

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Max Planck Institut für Biochemie

Abteilungen für Molekulare Strukturbiochemie und für Zelluläre Biochemie

**Die dreidimensionale Organisation des bakteriellen
und eukaryotischen Translationsapparates**

Florian Brandt

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
3. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 09.06.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 12.08.1009 angenommen.

Inhalt

Overview.....	7
Überblick.....	9
1. Einleitung.....	11
1.1. Proteinsynthese und –faltung in der Zelle.....	11
1.2. Translation in Polyribosomen.....	12
1.3. Struktur und Funktion des bakteriellen Ribosoms.....	15
1.4. Der Weg der mRNA durch die 30S Untereinheit.....	17
1.5. Mechanismen der Elongation und Peptidyltransferase.....	19
1.6. Translokation des naszenten Peptids.....	21
1.7. Faltung des naszenten Peptids.....	23
1.8. Bakterielle Chaperone können naszente Peptide binden.....	25
1.9. Funktionale Homologien eukaryotischer co-translationaler Chaperone.....	30
1.10. Kryo-Elektronenmikroskopie.....	33
1.10.1. Kontrastentstehung in der Kryo-Elektronenmikroskopie.....	34
1.10.2. Phasenkontrasttransferfunktion.....	36
1.10.3. Einzelpartikelanalyse von Makromolekülen.....	39
1.10.4. Elektronentomographische Rekonstruktion pleomorpher Strukturen.....	40
1.10.5. Mustererkennung in Kryo-Elektronentomogrammen.....	44
1.10.6. Experimentelle Limitierungen der globalen Mustererkennung.....	47
2. Material und Methoden.....	50
2.1. (Bio)chemikalien und Kits (nach Herstellern).....	50
2.2. Medien und Standardpuffer.....	50
2.3. Bakterielle und mammalische Zellkulturen.....	51

2.4.	Plasmide	51
2.5.	Oligonukleotide	52
2.6.	Molekularbiologische Methoden	53
2.6.1.	DNA-Klonierung, Transformation, Plasmidpräparation	53
2.6.2.	Polymerase Chain Reaction (PCR)	53
2.6.3.	<i>In vitro</i> Transkription	54
2.6.4.	<i>In vitro</i> Translationssysteme	54
2.6.5.	Bakterielle <i>in vitro</i> Translation	55
2.7.	Polysomenpräparation aus <i>E. coli</i> spheroplasten	56
2.8.	U-87MG Zellkultur, Vitrifizierung und Polysomenpräparation	56
2.9.	Dichtegradientenzentrifugation	57
2.10.	Gelfiltrationschromatographie	58
2.11.	Elektronenmikroskopie	59
2.11.1.	Negativkontrastierung	59
2.11.2.	Vitrifizierung von biologischen Proben	59
2.11.3.	Kryoelektronentomographie und 3D Rekonstruktion	60
2.11.4.	Mustererkennung durch 3D Korrelationsmethoden	61
2.11.5.	Klassifizierung anhand relativer räumlicher Konfiguration	63
2.11.6.	3D Modelle für Ribosomen, Polysomen, mRNA und naszente Peptide	65
3.	Ergebnisse und Diskussion	67
3.1.	Die 3D-Organisation von Bakteriellen Polysomen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	67
3.1.1.	Beobachtung von <i>in vitro</i> erzeugten Polysomen	67
3.1.2.	Stabile Polysomen-Naszente Ketten-Komplexe <i>in vitro</i>	69
3.1.3.	Trennung von Polysomen und Monosomen mit Gelfiltration	71
3.1.4.	Polysomen in Tomogrammen von vitrifiziertem Translationslysat	74

3.1.5.	Die Polysomentopologie ist unabhängig von ORF-Länge und -Sequenz	76
3.1.6.	Dichte Polysomen aus <i>E. coli</i> Spheroplasten.....	78
3.1.7.	Die räumliche Organisation von Polysomen aus <i>E. coli</i> Spheroplasten	83
3.1.8.	Bevorzugte Konfigurationen von polysomalen Ribosomen	85
3.1.9.	Nachbarribosomen in der gemittelten 3D Struktur klassifizierter Ribosomen..	91
3.1.10.	Modelle der 3D Organisation bakterieller Polysomen.....	94
3.1.11.	Modellierung von Konformeren naszenter Peptidketten in Polysomen.....	99
3.1.12.	Implikationen der polysomalen Organisation für die <i>de novo</i> Proteinfaltung	
	101	
3.2.	Konfigurationen eukaryotischer Polysomen in Säugerzellen	104
3.2.1.	Polysomen in menschlichen Zelllinien	104
3.2.2.	Die zytosolische Peripherie menschlicher Glioblastomzellen in Tomogrammen	
	106	
3.2.3.	Die Lokalisation einzelner Ribosomen in zellulären Tomogrammen	108
3.2.4.	Strukturaufklärung <i>in situ</i>	111
3.2.5.	Zusätzliche Dichte am ribosomalen Peptidunnel <i>in situ</i>	114
3.2.6.	Bevorzugte Konfigurationen benachbarter Ribosomen in humanen Zellen....	117
3.2.7.	Hierarchisches Clustering von Distanzen und relativen Winkeln	119
3.2.8.	Klassifizierung aktiver Ribosomen anhand der Nachbarkonfiguration.....	123
3.2.9.	Modelle der 3D Organisation eukaryotischer Polysomen	126
3.2.10.	Strukturen von Polyribosomen <i>in vivo</i>	129
3.2.11.	Beobachtung von <i>stress granules in situ</i> ?	130
4.	Zusammenfassung und Ausblick	133
4.1.	Konservierte Mechanismen polysomaler Organisation ?.....	133
4.2.	Makromolekulare Netzwerke in der Zelle	135

5.	Anhang	138
5.1.	Verwendete Abkürzungen.....	138
5.2.	Literaturverzeichnis.....	139
6.	Danksagung.....	148

Overview

Recent structural studies provided detailed mechanistic insights of the ribosome in its different functional states and its interplay with ribosome-bound complexes involved in nascent peptide folding, processing or targeting. However, it is largely unknown how the translational machinery is spatially arranged in the context of translating polysomes. Here, cryo electron tomography and a template matching approach were employed to map 70S ribosomes in vitrified bacterial translation extracts and in lysates of active *Escherichia coli* spheroplasts. In these preparations, polysomal arrangements were observed in which neighboring ribosomes are densely packed and exhibit preferred orientations. The analysis of characteristic examples of polysomes reveals a staggered or pseudo-helical organization of ribosomes along the mRNA trace, with the transcript being sequestered on the inside, the tRNA entrance sites being accessible and the polypeptide exit sites facing the cytosol. Modeling of elongating nascent polypeptide chains suggests that this arrangement maximizes the distance between nascent chains on adjacent ribosomes, thereby reducing the probability of intermolecular interactions that would give rise to aggregation and limit productive folding. In a continuing study, we mapped individual ribosomes in electron-tomographic reconstructions of the periphery of intact human cells by template matching. The average structure of the human ribosome was determined at intermediate resolution. Interestingly, the relative spatial configuration of adjacent ribosomes in a cellular environment is also clearly non-random and preferred configurations are characteristic for polysomes. These configurations are comparable to those of bacterial polysomes and might hint to a conserved mechanism of self-organization to prevent nascent-chain interactions between adjacent ribosomes.

This work should represent a further step towards the broader aim to comprehensively analyze the spatial distribution of macromolecules and the related biological significance within a close-to-native or even cellular context.

Überblick

Strukturelle Untersuchungen des bakteriellen Ribosoms haben zu weitgehenden molekularen Einblicken in die molekularen Mechanismen der Proteinsynthese geführt. In dieser Arbeit wird diese atomare Strukturinformation in den übergeordneten Kontext aktiv translatierender Polyribosomen (Polysomen) einzufügen: Anhand Kryoelektronentomographie wird die dreidimensionale Elektronendichtekarte von *in vitro* generierten und *ex vivo* präparierten bakteriellen Polysomen erzeugt und eine Referenzstruktur des 70S Ribosoms mit einem Mustererkennungsalgorithmus eingepasst. Wir gewinnen so die Topologie nativer Polysomen und können Aussagen über die relative Konfiguration zwischen Nachbarribosomen treffen. Es zeigt sich, dass die 30S Untereinheiten bevorzugt eng beieinander zu liegen kommen können, wohingegen die 50S Untereinheiten bevorzugt „nach außen“ zur zytosolischen Seite orientiert sind. So sind die Peptidausgänge der einzelnen Ribosomen zumeist so positioniert, dass die räumliche Nähe eines benachbarten Ribosoms minimiert wird. Dies könnte auf einen evolutionär konservierten Mechanismus der Translationsmaschinerie hindeuten, der Interaktionen zwischen naszierenden Peptiden minimieren hilft.

In einem weiterführenden Teil dieser Arbeit wird das periphere Zytoplasma einer humanen Zelle per Elektronentomographie und *template matching* untersucht. Zunächst lässt sich zeigen, dass sich per Mittelung der Subtomogramme von Ribosomen *in situ* strukturelle Charakteristika bei einer Auflösung von < 4 nm erkennen lassen. Zudem konnte eine spezifische Konfiguration benachbarter Ribosomen in der Zelle gefunden werden, die sich mit bakteriellen Polysomen vergleichen lässt.

Diese Arbeit stellt einen weiteren Schritt dar, 3D Dichtekarten großer Komplexe in zellulärer oder quasi-zellulärer Umgebung heterogener Proben zu rekonstruieren, um aus der Analyse der supramolekularen, relativen Verteilung Rückschlüsse auf die zugrundeliegende biologische Funktion ziehen zu können und um die räumliche Organisation der nativen Zelle in ihrer Gesamtheit zu verstehen.

1. Einleitung

1.1. Proteinsynthese und –faltung in der Zelle

Das Ribosom ist die molekulare Maschine zur Synthese der Proteine einer Zelle. In Bakterien werden die Transkripte (mRNA) aller Gene, in Eukaryoten aller im Nukleus kodierten Gene von den hochkonservierten, zytosolischen Ribosomen unter der Mitwirkung dutzender *transfer RNAs* (tRNA) und Co-Faktoren translatiert. Schon in den 1950er und 1960er Jahren wurde die zentrale Rolle der Ribosomen als Polymerasen in der Peptidsynthese erkannt. Fast zur selben Zeit wurde festgestellt, dass die *messenger RNA* (mRNA) zumeist nicht von einzelnen Ribosomen, sondern von vielen Ribosomen, sogenannten Polysomen gleichzeitig abgelesen wird (Kapitel 1.2). Schon damals wurden die Fragen erhoben, ob Polysomen eine geordnete Struktur einnehmen und wie die mRNA und die naszenten Peptide darin organisiert seien. Allerdings waren strukturelle Hypothesen diesbezüglich immer begrenzt durch die konventionellen elektronenmikroskopischen Techniken, welche die exakte räumliche Struktur von nativen Polysomen und den darin arrangierten Ribosomen nicht wiedergeben konnten. Zudem erschien schon die Struktur und der Mechanismus eines einzelnen Ribosoms für lange Zeit zu komplex, um annähernd atomar beschrieben werden zu können.

Erst seit Mitte der 1990er Jahre beantworten neue, strukturelle Einblicke elementare Fragen nach Zusammensetzung, Architektur und katalytischen Mechanismen des Ribosoms (Kapitel 1.3) (Nierhaus and Wilson 2004; Moore 2009). Zudem sind detaillierte Kenntnisse über den Verlauf der mRNA durch ein Ribosom (Kapitel 1.4), den Mechanismus der Elongation (Kapitel 1.5), sowie der Weg des naszenten Peptids (Kapitel 1.6) und dessen cotranslationale Faltung (Kapitel 1.7) erst seit knapp einem Jahrzehnt verfügbar. Insbesondere der Faltungsweg des naszenten Polypeptids ist von großem zellbiologischen und

biotechnologischen Interesse, da bei dessen sequentieller Synthese verhindert werden muss, dass aufgrund der unvollständigen Primärsequenz fehlgefaltete Intermediate akkumulieren, was auf die Zelle unter Umständen toxisch wirken kann (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Verschiedene molekulare Chaperonsysteme agieren während und nach der Translation zur Vermeidung lokaler Energieminima im Faltungsweg und zur Entfaltung kinetisch gefangener Konformere des entstehenden Polypeptids (Kapitel 1.8). Funktionell homologe Chaperone wurden auch in eukaryotischen Zellen beschrieben (Kapitel 1.9). Im Zusammenhang mit der *de novo* Proteinfaltung ist es von entscheidender Bedeutung, dass Polysomen in der Zelle eine hohe lokale Konzentration von unvollständig synthetisierten und ungefalteten Peptidketten aufweisen, weshalb in der Literatur immer wieder die Frage erhoben wurde, ob dies einen maßgeblichen Einfluss auf die Faltung naszenter Peptide haben kann (Hartl and Hayer-Hartl 2002).

Um einen Einblick in die native Struktur und supramolekulare Organisation von translatierenden Ribosomen und deren Peptidausgängen zu gewinnen, kann die Kryoelektronenmikroskopie (KryoEM, Kapitel 1.10), im Speziellen die Kryoelektronentomographie (KryoET, Kapitel 1.10.4), die Limitierungen der konventionellen Elektronenmikroskopie vermeiden. Die Strukturaufklärung nativer Polysomen mit KryoET und einem 3D-Mustererkennungsalgorithmus (Kapitel 1.10.5) ist daher die Zielsetzung dieser Arbeit und wird im Hauptteil dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 3.1 und 3.2).

1.2. Translation in Polyribosomen

Im Weiteren soll auch die eigentliche, zelluläre Umgebung für die Faltung aller zytosolischen Proteine näher untersucht werden: Es ist offensichtlich, dass die Translation und Faltung naszenter Ketten an Ribosomen in Zellen nicht dem Bild eines einzelnen Ribosoms in nahezu

wässriger Lösung entsprechen kann, sondern in einem Medium mit extrem hoher Proteindichte von 200-400 mg/ml und entsprechend geringem Volumenanteil von H₂O erfolgt. Dieser Zustand wird als *molecular crowding* bezeichnet (Ellis 2001; Minton 2005).

Wie schon in der frühen Phase der molekularbiologischen Untersuchung prokaryontischer und eukaryotischer Zellen beobachtet wurde, findet die Translation darüberhinaus nicht an einzelnen (Mono-) Ribosomen statt, sondern nach wiederholter Initiation auf derselben mRNA können mehrere Ribosomen ein Transkript gleichzeitig ablesen (Rich 1963; Warner, Knopf et al. 1963). Zunächst wurden solche Polyribosomen, oder Polysomen durch Zentrifugation auf Sucrosegradienten charakterisiert und wenig später in eukaryotischen oder prokaryontischen Lysaten mit konventioneller Transmissionselektronenmikroskopie Prof visualisiert (Warner, Rich et al. 1962; Slayter, Warner et al. 1963; Staehelin, Brinton et al. 1963; Wettstein, Staehelin et al. 1963; Slayter, Kiho et al. 1968).

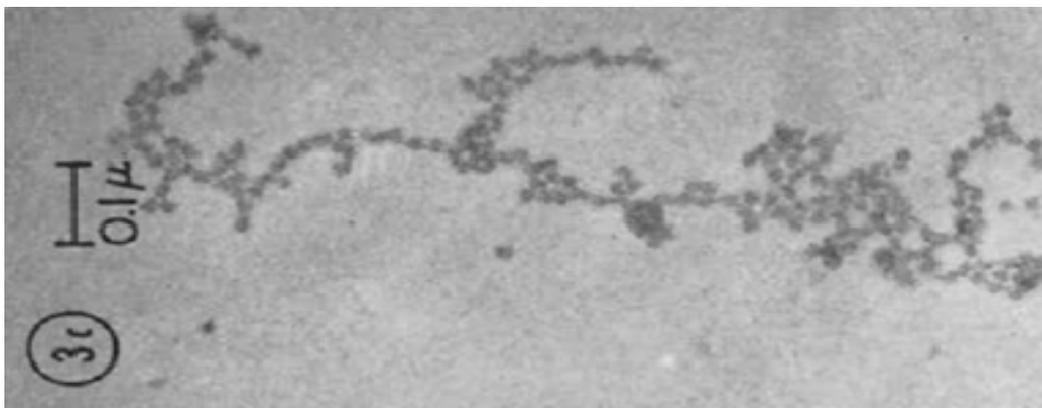


Abb. 1 Große bakterielle Polysomen (Positiv kontrastiert aus (Slayter, Kiho et al. 1968)). Gezeigt ist eine der ersten Aufnahmen von bakteriellen Polysomen. In diesen oder ähnlichen konventionellen TEM-Aufnahmen blieb die regelmäßige Anordnung der Ribosomen so wie die native Struktur letztlich unklar.

Die Vermutung liegt nahe, dass dicht gepackte, translatierende Polysomen die höchste zelluläre Konzentration an ungefalteten (nahezu identischen) Polypeptiden aufweisen und daher bei der *de novo* Faltung möglicherweise ungefaltete Konformere mit exponierten, hydrophoben Seitenketten benachbarter Peptide früh oder gar cotranslational aggregieren könnten (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Möglicherweise beeinflusst also die Polysomenorganisation eine mögliche intermolekulare Fehlfaltung der naszenten Peptide.

In den zumeist sehr heterogenen Gemischen von Polysomen waren, neben offenbar zufällig orientierten Ribosomen in linearen Ketten, auch wiederkehrende Muster von dichten Ribosomenarrangements zu erkennen (Wettstein, Staehelin et al. 1963). Es wurde spekuliert, ob ungebundene, aktive Polysomen im Zytosol generell unregelmäßige Abstandsverteilungen aufweisen, oder ob eine bevorzugte Topologie existiert, wie sie in eukaryotischen Polysomen auf rauem endoplasmatischem Reticulum (rER) beobachtet wurde (Walter, Gilmore et al. 1984). Heute ist klar, dass die Dichte von Polysomen und damit deren Arrangement maßgeblich vom Verhältnis der Translations-Initiation zur Elongation und Termination bestimmt wird, wobei unter logarithmischem Wachstum die Initiation als limitierender Faktor angenommen wird (Neidhardt 1987; Antoun, Pavlov et al. 2006). Dies würde andeuten, dass bei sättigenden Mengen von aa-tRNA die meisten Polysomen schneller elongieren als initiieren und es daher nicht zum Aufbau großer, dichter Polysomen kommt. Es ist allerdings erwiesen, dass Polysomen keine uniforme Dichteverteilung entlang der mRNA aufweisen (Ingolia, Ghaemmaghami et al. 2009), dass also die Elongationsrate diskontinuierlich ist (Buchan and Stansfield 2007). Also sollte immer zumindest ein gewisser Anteil aller Polysomen zumindest in Teilen der transkribierten mRNA dicht gepackt erscheinen und dabei auch eine reguläre Struktur einnehmen.

Tatsächlich war schon in Proben mit Schwermetallfärbung oder rotationaler Bedampfung erkennbar, dass in dichten *E. coli* Polysomen eine gewisse Anordnung, die als

„helikal“ bezeichnet wurde eingenommen wird (Kingsbury and Voelz 1969; Nauman, Silverman et al. 1971). Trotz einer gut approximierten Beschreibung dieser Strukturen in fixierten Plastikschnitten (Weiss and Grover 1968) war es mit damaliger Methodik aber nicht möglich, das tatsächliche dreidimensionale (3D) Abbild der biologischen Probe zu rekonstruieren: Zum einen war die 3D Rekonstruktion nach der Aufnahme einzelner Projektionen ohne automatisierte Datenakquisition und digitale Datenprozessierung stark erschwert oder unmöglich. Zum zweiten führt die Fixierung, Bedampfung oder Negativkontrastierung der Probe generell zu unkontrollierbaren Artefakten und zu einem Verlust der nativen Struktur, da bei konventioneller Methodik das Biomolekül selbst zerstört wird, und nur noch der Schwermetallabdruck Kontrast im EM erzeugt (Frank 2006). Zum dritten sind molekulare Details der Ribosomen erst seit ca. 10 Jahren bekannt. Somit war es in früheren Studien unmöglich, die Musterstruktur nativer Ribosomen in Polysomen zu erkennen oder einzupassen.

Im Folgenden wird der heutige Kenntnisstand über die native Form und Funktion des Ribosoms und assoziierter (Chaperon)-Komplexe zusammengefasst (Kapitel 1.3-1.9). Danach wird erläutert, wie sich diese Information in Verbindung mit der KryoET nutzen lässt, um die native polysomale Organisation 3D zu beschreiben (Kapitel 1.10.4 und 1.10.5).

1.3. Struktur und Funktion des bakteriellen Ribosoms

Bakterielle 70S Ribosomen setzen sich, benannt entsprechend ihren Sedimentationskoeffizienten (S), aus einer großen 50S und einer kleinen 30S Untereinheit zusammen, wobei ca. 2/3 des Ribosoms aus ribosomaler RNA besteht. Die 50S Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 1.5 MDa besteht aus einer kleinen 5S rRNA mit 120 Nukleotiden (nt) und einer großen 23S rRNA mit etwa 3000 nt, sowie 34 ribosomalen

Proteinen. Die 0.8 MDa schwere 30S Untereinheit besteht aus einer 16S rRNA (ca. 1500 nt) und 21 Proteinen (Steitz 2008). Es soll kurz angemerkt werden, dass archeale 70S Ribosomen und eukaryotische 80S Ribosomen in weiten Teilen ihrer rRNA- und Protein-Anteile zu den eubakteriellen Ribosomen homolog sind. Allerdings enthält die 2.8 MDa schwere eukaryotische 60S Untereinheit neben einer 5S rRNA (120 nt), eine 5.8S rRNA (160 nt), eine durch *expansion segments* vergrößerte 28S rRNA (4700 nt) und ca. 49 kanonische Proteine. Die (kleine) 40S Untereinheit besitzt in Eukaryoten eine Masse von 1.4 MDa und besteht aus einer 18S rRNA (1900 nt) und ca. 33 Proteinen (Doudna and Rath 2002). Die hochkonservierten Anteile des Ribosoms, also vor allem das katalytische Zentrum und der tRNA-Kanal scheinen auch strukturell sehr homolog zu sein (Lecompte, Ripp et al. 2002), allerdings ist das 80S Ribosom größer und dessen äußere Architektur weicht durchaus von der des bakteriellen 70S Ribosoms ab (Chandramouli, Topf et al. 2008).

Im Weiteren soll aber die wesentlich genauer bekannte Struktur und Funktion der bakteriellen bzw. archealen Ribosoms beschrieben werden. Dessen Architektur wurde durch Strukturaufklärung der isolierten Untereinheiten durch Röntgenkristallographie und Einzelpartikel-Kryoelektronenmikroskopie zum Teil bis zur atomaren Ebene beleuchtet, was letztlich auch den definitiven Beweis lieferte, dass das Ribosom ein Ribozym ist (Wimberly, Guymon et al. 1999; Ban, Nissen et al. 2000; Nissen, Hansen et al. 2000; Wimberly, Brodersen et al. 2000; Harms, Schluenzen et al. 2001). Wenig später wurden auch Einblicke in die Strukturen voll assemblierter bakterieller und archealer Ribosomen mit gebundener tRNA und mRNA gewonnen (Abb. 2), was das Verständnis des Elongationsmechanismus und des genauen Verlaufs der mRNA durch die 30S Untereinheit stark erweitert (Yusupov, Yusupova et al. 2001; Yusupova, Yusupov et al. 2001; Valle, Zavialov et al. 2003; Selmer, Dunham et al. 2006; Yusupova, Jenner et al. 2006).

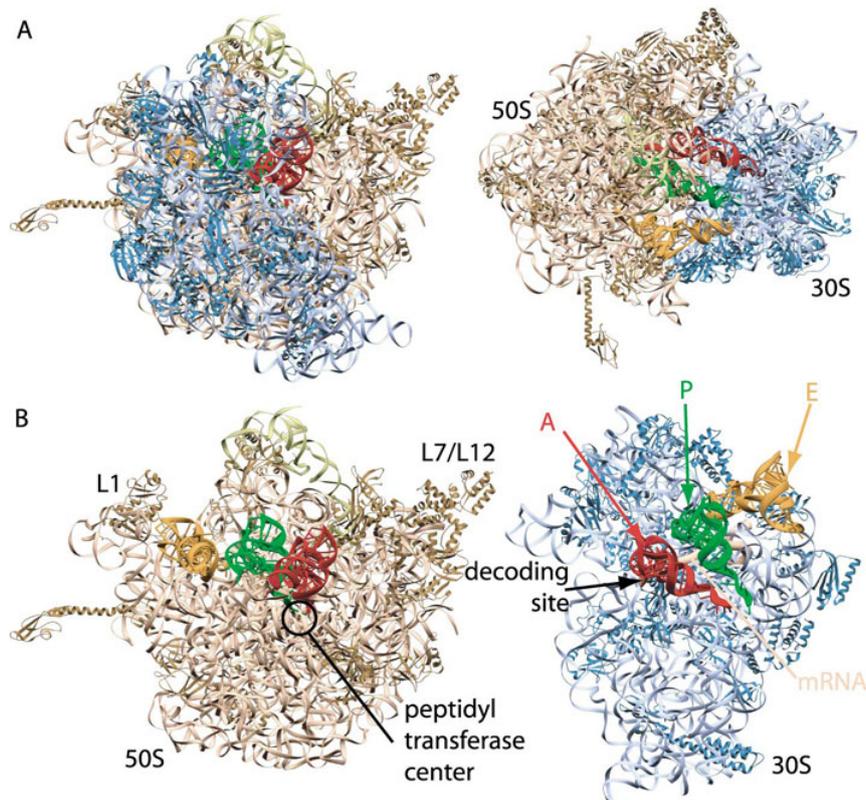


Abb. 2 tRNAs werden während der Dekodierung der mRNA zwischen drei Bindestellen translokiert (aus (Ramakrishnan 2002)). (A) Dargestellt ist das atomare Modell des voll assemblierten *T.th.* 70S Ribosoms im Komplex mit tRNAs und mRNA (Yusupov, Yusupova et al. 2001). Die 30S Untereinheit ist hier in blau, die 50S Untereinheit in rosa dargestellt, die tRNAs in den A (Aminoacyl-, rot), P (Peptidyl-, grün) und E (*Exit*, gelb) Bindestellen sind hervorgehoben. (B) Die 50S Untereinheit ist in *crown-view* und die 30S Untereinheit in Aufsicht mit gebundenen tRNAs dargestellt. Die CCA-Enden der A- und P-Stelle tRNAs werden am PTC in räumlicher Nähe koordiniert.

1.4. Der Weg der mRNA durch die 30S Untereinheit

Die Gruppe von Marat Yusupov konnte in mehreren Kristallstrukturen von *Thermus thermophilus* (*T.th.*) 70S Ribosomen zwischen 4-5.5 Å Auflösung kurze mRNA Stücke mit oder ohne Shine Dalgarno Sequenz (SD, 5'-AAGGAGGU-3'), mit oder ohne AUG-Startcodon und mit poly(U) oder poly(A) *open reading frames* (ORF) lokalisieren, wobei Ribosomen mit SD(A)₄AUG(A)₉ den Initiationskomplex und Ribosomen mit SD(U)₉UUU(U)₄ den Postinitiationszustand darstellen sollen (Yusupova, Jenner et al. 2006). Im ersten Fall bildet die SD-Sequenz mit der bekannten Komplementärsequenz (3'-

UUUCCUCCACUA-5') der 16S rRNA eine Duplex-Sekundärstruktur, die direkt außerhalb des mRNA-Ausgangs auf der 30S-Plattform zwischen den Proteinen S2 und S18 zu liegen kommt (Abb. 3). In der zitierten Arbeit wurden insgesamt 27 Nukleotidpositionen bestimmt, die den Weg der mRNA vom 5' Eingang bis zum 3' mRNA Ausgang der 30S Untereinheit beschreiben (Abb. 3). Dies ist für die aktuelle Arbeit relevant, da der genaue Weg der mRNA durch ein Polysom letztlich davon abhängen wird, welche räumlichen Beschränkungen die Ribosomenarchitektur auf die möglichen Konformationen der hochflexiblen mRNA (mit einer Persistenzlänge von nur ca. 7.9 Å (Vanzi, Takagi et al. 2005)) ausübt, und wie nahe sich die mRNA Ein- und Ausgänge von Ribosomen einander nähern können. Die Koordinaten der aufgelösten Nukleotide (ohne SD und 5' Erweiterungen) der *T.th.* 70S mRNA Komplexe wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um den Weg der mRNA innerhalb von Ribosomen und zwischen Nachbarn im Polyribosom zu modellieren (Kapitel 2.11.6 und 3.1.10).

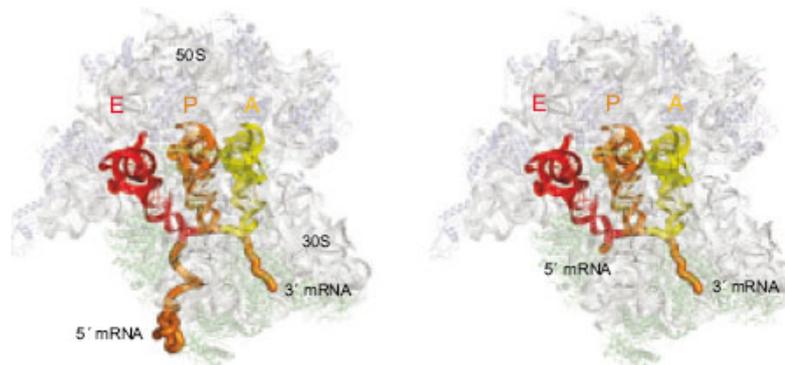


Abb. 3 Der Weg der mRNA durch die 30S Untereinheit (aus (Yusupova, Yusupov et al. 2001)). Dargestellt (in Aufsicht) ist das *T.th.* 70S Ribosom im Komplex mit A/P/E-Stelle tRNAs und einem Modell für die mRNA (orange). Im post-Initiationszustand (links) erscheint die 5' mRNA mit der SD Sequenz und einer Extension geordnet, während im Elongationszustand (rechts) Nukleotide upstream vom anti-Codon loop der E-Stelle tRNA flexibel erscheinen.

1.5. Mechanismen der Elongation und Peptidyltransferase

Da bei der Betrachtung von Polysomen vornehmlich Ribosomen während der Elongation vorliegen, werden die wichtigsten Elongationsmechanismen im Folgenden näher erläutert.

Nach der Translationsinitiation liegt eine Initiator (fMet)-tRNA in der P-Stelle zwischen den Untereinheiten gebunden vor und die A-Stelle ist unbesetzt. Nun wird die nächste Aminoacyl-tRNA im ternären Komplex mit dem Elongationsfaktor EF-TuGTP zur A-Stelle rekrutiert, wobei bei korrekter Codon/Anti-Codon-Basenpaarung die GTPase von EF-Tu aktiviert wird. Die GTP-Hydrolyse induziert die Dissoziation von EF-Tu vom Aminoacyl-Ende der tRNA, woraufhin sich dieses in Richtung des aktiven Zentrums und der dort residierenden P-tRNA dreht (Ramakrishnan 2002).

Durch die atomare Aufklärung der Strukturen verschiedener archealer und bakterieller Ribosomen, wie des *H. marismortui* 50S (Hm50S) (Nissen, Hansen et al. 2000), des *D. radiodurans* 50S (Harms, Schlutzen et al. 2001; Bashan, Agmon et al. 2003), des *T. thermophilus* 70S Partikels (Th70S) (Yusupov, Yusupova et al. 2001) und letztlich des *E. coli* 70S Ribosoms (Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005) ist Aufbau und Funktion des aktiven Zentrums umfassend beschrieben: Bei der Aminoacyltransferase-Reaktion im Peptidyl-Transferase-Zentrum (PTC) wird die Ester-Bindung der P-tRNA durch den nukleophilen Angriff der freien NH₂-Gruppe der A-tRNA auf deren Carbonylgruppe in einer spontanen Reaktion hydrolysiert. Das in dieser Arbeit verwendete Antibiotikum Puromycin (Prm) konkurriert mit dieser Reaktion, in dem es strukturell das 3'-Ende einer Tyrosyl-tRNA imitiert und dadurch als Peptidyl-Akzeptor im aktiven Zentrum wirken kann. Prm bewirkt damit einen Abbruch der Elongation und eine Dissoziation der unvollständigen Peptidkette sowie translatierender Polysomen (siehe auch Abb. 21, Abb. 38).

Die Erzeugung und Stabilisierung des beim Peptidyltransfer entstehenden tetraedrischen Oxyanion-Intermediats kann mit der Struktur von stabil gebundenen Intermediats-Analoga

(z.B. Derivate von Prm) nachempfunden werden, wie mit Hm50S Untereinheiten detailliert untersucht (Steitz 2008). Die erste Vermutung, dass die Nukleotide A2451 und G2447 (in *E. coli*) der 23S rRNA die Deprotonierung und des freien N-Endes der A-tRNA und damit dessen Angriff auf das peptidyl-C katalysieren (Nissen et al., 2000), wurde nicht bestätigt. Wie in Abb. 4 dargestellt, wird stattdessen nun davon ausgegangen, dass die 2'-OH-Gruppe des 3'-terminalen Adenosinrests (A76) der P-tRNA selbst katalytisch aktiv ist (Weinger, Parnell et al. 2004; Schmeing, Huang et al. 2005). Ein *substrate induced fit*-Mechanismus sorgt dafür, dass H₂O aus dem aktiven Zentrum ferngehalten wird, und die Peptidyl-Esterbindung nur bei korrekter Positionierung des A-tRNA Aminoterminus nukleophil attackiert werden kann (Schmeing, Huang et al. 2005). Die Reste A2451 und G2447 sind allerdings bei der Bindung des Elongationsinhibitors Chloramphenicol (Cam) beteiligt (Thompson, Kim et al. 2001), der ebenfalls in dieser Arbeit verwendet wird. Cam blockiert, ebenso wie Cycloheximid (CHX) in eukaryotischen Ribosomen, die Translokation der tRNA und arretiert somit elongierende Ribosomen bzw. Polysomen (siehe 1.2).

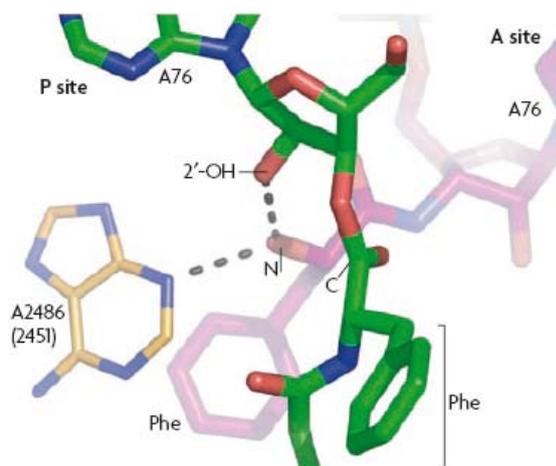


Abb. 4 Katalyse der Peptidyltransferase. Im Komplex von Hm50S und einem Substratanalogon bildet die freie NH₂-Gruppe (N) H-Brücken zu (*E. coli*) A2451 und der 2'-OH Gruppe von A76 der P-tRNA und wird so im aktiven Zentrum unter Ausschluss von H₂O positioniert. Nur die Mutation des tRNA A76, nicht jedoch von 23S rRNA A2451, weist eine drastisch niedrigere Transferase-Aktivität auf, weshalb A76-2'OH wohl einen Großteil der katalytischen Aktivität inne hat (aus (Steitz 2008)).

Nach der Peptidyltransferasereaktion wird die deacylierte tRNA unter Wirkung von EF-G, einer weiteren GTPase von der P-Stelle auf die E-Stelle, und die neue peptidyl-tRNA von der

A- auf die P-Stelle transloziert, so dass das Ribosom für einen weiteren Elongationszyklus bereit ist (Ramakrishnan 2002). Detaillierte strukturelle Modelle von Ribosomen mit tRNA in A/P, bzw. P/E Hybridzuständen beschreiben eine ratschenartige Konformationsänderung der Untereinheiten gegeneinander, bei der die tRNAs über einen zweistufigen Prozess spontan oder unter Katalyse von EF-G transloziert werden (Agrawal, Spahn et al. 2000; Frank and Agrawal 2000). Weitere Studien zeigen, dass die mRNA um drei Nukleotide weiter durch die *codon recognition site* verschoben wird, und die Kopffregion der 30S Untereinheit dieser Bewegung mit einer Rotation folgt. Gleichzeitig bewegt sich der L1-Arm um 20 Å in Richtung der E-Stelle und unterstützt dabei die Translokation der P-tRNA über den P/E Hybridzustand in die E-Stelle, aber erst nachdem die Peptidylkette auf die A-tRNA übertragen wurde (Valle, Zavialov et al. 2003; Yusupova, Jenner et al. 2006).

1.6. Translokation des naszenten Peptids

Unmittelbar oberhalb des aktiven Zentrums des Ribosoms beginnt ein größtenteils durch die Domänen I-V der 23S rRNA gebildeter Tunnel, der sich über 80-100 Å durch die 50S Untereinheit zieht, wo er am Peptidausgang die (zytosolische) Oberfläche erreicht, die von den Proteinen L19, L22, L23, L24, L29, and L31e umringt ist (Nissen, Hansen et al. 2000; Steitz 2008). Der Durchmesser des Tunnels beträgt an der weitesten Stelle (ungefähr auf halbem Wege) 20 Å. Durchschnittlich beträgt der Durchmesser 15 Å, die mit ca. 10 Å Durchmesser engste Stelle des Peptidkanals befindet sich an einem „Doppel-Knick“, 20-35 Å vom PTC entfernt zwischen den nicht-globulären, tief im Ribosom eingebetteten Teilen der Proteine L4 und L22, welche Resistenzmutationen gegen Makrolid-Antibiotika wie Erythromycin vermitteln können (Ban, Nissen et al. 2000; Tu, Blaha et al. 2005). Es wurde spekuliert, ob diese „Knickstelle“ eine regulierende Funktion auf die Translations oder

Translokationsgeschwindigkeit der Peptidsynthese hat, indem ein β -hairpin von L22 als „Sensor“ für das naszente Peptid dient (Nissen, Hansen et al. 2000; Mitra, Schaffitzel et al. 2006). Tatsächlich scheinen physiologisch relevante Arretierungsmechanismen der Elongation an dieser engsten Stelle zu wirken: Das SecM-Protein ist ein 170 aa ORF im SecMA-Operon, das die Translation des *downstream* liegenden SecA reguliert (Oliver, Norman et al. 1998). Entscheidend hierfür ist die korrekte Positionierung der 17 aa langen SecM sog. *stalling* Sequenz $^{150}\text{FxxxxWlxxxxGIRAGP}^{166}$ im Peptidkanal. Der W155-Rest kommt in einer kompaktierten *stalling* Sequenz an der engsten „Knickstelle“ des Tunnels zu liegen und vermittelt ebenfalls eine negative Rückkopplung zum PTC (Nakatogawa and Ito 2002). Reste des Proteins L22 und der 23S rRNA kommen als Interaktionsstellen mit dem SecM-Peptid in Betracht (Ban, Nissen et al. 2000). Der C-terminale Prolyl-Rest wird nicht auf die P-tRNA übertragen, scheint aber für die Stabilisierung der arretierten A-tRNA im PTC verantwortlich zu sein. SecM-vermitteltes *stalling* von Konstrukten *in vivo* kommt in Abschnitt 3.1.6 zur Anwendung.

Andere *stalling* Sequenzen wie z.B. im Tryptophanase *leader* Peptid, TnaC, scheinen ebenfalls an der engsten Stelle bei L22 mit der Tunnelinnenwand zu interagieren, jedoch unterscheidet sich bei TnaC der eigentliche Mechanismus zur PTC-Hemmung vom SecM-Peptid (Gollnick and Yanofsky 1990).

Eine weitere Möglichkeit, arretierte naszente Ketten gewünschter Länge zu erzeugen, besteht in der Translation trunkierter mRNA ohne Stop-Codon, was ebenfalls in *stalling* resultiert, indem schlicht keine neue A-tRNA binden kann. Ein solcher mRNA-Abbruch führt *in vivo* immer zur Aktivierung eines „Rettungsmechanismus“, wobei durch die Bindung und Wirkung der sog. tmRNA das Ribosom und die Peptidkette vom Transkript freigesetzt werden. Die tmRNA ist ein t-RNA-artiges Molekül, das selbst einen kurzen ORF ([A]ANDENYALAA-COOH) zur trans-Translation des naszenten Peptids kodiert, welches

dadurch zum Abbau durch das SsrA-System markiert wird (Moore and Sauer 2007). *In vitro* jedoch kann die tmRNA jedoch durch Bindung eines komplementären Oligonukleotids inaktiviert und Ribosomen-Nasente-Ketten Komplexe stabilisiert werden (Schaffitzel and Ban 2007), wie dies auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde (siehe 2.6.5 und 3.1.1). Sehr gut eignet sich trunkierte mRNA auch zum *stalling* von Ribosomen in einem hochreinen Translationssystem, in dem weder tmRNA noch SsrA-System aktiv sind (Matsuura, Yanagida et al. 2007).

1.7. Faltung des naszenten Peptids

Jenseits der Knickstelle bei Protein L22 / L4 eröffnet sich der Peptidkanal auf bis zu 20 Å, bevor er sich kurz vor Austritt ins Zytosol wieder verjüngt. Es wurde spekuliert, ob der Peptidtunnel in dieser Region einen direkten oder indirekten Einfluss auf den Faltungszustand des naszenten Peptids hat. Angesichts der strukturellen Rigidität und Hydrophilie des größtenteils mit RNA-Resten ausgekleideten Peptidkanals (Nissen, Hansen et al. 2000; Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005), ist davon auszugehen, dass dessen Innenwand für das naszente Peptid inert ist (Kapitel 1.8). Allerdings könnte ein lokal stark variierendes elektrostatisches Potential sowie die sterische Konstriktion einen indirekten Einfluss des Ribosoms auf die Faltung des Peptids darstellen (Lu, Kobertz et al. 2007): Die räumliche Eingrenzung durch den Kanal erlaubt zwar die Ausbildung simpler Sekundärstrukturelemente wie α -Helices, jedoch können keine β -Faltblätter oder gar ganze Domänen darin Platz finden (Etchells and Hartl 2004; Woolhead, McCormick et al. 2004; Johnson 2005; Kosolapov and Deutsch 2009). Abhängig vom Modellpeptid wurde beobachtet, dass ca. 30-40 Aminosäurereste den Peptidkanal durchspannen können und

längere Ketten ausschließlich außerhalb des Ribosoms Platz zur Faltung finden können (Abb. 5).

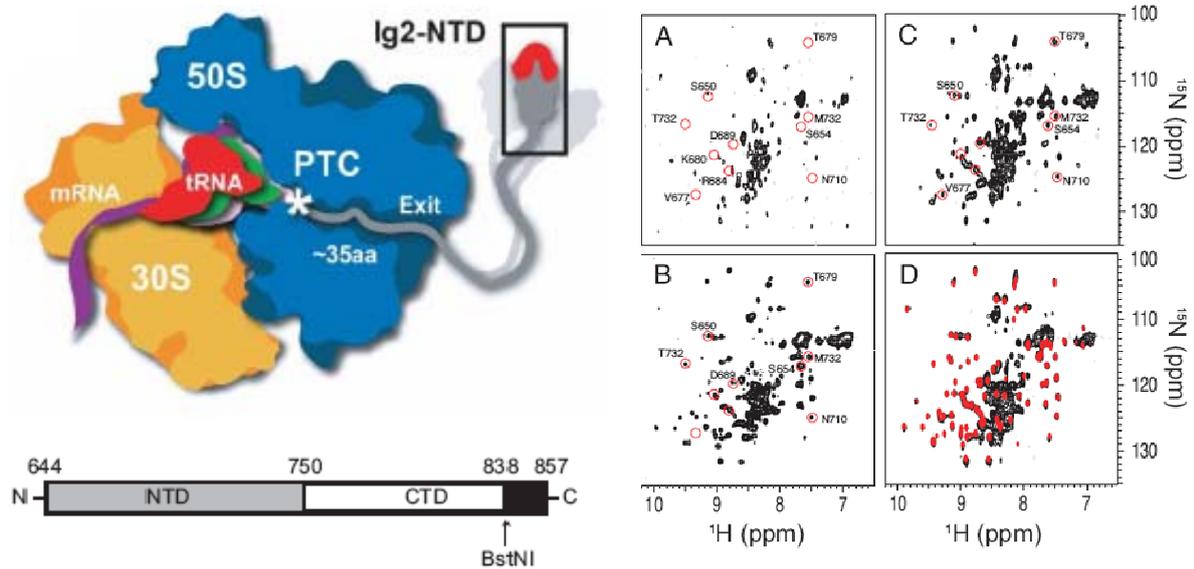


Abb. 5 Vollständige Domänen finden nur außerhalb des Ribosoms Platz zur Faltung (aus (Hsu, Fucini et al. 2007)). Wie links schematisch dargestellt, liegen ca. 30-40 aa C-terminale Reste im Peptikanal in nicht-nativer (z.B. extendierter Form) vor, während eine N-terminale Faltungseinheit (hier eine Ig-Domäne) außerhalb des Ribosoms falten kann, wie mit korrelativer Kernspinresonanz gezeigt:

(A-D) ^1H - ^{15}N (SOFAST-HMQC) Korrelationsspektren von Ig2-Tandemkonstrukten als Ig2-RNCs (A), als Gemisch von Ig2 mit isolierten 70S Ribosomen (B), als Ig2-RNCs die mit 1 mM / 1h Prm behandelt wurden (C), oder als isolierte Ig2 (schwarz) oder Ig2 NTD (rot) ohne Ribosomen (D).

Proteine, die ins (bakterielle) Periplasma, bzw. ins (eukaryotische) ER transloziert werden, tragen eine Translokationssequenz am N-terminus und werden gar nicht zytosolisch gefaltet, sondern werden vom *signal recognition particle* (SRP) sequestriert. Das translatierende Ribosom wird dann im SRP-arretiertem Zustand den Translokationsmaschinen SecYEG (in Bakterien) bzw. Sec61 (in Eukaryoten) zugeführt. Die genauen Mechanismen und Strukturen der SRP-vermittelten Elongationsinhibition sowie der Translokation werden aktuell ebenfalls intensiv erforscht. Diesbezüglich wird an dieser Stelle auf einschlägige Reviews verwiesen (Wild, Halic et al. 2004; Egea, Stroud et al. 2005; Halic and Beckmann 2005).

1.8. Bakterielle Chaperone können naszente Peptide binden

Ein Hauptaugenmerk bei der strukturellen und funktionalen Erforschung des Ribosoms liegt auf der Lokalisierung und Beschreibung aller an der Synthese, der Faltung, der Modifikation, des *Targeting* und der Translokation des Polypeptids beteiligter Komponenten und Komplexe. Der Fokus soll hier auf Komplexe gerichtet werden, die die cotranslationale Faltung unterstützen. Diese Funktion vermitteln mehr oder minder spezialisierte molekulare Chaperone, die entweder in der Nähe des Peptidtunnelausgangs an das Ribosom oder direkt an die naszente Peptidkette binden (Abb. 6). Da einige Chaperone auch als zelluläre Antwort auf Hitzeschockbedingungen exprimiert werden, werden diese Vertreter historisch bedingt als *heat shock proteins* (Hsp) bezeichnet. Chaperone können die Faltung komplexer oder Multi-Domänen-Proteine prinzipiell unterstützen, indem hydrophobe Bereiche oder unstrukturierte Teile des Peptidrückgrats zunächst gebunden werden. Häufig, aber nicht immer, wird dabei zyklisch ATP hydrolysiert und das entstehende ADP (z.B. mit Hilfe eines *nucleotide exchange factors*, NEF) gegen ein neues ATP ausgetauscht, woraufhin gebundene Peptide wieder dissoziieren. Dieser grundlegende Prozess verschafft dem ungefalteten Peptid Zeit, die thermodynamisch günstigste bzw. native Struktur einzunehmen, um nicht in kinetisch blockierten, lokalen Energieminima von nicht-nativen Faltungsintermediaten zu verharren oder gar irreversibel zu aggregieren.

