselwirkungen mit dem Ribosom ist ein intramolekularer Kontakt zwischen der Subdomäne IIIe und der zwischen Stem 1 und Domäne IIId angesiedelten Helix III₁ erkennbar. Easton und Kollegen [42] konnten zeigen, dass diese hochkonservierte A288-U297-Interaktion nahe dem Pseudoknoten für eine strukturelle Stabilisierung desselben sorgt und notwendig für eine effiziente Translationsinitiation der HCV IRES ist.

Tabelle 4.3 SD-Kammer Komponenten und ihre eukaryotischen Gegenstücke

Komponente der SD-Kammer (Prokaryoten)	Gegenstück in Interaktion mit der HCV IRES (Eukaryoten)
rpS7p	rpS5e (Homolog)
rpS11p	rpS14e (Homolog)
rpS18p	rpS1e (positionelles Analogon)
rpS1p	rpS28e (ß-Faltblatt ähnlich zur RBD)
h23a	h23
h26	ES7 (h26)

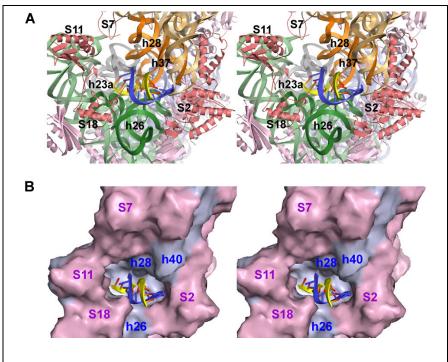


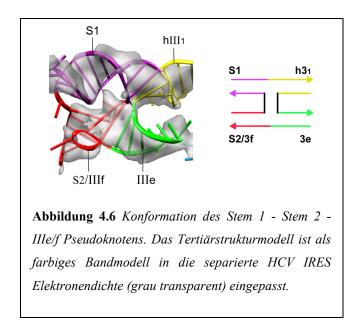
Abbildung 4.5 Stereo-Ansicht der Shine Dalgarno-Kammer in der bakteriellen 30S Untereinheit, entnommen aus [79]. (A) Darstellung als Bandmodelle. RNA-Helices der 30S-Kopfregion (h28, h37) und der Plattform (h23a, h26) sind Orange bzw. Grün. Die ribosomalen Proteine, welche die SD-Bindetasche umgeben, sind Hellrot. (B) Darstellung als Moleküloberflächen.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der hier vorgestellten Tertiärstruktur der HCV IRES wieder: Domäne IIIe wird durch diese und die Interaktion mit rpS1e in seiner Tertiärstruktur fixiert und hilft so, die SD-antiSD-ähnliche Region Stem 2 / IIIf korrekt zu positionieren.

Wie im nächsten Abschnitt noch ausführlicher beschrieben, besteht ein sehr ausgeprägter Kontakt der HCV IRES Domäne IIId zum Expansionssegment 7 der ribosomalen Helix h26, die ebenfalls eine Komponente der bakteriellen SD-Kammer darstellt (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5). SD-ähnliche Interaktionen, allerdings direkt über eine intermolekulare Basenpaarung mit der 18S rRNA, wurden in der Literatur ebenfalls für z. B. die humane IGF1R IRES [113] und das Picornavirus 5'-UTR [162] vermutet. Ein intrinsisches SD-antiSD-Mimikry, wie für die hier gezeigte HCV IRES RNA vorgeschlagen, ist bisher jedoch nicht beschrieben worden.

Strukturell stellt der Stem 1 - Stem 2 - IIIe/f Pseudoknoten eine RNA-4-Wege-Kreuzung dar, die sich nach Laing und Schlick [94] in die Familie H einordnen läßt. Diese ist charakterisiert

durch zwei koaxial gepackte Helices, wobei die kontinuierlichen Stränge jeder dieser koaxialen Helices antiparallel zueinander verlaufen (Abbildung 4.6).



4.2.3 Domäne IIId und Helix 26 der 18S rRNA

Domäne IIId zeigt die stärkste Verknüpfung mit der 40S Untereinheit - eine RNA-RNA-Interaktion ihrer G-reichen terminalen Schleife mit der terminalen Schleife des eukaryotenspezifischen Expansionssegmentes 7 (ES7) in Helix 26 (h26) der 18S rRNA (Abbildung 4.4). Die Guanosine G266-268 in Domäne IIId sind hochkonserviert und essentiell für die IRES Bindung und Aktivität [63; 76; 82; 83; 89; 107]. Ein Vergleich der ES7 von Tetrahymena thermophila, Hefe, Kaninchen und Mensch zeigt mögliche komplementäre Cytosine in der terminalen Schleife nur für Kaninchen und Mensch. Das Hefe-ES7 hat dagegen eine U-reiche apikale Schleife. Eine Watson-Crick-Basenpaarung zwischen der Domäne IIId Guanosinen G266-268 mit den drei Cytosinen der ES7-Schleife ist somit möglich. Da eine eindeutige Bindung von HCV- und HCV-ähnlichen IRESs bisher hauptsächlich für Ribosomen aus Kaninchen und Mensch beschrieben wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine Interaktion handelt, welche spezifisch auf die Wirtszellen des Hepatitis C Virus abgestimmt ist. Hefezellen zählen nicht zu den natürlichen Wirten dieses Virus und eine Bindung der IRES an Hefe 40S oder 80S ist bisher umstritten [110; 121; 154]. Die Möglichkeit einer Bindung an Heferibosomen kann mangels experimenteller Daten jedoch nicht ausgeschlossen werden und könnte, unterstützt durch die vielfältigen IRES-rProteinInteraktionen, über sogenannte G • U Wobble-Basenpaarung mit der h26/ES7-Schleife erfolgen. G • U Wobble-Basenpaare weisen eine der Watson-Crick-Basenpaarung vergleichbare thermodynamische Stabilität auf und können diese funktionell ersetzen [191]. RNA-RNA-Kontakte von kanonischer mRNA [139] und auch anderer IRES-Elemente, wie der GTx IRES [27; 71], dem Influenza B Virus Segment 7 [144] und dem TURBS motif 1 des Calcivirus Proteins VP2 [108], weisen der ribosomalen h26 eine entscheidende funktionelle Rolle bei der Translationsinitiation und der Reinitiation zu. Die Helix h26 ist beispielsweise ebenfalls ein wichtiger Interaktionspartner in der Shine-Dalgarno vermittelten prokaryotischen Translationsinitiation [79; 92; 205] (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5). Im Gegensatz zu biochemischen Untersuchungen [8] weist die HCV IRES Domäne IIId keinerlei Kontaktstellen zu den ribosomalen Proteinen rpS14e, rpS16e und rpS3a auf.

4.2.4 Konformation und Funktion der IIIabc-4-Wege-Kreuzung

Die hier gezeigte Tertiärstruktur der ans Ribosom gebundenen IIIabc-4-Wege-Kreuzung zeigt Unterschiede zur Konformation der IIIabc-Kristallstruktur von Kieft und Kollegen [81]. In dieser Struktur sind die beiden koaxial gepackten Helices IIIa/IIIb und IIIc/III* parallel zueinander orientiert. Nach Laing und Schlick [94] kann diese Struktur folglich in die cH-Familie der 4-Wege-Kreuzungen eingeordnet werden. Aber auch eine antiparallele Konformation dieser Helices (Familie H) ist beschrieben worden - die IIIabc-4-Wege-Kreuzung befindet sich in Lösung in einem dynamischen Equilibrium zwischen beiden Konformationen [112]. Boehringer und Kollegen [15] schlugen die antiparallele Konformation dieser RNA-Kreuzung vor, da eine parallele Konformation ein Verbiegen der Helix III* notwendig machen würde (vgl. Abbildung 4.7 A und B). Die in dieser Arbeit gefundene Tertiärstruktur der IIIabc-4-Wege-Kreuzung zeigt aber tatsächlich eine parallele Anordnung der Arme IIIa und IIIc zueinander, ähnlich der IIIabc-Kristallstruktur von Kieft und Kollegen. Die Arme IIIa und IIIc stehen hier allerdings in direkter Interaktion miteinander, während III* und IIIb voneinander weg orientiert sind (Abbildung 4.7 C). Die so entstandene Konformation entspricht somit eher der Familie cL [94], in die auch die Tertiärstruktur der tRNA eingeordnet wird. Domäne IIIc orientiert die Subdomäne IIIa über eine Schleifen-Helix-Interaktion mit dieser so, dass sie dem Cytosol zugewandt ist. Domäne IIIc bietet in der hier vorgestellten Konformation der IIIabc-4-Wege-Kreuzung eine ausgezeichnete Oberfläche für die Interaktion mit rpS27e. Domäne IIIa ist zusammen mit IIIb der IRES-Interaktionspartner für den Initiationsfaktor eIF3 [21; 82; 175].

