

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Strukturelle Studien am Ribosom von *P. falciparum*,
an ribosomalen Komplexen mit ERj1
und am translationsarretierten RNC mit XBP1**



Anian Peter Wilhelm Hiekel
(geb. Puls)
aus
München, Deutschland

2015

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Roland Beckmann betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, den 29.07.2015

.....

Anian Hiekel

Dissertation eingereicht am 30.07.2015

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Roland Beckmann

2. Gutachter: Herr Dr. Daniel Wilson

Mündliche Prüfung am 01.02.2016

1	Einleitung	1
1.1	Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie	1
1.1.1	3D-Rekonstruktion mithilfe der Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie	1
1.1.2	Technologische Weiterentwicklung der Bildaufnahme	2
1.2	Das Ribosom im Überblick	4
1.2.1	Aufbau des eukaryotischen Ribosoms	4
1.2.2	Das Ribosom als Katalysator in der Elongationsphase der Translation	5
1.2.3	Translationsarretierte RNC aufgrund Arrestsequenz in der naszierenden Kette	6
1.3	Das 80S Ribosom von <i>P. falciparum</i> als Angriffspunkt der Malariabehandlung	7
1.4	Die co-translationale Translokationsmaschinerie	9
1.4.1	Das Translokon	9
1.4.2	Überblick über die co- und post-translationale Translokation	10
1.4.3	Die co-translationale Translokationsmaschinerie	11
1.5	ERj1 als potentieller Bestandteil der Translokationsmaschinerie	12
1.5.1	Das HSP70/HSP40 Netzwerk	12
1.5.2	Das HSP40 ERj1	13
1.6	Der XBP1u-RNC in der UPR	15
1.6.1	Überblick über die UPR	15
1.6.2	XBP1u-RNC als Bestandteil des IRE1-Signalwegs	16
2	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Stämme und Vektoren	20
3.2	Generelle Methoden der Biochemie	20
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reinigung PCR-Produkte	20
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	21
3.2.3	Proteinfällung (TCA)	21
3.2.4	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)	22
3.2.5	Commasie-Färbung SDS-Gele	22
3.2.6	Western Blot und Immunfärbung	22
3.2.7	Konzentrationsbestimmung	23
3.3	Klonierung und Amplifikation der Plasmid-DNA	23
3.3.1	Medium (<i>E. Coli</i>)	23
3.3.2	Klonierung der Vektoren (TOPO®-Klonierung)	23
3.3.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	23
3.3.4	Kolonie-PCR	24
3.3.5	Isolation und Sequenzierung Plasmid-DNA	24
3.4	RNC-Gewinnung	24
3.4.1	Herstellung Translationsextrakt (<i>T. aestivum</i>)	24
3.4.2	<i>In vitro</i> -Transkription (Herstellung mRNA-Konstrukte)	25
3.4.3	Herstellung RNCs via <i>in vitro</i> -Translation	25
3.4.4	Reinigung von RNCs nach dem Standard-Protokoll im Labor	26
3.4.5	Reinigung RNCs aus Reticulozyten-Lysaten (optimiertes Protokoll)	27
3.5	Gewinnung von 80S Ribosomen	28
3.5.1	80s Ribosomen (<i>P. falciparum</i>)	28
3.5.2	80S Ribosomen (<i>C. l. familiaris</i>)	28
3.6	<i>In vitro</i>-Rekonstitution von ribosomalen Komplexen	29
3.6.1	Eingesetzte Proteine (Liganden) und Ribosomen	29

3.6.2	<i>In vitro</i> -Rekonstitution ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1	29
3.7	Kryo-EM und Negativkontrastfärbung	30
3.7.1	Datensammlung (Kryo-EM)	30
3.7.2	Negativkontrastfärbung	31
3.8	Einzel-Partikel Rekonstruktion	31
3.8.1	Selektion der Partikel	31
3.8.2	Referenz basierendes initiales Alignment	32
3.8.3	3D-Rückprojektion und Bestimmung der Auflösung	32
3.8.4	Refinement und Sortierung	33
3.8.5	Modellierung rRNA und rProteine	33
3.8.6	Abbildungen	34
4	Ergebnisse	35
4.1	Projekt I: Modellbau des 80S Ribosoms (<i>P. falciparum</i>)	35
4.1.1	Etablierung eines Protokolls zur Reinigung von 80S Ribosomen (<i>P. falciparum</i>)	35
4.1.2	3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms	36
4.1.3	Partielle Modellierung der rRNA und der rProteine	38
4.1.4	Ungewöhnliche N-terminale Verlängerung in der Proteinsequenz von L41e	43
4.1.5	Ungewöhnliche HLH-Struktur in ES3L	46
4.2	Projekt II: 3D-Rekonstruktionen ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1	49
4.2.1	Etablierung eines Protokolls für die <i>in vitro</i> -Rekonstitution	49
4.2.2	<i>In vitro</i> -Rekonstitutionen verschiedener ribosomaler Komplexe	51
4.2.3	Simultane Bindung von ERj1 und Sec61 an das Ribosom	53
4.2.4	3D-Rekonstruktionen bei niedriger Auflösung (dimerer und quartärer Komplex)	54
4.2.5	3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes am 80S Ribosom bei hoher Auflösung	55
4.2.6	Keine Identifizierung von ERj1 oder BiP in der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes	57
4.3	Projekt III: 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC	61
4.3.1	fXBP1u weist eine ähnlich hydrophobe Region wie HR2 auf	61
4.3.2	Optimierung der <i>in vitro</i> -Translation für die Generierung von XBP1u-RNCs	61
4.3.3	Standardprotokoll zur Reinigung der XBP1-RNCs führt zu Aggregationen	64
4.3.4	Reinigung hXBP1-RNC nach optimierten Protokoll	66
4.3.5	Erfolgreiche 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC mithilfe der SP-Kryo-EM	67
4.3.6	Orientierungsbias der ribosomalen Partikel	69
4.4	Projekt III: Interpretation der 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC	71
4.4.1	Verschiebung der tRNA Richtung P-Loop und L10e	73
4.4.2	Konformationsänderungen im Bereich des CCA-Endes	74
4.4.3	PTC und der obere Bereich des Exit-Tunnels	79
4.4.4	Konstriktion und der untere Bereich des Exit-Tunnels	82
4.4.5	Zusammenfassung der relevanten strukturellen Merkmale in hXBP1-RNC	84
5	Diskussion	85
5.1	Projekt I: Modellbau des 80S Ribosoms (<i>P. falciparum</i>)	85
5.1.1	Erfolgreiche Etablierung der Reinigung von 80S Ribosomen (<i>P. falciparum</i>)	85
5.1.2	DED-Technologie ermöglicht 3D-Rekonstruktion bei fast atomarer Auflösung	86
5.1.3	Hohe Detaildichte der modellierten Bereiche	87
5.1.4	Konservierte N-terminale Verlängerung von L41e in der Gruppe der Myzozoa	88
5.1.5	<i>P. falciparum</i> spezifische HLH-Struktur in ES3L	89
5.2	Projekt II: 3D-Rekonstruktionen ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1	90
5.2.1	Erfolgreiche <i>in vitro</i> -Rekonstitutionen der ribosomalen Komplexe	90
5.2.2	Keine Identifizierung von ERj1 oder BiP in den 3D-Rekonstruktionen	91
5.2.3	Ursache für die erfolglose Identifizierung von ERj1 in den 3D-Rekonstruktionen	91
5.2.4	<i>in vitro</i> -Rekonstitutionen belegen simultane Bindung von ERj1 und Sec61	92
5.2.5	Suboptimale Reinigungsstrategie für ERj1	93

5.3	Projekt III: 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC	95
5.3.1	Erfolgreiche 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC anhand gereinigter RNCs	95
5.3.2	Relevante strukturelle Merkmale in dem hXBP1-RNC	96
5.3.3	Postulierter Mechanismus für den Translationsarrest im hXBP1-RNC	97
5.3.4	Elemente des Translationsarrest im hXBP1-RNC im Kontext	99
5.3.5	Kooperativer Mechanismus der Lokalisierung im Reich der Tiere konserviert	100
5.3.6	Translationsarrest trotz 4 AS langen Einschubs in der Arrestsequenz (fXBP1u)	101
6	Zusammenfassung und Ausblick	103
7	Literaturverzeichnis	105
8	Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnisses

2D-Projektion	zwei dimensionale Projektion
3D-Rückprojektion	dreidimensionale Rückprojektion
40S	Bezeichnung für die kleine Untereinheit des 80S Ribosoms
60S	Bezeichnung für die große Untereinheit des 80S Ribosoms
80S	Bezeichnung für das eukaryotische Ribosom
Å	Ångström
A ₂₅₄	Absorption bei einer Wellenlänge von 254 nm
A ₂₆₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
A _{260/280}	Wert für A ₂₆₀ dividiert durch A ₂₈₀
A ₂₈₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm
A ₆₀₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
A-Stelle	Aminoacyl-Stelle
ATP	Adenosintriphosphat
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i> , Fadenwurm
CDD	in engl. charge-coupled device
<i>C. l. familiaris</i>	<i>Canis lupus familiaris</i> , Hund
C-terminal	Carboxyl-terminal
CTF	Kontrast Transfer Funktion
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> , Fliege
DED	in engl. direct electron detector
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP120	Auf 120 AS verkürzte cDNA des Proteins Dipeptidylaminopeptidase B ohne STOP-Codon

DP120-RNC	Translationsarretierter RNC mit der naszierenden Kette von DP120
DQE	in engl. detective quantum efficiency
DTT	in eng. Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
e80S	3D-Rekonstruktion vom leeren 80S Ribosom (<i>O. cuniculus</i>)
eAAP	3D-Rekonstruktion vom AAP-RNC
eBecker	3D-Rekonstruktion von (Becker et al., 2009)
eDifferenz	Dichtedifferenz-Karte der Elektrondichten von eXbp1 und e80S
eDP120	3D-Rekonstruktion vom DP120-RNC
EDTA	in engl. ethylenediaminetetraacetic acid
eMénétret	3D-Rekonstruktion von (Ménétret et al., 2008)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERj1C	Zytosolischen Fragment ERj1C- Δ C85 von ERj1 (Blau et al., 2005)
ES	Expansionssegmente
eSecM	3D-Rekonstruktion vom SecM-RNC
eTnaC	3D-Rekonstruktion vom TnaC-RNC
eVoorhees	3D-Rekonstruktion von (Voorhees et al., 2014)
eXbp1	3D-Rekonstruktion vom hXBP1-RNC
Exit-Stelle	Exit-Stelle
FSC	Fourier-Shell-Korrelation
FSC _{0,143}	FSC = 0,143
FSC _{0,5}	FSC = 0,5
fXBP1-RNC	Translationsarretierter RNC mit der naszierenden Kette von XBP1u (<i>D. melanogaster</i>)
fXBP1s	Proteinprodukt von gespleißter mRNA Xbp1s (<i>D. melanogaster</i>)
fXbp1s	gespleißte mRNA von Xbp1 (<i>D. melanogaster</i>)
fXbp1u	nicht gespleißte mRNA von Xbp1 (<i>D. melanogaster</i>)
fXBP1u	Proteinprodukt von nicht gespleißter mRNA Xbp1u (<i>D. melanogaster</i>)
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HR2	Hydrophobe Region 2
HSP	Hitzeschockprotein
HLH-Struktur	Helix-Loop-Helix Struktur
hXBP1-RNC	Translationsarretierter RNC mit der Mutation S255A in der naszierenden Kette von XBP1u (<i>H. sapiens</i>)
hXBP1s	Proteinprodukt von gespleißter mRNA Xbp1s (<i>H. sapiens</i>)
hXbp1u	nicht gespleißte mRNA von Xbp1 (<i>H. sapiens</i>)
hXBP1u	Proteinprodukt von nicht gespleißter mRNA Xbp1u (<i>H. sapiens</i>)
hXBP1u-S255A	hXBP1u mit der Translationsarrest-stabilisierenden Mutation S255A in der Arrestsequenz
hXbp1u-S255A	mRNA für Proteinprodukt hXBP1u-S255A
in engl.	in englisch
IR-Ansatz	<i>in vitro</i> -Rekonstitutionsansatz
kDA	Kilo-Dalton
Kryo-EM	Kryo-Elektronenmikroskopie
l	Liter
LB	in engl. lysogeny broth, Nährmedium
LSU	in engl. large subunit, Große Untereinheit des Ribosoms
MDa	Mega-Dalton
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	in engl. messenger RNA
NEB	Firma New England BioLabs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Noise-Volumen	Referenzvolumen für die Aussortierung nicht-ribosomaler Partikel bei der Datenprozessierung. Es wurde aus dem Hintergrundrauschen abgeleitet.
nt	Nukleotid
N-terminal	Amino-terminal
<i>O. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> , Kaninchen
O/N	Über Nacht (overnight)

OD	Optische Dichte
ORF	in engl. open reading frame, Offener Leserahmen
OST	Oligosaccharyltransferase
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PCR	in engl. polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	in engl. phenylmethylsulfonyl fluoride
ProtA	Protein A
P-Stelle	Peptidyl-Stelle
PTC	Peptidyltransferase-Zentrum
RAMP	in engl. ribosome associated membran protein
RAP	in eng. ribosome arrest peptides
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNC	in engl. ribosome-nascent chain-complex, in der Translation befindliches Ribosom, bei dem die naszierende Kette noch nicht freigesetzt wurde
RP	Rückprojektion
rpm	in engl. rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rProteine	ribosomale Proteine
rRNA	ribosomale rRNA
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Hefe
S255A	Mutation von Serin gegen Alanin in Position 255 der naszierenden Kette
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat Polyarylamid Gel Elektrophorese
Sec61	Abkürzung für den Sec61-Komplex bestehend aus der α -, β - und γ -Untereinheit
SNR	in engl. Signal to Noise Ratio, Verhältnis Signalstärke zu Hintergrundrauschen
SP-Kryo-EM	Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie
SSU	in engl. small subunit, Kleine Untereinheit des Ribosoms
Staller	translationsarretierter RNC
<i>S. s. domesticus</i>	<i>Sus scrofa domesticus</i> , Hausschwein
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i> , Weichweizen

TCA	Tri-Chlor-Essigsäure
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop
tRNAs	in engl. transferRNA
<i>T. thermophila</i>	<i>Tetrahymena thermophila</i>
u.	und
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UPR	in engl. unfolded protein response
v/v	Volumenprozent
vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
Xbp1	mRNA von Xbp1
XBP1s	Proteinprodukt von gespleißter mRNA Xbp1s
Xbp1s	gespleißte mRNA von Xbp1
Xbp1u	nicht gespleißte mRNA von Xbp1
XBP1u	Proteinprodukt von nicht gespleißter mRNA Xbp1u

1 Einleitung

Das Grundgerüst von Proteinen besteht aus einer Peptidkette, die aus einzelnen miteinander verknüpften Aminosäuren (AS) aufgebaut ist. Die Information über die Abfolge der einzelnen Aminosäuren in der Peptidkette ist auf als Genen bezeichneten Abschnitten der DNA enthalten. Die Information eines Gens wird in einem als Transkription bezeichneten Vorgang ausgelesen und ein Informationsträger erzeugt, welcher als „messenger RNA“ (mRNA) bezeichnet wird. Anhand der Information auf der mRNA erfolgt die Synthese der Peptidkette (Translation). Die Translation wird durch das Makromolekül Ribosom ausgeführt.

Das Ribosom selbst besteht aus einem Komplex ribosomaler Proteinen (rProteine) und RNAs (rRNAs) und tritt während der Translation mit vielen weiteren Makromolekülen und Proteinen in Interaktion.

Aufgrund seiner zentralen Bedeutung steht das Ribosom im Fokus der Forschung und die Zielsetzung dieser Arbeit war es mithilfe der Technik der Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie strukturelle Fragestellungen in Bezug auf das Ribosom zu untersuchen.

1.1 Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie

1.1.1 3D-Rekonstruktion mithilfe der Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie

In der Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) werden strahlungsempfindliche organische Proben bei kryogenen Bedingungen (<150 Grad) unter Verwendung eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) betrachtet (Milne et al., 2013).

Die kryogenen Bedingungen ermöglichen den Einsatz einer deutlich höheren Elektronendosis. Dadurch kommt es zu einer Verbesserung des Kontrasts der Aufnahme (ebd.), welche als Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) bezeichnet wird (Orlova und Saibil, 2011).

In der Einzelpartikel Kryo-Elektronenmikroskopie (SP-Kryo-EM) wird eine weitere Verbesserung des SNR durch die Aufsummierung identischer Partikel, zum Beispiel von Ribosomen, erreicht (Milne et al., 2013).

Wie in Abb. 1 schematisch dargestellt, wird in der SP-Kryo-EM eine homogene Lösung von Partikeln, zum Beispiel Ribosomen, auf einem mit Kohle beschichteten Grid vitrifiziert. Im vitrifizierten Eis liegen die Partikel in einer zufälligen räumlichen Orientierung und annähernd nativen, hydrierten Konformation vor (Orlova und Saibil, 2011).

Die anschließende Datensammlung am Mikroskop liefert zweidimensionale Projektionen (2D-Projektionen) der Partikel, welche entlang ihrer optischen Achse die vollständige dreidimensionale Strukturinformation jeden Partikels enthalten (Milne et al., 2013).

In der folgenden Datenprozessierung werden die 2D-Projektionen gleicher räumlicher Orientierung in einem als initialen Alignment bezeichneten Vorgang in Gruppen zusammengefasst, übereinander positioniert und aufsummiert (Orlova und Saibil, 2011). Das Alignment führt zu einer Erhöhung des SNR (Milne et al., 2013).

Mithilfe der alignierten 2D-Projektionen wird eine dreidimensionale Rückprojektion (3D-Rückprojektion oder 3D-Rekonstruktion) des Partikels durchgeführt.

Anschließend wird in einem als „Refinement“ bezeichneten iterativen Prozess das Alignment anhand der Rückprojektion als Referenz verbessert.

Auch erfolgt eine Klassifizierung der Partikel über einen als Sortierung bezeichneten Vorgang, um homogenere Klassen an Partikeln zu erhalten. Die Partikel weisen zum Beispiel oft unterschiedliche Konformationszustände auf.

Durch iterative Wiederholungen des Refinements und der Sortierung wird der Datensatz solange prozessiert, bis eine Verbesserung der Auflösung nicht mehr erreicht wird und somit die finale 3D-Rückprojektion vorliegt. Abschließend erfolgt die Interpretation der 3D-Rekonstruktion bezüglich der Fragestellung.

Die Auflösung der 3D-Rückprojektion wird in Ångström (Å) angegeben und meist über die „Fourier Shell Correlation“ (FSC) bei $FSC=0,5$ ($FSC_{0,5}$) (Orlova und Saibil, 2011) oder nach dem Goldstandard bei $FSC=0,143$ ($FSC_{0,143}$) bestimmt (Scheres und Chen, 2012). Im Falle des Ribosoms werden inzwischen 3D-Rekonstruktionen mit einer Auflösung um die 3,5 Å erreicht, in denen die Seitenketten der Aminosäuren sowie eine Basentrennung der rRNA zu erkennen ist (Voorhees et al., 2014).

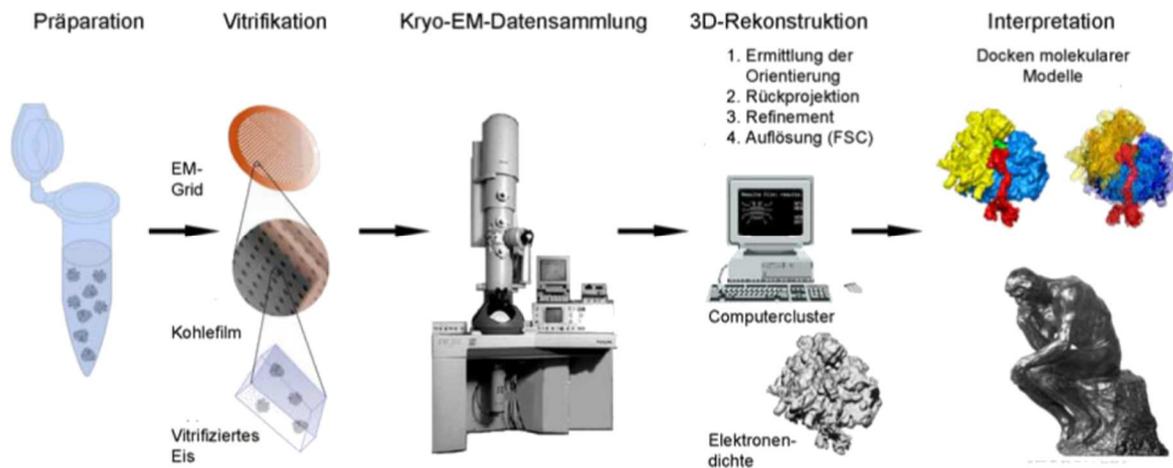


Abb. 1 Vorgehensweise bei der 3D-Rekonstruktion von Makromolekülen mit Hilfe der SP-Kryo-EM. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt im Text. Abbildung wurde von (Becker, 2007) übernommen und angepasst.

1.1.2 Technologische Weiterentwicklung der Bildaufnahme

Da im Verlauf dieser Arbeit aufgrund der technischen Weiterentwicklung verschiedene Technologien zur Bildaufnahme eingesetzt wurden, werden diese hier knapp beschrieben.

Die Qualität der Auflösung hängt neben der Limitierung der Elektronendosis aufgrund der Strahlenempfindlichkeit unter anderem auch von der „detective quantum efficiency“ (DQE) und der durch den Elektronenstrahl ausgelösten Bewegung der Partikel ab (Beamshift) (Bai et al., 2013). Die DQE beschreibt dabei wie stark das Signal relativ zum Hintergrundrauschen ist (Milne et al., 2013).

Ursprünglich erfolgten die Bildaufnahmen unter der Verwendung von Fotofilmen. Diese haben eine gute DQE und ermöglichen einen großen Aufnahmebereich (Bai et al., 2013). Allerdings ist die Filmentwicklung und Digitalisierung der Bilder sehr zeit- und arbeitsaufwendig.

Der Fotofilm wurde daher in den letzten Jahren immer mehr durch digitale Detektoren abgelöst, welche als „charge-coupled device“ (CCD) Kameras bezeichnet werden (Orlova und Saibil, 2011). Aufgrund der Digitalisierung der Daten kann die Datensammlung automatisiert werden, was eine effiziente Datensammlung bei geringem Aufwand ermöglicht.

Allerdings weist die CCD Kamera eine geringe DQE auf und somit liefert immer noch der Fotofilm die 3D-Rekonstruktionen mit der besseren Auflösung (Bai et al., 2013).

Die schlechte DQE beruht darauf, dass der Elektronenstrahl erst durch die Nutzung eines Szintillationsschirm in Photonen und diese wiederum durch eine CCD in ein digitales Signal umgewandelt werden müssen (Milazzo et al., 2010).

Daher wurden sogenannte „direct electron devices“ oder „direct electron detector“ (DED) entwickelt, welche der Elektronenstrahlung direkt ausgesetzt werden können (Milazzo et al., 2010) und somit keine Konvertierung der Elektronen in Photonen benötigen (Bai et al., 2013). Dadurch übertrifft die DQE bei hoher Auflösung Fotofilm und CCD (Bai et al., 2013) und ermöglicht trotzdem eine automatisierte Datensammlung.

Des Weiteren kann aufgrund der hohen Bildrate (10-40 Frames pro Sekunde) die durch die Strahlenexposition erhaltene Strukturinformation auf mehrere Frames (Subframes) aufgeteilt und dadurch der Beamshift durch das Alignment der Subframes weitestgehend eliminiert werden (Li et al., 2013). Somit konnte die 3D-Rekonstruktion des 20S Proteasoms durch den Einsatz von ca. 120,000 Partikeln bei 3,3 Å aufgelöst werden (ebd.).

Im Falle der β -Galaktosidase im Komplex mit einem Inhibitor wurde sogar eine Auflösung von 2,2 Å bei einem Einsatz von 93,686 Partikel erhalten (Bartesaghi et al., 2015).

Mit Hilfe der DED-Technologie konnte eine 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) unter dem Einsatz von nur ca. 35,000 Partikeln bei 4,5 Å aufgelöst werden (Bai et al., 2013). Die bis dahin beste 3D-Rekonstruktion eines 80S Ribosoms unter Verwendung eines Fotofilms wurde bei 5,5 Å unter dem Einsatz von 2,1 Millionen Partikeln erhalten (EMD-1780, Armache et al., 2010).

Wie bereits erwähnt, werden inzwischen Auflösungen um die 3,5 Å für das 80S Ribosom erreicht (Voorhees et al., 2014). Im Falle des 70S Ribosoms liegt die Auflösung bereits bei 2.9 Å (Fischer et al., 2015).

1.2 Das Ribosom im Überblick

1.2.1 Aufbau des eukaryotischen Ribosoms

Das Ribosom besteht aus einer kleinen (SSU) und großen Untereinheit (LSU) (Abb. 3). Beide Untereinheiten setzen sich aus einer Vielzahl ribosomaler Proteine (rProteine) und einiger langkettiger ribosomaler RNAs (rRNA) zusammen.

Die Masse des Ribosoms nimmt von den Prokaryoten über die Archaeen bis zu den Eukaryoten zu. Auch innerhalb der Eukaryoten nimmt die Masse von den niederen zu den höheren Eukaryoten zu (Melnikov et al., 2012). Zum Beispiel weist das prokaryotische Ribosom von *E. coli* eine Masse von 2,3 Mega-Dalton (MDa) auf und die eukaryotischen Ribosomen von *S. cerevisiae* 3,3 MDa sowie *Homo sapiens* (*H. Sapiens*) 4,3 MDa (ebd.).

Die Massenzunahme des Ribosoms beruht unter anderen auf einer Zunahme der Anzahl der rProteine sowie einer Verlängerung der homologen rProteine. Zum Beispiel weist das menschliche Ribosom im Gegensatz zu *E. coli* 80 statt 54 rProteine auf (ebd.).

Hauptsächlich beruht die Massezunahme aber auf der Längenzunahme der rRNAs. Zum Beispiel weisen die rRNAs im Prokaryot *E. coli* eine Gesamtlänge von 4567 Nukleotiden (nt), im niederen Eukaryot *S. cerevisiae* von 5475 nt und im höheren Eukaryot *H. sapiens* von 7181 nt auf (ebd.). Die Längenzunahme der rRNAs ist hauptsächlich auf die Verlängerung der sogenannten Expansionssegmente (ES) zurückzuführen (Anger et al., 2013), deren Funktion aber kaum erschlossen ist (Melnikov et al., 2012).

Der Kern des eukaryotischen Ribosoms besteht zum größten Teil aus dem konservierten Bereich des prokaryotischen Ribosoms und führt die grundlegenden Funktionen der Translation aus (Anger et al., 2013). An den Kern lagern sich zusätzliche spezifische eukaryotische Proteine an, die in Interaktion mit den verlängerten ES stehen und eine verwundene Protein-RNA-Schicht ausbilden (Abb. 2) (ebd.). Die Zunahme der Ribosoms spiegelt dabei wohl die zunehmende Komplexität der Regulierung des Translationsvorganges in Eukaryoten wieder (ebd.).

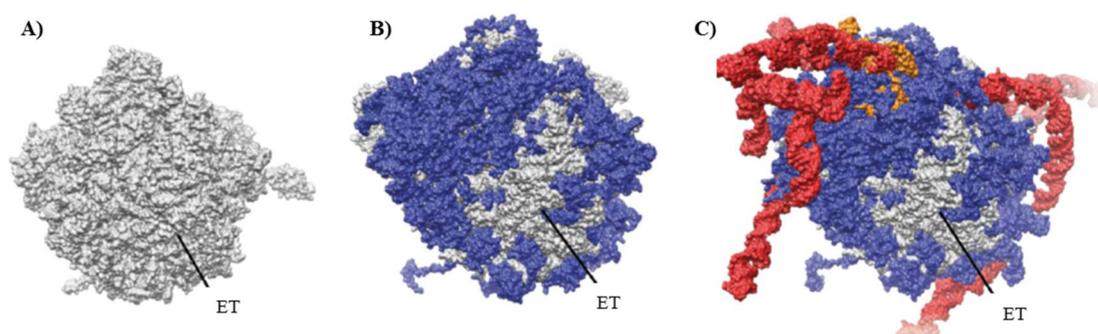


Abb. 2 Schematische Darstellung der Massenzunahme für die große ribosomale Untereinheit (A-C) Darstellung der großen Untereinheit für den Prokaryot *T. thermophilus* (A), den niederen Eukaryot *S. cerevisiae* (B) und den höheren Eukaryot *H. sapiens* (C). In grau ist der konservierte Kern des Ribosoms dargestellt und in blau die eukaryotische Protein-RNA-Schicht. In orange ist die in höheren Eukaryoten existierende RNA-RNA Schicht sowie in rot die stark verlängerten ES dargestellt. Prokaryoten-spezifische Proteine sind aufgrund der besseren Übersicht nicht eingefärbt. Zur Orientierung ist die Position des Exit-Tunnels (ET) eingezeichnet. Die Abbildung wurde von (Anger, 2013) übernommen und angepasst.

1.2.2 Das Ribosom als Katalysator in der Elongationsphase der Translation

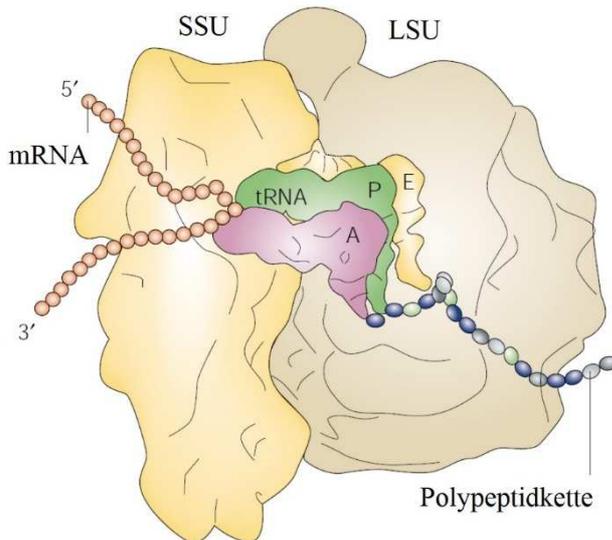


Abb. 3 Schematische Darstellung des Ribosoms in der Elongationsphase
Im Decodierungszentrum der SSU wird die zur mRNA passende tRNA in der A-Stelle erkannt. Anschließend wird im Peptidyl-Transferase-Zentrum der LSU die Polypeptidkette von der tRNA in der P-Stelle auf die AS der tRNA in der A-Stelle übertragen. Während der Elongation durchwandern die tRNAs die A-, P- und E-Stelle, bevor sie wieder freigesetzt werden. Näheres siehe Text. Abbildung wurde von (Lafontaine und Tollervy, 2001) übernommen und angepasst.

Für die Proteinsynthese steht im Zytosol ein Pool von verschiedenen transferRNAs (tRNAs) zur Verfügung, welche die zur Synthese der Peptidkette benötigten Aminosäuren tragen (Lafontaine und Tollervy, 2001).

Die beiden Untereinheiten des Ribosoms formen auf ihren gegenseitig zugewandten Seiten drei Bindungsstellen für die tRNA, welche die tRNAs sequentiell bei der Peptidsynthese von der Aminoacyl (A)-, zur Peptidyl (P)- und zur Exit (E)-Stelle durchlaufen (Abb. 3). (ebd.).

Die Translation kann grob in vier Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation, Termination und Recycling (Voorhees und Ramakrishnan, 2013). Nur die Elongationsphase ist in Prokaryoten und Eukaryoten hochkonserviert (ebd.).

In der Initiationsphase kommt es zur korrekten Positionierung des 80S

Ribosoms auf der mRNA mit der Initiator-tRNA in der P-Stelle (Aitken und Lorsch, 2012). Die Aminosäure Methionin der Initiator-tRNA stellt den ersten Baustein der Peptidkette da.

In jedem Elongationszyklus der Elongationsphase wird die mit einer tRNA verknüpfte Peptidkette (Peptidyl-tRNA) in der P-Stelle auf die Aminosäure der in der A-Stelle befindlichen tRNA übertragen und die Peptidkette somit um eine Aminosäure verlängert (Voorhees und Ramakrishnan, 2013). Dieser Schritt wird im Peptidyl-Transferase-Zentrum (PTC) der LSU katalysiert (ebd.).

Die Bindung der korrekten tRNA in der A-Stelle erfolgt im Decodierungszentrum der kleinen Untereinheit durch eine Basenpaarung zwischen drei Nukleotiden in der tRNA (Anti-Codon) und dem aktuell präsentierten Codon auf der mRNA (ebd.).

Anschließend erfolgt die Translokation als Vorbereitung für den nächsten Elongationszyklus (ebd.). In der Translokation wandert die Peptidyl-tRNA aus der A- in die P-Stelle und die deacetylierte tRNA aus der P-Stelle in die E-Stelle, bevor sie das Ribosom verlässt (ebd.). Auch die mRNA wandert um ein Codon weiter (ebd.). Die wachsende, naszierende Peptidkette schiebt sich während der Elongation durch den Exit-Tunnel zur Oberfläche des Ribosoms, wo sie ins Zytosol austritt (ebd.).

Der Vorgang der Elongation wird durch mehrere Elongationsfaktoren gesteuert, die ihre Energie aus der Hydrolyse von GTP zu GDP beziehen und die SSU durchwandern mehrere deutliche Konformationsänderungen während der Elongation (ebd.).

In der anschließenden Terminationsphase kommt es zu einer Freisetzung der fertiggestellten Peptids und in der Recyclingphase wird das Ribosom in seine Untereinheiten zerlegt und die mRNA und tRNA freigesetzt (Dever und Green, 2012).

1.2.3 Translationsarretierte RNC aufgrund Arrestsequenz in der naszierenden Kette

Bei einem „ribosome nascent chain complex“ (RNC) handelt es sich um ein in der Translation befindliches Ribosom, bei dem die naszierende Kette des Proteins noch nicht freigesetzt wurde. Bestimmte Sequenzen auf der mRNA oder naszierenden Kette können dabei zu einem vorübergehenden oder vollständigen Translationsarrest im RNC führen (arretierter RNC) (Ito und Chiba, 2013).

Die Proteine, bei denen ein Translationsarrest durch eine Aminosäuresequenz (Arrestsequenz) in der naszierenden Kette ausgelöst wird, werden als „ribosome arrest peptides“ (RAPs) bezeichnet (ebd.). RAPs weisen sich unterscheidende Arrestsequenzen auf und sind im Durchschnitt ca. 20 AS lang (ebd.). Bestimmte Aminosäuren in der Arrestsequenz interagieren über ihre Seitenketten mit den rRNAs und rProteinen im Exit-Tunnel und sind meist essentiell für den Arrest (Abb. 4) (ebd.).

Die Interaktion zwischen der Arrestsequenz und der Tunnelwand führt zu Konformationsänderungen im Ribosom, die den Translationsarrest bewirken (Ito und Chiba, 2013, Wilson und Beckmann, 2011). Die RAPs inhibieren dabei entweder die Translokation, den Peptidyl-Transfer oder die Termination und können dementsprechend in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Ito und Chiba, 2013).

In einigen Fällen ist die Arrestsequenz der naszierenden Kette nicht ausreichend für den Translationsarrest. Zum Beispiel ist im Fall von TnaC zusätzlich noch die Interaktion von zwei Tryptophanen mit der naszierenden Kette und der Tunnelwand notwendig (Bischoff et al., 2014).

Für einige RAPs wie zum Beispiel SecM und TnaC in Prokaryoten sowie AAP und hCMV in Eukaryoten existieren 3D-Rekonstruktionen der arretierten RNCs (Bhushan et al., 2010b, Bhushan et al., 2011, Seidelt et al., 2009, Bischoff et al., 2014). Diese ermöglichen Rückschlüsse auf den strukturellen Mechanismus des Translationsarrests.

In dieser Arbeit wurde versucht die 3D-Rekonstruktion für den translationsarretierten RNC für XBP1u zu generieren (siehe 1.6.2, S.24).

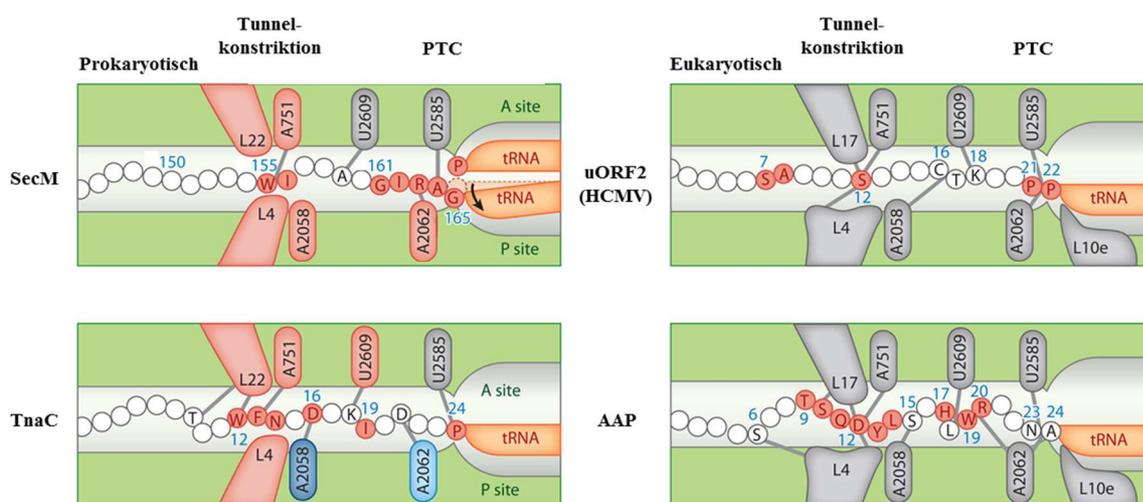


Abb. 4 Beispiele für die Interaktion zwischen der Arrestsequenz und dem Ribosom Eine schematische Darstellung der Interaktion zwischen dem Ribosom sowie den Arrestsequenzen von SecM, TnaC, hCMV und AAP basierend auf den zugehörigen Daten der SP-Kryo-Elektronenmikroskopie. Die blauen Nummern geben die Position der Aminosäuren in der naszierenden Kette an. Für eine bessere Vergleichbarkeit erfolgte die Nummerierung der rRNA durchgehend nach *E. coli*. Durch graue Linien sind die Interaktionen zwischen den Aminosäuren der naszierenden Kette und dem Ribosom dargestellt. In Rot sind rRNAs, rProteine und Aminosäuren in der Arrestsequenz hervorgehoben, bei denen Mutationsstudien auf eine wichtige Rolle beim Translationsarrest hindeuten. Die Mutation der Navy-blau dargestellten rRNAs zeigt einen verstärkenden Effekt auf den Translationsarrest und eine Mutation der hell-blau dargestellten rRNAs keinen Effekt. Im Falle der grau dargestellten rProteine und rRNAs existieren keine Mutationsstudien. Der schwarze Pfeil deutet im Falle von SecM die Verschiebung der tRNA im PTC an. Die Abbildung wurde von (Ito und Chiba, 2013) übernommen und angepasst.

1.3 Das 80S Ribosom von *P. falciparum* als Angriffspunkt der Malariabehandlung

Im Jahr 2012 sind geschätzt 207 Millionen Menschen an Malaria erkrankt und 627,000 Menschen daran gestorben (WHO, 2013). Malaria wird durch den Parasiten Plasmodium ausgelöst, welcher durch die Mücke *Anopheles mosquitoes* auf den Menschen übertragen wird (White et al., 2014). Plasmodium gehört den *Apicomplexa* an, welche eine Gruppe parasitärer, einzelliger, eukaryotischer Protisten umfasst (Botté et al., 2011).

Der Parasit durchläuft mehrere Entwicklungsstadien in der Mücke und dem menschlichen Körper (White et al., 2014). Dabei befällt er im menschlichen Körper die Erythrozyten, ernährt sich von deren Inhalt und vermehrt sich in diesen (ebd.). Anschließend platzen die Erythrozyten auf und der Parasit befällt neue Erythrozyten (ebd.). Die Symptome von Malaria wie zum Beispiel hohe Fieberschübe sind Auswirkungen der Reaktion des Körpers auf den parasitären Befall der Erythrozyten und deren Zerstörung (ebd.).

Es existieren mehrere Arten der Gattung Plasmodium, wobei die meisten Malariafälle durch *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) und *Plasmodium vivax* ausgelöst werden (ebd.). Fast alle Fälle mit tödlichem Verlauf werden durch den Erreger *P. falciparum* verursacht (ebd.).

Aufgrund des zunehmenden Auftretens von Resistenzen gegen Anti-Malaria Medikamente wie Chloroquin und Mefloquin durch *P. falciparum* kam es in den letzten Jahren wieder zu einer Zunahme der Malariainfektionen und Todesfälle (Kokwaro, 2009). Daher wird versucht durch Kombinationsbehandlungen wie zum Beispiel Chloroquin in Verbindung mit Doxycyclin der Resistenzbildung entgegenzuwirken (Taylor et al., 2001). Die Entwicklung neuer Medikamente ist aber unabdinglich im Wettlauf gegen die fortschreitende Resistenzbildung.

Im Fokus der Medikamentenentwicklung stehen dabei unter anderem auch translationsinhibierende Stoffe (Jackson et al., 2011).

Die Translation in Plasmodium erfolgt dabei in drei Bereichen der Zelle: im Zytosol, in den Mitochondrien und in den Apikoplasten (ebd.).

Der Apikoplast ist ein nicht photosynthetisches Plastid, welches Vorstufen einiger Verbindungen wie Fettsäuren und Eisen-Schwefel-Cluster synthetisiert (ebd.) und wie das Mitochondrium endosymbiontischen Ursprungs ist (Botté et al., 2011).

Als Besonderheit in Plasmodium existiert die rRNA (18S, 28S, 5S, 5.8S) des zytosolischen 80S Ribosoms in strukturell abweichenden rRNA Genvarianten (Jackson et al., 2011), deren Transkription in Abhängigkeit des Lebenszyklus des Parasiten variiert (Jackson et al., 2011). Dies führt zu drei Ribosomen-Typen, die jeweils in einem anderen Entwicklungsstadium des Parasiten auftreten (Li et al., 1997, Jackson et al., 2010): A-Typ (Asexuales Leber- und Blutstadium im Menschen), O-Typ (Oozystenstadium in Moskito), S-Typ (Sporozystenstadium in Moskito).

Aufgrund der endosymbiontischen Entstehung sind die Ribosomen in Apikoplast und Mitochondrium im Gegensatz zu den eukaryotischen Ribosomen im Zytosol prokaryotischen Ursprungs (Jackson et al., 2011). Daher wirken viele anti-bakterielle Medikamente, welche die prokaryotische Translation inhibieren, auch in Plasmodium (Ralph et al., 2001).

Doxycyclin als eines der bekanntesten Anti-Malaria Medikamente (Jackson et al., 2011) blockiert zum Beispiel die Anlagerung der tRNA an die 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms (Wilson, 2014). Es ist aber nicht bekannt, ob Doxycyclin mit den Ribosomen in den Mitochondrien und/oder Apikoplasten interagiert (Botté et al., 2011, Ralph et al., 2001).

Medikamente gegen das zytosolische Ribosom werden nicht eingesetzt, da diese aufgrund ihrer mangelnden Spezifität auch das zytosolische Ribosom im Mensch angreifen.

Als Beispiel ist Emetin zu nennen, welches die Translation von Plasmodium wirkungsvoll (Matthews et al., 2013) über die Bindung an die 40S Untereinheit inhibiert (Akinboye und Bakare, 2011). Allerdings wird Emetin, welches ursprünglich zur Behandlung des parasitären Befalls durch Amöben entwickelt wurde, seit über 50 Jahren aufgrund seiner starken Nebenwirkungen nicht mehr verwendet (Akinboye und Bakare, 2011).

Die Schwierigkeit bei der Entwicklung von spezifischen Medikamenten beruht hierbei auf der Ähnlichkeit des zytosolischen Ribosoms in Mensch und Plasmodium.

Die Entwicklung solcher Medikamente ist aber unabdingbar, um die Bandbreite an Medikamenten zu erhöhen und im Wettlauf gegen die Resistenzbildung zu bestehen. Dabei ist für die Entwicklung von spezifischen Medikamenten nur der A-Typ relevant, da nur dieser im Menschen auftritt (Li et al., 1997, Jackson et al., 2010).

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit ein Modell des 80S Ribosoms (A-Typ, *P. falciparum*) bei fast atomarer Auflösung zu bauen, um somit eine wertvolle Grundlage für die Entwicklung spezifischer Antibiotika zur Verfügung zu stellen.

1.4 Die co-translationale Translokationsmaschinerie

Im sekretorischen Weg, den ungefähr 30% der menschlichen Proteine nutzen (Skach, 2007), wird die ungefaltete Peptidkette während (co-translationale Translokation) oder nach der Translation (post-translationale Translokation) durch einen als Translokon bezeichneten Komplex vom Zytosol in das Lumen des ER bzw. im Falle von Membranproteinen in die ER-Membran transportiert (Park und Rapoport, 2012). Im ER-Lumen erfolgt die korrekte Faltung sowie Qualitätskontrolle der Proteine, bevor die Proteine über den Golgi-Apparat sekretiert oder zu den entsprechenden Kompartimenten der Zelle transportiert werden.

1.4.1 Das Translokon

Bei dem Translokon handelt es sich um einen evolutionär konservierten hetero-trimeren Transmembran-Proteinkomplex in der ER-Membran (Park und Rapoport, 2012). Nur die α - und γ -Untereinheit des Komplexes sind konserviert und essentiell, nicht aber die β -Untereinheit (ebd.). In Säugern werden die Untereinheiten mit Sec61 α ,- β und - γ , in *S. cerevisiae* mit Sec61p, Sbh1p und Sss1p, in Prokaryoten SecY, SecG und SecE sowie in Archaeen SecY,- β und -E bezeichnet (Osborne et al., 2005). Das Translokon in seiner Gesamtheit wird in Eukaryoten als Sec61-Komplex (Sec61) bezeichnet.

Die Kristallstruktur des inaktiven, geschlossenen SecYE β -Komplexes des Archaeen *Methanococcus jannaschii* ermöglicht Rückschlüsse auf die räumliche Struktur des Translokons (Abb. 5) (Berg et al., 2004).

Die α -Untereinheit besteht aus 10 Transmembransegmenten, welche sich zu einem hydrophilen Kanal zusammenlagern, der ähnlich wie eine Sanduhr geformt ist (Osborne et al., 2005). Der Kanal stellt eine passive Pore da, welche die Translokation nicht aktiv unterstützt (Rapoport, 2007) und die engste Stelle des Kanals wird als Porenring bezeichnet.

Durch diesen Kanal gelangen die Proteine vom Zytosol in das ER-Lumen und die Transmembrandomänen (TM) von Membranproteinen gelangen durch eine laterale Öffnung im Kanal in die ER-Membran (Park und Rapoport, 2012). Es ist nicht geklärt, ob die laterale Öffnung immer oder nur während der Translokation geöffnet ist (ebd.).

Im inaktiven Zustand (keine Translokation) ist der Kanal geschlossen und der zugrunde liegende Mechanismus wird kontrovers diskutiert (ebd.). Es wird aber angenommen, dass entweder eine als „Plug“ bezeichnete Helix der α -Untereinheit oder BiP involviert sind (ebd.).

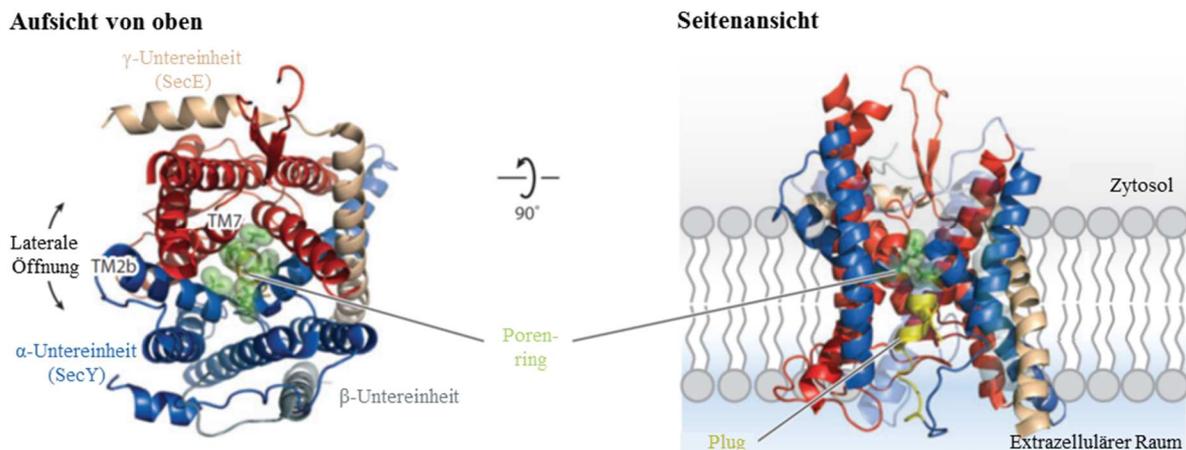


Abb. 5 Kristallstruktur des SecYE β -Komplexes Darstellung der Kristallstruktur des SecYE β -Komplexes (*Methanococcus jannaschii*) aus zwei unterschiedlichen Perspektiven. Die TM 1-5 der α -Untereinheit sind in blau und die TM 6-10 in rot dargestellt sowie die γ -Untereinheit in beige und die β -Untereinheit in grau. Die Seitenketten der Aminosäuren, welche den Porenring bilden, sind in grün dargestellt. Die laterale Öffnung zwischen TM2b und TM7 ist angedeutet. Der Plug ist in gelb dargestellt. Näheres siehe Text. Die Abbildung und Beschriftung wurde von (Park und Rapoport, 2012) übernommen und angepasst.

1.4.2 Überblick über die co- und post-translationale Translokation

In der co-translationalen Translokation (Abb. 6A) erfolgt die Bildung eines Sec61/RNC-Komplexes in einem als „SRP-Zyklus“ bekannten Vorgang (Wild et al., 2004). Der Sec61/RNC-Komplex stellt den zentralen Bestandteil eines als „Translokationsmaschinerie“ bezeichneten Komplexes dar (Siehe 1.4.3, S.11). Die Translokation erfolgt durch die gerichtete Bewegung der naszierenden Kette aufgrund der Translation (Park und Rapoport, 2012). In der post-translationalen Translokation (Abb. 6B) wird die freigesetzte Peptidkette nach der Translation durch einen Komplex aus Sec61, Sec62 und Sec63 gebunden (in *S. cerevisiae* enthält der Komplex zusätzlich die beiden nicht essentiellen Proteine Sec71p und Sec72p) (ebd.). Die Translokation erfolgt durch eine gerichtete Bewegung aufgrund eines BiP-abhängigen molekularen Ratsche-Mechanismus (ebd.).

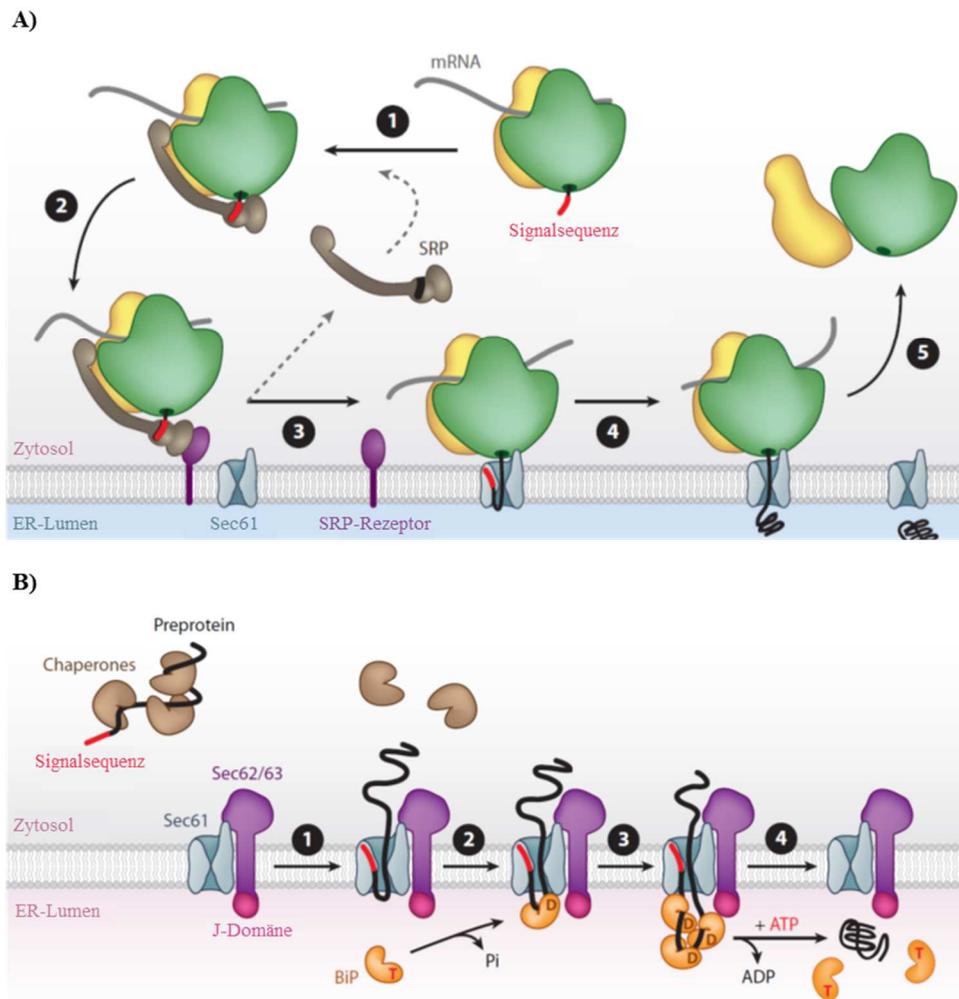


Abb. 6 Schematische Darstellung der co- und post-translationalen Translokation in Eukaryoten (A) Schematische Darstellung der co-translationalen Translokation. Schritt 1: Die co-translationale Translokation wird durch die Erkennung einer N-terminalen Signalsequenz auf der naszierenden Kette des RNC durch das Signalerkennungspartikel (SRP) eingeleitet, wobei SRP einen Translationsarrest bewirkt. Schritt 2: Es kommt zu einer Bindung des RNC/SRP-Komplexes durch den in der ER-Membran sitzenden SRP Rezeptor (SR). Schritt 3: Das Ribosom bindet an Sec61, die naszierende Kette wird im Kanal von Sec61 positioniert und SRP sowie SR freigesetzt. Schritt 4: Die Translation startet wieder, die naszierende Kette wandert in das ER-Lumen, die Signalsequenz wird abgespalten und die Faltung des Proteins beginnt. Schritt 5: Nach Beendigung der Translokation wird das Ribosom wieder freigesetzt.

(B) Schematische Darstellung der post-translationalen Translokation. Schritt 1: Die post-translationale Lokation startet mit der Bindung der komplett translatierten und freigesetzten Peptidkette an den Sec-Komplex, bestehend aus Sec61 und Sec62/Sec63, dabei werden mit der Peptidkette assoziierte Chaperone freigesetzt. Schritt 2: Im ER-Lumen interagiert HSP70 BiP im ATP gebundenen Zustand (T) mit der J-Domäne von HSP40 Sec63 (siehe 1.5.1, S.12). Nach der Hydrolyse von ATP (D) bindet BiP an die naszierende Kette, welche sich aufgrund der ungerichteten brownischen Bewegung in das ER-Lumen geschoben hat. Da BiP größer ist als der Kanal, wird ein Zurückgleiten der Peptidkette in den Kanal verhindert. Schritt 3: In einem sich wiederholenden Prozess binden weitere BiP-Moleküle an die in das ER-Lumen gleitende Peptidkette, bis die Peptidkette komplett durch das Translokationsgewandert ist. Schritt 4: Durch den Austausch von ADP gegen ATP löst sich BiP wieder von der naszierenden Kette und wird freigesetzt (Schritt 4). Die Abbildung und Beschriftung wurde von (Park und Rapoport, 2012) übernommen und angepasst.

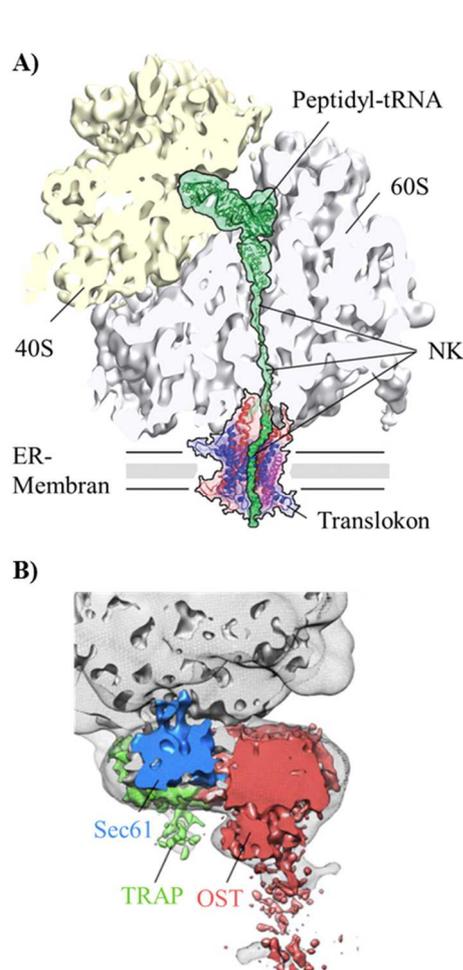
1.4.3 Die co-translationale Translokationsmaschinerie

In der co-translationalen Translokation stellt der Sec61/RNC-Komplex den zentralen Bestandteil eines als „Translokationsmaschinerie“ bezeichneten Komplexes dar (Abb. 7A). Die Translokationsmaschinerie enthält neben dem Sec61/RNC-Komplex noch weitere Komponenten (Zimmermann et al., 2011), aber es ist nicht einheitlich definiert, welche Elemente als Bestandteil der Translokationsmaschinerie anzusehen sind oder nur mit dieser interagieren (ebd.).

Als weitere Bestandteile der Translokationsmaschinerie werden unter anderem Proteine der RAMP-Fraktion („ribosome associated membran protein) angesehen, welche sich erst unter Hochsalzbedingungen aus Membran-solubilierten Ribosomenkomplexen herauslösen (Wang und Dobberstein, 1999). Zu den Proteinen der RAMP-Fraktion gehören neben Sec61 unter anderem die Oligosaccharyltransferase (OST) und der „Translokation assoziierte Protein Komplex“ (TRAP) (Wang und Dobberstein, 1999).

Zum Beispiel führt die OST die co-translationale N-Glykosylierung der naszierenden Kette aus (Kelleher und Gilmore, 2006), es ist aber auch eine post-translationale N-Glykosylierung möglich (Kelleher und Gilmore, 2006, Ruiz-Canada et al., 2009).

Der hetero-quartäre TRAP interagiert ebenfalls mit der naszierenden Kette und unterstützt einige Proteine bei ihrer co-translationalen Translokation (Menetret et al., 2005).



Bisher konnten mithilfe der SP-Kryo-EM 3D-Rekonstruktionen des Sec61/RNC-Komplexes (Gogala et al., 2014, Becker et al., 2009, Voorhees et al., 2014) des Sec61/TRAP/Ribosom-Komplexes (Menetret et al., 2005) und des Sec61/TRAP/OST/RNC-Komplexes erstellt werden (Abb. 7B). (Pfeffer et al., 2014).

Diese 3D-Rekonstruktionen ermöglichten wichtige Rückschlüsse auf die räumliche Anordnung und die zugrunde liegenden strukturellen Mechanismen in der Translokationsmaschinerie.

Neuere Studien deuten darauf hin, dass es sich bei dem Protein ERj1 auch um ein Protein der RAMP-Fraktion handelt und es sich bei ERj1 um ein weiteres Bestandteil der co-translationalen Translokationsmaschinerie handeln könnte (Zimmermann et al., 2011, Blau et al., 2005, Dudek et al., 2005). Dies wurde in dieser Arbeit näher untersucht (siehe 1.5.2, S.13).

Abb. 7 Darstellung von Bestandteilen der co-translationalen Translokationsmaschinerie (A) Schematische Darstellung des Sec61-RNC-Komplexes. Im Sec61-RNC-Komplex ist der Tunnelausgang des Ribosoms unmittelbar über dem Kanal von Sec61 positioniert (Beckmann et al., 1997). Durch die Interaktion zwischen Ribosom und Sec61 öffnet sich der Kanal und aufgrund der fortschreitenden Translation wird die naszierende Kette durch den Kanal in das ER-Lumen geschoben und dort freigesetzt (Park und Rapoport, 2012). Die Abbildung wurde von (Becker et al., 2009) übernommen und angepasst. NK: Naszierende Kette. (B) Darstellung der SP-Kryo-EM-Rekonstruktion des solubilierten Sec61/TRAP/OST/RNC-Komplexes (Pfeffer et al., 2014). Näheres siehe Text. Die Abbildung wurde von (Pfeffer et al., 2014) übernommen und angepasst.

1.5 ERj1 als potentieller Bestandteil der Translokationsmaschinerie

1.5.1 Das HSP70/HSP40 Netzwerk

Die 70 Kilo-Dalton (kDa) schweren Hitze Schock Proteine (HSP70) stellen eine zentrale Klasse von Chaperonen da, welche in ATP-Abhängigkeit bei der korrekten Faltung ungefalteter, fehlgefalteter und aggregierter Proteine helfen (Mayer, 2013).

Die Bindung erfolgt über kurze degenerierte, hydrophobe Motive, die durchschnittlich alle 40 AS in den Proteinen auftreten (Kampinga und Craig, 2010) und in korrekt gefalteten Proteinen nicht zugänglich sind (Mayer, 2013). Im ATP gebundenen Zustand weisen HSP70 eine hohe und im ADP gebundenen Zustand eine niedrige Assoziations- und Dissoziations-Rate für ungefaltete Peptide auf (ebd.). Die Peptidbindung beschleunigt die ATP-Hydrolyse (ebd.).

Die ATP-Hydrolyse und Peptidbindung der HSP70 wird durch Co-Chaperone reguliert (Meimaridou et al., 2009). Neben den Nukleotid-Austausch Faktoren (NEFs), welche die Austauschrate von ADP durch ATP erhöhen (Mayer, 2013), gehört die große Familie der 40 kDa schweren Hitze Schock Proteine (HSP40) ebenfalls zu den Co-Chaperonen (Meimaridou et al., 2009).

HSP40 binden über eine 70 AS lange konservierte J-Domäne an HSP70 (Meimaridou et al., 2009) und stimulieren deren ATP-Hydrolyse über ein konserviertes Motiv (HPD-Motiv) innerhalb der J-Domäne (Chevalier et al., 2000).

HSP40 erfüllen unterschiedliche Aufgaben, wie die Lieferung von ungefalteten Peptiden als Substrat (Abb. 8A) oder die Lokalisierung von HSP70 Proteinen an bestimmten Stellen der Zelle (Abb. 8B) (Kampinga und Craig, 2010, Mayer, 2013). Dadurch wird die HSP70 Maschinerie mit verschiedenen zellulären Aufgaben verknüpft (Meimaridou et al., 2009) und nimmt neben der Proteinfaltung auch weitere Aufgaben wahr wie zum Beispiel in der post-translationalen Translokation (Park und Rapoport, 2012): HSP70 Kar2p/HSP40 Sec63p in *S. cerevisiae* sowie HSP70 BiP/HSP 40 Sec63 in Säugern (siehe 1.4.2, S.10).