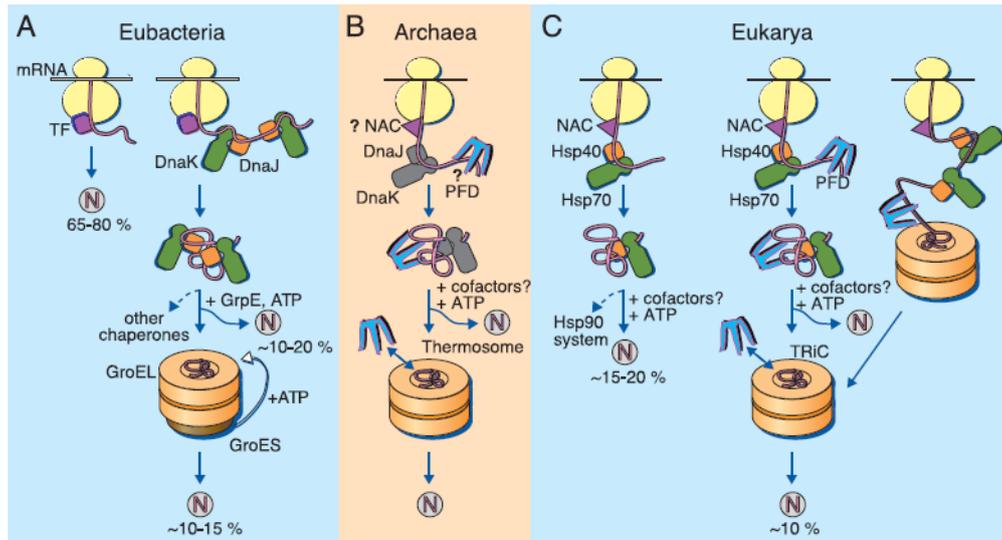


Abb. 6 Faltungswege neu synthetisierter Protein im Vergleich (aus (Hartl and Hayer-Hartl 2002)). (A) In Bakterien werden hydrophobe Bereiche in naszenten Peptiden vom ribosomen-assoziierten TF vom Zytoplasma abgeschildert. Nach weiterer Bindung von DnaJ, DnaK und GrpE können nicht unvollständig gefaltete Proteine an posttranslationale Chaperone und Chaperonine wie das GroEL/ES-System weitergereicht werden. (B) In Archaeen und (C) Eukaryoten könnte NAC ein funktionelles Homolog zu TF darstellen. In beiden Fällen können wiederum Hsp40 und Hsp70 Moleküle mit der naszenten Kette im Zytoplasma assoziieren. Die Chaperonine Thermosome (in Archaeen), bzw. TriC/CCT (in Eukaryoten) können mit Hilfe von Prefoldin (PFD) beladen werden. TriC/CCT kann dabei auch co-translational wirken, z.B. im Falle der Aktin-Faltung.

Im Falle der *de novo* Faltung im bakteriellen System sind drei Chaperonsysteme entscheidend für die Faltung aller nicht autonom faltender Proteinprodukte:

- Trigger Factor (TF) interagiert transient mit 65-80% aller neu entstehenden Proteinen (Abb. 6 A). TF ist ein 48 kDa großes, ATP-unabhängiges Chaperon mit einer N-terminalen Ribosomen-bindenden Domäne, einer mittleren Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase)-Domäne und einer C-terminalen Domäne mit zwei „Arm-Strukturen“, die *in vitro* die Chaperon-Aktivität vermittelt (Merz, Hoffmann et al. 2006). In einem heterologen Komplex aus Hm50S und *E. coli* TF, wurde die Bindestelle (F44, R45, K46) identifiziert, die den direkten Kontakt zu E18 des ribosomalen Proteins L23 aufnimmt (Kramer, Rauch et al. 2002). Damit ist TF bisher das einzig bekannte bakterielle Chaperon, dass direkt (auch ohne naszente Kette) am

Ribosom binden kann (Abb. 7 A). In positionsspezifischen *crosslinking*-Experimenten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass naszente Ketten ab einer Mindestlänge von ca. 60 Aminosäuren v.a. mit dem Arm 2 der C-terminalen Domäne von TF, lange Ketten mit größeren hydrophoben Abschnitten aber auch mit Teilen der N-terminalen und der PPIase-Domäne von TF zumindest transient interagieren (Lakshmipathy, Tomic et al. 2007). Gebundene Bereiche des naszenten Modellpeptids Luciferase sind dabei, im Gegensatz zu hydrophilen oder nativ entfalteten Peptiden wie α -Synuclein (α Syn), vor Verdau durch Proteinase K geschützt (Tomic, Johnson et al. 2006). Es zeigt sich zudem, dass sich die Bindung von TF an aktiv translatierende Ribosomen durch die Interaktion mit einem hydrophoben Substrat deutlich verstärkt (Kaiser, Chang et al. 2006; Raine, Lovmar et al. 2006). TF zeigt dabei eine beträchtliche Konformationsänderung (Abb. 7 B) was nahelegt, dass die unbekannte Struktur der gebundenen (Volllänge-) Form möglicherweise signifikant von der bekannten im Kristall des TF-Dimers abweicht (Kaiser, Chang et al. 2006). Der Komplex von Ribosomen mit TF ist strukturell bisher nur mit dessen N-terminalen Domäne atomar aufgelöst (Ferbitz, Maier et al. 2004). Der Komplex mit naszenter Kette und Vollängen-TF wurde mit Einzelpartikel-Analyse bis zu mittlerer Auflösung bestimmt, wobei allerdings keine direkte Aussage auf verschiedene konformationelle Subzustände während der Substratbindung möglich ist (Merz, Boehringer et al. 2008).

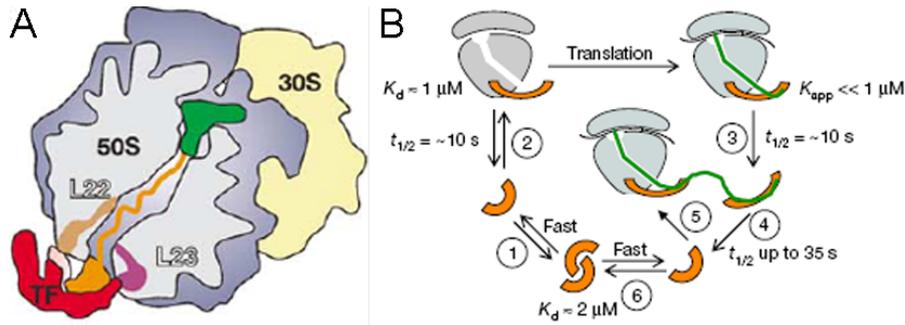


Abb. 7 Strukturelle und kinetische Modelle für die TF / Ribosomen-Nascente-Ketten Interaktion. (A) Basierend auf einer Kristallstruktur mit der NTD von *E. coli* TF und Hm50S und einer KryoEM-Struktur mit kovalent verbundener naszenter Kette wurde ein Modell für die TF-Bindung vorgeschlagen (Ferbitz, Maier et al. 2004). (B) Ein kinetisches Modell legt eine Konformationsänderung bei Bindung von einem oder mehreren TF-Molekülen nahe (Kaiser, Chang et al. 2006).

- Das Hsp70-Chaperon DnaK bindet ATP-abhängig und mit Hilfe seines (Hsp40) Co-Chaperon DnaJ (J) ebenfalls an hydrophobe Peptide, die von basischen Resten flankiert sind (Rudiger, Buchberger et al. 1997). Damit überlappt DnaK in seiner Substratspezifität partiell mit TF, wobei DnaK/J nicht direkt an das Ribosom bindet. Mit dem Nukleotidaustauschfaktor GrpE bilden DnaK/J das sogenannte KJE-System, das ca. 10-20% aller neuen Peptide faltet (siehe Abb. 6 A), aber nicht dezidiert auf die co-translationalen Faltung spezialisiert ist. Nur Peptidketten, die größer als ca. 30 kDa sind, werden von KJE auch co-translational gebunden (Teter, Houry et al. 1999). In der universellen Funktion der *de novo* Faltung überlappen TF und KJE dennoch; in *E.coli* TF-Deletionsmutanten (Δtig) wurde beobachtet, dass das KJE-System substantiell mehr naszente Proteine prozessiert, d.h. die Funktion von TF mindestens teilweise komplementieren kann (Teter, Houry et al. 1999). Erst die Doppelmutante $\Delta tig \Delta dnaK$ zeigt oberhalb der permissiven Temperatur von 30°C massive Defekte in der Faltung löslicher Proteine und wirkt lethal auf die Zelle (Deuerling, Schulze-Specking et al. 1999; Teter, Houry et al. 1999). Interessant ist, dass die Kooperation von TF und KJE bei der *de novo* Faltung von Multidomänen-Proteinen wie Luciferase

zu einer erhöhten Effizienz, aber zu einer niedrigeren Faltungsrate führt (Agashe, Guha et al. 2004). Diese Beobachtung deckt sich mit der Erwartung, dass die Chaperonfunktion dieser Systeme hauptsächlich auf der Verzögerung des Faltungswegs, der gleichzeitigen Abschirmung hydrophober Bereiche und damit der Vermeidung kinetisch gefangener Faltungsintermediate beruht. Bis zu 80% des zytosolischen *E. coli* Proteoms falten unter Normalbedingungen entweder autonom posttranslational oder cotranslational nach Interaktion mit TF. Mindestens 10% der zytosolischen Proteine erreichen mit Hilfe von DnaKJE ihren nativen Zustand. Darüberhinaus sind in Bakterien bisher keine weiteren, universellen Chaperone bekannt, die dezidiert cotranslational an das naszente Peptid binden.

- Ungefähr 10% aller neu synthetisierten Proteine interagieren posttranslational mit dem Chaperonin GroEL/ES, wobei das KJE-System der Stabilisierung und Anlieferung ungefalteter Peptide dient (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Absolut obligatorisch scheint die Interaktion mit dem Chaperonin während der *de novo* Faltung jedoch nur für weniger als 100 *E. coli* Proteine zu sein, wobei darunter vermehrt Vertreter mit komplexen Faltungsmotiven wie dem TIM (Triosephosphat-Isomerase) *barrel* auftreten (Kerner, Naylor et al. 2005).

Das Chaperonin GroEL gehört zu einer konservierten Klasse großer homo- oder oligomultimerer Komplexe, die eine Doppelringstruktur mit Substratbindestellen in einer inneren Kavität aufweisen. In Eubakterien finden sich mit dem Hsp60 Protein GroEL und dessen Co-Faktor GroES ausschließlich Chaperonine des Typs I, während Chaperonine des Typs II in Archaeen und Eukaryoten zu finden sind (siehe Kapitel 1.9). GroEL ist ein 57 kDa Protein mit drei Domänen (ATPase, Mitteldomäne und apikale Domäne) und assembliert in seiner physiologischen Form zu einem 14-mer aus zwei übereinanderliegenden Ringen aus Homoheptameren, wobei die ATPase-

Domänen äquatorial zu liegen kommen, und die apikalen Domänen eine Öffnung zur Kammer bilden und nach innen gerichtete, hydrophobe Reste zur Substratbindung aufweisen. GroES bildet ebenso ein Homoheptamer aus 10 kDa Untereinheiten und kann nach Bindung eines ungefalteten Peptids an den *cis*-Ring von GroEL ATP an die offene *cis*-Seite des zylindrischen Komplexes binden und damit die Kammer schließen. Nach ATP-Hydrolyse im GroEL *cis*-Ring und ATP-Bindung im *trans*-Ring dissoziiert GroES und das Substrat ab, um potentiell in einer weiteren Iteration von Bindung und ATPase-Zyklus erneut prozessiert zu werden (Sigler, Xu et al. 1998; Ranson, Clare et al. 2006).

1.9. Funktionale Homologien eukaryotischer co-translationaler Chaperone

In Eukaryoten existieren zu den Hsp70, Hsp60, Hsp40-Proteinen, sowie zu den bisher nicht erwähnten Hsp90-Proteinen funktionell homologe Chaperone. Das Netzwerk von Chaperonen erscheint in Eukaryoten jedoch stärker ausdifferenziert für unterschiedliche Anforderungen während der *de novo* Faltung oder während der Stabilisierung und Renaturierung von Proteinen nach Hitzestress (Albanese, Yam et al. 2006). Vor allem für die co-translationalen Faltung der durchschnittlich größeren eukaryotischen Proteine, die häufiger aus mehreren Domänen bestehen, ist ein spezialisierterer Chaperonapparat evolviert, der die Translation und die Faltung scheinbar effizienter koppelt als in Bakterien (Frydman, Nimmesgern et al. 1994; Frydman, Erdjument-Bromage et al. 1999; Agashe, Guha et al. 2004). In Eukaryoten wie *S. cerevisiae* ist TF nicht konserviert, jedoch besitzen Eukaryoten größere Chaperonkomplexe, die mit translatierenden Ribosomen assoziieren und RAC (*ribosome associated complex*) und NAC (*nascent chain associated complex*) genannt werden.

-
- In *Saccharomyces cerevisiae* und Metazoen wurde RAC als stabiler Komplex aus dem DnaJ-Homolog Zuotin (Zuo) und dem Hsp70-Molekül Ssz1p beschrieben, welcher mit Ssb, einem weiteren Hsp70-Molekül, einen ternären Komplex bilden kann (Gautschi, Lilie et al. 2001; Hundley, Eisenman et al. 2002). In höheren Eukaryoten wie *Homo sapiens* wurde ein RAC bestehend aus dem J-Protein DNAJC2 (auch genannt *M-phase phospho protein* MPP 11) und Hsp70L1 (auch HSP14A) in Lysat von HeLa-Zellen beschrieben, welcher partiell *S. cerevisiae* *zuo*^{-/-} Mutanten komplementieren kann (Hundley, Walter et al. 2005). Außerdem wurde postuliert, dass trotz fehlender Sequenz- oder Strukturhomologien TF in Bakterien und RAC in Eukaryoten eine konservierte ribosomale Bindestelle in (*E. coli*) L23, bzw. *S. cerevisiae* Rpl25 (entspricht *H. sapiens* L23a) nutzen, um mit naszenten Peptiden assoziieren zu können (Rauch, Hundley et al. 2005). Eine Struktur des Komplexes aus Ribosomen und RAC Proteinen ist allerdings nicht bekannt.
 - NAC wurde in Archaea und Eukaryoten als Heterodimer aus NAC α/β mit einem Molekulargewicht von jeweils zwischen 20-30 kDa beschrieben, welches unter anderem mit kurzen naszenten Peptiden (< 60 aa) interagiert und mit der Bindung von SRP teilweise kompetitiert (Wang, Sakai et al. 1995; Powers and Walter 1996; Beatrix, Sakai et al. 2000). Die Bindung von NAC an L23-Proteine von eukaryotischen Ribosomen (L25 in *S. cerevisiae*, L23a in *H. sapiens*) wird durch positiv geladene Reste in der NAC β -Untereinheit vermittelt (Wegrzyn, Hofmann et al. 2006). Die Kristallstruktur eines isolierten, archaealen NAC α_2 Homodimers offenbart eine UBA-Domäne und eine Dimerisierungsdomäne pro Monomer (Spreter, Pech et al. 2005). Die genaue biologische Funktion sowie der Mechanismus der Bindung naszenter Ketten durch NAC ist jedoch nicht letztlich geklärt, weshalb eine Homologie mit TF nicht bewiesen ist.

- Auch existiert in Eukaryoten ein dem GroEL funktionell ähnliches Hsp60-Chaperonin der Gruppe II, ein Doppelring-Komplex aus Heterooktameren, der TRiC/CCT genannt wird und z.B. für die Tubulin und Aktin-Faltung essentiell ist. Im Gegensatz zum bakteriellen Chaperonin TRiC co-translational an nascente Peptide binden und bei der Faltung einzelner Domänen von komplexen Substraten helfen (Frydman, Nimmesgern et al. 1994; Spiess, Meyer et al. 2004; Yam, Xia et al. 2008).

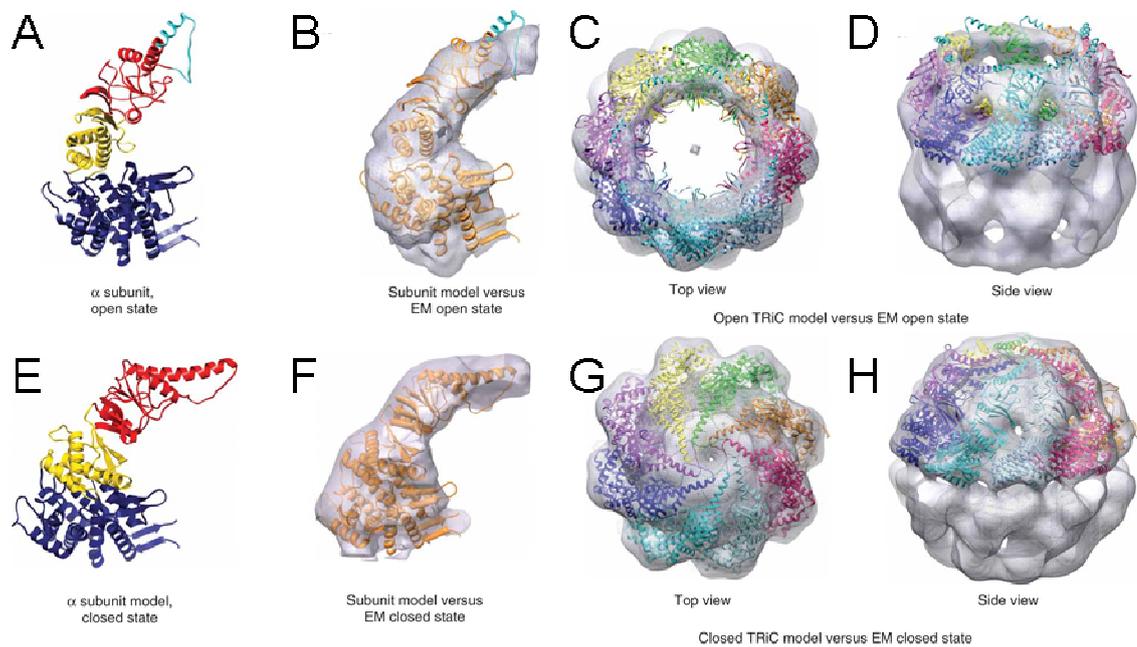


Abb. 8 Komparative Modellierung der Konformationen von TRiC.

(A) Homologiemodell der TRiC α -Untereinheit im offenen Zustand. Apikale Domäne, rot; Mitteldomäne, gelb; äquatoriale Domäne, dunkelblau.

(B) Docking des TRiC α - Modells in eine gemittelte Kryo-EM Dichte eines Monomers in offener Konformation. (C,D) Aufsicht und Seitenansicht des Homologiemodells des Oligomers.

(E-H) Wie in (A-D), aber für die (mit ADP-AlFx) geschlossene Konformation des TRiC Komplexes.

Unter Beteiligung des Hsp40/70-Systems und des ebenfalls eukaryotischen Chaperons Prefoldin (PFD) wird TRiC mit Substrat beladen. Durch zyklische ATP-Bindung, Hydrolyse und ADP/ATP Austausch wird das Substrat vom Zytosol sequestriert und wieder freigesetzt, wobei die apikalen Termini des TRiC im geschlossenen Zustand eine Art Irisblende aus β -

Blättern bilden (Abb. 8) und offenbar die Funktion des bakteriellen GroES ersetzen (Gutsche, Essen et al. 1999; Meyer, Gillespie et al. 2003).

1.10. Kryo-Elektronenmikroskopie

Eine hydratisierte biologische Probe würde bei Raumtemperatur im Hochvakuum eines Elektronenmikroskops kollabieren und ein Großteil des Solvents verdampfen. Bereits in den 1950er Jahren wurden deshalb Techniken zur Fixierung, Kontrastierung mit Schwermetallsalzen oder (rotationaler) Bedampfung entwickelt, um ganze oder geschnittene Zellen und Gewebe, sowie auf Kohlefilm absorbierte Makromoleküle abbilden zu können, welche unbestritten das allgemeine Bild des Zellaufbaus und makromolekularer Strukturen revolutionierte (Palade 1952). Abgebildet wird dabei allerdings nur der Abdruck des Schwermetalls, der von Partikel zu Partikel variiert, weshalb diese „konventionellen“ Techniken inhärent artefaktbehaftet sind (Frank 2006).

Heute hat die Kryo-Elektronenmikroskopie (KryoEM) die konventionelle Präparation weitgehend ersetzt oder zumindest komplementiert. Die KryoEM wurde in den 1970er Jahren eingeführt (Taylor and Glaeser 1974; Dubochet, Adrian et al. 1988) und umgeht viele Einschränkungen der konventionellen Methoden. Die Vermeidung der Kristallisation der wässrigen Probe ist bei der Kryo-Präparation essentiell, da H₂O-Kristalle die native Struktur von Makromolekülen (oder Zellen) zerstören können und eine starke anisotrope Elektronenstreuung am Gitter bewirken würden. Die Bildung von nicht-kristallinem amorphem, „vitrifiziertem“ Eis lässt sich durch eine sehr rasche Abkühlung der Probe mit mehr als 10⁴ K/s erreichen, was z.B. durch Eintauchen in stickstoff-gekühltes, flüssiges Ethan gewährleistet ist. Indem die Probe im Weiteren unter kryogenen Bedingungen (unterhalb von

ca. 140 K) ins Mikroskop transferiert und gehalten wird, lässt sich zum einen die Verdampfung im Vakuum verhindern und zum anderen werden Elektronenstrahlenschäden an der Probe im Vergleich zur Raumtemperatur-Mikroskopie verringert (vgl. 1.10.1). Der amorphe Eiszustand hält die biologische Probe in hydratisiertem Zustand und bietet Kontrast zu schwereren Atomen in Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren.

1.10.1. Kontrastentstehung in der Kryo-Elektronenmikroskopie

In modernen Kryo-Elektronenmikroskopen dient in aller Regel eine Feldemissionskathode (*field emission gun*, FEG) als Quelle für einen kohärenten Elektronenstrahl, der mit ringförmig angeordneten Anoden in einem Potential von 120-300 kV (je nach Anwendung und Probenbeschaffenheit) beschleunigt wird. Die Fokussierung und Bündelung erfolgt im klassischen Aufbau über zwei Kondensoren (C1 und C2) und eine Kondensorapertur, bevor im Transmissions-Modus die Probe möglichst parallel durchstrahlt wird. Stärker gestreute Komponenten werden jenseits eines Streuwinkels θ_{\max} durch die Objektivapertur entfernt und der gebeugte Strahl wird durch die Objektivlinse auf die erste Bildebene refokussiert.

(Nicht-biologische) Proben wie die o.g. Schwermetall-Färbungen erzeugen überwiegend Amplitudenkontrast durch inelastische Streuprozesse an Valenzelektronen der Atome hoher Ordnungszahl. Im Falle der biologischen Probe in einer amorphen Eisschicht von 50-200 nm Dicke geht man im relevanten Auflösungsbereich jedoch von > 90% Phasenkontrastbildung durch singuläre, elastische Streuprozesse an C, N, O und P-Atomen mit niedriger Ordnungszahl aus (Toyoshima and Unwin 1988). Phosphatgruppen von Nukleinsäuren (z.B. in Ribosomen) als elektronendichtere Anteile liefern einen vergleichsweise höheren Kontrast als Aminosäuren oder das umgebende H₂O, wobei aufgrund der hohen Tiefenschärfe des

Elektronenmikroskops davon auszugehen ist, dass der entstehende Kontrast der 2D-Projektion der vitrifizierten Probe entspricht in der Bildebene entspricht (Lucic, Forster et al. 2005).

Der Phasenkontrast resultiert aus der Interferenz der gestreuten Wellen mit dem ungestreuten Primärstrahl. Das entstehende Beugungsmuster entspricht einem 2D-Schnitt durch die Fouriertransformation (FT) des Bildes im reziproken Raum. Das Beugungsmuster wird von der Objektivlinse in der Fokusebene erzeugt und ist im Diffraktionsmodus (der unter der Objektivlinse angeordneten Intermediärlinse) auch auf dem Bildschirm zu visualisieren. Im normalen TEM-Modus allerdings wird stattdessen das reale Zwischenbild vergrößert und auf eine CCD (*charged coupled device*)-Kamera oder auf einen Film projiziert

Wichtig bei der KryoEM ist der für die jeweilige Anwendung angemessene Quotient aus Elektronendosis und Informationsgewinn (Henderson 1995): Da bei nicht zu unterdrückenden inelastischen Streuvorgängen hauptsächlich Valenzelektronen angeregt werden, kommt es immer auch zur Bildung diffusibler Radikale in der Probe, ein Prozess der temperaturunabhängig ist und auch unter kryogenen Bedingungen stattfindet. Nun begrenzt die Kühlung der Probe zwar den sekundären Diffusionsprozess von hochreaktiven Radikalen, allerdings kommt es mit steigender Elektronendosis pro Querschnitt unvermeidlich zu immer größeren Strahlenschäden. Bei biologischen Molekülen führt dies auf atomarer Ebene zur Brechung kovalenter Bindungen und später zu sichtbarer Evaporation auf dem Kohlefilm und im amorphen Eis führen (Heide and Zeitler 1985). Je höher die anvisierte Auflösung einer Struktur, desto geringer darf folglich die Gesamtdosis sein. Für hochauflösende ($< 10 \text{ \AA}$) Elektronenkristallographie- oder Einzelpartikelanalysen wird daher ein Richtwert von 10-20 $e^-/\text{\AA}^2$ empfohlen (Henderson 1995; Frank 2002). Bei der Kryoelektronentomographie sind auch bei 50-100 $e^-/\text{\AA}^2$ Veränderungen durch Strahlungsschäden noch tolerierbar, da die

Größe der zerstörten Strukturen noch unterhalb des vergleichsweise niedrigen Auflösungsbereichs ($> 30 \text{ \AA}$) liegen.

1.10.2. Phasenkontrasttransferfunktion

Die Entstehung eines Bildkontrasts $i(\mathbf{r})$ aus dem Objekt $o(\mathbf{r})$ in der Hellfeld-Elektronenmikroskopie kann durch die Faltung mit der *point spread function* $p(\mathbf{r})$ (PSF) beschrieben werden wobei \mathbf{r} dem Vektor der Bildkoordinaten im Realraum entspricht. Die PSF wiederum entspricht der FT der (Phasen)Kontrasttransferfunktion (CTF) $P(\mathbf{k})$ die mit der die Objektinformation im Frequenzraum \mathbf{k} gefaltet wird.

$$I(\mathbf{k}) = O(\mathbf{k}) P(\mathbf{k})$$

Parameter einer vereinfachten CTF sind der Defokus Δz , der sphärische Abberationskoeffizient C_s und die Wellenlänge der Elektronen λ , wobei in aller Regel (und in erster Näherung) nur Δz einen veränderlichen Parameter darstellt.

$$CTF(\mathbf{k}) = \sin\left(\frac{\pi}{2} [C_s \lambda^3 \mathbf{k}^4 - 2 \Delta z \lambda \mathbf{k}^2]\right)$$

Die CTF bedingt, dass der Kontrast im Frequenzraum zwischen ± 1 oszilliert, wobei sich die erste Nullstelle der CTF bei Vergrößerung von Δz in immer niedrigere Frequenzbereiche verschiebt. An den Nullstellen der CTF wird kein Kontrast übertragen und die entsprechende Information in diesen Frequenzbereichen ist nicht sichtbar. Oberhalb der ersten Nullstelle kippt der Kontrast ins Negative um und oszilliert dann in höheren Frequenzbereichen.

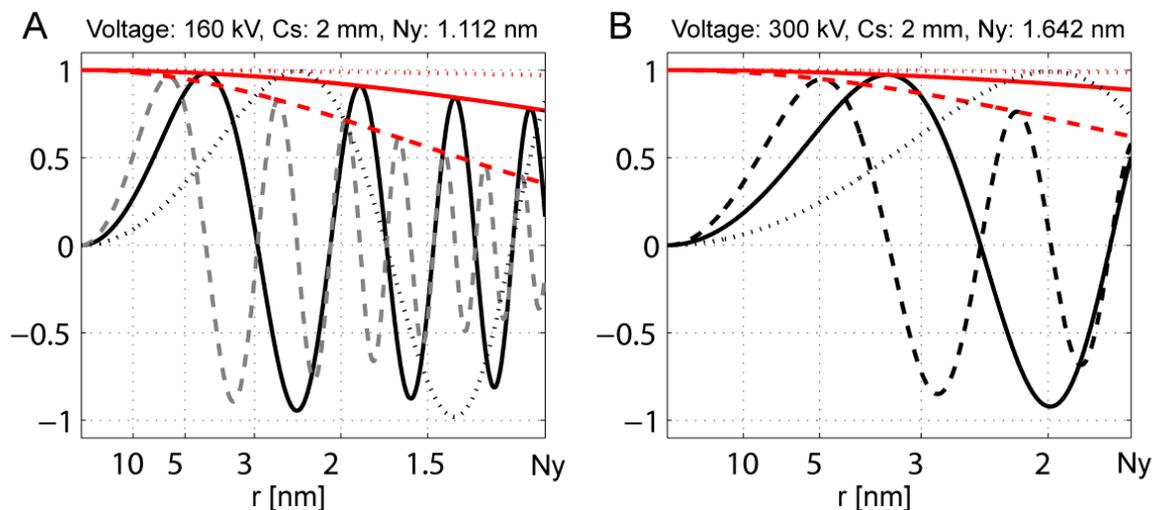


Abb. 9 Modelle der Phasenkontrasttransferfunktionen in Abhängigkeit von Δz . (A) Modell der CTF für eine Beschleunigungsspannung von 160 kV, eine sphärische Aberration Cs von 2 mm, und eine Objektpixelgröße von 5.6 Å oder (B) Modell der CTF für eine Spannung von 300 kV, eine Cs von 2 mm, eine Objektpixelgröße von 8.2 Å bei verschiedenen Defoki $\Delta z = 1 \mu\text{m}$ ($\bullet\bullet$), $3 \mu\text{m}$ (—), $6 \mu\text{m}$ (--) mit Δz -abhängigen Modellen der Einhüllenden (jeweils in rot). Ny, Nyquist-Frequenz im Realraum ($2 \cdot \text{Pixelgröße}$); r, $1/\text{Frequenz}$.

Abb. 9 zeigt Modelle der CTFs für die Aufnahme bei 160 kV und einem Defokus von $-3 \mu\text{m}$ (Abb. 9 A), bzw. bei 300 kV und einem Defokus von $-6 \mu\text{m}$ (Abb. 9 B). Die Dämpfung bei der Nyquist-Frequenz (Ny, Frequenz = $(2 \cdot \text{Pixelgröße})^{-1}$) ist in tatsächlichen EM-Aufnahmen wesentlich stärker als in den hier gezeigten Modellen, da mehrere Effekte die Kontrastübertragung bei höheren Frequenzen räumlich und zeitlich weiter dämpfen:

Zunächst wird die Amplitude im höherfrequenten Bereich aufgrund einer endlichen Kohärenz der Elektronenquelle $E_{pc}(k)$ (*partial coherence*) und einer chromatischen Aberration des Strahls $E_{es}(k)$ (*energy spread*) stark gedämpft, was die *envelope function* beschreiben soll (Zhu, Penczek et al. 1997). $E_{pc}(k)$ beschreibt die physikalischen Größe der Elektronenquelle und $E_{es}(k)$ berücksichtigt eine Aufweitung des Defokus.

Zusätzlich bewirkt die endliche Größe des Aufnahmemediums (in unserem Fall eine CCD-Kamera) eine zusätzliche Dämpfung hoher Frequenzen. Diese dominante Dämpfung des Signals wird durch die *Modulation transfer function* MTF (die diskrete FT der *linespread function*) beschrieben. Die MTF einer CCD-Kamera kann zum Beispiel als FT des

Durchschnitts von Linienverläufen senkrecht zu einer scharfen Materialkante gemessen werden (Abb. 10).

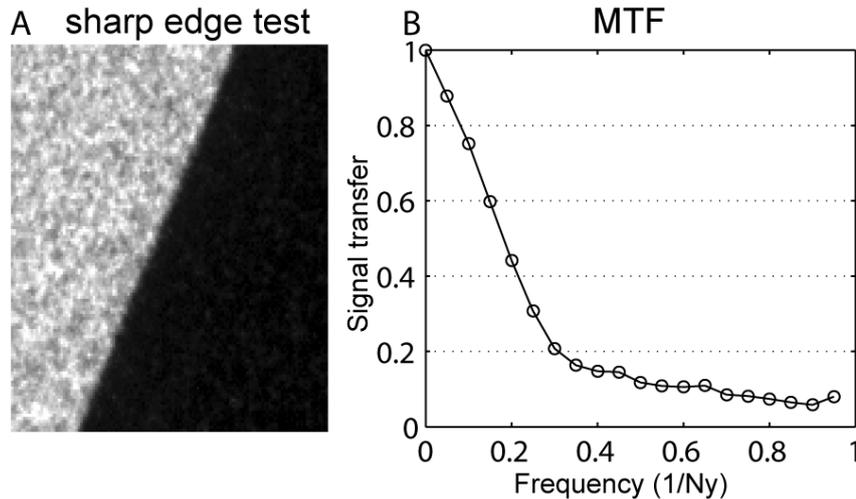


Abb. 10 Dämpfung durch die Modulation transfer function einer CCD Kamera.

(A) Gezeigt ist der Ausschnitt einer Aufnahme einer Materialkante (*sharp edge*) mit der 4k-Kamera (TVIPS, physikal. Pixelgröße 15 μm) im CM20-Gerät bei 160 kV. (B) MTF als diskrete FT des Durchschnitts von Linien senkrecht zur Materialkante (*line-spread function*).

Bei der CTF-Korrektur wird versucht, ein CTF-Modell an die Spektraldichtefunktion (*power spectrum*) des Bildsignals anzupassen, um geeignete Parameter zu finden, mit denen sich die Phasen und Amplituden des ursprünglichen Objekts aus dem deformierten Signal so gut wie möglich zurückzugewinnen lassen, wobei dies nur bei einem guten Signal-zu-Rausch Verhältnis (*signal/noise ratio*, S/N) bis in höhere Frequenzbereiche zu erreichen ist. Indem man bei leicht variierenden Defoki Δz_n Projektionen aufnimmt, lassen sich durch gewichtete Addition der unterschiedlichen CTFs $P_n(\mathbf{k})$ auch die leeren Frequenzbänder an den Nullstellen mit Information im Fourierraum auffüllen (Zhu, Penczek et al. 1997; Frank 2006). Für die Einzelpartikelanalyse (Kapitel 1.10.3) ist die CTF-Korrektur neben Alignierungs und Klassifizierungsalgorithmen in alle verfügbaren Softwarepakete eingebunden. Aufgrund des sehr niedrigen S/N-Verhältnisses und des Defokus-Gradienten in gekippten, tomographischen

Einzelprojektionen, ist die CTF-Korrektur bei der Kryoelektronentomographie (Kapitel 1.10.4) bis heute noch nicht in voller Anwendungsbreite etabliert. Deshalb geht die Information jenseits der 1. Nullstelle der CTF in Mittelungen von Subtomogrammen verloren, bzw. sollte nicht zur Alignierung von Subvolumina herangezogen werden.

1.10.3. Einzelpartikelanalyse von Makromolekülen

Geringste Mengen (bis zu 0.25 pmol) einer homogenen Probe von Makromolekülen sind ausreichend, um eine sehr große Zahl identischer Partikel in einer amorphen Eisschicht per KryoeM abzubilden (Frank 2006). Hierzu wird die Probe zumeist auf löchrige Kohlefilme aufgebracht und nach Abziehen des größten Teils der Lösung als sehr dünner Film (< 100 nm) vitrifiziert. Durch die Aufnahme von Einzeltransmissionsbildern an verschiedenen Stellen des Trägers lassen sich die Projektionen der Elektronendichten vieler tausender Partikel gewinnen. Unter der Annahme, dass Komposition und Konformation der Komplexe nahezu homogen sind, so unterscheiden sich die Projektionen der Einzelpartikel ausschließlich entsprechend ihrer Orientierung, ihres Defokus und des S/N-Verhältnisses der lokalen Umgebung im Eis. Zur Einzelpartikelanalyse (*single particle analysis*, SPA) bieten verschiedene Softwarepakete wie u.a. EMAN (Ludtke, Baldwin et al. 1999), SPIDER (Frank, Radermacher et al. 1996), oder Xmipp (Scheres, Nunez-Ramirez et al. 2008) verschiedene Varianten der CTF-Approximierung und -Korrektur (Sander, Golas et al. 2003), sowie der Partikelselektion, Alignierung und Klassifizierung mit Korrelationsmethoden oder *Maximum likelihood* Algorithmen an.

Bei der SPA wird zunächst ein initiales Partikelset gewählt. Aus diesem wird in einem iterativen Prozess der Alignierung per Kreuzkorrelation an Referenzprojektionen, Klassifizierung in Orientierungsklassen und Rekonstruktion eines 3D Modells (für die nächste

Iteration) eine gemittelte 3D Struktur errechnet. Weiter entwickelte SPA-Methoden wie *common lines* Analyse oder eine *maximum likelihood*-Approximierung können dabei auch ohne initiale Referenzstruktur, bzw. ohne Kreuzkorrelation auskommen (Fu, Gao et al. 2007; Scheres, Gao et al. 2007).

Eine gewisse Varianz des Defokus der Partikelbilder ist bei der SPA durchaus gewünscht, um den Informationsverlust an den Nullstellen der CTFs durch Mittelung auszugleichen, wie in Kapitel 1.10.2 angeführt. Auch lässt sich dann ein verlässlicheres Modell der CTF approximieren, welche mit verschiedenen Algorithmen dann für jede Projektion korrigiert werden kann. Heterogenere Proben oder Konformationssubzustände lassen sich dann weiterhin z.B. durch Hauptkomponenten-Analyse (*principal component analysis*, PCA) klassifizieren, so dass die gemittelten Signale bis in hohe Raumfrequenzen, bzw. Auflösungen relevante Informationen tragen. So wurden für symmetrische Partikel wie GroEL schon Auflösungen von bis zu 4 Å (Ludtke, Baker et al. 2008), für asymmetrische Komplexe wie das bakterielle Ribosom zwischen 9Å (Valle, Zavialov et al. 2003) und 6.7 Å (LeBarron, Grassucci et al. 2008), und für das eukaryotische Ribosom bis zu 8.7 Å (Chandramouli, Topf et al. 2008) berichtet.

1.10.4. Elektronentomographische Rekonstruktion pleomorpher Strukturen

Unter einem tomographischen Verfahren versteht man die Ermittlung einer 3D Struktur aus einzelnen 2D Projektionen unter variierendem Projektionswinkel.

Die Datenakquisition bei der Kryoelektronentomographie (KryoET) unterscheidet sich daher grundlegend von der Einzelpartikelanalyse: Während bei der letztgenannten Tausende von

Partikeln in unterschiedlichen Orientierungen projiziert werden, werden bei der KryoET an einer einzigen Probenstelle viele Projektionen des selben Objektes unter verschiedenen Kippwinkeln aufgenommen. Dadurch lassen sich einzelne, nicht-repetitive Strukturen in heterogenen Gemischen bzw. ganze Zellen 3D abbilden, was die SPA nicht vermag.

Obwohl das mathematische Fundament für die KryoET bereits früh entwickelt wurde, war die tomographische Rekonstruktion einer vitrifizierten Probe für lange Zeit technisch zu anspruchsvoll, um eine breitere Anwendung zu finden. Vor allem durch die Entwicklung automatisch kontrollierbarer dedizierter Kryo-Elektronenmikroskope und Kryo-Kipphalter mit verbesserter Feinmechanik, CCDs zur Detektion sowie einer leistungsfähigen digitalen Datenverarbeitung wurde die KryoET aber seit Ende der 1990er Jahre mehr und mehr als Standardmethode etabliert (Lucic, Forster et al. 2005). So wurden mit Hilfe der KryoET sehr große oder pleomorphe Strukturen zum ersten Mal 3D rekonstruiert, wie zum Beispiel das Aktinskelett einer eukaryotischen Zelle (Medalia, Weber et al. 2002), Herpes Simplex Virionen (Grunewald, Desai et al. 2003), der Kernporenkomplex (Beck, Forster et al. 2004), oder die äußere Membran von Mykobakterien (Hoffmann, Leis et al. 2008)

Die tomographische Aufnahme, bzw. die Projektion eines Objektes im TEM unter verschiedenen Winkeln entspricht dem Auffüllen mit Information verschiedener Kippebenen im Fourierraum (Crowther, Amos et al. 1970; Hoppe and Grill 1977).

Mit endlichen Winkelinkrementen ist aber eine kontinuierliche Übertragung der Strukturinformation nur unterhalb der Frequenz k_C zu erwarten (*Crowther*-Kriterium), jenseits davon kommt es zu Informationslücken im Frequenzraum (Abb. 11). Wie unten näher besprochen, bleibt zudem der nicht abgetastete Winkelbereich (*missing wedge*) frei von Information. Eine feinere Abtastung bis in möglichst hohe Winkelbereiche kommt daher dem theoretischen Ideal der kontinuierlichen Abtastung des Fourierraums näher. Wichtig dabei ist allerdings, dass die Gesamtelektronendosis über alle Kippwinkel einen Grenzwert von ca. 50-

$100 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ nicht überschreitet, was den maximalen Informationsgehalt prinzipiell limitiert (Abb. 11).

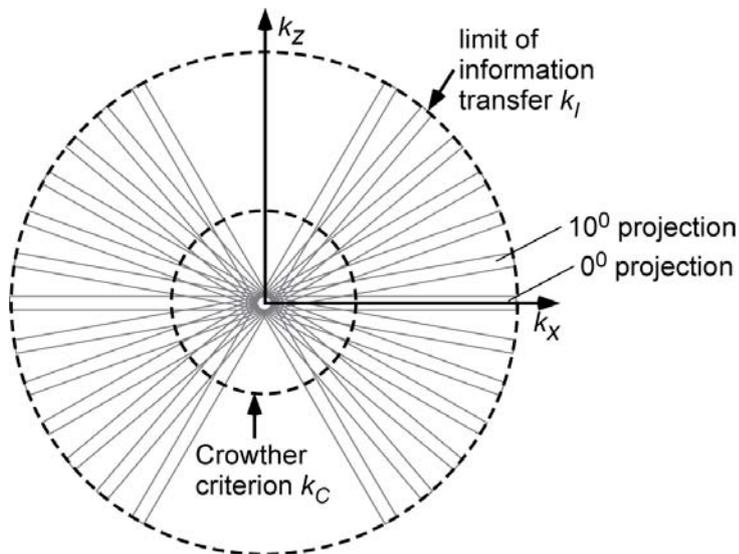


Abb. 11 Schematische Darstellung von Projektionen im Fourierraum (Lucic, Forster et al. 2005).

Die fouriertransformierten Projektionen (grau) unter verschiedenen Kippwinkeln ($-60^\circ..+60^\circ$) enthalten die Information des Objekts über die Dicke $1/d$. Gemäß dem sog. Crowther-Kriterium (für sphärische Objekte) ist der übertragene Strukturfaktor bis zur Frequenz k_C vollständig, darüber wird die Information lückenhaft übertragen. Es wird hier deutlich, weshalb ein feineres Winkelinkrement eine bessere Abtastung im Fourierraum bis zu höheren Frequenzen erlaubt.

Die Alignierung der Einzelprojektionen kann manuell erfolgen, indem im Eis eingebettete, kolloidale Goldpartikel in jeder Projektion verfolgt werden. Die Verschiebungen dieser *marker* werden von Projektion zu Projektion bestimmt und minimiert, indem Projektionstranslation und Rotation relativ zur Kippachse korrigiert werden (Lucic, Forster et al. 2005). In einem (semi-) automatischen Verfahren können die Projektionen auch global oder lokal (*feature tracking*) kreuzkorreliert werden, um die Verschiebungen, die Rotationen der Projektionen oder weitere Freiheitsgrade wie z.B. verfeinerte Kippwinkel zu modellieren (Guckenberger 1982; Mastrorade 2008).

Die 3D Rekonstruktion aus Projektionen erfolgt dann im Grunde analog der Einzelpartikelanalyse (bei der Projektionen einzelner Partikel aligniert und rücktransformiert werden) und es können ähnliche Algorithmen zur Anwendung kommen: Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist die gewichtete Rückprojektion (*weighted backprojection*, WBP)

(McEwen, Radermacher et al. 1986; Radermacher 1988), wobei die zentrale mathematische Operation der Rückprojektion von 2D-Projektionen in ein Volumen eine inverse Radon-Transformation approximiert (Radon 1917). Die Wichtung der Projektionen wird notwendig aufgrund der anisotropen Informationsübertragung im Frequenzraum: Wie in Abb. 11 schematisch dargestellt, würde der überlappende Informationsgehalt unterhalb der Grenzfrequenz k_C zu einer Überrepräsentation niederfrequenter Bereiche führen. Daher müssen die Projektionen vor der Rekonstruktion in Abhängigkeit der Objektstärke $1/d$ gewichtet werden, wofür sich eine analytische oder -bei Kenntnis der Probendicke- eine exakte Wichtung anbieten (Harauz and Van Heel 1986). Als Alternativen zur WBP werden algebraische Verfahren zur iterativen Optimierung der Rekonstruktion (*Algebraic Reconstruction Technique, ART*) erwähnt, da hier das Gewichtungsproblem und die Approximierung der Formfunktion der Probe umgangen werden kann (Gordon, Bender et al. 1970). Allerdings ist der Rechenaufwand höher als bei der WBP und der Informationsgewinn zumeist eher marginal.

Die KryoET wird durch die apparative Grenze der maximalen Kippwinkel eingeschränkt. Häufig wandern ab $\alpha = \pm 60^\circ$, entweder Teile des Kupfergitters des Trägernetzes oder des Probenhalters ins Sichtfeld ein, so dass Projektionen jenseits dieser Kippwinkel nicht aligniert oder gar nicht aufgenommen werden können. Im Fourierraum der 3D-Rekonstruktion resultiert diese Limitierung in einem „informationsleeren“ Winkelbereich von $\pm 2 \cdot (90^\circ - \alpha)$.

Diesen direktionalen Informationsverlust bezeichnet man entsprechend der Form im Fourierraum bei einer Einzelachsenkipfung als *missing wedge*, bei einer Doppelachsenkipfung als *missing pyramid* (Abb. 12). In den Realraum transformiert ergibt sich eine anisotrope Auflösung des Tomogramms über die Raumdimensionen: senkrecht zur 0° Projektionsebene liegende Strukturen werden dann verzerrt wiedergegeben.