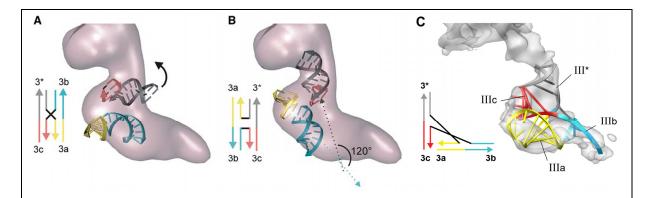


Abbildung 4.7 Konformation der IIIabc-4-Wege-Kreuzung. (A) und (B) entnommen aus [15]. (A) Parallele Konformation der 3abc-Kristallstruktur. Arm 3* müsste laut diesem Modell gebogen werden (Pfeil), um in die Kryo-EM Dichte zu passen. (B) Modell der antiparallelen 3abc-Konformation. Der Winkel zwischen den Armen 3* und 3b ist hier 120° und Arm 3* braucht nicht verbogen zu werden. (C) Die in dieser Arbeit gefundene Tertiärstruktur zeigt deutlich eine Konformation ähnlich der cL-Familie der RNA-4-Wege-Kreuzungen [94]. Die Tertiärstrukturmodelle sind in allen Abbildungen als farbige Bandmodelle in die jeweiligen separierten HCV IRES Elektronendichten (grau transparent) eingepasst.

Zu beachten ist auch, dass die beiden Schleifenregionen von IIIa und IIIc in der Darstellung der Kristallstruktur von Kieft und Kollegen fehlen; Schleife IIIa ist unstrukturiert und somit im Kristall nicht sichtbar und die IIIc-Schleife fehlt aufgrund von RNA-Dimerisierung. Gerade die IIIc-Schleifenregion bildet aber die Kontaktfläche zu rpS27e und IIIc positioniert Domäne IIIa so, dass sie mit eIF3 interagieren kann - die in Lösung dynamische IIIabc-4-Wege-Kreuzung wird erst durch die Bindung an die 40S Untereinheit in ihrer Tertiärstruktur stabilisiert. Der von Rijnbrand und Sizova [149; 175] beschriebene Effekt, dass eine Deletion der IRES Haarnadelstruktur IIIc die eIF3-Bindung an die IRES verhindert, wird dadurch ebenfalls erklärt. Der Kontakt der IRES Domäne IIIc zu rpS27e stimmt mit den Ergebnissen von Otto et al. [120] überein. Das Protein rpS27e hat kein bakterielles Gegenstück, nur in Archaea ist ein Homolog zu finden. Die N- und C-terminalen Verlängerungen sind Eukaryoten-spezifisch. Domäne IIIa weist außerdem eine Verbindung zu rpS7e auf, einem vollständig Eukaryoten-spezifischen Protein der 40S Untereinheit. Diese Verbindung ist vergleichsweise jedoch nicht sehr ausgeprägt und bei nur einem Oberflächenkonturniveau zu beobachten.

4.3 Visualisierung von RRL80S • CSFV IRES Komplexen mittels Kryo-

EM

Obwohl die aktuell erreichte Auflösung der 80S • CSFV IRES Rekonstruktion von 10 Å noch keine genauen Aussagen über die molekularen Details der CSFV IRES Struktur zulässt, so zeigen die Tertiärstrukturen von HCV und CSFV IRES in der ans Ribosom gebundenen Form doch eine große Übereinstimmung. Die CSFV IRES bindet in derselben Region des Ribosoms, wie die HCV IRES. Funktionell wichtige Domänen sind trotz Unterschieden in der Primärsequenz in derselben Weise orientiert. Biochemische Studien der letzten Jahre unterstreichen diese Ähnlichkeit noch: sowohl der Bedarf an Initiationsfaktoren, als auch der generelle Ablauf der Translationsinitiation zeigen fundamentale Übereinstimmungen beider IRES-Elemente [34; 63; 100; 132; 135]. Die G-reiche Schleife in Domäne IIId beispielsweise ist auch in der CSFV IRES ein bestimmender Faktor für die Bindung ans Ribosom und seine Aktivität [90]. Die NMR-Struktur der CSFV IRES Subdomäne IIa zeigte wie die HCV IRES Domäne II eine gebogene Struktur und eine vergleichbare Funktion während der Bildung von 80S Initiationskomplexen [100]. Diese für den Virus so wichtigen Elemente sind also tatsächlich nicht nur funktionell, sondern auch strukturell hoch konserviert innerhalb der HP IRES. Eine vergleichbare Tertiärstruktur ist somit auch für die HP-ähnlichen IRES-Elemente einiger Picornaviren (z.B. SPV-9, PTV-1) plausibel [34; 63]. Diese IRESs stellen laut Hellen und de Breyne modulare Elemente dar, die durch Rekombinationsereignisse nicht nur innerhalb der nahe verwandten Flaviviren, sondern auch zwischen Flavi- und Picornaviren ausgetauscht wurden. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen diese Vermutung. Die hohe strukturelle Konservierung unabhängig von der Primärsequenz und die kritische Rolle der einzelnen IRES-Domänen während der Translationsinitiation dieser Viren machen die IRES zu einem idealen therapeutischen Ziel.

4.4 Fazit

Bereits in früheren Studien wurden Parallelen der HCV IRES vermittelten Translationsinitiation und der prokaryotischen Initiation gezeigt [135]: die IRES mRNA kann ohne die Hilfe von Initiationsfaktoren stabile Komplexe mit der kleinen ribosomalen Untereinheit bilden und ihr Startkodon direkt in der ribosomalen P-Stelle platzieren. Solche binären Komplexe waren zuvor nur für die eubakterielle Initiation beschrieben worden. Bisher wurde zudem angenommen, daß die hochaffine IRES-40S-Interaktion ausschließlich proteinvermittelt ist [8; 95; 120], eine Bindung an ribosomale RNA konnte jedoch nicht

eindeutig ausgeschlossen werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse fügen einige weitere Einblicke in die Aktivität der IRES in eukaryotischen Zellen hinzu. Dank umfangreicher Optimierungen während der Probenpräparation in einem in vitro rekonstituierten System, bestehend nur aus isolierten 40S und 60S Untereinheiten und der IRES mRNA, konnten für eine kryo-elektronenmikroskopische Untersuchung ausreichend stabile 80S • IRES Komplexe erstellt werden. Die Erarbeitung des bisher größten kryo-elektronenmikroskopischen Datensatzes von fast 3 Millionen Einzelpartikeln in Kombination mit der Technik der Multireferenz-Klassifizierung ermöglicht die Rekonstruktion einer hochauflösenden 3D-Struktur dieser Komplexe. Anhand dieser Elektronendichtekarten ist es in der hier vorliegenden Arbeit erstmals gelungen, ein nahezu vollständiges Tertiärstrukturmodell der HCV IRES in der ribosomengebundenen Form zu erstellen. Der Vergleich mit NMR- und Kristallstrukturen einiger Teildomänen der HCV IRES in ihrer ungebundenen Form [30; 81; 87; 105-107] zeigt eine Konformationsänderung der IRES Domänen II und IIId, sowie der IIIabc-4-Wege-Kreuzung bei Bindung an das Ribosom auf. Dank der kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturmodelle der 40S Untereinheit [145] und des 80S Ribosoms [10] ist es gelungen, detaillierte Interaktionen dieser IRES mit der ribosomalen 40S Untereinheit aufzuklären. Die HCV IRES steht in vielfältigem Kontakt zu ribosomalen Proteinen der 40S Kopf- und Plattform-Domänen, aber auch zu Helices der 18S rRNA. Die Helix h26 zeigt dabei die am stärksten ausgeprägte Verbindung zur HCV IRES. Die zuvor beschriebenen Parallelen zur prokaryotischen Translationsinitiation sind weit ausgeprägter, als zuvor angenommen: Die helikale Struktur des Stem2-IIIf-Bereiches zur Positionierung des AUG in der P-Stelle, seine Positionierung nahe der ribosomalen E-Stelle und des 3'-Endes der 18S rRNA zusammen mit den vielfältigen Protein- und rRNA-Interaktionen (rpS1e, rpS5e, rpS14e, rpS26e, rpS28e, h23, h26) in dieser Region bilden ein strukturelles und funktionelles SD-antiSD-Mimikry durch die HCV IRES.