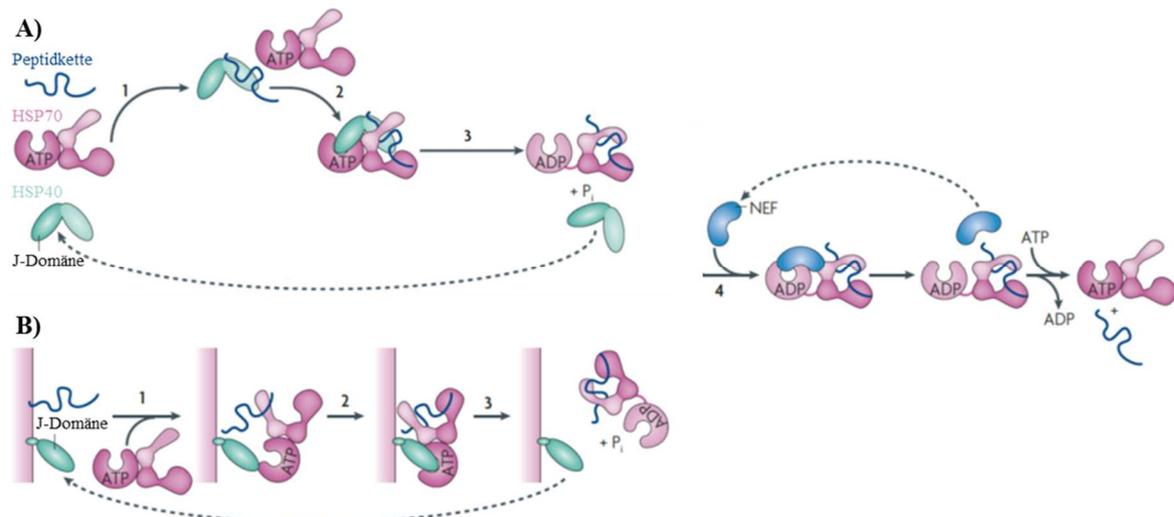


Abb. 8 Beispiele für HSP70/HSP40-Interaktion (A) HSP40 als Substratlieferant. Schritt 1: Die Peptidkette wird durch die Peptid-Bindungsdomäne von HSP 40 gebunden. Schritt 2: HSP40 bindet über die J-Domäne an HSP70-ATP. Das HPD-Motiv in der J-Domäne und die Peptidkette beschleunigen die Hydrolyse von ATP. Das HPD-Motiv beschleunigt die Hydrolyse bis um das 1000fache. Schritt 3: Das Peptid wird fest durch HSP70-ADP gebunden und das HSP40-Protein wird freigesetzt. Schritt 4: NEF bindet an HSP70-ADP und führt zur Freisetzung von ADP. ATP wird durch HSP70 gebunden. Aufgrund der niedrigen Affinität von HSP70-ATP für die Peptidkette, wird diese freigesetzt. Der Zyklus beginnt wieder von vorne, falls die Peptidkette noch nicht korrekt gefaltet ist. (B) Zelluläre Lokalisierung von HSP70 durch HSP40. Das HSP40 ist an eine bestimmte Stelle des Zellkompartiments gebunden und die lokale Konzentration somit stark erhöht. Dadurch kommt es zu einer effektiven Bindung und Hydrolyse von HSP70 und das durch HSP70-ATP schwach gebundene Peptid wird fest gebunden. Die lokale Konzentration von HSP70 wird durch die Bindung durch HSP40 ebenfalls erhöht. Schritt 3 und Schritt 4 sind gleich wie in (A). Die Abbildung wurde von (Kampinga und Craig, 2010) übernommen und angepasst.

1.5.2 Das HSP40 ERj1

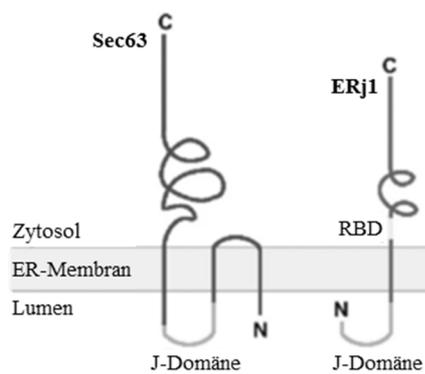


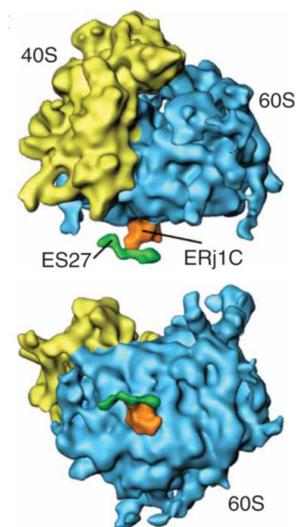
Abb. 9 Topologie von Sec63 und ERj1
Schematische Darstellung der Topologie von Sec63 und ERj1 in der ER-Membran (N=N-terminales Ende, C=C-terminales Ende). Die J-Domäne in Sec63 und ERj1 sowie die ribosomale Bindungsdomäne (RBD) in ERj1 sind farblich hervorgehoben. Die Abbildung und Beschriftung wurde von (Müller et al., 2010) übernommen und angepasst.

In Säugern existiert neben Sec63 das HSP40 ERj1¹ (ER-resident J-domain protein 1), welches eine teilweise Homologie zu Sec63 aufweist (Kroczyńska et al., 2004) und dessen Expression in *S. cerevisiae* die Inaktivierung des Gens von SEC63 komplementieren kann (ebd.).

Bei ERj1 handelt es sich um ein 64 kDa Type I Transmembran Protein des endoplasmatischen Retikulums mit einer einzelnen Transmembran-Helix (Dudek et al., 2005), welches wie Sec63 über die luminaire J-Domäne das HSP70 BiP binden kann (Abb. 9) (Dudek et al., 2002, Dudek et al., 2005, Benedix et al., 2010, Chevalier et al., 2000).

Neuere Experimente deuten darauf hin, dass Sec62p/Sec63p (in *S. cerevisiae*) und Sec63 (in Säugern) nicht nur eine Rolle in der post-transkriptionalen Translokation spielen, sondern auch eine Rolle in der co-translationalen Translokation bestimmter Proteine (Lang et al., 2012, Jung et al., 2014).

Auch ERj1 könnte eine Rolle in der co-translationalen Translokation spielen (Dudek et al., 2005). Erstens konnte gezeigt werden, dass ERj1 über eine zytoplasmische 17mer lange, positiv geladene ribosomale Bindungsdomäne an das Ribosom bindet (ebd.). Zweitens konnte anhand einer mithilfe der SP-Kryo-EM erstellten 3D-Rekonstruktion festgestellt werden, dass die Bindung von ERj1 anscheinend nahe am Tunnelausgang des Ribosoms erfolgt (Abb. 10) (Blau et al., 2005). Drittens wurden in Cross-Link Experimenten Cross-Links zwischen der naszierenden Kette und ERj1 erhalten (Dudek et al., 2005) und viertens konnte in *in vitro*-Translations-Assays gezeigt werden, dass ERj1 im nicht BiP gebundenen Zustand die Translation inhibiert, aber keine Inhibition im BiP gebundenen Zustand auftritt (ebd.). Dabei erfolgt die Inhibition über ein stark positiv geladenes Nonapeptid im zytoplasmischen Bereich von ERj1 (ebd.).

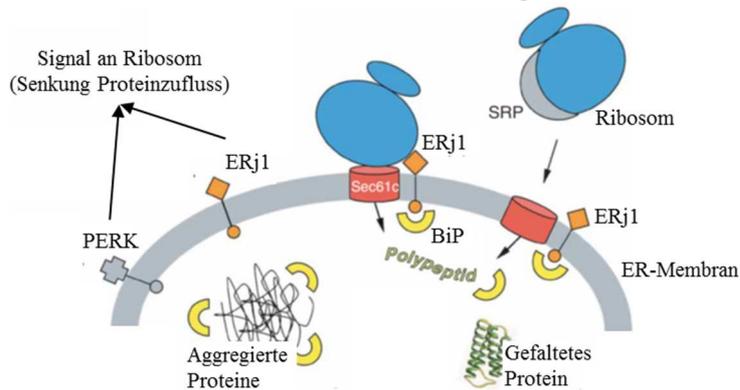


Aufgrund der experimentellen Ergebnisse scheint ERj1 eventuell eine regulatorische Funktion in der Proteintranslokation zu spielen (Abb. 11) (Dudek et al., 2005).

Abb. 10 Kryo-EM-Karte des ERj1C/Ribosom-Komplexes Die Kryo-EM-Karte wurde mit Hilfe der SP-Kryo-EM für eine *in vitro*-Rekonstitution eines C-terminalen Fragments von ERj1 (ERj1C, *H. sapiens*) am leeren 80S Ribosom (*C. l. familiaris*) erstellt (Blau et al., 2005). Das Fragment ERj1C besteht aus den Aminosäuren 173-467 von ERj1 und enthält die RBD (ebd.). Der luminaire Bereich und die TM-Domäne fehlen in ERj1C. Die Auflösung der Kryo-EM-Karte beträgt 20 Å (FSC_{0.5}) (ebd.) und ist aus zwei unterschiedlichen Blickwinkeln dargestellt. Die obere Abbildung zeigt die Seitenansicht auf das Ribosom und die untere Abbildung zeigt die Membran zugewandte Seite des Ribosoms. Dabei lassen sich beide Abbildungen durch eine 90 Grad-Rotation ineinander überführen. Neben der nicht-ribosomalen Extradichte für ERj1C ist eine Extradichte zu erkennen, bei der es sich eventuell um ES27 handelt (ebd.). Die Kryo-EM-Karte ist folgendermaßen eingefärbt: kleine ribosomale Untereinheit (gelb), große ribosomale Untereinheit (blau), ERj1C (orange) und ES27 (grün). Näheres siehe Text. Die Abbildung wurde von (Blau et al., 2005) übernommen.

¹ In dieser Arbeit wird der Nomenklatur der neueren Literatur gefolgt, durch welche die näher charakterisierten HSP40 im menschlichen ER systematisch erfasst werden sollen (Dudek et al., 2009). In der älteren Literatur wird das Protein ERj1 aufgrund seiner Entdeckung in einer Tumorzelllinie von Mäusen noch als Mtj1 (Murine tumor cell DnaJ-like Protein) bezeichnet (Brightman et al., 1995) sowie sein menschliches Homolog als Htj1 (Kroczyńska et al., 2004).

In der existierenden 3D-Rekonstruktion überlappen die Bindungsstellen von Sec61 und ERj1C am Ribosom und daher beeinflussen sich Sec61 und ERj1 eventuell in ihrer Bindung an das Ribosom (Blau et al., 2005). Allerdings ist die Auflösung der 3D-Rekonstruktion für eine



sichere Beurteilung der Bindungsstellen von ERj1C am Ribosom zu niedrig.

Daher wurde in dieser Arbeit versucht 3D-Rekonstruktionen des vollständigen Proteins von ERj1 alleine oder in Kombination mit Sec61 und/oder BiP am Ribosom bei hoher Auflösung zu generieren, um deren Interaktion zu untersuchen.

Abb. 11 Hypothetisches Modell über eine regulatorische Rolle von ERj1 in der Proteintranslokation Unter physiologischen Bedingungen rekrutiert ERj1 BiP an die Translokationsmaschinerie, um eventuell eine Unterstützung des Proteintransportes oder der Proteinfaltung durch BiP zu ermöglichen (Dudek et al., 2005). Beim Auftritt von ER-Stress fällt die Konzentration an freien BiP aufgrund der hohen Anzahl an ungefalteten Proteinen ab und ERj1 kann BiP nicht mehr binden (ebd.). Dadurch kommt es zu einer Inhibition der Translation durch ERj1 und somit zu einer Erniedrigung des Proteinzufusses in das ER-Lumen bis der physiologische Zustand im ER-Lumen wieder hergestellt ist (ebd.). Nach der Herstellung des physiologischen Zustands ist die Konzentration an freien BiP wieder hoch und kann durch ERj1 gebunden werden. Somit könnte eine Analogie zu dem PERK-Signalweg in der UPR bestehen (siehe 1.6.1, S.15), der bei ER-Stress vermutlich ebenfalls aufgrund einer niedrigen Konzentration an BiP aktiviert wird und zu einer Erniedrigung des Proteinzufusses in das ER-führt (ebd.). Die Abbildung wurde von (Dudek et al., 2005) übernommen.

1.6 Der XBP1u-RNC in der UPR

1.6.1 Überblick über die UPR

Übersteigt im sekretorischen Weg die Menge an ungefalteten Peptidketten im ER die Faltungskapazität des ERs, kommt es zu einer Störung des physiologischen Zustands im ER (ER-Stress) (Schröder und Kaufman, 2005, Ron und Walter, 2007, Bernales et al., 2006, Walter und Ron, 2011, Hetz, 2012). Um den physiologischen Zustand wieder herzustellen, erfolgt eine Aktivierung der „Unfolded Protein Response“ (UPR) (ebd.).

In der UPR wird erstens die Transkription und Translation von Proteinen im sekretorischen Weg herunterreguliert, um den Zufluss an ungefalteten Proteinen aus dem Zytosol zu senken (Schröder und Kaufman, 2005). Zweitens wird der Abbau von sich nur langsam faltenden oder fehlgefalteten Protein im ER-Lumen verstärkt (Smith et al., 2011) und drittens wird die Faltungskapazität des ERs durch die verstärkte Synthese von Chaperonen und Foldasen und einer Vergrößerung des ER-Kompartiments erhöht (Schröder und Kaufman, 2005).

In höheren Eukaryoten wird die UPR durch drei unterschiedliche Signalwege gesteuert, denen jeweils ein anderer Mechanismus der Signaltransduktion zu Grunde liegt (Walter und Ron, 2011): IRE1-, PERK-, und ATF6-Signalweg (Abb. 12).

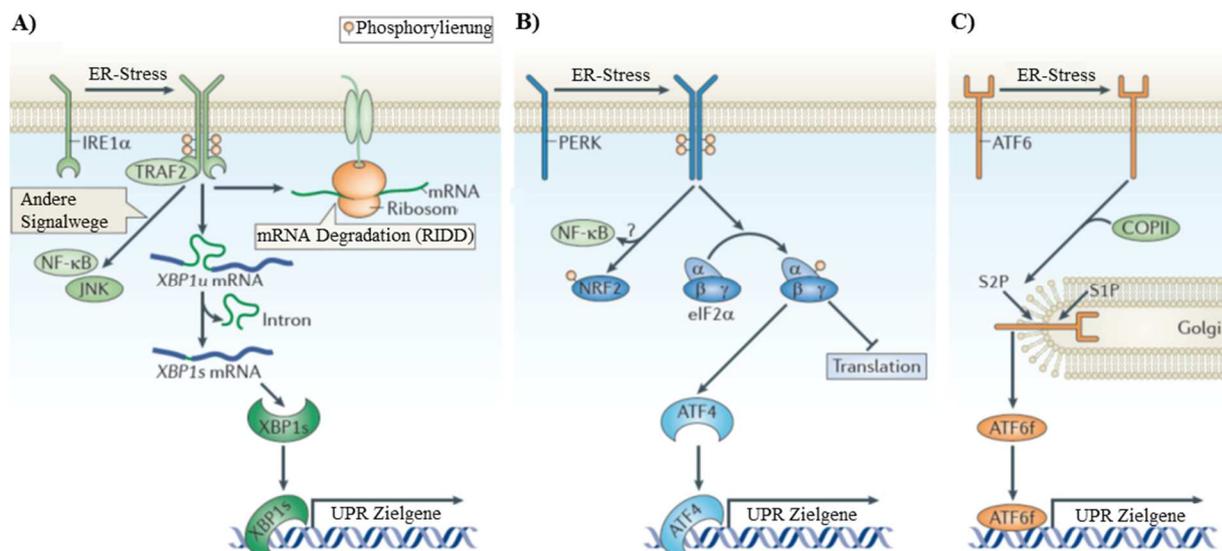


Abb. 12 Signaltransduktion in der eukaryotischen UPR. Bei der UPR erfolgt die Signaltransduktion vom ER-Lumen in das Zytosol über die in der ER-Membran sitzenden Stresssensoren IRE1α, PERK und ATF6. **(A)** IRE1-Signalweg. In Folge von ER-Stress kommt es zu einer Dimerisierung/Oligomerisierung und Autophosphorylierung von IRE1α. Dies führt zu einer Aktivierung der intrinsischen Ribonukleaseaktivität. In einem unkonventionellen Spleißvorgang wird ein Intron aus der mRNA von XBP1 (XBP1u mRNA) herausgeschnitten und das Translationsprodukt der gespleißten mRNA (mRNA XBP1s) dient als aktiver Transkriptionsfaktor (XBP1s) in der UPR (siehe 1.6.2, S.16). IRE1α reguliert auch die Degradation bestimmter mRNAs (RIDD) und aktiviert durch die Bindung von Adaptorproteinen wie zum Beispiel TRAF2 weitere Signalwege. **(B)** PERK-Signalweg. In Folge von ER-Stress kommt es zu einer Dimerisierung/Oligomerisierung und Autophosphorylierung von PERK. Die Autophosphorylierung führt zu einer Aktivierung der Kinaseaktivität von PERK. PERK phosphoryliert Ser51 der α-Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors-2 (eIF2α) und die Phosphorylierung führt zu einer Aktivitätsniedrigung von eIF2 (Ron und Walter, 2007). Dadurch kommt es zu einer globalen Reduzierung der Proteinsynthese (ebd.). Allerdings wird die Translation einiger Proteine wie zum Beispiel der Transkriptionsfaktor ATF4, welche kurze offene Leserahmen (ORF) oberhalb des Gen codierenden ORFs besitzen, durch die Phosphorylierung von eIF2α hochreguliert (Schröder und Kaufman, 2005). ATF4 reguliert unter anderem Gene, welche in der Autophagie und Apoptose involviert sind. **(C)** ATF6-Signalweg. Bei ER-Stress wird ATF6 aus der ER-Membran durch Interaktion mit dem COPII-Komplex in Transport-Vehikel gepackt und zum Golgi-Apparat transportiert (Walter und Ron, 2011). Dort werden durch die beiden Proteasen S1P und S2P die luminale Domäne und der Transmembrananker von ATF6 entfernt (ebd.). Das freigesetzte zytosolische Fragment (ATF6f) wandert in den Nucleus und wirkt dort als Transkriptionsfaktor (ebd.). ATF6 aktiviert unter anderem die Transkription der Chaperone BiP und GRP94, die im ER die Proteinen-Faltung unterstützen (ebd.). Die Abbildung wurde von (Hetz, 2012) übernommen und angepasst. Näheres siehe Text.

Alle drei Signalwege werden zwar unabhängig in der UPR aktiviert, stehen aber in intensiven Cross-Talk miteinander (Ron und Walter, 2007) und ermöglichen eine zeitversetzte Feinregulierung der UPR (Mori, 2009, Yoshida et al., 2003). Neben der zeitlichen wird auch eine zell-spezifische Feinregulierung durch die Existenz von Isoformen von ATF6 und IRE1 (IRE1 α und IRE1 β) ermöglicht (Mori, 2009).

Der Mechanismus der Aktivierung von IRE1, PERK und ATF6 bei ER-Stress wird kontrovers diskutiert (Ron und Walter, 2007).

Die Aktivierung könnte direkt erfolgen, indem ungefaltete Proteine gebunden werden oder indirekt durch eine fehlende Bindung von BiP (ebd.). Alle drei Proteine weisen Bindungsdomänen für BiP auf und während des ER-Stresses fällt die Konzentration an freien BiP ab (ebd.). Auch die Kombination beider Modelle wird diskutiert (ebd.).

In niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* existiert in der UPR nur der IRE1-Signalweg (Mori, 2009). Zum Beispiel ist PERK erst aus einem Gen-Shuffling zwischen IRE1 und der Proteinkinase GCN2 hervorgegangen (Mori, 2009).

1.6.2 XBP1u-RNC als Bestandteil des IRE1-Signalwegs

Unkonventioneller Spleißvorgang der Orthologe Hac1u und Xbp1u durch IRE1

Bei Auftreten von ER-Stress spleißt IRE1 aufgrund seiner aktivierten Ribonukleaseaktivität die mRNA von Hac1 (Hac1u) in *S. cerevisiae* (Sidrauski und Walter, 1997) und des Orthologs Xbp1²(Xbp1u) in höheren Eukaryoten wie *H. sapiens*, *Mus musculus* und *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Calfon et al., 2002, Yoshida et al., 2001). Die Enden des zu entfernenden Introns sind jeweils durch eine Haarnadelstruktur (Stem-Loop) flankiert, in welcher IRE1 schneidet (Abb. 13A)(Yoshida et al., 2001). Die Ligase Rlg1 fügt die Enden der gespleißten mRNA von Hac1 wieder zusammen (Sidrauski et al., 1996), im Falle von Xbp1 ist die Ligase nicht identifiziert.

Im Gegensatz zum Translationsprodukt (HAC1u, XBP1u) der nicht gespleißten mRNA (Hac1u, Xbp1u) handelt es sich bei dem Translationsprodukt (HAC1s, XBP1s) der gespleißten mRNA (Hac1s, Xbp1s) um den aktivierten Transkriptionsfaktor in der UPR (Abb. 13B) (Back et al., 2005).

Da es sich bei HAC1u bereits um einen schwachen Transkriptionsfaktor handelt, wenn auch um einen 10fach schwächeren als HAC1s (Mori et al., 2000), wird die Expression von HAC1u auf der Ebene der Translation durch die Ausbildung eines translationsarretierten RNC aufgrund einer Sekundärstruktur in der mRNA unterdrückt (Rüegsegger et al., 2001). Das Intron ist Bestandteil der Sekundärstruktur (ebd.). Durch die Entfernung des Introns wird die Sekundärstruktur aufgelöst, die Translation startet wieder und es wird das Translationsprodukt HAC1s erhalten (ebd.).

Bei XBP1u handelt es sich um keinen Transkriptionsfaktor, allerdings wurde, wie im Folgenden beschrieben, in Säugern gezeigt, dass für einen effizienten Spleißvorgang von Xbp1u die Ausbildung eines vorübergehend translations-arretierten RNC notwendig ist.

² Das Protein XBP1 (X-box binding protein 1) wurde erstmals als ein Protein identifiziert, welches an die „cis-acting X box“ in der Promoter Region des menschlichen „human major histocompatibility complex class II“ Gens bindet (Liou et al., 1990). Es ist unter anderem essentiell im hepatozyten Zellwachstum (Reimold et al., 2000) und der Differenzierung von Plasmazellen (Reimold et al., 2001).

Translationsarretierter XBP1u-RNC erforderlich für effizienten Spleißvorgang von Xbp1u

In Säugern wurde gezeigt, dass für einen effizienten Spleißvorgang von Xbp1u die mRNA über einen RNC (XBP1u-RNC), während der Translation von XBP1u, an der ER-Membran lokalisiert wird (Abb. 13C) (Yanagitani et al., 2009, Yanagitani et al., 2011).

Dabei ermöglicht eine hydrophobe, in Säugern evolutionär konservierte Sequenz (HR2) in der naszierenden Kette von XBP1u die Bindung an die ER-Membran (Yanagitani et al., 2009). Ein in der ER-Membran sitzender Rezeptor für die Lokalisierung von HR2 an der Membran konnte bis jetzt nicht identifiziert werden (Yanagitani et al., 2009), allerdings konnte in *in vitro*-Translations-Assays unter der Verwendung von künstlichen Lipiden gezeigt werden, dass HR2 wahrscheinlich direkt an die Membran binden kann (ebd.).

Da sich HR2 nur 53 AS vom C-terminalen Ende entfernt befindet (Yanagitani et al., 2011) und nur ca. 13 AS bis zur Beendigung der Translation verbleiben, sobald HR2 aus dem Tunnelausgang herausragt (Ito und Chiba, 2013), ist ein vorübergehender Translationsarrest notwendig, um vor Beendigung der Translation ausreichend Zeit für die Lokalisierung von XBP1u-RNC zu erhalten (Yanagitani et al., 2011). Der Translationsarrest erfolgt über eine in Wirbeltieren hochkonservierte Arrestsequenz von 14 AS am C-terminalen Ende der Peptidkette (Abb. 13C) (ebd.). Somit handelt es sich bei XBP1u um ein RAP (Ito und Chiba, 2013).

Eine Zielsetzung der Arbeit war es, eine 3D-Rekonstruktion des XBP1u-RNC zu generieren und daran wertvolle Erkenntnisse bezüglich des Translationsarrests zu gewinnen.

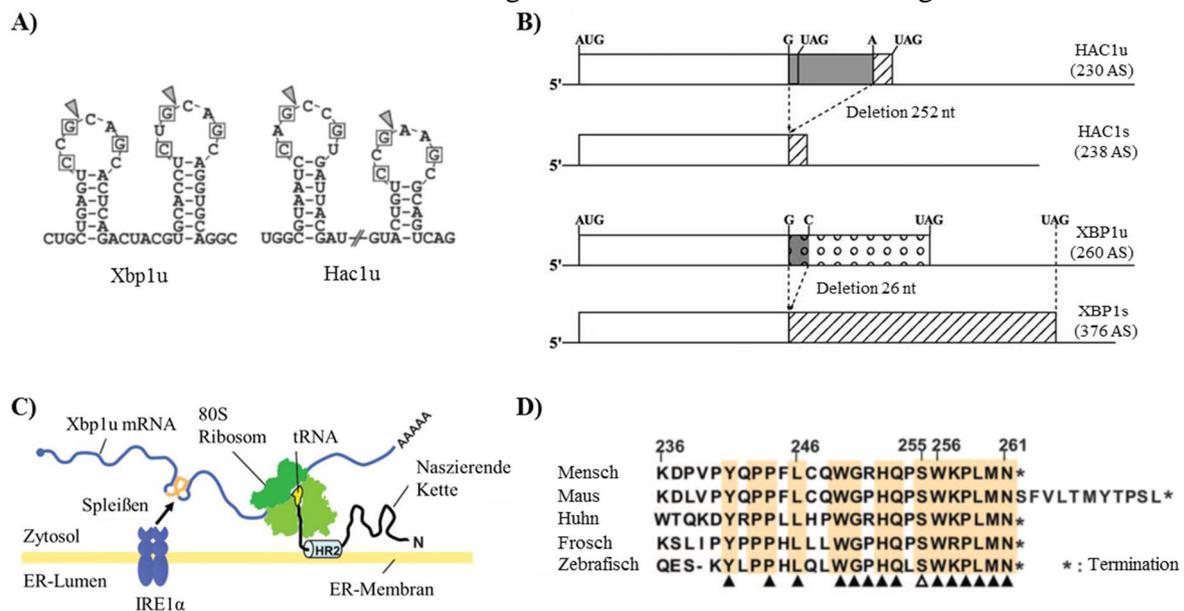


Abb. 13 Unkonventioneller Spleißvorgang der Orthologe Hac1u und Xbp1u durch IRE1 (A) Schematische Darstellung der Stem-loop Struktur in Xbp1u und Hac1u. Die für den Spleißvorgang durch IRE1 essentiellen und konservierten Nucleotide sind eingerahmt und die Schnittstellen durch Pfeile markiert. Das Intron in Hac1 ist aufgrund seiner Länge nicht vollständig dargestellt. Die Abbildung wurde von (Nagashima et al., 2011) übernommen und angepasst. (B) Schematische Darstellung der nicht gespleißten und gespleißten mRNA von Hac1 (*S. cerevisiae*) und Xbp1 (*H. sapiens*) sowie den korrespondierenden Protein codierenden Regionen. Im Falle von Hac1 wird durch die Entfernung des Introns (grau unterlegt) die letzten 10 AS des C-terminalen Endes von HAC1u gegen 18 neue AS (schraffierte Fläche) im C-terminalen Ende von HAC1s ausgetauscht (Mori et al., 2000). Im Falle von Xbp1 besitzt die mRNA zwei offene Leserahmen (ORF), die teilweise überlappen und nicht im gleichen Frame liegen (Yoshida et al., 2001). In Xbp1u wird der erste ORF translatiert und XBP1u erhalten (ebd.). Beim Spleißen des Introns (grau unterlegte Fläche), welches sich im überlappenden Bereich der ORFs befindet, kommt es zu einem Frameshift, aufgrund dessen der zweite ORF im Frame mit dem ersten ORF in Xbp1s liegt (ebd.). Dadurch werden bei der Translation von XBP1s die letzten 97 AS des C-terminalen Endes von XBP1u (Fläche mit Ringen) durch 212 neue AS des zweiten ORFs (gestreifte Fläche) ersetzt (ebd.). In dem neuen C-terminalen Bereichen von HAC1s/XBP1s (schraffierte Flächen) befindet sich eine aktivierende Domäne für die Transkription, daher handelt es sich bei HAC1s/XBP1s um den potentiellen Transkriptionsfaktor in der UPR (Mori et al., 2000, Yoshida et al., 2001). AUG und UAG markieren die START- und STOP-Codons. Bei den Nucleotiden G und A handelt es sich um die Schnittstellen in den Stem-Loops (siehe A). Des Weiteren ist die Länge der Introns sowie der Translationsprodukte angegeben. Näheres siehe Text. Die Abbildung wurde von (Back et al., 2005) übernommen und angepasst. (C) Schematische Darstellung des effizienten Spleißvorgangs von Xbp1u. Beschreibung siehe Text. Abbildung wurde von (Yanagitani et al., 2011) übernommen und angepasst. (D) Vergleich der C-terminalen Sequenzen von XBP1u in Wirbeltieren. Konservierte AS sind orange unterlegt. Durch schwarze Dreiecke sind die AS markiert, deren Mutation zu Alanin (Alaninscan) in XBP1u (*H. sapiens*) zu einer Verkürzung des Translationsarrestes führt und durch weiße Dreiecke AS, deren Mutation zu einer Verlängerung des Translationsarrestes führt. Die Positionsnummern der AS beziehen sich auf XBP1u (*H. sapiens*). Näheres siehe Text. Die Abbildung wurde von (Yanagitani et al., 2011) übernommen und angepasst.

2 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund seiner zentralen Bedeutung als „Fabrik“ der Proteinsynthese steht das Ribosom im Fokus der Forschung. Es war die Zielsetzung dieser Arbeit 3D-Rekonstruktionen verschiedener ribosomaler Komplexe mithilfe der SP-Kryo-EM zu generieren und anhand deren struktureller Informationen neue Erkenntnisse über die Funktionsweise des Ribosoms sowie der in Interaktion stehenden Proteine zu gewinnen. Im Rahmen der Arbeit wurden drei Projekte bearbeitet, die im Folgenden vorgestellt werden:

Projekt I: Modellbau des 80S Ribosoms (*P. falciparum*)

Bei Malaria tropica handelt es sich um die gefährlichste Variante der Malaria und sie wird durch den parasitären Erreger *P. falciparum* verursacht (White et al., 2014).

Anhand eines exakten Modells des 80S Ribosoms von *P. falciparum* wäre es möglich die Unterschiede zum 80S Ribosom des Menschen herauszuarbeiten und somit einen Beitrag zur Entwicklung spezifischer Antibiotika gegen das 80S Ribosom von *P. falciparum* zu liefern.

Daher ist die Zielsetzung dieses Projekts ein exaktes, molekulares Modell des 80S Ribosoms (A-Typ, *P. falciparum*) zu bauen und falls möglich potentielle Angriffspunkte für die spezifische Medikamentenentwicklung zu identifizieren.

Für den Bau des Modells soll erstmals im Labor die neue DED-Technologie eingesetzt werden, welche eine 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms bei fast atomarer Auflösung ermöglicht.

Des Weiteren soll für die Datensammlung ein Protokoll zur erfolgreichen Reinigung der 80S Ribosomen (*P. falciparum*) aus infizierten menschlichen Erythrozyten etabliert werden.

Projekt II: 3D-Rekonstruktionen ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1

In Säugern existiert neben Sec63 das ER-Membranprotein HSP40 ERj1³ (ER-resident J-domain protein 1), welches eine teilweise Homologie zu Sec63 aufweist (Kroczyńska et al., 2004). Wie Sec63 kann ERj1 über die luminaire J-Domäne das HSP70 BiP binden (Dudek et al., 2002, Dudek et al., 2005, Benedix et al., 2010, Chevalier et al., 2000). Interessanterweise kann ERj1 im Gegensatz zu Sec63 über eine zytosolische, ribosomale Bindungsdomäne auch an das Ribosom binden (Dudek et al., 2005). Verschiedene Experimente deuten dabei darauf hin, dass ERj1 wie Sec63 eine Rolle in der Proteintranslokation spielt (ebd.). Zum Beispiel inhibiert ERj1 in *in vitro*-Translations-Assays die Translation in Abwesenheit von BiP (ebd.).

Bis jetzt existiert nur eine 3D-Rekonstruktion eines zytosolischen Fragments von ERj1 am 80S Ribosom, welche zeigt, dass ERj1 anscheinend nahe am Tunnelausgang bindet und die Bindungsstelle mit der von Sec61 überlappen könnte (Blau et al., 2005). Allerdings ist eine eindeutige Interpretation aufgrund der niedrigen Auflösung von 20 Å nicht möglich.

³ In dieser Arbeit wird der Nomenklatur der neueren Literatur gefolgt, durch welche die näher charakterisierten HSP40 im menschlichen ER systematisch erfasst werden sollen (Dudek et al., 2009). In der älteren Literatur wird das Protein ERj1 aufgrund seiner Entdeckung in einer Tumorzelllinie von Mäusen noch als Mtj1 (Murine tumor cell DnaJ-like Protein) bezeichnet (Brightman et al., 1995) sowie sein menschliches Homolog als Htj1 (Kroczyńska et al., 2004).

Aufgrund dieser geringen strukturellen Kenntnisse ist es Ziel dieses Projekts die Interaktion von ERj1 mit dem 80S Ribosom, BiP und Sec61 auf struktureller Ebene näher zu untersuchen. Hierfür soll ein Protokoll für die erfolgreiche *in vitro*-Rekonstitution verschiedener ribosomaler Komplexe etabliert werden: Ligand ERj1 am Ribosom (dimerer Komplex), Ligand ERj1 und Sec61 am Ribosom (tertiärer Komplex) und Ligand ERj1, Sec61 und BiP am Ribosom (quartärer Komplex).

Anhand der *in vitro*-Rekonstitutionen soll zuerst in Bindungs-Tests festgestellt werden, ob sich Sec61 und ERj1 in ihrer Bindung an das Ribosom beeinflussen und die Bindung von BiP an ERj1 darauf einen Einfluss hat.

Anschließend sollen 3D-Rekonstruktionen der erfolgreichen *in vitro*-Rekonstitutionen bei hoher Auflösung erstellt werden, um die Bindungs- und Interaktionsstellen zwischen den Interaktionspartnern auf struktureller Ebene zu identifizieren. Diese ermöglichen eventuell Rückschlüsse auf die strukturelle Rolle von ERj1 in der Proteintranslokation.

Projekt III: 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC

In Säugern wird die konstitutiv exprimierte mRNA des Proteins XBP1u im Zuge der UPR durch das aktivierte ER-Membranprotein IRE1 α gespleißt und das Translationsprodukt XBP1s der gespleißten mRNA stellt einen aktiven Transkriptionsfaktor in der UPR dar (Yoshida et al., 2001).

In Säugern konnte gezeigt werden, dass die für den Spleiß-Vorgang notwendige Lokalisierung von Xbp1u (*H. sapiens*, hXbp1u) an der ER-Membran über eine hydrophobe Region (HR2) in der naszierenden Kette eines XBP1u translationsarretierten RNC erfolgt (hXBP1u-RNC (Yanagitani et al., 2011, Yanagitani et al., 2009).

Bis jetzt existieren keine strukturellen Daten von XBP1u-RNC, anhand deren der Mechanismus des Translationsarrests hergeleitet werden könnte.

Daher ist es die Zielsetzung dieser Arbeit eine 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC unter Nutzung der SP-Kryo-EM durchzuführen.

Anhand der 3D-Struktur sollen grundlegende strukturelle Merkmale des hXBP1-RNC herausgearbeitet werden, welche für den Mechanismus des Translationsarrests relevant sind.

Falls möglich soll anhand der Merkmale ein Modell über den strukturellen Mechanismus des Translationsarrests in hXBP1u-RNC aufgestellt werden.

Ein Protokoll für die Generierung der gereinigten RNC ist ebenfalls zu etablieren. Dabei soll für die *in vitro* Generierung ein Konstrukt mit der Translationsarrest-verstärkenden Mutation S255A in der Arrestsequenz von XBP1u erfolgen (Yanagitani et al., 2011). Dies gewährleistet eine höhere Stabilität des RNC.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob der Mechanismus der Lokalisierung über einen RNC in Säugern im Reich der Tiere konserviert ist.

Hierfür soll unter anderem geprüft werden, ob sich *in vitro* ebenfalls ein XBP1-RNC in *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*, fXBP1-RNC) erzeugen lässt.

3 Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Invitrogen, Merck, Sigma-Aldrich, Roth und VWR bezogen, außer es wurde explizit ein anderer Hersteller angegeben. Digitonin wurde von Calbiochem bezogen.

3.1 Stämme und Vektoren

Zur Transformation und Amplifizierung von Plasmiden wurde der *E. coli* Stamm XL1-blue (Stratagen) eingesetzt. Der Genotyp ist *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F' proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]. In Tabelle 1 sind die eingesetzten Vektoren aufgelistet.

Vektoren	Anmerkungen
pCR2.1-TOPO	Geliefert mit TOPO-Klonierungs-Kit, Hersteller Invitrogen.
Plasmid LD42070	Bezogen über das „Drosophila Genomics Resource Center“. Enthält die cDNA für Xbp1-RD (Bezeichnung für das Ortholog Xbp1u in <i>D. melanogaster</i>).
pBSII-SK(-)-F-Xbp1u-S255A-H	Bezogen durch den Kooperationspartner Arbeitskreis Kohno (Nara Institute of Science and Technology). Vektorrückgrat pBlueScript2-SK(-). Enthält die cDNA von Xbp1u (<i>H. sapiens</i>) mit der Mutation S255A (Austausch Serin gegen Alanin an der Position 255 in der cDNA). Die cDNA ist N-terminal mit FLAG-Tag und C-terminal mit HA-Tag fusioniert.
pCR2.1-fXbp1u	Durch TOPO-Klonierung von PCR-Produkt fXbp1u in Vektor pCR2.1-TOPO hergestellt. Enthält die cDNA für Xbp1u (<i>D. melanogaster</i>). Die cDNA ist N-terminal mit His ₈ - und FLAG- sowie C-terminal mit HA-Tag fusioniert.

Tabelle 1 Auflistung der eingesetzten Vektoren. In der Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sowie zugehörige Anmerkungen aufgelistet.

3.2 Generelle Methoden der Biochemie

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reinigung PCR-Produkte

Doppelsträngige DNA-Fragmente (PCR-Produkte) wurden unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) generiert und amplifiziert.

Für die PCR wurde der Phusion Flash High-Fidelity Master Mix von der Firma New England BioLabs (NEB) verwendet und die PCR nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 0.1 ng/μl des Plasmid-Templates und je 5 pmol/μl des zugehörigen 5'- und 3'-Primers eingesetzt. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit der Länge des PCR-Produkts und die Annealing-Temperatur in Abhängigkeit der eingesetzten Primer bestimmt. Hierbei wurde den Empfehlungen des Herstellers der Polymerase (NEB) gefolgt.

Die PCR-Produkte wurden mithilfe des „QIAquick PCR purification Kit“ (Quiagen) anhand des zugehörigen Protokoll des Herstellers gereinigt und mit dem im Kit enthaltenen EB-Puffer eluiert.

Die eingesetzten PCR-Templates, Primer und der Verwendungszweck der PCR-Produkte in dieser Arbeit sind in der Tabelle 2 aufgelistet. Die Primer wurden durch die Firma Metabion synthetisiert.

Die Generierung des PCR-Produktes für die Klonierung des Vektors pCR2.1-fXbp1u erfolgte in einer PCR. Als Template diente das Plasmid LD42070.

Name Primer	Primer-Sequenz (5'-3')	Template für PCR	Verwendungszweck
fXbp1_topo_vor	ACCAAACAAAACAAATAAAAC AAAAACAACATG <u>CATCACCAC</u> <u>ATCACCAGCATCA</u> GAATTC GACTACAAGGACGACGATGAC AAGGCACCCACAGCAAACACA GT	Plasmid LD42070	Herstellung des PCR-Produkts fXbp1u für die Generierung des Vektors pCR2.1-fXbp1u via TOPO-Klonierung.
fXbp1_topo_rück	TGTGCGACGTTGTCACACTTTT CAAGATCCAGCGTAATCTGGG ACATCGTATGGGTAGGCCATT AGCTCTATGCCCG	Plasmid LD42070	Herstellung des PCR-Produkts fXbp1u für die Generierung des Vektors pCR2.1-fXbp1u via TOPO-Klonierung
hXbp1_rück	TATAGGATCCCGAAAAGTCGA CTC	pBSII-SK(-)-F-Xbp1u-S255A-H	Herstellung des PCR-Produkts für die <i>in vitro</i> -Transkription der mRNA für hXBP1u-S255A (hXbp1u-S255A). hXbp1u-S255A wurde als mRNA-Konstrukt für die <i>in vitro</i> -Translation verwendet.
hXbp1_vor	<u>TAATACGACTCACTATAGGGA</u> GAATG <u>CATCACCACCATCAC</u> <u>CCATCAC</u> GAATTC <u>GACTACA</u> <u>AGGACGACGATGA</u>	pBSII-SK(-)-F-Xbp1u-S255A-H pCR2.1-fXbp1u	Herstellung der PCR-Produkte für die <i>in vitro</i> -Transkriptionen von hXbp1u-S255A und fXbp1u. Beide mRNA-Konstrukte wurden für die <i>in vitro</i> -Translation verwendet.
polyA_70_rück	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT AAGATCCAGCGTAATCTGGAA CATCGTATG	pCR2.1-fXbp1u	PCR-Produkt für die <i>in vitro</i> -Transkription von fXbp1u. fXbp1u wurde als mRNA-Konstrukt für die <i>in vitro</i> -Translation eingesetzt.

Tabelle 2 Auflistung der eingesetzten Primer, der PCR-Templates und der Verwendungszwecke der PCR-Produkte. In dieser Tabelle sind die eingesetzten Primer in dieser Arbeit aufgeführt. Des Weiteren sind die zugehörigen Sequenzen der Primer, die PCR-Templates und der Verwendungszweck der PCR-Produkte aufgelistet. Die Primer mit der Bezeichnung „_vor“ (vorwärts) erzeugen den codogenen Strang des PCR-Fragments und die Primer mit der Bezeichnung „_rück“ (rückwärts) den zugehörigen Gegenstrang. Das Programm für die PCR wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers für den Phusion Flash High-Fidelity Master Mix (NEB) gewählt. Bei dem unterstrichenen Bereich der Primer-Sequenz handelt es sich um den Template überlappenden Bereich und die Farbcodierung zeigt funktionale Sequenzen an: FLAG-Tag, His-Tag, HA-Tag, T7-Promoter.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Länge und Reinheit von DNA- und mRNA-Fragmenten wurde mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Hierfür wurde das PerfectBlue Gelsystem Mini (Peqlab) und 1%ige Agarose-Gele verwendet (1% Agarose, 40 mM Tris/HCl pH 8.0, 40 mM Tris/HCl pH 8.0, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA).

Es wurden 100-200 ng je Probe geladen. Die Proben wurden vor der Gelbeladung mit 6 × Gel Loading Dye (NEB) und GelRed™ (Biotium) entsprechend den Herstellerangaben versetzt. Die Laufzeit für eine ausreichende Bandenauftrennung im Laufpuffer (derselbe Puffer, der für die Agarose-Gele eingesetzt wurde) betrug 25-40 min bei 110V. Als Längenstandard wurden der 100bp und 1kb DNA ladder Plus der Firma NEB eingesetzt. Die Gele wurden bei einer Wellenlänge von 300 nm ausgewertet und digitalisiert (Intas Gel Dokumentation-System).

3.2.3 Proteinfällung (TCA)

Mithilfe der Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung) wurden Proteine aus Lösungen gefällt, deren Lösungsvolumina für eine Auftragung auf einem SDS-PAGE zu groß waren (siehe 3.2.4, S.22). Hierfür wurde die Proteinlösung mit Wasser auf ein Volumen von 800 µl verdünnt, 100 µl 0.15% Natriumdesoxycholat und 100 µl 72% Trichloressigsäure zugegeben, gevortext und für mind. 30 min bei -20 Grad inkubiert. Anschließend wurden die Proteine pelletiert (20,000 x g, 30 min, 4 Grad, Zentrifuge 5417 R Eppendorf) und das Pellet mit 1 ml Aceton (-20 Grad) gewaschen, getrocknet und in 10-20 µl 1x Proben-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin und 100 mM DTT) resuspendiert.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die Technik des SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach (Laemmli, 1970) eingesetzt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt, so dass im finalen Volumen Pufferbedingungen von mind. 100 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin und 100 mM DTT vorlagen.

Die Proben wurden auf ein denaturierendes 15% SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und die Elektrophorese erfolgte bei 200V für 45-60 min in einer Mini-Protean II Elektrophoresezelle (Bio-Rad). Der eingesetzte Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0.1 % SDS.

Als Größenstandard wurde der PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) und der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) eingesetzt.

3.2.5 Coomassie-Färbung SDS-Gele

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel durch Verwendung einer Coomassie-Färbelösung (0.25% (w/v) Coomassie Blue R 250, 50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) fixiert und eingefärbt. Die überschüssige Einfärbung des Gels wurde durch mehrere Waschstschritte mit einer Entfärbelösung (40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) entfernt und das Gel anschließend mithilfe eines Standard-Scanners digitalisiert.

3.2.6 Western Blot und Immunfärbung

Unter Nutzung der Technik des Western Blots sowie anschließender Immunfärbung konnten Proteine in Proben qualitativ nachgewiesen werden.

Hierfür wurden die Proteine in der Probe anhand eines SDS-PAGES aufgetrennt und anschließend mithilfe der Semi-Dry-Technik von dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (GE Healthcare) transferiert. Es wurde eine Semi-Dry-Apparatur (BioRad) und als Blottingpuffer 20% (v/v) Methanol, 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.037% (w/v) SDS eingesetzt. Die Blottingzeit betrug 50 min bei 75 mA pro Gel.

Der Proteintransfer wurde durch eine Membranfärbung mit einer Amid-Black-Lösung (0.1% (w/v) Amidoschwarz 10B, 7.5% (v/v) Essigsäure, 20% (v/v) Ethanol) kontrolliert.

Je nach Protein wurden unterschiedliche Antikörper für die Immunfärbung eingesetzt.

Für Proteine mit FLAG-Tag wurde der Peroxidase konjugierte monoklonale Antikörper ANTI-FLAG M2[®] (SIGMA) eingesetzt. Dabei wurde für die Immunfärbung dem Protokoll des Herstellers gefolgt. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

Für die Immunfärbung von Proteinen mit HA-Tag wurde die Membran 30 min in 5% Milchpulver, 1xTBS geblockt, die Membran 1 Stunde bei RT mit dem primären Antikörper „HA-probe Antikörper (F-7)“ (Santa Cruz Biotechnology) im Verhältnis 1:1000 in 2% BSA, 1xTBS inkubiert und 2x mit 1xTBS und 1x mit 1xTBS, 0.1% Tween für je 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper „goat anti-mouse IgG-HRP“ (Santa Cruz Biotechnology) in einem Verhältnis von 1:200 in 5% Milchpulver, 1xTBS für eine Stunde bei 4 Grad. Abschließend wurde die Membran 3x mit 1xTBS, 0.1% Tween für je 10 min gewaschen.

Die Visualisierung der durchgeführten Immunfärbungen erfolgte unter Verwendung des Chemiluminescent Detection Kit (AppliChem) und einem fluorographischen Film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) nach den Angaben des Herstellers. Für die Entwicklung des Fotofilms wurde der Kodak Xomat M35 (Kodak) genutzt.

3.2.7 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte unter Verwendung des Nanodrop 1000 Spektrometers (Thermo Scientific) bei A_{260} .

Die Konzentrationsbestimmung von Ribosomen und Proteinen erfolgte unter Verwendung des Eppendorf BioPhotometer bei A_{260} und A_{280} . Dabei wurde die Konzentration der Ribosomen unter der Näherung berechnet, dass $A_{260}=1$ ungefähr 20 pmol 80S Ribosomen entsprechen.

3.3 Klonierung und Amplifikation der Plasmid-DNA

Die Amplifizierung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide erfolgte in Zellen des *E. coli* Stamms XL1-blue (siehe 3.1, S.20).

3.3.1 Medium (*E. Coli*)

Die *E. coli* Zellen wurden im flüssigen LB-Medium hochgezogen oder auf LB-Platten kultiviert. Das LB Medium besteht aus 10 g/l Bacto™ Peptone (BD Bionutrients), 10 g/l NaCl, 5 g/l Bacto™ Yeast Extract (BD Bionutrients). Im Falle von LB-Platten wurde dem LB-Medium noch 15g/l Bacto™ Agar (BD Bionutrients) zugesetzt. Das Medium wurde bei 121 Grad für 20 min autoklaviert. Die Platten wurden bei ausreichender Abkühlung gegossen und im Kühlraum bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Falls benötigt wurde vor dem Gießen der Platten Ampicillin (amp) in einer Konzentration von 100 µg/ml zugeben und anschließend die Platten gegossen (LB+amp). Ebenso wurde falls benötigt dem LB-Mediums Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml kurz vor der Verwendung des Mediums zugegeben (LB+amp).

3.3.2 Klonierung der Vektoren (TOPO®-Klonierung)

Für die Klonierung des Vektors pCR2.1-fXbp1u wurde das TOPO® TA Cloning® Kit mit dem Vektor PCR®2.1 TOPO® eingesetzt. Dabei wurde dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

Die zu klonierenden PCR-Fragmente wurden mithilfe der PCR generiert (siehe 3.2.1, S.20). Der benötigte A-Überhang des PCR-Fragments für die TOPO-Klonierung wurde durch die Zugabe einer Taq-Polymerase (NEB) nach der PCR und anschließender Inkubation für 10 min bei 72 Grad erzeugt. Für die TOPO-Klonierung wurden 5 µl der PCR eingesetzt.

3.3.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente Zellen des *E. coli* Stamms XL1-blue. Um die *E. coli* Zellen kompetent zu machen, wurde eine 1:200 Verdünnung der Zellen in LB zu einer $OD_{600}=0.6$ bei 37 Grad im Schüttler herangezogen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis für 15 min gekühlt und pelletiert. Die Zellen wurden in 0.1 M $CaCl_2$ resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, erneut pelletiert und in 0.1 M $CaCl_2$, 15% Glycerin resuspendiert. Anschließend wurden die chemisch kompetenten Zellen aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 Grad gelagert.

Für die Transformation wurden zu 2 µl des TOPO-Klonierung-Ansatzes oder 1 µl Plasmid-DNA (Retransformation) 50 µl auf Eis aufgetaute chemisch kompetente Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einem Hitzeschock bei 42 Grad für 45 Sekunden ausgesetzt, zwei Minuten auf Eis gekühlt, 1 ml LB (37 Grad) zugegeben und 45 min bei 37 Grad unter Schütteln (600 rpm) inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf).

Abschließend wurden 100-200 µl der transformierten Zellen auf LB-Platten+amp ausplattiert und über Nacht bei 37 Grad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die erhaltenen Kolonien mithilfe der Kolonie-PCR (siehe 3.3.4, S.24) überprüft. Im Falle einer Retransformation wurde auf eine Kolonie-PCR verzichtet.

3.3.4 Kolonie-PCR

Mithilfe der Kolonie-PCR wurde die korrekte Klonierung der Plasmide überprüft. Die Kolonie-PCR erfolgte unter Verwendung der Taq DNA Polymerase (NEB).

Für die Kolonie-PCR wurden Einzel-Kolonien der Transformation mit einem sterilen Zahnstocher gepickt, jeweils in 20 µl PCR-Mix (Taq-Standardpuffer (NEB), Primer) gelöst und die Zellen anschließend für 5 min bei 95 Grad aufgebrochen. Abschließend wurden dem Protokoll des Herstellers folgend die Taq DNA Polymerase zugegeben und eine PCR durchgeführt.

Als Primer für die Kolonie-PCR wurden die gleichen Primer für die Generierung des PCR-Fragments für die Klonierung verwendet (siehe *Tabelle 2*), da die Orientierung des PCR-Fragments im Vektor nicht relevant war. Die Analyse der Kolonie-PCR erfolgte anhand eines Agarosegels und aus Kolonien mit einem PCR-Fragment korrekter Länge wurde die Plasmid-DNA für eine Sequenzierung isoliert.

3.3.5 Isolation und Sequenzierung Plasmid-DNA

Eine mittels Kolonie-PCR verifizierte *E. Coli* Kolonie mit korrektem Klon wurde gepickt und mit 10 ml LB+amp angeimpft und bei 37 Grad über Nacht inkubiert. Im Falle einer Retransformation wurde eine beliebige Kolonie von der Platte gepickt.

Am Morgen des nächsten Tages wurde dem Herstellerprotokoll folgend die Plasmid-DNA mithilfe des QIAprep®Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert.

Im Falle einer Retransformation erfolgte bei einer größeren Menge an benötigter Plasmid-DNA die Isolierung mithilfe des Plasmid Midi Kit (Qiagen). Hierfür wurde eine Vorkultur von 100 ml am Abend zuvor angeimpft.

1,5 µg Plasmid-DNA wurden entsprechend den Vorgaben der Firma Eurofins MWG vorbereitet und dieser zur Sequenzierung zugeschickt.

3.4 RNC-Gewinnung

3.4.1 Herstellung Translationsextrakt (*T. aestivum*)

Die Herstellung der Translationsextrakte (Weizenkeim, *T. aestivum*) orientierte sich am Protokoll von (Erickson und Blobel, 1983) und ist im Labor etabliert.

Die Weizenkeime wurden zu einem Chlorform/Cyclohexan-Gemisch (Verhältnis 100:6) gegeben. Die intakten Weizenkeime flotierten an der Oberfläche und wurden mit einem Sieb abgefischt, bei RT im Abzug getrocknet, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 Grad bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

Alle weiteren Schritte erfolgten im Kühlraum. 2,5 g der gefrorenen Zellen wurden in einem immer wieder mit flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser zu feinem Pulver zerrieben, in ein Falcon überführt, mit 3,5 ml 2x Homogenisierungspuffer (40 mM HEPES/KOH pH 7.6, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 2 mM CaCl₂, 4 mM DTT, 0.15 Pille/ml, 0.4U/µl RNAsin) versetzt und solange gevortext bis eine zähe Paste (Homogenisat) entstand.

Eine gute Kühlung bei der Herstellung des Pulvers und eine zügige Weiterverarbeitung zum Homogenisat waren entscheidend für die spätere Aktivität des Translationsextraktes. Anschließend wurde das Homogenisat zentrifugiert (20,000 rpm, 15 min, Sorvall SS34) und der Überstand erneut zentrifugiert (30,000 rpm, 30 min, TLA110). 2,5 ml des Überstands wurden auf eine mit 5 ml 1x Homogenisierungspuffer (2x Homogenisierungspuffer im gleichen Volumen mit Wasser verdünnt) äquilibrierte PD10 Säule (GE Healthcare) überführt. Anschließend wurde mit 2,5 ml 1x Homogenisierungspuffer eluiert und das Eluat mit 1x Homogenisierungspuffer auf 200 A₂₆₀/ml verdünnt. Der erhaltene Translationsextrakt wurde aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zu seiner Verwendung bei -80 Grad gelagert.

3.4.2 *In vitro*-Transkription (Herstellung mRNA-Konstrukte)

Die Herstellung gecappter mRNA-Konstrukte für die *in vitro*-Translation erfolgte unter Verwendung des „mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kits“ (Ambion®) nach dem Kit beiliegendem Protokoll. Für einen 20 µl Ansatz wurden 0,1 µg gereinigtes PCR-Produkt als Template eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 30 Grad wurde die mRNA mit der LiCl-Lösung gefällt und in RNA-freien Wasser resuspendiert.

3.4.3 Herstellung RNCs via *in vitro*-Translation

Herstellung RNCs (*Oryctolagus cuniculus*):

Die Herstellung der RNCs (*Oryctolagus cuniculus*, *O. cuniculus*) erfolgte unter Einsatz des *in vitro*-Translations-Kits „Rabbit Reticulocyte Lysate System“ (Promega) nach dem Kit beiliegendem Protokoll. Als mRNA Konstrukt für die Generierung von hXBP1-RNC wurde das mRNA-Konstrukt hXbp1u-S255A eingesetzt und für die Generierung von DP120-RNC das mRNA-Konstrukt DP120. Die Angaben bezüglich der eingesetzten mRNA-Konzentrationen und den Inkubationszeiten sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Herstellung RNCs (*D. melanogaster*):

Die Herstellung der RNCs erfolgte nach einem im Labor durch Doktor Andreas Anger etablierten Protokoll. Die für die *in vitro*-Translation benötigten embryonalen Zellextrakte (*D. Melanogaster*) wurden durch Andreas Anger im Labor freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Der *in vitro*-Translations-Ansatz wurde auf Eis angesetzt und enthielt neben der mRNA 24 mM HEPES/KOH pH 7.5, 80 ng/µl Creatine Kinase, 16.8 mM Creatine Phosphatase, 0.6 mM Mg(OAc)₂, 80 mM KOAc und 40% (v/v) embryonalen Zellextrakt. Die *in vitro*-Translation erfolgte durch Inkubation des Ansatzes bei 25 Grad. Als mRNA Konstrukt für die Generierung von fXBP1-RNC wurde das mRNA-Konstrukt. Die Angaben bezüglich der Inkubationszeit und der eingesetzten mRNA-Konzentrationen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Herstellung RNCs (*T. aestivum*):

Die Herstellung der DP120-RNCs erfolgte durch die Inkubation des *in vitro*-Translationsansatzes (50% (v/v) Weizenkeimextrakt, 14 mM HEPES/KOH pH 7.6, 75 mM KOAc, 1,25 mM Mg(OAc)₂, 2 mM DTT, 1,25 mM ATP, 0,25 mM GTP, 16 mM Kreatin Phosphatase, 0,45 µg/µl Kreatin Kinase, 50 ng/µl tRNA (Roche), 0,4 mM Spermidin, 0,1 mM Aminosäuren-Mixtur (Promega), 0,15 U /µl RNAsin, und 10 ng/µl mRNA DP120) für 60 min bei 30 Grad. Die Translation wurde durch die Zugabe von 0,2 µg/µl Cycloheximid gestoppt.

3.4.4 Reinigung von RNCs nach dem Standard-Protokoll im Labor

Die Reinigung von DP120-RNCs (*T. aestivum*) wurde nach dem Standardprotokoll ausgeführt. Dabei erfolgte die Reinigung aus 800 µl Weizenkeimextrakt.

Die Reinigung von hXBP1-RNC (*O. cuniculus*) und fXBP1u-RNC (*D. melanogaster*) erfolgte anfangs auch nach dem Standardprotokoll, bis festgestellt wurde, dass starke Aggregationen bei der Reinigung erhalten wurden. Dabei erfolgte die Reinigung aus 850 µl Translationsextrakt im Falle von fXBP1-RNC und 440 µl im Falle von hXBP1-RNC.

Während der Reinigung wurden Aliquots entnommen, um den Verlauf der Reinigung mithilfe eines Western Blots zu prüfen. An den betreffenden Stellen ist die Bezeichnung des Aliquots sowie das Verhältnis des entnommenen Volumens zum Gesamtvolumen des Translationsansatzes angegeben.

Nach der Inkubation des Translationsansatzes wurde die *in vitro*-Translation durch die Zugabe von 20 µl Cycloheximid (Konz. 10 mg/ml) gestoppt (Aliquot T: 1/200).

Anschließend wurde der Translationsextrakt auf ein 1 ml Saccharose-Kissen (1M Saccharose in Puffer A) geladen und zentrifugiert (100 krpm, 50 min, 4 Grad, TLA110). Dabei wurde der Translationsextrakt auf mehrere Saccharose-Kissen aufgeteilt. Im Falle des Translationsextraktes von *O. cuniculus* und *D. melanogaster* wurden pro Kissen 200 µl geladen und im Falle von *T. aestivum* 400 µl pro Kissen.

Die ribosomalen Pellets wurden in einen Volumen von insgesamt 1000 µl Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7.0, 250 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 250 mM Saccharose, 0,1% Nikkol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 10 µg/ml Cycloheximid, 0,1% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill (Boehringer), 0,2 U/µl RNAsin) durch gelegentliches Auf- und Abpipettieren für 45 min resuspendiert. Vom Überstand der Zentrifugation und dem resuspendierten Pellet wurden Aliquots entnommen (Aliquot SNI u. PI: 1/200). Alle folgenden Zentrifugations- und Resuspensionsschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben wie zuvor beschrieben.

Es wurde eine Polyprep-Chromatographiesäule (BioRad) mit 750 µl Talon®Metal Affinity Resin (Clontech) beschickt, mit 5 ml tRNA-Puffer (10 µg/ml tRNA in Puffer A ohne RNAsin) gewaschen, die Säule mit der Resuspension beladen und anschließend für 5 min bei Über-Kopf-Rotation auf einem Drehrad bei RT inkubiert. Danach wurde der Durchfluss aufgefangen, mit 1 ml Puffer A nachgespült und beide Fraktionen vereinigt (Aliquot DF: 1/200). In dem folgenden Waschschrift wurden die am Talon-Material gebundenen RNCs mit Puffer A gewaschen. Dabei wurde mit 8x 1ml gewaschen und alle Fraktionen vereinigt (Aliquot WI: 1/10).

Anschließend wurden die RNCs in einem zweiten Waschschrift mit Puffer B (Puffer A mit 500 mM KOAc) gewaschen, welcher eine höhere K⁺-Konzentration als Puffer A aufweist. Dabei wurde mit 2x 1 ml gewaschen und alle Fraktionen vereinigt (Aliquot WII: 1/10).

Die RNCs wurden mit 1 ml Imidazol-haltigem Elutionspuffer (Puffer A mit 100 mM Imidazol) auf dem Drehrad für 5 min bei Über-Kopf-Rotation und RT inkubiert. Anschließend wurde die Elution aufgefangen und die Säule mit 1,5 ml Elutionspuffer nachgewaschen. Die vereinigte Elution von 2,5 ml wurde durch 400 µl Saccharose-Kissen (1M Saccharose in Puffer A) pelletiert und die pelletierten, gereinigten RNCs in 20-40 µl Grid-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.0, 50 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 125 mM Saccharose, 0,05% Nikkol, 100 µg/ml Cycloheximid, 0,5% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill, 0,2 U/µl RNAsin) resuspendiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot entnommen (Aliquot SNII: 1/200). Die Konzentration der gereinigten RNCs wurde bestimmt (A₂₆₀) sowie die RNCs aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 Grad gelagert.

3.4.5 Reinigung RNCs aus Reticulozyten-Lysaten (optimiertes Protokoll)

Bei der Reinigung von RNCs aus dem Reticulozyten Lysat nach dem Standard-Protokoll wurde eine starke Aggregatsbildung beobachtet. Daher wurde die Reinigung von hXBP1-RNC aus dem Reticulozyten Lysaten optimiert, um aggregatfreie RNCs zu erhalten.

Während der Reinigung wurden Aliquots entnommen, um deren Verlauf anhand eines Western Blots zu überprüfen. An den betreffenden Stellen ist die Bezeichnung des Aliquots sowie das Verhältnis des entnommenen Volumens zum Gesamtvolumen des Translationsansatzes angegeben.

Für eine Aufreinigung wurden 1000 μ l *in Vitro*-Translations-Ansatzes angesetzt, um eine ausreichende Menge an gereinigten RNCs zu erhalten.