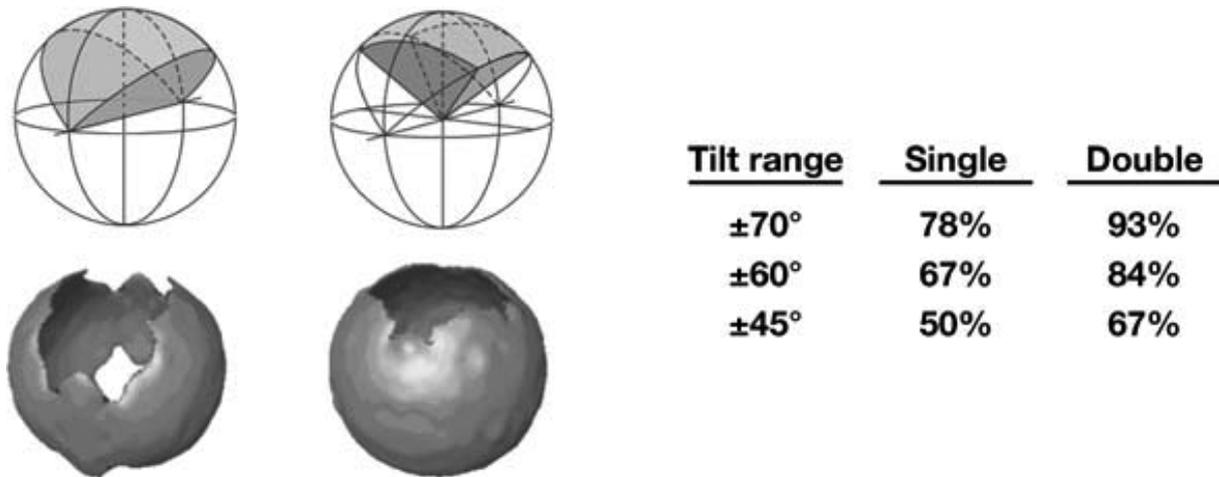


Abb. 12 Informationsverlust durch begrenzte Kipp-Geometrien (aus (Lucic, Forster et al. 2005)). Bei einer Einzelachsenkipfung (links) bleibt ein Keil-förmiger Bereich (*missing wedge*), bei einer Doppelachsenkipfung (Mitte) eine pyramidaler Bereich (*missing pyramid*) im Fourierraum frei von Information. Die Tabelle rechts zeigt an, welcher Anteil des Volumens im Fourierraum in Abhängigkeit von den Kippmaxima abgetastet werden kann.

Bei der Interpretation eines Tomogramms z.B. durch korrelative Methoden muss das Suchmuster (*template*) mit dem *missing wedge* Effekt korrigiert werden (siehe Kapitel 1.10.5). Mittelt man viele Subtomogramme mit gleichem *missing wedge*, aber isotroper Orientierungsverteilung, so werden auch die fehlende Informationsbereiche aufgefüllt; idealerweise ist die gemittelte Struktur dann in alle Raumrichtungen gleichmäßig aufgelöst.

1.10.5. Mustererkennung in Kryo-Elektronentomogrammen

Durch Korrelationsmethoden ist es zumindest für große (>200 kDa) makromolekulare Komplexe möglich, die Elektronendichte einer bekannten Kristall- oder KryoEM-Struktur in durch KryoET gewonnene 3D-Rekonstruktionen einer Zelle oder eines zell-nahen Systems einzupassen (Bohm, Frangakis et al. 2000; Frangakis, Bohm et al. 2002). Ein Algorithmus zur Berechnung der lokal normalisierten 3D Kreuzkorrelationsfunktion (CCF) eines Tomogramms mit einer externen Referenzstruktur muss hierzu neben dem Koordinatenraum

auch den (inkrementierten) Winkelraum abtasten. In dem in dieser Arbeit verwendeten und von F. Förster entwickelten Programm MOLMATCH (Forster 2005) wird die Referenzstruktur nach der zxz -Rotation mit einem inkrementierten Winkelsatz (φ, ψ, θ) rotiert, mit der (*missing wedge*-korrigierten) PSF gefaltet, in eine sphärischen Maske zur lokalen Normalisierung platziert und dann mit dem Zielvolumen gekreuzkorreliert (Abb. 13).

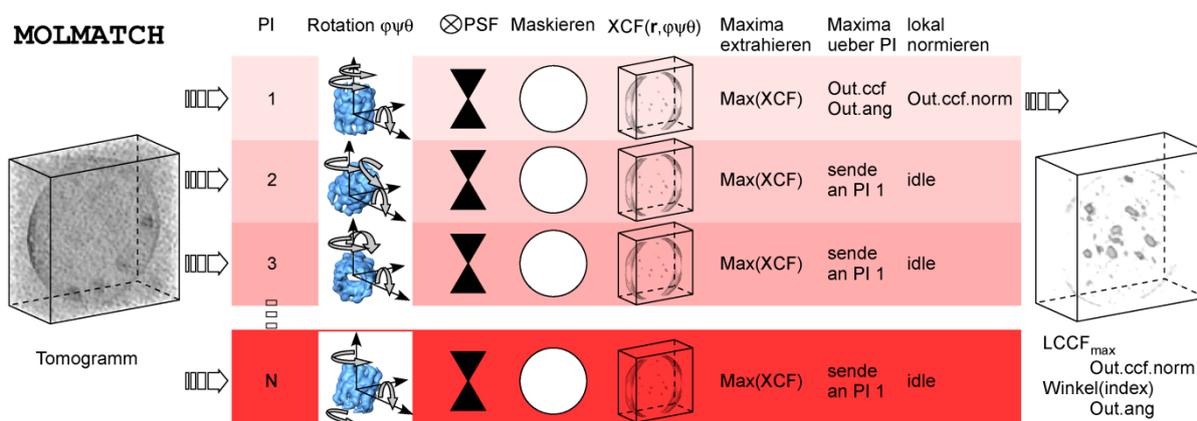


Abb. 13 Parallelierte 3D Kreuzkorrelation mit lokaler Normalisierung (aus (Forster 2005), Dissertation). Dargestellt ist der algorithmische Ablauf des MOLMATCH-Programms, dass auf PI Prozessoren eine 3D Referenzstruktur (blau, schematisch) mit inkrementierten Winkelsätzen rotiert, kubisch interpoliert, mit der PSF faltet, maskiert und dann die Kreuzkorrelation (XCF) innerhalb eines Subvolumens des Tomogramms berechnet und lokal normiert (LCCF).

Mit dieser Methode lassen sich Kryo-Tomogramme von komplexen (ungereinigten) Lysaten bis hin zu intakten Zellen nach ausreichend großen Zielkomplexen durchsuchen. Es ist somit im Prinzip möglich, die Verteilung makromolekularer Komplexe global zu erfassen. Auf diese Weise wurde zum Beispiel die Ribosomenverteilung in einem vitrifizierten, dünnen Bakterium bestimmt (Ortiz, Forster et al. 2006). Mögliche Probleme sind dabei unspezifische Korrelation mit kontrastreichen Strukturen, wie z.B. der Membran, sowie eine Orts- und Winkelabhängigkeit der Korrelationsmaxima (Abb. 14).

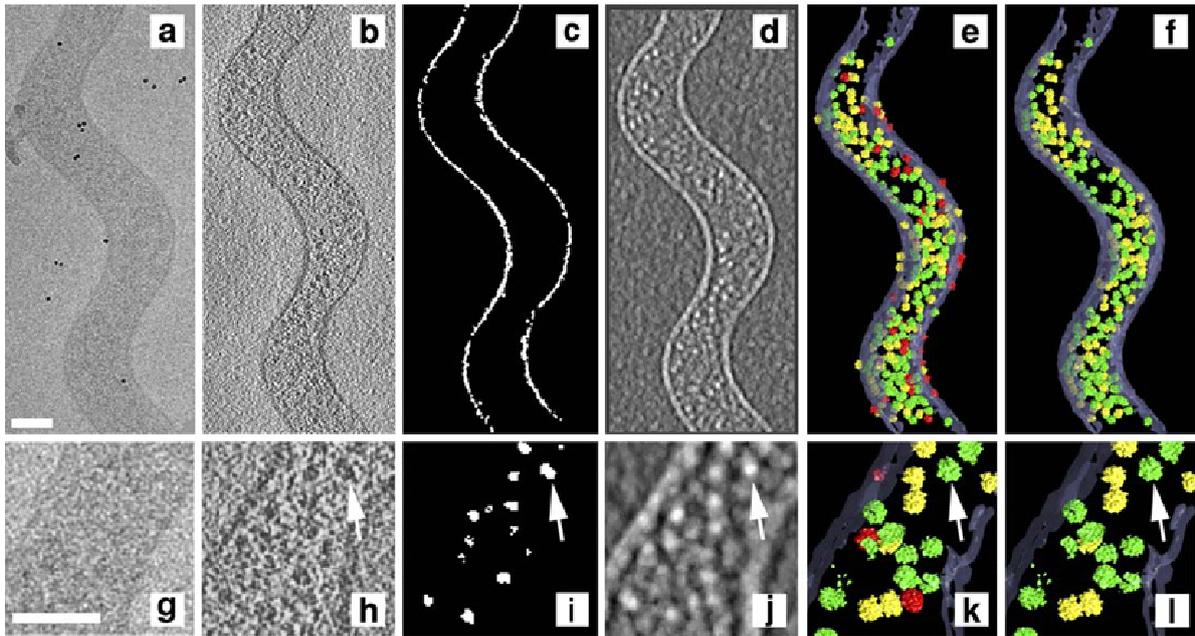


Abb. 14 Template matching von Ribosomen in einer dünnen Bakterienzelle (aus (Ortiz, Forster et al. 2006)). Gezeigt ist (a) ein Projektionsbild einer vitrifizierten Spiroplasmazelle, (b) Ein Z-Schnitt des rekonstruierten Tomogramms, (c) ein Z-Schnitt der Maske zur Segmentierung der Zellmembran, (d) ein Z-Schnitt der CCF nach *template matching* und (e,f) Modelle des Ribosoms in den ermittelten Koordinaten und Orientierungen der Zelle (grün = hohe CCC, rot = niedrigere CCC). (g-l) vergrößerte Detailausschnitte von (a-f).

Nun kann man an den Koordinaten der (richtig positiven) Peaks in der 3D CCF (ungebinnte) Subtomogramme rekonstruieren, die den Zielkomplex beinhalten. Viele Subtomogramme lassen sich wiederum durch Kreuzkorrelation aufeinander alignieren und durch gewichtete Mittelung lässt sich die 3D-Struktur des Zielmoleküls bei mittlerer Auflösung (z.B. der 1. Nullstelle der CTF, siehe 1.10.2) bestimmen. Klassifizierungsalgorithmen können Unterklassen im Partikelsatz finden, die dann iterativ aligniert und gemittelt werden, wobei wichtig ist, nur die Information außerhalb der überlappenden *missing wedges* zweier Subtomogramme zu korrelieren (Forster, Pruggnaller et al. 2008). Ist der artifizielle Einfluss der externen Referenz oder der Kippgeometrie weitestgehend ausgeschlossen, so lassen sich mit den feinalignierten Koordinaten und nachträglicher Partikelklassifizierung die Identität und die 3D Verteilung des Makromoleküls mit einem Fehler unter der Pixelgröße und unter 10° Winkelabweichung bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit soll mit ausreichender Genauigkeit die Position und Orientierung jedes einzelnen Ribosoms in Kryotomogrammen eines Translationsystems oder ganzer Zellen anhand des oben beschriebenen Mustererkennungsalgorithmus analysiert werden.

1.10.6. Experimentelle Limitierungen der globalen Mustererkennung

Ribosomen sind aufgrund ihrer kanonischen Zusammensetzung, struktureller Rigidität und sehr hoher Elektronendichte für die o.g. Mustererkennung vergleichsweise gut geeignet. Es sollte allerdings erwähnt werden, dass für die Verlässlichkeit und Genauigkeit der 3D-Mustererkennung im Speziellen von kleineren (< 250 kDa), kontrastärmeren oder flexibleren makromolekularen Komplexen noch mehrere biologische und physikalisch-technische Faktoren limitierend wirken:

1. Das S/N-Verhältnis wird für die gängigen Kreuzkorrelationsmethoden rasch limitierend (Bohm, Frangakis et al. 2000). Geringe Elektronendosis, zu niedriger Defokus oder zu hohe Probendicke können das Signal abschwächen und die Verlässlichkeit der Mustererkennung limitieren.
2. *Molecular Crowding* bezeichnet die sehr hohe Dichte makromolekularer Komplexe und organischer Verbindungen insbesondere in der physiologischen Umgebung einer intakten Zelle (Abb. 15). Näherungsweise wird tatsächlich nur ein Drittel des Volumens einer Zelle durch H₂O eingenommen, die Proteinkonzentration liegt unter diesen Bedingungen bei 200-400 mg/ml, ein Vielfaches der *in vitro* üblichen Konzentrationen, bis zu denen isolierte Proteine in Lösung verbleiben (Ellis and Hartl 1999; Ellis 2001). Die Korrelation mit Elektronendichten von Makromolekülen in einer solchen Umgebung wird erschwert, da sich bei direkter Angrenzung der Dichte

von Nachbarmolekülen die Wahl der 3D-Maske entscheidend auf das Ergebnis der Korrelationsfunktion auswirkt (Grunewald, Medalia et al. 2003).

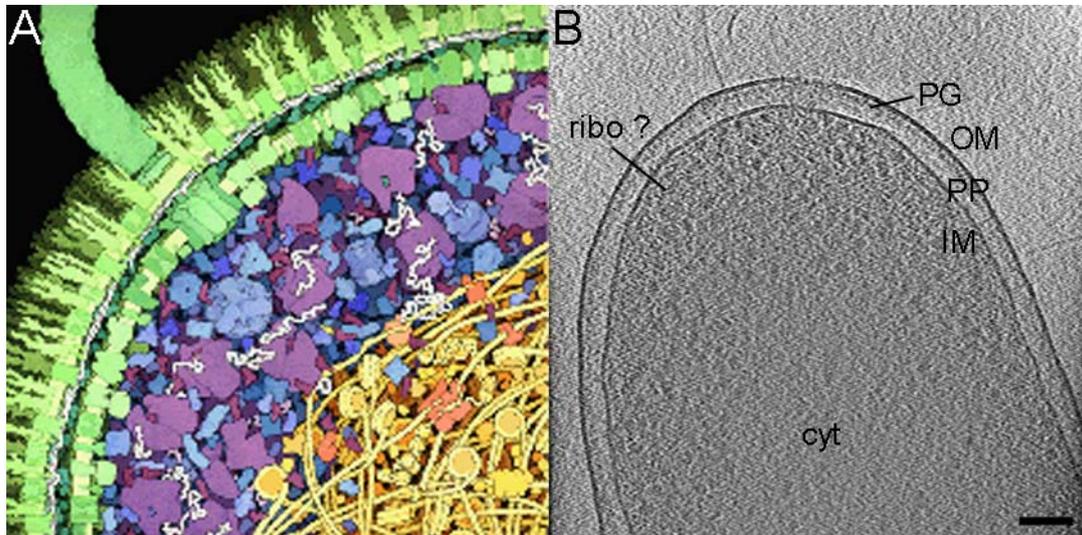


Abb. 15 *Molecular crowding* im Zytosol erschwert das erkennen individueller Makromoleküle in Tomogrammen.

(A) Die Illustration von David S. Goodsell (Goodsell 1991) verdeutlicht grafisch den Aufbau und die hohe Dichte an Biomolekülen einer *E.coli* Zelle: Ribosomen (violett), andere Makromoleküle (blau), die DNA im Nukleoid (gelb), sowie die Transkriptions- und Replikationsmaschinerie (orange/gelb) sind durch die Zellmembran und -wand (grün) stark räumlich eingegrenzt.

(B) Kryotomographische Rekonstruktion einer *E. coli*-Zelle (von Valerio Matias, MPI Biochemie). Zu erkennen sind die innere Plasmamembran (IM), das Periplasma (PP) mit Peptidoglykanschicht (PG) und die äußere Membran (OM). Komplexe im Zytosol (cyt) könnten Ribosomen (ribo) sein, was sich aber aufgrund der Dichte und des geringen Kontrasts schwierig ermitteln lässt. Maßstab, 100 nm.

3. Der *missing wedge* im Fourierraum einer Einzelachsen-Elektronentomographischen Rekonstruktion bewirkt im Falle der Korrelation mit „nicht-sphärischen“ Partikeln immer eine Anisotropie der Verteilung der Kreuzkorrelationskoeffizienten (CCC) in Abhängigkeit der Partikelorientierung im vitrifizierten Eis. Die CCCs unterschiedlicher Partikel sind streng genommen nur dann direkt vergleichbar, wenn im Winkelraum an gleicher Stelle Maxima zu finden sind, d.h. die Partikel mit großer Wahrscheinlichkeit gleich orientiert sind. Die fehlende Information im Fourierraum kann natürlich weiterhin dazu führen, mögliche falsch positive Korrelationsmaxima einer Musterstruktur mit Dichten aus rekonstruierten Tomogrammen zu finden, oder

tatsächlich vorhandene Zielpartikel aufgrund zu geringen Informationsgehalts im Fourierraum als falsch negativ zu klassifizieren, das heißt nicht zu erkennen.

4. Die Phasenkontrasttransferfunktion in unkorrigierten TEM-Aufnahmen verbietet die Interpretation von Information jenseits der ersten Nullstelle in der FT der Zielstruktur, da hier Kontrastaufhebung oder Phasenumkehr zu einem artefaktbehafteten Signal führen. Wie oben beschrieben, lassen sich in (nicht-gekippten) Aufnahmen mit genügendem S/N-Verhältnis die zugehörige CTFs approximieren, um das ursprüngliche Signal zurückzugewinnen. Auch wenn Vorschläge existieren, auf ähnliche Weise die Einzelprojektionen von tomographischen Kippserien zu korrigieren (Fernandez, Li et al. 2006; Winkler 2007), gibt es aber bisher noch keine CTF-korrigierten KryoET-Aufnahmen, die die Interpretation bis in den Bereich $< 20 \text{ \AA}$ erlauben würden. Die Folge ist, dass bei hohem Defokus und bei Partikeln, die weit von der Kippachse entfernt liegen und deshalb einen starken Defokus-Gradienten während der Kippserie durchlaufen, artefaktbehaftete Dichten in der 3D-Rekonstruktion zu finden sind, die der mit der Musterstruktur nicht mehr gut korrelieren.

2. Material und Methoden

2.1. (Bio)chemikalien und Kits (nach Herstellern)

Ambion / Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland): T7/SP6 MEGAscript Kit

BioRad (München, Deutschland): Ethidiumbromid, Bradford Assay

Difco (Heidelberg, Deutschland): Bacto tryptone, Bacto yeast extract, Bacto Agar

Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland): GeneRuler 1kb DNA Ladder, GeneRuler 100bp DNA Ladder, SDS Unstained / Pre-Stained ladder

New England Biolabs (Frankfurt a. Main, Deutschland): Restriktionsendonukleasen, T4 DNA Ligase, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)

Qiagen (Hilden, Deutschland): RNeasy Kit, PCRprep Kit, QIAprep Kit, Ni-NTA Agarose

Roche (Mannheim, Deutschland): RNase A, EDTA free Complete Protease Inhibitor

Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland): Protran Nitrocellulose Transfer Membrane

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland): Cycloheximid, Chloramphenicol, DEPC

Stratagene (Amsterdam, Netherlands): Herculase DNA polymerase

USB Biotech (Staufen, Deutschland): ECL plus detection kit

Weitere in dieser Arbeit verwendete Chemikalien waren *pro analysi* wenn nicht anderweitig erwähnt von Fluka, Calbiochem Calbiochem, Merck, Sigma-Aldrich, Roth oder Roche.

2.2. Medien und Standardpuffer

LB-Medium: 0.5% Hefeextrakt, 2.0% Bacto Trypton, 10 mM NaCl

LB-Agar: LB-Medium, 15 g/l Bacto Agar

Antibiotika zur Selektion: Chloramphenicol 25 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml

DMEM (Gibco) mit 10% FCS

DEPC-dH₂O: 1 ml Diethylpyrocarbonat ad 1 l dH₂O, durch Inkubation über Nacht bei RT oxidiert DEPC verbleibende RNasen und durch 2-maliges Autoklavieren reagiert es vollständig ab.

Alle weiteren Puffer für molekularbiologische Standardmethoden der SDS-PAGE und des Western blotting wurden entsprechend geläufiger Protokolle erstellt (Sambrook 2001).

2.3. Bakterielle und mammalische Zellkulturen

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> DH5αF'	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ-	Novagen
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> MC4100	F ⁻ araD139 Δ(argF-lac)U169* rspL150 relA1 flbB5301 fruA25‡ deoC1 ptsF25 e14-	(Agashe, Guha et al. 2004)
U-87MG,	Humane Glioblastoma-Zelllinie (freundliche Gabe von Günther Bernhardt, Institut für Pharmazie, Uni Regensburg)	(Ponten and Macintyre 1968),

2.4. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET 15b Luc	Luciferase zur Expression im RTS System	ST (Tomic, Johnson et al. 2006)
α-Syn	<i>M.mus.</i> α-Synuclein zur Expression in PURE	ST
pIVEX 2.7d Luc	<i>P. pyralis</i> Luciferase zur Expression im RTS System	ST
pIVEX 2.7d Luc	<i>M. musculus</i> α-Synuclein zur Expression in RTS	ST
pIVEX WG1.3 Luc	<i>P. pyralis</i> Luciferase zur Expression in WG Lysat	FBR

pRSET6a.mAct	<i>M. musculus</i> β -Actin zur Expression in RTS	(Siegers, Waldmann et al. 1999)
pET22b Eno	<i>E. coli</i> Enolase zur Expression in RTS	SKL
pET22b MetK	<i>E. coli</i> Met-Adenosyltransferase zur Expression in RTS	SAE
pET 22b GatD	<i>E. coli</i> GatD zur Expression in RTS	(Kaiser, Chang et al. 2006)
pBAD 33 Luc-SecM-GFP	<i>P. pyralis</i> Luciferase-SecM-GFP	SKL, (Brandt, Etechells et al. 2009)
pBAD 33 Luc wt	<i>P. pyralis</i> Luciferase wt	SKL, (Brandt, Etechells et al. 2009)

SAE, Stephanie A. Etechells; SKL, Sathish K. Lakshmiathy; ST, Sladjana Tomic; FBR, Florian Brandt (in dieser Arbeit)

2.5. Oligonukleotide

Name	Funktion	Sequenz (5' .. 3')	Quelle
36T7_F	T7 promoter fwd	CATTAATGCAGGATCTCGATCCC	FBR
aSyn140_R2	aSyn V140 noSTOP rev	CACTTCAGGCTCATAGTCTTG	FBR
SmaI_LucFL_R	Cterm FFLuc	CTAG CCCGGG TTACAATTTGGACTTTCCGCCC	FBR
SmaI_aSynFL_R	Cterm aSyn	CATG CCCGGG TTAGGCTTCAGGCTCATAGTCTTG	FBR
NcoI_Luc2_F2	Nterm FFLuc	GATC CCATGG AA GACGCCAAAAACATAAAGAAAG	FBR
Syn60_2R	aSyn V60 noSTOP rev		FBR
Syn77_2R	aSyn V77 noSTOP rev		FBR
T7pIVEX2.7_F	T7 Promotor		FBR
LucSeqPrFor	Luc Sequenzierung		FBR
Luc197mer	Luc noSTOP rev	GAATTCATTATCAGTGCAATTGTTTTG	FBR
Luc371mer	Luc noSTOP rev	GTCGCTTCAAAAAATGGAACAAC	FBR
Luc420mer	Luc noSTOP rev	CCAGAATGTAGCCATCCATCCTTG	FBR
LucFLnoTAA_R	Cterm FFLuc noSTOP	CAATTTGGACTTTCCGCCC	FBR
pET15b_T7_F	T7 prom in pET15b	GAT CTC GAT CCC GCG AAA TTA ATA CG	FBR
XhoI_pET15b_R	T7 term in pET15b	GGATCCTCGAGGATCCTTATTAC	FBR
pET15ext_aSyn_R	T7term für aSyn	GGATCCTTATTACGCTTCAGGCTCATAGTCTTG	FBR

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. DNA-Klonierung, Transformation, Plasmidpräparation

Zu klonierende Inserts wurden per PCR oder Plasmidpräparation amplifiziert. Nach Restriktionsverdau des Inserts und des Zielvektors mit entsprechenden Endonukleasen (NEB Inc.) und dephosphorylierung des linearen Plasmids wurden alle Fragmente elektrophoretisch getrennt und aus dem Agarosegel eluiert (Qiagen kit). Die Ligation von Insert und Plasmid erfolgte generell im Verhältnis von 1:2 mit 40 U T4 Ligase (NEB Inc.) für 15-30 min bei RT in o.g. Quick ligation buffer (66 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 7.5% PEG 6000).

Für die Transformation wurden chemisch oder elektro-kompetente *E. coli* Zellen mit Plasmid DNA oder dem Ligationsansatz versetzt und DNA nach Standardprotokollen eingebracht (Sambrook 2001).

2.6.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA Sequenzen zur Klonierung oder zur späteren *in vitro* Transkription (siehe 2.6.3) wurden mit PCR nach Standardprotokollen für die DNA-Polymerase Herculase (Stratagene) amplifiziert. Ein typischer 50 µl PCR-Ansatz enthielt ca. 40 ng template DNA, 50 pmol von jedem Primer, 200 µM dNTPs /jeweils), 1X Enzympuffer und 1 µl Herc Pol. Ein typischer Thermozyklus war wie folgt: Denaturierung bei 94°C, 3 min → [94 °C,45 s → 55 °C for 45 s → 72 °C 45 s - 120 s]_n → 72°C, 3 min. Es wurden n = 25-30 Zyklen amplifiziert.

2.6.3. *In vitro* Transkription

Zur Erzeugung von bakterieller mRNA zur *in vitro* Translation wurde 1 µg PCR DNA als Vorlage zur *in vitro* Transkription mit dem MEGAscript kit (Ambion) verwendet. ATP, CTP, GTP und UTP wurden jeweils mit 7.5 µM eingesetzt und die Transkription mit T7 RNA Polymerase (Enzymgemisch 1:10) bei 37°C über 4-5 h durchgeführt. Durch Zugabe von 0.2 U/µl DNaseI wurde die DNA Vorlage verdaut, und die synthetisierte RNA mit dem RNeasy kit (Qiagen) isoliert. Eukaryotische, 5'-[m⁷G]-cap mRNA wurde entsprechend den Herstellerangaben mit dem mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion) hergestellt und ebenfalls mit dem Rneasy Kit gereinigt. Die Größe der RNA-Produkte wurde in denaturierenden Formaldehyd/Agarose-Gelen mit Ethidiumbromidfärbung überprüft. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm und die Reinheit über das Verhältnis 260 nm / 280 nm bestimmt.

2.6.4. *In vitro* Translationssysteme

Zellfreie Translationssysteme werden aus dem Überständen einer Zentrifugation (S30 Fraktion bzw. S100 Fraktion ergänzt durch isolierte Ribosomen) von Zellextrakten präpariert, welche frei von endogener DNA und mRNA sind, aber Ribosomen, alle Enzyme, Translationsfaktoren und tRNAs für die Proteinsynthese beinhalten. Bakterielle Translationssysteme enthalten natürlicherweise RNA-Polymerase zur Kopplung von Transkription und Translation. Allerdings wird zur höheren Ausbeute sowohl bakterielle als auch eukaryotische *in vitro* Translationssysteme mit S6 oder T7 RNA Polymerase supplementiert, um Vorlagen mit entsprechendem Promotor gekoppelt zu translatieren.

Durch Optimierung der Konzentrationen von essentiellen Nukleotiden, Aminosäuren, Salzen (v.a. Mg²⁺) und Energie-regenerierenden Systemen lässt sich eine erhöhte

Translationseffizienz in Lysate erreichen. Um die Faltungseffizienz von Proteinen zu steigern, werden zusätzlich zu den endogenen Chaperonsystemen weitere Chaperone supplementiert (Kolb, Makeyev et al. 2000; Mattingly, Yanez et al. 2000).

Die gängigsten kommerziellen Systeme aus *E. coli*, Kaninchen-Reticulozyten (RRL) oder Weizenkeimen (WG). Das hauptsächlich in dieser Arbeit verwendete Lysat ist das *E. coli* Lysat *Rapid Translation System* RTS100 (Roche Diagnostics, Mannheim).

2.6.5. Bakterielle *in vitro* Translation

Zur *in vitro* Translation wurde das kommerzielle bakterielle Lysat RTS100 verwendet (Roche). Die Herstellerangaben zur Rekonstitution und Mischung der Komponenten wurden an die experimentellen Erfordernisse angepasst und optimiert. Als Vorlage für die *in vitro* Translation dienten entweder 0.5-1 µg / 50 µl PCR DNA oder 100 nM – 2.5 µM *in vitro* transkribierte mRNA (Kap. 2.6.3). Einer typischen Reaktion mit 50 µl Gesamtvolumen wurden weiterhin 1 mM Met, 0.4 U/µl RNAGuard (GE Healthcare), 17 µM antisense-ssrA oligo, 0-2.5 mM MgCl₂, und 25 µL rekonstituiertes *E.coli* S30 Lysat mit tRNA, Aminosäure- und NTP-Gemischen zugegeben. Zur radioaktiven Markierung der Reaktionsprodukte wurde unmarkiertes Met durch 0.2 µCi/µl [³⁵S]-Met ersetzt. Die Reaktionen wurden bei 30°C während 20-60 min durchgeführt und durch die Zugabe von 100 µg/ml Chloramphenicol (Cam) für 10 min bei 4°C, 200 µg/ml Puromycin (Prm) für 5 min bei 30°C, oder mit 100 µg/ml RNase A und / oder 10 mM EDTA gestoppt. Zur Abzentrifugation von größeren Aggregaten wurde die Probe nach der Translationreaktion für 10 min mit 20000 g bei 4°C zentrifugiert.

2.7. Polysomenpräparation aus *E. coli* spheroplasten

Luc und Luc-SecM-GFP wurden in *E. coli* MC4100 durch Induktion mit 0.5% Arabinose für 30-120 min bei 30°C exprimiert. Zur Ernte wurden die Zellen rasch auf 4°C heruntergekühlt, kurz zentrifugiert und in 50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.5 M Saccharose, 100 µg/ml Cam resuspendiert. Lysozym (Sigma) wurde mit einer Endkonzentration von 0.8 mg/ml zugegeben und für 5 min bei 4°C inkubiert, gefolgt durch eine Inkubation mit 2.5 mM EDTA für 5 min bei 4°C. Die Suspension wurde in 50 mM Tris-Cl (pH 8.0) verdünnt und für weitere 5 min bei 30°C inkubiert, bevor die Spheroplasten durch Zugabe eines gleichen Volumens Lysepuffer

(50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 5 mM MgSO₄, 0.2% Triton X-100, 5 U/ml DNase I, 100 µg/ml Cam) lysiert wurden. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden Zellreste bei 20.000 g zentrifugiert bevor das Lysat per SDS-PAGE oder Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe Abschnitt 2.9) analysiert wurde. Typischerweise wurden dazu 50-100 µl des zu analysierenden Translationslysats vorsichtig und mittig auf den Sucrose-Gradienten aufgetragen und für 75 min bei 200000 g (Beckman SW41 Ti) und bei 4°C zentrifugiert.

2.8. U-87MG Zellkultur, Vitrifizierung und Polysomenpräparation

Die humane Glioma Zelllinie U-87 MG (freundliche Gabe von Günther Bernhardt, Institut für Pharmazie, Uni Regensburg) wurde bei 37°C and 5% CO₂ in DMEM (Gibco) mit 10% FCS und Antibiotika kultiviert. Die Zellen wurden trypsinisiert und auf glimm-entladenen *holey carbon* Gold EM *grids* (C-flat 2/1, Protochips, Inc.) pipettiert. 2 d später, wurden die *grids* nach Zugabe von 10 nm BSA-belegtem Kolloidgold in flüssigem Ethane vitrifiziert. Als Negativekontrolle für Polysomenbildung, wurde vor dem Vitrifizieren 100 µg/ml Prm für 10 Minuten in das Zellmedium gegeben.

Zur Polysomenextraktion wurden U-87 MG Zellen wie oben zu subkonfluenten Dichten kultiviert. 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) oder 100 µg/ml Prm wurden 10 min vor der Ernte zum Medium gegeben. Die Zellen wurden rasch gekühlt, mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 4°C trypsiniert. Zu CHX-behandelten Zellen wurde auch zum Wasch- und Trypsin-Puffer 100 µg/ml CHX gegeben. Die Zellen wurden dann bei 125 g pelletiert und in 125 µl Puffer R resuspendiert (20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 U/µl RNAGuard). Die Lyse erfolgte nach Zugabe eines gleichen Volumens von Puffer R mit 1 % Triton-X100, 2 % Tween und Inkubation für 15 min bei 4°C. Die Nuklei wurden dann bei 220 g für 5 min pelletiert und der Überstand bei 20000 g für 10 min bei 4°C von weiteren makroskopischen Aggregaten geklärt. Kontrollproben wurden mit 15 mM EDTA unmittelbar vor Auftragen auf den Dichtegradienten behandelt. 200-300 µl Überstand wurde auf einem 10-50% Saccharosegradienten durch Ultrazentrifugation in einem SW41Ti Rotor (Beckman) bei 200,000 g / 90 min / 4°C aufgetrennt.

2.9. Dichtegradientenzentrifugation

Große makromolekulare Komplexe können durch Sedimentation in einem Dichtegradienten per Ultrazentrifugation entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt werden. Bakterielle Polysomen wurden auf 10-40% (w/v) Sucrose-Gradienten in 20 mM Tris·HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl und 2 mM DTT getrennt. Eukaryotische Polysomen wurden auf 10-50% (w/v) Sucrose-Gradienten in 20 mM HEPES pH 7.5, 80 mM KOAc, 1.5 mM MgOAc, und 2 mM DTT getrennt. Zur Herstellung der Gradienten werden die Zentrifugenröhrchen (Seton) zur Hälfte mit 10% Sucrose befüllt und mit 40% bzw. 50% Sucrose unterschichtet. Ein mit linearer Konzentrationsverlauf wird mit dem GradientMaster System (BioComp Instruments, Kanada) unter kontrollierter Kippung und Rotation der

Röhrchen erzeugt. Nach Ultrazentrifugation mit langsamer Beschleunigung und Bremsung erfolgte die Elution von oben nach unten mit dem Gradient Master System (Biocomp, Canada). Chromatogramme wurden mit einem EM-1 Econo UV Detektor (BioRad) bei 254 nm aufgenommen und mit einem DI-148U Digitalwandler (DataQ Instruments, USA) digitalisiert. Fraktionen von ca. 800 µl wurden mit einem FC203B Fraktionskollektor (Gilson, USA) gesammelt.

2.10. Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltrations- oder Größenausschluss-Chromatographie werden Proteinproben und Lysate entsprechend des hydrodynamischen Radius ihrer Komponenten aufgetrennt. Gelfiltrationssäulen lassen sich manuell oder maschinell mit verschiedenen Matrix-Materialien befüllen, wobei es sich zumeist um derivatisierte Sepharose handelt. In dieser Arbeit kamen fertig gepackte Superose 6, Superose 12, Superdex 200 und Superdex 75 Säulen (GE Healthcare, Deutschland) zum Einsatz.

25 – 50 µl von Translationslysaten wurden auf einer Superose 6 Säule in 20 mM Hepes pH 7.5, 100 mM KOAc, 14 mM MgOAc, 2 mM DTT in einem SMART Chromatographiesystem aufgetrennt und fraktioniert. Zur Analyse durch Western blotting oder Autoradiographie wurden die Fraktionen TCA-präzipitiert, 2x mit Aceton gewaschen und in SDS-Ladepuffer aufgenommen.

2.11. Elektronenmikroskopie

2.11.1. Negativkontrastierung

Zur raschen Überprüfung der Qualität von gereinigten Proben wurden diese auf einem Kohlefilm mit Uranylacetat gefärbt, getrocknet und mit einem RT-Halter in einem CM200 FEG Instrument (Philips/FEI) bei 160 kV untersucht. Dafür wurden auf einem Parafilm o.ä. 5 μ l der Probe aufpipettiert und das *grid* vorsichtig auf das Tröpfchen gelegt. Nach 1 min bei RT wurde das *grid* mit einem Filterpapier abgezogen und auf einen weiteren 5 μ l großen Tropfen mit Waschpuffer (dH₂O oder 10 mM Hepes, PH 7.5, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) gelegt. Wiederum nach 1 min bei RT wurde der Waschpuffer abgezogen und mit 5 μ l 2% UOAc ersetzt. Nach nochmals 60 s Inkubation wurde die UOAc-Lösung abgetupft und der Kohlefilm getrocknet.

2.11.2. Vitrifizierung von biologischen Proben

Lysate, gereinigte Proben oder Zellen wurden zur Kryoelektronenmikroskopie vitrifiziert. Typischerweise wurden hierzu *holey carbon grids* (Quantifoil GmbH, Deutschland) mit einer Maschenweite (des Kupfergitters) von 100 x 400 μ m oder 200 x 200 μ m und einer Lochgröße / einem Lochabstand von 2/1 oder 2/2 μ m verwendet. Die *grids* wurden zur Reinigung im Niedrigtemperaturplasma beglimmt, wodurch der Kohlefilm gereinigt und hydrophilisiert wird. Wenn die Probe zur KryoET vorbereitet wurde, wurden 3-5 μ l kolloidales Gold (5, 8 oder 10 nm) aufgetragen und getrocknet; die Menge an Gold wurde empirisch angepasst, so dass eine gleichmäßig verteilte Partikelzahl im Eis zu finden war. Zur Vitrifizierung wurden ca. 3-5 μ l Probe aufpipettiert und zwischen 0-60 s bei RT inkubiert. Dann wurde das *grid* manuell für 3-5 s mit einem Filterpapier (Whatman) seitlich abgezogen, mit einer Verzögerung von 0-1 s in flüssiges Ethan auf LN₂-Temperatur getaucht und zur

Lagerung in LN₂ überführt. Der Transfer in einen Kryohalter (Gatan) erfolgte ebenfalls in LN₂.

2.11.3. Kryoelektronentomographie und 3D Rekonstruktion

Die Daten für das Projekt mit bakteriellen Polysomen wurden mit einem CM 200 FEG Mikroskop (Philips, NL), das mit einer 4k x 4k Kamera (TVIPS, Gauting, Deutschland) ausgestattet ist, bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV und einer nominellen Vergrößerung auf Bildebene von 54000 und einer Objektpixelgröße von 2.789 Å aufgenommen. Zur Aufnahme von semiautomatischen KryoEM-Kippserien wurde die Software EM Menu V.3 (TVIPS) verwendet. Generell wurde für eine Einzelachsenkippserie ein Intervall von -60 deg bis +60 deg mit Winkelinkrementen von 3 deg durchschritten. Eine automatische Fokussierungs-prozedur wurde auf einen nominellen Unterfokus von $\Delta z = 3.0 \mu\text{m}$ eingestellt.

Die Daten für das Projekt mit humanen Polysomen in Glioblastomzellen wurden durch Lars-Anders Carlson (MPI Biochemie) an einem CM 300 FEG Mikroskop (Philips, NL), welches mit einem Energiefilter (Post-Column GIF2002, Gatan Inc.) und einer 2k x 2k Kamera (Gatan Inc., Pleasanton, CA) ausgestattet ist, bei einer nominellen Vergrößerung von 36500x und einer Pixelgröße von 8.21 Å aufgenommen. Zur Aufnahme von semi-automatischen KryoEM-Kippserien in einem Intervall von -60 deg bis + 60 deg mit einem Inkrement von 1.5 deg wurde die vom Kamera-Hersteller entwickelte Software DigitalMicrograph verwendet. Es wurde ein nomineller Unterfokus Δz von ca. 6 μm eingestellt und per Autofokusprozedur nachjustiert.

Die 3D Rekonstruktion aus Kippserien erfolgte durch das TOM Softwarepaket (Nickell, Forster et al. 2005). Zur Alignierung wurden ins Eis eingebrachte kolloidale Goldpartikel

manuell nachverfolgt und deren Abweichungen von einer linearen Kippgeometrie minimiert. Ein 3D Tomogramm wurde dann aus den *weighted back projections* (WBP) der Kippserie errechnet, wobei ein exaktes Maß von 100-200 nm für die Objektstärke gewählt wurde. Für initiales *template matching* wurden Übersichtsvolumina von 512x512x256 Voxeln rekonstruiert (was einem *binning* von 3 in jeder Dimension, bzw. einer Pixelgröße von 2.24 nm für 4k-Daten und einem *binning* von 1, bzw. einer Pixelgröße von 1.64 nm für 2k-Daten entsprach). Für die spätere Rekonstruktion von ungebinnten Partikeln wurden ungebinnte WBP's erzeugt und Partikel mit einer Boxgröße von 48 oder 96 Pixeln rekonstruiert.

2.11.4. Mustererkennung durch 3D Korrelationsmethoden

Vor der 3D Korrelation mit einer Referenzstruktur wurden alle Volumina entsprechend

$$vol_{norm} = \frac{vol - \bar{\mu}}{\sqrt{\sigma^2}} \begin{cases} vol_{norm}^r(r < -3) = -3 \\ vol_{norm}^r(r > 3) = 3 \end{cases}$$

auf die Standardabweichung normiert und der Kontrastverlauf auf 3σ limitiert. Zur Erzeugung der Referenz-Ribosomenstruktur wurden aus dem atomaren Modell des *E. coli* 70S Partikels (pdb # 2AWB + 2AW7, (Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005)) mit der EMAN-Prozedur `pdb2mrc.py` (Ludtke, Baldwin et al. 1999) ein 3D Dichtemodell erzeugt, das dann mit `tom_rescale3d.m` und `tom_bandpass.m` auf die Objektpixelgröße der rekonstruierten (gebinnten) Tomogramme interpoliert und auf eine Auflösung von ca. 4 nm filtiert wurden. Zur Erzeugung einer eukaryotischen Ribosomenreferenz wurde eine Elektronendichte des Weizen-Ribosoms (EMDB # 1125, (Halic, Becker et al. 2005)) ebenso reskaliert und auf 4 nm Auflösung reduziert.

Die 3D Musterkorrelation, auch *template matching* genannt, erfolgte mit derselben Prozedur wie in (Bohm, Frangakis et al. 2000; Frangakis, Bohm et al. 2002). Der Winkelraum wurde in allen drei Dimensionen ($0 \leq \varphi < 2\pi$, $0 \leq \psi < 2\pi$, $0 \leq \theta \leq \pi$) mit einem Inkrement von 10 deg

abgetastet. Die Kreuzkorrelationsfunktion (CCF) wurde entsprechend der lokalen Normierung wie in (Frangakis, Bohm et al. 2002) beschrieben errechnet. Zum Auffinden korrekt positiver Peaks, wurden Koordinaten- und Winkel-Maxima der CCF mit einem vorgegebenen Minimalradius extrahiert, eine Normalverteilung der Kreuzkorrelationskoeffizienten (CCC's) approximiert und alle Partikel mit $CCC > \mu - 2 \sigma_{std}$ zunächst als Ribosomen angenommen. Häufig war aber eine manuelle Nachkontrolle der Partikelidentität notwendig, da die CCC-Verteilung aus dreierlei Gründen mit falsch positiven Peaks verwechselt war: i. Aufgrund eines niedrigen S/N Verhältnisses bei *template matching* bei niedrigem Kontrast (z.B. in zellulären Tomogrammen), ii. in Bereichen fernab der Kippachse mit hohem Defokusgradienten und iii. bei Korrelation mit kontraststarken kolloidalen Goldpartikeln, Membranen oder anderen Makromolekülen vergleichbarer Form und Größe.

Rekonstruierte Partikel (siehe 2.11.3) wurden im Projekt mit bakteriellen Polysomen (Kapitel 3.1) mit dem Softwarepaket *av3* von F. Förster (MPI Biochemie) und der TOM-Toolbox entsprechend ihres Kreuzkorrelationskoeffizienten iterativ aligniert und klassifiziert, wobei die Startkoordinaten der *template matching* Prozedur zur Erzeugung eines Startreferenz verwendet wurden. Da hierbei vor allem bei niedrigem S/N-Verhältnis die ursprünglich verwendete, externe Referenz ein artefaktbehafteten Einfluss hat, wurde bei der Alignierung der humanen Ribosomen aus zellulärer Umgebung (Kapitel 3.2) mit der *av4* Prozedur (T. Haller, MPI Biochemie, nicht publiziert) nochmals iterativ über den gesamten Winkelraum abgetastet und eine stark filtrierte (Auflösung > 10 nm) Startreferenz verwendet.

2.11.5. Klassifizierung anhand relativer räumlicher Konfiguration

Die Raum- und Winkelkoordinaten alignierter Partikeldatensätze lassen sich bei Kenntnis der Koordinaten in den ursprünglichen Tomogrammen in Relation zueinander analysieren. Hierfür wurden während der Partikelrekonstruktion und der Alignierung sämtliche Partikelindizes, zugehörige Absolutkoordinaten und die jeweiligen Tomogrammindices in einer Motivliste beibehalten.

Zur räumlichen Korrelation der Partikeldatensätze wurden dann zunächst mit der Routine *av3_peakneighbor.m* die Distanzvektoren von den Massenschwerpunkten jedes identifizierten Partikels i eines Tomogramms zu allen anderen Partiken (Schwerpunkten) berechnet, und das nächste (oder zusätzlich zweit-, dritt-,... nächste) Nachbarpartikel k identifiziert. Wichtig für die Vergleichbarkeit aller Partikel ist eine Rückrotation der Abstandsvektoren in die Referenzorientierung mit dem invertierten Winkelsatz $(-\psi, -\varphi, -\theta)_i$ des zentrierten Ribosoms i .

Auf die selbe Weise lassen sich Distanzvektoren zu beliebigen weiteren Punkten (außerhalb des Massenzentrums) im Nachbarpartikel errechnen, wobei die Beschreibung dreier Vektoren vom Zentrum des Partikels i ausreichend ist für die eindeutige Beschreibung der Nachbarkonfiguration (Abb. 16). Die Nachbarkonfiguration kann außerdem durch die Errechnung des Distanzvektors der Zentren $\Delta(x,y,z)_{i,k}$ und einem relativen Winkelsatz $(\varphi, \psi, \theta)_{i,k}$ beschreiben werden. Der relative Winkelsatz errechnet sich aus der mit der invertierten Rotation des Partikels i transformierten Rotationsmatrix R_k . Die Verteilung der nächsten Nachbarn im Koordinaten und Winkelraum wird im Weiteren mit dem Begriff *next neighbor distribution* (NND) bezeichnet.