Dessen ungeachtet bestehen weiterhin viele wichtige offene Fragen bezüglich der HCV IRESvermittelten Translationsinitiation. So ist beispielsweise die Rolle der Domänen II und III
während der Bildung funktioneller 48S und 80S Initiationskomplexe sowie ihre Interaktion
mit den kanonischen Initiationsfaktoren nur zum Teil geklärt. Es bestehen weiterhin
Unklarheiten über den genauen Mechanismus zur Rekrutierung der Initiator-tRNA und
Etablierung einer stabilen Kodon-Antikodon-Interaktion mit dem AUG-Startkodon in der
ribosomalen P-Stelle. Zudem können bisher keine Aussagen über die strukturelle Flaxibilität
der HCV IRES entlang des Initiationspfades getroffen werden. Auch die stimulatorische Rolle

von IRES-*trans*-aktiven Faktoren (ITAFs), wie zum Beispiel des La-Autoantigens, auf die IRES Initiation ist bislang weitgehend unklar. Eine weitere Strukturaufklärung definierter Translationsintermediate mittels Kryo-EM ist daher fraglos notwendig und könnte auf lange Sicht richtungsweisend für die Entwicklung neuer antiviraler Strategien zur Behandlung von Hepatitis C Infektionen sein. Die hier vorgestellte Struktur der HCV IRES in der ribosomengebundenen Form bietet somit eine Grundlage für weiterführende Experimente.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Professor Dr. Christian M. T. Spahn herzlich bedanken. Er hat mir nicht nur die Möglichkeit geboten, an diesem interessanten Projekt mitzuarbeiten, sondern auch eine freundliche Aufnahme und familiäre Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe. Professor Dr. Thomas Schmülling und Professor Dr. Wolfgang Schuster danke ich für die Bereitschaft die Universitäts-interne Betreuung meiner Dissertation zu übernehmen.

Besonderer Dank gilt den Mitgliedern der AG Prof. Spahn, mit denen ich die letzten Jahre lachend und lernend verbringen durfte. Dear all Spahn goup members, thanks for your help, your teaching, and for the lot of fun we had. Insbesondere Justus Loerke, Marylena Dabrowski, Tanya Budkevych, Birgit Schroeer und Christine Gotthold gilt mein Dankeschön für ihre unendliche Geduld meine Fragen betreffend.

Herzlich danken möchte ich an dieser Stelle Professor Dr. Knud Nierhaus vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe für die hervorragende Kooperation sowie für wertvolle wissenschaftliche Diskussionen. Ein großes Dankeschön an dieser Stelle auch an Renate Albrecht!

An Dr. Thorsten Mielke und Jörg Bürger vom Ultra-Struktur-Netzwerk am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik geht ein großes Dankeswort für die intensive Betreuung im Umgang mit dem Mikroskop, sowie an Dr. Rudi Lurz für die herzliche Gastfreundschaft.

All meinen Freunden gilt meine Dankbarkeit, da sie mir auch in den nicht so fröhlichen Zeiten immer zur Seite standen. Besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Marcus Brille, der bisweilen nicht nur meine Launen tapfer ertragen und zum Positiven gewandelt hat, sondern auch bei auftretenden Problemen immer tatkräftig zur Seite stand. Danke, Danke, Danke!

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinem Onkel Dr. Rainer Collier und meiner Mutter bedanken, die für mich immer finanziell und vor allem moralisch immer da waren. Auch hier sind Worte zu wenig, um meine Dankbarkeit auszudrücken.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Kryoelektronenmikroskopische Darstellung eines 80S Ribosoms (Kaninchen)	
	und seiner Untereinheiten, sowie schematische Darstellung der Protein- und	
	rRNA-Bausteine der Untereinheiten.	14
Abbildung 1.2	Vergleich der Architektur von Ribosomen des Menschen, aus Hefe und	
	E. coli	15
Abbildung 1.3	Röntgenkristallstrukturen des Ribosoms	17
Abbildung 1.4	Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese	18
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung der kanonischen Translationsinitiation in	
	Eukaryoten.	23
Abbildung 1.6	Struktur des Hefe 40S Prä-Initiationskomplexes.	24
Abbildung 1.7	Schematische Darstellung der drei IRES-Typen am Beispiel viraler IRESs.	27
Abbildung 1.8	Sekundärstrukturdiagramme von HP und HP-ähnlichen IRES-Ele-menten.	28
Abbildung 1.9	Schematische Darstellung 5'-,,Cap"-unabhängigen Translationsiniti-ation des	
	Hepatitis-C-Virus.	30
Abbildung 1.10	Kryo-EM Rekonstruktionen von Ribosom - HCV IRES Komplexen	31
Abbildung 1.11	Lokalisation der strukturellen IRES Domänen im binären 40S • HCV IRES	
	Komplex.	32
Abbildung 1.12	Strukturen funktioneller HCV IRES Domänen	33
Abbildung 1.13	Übersicht über den Gesamtprozess der Kryo-EM.	35
Abbildung 1.14	Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Objekt.	36
Abbildung 1.15	Vergleich der theoretischen und der realen Kontrasttransferfunktion in	
	Abhängigkeit verschiedener Defokuswerte.	39
Abbildung 1.16	Schema der 3D-Rekonstruktion eines Objektes nach dem Projektions-	
	theorem.	44
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung der erzeugten und verwendeten pUC18-IRES	
	Plasmide	54
Abbildung 2.2	Plasmidkarte von pBS-SPV9.	56
Abbildung 2.3	Beispiel für einen Saccharosegradienten mit ribosomalen Partikeln.	75
Abbildung 2.4	Struktur- und Summenformel von Fluorescein-5-thiosemicarbazid	78
Abbildung 2.5	Schematische Übersicht über die Matrize MD01_HCV IRES 40-379#2 und	
	die verwendeten PCR-Primer.	84
Abbildung 2.6	Strukturformel von Puromycin.	89
Abbildung 2.7	Grids für die Kryo-EM.	97
Abbildung 2.8	Darstellung von 2D-Powerspektren	99
Abbildung 2.9	Schematischer Überblick über das 3D-Sortierungsverfahren.	103
Abbildung 2.10	Beispiel einer FSC-Kurve und einer 3σ-Kurve.	105
Abbildung 3.1	In vitro Transkription von IRES RNA.	107
Abbildung 3.2	Gradientenprofile und RNA-Agarose-Gelelektrophorese daraus isolierter	