Vor der Ansetzung des *in Vitro*-Translationsansatzes wurde das Reticulozyten Lysat abzentrifugiert (10,000 x g, 10 min, 4 Grad, 5417 R Eppendorf) und der Überstand weiter verwendet. Die mRNA-Konzentration betrug 20 μ g/ μ l und die Inkubationszeit 30 min. Nach der Inkubation wurde die *in Vitro*-Translation durch die Zugabe von 20 μ l Cycloheximid (Konz. 10 mg/ml) gestoppt (Aliquot T: 1/200).

Anschließend wurde der Translationsansatz mit Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 7.0, 250 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 250 mM Saccharose, 0,1% Nikkol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 10 μ g/ml Cycloheximid, 0,1% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill (Boehringer), 0,2 U/ μ l RNAsin) 1:7 verdünnt, je 2 ml der Verdünnung (4x 2ml) auf ein 1 ml Saccharose-Kissen (1M Saccharose in Puffer A) geladen und zentrifugiert (100 krpm, 50 min, 4 Grad, TLA110). Die vier Pellets wurden in je 250 μ l Puffer A auf einem Schüttler (Vortex-Genie2, Scientific Industries) komplett resuspendiert (Stufe 2, ca. 90 min 4 Grad) und anschließend vereinigt. Vom Überstand und dem resuspendierten Pellet wurden Aliquots entnommen (Aliquot SNI u. PI: 1/200). Alle folgenden Zentrifugations- und Resuspensionschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben wie zuvor beschrieben.

Zur Entfernung restlicher Verunreinigungen wurde die vereinigte Resuspension erneut durch ein Saccharose-Kissen zentrifugiert und in 1 ml Puffer A resuspendiert.

Es wurde eine Polyrep-Chromatographiesäule (BioRad) mit 750 μ l Talon®Metal Affinity Resin (Clontech) beschickt, mit 5 ml tRNA-Puffer gewaschen, die Säule mit der Resuspension beladen und anschließend für 5 min bei Über-Kopf-Rotation auf dem Drehrad bei RT inkubiert. Danach wurde der Durchfluss aufgefangen, mit 1 ml Puffer A nachgespült und beide Fraktionen vereinigt (Aliquot DF: 1/200). In dem folgenden Waschschrift wurden die am Talon-Material gebundenen RNCs mit Puffer A gewaschen. Dabei wurde mit 8x 1ml gewaschen und alle Fraktionen vereinigt (Aliquot WI: 1/10).

Anschließend wurden die RNCs in einem zweiten Waschschrift mit Puffer B (Puffer A mit 500 mM KOAc) gewaschen, welcher eine höhere K⁺-Konzentration als Puffer A aufweist. Dabei wurde mit 2x 1 ml gewaschen und alle Fraktionen vereinigt (Aliquot WII: 1/10).

Die RNCs wurden mit 1 ml Imidazol-haltigem Elutionspuffer (Puffer A mit 100 mM Imidazol) auf dem Drehrad für 5 min bei Über-Kopf-Rotation und RT inkubiert. Anschließend wurde die Elution aufgefangen und die Säule mit 1,5 ml Elutionspuffer nachgewaschen. Die vereinigte Elution von 2,5 ml wurde durch ein 400 μ l Saccharose-Kissen (1M Saccharose in Puffer A) pelletiert und in 15 μ l Grid-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.0, 50 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 125 mM Saccharose, 0,05% Nikkol, 100 μ g/ml Cycloheximid, 0,5% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill, 0,2 U/ μ l RNAsin) resuspendiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot entnommen (Aliquot SNII: 1/200).

Die aggregierten RNCs wurden durch eine Zentrifugation bei niedriger Drehzahl abgetrennt (20,000 x g, 10 min, 5417 R Eppendorf). Es wurden je 3 μ l des Überstandes und des im gleichen Volumen resuspendierten Pellets als Aliquot genommen. Für den Überstand mit den aggregatfreien RNCs wurde die Proteinkonzentration bestimmt, der Überstand aliquotiert und die RNCs bis zur Präparation der Grids für die EM bei -80 Grad gelagert.

3.5 Gewinnung von 80S Ribosomen

3.5.1 80s Ribosomen (*P. falciparum*)

7,5 ml mit *P. falciparum* (Klone 3D7) infizierte menschlicher Erythrozyten (2% Parasitämie) wurden in 7.5 ml RPMI/AlbuMAX I-Medium durch den Arbeitskreis Professor May (Bernard Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden pelletiert (2000 rpm, 10 min, Hettich Rotanta 460R), der Überstand verworfen, das Pellet im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 Grad gelagert.

Das Zellpellet (8 ml) wurde auf Eis aufgetaut, die Zellen mit 14 ml Lysispuffer (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 7,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0.15% (v/v) Triton-X 100, 2% (v/v) Pille/ml) versetzt, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde das Lysat gelegentlich durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Anschließend wurden die groben Zellreste durch eine Zentrifugation abgetrennt (20,000 x rcf, 20 min, 4 Grad, Sorvall SS34), der Überstand 1:1 mit 2xHP Puffer (40 mM HEPES/KOH pH 7.4, 1 M KOAc, 50 mM Mg(OAc)₂, 2 mM DTT, 1mM PMSF, 0.2 U/μl RNAsin, 1 mM Puromycin) versetzt und für 15 min auf Eis sowie 10 min bei RT inkubiert.

Nach der Puromycinbehandlung unter Hochsalzbedingungen wurden je 1,5 ml des Zelllysats (28 ml) durch ein 1 ml Saccharose-Kissen (1 M Saccharose, 20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 500 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF) pelletiert (100,000 rpm, 60 min, 4 Grad, TLA110). Dabei wurden insgesamt 8 TLA110-Röhrchen benutzt. Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Ribosomen-Pellet enthaltende Röhrchen erneut mit 1 ml Saccharose-Kissen sowie 1,5 ml Zelllysats beladen und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wie nötig wiederholt.

Anschließend wurden die Zellepellets in den acht Röhrchen in je 150 μl Puffer A (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 125 mM Saccharose, 1 mM DTT, 05 mM PMSF) auf Eis unter gelegentlichen Auf- und Abpipettieren für 45 min resuspendiert, vereinigt, durch eine erneute Zentrifugation durch ein 1 ml Saccharose-Kissen gewaschen und in 400 μl Puffer A resuspendiert.

Die Resuspension (400 μl) wurde durch einen kontinuierlichen 10-40% Saccharose-Dichtegradienten (unter denselben Pufferbedingungen wie Puffer A) sedimentiert (40,000 rpm, 160 min, SW40Ti). An der Gradientenstation (Biocomp) wurde der Gradient fraktioniert (Fließgeschwindigkeit 0,29 mm/sec, Zeitintervall 0.30). Dabei wurden die 80S Ribosomen enthaltenden Fraktionen am parallel erstellten A₂₅₄ Absorptionsprofils identifiziert, vereinigt, pelletiert (100,000 rpm, 90 min, TLA110) und in 15 μl Puffer B (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 50 mM KOAc, 2.5 mM Mg(OAc)₂, 100 mM Saccharose, 1 mM DTT, 05 mM PMSF) resuspendiert (A₂₆₀: 1,5, A_{260/280}: 1,5). Die gereinigten 80S Ribosomen wurden aliquotiert, in flüssigen Stickstoff gefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 Grad gelagert.

3.5.2 80S Ribosomen (*C. l. familiaris*)

Die Reinigung von 80S Ribosomen (*C. l. familiaris*) erfolgte nach dem beschriebenen Protokoll für die Gewinnung Puromycin- und Hochsalz-behandelter rauer Membranen aus mikrosomalen Membranen des Hundepankreas (Gogala et al., 2014).

Die Ribosomen wurden nach dem Flotationsschritt der Membranen aus dem Pellet der Zentrifugation gereinigt. Hierfür wurde der Membran enthaltende Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Puffer A Puffer A (20 mM HEPES/KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 125 mM Saccharose, 1 mM DTT, 05 mM PMSF) resuspendiert (A₂₆₀: 120, A_{260/280}: 1,89).

Die mikrosomalen Membranen des Hundepankreas wurden durch B. Dobberstein zur Verfügung gestellt (in 50 mM HEPES/KOH pH 7.5, 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, Protease Inhibitor) und es wurden ungefähr 12,000 Äquivalente eingesetzt.

10 A₂₆₀ der resuspendierten Ribosomen wurden mit Puromycin unter Hochsalzbedingungen in einem Volumen von 2400 µl für 30 min auf Eis und anschließend 5 min bei RT inkubiert (20 mM HEPES/KOH pH 7.5, 500 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 125 mM Saccharose, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1mM Puromycin, 0.2 U/µl RNAsin).

Das Vorgehen zur weiteren Reinigung der 80S Ribosomen mithilfe eines kontinuierlichen 10-40% Saccharose-Dichtegradienten wurde bereits beschrieben (siehe 3.5.1, S. 28).

3.6 *In vitro*-Rekonstitution von ribosomalen Komplexen

3.6.1 Eingesetzte Proteine (Liganden) und Ribosomen

Rekombinantes His₆-ERj1 (ERj1) sowie His₆-BiP (BiP) von *H. sapiens* wurden durch die AG Zimmermann freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dabei erfolgte die Reinigung durch eine Überexpression in *E. coli* sowie der anschließenden Reinigung aus Einschlusskörperchen (inclusion bodies) (Benedix et al., 2010).

Gereinigtes Sec61 (*C. l. familiaris*) stand im Labor zur Verfügung. Dabei erfolgte die Reinigung anhand eines bereits beschriebenen Protokolls (Görllich und Rapoport, 1993).

Anfangs wurden 80S Ribosomen (*C. l. familiaris*) im Labor zur Verfügung gestellt, da diese jedoch nicht Sec61 frei waren, wurden Sec61 freie Ribosomen selbst gereinigt (siehe 3.5.2, S.28). DP120-RNCs (*T. aestivum*, siehe 3.4.4, S.26) wurden ebenfalls selbst gereinigt.

3.6.2 *In vitro*-Rekonstitution ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1

Vor der Durchführung der *in vitro*-Translation wurden ERj1 und BiP abzentrifugiert, um störende Aggregate zu entfernen. Für die Zentrifugation wurden 450 pmol ERj1 auf ein Volumen von 150 µl in 36 mM HEPES/KOH 7.5, 27 mM KOAc, 45 mM KCl, 6 mM Mg(OAc)₂, 0,2 mM MgCl₂, 127 mM Saccharose, 1,52% Glycerol, 0,6 mM DTT, 0,01% Nikkol, 0,36% Digitonin, 0,87% CHAPS, 0,36 Pille/ml, 72 µg/ml Cycloheximid, gebracht sowie 1845 pmol BiP auf ein Volumen von 30 µl in 63 mM HEPES/KOH 7.5, 51 mM KOAc, 11 mM Mg(OAc)₂, 238 mM Saccharose, 2,85% Glycerol, 0,8 mM DTT, 0,02% Nikkol, 0,76% Digitonin, 1,53% CHAPS, 0,68% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill (Boehringer), 136 µg/ml Cycloheximid. Anschließend wurden beide Ansätze zentrifugiert (100,000 rpm, 90 min, TLA120). Je nach Umfang des Experimentes und der Anzahl der *in vitro*-Translationsansätze wurden die Volumina angepasst.

Für die *in vitro*-Rekonstitution wurden zu 42 µl des Überstandes von ERj1 (entspricht 126 pmol vor der Abtrennung Aggregate) 0,65 µl des Überstandes von BiP (entspricht 40 pmol vor der Abtrennung der Aggregate), 30 pmol Sec61 und 3 pmol Ribosomen (80S oder RNCs) gegeben. Falls eine der Komponenten nicht eingesetzt wurde, wurde stattdessen der entsprechende Kompensationspuffer eingesetzt. Der *in vitro*-Translationsansatz wurde auf ein finales Volumen von 50 µl in 31 mM HEPES/KOH 7.5, 5 mM Tris/HCl pH 7.0, 93 mM KOAc, 26 mM KCl, 5 mM Mg(OAc)₂, 128 mM Saccharose, 2,38 % Glycerol, 1 mM DTT, 0,02% Nikkol, 0,34% Digitonin, 0,66% CHAPS, 0,4% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill, und 80 µg/ml Cycloheximid gebracht. Wurde ATP eingesetzt betrug die finale Konzentration 1 mM. Der *in vitro*-Translationsansatz wurde zuerst ohne die Zugabe von Sec61 8 min bei 30 Grad vorinkubiert.

Anschließend wurde Sec61 oder der entsprechende Kompensationspuffer hinzugegeben und weitere 15 min bei 30 Grad inkubiert. Abschließend wurde der Translationsansatz für weitere 30 min auf Eis inkubiert, bevor der *in vitro*-Translationsansatz durch ein 100 µl Saccharose-Kissen (1M Saccharose, 30 mM HEPES/KOH pH 7.5, 100 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0,02% Nikkol, 0,3% Digitonin, 0,65% CHAPS, 0,4% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill, 80 µg/ml Cycloheximid) zentrifugiert wurde (100,000 rpm, 50 min, TLA100). Der Überstand wurde einer TCA-Fällung unterzogen und wie das Pellet in 20 µl 1xSB-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 10 µl anhand eines SDS-PAGE (Coomassie Färbung) ausgewertet. Wurde die *in vitro*-Rekonstitution zur Herstellung einer Proben für die Kryo-EM, durchgeführt, wurde das Pellet in 25 µl Grid-Puffer resuspendiert (20 mM Tris/HCl pH 7.0, 50 mM KOAc, 2,5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 125 mM Saccharose, 0,05% Nikkol, 100 µg/ml Cycloheximid, 0,2 U/µl RNasin, 0,5% (w/v) EDTA-free complete protease inhibitor pill), 5 µl für eine Kontrolle der erfolgreichen In-Vitro Rekonstruktion abgenommen (SDS-PAGE) und die restliche Lösung bis zu ihrer weiteren Verwendung in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 Grad gelagert.

3.7 Kryo-EM und Negativkontrastfärbung

3.7.1 Datensammlung (Kryo-EM)

Als Probenträger für die Datensammlung mittels der Kryo-EM wurden „holey carbon grids“ (Quantifol R3/3) genutzt, welche 2 nm dick mit Kohle beschichtet wurden.

Die Grids wurden vor der Auftragung der Probe bei 0.22 Torr für 30 sec. ionisiert (Plasma cleaner chamber, Harrick) und anschließend 3,5 µl der ribosomalen Probe (2,5-5 A₂₆₀/ml) aufgetragen. Die Probe wurde mithilfe des Vitrobot™ Mark IV (FEI Company) in flüssigem Ethan vitrifiziert und bis zur Datensammlung in flüssigen Stickstoff gelagert (Wagenknecht et al., 1988). Diese Schritte wurden freundlicherweise durch die technische Assistentin Charlotte Ungewickell ausgeführt.

Die Datensammlungen im eigenen Haus wurden freundlicherweise durch Dr. Berninghausen und Frau Ungewickell ausgeführt. Die Datensammlung bei niedriger Auflösung erfolgte am FEI Tecnai G2 Spirit TEM bei 120 kV, einer nominalen Vergrößerung von 90,000 und unter Nutzung einer Eagle 4K CCD Kamera (gebinnt auf 2048 x 2048 Pixel, 30 µm Pixel, 1s/voller Frame, FEI) mit einer resultierenden Pixelgröße von 3.5 Å.

Die Datensammlungen bei hoher Auflösung erfolgten an verschiedenen Mikroskopen.

Die Datensammlung für die 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes (80S Ribosom, ERj1, Sec61, BiP) erfolgte manuell an einem Tecnai Polara F30 Mikroskop Feldemissions-Mikroskop (Max-Planck-Institut, Berlin) bei Niedrigdosis-Bedingungen (ca. 20 Elektronen/Å² pro Sekunde), 300 keV, 39,000facher Vergrößerung und einem Defokusbereich von 1.0-4.5 µm.

Die Bilder (Mikrographen) wurden auf Fotofilm aufgenommen, entwickelt und mithilfe eines Heidelberg Trommelscanners bei einer Pixelgröße von 1,237 Å digitalisiert und als TIFF-Datei gespeichert.

Im Falle der 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC erfolgten zwei Datensammlungen. Beide Datensammlungen erfolgten am Titan Krios TEM (FEI Company) bei 200 keV, niedriger Elektronendosis (ca. 20 Elektronen/Å² pro Sekunde), einer nominalen Vergrößerung von 75,000 und einem nominalen Defokus zwischen -1 µm und -3,5 µm. Die Bilder der ersten Datensammlung wurden bei einer Vergrößerung von 148.721 auf der Ebene der CCD unter Nutzung einer TemCam F416 Kamera (4.096 x 4.096 Pixel, 15.6 µm Pixel, 1s/voller Frame, TVIPS GmbH) bei einer resultierenden Pixelgröße von 1.071 Å/Pixel gesammelt.

Die Datensammlung wurde durch die teil-automatisierte Software EM-TOOLS (TVIPS GmbH) erleichtert.

Die Bilder der zweiten Datensammlung wurden bei einer nominalen Vergrößerung von 288,000 auf der Ebene der CCD unter Nutzung einer TemCam F816 Kamera (gebinnt auf 4.096 x 4.096 Pixel, 31.2 μm Pixel, 1s/voller Frame, TVIPS GmbH) bei einer resultierenden Pixelgröße von 0,953 \AA gesammelt.

Im Falle der 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms (*P. falciparum*) erfolgten ebenfalls zwei Datensammlungen und wurden freundlicherweise durch Jan Schuller und Stefan Pfeffer (AG Förster, MPI für Biochemie, Martinsried) ausgeführt. Beide Datensammlungen wurden an einem Titan Krios TEM (FEI Company) bei 300 keV bei einem nominalen Defokusbereich von -1,5 bis -3,0 μm und unter Nutzung der teil-automatischen Software TOM² durchgeführt (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried). Die Bilder (10 Frames/s Sekunde) wurden bei einer Vergrößerung von 105 000x auf der Ebene des Detektors unter Verwendung einer Gatan K2 SummitTM Direct detector Camera (Gatan) bei einer resultierenden Pixelgröße von 0.675 \AA gesammelt.

3.7.2 Negativkontrastfärbung

Als Probenträger wurden ebenfalls die für die Kryo-EM verwendeten Grids eingesetzt (siehe 3.7.1, S.30).

Nach der Ionisierung der Grids bei 0.22 Torr für 45 s (Plasma cleaner chamber, Harrick) wurden 3,5 μl der ribosomalen Probe (2,5-5 A_{260}/ml) auf das Grid gegeben, 45 Sekunden inkubiert, und mit 5 Tropfen Wasser gewaschen. Das Grid wurde mit drei Tropfen einer 2% Uranylacetat-Lösung (Ted Pella, Inc., USA) für 15 Sekunden gefärbt und danach die überschüssige Färbelösung mit einem Blotting-Papier entfernt.

Anschließend wurde die Negativkontrastfärbung am Morgani manuell begutachtet und Aufnahmen gemacht (100 kV FEI Morgagni Elektronenmikroskop)

3.8 Einzel-Partikel Rekonstruktion

Die Einzel-Partikel Rekonstruktion der Datensammlung erfolgte hauptsächlich durch die Nutzung des SPIDER-Software-Pakets (Frank et al., 1996) in mehreren konsekutiven Skript basierenden Schritten (Shaikh et al., 2008).

3.8.1 Selektion der Partikel

Die digitalisierten Mikrographen einer Datensammlung wurden hierfür in SPIDER lesbare Dateien konvertiert und die Kontrast-Transfer-Funktion (CTF) für diese bestimmt (SPIDER-Befehl „TF ED“).

Anschließend wurden unter Nutzung des Programms JWEB (http://www.wadsworth.org/spider_doc/web/docs/jweb.html) eine visuelle Inspektion der Mikrographen auf Eiskontaminationen, Eisdicke und Aggregate sowie der zugehörigen Powerspektren auf Informationsgehalt, Astigmatismus und Drift durchgeführt. Mikrographen mangelnder Qualität wurden aussortiert sowie Mikrographen deren Defokuswerte zu niedrig oder zu hoch waren.

Auf den verbleibenden Mikrographen wurde mithilfe einer modifizierten Version der Software SIGNATURE (Chen und Grigorieff, 2007) die Koordinaten der ribosomalen Partikel bestimmt und basierend auf den erhaltenen Koordinaten die Partikel ausgefenstert (SPIDER-Befehl p_window).

Für die Bestimmung der Koordinaten wurden die Mikrographen in mrc-Format umgewandelt dezimiert und als Referenz für die 2D-Projektionen dienten das 80S Ribosom von *Canis lupus familiaris* (*C. l. familiaris*) oder *T. aestivum*.

Die ausgefensterten Partikel wurden für das Referenz basierende initiale Alignment auf den Intel/Opteron Computer Cluster mit einigen hundert Prozessoren transferiert.

Dort erfolgte im Falle der Datensammlungen bei niedriger Auflösung sowie für den quartären Komplex bei hoher Auflösung eine Mikrographen basierende Organisation der Partikel und im Falle der anderen Datensammlungen eine Defokus basierenden Organisation. Eine Defokus basierende Organisation war aufgrund der hohen Anzahl an digital gesammelten Mikrographen notwendig, um ein schnelleres Prozessieren auf dem Cluster zu ermöglichen.

Abschließend wurden die Partikel mit ähnlichem Defokuswerten vor dem initialen Alignment in Defokus-Gruppen zusammengefasst.

3.8.2 Referenz basierendes initiales Alignment

Im initialen Referenz basierenden Alignment wurden die eulerschen Winkel der Partikel (Orientierung der Partikel im Raum) auf eine Winkelgenauigkeit von 15 Grad bestimmt. Dafür wurde die Methode des „projection matching“ verwendet, bei der die 2D-Projektion des Partikels der 2D-Projektion einer Referenz zugeordnet wurde, die den größten Kreuzkorrelationskoeffizienten aufwies (beste Orientierung im Raum). Für die benötigte Winkelgenauigkeit wurden 83 2D-Projektionen der 3D-Referenz unter der Berücksichtigung der CTF des betreffenden Partikels angefertigt. An der entsprechenden Stelle des Ergebnisteils wird jeweils die als Referenz eingesetzte 3D-Rekonstruktion für das erste initiale Alignment einer Datenprozessierung genannt.

Den zentralen Bestandteil des initialen Alignments stellt der SPIDER Befehl `ap mq` dar, welcher in einem Algorithmus durch Rotation und Translation der Partikel den höchsten Kreuzkorrelationskoeffizienten mit einen der 83 2D-Projektionen bestimmt.

3.8.3 3D-Rückprojektion und Bestimmung der Auflösung

Für die 3D-Rückprojektion wurden die Partikel entsprechend den erhaltenen Translations- sowie Rotationsparametern aus dem Alignment für die maximale Kreuzkorrelation verschoben und je nach Mikrographen oder Defokus basierender Organisation zusammengehörige Partikel in Stapeldateien zusammengefasst.

Für die Partikel jeder Defokusgruppe wurde ein 3D-Rückprojektion erstellt sowie zwei 3D-Rückprojektionen, die jeweils nur eine zufällig bestimmte Hälfte an Partikeln der Defokusgruppe enthielten (SPIDER-Befehl `bp32f`).

Anschließend wurden die drei 3D-Projektionen der einzelnen Defokusgruppen CTF-korrigiert und über alle Defokusgruppen zu drei 3D-Rückprojektionen aufsummiert. Die erhaltene 3D-Rückprojektion für den gesamten Datensatz (3D-Projektion, Volumen) wurde nach entsprechender Filterung auch als Referenzvolumen für das Refinement eingesetzt. Die zwei 3D-Rückprojektionen für den jeweils halben Datensatz wurden zur Berechnung der Fourier-Shell-Korrelation (FSC) genutzt. Durch die Umrechnung des Wertes der FSC für die Raumfrequenz 0.5 wurde die Auflösung der 3D-Projektion in Å bestimmt. Die lokale Auflösung wurde mithilfe des Programms ResMap (Kucukelbir et al., 2014) bestimmt und visualisiert

Wurde eine Rückprojektion höherer Qualität erwünscht, erfolgte die Rückprojektion mit dem SPIDER-Befehl `bprp` anstatt `bp32f`.

3.8.4 Refinement und Sortierung

Im Refinement wurden die Partikel des Datensatzes gegen das Volumen der Vorrunde oder im Falle des ersten Refinements gegen das Referenzvolumen des initialen Alignments aligniert und eine neue 3D-Rückprojektion durchgeführt, die als Volumen für das Alignment der nächsten Runde diente. Dieser Prozess wurde iterativ wiederholt, um die Auflösung der 3D-Projektion zu verbessern.

Dabei wurden unter immer größeren Winkelbeschränkungen die Winkelgenauigkeit in dem iterativen Prozess erhöht sowie später auch die Rotationsfreiheit eingeschränkt, um eine schnelleres Prozessieren zu ermöglichen (Zentrale SPIDER-Befehle für das Alignment: ap md, ap rq und ap rn).

Das Ziel der Sortierung war es Datensätzen mit homogenen Populationen an Partikeln zu erhalten, da mit steigender Homogenität des Datensatzes auch die Auflösung der 3D-Rückprojektion zunimmt.

Für den Sortiervorgang wurden im Refinement zwei Referenzvolumen angeboten und die einzelnen Partikel des Datensatzes dem Referenzvolumen mit dem höheren Korrelationskoeffizienten zugeordnet. Somit wurden zwei Subpopulationen an Partikeln erhalten, für die eine 3D-Projektion durchgeführt wurde. Die beiden 3D-Projektionen dienten als Referenzvolumen in der nächsten Refinementrunde der Sortierung. Dieser iterative Prozess wurde solange wiederholt bis die Anzahl der Partikel in den Subpopulationen konstant war. Dabei wurden in jeder Refinementrunde die Parameter bis auf die angebotenen Referenzvolumen konstant gehalten (z.B. Filterparameter, Winkelgenauigkeit). Die so aus der Mischpopulation des gesamten Datensatzes erhaltenen homogeneren Subpopulationen an Partikeln wurden in zwei Datensätze getrennt und unabhängig voneinander weiterprozessiert. Nähere Angaben über das verwendete Sortierungsschema für die einzelnen Datensätze in dieser Arbeit sind an der entsprechenden Stelle im Ergebnissteil zu finden.

3.8.5 Modellierung rRNA und rProteine

Anhand der erhaltenen 3D-Projektion für das 80S Ribosoms von *P. falciparum* wurden einige der Proteine und Teilbereiche der rRNAs modelliert.

Für die Modellierung der rRNAs wurde mithilfe des Programms S2S-Assemble2 (Jossinet und Westhof, 2014) zuerst ein strukturelles Alignment für die Sequenzen der rRNAs von *P. falciparum* durchgeführt. Als Templates für das strukturelle Alignment dienten die PDBs der rRNAs der Kristallstruktur von *S. cerevisiae* (PDB: 3U5B, 3U5D). Bereiche die sich dabei stark unterschieden, konnten nicht aligniert werden und mussten später de novo modelliert werden. Die Sequenzen der rRNAs wurden der Datenbank der „Comparative RNA Web Site“ entnommen (Cannone et al., 2002). Dabei wurden die rRNA-Sequenzen unter der Nutzung der Online-Software NCBI Standard Nucleotide Blast (Sayers et al., 2011) mit rRNA-Sequenzen anderer Sequenzierungen aligniert, um vorhandene Unstimmigkeiten in den Sequenzierungen zu entdecken und bei der Modellierung zu berücksichtigen.

Anhand des strukturellen Alignments wurden mithilfe von S2S-Assemble2 3D-Strukturen der rRNAs von *P. falciparum* generiert und als PDBs abgespeichert.

Die erhaltenen 3D-Strukturen (PDBs) stellten das Kernmodell da, in dem die fehlenden nicht alignierbaren Bereiche anhand der Elektronendichte der 3D-Projektion (80S *P. falciparum*) de novo modelliert werden konnten. Zuvor wurde mit USCF Chimera (Chimera) (Pettersen et al., 2004) das Kernmodell mittels Rigid Body Fit in die Elektronendichte geschoben. Die de novo Modellierung erfolgte mithilfe der Programme Chimera und Coot (Emsley und Cowtan, 2004) und wurde größtenteils durch Doktor Andreas Anger ausgeführt.

Im Falle der Proteine wurde in einem ersten Schritt unter der Nutzung der Online-Software Swiss-Modell (Guex et al., 2009) eine Homologie-basierte Protein-Modellierung der betreffenden Proteine vorgenommen. Als Template dienten die Kristallstrukturen von *S. cerevisiae* (Ben-Shem et al., 2011) und *Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*) (Klinge et al., 2011).

Die erhaltenen Homologie-Modelle der Proteine (PDBs) wurden zuerst unter der Nutzung von Chimera (Pettersen et al., 2004) mithilfe eines Rigid Body Fits in die Elektronendichte der 3D-Projektion vom 80S Ribosom (*P. falciparum*) geschoben und anschließend mit Coot (Emsley und Cowtan, 2004) bestmöglich in die Elektronendichte gefittet. Nicht oder falsch modellierte Bereiche in dem erhaltenen Homologie-Modellen der Proteine aufgrund zu geringer Homologie wurden anhand der Elektronendichte in Coot (Emsley und Cowtan, 2004) korrigiert oder de novo modelliert.

3.8.6 Abbildungen

Die Visualisierung und Anfertigung der Abbildungen erfolgte entweder mit UCSF Chimera oder Coot.

4 Ergebnisse

4.1 Projekt I: Modellbau des 80S Ribosoms (*P. falciparum*)

Malaria tropica ist die gefährlichste Variante der Malaria und wird durch den parasitären Erreger *P. falciparum* ausgelöst (White et al., 2014).

Zur Behandlung von Malaria werden unter anderem Antibiotika eingesetzt, welche auf die 70S ähnlichen Ribosomen des Apikoplasten oder des Mitochondriums wirken (Ralph et al., 2001). Antibiotika, welche die Translation des zytosolischen 80S Ribosoms von *P. falciparum* inhibieren, werden nicht mehr verwendet, da diese Antibiotika aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen dem 80S Ribosom von *P. falciparum* und dem Menschen starke Nebenwirkungen im Mensch auslösen. Als Beispiel ist Emetin zu nennen (Akinboye und Bakare, 2011).

Da *P. falciparum* aber eine zunehmende Resistenz gegen die eingesetzten Antibiotika entwickelt (Kokwaro, 2009), ist es notwendig das Spektrum an Antibiotika auszuweiten.

Daher sollte in dieser Arbeit ein hochaufgelöstes, strukturelles Modell des 80S Ribosoms des A-Typs (Li et al., 1997) von *P. falciparum* (Jackson et al., 2011) gebaut werden, um als Grundlage beim gezielten Design von spezifischen Antibiotika gegen das 80S Ribosom von *P. falciparum* zu dienen.

Hierfür wurde erfolgreich ein Protokoll zur Reinigung der 80S Ribosomen (A-Typ, *P. falciparum*) aus infizierten menschlichen Erythrozyten etabliert und in der anschließenden Datensammlung erstmals die neue Technologie der DED im Arbeitskreis eingesetzt.

Bei der Modellierung konnten einige für Plasmodium spezifische Merkmale des 80S Ribosoms herausgearbeitet werden, auch wenn der Bau des vollständigen Modells nicht abgeschlossen wurde, da das vollständige Modell durch eine andere Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde (Wong et al., 2014).

Zwei der spezifischen Merkmale des 80S Ribosoms sind dabei besonders interessant, da sie potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung spezifischer Medikamente darstellen könnten (siehe Diskussion 5.1.4, S.88 und 5.1.5, S. 89) und werden hier präsentiert. Auch belegen sie eindrucksvoll den hohen Informationsgehalt der 3D-Rekonstruktion bei fast atomarer Auflösung.

Dabei handelt es sich um eine nur im Phyla der Myzozoa existierenden N-terminalen Verlängerung von L41e und eine neue Helix-Loop-Helix Struktur in ES3L der 5.8S rRNA die zu einer neuen Positionierung des terminalen Loops führt.

4.1.1 Etablierung eines Protokolls zur Reinigung von 80S Ribosomen (*P. falciparum*)

Mit *P. falciparum* (Klon 3D7) infizierte menschliche Erythrozyten (2% Parasitämie) wurden in dieser Arbeit freundlicherweise durch den Arbeitskreis Professor May (Bernard Nocht Institut für Tropenmedizin, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden durch die Verwendung des milden Detergens Triton X-100 lysiert, die groben Zellreste durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit Puromycin unter Hochsalzbedingungen behandelt, um alle gebundenen Faktoren wie SRP, mRNAs, tRNAs und die naszierende Kette vom Ribosom zu entfernen.

Die Hochsalz und Puromycin behandelten Ribosomen wurden durch ein 1 M Saccharose-Kissen pelletiert, um das Lysat und die Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht abzutrennen. Anschließend wurden die 80S Ribosomen von den einzeln vorliegenden 40S und 60S Untereinheiten mittels einer Sedimentation durch einen kontinuierlichen 10-40% Saccharose-Dichtegradienten gereinigt (Abb. 14A).

Die 80S Ribosomen enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, zentrifugiert und die pelletierten Ribosomen im finalen Puffer resuspendiert (20 μ l, $A_{260}=1,5$, $A_{260/280}=1,5$). Aus 7,5 ml Zellen konnten somit 0,6 pmol 80S Ribosomen gereinigt werden. Da Erythrozyten keine zelleigenen Ribosomen enthalten, handelte es sich bei den gereinigten Ribosomen ausschließlich um Ribosomen von *P. falciparum*.

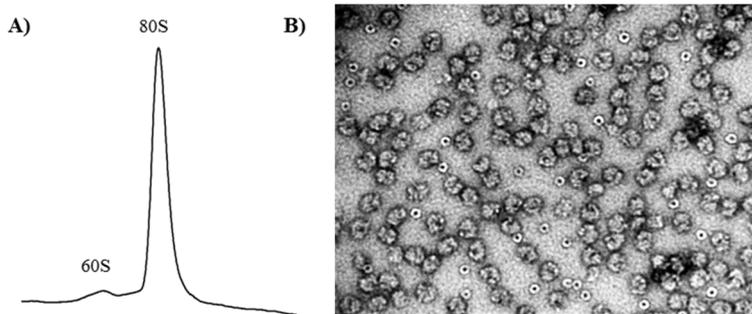


Abb. 14 Reinigung 80S Ribosomen (*P. falciparum*) (A) A254-Profil vom 10-40% Saccharose-Dichtegradienten. Es wurden zwei Peaks erhalten. Einer für die 60S Untereinheit und einer für das 80S Ribosom. (B) Negativkontrastierung der gereinigten 80S Ribosomen. Neben den 80S Ribosomen, wurden auch die deutlich kleineren, kreisförmigen hellen Ferritin-Komplexe co-gereinigt.

Die zugehörige Negativkontrastierung zeigte, dass die Dichte an Ribosomen für eine Datensammlung ausreichend war und der Proteinkomplex Ferritin co-gereinigt wurde (Abb. 14B). Ferritin, als Eisen speichernder Proteinkomplex (Harrison und Arosio, 1996), zeigt aufgrund des eingelagerten Eisens einen hohen Kontrast bei der Negativkontrastierung (Abb. 14B).

4.1.2 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms

Die Datensammlung der gereinigten 80S Ribosomen (*P. falciparum*) erfolgte an einem Titan Krios TEM (FEI Company) mit einer Gatan K2 Summit™ Direktdetektor Kamera (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) und wurde freundlicherweise durch die Kollaborationspartner Dr. Stefan Pfeffer und Jan Schuller (AG Förster, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Es erfolgten zwei Datensammlungen und die erhaltenen Datensätze wurden für die Datenprozessierung vereinigt.

Bei der ersten Datensammlung kam es zu Unregelmäßigkeiten. Erstens erfolgte teilweise eine zweite Aufnahme der gleichen Position auf dem Grid. Dies führte zu Mikrographen auf denen die Ribosomen Strahlenschäden aufwiesen. Bei der visuellen Inspektion der Mikrographen konnten diese aber sowie weitere Mikrographen minderer Qualität aussortiert werden.

Zweitens war bei der ersten Datensammlung die eingesetzte Elektronendosis aufgrund eines Berechnungsfehlers höher und entsprach ca. 80 Elektronen/Å² pro Sekunde anstatt 20 Elektronen/Å². Dadurch wiesen die Ribosomen teilweise leichte bis mittlere Strahlenschäden auf. Ribosomen mit mittleren Strahlenschäden konnten bei der Klassifizierung der Ribosomen (Sortierung) aussortiert werden.

Als erstes wurden die Mikrographen einer Qualitätsbeurteilung unterzogen und der 2.-10. Subframe jedes guten Mikrographen mithilfe der Gatan Microscopy Suite Software aligniert, um den Beamshift weitestgehend zu eliminieren (siehe 1.1.2, S.2). Anschließend wurden die alignierten Subframes aufsummiert und die zugehörigen Powerspektren einer Qualitätskontrolle unterzogen. Am Ende wurden 906 Mikrographen mit insgesamt 59.373 Partikeln für das initiale Alignment eingesetzt. Als Referenzvolumen für das initiale Alignment wurde ein leeres 80S Ribosom (*C. l. familiaris*) eingesetzt. Die am Ende des Refinements und der Sortierung erhaltene finale Struktur des 80S Ribosoms (*P. falciparum*) wurde als Referenzvolumen für ein erneutes initiales Alignment eingesetzt, da die Qualität des initialen Alignments mit der Qualität der Referenz zunimmt.

Dieser Vorgang wurde dreimal mit der gesamten Partikelanzahl wiederholt (Daten nicht gezeigt) und die abschließende finale Datenprozessierung wird im Folgenden beschrieben.

Im Zuge der finalen Datenprozessierung erfolgten vier Sortierungsschritte nach dem Refinement der 3D-Rückprojektion des initialen Alignments (Abb. 15, RP 0). Die 3D-Rückprojektion wies im Gegensatz zur Referenz eine nicht-ribosomale stabförmige Dichte auf (Abb. 15, RP 0), welche durch die hohe Elektronendichte der Ferritin-Partikel erzeugt wurde.

Im ersten Sortierungsschritt konnte bei einer vierfachen Dezimierung ($2,7\text{\AA}/\text{Pixel}$) die Subpopulation der Ferritin-Partikel aussortiert werden (Abb. 15, RP 1.II). Dafür wurde gegen die 3D-Projektion des 80S Ribosoms und Ferritins aus der vorherigen Datenprozessierung sortiert. Die erste 3D-Rückprojektion des Ferritins wurde in der ersten Datenprozessierung durch eine Sortierung gegen das Noise-Volumen erhalten (Daten nicht gezeigt).

Im zweiten Sortierungsschritt wurde bei einer vierfachen Dezimierung ($2,7\text{\AA}/\text{Pixel}$) gegen das Noise-Volumen sortiert und somit eine Subpopulation nicht-ribosomaler Partikel aussortiert (Abb. 15, RP 2.II).

Im dritten und vierten Sortierungsschritt wurde bei einer zweifachen Dezimierung ($1,35\text{\AA}/\text{Pixel}$) jeweils gegen ein Volumen aus einer früheren Refinementrunde sortiert.

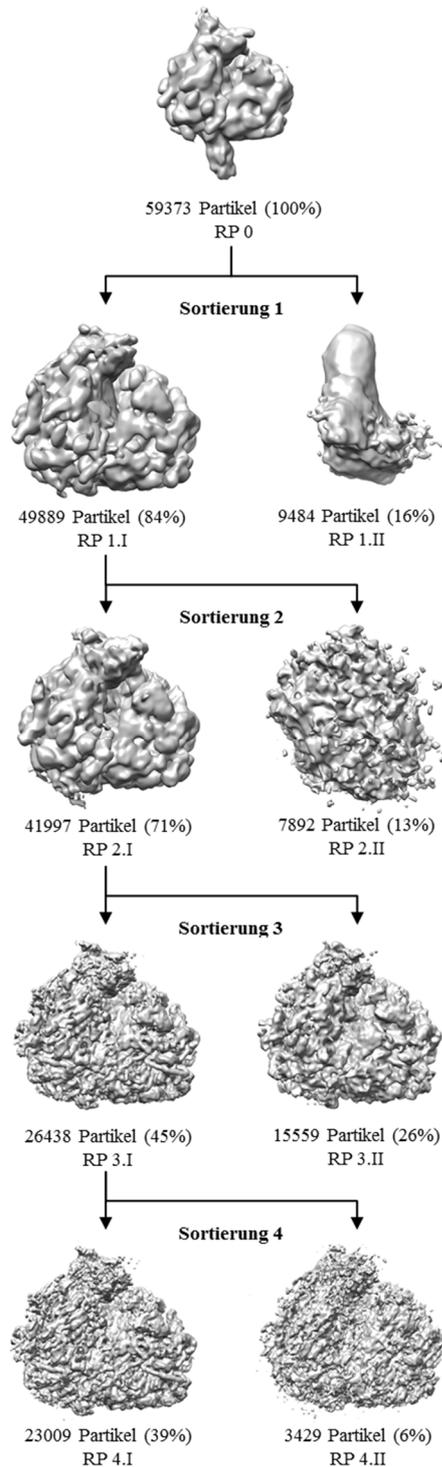
Dabei wurde im dritten Sortierungsschritt eine Subpopulation an Ribosomen mit Strahlenschäden aussortiert (Abb. 15, RP 3.II). Bei der ersten Datensammlung kam es nämlich zu Unregelmäßigkeiten, die dazu führten, dass ein Teil der Ribosomen einer erhöhten Elektronendosis ausgesetzt wurden.

Im vierten Sortierungsschritt wurde eine weitere kleine Subpopulation an Ribosomen aussortiert, deren 3D-Rückprojektion leicht verzerrt war, eventuell aufgrund der geringen Anzahl an Partikeln in der Subpopulation (Abb. 15, RP 4.II).

Von den verbliebenen 23.009 Partikeln wurden nochmals 1.691 Partikel aussortiert, indem alle Mikrographen entfernt wurden, bei denen mehr als 80% der Partikel der Ausgangspopulation RP 0 aussortiert wurden oder mit weniger als 10 Partikeln in der letzten Subpopulation RP 4.I vertreten waren.

Es wurde unterstellt, dass es sich bei den Partikeln dieser Mikrographen, um Partikel geringerer Qualität handelte, da unverhältnismäßig viele Partikel aussortiert wurden oder unverhältnismäßig wenige Partikel auf den Mikrographen identifiziert wurden. Somit wurden am Ende der Sortierung 21.318 Partikel erhalten.

Abb. 15 Sortierungsschema des Datensatzes vom 80S Ribosom (*P. falciparum*) Das Schema zeigt die einzelnen Sortierungsschritte bei der Datenprozessierung. Dabei sind für jeden Sortierungsschritt die erhaltenen Subpopulationen, die gefilterten 3D-Rekonstruktionen, die Anzahl der Partikel und in Klammern der Anteil der Partikel im Verhältnis zu der Ausgangspopulation RP 0 angegeben. Das 80S Ribosom ist in grau dargestellt.



Aufgrund der geringen Anzahl an 21.318 Partikeln wurde das optimale Verhältnis zwischen der Anzahl der Partikel pro Defokusgruppe und der Differenz der Defokuswerte für die Partikel innerhalb einer Defokusgruppe bestimmt. Hierfür wurden mit den verbliebenen Partikeln wiederholt initiale Alignments und Refinements für unterschiedlich große Defokusgruppen mit unterschiedlicher Differenz der Defokuswerte durchgeführt und die erhaltenen 3D-Projektionen sowie die zugehörigen Auflösungskurven bewertet (Daten nicht gezeigt). Das beste Resultat lieferte die vorrangige Einschränkung auf mind. 150 Partikel pro Defokusgruppe und die nachrangige Einschränkung auf eine max. Differenz der Defokuswerte von 200 nm. Unter diesen beiden Einschränkungen wurde für die verbliebenen 21.318 Partikel ein initiales Alignment sowie ein finales Refinement durchgeführt. Für die letzten Runden des Refinements wurde die Pixelgröße von 0,675 Å auf 0,8775 Å interpoliert (IP-Kommando in SPIDER), da bei der Pixelgröße von 0,675 Å die Partikel enthaltende Box die erlaubte Größe für die Datenprozessierung überschritt.

In den letzten Runden des Refinements wurde statt der ribosomalen Maske über das gesamte 80S Ribosom eine ribosomale Maske über die 60S Untereinheit eingesetzt. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung für die 60S Untereinheit. Die finale globale Auflösung für die 60S Untereinheit bei $FSC_{0,5}$ betrug am Ende 5,2 Å (Abb. 16A).

Die Verbesserung der Auflösung in Bezug auf die 60S Untereinheit ist darauf zurückzuführen, dass die 40S Untereinheit aufgrund ihrer Flexibilität in unterschiedlichen Konformationen vorlag, die sich nicht aussortieren ließen. Diese Konformationsunterschiede führten bei Einsatz einer ribosomalen Maske über das ganze Ribosom zu einer Verschlechterung des Alignments. Da aufgrund der nicht aussortierbaren Konformationsunterschiede die Auflösung für die 40S Untereinheit generell niedriger ist als für die 60S Untereinheit (Bai et al., 2013, Voorhees et al., 2014), wurde ein Refinement der 40S Untereinheit unter Nutzung einer Maske über die 40S Untereinheit hinten angestellt und erfolgte nach der Veröffentlichung des Modells nicht mehr (Wong et al., 2014).

In Abbildung Abb. 16B ist die finale, gefilterte 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms dargestellt. Da die 40S Untereinheit beim Refinement nicht berücksichtigt wurde, ist diese, besonders im sehr flexiblen Kopfbereich, teilweise nicht aufgelöst (Abb. 16B).

Auch die lokale Auflösung zeigt, dass die 60S Untereinheit besser aufgelöst ist als die 40S Untereinheit (Abb. 16C-D) und bei einen Querschnitt durch das Ribosom die lokale Auflösung der 60S Untereinheit über große Bereiche um die 4,0 Å liegt. (Abb. 16D).

Die Abb. 16E-G zeigen, dass bei der gegebenen Auflösung eine Modellierung der Proteine und rRNA für die 60S Untereinheit möglich war, da die Seitenketten der Proteine sowie die einzelnen Nukleotide der rRNA zum größten Teil visualisiert werden konnten. Die Auflösung war aber nicht ausreichend, um eine vollständige Basentrennung der rRNA zu erreichen (Abb. 16G).

4.1.3 Partielle Modellierung der rRNA und der rProteine

Anhand der erhaltenen 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms (*P. falciparum*) wurde eine teilweise Modellierung der zugehörigen ribosomalen Proteine und rRNA durchgeführt.

Die konservierte Kernstruktur der rRNA wurde durch ein strukturelles Alignment unter der Verwendung der Software S2S-Assemble (Jossinet und Westhof, 2014) generiert. Als Template für das Alignment diente die Kristallstruktur von *S. cerevisiae* (PDB: 3U5B, 3U5D). Die Nukleotidsequenzen der 5S, 5.8S, 18S sowie 28S rRNA von *P. falciparum* wurden der Datenbank „Comparative RNA Web Site“ entnommen (Cannone et al., 2002).

Die erfolgreich alignierten Bereiche der rRNA wurden mithilfe von Chimera durch einen Rigid Body Fit in die Elektronendichte der 3D-Rekonstruktion von *P. falciparum* gefittet und bildeten das Kernmodell der rRNA.

Anhand des generierten Kernmodells und der gefilterten Elektronendichte der 3D-Rekonstruktion (Butterworth low-pass Filter bei 4.0-4.2 Å) konnten die nicht alignierbaren und somit strukturell abweichenden Strukturen für die 5.8S rRNA und einen großen Bereich der 28S rRNA (Domäne I/II, Nukleotide 1-1600) modelliert werden.. In Abb. 17 ist die In Abb. 17

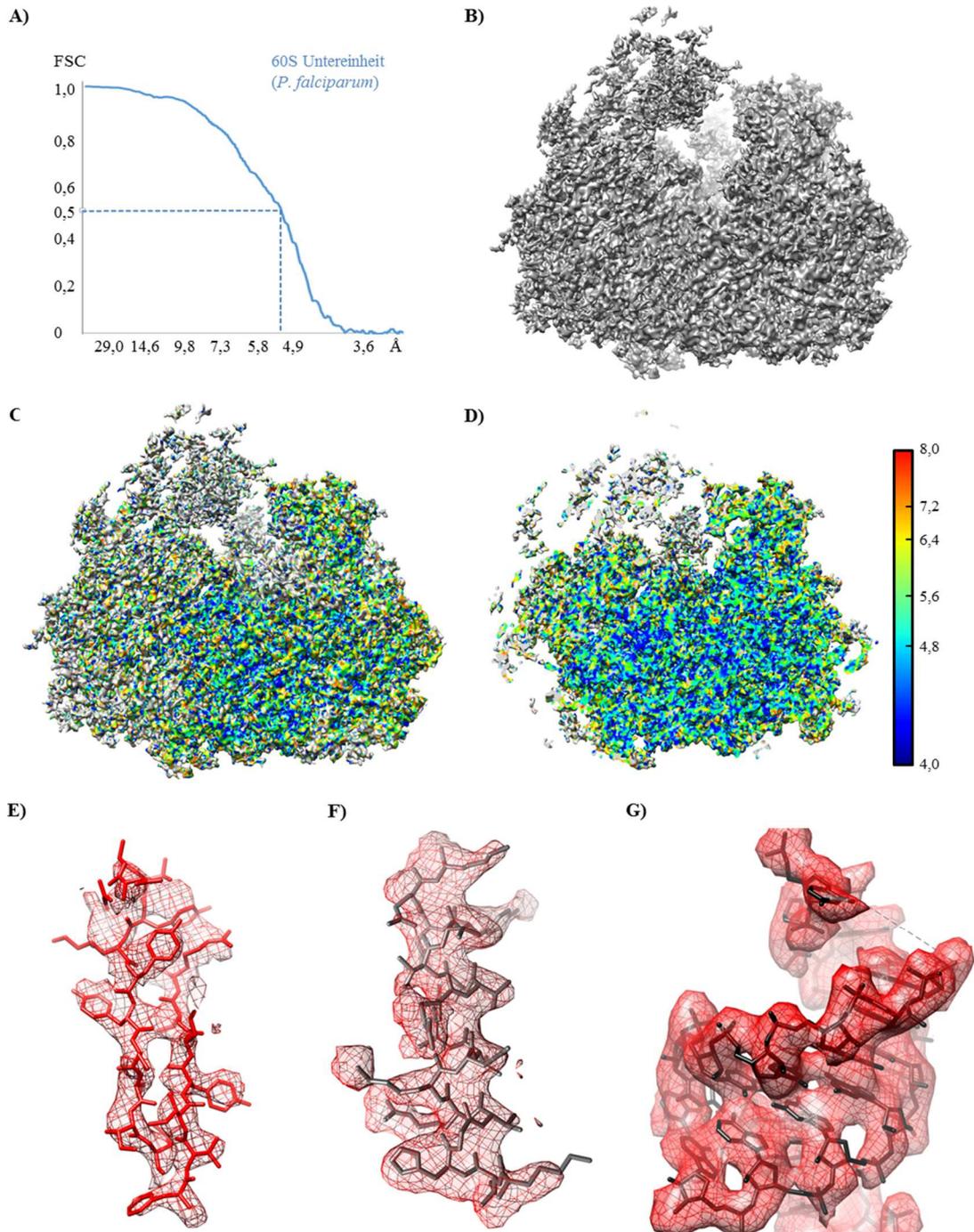


Abb. 16 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms (*P. falciparum*) (A) Das Diagramm zeigt die globale Auflösungskurve für die Elektronendichte der 60S Untereinheit des 80S Ribosoms (*P. falciparum*) auf Basis der Fourier-Shell-Korrelation (blaue durchgehende Linie). Die globale Auflösung bei $FSC_{0.5}$ beträgt 5,2 Å (gestrichelte blaue Linie). Näheres siehe Text. (B) Kryo-EM-Struktur des 80S Ribosom (*P. falciparum*). Die 3D-Rekonstruktion wurde mit einem Butterworth low-pass Filter bei 4.0-4.2 Å gefiltert. Näheres siehe Text. (C) Visualisierung der lokalen Auflösung an der Oberfläche vom 80S Ribosom (A) mit Hilfe von ResMap. Die zugehörige Farbleiste gibt die lokale Auflösung in Å an. Bei den grau dargestellten Bereichen liegt die Auflösung über 8 Å. (D) Querschnitt durch das 80S Ribosom (*P. falciparum*) aus (A) zur Visualisierung der lokalen Auflösung in den inneren Regionen. Die Perspektive entspricht der aus (A). Näheres siehe Text. (E-G) zeigen isolierte Elektronendichten mit den gefitteten Modellen für einen Teil eines β -Faltblattes (L15e) (E), einer α -Helix (L35) (F) und eines RNA-Segments (28S rRNA) (G). Näheres siehe Text.

In Abb. 17 ist die Sekundärstruktur der 5.8S rRNA und den bearbeiteten Bereich der 28S rRNA (Domäne I/II) schematisch dargestellt. Bei den nicht modellierbaren Bereichen (rot) handelte es sich um Regionen, die aufgrund der schlechten Auflösung der Elektronendichte, wahrscheinlich bedingt durch die Flexibilität dieser Bereiche, nicht modellierbar waren. Die de novo Modellierung der rRNA wurde hauptsächlich durch Dr. Anger durchgeführt.

Es wurde auch ein weiterer Bereich der 28S rRNA (1760-1768, 2088-2097) de novo modelliert (Abb. 17), da dieser Bereich eine Tertiärstruktur mit einer neuartigen HLH-Struktur in ES3L⁴ der 5.8S rRNA ausbildet (siehe 4.1.5, S.46).

Für die Homologie-Modellierung der ribosomalen Proteine wurde die Online-Software Swiss-Modell (Guex et al., 2009) benutzt. Als Template dienten die Kristallstrukturen des 80S Ribosoms von *S. cerevisiae* (Ben-Shem et al., 2011) und *T. thermophila* (Klinge et al., 2011). Die Proteinsequenzen der ribosomalen Proteine von *P. falciparum* wurden unter Nutzung der Online-Software NCBI Standard Protein Blast bestimmt (Sayers et al., 2011).

Die erhaltenen Homologie-Modelle der Proteine wurden mit Chimera durch einen Rigid Body Fit in die Elektronendichte der 3D-Rekonstruktion gefittet und anschließend in Coot genauer angepasst. Nicht modellierte Bereiche wurden anschließend de novo gebaut. Teilweise ließen sich Regionen der Proteine aufgrund einer zu geringen Auflösung der Elektronendichte jedoch nicht modellieren. Dabei handelte es sich meist um flexible Regionen ohne Sekundärstruktur.

In Tabelle 3 sind die Proteine, für welche in dieser Arbeit Modelle gebaut wurden aufgelistet. Die Proteine befinden sich mit Ausnahme von L41e in räumlicher Nähe zu der Domäne I und II der 28S rRNA. L41e befindet sich trotz der Kategorisierung als LSU-Protein größtenteils innerhalb einer Bindungstasche der 18S rRNA (Ben-Shem et al., 2011). Es weist in *P. falciparum* eine neuartige N-terminale Verlängerung von 14 AS auf (siehe 4.1.4, S.43) und wurde deshalb inklusive der umgebenden 18S rRNA modelliert (Abb. 19D).

Bezeichnung des Proteins ⁵	Länge der Proteinsequenz (in AS)	Modellierte Bereiche der Proteinsequenz	Konservierung der Proteinsequenz (vgl. zu <i>S. cerevisiae</i>)
L4	411	2-409	43%
L6e	221	1-107	27%
L15e	205	1-205	60%
L23	190	69-190	31%
L28	127	1-61, 92-127	existiert in <i>S. cerevisiae</i> nicht
L32e	131	1-131	44%
L29	124	1-124	44%
L37e	92	5-92	59%
L41e	39	3-39	46%

Tabelle 3 Auflistung der gebauten Protein-Modelle In dieser Tabelle sind die in dieser Arbeit gebauten Protein-Modelle aufgelistet. Des Weiteren sind die zugehörigen Längen der Proteinsequenzen, der erfolgreich modellierten Bereiche der Proteinsequenzen und der Grad der Konservierung für die Proteinsequenzen im Vergleich zu *S. cerevisiae* aufgelistet. Die Proteinsequenzen der Proteine von *S. cerevisiae* wurden der „Saccharomyces Genome Database“ entnommen (Cherry et al., 2011)

⁴ In dieser Arbeit erfolgt die Nomenklatur der Expansions-Segmente nach (Armache et al., 2010).

⁵ In dieser Arbeit erfolgte die Nomenklatur der rProteine nach (Jenner et al., 2012).

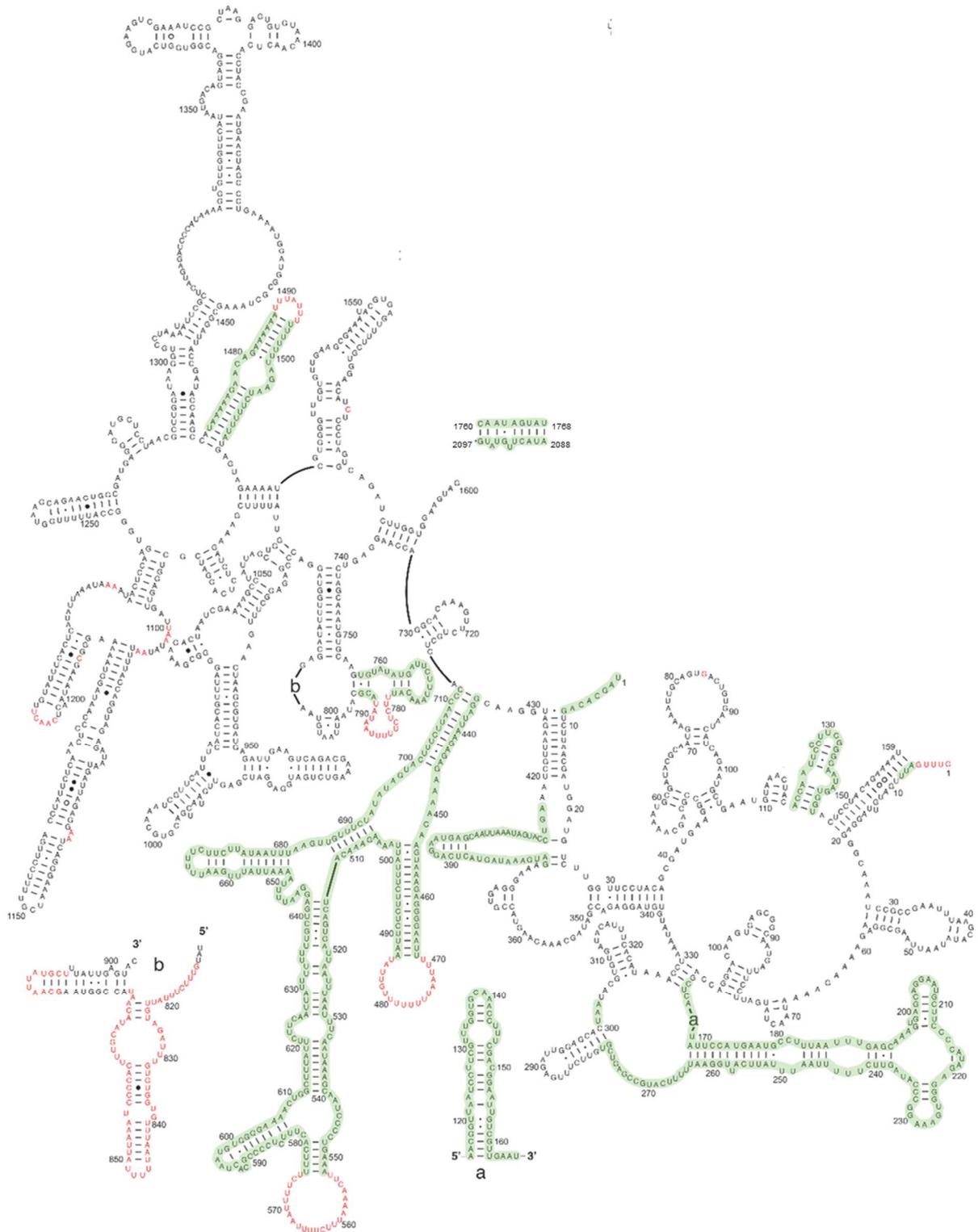


Abb. 17 Darstellung der Sekundärstrukturen für die 5.8S rRNA und Domänen I/II der 28S rRNA. Die Darstellung zeigt schematisch die Sekundärstrukturen für die 5.8S rRNA sowie für den modellierten Teil der 28S rRNA. Linien deuten Watson-Crick-Basen-Paarungen und Punkte sonstige Basenpaarungen an. In dieser Arbeit de novo modellierte Bereiche sind grün unterlegt und aufgrund zu geringer Auflösung nicht modellierbare Bereiche in rot dargestellt. Die restlichen Bereiche sind Bestandteil des mittels S2S-Assemble S2S erhaltenen konservierten Kernmodells der rRNA. Näheres siehe Text. Die Darstellung wurde der Datenbank „Comparative RNA Web Site“ entnommen (Cannone et al., 2002) und manuell entsprechend dem finalen rRNA Modell modifiziert.