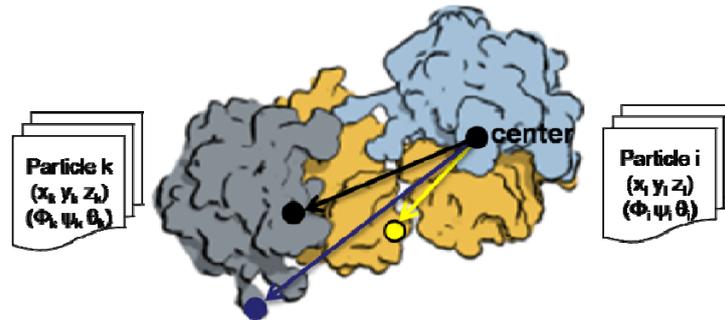


Abb. 16 Berechnung der Verteilung der nächsten Nachbarn, schematisch. Zwischen einem Partikel i und dem nächsten Nachbarn k sind entweder drei Distanzvektoren ($\bullet, \bullet, \bullet$), oder 1 Distanzvektor und 1 relativer Winkelsatz hinreichend, um die Nachbarkonfiguration eindeutig zu beschreiben.

Bei bevorzugter Positionierung von Nachbarpartikeln sollte es zu einem Clustern der NND kommen, bei gleichzeitiger bevorzugter Orientierung beobachtet man ein Clustern auch der Vektoren außerhalb des Schwerpunkts. Im Eulerraum lässt sich ein Cluster von Relativwinkeln aufgrund der nicht-linearen, diskontinuierlichen Metrik naturgemäß schwieriger darstellen, daher ist die Darstellung der Winkelverteilungen (vgl. 3.1.8 bzw. Abb. 34) nur als Anhaltspunkt zur Abschätzung der Zahl der Cluster, nicht aber als direktes Maß für die Ähnlichkeit von Winkelsätzen geeignet. Zum Abstandsberechnung sowie Interpolation von Winkelsätzen müssen diese deshalb in Quaternionen transformiert werden, was durch die Routinen *av3_eul2quat.m*, *av3_cluster_quaternions.m* und *av3_quat2eul.m* bewerkstelligt wurde.

Für das Clustering der NND wurde in der Prozedur *av3_peakneighbor_kmeans.m* direkt ein *k-means*-Algorithmus (MATLAB[®] *Statistics Toolbox*) zum Auffinden von Klassenelementen und Schwerpunkten verwendet, wenn die Zahl der Cluster unzweideutig war (vgl. 3.1.8).

Eine geeignetere Methode, um natürliche Cluster aufzufinden, vor allem bei breiteren, nicht-globulären NND wie bei dem Datensatz aus humanen Polysomen (vgl. 3.2.6), stellt hierarchisches Clustern dar. Hierzu wurde die NND der nächsten Nachbarribosomen mit einem 7-dimensionalen Satz aus Distanzvektoren und relativen Quaternionen verwendet:

$$NND = \left[\Delta(x, y, z)_{ik} ; \Delta(q_0, q_x, q_y, q_z)_{ik} \right] \quad i = 1 \dots N, k = N \cap i$$

Als Abstandsmetrik *dist* dient sowohl für $\Delta(x, y, z)_{i,k}$ als auch für $\Delta(q_0, q_x, q_y, q_z)_{i,k}$ das jeweilige Skalarprodukt, das mit w_T oder w_R getrennt gewichtet werden kann.

$$dist = w_T \left(1 - \frac{\mathbf{d}_i \cdot \mathbf{d}_k}{|\mathbf{d}_i| |\mathbf{d}_k|} \right) + w_R (1 - \mathbf{q}_i \cdot \mathbf{q}_k)$$

Zur Klassifizierung wurde dies in der Prozedur *pdist_xyzquat* implementiert, zur Clusteranalyse wurden dann *linkage* und *cluster* der MATLAB® *Statistics Toolbox* in die Routine *av3_nnd_cluster.m* eingebunden.

2.11.6. 3D Modelle für Ribosomen, Polysomen, mRNA und naszente Peptide

3D-Modelle der Ribosomen-Struktur wurden mit der Software UCSF Chimera (Pettersen, Goddard et al. 2004) visualisiert und pseudo-atomare Modelle von Ribosomen wurden manuell und per Realraum-Alignierung eingepasst.

Um 3D Modelle für große Polysomen zu erzeugen, wurde die tomographische, gemittelte Struktur des Ribosoms mit den zuvor alignierten Koordinaten und Winkeln in ein artifizielles Volumen platziert. Hierfür wurde eine Plug-in-Prozedur von Julio Ortiz (MPI Biochemie) für 3ds Max ® (Autodesk Inc.) entwickelt, die diese Parameter aus einer alignierten Motivliste einliest und damit Instanzen eines Oberflächenmodells der gemittelten Struktur erzeugt. Ein weiteres Plug-in (Polysome Maker, Julio Ortiz) konnte dazu verwendet werden, die Koordinaten der mRNA Eingänge, *codon recognition sites* und mRNA Ausgänge aller erzeugten Ribosomenmodelle mit einer (grafischen) Repräsentierung zu verbinden, wodurch der Weg des Transkripts durch das Polysom einfach und schematisch nachvollzogen werden konnte.

Ein physikalisch bedeutsameres Modell wurde von Adrian Elcock (U Iowa, USA) entwickelt, wofür 27 Nukleotide an bekannten Koordinaten innerhalb der 30S Untereinheiten platziert wurden (Yusupova, Yusupov et al. 2001) und die Lücken zwischen Polysomalen Nachbarn mit einem *Worm like chain* Modell mit einer Persistenzlänge von 7.9 Å (Vanzi, Takagi et al. 2005) „aufgefüllt“ wurden. Daraus ergaben sich Schätzwerte für die Anzahl der Nukleotidreste, die zwischen polysomalen Nachbarn zu erwarten wären.

Zur Abschätzung der Kontakthäufigkeiten zwischen benachbarten naszenten Peptiden wurden durch A. Elcock simplifizierte, C_{α} -Modelle von *random coil* Peptidkonformeren mit pseudo-atomaren Modellen von 70S Ribosomen in den experimentell gefundenen Koordinaten erzeugt.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Die 3D-Organisation von Bakteriellen Polysomen *in vitro* und *in vivo*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die räumliche Anordnung von Polysomen anhand von bakteriellen *in vitro* Translationssystemen untersucht. Da bisher unbekannt war, ob eine definierte 3D-Anordnung von Polysomen zu finden sei und wie deren Topologie erkannt werden könne, musste zunächst unter definierten Bedingungen eine möglichst homogene Spezies an Polysomen generiert werden. Hierzu wurden einige Parameter darauf optimiert, *in vitro* eine möglichst hohe Dichte von Ribosomen auf der mRNA zu erzielen (siehe 3.1.1). In einem weiteren Schritt wird dann gezeigt, dass zumindest unter bestimmten Bedingungen auch aus aktiv wachsenden *E. coli* Zellen Polysomen ähnlicher oder gleicher Dichte zu isolieren sind (siehe 3.1.6).

3.1.1. Beobachtung von *in vitro* erzeugten Polysomen

Zunächst wurde ein kommerzielles *in vitro* Translationssystem (siehe Material und Methoden) für die Bildung von Polysomen optimiert. Dabei wurde angenommen, dass die Akkumulation von großen, dichten Polysomen bevorzugt sein würde, wenn das Transkript im Überschuss zur Ribosomenkonzentration vorliegt, die Termination der Ribosomen verlangsamt oder verhindert wird, und bei genügend langer Reaktionszeit, während der möglichst viele Ribosomen Initiation und Elongation entlang der mRNA durchlaufen können. Zunächst wurde also versucht, mit einer trunkierten mRNA ohne *stop*-Codon Ribosomen am 3' Ende zu arretieren (*stalling*), wie in Abb. 17 A schematisch dargestellt.

Luc 371 wurde als naszente Kette translatiert, wobei bei verschiedenen mRNA Startkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten Lysat entnommen wurde und auf 10-40%

Saccharose-Gradienten analysiert wurde. Eine geringere mRNA-Startkonzentration von 100 nM resultiert in einem größeren Anteil inaktiver Monosomen, oder kleiner und großer Untereinheiten. Eine wesentlich höhere Konzentration von 2.5 μ M begünstigt die Bildung von kleinen Polysomen oder aktiven Monosomen (Daten nicht gezeigt). Eine kürzere Reaktionszeit führt zu einem geringeren Anteil von großen Polysomen, nach wesentlich längerer Inkubation (z.B. 60 min) wird keine weitere Akkumulation von Polysomen beobachtet (vgl. Abb. 18 B). Im gewählten System zeigt sich, dass bei einer Konzentration von 250 nM mRNA nach 30 min bei 30°C mehr als 50% aller Ribosomen in Polysomen auftreten (Abb. 17 B). Keine oder signifikant weniger Polysomen sind nach kurzer Behandlung mit RNase A (Abb. 17 C) sowie Prm oder in nicht-translatierendem Lysat zu finden (nicht gezeigt).

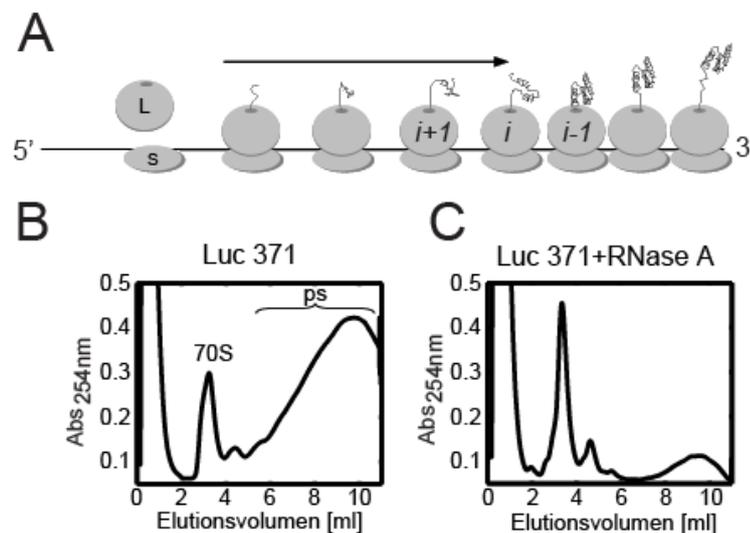


Abb. 17. Arrestierte Polysomen bilden sich *in vitro*.

(A) Schema eines Polysoms. Die Partikelabfolge ist wie im Text bezeichnet mit Indizes ($5' \rightarrow 3'$: $i+1$, i , $i-1, \dots$). L, S: Große (large), und kleine (small) ribosomale Untereinheit. Schwarze Linie: mRNA. Naszente Peptide sind in Schwarz angedeutet.

(B,C) *In vitro* Translationsreaktionen von Luc 371 mRNA mit oder ohne RNase A-Behandlung wurden auf einem Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Die Absorptionsprofile bei 254 nm wurden kontinuierlich detektiert (schwarze Kurve). Die Positionen von 70S Ribosomen und Polysomen (ps) sind eingezeichnet.

3.1.2. Stabile Polysomen-Nascente Ketten-Komplexe *in vitro*

Die Bildung naszenter, nicht-terminierter Peptidketten kann per SDS-PAGE nachvollzogen werden. Durch die Inkorporierung von [³⁵S]Met während der Translation werden radioaktiv markierte Peptide erzeugt, die bei fehlender Termination eine Größenverschiebung von ca. 20 kDa bei der SDS-PAGE aufweisen, bedingt durch eine kovalente Verbindung zur tRNA des letzten Codons an der P-Stelle.

Dabei ist es entscheidend, die im *E. coli* Lysat endogene tmRNA zu inhibieren, die ansonsten arretierte Ribosomen von der mRNA dissoziieren und die naszente Kette zum ssrA-vermittelten Abbau markieren würde (vgl. 1.6). Durch Zugabe eines der kodierenden Sequenz der tmRNA komplementären Oligonukleotids werden arretierte Ribosomen-Nascente-Ketten Komplexe (RNCs) stabilisiert, wie für Luc 371 mRNA gezeigt (Abb. 18).

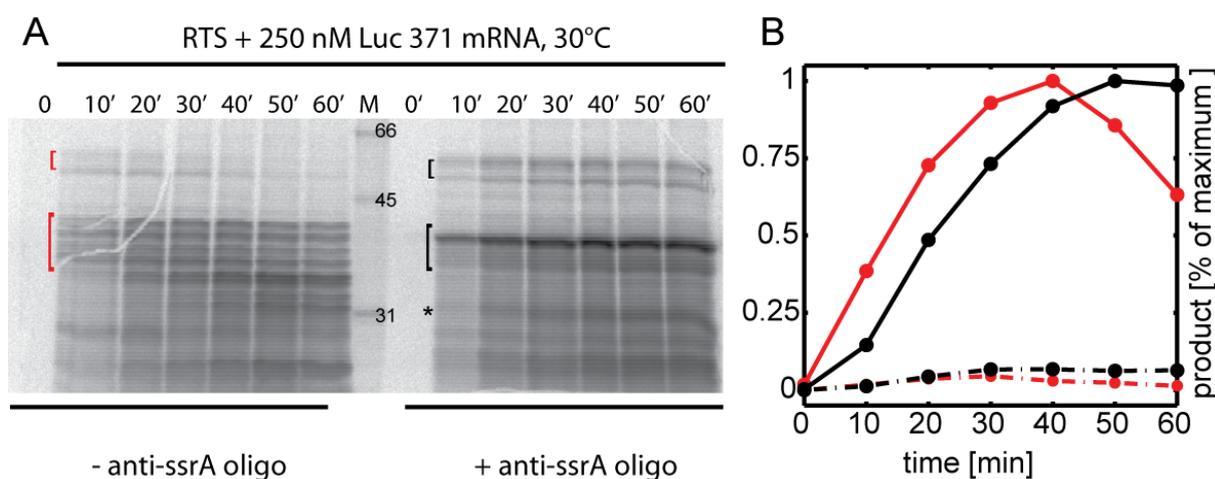


Abb. 18 Die Inhibition des ssrA-Systems stabilisiert naszente Ketten und verhindert vorzeitige Termination. (A) Luc 371 wurde mit (rechts) und ohne (links) ein zur tmRNA komplementäres Oligo translatiert. Fehlt das Oligo kommt es durch trans-translation der tmRNA zur Markierung des arretierten Peptids mit einem ssrA-Signalpeptid. Früher Translationsabbruch oder interner Arrest führen zu kürzeren Produkten (*). (B) Der entsprechende Zeitverlauf der *in vitro* Translation naszenter Ketten (durchgehende Linien), bzw. der hydrolysierten Peptids (gestrichelt) ist für die Reaktion ohne (●) oder mit anti-ssrA Oligo (○) Graphen dargestellt.

Bei der Translation von trunkierter mRNA für Luc 197, Luc 371, (Luc 420, nicht gezeigt) und Luc 550 während 30 min bei 30°C lassen sich die Banden der hydrolysierten freien Peptide bei 21, 41, bzw. 60 kDa detektieren (**Abb. 19**, Bahnen 1-3). Zusätzlich sieht man die Banden der nicht-hydrolysierten peptidyl-tRNAs bei ca. 40, 60, bzw. 80 kDa (**Abb. 19**, Bahnen 1-3, >). Wird ein Luc Vollängen-Transkript mit Stop-Codon translatiert, ist peptidyl-tRNA ebenso zu detektieren, allerdings in wesentlich geringerem Anteil verglichen mit Luc 550 (**Abb. 19**, Bahn 4).

Die RNCs können zu Ende der *in vitro* Translation durch die Zugabe von EDTA und RNase A zerstört werden, wobei das 70S Ribosom in seine Untereinheiten dissoziiert und sein rRNA-Anteil hydrolytisch verdaut wird. Es verbleiben dann nur noch die hydrolysierten Peptidketten (**Abb. 19**, Bahnen 5-8).

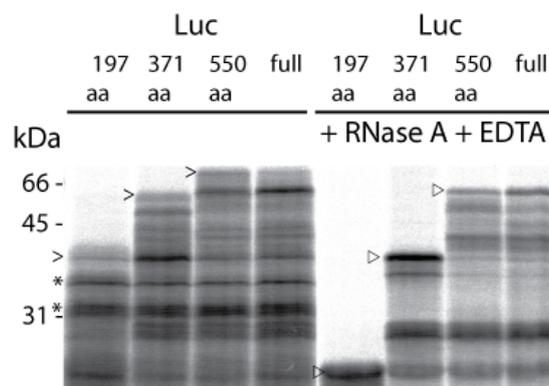


Abb. 19 *In vitro* stalling verschiedener naszenter Ketten von Luc in Polysomen. Gezeigt ist ein Autoradiogramm von [S35]Met-markierten naszenten Ketten von verschiedener Länge wie angegeben. Die peptidyl-tRNA gebundenen Vollänge-Ketten (>) sind nach RNase-Verdau+EDTA (rechts) hydrolysiert und laufen dann auf Höhe der erwarteten Molekulargewichte (▷). Weitere Banden (*) stellen Polysomen-gebundene, intern arretierte naszente Ketten dar, die nach Verdau ebenfalls nicht mehr zu sehen sind.

RNCs können auch durch die Wirkung des Nukleosid-Antibiotikums Puromycin (Prm) dissoziiert werden: Prm imitiert strukturell das 3'-CCA-Ende einer Tyrosin-tRNA, das dem aktiven Zentrum der Peptidyl-Transferase zugänglich ist, wodurch die elongierende

Peptidkette kovalent an den Pseudoaminosäurerest des Prms transaminiert wird. Diese Reaktion erfordert, wie eine normale tRNA-Translokation, die GTPase-Funktion von EF-G und resultiert letztlich in der Dissoziation der Peptidkette vom Ribosom (vgl. Abb. 21 C, unteres Gel).

3.1.3. Trennung von Polysomen und Monosomen mit Gelfiltration

Um zu zeigen, dass die naszenten Peptidketten stabil an den generierten Polysomen haften, wurden die *in vitro* Reaktionsansätze per Gelfiltrationschromatographie analysiert. Auf einer Superose 6 Säule mit weitem Trennbereich eluieren alle Spezies, die deutlich größer als ein 70S Ribosom sind, im Ausschlussvolumen, wohingegen einzelne Ribosomen im Trennbereich der Säule eluieren. Niedermolekulare Spezies wie monomere Peptide / Proteine migrieren bedeutend langsamer durch die Säulenmatrix.

Bei der Auftrennung von [³⁵S]Met-markierten Luc 371 RNCs eluieren sämtliche polysomalen Spezies (Disomen, Trisomen, Tetrasomen, ...) vor dem Peak der Monosomen (Abb. 20, unten). Naszente Peptidketten an Polysomen können prinzipiell den gesamten Längenbereich von N-terminalen Polypeptiden bis zum Vollängen-Produkt repräsentieren, was sich in einem verschmierten Bandenmuster unterhalb des Vollängen-Peptids, bzw. der peptidyl-tRNA widerspiegelt (Abb. 20, oben). Die Polysomen können nach der Reaktion wiederum durch EDTA und RNaseA-Behandlung (Abb. 20, mittleres Feld) oder die Zugabe von Prm (Abb. 21 A,C) dissoziiert werden.

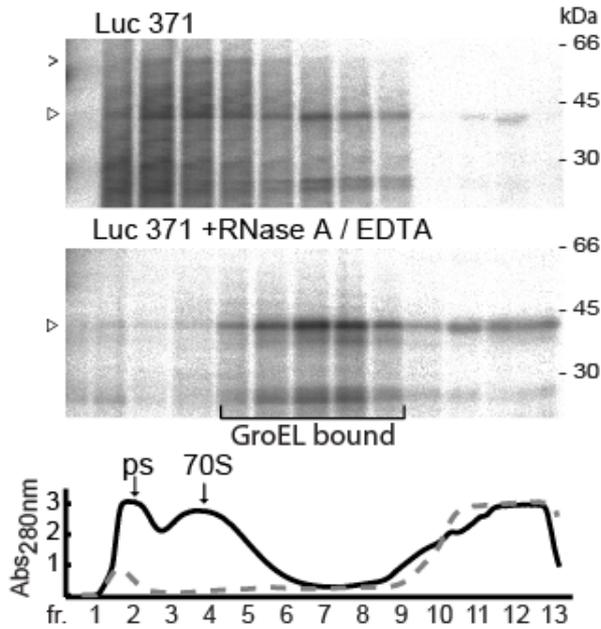


Abb. 20 *In vitro* generierte arretierte Polysomen tragen nascente Peptidketten.

Luc 371 wurde mit radioaktiver Markierung translatiert und ohne (oberes Gel) oder mit RNaseA und EDTA Behandlung (unteres Gel) per Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt und mit SDS-PAGE. Die Präsenz von Ribosomen mit naszenten Ketten wird durch die Beobachtung von peptidyl-tRNA (>) angezeigt, die ca. 20 kDa oberhalb des hydrolysierten Vollängenproduktes (▶) läuft. Die Cofraktionierung von GroEL-assoziierten Luc 371 Ketten ist mit einer Klammer angezeigt.

Im unteren Panel ist das den beiden Läufen entsprechende Absorptionsprofil bei 280 nm gezeigt (schwarze Linie, Luc 371 Translation; gestrichelte graue Linie, mit RNase A/EDTA Behandlung).

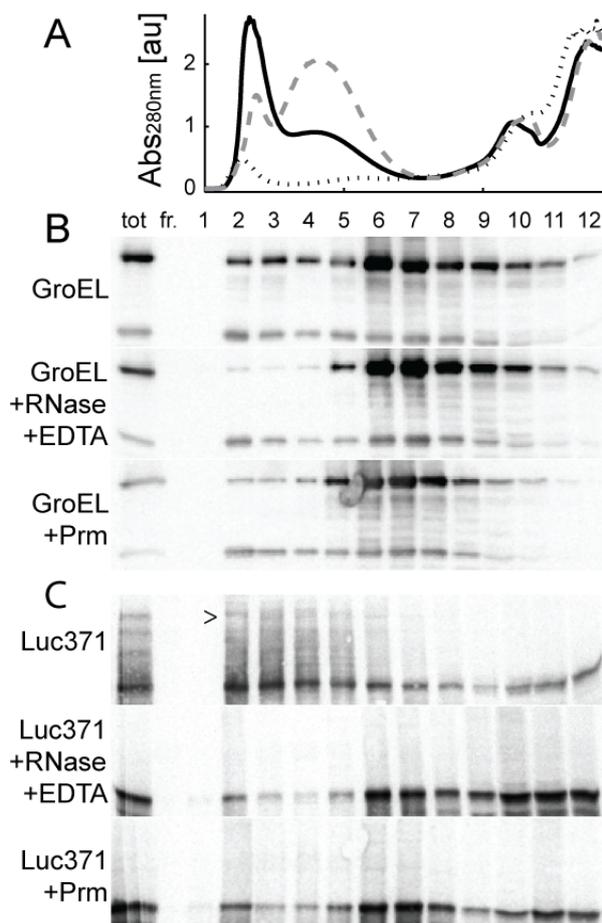


Abb. 21 Das Chaperonin GroEL bindet hydrolysierte Luc371-Peptide.

(A) Elutionsprofil (280 nm) einer Superose 6 SEC mit 50 μ l *in vitro* Translationsreaktionen mit Luc 371 mRNA (—), +RNase/EDTA (···) oder +Prm(---).

(B) anti-GroEL WB der Fraktionen (fr.) deuten auf eine co-migration mit freigesetzten Luc371-Ketten hin. Möglicherweise co-migriert GroEL auch mit einem Teil der RNCs in der unbehandelten Translationsreaktion (oberes Gel, fr. 2-4).

(C) S^{35} -Autoradiogramm der Fraktionen (fr.) zur Detektion von Luc371. Peptidyl-tRNA (>) wird nicht in Fraktionen von RNaseA/EDTA-behandelten (Mitte) oder Prm-behandelten Proben (unten) detektiert. GroEL-ungebundene Luc371 migriert in Fraktionen 10-12.

Die hydrolysierten Peptidketten co-eluieren in diesem Fall größtenteils mit dem endogenen Chaperonin GroEL (Abb. 20, fr. 5-8), das durch *Western blotting* (WB) detektiert wurde (Abb. 21 B). Dies deutet darauf hin, dass das Produkt keine native Struktur einnimmt und freie Luc-Peptide von GroEL gebunden werden (Abb. 21 C).

Im Gegensatz zur Zentrifugation im Saccharose-Gradienten kann die eluierte Probe von der Gelfiltrationssäule unmittelbar ohne Dialyse für die KryoET vitrifiziert werden. Um die Anwesenheit von Polysomen zu belegen, wurden die entsprechenden Fraktionen mit KryoET untersucht. Wie erwartet finden sich im Ausschlussvolumen dichtgepackte Gruppen von Ribosomen, bzw. Polysomen (Abb. 22, fr.2), wohingegen die zweite Peakfraktion (Abb. 22, fr.4) größtenteils einzelne Ribosomen enthält.

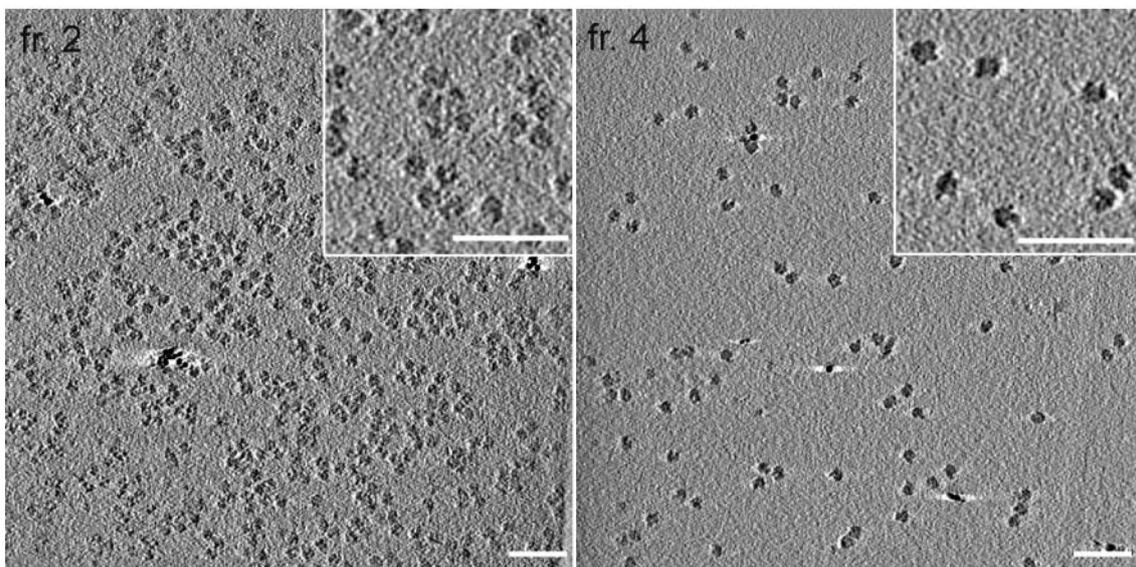


Abb. 22 Bakterielle Polysomen können per Gelfiltration von Monosomen getrennt werden. Dargestellt sind z-Schnitte aus tomographischen Rekonstruktionen der vitrifizierten Fraktion 2 (links, Polysomen) und Fraktion 4 (rechts, größtenteils Monosomen). Die Proben entsprechen jenen in Abb. 20. Jeweils rechts oben sind Ausschnitte vergrößert dargestellt. Skalenbalken, 100 nm.

In Kombination mit den obigen Experimenten ist damit erwiesen, dass sich unter den gewählten Bedingungen bei der *in vitro* Translation stabile RNCs in Polysomen bilden, die

bei genügender Verdünnung klar von einzelnen Ribosomen unterscheidbar sind. Für die weitere Untersuchung der nativen Polysomenstruktur unmittelbar bei der Translation wurden daher unfraktionierte Proben verwendet, da damit die größtmögliche Integrität gewährleistet ist.

3.1.4. Polysomen in Tomogrammen von vitrifiziertem Translationslysat

Unfraktioniertes Translationslysat wurde nun vorverdünnt vitrifiziert und mit KryoET untersucht. In Tomogrammen von Translationsansätzen mit trunkierter mRNA für Luc 197, Luc 371 und Luc 550 sind ribosomale Partikel in charakteristischen, aber heterogenen „doppel-reihigen“ oder helikalen Anordnungen zu finden, die Polysomen repräsentieren (Abb. 23 A-C, Pfeile). In Negativkontrollen, die zu Ende der Translationsreaktion kurz mit RNase A behandelt wurden, lösen sich sämtliche Polysomen auf (Abb. 23 D), ebenso sind die charakteristischen Anordnungen nicht nach Prm-Behandlung oder in nicht-translatierenden Lysaten zu finden (nicht gezeigt).

Mit Luc 371 und Luc 550 mRNA (Abb. 23 B,C) befindet sich die Mehrzahl der großen Polysomen ungefähr in einer Ebene, die rechtwinklig zur tomographischen Z-Achse verläuft und fast parallel zur Eisfläche orientiert ist. Beispiele kleinerer Polysomen wurden in Lysaten mit Luc 197 (Abb. 23 A) oder Luc 371 (Abb. 23 B) auch in vertikaler, helikaler Anordnung beobachtet. Es soll angemerkt werden, dass auch dichtere Agglomerate von Ribosomen in Tomogrammen gefunden wurden, die nicht eindeutig als einzelne Polysomen von zufälligen Anhäufungen (z.B. am Lochrand des Kohlefilms) unterschieden werden konnten. Bei geringerer lokaler Ribosomendichte waren Polysomen aber zumeist deutlich als solche erkennbar.

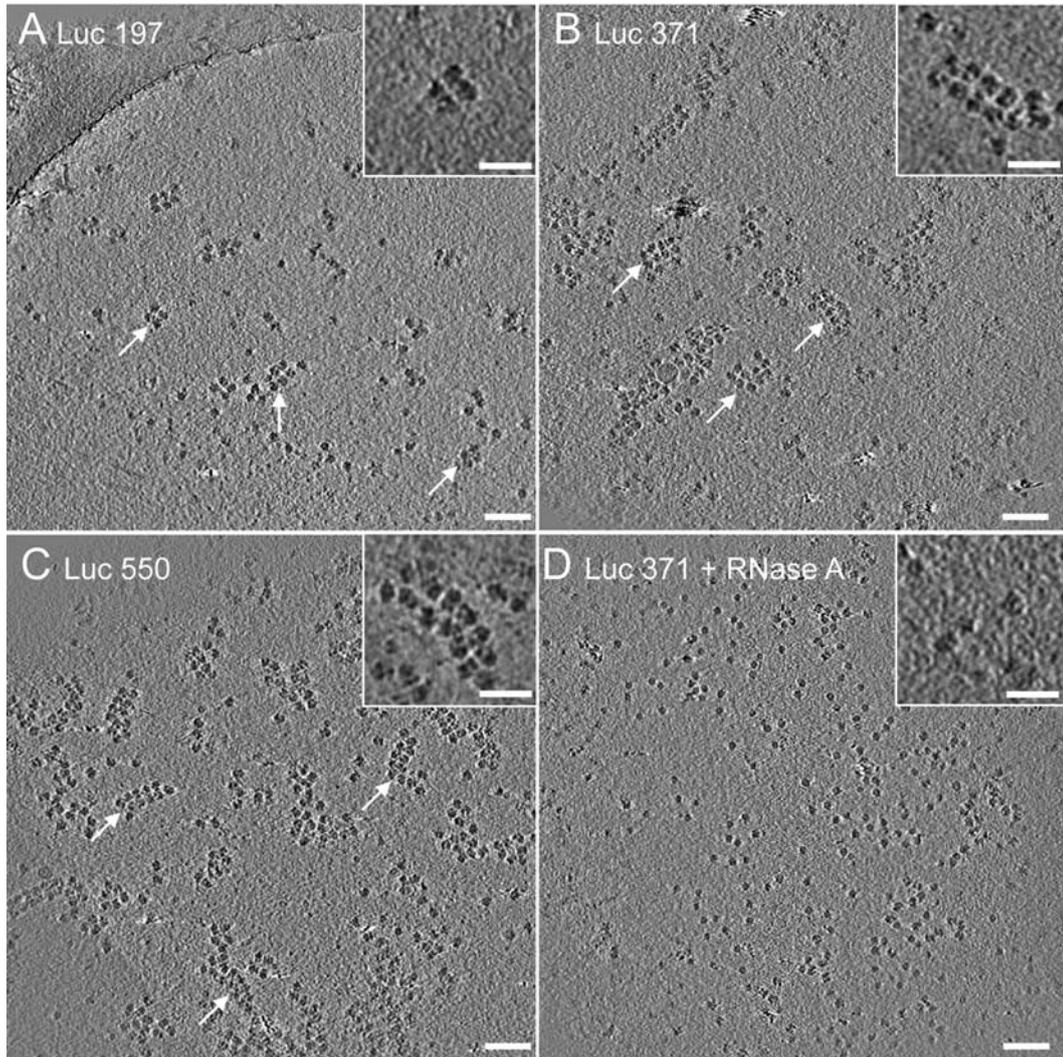


Abb. 23 Polysomen in Tomogrammen von unfraktionierten *in vitro* Translationsreaktionen

(A-D) Z-Schnitte von Tomogrammen vitrifizierten *E. coli* Lysats nach der Translation von trunkierter mRNA für Luc 197 (A), Luc 371 (B, D) und Luc 550 (C). Die Translationsreaktion in (D) wurde vor der Vitrifizierung für 1 min mit RNase A behandelt (Skalenbalken, 100 nm). Beispiele von beobachteten Polysomen sind mit weißen Pfeilsymbolen gekennzeichnet. Vergrößerte representative Beispiele sind jeweils oben rechts hervorgehoben (Skalenbalken, 50 nm).

In Ansätzen in denen Vollängen-Luc mit Stop-Codon translatiert werden, sind ähnliche Ribosomenanordnungen zu finden, jedoch mit etwas höherer Variabilität in ihrer Größe und Gesamtstruktur (vgl. Abb. 26 A). Dies könnte sich dadurch erklären, dass sich in Lysaten, die das Vollängen-Konstrukt translatieren, ein Gemisch von initierenden, elongierenden und

terminierenden Ribosomen befinden, wohingegen trunkierte mRNAs arretierte, dicht gepackte Polysomen an ihrem 3'-Ende akkumulieren sollten.

3.1.5. Die Polysomentopologie ist unabhängig von ORF-Länge und -Sequenz

Die Zahl der Ribosomen in Polysomen wurde in Tomogrammen und Einzelprojektionen bestimmt, in denen polysomale Anordnungen deutlich und getrennt voneinander erkennbar waren. Für Translationsreaktionen mit Luc 197, Luc 371 und Luc 550 wurde die durchschnittliche Zahl von Ribosomen pro Polysom auf 4 ± 1 , 8 ± 2 , and 11 ± 2 bestimmt (Abb. 24 A-C). Wie oben angemerkt wurden unspezifischere Agglomerate von Ribosomen, die nicht als einzelne Polysomen erkennbar waren, nicht in die Quantifizierung mit eingeschlossen. Desweiteren sind kleinere polysomale Arrangements (Di-, Tri- oder Tetrasomen, v.a. bei Luc 197) häufig erst bei höherer Verdünnung klar von Monosomen unterscheidbar.

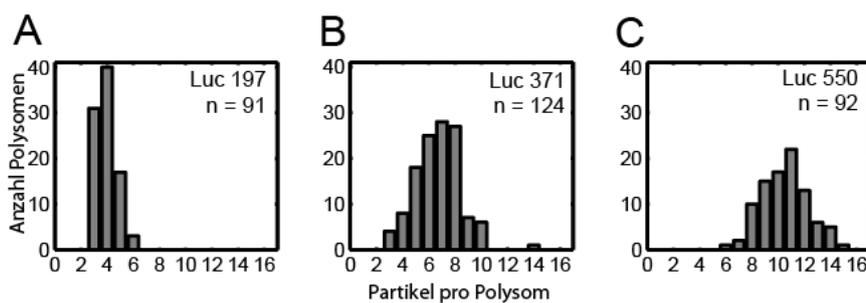


Abb. 24 Die Größenverteilung von Polysomen ist ungefähr proportional zur Transkriptlänge. Die Balkendiagramme stellen ein Histogramm der gezählten Ribosomen (x-Achsen) pro Polysom auf, womit sich eine Abschätzung der Größenverteilung für Polysomen in Translationslysat mit (A) Luc 197, (B) Luc 371 oder (C) Luc 550 mRNA ergibt. Umfang der jeweiligen Probe, n.

Um zu prüfen, ob die Art und Primärsequenz einen Einfluss auf die Bildung dichter Polysomen haben, wurde die Bildung von Polysomen mit Vollängen- und stalling-Modellkonstrukten von *E. coli* Galactitol-1-Phosphate Dehydrogenase (GatD), *E. coli* Enolase (Eno), oder *E. coli* Methionin-Adenosyltransferase (MetK) nachvollzogen (**Abb. 25 A**). Die mRNA für alle Konstrukte wurde ebenfalls mit dem T7-Promotor (pET15b) transkribiert, enthielt also dieselbe 5'UTR wie die Luciferase-Konstrukte. In Translationsansätzen mit allen sechs mRNAs (GatD, Eno, MetK jeweils mit und ohne Stop Codon) lassen sich große Polysomen im Dichtegradienten detektieren (**Abb. 25 B**).

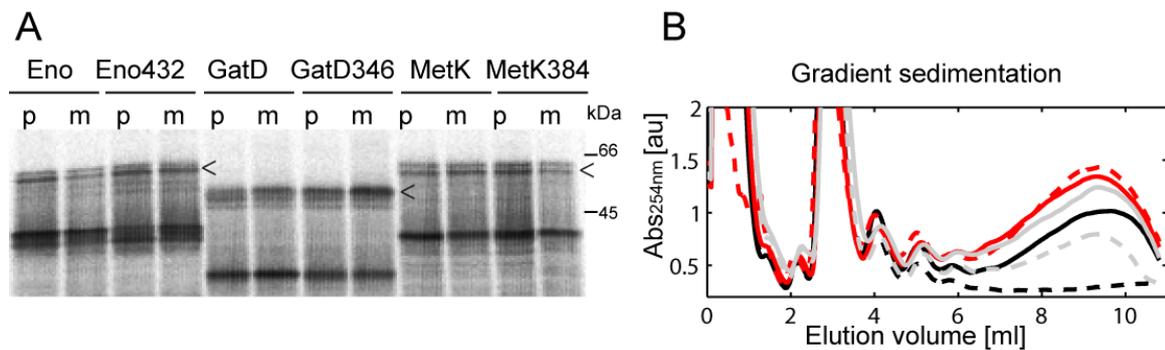


Abb. 25 Arretierte Polysomen bilden sich mit Eno, GatD, MetK-Konstrukten.

(A) Translationstest für 30 min bei 30°C /von Eno, Eno384 (kein STOP), GatD, GatD346 (kein STOP), MetK, MetK384 (kein STOP) mit PCR-DNA (p) oder mRNA (m). P-tRNAs (<) sind für alle Konstrukte unabhängig von STOP-Codons zu detektieren. (B) Gradientensedimentation von 50 µl RTS-Reaktionen wie in (A) mit mRNA für Eno (••), Eno 432 (—), GatD (••), GatD346(—), MetK(••), MetK384(—).

In Tomogrammen von Ansätzen mit trunkierter mRNA für naszente Ketten von GatD364 wurden Polysomen in dichter Anordnung gefunden (Abb. 26 B), ebenso in Einzelprojektionen mit allen anderen Konstrukten (nicht gezeigt).

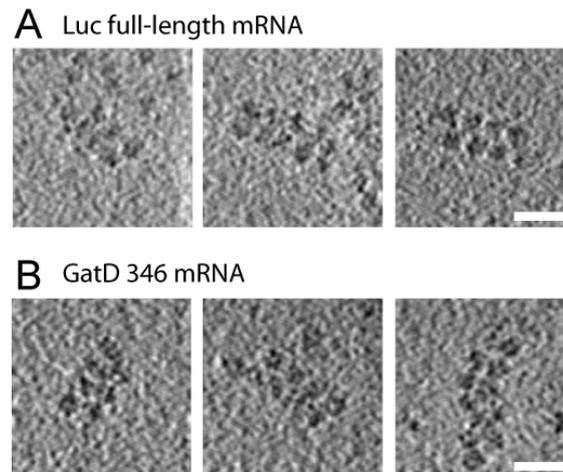


Abb. 26 Dichte Topologien *in vitro* gebildeter Polysomen sind auch mit terminierender mRNA und anderen ORFs zu finden.

(A) Dargestellt sind drei Subtomogramme mit Polysomen, die nicht-arretierende, Vollängen Luc translatieren.

(B) Dargestellt sind drei Beispiele von Polysomen in Tomogrammen nach der *in vitro* Translation von GatD als naszentes Konstrukt von 346 aa (GatD 346). Die Organisation dichter Polysomen scheint unabhängig vom spezifischen Transkript zu sein. Skalenbalken, 50 nm.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die kodierende Primärsequenz der mRNA keinen direkten Einfluss auf die Anordnung von dichten Polysomen hat. Die lokale Dichte von Ribosomen auf der mRNA variiert sicherlich mit der lokalen Elongationsrate auch in Abhängigkeit von Sekundärstruktur im ORF (Buchan and Stansfield 2007), wichtiger erscheint in diesem Zusammenhang jedoch der Einfluss der Sekundärstruktur im Bereich der 5'-Ribosomenbindestelle auf die Initiationsfrequenz (Antoun, Pavlov et al. 2006).

3.1.6. Dichte Polysomen aus *E. coli* Spheroplasten

Das *in vitro* Translationssystem wurde durch die Verwendung von trunkierten mRNAs bei niedriger Konzentration und gleichzeitiger Hemmung des tmRNA/ssrA *rescue*-Systems auf die Bildung dichter Polysomen hin optimiert (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Außerdem sollte die niedrigere Elongationsrate der Ribosomen *in vitro* zu einer dichteren Polysomenpackung führen. Nun wurde untersucht, ob sich ähnlich dichte Arrangements auch in lebenden Zellen

unter Normalbedingungen, bzw. in logarithmischer oder stationärer Wachstumsphase finden lassen. In klassischen Experimenten wurden Polysomen in Lysaten von *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen beschrieben (Slayter, Kiho et al. 1968), jedoch blieb unklar, ob eine regelmäßige Anordnung von zytosolischen Polysomen die Regel oder die Ausnahme bedeutet. Mit KryoET wurden auch Polysomen in Zelllysaten noch nie untersucht.

Aufgrund der Limitation der Probendicke ist es zum aktuellen Stand der Technik noch unmöglich, Rekonstruktionen mit ausreichendem S/N-Verhältnis einer intakten *E. coli*-Zelle zu erhalten (vgl. Abb. 15). Also wurde die Polysomenisolation zu verschiedenen Wachstumsphasen einer *E. coli* MC4100 Kultur nachvollzogen und KryoET direkt an Zelllysaten durchgeführt. Im Vergleich zu uninduzierten Zellen in log-Phase wurden auch rekombinante Konstrukte vor der Lyse exprimiert. Hierzu wurde wt-Luc einem pBAD-Vektor (wtLuc) unter einem Arabinose(Ara)-Promotor oder ein pBAD Luciferase-SecM-GFP (Luc-SecM-GFP) Konstrukt exprimiert (Abb. 27 A). In letzteren Konstrukt sollte die 17 aa *stalling* Sequenz des SecM Proteins zwischen einer N-terminalen wt-Luciferase und einer C-terminale GFP-Fusion *in vivo* arretierte Polysomen hervorrufen (vgl. 1.6). Nur bei einem Überlesen der SecM-Sequenz sollte es zur Translation des GFP kommen.

Die Expression der Konstrukte wurde mit einem anti-Luc WB überprüft. Nach 30 min Induktion mit 0.5% Ara bei 30°C sind mit beiden Konstrukten (wtLuc, Luc-SecM-GFP) deutliche Banden bei 60 kDa, bzw. der erwarteten Volllänge von wtLuc zu detektieren (Abb. 27 B, Bahnen 2,4).

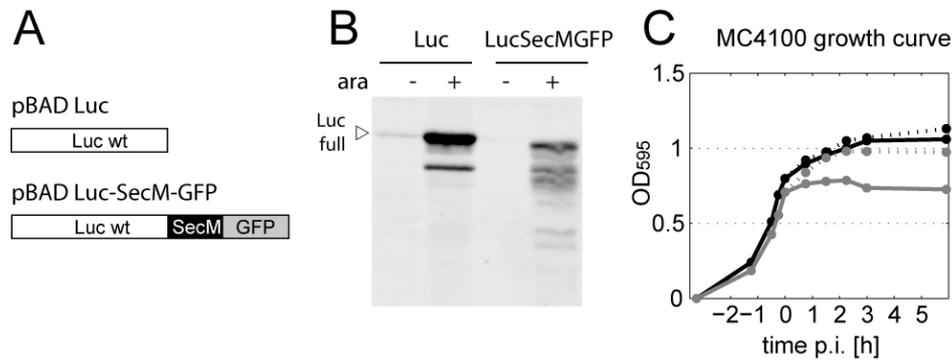


Abb. 27 **In vivo Expression von Luc wt und einem Luc-SecM-GFP Konstrukt**

(A) Schematische Darstellung der Arabinose-induzierbaren Modellkonstrukte pBAD Luc and pBAD Luc-SecM-GFP mit der 17 aa *stalling* Sequenz des SecM Proteins.

(B) Ein Anti-Luc Western Blot zeigt die Induktion von Luc and Luc-SecM-GFP. Spheroplastenlysat aus uninduzierten (Bahnen 1 und 3) oder Arabinose-induzierten Zellen (Bahnen 2 und 4). Das Lysat wurde 30 min nach Induktion bei 30°C präpariert.

(C) Wachstumskurve der MC4100 Zellen nach Induktion von Luc wt (—) oder Luc-SecM-GFP (—) bei $t = 0$, bzw. ohne Induktion (gestrichelte Linien).

Die Luc-SecM-GFP-Expression ist deutlich schwächer und es sind mehrere Abbruchprodukte oder intern arretierte Produktbanden zu finden. Dies ist bei Expression eines Konstrukts, das arretierte Polysomen akkumuliert, zu erwarten. Interessant ist außerdem, dass >90% des Signals im WB sich in oder unterhalb der Luc-Vollängen Bande findet, das heißt dass es so gut wie nicht zum Überlesen der SecM-*stalling*-Sequenz und Translation der GFP-Fusion kommt. Die Negativkontrollen ohne Induktion der beiden Konstrukte enthalten so gut wie keine Produktbanden, was die stringente Kontrolle des Ara-Promotors unterstreicht (Abb. 27 B, Bahnen 1,3). Auch erwähnt werden sollte, dass die Expression des Luc-SecM-GFP-Konstrukts bakteriostatisch wirkt: fast unmittelbar nach Induktion ($t=0$) stoppt das Wachstum der Kultur (Abb. 27 C, graue Linie). Möglicherweise wird ein Großteil der zytosolischen Ribosomen an der überexprimierten Arrest-Sequenz sequestriert und steht für die normale Proteinsynthese nicht mehr zur Verfügung.

Nun wurden die Zellen nach Expression über verschiedene Zeiträume durch Verdau der Zellwand in hypoosmotischem Puffer mit Detergens lysiert. Durch die rasche Abkühlung der Zellen bei gleichzeitiger Elongationsinhibition mit Cam sollte ein Großteil der Ribosomen in Polysomen vorliegen. Tatsächlich finden sich in Elutionsprofilen von Dichtegradienten sowohl nach Expression von wt-Luc also auch LucSecMGFP und in den uninduzierten Kontrollen nach 30 min bei 30°C Peaks im Bereich großer Polysomen (Abb. 28). Der Anteil von Monosomen am Gesamtsignal schwankt dabei zwischen 85% (Abb. 28 C) und 75% (Abb. 28 A), aber ein grundlegender Unterschied der Polysomenprofile ist nicht erkennbar.