	ribosomaler Untereinheiten, präpariert nach dem modifizierten Protokoll von Pisarev et al	108
Abbildung 3.3	Gradientenprofile und RNA-Agarose-Gelelektrophorese daraus isolierter	100
Applicating 5.5	ribosomaler Untereinheiten, präpariert nach dem modifizierten Protokoll von	
	Bommer et al.	110
Abbildung 2.4		
Abbildung 3.4	Analyse der Proteine aus RRL 40S Untereinheiten mittels SDS-PAGE.	
Abbildung 3.5	Ribosomen-Bindungstest der HCV IRES RNA unter FBB(K)-Bedingungen	112
Abbildung 3.6	Ribosomen-Bindungstest der HCV IRES RNA bei erhöhter Mg ²⁺ -	11.4
	Konzentration (10 mM) unter verschiedenen Zentrifugations-bedingungen.	114
Abbildung 3.7	Ribosomen-Bindungstest der HCV IRES RNA unter verschiedenen	
	Ionenbedingungen bei sanfter Zentrifugation mit niedriger g-Zahl.	
Abbildung 3.8	Erste Präparation von 80S • HCV IRES Komplexen für die Kryo-EM.	
Abbildung 3.9	Einfluss von Ca ²⁺ auf Bildung von 80S • HCV IRES Komplexen.	119
Abbildung 3.10	Stabilität der unter R80S-C-Bedingungen hergestellten und isolierten	
	80S • HCV IRES Komplexe.	121
Abbildung 3.11	Darstellung von 80S • IRES Komplexen mit HCV IRES - ähnlichen RNAs	
	unter R80S-C Bedingungen.	123
Abbildung 3.12	Präparation von 80S • HCV IRES und 80S • CSFV IRES Komplexen für die	
	Kryo-EM.	
Abbildung 3.13	Beispiele der zur IRES-Quantifizierung verwendeten Standards.	
Abbildung 3.14	Aufreinigung über das Streptavidin-tag (StAv-tag)	
Abbildung 3.15	Aufreinigung über das Streptomycin-tag Variante A (StM-tag A)	
Abbildung 3.16	Aufreinigung über das MS2-tag.	
Abbildung 3.17	Aufreinigung über das Tobramycin-tag (TOB-tag).	131
Abbildung 3.18	Vergleich der verwendeten Streptomycin-tags.	
Abbildung 3.19	Aufreinigung über das Streptomycin-tag (StM-B).	133
Abbildung 3.20	Aufreinigung über das Streptomycin-tag (StM-B), nach vorheriger	
	Aufreinigung über einen Saccharose-Gradienten.	134
Abbildung 3.21	Multireferenz Klassifizierung und Strukturverfeinerung des 80S • HCV IRES	
	Datensatzes.	
Abbildung 3.22	Flexibilität der 80S • HCV IRES Komplexe	139
Abbildung 3.23	FSC-Kurven zur Aulösungsbestimmung mit und ohne Maskierung zur	
	Verstärkung hochfrequenter Strukturinformationen.	140
Abbildung 3.24	3D-Elektronendichtekarte des 80S • HCV IRES Komplexes bei 7,8 Å	
	Auflösung.	141
Abbildung 3.25	Tertiärstrukturmodellierung der HCV IRES RNA	
Abbildung 3.26	Tertiärstruktur der HCV IRES RNA	146
Abbildung 3.27	Interaktionen der HCV IRES RNA mit Helices der 18S rRNA	147
Abbildung 3.28	Interaktionen der HCV IRES RNA mit ribosomalen Proteinen der 40S	
	Untereinheit.	149
Abbildung 3.29	3D-Elektronendichtekarte des 80S • CSFV IRES Komplexes bei 10 Å	

Abbildungsverzeichnis

151
152
154
156
156
158
162
163
165

Tabellenverzeichnis

Eukaryotische Initiationsfaktoren.	22
Bespiele für Gene mit IRES Elementen.	26
Übersicht über die in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Plasmide.	57
Herstellung eines Agarosegels.	68
Denaturierendes Polyacrylamidgel	69
Trenngel	70
Sammelgel	71
Herstellung eines Kompositgels	72
PCR-Programm für Pfx-Polymerase.	80
PCR-Primer zur Erstellung getaggter HCV IRES ΔdI - Konstrukte	81
PCR-Primer zur Erstellung von wt-HCV IRES-Konstrukten mit XhoI-	
Schnittstelle	82
Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide zur Erstellung MS2- bzw. TOB-getaggter	
HCV IRES ΔdI - Konstrukte	83
Beispiele zur Quantifizierung der IRES-Besetzung der isolierten Komplexe mittels	
FTS-Fluoreszenz.	126
Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen Nachbarschaftsbeziehungen	
zwischen kanonischer mRNA bzw. HCV IRES RNA und dem Ribosom.	155
Interaktionen der HCV IRES RNA mit der 40S Untereinheit	
SD-Kammer Komponenten und ihre eukaryotischen Gegenstücke	161
	Übersicht über die in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Plasmide. Herstellung eines Agarosegels. Denaturierendes Polyacrylamidgel. Trenngel

Literaturverzeichnis

- 1. Agirrezabala, X., Lei, J., Brunelle, J. L., et al. (2008). "Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome". Mol Cell **32**, 190-197.
- 2. Alkalaeva, E. Z., Pisarev, A. V., Frolova, L. Y., et al. (2006). "In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3". Cell 125, 1125-1136.
- 3. Alting-Mees, M. A. & Short, J. M. (1989). "pBluescript II: gene mapping vectors". Nucleic Acids Research 17, 9494.
- 4. Andersen, G. R., Stepanov, V. G., Kjeldgaard, M., et al. (2000). "Ternary complex of EF-Tu and its action on the ribosome". In The ribosome structure, function, antibiotics, and cellular interactions, Garrett, R. A., Douthwaite, S. R., Liljas, A., et al., eds. (Washington, DC, ASM press), pp. 337-345.
- 5. Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A. M., et al. (2010). "Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Ã resolution". Proceedings of the National Academy of Sciences **107**, 19748-19753.
- 6. Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A. M., et al. (2010). "Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Ã cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome". Proceedings of the National Academy of Sciences **107**, 19754-19759.
- 7. Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., et al. (2000). "A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo". Genes Dev 14, 2534-2546.
- 8. Babaylova, E., Graifer, D., Malygin, A., et al. (2009). "Positioning of subdomain IIId and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome". Nucleic Acids Res **37**, 1141-1151.
- 9. Bachler, M., Schroeder, R. & von Ahsen, U. (1999). "StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins". RNA 5, 1509-1516.
- 10. Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., et al. (2010). "Crystal structure of the eukaryotic ribosome". Science **330**, 1203-1209.
- 11. Berry, K. E., Waghray, S. & Doudna, J. A. (2010). "The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit". RNA 16, 1559-1569.
- 12. Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA". Meth Enzymol **100**, 243-255.
- 13. Blanchard, S. C., Kim, H. D., Gonzalez, R. L., Jr., et al. (2004). "tRNA dynamics on the ribosome during translation". Proc Natl Acad Sci USA **101**, 12893-12898.
- 14. Blobel, G. & Sabatini, D. (1971). "Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin". Proc Natl Acad Sci U S A **68**, 390-394.