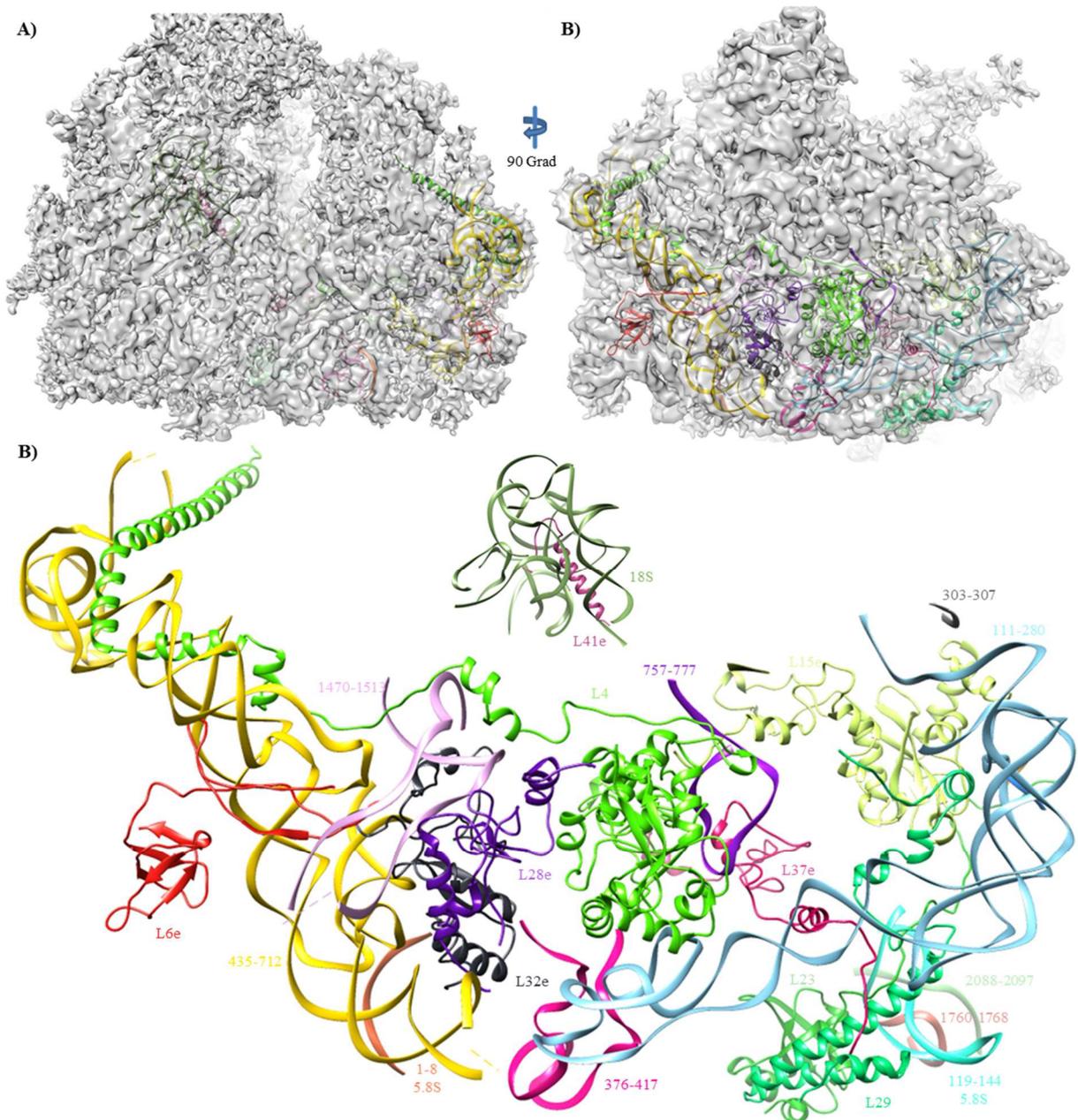


Abb. 18 Räumliche Anordnung der modellierten Proteine und rRNA im Ribosom. (A) Räumliche Anordnung der modellierten Proteine und de novo gebauten Bereiche der rRNA in der transparenten Elektronendichte des 80S Ribosoms (Gaus gefilterte Elektronendichte, Wert 1.26). Das generierte Kernmodell der rRNA ist aufgrund der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Bei der linken Hälfte des Ribosoms handelt es sich um die 40S Untereinheit und bei der rechten um die 60S Untereinheit. (B) Darstellung wie in (A), aber perspektivisch um 90 Grad nach links gedreht, um eine bessere Darstellung des hauptsächlich modellierten Bereiches zu erhalten. Das modellierte Protein L41e und der zugehörige modellierte Bereich der 18S rRNA sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt. (C) Darstellung wie in (B) ohne die Elektronendichte des Ribosoms und auf den modellierten Bereich der 80S Untereinheit vergrößert. Dies ermöglicht einen besseren Überblick über die räumliche Anordnung der modellierten Proteine und de novo gebauten Bereiche der rRNA in der 80S Untereinheit. L41e und der zugehörige Bereich der 18S rRNA sind vollständig halber mit abgebildet, befinden sich aber nicht in der richtigen räumlichen Anordnung zu den dargestellten modellierten Bereichen der 60S Untereinheit. Die in der Abbildung dargestellten Zahlen geben jeweils den modellierten Bereich der 28S und 5.8S rRNA an und sind in der Darstellung der Sekundärstruktur hervorgehoben (Abb. 17). Bei der Bezeichnung der Proteine wurde der Nomenklatur von (Jenner et al., 2012) gefolgt.

4.1.4 Ungewöhnliche N-terminale Verlängerung in der Proteinsequenz von L41e

Das Protein L41e ist in seiner Proteinsequenz sowie Proteinlänge von 25 AS in Eukaryoten hochkonserviert (Dresios et al., 2003) und bildet eine stark basische α -Helix aus (Ben-Shem et al., 2011). Zum Beispiel bestehen 17 der 25 Aminosäuren von L41e in *S. cerevisiae* aus Argininen und Lysininen (Dresios et al., 2003).

Das Protein formt in der Nähe des Decodierungszentrums eine Brücke zwischen der kleinen und großen Untereinheit (Ben-Shem et al., 2011). Es stellt Kontakte zur rRNA der 60S Untereinheit her, liegt aber größtenteils innerhalb einer Bindungstasche der 18S rRNA (ebd.), welche durch die konservierten Helices h27, h45 und h44 gebildet wird (Abb. 19D) (ebd.).

L41e ist in *S. cerevisiae* nicht essentiell und die genaue Funktion ist unbekannt (Dresios et al., 2003). Es wurde aber gezeigt, dass es mit der Proteinkinase CKII interagieren kann und dessen Aktivität reguliert (ebd.). Außerdem zeigt eine Deletion von L41e in *S. cerevisiae* einen Effekt auf die Peptidyl-Transferase-, die Translokations- und die Decodierungsaktivität des Ribosoms (ebd.). Zum Beispiel führt die Deletion von L41e zu einer Senkung der Peptidyl-Transferaseaktivität um den Faktor 3 (ebd.).

Bei der Bestimmung der Proteinsequenzen der ribosomalen Proteine von *P. falciparum* mithilfe von NCBI Standard Protein Blast wurde für L41e als einziges Ergebnis ein hypothetisches Protein mit der Länge von 39 AS erhalten. Dieses hypothetische Protein enthält neben den 25 hoch-konservierten Aminosäuren (75% Konservierung im vgl. zu *S. cerevisiae*) eine zusätzliche Verlängerung um 14 AS am N-terminalen Ende (Abb. 19G).

Da sich der konservierte Bereich und die N-terminale Verlängerung bis auf die ersten zwei AS gut in die Elektronendichte modellieren ließen, konnte bestätigt werden, dass es sich bei der hypothetischen Proteinsequenz um die Proteinsequenz von L41e handelte.

Die N-terminale Verlängerung von L41e wurde bisher in keinem anderen Organismus beschrieben.

In Abb. 19A ist das Modell von L41e in der Elektronendichte von *P. falciparum* in einem größeren räumlichen Ausschnitt dargestellt, um eine Vorstellung über die Position von L41e im Ribosom zu erhalten. Dabei sind neben L41e das modellierte Kernmodell der umgebende 18S rRNA sowie das Kernmodell der 28S rRNA dargestellt.

Der Vergleich des Modells von L41e in *P. falciparum* (Abb. 19B) und *S. cerevisiae* (Abb. 19C) zeigt, dass L41e in *P. falciparum* neben der konservierten α -Helix eine Verlängerung ohne Sekundärstruktur aufweist, welche der Form nach einem Haken ähnelt und aus den 14 neuen N-terminalen Aminosäuren gebildet wird und in die Bindungstasche der 18S rRNA hineinragt.

In der Biegung der Verlängerung, dessen Elektronendichte gut aufgelöst ist, bestehen zwei deutliche Kontakte zur 18S rRNA (Abb. 19E-F).

Der erste Kontakt wird durch das aus h28 herausgeklappte Nukleotid A1631 sowie den Aminosäuren Ser11 und Ala13 gebildet (Abb. 19E-F). Dieser Kontakt bildet die Spitze der Biegung und dadurch wirkt es, als wäre das Protein an dem herausgeklappten Nukleotid A1631 aufgehängt.

h28 dient als Drehlager für die Kopfdrotation der kleinen Untereinheit bei der Translation (Mohan et al., 2014, Fischer et al., 2010).

Der zweite Kontakt wird durch die drei übereinander gestackten Nukleotide A1027, A1030 und ES14S⁶ und G1792 aus h45 und den gut aufgelösten Seitenketten von Tyr8 und Lys10 gebildet (Abb. 19E-F).

⁶ In dieser Arbeit erfolgt die Nomenklatur der Expansions-Segmente nach (Armache et al., 2010)

Die Seitenkette von Lys9 ist in der Elektronendichte nicht aufgelöst und wurde daher in der am häufigsten auftretenden Konformation modelliert (Abb. 19E-F), liegt aber wahrscheinlich flexibel vor.

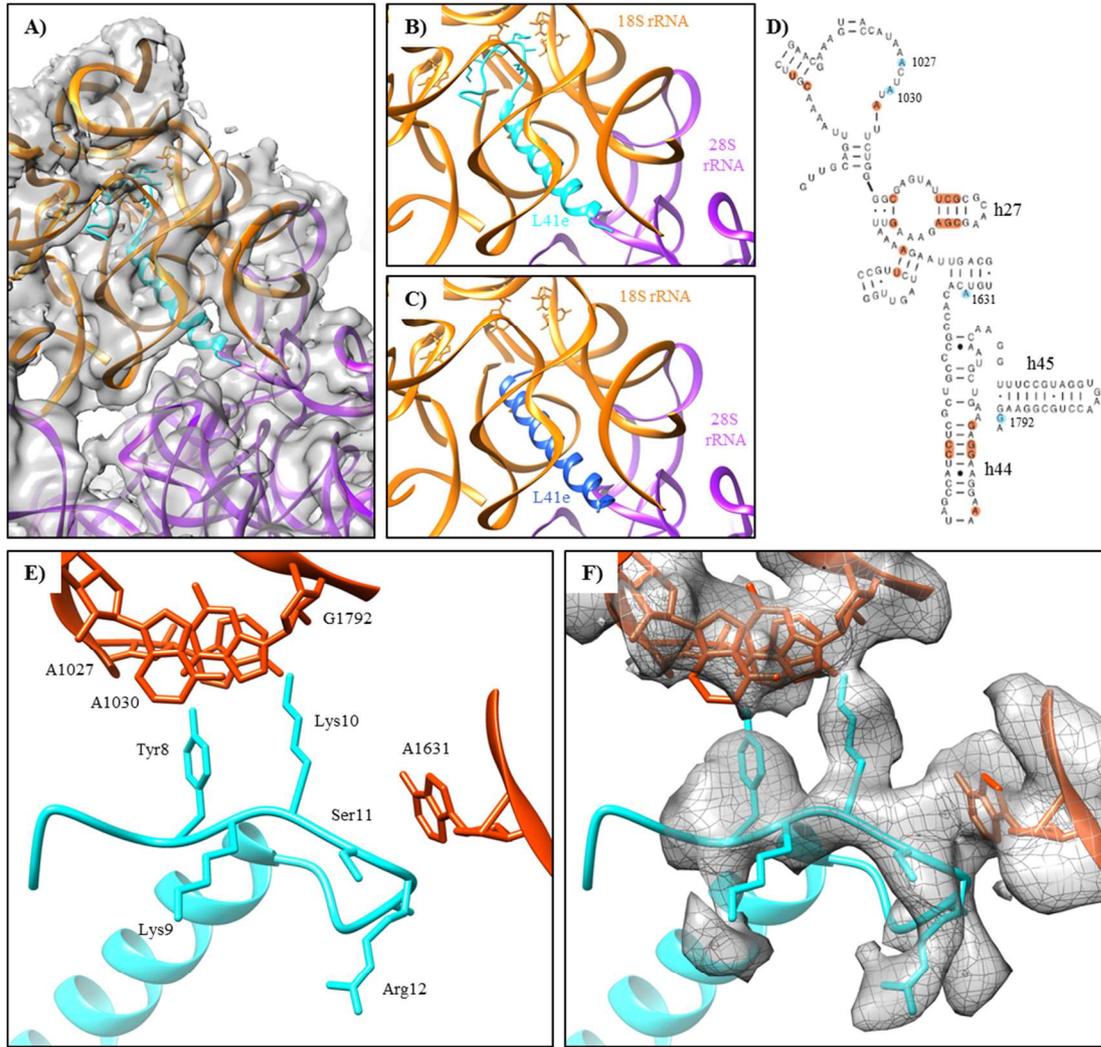
Bei A1631, A1027, A1030 und G1792 handelt es sich um in *S. cerevisiae* und *P. falciparum* konservierte Nukleotide (Abb. 19D), welche die gleiche räumliche Struktur im Ribosom annehmen (Daten nicht gezeigt). Somit liegt keine co-evolutionäre Entwicklung zwischen der N-terminalen Verlängerung von L41e und der 18S rRNA in *P. falciparum* vor.

Der restliche Bereich der Verlängerung (Met1-Arg7) ist deutlich schlechter aufgelöst und nur für His3 wurde eine gut zuordbare Elektronendichte für die Seitenkette erhalten (nicht gezeigt). Somit scheint dieser Bereich deutlich flexibler zu sein, als die übrigen Teile von L41e.

Ein Alignment gegen die 14 AS lange N-terminale Proteinsequenz von *P. falciparum* (Online-Software NCBI Standard Protein Blast, Sayers et al., 2011) zeigte, dass auch andere Organismen in verschiedenen Phyla diese Verlängerung aufweisen (Abb. 19G). Die gefundenen Phyla (Apicomplexa, Dinoflagellaten, Perkinsoza) gehören alle der Gruppe der Myzozoa an. Diese Gruppe ernährt sich durch Myzocytosis und bildet eine Gruppe im Taxon der Alveolata (ebd.).

Somit ist die N-terminale Verlängerung auf einen gemeinsamen Vorfahren in der Gruppe der Myzozoa zurückzuführen und da die Verlängerung während der Evolution in den verschiedenen Phyla erhalten blieb, verschafft sie einen Evolutionsvorteil.

Dabei ist der Evolutionsvorteil vermutlich auf die beiden beschriebenen Kontakte zurückzuführen, da die beteiligten Aminosäuren in Position 11 und 13 konserviert sowie Tyr8-Lys9-Lys10 (YKK) durchgehend konserviert sind (Abb. 19G) (Siehe 5.1.4, S.88).



G)

Proteinsequenz	AS	Organismus	Phylum	Protein
MAHGASRYKKSRK	25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		L41e
MAHGASRYKKAARK	39	<i>Plasmodium falciparum</i>	Apicomplexa	L41e
MSHGASRYKKAHAK	39	<i>Neospora caninum</i>	Apicomplexa	hypothetisch Prot.
MAHKSNPYKKAARS	39	<i>Theileria orientalis</i>	Apicomplexa	nicht charakterisiert
MAHKSNPYKKAARS	39	<i>Karlodinium veneticum</i>	Dinoflagellaten	nicht bekannt
MAHKSNPYKKAARS	39	<i>Oxyrrhis marina</i>	Dinoflagellaten	nicht bekannt
MAHKSNPYKKAARA	55	<i>Perkinsus marinus</i>	Perkinsozoa	L41e (putativ)

Abb. 19 Verlängerte Proteinstruktur für L41e in *P.falciparum*. (A) Darstellung des modellierten Proteins L41e sowie des umgebenden modellierten Kernmodells der 18S rRNA und des Kernmodells der 28S rRNA von *P. falciparum* in einer gefilterten Elektronendichte (Gauß-Filter, Chimera) des 80S Ribosoms. Im Falle der kleinen Untereinheit ist nur die Elektronendichte für den dargestellten Teil der 18S rRNA sichtbar. Näheres siehe Text. (B) Darstellung wie in (A) nur ohne Elektronendichte. (C) Darstellung wie in (B) nur mit dem Modell von L41e aus der Kristallstruktur von *S. cerevisiae* (PDB:3U5E). Näheres siehe Text. (D) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur für den L41e umgebenden und modellierten Bereich des Kernmodells der 18S rRNA für *P. falciparum*. Linien deuten Watson-Crick-Basen-Paarungen und Punkte sonstige Basenpaarungen an. Die Nummerierung der Basen folgt der Nummerierung von *S. cerevisiae* (PDB:3U5E). Nicht konservierte Nucleotide im Vergleich zu *S. cerevisiae* sind orange unterlegt. Die in (E-F) beschriebenen Kontakte zwischen L41e und der 18S rRNA sind blau unterlegt. Die Darstellung der Sekundärstruktur wurde der Datenbank „Comparative RNA Web Site“ entnommen (Cannone et al., 2002) und modifiziert. Näheres siehe Text. (E-F) Darstellung von L41e mit Fokus auf der de novo modellierten N-terminalen Verlängerung (H3-K14) und Kontakten zur 18S rRNA: mit (E) und ohne Elektronendichte (F). Näheres siehe Text. (G) Proteinsequenzen für L41e aus Organismen, in denen das Protein ebenfalls die N-terminale Verlängerung im Vergleich zu *S. cerevisiae* aufweist. Die 14 AS lange N-terminale Verlängerung ist räumlich von dem ansonsten hoch-konservierten C-terminalen Bereich von L41e getrennt. AS die von der Proteinsequenz in *P. falciparum* abweichen sind in rot dargestellt. Im Falle von *Perkinsus marinus* weist L41e auch eine C-terminale nicht dargestellte Verlängerung auf, daher beträgt die Proteinflänge in diesem Fall 55 AS. **Farbcode:** 18S rRNA (orange), 28S rRNA (lila), L41e (*P. falciparum*, cyan), L41e (*S. cerevisiae*, dunkelblau)

4.1.5 Ungewöhnliche HLH-Struktur in ES3L

Einige tertiäre RNA-Motive wie der Kink-Turn, Hook-Turn und C-Loop basieren auf einer als der Helix-Internal Loop-Helix-Struktur (HLH-Struktur) bekannten Sekundärstruktur (Hendrix et al., 2005, Klein et al., 2001).

Ein solche Sekundärstruktur wurde in dieser Arbeit auch im Expansionssegment (ES) von ES3L der 5.8S rRNA von *P. falciparum* identifiziert.⁷

Aufgrund der HLH-Struktur weist die Helix von ES3L in *P. falciparum* einen Knick auf (Abb. 20A und B), ganz im Gegensatz zu allen anderen betrachteten eukaryotischen Organismen⁸ in denen ES3L eine durchgehende Helix bildet (Abb. 20C).

Durch diesen Knick kommt es zu einer Positionierung des Endbereiches der Helix sowie des zugehörigen terminalen Loops an der Oberfläche des Ribosoms (Abb. 20A).

Der Endbereich der Helix und der terminale Loop bilden zahlreiche Kontakte mit den ribosomalen Protein L29 aus (Abb. 20D-E). Diese Kontakte stabilisieren wahrscheinlich die Struktur des terminalen Loops sowie die Positionierung der Helix.

Die neu positionierte Helix (terminaler Helix-Arm) von ES3L verläuft auch in großer räumlicher Nähe parallel zu einer α -Helix des Proteins L23 (K140-F151) (Abb. 20B). Allerdings sind bei der gegebenen Auflösung keine Kontakte zu erkennen (nicht dargestellt).

Der interne Loop der HLH-Struktur wird durch die beiden Nukleotide A139 und G140 in ES3L gebildet, welche weder eine Watson-Crick-Basen-Paarung noch einen sonstigen Kontakt mit den Nukleotiden des Gegenstranges ausbilden (Abb. 20F). Da die Elektronendichte der beiden Nukleotide gut aufgelöst ist, scheinen diese eine definierte Konformation anzunehmen (Abb. 20H u. K). Aufgrund der Struktur des Loops kommt es zu einem Knick im Phosphatrückgrat des Loops um ca. 90 Grad (Abb. 20B).

Die beiden Helix-Arme der HLH-Struktur werden durch die flankierenden Nukleotide des Loops gebildet, welche Watson-Crick-Basen-Paarungen mit dem Gegenstrang ausbilden und die Struktur des Loops stabilisieren (Abb. 20F). Die Achsen der beiden Helix-Arme stehen ungefähr im 50-60 Grad Winkel zueinander.

Neben der Stabilisierung durch die Watson-Crick-Basen-Paarungen der flankierenden Helix-Arme scheint auch eine Tertiärstruktur mit den beiden Nukleotide G2094 und U2095 der 28S rRNA die HLH-Struktur zu stabilisieren (Abb. 20F).

Dabei bildet die betreffende Region der 28S rRNA (Nukleotide 2088-2097) einen Bogen, um die notwendige räumliche Nähe für eine Interaktion mit der HLH-Struktur zu schaffen (Abb. 20B). In den anderen betrachteten eukaryotischen Organismen⁸ weist die betreffende Region der 28S rRNA einen geraden und daher räumlich entfernten Verlauf auf (Abb. 20C).

Das Nukleotid G2094 stackt mit A123, welches mit U138 ein flankierendes Watson-Crick-Basen-Paar zum Loop ausbildet (Abb. 20G-H). Eventuell wird durch das Stacking das Watson-Crick-Basen-Paar stabilisiert und somit auch die Struktur des Loops. Außerdem scheint auch ein Kontakt zwischen G2094 und G140 zu bestehen (Abb. 20G-H), der eventuell die Konformation von G140 stabilisiert.

Das Nukleotid U2095 bildet einen deutlichen Kontakt zu A139 aus (Abb. 20G-H) und stabilisiert dadurch wahrscheinlich ebenfalls dessen Konformation.

Somit scheinen G2094 und U2095 die Basenpaarung von A123/U138 sowie die definierten Konformationen von A139 sowie U138 zu stabilisieren und somit auch die Struktur des Loops.

⁷ In dieser Arbeit erfolgt die Nomenklatur der Expansions-Segmente nach (Armache et al., 2010).

⁸ Es wurden die Modelle von *H. sapiens* (PDB: 4V6X), *D. melanogaster* (PDB: 4V6W), *S. cerevisiae* (PDB: 4V88), *T. thermophila* (PDB: 4V8P) und *Trypanosoma brucei* (PDB: 4V8M) betrachtet.

Um welche Arten der Nicht-Watson-Crick-Basen-Paarung (Leontis et al., 2002) es sich bei den Kontakten handelt, ist bei der gegebenen Auflösung, aber nicht zu erkennen.

Bei niedrigem Konturlevel ist ein Kontakt zwischen Lys145 des Proteins L23 und U2095 zu erkennen (Abb. 20G, I), welcher wahrscheinlich die Konformation von U2095 stabilisiert.

Obwohl die Nukleotidsequenzen von ES3L sowie des relevanten Bereichs der 28S rRNA im A- und S-Typ größtenteils nicht konserviert sind, ließ sich für den S-Typ eine räumlich strukturell fast gleiche HLH-Struktur wie im A-Typ vorhersagen (Abb. 20, vgl. F und L).

Strukturell unterscheidet sich die HLH-Struktur im S- und A-Typ nur durch die Größe des Loops aufgrund der Insertion eines Cysteins zwischen den konservierten Adenosin und Guanin im S-Typ (A139/G140 im A-Typ) (Abb. 20, vgl. F und L).

Außerdem ist die Nukleotidsequenz im flankierenden terminalen Helix-Arme nicht konserviert. Da aber die Nukleotide durch das jeweils komplementäre Nukleotid ausgetauscht wurden, blieb die räumliche Struktur des Helix-Arms mit den zugehörigen Watson-Crick-Basenpaarungen mit großer Wahrscheinlichkeit erhalten (Abb. 20, vgl. F und L).

Sowohl die variierende Größe des Loops als der Austausch der komplementären Nukleotide bei Erhaltung der Helixstruktur sind auch in der HLH-Struktur des Kink-Turns bekannt (Klein et al., 2001). Dabei erfolgt im internen Loop des Kink-Turns (Länge 1-3 nt) ebenfalls ein Knick im Phosphatrückgrat, welcher zu einem Winkel von ca. 120 Grad zwischen den Achsen der beiden Helix-Armen führt (ebd.).

Somit ist anzunehmen, dass es in ES3L des S-Typs ebenfalls zur Ausbildung der beobachteten HLH-Struktur des A-Typs kommt.

Auch der Austausch von A121 in der HLH-Struktur des A-Typs durch U im S-Typ spricht nicht gegen eine Stabilisierung der HLH-Struktur durch die 28S rRNA, da bei einem Basen-Stacking wie im Falle von G2094/A121 nicht relevant ist, welche Basen am Stacking beteiligt sind.

Über eine mögliche Funktion der Neu-Positionierung des terminalen Helix-Arms von ES3L kann nur spekuliert werden. Er formt durch die Neu-Positionierung eine abgeflachte, plattformartige Struktur an der Oberfläche des Ribosoms (Abb. 20A) und befindet sich in räumlicher Nähe zu L23 und in engen Kontakt zu L29 (Abb. 20A, G-H). L23 und L29 bilden eine universale ribosomale Bindungsstelle für Proteine wie Sec61 und SRP (Pech et al., 2010), welche mit dem Ribosom am Tunnel-Exit interagieren. Die Funktion als universale Bindungsstelle ist dabei in Bakterien und Eukaryoten konserviert (ebd.).

Daher stellt ES3L eventuell als strukturelle Plattform eine Erweiterung der Bindungsstelle für *P. falciparum* spezifische Proteine dar oder moduliert die Funktion von L29.

Es soll abschließend erwähnt werden, dass der terminale Helix-Arm im S-Typ 8 nt länger ist als im A-Typ. Somit scheint die gebildete Plattform im S-Typ größer zu sein als im A-Typ.

Abb. 20 Ungewöhnliche HLH-Struktur im Expansions-Segment ES3L von *P. falciparum* (A) Darstellung des modellierten ES3L (5.8 rRNA, Nukleotid 119-144) und des beteiligten Bereichs der 28s rRNA (Nukleotid 2088-2097) in einer gefilterten Elektronendichte (Gauß-Filter, Chimera) des 80S Ribosoms. Ebenfalls sind die Proteine L29 und L23 dargestellt, welche ES3L flankieren. ES3L befindet sich auf der ER-Membran zugewandten Seite des Ribosoms und der Ausgang des Exit-Tunnel ist mit einem * markiert. Näheres siehe Text. (B) Der in (A) dargestellte, modellierte Bereich aus einer Perspektive, welche den Knick um ca. 90 Grad im internen Loop hervorhebt. L23 wurde auf den relevanten Bereich gekürzt. Die Nukleotide und Aminosäuren, welche die HLH-Struktur ausbilden sind dargestellt und werden in (F-K) näher beschrieben. Ebenfalls sind die Aminosäuren dargestellt, welche den terminalen Loop des ES stabilisieren und werden in (D-E) näher beschrieben. (C) Gleiche Darstellung wie in (B) nur für die rRNA und Proteine des Organismus *Sus scrofa domestica* (*S. s. domestica*) (PDB: 4W26, 4W27). (D-E) Darstellung des modellierten terminalen Loops des ES sowie der Seitenketten von L29, welche den Loop wahrscheinlich stabilisieren. Dargestellt ohne (D) und mit Elektronendichte (E). Außerdem macht L23 an dieser Stelle eine Biegung, welche nur in *P. falciparum* vorkommt und anscheinend durch den Kontakt zwischen Ser99/L23 und Arg64/L29 stabilisiert wird. (F) Schematische Darstellung der Kontakte innerhalb der HLH-Struktur sowie der stabilisierenden Tertiärstruktur. Abgeleitet aus der Elektronendichte. Durchgehende Linien stehen für Watson-Crick-Basenpaarungen und gepunktete Linien für Interaktion anderer Art. Zum Beispiel deutet die Elektronendichte darauf hin, dass G2094 und A122 miteinander stacken. (G-I) Darstellung der Tertiärstruktur, welche den internen Loops stabilisiert: ohne Elektronendichte (G) sowie mit Elektronendichte bei hohen (H) und niedrigen Konturlevel (I). Lys145/L23, welches eventuell Bestandteil der Tertiärstruktur ist, wurde gelb hervorgehoben. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde Nukleotid G140 nicht dargestellt. Näheres siehe Text. (J-K) Darstellung der Tertiärstruktur aus einer weiteren Perspektive ohne (J) und mit Elektronendichte (K). Zur besseren Übersichtlichkeit wurde U2095 nicht dargestellt. Näheres siehe Text. (L) Schematische und hypothetische Darstellung der vorhergesagten HLH-Struktur in ES3L des S-Typs. Abgeleitet aus der Sekundärstruktur der HLH-Struktur des A-Typs (F). Durchgehende Linien stehen für Watson-Crick-Basenpaarungen. **Farbcode:** L23 (grün), L29 (blau), 5.8S rRNA (orange), 28S rRNA (cyan), Elektronendichte *P. falciparum* (grau)

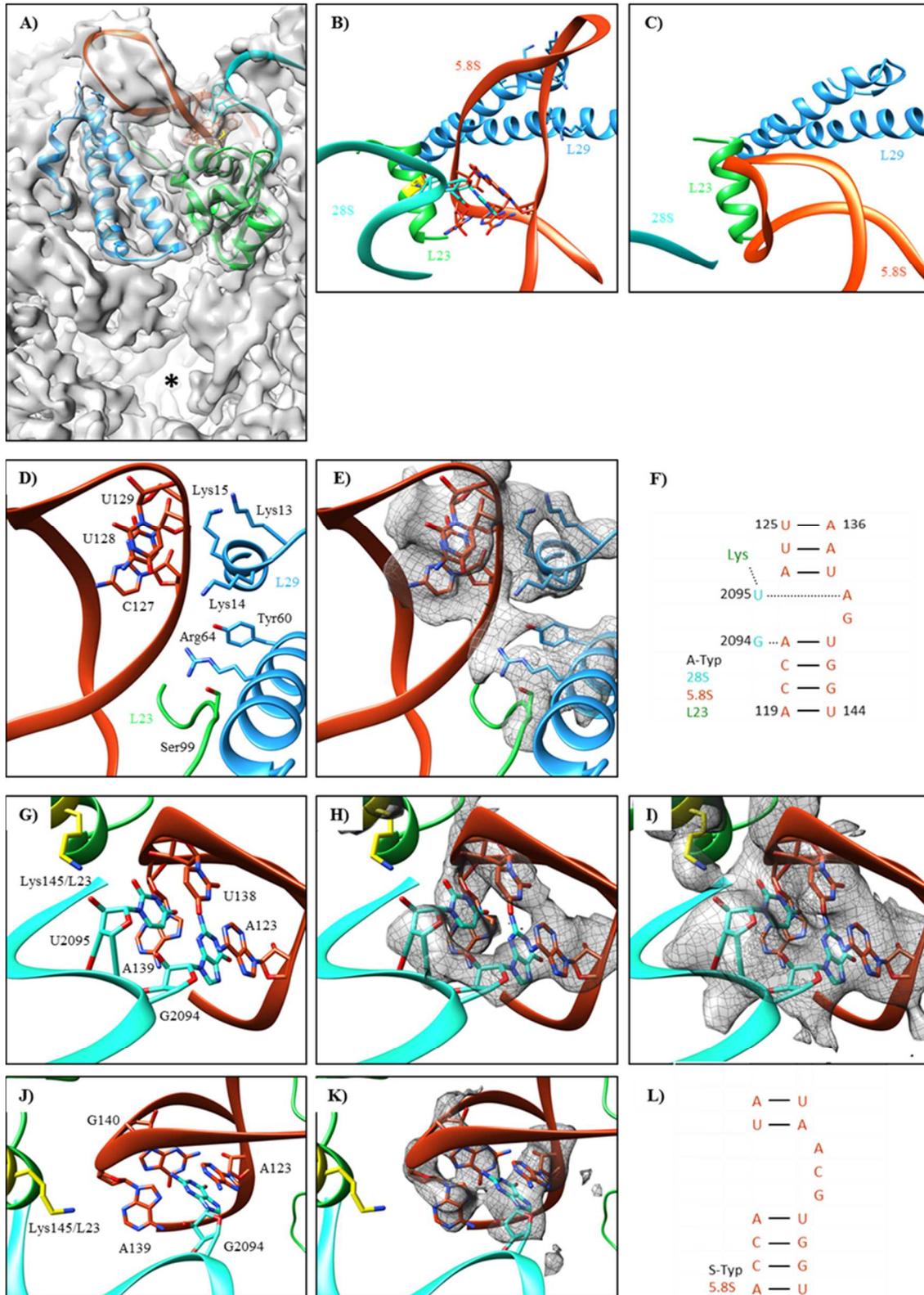


Abb. 20 Zugehörige Beschriftung der Abbildung siehe vorherige Seite.

4.2 Projekt II: 3D-Rekonstruktionen ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1

Das in der ER-Membran sitzende Type I Trans-Membran-Protein ERj1 weist eine teilweise Homologie zu Sec63 auf (Kroczyńska et al., 2004) und kann mit seinem zytosolischen Bereich an das Ribosom sowie mit seinem luminalen Bereich als HSP40 an das HSP70 BiP binden (Dudek et al., 2005). Auch zeigen *in vitro*-Translations-Assays, dass ERj1 die Translation des Ribosoms inhibiert, wenn BiP nicht an ERj1 gebunden vorliegt (Dudek et al., 2005). Es wird daher vermutet, dass ERj1 eine Rolle bei der Translokation von Proteinen in das ER spielt und dadurch eine Funktion in der Regulierung des Proteinzufusses erfüllt (siehe 1.5.2, S.13) (ebd.). Bisher existiert nur eine 3D-Rekonstruktion eines C-terminalen Fragments von ERj1 (ERj1C) bei niedriger Auslösung (20 Å), die nahe legt, dass ERj1 nahe am Tunnelausgang des Ribosoms bindet und die Bindungsstelle mit der von Sec61 am Ribosom überschneiden könnte (Blau et al., 2005). Somit könnten sich ERj1 und Sec61 eventuell in ihrer Bindung beeinflussen (ebd.).

Daher wurde in dieser Arbeit versucht die Bindung und Interaktion von ERj1 am Ribosom strukturell genauer zu untersuchen.

Hierfür sollten hochaufgelöste 3D-Rekonstruktionen verschiedener *in vitro*-Rekonstitutionen von Liganden/Ribosomen-Komplexen (ribosomale Komplexe) mithilfe der SP-Kryo-EM generiert werden: Ligand ERj1 am Ribosom (dimerer Komplex), Ligand ERj1 und Sec61 am Ribosom (tertiärer Komplex) und Ligand ERj1, Sec61 und BiP am Ribosom (quartärer Komplex).

Anhand dieser sollten die Interaktion von ERj1 mit dem 80S Ribosom, BiP und Sec61 auf struktureller Ebene näher untersucht werden und eventuell Rückschlüsse auf die Funktion von ERj1 gezogen werden.

Für die *in vitro*-Rekonstitutionen wurden Sec61 (*Canis lupus familiaris*), leere 80S Ribosomen (*Canis lupus familiaris*) und RNCs (DP120-RNC, *Triticum aestivum*) im Labor gereinigt. Gereinigtes, rekombinantes His₆-ERj1 (ERj1) und His₆-BiP (BiP) (*H. sapiens*) wurden durch den Kollaborationspartner AG Zimmermann zur Verfügung gestellt (Benedix et al., 2010).

4.2.1 Etablierung eines Protokolls für die *in vitro*-Rekonstitution

In einem ersten Schritt wurde ein Protokoll für die *in vitro*-Rekonstitution von ERj1 am 80S Ribosom (*C. l. familiaris*) etabliert.

Die Überprüfung des Erfolgs der *in vitro*-Rekonstitution erfolgte durch eine Zentrifugation des jeweiligen *in vitro*-Rekonstitution-Ansatzes (IR-Ansatz) durch ein 1M Saccharose-Kissen (Bindungstest). Im Bindungstest pelletieren nur die am ribosomalen Komplex erfolgreich gebundenen Liganden aufgrund der hohen Molekularmasse der Ribosomen durch das Saccharose-Kissen, wohingegen die ungebundenen Liganden aufgrund ihrer niedrigen Molekularmasse im Überstand verbleiben.

Aggregationsproblem von His₆-ERj1 (ERj1):

Bei den Bindungstests zeigte sich, dass ERj1 im Kontrollansatz auch in Abwesenheit der Ribosomen pelletierte (Daten nicht gezeigt). Somit schien ERj1 Aggregate zu bilden, welche aufgrund ihrer hohen Molekularmasse durch das Saccharose-Kissen pelletieren.

Um die ERj1-Präparation homogener zu bekommen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt, bei der Aggregate und oligomeres Protein von der monodispersen Probe abgetrennt werden kann. Die Gelfiltration lieferte drei Fraktionen für ERj1 (Abb. 21A). In allen Fraktionen pelletierte ERj1 bei einer Zentrifugation durch ein 1M Saccharose-Kissen zum größten Teil (Abb. 21B, vgl. Spur 1 und 2, 3 und 4, 5 und 6). Somit schienen sich bei der Zentrifugation größere Aggregate zu bilden, welche anschließend pelletierten.

Mehrere Gründe kommen in Frage, warum ERj1 in verschiedenen Fraktionen erhalten wurde und somit nicht homogen vorlag.

Erstens könnte ERj1 in unterschiedlicher Größe aufgrund unterschiedlicher Faltungszustände vorliegen (nativ/nicht nativ). Zweitens könnte ERj1 bei der Reinigung in Detergens-Mizellen unterschiedlicher Größe erhalten worden sein und drittens könnte ERj1 in kleineren Aggregaten unterschiedlicher Größe vorliegen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aggregationsneigung von ERj1 abhängig von der K^+ -Konzentration in den verwendeten Puffern war (Abb. 22A).

Im Kontrollansatz einer *in vitro*-Rekonstitution von ERj1 am 80S Ribosom (*C. l. familiaris*) mit einer K^+ -Konzentration von 500 mM im Rekonstitutionspuffer pelletierte deutlich weniger ERj1 durch das Saccharose-Kissen, als bei einer K^+ -Konzentration von 175 mM im Rekonstitutionspuffer (Abb. 22A, vgl. Spur 2 und 4). Allerdings erfolgte bei einer K^+ -Konzentration von 500 mM auch keine Bindung von ERj1 an das Ribosom, da sich die Bandenintensitäten von ERj1 in den Pellets des Kontrollansatzes und des IR-Ansatzes entsprachen (Abb. 22A, vgl. Spur 2 und 6).

Da bei einer K^+ -Konzentration von 500 mM immer noch ein großer Teil von ERj1 im Kontrollansatz pelletierte (Abb. 22A, Spur 2), wurden Konzentrationen zwischen 175 mM und 500 mM nicht weiter getestet. Auch wurde bereits gezeigt, dass ERj1 bei K^+ -Konzentrationen von über 200 mM nicht mehr an das Ribosom bindet (Dudek et al., 2002).

Letzendlich konnten die Aggregate durch eine Vorzentrifugation erfolgreich abgetrennt werden. Hierfür wurde ERj1 zu den für die anschließende *in vitro*-Rekonstitution verwendeten Rekonstitutionspuffer gegeben.

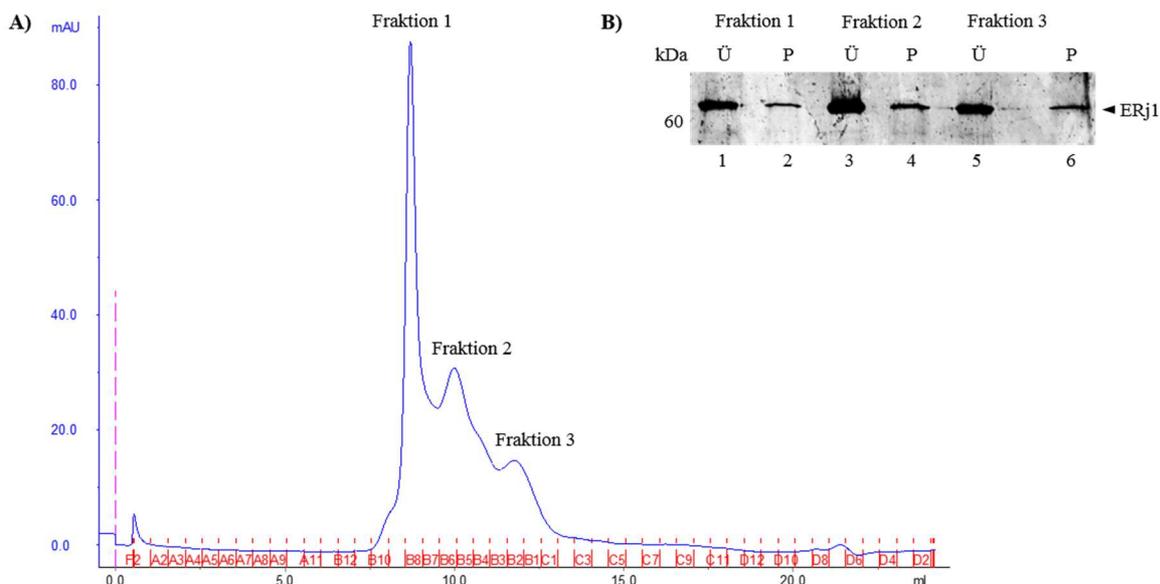


Abb. 21 Gelfiltration von ERj1. (A) Elutionsprofil der Gelfiltration. Für die Gelfiltration wurde eine 10/300 Superdex200 Säule verwendet. Es wurden 850 µg gereinigtes ERj1 im Aufbewahrungspuffer aufgetragen (20 mM HEPES/KOH (pH 7.55), 2 mM $MgCl_2$, 0,65% CHAPS, 500 mM KCl, 2 mM DTT). Dieser Puffer diente auch als Elutionspuffer. Die Sammlung erfolgte in 500 µl Schritten. Es wurden drei unterschiedliche Fraktionen erhalten. (B) SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) eines Aggregationstest für die drei erhaltenen Fraktionen der Gelfiltration. Es wurden jeweils 50 µl der Fraktionen auf 100 µl eines 1 M Saccharose-Kissen aufgetragen und zentrifugiert (80 krpm, 50 min., TLA100). Anschließend wurden der Überstand (Ü) und das Pellet (P) für ein SDS-PAGE verwendet. Näheres siehe Text.

Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (90 min, 100 krpm, TLA120) und der Überstand (Abb. 22B, Spur 3) für die *in vitro*-Rekonstitution genutzt. Die Aggregate wurden mit dem Pellet abgetrennt (Abb. 22B, Spur 4). Dabei entsprachen die Konditionen der Zentrifugation den Konditionen des Bindungstests.

Für die *in vitro*-Rekonstitution wurden die Ribosomen direkt in der benötigten Konzentration zu dem gewünschten Volumen des ERj1 enthaltenden aggregationsfreien Überstand hinzugegeben (IR-Ansatz) und der IR-Ansatz für 20 Minuten bei 30 Grad inkubiert.

Im anschließenden Bindungstest zeigte der zugehörige Kontrollansatz für die *in vitro*-Rekonstitution keine Aggregate im Pellet (Abb. 22B, Spur 6). ERj1 verblieb somit komplett im Überstand (Abb. 22B, Spur 5).

Für den Ansatz der *in vitro*-Rekonstitution wurde im Pellet eine deutliche Bande für ERj1 erhalten (Abb. 22B, Spur 8) und somit lag ERj1 am Ribosom gebunden vor.

Dabei erfolgte eine stöchiometrische Bindung von ERj1, allerdings wurde ERj1 nicht im Überschuss eingesetzt (Abb. 22B, Spur 7).

Das beschriebene Vorgehen der *in vitro*-Rekonstitution ließ sich erfolgreich auch auf die *in vitro*-Rekonstitution der im folgenden beschriebenen ribosomalen Komplexe übertragen, indem neben den entsprechenden Ribosomen auch die anderen Liganden dem ERj1 enthaltenden Überstand in der gewünschten Konzentration hinzugefügt wurden.

4.2.2 *In vitro*-Rekonstitutionen verschiedener ribosomaler Komplexe

In vitro-Rekonstitution am 80S Ribosom

Anhand des erfolgreich etablierten Protokolls für die *in vitro*-Rekonstitution ribosomaler Komplexe mit ERj1 wurden die *in vitro*-Rekonstitutionen des dimeren, tertiären und quartären Komplexes am 80S Ribosom durchgeführt. Die zugehörigen Bindungstests sind in Abb. 23 dargestellt.

Der Kontrollansatz zeigte, dass die Liganden (ERj1, Sec61 und BiP) in der Abwesenheit der Ribosomen bei der Zentrifugation im Überstand verblieben (Abb. 23A, Spur 1) und nicht pelletierten (Abb. 23A, Spur 2).

Die *in vitro*-Rekonstitutionen aller Komplexe waren erfolgreich, da die zugehörigen Proteinbanden des dimeren (Abb. 23A, Spur 10), tertiären (Abb. 23A, Spur 8) und quartären Komplexes (Abb. 23A, Spur 4) im Pellet zu erkennen waren.

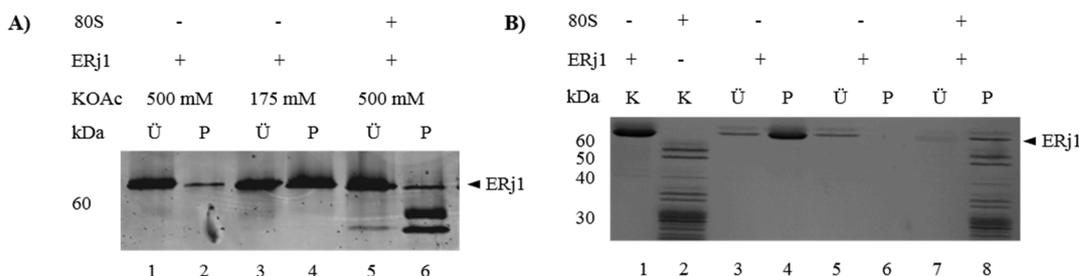


Abb. 22 Etablierung der *in vitro*-Rekonstitution für ERj1. (A) *In vitro*-Rekonstitutionen bei unterschiedlichen K^+ -Konzentrationen zeigen die Abhängigkeit der Aggregationsneigung von ERj1 von der K^+ -Konzentration. SDS-PAGE (Coomassie Färbung) für den zugehörigen Bindungstest. Es wurden jeweils der Überstand (Ü) und das Pellet (P) der Zentrifugation des Kontrollansatzes bei 500 mM KOAc (Spur 1 und 2), bei 175 mM KOAc (Spur 3 und 4) sowie des IR-Ansatzes bei 500 mM KOAc aufgetragen. Dabei wurde in den Kontrollansätzen ERj1 ohne Ribosomen eingesetzt. Näheres siehe Text. (B) SDS-PAGE (Coomassie Färbung) zum erfolgreichen Vorgehen der *in vitro*-Rekonstitution. Als Kontrolle und zur leichteren Zuordnung der Proteinbanden wurden äquivalente Mengen des für die Vorzentrifugation eingesetzten ERj1 (K, Spur 1) und der für die *in vitro*-Rekonstitution eingesetzten Ribosomen (K, Spur 2) direkt auf dem SDS-PAGE aufgetragen. Es wurde des Weiteren der Überstand (Ü) und das Pellet (P) der Vorzentrifugation (Spur 3 und 4) sowie der Zentrifugation des Kontrollansatzes für die *in vitro*-Rekonstitution (Spur 3 und 4) und der *in vitro*-Rekonstitution selber aufgetragen (Spur 3 und 4). Näheres siehe Text.

Dabei erfolgte die Bildung des quartären Komplexes nur in der Anwesenheit von ATP (Abb. 23A, vgl. Spur 4 und 6). Die ATP-Abhängigkeit für eine stabile Bindung von BiP an ERj1 wurde bereits gezeigt (Dudek et al., 2005).

Die Liganden zeigten allerdings leichte stöchiometrische Abweichungen in den ribosomalen Komplexen.

ERj1 lag in allen Komplexen leicht überstöchiometrisch gebunden vor (Abb. 23A, Spur 4, 8 und 10). Dies wurde bereits in früheren *in vitro*-Rekonstitutionen des dimeren Komplexes und ERj1 sowie BiP am 80S Ribosom beobachtet (Dudek et al., 2005). Auch im Falle der *in vitro*-Rekonstitution für die 3D-Rekonstitution des C-terminalen Fragments von ERj1 am 80S Ribosoms (Blau et al., 2005). Aufgrund der erfolgreichen 3D-Rekonstitution des C-terminalen Fragmentes von ERj1 am 80S Ribosom ist anzunehmen, dass ERj1 stöchiometrisch gebunden vorlag und sich mit Coomassie besser einfärben ließ als die anderen Proteine im Gel.

Sec61 lag im tertiären (Abb. 23A, Spur 8) und quartären Komplex (Abb. 23A, Spur 4) sowie der Kontroll-Rekonstitution von Sec61 am Ribosom (Abb. 23A, Spur 12) stöchiometrisch gebunden vor.

BiP lag im quartären Komplex leicht unterstöchiometrisch gebunden vor (Spur 4), bei einem deutlichen Überschuss im Überstand (Spur 3). Eventuell ist nur noch ein Teil von ERj1 oder BiP funktionell aktiv und in der Lage eine gegenseitige Bindung einzugehen.

Da die eingesetzten Ribosomen eine unter-stöchiometrische Verunreinigung mit Sec61 zeigten (Abb. 23A, Spur 10), wurde ein effizienteres Protokoll für die Reinigung der Ribosomen im Labor etabliert. Unter Verwendung der Sec61 freien 80S Ribosomen (*C. l. familiaris*) konnte die *in vitro*-Rekonstitution des binären Komplexes erfolgreich wiederholt werden (Abb. 23B). Es wurde dabei ein annähernd stöchiometrische Bindung von ERj1 an das Ribosom erhalten (Abb. 23B, Spur 2).

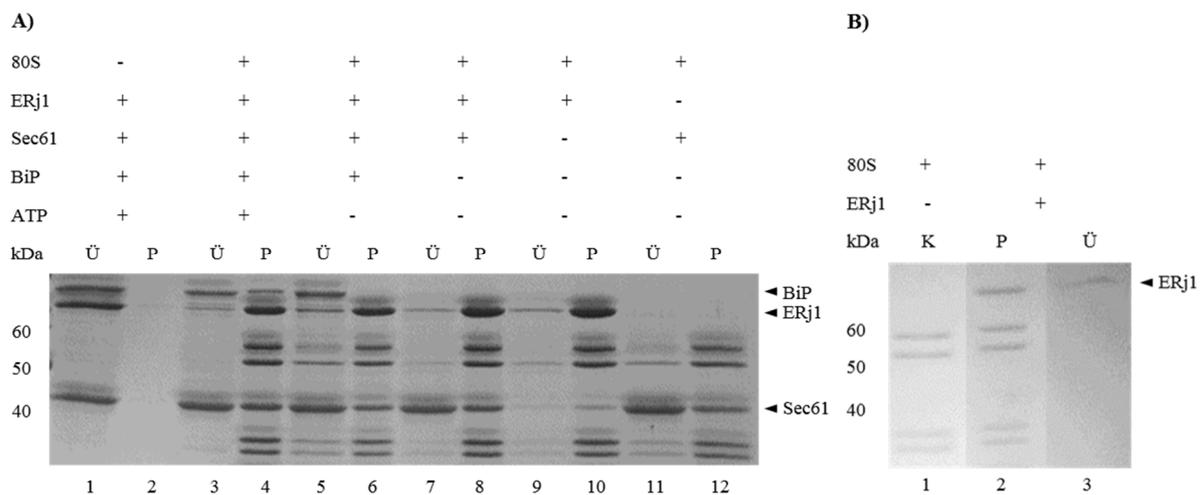


Abb. 23 In Vitro-Rekonstitutionen von ERj1, Sec61 und BiP am 80S Ribosom (A) Bindungstest für die *in vitro*-Rekonstitution des dimeren, tertiären und quartären Komplexes an Sec61 kontaminierten 80S Ribosomen. SDS-PAGE (Coomassie Färbung). Es wurden der Überstand (Ü) und das Pellet (P) von der Zentrifugation des Kontrollansatzes (ERj1, Sec61, BiP) (Spur 1 und 2) sowie der *in vitro*-Rekonstitutionen des quartären Komplexes in Anwesenheit von ATP (Spur 3 und 4), des quartären Komplexes in Abwesenheit von ATP (Spur 5 und 6), des tertiären Komplexes (Spur 7 und 8), des dimeren Komplexes (Spur 9 und 10) und der Kontroll-Rekonstruktion von Sec61 am Ribosom aufgetragen (Spur 11 und 12). Näheres siehe Text. (B) Bindungstest für die *in vitro*-Rekonstitution des dimeren Komplexes an Sec61 freien 80S Ribosomen. SDS-PAGE (Coomassie Färbung). Als Kontrolle (K, Spur 1) wurde eine zum IR-Ansatz äquivalente Menge an Ribosomen direkt auf dem Gel aufgetragen. Des Weiteren wurden das Pellet (P, Spur 2) und der Überstand (Ü, Spur 3) von der Zentrifugation der *in vitro*-Rekonstitution des dimeren Komplexes aufgetragen. Näheres siehe Text.

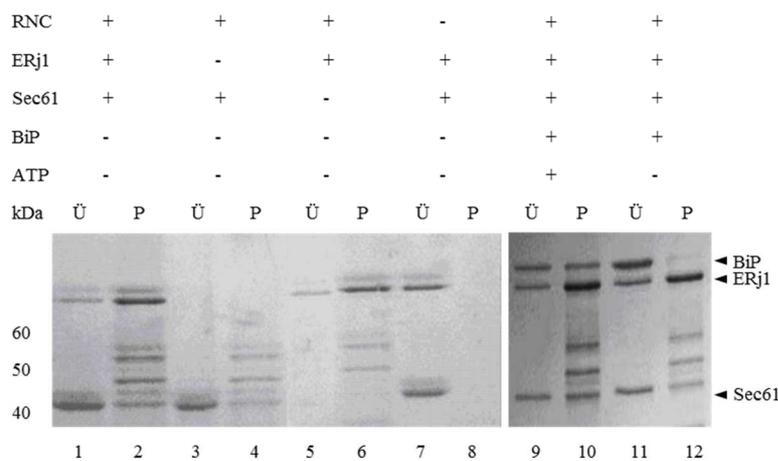
in vitro-Rekonstitution am RNC:

Die *in vitro*-Rekonstitution des dimeren, tertiären und quartären Komplexes am DP120-RNC waren ebenfalls erfolgreich, wie der zugehörige Bindungstest in Abb. 24 zeigt.

Während die Liganden in den Kontrollansätzen nicht pelletierten (ERj1 und Sec61: Abb. 24, Spur 8, BiP: Abb. 24, Spur 12), wurden die entsprechenden Proteinbanden der Liganden in den Pellets des dimeren (Abb. 24, Spur 6), des tertiären (Abb. 24, Spur 2) und des quartären Komplexes (Abb. 24, Spur 10) erhalten.

Die stöchiometrische Abweichung der Liganden ERj1 und Sec61 in den Komplexen entsprach denen am 80S Ribosom. ERj1 lag leicht überstöchiometrisch (Abb. 24, Spur 2, 6 und 10) und Sec61 stöchiometrisch (Abb. 24, Spur 2 und 10) gebunden vor.

Dagegen lag BiP an DP120 stöchiometrisch (Abb. 24, Spur 10) und nicht wie am 80S Ribosom unterstöchiometrisch gebunden vor (Abb. 23A, Spur 4).



Wahrscheinlich war die stöchiometrische Bindung auf eine höhere Konzentration an BiP für die *in vitro*-Rekonstitution zurückzuführen. Diese war, wie ein Vergleich der Bandenintensitäten zeigte, für die *in vitro*-Rekonstitution am DP120-RNC höher als am 80S Ribosom (vgl. Abb. 23A, Spur 3 und 4 mit Abb. 24, Spur 9 und 10). Es ist aber auch möglich, dass die naszierende, nicht gefaltete Peptid-Kette BiP bindet.

Abb. 24 *In vitro*-Rekonstitutionen ERj1, Sec61 und BiP am DP120-RNC SDS-PAGE (Coomassie Färbung) für den Bindungstest der *in vitro*-Rekonstitution des dimeren, tertiären und quartären Komplexes am DP120-RNC. Es wurden der Überstand (Ü) und das Pellet (P) von der Zentrifugation des Kontrollansatz (ERj1, Sec61) (Spur 7 und 8) sowie der *in vitro*-Rekonstitutionen des tertiären Komplexes (Spur 1 und 2), der Kontroll-Rekonstruktion von Sec61 am Ribosom (Spur 3 und 4), des dimeren Komplexes (Spur 5 und 6), des quartären Komplexes in Abwesenheit von ATP (Spur 9 und 10) und des quartären Komplexes in Anwesenheit von ATP (Spur 11 und 12) aufgetragen. Näheres siehe Text.

4.2.3 Simultane Bindung von ERj1 und Sec61 an das Ribosom

Die existierende 3D-Rekonstruktion von ERj1C am 80S Ribosom deutet darauf hin, dass die Bindungsstellen von ERj1C und Sec61 nahe des ribosomalen Ausgangstunnels eventuell überlappen (Blau et al., 2005). Somit besteht die Möglichkeit, dass ERj1 und Sec61 um die Bindung am Ribosom konkurrieren und sich gegenseitig verdrängen.

Die Ergebnisse der Bindungstests belegen eindeutig, dass die Bindung von ERj1 und Sec61 in den durchgeführten *in vitro*-Rekonstitutionen simultan an das 80S Ribosom und DP120-RNC erfolgte, da im tertiären und quartären Komplex eine leicht überstöchiometrische Bindung von ERj1 und eine stöchiometrische Bindung von Sec61 erhalten wurde (Abb. 23A, Spur 4 und 8 sowie Abb. 24, Spur 2 und 10).

Auch scheinen sich Sec61 und ERj1 bei ihrer Bindung an das Ribosom nicht gegenseitig zu beeinflussen, da im Falle der ribosomalen Komplexe am 80S Ribosom die Bandenintensitäten von ERj1 im binären und tertiären Komplex (Abb. 23A, vgl. Spur 10 und 8) sowie die Bandenintensitäten von Sec61 in der Kontroll-Rekonstitution für Sec61 und dem tertiären Komplex sich jeweils entsprachen (Abb. 23A, vgl. Spur 12 und 8).

Die Bindung von BiP an ERj1 zeigte dabei keinen Einfluss auf die Bindung von ERj1 und Sec61 an das Ribosom, da sich die jeweiligen Bandenintensitäten für ERj1 und Sec61 im tertiären und quartären Komplex ebenfalls entsprachen (vgl. Spur 8 und 4).

Im Falle des DP120-RNCs erfolgte, wie bereits erwähnt ebenfalls eine simultane Bindung von ERj1 und Sec61 an das Ribosom, allerdings war die Beurteilung der unabhängigen Bindung von ERj1 und Sec61 an das Ribosom weniger eindeutig, da anscheinend nicht die gleichen Mengen an IR-Ansatz auf das Gel aufgetragen wurden, wie an der Bandenintensität der RNCs zu erkennen ist (Abb. 24, vgl. Spur 2 und 3).

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei einer *in vitro*-Rekonstitution ERj1 und Sec61 simultan an das Ribosom binden und sich anscheinend nicht gegenseitig bei der Bindung an das Ribosom beeinflussen. Auch scheint BiP keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von ERj1 oder Sec61 zu haben

4.2.4 3D-Rekonstruktionen bei niedriger Auflösung (dimerer und quartärer Komplex)

Aufgrund der erfolgreichen Bindungstests der *in vitro*-Rekonstitutionen des dimeren, tertiären und quartären Komplexes wurden im nächsten Schritt 3D-Rekonstruktionen für die *in vitro*-Rekonstitutionen des dimeren und quartären Komplexes bei niedriger Auflösung generiert, um den Erfolg der *in vitro*-Rekonstitutionen zu überprüfen.

Hierfür erfolgten die Datensammlungen am FEI Tecnai G2 Spirit 120 kV Elektronenmikroskop, welches eine schnelle Datensammlung bei niedriger Auflösung ermöglichte.

Bei der anschließenden Datenprozessierung wurden nicht-ribosomale Partikel durch einen Sortierungsschritt gegen ein aus dem Hintergrundrauschen abgeleitetes Referenzvolumen (Noise-Volumen) aussortiert (Daten nicht gezeigt). Dieses Referenzvolumen weist nur in den äußeren Bereichen der Box eine Elektronendichte auf. Im Falle des quartären Komplexes erfolgte ein zweiter Sortierungsschritt, um ribosomale Partikel auszusortieren, welche keine ribosomale Extradichte aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Als Referenz diente das Volumen der gleichen Refinementrunde für den quartären Komplex, allerdings wurde die Elektronendichte für die nicht-ribosomale Extradichte mit dem Volumen Eraser in Chimera entfernt und die Kanten mit einem Low-Pass Gauß-Filter (Filterradius 0,3, SPIDER) geglättet.

In Abb. 25 sind die erhaltenen 3D-Rekonstruktionen für den dimeren (Abb. 25A) und quartären Komplex (Abb. 25B) am 80S Ribosom sowie den dimeren (Abb. 25C) und quartären Komplex (Abb. 25D) am DP120-RNC dargestellt. Als Vergleichsmöglichkeit sind ebenfalls die 3D-Rekonstruktionen vom C-terminalen Fragment von ERj1 (ERj1C) am 80S Ribosom von *C. l. familiaris* (Blau et al., 2005) (Abb. 25E) sowie Sec61 am RNC von *T. aestivum* (Gogala et al., 2014) (Abb. 25F) dargestellt.

Im Gegensatz zu der 3D-Rekonstruktion von ERj1C am 80S Ribosom (Abb. 25E) war weder für den dimeren Komplex am 80S Ribosom (Abb. 25A) noch am DP120-RNC (Abb. 25E) eine nicht-ribosomale Extradichte an der ER-Membran zugewandten Seite zu erkennen, bei der es sich um ERj1 handeln könnte. Eine stabile Bindung von ERj1 am Ribosom konnte unter den gewählten Bedingungen somit nicht gezeigt werden.

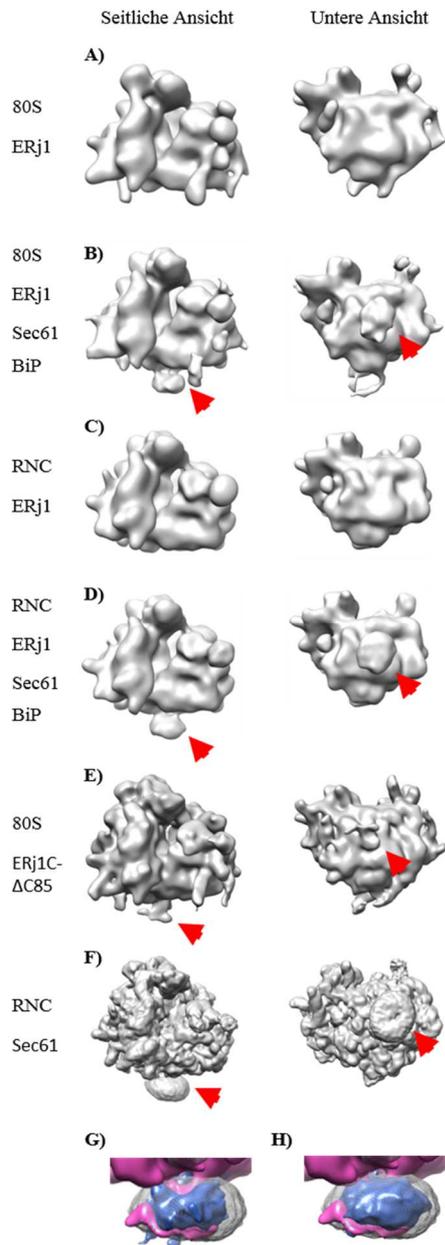
Für die fehlende Extradichte von ERj1 kommen hauptsächlich zwei Gründe in Frage.

Erstens könnte die *in vitro*-Rekonstitution erfolglos gewesen sein und ERj1 lag nur unspezifisch an dem Ribosom gebunden vor oder aggregierte in der Anwesenheit der Ribosomen.

Zweitens könnte die *in vitro*-Rekonstitution erfolgreich gewesen sein, aber ERj1 bei der Beladung der Grids für das Mikroskop dissoziieren oder eine so große Flexibilität aufweisen, dass eine Visualisierung mithilfe der SP-Kryo-EM nicht möglich ist. Eine ausführliche Diskussion der möglichen Gründe erfolgt später (siehe 5.2.3, S.91).

Dagegen wies der quartäre Komplex am 80S Ribosom (Abb. 25B) sowie am DP120-RNC (Abb. 25D) eine deutliche nicht-ribosomale Extradichte an der ER-Membran zugewandten Seite nahe dem Exit-Tunnel auf (Pfeilspitze zeigt auf die Extradichte).

Die Extradichte lag in der gleichen räumlichen Position wie in den beiden Vergleichsstrukturen (vgl. Abb. 25B, D E und F, Pfeilspitze zeigt auf die Extradichte).



Ein Rigid Body Fit der ribosomalen Komplexe der beiden Vergleichsstrukturen ERj1C (lila) am 80S Ribosom und Sec61 am RNC (graues Netz) mit dem quartären Komplex (blau) am 80S Ribosom (Abb. 25G) oder am DP120-RNC (Abb. 25H) zeigte, dass sich die nicht-ribosomalen Extradichten mit der Elektronendichte von Sec61 und der umgebenden Detergens/Lipid-Mizelle sowie der Elektronendichte für ERj1C überlagerten.