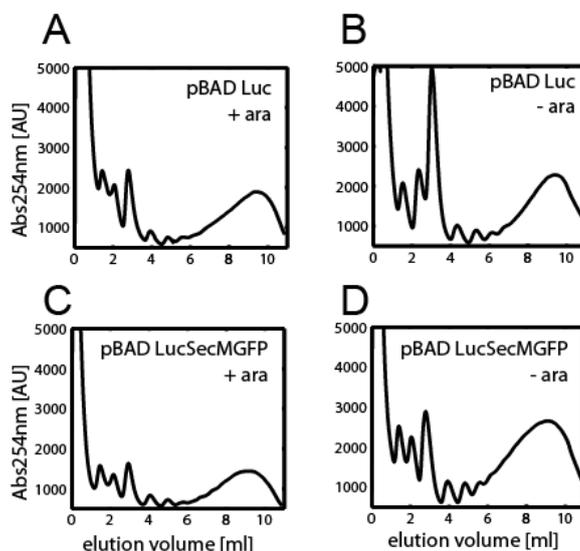


Abb. 28 Polysomen in *E. coli* bei heterologer Proteinexpression und in uninduzierten Kontrollzellen.

Die Abbildungen zeigen Elutionsprofile von Spheroplastenlysaten von *E. coli* MC4100 Zellen in log-Phase bei 30°C, aufgetrennt auf 10-40% Saccharosegradienten. Die Zellen waren wie konnotiert entweder mit (A,B) pBAD Luc oder (C,D) pBAD Luc-SecM-GFP transformiert (A) Luc oder (C) Luc-SecM-GFP wurden mit 0.5% Arabinose (+ ara) induziert, 30 min später geerntet und lysiert. (B,D) In Kontrollzellen ohne heterologe Proteinexpression (- ara) werden ähnliche Mengen an Polysomen auf Dichtegradienten detektiert.

Nun wurden die Zellysate von uninduzierten oder induzierten *E. coli* unmittelbar nach der Lyse vitrifiziert um die enthaltenen Polysomen möglichst in ihrer physiologischen Konfiguration zu erhalten. Die Proben weisen naturgemäß eine hohe Heterogenität auf,

allerdings sind bei höherer Probenverdünnung Ribosomen und isolierte Polysomen als prominenteste Spezies klar von unidentifizierten makromolekularen Komplexen oder Proteinaggregaten zu unterscheiden (Abb. 29 und Abb. 30). In Tomogrammen aller Proben finden sich akkumulierte Ribosomen, aber nur in der Luc-SecMGFP-Probe, in der das SecM-stalling Konstrukt exprimiert worden war, sind sehr dichte, helikale Polysomen evident (Abb. 29 A, oben). In Lysaten von uninduzierten Zellen oder Luc wt-exprimierenden Zellen nach 30 min sind nur kleine oder weniger geordnete Polysomen per Auge zu erkennen (Abb. 29 A, unten). Nach längerer Expression über 120 min, bzw. dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, sind vereinzelt auch große, dichte Polysomen in Lysat von Luc wt-exprimierenden Zellen oder den Negativkontrollen zu finden (Abb. 29 B).

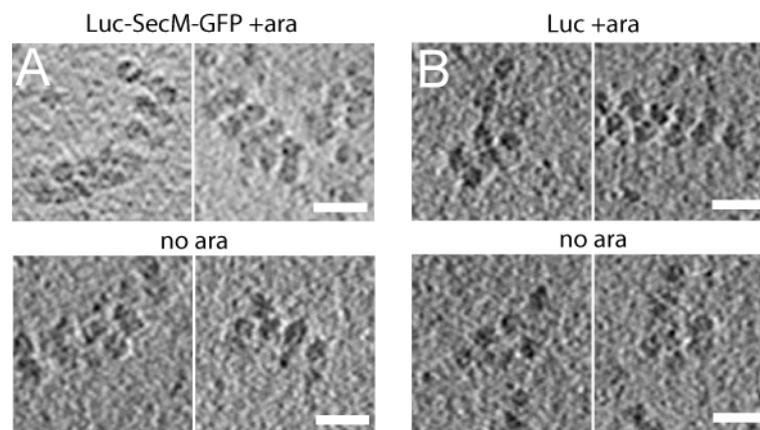


Abb. 29 In Lysaten von *E. coli* Spheroplasten lassen sich dichte Polysomen finden.

(A) Dargestellt sind Subtomogramme von Spheroplastenlysaten, die 30 min nach Induktion von *E. coli* Luc-SecM-GFP mit Arabinose (+ ara) oder von uninduced Kontrollzellen (no ara) extrahiert wurden. Skalenbalken, 50 nm.

(D) Subtomogramme von Spheroplastenlysaten aus *E. coli* pBAD Luc 120 min nach der Induktion mit Arabinose (+ ara) oder aus uninduzierten Kontrollzellen (no ara). Skalenbalken, 50 nm.

3.1.7. Die räumliche Organisation von Polysomen aus *E. coli* Spheroplasten

Wie weiter unten genauer beschrieben, wurden mittels 3D Mustererkennung die räumlichen Koordinaten aller im Ribosomen in Tomogrammen der Zellysate erfasst und die relativen Konfigurationen zu den nächsten Nachbarpeaks bestimmt. Es zeigt sich, dass in allen Zellysaten unabhängig von der allgemeinen Größenverteilung der Polysomen immer die *in vitro* beobachteten Nachbarkonfigurationen zu finden sind (Abb. 30 A-D, II) wobei Polysomen aus LucSecMGFP-exprimierenden Zellen die am deutlichsten definierte Anisotropie ihrer NND aufweisen.

Daher liegt die Annahme nahe, dass unter allen physiologischen Bedingungen zumindest kleine Polysomen (Di- bis Tetrasomen) oder Teile von größeren Polysomen in dichter Packung auftreten und dann eine Vorzugskonfiguration einnehmen. Die Möglichkeit, dass über die volle Länge einer Mehrzahl aller Transkripte in der Zelle die dichteste Packung von Ribosomen auftritt, scheint eher gering. Unter Bedingungen aber, bei denen die Elongation zum limitierenden Schritt wird, bilden sich sehr große, dichte Polysomen mit beschriebener Konfiguration, was hier durch Expression des SecM-Peptids in einem Fusionskonstrukt gezeigt wird.

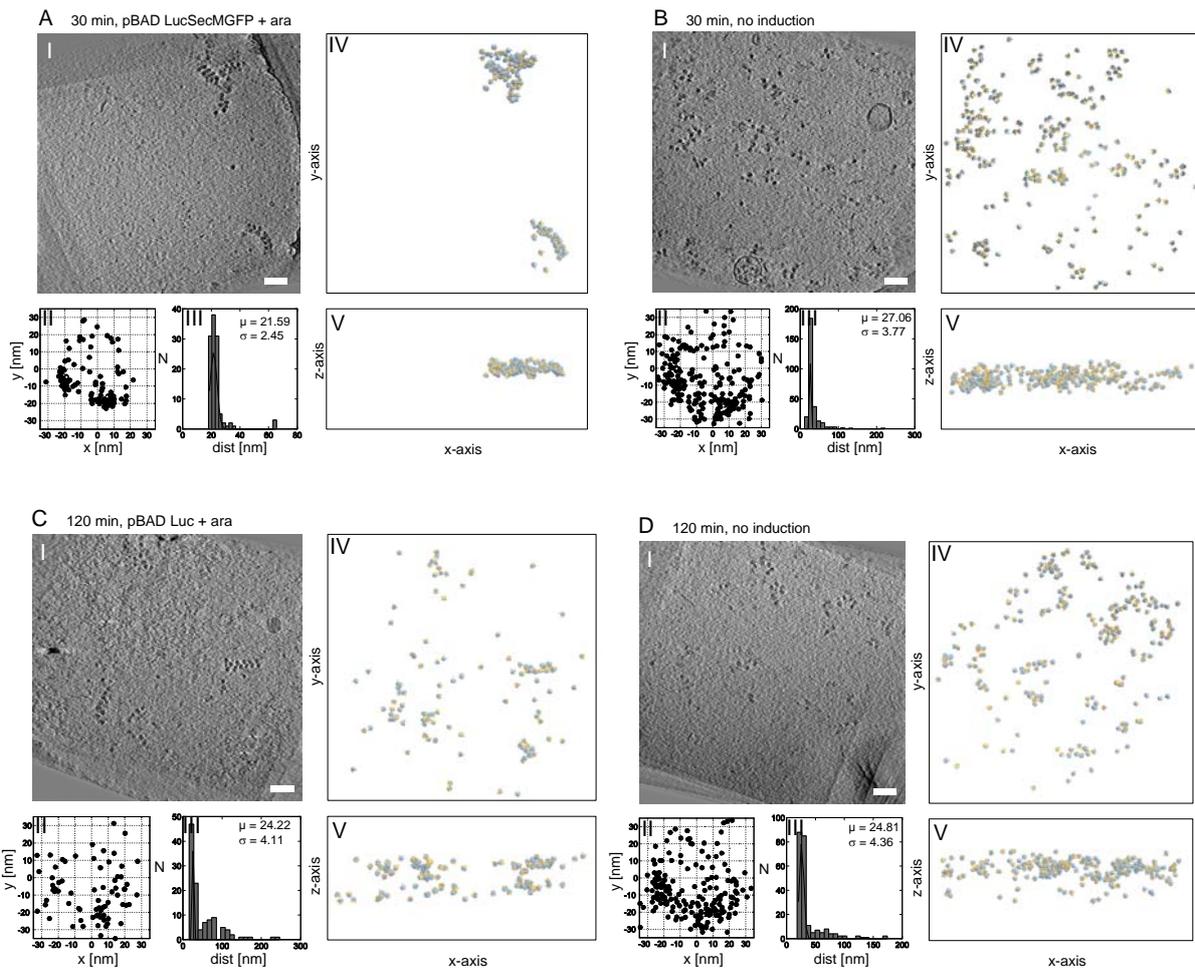


Abb. 30 Die Organisation von Polysomen in *E. coli* Spheroplastenlysaten.

(A-D) Jede Abbildung beschreibt die Verteilung von Ribosomen in einzelnen Tomogrammen von *E. coli* Lysaten mit oder ohne die vorherige Induktion eines Modellkonstrukts, wie im Text beschrieben.

(A) Große, dichte Polysomen konnten nach 30 min Induktion des *stalling*-Konstrukts Luc-SecM-GFP beobachtet werden.

(B) Uninduzierte Kontrollzellen weisen generell kleinere und variabelere Polysomen auf.

(C) In Luc wt-experimentierenden Zellen Luc oder

(D) in nicht-induzierten Kontrollzellen kommen große Polysomen im Vergleich zu (A) seltener vor, die charakteristische Vorzugspositionierung von nächsten Nachbarribosomen (II) ist jedoch immer zu beobachten.

(I) Tomographische Z-Schnitte (Maßstab, 100 nm). (II) Verteilung von Distanzvektoren zwischen allen identifizierten Ribosomen und deren nächsten Nachbarn in einem (x,y)-Graphen. (III) Verteilung der Distanzen nächster Nachbarn mit dem Gausschen Mittel μ und der Standardabweichung σ . (IV, V) *Isosurface*-Modelle von identifizierten 70S Ribosomen in den Tomogrammen (50S, blau; 30S, gelb), dargestellt in der (x,y)-Ebene (IV) oder der (x,z)-Ebene (V).

3.1.8. Bevorzugte Konfigurationen von polysomalen Ribosomen

Die räumliche Anordnung von polysomalen Ribosomen *in vitro* wurde durch 3D *template matching* mit einer externen Referenzstruktur erfasst, die aus einer Kristallstruktur des 70S Ribosoms (Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005) generiert wurde. Wie in Material und Methoden (Kapitel 2.11.4) beschrieben, werden die Winkel- und Ortskoordinaten für jedes Partikel im Tomogramm annäherungsweise erfasst und dann per 3D Partikelalignierung verfeinert. Aus dem Datensatz aller Partikelkoordinaten eines Tomogramms lassen sich wiederum relative Abstände und relative Orientierungen errechnen und klassifizieren.

Zunächst wurden alle identifizierten Ribosomen in einzelnen Tomogrammen mit unfraktioniertem *in vitro* Translationslysate mit Luc 371 (**Abb. 31** A,B), Luc 197 oder Luc 550 (nicht gezeigt) mRNA untersucht. Es sollte angemerkt werden, dass einzelne Monosomen eine geringfügig höhere Korrelation mit der *template*-Struktur als dicht akkumulierte Ribosomen bzw. Polysomen aufweisen (**Abb. 31** C). Wenn nun die 3D Distanzvektoren zwischen jedem Partikelschwerpunkt i und dem nächsten Nachbarn k in Relation zur Ausgangsorientierung der Referenz berechnet werden (siehe 2.11.5), zeigt sich eine deutlich anisotrope Verteilung der Nachbar-Nachbarvektoren, die sich augenscheinlich in zwei Hauptcluster in der Nähe der kleinen ribosomalen Untereinheit aufteilen (**Abb. 31** D) mit einem durchschnittlichen Abstand der Nachbarpartikel von ca. 22 nm.

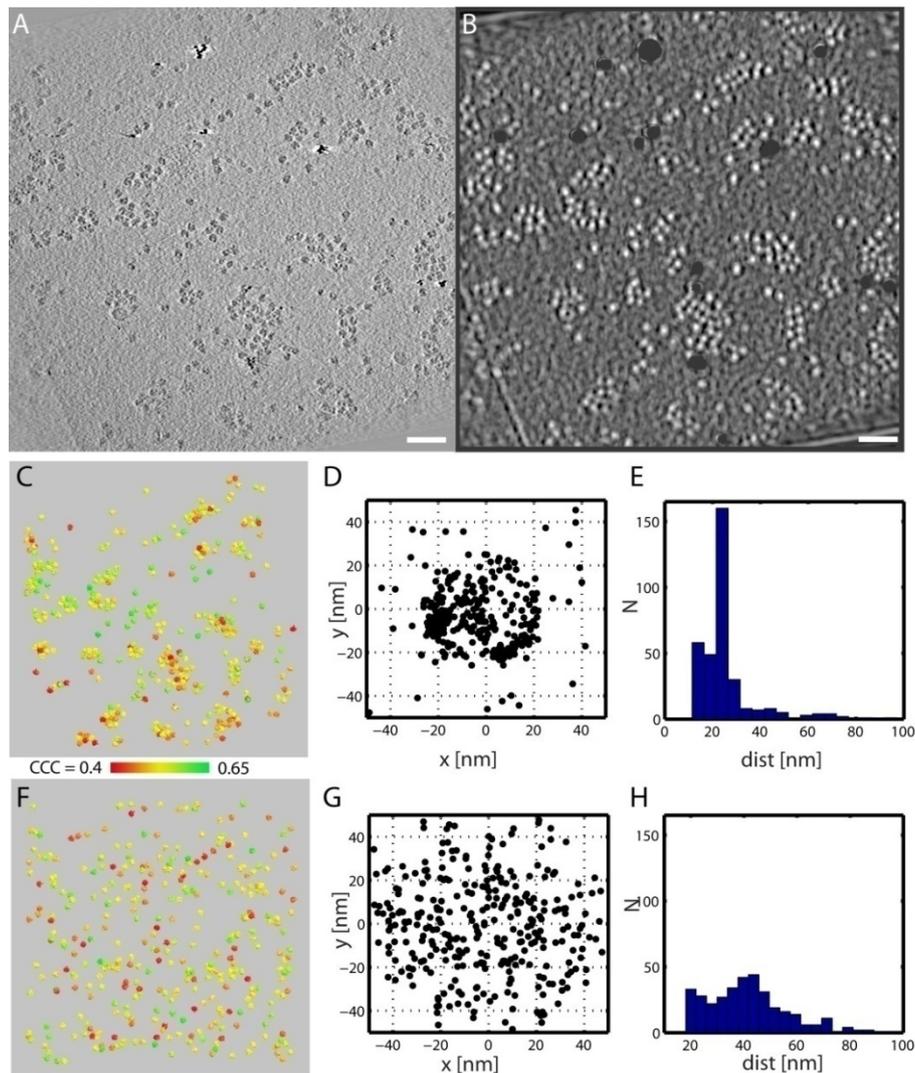


Abb. 31 Die Ribosomenverteilung und NND in einzelnen Tomogrammen.

(A) Tomogramm von Luc 371 translatierendem *in vitro* Translationslysate (Maßstab, 100 nm).

(B) 3D CCF des Tomogramms in (A) mit einer 70S Referenzstruktur. Weiße Peaks zeigen Korrelationsmaxima im Koordinatenraum an. Kolloidales Markergold wurde vor der Peak-Extraktion mit einer binären Maske ausmaskiert (dunkelgrau).

(C) Schematisierte Ribosomen / CCC Verteilung der 3D CCF in (B). Einzelne Monosomen korrelieren z.T. besser mit der Referenzstruktur (grün) als Ribosomen in dichten (polysomalen) Arrangements (gelb, rot).

(D) NND der Schwerpunktsdistanzen (schwarze Punkte) aller Peaks in (C) in einem (x,y)-Diagramm. Die Anisotropie der relativen Nachbarverteilung ist deutlich zu erkennen. (E) Die durchschnittliche Länge der Distanzvektoren in (D) beträgt ca. 22 nm, in etwa dem Durchmesser eines bakteriellen Ribosoms.

(F-H) Wie (C-E), aber für eine randomisierte „Partikelverteilung“ gleicher Zahl wie (C) in einem ähnlich großen, artifiziellen Volumen.

Um nun genauer einzugrenzen, ob es die Polysomenspezies ist, die diese Vorzugspositionierung einnahm, wurden manuell selektierte Subtomogramme bei niedrigerem Binning-Faktor rekonstruiert (1.12 nm / vx), die dichte Polysomen enthielten. Nach erneutem *template matching* und iterativer Alignierung wurden die relativen Konfigurationen der Partikel in selektierten Polysomen ermittelt.

Die Positionen der nächsten Nachbarpartikel in diesem Teildatensatz sind deutlich in zwei Hauptwolken geclustert, mit einem mittleren Abstand von 21.6 nm in Relation zum Zentrum der Referenz. Mit dem *k-means*-Algorithmus wurde ein erstes Zentrum bei $\Delta(x,y,z)_{ik} = (6.7 \text{ nm}, -18.3 \text{ nm}, -2.9 \text{ nm})$, ein zweites bei $\Delta(x,y,z)_{ik} = (-18.6 \text{ nm}, -5.5 \text{ nm}, 0.77 \text{ nm})$ relativ zum Partikelmittelpunkt i lokalisiert (Abb. 32 B,C). Diese Raumkoordinaten liegen in der Nähe des mRNA- Eingangs bzw. Ausgangs des Ribosoms i , womit sich die Erwartung bestätigt, dass sich polysomale Nachbarn bevorzugt dort positionieren.

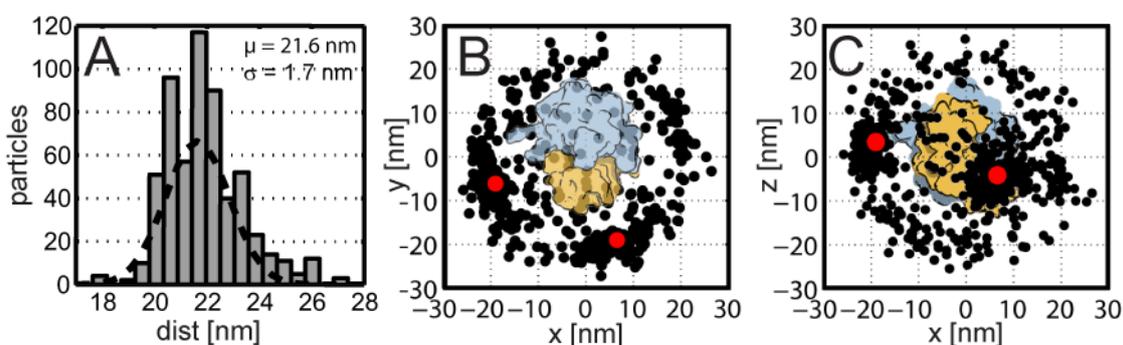


Abb. 32 Die räumliche Nachbarbeziehung in polysomalen Ribosomen.

(A) Die Abstandsverteilung eines Sets von ribosomal Partikeln zum jeweiligen nächsten Nachbarribosom innerhalb von vorausgewählten Polysomen die *in vitro* bei der Translation von Luc 197, Luc 371 und Luc 550 gebildet wurden. Ein gefittete Normalverteilung von Abständen (gestrichelte Linie) ergibt einen durchschnittlichen Abstand der Massenschwerpunkte von 21.6 nm. (B-C) Die entsprechende 3D Darstellung der Distanzvektoren (schwarze Punkte) jedes polysomalen Ribosoms zu dessen nächstem Nachbarn als (B) x,y-plot und (C) x,z-plot zeigt deutlich deren anisotrope Verteilung. Die zwei *k-means* Hauptcluster (rote Punkte) bei $(x,y,z) = (6.7 \text{ nm}, -18.3 \text{ nm}, -2.9 \text{ nm})$ und $(x,y,z) = (-18.6 \text{ nm}, -5.5 \text{ nm}, 0.77 \text{ nm})$ wurden relativ zur Referenzorientierung (schematisch dargestellt) in unmittelbarer Nähe der 30S Untereinheit (gelb) lokalisiert.

Mit der Berechnung zweier weiterer Abstandsvektoren zu Punkten außerhalb des Zentrums in Nachbarribosomen k lässt sich nicht nur deren Position, sondern auch deren Orientierung eindeutig ermitteln. Diese Vektorensätze wurden mit dem Datensatz manuell selektierter polysomaler Ribosomen für alle jeweils nächsten Nachbarribosomen bestimmt und waren ebenfalls deutlich geclustert (nicht gezeigt). Dies beweist, dass Polysomen charakteristische Nachbarkonfigurationen aufweisen und diese zur Klassifikation polysomaler Ribosomen ausreichend sind.

Eine Analyse der Nachbar-Nachbar-Konfiguration ohne Vorauswahl (durch Selektion einzelner Subtomogramme) wurde nun auf ein Set von 2393 identifizierten Partikeln aus 12 Tomogrammen von vitrifiziertem Translationslysats mit Luc 197, Luc 371 oder Luc 550 mRNA erweitert. Zwischen allen Partikeln wurden zunächst drei Distanzvektoren zwischen den Schwerpunkten (Zentren) aller Ribosomen i und drei Punkten in deren Nachbarn k berechnet. Anhand des ersten Vektors zwischen den Schwerpunkten i und k wurden nun gezielt Ribosomen identifiziert und selektiert, die in der Nähe der $i+1$ (ca. 600 Ribosomen), oder der $i-1$ Position (ca. 630 Ribosomen) ein Nachbarpartikel aufweisen, wobei die Partikelsätze teilweise überlappen können (Partikel mit zwei identifizierten Nachbarn an den Positionen $i+1$ und $i-1$). Innerhalb dieser Subsets wurden anhand der zwei weiteren Vektoren entsprechend der Orientierung des Nachbarpartikels klassifiziert (Abb. 32 A).

Am Beispiel der Nachbarpartikel am $i+1$ Zentrum zeigen sich deutlich mindestens zwei Orientierungsklassen, wobei eine deutlich höher und definierter populierte ist: In dieser Orientierungsklasse neigt sich das Ribosom am $i+1$ Zentrum um ca. -90° um die z-Achse und um ca. 20° um die x-Achse des Bezugssystems in „top“-Ansicht (Vgl. Kapitel 2.11.4). Dabei verbleibt das Nachbarpartikel in gekippter „top“-Orientierung, weshalb diese im Weiteren als „top-to-top“ bzw. „t-t“ Klasse bezeichnet wird (Abb. 32 A, Schemazeichnung rechts unten). Die zweite, weniger definierte und geringer populierte Konfiguration unterscheidet sich von

t-t in einer weiteren Rotation des Nachbarrisoms um ca. 180° um die x-Achse des Referenzsystems, weshalb diese im Weiteren als „*top-to-bottom*“ bzw. „*t-b*“ Klasse bezeichnet wird (Abb. 32 A, Schemazeichnung rechts oben). In beiden Konfigurationsklassen verbleiben $>90\%$ der kleinen Untereinheiten der Nachbarrisomen in unmittelbarer Nähe des mRNA Ausgangs im Ribosom i . In beiden Orientierungsklassen beträgt der durchschnittliche Abstand zwischen dem mRNA Ausgang i und dem mRNA Eingang $i+1$ ungefähr 5.5 ± 1 nm, was auf eine kleine Lücke zwischen den 30S Untereinheiten hindeutet.

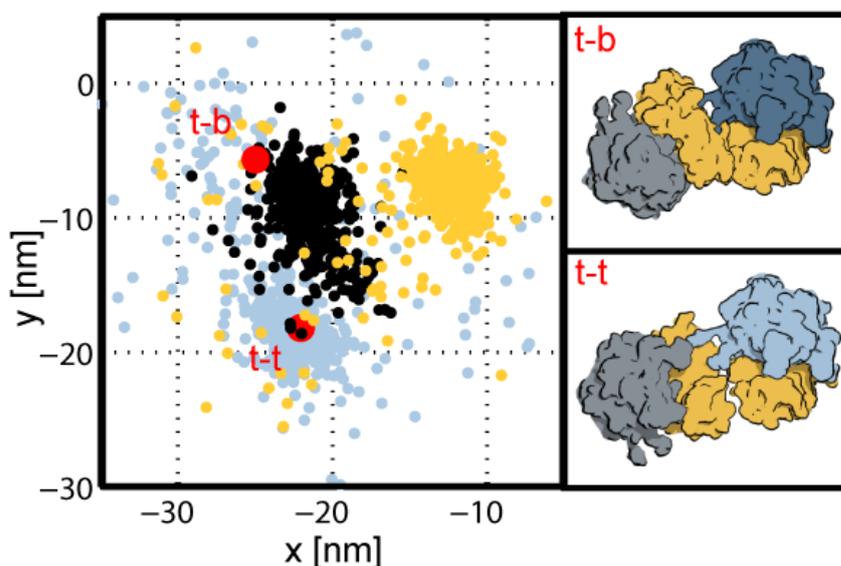


Abb. 33 Polysomale Nachbarrisomen zeigen mindestens zwei präferentielle Konfigurationen. Die relative Nachbarkonfiguration zwischen 595 Partikeln und deren Nachbarn mit Schwerpunkten an $i+1$ Position (schwarz). Zwei weitere Distanzvektoren zu Punkten in der 30S Untereinheit (gelb) oder der großen Untereinheit (blau) zeigen ebenso ein deutliches Clustering in mindestens zwei Wolken (Zentren, rot), was die Existenz mindestens zweier Konfigurationsklassen (t-t, t-b wie im Text) andeutet. Die zwei Schemata rechts verdeutlichen die mittlere, relative Orientierung der t-b (oben) und t-t-Klasse, wobei die 50S Untereinheit von Ribosomen i in t-b-Konfiguration in dunkelblau und in t-t-Konfiguration in hellblau dargestellt ist.

Die relativen Orientierungen zwischen allen Ribosomen i und den nächsten Nachbarn k können auch als ein Set aus drei Winkeln $(\varphi, \theta, \psi)_{i,k}$ beschrieben werden. Die 3D Verteilung der Winkelsätze zeigte wiederum deutlich bevorzugte Nachbarorientierungen auf: Für

Ribosomen mit einem $i+1$ Nachbarn werden mindestens zwei definierbare Wolken im 3D-Winkelraum beobachtet.

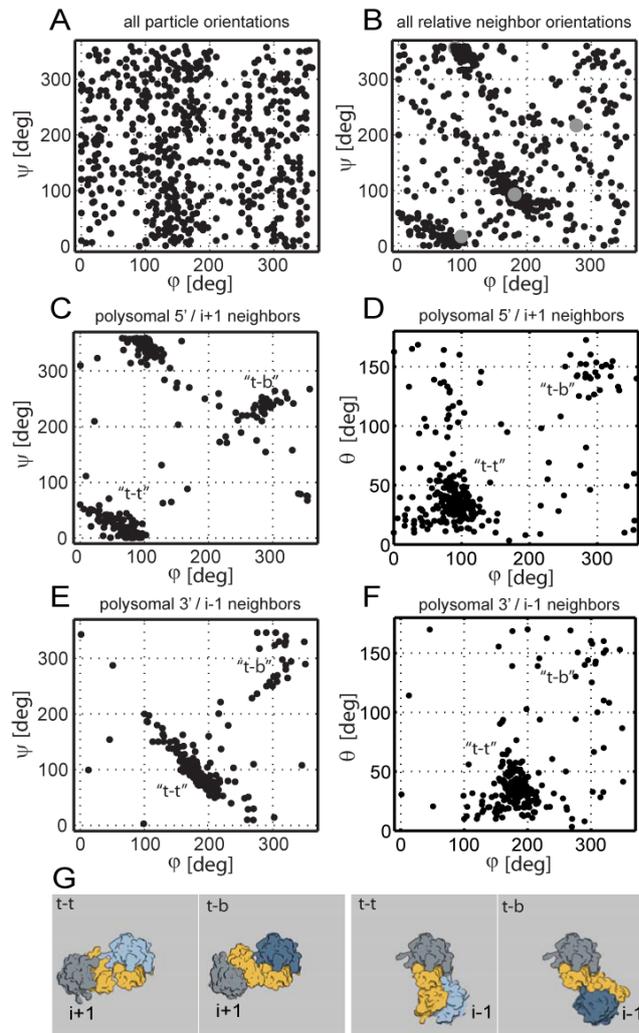


Abb. 34 Cluster von relativen Orientierungen im Winkelraum.

(A) Absolute $(\varphi, \theta, \psi)_i$ aller Partikel im Vergleich zu (B) den relativen $(\varphi, \theta, \psi)_{i,k}$ aller nächsten Nachbarn i, k . (C,D) Mindestens 2 deutliche Cluster im Winkelraum sind für Nachbarribosomen am $i+1$ Zentrum in der (C) (φ, ψ) -Verteilung oder (D) (φ, θ) -Verteilung zu sehen. (E,F) Nachbarribosomen in der Nähe der Position $i-1$ zeigen ebenfalls deutliche Vorzugsorientierungen in der (E) (φ, ψ) -Verteilung oder (F) (φ, θ) -Verteilung.

(G) Schematische Darstellung der mittleren Nachbarkonfigurationen t-t und t-b an Positionen $i+1$, bzw. $i-1$.

Nach Transformation der relativen $(\varphi, \theta, \psi)_{i,k}$ in den Quaternionenraum lassen sich diese per euklidischer k -means-Minimierung clustern. Die in den Eulerraum rücktransformierten k -means-Zentren entsprechen dann den mittleren Orientierungen der t-t- oder t-b-Konfigurationen, die mit Hilfe der oben beschriebenen Vektorklassifizierung beschrieben wurden (Abb. 34 C,D). Mindestens zwei Cluster von relativen Orientierungen wurden auch für Nachbarribosomen an Position $i-1$ gefunden (Abb. 34 E,F).

3.1.9. Nachbarribosomen in der gemittelten 3D Struktur klassifizierter Ribosomen

Nachdem nun gezeigt ist, dass polysomale Ribosomen charakteristische und spezifische Nachbarkonfigurationen einnehmen, wird erwartet, dass sich nach Mittelung von klassifizierten Subtomogrammen polysomaler Ribosomen und ihrer näheren Umgebung die Dichten der Nachbarribosomen finden lassen müssen.

Es wurden zunächst die initialen Winkelsätze aus der *template matching* Prozedur verwendet um eine erste Referenz zu erzeugen. Die Referenz und alle Partikel wurden während des weiteren Alignments sphärisch maskiert, um Dichten der umliegenden Partikel bei der Korrelation der Subtomogramme auszuschließen.

In der initialen Mittelung aller polysomalen Partikel mit Nachbarn an der $i+1$, der $i-1$ oder an beiden Positionen sind bereits deutliche zusätzliche Dichten außerhalb der Alignierungsmaske zu finden, die den Nachbarribosomen zugeschrieben werden (nicht gezeigt). Wie in Kapitel 3.1.8 beschrieben, wurden nun 595 Partikel, die einen Nachbarn an Position $i+1$ aufweisen, entsprechend ihrer relativen Nachbarkonfiguration klassifiziert. Werden nun von 595 Partikeln mit einem Nachbarn an Position $i+1$ nur die 391 in der t-t-Klasse unter Maskierung der umliegenden Ribosomen neu aligniert und gemittelt, lässt sich das zentrale Ribosom bei einer Auflösung von ca. 3 nm erkennen (entsprechend dem 0.5 FSC Kriterium), wobei größere strukturelle Komponenten wie der L1 Arm, die Zentrale Protuberanz, und der L7/L12 Arm der großen ribosomalen Untereinheit, sowie die Kopfreion, der mRNA-Eingang, die EF-Bindestelle und der tRNA-Kanal klar zuzuordnen sind (Abb. 35 A,D). Bemerkenswerterweise ist neben der Dichte der zentrierten und alignierten Ribosomen noch eine deutliche Dichte des $i+1$ Nachbarn zu beobachten. Die

Auflösung ist in diesem Bereich der Karte zwar schlechter als 4 nm, jedoch noch ausreichend um zumindest die Orientierung und Lokalisation des Nachbarribosoms eindeutig zu erkennen. In der gemittelten Struktur der t-t-Klasse kommen die 30S Untereinheiten des zentrierten Ribosoms i und des $i+1$ Nachbarn so nebeneinander zu liegen, dass der mRNA Ausgang und der mRNA Eingang des $i+1$ Nachbarn in unmittelbarer räumlicher Nähe angeordnet sind (Abb. 35 A-C). Ein geringer Abstand ist in der *isosurface*-Darstellung klar zu erkennen, was wie schon bei der Errechnung der NND-Vektoren (siehe oben) darauf hindeutet, dass selbst in dicht gepackten Polysomen noch eine geringe Lücke verbleibt, welche die mRNA überbrücken muss.

Interessanterweise ist eine deutliche und kontinuierliche Dichte zwischen dem L1-Arm des zentrierten Ribosoms i und der 30S-Untereinheit des Nachbarn $i+1$ in der Nähe der *neck*-Region sichtbar, bei der es sich um eine unmittelbare Kollision ribosomaler Komponenten oder um eine nicht-ribosomale Komponente handeln könnte (Abb. 35 A, Pfeil). Um die Position der kontinuierlichen Dichte genauer zu lokalisieren, wurden zwei Kopien des atomaren Modells für das *E. coli* Ribosomen (Schuwirth, Borovinskaya et al. 2005) in die gemittelte Dichtekarte der polysomalen Ribosomen der t-t-Klasse eingepasst (Abb. 35 B,C). Obgleich die Genauigkeit des *dockings* vor allem an der Position $i+1$ durch eine geringe Auflösung limitiert wird, ist es zumindest naheliegend, dass die kontinuierliche Dichte sich vom L1-Arm in der 23S rRNA des Ribosoms i bis zu einer Position in der Nähe einer Helix (U407-A434) der 16S rRNA, oder protein S4 in der kleinen Untereinheit der $i+1$ Nachbarribosoms erstreckt (Abb. 35 C). Nun ist bekannt, dass der L1-Arm der großen Untereinheit während verschiedener Translationsphasen eine hohe konformationelle Variabilität aufweist (Valle, Zavialov et al. 2003), weshalb eine funktionelle Signifikanz, zumindest bei der erreichten Auflösung, noch ungeklärt bleibt.

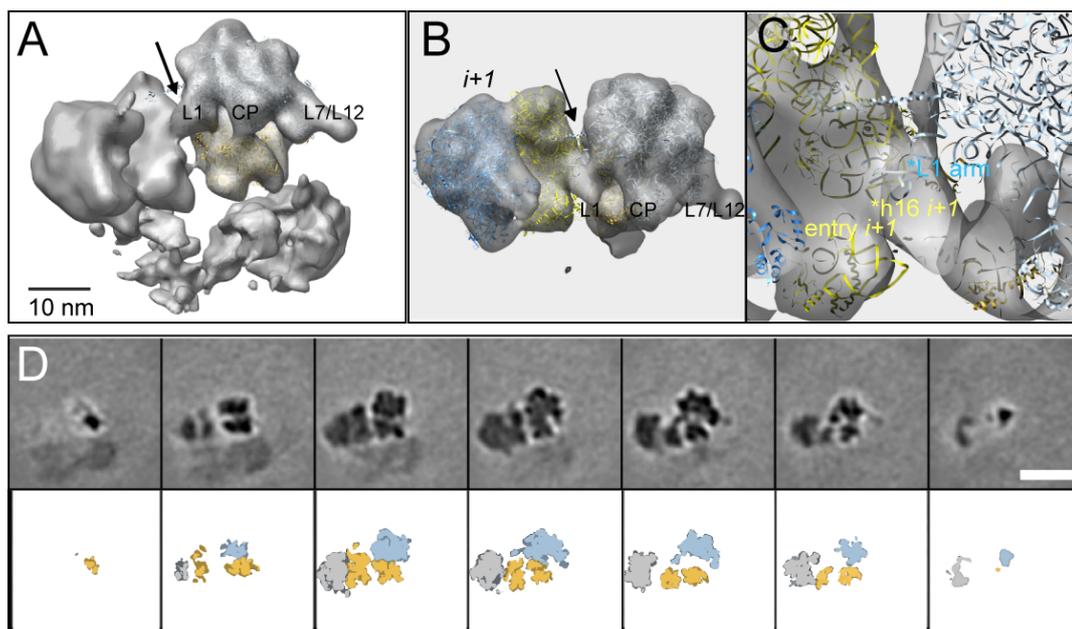


Abb. 35 Kontinuierliche Dichte zwischen polysomalen Nachbarribosomen.

(A) Oberflächendarstellung einer mittleren Struktur von 391 Ribosomen in t-t-Konfiguration mit einer Boxgröße von 96x96x96 Voxeln. Zur Orientierung sind L1, CP und der L7/L12 Arm markiert. Eine deutliche, kontinuierliche Dichte wird zwischen den Nachbarribosomen beobachtet (Pfeil).

(B) Zwei ribosomale Nachbarn in t-t-Konfiguration (wie in A) mit gedockten atomaren Modellen des 70S Ribosoms an den Positionen i und $i+1$ in Draufsicht (30S, gelb; 50S, blau).

(C) Die kontinuierliche Dichte findet sich in Relation zu den eingepassten atomaren Modellen in der Nähe des mRNA Eingangs des Ribosoms $i+1$ (entry $i+1$), genauer zwischen dessen 16S rRNA Helix 16 (*h16 $i+1$) und dem L1 Arm des Ribosoms an Position i (*L1 arm i).

(D) Galerie-Darstellung einzelner Z-Schnitte (oben) des gemittelten Volumens (wie A) mit 3.3 nm Abstand zwischen den Ausschnitten (Maßstab, 25 nm) und eine Schemazeichnung zur Orientierung (unten; 50S blau/ grau; 30S, gelb)

Kleinere, flexiblere oder substöchiometrisch gebundene Ribosomen-assoziierte Komponenten, z.B. das Chaperon TF, können in der gemittelten Struktur nicht aufgelöst werden. Allerdings wäre dies für TF auch nicht zwingend zu erwarten, da alle Domänen außer evtl. der Ribosomen-assoziierten NTD eine sehr hohe Flexibilität besitzen, und daher in der Kristallstruktur von Vollängen TF-RNC ebenso nicht aufzulösen waren (Ferbitz, Maier et al. 2004). Nur von einem kovalent *gecrosslinkten* TF-RNC Komplex existiert eine Einzelpartikelrekonstruktion niedriger Auflösung (Merz, Boehringer et al. 2008).

Eine zusätzliche Dichte der mRNA konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, was ebenso nicht zwingend zu erwarten wäre: Ein einzelner Strang von RNA sollte bei der

erreichten Auflösung und in Anbetracht der unkorrigierten CTF ebenso wenig von ribosomalen Dichten zu unterscheiden sein, wie dsRNA-Helices im Ribosom selbst.

Die gemittelte Struktur von 116 Ribosomen in der t-b-Klasse ist generell ähnlich oder identisch zu den zentrierten Ribosomen der t-t-Klasse. Allerdings ist die Dichte des $i+1$, bzw. $i-1$ zu diffus, um das Nachbarribosom einzupassen oder dessen genaue Orientierung direkt strukturell zu erkennen (nicht gezeigt). Die geringer definierte Nachbardichte reflektiert die höhere Variabilität der Nachbar-Nachbar-Konfiguration der t-b-Klasse. Angesichts der oben beschriebenen, klar erkennbarer Cluster im relativen Winkelraum (siehe 3.1.8) ist aber dennoch davon auszugehen, dass diese zweite Orientierungsklasse eine distinkte Konfiguration darstellt, die womöglich sterisch oder energetisch ungünstiger und daher geringer populiert ist.

3.1.10. Modelle der 3D Organisation bakterieller Polysomen

Um den prinzipiellen Aufbau bakterieller Polysomen und zugrundeliegende Ribosomenkonfigurationen besser erfassen zu können, wurden 3D Modelle für mehrere Dutzend Polysomen in den Tomogrammen von Translationslysaten mit Luc 197, Luc 371 oder Luc 550 erzeugt. Hierfür wurden *isosurface*-Modelle der tomographischen, gemittelten Struktur polysomaler Ribosomen mit den feinalignierten Koordinaten und Winkelsätzen in einem Volumen platziert und zum visuellen Verständnis eingefärbt (siehe 2.11.6).

Zur visuellen Verdeutlichung wurde der mögliche mRNA Pfad zwischen dem mRNA Ausgang jedes Ribosoms und dem nächstgelegenen mRNA Eingang am nächsten Ribosom schematisch modelliert (Abb. 36, rechts). Entlang des vermuteten mRNA Pfades kann so (von 3' nach 5') die wahrscheinlichste Abfolge der Ribosomen eines Polysoms häufig unzweideutig zugeordnet werden (siehe unten). In allen Fällen dichter Packung der

Ribosomen (Abb. 36 A,B) scheint das Transkript im Inneren des Polysoms „verpackt“ zu werden, während der Peptidkanalausgang sowie der tRNA Kanal von „außen“, bzw. vom Zytosol aus zugänglich bleiben.

Generell lassen sich die beobachteten Topologien am besten verstehen, wenn man die oben beschriebenen Konfigurationsklassen (t-t und t-b) zwischen jeweils zwei Ribosomen als elementare Bausteine oder Module dichter Polysomen betrachtet: Die t-t-Konfiguration war unter allen untersuchten Partikeln von arretierten Polysomen (z.B. mit Luc550) klar dominant (siehe 3.1.8) und in seltenen Fällen wurden Polysomen beobachtet, die ausschließlich Ribosomen in dieser Konfigurationsklasse aufweisen (Abb. 36 A). Dies resultiert in einer charakteristischen helikalen oder solenoiden übergeordneten Organisation des Polysoms mit ca. 4 Ribosomen pro Windung (Abb. 36 A, Mitte), wobei alle 30S Untereinheiten nach „innen“ einander zugewandt zu liegen kommen und das mRNA-Modell in einer linksgängigen Helix verlaufen muss (Abb. 36 A, rechts). Die großen Untereinheiten mit den Peptidausgängen (Abb. 36 A, rote Kegel) sind hierbei um ca. 90° pro Ribosom voneinander weggedreht und weisen nach „außen“ oder in „zytosolische Richtung“. Eine zweite charakteristische Topologie ist in planaren Polysomen zu finden, welche –per Auge leicht zu erkennen – häufig horizontal in der vitrifizierten Probe liegen (Abb. 36 B). Hier treten die t-t- und die t-b-Konfigurationen entlang des erwarteten mRNA-Pfades alternierend im Verhältnis 1:1 auf. In den rigidesten experimentellen Beispielen resultiert daraus eine sinusoidale Anordnung der Ribosomen entlang dem kürzesten möglichen Pfades für die mRNA (Abb. 36 B, rechts).

Weitere prinzipielle Topologien mit anderen Vorzugskonfigurationen oder einer anderen Verteilung derselben wurde nicht beobachtet: Der Großteil der experimentell beobachteten Polysomen entspricht zumindest in Teilen einer oder beider der zwei oben beschriebenen supramolekularen Organisationen. Häufig jedoch sind geordnete Regionen

auch in arretierten Polysomen unterbrochen durch einzelne oder mehrere Ribosomen in flexiblerer Ausrichtung, vor allem im Bereich des vermuteten 5' Endes der mRNA (Abb. 36 C). Diese Beobachtung entspricht der erwartungsgemäß hohen, inhärenten Flexibilität polysomaler Arrangements, wie zum Beispiel mit dem Luc-Konstrukt mit STOP Codon *in vitro* beobachtet wurde (Abb. 36 D).

Ebenso wurden einige Polysomen in Spheroplasten-Lysaten modelliert. Große, arretierte Polysomen weisen dabei eine sehr ähnliche Konfiguration wie die *in vitro* generierten Polysomen auf (Abb. 36 E). Aufgrund einer höheren Variabilität und Flexibilität kann ein definitiver mRNA Pfad jedoch häufig nur für bestimmte Abschnitte von 3-4 Ribosomen innerhalb eines größeren Polysoms nachvollzogen werden (Abb. 36 E, rechts).

Wie in 3.1.1 beschrieben muss erwähnt werden, dass die meisten großen Polysomen horizontal in der Eisschicht orientiert sind, bzw. in einer zur Achse des Elektronenstrahls senkrechten Ebene. Da die Dicke der amorphen Eisschicht ca. 50-100 nm beträgt, erscheint es nicht ausgeschlossen, dass es durch Phaseneffekte an der Grenzschicht unmittelbar vor der Vitrifizierung des Lysats auch auf makromolekularer Ebene zu Umordnungen kommen kann, welche die Auswertung der Polysomenkonfigurationen potentiell beeinflussen. Allerdings zeigen sich kleinere Segmente von helikalen und planaren Polysomen auch entlang der tomographischen Z-Achse (Abb. 23). Dies weist darauf hin, dass die Eistopologie und die Phasengrenze keinen dominanten Einfluss auf die präferentielle Polysomenkonfiguration haben.