- 15. Boehringer, D., Thermann, R., Ostareck-Lederer, A., et al. (2005). "Structure of the hepatitis C virus IRES bound to the human 80S ribosome: remodeling of the HCV IRES". Structure **13**, 1695-1706.
- 16. Bommer, U., Burkhardt, N., Jünemann, R., et al. (1996). "Isolation of ribosomes and ribosomal subunits from eucaryitic cells". In Subcellular fractionation A practical approach, Ribosomes and polysomes., Graham, J. and Rickwoods, D., eds. (Oxford, IRL Press at Oxford University Press), pp. 283-287.
- 17. Bommer, U., Burkhardt, N., Jünemann, R., et al. (1996). "Single reactions of the elongation cycle with heteropolymeric mRNA". In Subcellular fractionation A practical approach, Ribosomes and polysomes., Graham, J. and Rickwoods, D., eds. (Oxford, IRL Press at Oxford University Press), pp. 296-299.
- 18. Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. H., et al. (1992). "Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs". Nucleic Acids Res **20**, 5041-5045.
- 19. Bulygin, K., Chavatte, L., Frolova, L., et al. (2005). "The first position of a codon placed in the A site of the human 80S ribosome contacts nucleotide C1696 of the 18S rRNA as well as proteins S2, S3, S3a, S30, and S15". Biochemistry 44, 2153-2162.
- 20. Bycroft, M., Hubbard, T. J. P., Proctor, M., et al. (1997). "The solution structure of the S1 RNA binding domain: A member of an ancient nucleic acid-binding fold". Cell **88**, 235-242.
- 21. Cai, Q., Todorovic, A., Andaya, A., et al. (2010). "Distinct regions of human eIF3 are sufficient for binding to the HCV IRES and the 40S ribosomal subunit". J Mol Biol **403**, 185-196.
- 22. Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., et al. (2000). "Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics". Nature **407**, 340-348.
- 23. Carter, A. P., Clemons, W. M., Jr., Brodersen, D. E., et al. (2001). "Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit". Science **291**, 498-501.
- 24. Caskey, T., Scolnick, E., Tompkins, R., et al. (1969). "Peptide chain termination, codon, protein factor, and ribosomal requirements". In Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, pp. 479-491.
- 25. Chandramouli, P., Topf, M., Menetret, J. F., et al. (2008). "Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 A resolution". Structure **16**, 535-548.
- 26. Chao, F.-C. (1957). "Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast". Archives Of Biochemistry And Biophysics **70**, 426-431.
- 27. Chappell, S. A., Edelman, G. M. & Mauro, V. P. (2000). "A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity". Proc Natl Acad Sci U S A 97, 1536-1541.
- 28. Chen, J. Z. & Grigorieff, N. (2007). "SIGNATURE: A single-particle selection system for molecular electron microscopy". Journal of Structural Biology **157**, 168-173.
- 29. Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Anal Biochem **162**, 156-159.

- 30. Collier, A. J., Gallego, J., Klinck, R., et al. (2002). "A conserved RNA structure within the HCV IRES eIF3-binding site". Nat Struct Biol 9, 375-380.
- 31. Connell, S. R., Takemoto, C., Wilson, D. N., et al. (2007). "Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors". Mol Cell **25**, 751-764.
- 32. Dahlberg, A. E., Dingman, C. W. & Peacock, A. C. (1969). "Electrophoretic characterization of bacterial polyribosomes in agarose-acrylamide composite gels." J Mol Biol **41**, 139-147.
- 33. Dahlquist, K. D. & Puglisi, J. D. (2000). "Interaction of translation initiation factor IF1 with the *E. coli* ribosomal A site". J Mol Biol **299**, 1-15.
- 34. de Breyne, S., Yu, Y., Pestova, T. V., et al. (2008). "Factor requirements for translation initiation on the Simian picornavirus internal ribosomal entry site". RNA 14, 367-380.
- 35. De Rosier, D. J. & Klug, A. (1968). "Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs". Nature **217**, 130-134.
- 36. Demeshkina, N., Repkova, M., Ven'yaminova, A., et al. (2000). "Nucleotides of 18S rRNA surrounding mRNA codons at the human ribosomal A, P, and E sites: a crosslinking study with mRNA analogs carrying an aryl azide group at either the uracil or the guanine residue". RNA 6, 1727-1736.
- 37. Dever, T. E. (2002). "Gene-specific regulation by general translation factors". Cell **108**, 545-556.
- 38. Dibrov, S. M., Johnston-Cox, H., Weng, Y. H., et al. (2007). "Functional architecture of HCV IRES domain II stabilized by divalent metal ions in the crystal and in solution". Angew Chem Int Ed Engl **46**, 226-229.
- 39. Döring, T., Mitchell, P., Osswald, M., et al. (1994). "The decoding region of 16S RNA; a cross-linking study of the ribosomal A, P and E sites using tRNA derivatized at position 32 in the anticodon loop". Embo J 13, 2677-2685.
- 40. Doudna, J. A. & Rath, V. L. (2002). "Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier". Cell **109**, 153-156.
- 41. Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., et al. (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens". Q Rev Biophys **21**, 129-228.
- 42. Easton, L. E., Locker, N. & Lukavsky, P. J. (2009). "Conserved functional domains and a novel tertiary interaction near the pseudoknot drive translational activity of hepatitis C virus and hepatitis C virus-like internal ribosome entry sites". Nucleic Acids Res 37, 5537-5549.
- 43. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., et al. (2010). "Features and development of Coot". Acta Crystallographica Section D **66**, 486-501.
- 44. Filbin, M. E. & Kieft, J. S. (2009). "Toward a structural understanding of IRES RNA function". Curr Opin Struct Biol.
- 45. Fitzgerald, K. D. & Semler, B. L. (2009). "Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus". Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Regulatory Mechanisms 1789, 518-528.

- 46. Fletcher, S. P., Ali, I. K., Kaminski, A., et al. (2002). "The influence of viral coding sequences on pestivirus IRES activity reveals further parallels with translation initiation in prokaryotes". Rna **8**, 1558-1571.
- 47. Fletcher, S. P. & Jackson, R. J. (2002). "Pestivirus internal ribosome entry site (IRES) structure and function: elements in the 5' untranslated region important for IRES function". J Virol **76**, 5024-5033.
- 48. Frank, J. (2002). "Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure **31**, 303-319.
- 49. Frank, J. & Agrawal, R. K. (2000). "A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation". Nature **406**, 318-322.
- 50. Frank, J., Penczek, P., Agrawal, R. K., et al. (2000). "Three-dimensional cryoelectron microscopy of ribosomes". RNA Ligand Interactions Pt A: Structural Biology Methods **317**, 276-291.
- 51. Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., et al. (1996). "SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields". J Struct Biol **116**, 190-199.
- 52. Frank, J. & van Heel, M. (1982). "Correspondence analysis of aligned images of biological particles". J Mol Biol **161**, 134-137.
- 53. Fraser, C. S. & Doudna, J. A. (2007). "Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation". Nat Rev Microbiol 5, 29-38.
- 54. Fraser, C. S., Hershey, J. W. & Doudna, J. A. (2009). "The pathway of hepatitis C virus mRNA recruitment to the human ribosome". Nat Struct Mol Biol.
- 55. Fukushi, S., Okada, M., Stahl, J., et al. (2001). "Ribosomal protein S5 interacts with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus". J Biol Chem **276**, 20824-20826.
- 56. Gamble, C., Trotard, M., Seyec, J. L., et al. (2009). "Antiviral effect of ribonuclease conjugated oligodeoxynucleotides targeting the IRES RNA of the hepatitis C virus". Bioorg Med Chem Lett.
- 57. Gao, H., Zhou, Z., Rawat, U., et al. (2007). "RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors". Cell **129**, 929-941.
- 58. Graifer, D., Molotkov, M., Styazhkina, V., et al. (2004). "Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites". Nucleic Acids Res **32**, 3282-3293.
- 59. Gualerzi, C., Brandi, L., Caserta, E., et al. (2000). "Translation initiation in bacteria". In The ribosome structure, function, antibiotics, and cellular interactions, Garrett, R. A., Douthwaite, S. R., Liljas, A., et al., eds. (Washington D.C., ASM Press), pp. 477-494.
- 60. Hamasaki, K., Killian, J., Cho, J., et al. (1998). "Minimal RNA constructs that specifically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities". Biochemistry **37**, 656-663.
- 61. Hapke, B. & Noll, H. (1976). "Structural dynamics of bacterial ribosomes, : IV. Classification of ribosomes by subunit interaction". Journal Of Molecular Biology **105**, 97-109.