Somit könnte die Extradichte im Falle des quartären Komplexes neben Sec61 und der umgebenden Detergens/Lipid-Mizelle (Becker et al., 2009) auch ERj1 und BiP enthalten. Eine Zuordnung der Dichte war aber aufgrund der niedrigen Auflösung nicht möglich, daher wurde eine 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes am 80S Ribosom bei hoher Auflösung durchgeführt.

4.2.5 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes am 80S Ribosom bei hoher Auflösung

Da anhand der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes bei niedriger Auflösung nicht zuzuordnen war, ob die sichtbare nicht-ribosomale Extradichte neben Sec61 und der umgebenden Detergens/Lipid-Mizelle auch ERj1 oder BiP aufwies, wurde eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes am 80S Ribosom durchgeführt.

Die Datensammlung erfolgte am Tecnai Polara F30 TEM (Max-Plank-Institut, Berlin), da das Titan Krios TEM im Labor zu diesem Zeitpunkt noch nicht im Betrieb war. Die auf Fotofilm befindlichen Mikrographen wurden entwickelt, eingescannt und digitalisiert.

Abb. 25 3D-Rekonstruktionen des dimeren und quartären Komplexes bei niedriger Auflösung Für die Darstellung der 3D-Rekonstruktionen wurden diese mit einem Gauß-Filter (Chimera) gefiltert und anschließend aus zwei Perspektiven abgebildet. Die erste Perspektive zeigt eine seitliche Ansicht auf das Ribosom und die zweite Perspektive eine Ansicht auf die ER-Membran zugewandte Seite des Ribosoms mit Aufsicht auf den Ausgang des Exit-Tunnels. Die zweite Perspektive wurde durch eine 90 Grad Drehung des Ribosoms in der ersten Perspektive nach hinten erhalten. (A) 3D-Rekonstruktion des dimeren Komplexes am 80S Ribosom (23,800 Partikel, 34 Å). Näheres siehe Text. (B) 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes am 80S Ribosom (5,400 Partikel, 42 Å). Der rote Pfeil zeigt auf die nicht-ribosomale Extradichte. Näheres siehe Text. (C) 3D-Rekonstruktion des dimeren Komplexes am DP120-RNC (81,800 Partikel, 21 Å). Näheres siehe Text. (D) 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes am DP120-RNC (11,350 Partikel, 28 Å). Der rote Pfeil zeigt auf die nicht-ribosomale Extradichte. Näheres siehe Text. (E) 3D-Rekonstruktion von ERj1C-ΔC85 am 80S Ribosom (*C. l. familiaris*) (Blau et al., 2005). Der rote Pfeil zeigt auf die nicht-ribosomale Extradichte, bei der es sich um ERj1C-ΔC85 handelt. Näheres siehe Text. (F) 3D-Rekonstruktion von Sec61 sowie der umgebenden Detergens/Lipid-Mizelle am RNC (*T. aestivum*) (Gogala et al., 2014). Der rote Pfeil zeigt auf die nicht-ribosomalen Extradichte, bei der es sich um Sec61 handelt. Näheres siehe Text. (G) Überlagerung der Elektronendichten für den quartären Komplex am 80S Ribosom (B) (blau) sowie mit den Vergleichsstrukturen Sec61 am RNC (F) (graues Netz) und ERj1C-ΔC85 (E) (pink) enthaltenden Referenzstrukturen. Die Darstellung ist auf die ribosomale Extradichte der Komplexe fokussiert. Näheres siehe Text. (H) Darstellung wie in (F), nur dass der quartäre Komplex am DP120-RNC (D) (blau) anstatt am 80S Ribosom dargestellt ist. Näheres siehe Text.

Nach der Qualitätsbeurteilung der Mikrographen und der zugehörigen Powerspektren wurden 188 Mikrographen für die 3D-Rekonstruktion verwendet und 146.006 Partikel für das initiale Alignment bei dreifacher Dezimierung eingesetzt. Als Referenz für das erste initiale Alignment diente ein leeres 80S Ribosom (*S. cerevisiae*).

Im Zuge der finalen Datenprozessierung erfolgten zwei Sortierungsschritte nach dem Refinement (Abb. 26, RP 0).

Im ersten Sortierungsschritt wurde bei einer dreifachen Dezimierung gegen das Noise-Volumen sortiert und eine Subpopulation an nicht-ribosomalen Partikeln aussortiert (Abb. 26, RP 1.II).

Im zweiten Sortierungsschritt wurde gegen das Volumen der gleichen Refinementrunde sortiert, in welchem mithilfe des Werkzeuges „Volume Eraser“ (Software Chimera) die Elektronendichte für die nicht-ribosomale Extradichte entfernt wurde und die Kanten mit einem Low-Pass Gauß-Filter (Filterradius 0,3, SPIDER) geglättet wurden. Dadurch konnte eine Subpopulation an Ribosomen ohne ribosomale Extradichte aussortiert werden (Abb. 26, RP 2.II).

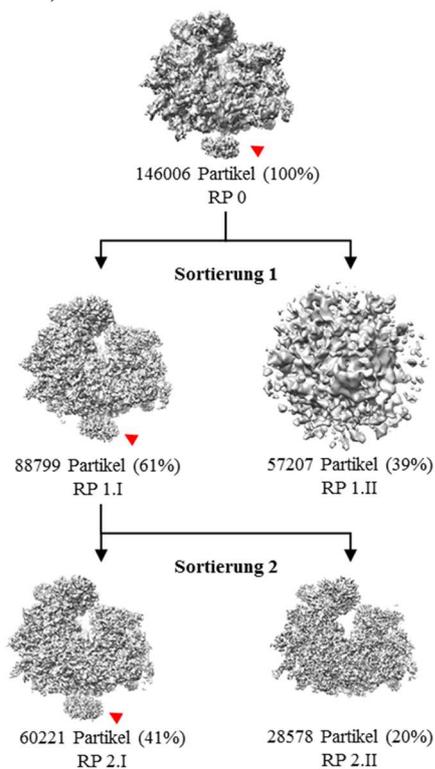


Abb. 26 Sortierungsschema des Datensatzes für den quartären Komplex. Das Schema zeigt die einzelnen Sortierungsschritte bei der Datenprozessierung. Dabei sind für jeden Sortierungsschritt die erhaltenen Subpopulationen, die gefilterten 3D-Rekonstruktionen (RP), die Anzahl der Partikel und in Klammern der Anteil der Partikel im Verhältnis zu der Ausgangspopulation RP 0 angegeben. Das 80S Ribosom ist in grau dargestellt. Der rote Pfeil zeigt auf die nicht-ribosomale Extradichte in den 3D-Rekonstruktionen. Näheres siehe Text.

Da bei weiteren Sortierungsversuchen keine weiteren Subpopulationen aussortiert werden konnten, schienen diese homogen zu sein.

Am Ende des finalen Refinements wurde für die Subpopulation mit der nicht-ribosomalen Extradichte (Abb. 26, RP 2.I, 60.221 Partikel) eine 3D-Rekonstruktion mit einer globalen Auflösung von 8.7 Å bei FSC_{0,5} erhalten (Abb. 27A und B). In der 3D-Rekonstruktion sind deutliche Kontakte zwischen der ribosomalen Extradichte und dem Ribosom zu erkennen.

Die lokale Auflösung zeigte, dass, wie erwartet, die Auflösung an der Oberfläche des Ribosoms schlechter war als in den inneren Regionen des Ribosoms (Abb. 27A und B). Dabei lag die Auflösung für die inneren Regionen größtenteils um die 8 Å.

Die lokale Auflösung für die nicht-ribosomale Extradichte war deutlich schlechter. Dies ist auf die flexible Bindung von Sec61 am Ribosom zurückzuführen (Becker et al., 2009).

In Abbildung Abb. 29L (S.59) ist die lokale Auflösung für die nicht-ribosomale Extradichte nochmals genauer dargestellt. Neben dem relativ gut aufgelösten Kontakt zwischen Sec61α und dem Ribosom (8-9 Å) sind auch deutlich schlechter aufgelöste Bereiche zu erkennen (über 13 Å) bei denen es sich um die Elektronendichte der umgebenden, heterogenen Detergens/Lipid-Mizelle handelt (ebd.).

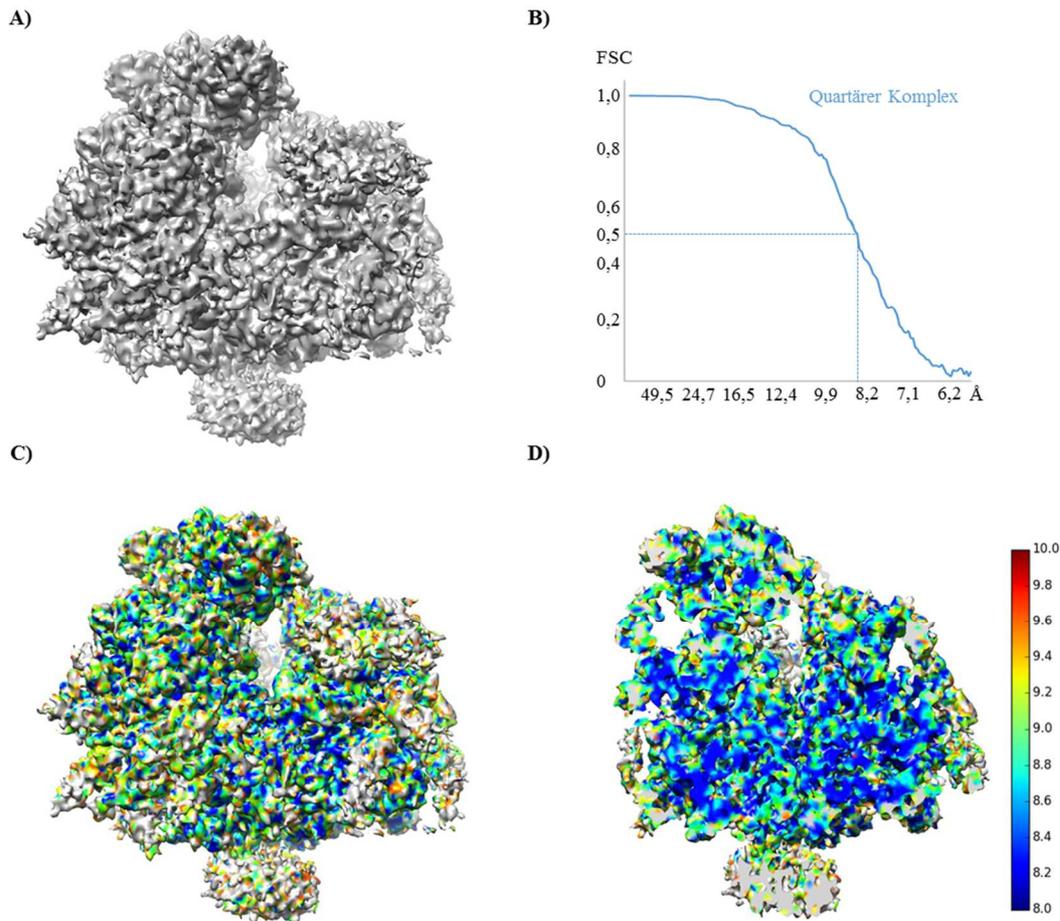


Abb. 27 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes (A) Kryo-EM-Struktur des quartären Komplexes. Die 3D-Rekonstruktion wurde mit einem Butterworth low-pass Filter bei 7.0-7.2 Å gefiltert. Näheres siehe Text. (B) Das Diagramm zeigt die globale Auflösungskurve für die Elektronendichte des quartären Komplexes auf Basis der Fourier-Shell-Korrelation (blaue durchgehende Linie). Die globale Auflösung bei $FSC_{0.5}$ beträgt 8,7 Å (gestrichelte blaue Linie). Näheres siehe Text. (C) Darstellung der lokalen Auflösung an der Oberfläche vom quartären Komplex aus (A) mit Hilfe von ResMap. Die zugehörige Farbleiste gibt die lokale Auflösung in Å an. Bei den grau dargestellten Bereichen liegt die Auflösung über 10 Å. Näheres siehe Text. (D) Querschnitt durch den quartären Komplex 80S Ribosom (*P. falciparum*) aus (A) zur Darstellung der lokalen Auflösung in den inneren Regionen. Die Perspektive entspricht der aus (A). Näheres siehe Text.

4.2.6 Keine Identifizierung von ERj1 oder BiP in der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes

Eingesetzte Modelle und 3D-Rekonstruktionen als Interpretationshilfe

Zur eindeutigen Identifizierung des Ribosoms und Sec61 wurde ein Modell der 60S Untereinheit mit gebundenem, inaktivem Sec61 in die Elektronendichte der 3D-Rekonstruktion mittels Rigid Body Fit gefittet (PDB: 4W24, 4W25, Voorhees et al., 2014). Für einen besseren Fit wurde dabei das Modell von Sec61 aus der PDB (4W24) isoliert und getrennt vom Modell des Ribosoms in die Elektronendichte gefittet.

Des Weiteren wurden drei 3D-Rekonstruktionen in die 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes mittels Rigid Body Fit gefittet und zur Interpretation herangezogen.

Bei der ersten handelte es sich um eine 3D-Rekonstruktion von Sec61/TRAP am 80S Ribosom (*C. l. familiaris*, 8.7Å bei $FSC_{0.5}$) (EMD-1528, Ménétret et al., 2008) und wurde herangezogen, da Sec61 und das Ribosom ebenfalls aus dem Organismus *C. l. familiaris* stammten.

Bei der zweiten handelte es sich um eine 3D-Rekonstruktion von Sec61 am RNC (*C. l. familiaris*/ *T. aestivum*, 6.5Å bei FSC_{0.5}) (EMD-1652, Becker et al., 2009) und wurde herangezogen, da es sich zu dem damaligen Zeitpunkt, um die 3D-Rekonstruktion mit der höchsten Auflösung von Sec61 am Ribosom handelte.

Bei der dritten handelte es sich ebenfalls um eine 3D-Rekonstruktion von Sec61 am Ribosom (*S. s. domesticus*, 3.4 Å bei FSC_{0.143}, Gold Standard) (EMD-2649, Voorhees et al., 2014) und wurde herangezogen, da es sich um die zurzeit existierende 3D-Rekonstruktion mit der höchsten Auflösung handelt. Dabei ist die fast atomare Auflösung auf den Einsatz der neuen DQE-Technologie bei der Datensammlung zurückzuführen. Für eine bessere Vergleichbarkeit in dieser Arbeit wurde die 3D-Rekonstruktion mit einem Gauß-Filter gefiltert, um eine ähnliche Auflösung wie bei der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes zu erhalten.

Im Folgenden wird die erste 3D-Rekonstruktion als eMénétret, die zweite als eBecker und die dritte gefilterte 3D-Rekonstruktion als eVoorhees bezeichnet.

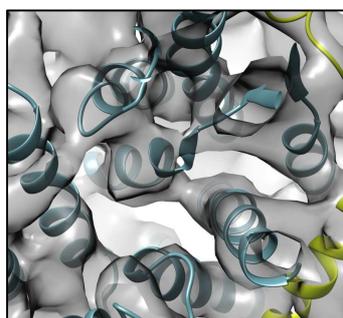


Abb. 28 Sec61 α in der Mizelle
Partielle Darstellung von Sec61 α (blau, PDB: 4W25) in der Elektronendichte des quartären Komplexes (grau). Näheres siehe Text.

In der nicht-ribosomalen Extradichte der 3D-Rekonstruktion ist trotz der Elektronendichte der umgebenden Detergens/Lipid-Mizelle (Becker et al., 2009) Sec61 gut zu erkennen. In Abb. 28 ist exemplarisch ein gut aufgelöster Bereich von Sec61 α im Bereich der Pore dargestellt.

Besser sind aber die aus der Mizelle herausragenden Regionen der Untereinheit Sec61 α (incl. Loop 6/7 und 8/9) sowie die N-terminale Helix der Untereinheit Sec61 γ aufgelöst (Abb. 29A) und zeigen eine lokale Auflösung um die 8-10 Å (Abb. 29L).

Der Loop 8/9 sowie dessen Kontakte zum Ribosom sind in der eigenen 3D-Rekonstruktion (Abb. 29A) besser aufgelöst als in eBecker (Abb. 29B) und in eMénétret (Abb. 29C). Die Auflösung erreicht aber nicht annähernd die von eVoorhees (ungefiltert).

Sec61 liegt in der inaktiven Konformation vor

Die Elektronendichte von Sec61 in der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes zeigt, soweit dies bei der gegebenen Auflösung zu beurteilen ist, keine Abweichungen von dem gefittetem Modell des inaktiven Sec61 (Abb. 28). Somit liegt Sec61 im inaktiven Zustand vor und zeigt keine abweichende Konformation.

Keine Identifizierung eines neuen Kontaktes zwischen der ribosomalen Extradichte und dem Ribosom

In der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes sind zahlreiche Kontakte zwischen der nicht-ribosomalen Extradichte und dem Ribosom zu erkennen.

Es bestehen sichtbare Kontakte zwischen dem Loop 6/7 und der rRNA sowie ein deutlich sichtbarer Kontakt zu L29 (K1, Abb. 29A). Interessanterweise berichten (Voorhees et al., 2014), dass der Kontakt zu L29 ebenfalls in der 3D-Rekonstruktion von (Becker et al., 2009) sichtbar ist, nicht aber in deren eigenen 3D-Rekonstruktion (Voorhees et al., 2014).

Auch in eMénétret ist der Kontakt erkennbar (K1, Abb. 29C). Somit wird der Kontakt entweder nicht immer ausgebildet oder es handelt sich um einen unspezifischen Kontakt bedingt durch die schlechtere Auflösung der eigenen 3D-Rekonstruktion, der 3D-Rekonstruktion von (Becker et al., 2009) und der 3D-Rekonstruktion von (Ménétret et al., 2008).

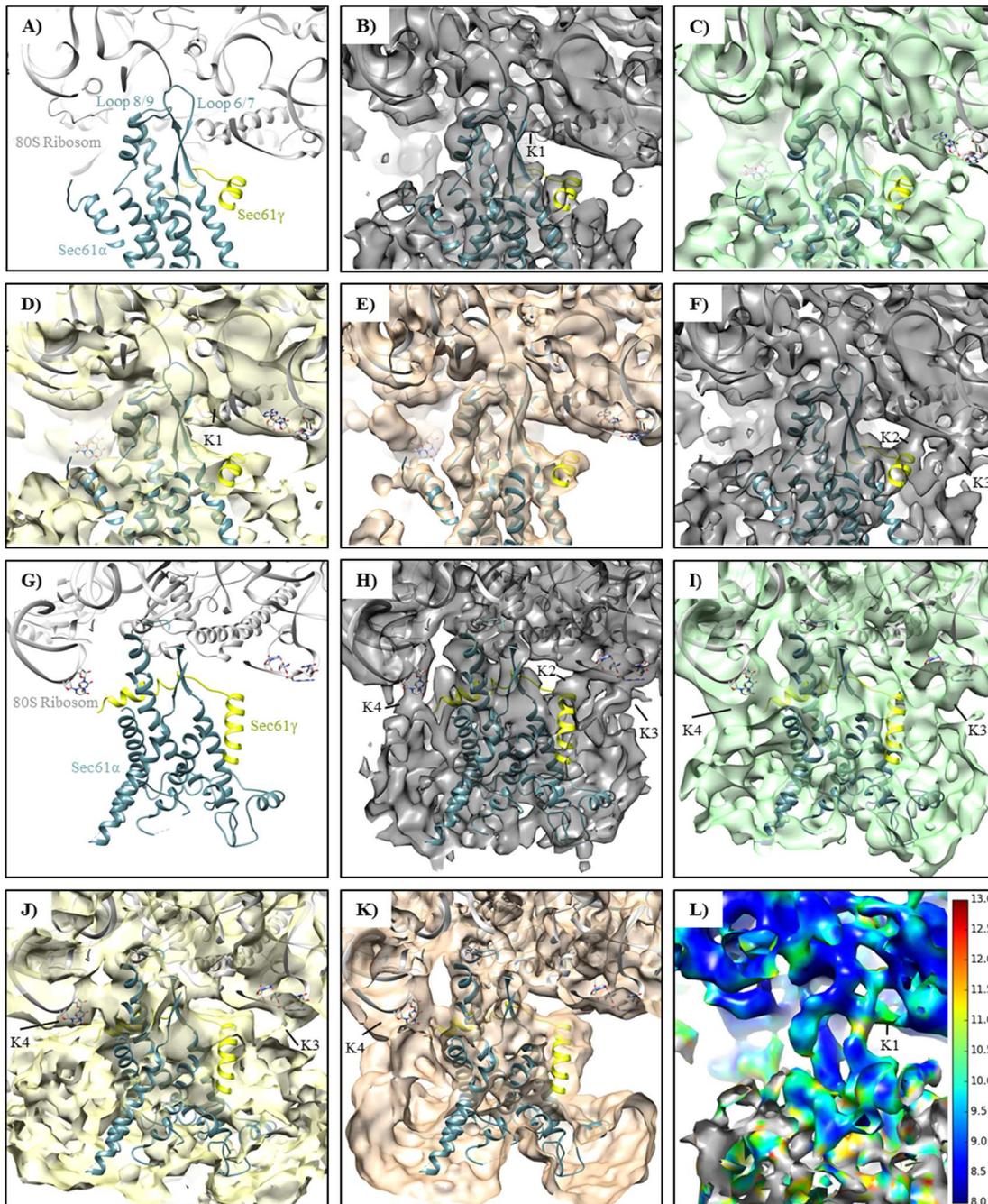


Abb. 29 Kontakte der nicht-ribosomalen Extradichte zum Ribosom. Die Darstellung der nicht ribosomalen Extradichte am 80S Ribosom erfolgt auch in den zwei Perspektiven (A-F) und (G-K). (A u. G) Modell von Sec61 am 80S Ribosom (PDB: 4W24, 4W25, Voorhees et al., 2014). (B u. H) Modell aus (A) in der Elektronendichte von der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes. (C u. I) Modell aus (A) in der Elektronendichte von der 3D-Rekonstruktion von Sec61 (*C. l. familiaris*) am RNC (Weizen) (EMD-1652, Becker et al., 2009). (D u. J) Modell aus (A) in der Elektronendichte von der 3D-Rekonstruktion von Sec61/TRAP am 80S Ribosom (*C. l. familiaris*) (EMD-1528, Ménétret et al., 2008). (E u. K) Modell aus (A) in der Elektronendichte von der 3D-Rekonstruktion von Sec61 am 80S Ribosom (*S. s. domesticus*) (EMD-2649, Voorhees et al., 2014) (E). Die Elektronendichte ist Gauß-gefiltert. (F) Gleiche Darstellung wie in (A) nur bei niedrigerem Konturlevel. (L) Lokale Auflösung der nicht-ribosomalen Extradichte aus sehr ähnlicher Perspektive zu (A u. B) mit Hilfe von ResMap. Die zugehörige Farbleiste gibt die lokale Auflösung in Å an. Bei den grau dargestellten Bereichen liegt die Auflösung über 13 Å. **K1-4** heben bestimmte Kontakte zwischen der Extradichte und dem Ribosom hervor: K1 bezeichnet den Kontakt von Secα zu L29, K2 den Kontakt von der N-terminalen Helix von Secγ zum Ribosom, K3 und K4 Kontakte von der Mizelle zu der 28S rRNA. Dabei können dem Kontakt K4 die beiden herausgeklappten Nukleotide der 28S rRNA zugeordnet werden (H). **Farbcode:** Modell von 80S Ribosom (grau), von Sec61α (blau), Sec61γ (gelb). Elektronendichte der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes (grau), von eBecker (grün), von eMénétret (gelb), eVoorhees (hell-braun).

Bei einem niedrigeren Konturlevel sind neben einem Kontakt der N-terminalen Helix von Sec61 γ (K2, Abb. 29F und H) ebenfalls Kontakte der ribosomalen Extradichte zu dem Ribosom zu erkennen, die nicht auf Sec61 zurückzuführen sind (K3 und K4, Abb. 29F und H). Diese Kontakte wurden aber auch in den anderen 3D-Rekonstruktionen erhalten (K3 und K4, Abb. 29I und J). Daher handelt es sich anscheinend, um unspezifische Kontakte zwischen der Detergens/Lipid-Mizelle und dem Ribosom.

Somit konnte kein neuer Kontakt zwischen der nicht-ribosomalen Extradichte und dem Ribosom identifiziert werden, welcher auf eine Bindung von ERj1 an das Ribosom hinweisen würde.

Keine Identifizierung von ERj1 als Bestandteil der Mizelle

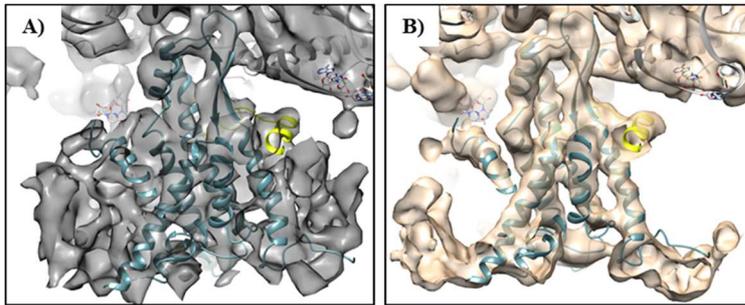


Abb. 30 Extradichte besteht zu großen Teilen aus Detergens/Lipid-Mizelle. Vergleich der 3D-Rekonstruktion (A) des quartären Komplexes und (B) von eVoorhees verdeutlicht die Größe der Bereiche in der nicht-ribosomalen Extradichte des quartären Komplexes, welche durch die Elektronendichte der Detergens/Lipidmizelle gebildet werden. Näheres siehe Text. **Farbcode:** siehe Farbcode von Abb. 29

Ein Vergleich der eigenen 3D-Rekonstruktion (Abb. 29H) mit der von eBecker zeigt (Abb. 29I), dass keine nennenswerten Unterschiede in der Form der nicht-ribosomalen Extradichte bestehen. Dies deutet darauf hin, dass die nicht-ribosomale Extradichte nur aus Sec61 und der umgebenden Detergens/Lipid-Mizelle besteht und kein weiteres Protein enthält.

Allerdings zeigt ein Vergleich der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes (Abb. 30A) mit der von eVoorhees (Abb. 30B), dass die Elektronendichte der Detergens/Lipid-Mizelle große Teile der nicht-ribosomalen Extradichte ausmacht und genügend Platz für die Transmembranhelix von ERj1 bieten würde. Daher kann besonders unter der Berücksichtigung, dass die Transmembranhelix von Sec γ auch kaum aufzulösen war, bei der gegebenen Auflösung nicht sicher ausgeschlossen werden, dass ERj1 nicht doch Bestandteil der ribosomalen Extradichte ist.

4.3 Projekt III: 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC

Bei ER-Stress kommt es im Zuge der UPR zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors XBP1 durch einen unkonventionellen Spleißvorgang der mRNA *Xbp1u* durch den Stress-Sensor IRE1 (Yoshida et al., 2001). Die gespleißte mRNA *Xbp1s* codiert für den in der UPR aktiven Transkriptionsfaktor XBP1s (ebd.).

Für den effizienten Spleißvorgang muss die mRNA *Xbp1u* an der ER-Membran lokalisiert werden (Yanagitani et al., 2009). Im Falle von *Xbp1u* in *H. sapiens* (hXbp1u) konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierung über einen vorübergehend translationsarretierten RNC (hXBP1u-RNC) erfolgt (Yanagitani et al., 2011). Dabei erfolgt die Bindung an die ER-Membran über eine hydrophobe Region HR2 nahe dem C-terminalen Ende der naszierenden Kette (Yanagitani et al., 2009). Durch den Translationsarrest wird ausreichend Zeit für die Lokalisierung gegeben und der Translationsarrest wird durch eine in Säugern konservierte C-terminale Arrestsequenz in XBP1u (hXBP1u) ausgelöst (Yanagitani et al., 2011).

In dieser Arbeit konnte unter Nutzung der SP-Kryo-EM erfolgreich eine 3D-Rekonstruktion eines RNC mit dem Arrestpeptid hXBP1u generiert werden (hXBP1-RNC). Das Arrestpeptid wies die Mutation S255A auf, die zu einer Verstärkung des Translationsarrestes führt (ebd.). Anhand der 3D-Rekonstruktion konnten relevante strukturelle Informationen herausgearbeitet werden, die als Basis zur Erklärung eines molekularen Mechanismus dienen (siehe 5.3.3, S97).

Des Weiteren konnte in der Arbeit ein translationsarretierter RNC (fXBP1-RNC) in *D. melanogaster* *in vitro* generiert werden.

Dies legt unter der Berücksichtigung weiterer Literaturrecherchen nahe, dass die Lokalisierung von *Xbp1u* an der ER-Membran via RNC-Komplex im Reich der Tiere konserviert ist (siehe 5.3.5, S.100).

Bisher war nur bekannt, dass die mRNA des Orthologs in *D. melanogaster* (fXbp1u) ebenfalls durch IRE1 gespleißt wird und die gespleißte mRNA für den aktiven Transkriptionsfaktor in der UPR codiert (Plongthongkum et al., 2007, Souid et al., 2007, Ryoo et al., 2007).

4.3.1 fXBP1u weist eine ähnlich hydrophobe Region wie HR2 auf

In einer Sequenzanalyse konnten in fXbp1u keine Peptidsequenzen identifiziert werden, welche Ähnlichkeiten zu HR2 oder der Arrestsequenz in hXBP1 aufwiesen.

Hydrophobizitätsprofile für die Orthologe von XBP1u in *H. sapiens* und *D. melanogaster* zeigen aber, dass das Ortholog in *D. melanogaster* eine ähnlich starke hydrophobe Region bei annähernd gleichem Abstand zum C-terminalen Ende wie HR2 in *H. sapiens* aufweist (Abb. 31). Eine etwas schwächere hydrophobe Region weist auch *C. elegans* auf (Abb. 31), für dessen Ortholog ebenfalls gezeigt wurde, dass es IRE1 abhängig gespleißt wird (Calfon et al., 2002). Daher wurde in der Arbeit versucht, *in vitro* einen fXBP1-RNC Komplex zu erzeugen. Dies wäre ein Hinweis auf die Existenz einer Arrestsequenz in fXBP1u.

4.3.2 Optimierung der *in vitro*-Translation für die Generierung von XBP1u-RNCs

Die Generierung der XBP1u-RNCs wurde in zellfreien Translationssystemen durchgeführt. Für die Generierung von hXBP1-RNC wurde der etablierte Reticulozyten-Extrakt von *O. cuniculus* (Kit Rabbit Reticulocyte Lysate System, Promega) verwendet und für fXBP1-RNC ein selbst hergestellter Extrakt aus Fliegenembryonen (Dr. Anger, Prof. Klaus Förstemann).

Für die *in vitro*-Translation wurden gekappte mRNA-Konstrukte eingesetzt, welche alle nach dem gleichen Prinzip aufgebaut waren (Abb. 32A). Die Konstrukte codierten für ein Fusionsprotein, in welchem die Peptidsequenz von XBP1u N-terminal mit einem FLAG- und His₈- sowie C-terminal mit einem HA-Tag fusioniert wurde (Abb. 32A).

Der FLAG-Tag ermöglichte die Detektion der Peptidyl-tRNA des RNC, des durch eine Hydrolyse von der Peptidyl-tRNA freigesetzten Peptids (F-Peptid) und des vollständig translatierten Peptids (V-Peptid) im Western Blot. Der HA-Tag diente zur sicheren Unterscheidung des F- und V-Peptids im Western Blot und der His₈-Tag zur späteren Aufreinigung des RNC.

Die gekappten mRNAs wurden durch eine *in vitro*-Transkription hergestellt (Kit mMESSAGE mMACHINE®T7 Transcription Kit, Ambion).

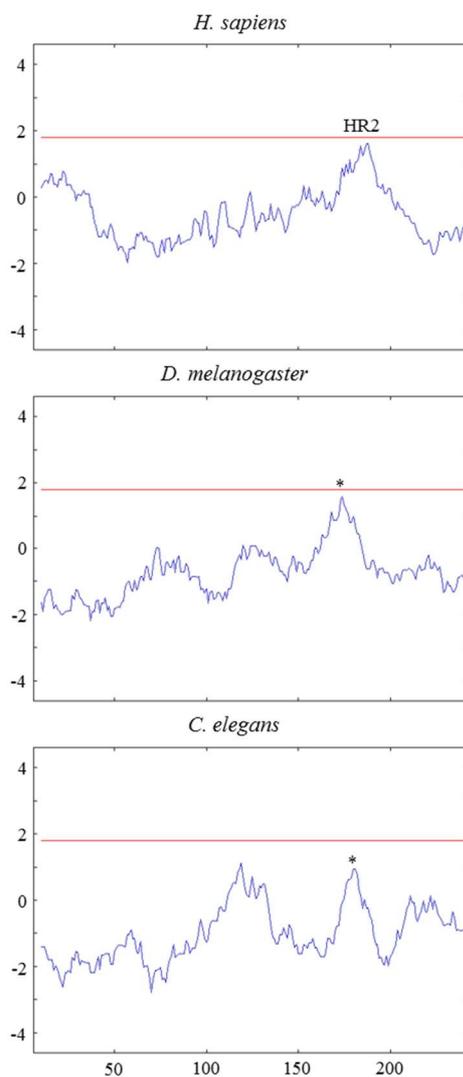


Abb. 31 Hydrophobizitätsprofile für XBP1u Die Profile wurden nach der Methode von (Kyte und Doolittle, 1982) unter Verwendung eines Online-Programms erstellt (gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm). Auf der X-Achse ist die Position der AS in der betrachteten Peptidsequenz angegeben. Zum besseren Vergleich wurden die Profile nur für die jeweils letzten 250 AS der Peptidsequenzen für XBP1u erstellt. Da als Fenstergröße 19 AS definiert wurden, ist auf der Y-Achse der gemittelte Wert der Hydrophobizität für einen Sequenzbereich von 19 AS angegeben, in deren Mitte sich die zugehörige AA auf der X-Achse befindet. Je positiver der Wert ist, desto hydrophober ist die betrachtete Region. Liegt die Hydrophobizität über der roten Linie, kann es sich um eine Transmembrandomäne handeln (gcat.davidson.edu/DGPB/kd/kyte-doolittle.htm). * Hydrophobe Region in *D. melanogaster* und *C. elegans*, die sich im etwa gleichen Abstand vom C-terminalen Ende wie HR2 in *H. Sapiens* befindet.

Die *in vitro*-Translation wurde hinsichtlich der Inkubationszeit und der eingesetzten mRNA-Konzentration optimiert, um eine hohe Ausbeute an gestallten RNCs zu erhalten.

Optimierung der Inkubationszeit

Für die Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurden 20 ng/μl mRNA für hXbp1-S255A und 30 ng/μl mRNA für fXbp1u eingesetzt. Nach 10 und 30 min Inkubationszeit wurden Proben entnommen und die Translation jeweils mit Cycloheximid gestoppt.⁹

Die Proben wurden anschließend durch ein 1M Saccharose-Kissen zentrifugiert (100,000 rpm, 45 min, 4 Grad, TLA100). Das V-Peptid sowie andere niedermolekulare Verbindungen wie zum Beispiel Immunoglobulin G, welches mit den eingesetzten Antikörpern im Westernblot wechselwirkt, sollten im Überstand verbleiben und somit eine bessere Auswertbarkeit ermöglichen. Die Pellets sowie die zugehörigen mit TCA gefällten Überstände wurden halbiert und in zwei Western Blots hinsichtlich FLAG- oder HA-TAG analysiert (Abb. 32B).

Im Falle von fXBP1-RNC wurde für die Peptidyl-tRNA nach 30 min Inkubationszeit ein schwaches Signal im Western Blot erhalten (Abb. 32, FLAG, Spur 3).

Ebenso war für das F-Peptid nach 30 min Inkubationszeit ein Signal im Pellet erkennbar (Abb. 32B, FLAG, Spur 3).

⁹ In einem vorhergehenden Experiment wurde gezeigt, dass bei einer Inkubationszeit von 60 min im vgl. zu einer Inkubationszeit von 30 min. die Signalstärke für die Peptidyl-tRNA gleich blieb und stattdessen nur die Signalstärke des V-Peptids deutlich zunahm (Daten nicht gezeigt).

Für das V-Peptid wurde bereits nach 10 min ein schwaches und nach 30 min ein starkes Signal erhalten (Abb. 32B, FLAG, Spur 1 und 3, Abb. 32B, HA, Spur 1 und 3).

Aufgrund seines niedrigen Molekulargewichts sollte das V-Peptid eigentlich im Überstand verbleiben und nicht mit den Ribosomen pelletieren. Das V-Peptid scheint daher an Komponenten mit hohem Molekulargewicht wie zum Beispiel den Ribosom zu binden oder zu aggregieren.

Im Falle von fXBP1-RNC wurde für die Peptidyl-tRNA ein zunehmendes Signal in den Pellets nach 10 und 30 min Inkubationszeit erhalten (Abb. 32B, FLAG, vgl. Spur 7 und 9).

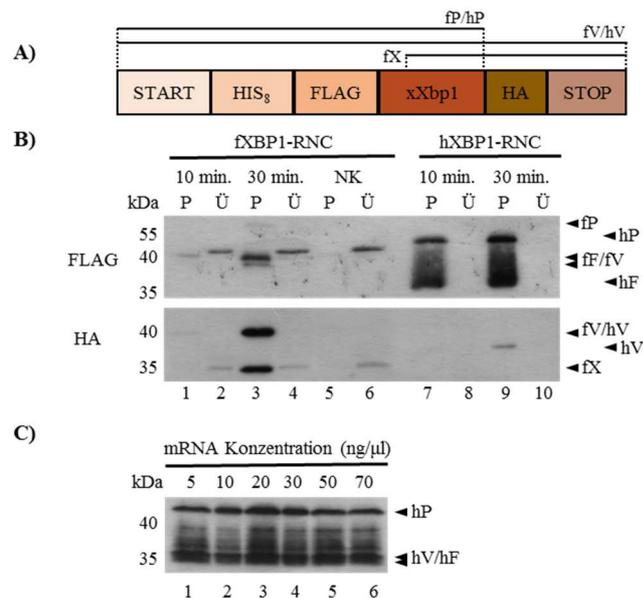
Für das F-Peptid war erst nach 30 min Inkubationszeit ein Signal im Pellet zu erkennen (Abb. 32B, FLAG, vgl. Spur 9).

Für das V-Peptid wurde nach 30 min ein schwaches Signal erhalten und zwar ebenfalls wie für fXBP1u im Pellet anstatt im Überstand (Abb. 32B, HA, vgl. Spur 9 und 10).

Da in beiden Westernblots die Signale für die Peptidyl-tRNA und das F-Peptid nach 30 min Inkubationszeit am stärksten waren (Abb. 32, FLAG, vgl. Spur 1 und 3 sowie Spur 7 und 8), wurde die optimale Inkubationszeit auf 30 min festgesetzt. Die Existenz des V-Peptides sollte im Falle einer späteren 3D-Rekonstruktion keine störende Verunreinigung darstellen.

Im Falle von fXBP1-RNC zeigt der Western Blot ein zusätzliches deutliches Signal für das V-Peptid eines weiteren Translationsproduktes von fXbp1u, welches hier als Protein X bezeichnet wird (Abb. 32B, HA, Spur 3). Die mRNA von fXbp1u weist nämlich zwei ORFs auf, welche

im gleichen Frame liegen und beide translatiert werden (Plongthongkum et al., 2007).¹⁰ Protein X und fXBP1u unterscheiden sich nur darin, dass dem Protein X die ersten 75 N-terminalen AS fehlen (Abb. 32A).



Optimierung der mRNA-Konzentration

Für die Bestimmung der optimalen mRNA-Konzentration für die *in vitro*-Translation wurden unterschiedliche Konzentrationen der mRNA-Konstrukte (zwischen 5 bis 70 ng/μl) bei einer Inkubationszeit von 30 min getestet. Nach der Inkubation wurden die Ansätze direkt für die Analyse eingesetzt.

Abb. 32 Optimierung der *in vitro*-Translation für die Generierung von XBP1-RNCs (A) Schematische Darstellung über den prinzipiellen Aufbau der mRNA-Konstrukte und der resultierenden Translationsprodukte. Die mRNA codiert für das Startcodon (START), Polyhistidintag bestehend aus acht Histidinen (HIS₈), FLAG-Tag (FLAG), je nach Konstrukt unterschiedliche Sequenz für XBP1 (xXBP1), HA-Tag (HA) und STOP-Codon (STOP). Die translatierten Bereiche der resultierenden Translationsprodukte sind durch die schwarzen Balken schematisch angedeutet. Bei den resultierenden Translationsprodukten handelt es sich um das V- (fV), das X-Peptid (fX) und die Peptidyl-tRNA (fP), für fXBP1 sowie die Peptidyl-tRNA (hP) und das V-Peptid (hV) für hXBP1. Näheres siehe Text. (B) Optimierung der Inkubationszeit. Im oberen Western Blot wurde der FLAG- und im unteren der HA-Tag detektiert. Den sichtbaren Banden sind die Peptidyl-tRNA (fP), das F- (fF), V- (fV) und X-Peptid (fX) für fXBP1 sowie das P- (hP), F- (hF) und V-Peptid (hV) für hXBP1 zugeordnet. Bei der sichtbaren Bande im Überstand (Spur 2 und 3) handelte es sich um ein unspezifisches Signal, wie der Vergleich mit der Negativkontrolle (NK, Spur 4) zeigt. Als Negativkontrolle diente eine *in vitro*-Translation ohne mRNA bei einer Inkubationszeit von 30 min. Näheres siehe Text. (C) Optimierung der mRNA-Konzentration. Western Blot gegen FLAG-Tag. Den sichtbaren Banden sind das P- (hP), F- (hF) und das V-Peptid (hV) für hXBP1 zugeordnet. Näheres siehe Text.

¹⁰ Es wird vermutet, dass die Stem-Loop-Struktur, welche das zu spleißende Intron in fXbp1u flankiert, als IRES für die Translation des zweiten ORFs dient (Plongthongkum et al., 2007).

Im Falle des hXBP1-RNC wurde das stärkste Signal für die Peptidyl-tRNA bei einer Konzentration von 20 und 30 ng/μl erhalten (Abb. 32, Spur 3 und 4). Daher wurden für die weiteren Experimente 20 ng/μl eingesetzt. Bei der sichtbaren Doppelbande handelt es sich um das F- und das V-Peptid (Abb. 32C, Spur 3 und 4).

Im Falle des fXBP1-RNC wurde die optimale mRNA-Konzentration ebenfalls mit 20 ng/μl bestimmt (Daten nicht gezeigt).

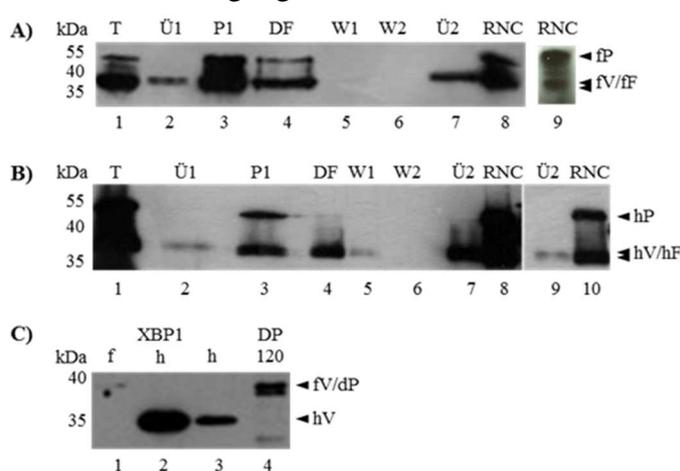
Zusammenfassung

Die Generierung eines translationsarretierten fXBP1-RNC *in vitro* war möglich und konnte erfolgreich optimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Translationsarrest erstens, wie in den Säugern (Yanagitani et al., 2011), nicht stabil ist, da bereits nach 10 min ein Signal für das V-Peptid erhalten wurde (Abb. 32B, HA, Spur 1). Zweitens erfolgt der Translationsarrest (ebd.), wie in den Säugern, in unmittelbarer Nähe des C-terminalen Endes von XBP1u, da der Unterschied des Molekulargewichts zwischen V- und F-Peptid von ca. 1-2 kDa im Westernblot auf das Molekulargewicht des HA-Tags zurückzuführen ist (Abb. 32B, FLAG, Spur 3).

Auch die Generierung des hXBP1-RNC war reproduzierbar (ebd.) und konnte erfolgreich optimiert werden. Aufgrund der Mutation S255A in der Arrestsequenz war der Translationsarrest für den hXBP1-RNC stabiler als für den fXBP1-RNC, da im Falle des hXBP1-RNC erst nach 30 min ein Signal für das V-Peptid detektiert werden konnte (Abb. 32B, HA, vgl. Spur 7 und 9).

4.3.3 Standardprotokoll zur Reinigung der XBP1-RNCs führt zu Aggregationen

Nach der Optimierung der *in vitro*-Translation erfolgte die Reinigung der XBP1-RNCs anhand des im Labor etablierten Standardprotokolls. Die Reinigung erfolgte aus 850 μl Translationsextrakt im Falle von fXBP1-RNC und 440 μl im Falle von hXBP1-RNC. Der Verlauf der Reinigung wurde durch die Entnahme von Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten



der Reinigung kontrolliert (Abb. 33A und B).

Im Falle von fXBP1-RNC wurden nach der *in vitro*-Translation (Abb. 33A, Spur 1) die Ribosomen in einem ersten Zentrifugationsschritt vollständig durch ein 1M Saccharose-Kissen pelletiert (Abb. 33A, Spur 3) und die niedermolekularen Bestandteile des Translationsextraktes mit dem Überstand abgetrennt (Abb. 33A, Spur 2). Das V-Peptid pelletierte ebenfalls.

Abb. 33 Reinigung XBP1-RNCs nach dem Standardprotokoll (A) Darstellung des Western Blots (FLAG-Tag) für die Reinigung fXBP1-RNC. Es wurden 0,5% des Translationsansatzes (T, Spur 1), des ersten Überstandes (Ü1, Spur 2), des ersten Pellets (P1, Spur 3), des Durchflusses (DF, Spur 4) und des zweiten Überstandes (Ü2, Spur 5) aufgetragen sowie 10% des ersten (W1, Spur 5) und zweiten Waschschrittes (W2, Spur 6). In Spur 8 wurden 3 μl der RNCs aufgetragen. In Spur 9 wurden in einem weiteren Western Blot unter Verwendung eines nativen NuPAGE®SDS-PAGE Gels erneut 3 μl der RNCs eingesetzt. Näheres siehe Text. **(B)** Darstellung des Western Blots (FLAG-Tag) für die Reinigung hXBP1-RNC. Das Auftragungsschema für die Spuren 1-8 entspricht dem beschriebenen unter (A). Spur 9 und 10 stellen nochmals Spur 7 und 8 bei kürzerer Belichtungszeit dar. Näheres siehe Text. **(C)** Darstellung des Western Blots (HA-Tag) zur Kontrolle der gereinigten fXBP1-RNCs auf eine Co-Reinigung mit dem V-Peptid. Es wurden je 0,2 OD von fXBP1-RNC (Spur 1), hXBP1-RNC (Standardreinigung, Spur 2) und hXBP1-RNC (optimierte Reinigung, Spur 3) aufgetragen. Als Positivkontrolle wurden DP120-RNCs aufgetragen, bei dem die naszierende Kette einen N-terminalen HA-Tag besitzt. (Spur 4).

Die verwendeten Kürzel zur Beschreibung der Proteinbanden sind in Abb. 32 erläutert. Des Weiteren steht dP für die Peptidyl-tRNA von DP120.

Das ribosomale Pellet wurde resuspendiert und in eine mit Talon® Metall Affinität Granulat gefüllte Säule überführt. Aufgrund der Ausbildung eines stabilen Chelat-Komplex zwischen dem Polyhistidintag (His₈) der naszierenden Kette und den Co²⁺-Ionen des Talon® Granulats kommt es zu einer Immobilisierung der RNCs sowie des V-Peptids.

In den folgenden Waschschrritten unter Niedrig- (Abb. 33A, Spur 5) und Hochsalzbedingungen (Abb. 33A, Spur 6) wurden nach Maßgabe der HA-Signale auf dem Film leere 80S Ribosomen sowie weitere Verunreinigungen abgetrennt, ohne das RNCs verloren gingen.

Anschließend wurden die RNCs mit Imidazol-haltigem Puffer von der Säule eluiert und erneut durch ein 1M Saccharose-Kissen pelletiert. Dabei verblieb das V-Peptid teilweise im Überstand (Abb. 33A, Spur 7).

Die pelletierten fXBP1-RNCs wurden in 30 µl Grid-Puffer resuspendiert (Abb. 33A, Spur 8, A₂₆₀ = 12.8) und es konnten aus 850 µl Translationsextrakt 8 pmol fXBP1-RNCs gewonnen werden.

Allerdings war die Bande der Peptidyl-tRNA in Relation zur Bande des F-Peptids nur schwach ausgeprägt (Abb. 33A, Spur 8). Es ist jedoch bekannt, dass die labile Peptidyl-tRNA-Bindung leicht während des Gellaufs im basischen Laufpuffer hydrolysiert.

Um zu überprüfen, ob die Überpräsenz des freien Peptids durch eine Hydrolyse im Gel und nicht durch eine Hydrolyse während der Präparation zu erklären ist, wurde ein neutrales NuPAGE®SDS-PAGE verwendet. Der Western Blot von diesem Gel zeigte, dass die Qualität der RNCs gut war, da jetzt die Bande der Peptidyl-tRNA deutlich überpräsentiert war (Abb. 33A, Spur 9).

Ein Western Blot gegen den HA-Tag zeigte, dass das V-Peptid noch in geringen Spuren in der Probe der gereinigten RNCs vorhanden war (Abb. 33C, Spur 1).

Die Co-Reinigung ist wahrscheinlich auf die hohe Hydrophobizität von HR2 im V-Petid zurückzuführen, welche zu einer unspezifischen Interaktion mit dem Ribosom führen könnte.

Der Verlauf der Reinigung der hXBP1-RNCs (Abb. 33B, Spur 1-8) verlief gleich der Reinigung der fXBP1-RNCs. Spur 9 und 10 (Abb. 33B) zeigen den Western Blot für die Spuren 7 und 8 (Abb. 33B) bei kürzerer Belichtungszeit. Auch hier wurden gereinigte RNCs in ausreichender Menge und Reinheit erhalten (20 µl, A₂₆₀ = 5) und es konnten aus 440 µl Translationsextrakt 3 pmol fXBP1-RNCs gewonnen werden. Das V-Peptid wurde ebenfalls co-gereinigt (Abb. 33C, Spur 2).

Da das Signal für das V-Peptid von hXBP1 deutlich stärker war als für fXBP1 scheint die unspezifische Bindung des V-Peptids in *H. sapiens* stärker zu sein als in *D. melanogaster* (Abb. 33C, vgl. Spur 1 und 2).

Ein anschließende EM mit Negativkontrastfärbung zeigte, dass die gereinigten fXBP1- und hXBP1-RNCs in den Proben zum großen Teil in aggregierter Form vorlagen (Abb. 34A). Trotzdem wurden von der Probe des hXBP1-RNC Kryo-EM-Daten gesammelt. Hier erwies sich beim Versuch einer 3D-Rekonstruktion jedoch schon das in initiales Alignment als problematisch und wurde nicht weiter verfolgt (Daten nicht gezeigt).

Mithilfe eines kontinuierlichen 10-40% Saccharose-Gradienten konnte gezeigt werden, dass die RNCs nach der *in vitro*-Translation als 80S Monosomen vorlagen. Somit handelte es sich bei den Aggregationen nicht um Polysomen (Abb. 34B).

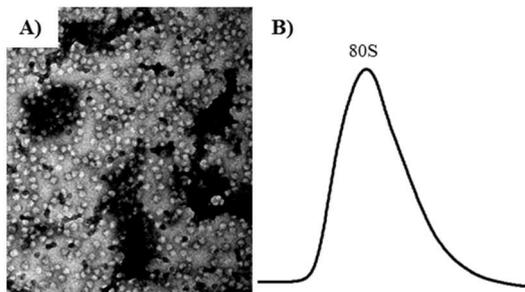


Abb. 34 Aggregation der hXBP1-RNCs nach der Standardreinigung (A) A₂₅₄ Absorptionsprofil der Ribosomen nach der In-Vitro-Translation von mRNA hXBP1-S255A im Reticulozyten-Extrakt von *O. cuniculus*. 100 µl Translationsansatz wurden nach der In-Vitro-Translation direkt durch einen 10-40% Saccharose-Dichtegradienten sedimentiert (40,000 rpm, 160 min., SW40Ti.) und anschließend ein Absorptionsprofil aufgenommen (Gradientenstation, Biocomp). Es wurde nur ein Peak für das 80S Ribosom detektiert. Somit liegen die RNCs als 80S Monosomen vor. (B) Ausschnitt einer Negativkontrastfärbung für gereinigte hXBP1-RNCs (Standardprotokoll). Bei den hellgrauen, leicht runden Partikeln handelt es sich um einzelne RNCs und bei den großen dunklen Flächen um Aggregationen der RNCs. Näheres siehe Text.

4.3.4 Reinigung hXBP1-RNC nach optimierten Protokoll

Es erfolgte eine Optimierung des Standardprotokolls zur RNC-Reinigung, welches zum Erhalt aggregatsfreier RNCs führte. Die Optimierung wurde aufgrund des stabileren Translationsarrests für hXBP1-RNC durchgeführt.

Im Folgenden werden nur die Abweichungen zum bereits beschriebenen Standardprotokoll der Reinigung beschrieben (siehe 4.3.3, S.64).

Um eine ausreichende Ausbeute an gereinigten RNCs für die Datensammlung zu erhalten, wurde das Volumen des Translationsansatzes auf 1000 μ l festgesetzt.

Zur Minimierung der Aggregationsbildung wurde das aufgetaute Zelllysate bei niedriger Zentrifugationsgeschwindigkeit vorzentrifugiert (10,000xg, 10 min, 4 Grad, 5417 R Eppendorf), um leicht sedimentierende Bestandteile aus dem Lysat zu entfernen (Änderung 1). Der Überstand wurde für den *in vitro*-Translationsansatz verwendet und das erhaltene relativ große Pellet verworfen. Eine vergleichende *in vitro*-Translation mit vorzentrifugierten und nicht vorzentrifugierten Zelllysate zeigte keinen Effekt auf die Translationseffizienz (Daten nicht gezeigt).

Nach der Inkubationszeit wurde die Translation mit Cycloheximid gestoppt und der Translationsextrakt im Verhältnis 1:7 verdünnt sowie auf vier Zentrifugationsgefäße verteilt auf jeweils ein 1 M Saccharose-Kissen aufgetragen (Änderung 2). Die Verdünnung sollte zu einer Senkung der Aggregationsneigung beitragen. Durch die Verdünnung wurde die scharfe Trennung des rötlichen Translationsextraktes und des farblosen Saccharose-Kissens nach der Zentrifugation erhalten. Im Gegensatz zum unverdünnten Translationsextrakt, bei dem das Saccharose-Kissen durchgehend bis zum Boden des Zentrifugationsgefäßes die rötliche Färbung des Translationsextraktes aufwies.

Die erhaltenen zähen und schwerlöslichen ribosomalen Pellets wurden nach der Zentrifugation anstatt durch gelegentlichen Pipettieren durch kontinuierliches Schütteln für ca. 90 min resuspendiert (Änderung 3). Durch diese Änderung konnten bestehende Aggregationen anscheinend teilweise aufgelöst werden, da die Ausbeuten an nicht aggregierten RNCs am Ende der Reinigung erhöht wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Reinigung der RNCs über das Talon® Metall Affinität Granulat erfolgte nach dem Standardprotokoll (siehe 4.3.3, S.64). Nach der Zentrifugation der Elution durch das 1M Saccharose-Kissen wurde das RNC-Pellet erneut durch kontinuierliches Schütteln anstatt gelegentlichem Pipettieren in 20 μ l RNC-Puffer resuspendiert (Stufe 2, 4 Grad, ca. 90 min, Änderung 4).

Die verbliebenen aggregierten RNCs wurden durch eine kurze Zentrifugation bei niedriger Drehzahl pelletiert und abgetrennt (20,000xg, 10 min, 4 Grad, 5417 R Eppendorf, Änderung

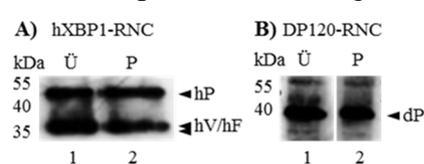


Abb. 35 Abtrennung der aggregierten RNCs
(A) Darstellung des Western Blots (FLAG-Tag) für den letzten Zentrifugationsschritt der Reinigung von hXBP1-RNCs. Näheres siehe Text. (B) Darstellung des Western Blots für den letzten Schritt der Kontroll-Reinigung von DP120-RNCs. Näheres siehe Text.

Die verwendeten Kürzel zur Beschreibung der Proteinbanden sind in Abb. 32 erläutert. Desweiteren steht dP für die Peptidyl-tRNA von DP120.

5). Der in Abb. 35A dargestellte Western Blot zeigt, dass der Überstand (Abb. 35A, Spur 1) sowie das Pellet (Abb. 35A, Spur 2) nach der Zentrifugation RNCs aufwies. Es wurden deutliche Signale für die Peptidyl-tRNA, das F-Peptid und das V-Peptid erhalten.

Das V-Peptid wurde dabei erneut co-gereinigt (Abb. 33B, Spur 3), wenn auch im geringeren Ausmaß als beim Standardprotokoll (Abb. 33B, vgl. Spur 2 und 3).

Bei der Reinigung gingen 1/3 der RNCs in Form von Aggregationen verloren: Überstand ($A_{260} = 7.5$, $A_{260/280} = 1.8$), Pellet ($A_{260} = 4.5$, $A_{260/280} = 1.6$). Die Ausbeute an aggregatsfreien RNCs war aber ausreichend für die Datensammlung.

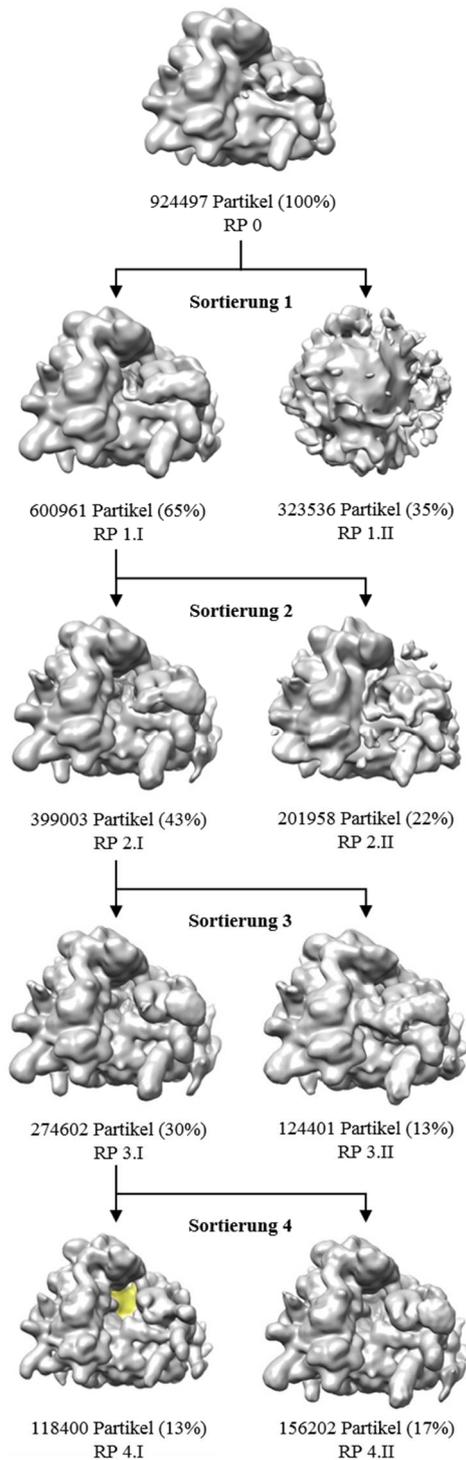


Abb. 36 Sortierungsschema des Datensatzes vom hXBP1-RNC Das Schema zeigt die einzelnen Sortierungsschritte bei der Datenprozessierung. Dabei sind für jeden Sortierungsschritt die erhaltenen Subpopulationen, die gefilterten 3D-Rekonstruktionen, die Anzahl der Partikel und in Klammern der Anteil der Partikel im Verhältnis zu der Ausgangspopulation RP 0 angegeben. Das 80S Ribosom ist in grau und die tRNA in gelb eingefärbt. Näheres siehe Text.

Dabei wurden im zweiten Sortierungsschritt eine Subpopulation an Ribosomen aussortiert, in welcher die Partikel entweder einen Astigmatismus aufwiesen (Abb. 36, RP 2.II), oder sich nicht alignieren ließen.

Im dritten Sortierungsschritt wurde eine Subpopulation an Ribosomen aussortiert, die eEF2 und eine tRNA in der E-Stelle aufwies (Abb. 36, RP 3.II).

Eine Negativkontrastfärbung bestätigte, dass die RNCs im Überstand frei von Aggregationen waren (Daten nicht gezeigt).

Somit wurden mit dem optimierten Protokoll aggregationsfreie RNCs in ausreichender Menge und Reinheit für eine 3D-Rekonstruktion mithilfe der SP-Kryo-EM erhalten.

Ein Kontrollexperiment zeigte außerdem, dass auch bei der Reinigung der RNCs für das mRNA-Konstrukt DP120 beim letzten Zentrifugationsschritt aggregierte RNCs im Pellet erhalten wurden (Abb. 35B, Spur 2). Somit war das Aggregationsverhalten der RNCs unabhängig von dem eingesetzten mRNA-Konstrukt.

4.3.5 Erfolgreiche 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC mithilfe der SP-Kryo-EM

Für die 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC erfolgten zwei zeitlich unabhängige Datensammlungen am Titan Krios TEM (FEI Company) (AG Beckmann, München). Aufgrund des Einsatzes unterschiedlicher CCD-Kameras wurden für beide Datensammlungen unterschiedliche Pixelgrößen erhalten. Daher wurden vor der Datenprozessierung die erhaltenen Mikrographen der ersten Datensammlung durch Interpolation mithilfe von SPIDER an die Pixelgröße der zweiten Datensammlung angepasst.

Nach der Qualitätsbeurteilung der Mikrographen und der zugehörigen Powerspektren wurden am Ende 924.497 Partikel von 18.643 Mikrographen für das initiale Alignment eingesetzt. Als Referenzvolumen wurde ein leeres 80S Ribosom von *C. l. familiaris* genutzt. Dabei erfolgte das initiale Alignment bei einer dreifachen Dezimierung (3,71 Å/Pixel) der Partikel.

Im Zuge der finalen Datenprozessierung erfolgten vier Sortierungsschritte nach dem Refinement des initialen Alignments (Abb. 36, RP 0).

Im ersten Sortierungsschritt wurde bei einer dreifachen Dezimierung (3,71 Å/Pixel) gegen das Noise-Volumen sortiert und eine Subpopulation nicht-ribosomaler Partikel aussortiert (Abb. 36, RP 1.II).

Im zweiten und dritten Sortierungsschritt wurde bei einer zweifachen Dezimierung (2,47 Å/Pixel) jeweils gegen ein Volumen aus einer früheren Refinementrunde sortiert.