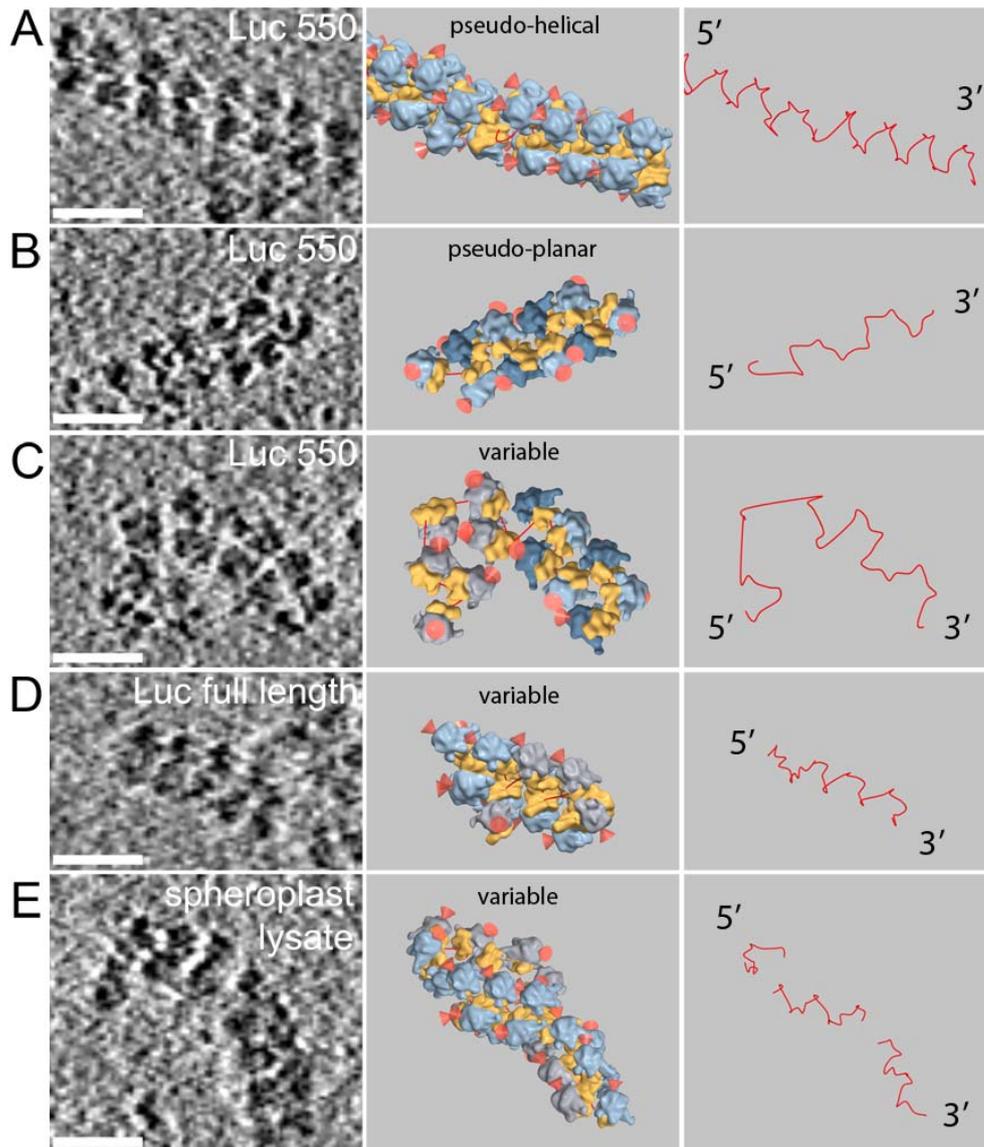


Abb. 36 Polysomen mit charakteristischen Topologien

(A-E, links) Tomographische z-Schnitte von drei Klassen von Polysomenorganisationen. (A-C) Beispiele von Polysomen aus *in vitro* Translationslysaten mit trunkierter Luc 550 mRNA, (D) terminierendem Vollängen Luc-Konstrukt und (E) aus Spheroplastenlysaten nach *in vivo* Expression von Luc-SecM-GFP (Skalenbalken, 50 nm).

(A-E, Mitte) *Isosurface*-Modelle einzelner Ribosomen (50S, blau; 30S, gelb) wurden an entsprechenden experimentellen Positionen platziert (hellblau, t-t Konfiguration; dunkelblau, t-b). Rote Kegel deuten den Peptidausgang jeder 50S Untereinheit an. Graue Modelle wurden für Ribosomen eingefügt, die nicht eindeutig dem Polysom zugeordnet werden konnten. Die Organisationsklassen sind über jedem Modell bezeichnet.

(A-E, right panels) Der wahrscheinlichste Weg der mRNA mit der kürzesten Distanz zwischen jedem Ribosom ist rot dargestellt. In (A) liegt ein helikaler Verlauf, in (B) ein 'sinusoidaler' Verlauf der mRNA vor. Bei höherer Flexibilität (C-E) ist der Weg der mRNA nur für Teile des Polysoms nachzuvollziehen.

Der Abstand zwischen den *codon recognition sites* von dicht gepackten polysomalen Ribosomen wurde wie folgt abgeschätzt: Die Koordinaten von 26 Ribonukleotiden, die in einer Kristallstruktur des *Th. thermophilus* 70S Ribosoms mit gebundener mRNA gefunden wurden (Yusupova, Jenner et al. 2006), wurden als fixe Positionen im Polysomenmodell übernommen. Zwischen der ersten fixierten Nukleotidposition (am mRNA Eingang) eines Ribosoms und der letzten fixierten Nukleotidposition (am mRNA Ausgang) des nächstgelegenen Ribosoms, wurde ein durchschnittlicher Abstand von 6.7 ± 0.5 nm bestimmt. Die fehlenden Basen in der Lücke zwischen jeweils zwei Ribosomen wurde dann mit einem *Worm like chain* Modell ergänzt (siehe 2.11.6), wodurch eine zusätzliche Zahl von 46 ± 6 Nukleotiden abgeschätzt wird, die den Abstand zwischen nebeneinanderliegenden mRNA Eingängen und Ausgängen überbrücken. Damit ergibt sich ein durchschnittlicher Schätzwert von 72 Nukleotiden zwischen den *codon recognition sites* in den Polysomenmodellen. Dies entspricht einem Unterschied von 24 Codons oder 24 Aminosäureresten auf Proteinebene pro Ribosom.

Um ein Maß für den durchschnittlichen Abstand von naszenten Peptiden im Kontext von Polysomen zu gewinnen, wurden die Distanzen der Peptidausgänge von Paaren benachbarter Ribosomen errechnet. Der durchschnittliche Abstand von Koordinaten in der Nähe des Proteins L23 von jedem Partikel *i* und dessen nächsten Nachbarn beträgt 29 ± 1 nm (nicht gezeigt). Die visuelle 3D Darstellung der modellierten Polysomen legte die Vermutung nahe, dass der nächstgelegene Peptidkanal nicht auf dem nächsten Ribosom auf der mRNA (*i+1* oder *i-1*), sondern auf dem drittnächsten Nachbarn zu finden sei. In hochgeordneten Polysomen wurde dafür ein durchschnittlicher Abstand von ca. 15 nm zwischen den Koordinaten des Proteins L23 bestimmt (nicht gezeigt).

3.1.11. Modellierung von Konformeren naszenter Peptidketten in Polysomen

Die nicht-native Interaktion von Polypeptiden sehr früh nach oder sogar während ihrer Synthese wird als ein Grund für Proteinmissfaltung und die Akkumulierung von Aggregaten in der Zelle vermutet, da naszente Peptide entfaltete oder nicht-native Zustände populieren, zumindest bis komplette Faltungseinheiten (z.B. Domänen) das Ribosom komplett verlassen haben (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Die Annahme ist naheliegend, dass Polysomen die höchste lokale Konzentration von aggregationsanfälligen Polypeptiden in der Zelle aufweisen (Hartl and Hayer-Hartl 2002).

Um das Potential für solche Interaktionen abzuschätzen, wurde in einer Kollaboration mit Adrian Elcock (University of Iowa, USA) zunächst ein pseudoatomares Modell von Ribosomen mit den experimentellen Koordinaten und Orientierungen eines ausgewählten, planaren Polysoms plaziert (Abb. 37 A). Dieses Beispiel eines hochgeordneten Polysoms wurde gewählt, weil es verschiedene aber definierte / repetitive Konfigurationen aufweist, die sich untereinander vergleichen lassen. Für jedes der pseudoatomaren Ribosomenmodelle wurden nun tausende von *random coil* Konformeren für die C_{α} -Modelle der naszenten Peptidketten erzeugt, wie andernorts näher beschrieben (Elcock 2006; Brandt, Etchells et al. 2009). Die Konformere wurden so modelliert, dass sie denaturierten, aber kompaktierten Peptidketten (in der Abwesenheit von Chaperonen) entsprechen (Abb. 37 A). Die Kontaktwahrscheinlichkeiten wurden dann in Kontrollsimulationen mit 1500 randomisierten Ribosomenkonfigurationen verglichen, um ein relatives Maß für die zufällig auftretenden Konformer-Interaktionen abzuschätzen (Abb. 37 B).

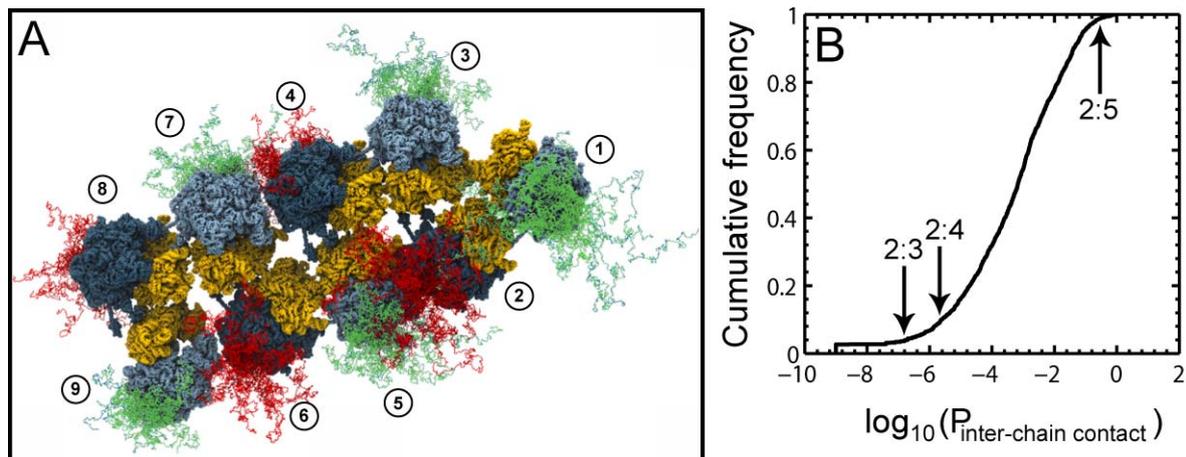


Abb. 37 Random coil Modell von Konfigurationen naszenter Ketten in einem planaren Polysom. (A) Zwanzig Konformere (von mehreren tausend modellierten) pro naszenter Kette sind an jedem pseudo-atomaren Modell der am Polysom beteiligten Ribosomen (nummeriert mit 1-9 von 3' nach 5'; hellblaue 50S, t-t-Konfiguration; dunkelblaue 50S, t-b-Konfiguration) abgebildet. Zur besseren Unterscheidbarkeit sind Konformermodele an ungerade nummerierten Ribosomen grün, an gerade nummerierten rot. (B) Kumulatives Histogramm der relativen Wahrscheinlichkeit von intermolekularen Kontakten ungefalteter, kompakterer Ketten zwischen 1500 künstlich randomisiert orientierten Ribosomenpaaren (wie in (Brandt, Etchells et al. 2009), Supplemental Information beschrieben). Pfeile markieren die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten für tatsächlich experimentell beobachtete Ribosomenpaaren (2:3, 2:4, 2:5) im gewählten Polysom. Das Paar 2:5 weist Kontaktwahrscheinlichkeiten nahe des theoretischen Maximums, 2:3 hingegen nahe des theoretischen Minimums auf.

Interessanterweise weisen die in Abb. 37 A gekennzeichneten Ribosomenpaare 2:3 und 2:4 eine Kontakthäufigkeit ihrer naszenten Ketten auf, die nahe der im randomisierten Datensatz errechneten theoretisch geringsten Wahrscheinlichkeit lag. Im Gegensatz dazu ergibt sich für das Ribosomenpaar 2:5 eine Wahrscheinlichkeit, die nahe der theoretisch maximal möglichen in Relation zu den zufälligen Konfigurationen liegt (Abb. 37 B, Pfeile).

Diese Simulationsergebnisse deuten darauf hin, dass die experimentell beobachteten Ribosomenkonfigurationen eine Interaktion zwischen naszenten Peptiden auf unmittelbar benachbarten Ribosomen minimiert. Zwar beinhaltet das Modell zur Erzeugung der naszenten Ketten außer den für *random coils* charakteristischen Bindungslängen und -winkeln, sowie einen Minimalradius für die C_{α} Pseudoatome aller Aminosäuren keinerlei weitere physikochemische Parameter und erhebt deshalb keineswegs den Anspruch,

Aussagen über die absolute Aggregationsanfälligkeit oder die exponierte Hydrophobizität verschiedener Peptidketten zu liefern. Dennoch scheint es allein unter sterischen Gesichtspunkten beinahe unmöglich, dass unmittelbar benachbarte naszente Peptide sich in ihrem Faltungsweg beeinflussen. Möglich erscheinen höchstens weitreichendere Interaktionen mit weiter *upstream* oder *downstream* elongierenden Ribosomen oder aber mit anderen Polysomen.

3.1.12. Implikationen der polysomalen Organisation für die *de novo* Proteinfaltung

Es wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass der ribosomale Peptidkanal nur sehr begrenzt Raum für die Faltung des naszenten Peptids, geschweige denn für die Ausbildung von Tertiärstruktur bietet. Nur für α -helikale Sekundärstrukturelemente ist schlüssig erwiesen, dass sich diese auch intra-Ribosomal bilden (Etchells and Hartl 2004; Woolhead, McCormick et al. 2004; Lu and Deutsch 2005), und für kleine β -*hairpin* Strukturen gibt es Hinweise, dass sich diese in der Nähe des Peptidausgangs ausbilden könnten (Kosolapov and Deutsch 2009). Aber alle größeren Faltungseinheiten, insbesondere β -Blattstrukturen wie z.B. Ig-Domänen müssen extraribosomal falten (Hsu, Fucini et al. 2007). Das bedeutet, dass zumindest einzelne Domänen im nicht-nativen Zustand außerhalb des Ribosoms vorliegen müssen, bis die komplette Sequenz (der Faltungseinheit) synthetisiert ist und den Tunnel verlassen hat.

Die naszenten Ketten von Luc, die hier untersucht wurden, werden am Peptidausgang von Ribosomen-assoziiertem TF transient gebunden, um unproduktive Wechselwirkungen zu verhindern (Kaiser, Chang et al. 2006; Tomic, Johnson et al. 2006). Deren Faltung wird weiter unterstützt durch die (teils posttranslationale) Wechselwirkung mit KJE (Agashe,

Guha et al. 2004). Nun wurde bisher davon ausgegangen, dass eine Hauptfunktion der (co-translational wirkenden) Chaperone ist, intermolekulare Aggregation zu unterdrücken, indem hydrophobe Sequenzen vom Zytosol bzw. von anderen aggregationsanfälligen Spezies abgeschirmt werden. So wurde z.B. in Δ tig Δ dnaK Doppeldeletionsmutanten gezeigt, dass die Abwesenheit von TF und DnaK zu massiver, globaler Aggregation führt und für *E. coli* jenseits 30°C lethal wirkt (Deuerling, Schulze-Specking et al. 1999; Teter, Houry et al. 1999). Ohne ausreichenden Schutz durch Chaperone kann ein neu synthetisiertes Peptid also sehr früh in seinem Lebenszyklus irreversibel fehlfalten und mit anderen Peptiden im dichten Zytosol Aggregate bilden. Es wurde vermutet, dass dies gar cotranslational im Kontext von Polysomen geschehen könnte, da diese eine sehr hohe lokale Dichte (nahezu) identischer, ungefalteter Peptide aufweisen (Hartl and Hayer-Hartl 2002), allerdings gibt es bislang keine experimentellen Daten, die einen solchen Effekt direkt belegen könnten.

Basierend auf den Strukturdaten für dichte Polysomen, die in der vorliegenden Arbeit präsentiert werden, und gestützt auf die Hinweise aus der Simulation für naszente Peptide auf benachbarten Ribosomen eines Polysoms, erscheint der Schluss nahe, dass die polysomale Organisation tatsächlich einer möglichen Aggregation von naszenten Peptiden entgegenwirkt: Indem sich die großen Untereinheiten mit den Peptidausgängen auf unmittelbar benachbarten Ribosomen offenbar in größtmöglicher Distanz orientieren, besitzt das Polysom eine inhärente Fähigkeit, ungefaltete Konformere von Peptiden mittlerer Länge (~ 300 aa) voneinander räumlich getrennt zu halten. In dichten Polysomen scheint höchstens eine Interaktion mit Peptidketten mindestens ± 3 Ribosomen weiter *up-* bzw. *downstream* auf der mRNA möglich. Mit einem mittleren errechneten Abstand von 24 Codons pro Ribosom auf der mRNA wird ein Peptid also um mindestens 72 aa verlängert, bevor es in die unmittelbare Nähe eines weiteren RNCs gerät. In diesem Fall könnten kleine Domänen oder Faltungseinheiten schon ihren nativen Zustand einnehmen, wie für Konstrukte mit Ig-

Domänen gezeigt (Hsu, Fucini et al. 2007), oder zumindest zu einer Form kollabieren, die keine hydrophobe Bereiche exponiert.

Die Beschreibung der Polysomenorganisation in dieser Arbeit könnte also eine Erweiterung der bisherigen Hypothese darstellen, der zufolge die Hauptfunktion der cotranslational bindenden Chaperone die Verhinderung von intermolekularer Aggregation ist (Hartl and Hayer-Hartl 2002). Möglicherweise evolvierte diese Funktion der Chaperone nur sekundär zur Unterstützung der Polysomenarchitektur, und deren Hauptaufgabe liegt tatsächlich in der Verhinderung intramolekularer Fehlfaltung.

3.2. Konfigurationen eukaryotischer Polysomen in Säugerzellen

Im folgenden Teilprojekt soll beleuchtet werden, von welcher physiologischen Relevanz für eine intakte Zelle die im *E. coli*-Lysat beobachteten Polysomenkonfigurationen sind. Zudem ist es von großem Interesse, die evolutionäre Konservierung der Polysomenanordnungen bis hin zu höheren Eukaryoten zu überprüfen.

Mit dieser doppelten Zielsetzung wurde eine Säugerzelllinie gesucht, bei der morphologisch und funktionell zu erwarten wäre, aktive Ribosomen im peripheren Zytoplasma zu finden, das der KryoET zugänglich ist (< 500 nm Probendicke). In Kollaboration mit Lars-Anders Carlson und Kay Grünewald (beide Molekulare Strukturbiologie, MPI Biochemie) wurde hierfür die humane Glioblastomazelllinie U-87MG gewählt, die morphologische Ähnlichkeit mit Astrozyten oder -im weiteren Sinne- Neuronen aufweist. Gleichzeitig verspricht eine relativ hohe Proliferationsrate mit einer Generationszeit von ca. 24 h einen hohen Anteil aktiver Ribosomen am Gesamzellvolumen.

3.2.1. Polysomen in menschlichen Zelllinien

Zunächst wurde geprüft, ob und in welchem Anteil Polysomen in Lysaten von U-87MG zu finden sind, und wie sich deren Verteilung mittels Zugabe von Inhibitoren beeinflussen lässt. Hierzu wurde die Zelllinie als adhärente Kultur bis zu einer Konfluenz von 20-30% kultiviert. Vor der Ernte wurden verschiedene Proben von Kulturen entweder mit 100 µg/ml Cycloheximid (CHX) oder als Negativkontrolle 100 µg/ml Prm für 10 min bei 37°C inkubiert. CHX soll die Elongation eukaryotischer Ribosomen inhibieren und Polysomen stabilisieren. Prm fungiert ebenso wie in prokaryontischen Ribosomen auch in Eukaryoten als Peptidyl-Akzeptor im aktiven Zentrum des Ribozyms und soll Polysomen auch in Säugerzellen

dissoziieren (siehe 1.5). Im Lichtmikroskop ist keine morphologische Änderung während der CHX- oder Prm-Behandlung zu beobachten.

Nach rascher Abkühlung, Ernte durch Trypsinierung und sanfter Lyse durch hypoosmotischen Schock und Detergenzien (siehe 2.8), wurde das Zellysate aus CHX- bzw. Prm-behandelten Proben auf Saccharose-Dichtegradienten geladen und nach Ultrazentrifugation analysiert. Als weitere Negativkontrolle wurde das Lysat vor dem Beladen des Gradienten mit einem Überschuss von EDTA über Mg^{2+} behandelt, wodurch die großen 60S von den kleinen 40S Untereinheiten vollständig dissoziieren.

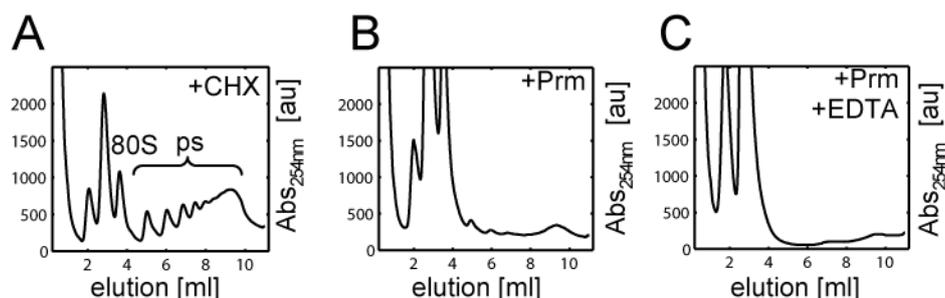


Abb. 38 Polysomen in U-87MG Zellen können *in situ* durch Puromycin disassembliert werden.

(A-C) Elutionsprofile von Zellysaten auf 10-50% Saccharose-Dichtegradienten bei 254 nm.

(A) Polysomen (ps) sind nach Vorinkubation der Zellen für 10 min mit 50 $\mu\text{g/ml}$ CHX zu detektieren, (B) nicht jedoch nach Inkubation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Prm.

(C) Als weitere Kontrolle wurde Lysat aus Prm-behandelten Zellen mit EDTA behandelt, um 80S Ribosomen zu disassemblieren. Es zeigt sich, dass eine geringe Menge Polysomen in der Prm-Kontrolle detektiert werden.

Das 254 nm-Elutionsprofil des Lysats aus CHX-behandelten Zellen zeigt deutlich die Anwesenheit von mittleren und großen Polysomen, die bis zu einer Größe von ca. 7-8 Ribosomen als Einzelpeaks auflösbar sind (Abb. 38 A). In der Prm-Kontrolle ist das Signal stark vom polysomalen Größenbereich hin zu monosomalen 80S Ribosomen verschoben: Im Bereich großer Polysomen ist kein Signal zu detektieren, aber geringe Mengen kleinerer Polysomen (Di-, Trisomen) sind noch zu finden (Abb. 38 B). Wie erwartet weist die EDTA-behandelte Kontrolle weder Polysomen noch Monosomen auf, sondern enthält ausschließlich

dissoziierte 40S (oder 48S) und 60S Komplexe (Abb. 38 C). Es wird betont, dass Prm ausschließlich vor der Lyse der Zellen präsent war, aber dann durch mehrmaliges Waschen entfernt wurde. Das bedeutet, dass die beobachtete Dissoziation von Polysomen schon *in situ* geschieht, also aktive Polysomen in der intakten Zelle dissoziieren. Dies sollte im Weiteren unter anderem dazu dienen, die Ribosomenverteilung in zellulären Tomogrammen mit dem Inhibitor messbar zu beeinflussen (siehe 3.2.4 und 3.2.6).

3.2.2. Die zytosolische Peripherie menschlicher Glioblastomzellen in Tomogrammen

Zur Untersuchung von Gliomzellen mit KryoET wurde die Zelllinie unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben (siehe 2.8) auf Goldnetzen für die KryoEM kultiviert. Die zu vitrifizierenden Zellen wurden nicht mit CHX vorbehandelt, da die Stabilisierung der Polysomen bei derart rascher Abkühlung überflüssig ist. Als Negativkontrolle wurden die Zellen vor der Vitrifizierung für 10 min mit Prm inkubiert.

Sehr lange, dünne Fortsätze der verwendeten Zelllinie mit einer Dicke von ca. 100-400 nm sind für die KryoET geeignet (Abb. 39 A). Es zeigte sich, dass in einem CM 300-Instrument bei 300 kV mit Energiefilter und Unterfokussierung von $\Delta z = 6 \mu\text{m}$ ein ausreichender Kontrast erreicht werden kann. Die erste Nullstelle bei der diesen Parametern entsprechenden CTF liegt bei 3.4 nm (vgl. Abb. 9 B), also sollte theoretisch selbst ohne Phasenkorrektur eine mittlere Auflösung erreichbar sein.

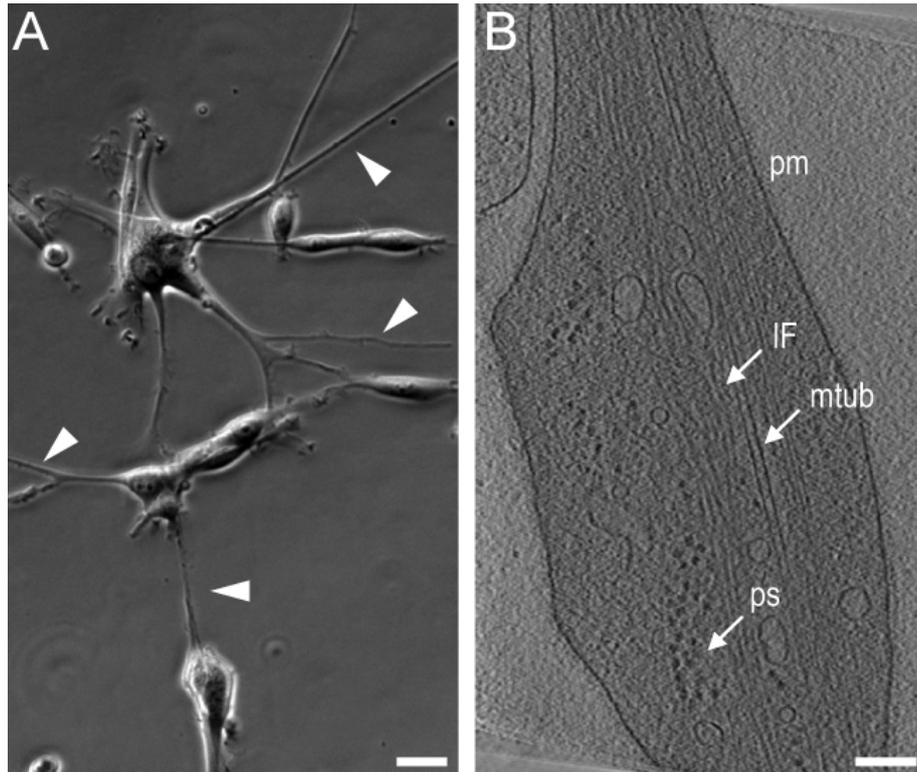


Abb. 39 Dünne Zellfortsätze der Glioblastoma Zelllinie U-87 enthalten lokale Akkumulationen von Ribosomen und sind für die KryoET zugänglich.

(A) In einem lichtmikroskopischen Phasenkontrastbild adhärenter U-87 Zellen sind dünne Fortsätze einer Länge $> 10 \mu\text{m}$ zu erkennen (weiße Pfeilspitzen). Maßstab, $30 \mu\text{m}$.

(B) Tomogramme wurden an peripheren Fortsätzen von auf kryoEM *grids* kultivierten Zellen aufgenommen. Verschiedene Zytoskelettkomponenten, Vesikel und Ribosomen in Polysomen können visuell lokalisiert werden (ps, Polysomen; mtub = Microtubuli; IF = Intermediärfilamente; pm = Plasmamembran). Maßstab, 100 nm .

12 Tomogramme der unbehandelten Zellen wurden im Bereich peripherer Zellfortsätze mit einem linearen Winkelinkrement von 1.5 deg aufgenommen, manuell aligniert und per WBP rekonstruiert (Lars-Anders Carlson, MPI Biochemie). Generell wird in Tomogrammen der unbehandelten Zellen ein großer Volumenanteil von Mikrotubuli, Intermediärfilamenten (IFs), (mutmaßlichen) Transportvesikeln und multivesikulären Einschlüssen, sowie ein geringerer Volumenanteil von F-Actin eingenommen (Abb. 39 B). Der Rest des peripheren Zytoplasmas ist dicht besetzt mit großen, elektronendichten Makromolekülen, von denen einige mit bloßem Auge als assemblierte Ribosomen erkennbar sind. Da zuvor im Zellysat ein großer Mengenanteil von Polysomen auf Saccharosegradienten zu detektieren ist, liegt der

Schluss nahe, dass auch in den rekonstruierten Tomogrammen größtenteils Ribosomen in Polysomen zu sehen sein sollten, wobei allerdings einzelne Polysomen per Auge nur in Ausnahmefällen abzugrenzen sind (Abb. 39 B, ps).

In 9 Tomogrammen der Prm-behandelten Kontrollzellen sind, wie zuvor im Lichtmikroskop, auch mittels KryoET keine prinzipiellen morphologischen Unterschiede festzustellen. Prm-behandelte Zellen weisen ebenso ein Zytosol mit dichter Packung von Mikrotubuli, IFs, Vesikeln, F-Actin und Ribosomen auf. Auch eine (globale) Umverteilung der Ribosomen ist per Auge nicht sofort festzustellen (vgl. Abb. 40 C). Allerdings fällt in Prm-behandelten Zellen eine abundante, ca. 1.5 Ribosomendurchmesser große, globuläre Spezies auf, die eine funktionale Bedeutung in translationsinhibierten oder gestressten Zellen haben könnte, wie weiter unten näher erläutert (siehe 3.2.11 und Abb. 52).

3.2.3. Die Lokalisation einzelner Ribosomen in zellulären Tomogrammen

Die räumlichen Koordinaten und Orientierungen einzelner Ribosomen in den rekonstruierten Tomogrammen wurde wiederum mit *template matching* erfasst. Hierzu wurden an Stellen mit vermuteten Ribosomenakkumulationen Subvolumen der o.g. Tomogramme mit einer Voxelgröße von $(1.64 \text{ nm})^3$ rekonstruiert. Zur initialen Selektion von Partikelkandidaten wurde dann eine externe Referenz eines eukaryotischen Ribosoms auf eine Auflösung von 4 nm gefiltert, auf dieselbe Voxelgröße reskaliert (Abb. 40 A) und mit *missing wedge* Korrektur in 3 Raum- und 3 Winkeldimensionen (Inkrementen von 10 deg) mit dem Zielvolumen korreliert (Abb. 40 B,C).

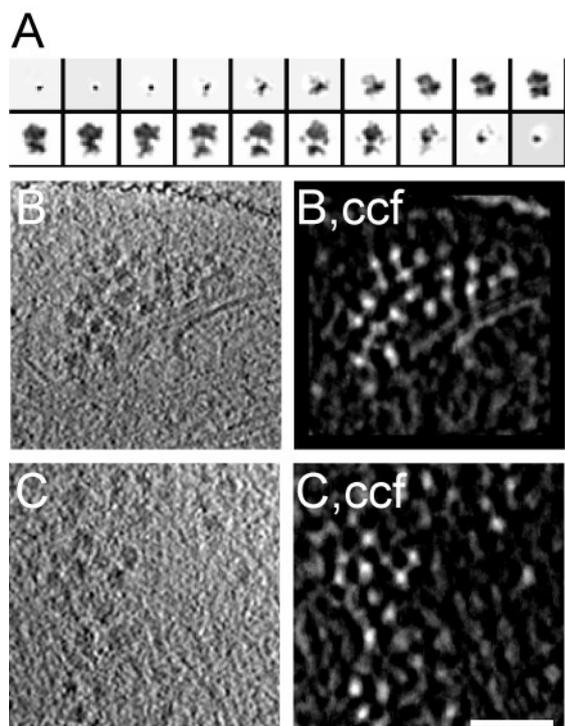


Abb. 40 3D template matching zytosolischer, eukaryotischer Ribosomen in U-87MG Zellen.

(A) Die verwendete Referenzstruktur eines Weizen-Ribosoms (Halic, Becker et al. 2005) reskaliert auf eine Größe von $(1.64 \text{ nm})^3/vx$ und *lowpass*-gefiltert auf ca. 4 nm Auflösung in einer kubischen Box von 48 vx Kantenlänge.

(B) Z-Schnitt eines Subtomogramms (rekonstruiert mit $(1.64 \text{ nm})^3/vx$, limitiert auf 3σ , unfiltriert) unbehandelter U-87MG Zellen mit Ribosomen und (B, ccf) die entsprechende 3D CCF im Koordinatenraum. Weiße Peaks entsprechen Koordinaten höchster Korrelation mit der Referenzstruktur in (A).

(C) Z-Schnitt eines Subtomogramms (rekonstruiert mit $(1.64 \text{ nm})^3/vx$, limitiert auf 3σ , unfiltriert) Prm-behandelter Zellen mit Ribosomen und (C, ccf) die entsprechende 3D CCF (Maßstab, 100 nm).

Wie vormals beschrieben (siehe 2.11.4 und 3.1.8), wurden die Koordinaten und Winkel der Maxima der CCF extrahiert und ungebinnte Subvolumina mit $(8.21 \text{ \AA})^3/vx$ an den Koordinaten der Peakmaxima rekonstruiert. Aus diesen initialen Partikelsätzen wurden manuell offensichtlich falsch positive Treffer, zum Beispiel kolloidales Gold oder Membranen, aussortiert, wobei Partikelsätzen von 1911 putativen Ribosomen aus unbehandelten Zellen und 1568 putativen Ribosomen aus Prm-behandelten Zellen verblieben. Die initialen CCC-Werte der selektierten Partikel (vor der Alignierungs-Prozedur) unterliegen einer gewissen Variation in Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses, des tatsächlichen Defokus(gradienten) und der Qualität der Rekonstruktion von Tomogramm zu Tomogramm, sind aber im Allgemeinen untereinander vergleichbar (Abb. 41 A,B). Prm-behandelte Ribosomen scheinen durchschnittlich etwas besser mit der Referenz zu korrelieren, möglicherweise wegen einer geringeren Partikeldichte in deren unmittelbarer Umgebung (Abb. 41 B).

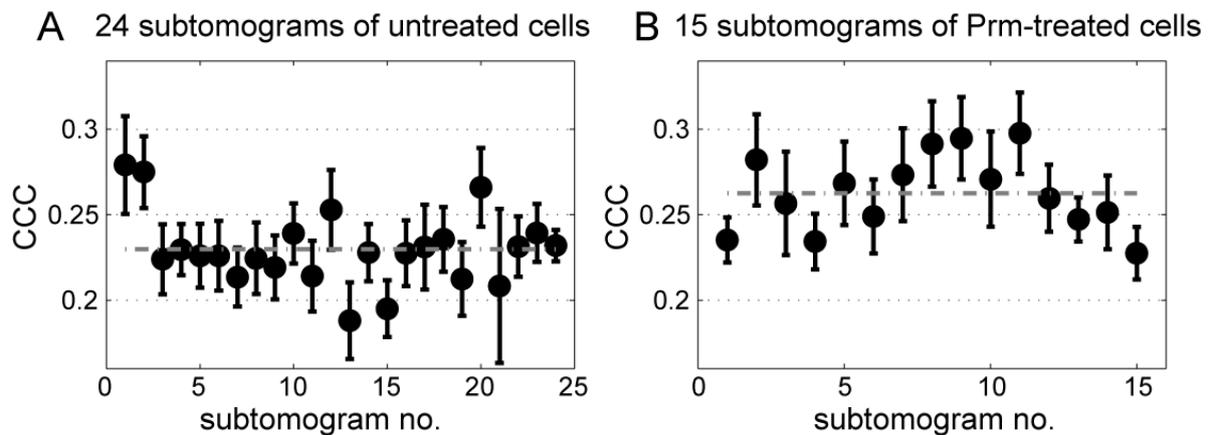


Abb. 41 Verteilung der CCC-Werte aller selektierten Partikel.

(A,B) Dargestellt sind die Mittelwerte (●) und Standardabweichungen (schwarze Balken) der CCCs von Partikeln aus allen verwendeten (Sub)Tomogrammen, sowie der Mittelwert aller Partikel (—) für die Datensätze mit (A) unbehandelten Ribosomen oder (B) Prm-behandelten Ribosomen.

Da jedoch im Vergleich zu der vorigen *in vitro* Studie (vgl. 3.1.1) die Erkennung von Partikeln in dichter, kontrastarmer zellulärer Umgebung maßgeblich beeinträchtigt ist, muss mit einer höheren Zahl falsch positiver Treffer und größerer Ungenauigkeit vor allem der Winkelkoordinaten gerechnet werden (vgl. 1.10.5). Aus diesen Gründen und um den Einfluss der externen Referenz auf die endgültige Partikelalignierung und Klassifizierung auszuschließen, wurden die ausgewählten, ungebinnten Partikelsätze (Voxelgröße $8.21^3 \text{ \AA}^3/vx$) einem neuen, unabhängigen Alignierungsalgorithmus unterzogen. Diese von T. Haller entwickelte Korrelationsprozedur (MPI Biochemie, unpubliziert) tastet nochmals den gesamten Eulerraum mit (mehreren tausend) Winkelsätzen, die zuvor im Quaternionenraum gleichmäßig inkrementiert wurden, ab. Als Startreferenzen genügen in diesem Falle sehr stark *lowpass*-filtrierte Mittelungen aus allen Partikeln, die zwar noch die grobe Orientierung der Untereinheiten, jedoch keinerlei detaillierte strukturellen Merkmale des Ribosoms im Frequenzbereich $< 10 \text{ nm}$ mehr vorgeben (Abb. 42 A, E). Die Alignierung und iterative Mittelung beider o.g. Partikelsätze konvergierte jeweils nach wenigen Abtastungen der fixen

Winkelsätze woraufhin zur Feinalignierung für jedes Partikel noch einige Iterationen mit sinkenden Winkelinkrementen um die jeweiligen Korrelationsmaxima herum gerechnet wurden. Die Partikelsätze wurden dabei anhand der CCC-Maxima in jeweils zwei Klassen getrennt, wobei jene mit höherer FRC als „echt positive“ Ribosomen und die schlechter korrelierenden als fragliche Treffer weiterbehandelt wurden. Die feinalignierten Partikelsätze werden im Folgenden direkt zur Strukturaufklärung verwendet (siehe 3.2.4), die zugehörigen Koordinaten und Orientierungen in einem weiteren Schritt zur räumlichen Korrelation von benachbarten Ribosomen (siehe 3.2.6).

3.2.4. Strukturaufklärung *in situ*

Die Dichten von 1081 der 1911 alignierten, unbehandelten Ribosomen (Abb. 42 B) und 1229 der 1568 Prm-behandelten Ribosomen (Abb. 42 C) wurden als „echt positive“ Treffer gemittelt ($CCC > \mu$). Die gemittelten Strukturen wiesen mit einer Auflösung bei 0.5 FSC von 3.9 nm (Abb. 42 E) bzw. 3.8 nm (nicht gezeigt) beide klar erkennbare Merkmale von Säugerribosomen auf (Spahn, Jan et al. 2004; Chandramouli, Topf et al. 2008); am deutlichsten erkennbar sind der L1 Arm, der L7/L12-Arm, die Zentrale Protuberanz (CP), der Kopf der 40S Untereinheit, sowie mehrere *expansion segments* (ES) (vgl. Abb. 43 A und Abb. 44).

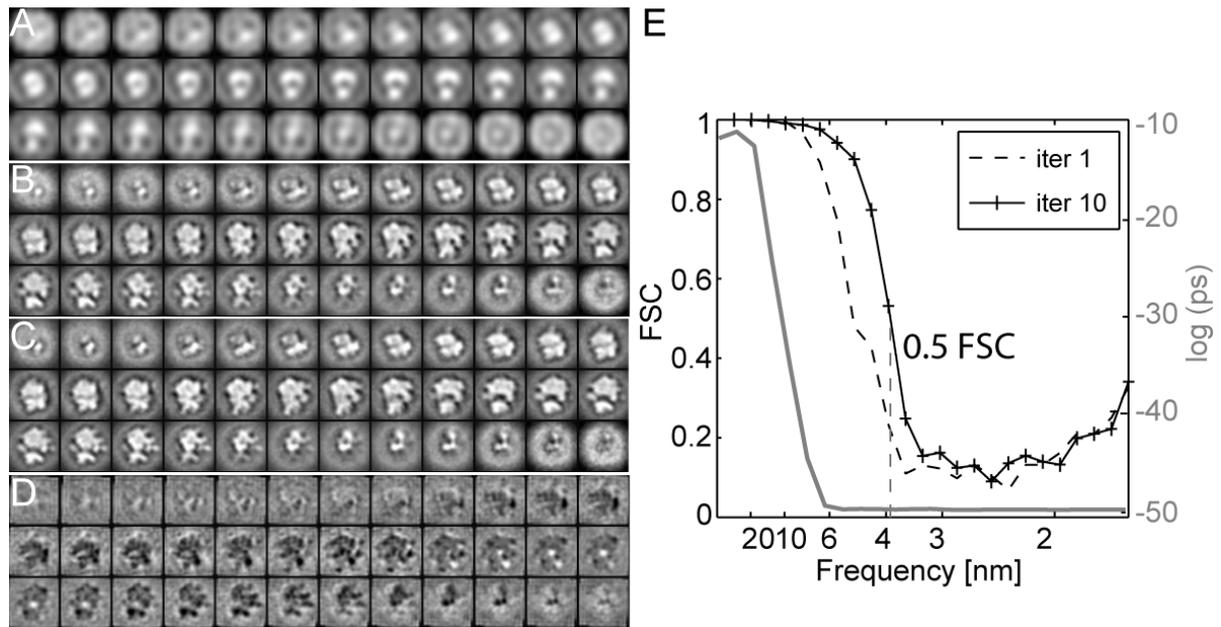


Abb. 42 Alignierung, Mittelung und Differenzkarte von unbehandelten und Puromycin-behandelten Ribosomen *in situ*.

(A) Die initiale, *lowpass*-gefilterte Startreferenz zur iterativen Alignierung gibt die grobe Orientierung des Ribosoms, aber keine Information im Frequenzbereich < 10 nm vor (E).

(B) Die gemittelte Struktur von 1081 klassifizierten unbehandelten Ribosomen aus einem Satz von 1911 Partikeln nach 10 Alignierungsiterationen erreicht eine Auflösung von 3.9 nm bei 0.5 FSC (E).

(C) Die gemittelte Struktur von 1229 klassifizierten Prm-behandelten Ribosomen aus einem Satz von 1568 Partikeln nach 10 Alignierungsiterationen erreicht eine Auflösung von 3.8 nm bei 0.5 FSC.

(D) Die Differenzkarte von (B)–(C) deutet auf eine signifikant höhere Dichte in unbehandelten Partikeln an der P-Stelle, sowie dem mRNA Eingang in der SSU hin (weiße Peaks).

(E) Auflösungsstest der Struktur unbehandelter Ribosomen (B). Nach zehn Iterationen wurden 1081 Ribosomen (—) als echt positive Treffer gemittelt mit einer Auflösung von 3.9 nm bei 0.5 FSC (senkrechte gestrichelte Linie). Im Vergleich ist die FSC nach der ersten Iteration (---) und die radial gemittelte Spektraldichtefunktion (ps) der Startreferenz dargestellt (—).

Um Dichten in tomographischen Mittelungen besser zuordnen zu können, wurden die Differenzdichten zwischen dem unbehandelten Partikelset und der Prm-behandelten Negativkontrolle errechnet. Hierzu wird der *average* der Prm-behandelten Ribosomen mit der EMAN-Prozedur *align3d* auf die gemittelte Dichte der unbehandelten Ribosomen aligniert. Dann wurden beide Dichten auf $\mu = 0$ und $\sigma = 1$ normalisiert und voneinander subtrahiert. Die Differenzkarte zeigt bei einem *isosurface threshold* von 3σ zwei sehr deutliche Dichteunterschiede: dem Prm-behandelten Partikelset fehlt eine globuläre Dichte an der wo die tRNA an der A- oder P-Stelle zu erwarten ist und eine etwas kleinere Dichte am mRNA

Eingang (Abb. 43 A, Spalten 2, 4). Zwar lässt sich die Tertiärstruktur der tRNA bei Auflösungen um die 4 nm nicht direkt erkennen, jedoch ist ein Fehlen in der Prm-Kontrolle ein deutliches Zeichen, dass ein Großteil der aktiven Ribosomen *in situ* von ihren Transkripten disassembliert wurden. Bei der *in situ* Behandlung mit Prm ist allerdings nicht auszuschließen, dass ein geringer Teil von Ribosomen in die Untereinheiten disassembliert wurde und neu initiiert hat (vgl. Abb. 38 B und Abb. 45). Interessanterweise lassen sich aber keine signifikanten Dichteunterschiede am Peptidausgang oder an der EF-Bindestelle detektieren. Vor allem ersteres deutet drauf hin, dass vornehmlich gebundene Komplexe und nicht naszentes Protein die zusätzliche Dichte am Peptidausgang ausmachen.

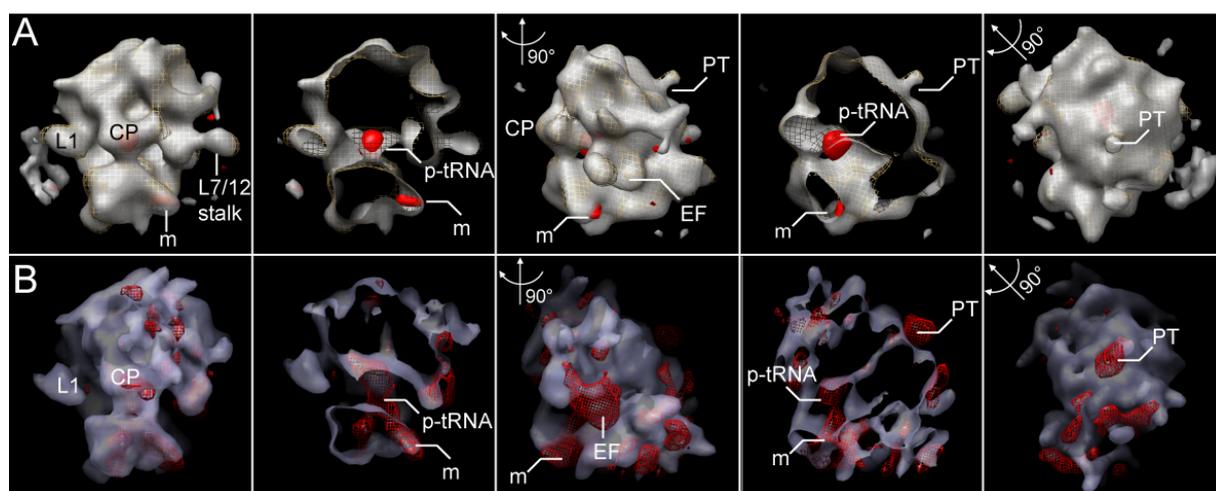


Abb. 43 Dichtedifferenzkarten von aktiven, Prm-behandelten und leeren 80S Ribosomen.

(A) *Isosurface* Darstellung der unbehandelten Ribosomen *in situ* (grau), der Prm-behandelten Ribosomen (gelbe Gitterdarstellung) und der Differenzdichte (rot) in drei Orientierungen (Spalten 1, 3, 5) und Querschnitten (Spalten 2, 4). L1 Arm, Zentrale Protuberanz (CP), L7/12 *stalk*, mRNA Eingang (m), EF Bindestelle (EF), peptidyl-tRNA, Peptidtunnelausgang (PT) wie eingezeichnet.