- 62. Hartmuth, K., Vornlocher, H.-P. & Lührmann, R. (2004). "Tobramycin Affinity Tag Purification of Spliceosomes". In mRNA Processing and Metabolism: Methods and Protocols, pp. 47-64.
- 63. Hellen, C. U. & de Breyne, S. (2007). "A distinct group of hepacivirus/pestivirus-like internal ribosomal entry sites in members of diverse picornavirus genera: evidence for modular exchange of functional noncoding RNA elements by recombination". J Virol 81, 5850-5863.
- 64. Hellen, C. U. & Sarnow, P. (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules". Genes Dev 15, 1593-1612.
- 65. Hirashima, A. & Kaji, A. (1970). "Factor dependent breakdown of polysomes." Biochem Biophys Res Com **41**, 877-883.
- 66. Hirashima, A. & Kaji, A. (1972). "Factor-dependent release of ribosomes from mRNA. Requirement for 2 heat-stable factors." J Mol Biol **65**, 43-58.
- 67. Hirashima, A. & Kaji, A. (1973). "Role of elongation factor G and a protein factor on the release of ribosomes from messenger ribonucleic acid". J Biol Chem **248**, 7580-7587.
- 68. Hofmann, K. P., Spahn, C. M. T., Heinrich, R., et al. (2006). "Building functional modules from molecular interactions". Trends in Biochemical Sciences **31**, 497-508.
- 69. Honda, M., Brown, E. A. & Lemon, S. M. (1996). "Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA". RNA 2, 955-968.
- 70. Honda, M., Ping, L. H., Rijnbrand, R. C. A., et al. (1996). "Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA". Virology **222**, 31-42.
- 71. Hu, M. C., Tranque, P., Edelman, G. M., et al. (1999). "rRNA-complementarity in the 5' untranslated region of mRNA specifying the Gtx homeodomain protein: evidence that base-pairing to 18S rRNA affects translational efficiency". Proc Natl Acad Sci U S A **96**, 1339-1344.
- 72. Hundsdoerfer, P., Thoma, C. & Hentze, M. W. (2005). "Eukaryotic translation initiation factor 4GI and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation". Proc Natl Acad Sci U S A **102**, 13421-13426.
- 73. Jackson, R. J., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation". Nat Rev Mol Cell Biol 11, 113-127.
- 74. Jang, S. K., Kraeusslich, H. G., Nicklin, M. J. H., et al. (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.
- 75. Ji, H., Fraser, C. S., Yu, Y., et al. (2004). "Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA". Proc Natl Acad Sci U S A **101**, 16990-16995.
- 76. Jubin, R., Vantuno, N. E., Kieft, J. S., et al. (2000). "Hepatitis C virus internal ribosome entry site (IRES) stem loop IIId contains a phylogenetically conserved GGG triplet essential for translation and IRES folding". J Virol 74, 10430-10437.

- 77. Julian, P., Konevega, A. L., Scheres, S. H., et al. (2008). "Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states". Proc Natl Acad Sci U S A **105**, 16924-16927.
- 78. Kalliampakou, K. I., Psaridi-Linardaki, L. & Mavromara, P. (2002). "Mutational analysis of the apical region of domain II of the HCV IRES". FEBS Lett **511**, 79-84.
- 79. Kaminishi, T., Wilson, D. N., Takemoto, C., et al. (2007). "A snapshot of the 30S ribosomal subunit capturing mRNA via the Shine-Dalgarno interaction". Structure **15**, 289-297.
- 80. Karimi, R., Pavlov, M. Y., Buckingham, R. H., et al. (1999). "Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation". Mol Cell **3**, 601-609.
- 81. Kieft, J. S., Zhou, K., Grech, A., et al. (2002). "Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation". Nat Struct Biol 9, 370-374.
- 82. Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R., et al. (2001). "Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA". Rna 7, 194-206.
- 83. Kieft, J. S., Zhou, K., Jubin, R., et al. (1999). "The Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site Adopts an Ion-dependent Tertiary Fold". Journal Of Molecular Biology **292**, 513-529.
- 84. Kikuchi, K., Umehara, T., Nishikawa, F., et al. (2009). "Increased inhibitory ability of conjugated RNA aptamers against the HCV IRES". Biochem Biophys Res Commun.
- 85. Kim, I., Lukavsky, P. J. & Puglisi, J. D. (2002). "NMR study of 100 kDa HCV IRES RNA using segmental isotope labeling". J Am Chem Soc **124**, 9338-9339.
- 86. Kisselev, L. L. & Frolova, L. (1995). "Termination of translation in eukaryotes". Biochem Cell Biol **73**, 1079-1086.
- 87. Klinck, R., Westhof, E., Walker, S., et al. (2000). "A potential RNA drug target in the hepatitis C virus internal ribosomal entry site". RNA 6, 1423-1431.
- 88. Koev, G., Duncan, R. F. & Lai, M. M. (2002). "Hepatitis C virus IRES-dependent translation is insensitive to an eIF2alpha-independent mechanism of inhibition by interferon in hepatocyte cell lines". Virology **297**, 195-202.
- 89. Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. T. (2000). "An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus". Journal of Virology 74, 6242-6250.
- 90. Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. & Hellen, C. U. T. (2000). "Ribosomal binding to the internal ribosomal entry site of classical swine fever virus". Rna A Publication of the Rna Society 6, 1791-1807.
- 91. Komar, A. A. & Hatzoglou, M. (2011). "Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states". Cell Cycle **10**, 229-240.
- 92. Korostelev, A., Trakhanov, S., Asahara, H., et al. (2007). "Interactions and dynamics of the Shine Dalgarno helix in the 70S ribosome". Proc Natl Acad Sci U S A **104**, 16840-16843.
- 93. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature **227**, 680-685.
- 94. Laing, C. & Schlick, T. (2009). "Analysis of four-way junctions in RNA structures". J Mol Biol 390, 547-559.

- 95. Laletina, E., Graifer, D., Malygin, A., et al. (2006). "Proteins surrounding hairpin IIIe of the hepatitis C virus internal ribosome entry site on the human 40S ribosomal subunit". Nucleic Acids Res **34**, 2027-2036.
- 96. Lancaster, A. M., Jan, E. & Sarnow, P. (2006). "Initiation factor-independent translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site". RNA 12, 894-902.
- 97. Landry, D. M., Hertz, M. I. & Thompson, S. R. (2009). "RPS25 is essential for translation initiation by the Dicistroviridae and hepatitis C viral IRESs". Genes Dev **23**, 2753-2764.
- 98. Lee, K.-M., Yu, C. W.-H., Chan, D. S.-B., et al. (2010). "Solution structure of the dimerization domain of ribosomal protein P2 provides insights for the structural organization of eukaryotic stalk". Nucleic Acids Research 38, 5206-5216.
- 99. Locker, N., Easton, L. E. & Lukavsky, P. J. (2006). "Affinity purification of eukaryotic 48S initiation complexes". Rna 12, 683-690.
- 100. Locker, N., Easton, L. E. & Lukavsky, P. J. (2007). "HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly". Embo J **26**, 795-805.
- 101. Locker, N. & Lukavsky, P. J. (2007). "A practical approach to isolate 48S complexes: affinity purification and analyses". Methods Enzymol **429**, 83-104.
- 102. Lockwood, A. H., Chakraborty, P. R. & Maitra, U. (1971). "A complex between initiation factor IF2, guanosine triphosphate, and fMet-tRNA: an intermediate in initiation complex formation". PNAS USA **68**, 3122-3126.
- 103. Loerke, J., Giesebrecht, J., Spahn, C. M. T., et al. (2010). "Multiparticle Cryo-EM of Ribosomes". In Methods in Enzymology, (Academic Press), pp. 161-177.
- 104. Loh, P. G. & Song, H. (2009). "Structural and mechanistic insights into translation termination". Current Opinion in Structural Biology **20**, 98-103.
- 105. Lukavsky, P. J. (2009). "Structure and function of HCV IRES domains". Virus Res **139**, 166-171.
- 106. Lukavsky, P. J., Kim, I., Otto, G. A., et al. (2003). "Structure of HCV IRES domain II determined by NMR". Nat Struct Biol 10, 1033-1038.
- 107. Lukavsky, P. J., Otto, G. A., Lancaster, A. M., et al. (2000). "Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function". Nat Struct Biol 7, 1105-1110.
- 108. Luttermann, C. & Meyers, G. (2009). "The importance of inter- and intramolecular base pairing for translation reinitiation on a eukaryotic bicistronic mRNA". Genes Dev 23, 331-344.
- 109. Maag, D., Fekete, C. A., Gryczynski, Z., et al. (2005). "A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon". Mol Cell 17, 265-275.
- 110. Masek, T., Vopalensky, V., Horvath, O., et al. (2007). "Hepatitis C virus internal ribosome entry site initiates protein synthesis at the authentic initiation codon in yeast". J Gen Virol 88, 1992-2002.