In einem vierten Sortierungsschritt wurde gegen das Volumen der gleichen Refinementrunde sortiert, in welchem mithilfe des Werkzeuges „Volume Eraser“ (Software Chimera) die Elektronendichte für die tRNA entfernt wurde und die Kanten mit einem Low-Pass Gauß-Filter (Filterradius 0,3, SPIDER) geglättet wurden. Dadurch konnte eine Subpopulation an leeren Ribosomen aussortiert werden (Abb. 36, RP 4.II) und die verbleibende Subpopulation enthielt eine annähernd stöchiometrische Besetzung des Ribosoms mit einer Peptidyl-tRNA in der P-Stelle (Abb. 36, RP 4.I). Weitere Subpopulationen ließen sich nicht mehr aussortieren.

Für die beiden Subpopulationen RP 4.I und RP 4.II wurde jeweils solange ein Refinement bei zweifacher Dezimierung ($2,47 \text{ \AA}/\text{Pixel}$) durchgeführt bis eine Verbesserung der Auflösung nicht mehr erreicht werden konnte. Die erhaltene finale 3D-Rekonstruktion für hXBP1-RNC (RP 4.I) ist in Abb. 37A dargestellt.

Dabei wurde für die 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC (RP 4.I) eine globale Auflösung von $8,3 \text{ \AA}$ bei $\text{FSC}_{0,5}$ und für das leere 80S Ribosom (RP 4.II) von $8,0 \text{ \AA}$ bei $\text{FSC}_{0,5}$ erhalten (Abb. 37B).

Wie exemplarisch an hXBP1-RNC dargestellt, war die lokale Auflösung für die große Untereinheit des Ribosoms deutlich besser als für die kleine Untereinheit (Abb. 37C und D). Dies ist auf die Rigidität der großen Untereinheit im Gegensatz zur kleinen Untereinheit zurückzuführen. Ein Querschnitt durch das Ribosom zeigte, dass im relevanten Bereich des Exit-Tunnels die lokale Auflösung um die $6 \text{ bis } 7 \text{ \AA}$ lag (Abb. 37D).

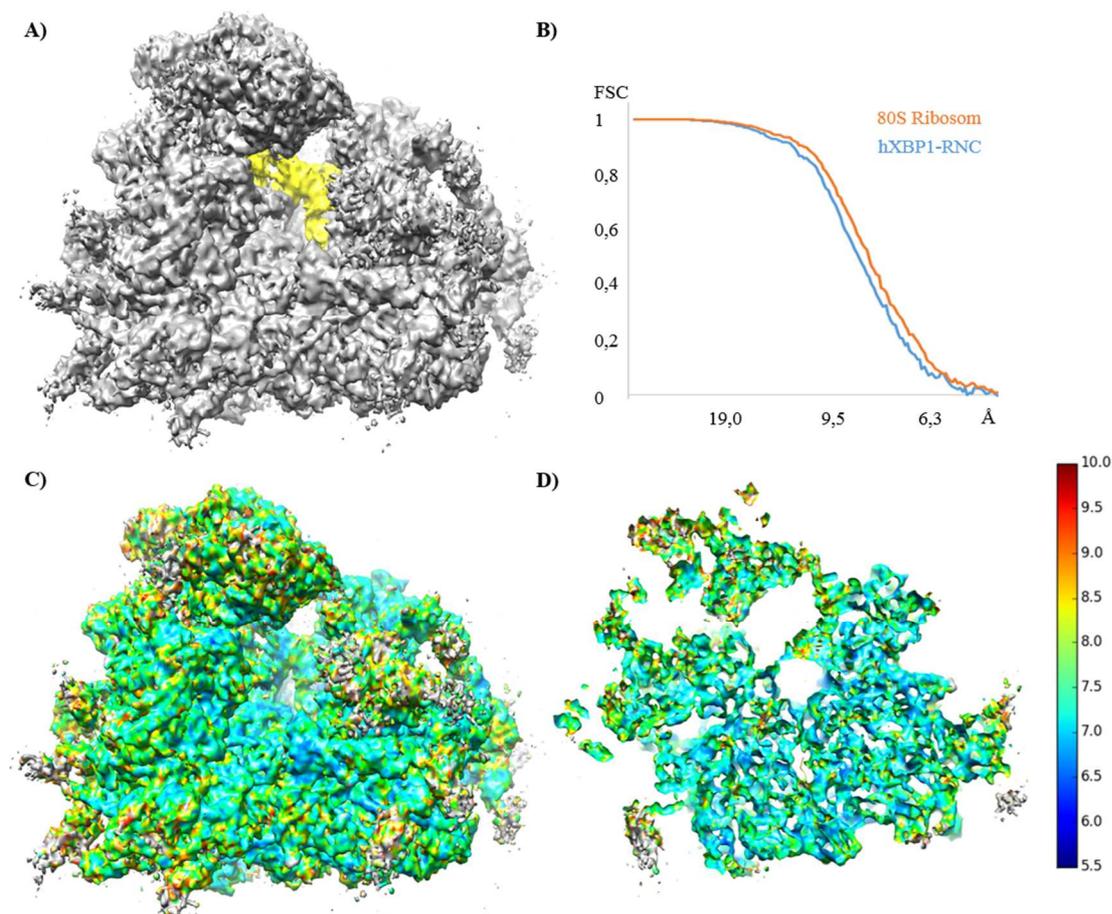


Abb. 37 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC (A) Kryo-EM-Struktur des hXBP1-RNC. Die 3D-Rekonstruktion wurde mit einem Butterworth low-pass Filter bei $5\text{-}5.2 \text{ \AA}$ gefiltert. In Grau ist das 80S Ribosom dargestellt und in Gelb die tRNA in der P-Stelle. (B) Das Diagramm zeigt die globalen Auflösungskurven für die Elektronendichte des hXBP1-RNC und das leere 80S Ribosom auf Basis der Fourier-Shell-Korrelation. (C-D) Lokale Auflösung des hXBP1-RNC (A) mit Hilfe von ResMap erstellt. Die Auflösung (in \AA) ist der dargestellten Farbleiste zu entnehmen. Bei den grau dargestellten Bereichen liegt die Auflösung über 10 \AA . (C) Seitenansicht auf und (D) Querschnitt durch den hXBP1-RNC zur Visualisierung der lokalen Auflösung in den inneren Regionen. Die Perspektive entspricht der Perspektive aus (A).

4.3.6 Orientierungsbias der ribosomalen Partikel

Eine nachträgliche Überprüfung der räumlichen Orientierung der ribosomalen Partikel im Datensatz zeigte, dass ein Orientierungsbias vorlag.

Für die Überprüfung wurden 2D-Projektionen der 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC mit unterschiedlicher räumlicher Orientierung erstellt. Bei der gewählten Schrittgröße der Winkeländerungen wurden so 195 2D-Projektionen erhalten ($\theta=10$ Grad, $d(\phi) = d(\theta) / \sin(\theta)$, SPIDER).

Den 195 2D-Projektionen (Projektionsgruppen) wurden jeweils die einzelnen Partikel der Subpopulation des hXBP1-RNC (RP 4.I) mit der ähnlichsten räumlichen Orientierung (größten Kreuzkorrelation) zugeordnet.

Ein anschließend erstelltes Histogramm zeigte, dass sich der größte Anteil der Partikel auf drei Cluster an Projektionsgruppen aufteilte (Abb. 38A, blau hinterlegte Fläche) und die Partikel der zugehörigen Projektionsgruppen eine ähnliche räumliche Orientierung zeigten, bei welcher das Ribosom mit der ER-Membran zugewandten Seite zum Grid ausgerichtet war (Abb. 38B).

Der Orientierungsbias liefert eine Erklärung, warum die Auflösung der 3D-Rekonstruktion geringer als erwartet war. Eine starke Überrepräsentation weniger Projektionsgruppen führt nämlich zu einer Verzerrung der 3D-Rückprojektion. Diese wiederum dient als Referenz für das Alignment. So kommt es zu einer Verschlechterung des Refinements und somit der finalen Auflösung.

Der Grund für den Orientierungsbias konnte nicht eindeutig bestimmt werden. In Frage kam entweder die Interaktion des Ribosom oder der naszierenden Kette mit dem Grid.

Das Histogramm für das leere 80S Ribosom (RP 4.II) zeigte die gleiche Clusterbildung (Abb. 38A, orange hinterlegte Fläche) und somit den gleichen Orientierungsbias. Da allerdings das V-Peptid co-gereinigt wurde und eventuell unspezifisch am 80S Ribosom gebunden vorlag, konnte nicht bestimmt werden, ob der Orientierungsbias durch eine intrinsische Eigenschaft des Ribosoms oder der naszierenden Kette verursacht wurde.

Im Labor ist aber bekannt, dass die hydrophobe Signalsequenz in der naszierenden Kette von DP120-RNC ebenfalls zu einem ähnlichen Orientierungsbias führt. Somit ist anzunehmen, dass der Orientierungsbias auf die hydrophobe Region HR2 in der naszierende Kette zurückzuführen ist.

Außerdem zeigt ein erstelltes Histogramm für den Datensatz des leeren 80S Ribosoms (*P. falciparum*), dessen 3D-Rekonstruktion in dieser Arbeit ebenfalls erfolgte (siehe 4.1, S.35), ein abweichendes Muster (Abb. 38A), indem die Projektionsgruppen der erhaltenen Cluster unterschiedliche räumliche Orientierungen aufweisen. Auch wurden im Falle höherer Eukaryoten wie *D. melanogaster* und *H. sapiens* kein solcher intrinsischer Orientierungsbias für das leere 80S Ribosom im Labor beobachtet und somit ist ein intrinsischer Orientierungsbias zum Beispiel aufgrund der deutlich längeren rRNA-Expansionssegmente in höheren Eukaryoten (Anger et al., 2013) mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Strategien um den Orientierungsbias in zukünftigen Datensammlungen zu vermeiden und somit eine Verbesserung der Auflösung zu erhalten, werden an entsprechender Stelle diskutiert (siehe 5.3.1, S.95).

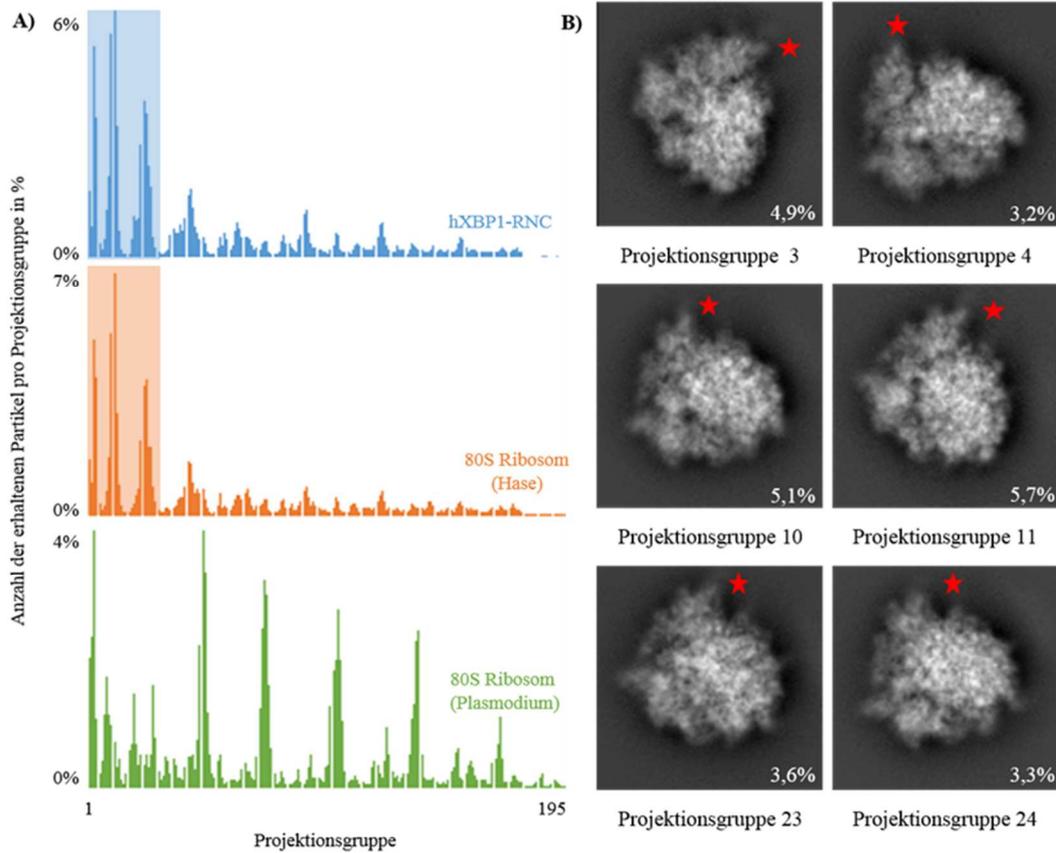


Abb. 38 Orientierungsbias der ribosomalen Partikel für hXBP1-RNC A) Das Histogramm zeigt die Anzahl der Partikel in jeder der 195 Projektionsgruppen bezogen auf die Gesamtanzahl an Partikeln für die entsprechende Subpopulation (in %). Es wurde je ein Histogramm für die Subpopulation des hXBP1-RNC, des aussortierten leeren 80 Ribosoms (*O. cuniculus*) und des leeren 80S Ribosoms (*P. falciparum*) erstellt. Die blau und orange hinterlegten Flächen heben jeweils die drei Cluster an Projektionsgruppen mit einer hohen Anzahl an Partikeln hervor, welche alle eine ähnliche räumliche Orientierung aufweisen. Näheres siehe Text. B) Darstellung der 2D-Projektionen für die drei hervorgehobenen Cluster an Projektionsgruppen (hXBP1-RNC) in (A). Es sind jeweils die 2D-Projektionen für die zwei Projektionsgruppen mit der größten Anzahl an Partikeln in den drei Clustern abgebildet. Alle 2D-Projektionen zeigen eine ähnliche räumliche Orientierung. Der rote Stern markiert das gleiche sichtbare Strukturmerkmal des Ribosoms. Näheres siehe Text.

4.4 Projekt III: Interpretation der 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC

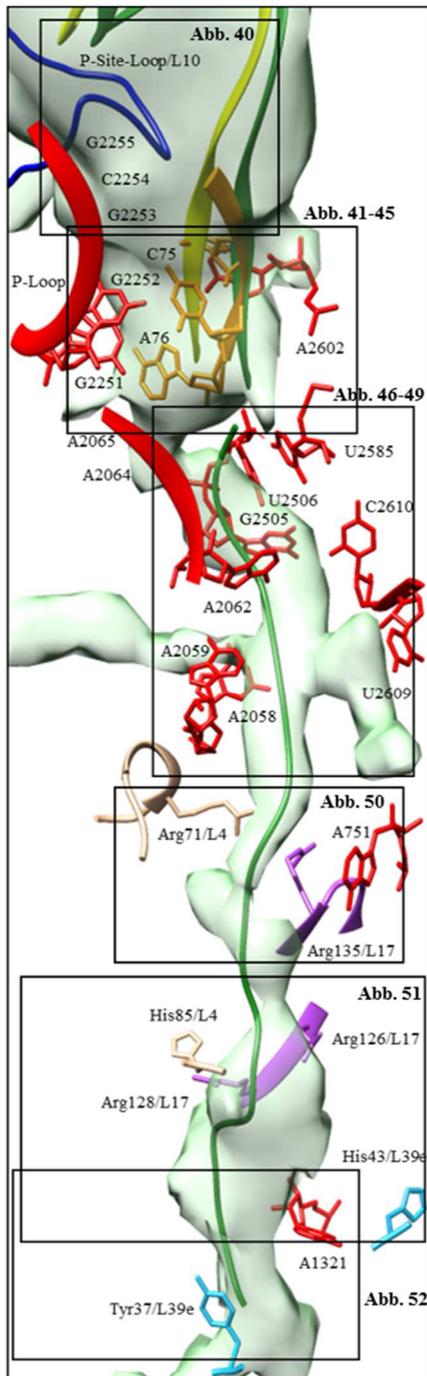


Abb. 39 Übersicht der ribosomalen Kontakte zu der tRNA und naszierenden Kette Übersicht über die Kontakte der ribosomalen Proteine L10e (dunkelblau), L4 (beige), L17 (lila), L39e (hellblau) und der 28S rRNA (rot) zu der tRNA und der modellierten naszierenden Kette (grün). Die tRNA (isoliert aus PDB: 2WWL) wurde mittels Rigid Body Fit in eXbp1 (gelb) oder eTnaC (grün) gefittet. Ebenso ist der in eXbp1 modellierte CCA-Überhang dargestellt (orange). Bei der dargestellten Elektronendichte (hell-grün) handelt es sich um eDifferenz. Die eingerahmten Regionen werden in den zugeordneten Abbildungen näher besprochen. Näheres siehe Text

Das Ribosom in der 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC liegt in einer nicht rotierten Konformation vor (engl. unratcheted conformation). Der hXBP1-RNC Komplex weist eine eindeutige nicht-ribosomale Extradichte für eine Peptidyl-tRNA in der P-Stelle sowie für die naszierende Kette im Tunnel auf. Eine Besetzung der A- und E-Stelle liegt nicht vor.

Für die nähere Interpretation wurden die 3D-Rekonstruktionen des hXBP1-RNC und des leeren 80S mit einem Butterworth low-pass Filter bei 5,0 bis 5,2 Å gefiltert und im weiteren Text als eXbp1 und e80S bezeichnet.

Zur Unterstützung der Interpretation wurde für eXbp1 und e80S eine Dichtedifferenz-Karte mit SPIDER erstellt. Die Dichtedifferenz-Karte visualisiert Elektronendichten, die mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit Sigma nur in eXbp1 und nicht in e80S existieren. Je höher das Konturlevel in Chimera gewählt wird, desto höher der Wert für Sigma.

Die erhaltene Dichtedifferenz-Karte wurde gefiltert (Gauss-Filter, Chimera) und im Weiteren als eDifferenz bezeichnet. Zur Übersichtlichkeit sind in den Abbildungen von eDifferenz kleinere Unterschiede in der Elektronendichte mithilfe der Funktion „Hide Dust“ (Chimera) verborgen.

In eXbp1 wurde ein Modell der 60S Untereinheit von *O. cuniculus* (Yamamoto et al., 2014, PDB: 4UPW, 4UPX) mittels eines Rigid Body Fits gefittet.

In einem „Ribosome Footprint Profile“ konnte gezeigt werden, dass sich beim Translationsarrest die Asn-tRNA^{Asn} an Position 261 in der A-Stelle des hXBP1-RNC befindet (Ingolia et al., 2011). Daher handelt es sich bei der sichtbaren Peptidyl-tRNA in der P-Stelle um eine tRNA^{Met} (Abb. 13, S. 17). Da ein entsprechendes Modell der Peptidyl-tRNA^{Met} nicht vorhanden war und die Modellierung der tRNA bei der gegebenen Auslösung nicht möglich war, wurde stattdessen das Modell der tRNA^{Pro} aus der Peptidyl-tRNA^{Pro} eines translationsarretierten prokaryotischen 70S-RNCs mit der TnaC-Peptidsequenz isoliert (Seidelt et al., 2009, PDB 2WWL) und mittels eines Rigid Body Fits in die Elektronendichte der Peptidyl-tRNA in eXbp1 gefittet. Das Modell der tRNA passte sehr gut in den Verlauf der Elektronendichte und ermöglichte die Beschreibung der Kontakte zwischen der tRNA und dem 80S Ribosom.

Da die Sequenz der tRNA^{Met} in *O. cuniculus* nicht bekannt ist, wurde bei der Nummerierung nicht konservierter Nukleotide der tRNA in dieser Arbeit der Buchstaben „N“ verwendet.

<i>E.coli</i>	<i>O. cuniculus</i>
A2058	G3873
A2059	A3874
A761	A1579
A1321	A2394
A2062	A3877
C2063	C3878
C2064	C3879
C2065	C3880
G2252	G4157
G2253	G4158
C2254	C4159
G2255	G4160
G2256	G4161
G2505	G4411
U2506	U4412
U2585	U4491
U2609	U4515
C2610	U4516

Tabelle 4 Nummerierung der relevanten rRNA Nukleotide. Aufgrund der höheren Bekanntheit wurde die Nummerierung von *e.coli* anstatt *O. cuniculus* in dieser Arbeit verwendet. In der gleichen Zeile der Tabelle ist die Nummerierung der jeweils korrespondierenden Base in *O. cuniculus* aufgeführt. Die Positionen und Nummerierungen der Nukleotide wurden den PDBs 4PEP (*e.coli*) und 4UPW (*O. cuniculus*) entnommen.

Der ungefähre Verlauf des C α -Rückgrats der naszierenden Kette konnte bei der gegebenen Auflösung mithilfe von Coot modelliert werden.

Nur im letzten Stück vor dem Tunnelausgang war eine Zuordnung des Verlaufs nicht sicher möglich. Zur Modellierung wurden eXbp1, e80S und eDifferenz herangezogen.

Neben weiteren Modellen (an entsprechender Stelle genannt) wurden Kryo-EM Elektronendichte-Karten anderer translationsarretierter RNCs (Staller) zur Interpretation herangezogen.

Es wurden Elektronendichte-Karten des translationsarretierten prokaryotischen 70S-RNCs herangezogen, die entweder durch die TnaC-Peptidsequenz (eTnaC) (Seidelt et al., 2009, EMD-1657) oder die SecM-Peptidsequenz (eSecM) arretiert werden (Bhushan et al., 2011, EMD-1829). Zudem wurde eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion eines translationsarretierten eukaryotischen 80S-RNCs herangezogen, die noch nicht veröffentlicht wurde (Clara Barrio Garcia, AG Beckmann) und der Arrest durch die Peptidsequenz von AAP erfolgt (Bhushan et al., 2010b). Dabei wurde die Elektronendichte-Karte zur besseren Vergleichbarkeit bei 5 bis 5,2 Å gefiltert (Butterworth low-pass Filter, SPIDER) (eAAP).

Anhand dieser Elektronendichte-Karten sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Bezug auf die Peptidyl-tRNA und deren Kontakte zum Ribosom im Vergleich zu eXBP1 herausgearbeitet werden.

Des Weiteren wurde die Elektronendichte-Karte eines eukaryotischen 80S-RNCs herangezogen (eDP120), in welcher der Translationsarrest aufgrund eines fehlenden STOP-Codons in der trunkierten mRNA erzeugt wurde (Becker et al., 2009, EMD-1652). Die trunkierte mRNA codiert dabei für die ersten 120 AA des Proteins Dipeptidylaminopeptidase B (DP120).

Da der Translationsarrest nicht auf einer intrinsischen Eigenschaft der naszierenden Kette beruht, sondern auf der geblockten Termination aufgrund des entfernten STOP-Codons, dient eDP120 als wertvolle Kontrolle. Erstens ist das PTC unverändert, wie die Puromycin-Sensitivität der Peptidyl-tRNA belegt und zweitens induzieren die Kontakte der naszierenden Kette zum 80S Ribosom keinen Translationsarrest. Somit können durch den Vergleich von eXbp1 und eDP120 unter anderem die Kontakte zum 80S Ribosom herausgearbeitet werden, welche für den Translationsarrest relevant sein könnten.

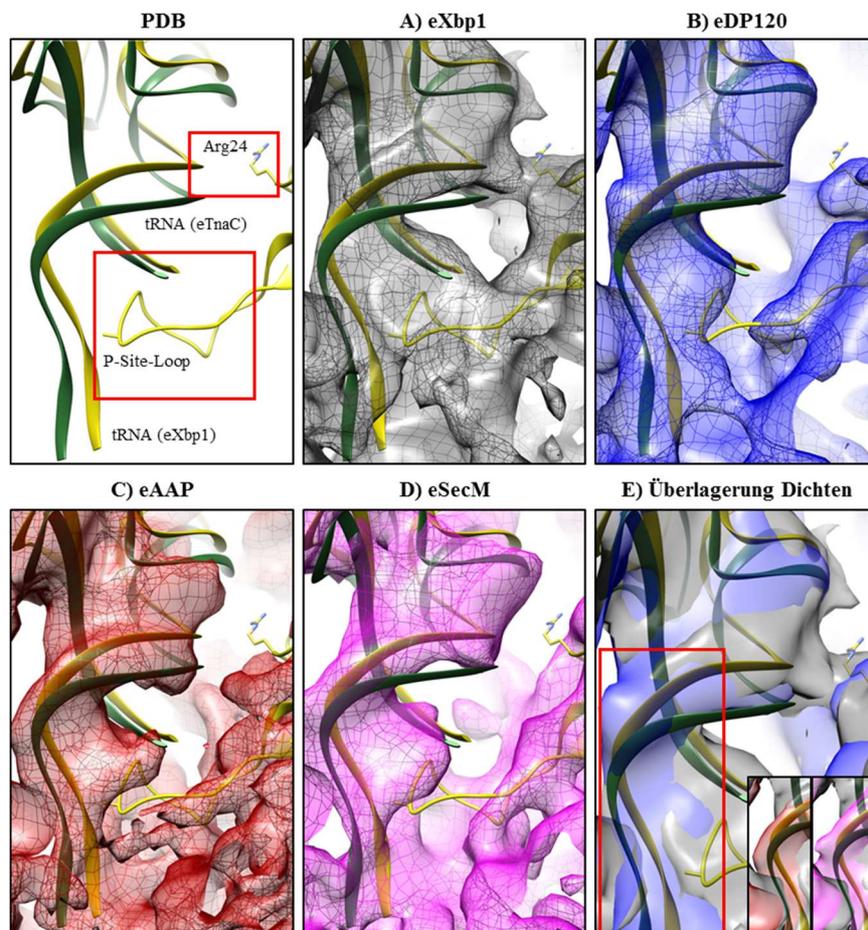
Die Interpretation von eXbp1 erfolgte im Folgenden systematisch beginnend mit der tRNA, gefolgt vom PTC, dem oberen Bereich des Exit-Tunnels, der Konstriktion und dem unteren Bereich des Exit-Tunnels. In Abb. 39 wurden die im Folgenden besprochenen Regionen eingerahmt und den zugehörigen Abbildungen zugeordnet. Außerdem gibt Abb. 39 einen Überblick über die sichtbaren Kontakte der ribosomalen Proteine und 28S rRNA zu der Peptidyl-tRNA und der naszierenden Kette. Dabei wurde aufgrund der höheren Bekanntheit die Nummerierung von *e. coli* anstatt *O. cuniculus* für die rRNA verwendet und die korrespondierende Nummerierung für *O. cuniculus* kann Tabelle 4 entnommen werden.

4.4.1 Verschiebung der tRNA Richtung P-Loop und L10e

Eine Überlagerung der Elektronendichten für eXbp1 mit denen der anderen Staller zeigte, dass in eXbp1 im Vergleich zu den anderen Stallern eine Verschiebung der Peptidyl-tRNA in Richtung L10e und P-Loop vorlag (Abb. 40A-E). Die Verschiebung war besonders im Bereich des Akzeptorarms ausgeprägt (Abb. 40E) und der Abstand des Akzeptorarms für die mittels Rigid-Body-Fit gefitteten tRNAs^{Pro} in eXBP1 (gelb) und eTnaC (grün) betrug um die 5 Å.¹¹ Aufgrund der stärker ausgeprägten Verschiebung im Bereich des Akzeptorarms kam es bei dem Rigid Body Fit zu einer Neigung der tRNA (gelb). Dadurch scheint es, als wäre die tRNA oberhalb des Drehpunktes nach oben und nicht in Richtung P-Loop und L10e verschoben (Abb. 40A).

In eXbp1 scheint der als „P-Site-Loop“ bezeichneten essentiellen Loops von L10e (AS102-112) in einer stabileren Konformation vorzuliegen (Sulima et al., 2014), da in dieser Region ein starke Extradichte erhalten wurde (Abb. 40A). Im Falle der anderen Staller liegt keine Extradichte vor (Abb. 40B-D),

Der P-Site-Loop ist von allen ribosomalen Proteinen am nächsten am PTC lokalisiert und ist aufgrund seiner Flexibilität im leeren Ribosom bei hoher Auflösung normalerweise nicht aufzulösen (ebd.).



Es existiert aber eine Kryo-EM-Struktur, in welcher der P-Site-Loop von L10e wahrscheinlich aufgrund stabilisierender Kontakte zu dem Protein eEF2 visualisiert werden konnte (Voorhees et al., 2014). Zur Orientierung wurde das Modell von L10e isoliert und in eXbp1 mittels Rigid-Body-Fit gefittet (Voorhees et al., 2014, PDB: 1VWX). Aufgrund der gegebenen Auflösung in diesem Bereich ließ sich aber nicht bestimmen, ob der flexible P-Site-Loop in einer abweichenden Konformation von dem Modell vorliegt.

Abb. 40 Verschiebung tRNA Richtung L10e und P-Loop. (A)-(D) Darstellung der Elektronendichten für die verschiedenen Staller. Näheres siehe Text. (E) In der großen Abbildung ist die Überlagerung der Elektronendichten von eXbp1 (grau) und eDP120 (blau) dargestellt. Im rot umrahmten Bereich ist deutlich zu erkennen, dass die Elektronendichte von eDP120 die von eXbp1 im Bereich des Akzeptorarms überlagert und auf eine Verschiebung der Dichte in diesem Bereich hindeutet. In den kleinen Bildern ist die Überlagerung von eXbp1 (grau) mit eAAP (rot) und SecM (rosa) dargestellt. Beide weisen das gleiche Muster der Überlagerung auf.

Farbcode: tRNA (isoliert aus PDB: 2WWL) mittels Rigid-Body Fit in eXBP1 (dunkel-gelb) oder eTnaC (dunkel-grün) gefittet, L10e (gelb, PDB:1VWX). Rot umrahmt sind die Bereiche, die im Text beschrieben werden.

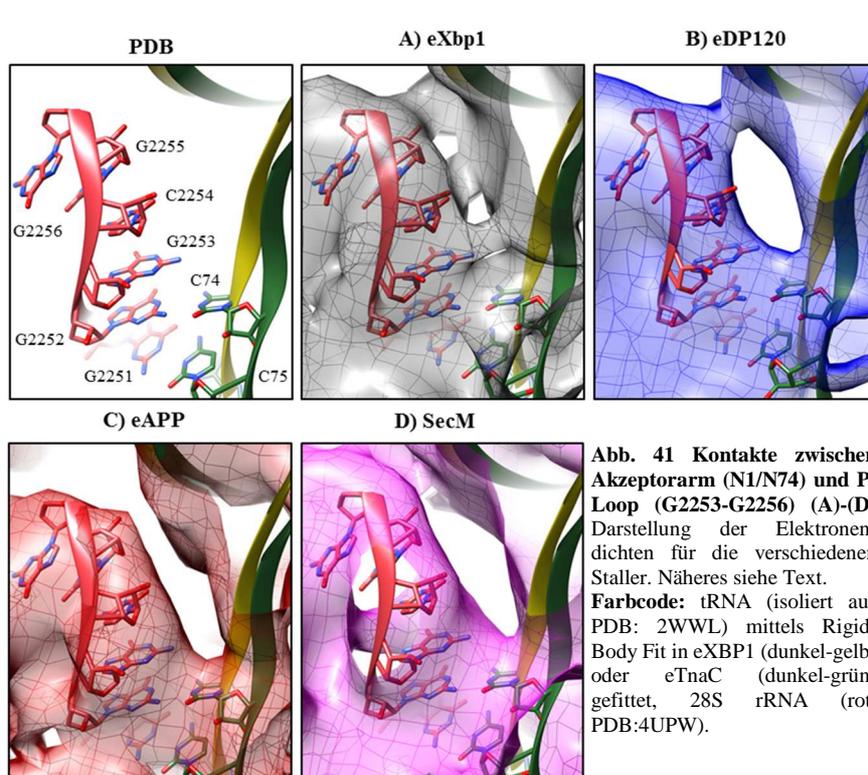
¹¹ Der Abstand wurde für N4 des Nucleotids 72 in den beiden gefitteten tRNAs mit Hilfe von Chimera bestimmt.

Die Stabilisierung des P-Site-Loops ist wahrscheinlich auf die zahlreichen sichtbaren Kontakte zwischen L10e und dem Akzeptorarm der tRNA aufgrund der räumlichen Nähe zurückzuführen (nicht dargestellt). Ein weiterer starker Kontakt besteht im oberen Bereich der tRNA mit Arg24/L10e (Abb. 40A), der im Falle der anderen eukaryotischen Staller nicht existiert (Abb. 40B-C).

Auch im Falle einer Kristallstruktur wurde die erfolgreiche Visualisierung des Prokaryoten spezifischen Loops L27 auf stabilisierender Kontakte zu einer Peptidyl-tRNA zurückgeführt (Sulima et al., 2014).

L10e scheint Signale zwischen dem PTC und anderen funktionalen Zentren des Ribosoms zu übermitteln (Sulima et al., 2014) und eine wichtige Rolle bei der Translationsgenauigkeit (ebd.) sowie der Bewegung der tRNA durch das Ribosom zu spielen (Petrov et al., 2008). Daher besteht die Möglichkeit, dass L10e in seiner stabilisierten Konformation in den Mechanismus des Translationsarrestes oder dessen Aktivierung involviert ist.

4.4.2 Konformationsänderungen im Bereich des CCA-Endes



Kontakte der tRNA zu G2253-G2256:

Folgt man dem Verlauf des Akzeptorarms in Richtung CCA-Ende sind drei deutliche Kontakte zwischen den Nucleotiden G2253-G2256 des P-Loops und der Region des letzten Basenpaares des Akzeptorarms zu erkennen (Abb. 41A). Das Basenpaar wird durch die Nucleotide 1 (N1) und 72 (N72) der tRNA gebildet.

Bei den anderen Stallern sind die Kontakte mit Ausnahme für eDP120 nicht sichtbar (Abb.

41B-D). Allerdings ist der Kontakt im Falle von eDP120 fragwürdig, da dieser nur bei sehr niedrigen Konturlevel besteht.

Die Kontakte von N1/N72 zu G2253-G2256 sind wahrscheinlich auf die Verschiebung des Akzeptorarms Richtung P-Loop und L10e zurückzuführen und könnten die neue Position des Akzeptorarms stabilisieren.

Abweichende Konformation des einzelsträngigen Überhangs des Akzeptorarms

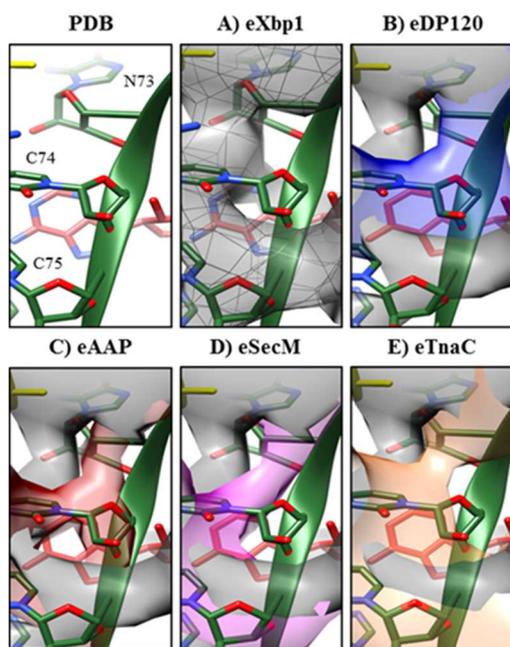


Abb. 42 Verschiebung der Elektronendichte im Bereich N73/C75 (A) Darstellung der Elektronendichte. Näheres siehe Text. (B-E) Überlagerung der Elektronendichte von eXbp1 mit den Elektronendichten der jeweiligen Staller. Die Elektronendichte von eXbp1 ist grau dargestellt. Näheres siehe Text. **Farbcode:** siehe Abb. 41.

Die Überlagerung von eXbp1 (Abb. 42A) mit den 3D-Rekonstruktionen der anderen Staller zeigt eine Verschiebung der Elektronendichte zwischen N73 und C74 in Richtung P-Loop (Abb. 42B-E).

Der Neigungswinkel für den Verlauf der Dichte zwischen N73 und C74 ist entgegengesetzt zu dem Neigungswinkel der anderen Staller und führt zu einer geringeren Verschiebung von C74 als für N73.

Wahrscheinlich wird die Verschiebung von N73 Richtung P-Loop durch die Kontakte von N1/N2 zu G2253-G2256 stabilisiert und im Falle von C74 ermöglicht die große räumliche Nähe zum P-Loop keine stärkere Verschiebung.

Die lokale Auflösung deutet auf eine Flexibilität des Kontaktes N73/C74 hin, somit steht dieser Bereich eventuell unter Spannung (siehe Abb. 45C, S.77).

In Abb. 43A-E sind die Elektronendichten für das CCA-Ende (C74-A76) von eXbp1 und den anderen Stallern dargestellt. Neben der bereits erwähnten Verschiebung der Dichte für N73/C74 fällt auf, dass im Falle von eXbp1 keine Elektronendichte für C75 sichtbar ist. Im Falle der anderen Staller erscheint

diese bereits bei einem hohen Konturlevel. Somit scheint in eXbp1 eine Watson-Crick-Basen-Paarung zwischen C75 und G2251 nicht vorzuliegen.

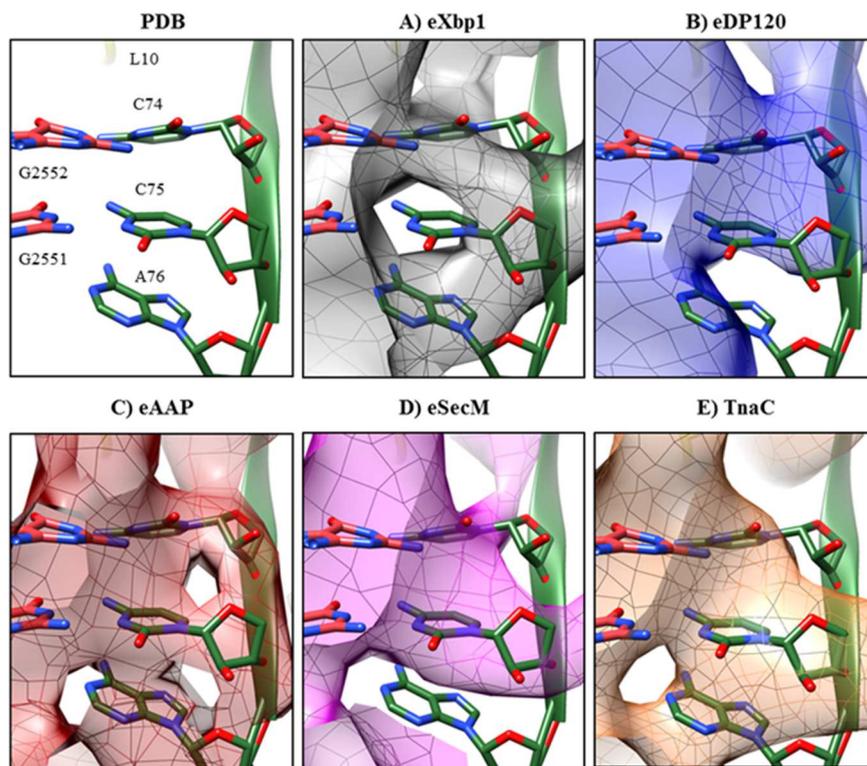


Abb. 43 Vergleich Elektronendichten für das CCA-Ende (A-E) Darstellung der Elektronendichten für das CCA-Ende der verschiedenen Staller. Näheres siehe Text. **Farbcode:** siehe Abb. 41.

In eXbp1 besteht zwischen G2251 und C2064/C2065 ein starker Kontakt (Abb. 44A), der im Falle der anderen Staller sowie e80S nicht vorliegt (Abb. 44B-D). Der Unterschied ist auch in der Dichtedifferenz zu erkennen (Abb. 44E). Dieser Kontakt könnte auf eine Konformationsänderung von G2251 hindeuten und stützt die Annahme der fehlenden Watson-Crick-Basen-Paarung zwischen C75 und G2251.

Modellierung des einzelsträngigen Überhangs des Akzeptorarms

Aufgrund der abweichenden Elektronendichte für das CCA-Ende in eXbp1 wurde der einzelsträngige 3'-Überhang des Akzeptorarms (N73-A76) unter der Nutzung von Coot neu modelliert (Template PDB:2WWL, gefittet in eTnaC).

In Abb. 45A-B ist der modellierte 3'-Überhang (gelb) in eXbp1 dargestellt. Dabei erfolgt die Darstellung aus zwei unterschiedlichen Perspektiven (I und II), die durch eine Rotation um ca. 180 Grad entlang der tRNA-Achse erhalten wurden.

In Abb. 45C-D sind sich der modellierte (gelb) und nicht modellierte 3'-Überhang (grün, PDB:2WWL, gefittet in eTnaC) gegenübergestellt und die erhaltene Verschiebung der Nukleotide bei der Modellierung ist für C74, C75 und A76 schematisch mit Pfeilen angedeutet. N73 ist nicht dargestellt, da die Orientierung des Nukleotids aufgrund der diffusen Dichte in diesem Bereich nicht aussagekräftig ist.

Konformationsänderung C74 und C75

Bei der Gegenüberstellung des modellierten und nicht modellierten 3'-Überhangs in eXbp1 ist gut zu erkennen, dass sich C75 3 Å (für N4 gemessen) in die Richtung C74 zeigende Elektronendichte verschoben hat (Abb. 45E-F). Durch die Verschiebung steht C75 etwas seitlicher zum P-Loop und ist in die Papierebene hinein gerichtet.

Der benötigte Platz für die Neuausrichtung von C75 wird durch eine ebenfalls zum P-Loop seitliche und in die Papierebene ausgerichtete Verschiebung von C74 4 Å (für N4 gemessen) ermöglicht (Abb. 45E-F). Dabei verschiebt sich C74 in die bereits beschriebene Elektronendichte zwischen N73/74 (Abb. 45E-F), welcher im Vergleich zu den anderen Stallern nicht nur näher am P-Loop, sondern auch weiter hinten in der Papierebene liegt (Abb. 42B-E).

Die Neupositionierung von C74 führt zu einer Verkürzung der Distanz zwischen A2602 und C74 und erklärt wahrscheinlich den deutlich sichtbaren Kontakt zwischen A2602 und C74 (Abb. 45B), der im Falle der anderen Staller nicht besteht (Abbildungen nicht gezeigt).

A2602 koordiniert mit U2584 ein Wassermolekül, welches die Oxyanionhöhle für die Peptidyltransferase-Reaktion im Peptidyltransferase-Zentrum (PTC) formt (Simonović und

Steitz, 2009) und spielt auch eine wichtige Rolle bei der Termination der Proteinsynthese und der Freisetzung des Peptides (Polacek et al., 2003).

Bei A2602 handelt es sich um ein flexibles Nukleotid, welches je nach Substrat und dem funktionalen Zustand des Ribosoms unterschiedliche Konformationen annehmen kann (Schmeing et al., 2005b).

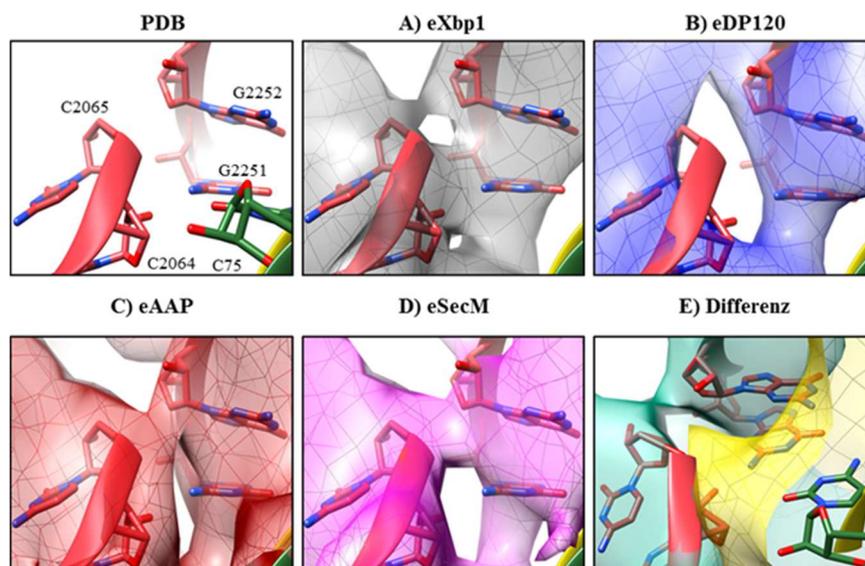


Abb. 44 Kontakt zwischen G2251 und C2064/C2065 (A-D) Darstellung der Elektronendichten für die verschiedenen Staller. Näheres siehe Text. (E) Überlagerung der Elektronendichte für e80s (grün) und eDifferenz (gelb). Näheres siehe Text. **Farbcode:** siehe Abb. 41.

Zum Beispiel nimmt A2602 im Falle von TnaC und AAP eine Konformation an, welche wahrscheinlich einen behindernden Effekt auf die Termination der Translation hat (Seidelt et al., 2009, Bhushan et al., 2010b) und im Falle von SecM und DP120 scheint A2602 flexibel zu sein, da keine Elektronendichte erhalten wird (Abbildungen nicht gezeigt).

In Abb. 45H sind die Konformationen von A2602 aus verschiedenen Kristallstrukturen dargestellt und lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Gruppe I: nach oben gerichtete Konformation, nicht besetzte P-Stelle, Gruppe II: nach unten gerichtete Konformation, besetzte P-Stelle).

Die Konformationen der Gruppe I passen besser als die Konformationen der Gruppe II in die Elektronendichte des beschriebenen Kontaktes zwischen C74 und A2602 (Abb. 45H). Zur Verdeutlichung ist nochmals exemplarisch je eine Konformation beider Gruppen in Perspektive II dargestellt (Abb. 45B).

Allerdings kann aufgrund der niedrigen Auflösung nicht sicher beurteilt werden, ob A2602 tatsächlich in einer zu Gruppe I ähnlichen Konformation vorliegt oder es sich um eine andere Art von Kontakt zwischen C74 und A2602 handelt.

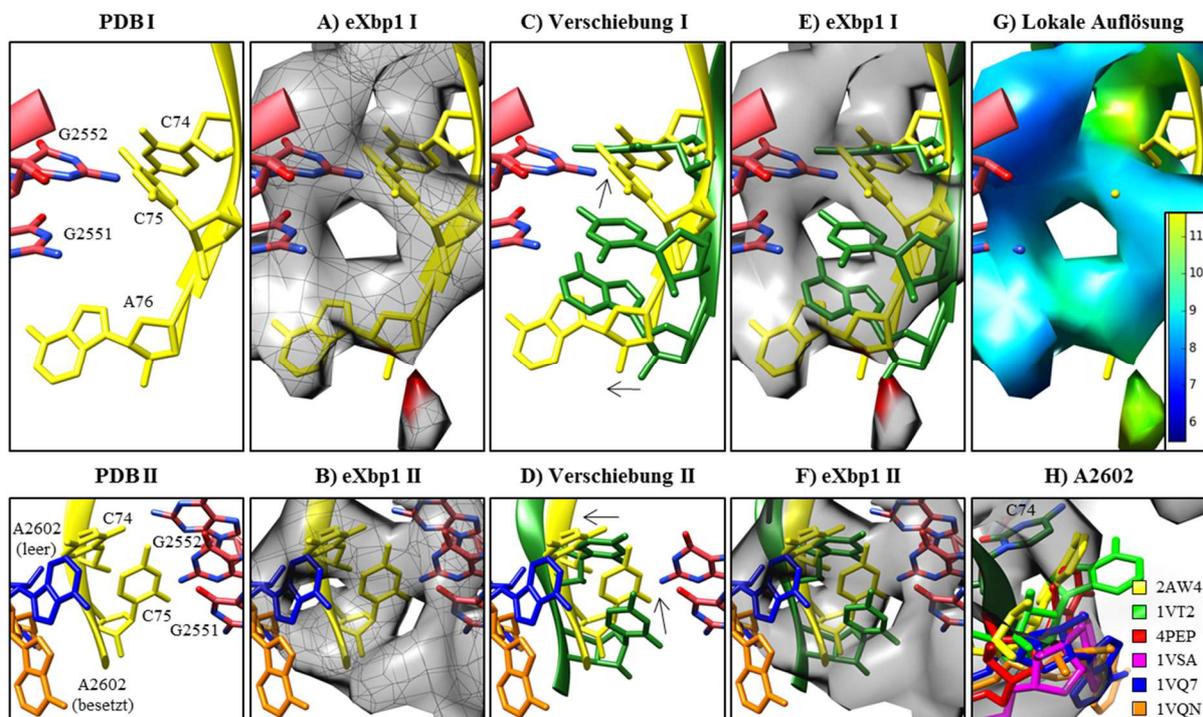


Abb. 45 Konformationsänderung des CCA-Endes im Fall von hXbp1-RNC (A-B) Darstellung des modellierten CCA-Überhangs in der Elektronendichte von eXbp1 aus zwei unterschiedlichen Perspektiven (I u. II). Näheres siehe Text. (C-D) Gegenüberstellung des modellierten und nicht modellierten CCA-Überhangs aus zwei unterschiedlichen Perspektiven. Die Pfeile deuten schematisch die Richtung der Basenverschiebung bei der Modellierung an. Näheres siehe Text. (E-F) Gegenüberstellung des modellierten und nicht modellierten CCA-Überhangs in der Elektronendichte von eXbp1 aus zwei unterschiedlichen Perspektiven. Näheres siehe Text. (G) Lokale Auflösung aus Perspektive I für eXbp1. (H) Darstellung von Konformationen für A2602 aus verschiedenen Kristallstrukturen in Relation zu eXbp1 (grau), dabei lassen sich die Konformationen in zwei Gruppen einteilen. Zu der ersten Gruppe (nicht besetzte P-Stelle, nach oben gerichtete Konformation von A2602) gehören das leere 70S Ribosom (PDB:2AW4) sowie zwei 70S Ribosomen mit gebundenen Antibiotika im Exit-Tunnel (PDB: 1VT2, 4PEP). Der zweiten Gruppe (besetzte P-Stelle, nach unten gerichtete Konformation) gehören das 70S Ribosom mit gebundener tRNA und naszierender Kette (PDB: 1VSA) sowie zwei Ribosomen mit gebundenen Peptidyl-Transferase-Substratanalogon in der P-Stelle an. Bedingt durch unterschiedliche Substrate in der A-Stelle weist das PTC in den beiden Ribosomen eine unterschiedliche Konformation auf, die in einem Fall die Katalyse des Peptidyltransfers ermöglicht (PDB: 1VQ6) und in dem anderen Fall nicht (PDB: 1VQN) (Schmeing et al., 2005a). **Farbcode:** nicht modellierter CCA-Überhang (grün, PDB:2WWL, gefittet in eTnaC), modellierter CCA-Überhang (gelb, modelliert aus PDB:2WWL, gefittet in eTnaC), 28S rRNA (rot, PDB:4UPW), repräsentative Konformationen von A2602 für die Gruppe der Ribosomen mit leerer (orange, PDB:4PEP) sowie besetzter P-Stelle (blau, PDB: 1VQN).

Verschiebung von A76 und der naszierenden Kette

Im Falle von A76 wurde bei der Modellierung eine Verschiebung Richtung P-Loop erhalten (Abb. 45C). Die neue Position des modellierten Ribose- und Phosphatanteils von A76 passt besser in die gegebene Elektronendichte von eXbp1 und C3 von A76 dessen Hydroxylgruppe die Esterbindung zur naszierenden Kette bildet, ist besser zur sichtbaren Dichte der naszierenden Kette positioniert (Abb. 45A, Anfang der naszierenden Kette ist rot eingefärbt). Abb. 46A und F zeigen nochmals deutlich bei niedrigen und hohen Konturlevel, dass die modellierte Ribose von A76 besser als die nicht modellierte Ribose in die Elektronendichte passt und besser zur naszierenden Kette positioniert ist. Die Verschiebung zwischen C3 im modellierten und nicht modellierten A76 beträgt 2 Å.

Die Orientierung der Base von A76 ist aufgrund der hohen Elektronendichte in diesem Bereich nicht glaubwürdig und die Base würde bei der gegebenen Orientierung mit A2451 kollidieren.

Die Überlagerung der Elektronendichte von eXbp1 (Abb. 46A) mit den Elektronendichten der anderen Staller bestätigt nochmals, dass A76 sowie die Esterbindung zur naszierenden Kette in eXbp1 in Relation zu den anderen Stallern Richtung P-Loop verschoben ist (Abb. 46F-I). Im Falle von eAAP und eTnaC passt die nicht modellierte Ribose von A76 besser in die Elektronendichte und ist besser zur naszierenden Kette positioniert (Abb. 46B und D).

Im Falle von SecM-RNC ist bekannt, dass im Vergleich zu TnaC-RNC die Esterbindung in Relation zum PTC ebenfalls um 2 Å verschoben vorliegt (Bhushan et al., 2011), allerdings in Richtung A-Loop (Abb. 46C). Im Falle des SecM-RNC führt die Verschiebung aufgrund einer ungünstigen Geometrie zu einer resultierenden Minderung der Peptidyltransferase-Effizienz (Bhushan et al., 2011). Daher ist anzunehmen, dass im Falle von hXBP1-RNC die Verschiebung der Esterbindung auch zu einer Minderung der Peptidyltransferase-Effizienz führt oder sogar zu einer kompletten Inhibition des Peptidyl-Transfers.

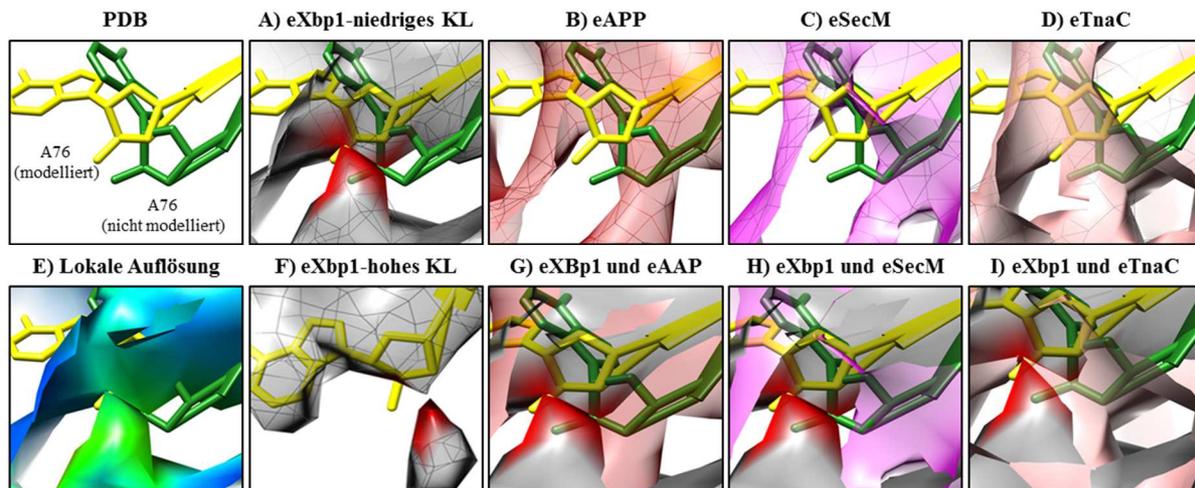


Abb. 46 Verschiebung von A76 und der naszierenden Kette Richtung P-Loop (A-D) Darstellung von A76 (modelliert) und A76 (nicht modelliert) in der Elektronendichte der entsprechenden Staller aus Perspektive I. Näheres siehe Text. **(E)** Lokale Auflösung für eXbp1 aus Perspektive I. Die Farbskala ist in Abb. 45H dargestellt. **(F)** Darstellung von A76 (modelliert) in eXbp1 aus Perspektive II und bei höheren Konturlevel (KL) als in (A). Näheres siehe Text. **(G-H)** Überlagerung der Elektronendichten von eXbp1 (grau) und den entsprechenden Stallern aus der Perspektive I (A-D). Näheres siehe Text. **Farbcode:** A76 (modelliert, gelb), A76 (nicht modelliert, Rigid Body Fit in eTnaC, PDB: 2WWL, grün). Der Beginn der naszierenden Kette ist in eXbp1 rot eingefärbt.

4.4.3 PTC und der obere Bereich des Exit-Tunnels

Induzierte Konformation des PTCs

Das PTC befindet sich in der Domain V der 50S Untereinheit in Prokaryoten und ist im Radius von 18 Å nur von rRNA umgeben (Simonović und Steitz, 2009). Im PTC erfolgt der Peptidyltransfer durch einen nukleophilen Angriff der α -Amino-Gruppe der Amino-Acyl-tRNA in der A-Stelle auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle (ebd.). Die Reaktion verläuft dabei über ein tetrahedrales Oxyanion als Intermediat (ebd.).

Dabei scheinen die fünf Nukleotide C2063, A2451, U2506, U2585 und A2602 eine zentrale Rolle bei der Organisation des PTCs zu spielen (Leung et al., 2011).

Es wurde gezeigt, dass erst durch die Bindung des korrekten Substrates in der A-Stelle das PTC eine Konformation annimmt (Substrat induzierte Konformation), die zu einer Exposition der Estergruppe der Peptidyl-tRNA für den nukleophilen Angriff führt (Schmeing et al., 2005a).

Ohne die Bindung des Substrates liegt das PTC in einer Konformation vor, in welcher der Peptidyltransfer nicht möglich ist und die Esterbindung vor einer unspezifischen Hydrolyse mit Wassermolekülen geschützt ist (nicht induzierte Konformation) (Schmeing et al., 2005a).

Im Falle von eXBP1 passt die Elektronendichte zu der induzierten Konformation (Schmeing et al., 2005a, PDB: 1VQ7) der flexiblen Nukleotide U2506 und U2585 (Abb. 47A).

Beide Nukleotide sowie U2505 stellen Kontakte zu der naszierenden Kette her, deren Beginn rot eingefärbt ist (Abb. 47A).

Die lokale Auflösung der Elektronendichte ermöglicht die Zuordnung der naszierenden Kette und deren Kontakte zu dem Ribosom, da diese im Gegensatz zum restlichen Ribosom niedriger aufgelöst sind (Abb. 47B).

Die niedrigere Auflösung der naszierenden Kette ist entweder auf eine unterstöchiometrische Besetzung des Ribosoms oder die Flexibilität der naszierenden Kette zurückzuführen.

Die Gegenüberstellung der nicht induzierten Konformation von U2506 und U2585 (PDB:1VQ7) gegenüber nicht induzierten Konformationen aus verschiedenen Kristallstrukturen verdeutlicht nochmals, dass die beiden Nukleotide in eXbp1 in der induzierten Konformation vorliegen.

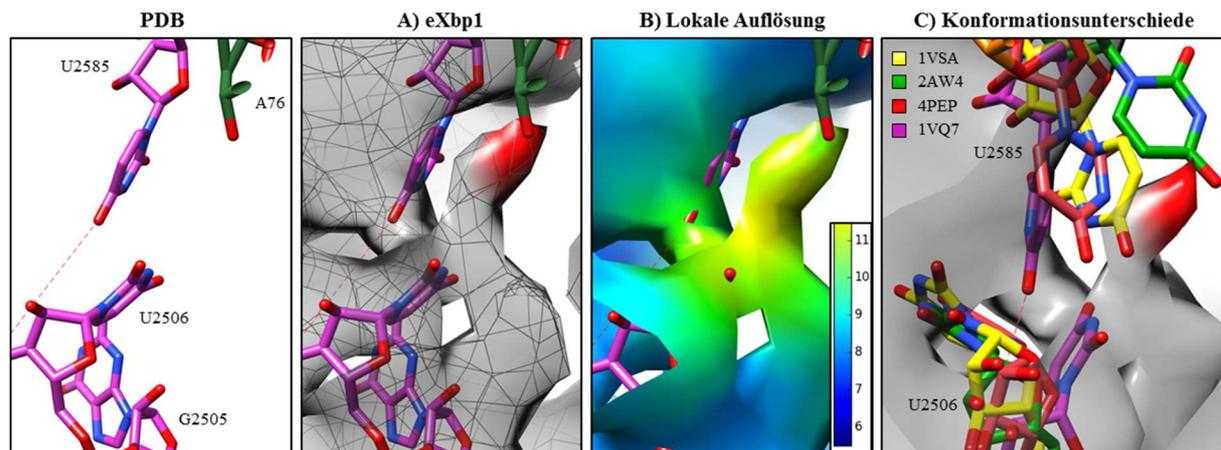


Abb. 47 Induzierte Konformation des PTCs (A) Darstellung der induzierten Konformation des PTCs in der Elektronendichte von eXbp1. Näheres siehe Text. **(B)** Lokale Auflösung von eXbp1. Bei den Bereichen mit der niedrigeren Auflösung handelt es sich um die naszierende Kette und deren Kontakte zum Ribosom. Näheres siehe Text. **(C)** Gegenüberstellung von der induzierten Konformation (PDB:1VQ7) gegenüber den nicht induzierten Konformationen für die flexiblen Nukleotide U2506 und U2585 in eXbp1. Bei den nicht induzierten Konformationen handelt es sich um das leere 70S Ribosom (PDB:2AW4), das 70S Ribosom mit tRNA in der P-Stelle (1VSA) sowie ein 70S Ribosom mit gebundenen Antibiotikum im Exit-Tunnel (PDB: 4PEP). Näheres siehe Text. **Farbcode:** induzierte 28S rRNA (lila, PDB:1VQ7), tRNA (grün, 2WWL, mittels Rigid Body Fit in eTnaC gefittet).

Kontakte zu zentralen Nukleotiden in der Aktivierung des Translationsarrests

Folgt man dem Verlauf der naszierenden Kette vom PTC aus in den Exit-Tunnel, erkennt man in eXbp1 Kontakte der naszierenden Kette zu A2062 und C2610 (Abb. 48A) sowie zu A2058, A2059 und U2609 (Abb. 49A).

Es ist bekannt, dass einige dieser Nukleotide häufig mit verschiedenen Stallern sowie Antibiotika (z.B. Makrolide, Ketolide und Streptogramine) Kontakte ausbilden und relevant für den Translationsarrest sind (Wilson und Beckmann, 2011, Noeske et al., 2014, Kannan und Mankin, 2011). Am häufigsten werden Kontakte zu den Nukleotiden A2062, A2058 und A2609 ausgebildet (Wilson und Beckmann, 2011).

Bei A2062 handelt es sich um ein flexibles Nukleotid, welches mit verschiedenen Antibiotika und der naszierenden Kette interagieren kann und dabei interaktionsabhängig unterschiedliche Konformationen annimmt (Abb. 10G) (Fulle und Gohlke, 2009).

Dabei ist A2062 über seine benachbarten Nukleotide direkt mit dem PTC verlinkt (Vazquez-Laslop et al., 2008). G2061 interagiert mit A2451 und C2063 mit A2450 (ebd.). Somit dient A2062 wahrscheinlich als Sensor, um die Beschaffenheit der naszierenden Kette zu erfassen und an das PTC zu übertragen (Vazquez-Laslop et al., 2008, Chirkova et al., 2010).

Im Falle aller Staller besteht ein Kontakt zu A2062 (Abb. 48A, C-E) außer für eDP120 (Abb. 48B), bei dem der Translationsarrest nicht auf Eigenschaften der naszierenden Kette beruht.

In eXbp1, eAAP und eTnaC scheint A2062 eine ähnliche Konformation anzunehmen (Abb. 48, C, E) und die Konformation von A2062 im 70S Ribosom mit dem gebundenen Antibiotika Quinupristin (Streptogramin B, PDB:4PEP) passt genau in die Elektronendichte von eXbp1 (Abb. 48A, G). Auch passt wie später beschrieben Quinupristin generell sehr gut in die Elektronendichte der naszierenden Kette in eXbp1.

Im Falle von eSecM scheint A2062, wie publiziert, flacher gegen die Tunnelwand zu stehen (Abb. 48D). Dabei führt im Fall von SecM und ErmC eine Mutation von A2062 zu einer Aufhebung des Translationsarrests (Bhushan et al., 2011).