(B) Externe Referenz eines humanen 80S IRES (blau) und Differenzkarte (rot) mit tomographischem Mittel unbehandelter Ribosomen aus (A).

Im Vergleich der tomographischen Mittelung mit der Auflösungs-angepassten (*lowpass*-gefilterten) 3D Dichtekarte eines „leeren“ (IRES-gebundenen) humanen 80S Ribosoms (Spahn, Jan et al. 2004), zeigen sich weitere Unterschiede (Abb. 43 B). Eindeutig ist neben

der tRNA an der A- oder P-Stelle, einem gebundenen Elongationsfaktor (eEF1 α oder eEF2) und einer U-förmigen Dichte in der 40S-*neck*-Region (also im mRNA-Kanal / *codon recognition sites*) auch eine zusätzliche Dichte am Peptidtunnel auszumachen (Abb. 43 B).

3.2.5. Zusätzliche Dichte am ribosomalen Peptidtunnel *in situ*

In einem weiteren Schritt sollten nun gebundene Faktoren aktiver Ribosomen *in situ* genauer zugeordnet werden, um insbesondere am Peptidausgang ribosomale Komponenten von gebundenen Komplexen zu unterscheiden und diese zu lokalisieren. Hierzu wurden quasi-atomare Modelle der 40S und 60S Untereinheiten (pdb no. 2ZKQ, 2ZKR), die in einer anderen Studie durch Homologie-Modellierung und *flexible fitting* mit der KryoEM-Struktur eines Säuger-Ribosoms erstellt wurden (Chandramouli, Topf et al. 2008), manuell eingepasst und im Realraum mit dem tomographischen Mittel von unbehandelten Ribosomen aligniert. Zur Lokalisierung der Elongationsfaktoren-Bindestelle wurde ein weiteres pseudo-atomares Modell (pdb no. 1S1H) der *S. cerevisiae* 40S Untereinheit mit gebundenem eEF2 (Spahn, Gomez-Lorenzo et al. 2004) eingepasst (Abb. 44).

Mehr als 90% der pseudo-atomaren Modelle für 40S und 60S liegen innerhalb des gewählten *isosurface*-Grenzwerts von $1 \sigma_{\text{std}}$. Außerhalb der Dichte liegen neben geringen Anteilen der Modelle für ES7, ES9, ES31, ES27 und ES39, ein Teil des L1-Arms (28S rRNA und rpL10a/L1) und interessanterweise die E-tRNA (Abb. 44 A). Möglicherweise liegt der flexible L1-Arm *in vivo* also überwiegend in einer offenen Konformation nach E-tRNA Dissoziation vor, wie sie für bakterielle Ribosomen beschrieben wurde (Fei, Kosuri et al. 2008; Cornish, Ermolenko et al. 2009). Das bedeutet entweder, dass die E-Stelle *in situ* nur sehr transient besetzt ist, oder dass die deacylierte tRNA zwischen der klassischen E/E-

Konformation und dem P/E-Hybridzustand zu stark fluktuiert, um als Dichte gemittelt zu werden.

Klar lokalisierbar in den pseudo-atomaren Modellen ist hingegen die oben beschriebene zusätzliche Dichte einer tRNA an der P-Stelle, sowie Dichten am mRNA-Eingang, an der EF-Bindestelle und an der Bindestelle für das regulatorische, ribosomale WD40-Protein RACK1 (Abb. 44 A,B), die zuvor beschrieben wurde (Chandramouli, Topf et al. 2008).

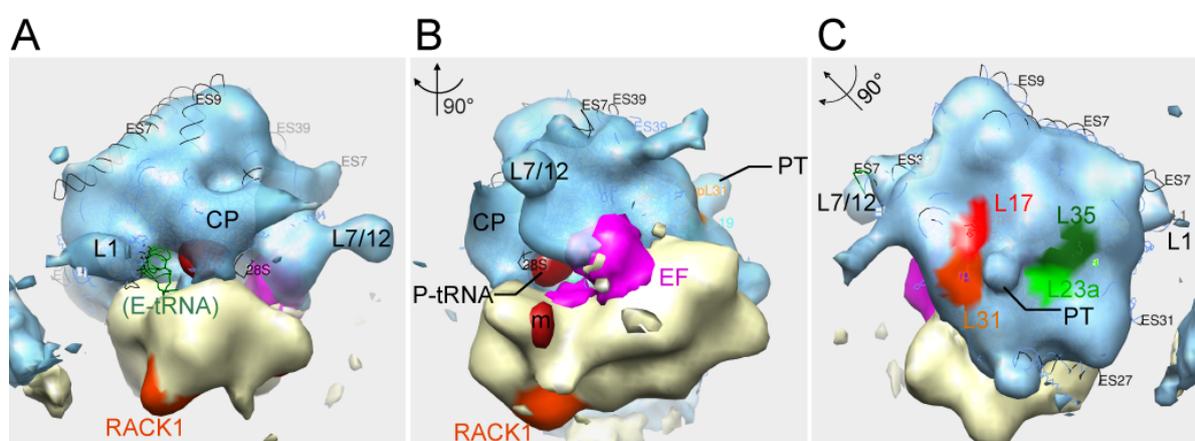


Abb. 44 Aktive Ribosomen tragen eine zusätzliche Dichte über dem Peptidausgang. (A) Top-Ansicht des gemittelten 80S Partikels (60S, blau; 40S gelb) mit einem eingepassten pseudo-atomaren Modell für die 60S Untereinheit. Zur Orientierung sind der L1-Arm, die CP, der L7/L12-Arm und die Bindestelle von RACK1 hervorgehoben. Der E-tRNA ist keine Dichte zuzuordnen (grün). *Expansion segments* (ES) der rRNA, die nicht vollständig in die Dichte passen, sind schwarz bezeichnet. (B) Front-Ansicht des 80S in (A). Die besetzte EF-Bindestelle (EF, magenta), die peptidyl-tRNA (rot) sowie der Peptid-tunnel-Ausgang (PT) sind markiert. (C) In der Rückansicht des gemittelten 80S ist die Positionierung einer zusätzlichen Dichte über dem PT zwischen oberflächen-exponierten Resten der Proteine Rpl17 (L17, rot), Rpl23a (L23a, grün), Rpl35 (L35, dunkelgrün) und Rpl31 (L31, orange) erkennbar.

Die zusätzliche Dichte an der 60S Untereinheit, die je nach gewähltem *isosurface* Grenzwert gebundene Komponenten zwischen 20-40 kDa umfassen könnte, ist im pseudo-atomaren Modell unzweifelhaft einer Region über dem Peptid-tunnel zuzuordnen, mit ungefähr gleichem Abstand zu den Oberflächen-exponierten Resten der (humanen) Proteine Rpl17, Rpl23a, Rpl35 und Rpl31 (Abb. 44). Rpl17, Rpl23a und Rpl35 sind zu *E. coli* L22, L23 und L29 homolog, zu Rpl31 gibt es kein homologes bakterielles Protein. In Bakterien dient L23

zusammen mit Resten von L29 und der 23S rRNA (Domäne III) als Bindestelle für TF (Ferbitz, Maier et al. 2004), und SRP weist Bindestellen zu Resten von L23, L29, L22 sowie L18 auf (Schaffitzel, Oswald et al. 2006). In Eukaryoten wurde L23 (und L29) ebenso als Haupt-Bindestelle für SRP54 (Halic, Becker et al. 2004; Wild, Halic et al. 2004) als auch für den Sec61-Komplex charakterisiert (Beckmann, Spahn et al. 2001).

Darüber hinaus wurde postuliert dass L23 in Eukaryoten als Bindestelle für RAC und NAC dient (Rauch, Hundley et al. 2005; Wegrzyn, Hofmann et al. 2006). Bisher ist allerdings keine Struktur von RAC oder NAC am Ribosom bekannt, im Gegensatz zu SRP oder dem Translokton.

Nun kann die Dichte am Peptidaustritt der gemittelten Struktur *in situ* naturgemäß wohl keinem gebundenen Komplex in der Zelle direkt zugeordnet werden, sondern repräsentiert wahrscheinlich das zytosolisch vorliegende Gemisch verschiedener Chaperonkomplexe, dem SRP und/oder Methionyl-Aminopeptidasen oder N-Acetyltransferasen. Zumindest ist auszuschließen, dass sich Translokton-assoziierte Ribosomen im Datensatz befinden, da in keinem der zellulären Tomogramme eine Struktur, die dem rER entsprechen könnte, zu sehen ist.

Im Weiteren wurde versucht, die Polysomen-assoziierten Komponenten durch die Isolierung von Polysomen aus den Gliomzellen, Pelletierung mit oder ohne Prm und mit oder ohne 700 mM NaCl und anschließende LC-MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) der tryptinierten Peptidfragmente nachzuweisen und zu quantifizieren. In vorläufigen Analysen wurden dabei in CHX-behandelten Polysomenfraktionen u.a. Peptide von humanem NAC α/β , Hsp70L1 (dem mRAC-Hsp70), Hsc70 sowie von Polysomen-spezifischen Proteinen wie PABP und eIF4G/F im Vergleich zu Prm-behandelten Polysomen angereichert gefunden (Daten nicht gezeigt). Die zu Abschluss dieser Arbeit vorliegenden Daten erlauben allerdings

noch keine definitive Aussage zum quantitativen Verhältnis der am Peptidtunnel gebundenen Kandidaten-Proteine.

3.2.6. Bevorzugte Konfigurationen benachbarter Ribosomen in humanen Zellen

Mit den feinalignierten Koordinaten und Winkeln der Partikeldatensätze lassen sich nun wiederum die räumliche Verteilungen von Ribosomen in den Ausgangstomogrammen erfassen. Mit der gleichen Prozedur wie unter 3.1.8 beschrieben wurden nun die relativen NNDs für alle Ribosomen und deren nächste (oder zweit-, dritt-, ...-nächste) Nachbarn, sowie die entsprechenden relativen Orientierungen bestimmt.

Zunächst wurde diese Analyse für die 1911 initial gewählten Ribosomen in unbehandelten Zellen durchgeführt. Es zeigte sich eine deutlich anisotrope Verteilung der Distanzvektoren zwischen den Schwerpunkten der NND, was eine präferentielle Positionierung benachbarter Partikel in mindestens zwei Hauptclustern an den Positionen $i+1$ oder $i-1$ mit einem mittlerem Abstand zum Zentrum i von 26.8 ± 2.8 nm andeutet (Abb. 45 A). Die Schwerpunkte der Cluster liegen wie schon bei den untersuchten Bakterien-Polysomen in unmittelbarer Nähe zum mRNA Eingang, bzw. Ausgang, erscheinen allerdings etwas breiter und „verrauschter“ als im Falle der arretierten Bakterienpolysomen *in vitro* (vgl. Abb. 32 B,C). Während keine globale Vorzugsorientierung der Ribosomen in der Zelle zu sehen ist (Abb. 45 B), weist die Verteilung der relativen Winkelsätze $(\varphi, \psi, \theta)_{i,k}$ für jedes Partikel i und dessen nächstem Nachbarn k deutliche Cluster von relativen Vorzugsorientierungen auf (Abb. 45 C), die allerdings etwas geringer als bei arretierten bakteriellen Polysomen ausgeprägt sind (vgl. Abb. 34 B). Gründe für das erwartbare höhere Maß an Flexibilität ist

wahrscheinlich eine geringere Dichte von Polysomen auf den mRNAs *in vivo* (Ingolia, Ghaemmaghami et al. 2009).

Um auszuschließen, dass unspezifisches Akkumulieren von Ribosomen *in situ* alleine durch *molecular crowding* (Grunewald, Medalia et al. 2003) schon zu einer Vorzugskonfiguration zwischen Nachbarpartikeln führen kann, wurden die NNDs von unbehandelten mit jener von 1568 Ribosomen aus Prm-behandelten Zellen verglichen. Da ein Großteil der Ribosomen auf Dichtegradienten nach *in situ* Prm-Behandlung nicht mehr in Polysomen vorlag (vgl. Abb. 38 B), ist zu erwarten, dass Nachbarribosomen in den entsprechenden Tomogrammen keine oder eine verminderte relative Vorzugskonfiguration aufweisen.

Tatsächlich zeigt die NND von Prm-behandelten Ribosomen eine deutlich geringer ausgeprägte Anisotropie der Distanzvektoren mit einem erhöhten durchschnittlichen Partikelabstand von 29.9 ± 5.3 nm (Abb. 45 D) und größtenteils isotroper Verteilung der relativen Nachbar-Orientierungen (Abb. 45 E,F).

Zwar verbleibt noch eine Restanzahl von präferentiell positionierten Nachbarribosomen, die nach wie vor eine gering ausgeprägte Vorzugsorientierung im Winkelraum aufweisen (Abb. 45 F) jedoch ist anzunehmen, dass dieser Resteffekt aus der Präsenz von re-initiierten oder unvollständig dissoziierten Polysomen in Prm-behandelten Zellen resultiert. Auf eine möglicherweise unvollständige Wirkung von Prm deutet auch die Beobachtung von geringen Mengen kleiner Polysomen in der Dichtegradientenzentrifugation hin (vgl. Abb. 38 B). Insgesamt ist aber deutlich erkennbar, dass Prm präferentielle ribosomale Nachbarkonfigurationen spezifisch vermindert, und diese daher charakteristisch für aktive Polysomen sind.

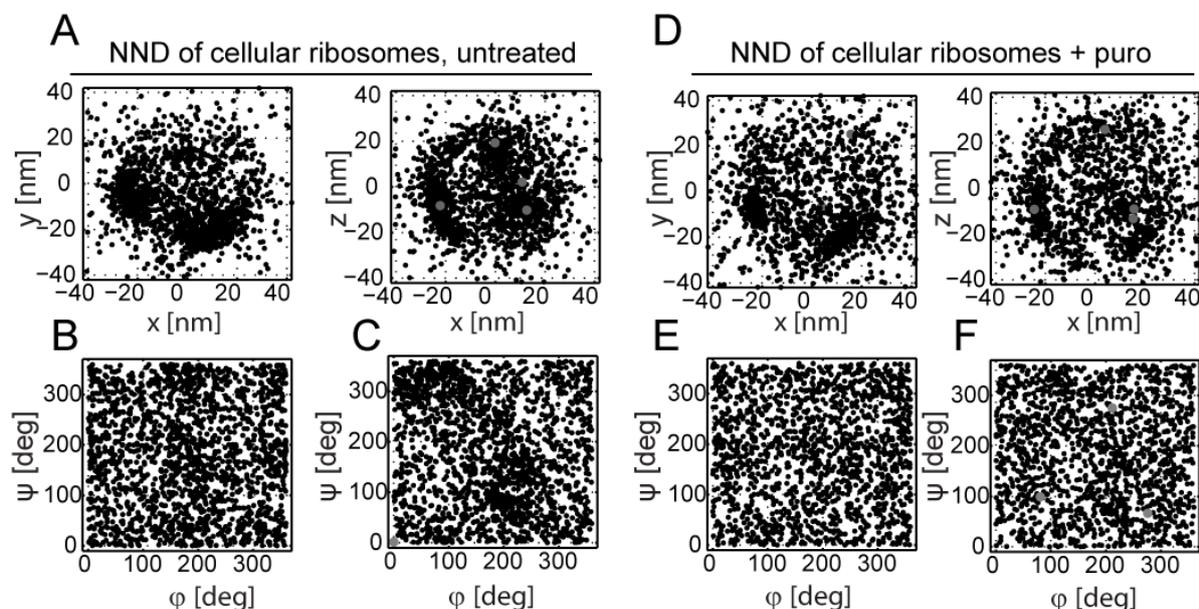


Abb. 45 Die NND zwischen (erst)nächsten zytosolischen Nachbarribosomen ist in aktiv translatierenden Zellen stark anisotrop.

(A) Die Verteilung der Distanzvektoren zwischen 1911 alignierten Partikeln und deren nächsten Nachbarn ist in der (x,y)-Ebene (links) und der (x,z)-Ebene (rechts) dargestellt.

(B) Die (ϕ, ψ) -Verteilung der absoluten Winkelsätze (ϕ, ψ, θ) aller Partikel ist größtenteils isotrop, d.h. die Partikel weisen keine globale Vorzugsorientierung auf.

(C) Die (ϕ, ψ) -Verteilung der relativen Winkelsätze $(\phi, \psi, \theta)_{i,k}$ wurde für jedes Partikel i (wie in A,B) und dessen nächstem Nachbarn k bestimmt und weist deutliche Cluster von Vorzugsorientierungen auf.

(D) Für 1568 alignierte Partikel aus Prm-behandelten Zellen ist wie in (A) die NND der Massenschwerpunkte dargestellt. Dargestellt sind jeweils nur $\Delta(x,y,z)_{i,k}$ zu Nachbarn innerhalb eines (relevanten) Maximalabstands von ± 40 nm in jede Raumrichtung.

(E,F) Wie in (B,C) ist die Verteilung der absoluten Winkel (E) und aller relativen (F) nächsten Nachbarorientierungen von Prm-behandelten Ribosomen dargestellt.

3.2.7. Hierarchisches Clustering von Distanzen und relativen Winkeln

Mit dem Datensatz von NNDs *in situ* erwies sich ein direktes *k-means* Clustering als weniger geeignet zur gezielten Klassifizierung aufgrund der recht breiten und nicht globulären Verteilung der NND. Als besser geeignet, um natürlich vorkommende Cluster im Koordinaten- und Winkelraum gleichzeitig zu erfassen, erweist sich hier eine hierarchische Clusteranalyse von Distanzvektoren $\Delta(x,y,z)_{ik}$ und relativer Winkelsätze $(\phi, \psi, \theta)_{ik}$. Um gemeinsam klassifiziert zu werden, müssen zunächst die relativen Winkel zu den nächsten

Nachbarpartikeln in Quaternionen $\Delta(q_0, q_x, q_y, q_z)_{ik}$ transformiert werden. Als Abstandsmaß zwischen verschiedenen $\Delta(x, y, z)_{ik}$ und $\Delta(q_0, q_x, q_y, q_z)_{ik}$ dient die Summe deren Skalarprodukte, also der Cosinus der Winkel zwischen Abstands- bzw. Quaternionenvektoren (genauer beschrieben in Abschnitt 2.11.5). Ebenso können die zweitnächsten Nachbarn zu jedem Ribosom i erfasst und in die Clusteranalyse mit einbezogen werden (siehe unten).

Die NND weist mindestens 4 stark populierte Konfigurationen von nächsten und zweitnächsten Nachbarn auf (Abb. 46 A,B), wobei sich jeweils mindestens zwei Vorzugspositionen von nächsten Nachbarn an der $i+1$ (#118 und #30), bzw. an der $i-1$ Position (#42 und #125) zeigen, die sich alle in der Nähe des mRNA Eingangs, bzw. Ausgangs an der *neck*-Regions der 40S Untereinheit befinden (Abb. 46 C).

In Bezug auf die gewählte Referenzorientierung (0,0,0), befinden sich die mittleren Massenschwerpunkte der nächsten $i+1$ Nachbarn bei $\Delta(x, y, z) = (-24 \text{ nm}, -7 \text{ nm}, -4 \text{ nm})$, oder $\Delta(x, y, z) = (-20 \text{ nm}, -3 \text{ nm}, -16 \text{ nm})$ und die mittleren Massenschwerpunkte der nächsten $i-1$ sind bei $\Delta(x, y, z) = (10 \text{ nm}, -22 \text{ nm}, -8 \text{ nm})$, bzw. $\Delta(x, y, z) = (3 \text{ nm}, -21 \text{ nm}, 15 \text{ nm})$ zu finden (Abb. 46 C, Kreuze). Außerdem wurden zwei weniger definierte Cluster identifiziert, die weitere Konfigurationsklassen mit höherer Flexibilität repräsentieren könnten (Abb. 46 C, magenta/ocker). Bemerkenswerterweise zeigen alle Cluster deutlich bevorzugte relative Orientierungen, wie an der Verteilung relativer Winkelsätze $(\varphi, \psi, \theta)_{i,k}$ zu erkennen (Abb. 46 D). Die wahrscheinlichste Orientierung jedes Clusters von Nachbarorientierungen kann aus dem arithmetischen Mittel im Quaternionenraum ermittelt und in Eulerwinkel rücktransformiert werden (Abb. 46 D, Kreuze).

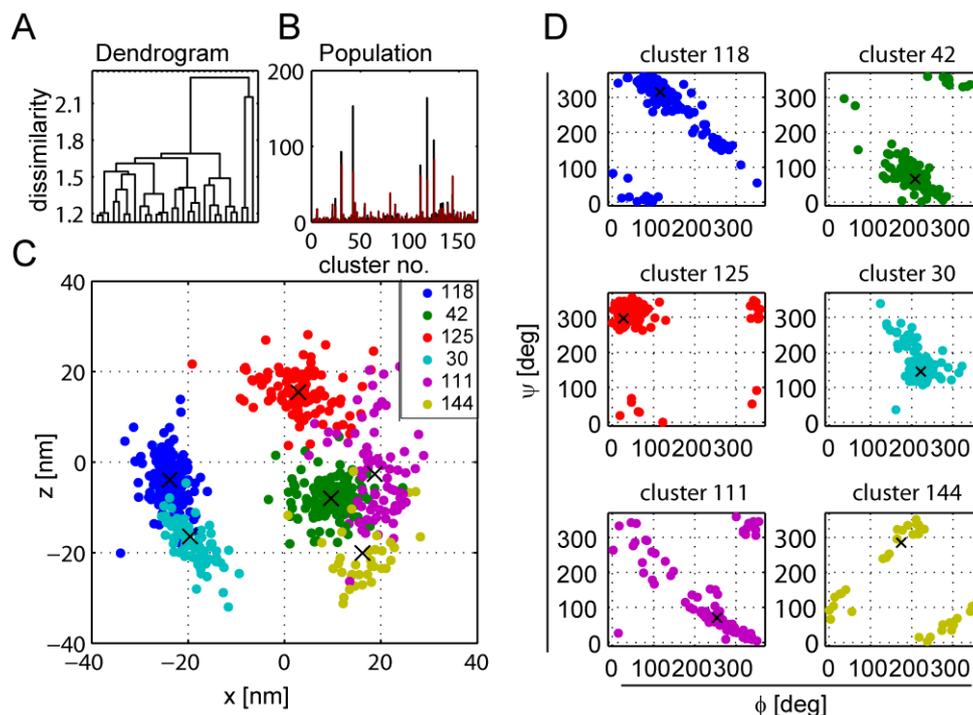


Abb. 46 Hierarchisches Clustering der NND im Koordinaten- und Winkelraum.

(A) Dendrogramm der gewichteten NND_{weight} bei einem Grenzwert von $2 \sigma_{\text{std}}$. Halbschematische Darstellung ohne Populationsangaben der einzelnen Äste.

(B) Populationen der hierarchischen Cluster für die Verteilung der erstnächsten (schwarz) und der zweitnächsten Ribosomen (rot). 4 Hauptcluster (hier # 118, 42, 125, 30) sind besonders bevorzugt.

(C) (x,z) -Darstellung der geclusterten Distanzvektoren (ungewichtet, physikalische Länge) für die 6 häufigsten Klassen (wie farblich kodiert). An jeder Stelle $i+1$ und $i-1$ sind wenigstens zwei Vorzugskonfigurationen zu beobachten. Die Mittelwerte der Distanzvektoren sind markiert (\times).

(D) (ϕ, ψ) -Verteilung der geclusterten relativen NND Konfigurationen (ungewichtet, Euler-Winkel), wie in (C) entsprechend der Cluster-Zugehörigkeit farblich kodiert. Mittelwerte der Winkelcluster sind mit (\times) markiert.

Im Vergleich mit der NND und den relativen Orientierungen erscheinen vor allem die zwei häufigsten Konfigurationsklassen an $i+1$ Position (Cluster #118), bzw. $i-1$ Position (Cluster #42) sehr ähnlich oder identisch zur top-top-Konfiguration in arretierten *E. coli* Polysomen (vgl. Abb. 33 und Abb. 34), was auch nochmals unterstreicht, dass die *in situ* gefundenen Nachbarkonfigurationen spezifisch für Polysomen sind. Die zweite Vorzugskonfiguration an Position $i+1$ (Cluster #30) stellt eine alternative Konformation dar und ähnelt möglicherweise der top-to-bottom Konfiguration der bakteriellen Polysomen.

Die zweite Konfigurationsklasse an $i-1$ Position (Cluster #125) ist jedoch entlang der z -Achse in Richtung des 40S Kopfes in Ribosom i verschoben, was in Bakterien so nicht beobachtet

wurde (Abb. 46 C). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Klasse gar nicht die nächsten Ribosomen auf der mRNA erfasst, sondern möglicherweise weiter *up-* oder *downstream* gelegene Ribosomen in dichten (helikalen) Polysomen beschreibt. Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, quantitativ eine so klar definierte, rigide Konfiguration für Ribosomen, die keine direkten Nachbarn auf der mRNA sind, zu finden.

Um abzuschätzen, ob die einzelnen Konfigurationsklassen in einem Polysom regelmäßig oder alternierend auftreten, wurde nun die Clusterpopulation der jeweils zweitnächsten Nachbarn für jede Konfiguration ermittelt. Das bedeutet, dass in Modulen von drei aufeinanderfolgenden „Trisomen“ nach bevorzugtem Auftreten von „Konfigurationspaaren“ gesucht wurde. Es zeigt sich, dass wenn z.B. der nächste Nachbar zur Konfiguration top-top an Position $i+1$ aufweist (Abb.47, Cluster #118), so befindet sich eine signifikante Zahl der zweitnächsten Ribosomen in der alternativen $i+1$ Konfigurationsklasse (#30).

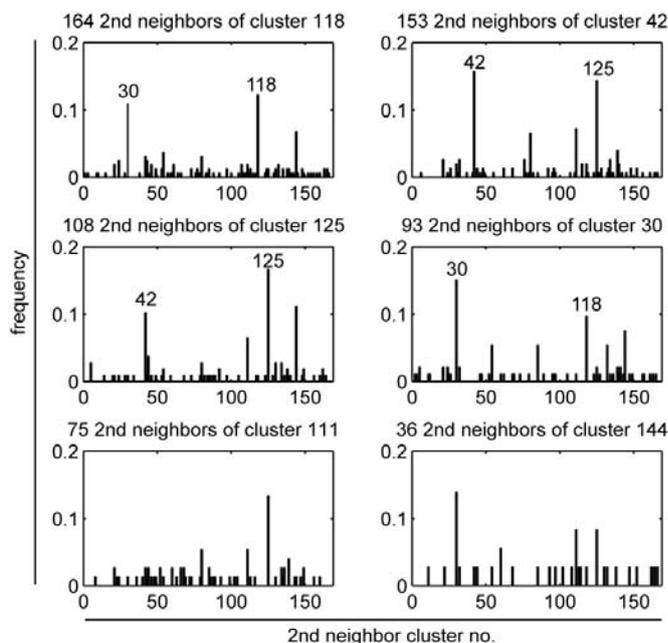


Abb. 47 Unimodale und alternierende Konfigurationen in Modulen aus Tri-somen. Dargestellt sind Histogramme der Konfigurationsklassenpopulationen der jeweils zweitnächsten Nachbarribosomen, aufgetrennt nach den Konfigurationen der erstnächsten Ribosomen. Häufig auftretende Konfigurationsklassen der zweitnächsten Nachbarn sind mit den entsprechenden Klassen-Indizes hervorgehoben.

Das bedeutet, dass neben unimodalen Topologien von Tri-somen auch alternierende Konfigurationen *in vivo* auftreten. Dieses Ergebnis ist wichtig, wenn man die Struktur eines (hypothetischen) großen Polysoms extrapolieren möchte (vgl. 3.2.9).

3.2.8. Klassifizierung aktiver Ribosomen anhand der Nachbarkonfiguration

Die Idee ist naheliegend, die oben beschriebenen, polysomalen Vorzugskonfigurationen in einem Klassifizierungsschritt zur Identifizierung von aktiven Ribosomen *in situ* heranzuziehen. Hierzu werden die den einzelnen Konfigurationsklassen zugeordneten Partikel gewählt und dann entweder ohne weitere Alignierung direkt gemittelt oder weiteren Klassifizierungsmethoden unterzogen.

Zur Abschätzung und Verdeutlichung der klassifizierten Vorzugskonfigurationen lassen sich (anstatt eher abstrakter relativer Winkelsätze im Eulerraum) auch Gruppen von jeweils drei Distanzvektoren abbilden (Abb. 48 A). Drei Vektoren sind ausreichend, um die Nachbarkonfiguration eindeutig zu erfassen und in dieser Darstellung wird die Ähnlichkeit mit den unter Abschnitt 3.1.8 beschriebenen *E. coli*-Polysomenkonfigurationen deutlicher (vgl. Abb. 33).

Nun wurden für alle 1911 unbehandelten Ribosomen und 1568 Prm-behandelten Ribosomen größere, ungebinte Subtomogramme mit einer Box-Größe von 96x96x96 Voxel ($8.21^3 \text{ \AA}^3/\text{vx}$) rekonstruiert, die mehrere Ribosomen enthalten können. Dann wurden zwischen 100-200 Partikel pro Klasse (vgl. Abb. 46 B) mit Nachbarn an den Positionen $i+1$ und $i-1$ mit den alignierten Raum- und Winkelkoordinaten, die zum hierarchischen Clustering verwendet wurden, gemittelt (siehe 3.2.6). Bei geringer Flexibilität innerhalb der Klassen ist zu erwarten, dass die Dichten der Nachbarribosomen, die nicht im Alignment mit einbezogen waren, in den gemittelten Subvolumina zu erkennen sein müssten. In der Tat werden

zusätzliche Massendichten in der Nähe der $i+1$ und $i-1$ Positionen beobachtet, die allerdings nicht klar genug definiert sind, um eindeutig als 80S Ribosomen identifiziert zu werden (Abb. 48 B). So ergibt sich für die Positionierung der kleinen Untereinheiten ein Anhaltspunkt, aber keine direkte strukturelle Beschreibung.

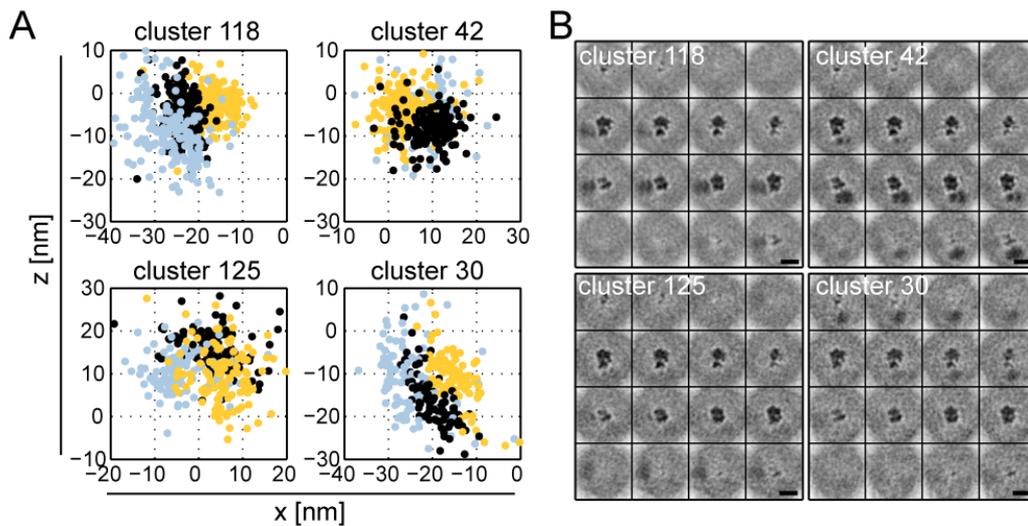


Abb. 48 Die Hauptklassen von NNDs sind flexibler aber vergleichbar mit bakteriellen Polysomen.

(A) In der (x, z) -Darstellung der 3 Distanzvektoren zwischen Massenschwerpunkten CM_{ik} (●), Vektoren zwischen CM_i und zwei Punkten in der 40S (●) oder der 60S Untereinheit (●) der klassifizierten Partikel i_{clust} beschriebenen Hauptcluster zeigen sich deutlich ausgeprägte Vorzugskonfigurationen an Position $i+1$ (Cluster #118, 30) und $i-1$ (Cluster # 42, 125).

(B) In den Mittelungen der entsprechenden Partikelsätze zeigt sich eine undeutliche Dichte der Nachbarrisomen für jede Klasse. Maßstab, 25 nm.

Die tatsächlich gemittelte Elektronendichte eines „Disoms“ *in situ* ist also nicht direkt zu bestimmen. Jedoch lässt sich die häufigste Disomenstruktur zumindest *bona fide* modellieren, indem neben die gemittelte Struktur eines auf $(x, y, z) = (0, 0, 0)$ zentrierten Ribosoms in Referenzorientierung ein zweites Ribosom mit den durch die oben beschriebene Clusteranalyse ermittelten Clusterschwerpunkten im Koordinaten- und Winkelraum platziert wird (Abb. 49 A).

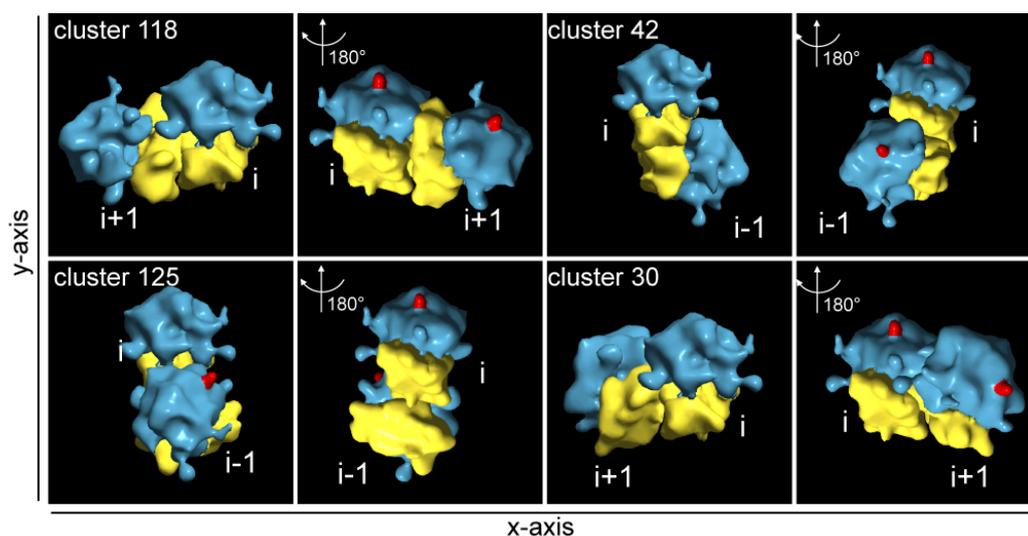


Abb. 49 Modellierung der 4 dominanten relativen Konfigurationen von $i+1$ und $i-1$ Nachbarn. 80S Ribosomen (60S, blau; 40S gelb; Peptidausgang, rot) wurden als *isosurface* Modelle mit den mittleren Abstandsvektoren und Winkeln der entsprechenden Clusterschwerpunkte plaziert und sind in *top* Ansicht (jeweils links) oder um 180° um die *y*-Achse gedreht dargestellt (jeweils rechts).

Es lassen sich so die Abstände zwischen mRNA Eingang und dem nächstgelegenen Ausgang, die Abstände der Peptid tunnel-Ausgänge sowie potentielle Kontaktstellen zwischen benachbarten Ribosomen visualisieren. In Kombination mit einem gedockten (pseudoatomaren) Homologiemodell (vgl. Abb. 44) lässt sich abschätzen, welche ribosomalen Komponenten an der Nachbar-Nachbar-Positionierung beteiligt sein könnten. So befindet sich in der top-to-top Konfiguration zwischen Ribosomen i und $i+1$ (Abb. 49, #118) das Ende des L1-Arms (28S rRNA ~U3965-A3984 + Protein L1) des Ribosoms i unweit der eEF-Bindestelle von $i+1$ (vgl. Abb. 44). Der mRNA Ausgang wird in unmittelbarer Nähe des mRNA Eingangs von Ribosom $i+1$ positioniert und große Teile der 40S Untereinheit von i (Rps5e, Rps14e und eine 18S rRNA Helix zwischen U1252-C1264) könnte möglicherweise mit Anteilen der 40S Untereinheit $i+1$ (Rps20, Rps3e, Rps9e, und ES4 der 18S rRNA) unmittelbar interagieren.

Es ist denkbar, dass ein bisher unbekannter Mechanismus in dichten Polysomen zum Tragen kommt, der eine Rückkopplung der Dissoziation von der E-Stellen tRNA, der Bewegung des L1-Arms und der Bindung von EF1 α -tRNA oder EF2 am 5'-gelegenen Ribosom bewirkt. Diese Hypothese könnte im Vergleich zu bisherigen (bakteriellen) Modellen zur Bewegung des L1-Arms und der Ratschen-Bewegung der kleinen Untereinheit (Fei, Kosuri et al. 2008; Cornish, Ermolenko et al. 2009) in Anwesenheit von dichten Polysomen (z.B. Disomen) experimentell getestet werden. Beispielsweise könnte die Verweildauer des L1-Arms in der offenen Konformation, der tRNA an der E-Stelle oder der Elongationsfaktoren mit Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer im Fließgleichgewicht gemessen werden, wie in den zitierten Arbeiten beschrieben, und zwischen Monosomen und Polysomen verglichen werden.

3.2.9. Modelle der 3D Organisation eukaryotischer Polysomen

Polysomen im peripheren Zytoplasma des beschriebenen Zelltyps sind unter normalen Wachstumsbedingungen stark pleomorph. Es konnte hier allerdings gezeigt werden, dass zumindest auf der Ebene von nächsten Nachbarn deutlich ausgeprägte Vorzugskonfigurationen bestehen. Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, sind zwar auch „Module“ aus Disomen in zellulärer Umgebung noch zu flexibel, um eine deutlich definierte 3D Struktur direkt zu mitteln (siehe 3.2.8), aber es lassen sich mit den gemittelten Konfigurationen zumindest gut fundierte Modelle für Disomen errechnen. Verfährt man so mit N Iterationen von einem Ribosom zum nächsten, lässt sich die Struktur des theoretischen N -Polysoms „der wahrscheinlichsten Clusterschwerpunkte“ modellieren (Abb. 50). Wird zum Beispiel die relative Konfiguration der oben beschriebenen top-to-top Hauptcluster $i+1$, bzw. $i-1$ n -fach repliziert und jeweils Ribosomen-Modelle in einem Volumen entsprechend platziert, lässt sich unmittelbar die extrapolierte helikale Anordnung mit 4 Ribosomen pro

Windung erkennen (Abb. 50, #118 und #42). Unimodale Extrapolationen der weniger häufigen Konfigurationen an Position $i+1$, bzw. $i-1$ ergeben eine lockere helikale Gesamttopologie mit ca. 5.5 Ribosomen pro Windung (Abb. 50 #30, #125). Wie oben beschrieben (vgl.

Abb. 47) treten in der Zelle alternierende Konfigurationenklassen in drei aufeinander folgendenen Nachbar-Ribosomen auf. Modelliert man Polysomen in einem 1:1-Verhältnis der Konfigurationen an entweder $i+1$ oder $i-1$ -Positionen, so ergibt sich eine weite spiralförmige Topologie mit ca. 8-12 Ribosomen pro Windung (Abb. 50, rechts).

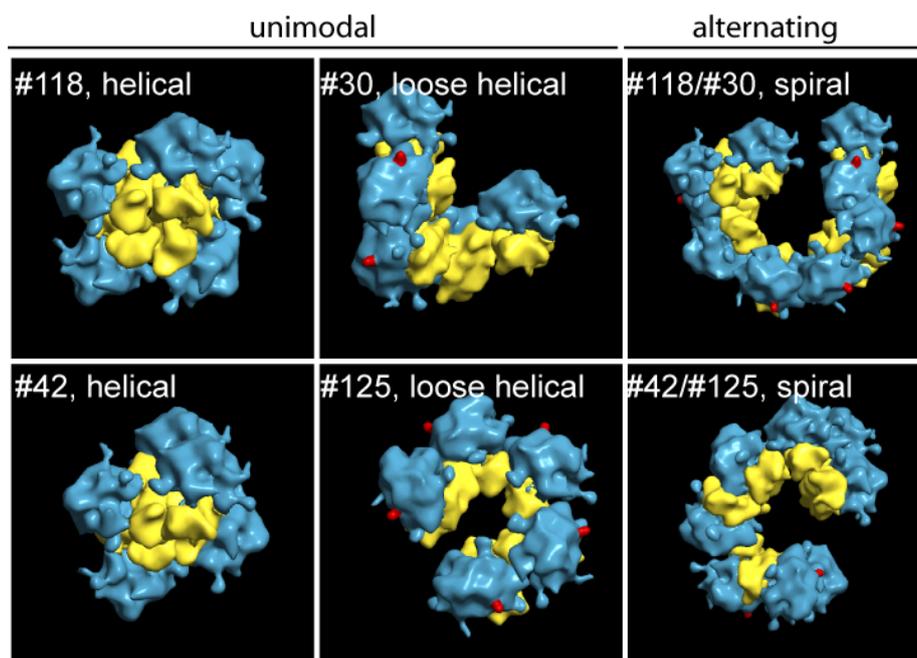


Abb. 50 Extrapolierte Modelle dichter Polysomen.

Dargestellt sind isosurface-Modelle von 80S Ribosomen (60S, blau; 40S gelb; Peptidausgang, rot) in mittleren Konfigurationen der ermittelten Cluster, die 5-9 mal iterativ repliziert wurden. In unimodalen Modellen ergeben sich helikale (links) oder lockere helikale (Mitte) Topologien. Alternierenden Modelle weisen auf einen weiten, spiralförmigen Polysomenverlauf hin (rechts).

Die extrapolierten Modelle erheben nicht den Anspruch, experimentell beobachtbare Polysomen über deren gesamte Länge darzustellen, jedoch dienen sie als Hilfsmittel, die

grundlegende Topologie der Polysomenorganisation und den Einfluss der Ribosomenarchitektur auf deren Ausprägung zu verstehen.

Wird nun die Ribosomenverteilung in (Sub-) Tomogrammen ganzer Zellen modelliert, indem man an jedem CCF-Peak ein 80S-Modell mit den experimentellen, alignierten Koordinaten und Winkeln platziert, so ergibt sich ein sehr komplexes Bild des dichten Zytosols. Nur an Stellen, wo Ribosomen isolierter erscheinen, lassen sich einzelne Polysomen mit hoher Wahrscheinlichkeit identifizieren (Abb. 51).

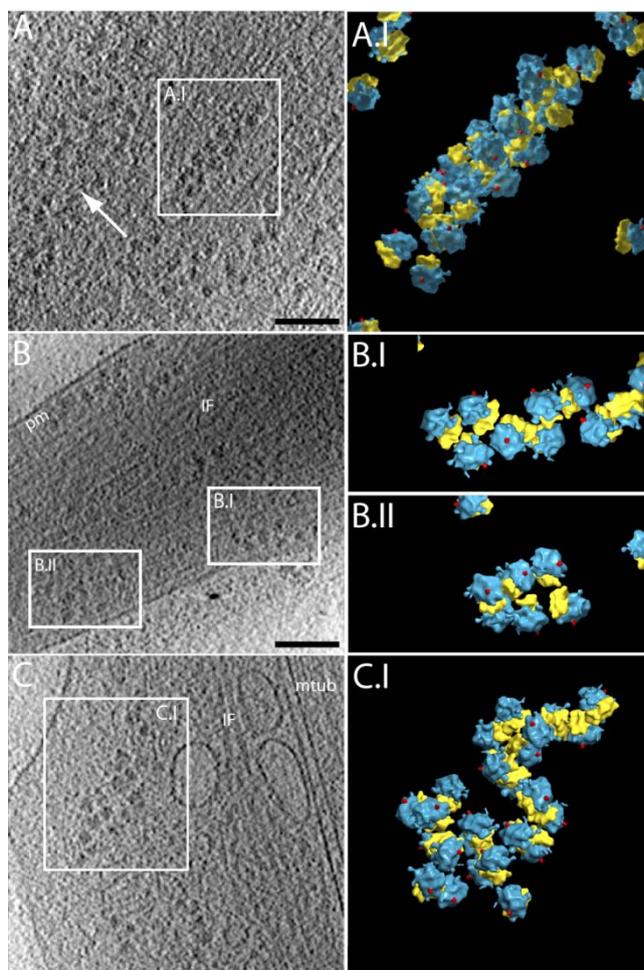


Abb. 51 Zytosolische Polysomen *in situ*.

(A-C) Dargestellt sind z-Schnitte von Subvolumina aus Rekonstruktionen des peripheren Zytosols bei $(1.64 \text{ nm})^3/vx$. Regionen mit isolierten Polysomen sind mit weißen Rechtecken hervorgehoben. In Schnitten von Regionen mit dichten Ribosomen-Akkumulationen sind Polysomen nicht per Auge zu unterscheiden (weißer Pfeil). IF, Intermediärfilament; mtub, Mikrotubuli; pm, Plasmamembran. Maßstab, 100 nm.

(A.I-C.I) *Isosurface* Modelle der 80S Ribosomen (60S, blau; 40S gelb; Peptidausgang, rot) wurden in experimentell ermittelten Koordinaten und Orientierungen platziert, um Polysomen in 3D zu visualisieren. Ein helikales Polysom kann in Ausschnitt A.I gefunden werden. B.I und B.II stellen eher planare Topologien, C.I eine eher spiralförmige Topologie dar. Abweichungen von den extrapolierten Polysomenmodellen liegen in der hohen Variabilität der Polysomen *in vivo* begründet.

Die helikale Konfiguration mit ca. 4 Ribosomen pro Windung, die zuvor durch Extrapolation vorhergesagt wurden, lässt sich (zumindest in Einzelfällen) eindeutig in der Zelle

wiederfinden (Abb. 51 A). Im Modell für die helikale Konfiguration (Abb. 51 A.I) ist zu erkennen, wie sich die Peptid-Ausgänge zytosolisch orientieren und die 40S Untereinheiten im Inneren positionieren. In einigen weniger deutlich erkennbaren Beispielen ist am ehesten eine planare Organisation naheliegend (Abb. 51 B.I, B.II), die allerdings keiner der extrapolierten Topologien entspricht (vgl. Abb. 50). Wahrscheinlich lassen sich hingegen spiralförmige Polysomen in den 3D-Modellen beobachten (Abb. 51 C.I), wobei die Abfolge der Polysomen allerdings oft schwierig von unspezifischen Akkumulationen von Ribosomen zu trennen ist.

3.2.10. Strukturen von Polyribosomen *in vivo*

Polysomen wurden bereits früh als morphologische Charakteristika zytosolischer Translation (Warner, Rich et al. 1962; Marks and Rifkind 1963; Rich 1963; Wettstein, Staehelin et al. 1963) und ER-gebundener Translation/Translokation (Blobel and Dobberstein 1975; Walter, Gilmore et al. 1984) in Eukaryoten beschrieben. Bei verschiedenen beobachteten dichten Polysomen wurde dabei über eine doppelreihige, flache (Marks and Rifkind 1963), helikale (Weiss and Grover 1968) oder spiralförmige (Christensen, Kahn et al. 1987) Anordnung spekuliert, wobei letztere auf dem rER prädominant sein soll. Die konventionellen Studien in fixierten 2D-Schnitten erlaubten aber keine Interpretation der Ribosomenstruktur oder der räumlichen Partikelverteilung.