- 111. Meinnel, T., Sacerdot, C., Graffe, M., et al. (1999). "Discrimination by *Escherichia coli* initiation factor IF3 against initiation on non-canonical codons relies on complementarity rules". J Mol Biol **290**, 825-837.
- 112. Melcher, S. E., Wilson, T. J. & Lilley, D. M. (2003). "The dynamic nature of the four-way junction of the hepatitis C virus IRES". Rna **9**, 809-820.
- 113. Meng, Z., Jackson, N. L., Shcherbakov, O. D., et al. (2010). "The human IGF1R IRES likely operates through a Shine-Dalgarno-like interaction with the G961 loop (E-site) of the 18S rRNA and is kinetically modulated by a naturally polymorphic polyU loop". Journal of Cellular Biochemistry 110, 531-544.
- 114. Mindell, J. A. & Grigorieff, N. (2003). "Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy". J Struct Biol **142**, 334-347.
- 115. Moazed, D. & Noller, H. F. (1989). "Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome". Nature **342**, 142-148.
- 116. Moazed, D. & Noller, H. F. (1990). "Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in the 16S rRNA". J Mol Biol **211**, 135-145.
- 117. Muhs, M., Yamamoto, H., Ismer, J., et al. (2011). "Structural basis for the binding of IRES RNAs to the head of the ribosomal 40S subunit". Nucleic Acids Res.
- 118. Munir, S., Saleem, S., Idrees, M., et al. (2010). "Hepatitis C treatment: current and future perspectives". Virol J 7, 296.
- 119. Munro, J. B., Sanbonmatsu, K. Y., Spahn, C. M., et al. (2009). "Navigating the ribosome's metastable energy landscape". Trends Biochem Sci **34**, 390-400.
- 120. Otto, G. A., Lukavsky, P. J., Lancaster, A. M., et al. (2002). "Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction". Rna **8**, 913-923.
- 121. Otto, G. A. & Puglisi, J. D. (2004). "The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation". Cell 119, 369-380.
- 122. Ouellet, J., Melcher, S., Iqbal, A., et al. (2010). "Structure of the three-way helical junction of the hepatitis C virus IRES element". RNA **16**, 1597-1609.
- 123. Pacheco, A. & Martinez-Salas, E. (2010). "Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches". J Biomed Biotechnol **2010**, 458927.
- 124. Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., et al. (2007). "The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome". Mol Cell **26**, 41-50.
- 125. Paulin, F. E., Campbell, L. E., O'Brien, K., et al. (2001). "Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein". Curr Biol 11, 55-59.
- 126. Paulsen, R. B., Seth, P. P., Swayze, E. E., et al. (2010). "Inhibitor-induced structural change in the HCV IRES domain IIa RNA". Proc Natl Acad Sci U S A **107**, 7263-7268.
- 127. Peinelt, C., Beck, A., Monteilh-Zoller, M. K., et al. (2009). "IP3 receptor subtype-dependent activation of store-operated calcium entry through ICRAC". Cell Calcium **45**, 326-330.

- 128. Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA". Nature **334**, 320-325.
- 129. Penczek, P. A., Grassucci, R. A. & 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.
- 130. Penczek, P. A., Zhu, J., Schröder, R., et al. (1997). "Three Dimensional Reconstruction with Contrast Transfer Correction from Defocus Series". Scanning Microscopy 11, 147-154.
- 131. Peske, F., Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. (2005). "Sequence of steps in ribosome recycling as defined by kinetic analysis". Mol Cell **18**, 403-412.
- 132. Pestova, T. V., de Breyne, S., Pisarev, A. V., et al. (2008). "eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II". Embo J 27, 1060-1072.
- 133. Pestova, T. V. & Kolupaeva, V. G. (2002). "The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection". Genes Dev 16, 2906-2922.
- 134. Pestova, T. V., Lorsch, J. R. & Hellen, C. U. T. (2007). "The Mechanism of Translation Initiation in Eucaryotes". In Translational Control in Biology and Medicine, Mathews, M. B., Sonenberg, N. and Hershey, J. W. B., eds. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 87-182.
- 135. Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., et al. (1998). "A Prokaryotic-Like Mode of Cytoplasmic Eukaryotic Ribosome Binding to the Initiation Codon During Internal Translation Initiation of Hepatitis C and Classical Swine Fever Virus Rnas". Genes & Development 12, 67-83.
- 136. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., et al. (2004). "UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis". Journal of Computational Chemistry 25, 1605-1612.
- 137. Pisarev, A. V., Chard, L. S., Kaku, Y., et al. (2004). "Functional and structural similarities between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and porcine teschovirus, a picornavirus". J Virol 78, 4487-4497.
- 138. Pisarev, A. V., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. (2007). "Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes". Cell **131**, 286-299.
- 139. Pisarev, A. V., Kolupaeva, V. G., Yusupov, M. M., et al. (2008). "Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes". EMBO J **27**, 1609-1621.
- 140. Pisarev, A. V., Shirokikh, N. E. & Hellen, C. U. (2005). "Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites". C R Biol **328**, 589-605.
- 141. Pisarev, A. V., Skabkin, M. A., Pisareva, V. P., et al. (2010). "The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling". Mol Cell **37**, 196-210.
- 142. Pisarev, A. V., Unbehaun, A., Hellen, C. U. T., et al. (2007). "Assembly and Analysis of Eukaryotic Translation Initiation Complexes". In Methods In Enzymology, (Academic Press), pp. 147-177.

- 143. Pisareva, V. P., Pisarev, A. V., Komar, A. A., et al. (2008). "Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29". Cell **135**, 1237-1250.
- 144. Powell, M. L., Leigh, K. E., Poyry, T. A., et al. (2011). "Further characterisation of the translational termination-reinitiation signal of the influenza B virus segment 7 RNA". PLoS One 6, e16822.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S. F., et al. (2011). "Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1". Science **331**, 730-736.
- 146. Ramakrishnan, V. (2002). "Ribosome structure and the mechanism of translation". Cell **108**, 557-572.
- 147. Ramakrishnan, V. & Moore, P. B. (2001). "Atomic structures at last: the ribosome in 2000". Curr Opin Struct Biol 11, 144-154.
- Ratje, A. H., Loerke, J., Mikolajka, A., et al. (2010). "Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites". Nature **468**, 713-716.
- 149. Rijnbrand, R., Bredenbeek, P., Vanderstraaten, T., et al. (1995). "Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation". FEBS Lett **365**, 115-119.
- 150. Rijnbrand, R., vanderStraaten, T., vanRijn, P. A., et al. (1997). "Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon". J Virol 71, 451-457.
- 151. Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., et al. (1992). "Translation initiation in *Escherichia coli*: Sequences within the ribosome-binding site". Mol Microbiol **6**, 1219-1229.
- 152. Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. (2009). "Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes". Current Opinion in Cell Biology **21**, 435-443.
- 153. Romero-Lopez, C., Diaz-Gonzalez, R., Barroso-Deljesus, A., et al. (2009). "Inhibition of HCV replication and IRES-dependent translation by an RNA molecule". J Gen Virol.
- 154. Rosenfeld, A. B. & Racaniello, V. R. (2010). "Components of the multifactor complex needed for internal initiation by the IRES of hepatitis C virus in Saccharomyces cerevisiae". RNA Biol 7.
- 155. Ruska, E. & Knoll, M. (1932). "Das Elektronenmikroskop." Zeitschrift für Physik **78**, 318-339.
- 156. Sachs, A. B., Sarnow, P. & Hentze, M. W. (1997). "Starting at the beginning, middle, and end: Translation initiation in eukaryotes". Cell **89**, 831-838.
- 157. Salas-Marco, J. & Bedwell, D. M. (2004). "GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination". Mol Cell Biol **24**, 7769-7778.
- 158. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning, a laboratory manual: 2nd edition" (Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- 159. Sarnow, P., Cevallos, R. C. & Jan, E. (2005). "Takeover of host ribosomes by divergent IRES elements". Biochem Soc Trans **33**, 1479-1482.