Interessant ist, dass in eXbp1 neben A2062 ein sehr starker Kontakt zu C2610 besteht (Abb. 48A), welcher spezifisch für eXbp1 zu sein scheint, da er im Falle der anderen Staller nicht existiert (Abb. 48B-E). Erst bei einem niedrigeren Konturlevel ist im Falle von eSecM ein schwacher Kontakt zu erkennen (Abb. 49D), der aber wahrscheinlich unspezifisch ist und in der entsprechenden Veröffentlichung auch nicht erwähnt wird (Bhushan et al., 2011).

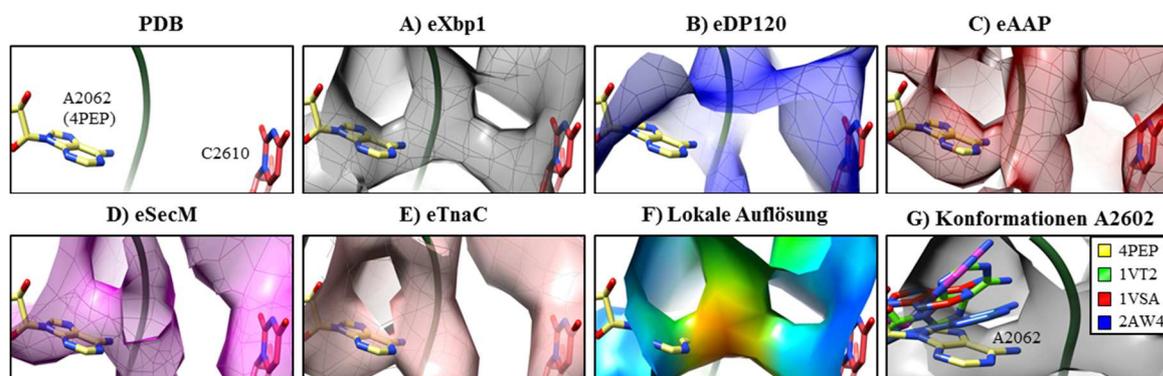


Abb. 48 Kontakte der naszierenden Kette zu A2062 und U2610 (A-E) Darstellung der Elektronendichten für die verschiedenen Staller. Näheres siehe Text. **(F)** Lokale Auflösung von eXbp1. Bei den Bereichen mit der niedrigeren Auflösung handelt es sich um die naszierende Kette und deren Kontakte zum Ribosom. Näheres siehe Text. **(G)** Konformationen von A2062 aus unterschiedlichen 3D-Rekonstruktionen in der Elektronendichte von eXbp1 (grau). Dabei handelt es sich um Konformationen des leeren 70S Ribosoms (PDB:2AW4, blau), des 70S Ribosoms mit tRNA und naszierender Kette (PDB: 1VSA, rot) und des 70S Ribosoms mit gebundenen Streptogramin Quinupristin (PDB: 4PEP, gelb) sowie gebundenen Ketolide CEM-101 (PDB: 1VT2, grün). Näheres siehe Text. **Farbcode:** 28S rRNA (gelb, PDB: 4PEP), 28S rRNA (rot, PDB:4UPW), naszierende Kette (grün, modelliert).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von C2610 zu einer deutlichen Reduzierung des durch das Antibiotika Erythromycin verstärkten Translationsarrests von ermCL führt (Vázquez-Laslop et al., 2011). Dabei scheint C2610 allerdings einen Kontakt mit Erythromycin und nicht mit der naszierenden Kette auszubilden (ebd.).

Die Nukleotide A2058 und U2609 spielen eine wichtige Rolle im Translationsarrest von SecM, TnaC und bestimmter Antibiotika wie den Makroliden (Vazquez-Laslop et al., 2008). Auch im Falle von AAP, CMV und ErmC wurde gezeigt, dass Mutationen von U2609 oder den kontaktierenden Aminosäuren in der naszierenden Kette ebenfalls Effekte auf den Translationsarrest zeigen. (Bhushan et al., 2010b).

Daher handelt es sich bei A2058 und U2609 wahrscheinlich um zentrale Nukleotide, welche als Bestandteile der als „A-Patch“ (A2058, A2059, A2503 und A2062) und „U-Patch“ (U2609, U1782, U2586 und A2587) bezeichneten Signalübertragungswege Signale der naszierende Kette an das PTC übertragen können (Rodnina et al., 2011, S.383).

In eXbp1 sind ebenfalls deutliche Kontakte zu A2058, A2059 und U2609 zu erkennen (Abb. 49A, C).

Das Antibiotikum Quinupristin (Streptogramin B, PDB:4PEP) passt sehr gut in die Elektronendichte der naszierenden Kette (Abb. 49C). Quinupristin bildet ebenfalls Kontakte zu U2058, U2609 und A2062 aus (Noeske et al., 2014) und die Konformation von A2062 passt genau in die Elektronendichte von eXbp1 (Abb. 48A). Mutationen von A2062 oder U2609 führen zu einer Resistenz gegen Quinupristin (ebd.).

Die ähnlichen Kontakte und der gute Fit von Quinupristin in die Elektronendichte von eXbp1 belegen die zentrale Bedeutung dieses Bereiches für die Aktivierung des Translationsarrests.

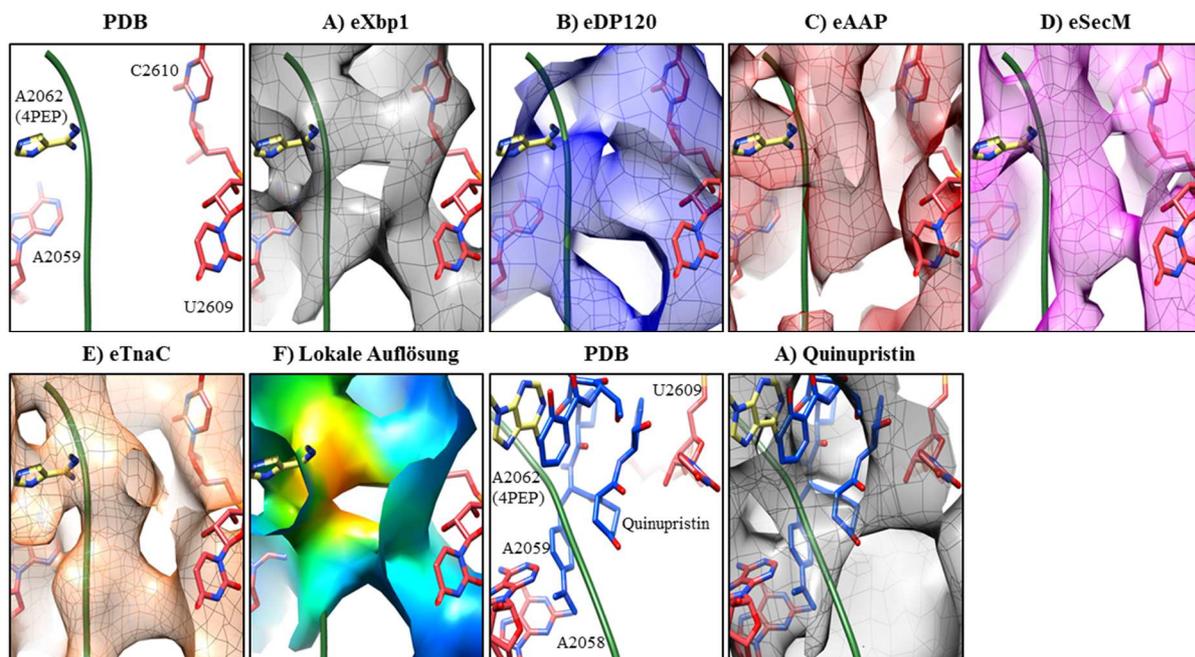


Abb. 49 Kontakte der naszierenden Kette zu A2058, A2059, A2062, U2609 und U2610 (A) Darstellung Elektronendichte von eXbp1 aus Perspektive I. Näheres siehe Text. **(B)** Lokale Auflösung von eXbp1. Bei den Bereichen mit der niedrigeren Auflösung handelt es sich um die naszierende Kette und deren Kontakte zum Ribosom. **(C)** Darstellung des Antibiotikums Quinupristin in der Elektronendichte von eXbp1 aus Perspektive II. Näheres siehe Text. **Farbcode:** 28S rRNA (gelb, PDB: 4PEP), 28S rRNA (rot, PDB:4UPW), naszierende Kette (grün, modelliert), Quinupristin (blau, PDB:4PEP).

4.4.4 Konstriktion und der untere Bereich des Exit-Tunnels

Die Wand des Exit-Tunnels besteht hauptsächlich aus rRNA, aber es sind auch die Proteine L4, L17 und L39e (in Eukaryoten) an der Bildung der Tunnelwand beteiligt (Ito und Chiba, 2013). L4 und L17 (L22 in Prokaryonten) sind Teil der Konstriktion (größte Verengung des Tunnels, 12Å) (Nissen et al., 2000, Ito und Chiba, 2013), welche sich ca. am Ende des ersten Drittels des Exit-Tunnels befindet (Ito und Chiba, 2013).

Die Konstriktion scheint eine zentrale Rolle im Translationsarrest zu spielen, da Mutationen im betreffenden Bereich der naszierenden Kette oder in der Konstriktion Effekte auf den Translationsarrest verschiedener Staller zeigen (Wilson und Beckmann, 2011).

Dabei bilden die Staller unterschiedliche Kontakte zu der Konstriktion aus (Bhushan et al., 2010b) und die beobachteten Effekte beruhen wahrscheinlich auf Konformationsänderungen flexibler Bereiche in L4 und L22/L17 (Fulle und Gohlke, 2009).

In eXbp1 sind in der Konstriktion starke Kontakte zwischen Arg71/L4 und A761 zur naszierenden Kette sichtbar, sowie bei niedrigem Konturlevel zu Arg135/L17 (Abb. 50A).

Die anderen Staller weisen abweichende Kontakte zur Konstriktion auf, aber alle bilden offenbar einen Kontakt zu A761 aus (Abb. 50D-G). Im Falle von eDP120 ist der Kontakt aufgrund der niedrigen Auflösung sowie der nicht sichtbaren naszierenden Kette zweifelhaft (Abb. 50D) und in eAAP scheint A761 eine weiter nach oben gerichtete Konformation einzunehmen, um in die Elektronendichte zu passen (Abb. 50E).

Es ist bekannt, dass A761 eine Rolle im Translationsarrest einiger Staller spielt (Bhushan et al., 2010b). Zum Beispiel führen Mutationen der Aminosäuren in der naszierenden Kette von CMV sowie AAP, die mit A761 einen Kontakt ausbilden zu einer Aufhebung des Translationsarrests und im Falle von TnaC und SecM führen Insertionen in der Region um A761 zu einer Schwächung des Translationsarrests (ebd.).

Im letzten Teil des Exit-Tunnels im Bereich vor dem Tunnelausgang lässt sich die naszierende Kette im Falle von eXbp1 auch bei einem niedrigen Konturlevel nicht auflösen (Abb. 51A, B). Im Gegensatz zu den anderen Stallern, bei denen die naszierende Kette deutlich zu erkennen ist (Abb. 51D-G).

Anscheinend ist die naszierende Kette im Falle von eXbp1 in diesem Bereich sehr flexibel, da nur bei einem sehr niedrigen Konturlevel eine massive Extradichte erhalten wird (nicht dargestellt).

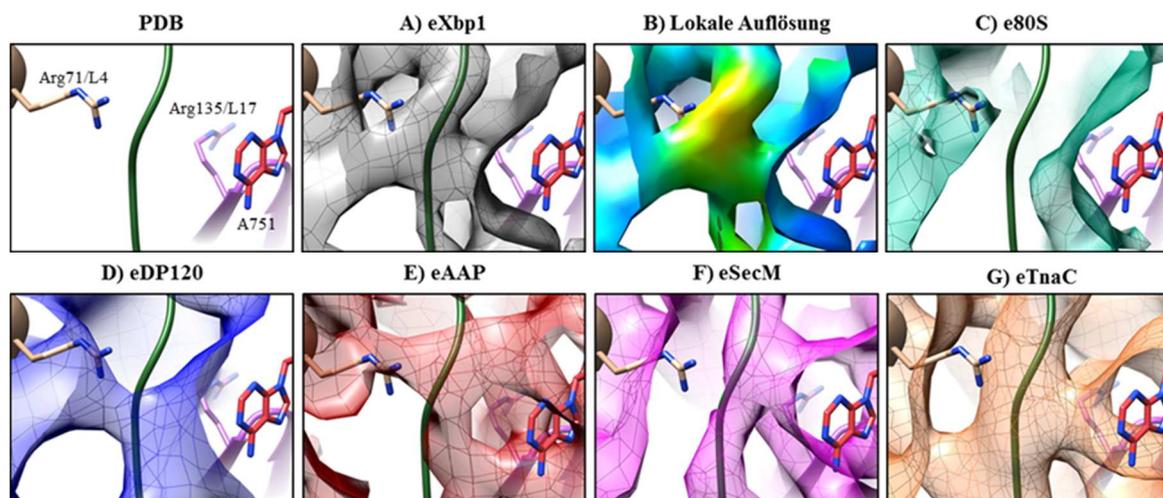


Abb. 50 Kontakte der naszierenden Kette zu Arg71/L4 und A761 (A) Darstellung der Elektronendichten für eXbp1. Näheres siehe Text. **(B)** Lokale Auflösung von eXbp1. Bei den Bereichen mit der niedrigeren Auflösung handelt es sich um die naszierende Kette und deren Kontakte zum Ribosom. Näheres siehe Text. **(C)** Darstellung der Elektronendichten für e80S. **(D-E)** Darstellung der Elektronendichten für die verschiedenen Staller. Näheres siehe Text. **Farbcode:** 28S rRNA (rot, PDB: 4UPW), naszierende Kette (grün, modelliert), L4 (beige, PDB: 4UPX)

Daher ist der modellierte Verlauf der naszierenden Kette in diesem Bereich fragwürdig und erklärt, warum der modellierte Verlauf nicht in die ähnlich verlaufenden Elektronendichten der naszierenden Ketten der anderen Staller passt (Abb. 51D-G).

Nur im oberen Teil wird die naszierende Kette durch die Kontakte zu His85/L4 und eventuell auch zu Arg128/L17 stabilisiert, da in eXbp1 eine deutliche Extradichte im Vergleich zu e80S zu erkennen ist (vgl. Abb. 51A u. C). Dabei ist die lokale Auflösung für die naszierende Kette deutlich besser als in den vorhergehenden Abbildungen (Abb. 51B).

Die naszierende Kette scheint auch einen Kontakt zu Arg126/L17 und His43/L39e auszubilden, da im Vergleich zu e80S in eXbp1 ebenfalls eine Extradichte für diese zu erkennen ist (vgl. Abb. 51A u. C), die sich bei einer weiteren Senkung des Konturlevels verstärkt.

Ein zu Arg126/L17 ähnlicher Kontakt besteht auch im Fall von SecM zwischen K84/L22 und der naszierenden Kette (Abb. 51F). Diese Region des Tunnels besitzt aber im Falle von SecM keine Relevanz für den Translationsarrest (Bhushan et al., 2011).

Erst am Tunnelausgang selbst sind wieder deutliche Kontakte der naszierenden Kette zu Tyr37/L39e und A1321 in Helix 50 sichtbar (Abb. 52A).

Der Kontakt zu A1321 scheint im Falle aller Staller zu existieren (Abb. 52D-G), aber eine Relevanz für den Translationsarrest wurde nicht gezeigt.

Das Protein L39e existiert nur in Eukaryoten. Im Gegensatz zu eXbp1 (Abb. 52A) wird in eAAP kein Kontakt zu Tyr37/L39e erhalten (vgl. Abb. 52A und E). Der sichtbare Kontakt in eDP120 ist aufgrund des niedrigen Konturlevels und der niedrigen Auflösung fragwürdig (Abb. 52D).

Da eine Störung des Kontakts zu Tyr37/L39e im Falle des eukaryotischen Staller CMV zu einer Aufhebung des Translationsarrests führt (Bhushan et al., 2010b), könnte dieser Kontakt auch im Falle von Xbp1 eine wichtige Rolle im Translationsarrest spielen.

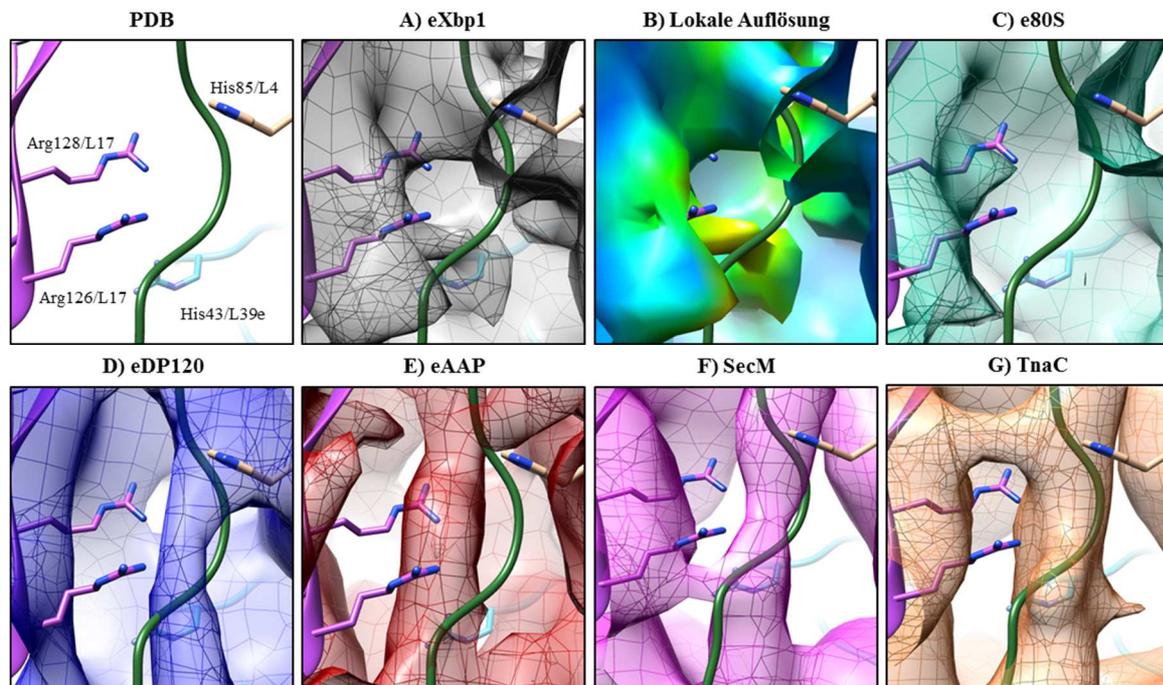


Abb. 51 Flexibilität der naszierenden Kette vor dem Ende des Exit-Tunnels (A) Darstellung der Elektronendichten für eXbp1. Näheres siehe Text. (B) Lokale Auflösung von eXbp1. Bei den Bereichen mit der niedrigeren Auflösung handelt es sich um die naszierende Kette und deren Kontakte zum Ribosom. Näheres siehe Text. (C) Darstellung der Elektronendichten für e80S. (D-E) Darstellung der Elektronendichten für die verschiedenen Staller. Näheres siehe Text. **Farbcode:** 28S rRNA (rot, PDB: 4UPW), naszierende Kette (grün, modelliert), L4 (beige, PDB: 4UPX), L17 (lila, PDB: 4UPX), L39e (cyan, PDB: 4UPX).

4.4.5 Zusammenfassung der relevanten strukturellen Merkmale in hXBP1-RNC

An dieser Stelle soll zur Übersicht nochmals knapp in Stichpunkten eine Zusammenfassung der herausgearbeiteten und wahrscheinlich für den Mechanismus des Translationsarrests relevanten strukturellen Merkmale in hXBP1-RNC gegeben werden:

- Verschiebung der Peptidyl-tRNA Richtung P-Loop und L10e
- Neue Kontakte zwischen Akzeptorarm und P-Loop sowie P-Site-Loop von L10e
- Stabilisierung der Konformation des P-Site-Loops von L10e
- Fehlende Ausbildung Watson-Crick-Basenpaarungen: C74/C75 mit G2251/G2252
- Verschiebung A76 und Esterbindung relativ zum PTC in Richtung P-Loop
- A2602 liegt vermutlich nicht in der induzierten Konformation vor
- Identifizierung zentraler Kontakte zwischen der naszierenden Kette und der Tunnelwand, die für ihrer Rolle in der Aktivierung des Translationsarrests bekannt sind
- Identifizierung einer in hXBP1-RNC spezifischen den Exit-Tunnel überspannenden Brücke, gebildet aus den beiden Kontakten von A2062 und C2610 zur naszierende Kette

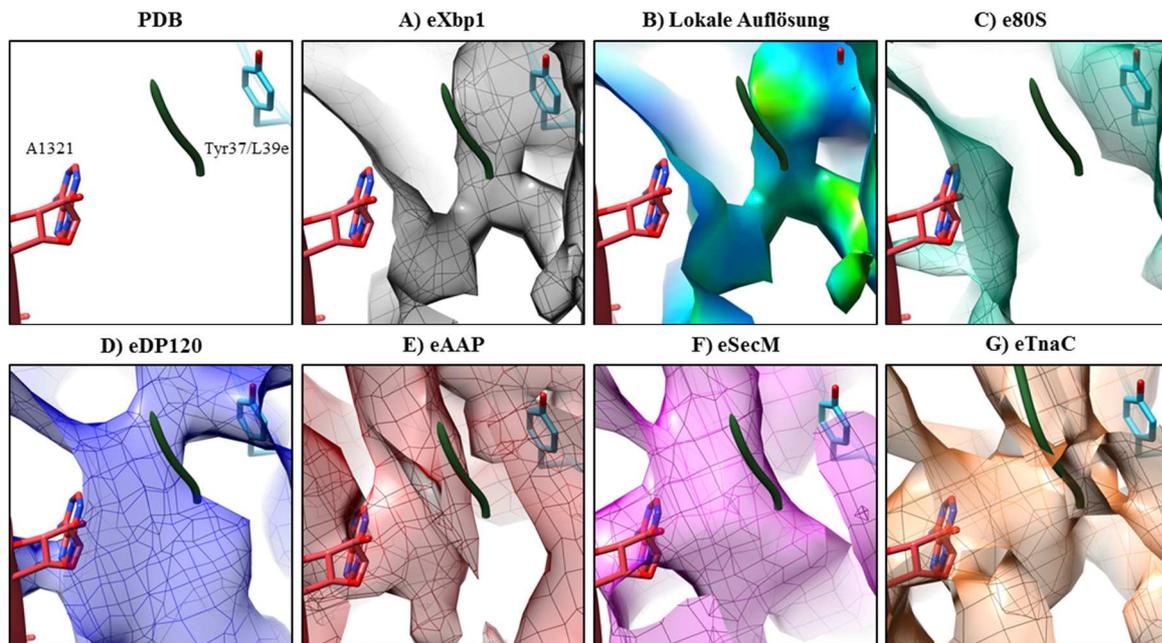


Abb. 52 Kontakte der naszierenden Kette zu A1321 und Tyr37/L39e (A) Darstellung der Elektronendichten für eXbp1. Näheres siehe Text. (B) Lokale Auflösung von eXbp1. Bei den Bereichen mit der niedrigeren Auflösung handelt es sich um die naszierende Kette und deren Kontakte zum Ribosom. Näheres siehe Text. (C) Darstellung der Elektronendichten für e80S. (D-E) Darstellung der Elektronendichten für die verschiedenen Staller. Näheres siehe Text. **Farbcode:** 28S rRNA (rot, PDB: 4UPW), naszierende Kette (grün, modelliert), L39e (cyan, PDB: 4UPX)

5 Diskussion

5.1 Projekt I: Modellbau des 80S Ribosoms (*P. falciparum*)

Bei Malaria tropica handelt es sich um die gefährlichste Variante der Malaria und wird durch den parasitären Erreger *P. falciparum* verursacht (White et al., 2014).

Durch die strukturelle Ähnlichkeit des 80S Ribosoms in *P. falciparum* und *H. sapiens* führen Antibiotika wie Emetin, welche die Translation des zytosolischen 80S Ribosoms von *P. falciparum* inhibieren zu starken, unspezifischen Nebenwirkungen beim Menschen und werden daher nicht eingesetzt (Akinboye und Bakare, 2011).

Für die Entwicklung spezifischer Antibiotika gegen das 80S Ribosom (*P. falciparum*) wäre ein molekulares Modell des zugehörigen 80S Ribosoms hilfreich, anhand dem die Unterschiede zum menschlichen Ribosom herausgearbeitet werden könnten.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit unter Nutzung der SP-Kryo-EM eine 3D-Rekonstruktion des gereinigten 80S Ribosoms (*P. falciparum*, A-Typ) generiert.

Dank der neuen DED-Technologie zeigte die generierte 3D-Rekonstruktion eine sehr hoher Detaildichte bei fast atomarer Auflösung. Unter anderem konnten die Seitenketten für einen Großteil der Aminosäuren der rProteine aufgelöst werden.

Bei der Modellierung konnten einige Plasmodium spezifische Merkmale des 80S Ribosoms herausgearbeitet werden, auch wenn der Bau des gesamten Modells nicht abgeschlossen wurde, da dieses durch eine andere Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde (Wong et al., 2014).

Zwei der interessantesten strukturellen Besonderheiten wurden in dieser Arbeit näher präsentiert, da sie eindrucksvoll den hohen Informationsgehalt der 3D-Rekonstruktion bei fast atomarer Auflösung belegen und als potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung spezifischer Medikamente dienen könnten.

Dabei handelt es sich erstens um eine, in einigen Organismen der Myxozoa, spezifische konservierte N-terminalen Verlängerung von L41e, die einen konservierten Kontakt zu h28 der 18S rRNA aufweist. h28 dient als Drehlager für die Kopffrotation der kleinen Untereinheit bei der Translation (Mohan et al., 2014, Fischer et al., 2010).

Zweitens konnte in ES3L der 5.8S rRNA eine neue Helix-Loop-Helix Struktur identifiziert werden, welche durch eine Tertiärstruktur mit der 28S rRNA stabilisiert wird. Eventuell handelt es sich dabei, um ein neues RNA-Motiv. Durch die neue Ausrichtung von ES3L steht der terminale Helix-Arm in Kontakt zur universalen Bindungsstelle und könnte eine Plasmodium spezifische Erweiterung dieser Bindungsstelle darstellen.

5.1.1 Erfolgreiche Etablierung der Reinigung von 80S Ribosomen (*P. falciparum*)

In der Arbeit konnte erfolgreich ein Protokoll zur Reinigung der 80S Ribosomen (*P. falciparum*, A-Typ) aus infizierten menschlichen Erythrozyten in ausreichender Ausbeute für die SP-Kryo-EM etabliert werden. Hierzu wurde auf das im Originalprotokoll verwendete amphipatische Glycosid Saponin verzichtet und eine zusätzlich Puromycin-Hochsalz-Behandlung eingeführt, um möglichst homogene 80S Ribosomen ohne tRNA und mRNA zu erhalten. Dies ist notwendig, wenn man höchste Auflösung für ribosomale Partikel erreichen will. Dabei ermöglichte die Qualität und Homogenität der gereinigten leeren 80S Ribosomen eine 3D-Rekonstruktion des 80S Ribosoms bei fast atomarer Auflösung.

5.1.2 DED-Technologie ermöglicht 3D-Rekonstruktion bei fast atomarer Auflösung

Die „detective quantum efficiency“ (DQE)¹² und der Beamshift stellen begrenzende Parameter für die Auflösung der Datensammlung bei der SP-Kryo-EM dar (Bai et al., 2013).

Die neue Technologie des „direct electron detectors“ (DED) ermöglicht bei der digitalen Bildaufnahme eine direkte Detektion der Elektronenstrahlung ohne eine vorhergehende Konvertierung der Elektronen in Photonen wie bei der älteren CCD-Technologie (Bai et al., 2013). Dies führt zu einer höheren „detective quantum efficiency“ (DQE) als bei Fotofilm und CCD (ebd.).

Auch ermöglichen DED eine hohe Bildrate bei der Datensammlung (10-40 Frames pro Sekunde) (Li et al., 2013). Durch ein Alignment dieser Frames kann der auftretende Beamshift bei der Datensammlung weitestgehend eliminiert werden (ebd.).

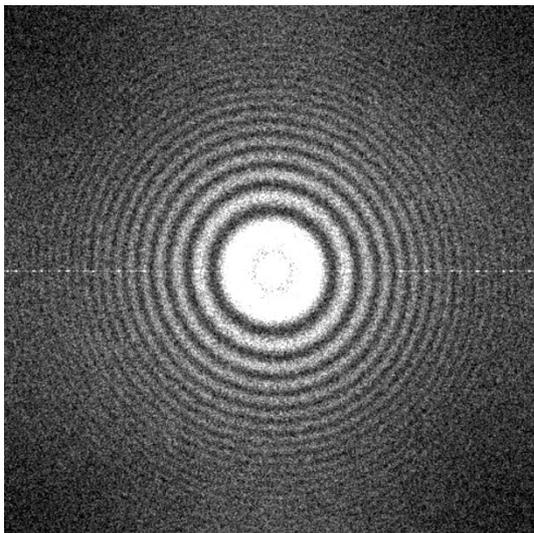


Abb. 53 Powerspektrum eines exemplarischen Mikrographen Der exemplarische Beamshift korrigierte Mikrograph wurde für die Berechnung des Powerspektrums dreifach dezimiert (2,0 Å). Die Thonringe des Powerspektrums reichen bis zur Nyquist-Grenze von 4 Å.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit erstmals im Arbeitskreis Beckmann in Kollaboration mit dem Arbeitskreis Förster die DED-Technologie für die Datensammlung der gereinigten 80S Ribosomen (*P. falciparum*) eingesetzt und die Powerspektren sowie die zugehörigen CTF der erhaltenen Beamshift korrigierten Mikrographen zeigten eine hohe Auflösung von bis zu unter 4 Å.

Die zugehörige mit einem Butterworth low-pass Filter bei 4,0-4,2 Å gefilterte 3D-Rekonstruktion zeigte daher eine beeindruckend hohe Detaildichte bei fast atomarer Auflösung. Es konnten die Seitenketten der Aminosäuren sowie einzelnen Nukleotide der rRNA zum größten Teil visualisiert werden. Die Auflösung war aber nicht ausreichend, um eine vollständige Basentrennung der rRNA zu erreichen. Dabei wurden für die 3D-Rekonstruktion nur 21.318 Partikel eingesetzt. Anhand der 3D-

Rekonstruktion war ein exakter Modellbau möglich.

Der Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit angefertigten 3D-Rekonstruktionen unter Verwendung der CCD-Technologie oder Fotofilms belegt eindrucksvoll den Vorteil der neuen DED-Technologie.

Im Falle der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes (ERj1, BiP und Sec61 am 80S Ribosom) wurde für die Bildaufnahme ein Fotofilm eingesetzt. Obwohl für die 3D-Rekonstruktion annähernd die dreifache Anzahl an Partikeln (60.221 Partikel) eingesetzt wurde, musste aufgrund der gegebenen Auflösung die 3D-Rekonstruktion für eine sinnvolle Dateninterpretation mit einem Butterworth low-pass Filter bei 7.0-7.2 Å gefiltert werden. Die Detaildichte ist deutlich geringer. Es sind nur die Sekundärstrukturen der rProteine und rRNA zu erkennen. Die Seitenketten der Aminosäuren sind nicht aufgelöst und einzelne isolierte Nukleotide nur sehr grob.

Im Falle der 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC wurde für die Bildaufnahme die CCD-Technologie eingesetzt. Auch hier wurde, obwohl ungefähr die sechsfache Menge an Partikeln (118.400 Partikel) eingesetzt wurde, die 3D-Rekonstruktion für eine sinnvolle Dateninterpretation bei einer höheren Frequenz gefiltert (Butterworth low-pass Filter, 5-5.2 Å).

¹² Die DQE gibt die Signalstärke im Verhältnis zum Hintergrundrauschen an (Milne et al., 2013).

Auch hier ist die Detaildichte deutlich geringer. Die Seitenketten der rProteine sind ebenfalls nicht aufgelöst, aber die Konformation isolierter Basen der rRNAs wie zum Beispiel von C74 und C75 der Peptidyl-tRNA können mit einer Genauigkeit von ungefähr 2 Å ungefähr modelliert werden.

Der Vergleich zu zwei weiteren 3D-Rekonstruktionen, welche durch andere Mitglieder des Arbeitskreises angefertigt wurden, zeigen noch eindrucksvoller die Überlegenheit der neuen DED-Technologie gegenüber dem Fotofilm und der CCD-Technologie.

Die globale Auflösung der beiden 3D-Rekonstruktionen des 80S Ribosoms liegt im Falle von *T. aestivum* unter Verwendung eines Fotofilms bei 5.5 Å_{FSC0,5} (EMD-1780, Armache et al., 2010) und im Falle von *H. sapiens* unter Verwendung der CCD-Technologie 5.0 Å_{FSC0,5} (EMD-5592, Anger et al., 2013). Somit zeigen beide Rekonstruktionen eine ähnliche globale Auflösung wie die eigene 3D-Rekonstruktion von *P. falciparum* für die 60S Untereinheit (5,2 Å_{FSC0,5}).

Allerdings wurden erstens 2.1 Millionen Partikel für die 3D-Rekonstruktion (*T. aestivum*) sowie 343.343 Partikel für die 3D-Rekonstruktion (*H. sapiens*) eingesetzt und zweitens ist der Detailgehalt der beiden 3D-Rekonstruktionen deutlich geringer, da die Seitenketten der Aminosäuren nicht sowie die Nukleotide deutlich schlechter aufgelöst sind (EMD-1780, EMD-5592).

Anhand des Beispiels beider 3D-Rekonstruktionen konnte auch verdeutlicht werden, dass der numerische Wert der globalen Auflösung nur ein Anhaltspunkt für die tatsächliche Qualität der 3D-Rekonstruktion ist, aber entscheidend für die Beurteilung der Qualität der aufgelösten Details sind.

Somit konnte die Überlegenheit der DED-Technologie gegenüber dem Fotofilm und der CCD-Technologie im Falle hochauflösender Datensammlungen im eigenen Arbeitskreis demonstriert werden.

5.1.3 Hohe Detaildichte der modellierten Bereiche

Basierend auf der 3D-Rekonstruktion erfolgte der Modellbau, der sich auf die Plasmodien-spezifischen Bereiche der großen Untereinheit im Ribosom fokussierte.

Auch bei dem Modellbau zeigte sich der Vorteil der DED-Technologie. Aufgrund der sichtbaren Ansätze der Seitenketten und der besser aufgelösten Nukleotide in der 3D-Rekonstruktion ließen sich die Konformationen der Nukleotide und Aminosäuren deutlich besser bestimmen (siehe 1.1.2, S.2).

Dadurch war es beim Modellbau möglich, Abweichungen der Konformationen im Vergleich zu den eingesetzten Homologie-Modellen zu korrigieren und Bereiche für die keine Homologie-Modelle existieren de novo zu bauen.

Auf diese Weise nahm der Informationsgehalt des Modells deutlich zu und ermöglichte eine deutlich bessere Interpretation

Anhand dieser Strategie konnten ausgenommen von einigen flexiblen Regionen, deren Auflösung zu schlecht war, die 5.8S rRNA und einen Teil der 28S rRNA (Nukleotide 1-1600, Domänen I/II) sowie die umgebenden Proteine modelliert werden, als auch eine interessante N-terminalen Verlängerung im Protein L41e und deren umgebende Region der 18S rRNA.

5.1.4 Konservierte N-terminale Verlängerung von L41e in der Gruppe der Myozoa

Das Protein L41e sitzt in einer Bindungstasche der 18S rRNA nahe dem Decodierungszentrum und formt durch Kontakte zur 28S rRNA eine Brücke zwischen der kleinen und großen Untereinheit (Ben-Shem et al., 2011).

Die genaue Funktion des nicht essentiellen Proteins ist unbekannt, die Deletion zeigt aber in *S. cerevisiae* einen Effekt auf die Peptidyl-Transferase-, die Translokations- und die Decodierungsaktivität des Ribosoms (Dresios et al., 2003).

Die Proteinsequenz von L41e mit 25 AS Länge ist in den Eukaryoten hochkonserviert (Dresios et al., 2003) und bildet eine α -Helix aus (Ben-Shem et al., 2011).

In dieser Arbeit konnte im Falle von Plasmodium erstmals in einem Organismus eine 14 AS lange N-terminale Verlängerung in L41e identifiziert und modelliert werden. Eine Sequenzanalyse zeigte, dass die N-terminale Verlängerung auch in Organismen anderen Phyla der Myozoa existiert und konserviert ist. Die Verlängerung bildet zwei deutliche konservierte Kontakte zur 18S RNA aus, die aufgrund ihrer Konservierung anscheinend zu einem Evolutionsvorteil führen.

Der erste Kontakt wird durch das aus h28 herausgeklappte in *P. falciparum* und *S. cerevisiae* konservierte Nukleotid A1631 sowie den konservierten Aminosäuren Ser11 und Ala13 der Verlängerung gebildet.

h28 dient als Drehlager für die Kopfrotation der kleinen Untereinheit bei der Translation (Mohan et al., 2014, Fischer et al., 2010). Da die Kopfrotation die Translokation der tRNAs erleichtert (Ratje et al., 2010), könnte dieser zusätzliche Kontakt zu h28 Einfluss auf die Translokationsaktivität haben. Die Deletion von L41e von *S. cerevisiae* zeigt einen Einfluss auf die Translokationsaktivität (Dresios et al., 2003).

Der zweite Kontakt wird durch die Seitenketten Tyr8 und Lys10 des in der Verlängerung durchgehend konservierten Motivs YKK und der in *S. cerevisiae* und *P. falciparum* konservierten Tertiärstruktur (A1027, A1030 und G1792 der 18S rRNA) gebildet.

Der Evolutionsvorteil könnte durch eine Stabilisierung der Tertiärstruktur durch YKK entstehen. Besonders unter der Berücksichtigung, dass es sich bei der Tertiärstruktur um einen Kontakt der „central“ Domäne (A1027/A1030) und der „3' minor“ Domäne (G1792) handelt. Eine Literaturrecherche ergab, dass das Motiv YKK nicht als Bindungsmotiv für RNA bekannt ist. Es wurde nur in Fliege gezeigt, dass das Motiv RYKK, wie es in den Apicomplexa vorliegt (Abb. 19G), in HOX-Proteinen als Bindungsmotiv für das Protein CBP dient (Shen et al., 2001).

Die N-terminale Verlängerung stellt einen potentiellen Angriffspunkt für die Entwicklung spezifischer Medikamente dar. Durch die Bindung eines Medikaments an die N-terminalen Verlängerung, könnte die Ausbildung beider Kontaktes unterdrückt werden. Besonders im Falle des ersten Kontaktes würde dies wahrscheinlich zur Senkung der Translokationsaktivität führen. Eventuell könnte durch ein gezieltes Design eines Medikaments auch die Translokationsaktivität komplett inhibiert werden.

Weiterführender Versuch

Da in *S. cerevisiae* und *P. falciparum* die am zweiten Kontakt beteiligten Nukleotide (A1631 sowie A1027, A1030, G1792) und Tertiärstruktur identisch sind, sollte in Erwägung gezogen werden, L41e genetisch um die N-terminale Verlängerung von *P. falciparum* zu verlängern. Anhand der Mutante könnten verschiedene Experimente im Vergleich zum WT durchgeführt werden. Zum Beispiel könnte untersucht werden, ob die Translokationsaktivität abweicht.

5.1.5 *P. falciparum* spezifische HLH-Struktur in ES3L

Einige tertiäre RNA-Motive wie der Kink-Turn basieren auf einer als Helix-Interner Loop-Helix-Struktur (HLH-Struktur) bekannten Sekundärstruktur (Hendrix et al., 2005, Klein et al., 2001).

In dieser Arbeit konnte eine neuartige HLH-Struktur in dem Expansionssegment ES3L der 5.8S rRNA von *P. falciparum* identifiziert werden. Diese führt zu einem Knick im normalerweise durchgehend geraden Verlauf der Helix von ES3L.

Der interne Loop der HLH-Struktur besteht aus zwei Nukleotiden und die flankierenden Helix-Arme bilden Watson-Crick-Basenpaarungen aus. Aufgrund eines 90 Grad Knicks im Phosphat-Rückgrat des Loops stehen die Achsen der beiden Helix-Arme ungefähr im 50-60 Grad Winkel zueinander. Der Knick wird anscheinend durch eine Tertiärstruktur mit zwei Nukleotiden der 28S rRNA sowie einem Kontakt zu L23 stabilisiert.

Für den S-Typ der 28S rRNA ließ sich eine räumlich strukturell fast gleiche HLH-Struktur wie im A-Typ vorhersagen. Allerdings besteht der Loop aufgrund einer Insertion aus drei Nukleotiden und die Nukleotidsequenz in einem Helixarm ist nicht konserviert. Solche Abweichungen sind im Falle andere RNA-Motive wie dem Kink-Turn aber auch bekannt (Leontis und Westhof, 2003, Klein et al., 2001).

Ob es sich bei der neuen HLH-Struktur um ein generelles RNA-Motiv handelt bleibt zu untersuchen. Hierfür müsste dieses in weiteren RNAs identifiziert werden.

Durch die HLH-Struktur kommt es zu einer *P. falciparum* spezifischen Neu-Positionierung des terminalen Helix-Arms. Dadurch bildet der Helix-Arm eine abgeflachte, plattformartige Struktur an der Oberfläche des Ribosoms aus. Die strukturelle Plattform könnte aufgrund der räumlichen Nähe zu L23 und zahlreicher Kontakte zu L29 eine Erweiterung der universellen ribosomalen Bindungsstelle (L23 und L29, Pech et al., 2010) für *P. falciparum* spezifische Proteine darstellen oder die Funktion von L29 modulieren. An die universelle Bindungsstelle binden Proteine wie Sec61, welche mit dem Tunnelexit oder der naszierenden Kette interagieren (ebd.). Dabei ist der terminale Helix-Arm im S-Typ um 8 Nukleotide länger als im A-Typ und bildet somit wahrscheinlich eine größere Plattform.

Die Plasmodium spezifische Plattform stellt einen potentiellen Angriffspunkt für die Entwicklung spezifischer Medikamente dar. Durch die Bindung eines Medikaments an die Plattform, könnte eventuell durch eine entsprechende räumliche Ausdehnung des Medikaments die Bindung von Proteinen an die universelle Bindungsstelle blockiert werden. Da das Medikament dabei an der Oberfläche des Ribosoms bindet, gelten auch nicht die gleichen Größenrestriktionen wie für Medikamente, die in das Innere des Ribosoms gelangen müssen.

5.2 Projekt II: 3D-Rekonstruktionen ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1

Das in der ER-Membran sitzende Type I Trans-Membran-Protein ERj1 weist eine teilweise Homologie zu Sec63 auf (Kroczyńska et al., 2004) und kann wie Sec63 mit der luminalen J-Domäne BiP binden (Dudek et al., 2005). Zusätzlich kann ERj1 mit einer positiv geladenen Sequenz im zytosolischen Bereich an das Ribosom binden und falls BiP nicht an ERj1 gebunden vorliegt, *in vitro* die Translation inhibieren (Dudek et al., 2005). Es wird daher vermutet, dass ERj1 eine regulierende Rolle bei der Translokation in das ER spielt (siehe 1.5.2, S.13) (ebd.).

Es existiert eine niedrig aufgelöste 3D-Rekonstruktion (20 Å) eines C-terminalen Fragments von ERj1 (ERj1C) am leeren 80S Ribosom (Blau et al., 2005). Diese legt nahe, dass sich die Bindungsstellen von ERj1 und Sec61 überschneiden und sich eventuell in ihrer Bindung an das Ribosom beeinflussen (ebd.). Allerdings ist dies bei der geringen Auflösung nicht sicher zu beurteilen (ebd.). Ansonsten liegen keine strukturellen Informationen über die Bindung von ERj1 am Ribosom vor.

Daher wurde in dieser Arbeit versucht die Bindung und Interaktion von ERj1 am Ribosom strukturell genauer zu untersuchen. Hierfür wurden hochaufgelöste 3D-Rekonstruktionen verschiedener *in vitro*-Rekonstitutionen von Liganden/Ribosomen-Komplexen (ribosomale Komplexe) mithilfe der SP-Kryo-EM generiert.

Trotz der erfolgreichen *in vitro*-Rekonstitutionen konnten ERj1 und BiP aber in den zugehörigen 3D-Rekonstruktionen nicht identifiziert werden. Es ist anzunehmen, dass ERj1 aufgrund hydrophober Interaktionen mit dem Kryo-EM-Grid dissoziiert oder zu flexibel ist, um visualisiert zu werden.

Entgegen einer bestehenden Hypothese (Benedix et al., 2010) konnte aber gezeigt werden, dass ERj1 und Sec61 *in vitro* simultan an das Ribosom binden können und BiP keinen Einfluss auf die Bindung hat.

Auch wurde eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion von Sec61 am 80S Ribosom erhalten, in welcher die Kontakte von Sec61 zum 80S Ribosom besser aufgelöst sind als in den damals veröffentlichten 3D-Rekonstruktionen (Becker et al., 2009, Ménétret et al., 2008).

5.2.1 Erfolgreiche *in vitro*-Rekonstitutionen der ribosomalen Komplexe

Für die *in vitro*-Rekonstitutionen wurden im Labor gereinigtes Sec61 (*Canis lupus familiaris*), leere 80S Ribosomen (*Canis lupus familiaris*) und RNCs (DP120-RNC, *Triticum aestivum*) eingesetzt sowie durch den Kollaborationspartner AG Zimmermann zur Verfügung gestelltes gereinigtes, rekombinantes His₆-ERj1 (ERj1) und His₆-BiP (BiP) (*H. sapiens*) (Benedix et al., 2010).

Ein Protokoll für die benötigten *in vitro*-Rekonstitutionen konnte erfolgreich etabliert werden: Ligand ERj1 am Ribosom (dimerer Komplex), Ligand ERj1 und Sec61 am Ribosom (tertiärer Komplex) und Ligand ERj1, Sec61 und BiP am Ribosom (quartärer Komplex).

In den zugehörigen Bindungstests wurde eine leicht abweichenden Stöchiometrie der Liganden erhalten: ERj1 lag leicht überstöchiometrisch, BiP meist unterstöchiometrisch und Sec61 stöchiometrisch in den Komplexen gebunden vor.

Auch in Bindungstests anderer Arbeiten wurde eine leicht überstöchiometrische Bindung von ERj1 erhalten (Dudek et al., 2002, Dudek et al., 2005). Ebenso wurde bei der erfolgreichen 3D-Rekonstruktion von ERj1C am 80S Ribosom im zugehörigen Bindungstest der *in vitro*-Rekonstitution eine leicht überstöchiometrische Bindung für ERj1C erhalten (Blau et al., 2005). Dies legt nahe, dass ERj1 nicht überstöchiometrisch oder unspezifisch bindet, sondern sich im Vergleich zu den anderen Proteinen im SDS-PAGE (Coomassie) nur besser einfärben lässt.

5.2.2 Keine Identifizierung von ERj1 oder BiP in den 3D-Rekonstruktionen

Es wurden 3D-Rekonstruktionen für die *in vitro*-Rekonstitutionen des dimeren und quartären Komplexes am 80S Ribosom und DP120-RNC bei niedriger Auflösung generiert sowie für den quartären Komplex am 80S Ribosom bei hoher Auflösung.

Im Gegensatz zu der 3D-Rekonstruktion von ERj1C am 80S Ribosom (Blau et al., 2005) zeigten die 3D-Rekonstruktionen der dimeren Komplexe keine nicht-ribosomale Extradichte, welche ERj1 zugeordnet werden konnte.

Im Falle des quartären Komplexes wurde eine nicht-ribosomale Extradichte erhalten. Durch einen Rigid Body Fit eines isolierten Modells von Sec61 (PDB: 4W24, 4W25, Voorhees et al., 2014) konnte dieses in der Extradichte identifiziert werden. Dabei waren die Helices von Sec61 zum größten Teil gut aufgelöst und zu identifizieren.

Alle Kontakte zwischen der Extradichte und dem Ribosom konnten entweder Sec61 zugeordnet werden oder es handelte sich um Kontakte zwischen der Mizelle und dem Ribosom, welche auch in anderen 3D-Rekonstruktionen bestanden (Becker et al., 2009, Ménétret et al., 2008). Somit wurde kein neuer Kontakt identifiziert, der auf eine Bindung von ERj1 hindeutete. Auch konnte ERj1 nicht als Bestandteil der Mizelle identifiziert werden.

Somit konnten anhand der generierten 3D-Rekonstruktionen keine neuen strukturellen Informationen über die Bindung von ERj1 am Ribosom gewonnen werden.

Allerdings war in der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes Sec61 und besonders dessen Kontakte zum Ribosom besser aufgelöst als in den zu diesem Zeitpunkt existierenden 3D-Rekonstruktionen von Sec61 am Ribosom (ebd.) und diente als wertvolle Referenz im Labor.

5.2.3 Ursache für die erfolglose Identifizierung von ERj1 in den 3D-Rekonstruktionen

Erfolglose *in vitro*-Rekonstitution ist auszuschließen

Eine erfolglose *in vitro*-Rekonstitution trotz positiver Bindungstests kann wie im Folgenden nochmals kurz zusammengefasst, ausgeschlossen werden.

Dabei kommen drei Ursachen für ein fehlerhaftes positives Ergebnis eines Bindungstests in Frage: Aggregation oder unspezifische Bindung der Liganden bei der *in vitro*-Rekonstitution sowie die Existenz unterschiedlicher Subpopulationen an ribosomalen Komplexen.

Eine Aggregation oder unspezifische Bindung von ERj1 in den *in vitro*-Rekonstitutionsansätzen kann ausgeschlossen werden, da in den Bindungstests trotz eines eingesetzten Überschusses an ERj1 nur eine schwach überstöchiometrische Bindung am Ribosom erhalten wurde und diese auch im Fall der erfolgreichen 3D-Rekonstruktion von ERj1C am 80S Ribosom erhalten wurde (Blau et al., 2005). Dabei ist wie bereits beschrieben wurde, die schwach überstöchiometrische Bindung auf eine bessere Einfärbung von ERj1 im SDS-PAGE (Coomassie) zurückzuführen (siehe 5.2.1, S.90).

Die Existenz von Subpopulationen kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da ERj1 stöchiometrisch am Ribosom gebunden vorlag und somit jedes Ribosom mit ERj1 besetzt war.

Nachträgliche Dissoziation von ERj1 am wahrscheinlichsten

Für die fehlende Identifizierung von ERj1 in den 3D-Rekonstruktionen kommen drei Ursachen in Frage: Unzureichende Auflösung der 3D-Rekonstruktion sowie Flexibilität oder Dissoziation des Liganden.

Aufgrund der hohen Detaildichte im Falle der 3D-Rekonstruktion des quartären Komplexes ist es unwahrscheinlich, dass ERj1 wegen einer unzureichenden Auflösung im Bereich der Mizelle nicht identifiziert wurde. Auch wurde im Falle des dimeren Komplexes keine Extradichte identifiziert.

Es besteht die Möglichkeit, dass ERj1 eine hohe Flexibilität aufweist und daher nicht auszulösen ist. Zum Beispiel aufgrund fehlender stabilisierender Interaktionen mit der ER-Membran.

Allerdings konnte ERj1C am Ribosom identifiziert werden (Blau et al., 2005) und somit scheint der C-terminale Bereich von ERj1 ausreichend rigide zu sein, um visualisiert zu werden (ebd.). Es ist aber nicht auszuschließen, dass im Falle von ERj1 aufgrund der größeren Masse des gesamten Proteins sowie der TM-Domäne umgebenden Mizelle das C-terminale Ende destabilisiert wird.

Die nachträgliche Dissoziation von ERj1 bei der Präparation der Grids aufgrund hydrophober Interaktionen zwischen der TM-Domäne und dem Kohlefilm scheint aber am wahrscheinlichsten.

Erstens weist ERj1 keine starke Bindung zum Ribosom auf, da es weder Bestandteil der RAMP-Fraktion ist (Wang und Dobberstein, 1999) noch bei K^+ -Konzentration über 200 mM an das Ribosom bindet (Dudek et al., 2005).

Zweitens zeigt die Datenprozessierung, dass im Falle von Sec61 auch nur 2/3 der Ribosomen eine Besetzung mit Sec61 aufwiesen, obwohl der Bindungstest eine stöchiometrische Bindung von Sec61 am Ribosom belegte. Somit ist ein Teil von Sec61 ebenfalls nachträglich dissoziiert, obwohl Sec61 Bestandteil der RAMP-Fraktion ist und erst bei hohen K^+ -Konzentrationen vom Ribosom dissoziiert (Wang und Dobberstein, 1999).

Drittens würde eine nachträgliche Dissoziation aufgrund hydrophober Interaktionen erklären, warum eine 3D-Rekonstruktion von ERj1C am 80S Ribosom möglich war (Blau et al., 2005). ERj1C weist nämlich keine hydrophobe Transmembrandomäne auf, welche mit dem Kohlefilm des Grids interagieren könnte.

Die Möglichkeit der nachträglichen Dissoziation wird auch im Falle anderer 3D-Rekonstruktionen wie zum Beispiel der erfolglosen 3D-Rekonstruktion von OST am Ribosom in Betracht gezogen (Menetret et al., 2005).

5.2.4 *in vitro*-Rekonstitutionen belegen simultane Bindung von ERj1 und Sec61

Wie in der Einleitung beschrieben, besteht die Hypothese, dass ERj1 eine regulierende Rolle in der co-translationalen Proteintranslokation spielt (siehe 1.5.2, S.13). Aufgrund neuerer Ergebnisse wird postuliert, dass ERj1 im BiP-ungebundenen Zustand eine simultane Bindung von Sec61 an das Ribosom verhindert und erst durch eine Konformationsänderung aufgrund der Bindung von BiP die simultane Bindung von Sec61 ermöglicht (Benedix et al., 2010).

Das Postulat beruht erstens darauf, dass ERj1 im BiP-ungebundenen Zustand aber nicht im BiP-gebundenen Zustand die Translation *in vitro* inhibiert (Dudek et al., 2005).

Zweitens bildet in der 3D-Rekonstruktion von ERJ1C am 80S Ribosom ERJ1C bei der gegebenen Auflösung Kontakte zu L23 sowie L29 aus und somit überlappen die Bindungsstellen von ERj1 und Sec61 am Ribosom (Blau et al., 2005).

Drittens zeigen experimentelle Daten unter Nutzung der „Surface plasmon resonance spectroscopy“, dass ERj1 im BiP-ungebundenen Zustand eine höhere Affinität für das Ribosom aufweist als im BiP-ungebundenen Zustand sowie ERj1 im BiP ungebundenen Zustand (30 μ M) eine höhere Affinität als Sec61 für das Ribosom (~20 nm) zeigt (Benedix et al., 2010). In keinen der Experimente wurde aber untersucht, ob ERj1 und Sec61 simultan an das Ribosom binden können.

In dieser Arbeit konnte aufgrund der erfolgreichen *in vitro*-Rekonstitutionen unterschiedlicher ribosomaler Komplexe erstmals gezeigt werden, dass ERj1 und Sec61 *in vitro* nicht um die Bindung an das Ribosom konkurrieren. Auch konnte gezeigt werden, dass BiP keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten von ERj1 und Sec61 haben.

Damit konnte das Postulat widerlegt werden und eine Anpassung der Hypothese muss erfolgen. Eventuell binden ERj1 und Sec61 zwar simultan, aber ERj1 beeinflusst über Konformationsänderungen die Funktionalität von Sec61.

5.2.5 Suboptimale Reinigungsstrategie für ERj1

Das von dem Arbeitskreis AG Zimmermann freundlicherweise zur Verfügung gestellte gereinigte rekombinante Protein His₆-ERj1 (ERj1, *H. sapiens*) enthielt eine sehr große Subpopulation an aggregationsanfälligem ERj1. Vor der Durchführung einer *in vitro*-Rekonstitution konnte diese Subpopulation durch eine Zentrifugation mit dem Pellet in Form von Aggregationen abgetrennt werden (ca. 80% der Gesamtpopulation) und der Überstand erfolgreich für die *in vitro*-Rekonstitution eingesetzt werden.

Die Aggregationsneigung der Subpopulation beruhte wohl auf einer nicht nativen oder fehlerhaften Faltung von ERj1 und war wahrscheinlich auf die gewählte Reinigungsstrategie von ERj1 zurückzuführen.

Die Reinigung erfolgte durch eine heterologe Überexpression des rekombinanten Proteins His₆-ERj1 im Zytoplasma von *E. coli* und einer anschließenden Reinigung aus Einschlusskörperchen (Benedix et al., 2010).

Bei den Einschlusskörperchen handelt es sich um Aggregate, welche zum größten Teil aus irregulär oder nicht vollständig gefalteten Proteinen bestehen (Ventura und Villaverde, 2006). Zum Beispiel wird die fehlerhafte Faltung durch eine Überlastung der existierenden Faltungssysteme aufgrund der Überexpression verursacht oder durch fehlende eukaryotische Systeme der post-translationalen Proteinmodifikation, welche für die Stabilisierung und korrekte Faltung einiger Proteine notwendig sind (Sahdev et al., 2008).

Daher sind bei der Solubilisierung der Proteine aus den Einschlusskörperchen Pufferbedingungen zu wählen, welche eine korrekte Rückfaltung der Proteine in ihren nativen und aktiven Zustand ermöglichen (ebd.).

Im Falle von Membranproteinen wie ERj1 müssen zusätzlich Detergenzien zur Solubilisierung, Isolierung und Stabilisierung eingesetzt werden (Lin und Guidotti, 2009), um die hydrophoben Transmembrandomänen durch Detergens -Mizellen nach außen hin abzuschirmen. Dies erschwert das Auffinden der optimalen Pufferbedingungen für eine korrekte Rückfaltung.

Aufgrund der hohen Subpopulation an aggregationsanfälligen ERj1 war die korrekte Rückfaltung in der Reinigung nicht effizient. Allerdings war die erhaltene Subpopulation an nicht aggregationsanfällige ERj1 ausreichend für die Experimente. Auch lag ERj1 in dieser Subpopulation im nativen oder fast nativen Zustand vor, da es in Abhängigkeit von BiP eine inhibierende Wirkung auf die Translation des Ribosoms zeigte. (Dudek et al., 2002).

Dennoch sollte in zukünftigen Experimenten erwogen werden die Reinigungsstrategie folgendermaßen anzupassen.

Im Labor ist ein Protokoll zur Reinigung von Sec63 aus der ER-Membran von *S. cerevisiae* über einen fusionierten Protein A-Tag etabliert. Es ist bekannt, dass die Expression von ERj1 die Inaktivierung des Gens von SEC63 in *S. cerevisiae* komplementieren kann (Kroczyńska et al., 2004). Somit sollte durch eine Ersetzung des Gens für Sec63 durch das Gen von ERj1 in *S. cerevisiae* unter der Nutzung der etablierten Reinigungsstrategie für Sec63 eine Reinigung von ERj1 möglich sein. Bei dieser Reinigungsstrategie erfolgt kein denaturierender Schritt und die Reinigung erfolgt aus der ER-Membran. Daher sollte eine qualitativ bessere Reinigung von naiven ERj1 möglich sein als über die Reinigung aus Einschlusskörperchen.

Auch wäre die Rekonstitution von ERj1-haltigen Proteoliposomen am 80S Ribosom zu erwägen. Eventuell stabilisieren die Proteoliposomen ERj1 ausreichend für eine 3D-Rekonstruktion mit Hilfe der SP-Kryo-EM.

5.3 Projekt III: 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC

Das Protein XBP1u ist Bestandteil des IRE1-Signalwegs in der „Unfolded Protein Response“ (UPR) in höheren Eukaryoten und wird in den Zellen konstitutiv exprimiert (Yoshida et al., 2001).

Im Zuge der UPR wird die mRNA Xbp1u durch das aktivierte ER-Membranprotein IRE1 gespleißt (ebd.) und das Translationsprodukt XBP1s der gespleißten mRNA ist ein aktiver Transkriptionsfaktor in der UPR (ebd.).

In Säugern wurde gezeigt, dass die mRNA von XBP1u für den Spleißvorgang an der ER-Membran lokalisiert werden muss (Yanagitani et al., 2009). Die Lokalisierung erfolgt über eine in Säugern konservierte hydrophobe Region (HR2) in der naszierenden Kette eines translationsarretierten XBP1u-RNC (Yanagitani et al., 2011).

Aufgrund einer fehlenden 3D-Rekonstruktion des RNC existiert bis jetzt keine strukturelle Beschreibung über den Mechanismus des Translationsarrestes.

Vor diesem Hintergrund konnte in dieser Arbeit erfolgreich unter Nutzung der SP-Kryo-EM eine 3D-Rekonstruktion des XBP1u-RNC mit der den Translationsarrest-verstärkenden Mutation S255A in der Arrestsequenz von XBP1u (*H. sapiens*) generiert werden (hXBP1-RNC) (ebd.).

Anhand der 3D-Rekonstruktion konnten für den Mechanismus des Translationsarrests relevante strukturelle Merkmale herausgearbeitet und ein Modell bezüglich des Mechanismus des Translationsarrestes postuliert werden. Dabei weist der vorgeschlagene Mechanismus im Vergleich zu den Mechanismen anderer Arrestpeptiden bekannte sowie neue Elemente auf.

Zudem ließ sich in der Arbeit *in vitro* ein translationsarretierter XBP1u-RNC in *D. melanogaster* generieren (fXBP1u-RNC). Aufgrund dessen Existenz und unter Berücksichtigung weiterer Literatur wird postuliert, dass die Lokalisierung von XBP1u an der ER-Membran über einen translationsarretierten XBP1u-RNC im Reich der Tiere konserviert ist.

5.3.1 Erfolgreiche 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC anhand gereinigter RNCs

Die Generierung des hXBP1-RNC mit der Translationsarrest-verstärkenden Mutation S255A erfolgte in einem zellfreien Translationssystem (Kit Rabbit Reticulocyte Lysate System, Promega).

Aufgrund einer erhöhten Aggregationsneigung des hXBP1-RNC wurde das im Arbeitskreis etablierte Standardprotokoll der RNC-Reinigung optimiert. Dadurch konnte die Aggregationsbildung minimiert und die vorhandenen Aggregate abgetrennt werden. Auf diese Weise konnten aggregatsfreie hXBP1-RNCs in ausreichender Menge für die SP-Kryo-EM gereinigt werden.

Eine Struktur des hXBP1-RNC konnte mithilfe der SP-Kryo-EM ermittelt werden. In der Struktur weist das Ribosom eine fast stöchiometrische Besetzung mit einer Peptidyl-tRNA in der P-Stelle auf und die naszierende Kette selbst sowie Kontakte zur Wand des Exit-Tunnels konnten über den gesamten Tunnelverlauf visualisiert werden.

Die globale Auflösung der 3D-Rekonstruktion lag bei 8,3 Å (FSC_{0,5}, 118.400 Partikel), die lokale Auflösung des Exit-Tunnels war jedoch besser und betrug 6-7 Å, da diese Region zum konservierten und wenig flexiblen Kern der großen Untereinheit gehört. Die Auflösung der naszierenden Kette selbst war jedoch niedriger. Dies kann daran liegen, dass sie in weiten Teilen flexibler ist und multiple Konformationen aufweist.

Im letzten Sortierungsschritt wurde neben der Subpopulation des hXBP1-RNC auch eine Subpopulation an leeren 80S Ribosomen erhalten. Die globale Auflösung dieser 3D-Rekonstruktion lag bei 8.0 Å (FSC_{0,5}, 156.202 Partikel).