Durch die 3D-Rekonstruktion des nativen, peripheren Zytosols einer humanen Glioma-Zelllinie können wir zum ersten Mal die globale und relative Ribosomenkonfiguration basierend auf der 3D-Dichte der Ribosomen analysieren. Die beobachteten, relativen Ribosomenkonfigurationen sind deutlich anisotrop (vgl. 3.2.6 - 3.2.7), spezifisch und charakteristisch für Polysomen.

Die früher postulierte Hypothese der helikalen Anordnung von dichten Polysomen (Weiss and Grover 1968) kann hier mit extrapolierten Modellen und experimentellen Beispielen bestätigt und mit der nativen 3D Rekonstruktion und der Einpassung eines pseudo-atomaren Modells stark erweitert werden (vgl. 3.2.8). Spiralförmige Topologien werden durch alternierende Nachbarkonfigurationen extrapoliert, die jedoch *in situ* in 3D schwierig zu identifizieren sind. Planare Topologien, die wir für bakterielle Polysomen beschrieben haben (Brandt, Etechells et al. 2009), sind für eukaryotische Polysomen nicht aus den bevorzugten relativen Konfigurationen zu extrapolieren, kommen aber möglicherweise mit geringer Abundanz intrazellulär vor.

3.2.11. Beobachtung von *stress granules in situ* ?

Wie oben bereits angemerkt (3.2.2), ist in den meisten Tomogrammen, die nach 10-minütiger Prm-Behandlung aufgenommen wurden, reproduzierbar eine noch nicht identifizierte Struktur zu beobachten, die als globuläre Dichte mit ca. 1.5-fachen Durchmesser von Ribosomen und einer annähernd vergleichbaren Elektronendichte erkennbar ist (Abb. 52 A). Bezeichnend ist eine augenscheinlich isomorphe Größenverteilung dieser Spezies, die zwischen Ribosomen eingebettet oder auch lokal angehäuft aufzufinden sind (Abb. 52 A, rechts oben). Aus 8 Tomogrammen wurden manuell 143 solcher Dichten selektiert und ungebinnt rekonstruiert (Abb. 52 B). Zur Zentrierung wurden diese Partikel vier Iterationen einer Alignierung unterzogen, bei der eine aus allen Partikeln (mit randomisierten Winkeln) gemittelte Struktur als Startreferenz diente. Um zunächst den durchschnittlichen Radius zu ermitteln, wurde für alle Partikel die sphärisch gemittelte Dichteverteilung von innen nach außen bestimmt und das Maxima der 1. Ableitung als Partikelrand angenommen, wie für 36 Beispiele gezeigt (Abb. 52, C). Vergleicht man die Radii aller 143 Dichten (Abb. 52 D)

ergibt sich eine auffallend gleichmäßige Verteilung mit einem mittleren Wert von 18.6 ± 2.7 nm (Abb. 52 E).

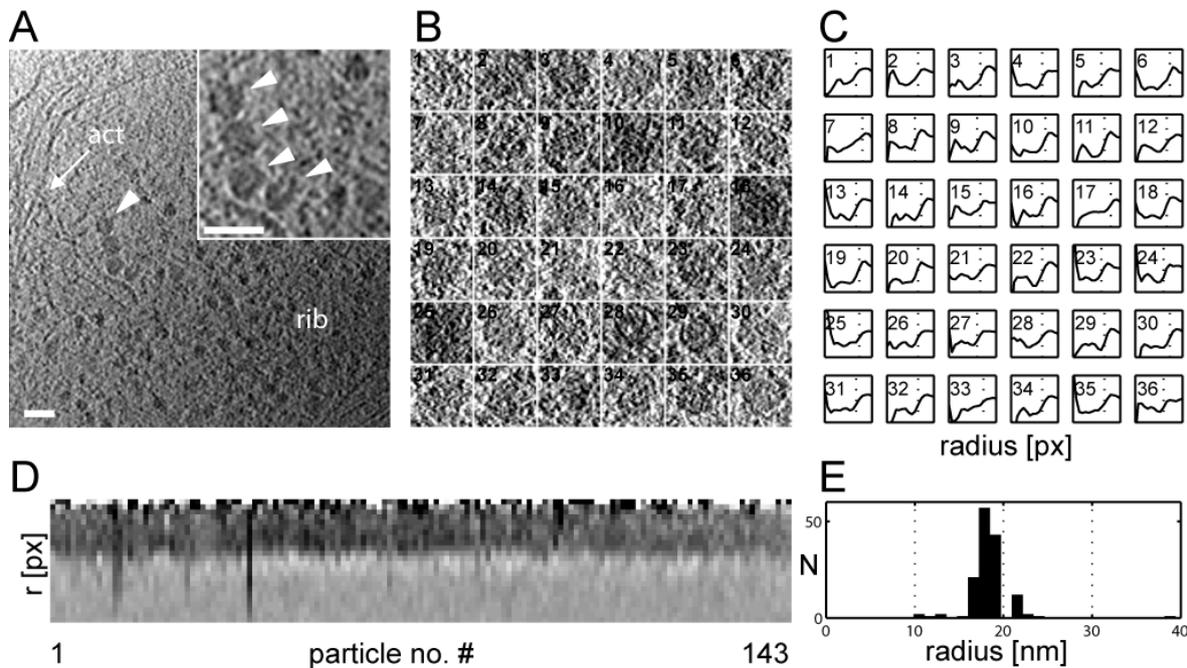


Abb. 52 Große granuläre Dichten in Puromycin-behandelten Zellen könnten frühe *stress granules* repräsentieren.

(A) Z-Schnitt aus einem Subtomogramm U-87MG Zellen nach 10 min Prm-Behandlung.

Ribosomen (rib) und Zytoskelettkomponenten (act) sind ähnlich verteilt wie in unbehandelten Zellen. Eine granuläre, unidentifizierte Spezies (Pfeilspitzen) ist jedoch ausschließlich in Prm-behandelten Zellen sichtbar (vergrößert oben rechts). Maßstab, 50 nm.

(B) Eine representative Auswahl manuell gewählter Subvolumen (Z-Schnitte) mit Granulae ist abgebildet. Die Boxgröße entspricht $(52.5 \text{ nm})^3$.

(C) Die Partikel in (B) sind entlang des Radius von den inneren zu den äußeren Pixeln (links nach rechts) dargestellt. Maxima der 1. Ableitung (·) wurden zur Detektion der äußeren Partikelränder ermittelt. Nummerierung wie in (B).

(D) Die sphärisch gemittelten Dichteverteilungen für alle 143 selektierte Granulae (von links nach rechts) ist vom innersten zu den äußersten Pixeln (von oben nach unten) dargestellt. Bemerkenswert sind ähnliche radiale Kanten der Granulae (Übergang zu niedriger Dichte), was auf eine gewisse isomorphie hinweist.

(E) Histogramm aller errechneten Partikelradii in (D) mit einem Mittelwert von 18.6 ± 2.7 nm.

Dies deutet darauf hin, dass es sich durchaus um eine mehr oder weniger homogene Spezies mit definierter Stöchiometrie handeln könnte. Dafür spricht auch, dass in einigen Beispielen

eine innere Struktur, die möglicherweise einer ribosomalen Untereinheit entspricht, zu sehen ist (Abb. 52 A, Pfeilspitzen).

Diese Vermutung wird gestützt durch Berichte in der Literatur, die eine Bildung sogenannter *stress granules* als zelluläre Antwort auf die Aktivierung verschiedener Stress-Signalkaskaden, als auch der Translations / Initiationsinhibition durch Prm beschreiben (Anderson and Kedersha 2008). *Stress granules* formieren sich demnach durch eine lokale, dynamische und reversible Sequestrierung von Transkripten und (inaktivierten) 48S Prä-Initiationskomplexen und beinhalten neben eIF3, eIF4F, *poly(A) binding protein* (PABP) u.a. auch die Proteine FMRP, TIA1, TIAR, G3BP und CPEB1 (Kedersha, Chen et al. 2002; Mazroui, Huot et al. 2002; Wilczynska, Aigueperse et al. 2005). *Stress granules* wurden bisher nach längerer Inkubation mit Prm (für > 60 min) mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet, die durch eine Auflösungsgrenze von ca. 200 nm limitiert ist. Die von uns beschriebene Beobachtung könnte also zum ersten Mal eine sehr frühe oder gar die Minimalform solcher Granula abbilden.

Eine eingehendere Untersuchung dieses Phänomens würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Es wird jedoch für die Zukunft von Interesse sein, im Speziellen transiente und pleomorphe Komplexe der RNA-Prozessierung und post-transkriptionalen Kontrolle mit Hilfe der Kryoelektronentomographie strukturell eingehend zu charakterisieren und in das Verständnis der räumlichen und zeitlichen Translationsregulation einzubetten (Kindler, Wang et al. 2005).

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Konservierte Mechanismen polysomaler Organisation ?

Unsere Daten von bakteriellen und humanen Polysomen deuten an, dass deren räumliche Vorzugskonfigurationen zu weiten Teilen konserviert sind, obwohl Ribosomen von Bakterien und Eukaryoten zumindest in ihrer äußeren Architektur und Größe voneinander abweichen (Doudna and Rath 2002). Basierend auf unserer Entdeckung wird für die zytosolische Polysomenorganisation ein universeller evolutionärer Druck postuliert, der auf die Ribosomenarchitektur wirkt. Nun wurde zwar beobachtet, dass die durchschnittliche Ribosomendichte auf zytosolischen Transkripten im Falle von logarithmisch wachsenden (Hefe-) Zellen tatsächlich eher gering ist (Ingolia, Ghaemmaghami et al. 2009). In der gleichen Studie wird allerdings auch gezeigt, dass die Ribosomendichte entlang der mRNA dramatisch schwanken kann. Bei diskontinuierlicher, pausierender Elongation auf der mRNA können sich also Ribosomen lokal akkumulieren, bzw. lokal dichte Polysomen bilden (Buchan and Stansfield 2007). Desweiteren können sich große, dichte Polysomen während vorübergehender, globaler Translationsrepression z.B. während der Mitose bilden (Sivan, Kedersha et al. 2007).

Eine Hypothese für die evolutionäre Notwendigkeit einer definierten Polysomenstruktur könnte die Verhinderung von Interaktionen zwischen naszenten, nicht-nativen Polypeptiden sein, die als peptidyl-tRNA auf benachbarten Ribosomen translatiert werden. Die polysomale Organisation kann dem zufolge als supramolekulare Struktur angesehen werden, welche die Aggregation naszenter Peptide reduziert oder verhindert (Brandt, Etchells et al. 2009). Desweiteren ermöglichen alle beschriebenen Topologien den direkten räumlichen Zugang von Chaperonkomplexen oder Chaperoninen zum synthetisierten Polypeptid, um dieses

cotranslational von der sehr dichten Umgebung des Zytoplasmas abzuschirmen bis dessen Faltung abgeschlossen ist (Frydman, Nimmesgern et al. 1994; Hartl and Hayer-Hartl 2002).

Andere Hypothesen, die erklären könnten, warum eine bevorzugte Polysomenorganisation von Bakterien bis zu höheren Eukaryoten konserviert ist, könnten sich auf die mRNA-Stabilität oder deren posttranskriptionale Regulation beziehen:

Zunächst könnte es notwendig sein, während vorübergehender Arretierung von Ribosomen, z.B. während der Mitose oder bei substratlimitierter, verlangsamter Elongation an seltenen Codons, die mRNA im Inneren dichter Polysomen vor dem Abbau durch RNA-Endonukleasen abzuschirmen (Buchan and Stansfield 2007; Sivan, Kedersha et al. 2007).

Außerdem könnte die dichte, helikale Polysomenorganisation in Eukaryoten einen Mechanismus zur Selbstregulation der mRNA-Translation darstellen: Das *closed-loop*-Modell schlägt eine Pseudozirkularisierung des poly(A) 3'-Endes und der 5'-*cap*-Struktur (Me⁷G-ppp) eukaryotischer mRNAs vor, die durch das poly(A) *binding protein* (PABP) und die Initiationsfaktoren eIF4E und eIF4G vermittelt werden (Tarun and Sachs 1996; Wells, Hillner et al. 1998). Das *closed-loop* Modell liefert eine attraktive Erklärung, wie terminierende Ribosomen (bzw. die 40S Untereinheiten) unmittelbar am 5'Ende des selben Transkripts reinitiiert werden könnten. Das Modell ist bereits in Textbüchern eingegangen, jedoch fehlt ein eindeutiger struktureller Beweis für eine solche Topologie. Zumindest für die Organisation dicht besetzter eukaryotischer Polysomen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, führt die räumliche Begrenzung dazu, dass die mRNA-Enden voneinander entfernt werden. Dadurch wird eine Pseudo-Zirkularisierung unwahrscheinlicher und somit die Reinitiationsrate herunterreguliert. Dieser Befund widerspricht jüngeren Studien auf der Basis von konventionellen EM-Aufnahmen, die Hinweise für dicht gepackte, zirkuläre Polysomen proklamieren (Madin, Sawasaki et al. 2004; Kopeina, Afonina et al. 2008). In den zuletzt zitierten Arbeiten sind höchstwahrscheinlich ebenfalls helikale oder planare

Polysomen zu sehen, deren Topologie aber aufgrund der nicht-nativen Präparation und mangels 3D Information fehlinterpretiert wurde. Die KryoET und das hier gezeigte Vorgehen sollte von großem Wert sein, um die *closed-loop* Hypothese an einem geeigneten System zu untersuchen.

Desweiteren wird es von großem Interesse sein, die polysomalen Organisationen in der vorliegenden Arbeit mit 3D Rekonstruktionen nativer, membran-gebundener Polysomen verschiedener Organismen zu vergleichen; diese müssen die 60S Untereinheit zur ER-Membran orientieren, um mit dem Peptid Ausgang die Translokation-Komplexe zu kontaktieren (Walter, Gilmore et al. 1984), weshalb eine helikale Organisation schwer vorstellbar ist. Möglicherweise ist hier eine pseudo-zirkuläre, planare oder spiralförmige Topologie stark bevorzugt, was sich in der Umorientierung der relativen Ribosomenkonfiguration zeigen muss.

4.2. Makromolekulare Netzwerke in der Zelle

Die räumliche und zeitliche Organisation makromolekularer Komplexe ist entscheidend für deren Funktion im zellulären, zytosolischen Kontext. Die genaue Anordnung aller an der Translation beteiligten Makromoleküle ist speziell in höheren Eukaryoten von besonderem Interesse, da die Komplexität eines dynamischen Systems aus (lokalisierter) mRNA/mRNPs, Initiationskomplexen, Ribosomen, tRNAs, Elongations- und Terminationsfaktoren (Ramakrishnan 2002; Steitz 2008), mehreren identischen naszenten Peptiden, modifizierenden Enzymen, Chaperonen und/oder Chaperoninen (Hartl and Hayer-Hartl 2002) sowie der *targeting* und Translokationsmaschinerie (Halic and Beckmann 2005) ein hohes Maß an räumlicher Koordination erfordert.

Die Kryoelektronentomographie in Kombination mit *template matching* hat das Potential, die Gesamtheit aller makromolekularen Komplexe (> 250 kDa) *in vitro* oder in einer Zelle strukturell zu erfassen, um so in Zukunft ein besseres Verständnis der räumlichen Organisation von funktionalen Modulen der Zelle zu gewinnen (Baumeister 2004). In Kombination mit proteomischen Methoden sollte es möglich sein, parallel zur tomographischen Analyse, alle großen Komplexe qualitativ und quantitativ zu erfassen (Robinson, Sali et al. 2007); M. Beck, persönliches Gespräch). Dieses Vorgehen könnte in Zukunft ein makromolekulares oder gar pseudo-atomares Modell des Zytosols in bisher nicht erreichter räumlicher Exaktheit liefern.

In diesem Sinne stellen die hier vorgestellten Strukturen für bakterielle und eukaryotische Polysomen die ersten auf der Erfassung der Koordinaten und Orientierung aller Einzelribosomen beruhenden 3D Modelle für das supramolekulare Netzwerk des zellulären Translationsapparat dar, aus denen sich grundlegende Aussagen zur funktionellen Bedeutung der relativen Konfiguration in Polysomen ableiten lassen (Brandt, Etchells et al. 2009).

Hinzuzufügen ist, dass die vorgestellte Methodik zur Erfassung makromolekularer Komplexe in der Zelle noch bei Weitem nicht die physikalisch-technischen Grenzen ausschöpft (Tab. 1):

- 1.) Die Entwicklung von Phasenplatten für das TEM könnte das S/N-Verhältnis auch bei niedrigen Defoki verbessern und damit u.a. 2.) CTF-Artefakte vermindern und die CTF-Korrektur in Tomogrammen erleichtern. 3.) Neue (korrelations-unabhängige) Alignierungs- und Klassifizierungsalgorithmen wie *maximum likelihood*-Verfahren könnten eine bessere qualitative und quantitative Erkennung von Makromolekülen ermöglichen. 4.) Die Zugänglichkeit zu anderen Zelltypen (bzw. dickeren Probenbereichen) könnte durch Oberflächenfräsung mit fokussierten Ionenstrahlen ermöglicht werden. 5.) Die Quantifizierung aller Komponenten einer Zelle wird durch die rapide Entwicklung der quantitativen Massenspektrometrie mehr und mehr zur Standardmethode.

Tab. 1 Aktuelle technische Limitierungen und Entwicklungen

Methoden	Aktuelle Limitierung	Mögliche Perspektive	Referenz
KryoEM	S/N-Verhältnis bei niedrigen Defoki	Phasenplatte in der hinteren Fokusebene	(Barton, Joos et al. 2008; Danev and Nagayama 2008)
(Einzelachsen)-KryoET	<i>Missing wedge</i> , 1. Nullstelle der CTF	Doppelachsenkipfung + CTF Korrektur	(Iancu, Wright et al. 2005; Winkler 2007)
Korrelations-basierte Mustererkennung	Referenz-Artefakt, S/N Verhältnis, <i>molecular crowding</i>	<i>ML</i> Algorithmen ¹ , Multi-Referenz-Alignment	(Scheres, Valle et al. 2009)
Zelluläre Tomographie, CEMOVIS ²	Elektronentransparent bis maximal 500 nm, Mikrotomie mit Deformationsartefakten	<i>FIB milling</i> ³	(Marko, Hsieh et al. 2006)
(LS-)MS/MS ⁴	Proteom-weite Quantifizierung und Identifizierung	Proteom-weite oder spezifische Isotopenmarkierung (<i>iTRAQ</i> ⁵ , <i>SILAC</i> ⁶)	(Cox and Mann 2007)

¹Maximum-likelihood; ²KryoET an kryomikrotomierten Proben; ³Probenfräsung mit fokussierten Kationen-Strahlen (z.B. Ga⁺); ⁴*Liquid chromatography(tandem) mass spectrometry*; ⁵Isotopenkodierte Markierung der Aminotermini und Seitenketten-Amininen); ⁶Metabolische Inkorporierung von isotopenkodierte (z.B. C¹²/C¹³) Aminosäuren in Zellkultur.

Sehr wahrscheinlich wird es also in naher Zukunft möglich sein, auch tendenziell kleinere und flexiblere Makromoleküle räumlich quantitativ zu erfassen und deren Positionen in einer zellulären Umgebung in Relation zueinander zu setzen. Dies sollte weitere fundamentale Einblicke gewähren, wie der Proteinsynthese-Apparat, aber auch die molekularen Maschinen des Proteintransports und -exports, der Qualitätskontrolle oder Proteindegradation räumlich organisiert sind.

5. Anhang

5.1. Verwendete Abkürzungen

Es wurden die gängigen Abkürzungen für alle metrischen Längen-, Massen- und Temperatureinheiten, sowie Konzentrationseinheiten verwendet. Darüber hinaus erscheinen folgende Abkürzungen im Text dieser Arbeit :

(e)EF	(eukaryotischer) Elongationsfaktor
(e)IF	(eukaryotischer) Initiationsfaktor
(F)FT	<i>Fast Fourier Transformation</i>
(FF)Luc	<i>Firefly Luciferase</i>
(Kryo)EM	(Kryo) Elektronenmikroskopie
(L)CCF	(Lokal normierte) Kreuzkorrelationsfunktion
(p-)tRNA	(Peptidyl) <i>Transfer</i> RNA
Å	Ångstrom
ATP	Adenosintriphosphat
Cam	Chloramphenicol
CCC	Kreuzkorrelationskoeffizient
CHX	Cycloheximid
CTF	Phasenkontrasttransferfunktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FSC	<i>Fourier Shell Correlation</i>
GTP	Guanosintriphosphat
Kd	Dissoziationskoeffizient
kDa	Kilodalton
KryoET	Kryoelektronentomographie
mAb	Monoklonarer Antikörper
Met / Met-	Methionin / Methionyl-
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mRNP	<i>Messenger ribonucleoprotein particle</i>
NND	<i>Next neighbor distribution</i> , Verteilung nächster Nachbarn
Ny	Nyquist-Frequenz
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Prm	Puromycin
px	Pixel
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SIRT	<i>Simultaneous Iterative Reconstruction Technique</i>
TCA	Trichloressigsäure
vx	Voxel
WBP	<i>Weighted back projection</i>

5.2. Literaturverzeichnis

- Agashe, V. R., S. Guha, et al. (2004). "Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed." *Cell* **117**(2): 199-209.
- Agrawal, R. K., C. M. Spahn, et al. (2000). "Visualization of tRNA movements on the Escherichia coli 70S ribosome during the elongation cycle." *J Cell Biol* **150**(3): 447-60.
- Albanese, V., A. Y. Yam, et al. (2006). "Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells." *Cell* **124**(1): 75-88.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2008). "Stress granules: the Tao of RNA triage." *Trends Biochem Sci* **33**(3): 141-50.
- Antoun, A., M. Y. Pavlov, et al. (2006). "How initiation factors tune the rate of initiation of protein synthesis in bacteria." *Embo J* **25**(11): 2539-50.
- Ban, N., P. Nissen, et al. (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution." *Science* **289**(5481): 905-20.
- Barton, B., F. Joos, et al. (2008). "Improved specimen reconstruction by Hilbert phase contrast tomography." *J Struct Biol*.
- Bashan, A., I. Agmon, et al. (2003). "Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression." *Mol Cell* **11**(1): 91-102.
- Baumeister, W. (2004). "Mapping molecular landscapes inside cells." *Biol Chem* **385**(10): 865-72.
- Beatrix, B., H. Sakai, et al. (2000). "The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions." *J Biol Chem* **275**(48): 37838-45.
- Beck, M., F. Forster, et al. (2004). "Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography." *Science* **306**(5700): 1387-90.
- Beckmann, R., C. M. Spahn, et al. (2001). "Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome." *Cell* **107**(3): 361-72.
- Blobel, G. and B. Dobberstein (1975). "Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components." *J Cell Biol* **67**(3): 852-62.
- Bohm, J., A. S. Frangakis, et al. (2000). "Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: template matching applied to electron tomograms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14245-50.
- Brandt, F., S. A. Etchells, et al. (2009). "The native 3D organization of bacterial polysomes." *Cell* **136**(2): 261-71.
- Buchan, J. R. and I. Stansfield (2007). "Halting a cellular production line: responses to ribosomal pausing during translation." *Biol Cell* **99**(9): 475-87.
- Chandramouli, P., M. Topf, et al. (2008). "Structure of the mammalian 80S ribosome at 8.7 Å resolution." *Structure* **16**(4): 535-48.
- Christensen, A. K., L. E. Kahn, et al. (1987). "Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammatropes in the rat anterior pituitary." *Am J Anat* **178**(1): 1-10.
- Cornish, P. V., D. N. Ermolenko, et al. (2009). "Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2571-6.
- Cox, J. and M. Mann (2007). "Is proteomics the new genomics?" *Cell* **130**(3): 395-8.

- Crowther, R. A., L. A. Amos, et al. (1970). "Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs." *Nature* **226**(5244): 421-5.
- Danev, R. and K. Nagayama (2008). "Single particle analysis based on Zernike phase contrast transmission electron microscopy." *J Struct Biol* **161**(2): 211-8.
- Deuerling, E., A. Schulze-Specking, et al. (1999). "Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins." *Nature* **400**(6745): 693-6.
- Doudna, J. A. and V. L. Rath (2002). "Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier." *Cell* **109**(2): 153-6.
- Dubochet, J., M. Adrian, et al. (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." *Q Rev Biophys* **21**(2): 129-228.
- Egea, P. F., R. M. Stroud, et al. (2005). "Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle." *Curr Opin Struct Biol* **15**(2): 213-20.
- Elcock, A. H. (2006). "Molecular simulations of cotranslational protein folding: fragment stabilities, folding cooperativity, and trapping in the ribosome." *PLoS Comput Biol* **2**(7): e98.
- Ellis, R. J. (2001). "Macromolecular crowding: obvious but underappreciated." *Trends Biochem Sci* **26**(10): 597-604.
- Ellis, R. J. and F. U. Hartl (1999). "Principles of protein folding in the cellular environment." *Curr Opin Struct Biol* **9**(1): 102-10.
- Etchells, S. A. and F. U. Hartl (2004). "The dynamic tunnel." *Nat Struct Mol Biol* **11**(5): 391-2.
- Fei, J., P. Kosuri, et al. (2008). "Coupling of ribosomal L1 stalk and tRNA dynamics during translation elongation." *Mol Cell* **30**(3): 348-59.
- Ferbitz, L., T. Maier, et al. (2004). "Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins." *Nature* **431**(7008): 590-6.
- Fernandez, J. J., S. Li, et al. (2006). "CTF determination and correction in electron cryotomography." *Ultramicroscopy* **106**(7): 587-96.
- Forster, F. (2005). Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden. *Fakultät für Physik, Technische Universität München*.
- Forster, F., S. Pruggnaller, et al. (2008). "Classification of cryo-electron sub-tomograms using constrained correlation." *J Struct Biol* **161**(3): 276-86.
- Frangakis, A. S., J. Bohm, et al. (2002). "Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14153-8.
- Frank, J. (2002). "Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**: 303-19.
- Frank, J. (2006). *Three-Dimensional Electron Microscopy Of Macromolecular Assemblies*. New York, Oxford University Press.
- Frank, J. and R. K. Agrawal (2000). "A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation." *Nature* **406**(6793): 318-22.
- Frank, J., M. Radermacher, et al. (1996). "SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields." *J Struct Biol* **116**(1): 190-9.
- Frydman, J., H. Erdjument-Bromage, et al. (1999). "Co-translational domain folding as the structural basis for the rapid de novo folding of firefly luciferase." *Nat Struct Biol* **6**(7): 697-705.
- Frydman, J., E. Nimmesgern, et al. (1994). "Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones." *Nature* **370**(6485): 111-7.

-
- Fu, J., H. Gao, et al. (2007). "Unsupervised classification of single particles by cluster tracking in multi-dimensional space." *J Struct Biol* **157**(1): 226-39.
- Gautschi, M., H. Lilie, et al. (2001). "RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3762-7.
- Gollnick, P. and C. Yanofsky (1990). "tRNA(Trp) translation of leader peptide codon 12 and other factors that regulate expression of the tryptophanase operon." *J Bacteriol* **172**(6): 3100-7.
- Goodsell, D. S. (1991). "Inside a living cell." *Trends Biochem Sci* **16**(6): 203-6.
- Gordon, R., R. Bender, et al. (1970). "Algebraic reconstruction techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and x-ray photography." *J Theor Biol* **29**(3): 471-81.
- Grunewald, K., P. Desai, et al. (2003). "Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography." *Science* **302**(5649): 1396-8.
- Grunewald, K., O. Medalia, et al. (2003). "Prospects of electron cryotomography to visualize macromolecular complexes inside cellular compartments: implications of crowding." *Biophys Chem* **100**(1-3): 577-91.
- Guckenberger, R. (1982). "Determination of a common origin in the micrographs of tilt series in three-dimensional electron microscopy." *Ultramicroscopy* **9**: 167-174.
- Gutsche, I., L. O. Essen, et al. (1999). "Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine." *J Mol Biol* **293**(2): 295-312.
- Halic, M., T. Becker, et al. (2005). "Localization and dynamic behavior of ribosomal protein L30e." *Nat Struct Mol Biol* **12**(5): 467-8.
- Halic, M., T. Becker, et al. (2004). "Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome." *Nature* **427**(6977): 808-14.
- Halic, M. and R. Beckmann (2005). "The signal recognition particle and its interactions during protein targeting." *Curr Opin Struct Biol* **15**(1): 116-25.
- Harauz, G. and M. Van Heel (1986). "Exact filter for general geometry three-dimensional reconstruction." *Optik* **73**: 146- 156.
- Harms, J., F. Schluenzen, et al. (2001). "High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium." *Cell* **107**(5): 679-88.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." *Science* **295**(5561): 1852-8.
- Heide, H. G. and E. Zeitler (1985). "The physical behavior of solid water at low temperatures and the embedding of electron microscopical specimens " *Ultramicroscopy* **16**(2): 151-160
- Henderson, R. (1995). "The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules." *Q Rev Biophys* **28**(2): 171-93.
- Hoffmann, C., A. Leis, et al. (2008). "Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(10): 3963-7.
- Hoppe, W. and B. Grill (1977). "Prospects of three-dimensional high resolution electron microscopy of non-periodic structures." *Ultramicroscopy* **2**(2-3): 153-68.
- Hsu, S. T., P. Fucini, et al. (2007). "Structure and dynamics of a ribosome-bound nascent chain by NMR spectroscopy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(42): 16516-21.
- Hundley, H., H. Eisenman, et al. (2002). "The in vivo function of the ribosome-associated Hsp70, Ssz1, does not require its putative peptide-binding domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4203-8.

- Hundley, H. A., W. Walter, et al. (2005). "Human Mpp11 J protein: ribosome-tethered molecular chaperones are ubiquitous." *Science* **308**(5724): 1032-4.
- Iancu, C. V., E. R. Wright, et al. (2005). "A "flip-flop" rotation stage for routine dual-axis electron cryotomography." *J Struct Biol* **151**(3): 288-97.
- Ingolia, N. T., S. Ghaemmaghami, et al. (2009). "Genome-Wide Analysis In Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling." *Science*.
- Johnson, A. E. (2005). "The co-translational folding and interactions of nascent protein chains: a new approach using fluorescence resonance energy transfer." *FEBS Lett* **579**(4): 916-20.
- Kaiser, C. M., H. C. Chang, et al. (2006). "Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes." *Nature* **444**(7118): 455-60.
- Kedersha, N., S. Chen, et al. (2002). "Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules." *Mol Biol Cell* **13**(1): 195-210.
- Kerner, M. J., D. J. Naylor, et al. (2005). "Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli." *Cell* **122**(2): 209-20.
- Kindler, S., H. Wang, et al. (2005). "RNA transport and local control of translation." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 223-45.
- Kingsbury, E. W. and H. Voelz (1969). "Induction of helical arrays of ribosomes by vinblastine sulfate in Escherichia coli." *Science* **166**(906): 768-9.
- Kolb, V. A., E. V. Makeyev, et al. (2000). "Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system." *J Biol Chem* **275**(22): 16597-601.
- Kopeina, G. S., Z. A. Afonina, et al. (2008). "Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA." *Nucleic Acids Res* **36**(8): 2476-88.
- Kosolapov, A. and C. Deutsch (2009). "Tertiary interactions within the ribosomal exit tunnel." *Nat Struct Mol Biol*.
- Kosolapov, A. and C. Deutsch (2009). "Tertiary interactions within the ribosomal exit tunnel." *Nat Struct Mol Biol* **16**(4): 405-11.
- Kramer, G., T. Rauch, et al. (2002). "L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome." *Nature* **419**(6903): 171-4.
- Lakshmipathy, S. K., S. Tomic, et al. (2007). "Identification of nascent chain interaction sites on trigger factor." *J Biol Chem* **282**(16): 12186-93.
- LeBarron, J., R. A. Grassucci, et al. (2008). "Exploration of parameters in cryo-EM leading to an improved density map of the E. coli ribosome." *J Struct Biol* **164**(1): 24-32.
- Lecompte, O., R. Ripp, et al. (2002). "Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale." *Nucleic Acids Res* **30**(24): 5382-90.
- Lu, J. and C. Deutsch (2005). "Folding zones inside the ribosomal exit tunnel." *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1123-9.
- Lu, J., W. R. Kobertz, et al. (2007). "Mapping the electrostatic potential within the ribosomal exit tunnel." *J Mol Biol* **371**(5): 1378-91.
- Lucic, V., F. Forster, et al. (2005). "Structural studies by electron tomography: from cells to molecules." *Annu Rev Biochem* **74**: 833-65.
- Ludtke, S. J., M. L. Baker, et al. (2008). "De novo backbone trace of GroEL from single particle electron cryomicroscopy." *Structure* **16**(3): 441-8.
- Ludtke, S. J., P. R. Baldwin, et al. (1999). "EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions." *J Struct Biol* **128**(1): 82-97.

- Madin, K., T. Sawasaki, et al. (2004). "Formation of circular polyribosomes in wheat germ cell-free protein synthesis system." FEBS Lett **562**(1-3): 155-9.
- Marko, M., C. Hsieh, et al. (2006). "Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative to cryo-ultramicrotomy of frozen-hydrated biological samples." J Microsc **222**(Pt 1): 42-7.
- Marks, P. A. and R. A. Rifkind (1963). "Danon D: Polyribosomes and Protein Synthesis during Reticulocyte Maturation in Vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **50**: 336-42.
- Mastronarde, D. N. (2008). "Correction for non-perpendicularity of beam and tilt axis in tomographic reconstructions with the IMOD package." J Microsc **230**(Pt 2): 212-7.
- Matsuura, T., H. Yanagida, et al. (2007). "Nascent chain, mRNA, and ribosome complexes generated by a pure translation system." Biochem Biophys Res Commun **352**(2): 372-7.
- Mattingly, J. R., Jr., A. J. Yanez, et al. (2000). "The folding of nascent mitochondrial aspartate aminotransferase synthesized in a cell-free extract can be assisted by GroEL and GroES." Arch Biochem Biophys **382**(1): 113-22.
- Mazroui, R., M. E. Huot, et al. (2002). "Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression." Hum Mol Genet **11**(24): 3007-17.
- McEwen, B. F., M. Radermacher, et al. (1986). "Tomographic three-dimensional reconstruction of cilia ultrastructure from thick sections." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(23): 9040-4.
- Medalia, O., I. Weber, et al. (2002). "Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography." Science **298**(5596): 1209-13.
- Merz, F., D. Boehringer, et al. (2008). "Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome." Embo J **27**(11): 1622-32.
- Merz, F., A. Hoffmann, et al. (2006). "The C-terminal domain of Escherichia coli trigger factor represents the central module of its chaperone activity." J Biol Chem **281**(42): 31963-71.
- Meyer, A. S., J. R. Gillespie, et al. (2003). "Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis." Cell **113**(3): 369-81.
- Minton, A. P. (2005). "Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: macromolecular crowding and protein stability revisited." Biophys J **88**(2): 971-85.
- Mitra, K., C. Schaffitzel, et al. (2006). "Elongation arrest by SecM via a cascade of ribosomal RNA rearrangements." Mol Cell **22**(4): 533-43.
- Moore, P. B. (2009). "The ribosome returned." J Biol **8**(1): 8.
- Moore, S. D. and R. T. Sauer (2007). "The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue." Annu Rev Biochem **76**: 101-24.
- Nakatogawa, H. and K. Ito (2002). "The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate." Cell **108**(5): 629-36.
- Nauman, R. K., D. J. Silverman, et al. (1971). "Ribosomal helices: formation in Escherichia coli during acidic growth." J Bacteriol **107**(1): 358-60.
- Neidhardt, F. C., Ed. (1987). Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Nickell, S., F. Forster, et al. (2005). "TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography." J Struct Biol **149**(3): 227-34.
- Nierhaus, K. H. E. and D. N. Wilson (2004). Protein Synthesis and Ribosome Structure. Translating the Genome. Weinheim, Wiley-VCH.

- Nissen, P., J. Hansen, et al. (2000). "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis." *Science* **289**(5481): 920-30.
- Oliver, D., J. Norman, et al. (1998). "Regulation of Escherichia coli secA by cellular protein secretion proficiency requires an intact gene X signal sequence and an active translocon." *J Bacteriol* **180**(19): 5240-2.
- Ortiz, J. O., F. Forster, et al. (2006). "Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition." *J Struct Biol* **156**(2): 334-41.
- Palade, G. E. (1952). "A study of fixation for electron microscopy." *J Exp Med* **95**(3): 285-98.
- Pettersen, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." *J Comput Chem* **25**(13): 1605-12.
- Ponten, J. and E. H. Macintyre (1968). "Long term culture of normal and neoplastic human glia." *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**(4): 465-86.
- Powers, T. and P. Walter (1996). "The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome." *Curr Biol* **6**(3): 331-8.
- Radermacher, M. (1988). "Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series." *J Electron Microscop Tech* **9**(4): 359-94.
- Radon, J. (1917). "Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten." *Berichte Sächsische Akademie der Wissenschaften, Leipzig Math.-Phys. Kl*(69): 26-277.
- Raine, A., M. Lovmar, et al. (2006). "Trigger factor binding to ribosomes with nascent peptide chains of varying lengths and sequences." *J Biol Chem* **281**(38): 28033-8.
- Ramakrishnan, V. (2002). "Ribosome structure and the mechanism of translation." *Cell* **108**(4): 557-72.
- Ranson, N. A., D. K. Clare, et al. (2006). "Allosteric signaling of ATP hydrolysis in GroEL-GroES complexes." *Nat Struct Mol Biol* **13**(2): 147-52.
- Rauch, T., H. A. Hundley, et al. (2005). "Dissecting functional similarities of ribosome-associated chaperones from Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli." *Mol Microbiol* **57**(2): 357-65.
- Rich, A. (1963). "Polyribosomes." *Sci Am* **209**: 44-53.
- Robinson, C. V., A. Sali, et al. (2007). "The molecular sociology of the cell." *Nature* **450**(7172): 973-82.
- Rudiger, S., A. Buchberger, et al. (1997). "Interaction of Hsp70 chaperones with substrates." *Nat Struct Biol* **4**(5): 342-9.
- Sambrook, J. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, B., M. M. Golas, et al. (2003). "Automatic CTF correction for single particles based upon multivariate statistical analysis of individual power spectra." *J Struct Biol* **142**(3): 392-401.
- Schaffitzel, C. and N. Ban (2007). "Generation of ribosome nascent chain complexes for structural and functional studies." *J Struct Biol* **158**(3): 463-71.
- Schaffitzel, C., M. Oswald, et al. (2006). "Structure of the E. coli signal recognition particle bound to a translating ribosome." *Nature* **444**(7118): 503-6.
- Scheres, S. H., H. Gao, et al. (2007). "Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization." *Nat Methods* **4**(1): 27-9.
- Scheres, S. H., R. Nunez-Ramirez, et al. (2008). "Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP." *Nat Protoc* **3**(6): 977-90.
- Scheres, S. H., M. Valle, et al. (2009). "Maximum likelihood refinement of electron microscopy data with normalization errors." *J Struct Biol* **166**(2): 234-40.

- Schmeing, T. M., K. S. Huang, et al. (2005). "Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction." *Mol Cell* **20**(3): 437-48.
- Schmeing, T. M., K. S. Huang, et al. (2005). "An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA." *Nature* **438**(7067): 520-4.
- Schuwirth, B. S., M. A. Borovinskaya, et al. (2005). "Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution." *Science* **310**(5749): 827-34.
- Selmer, M., C. M. Dunham, et al. (2006). "Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA." *Science* **313**(5795): 1935-42.
- Siegers, K., T. Waldmann, et al. (1999). "Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system." *Embo J* **18**(1): 75-84.
- Sigler, P. B., Z. Xu, et al. (1998). "Structure and function in GroEL-mediated protein folding." *Annu Rev Biochem* **67**: 581-608.
- Sivan, G., N. Kedersha, et al. (2007). "Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division." *Mol Cell Biol* **27**(19): 6639-46.
- Slayter, H., Y. Kiho, et al. (1968). "An electron microscopic study of large bacterial polyribosomes." *J Cell Biol* **37**(2): 583-90.
- Slayter, H. S., J. R. Warner, et al. (1963). "The Visualization of Polyribosomal Structure." *J Mol Biol* **17**: 652-7.
- Spahn, C. M., M. G. Gomez-Lorenzo, et al. (2004). "Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation." *Embo J* **23**(5): 1008-19.
- Spahn, C. M., E. Jan, 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**(4): 465-75.
- Spiess, C., A. S. Meyer, et al. (2004). "Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets." *Trends Cell Biol* **14**(11): 598-604.
- Spreter, T., M. Pech, et al. (2005). "The crystal structure of archaeal nascent polypeptide-associated complex (NAC) reveals a unique fold and the presence of a ubiquitin-associated domain." *J Biol Chem* **280**(16): 15849-54.
- Staehein, T., C. C. Brinton, et al. (1963). "Structure and Function of E. Coli Ergosomes." *Nature* **199**: 865-70.
- Steitz, T. A. (2008). "A structural understanding of the dynamic ribosome machine." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(3): 242-53.
- Tarun, S. Z., Jr. and A. B. Sachs (1996). "Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G." *Embo J* **15**(24): 7168-77.
- Taylor, K. A. and R. M. Glaeser (1974). "Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals." *Science* **186**(4168): 1036-7.
- Teter, S. A., W. A. Houry, et al. (1999). "Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains." *Cell* **97**(6): 755-65.
- Thompson, J., D. F. Kim, et al. (2001). "Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9002-7.
- Tomic, S., A. E. Johnson, et al. (2006). "Exploring the capacity of trigger factor to function as a shield for ribosome bound polypeptide chains." *FEBS Lett* **580**(1): 72-6.
- Toyoshima, C. and N. Unwin (1988). "Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: determination from pairs of defocused images." *Ultramicroscopy* **25**(4): 279-91.

- Tu, D., G. Blaha, et al. (2005). "Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance." *Cell* **121**(2): 257-70.
- Valle, M., A. Zavialov, et al. (2003). "Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy." *Nat Struct Biol* **10**(11): 899-906.
- Valle, M., A. Zavialov, et al. (2003). "Locking and unlocking of ribosomal motions." *Cell* **114**(1): 123-34.
- Vanzi, F., Y. Takagi, et al. (2005). "Mechanical studies of single ribosome/mRNA complexes." *Biophys J* **89**(3): 1909-19.
- Walter, P., R. Gilmore, et al. (1984). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum." *Cell* **38**(1): 5-8.
- Wang, S., H. Sakai, et al. (1995). "NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center." *J Cell Biol* **130**(3): 519-28.
- Warner, J. R., P. M. Knopf, et al. (1963). "A multiple ribosomal structure in protein synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **49**: 122-9.
- Warner, J. R., A. Rich, et al. (1962). "Electron Microscope Studies of Ribosomal Clusters Synthesizing Hemoglobin." *Science* **138**: 1399-1403.
- Wegrzyn, R. D., D. Hofmann, et al. (2006). "A conserved motif is prerequisite for the interaction of NAC with ribosomal protein L23 and nascent chains." *J Biol Chem* **281**(5): 2847-57.
- Weinger, J. S., K. M. Parnell, et al. (2004). "Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome." *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1101-6.
- Weiss, P. and N. B. Grover (1968). "Helical array of polyribosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**(3): 763-8.
- Wells, S. E., P. E. Hillner, et al. (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." *Mol Cell* **2**(1): 135-40.
- Wettstein, F. O., T. Staehelin, et al. (1963). "Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: characterization of the ergosome." *Nature* **197**: 430-5.
- Wilczynska, A., C. Aigueperse, et al. (2005). "The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 981-92.
- Wild, K., M. Halic, et al. (2004). "SRP meets the ribosome." *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1049-53.
- Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, et al. (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." *Nature* **407**(6802): 327-39.
- Wimberly, B. T., R. Guymon, et al. (1999). "A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11-RNA complex." *Cell* **97**(4): 491-502.
- Winkler, H. (2007). "3D reconstruction and processing of volumetric data in cryo-electron tomography." *J Struct Biol* **157**(1): 126-37.
- Woolhead, C. A., P. J. McCormick, et al. (2004). "Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins." *Cell* **116**(5): 725-36.
- Yam, A. Y., Y. Xia, et al. (2008). "Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of newly made proteins with complex topologies." *Nat Struct Mol Biol* **15**(12): 1255-62.
- Yusupov, M. M., G. Z. Yusupova, et al. (2001). "Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution." *Science* **292**(5518): 883-96.
- Yusupova, G., L. Jenner, et al. (2006). "Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome." *Nature* **444**(7117): 391-4.

- Yusupova, G. Z., M. M. Yusupov, et al. (2001). "The path of messenger RNA through the ribosome." Cell **106**(2): 233-41.
- Zhu, J., P. A. Penczek, 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**(3): 197-219.

6. Danksagung

Diese Arbeit wurde von September 2005 bis Mai 2009 in einer Kollaboration der Abteilung Molekulare Strukturbiologie und der Abteilung Zelluläre Biochemie des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Allen Mitarbeitern dieser Abteilungen danke ich für die produktive und bereichernde Arbeitsumgebung.

Inbesondere gilt mein Dank folgenden Personen:

Prof. Wolfgang Baumeister und Prof. F. Ulrich Hartl, die als Direktoren diese Arbeit ständig unterstützten, für die sehr wertvolle Hilfe in entscheidenden thematischen und organisatorischen Punkten, im Speziellen während der Anfangsphase und während des Prozesses der Publikation der Arbeit.

Julio Ortiz und Stephanie Etchells, für die Zusammenarbeit, Rat und Unterstützung während des bakteriellen Polysomen-Projekts und für die Hilfe bei der Publikation.

Lars-Anders Carlson und Kay Grünewald für viel Zeit am Mikroskop und die Unterstützung für das Projekt über eukaryotische Polysomen, sowie Korrekturvorschläge zum Manuskript.

Adrian Elcock (U Iowa) für den Besuch und die Arbeit über die Interaktion naszenter Peptide.

Sathish Kumar Lakshmiathy, Rashmi Gupta und Florian Rübmann für den regen Austausch und Gespräche über Ribosomen, Chaperone und die Welt.

Markus Stemp, Sladjana Tomic und Karoline Bopp für den Austausch über die *in vitro* Translation und weitere Hintergrundinformationen.

Friedrich Förster für seine Hilfe und Erläuterung der Algorithmen der Mustererkennung und Partikelanalyse sowie für die Korrektur dieser Arbeit.

Martin Beck (ETH Zürich) für die Aufnahme und Auswertung von LC-MS Daten.

Jürgen Plitzko, Günter Pfeifer und Oana Mihalache für die Hilfe an den Mikroskopen und deren Instandhaltung/setzung.

Christian Hoffmann und Radosav Pantelic für eine durchweg positive Grundstimmung beim Mittagessen.

Außerdem gilt mein Dank meiner Freundin Bettina, für den freudvollen Ausgleich im Alltag des Forscherdaseins, ohne den alles schwieriger wäre.

Zuguterletzt verdanke ich meine Ausbildung meinen Eltern und im Besonderen das Zustandekommen dieser Dissertation meinem Vater, dem ich dafür diese Arbeit widme.