- 160. Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Mohr, D., et al. (2003). "An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation". Mol Cell **11**, 1517-1523.
- 161. Savelsbergh, A., Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. (2009). "Distinct functions of elongation factor G in ribosome recycling and translocation". Rna.
- 162. Scheper, G. C., Voorma, H. O. & Thomas, A. A. M. (1994). "Basepairing with 18S ribosomal RNA in internal initiation of translation". FEBS Lett **352**, 271-275.
- 163. Scherzer, O. (1949). "The Theoretical Resolution Limit of the Electron Microscope." Journal of Applied Physics **20**, 20-29.
- 164. Schuette, J. C., Murphy, F. V. t., Kelley, A. C., et al. (2009). "GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding". Embo J **28**, 755-765.
- 165. Schüler, M. (2009) "Die Struktur der IRES-RNA von Dicistroviren" *Thesis, (Dr. rer. medic.)*, Institut für medizinische Physik und Biophysik, Medizinische Fakultät der Charité Universitätsmedizin, Berlin
- 166. Schüler, M., Connell, S. R., Lescoute, A., et al. (2006). "Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA". Nat Struct Mol Biol 13, 1092-1096.
- 167. Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., et al. (1968). "Release factors differing in specificity for terminator codons". Proc Natl Acad Sci USA **61**, 768-774.
- 168. Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy, F. V., et al. (2006). "Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA". Science **313**, 1935-1942.
- 169. Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., et al. (2004). "Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM". Nat Struct Mol Biol 11, 957-962.
- 170. Shaikh, T. R., Gao, H., Baxter, W. T., et al. (2008). "SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs". Nat Protoc 3, 1941-1974.
- 171. Shenvi, C. L., Dong, K. C., Friedman, E. M., et al. (2005). "Accessibility of 18S rRNA in human 40S subunits and 80S ribosomes at physiological magnesium ion concentrations-implications for the study of ribosome dynamics". RNA 11, 1898-1908.
- 172. Shine, J. & Dalgarno, L. (1975). "Terminal-sequence analysis of bacterial ribosomal RNA. Correlation between the 3' terminal polypyrimidine sequence of 16S RNA and translational specificity of the ribosome". Eur J Bioch 57, 221-230.
- 173. Shirasaki, T., Honda, M., Mizuno, H., et al. (2010). "La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication". J Infect Dis 202, 75-85.
- 174. Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., et al. (2009). "A structural view of translation initiation in bacteria". Cell Mol Life Sci **66**, 423-436.
- 175. Sizova, D. V., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., et al. (1998). "Specific Interaction of Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 With the 5' Nontranslated Regions of Hepatitis C Virus and Classical Swine Fever Virus Rnas". Journal of Virology 72, 4775-4782.
- 176. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets". Cell **136**, 731-745.

- 177. Spahn, C. M., Jan, E., Mulder, A., et al. (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.
- 178. Spahn, C. M., Kieft, J. S., Grassucci, R. A., et al. (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit". Science **291**, 1959-1962.
- 179. Srisawat, C. & Engelke, D. R. (2002). "RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes". Methods **26**, 156-161.
- 180. Stark, H., Rodnina, M. V., Wieden, H. J., et al. (2002). "Ribosome interactions of aminoacyltRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex". Nat Struct Biol **15**, 15-20.
- 181. Steven, A. & Belnap, D. (2001). "Electron Microscopy and Image Processing: An Essential Tool for Structural Analysis of Macromolecules" (John Wiley & Sons, Inc.).
- 182. Tarn, W. Y. & Chang, T. H. (2009). "The current understanding of Ded1p/DDX3 homologs from yeast to human". RNA Biol 6, 17-20.
- 183. Tarun, S. Z. & Sachs, A. B. (1996). "Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G". Embo J 15, 7168-7177.
- 184. Tautz, D. & Renz, M. (1983). "An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels". Analytical Biochemistry **132**, 14-19.
- 185. Taylor, D. J., Devkota, B., Huang, A. D., et al. (2009). "Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome". Structure 17, 1591-1604.
- 186. Trabuco, L. G., Schreiner, E., Eargle, J., et al. (2010). "The Role of L1 Stalk-tRNA Interaction in the Ribosome Elongation Cycle". Journal Of Molecular Biology **402**, 741-760.
- 187. Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., et al. (2003). "Locking and unlocking of ribosomal motions". Cell **114**, 123-134.
- 188. van Heel, M. (1987). "Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction". Ultramicroscopy **21**, 111-123.
- 189. van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., et al. (2000). "Single-particle electron cryomicroscopy: towards atomic resolution". Q Rev Biophys **33**, 307-369.
- 190. van Heel, M. & Harauz, G. (1988). "Biological macromolecules explored by pattern recognition". Scanning Microsc Suppl **2**, 295-301.
- 191. Varani, G. & McClain, W. H. (2000). "The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems". EMBO Rep 1, 18-23.
- 192. Villa, E., Sengupta, J., Trabuco, L. G., et al. (2009). "Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis". Proc Natl Acad Sci U S A **106**, 1063-1068.
- 193. Wade, R. H. (1992). "A brief look at imaging and contrast transfer." Ultramicroscopy **46**, 145-156.
- 194. Walton, J. (2003). "NAG's IRIS Explorer". IRIS Explorer Technical Report No IETR/12 (NAG Publication reference No NP3654).

- 195. Whitford, P. C., Geggier, P., Altman, R. B., et al. (2010). "Accommodation of aminoacyltRNA into the ribosome involves reversible excursions along multiple pathways". Rna.
- 196. Wilson, D. N. & Nierhaus, K. H. (2003). "The ribosome through the looking glass". Angew Chem Int Ed Engl **42**, 3464-3486.
- 197. Windbichler, N. & Schroeder, R. (2006). "Isolation of specific RNA-binding proteins using the streptomycin-binding RNA aptamer". Nat Protoc 1, 637-640.
- 198. Wower, J., Scheffer, P., Sylvers, L. A., et al. (1993). "Topography of the E-site on the *Escherichia coli* ribosome". Embo J **12**, 617-623.
- 199. Wu, H., Yang, P. K., Butcher, S. E., et al. (2001). "A novel family of RNA tetraloop structure forms the recognition site for Saccharomyces cerevisiae RNase III". Embo J **20**, 7240-7249.
- 200. Wu, T.-p., Ruan, K.-c. & Liu, W.-y. (1996). "A Fluorescence-Labeling Method for Sequencing Small RNA on Polyacrylamide Gel". Nucleic Acids Research **24**, 3472-3473.
- 201. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors". Gene **33**, 103-119.
- 202. Yoshizawa, S., Fourmy, D. & Puglisi, J. D. (1999). "Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA". Science **285**, 1722-1725.
- 203. Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B., et al. (2004). "The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release". Cell 117, 589-599.
- 204. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., et al. (2001). "Crystal structure of the ribosome at 5.5 A resolution". Science **292**, 883-896.
- 205. Yusupova, G., Jenner, L., Rees, B., et al. (2006). "Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome". Nature **444**, 391-394.
- 206. Yusupova, G. Z., Yusupov, M. M., Cate, J. H., et al. (2001). "The path of messenger RNA through the ribosome". Cell **106**, 233-241.
- 207. Zavialov, A. V., Buckingham, R. H. & Ehrenberg, M. (2001). "A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3". Cell **107**, 115-124.
- 208. Zhao, Q., Han, Q., Kissinger, C. R., et al. (2008). "Structure of hepatitis C virus IRES subdomain IIa". Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **64**, 436-443.
- 209. Zhu, J., Penczek, P. A., Schroder, R., et al. (1997). "Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs: procedure and application to the 70S Escherichia coli ribosome". J Struct Biol 118, 197-219.