Es ist zu erwähnen, dass die ribosomalen Partikel bei der Datensammlung einen Orientierungsbias aufwiesen. Viele Partikel waren mit der ER-Membran zugewandten Seite des Ribosoms zum Kryo-Grid ausgerichtet, wahrscheinlich aufgrund hydrophober Interaktionen zwischen dem Grid und der stark hydrophoben Region HR2 in der naszierenden Kette.

Ein Orientierungsbias führt aufgrund der Überpräsentation bestimmter Projektionsgruppen zu einer Verzerrung der Rückprojektion bei der Datenprozessierung und somit zu einer geringeren Auflösung der 3D-Rekonstruktion.

Daher sollte im Falle zukünftiger Datensammlungen mRNA-Konstrukte mit deletierter HR2-Region für die Generierung der RNCs eingesetzt oder/und eine *in vitro*-Rekonstitution von Sec61 am hXBP1-RNC vor der Datensammlung durchgeführt werden. Im Arbeitskreis konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro*-Rekonstitution mit Sec61 im Falle der Datensammlung translationsarretierter RNC zu einer Verringerung des Orientierungsbias führt (Preis et al., 2014, Becker et al., 2011, Becker et al., 2009).

5.3.2 Relevante strukturelle Merkmale in dem hXBP1-RNC

Die 3D-Struktur von hXBP1-RNC wurde mit Hilfe vorhandener Kristallstrukturen und Kryo-EM-Karten interpretiert (siehe 5.3, S.95). Darunter befanden sich Kryo-EM-Karten des leeren 80S Ribosoms sowie translationsarretierter RNCs mit den Arrestpeptiden SecM (Bhushan et al., 2011, EMD-1829), TnaC (Seidelt et al., 2009, EMD-1657), AAP (Clara Barrio Garcia, AG Beckmann, nicht veröffentlicht) und dem artifiziellen Arrestpeptid DP120 (Becker et al., 2009, EMD-1652).

Durch Zuhilfenahme einer Differenzdichte-Karte von hXBP1-RNC und dem leeren 80S Ribosom konnte auch ein Poly-Alanin-Modell des C α -Rückgrads für die naszierende Kette und das CCA-Ende der Peptidyl-tRNA modelliert werden.

Bei der molekularen Analyse der 3D-Struktur ergaben sich folgende Beobachtungen. Im Vergleich zu den anderen translationsarretierten RNCs ist die gesamte Peptidyl-tRNA in Richtung P-Loop und L10e verschoben und es bilden sich neue Kontakte zwischen dem Akzeptorarm und P-Loop sowie P-Site-Loop von L10e aus. Dadurch kommt es anscheinend zu einer Stabilisierung des oftmals flexiblen P-Site-Loops von L10e (Sulima et al., 2014).

Des Weiteren ist auffällig, dass das CCA-Ende in einer abweichenden Konformation im Vergleich zu den anderen translationsarretierten RNCs vorliegt. Dabei scheint die konservierte Watson-Crick-Basenpaarung zwischen C74/C75 des CCA-Endes der tRNA und G2251/G2252 des P-Loops der 28S rRNA nicht ausgebildet zu werden oder geschwächt zu sein. Die Basenpaarung ist aber relevant für die korrekte Positionierung der Peptidyl-tRNA im PTC (Leung et al., 2011).

Zudem ist die Esterbindung zwischen A76 und der ersten Aminosäure der naszierenden Kette relativ zum PTC in Richtung P-Loop verschoben. Im PTC selbst liegt A2602 anscheinend nicht in der induzierten Konformation vor.

In der induzierten Konformation koordiniert A2602 mit U2854 ein Wassermolekül als Oxyanionhöhle für die Peptidyl-Transferase-Reaktion (Simonović und Steitz, 2009).

Downstream des PTCs wurden weitere, vermutlich wichtige zentrale Kontakte (wie A2058, A2059, U2609, A2062 und A761) zwischen der naszierenden Kette und der Tunnelwand identifiziert, die für ihrer Rolle in der Aktivierung des Translationsarrests bekannt sind (Ito und Chiba, 2013).

Darüber hinaus wurde eine hXBP1-spezifische Brücke im oberen Bereich des Exit-Tunnels identifiziert, die durch die zwei Kontakte der naszierenden Kette zu A2062 und C2610 ausgebildet wird.

5.3.3 Postulierter Mechanismus für den Translationsarrest im hXBP1-RNC

Die strukturellen Merkmale der 3D-Struktur führen zu einem einfachen Modell für die Translationsinhibition durch hXBP1:

Aktivierung des Translationsarrests

Die Aktivierung des Translationsarrestes erfolgt durch die Interaktion der naszierenden Kette mit der Tunnelwand des Exit-Tunnels. Dies wurde schon für die Arrestpeptide SecM (Bhushan et al., 2011), AAP (Bhushan et al., 2010b) sowie TnaC (Seidelt et al., 2009, Bischoff et al., 2014) postuliert und ist auch im Falle von hXBP1u wahrscheinlich, da Mutationen in der Arrestsequenz von XPP1u zu einer Stärkung oder Schwächung des Translationsarrestes führen (Yanagitani et al., 2011). Wie bei den erwähnten Arrestpeptiden beobachtet führt die Interaktion mit der naszierenden Kette zu Konformationsänderungen einiger Nukleotide und Aminosäuren in der Tunnelwand (Bhushan et al., 2011, Bhushan et al., 2010b, Seidelt et al., 2009, Bischoff et al., 2014). Aufgrund dieser Konformationsänderungen kommt es vermutlich, wie für Arrestpeptide generell angenommen (Wilson und Beckmann, 2011), zu einer Signalübertragung in die für den Translationsarrest relevanten Regionen und dessen Aktivierung. Dabei sind die genauen allosterischen Details der Signalübertragung bisher nicht verstanden (ebd.).

Die Relevanz vieler der in hXBP1-RNC identifizierten Kontakte (wie A2058, A2059, U2609, A2062 und A761) sind auch im Falle anderer Arrestpeptide für die Aktivierung des Translationsarrests bekannt (Ito und Chiba, 2013).

Eventuell ist eine im hXBP1-RNC spezifische den Tunnel überspannende Brücke in eine Modellierung der Signalübertragung involviert. Die Brücke wird durch die starken Kontakte der im Tunnel gegenüberstehenden Nukleotide A2062 und C2610 zur naszierenden Kette gebildet.

A2602 ist Bestandteil des „A-Patch“ (A2058, A2059, A2503 und A2062) und C2610 benachbart zu U2609 des „U-Patches“ (U2609, U1782, U2586 und A2587) (Rodnina et al., 2011, S.383). Bei dem A- und U-Patch handelt es sich um potentielle Wege der Signalübertragung, die vermutlich Signale aus dem Tunnel in das PTC übertragen können (ebd.). Die Brücke könnte daher zum Austausch von Signalen zwischen den beiden Patches dienen und in die spezifische Modellierung des Translationsarrestes in hXBP1-RNC involviert sein.

Die Mutation von C2610 zeigt im Falle des Erythromycin verstärkten Translationsarrests durch das Arrestpeptid ermCL einen deutlich senkenden Effekt auf den Translationsarrest (Vázquez-Laslop et al., 2011) und ist bis jetzt das einzige publizierte Beispiel für einen Kontakt zu C2610.

L10e bewirkt eine Verschiebung der Peptidyl-tRNA Richtung P-Loop

In der 3D-Rekonstruktion des hXBP1-RNC weist die Peptidyl-tRNA in der P-Stelle eine ungewöhnliche Verschiebung in Richtung L10e und P-Loop auf, besonders stark ausgeprägt im Bereich des Akzeptorarms ($\sim 5 \text{ \AA}$). Es bestehen Kontakte zwischen dem Akzeptorarm und L10e und der flexible P-Site-Loop von L10e liegt in einer stabilisierten Konformation vor.

Da L10e anscheinend Signale zwischen dem PTC und anderen funktionalen Zentren des Ribosoms übermittelt (Sulima et al., 2014) und eine Rolle bei der Bewegung der tRNA durch das Ribosom spielt (Petrov et al., 2008), wird an dieser Stelle vermutet, dass die Signalübertragung aus dem Exit-Tunnel eine Konformationsänderung von L10e bewirkt.

Aufgrund der Konformationsänderung bildet der P-Site-Loop Kontakte zu dem Akzeptorarm der Peptidyl-tRNA auf und bewirkt dessen Verschiebung.

Verschiebung der Peptidyl-tRNA führt zu einer Konformationsänderung des CCA-Endes und somit zu einer fehlerhaften Positionierung der Peptidyl-tRNA

Der einzelsträngige 3'-Überhangs des Akzeptorarms (N73-A76) zeigt eine deutliche Konformationsänderung, vermutlich aufgrund der räumlichen Nähe zum P-Loop.

Die räumliche Nähe wird wahrscheinlich durch neue Kontakte zwischen dem letzten Basenpaar (N1/N72) des Akzeptorarms und den Nukleotiden G2253-G2256 des P-Loops stabilisiert.

Das Ribose-Phosphat-Rückgrat liegt parallel zum Verlauf des P-Loops verformt vor. C74 und C75 des CCA-Endes nehmen aufgrund der räumlichen Nähe seitliche Konformationen zum P-Loop an und können keine Watson-Crick-Basenpaare mit G2251 und G2252 des P-Loops ausbilden. Die Watson-Crick-Basenpaarungen sind aber für eine korrekte Positionierung der Peptidyl-tRNA im PTC notwendig (Leung et al., 2011).

Die relative Verschiebung der Esterbindung führt zu einer Inhibierung der Peptidyl-Transferase-Reaktion und somit zum Translationsarrest

In Relation zum PTC führt die nicht korrekte Positionierung der Peptidyl-tRNA zu einer Verschiebung von A76 sowie der Esterbindung zur naszierenden Kette um $\sim 2 \text{ \AA}$ in Richtung P-Loop.¹³

Da selbst geringste Verschiebungen des Substrats die Effizienz der Peptidyl-Transferase-Reaktion aufgrund einer ungünstigen Geometrie minimieren (Wilson und Beckmann, 2011), führt die Verschiebung der Esterbindung in Relation zum PTC vermutlich zum Translationsarrest.

Eine Reduzierung der Effizienz der Peptidyl-Transfer-Reaktion wird im Falle der entgegengesetzte Verschiebung der Esterbindung im SecM-RNC ebenfalls unterstellt (Bhushan et al., 2011).

¹³ Als Bezugspunkt für die Bestimmung der Verschiebung wurde das Modell der Peptidyl-tRNA von TnaC-RNC im PTC herangezogen. Diese wurde auch als Bezugspunkt für die Bestimmung der Verschiebung im Falle des SecM-RNC herangezogen (Bhushan et al., 2011).

Eventuell verstärkt nicht induzierte Konformation von A2602 den Translationsarrest

Das flexible Nukleotid A2602 koordiniert mit U2854 ein Wassermolekül als Oxyanionhöhle im PTC für die Peptidyl-Transferase-Reaktion (Simonović und Steitz, 2009).

In der 3D-Rekonstruktion scheint A2602 nicht in der induzierten Konformation vorzuliegen, sondern durch die räumliche Nähe zu der neuen Konformation von C74 in einer abweichenden Konformation stabilisiert. Dies ist bei der gegebenen Auflösung allerdings nicht sicher zu beurteilen und ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Falls A2602 aber in einer neuer Konformation vorliegt, könnte dies zu einer weiteren Senkung der Effizienz des Peptidyl-Transfers führen und somit den Translationsarrest verstärken.

Im Falle des Arrestpeptids SecM ist zum Beispiel die Verschiebung der Esterbindung für einen effizienten Translationsarrest nicht ausreichend (Bhushan et al., 2011).

Spannungen im 3'-Überhang führen wahrscheinlich zum vorübergehenden Translationsarrest

Die Konformationsänderung des 3'-Überhangs aufgrund der räumlichen Nähe zum P-Loop führt wahrscheinlich zu starken Spannungen. Daher wird angenommen, dass die Konformationsänderung nicht stabil ist und wieder in die normale Konformation zurückspringt. Dadurch kommt es zur Aufhebung der Inhibierung der Peptidyl-Transferase-Reaktion.

5.3.4 Elemente des Translationsarrest im hXBP1-RNC im Kontext

An dieser Stelle werden einige Elemente des postulierten Mechanismus des Translationsarrestes im hXBP1-RNC mit denen anderer translationsarretierter RNC mit einem Arrestpeptid verglichen und somit in Kontext gesetzt. Dabei wird gezeigt, dass der postulierte Mechanismus des Translationsarrests in hXBP1-RNC gleiche, ähnliche und neue Elemente nutzt.

Allen Arrestpeptiden ist gemeinsam, dass sie eine Aktivierung des Translationsarrestes über die Interaktion ihrer Arrestsequenz mit der Tunnelwand des Exit-Tunnels bewirken.

Einige Arrestpeptide benötigen aber für eine Aktivierung die Bindung eines zusätzlichen Faktors im Exit-Tunnel sowie dessen Interaktion mit der naszierenden Kette. Als prominente Beispiele sind Tryptophan im Falle des Arrestpeptids TnaC (Bischoff et al., 2014) und Arginin im Falle des Arrestpeptids AAP zu nennen (Bhushan et al., 2010b). Das Arrestpeptid Xbp1u benötigt keinen zusätzlichen Faktor.

Die Arrestpeptide können in drei Kategorien eingeteilt werden, abhängig davon welchen Schritt der Translation sie inhibieren: Inhibierung der Translokation (1.Kategorie), des Peptidyltransfers (2.Kategorie) oder der Hydrolyse bei der Termination (3.Kategorie).

Den Arrestpeptiden der 2. und 3. Kategorie ist gemeinsam, dass der Mechanismus des Translationsarrests zu einer Inaktivierung des PTCs durch eine Inhibierung der Peptidyl-Transferase-Reaktion führt (Wilson und Beckmann, 2011).

Die in hXBP1-RNC festgestellte Inhibierung der Peptidyl-Transferase Reaktion durch eine Verschiebung der Esterbindung in Relation zum PTC existiert auch im Fall des Arrestpeptids SecM (Bhushan et al., 2011). Interessanterweise erfolgt die Verschiebung in der gleichen Größenordnung ($\sim 2\text{\AA}$), allerdings in die gegensätzliche Richtung.

Auch ist im Falle von hXBP1u die Aminosäure in der A-Stelle nicht wie im Falle von SecM essentiell für den Translationsarrest (Yanagitani et al., 2011).

Eine Inhibierung der Peptidyl-Transferase Reaktion kann auch aufgrund einer abweichenden Konformationen der Nukleotide von der induzierten Konformation im PTC erfolgen.

Zum Beispiel führt im Falle des Arrestpeptids ErmBL eine Konformationsänderung von U2585 zu einer Inhibierung der Peptidyl-Transferase-Reaktion (Arenz et al., 2014) und im Falle von TnaC verhindern A2602 und U2585 in einer nicht induzierten Konformationen wahrscheinlich die korrekte Bindung des Terminationsfaktors RF2 (Bischoff et al., 2014, Seidelt et al., 2009). In hXBP1-RNC liegt U2585 in der induzierten Konformation vor, aber A2602 wahrscheinlich in einer nicht induzierten Konformation. Daher könnte A2602 eine Rolle in der Inhibierung der Peptidyl-Transferase Reaktion spielen.

Die Involvierung von L10e in den Mechanismus des Translationsarrests wird zwar auch im Falle des Arrestpeptids AAP unterstellt (Bhushan et al., 2010b), allerdings konnte dieses anhand einer höher aufgelösten 3D-Struktur nicht bestätigt werden (nicht veröffentlicht).

Die starke Verschiebung der Peptidyl-tRNA Richtung P-Loop und L10e, die Konformationsänderung des CCA-Endes und die fehlende Ausbildung der Watson-Crick-Basen-Paarungen sind für kein anderes Arrestpeptid bekannt und scheinen neue Elemente darzustellen.

Im Falle des Antibiotikums Blastidicin S ist aber bekannt, dass die Bindung des Antibiotikums zwischen dem P-Loop und der Peptidyl-tRNA ebenfalls zu einer starken Konformationsänderung des CCA-Endes führt (Svidritskiy et al., 2013). Dadurch kommt es ebenfalls zu keiner Watson-Crick-Basen-Paarung für C75 und das Ribose-Phosphatrückgrat von A76 verschiebt sich um 2 Å. (ebd.).

5.3.5 Kooperativer Mechanismus der Lokalisierung im Reich der Tiere konserviert

Die Orthologe von Xbp1 (*H. sapiens*) in *D. melanogaster* (fXbp1u) und *C. elegans* (cXbp1u) werden ebenfalls durch IRE1 gespleißt und bei dem Translationsprodukten der gespleißten mRNA handelt es sich um den aktiven Transkriptionsfaktor (Calfon et al., 2002, Plongthongkum et al., 2007, Ryoo et al., 2007).

Die Existenz eines Lokalisierungsmechanismus an der ER-Membran über einen kooperativen Mechanismus einer hydrophoben Region in der naszierenden Kette (HR2) und einem translationsarretierten RNC wurde bis jetzt nur in Säugern belegt (Yanagitani et al., 2011).

Unter Verwendung eines zellfreien Translationssystem basierend auf einem selbst hergestellten Extrakt aus Fliegenembryonen (Dr. Anger, Prof. Klaus Förstemann) konnte in dieser Arbeit erstmals ein translationsarretierter RNC mit dem Arrestpeptid fXBP1u generiert werden (fXBP1-RNC).

Dabei konnte gezeigt werden, dass der Translationsarrest, wie in Säugern (Yanagitani et al., 2011), am C-terminalen Ende auftritt und vorübergehender Natur ist.

Vor kurzem wurde auch eine potentielle Arrestsequenz unmittelbar am C-terminalen Ende identifiziert (Sone et al., 2013) (siehe 5.3.6, *S.101*) und gezeigt, dass das C-terminale Ende für ein effizientes Spleißen des Stem-Loops von fXbp1u *in vivo* notwendig ist (ebd.).

Dies stützt die eigene Ergebnisse und legt nahe, dass der translationsarretierte RNC, wie in Säugern (ebd.), für einen effizienten Spleiß-Vorgang notwendig ist.

An Hydrophobizitätsprofilen konnte weiter gezeigt werden (Kyte und Doolittle, 1982), dass in fXBP1u ebenfalls eine vergleichbare hydrophobe Region im gleichen Abstand zum C-terminalen Ende wie HR2 in Säugern existiert. Dies erklärt die Notwendigkeit des translationsarretierten Komplexes, wie in den Säugern (Yanagitani et al., 2011). Auch eine andere Arbeitsgruppe zeigte die Existenz der hydrophoben Domäne (Sone et al., 2013).

Zusammenfassend lässt sich unter Berücksichtigung der eigenen und der Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppe (ebd.) postulieren, dass die Lokalisierung von fXBP1 ebenfalls nach dem kooperativen Mechanismus in Säugern erfolgt (Yanagitani et al., 2011).

Somit ist der kooperative Mechanismus im Reich der Tiere konserviert, da sich die Entwicklungslinien der Urmünder (Protostomia) und der Neumünder (Deuterostomia), der ersten gehören die Insekten und der zweiten die Säuger an, schon früh in der Evolution der vielzelligen Tiere (Metazoen) voneinander getrennt haben (Dunn et al., 2008).

Dabei ist nur der Mechanismus konserviert, da die hydrophoben Region HR2 nicht und die Arrestsequenz nur bedingt in der Peptidsequenz konserviert sind (siehe 5.3.6, S.101). Im Falle von Erythromycin ist eine Variation der Arrestsequenz in verschiedenen Bakterien aber ebenfalls bekannt (Ito und Chiba, 2013).

5.3.6 Translationsarrest trotz 4 AS langen Einschubs in der Arrestsequenz (fXBP1u)

Die potentielle Arrestsequenz von fXBP1u weist 10 AS auf, die in der Arrestsequenz von hXBP1u für den Translationsarrest relevant sind (Abb. 54) (Sone et al., 2013). Daher ist anzunehmen, dass die 10 AS in fXBP1u ebenfalls für den Translationsarrest relevant sind und mit den gleichen Bereichen der Tunnelwand interagieren wie im Falle von hXBP1u. Allerdings wird die potentielle Arrestsequenz in fXBP1u durch einen Einschub von 4 AS in zwei Abschnitte geteilt (Abb. 54).

Damit die 10 konservierten AS in den beiden Abschnitten der potentiellen Arrestsequenz in fXBP1u im gleichen räumlichen Abstand zueinanderstehen wie in der Arrestsequenz in hXBP1u und so die Interaktion mit den gleichen Bereichen der Tunnelwand ermöglicht wird, müsste die naszierende Kette im Bereich des Einschubs in einer kompakten Form vorliegen. Durch die kompakte Form würde der Abstand der beiden Abschnitte zueinander verringert.

Im Exit-Tunnel ist die Ausbildung einer kompakten α -Helix möglich (Lu und Deutsch, 2005, Bhushan et al., 2010a), wie im Falle des Arrestpeptids AAP nach dem PTC (Bhushan et al., 2010b).

In einer α -Helix beträgt der Abstand zwischen zwei $C\alpha$ -Atomen benachbarter Aminosäuren nur 1,5 Å, anstatt zwischen 3,0-3,5 Å in der gestreckten Form der Peptidkette (Lu und Deutsch, 2005). Dabei bilden 3,6 AS eine Windung der Helix bei einer Ganghöhe von 5,4 Å.

D. melanogaster	A	T	Q	S	D	C	L	D	Q	W	W	G	P	Q	Q	-	S	A	W	N	P	T	G	I	E	L	M	A	STOP
H. sapiens	P	Y	Q	P	P	F	L	C	Q	W	-	G	R	H	Q	P	S	-	W	K	P	-	-	-	-	L	M	N	STOP
							246									255						256							259

Abb. 54 Sequenzvergleich des C-terminalen Endes von XBP1u in *D. melanogaster* und *H. Sapiens* Die Sequenz des C-terminalen Endes von XBP1u in *D. melanogaster* weist zwei hoch konservierte Abschnitte zu der Arrestsequenz von *H. Sapiens* auf (Sone et al., 2013), welche durch einen Einschub von 4AS getrennt sind (hellblau eingefärbt). Der erste Abschnitt besteht aus 14 AS (hellbraun eingefärbt) und der zweite Abschnitt aus 3 AS+STOP-Codon (dunkelbraun eingefärbt). Die durchgehenden Balken markieren konservierte Aminosäuren in der Sequenz von *D. melanogaster* und *H. sapiens* sowie der gestrichelte Balken eine positiv geladene Aminosäure. (-) bedeutet, dass sich in dieser Position keine AS befindet, aber im Gegenstrang. Die Einzel-Mutationen der Aminosäure L246, S255, W256 oder L259 in einem Alaninscan zeigen in *H. sapiens* einen sehr starken Effekt auf den Translationsarrest (Yanagitani et al., 2011). Näheres siehe Text. **Farbcode:** Aminosäuren, die in Mensch, Maus, Huhn, Frosch und Zebrafisch konserviert sind, sind in Rot dargestellt. Aminosäuren, die nur in einem Subset der erwähnten Tiere konserviert sind, sind unterstrichen dargestellt. Die Abbildung ist an (Sone et al., 2013) angelehnt und modifiziert.

Im Falle einer Helixbildung würde der Einschub aus 4 AS fast einer Windung entsprechen. Dadurch würde das auf den Einschub folgende Prolin fast in der gleichen Orientierung zur Tunnelwand stehen wie in hXBP1, nur um 5.4 Å in Richtung Tunnelausgang versetzt. Im Falle der gestreckten Form läge die Verschiebung bei gleicher Orientierung zwischen 12 und 14 Å. Die Arrestsequenzen in hXBP1u und fXBP1u bilden aber nach der Vorhersage basierend auf der Peptidsequenz keine helikalen Strukturen aus (Software Jpred 4, Cole et al., 2008). Allerdings können helikale Strukturen durch die Interaktionen mit der Tunnelwand stabilisiert werden (Bhushan et al., 2010a) und somit die Möglichkeit der Helix-Bildung nicht ausgeschlossen werden.

Aber selbst im Falle eine Helix-Bildung ist fraglich, ob eine Verschiebung um 5,4 Å nicht dennoch zu groß wäre, damit die unmittelbar folgenden Aminosäuren mit den gleichen Stellen der Tunnelwand interagieren können wie in hXBP1u. Gerade im Falle des folgenden Prolins ist keine große räumliche Variation durch unterschiedliche Konformationen der Seitenkette gegeben, um die räumliche Distanz von 5.4 Å zu überbrücken. Allerdings im Falle der folgenden Aminosäuren Lysin und Tryptophan.

Die Fragestellung kann eindeutig nur an einer 3D-Rekonstruktion des XBP1u-RNC in *D. melanogaster* geklärt werden und ist somit Gegenstand zukünftiger Versuche.

Eine weitere Erklärung für die Funktionalität der Arrestsequenz trotz des Einschubs wäre die Existenz eines Elongationsarrestes an zwei verschiedenen Stellen der Arrestsequenz. Zum Beispiel erfolgt im Falle von MifM jeweils ein Elongationsarrest an vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren der Arrestsequenz (Ito und Chiba, 2013).

Träte im Fall von fXbp1u je ein Elongationsarrest im ersten und zweiten Abschnitt auf und nur der jeweilige Abschnitt wäre relevant für die Aktivierung des Translationsarrests, wäre der räumliche Abstand der beiden Abschnitten zueinander nicht relevant sein.

Die Arrestsequenz von 3 AS im zweiten Abschnitt wäre dabei sehr kurz, aber auch im Falle von ErmCL ist die Arrestsequenz nur 4 AS lang (ebd.). Allerdings ist im Falle von ErmCL die Interaktion der naszierenden Kette mit dem Antibiotikum Erythromycin notwendig (ebd.).

Die Existenz mehrerer Stellen mit Elongationsarrest kann aber ausgeschlossen werden, da in einem Ribosom Profiling nur ein Stelle für einen Translationsarrest nachgewiesen wurde (Ingolia et al., 2011).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Projekt I: Modellbau des 80S Ribosoms (*P. falciparum*)

In diesem Projekt wurde durch die Nutzung der neuen DED-Technologie eine hochaufgelöste Struktur des 80S Ribosoms vom Malariaerreger *P. falciparum* generiert. Aufgrund der fast atomaren Auflösung konnte ein detailliertes molekulares Modell für die erste und zweite Domäne der großen Untereinheit sowie wie für L41 und dessen unmittelbare Umgebung gebaut werden. Hierbei wurde ein besonderer Fokus auf Plasmodium-spezifische Merkmale gelegt, bei denen es sich um potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung von Malaria-Medikamenten handeln könnte. Ein vollständiges Modell wurde nicht erstellt, da dies parallel zur Arbeit durch eine andere Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde (Wong et al., 2014).

Zwei dieser potentiellen Angriffspunkte wurden in dieser Arbeit näher präsentiert und belegen eindrucksvoll den hohen Informationsgehalt der 3D-Rekonstruktion.

Erstens konnte im Expansionssegment von ES3L in der 5.8S rRNA ein neues Helix-Interner Loop-Helix-Motiv identifiziert und gebaut werden. Das Motiv führt zu einer Neupositionierung der terminalen Helix von ES3L und die Helix könnte aufgrund ihrer räumlichen Nähe eine Erweiterung der universellen Bindungsstelle (L23 und L29, Pech et al., 2010) darstellen.

Zweitens konnte eine ungewöhnliche 14 AS lange N-terminale Verlängerung des in Sequenz und Länge hochkonservierten Proteins L41e in *P. falciparum* identifiziert und gebaut werden. Die N-terminale Verlängerung scheint eine Tertiärstruktur zwischen der "central" Domäne und der "3' minor" Domäne der 18S rRNA zu stabilisieren und könnte über einen Kontakt zu h28, das als Drehlager für die Kopfrotation der kleinen Untereinheit dient (Mohan et al., 2014, Fischer et al., 2010), einen Einfluss auf die Translokationsaktivität zu haben.

Projekt II: 3D-Rekonstruktionen ribosomaler Komplexe mit dem Liganden ERj1

In diesem Projekt war das Ziel, mit Hilfe biochemischer und struktureller Methoden, die Funktion des Sec63-Homologs ERj1 am Ribosom besser zu verstehen und die Interaktion von ERj1 mit seinen Bindungspartnern BiP und Sec61 am ribosomalen Exit-Tunnel strukturell zu untersuchen.

Dabei konnte in *in vitro*-Rekonstitutionen gezeigt werden, dass entgegen der Literatur (Benedix et al., 2010) Sec61 und ERj1 parallel mit dem 80S Ribosom interagieren können und BiP keinen Einfluss auf die parallele Bindung hat. Auf dieser Basis wurden Kryo-EM-Strukturen verschiedener ERj1-gebundener Komplexe errechnet. Leider konnte in keinem der Strukturen ERj1 visualisiert werden.

Für die fehlende Visualisierung kamen verschiedene Gründe in Frage, die ausführlich diskutiert wurden. Am wahrscheinlichsten ist eine nachträgliche Dissoziation nach der erfolgreichen *in vitro*-Rekonstitution oder eine mangelnde Rigidität des Proteins.

Bei der Weiterführung des Projektes sollte eine Rekonstitution von ERj1-haltigen Proteoliposomen und eine Optimierung der Reinigungsstrategie in Betracht gezogen werden (siehe 5.2.5, S.93).

In einer der errechneten 3D-Rekonstruktionen konnte die Interaktion zwischen Sec61 und dem 80S Ribosom besser aufgelöst werden, als in den zu diesem Zeitpunkt vorhandenen 3D-Rekonstruktionen (Becker et al., 2009, Ménétret et al., 2008).

Projekt III: 3D-Rekonstruktion von hXBP1-RNC

Das Ziel dieses Projektes war es den strukturellen Mechanismus für den Translationsarrest im XBP1-RNC Komplex von Säugertieren zu untersuchen. Hierfür wurde mit Hilfe der SP-Kryo-EM eine Struktur des *in vitro* generierten XBP1-RNC mit dem humanen Arrestpeptid von XBP1 errechnet.

Durch eine ausführliche Strukturanalyse und dem Vergleich mit Strukturen anderer translationsarretierter RNCs war es möglich einen Mechanismus für den Translationsarrest vorzuschlagen. In diesem erfolgt die Aktivierung des Translationsarrestes über die Kontakte der naszierenden Kette mit der Tunnelwand. Die Aktivierung führt zu einer Verschiebung der Peptidyl-tRNA Richtung P-Loop und einer Stabilisierung von L10e. Aufgrund der Verschiebung kommt es zu einer Störung der Watson-Crick-Basen-Paarung zwischen dem CCA-Ende und dem P-Loop sowie einer Verschiebung der Esterbindung zur naszierenden Kette um ca. 2 Å relativ zum PTC. Die geometrisch ungünstige Positionierung der Esterbindung für die Peptidyl-Transferase-Reaktion bewirkt den Translationsarrest. Eventuell verstärkt eine von der induzierten Konformation abweichenden Konformation von A2602 den Translationsarrest.

Interessanterweise weist der Mechanismus neben bekannten Elementen, auch einige neue bisher noch nicht beschriebene Elemente auf und unterscheidet sich somit von den bisher beschriebenen Mechanismen in anderen Stallern.

Um den Mechanismus weiter im Detail zu untersuchen, ist eine 3D-Rekonstruktion bei einer höheren Auflösung notwendig. Dies kann durch den Einsatz der DED-Technologie und einer Minimierung des Orientierungs-Bias bei der Probenvorbereitung in zukünftigen Experimenten erreicht werden.

In dieser Arbeit konnte die Existenz eines translationsarretierten XBP1-RNC auch in *D. melanogaster in vitro* nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde postuliert, dass der in Säugern bekannte Lokalisierungsmechanismus für Xbp1 an der ER-Membran über einen XBP1-RNC im Reich der Tiere konserviert ist. Daher wäre es auch interessant die Struktur für XBP1-RNC in *D. melanogaster* zu berechnen und mit der Struktur in *H. sapiens* zu vergleichen, da die Arrestsequenzen nur bedingt konserviert sind.

7 Literaturverzeichnis

- AITKEN, C. E. & LORSCH, J. R. 2012. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology*, 19, 568-576.
- AKINBOYE, E. S. & BAKARE, O. 2011. Biological activities of emetine. *Open Nat Prod J*, 4, 8-15.
- ANGER, A. 2013. *Structural evolution of the eukaryotic ribosome*. Dissertation, LMU München.
- ANGER, A. M., ARMACHE, J.-P., BERNINGHAUSEN, O., HABECK, M., SUBKLEWE, M., WILSON, D. N. & BECKMANN, R. 2013. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature*, 497, 80-85.
- ARENZ, S., RAMU, H., GUPTA, P., BERNINGHAUSEN, O., BECKMANN, R., VÁZQUEZ-LASLOP, N., MANKIN, A. S. & WILSON, D. N. 2014. Molecular basis for erythromycin-dependent ribosome stalling during translation of the ErmBL leader peptide. *Nat Commun*, 5.
- ARMACHE, J.-P., JARASCH, A., ANGER, A. M., VILLA, E., BECKER, T., BHUSHAN, S., JOSSINET, F., HABECK, M., DINDAR, G. & FRANCKENBERG, S. 2010. Cryo-EM structure and rRNA model of a translating eukaryotic 80S ribosome at 5.5-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 19748-19753.
- BACK, S. H., SCHRÖDER, M., LEE, K., ZHANG, K. & KAUFMAN, R. J. 2005. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods*, 35, 395-416.
- BAI, X.-C., FERNANDEZ, I. S., MCMULLAN, G. & SCHERES, S. H. 2013. Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles. *Elife*, 2.
- BARTESAGHI, A., MERK, A., BANERJEE, S., MATTHIES, D., WU, X., MILNE, J. L. & SUBRAMANIAM, S. 2015. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. *Science*, aab1576.
- BECKER, T. 2007. *Strukturen von eEF3 und Sec61 als aktive ribosomale Liganden*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- BECKER, T., ARMACHE, J.-P., JARASCH, A., ANGER, A. M., VILLA, E., SIEBER, H., MOTAAL, B. A., MIELKE, T., BERNINGHAUSEN, O. & BECKMANN, R. 2011. Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome. *Nature structural & molecular biology*, 18, 715-720.
- BECKER, T., BHUSHAN, S., JARASCH, A., ARMACHE, J.-P., FUNES, S., JOSSINET, F., GUMBART, J., MIELKE, T., BERNINGHAUSEN, O. & SCHULTEN, K. 2009. Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science*, 326, 1369-1373.
- BECKMANN, R., BUBECK, D., GRASSUCCI, R., PENCZEK, P., VERSCHOOR, A., BLOBEL, G. & FRANK, J. 1997. Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, 278, 2123-2126.
- BEN-SHEM, A., DE LOUBRESSE, N. G., MELNIKOV, S., JENNER, L., YUSUPOVA, G. & YUSUPOV, M. 2011. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 334, 1524-1529.
- BENEDIX, J., LAJOIE, P., JAISWAL, H., BURGARD, C., GREINER, M., ZIMMERMANN, R., ROSPERT, S., SNAPP, E. L. & DUDEK, J. 2010. BiP modulates the affinity of its co-chaperone ERj1 for ribosomes. *Journal of biological chemistry*, 285, 36427-36433.
- BERG, B. V. D., CLEMONS, W. M., COLLINSON, I., MODIS, Y., HARTMANN, E., HARRISON, S. C. & RAPOPORT, T. A. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427, 36-44.
- BERNALES, S., PAPA, F. R. & WALTER, P. 2006. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22, 487-508.
- BHUSHAN, S., GARTMANN, M., HALIC, M., ARMACHE, J.-P., JARASCH, A., MIELKE, T., BERNINGHAUSEN, O., WILSON, D. N. & BECKMANN, R. 2010a. [alpha]-Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel. *Nature structural & molecular biology*, 17, 313-317.
- BHUSHAN, S., HOFFMANN, T., SEIDELT, B., FRAUENFELD, J., MIELKE, T., BERNINGHAUSEN, O., WILSON, D. N. & BECKMANN, R. 2011. SecM-stalled ribosomes adopt an altered geometry at the peptidyl transferase center. *PLoS biology*, 9, e1000581.

- BHUSHAN, S., MEYER, H., STAROSTA, A. L., BECKER, T., MIELKE, T., BERNINGHAUSEN, O., SATTLER, M., WILSON, D. N. & BECKMANN, R. 2010b. Structural basis for translational stalling by human cytomegalovirus and fungal arginine attenuator peptide. *Molecular cell*, 40, 138-146.
- BISCHOFF, L., BERNINGHAUSEN, O. & BECKMANN, R. 2014. Molecular Basis for the Ribosome Functioning as an L-Tryptophan Sensor. *Cell reports*, 9, 469-475.
- BLAU, M., MULLAPUDI, S., BECKER, T., DUDEK, J., ZIMMERMANN, R., PENCZEK, P. A. & BECKMANN, R. 2005. ERj1p uses a universal ribosomal adaptor site to coordinate the 80S ribosome at the membrane. *Nature structural & molecular biology*, 12, 1015-1016.
- BOTTÉ, C. Y., DUBAR, F., MCFADDEN, G. I., MARÉCHAL, E. & BIOT, C. 2011. Plasmodium falciparum apicoplast drugs: targets or off-targets? *Chemical reviews*, 112, 1269-1283.
- BRIGHTMAN, S. E., BLATCH, G. L. & ZETTER, B. R. 1995. Isolation of a mouse cDNA encoding MTJ1, a new murine member of the DnaJ family of proteins. *Gene*, 153, 249-254.
- CALFON, M., ZENG, H., URANO, F., TILL, J. H., HUBBARD, S. R., HARDING, H. P., CLARK, S. G. & RON, D. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415, 92-96.
- CANNONE, J. J., SUBRAMANIAN, S., SCHNARE, M. N., COLLETT, J. R., D'SOUZA, L. M., DU, Y., FENG, B., LIN, N., MADABUSI, L. V. & MÜLLER, K. M. 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC bioinformatics*, 3, 2.
- CHEN, J. Z. & GRIGORIEFF, N. 2007. SIGNATURE: a single-particle selection system for molecular electron microscopy. *Journal of structural biology*, 157, 168-173.
- CHERRY, J. M., HONG, E. L., AMUNDSEN, C., BALAKRISHNAN, R., BINKLEY, G., CHAN, E. T., CHRISTIE, K. R., COSTANZO, M. C., DWIGHT, S. S. & ENGEL, S. R. 2011. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic acids research*, gkr1029.
- CHEVALIER, M., RHEE, H., ELGUINDI, E. C. & BLOND, S. Y. 2000. Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 19620-19627.
- CHIRKOVA, A., ERLACHER, M. D., CLEMENTI, N., ZYWICKI, M., AIGNER, M. & POLACEK, N. 2010. The role of the universally conserved A2450–C2063 base pair in the ribosomal peptidyl transferase center. *Nucleic Acids Research*.
- COLE, C., BARBER, J. D. & BARTON, G. J. 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*, 36, W197-W201.
- DEVER, T. E. & GREEN, R. 2012. The Elongation, Termination and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4, a013706.
- DRESIOS, J., PANOPOULOS, P., SUZUKI, K. & SYNETOS, D. 2003. A dispensable yeast ribosomal protein optimizes peptidyltransferase activity and affects translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 3314-3322.
- DUDEK, J., BENEDIX, J., CAPPEL, S., GREINER, M., JALAL, C., MÜLLER, L. & ZIMMERMANN, R. 2009. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cellular and molecular life sciences*, 66, 1556-1569.
- DUDEK, J., GREINER, M., MÜLLER, A., HENDERSHOT, L. M., KOPSCH, K., NASTAINCZYK, W. & ZIMMERMANN, R. 2005. ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *Nature structural & molecular biology*, 12, 1008-1014.
- DUDEK, J., VOLKMER, J., BIES, C., GUTH, S., MÜLLER, A., LERNER, M., FEICK, P., SCHÄFER, K. H., MORGENSTERN, E. & HENNESSY, F. 2002. A novel type of co-chaperone mediates transmembrane recruitment of DnaK-like chaperones to ribosomes. *The EMBO journal*, 21, 2958-2967.
- DUNN, C. W., HEJNOL, A., MATUS, D. Q., PANG, K., BROWNE, W. E., SMITH, S. A., SEAVER, E., ROUSE, G. W., OBST, M., EDGECOMBE, G. D., SORENSEN, M. V., HADDOCK, S. H. D., SCHMIDT-RHAESA, A., OKUSU, A., KRISTENSEN, R. M., WHEELER, W. C., MARTINDALE, M. Q. & GIRIBET, G. 2008. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature*, 452, 745-749.

- EMSLEY, P. & COWTAN, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60, 2126-2132.
- ERICKSON, A. H. & BLOBEL, G. 1983. [3] Cell-free translation of messenger RNA in a wheat germ system. *Methods in enzymology*, 96, 38-50.
- FISCHER, N., KONEVEGA, A. L., WINTERMEYER, W., RODNINA, M. V. & STARK, H. 2010. Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. *Nature*, 466, 329-333.
- FISCHER, N., NEUMANN, P., KONEVEGA, A. L., BOCK, L. V., FICNER, R., RODNINA, M. V. & STARK, H. 2015. Structure of the E. coli ribosome-EF-Tu complex at < 3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*.
- FRANK, J., RADERMACHER, M., PENCZEK, P., ZHU, J., LI, Y., LADJADJ, M. & LEITH, A. 1996. SPIDER and WEB: Processing and Visualization of Images in 3D Electron Microscopy and Related Fields. *Journal of Structural Biology*, 116, 190-199.
- FULLE, S. & GOHLKE, H. 2009. Statics of the Ribosomal Exit Tunnel: Implications for Cotranslational Peptide Folding, Elongation Regulation, and Antibiotics Binding. *Journal of Molecular Biology*, 387, 502-517.
- GOGALA, M., BECKER, T., BEATRIX, B., ARMACHE, J.-P., BARRIO-GARCIA, C., BERNINGHAUSEN, O. & BECKMANN, R. 2014. Structures of the Sec61 complex engaged in nascent peptide translocation or membrane insertion. *Nature*, 506, 107-110.
- GÖRLICH, D. & RAPOPORT, T. A. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75, 615-630.
- GUEx, N., PEITSCH, M. C. & SCHWEDE, T. 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS*, 30, S162-S173.
- HARRISON, P. M. & AROSIO, P. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1275, 161-203.
- HENDRIX, D. K., BRENNER, S. E. & HOLBROOK, S. R. 2005. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Quarterly reviews of biophysics*, 38, 221-243.
- HETZ, C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 89-102.
- INGOLIA, N. T., LAREAU, L. F. & WEISSMAN, J. S. 2011. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 147, 789-802.
- ITO, K. & CHIBA, S. 2013. Arrest peptides: cis-acting modulators of translation. *Annual review of biochemistry*, 82, 171-202.
- JACKSON, K. E., HABIB, S., FRUGIER, M., HOEN, R., KHAN, S., PHAM, J. S., POUPLANA, L. R. D., ROYO, M., SANTOS, M. A. & SHARMA, A. 2011. Protein translation in *Plasmodium* parasites. *Trends in parasitology*, 27, 467-476.
- JACKSON, R. J., HELLEN, C. U. & PESTOVA, T. V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11, 113-127.
- JENNER, L., MELNIKOV, S., DE LOUBRESSE, N. G., BEN-SHEM, A., ISKAKOVA, M., URZHUMTSEV, A., MESKAUSKAS, A., DINMAN, J., YUSUPOVA, G. & YUSUPOV, M. 2012. Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current opinion in structural biology*, 22, 759-767.
- JOSSINET, F. & WESTHOF, E. 2014. S2S-Assemble2: a Semi-Automatic Bioinformatics Framework to Study and Model RNA 3D Architectures. *Handbook of RNA Biochemistry: Second, Completely Revised and Enlarged Edition*, 667-686.
- JUNG, S.-J., KIM, J. E. H., REITHINGER, J. H. & KIM, H. 2014. The Sec62–Sec63 translocon facilitates translocation of the C-terminus of membrane proteins. *Journal of cell science*, 127, 4270-4278.
- KAMPINGA, H. H. & CRAIG, E. A. 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 579-592.
- KANNAN, K. & MANKIN, A. S. 2011. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241, 33-47.

- KELLEHER, D. J. & GILMORE, R. 2006. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*, 16, 47R-62R.
- KLEIN, D., SCHMEING, T., MOORE, P. & STEITZ, T. 2001. The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *The EMBO journal*, 20, 4214-4221.
- KLINGE, S., VOIGTS-HOFFMANN, F., LEIBUNDGUT, M., ARPAGAUS, S. & BAN, N. 2011. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science*, 334, 941-948.
- KOKWARO, G. 2009. Ongoing challenges in the management of malaria. *Malaria journal*, 8, S2.
- KROCZYNSKA, B., EVANGELISTA, C. M., SAMANT, S. S., ELGUINDI, E. C. & BLOND, S. Y. 2004. The SANT2 domain of the murine tumor cell DnaJ-like protein 1 human homologue interacts with α 1-antichymotrypsin and kinetically interferes with its serpin inhibitory activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 11432-11443.
- KUCUKELBIR, A., SIGWORTH, F. J. & TAGARE, H. D. 2014. Quantifying the local resolution of cryo-EM density maps. *Nature methods*, 11, 63-65.
- KYTE, J. & DOOLITTLE, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157, 105-132.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- LAFONTAINE, D. L. & TOLLERVEY, D. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 514-520.
- LANG, S., BENEDIX, J., FEDELES, S. V., SCHORR, S., SCHIRRA, C., SCHÄUBLE, N., JALAL, C., GREINER, M., HAßDENTEUFEL, S. & TATZELT, J. 2012. Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *Journal of cell science*, 125, 1958-1969.
- LEONTIS, N. B., STOMBAUGH, J. & WESTHOF, E. 2002. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic acids research*, 30, 3497-3531.
- LEONTIS, N. B. & WESTHOF, E. 2003. Analysis of RNA motifs. *Current opinion in structural biology*, 13, 300-308.
- LEUNG, E. K. Y., SUSLOV, N., TUTTLE, N., SENGUPTA, R. & PICCIRILLI, J. A. 2011. The mechanism of peptidyl transfer catalysis by the ribosome. *Annual review of biochemistry*, 80, 527-555.
- LI, J., GUTELL, R. R., DAMBERGER, S. H., WIRTZ, R. A., KISSINGER, J. C., ROGERS, M. J., SATTABONGKOT, J. & MCCUTCHAN, T. F. 1997. Regulation and trafficking of three distinct 18 S ribosomal RNAs during development of the malaria parasite. *Journal of molecular biology*, 269, 203-213.
- LI, X., MOONEY, P., ZHENG, S., BOOTH, C. R., BRAUNFELD, M. B., GUBBENS, S., AGARD, D. A. & CHENG, Y. 2013. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nature methods*, 10, 584-590.
- LIN, S.-H. & GUIDOTTI, G. 2009. Chapter 35 Purification of Membrane Proteins. In: RICHARD, R. B. & MURRAY, P. D. (eds.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- LIOU, H.-C., BOOTHBY, M. R., FINN, P. W., DAVIDON, R., NABAVI, N., ZELEZNIK-LE, N. J., TING, J. & GLIMCHER, L. H. 1990. A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science*, 247, 1581-1584.
- LU, J. & DEUTSCH, C. 2005. Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nature structural & molecular biology*, 12, 1123-1129.
- MATTHEWS, H., USMAN-IDRIS, M., KHAN, F., READ, M. & NIRMALAN, N. 2013. Drug repositioning as a route to anti-malarial drug discovery: preliminary investigation of the in vitro anti-malarial efficacy of emetine dihydrochloride hydrate. *Malaria journal*, 12, 359.
- MAYER, M. P. 2013. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in biochemical sciences*, 38, 507-514.
- MEIMARIDOU, E., GOOLJAR, S. B. & CHAPPLE, J. P. 2009. From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42, 1-9.

- MELNIKOV, S., BEN-SHEM, A., DE LOUBRESSE, N. G., JENNER, L., YUSUPOVA, G. & YUSUPOV, M. 2012. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 19, 560-567.
- MÉNÉTRET, J.-F., HEGDE, R. S., AGUIAR, M., GYGI, S. P., PARK, E., RAPOPORT, T. A. & AKEY, C. W. 2008. Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure*, 16, 1126-1137.
- MENETRET, J.-F., HEGDE, R. S., HEINRICH, S. U., CHANDRAMOULI, P., LUDTKE, S. J., RAPOPORT, T. A. & AKEY, C. W. 2005. Architecture of the ribosome–channel complex derived from native membranes. *Journal of molecular biology*, 348, 445-457.
- MILAZZO, A.-C., MOLDOVAN, G., LANMAN, J., JIN, L., BOUWER, J. C., KLIENFELDER, S., PELTIER, S. T., ELLISMAN, M. H., KIRKLAND, A. I. & XUONG, N.-H. 2010. Characterization of a direct detection device imaging camera for transmission electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 110, 741-744.
- MILNE, J. L., BORGNIA, M. J., BARTESAGHI, A., TRAN, E. E., EARL, L. A., SCHAUDER, D. M., LENGYEL, J., PIERSON, J., PATWARDHAN, A. & SUBRAMANIAM, S. 2013. Cryo-electron microscopy—a primer for the non-microscopist. *FEBS Journal*, 280, 28-45.
- MOHAN, S., DONOHUE, J. P. & NOLLER, H. F. 2014. Molecular mechanics of 30S subunit head rotation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 13325-13330.
- MORI, K. 2009. Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *Journal of Biochemistry*, 146, 743-750.
- MORI, K., OGAWA, N., KAWAHARA, T., YANAGI, H. & YURA, T. 2000. mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4660-4665.
- MÜLLER, L., DE ESCAURIAZA, M. D., LAJOIE, P., THEIS, M., JUNG, M., MÜLLER, A., BURGARD, C., GREINER, M., SNAPP, E. L. & DUDEK, J. 2010. Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Molecular biology of the cell*, 21, 691-703.
- NAGASHIMA, Y., MISHIBA, K.-I., SUZUKI, E., SHIMADA, Y., IWATA, Y. & KOIZUMI, N. 2011. Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Scientific reports*, 1.
- NISSEN, P., HANSEN, J., BAN, N., MOORE, P. B. & STEITZ, T. A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289, 920-930.
- NOESKE, J., HUANG, J., OLIVIER, N. B., GIACOBBE, R. A., ZAMBROWSKI, M. & CATE, J. H. 2014. Synergy of streptogramin antibiotics occurs independently of their effects on translation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58, 5269-5279.
- ORLOVA, E. V. & SAIBIL, H. R. 2011. Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. *Chemical reviews*, 111, 7710-7748.
- OSBORNE, A. R., RAPOPORT, T. A. & VAN DEN BERG, B. 2005. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 529-550.
- PARK, E. & RAPOPORT, T. A. 2012. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annual review of biophysics*, 41, 21-40.
- PECH, M., SPRETER, T., BECKMANN, R. & BEATRIX, B. 2010. Dual binding mode of the nascent polypeptide-associated complex reveals a novel universal adapter site on the ribosome. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 19679-19687.
- PETROV, A. N., MESKAUSKAS, A., ROSHWALB, S. C. & DINMAN, J. D. 2008. Yeast ribosomal protein L10 helps coordinate tRNA movement through the large subunit. *Nucleic acids research*, 36, 6187-6198.
- PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C. & FERRIN, T. E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25, 1605-1612.
- PFEFFER, S., DUDEK, J., GOGALA, M., SCHORR, S., LINXWEILER, J., LANG, S., BECKER, T., BECKMANN, R., ZIMMERMANN, R. & FÖRSTER, F. 2014. Structure of the mammalian oligosaccharyl-transferase complex in the native ER protein translocon. *Nat Commun*, 5.

- PLONGTHONGKUM, N., KULLAWONG, N., PANYIM, S. & TIRASOPHON, W. 2007. Ire1 regulated *XBP1* mRNA splicing is essential for the unfolded protein response (UPR) in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and biophysical research communications*, 354, 789-794.
- POLACEK, N., GOMEZ, M. J., ITO, K., XIONG, L., NAKAMURA, Y. & MANKIN, A. 2003. The critical role of the universally conserved A2602 of 23S ribosomal RNA in the release of the nascent peptide during translation termination. *Molecular cell*, 11, 103-112.
- PREIS, A., HEUER, A., BARRIO-GARCIA, C., HAUSER, A., EYLER, D. E., BERNINGHAUSEN, O., GREEN, R., BECKER, T. & BECKMANN, R. 2014. Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1. *Cell reports*, 8, 59-65.
- RALPH, S. A., D'OMBRAIN, M. C. & MCFADDEN, G. I. 2001. The apicoplast as an antimalarial drug target. *Drug Resistance Updates*, 4, 145-151.
- RAPOPORT, T. A. 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, 450, 663-669.
- RATJE, A. H., LOERKE, J., MIKOLAJKA, A., BRÜNNER, M., HILDEBRAND, P. W., STAROSTA, A. L., DÖNHÖFER, A., CONNELL, S. R., FUCINI, P. & MIELKE, T. 2010. Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature*, 468, 713-716.
- REIMOLD, A. M., ETKIN, A., CLAUSS, I., PERKINS, A., FRIEND, D. S., ZHANG, J., HORTON, H. F., SCOTT, A., ORKIN, S. H. & BYRNE, M. C. 2000. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes & development*, 14, 152-157.
- REIMOLD, A. M., IWAKOSHI, N. N., MANIS, J., VALLABHAJOSYULA, P., SZOMOLANYI-TSUDA, E., GRAVALLESE, E. M., FRIEND, D., GRUSBY, M. J., ALT, F. & GLIMCHER, L. H. 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 412, 300-307.
- RODNINA, M. V., WINTERMEYER, W. & GREEN, R. 2011. *Ribosomes Structure, Function, and Dynamics: Structure, Function, and Dynamics*, 1. Auflage, Wien, Springer.
- RON, D. & WALTER, P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8, 519-529.
- RÜEGSEGGER, U., LEBER, J. H. & WALTER, P. 2001. Block of HAC1 mRNA Translation by Long-Range Base Pairing Is Released by Cytoplasmic Splicing upon Induction of the Unfolded Protein Response. *Cell*, 107, 103-114.
- RUIZ-CANADA, C., KELLEHER, D. J. & GILMORE, R. 2009. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell*, 136, 272-283.
- RYOO, H. D., DOMINGOS, P. M., KANG, M. J. & STELLER, H. 2007. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *The EMBO journal*, 26, 242-252.
- SAHDEV, S., KHATTAR, S. K. & SAINI, K. S. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and cellular biochemistry*, 307, 249-264.
- SAYERS, E. W., BARRETT, T., BENSON, D. A., BOLTON, E., BRYANT, S. H., CANESE, K., CHETVERNIN, V., CHURCH, D. M., DICUCCIO, M. & FEDERHEN, S. 2011. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 39, D38-D51.
- SCHERES, S. H. & CHEN, S. 2012. Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination. *Nature methods*, 9, 853-854.
- SCHMEING, T. M., HUANG, K. S., KITCHEN, D. E., STROBEL, S. A. & STEITZ, T. A. 2005b. Structural insights into the roles of water and the 2' hydroxyl of the P site tRNA in the peptidyl transferase reaction. *Molecular cell*, 20, 437-448.
- SCHMEING, T. M., HUANG, K. S., STROBEL, S. A. & STEITZ, T. A. 2005a. An induced-fit mechanism to promote peptide bond formation and exclude hydrolysis of peptidyl-tRNA. *Nature*, 438, 520-524.
- SCHRÖDER, M. & KAUFMAN, R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 739-789.

- SEIDELT, B., INNIS, C. A., WILSON, D. N., GARTMANN, M., ARMACHE, J.-P., VILLA, E., TRABUCO, L. G., BECKER, T., MIELKE, T. & SCHULTEN, K. 2009. Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling. *Science*, 326, 1412-1415.
- SHAIKH, T. R., GAO, H., BAXTER, W. T., ASTURIAS, F. J., BOISSET, N., LEITH, A. & FRANK, J. 2008. SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nature protocols*, 3, 1941-1974.
- SHEN, W.-F., KRISHNAN, K., LAWRENCE, H. & LARGMAN, C. 2001. The HOX homeodomain proteins block CBP histone acetyltransferase activity. *Molecular and cellular biology*, 21, 7509-7522.
- SIDRAUSKI, C., COX, J. S. & WALTER, P. 1996. tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 87, 405-413.
- SIDRAUSKI, C. & WALTER, P. 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90, 1031-1039.
- SIMONOVIĆ, M. & STEITZ, T. A. 2009. A structural view on the mechanism of the ribosome-catalyzed peptide bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1789, 612-623.
- SKACH, W. R. 2007. The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding. *The Journal of cell biology*, 179, 1333-1335.
- SMITH, M. H., PLOEGH, H. L. & WEISSMAN, J. S. 2011. Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science*, 334, 1086-1090.
- SONE, M., ZENG, X., LARESE, J. & RYOO, H. 2013. A modified UPR stress sensing system reveals a novel tissue distribution of IRE1/XBP1 activity during normal *Drosophila* development. *Cell Stress and Chaperones*, 18, 307-319.
- SQUID, S., LEPESANT, J.-A. & YANICOSTAS, C. 2007. The xbp-1 gene is essential for development in *Drosophila*. *Development genes and evolution*, 217, 159-167.
- SULIMA, S. O., GÜLAY, S. P., ANJOS, M., PATCHETT, S., MESKAUSKAS, A., JOHNSON, A. W. & DINMAN, J. D. 2014. Eukaryotic rpL10 drives ribosomal rotation. *Nucleic acids research*, 42, 2049-2063.
- SVIDRITSKIY, E., LING, C., ERMOLENKO, D. N. & KOROSTELEV, A. A. 2013. Blasticidin S inhibits translation by trapping deformed tRNA on the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 12283-12288.
- TAYLOR, W. R., WIDJAJA, H., RICHIE, T. L., BASRI, H., OHRT, C., TJITRA, TAUFIK, E., JONES, T. R., KAIN, K. C. & HOFFMAN, S. L. 2001. Chloroquine/doxycycline combination versus chloroquine alone, and doxycycline alone for the treatment of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Irian Jaya, Indonesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64, 223-8.
- VÁZQUEZ-LASLOP, N., KLEPACKI, D., MULHEARN, D. C., RAMU, H., KRASNYKH, O., FRANZBLAU, S. & MANKIN, A. S. 2011. Role of antibiotic ligand in nascent peptide-dependent ribosome stalling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 10496-10501.
- VAZQUEZ-LASLOP, N., THUM, C. & MANKIN, A. S. 2008. Molecular mechanism of drug-dependent ribosome stalling. *Molecular cell*, 30, 190-202.
- VENTURA, S. & VILLAVARDE, A. 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in biotechnology*, 24, 179-185.
- VOORHEES, REBECCA M., FERNÁNDEZ, ISRAEL S., SCHERES, SJORS H. W. & HEGDE, RAMANUJAN S. 2014. Structure of the Mammalian Ribosome-Sec61 Complex to 3.4 Å Resolution. *Cell*, 157, 1632-1643.
- VOORHEES, R. M. & RAMAKRISHNAN, V. 2013. Structural Basis of the Translational Elongation Cycle*. *Annual review of biochemistry*, 82, 203-236.
- WAGENKNECHT, T., GRASSUCCI, R. & FRANK, J. 1988. Electron microscopy and computer image averaging of ice-embedded large ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 199, 137-147.
- WALTER, P. & RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-1086.

- WANG, L. & DOBBERSTEIN, B. 1999. Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS letters*, 457, 316-322.
- WHITE, N. J., PUKRITTAYAKAMEE, S., HIEN, T. T., FAIZ, M. A., MOKUOLU, O. A. & DONDORP, A. M. 2014. Malaria. *The Lancet*, 383, 723-735.
- WHO 2013. World malaria report 2013.
- WILD, K., HALIC, M., SINNING, I. & BECKMANN, R. 2004. SRP meets the ribosome. *Nature structural & molecular biology*, 11, 1049-1053.
- WILSON, D. N. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 35-48.
- WILSON, D. N. & BECKMANN, R. 2011. The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Current Opinion in Structural Biology*, 21, 274-282.
- WONG, W., BAI, X.-C., BROWN, A., FERNANDEZ, I. S., HANSEN, E., CONDRON, M., TAN, Y. H., BAUM, J. & SCHERES, S. H. 2014. Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine. *Elife*, 3, e03080.
- YAMAMOTO, H., UNBEHAUN, A., LOERKE, J., BEHRMANN, E., COLLIER, M., BÜRGER, J., MIELKE, T. & SPAHN, C. M. T. 2014. Structure of the mammalian 80S initiation complex with initiation factor 5B on HCV-IRES RNA. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 721-727.
- YANAGITANI, K., IMAGAWA, Y., IWAWAKI, T., HOSODA, A., SAITO, M., KIMATA, Y. & KOHNO, K. 2009. Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Molecular cell*, 34, 191-200.
- YANAGITANI, K., KIMATA, Y., KADOKURA, H. & KOHNO, K. 2011. Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science*, 331, 586-589.
- YOSHIDA, H., MATSUI, T., HOSOKAWA, N., KAUFMAN, R. J., NAGATA, K. & MORI, K. 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental cell*, 4, 265-271.
- YOSHIDA, H., MATSUI, T., YAMAMOTO, A., OKADA, T. & MORI, K. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, 107, 881-891.
- ZIMMERMANN, R., EYRISCH, S., AHMAD, M. & HELMS, V. 2011. Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808, 912-92

8 Danksagung

Als erstes möchte ich Professor Dr. Roland Beckmann danken, dass er mir die Möglichkeit gab, in seinen Arbeitskreis zu arbeiten. Dies gab mir die Gelegenheit mich intensiv mit dem Forschungsfeld der Kryo-EM Elektronenmikroskopie auseinanderzusetzen und verschiedene spannende Projekte zu bearbeiten. Dabei stand seine Tür immer offen und er motivierte einen weiterzumachen, falls etwas nicht so funktionierte, wie es sollte.

Besonderer Dank gilt Dr. Thomas Becker, der immer für mich da war und viel seiner wertvollen Zeit investiert hat, um mir weiterzuhelfen, falls ich Rat brauchte oder ein Problem hatte. Das ist nicht selbstverständlich.

Desweiteren möchte ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises Beckmann und Wilson danken, ohne deren Hilfe die Arbeit nicht möglich gewesen wäre, darunter das Titan-Team, welches all die Proben gesammelt hat. Ein großer Dank gilt dabei Andre Heuer, der neben Dr. Thomas Becker, immer Zeit hatte, um bei Problemen bezüglich der Datenprozessierung zu helfen.

In Bezug auf das Projekt der Modellierung des Plasmodium-Ribosoms möchte ich folgenden Leuten danken. Erstens dem Arbeitskreis Professor May für die Kollaboration und die Bereitstellung der infizierten Erythrozyten. Zweitens Dr. Stefan Pfeffer und Jan Schuller (AG Förster, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried), welche erst die Datensammlungen mit Hilfe der neuen DED-Technologie ermöglichten und auch selber durchführten. Drittens Andre Heuer, der bei der Implementierung der Datenprozessierung half und viertens Dr. Anger, der die Modellierung der rRNA übernahm.

In Bezug auf das Projekt mit dem Liganden Erj1 möchte ich der AG Professor Zimmermann (Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes) für die Kollaboration und die Bereitstellung der Proteinproben danken sowie für deren freundliche Einladung in ihr Labor, um mit den Arbeitstechniken vertraut zu werden.

In Bezug auf das Projekt mit dem translationsarretierten RNC mit dem Arrestpeptid XBP1 möchte ich der AG Professor Kohono (Nara Institute of Science and Technology) für die Kollaboration danken und die Bereitstellung des Plasmides mit der cDNA von XBP1-S255A.

Zuletzt möchte ich noch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während meiner Promotion stets zur Seite standen.