

**STRUKTURAUFKLÄRUNG RIBOSOMALER  
KOMPLEXE MITTELS KRYO-EM**

- **Mechanismus der Translokationsreaktion**
- **ribosomal verankerte ncRNAs**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich  
Pharmazeutische Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
eingereicht

von  
**Andreas Heinrich Ratje**  
geboren in Bremerhaven

Marburg/Lahn 2010

---

**Hochschule:** Philipps-Universität Marburg

**Hochschulkennziffer:** 1180

**Erstgutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Roland K. Hartmann

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Christian M. T. Spahn

**Dissertation eingereicht am:** 29.11.2010

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10.01.2011

**Für meine Eltern**



# INHALTSVERZEICHNIS

---

1	Abkürzungen und Einheiten . . . . .	1
2	Einleitung . . . . .	5
2.1	Das Ribosom . . . . .	5
2.2	Nicht-kodierende Ribonukleinsäuren . . . . .	10
2.3	Das Ribozym GIR1 . . . . .	11
3	Ziel des Projekts . . . . .	17
3.1	Mechanismus der Translokationsreaktion . . . . .	17
3.2	Strukturaufklärung funktioneller RNAs . . . . .	18
4	Materialien und Methoden . . . . .	19
4.1	Synthetische DNA-Oligonukleotide . . . . .	19
4.1.1	Primer für PCR und Sequenzierungen . . . . .	19
4.2	Bakterielle Zellkultur . . . . .	19
4.2.1	Kultivierung in Flüssigmedium . . . . .	19
4.2.2	Kultivierung auf Agarplatten . . . . .	19
4.2.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen . . . . .	20
4.2.4	Transformation . . . . .	20
4.2.5	Konservierung von Zellen . . . . .	21
4.3	Plasmidpräparation . . . . .	21
4.4	Überexpression und Aufreinigung des MS2-GST-Fusionsproteins21	
4.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford . . . . .	23
4.5	Ribosomenpräparation . . . . .	24
4.5.1	Präparation von Ribosomen aus <i>E.coli</i> . . . . .	25
4.5.2	Nicht-dissoziierender analytischer Gradient für Ribosomen aus <i>E. coli</i> . . . . .	25
4.5.3	Präparation von Untereinheiten und 70S Ribosomen aus <i>E. coli</i> . . . . .	26
4.5.4	Aufreinigung mutierter Ribosomen . . . . .	28
4.5.5	Präparation von Ribosomen aus <i>B. subtilis</i> . . . . .	28
4.5.6	Nicht-dissoziierender analytischer Gradient für Ribosomen aus <i>B. subtilis</i> . . . . .	29
4.5.7	Präparation von 30S Untereinheiten aus <i>B.subtilis</i> . . . . .	30
4.6	Nukleinsäure-Techniken . . . . .	32
4.6.1	Gelelektrophorese . . . . .	32
4.6.1.1	Agarose-Gele . . . . .	32
4.6.1.2	Polyacrylamid-Gele . . . . .	33
4.6.1.3	Native Gelelektrophorese . . . . .	34
4.6.2	Detektion der Nukleinsäuren . . . . .	35
4.6.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . . . . .	36
4.6.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	36

4.6.5	Isolierung von RNA aus Polyacrylamidgelen . . . . .	37
4.6.6	Phenol-Chloroform-Extraktion . . . . .	37
4.6.7	Ethanol-Fällung . . . . .	37
4.7	DNA-Techniken . . . . .	38
4.7.1	Restriktionsspaltung . . . . .	38
4.7.2	Dephosphorylierung . . . . .	38
4.7.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	38
4.8	RNA-Techniken . . . . .	39
4.8.1	T7-Transkription . . . . .	39
4.8.2	RNA-Isolierung . . . . .	39
4.8.2.1	Gesamt-RNA . . . . .	39
4.8.2.2	Ribosomale RNA . . . . .	39
4.8.3	DNase I-Verdau . . . . .	40
4.8.4	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) . . . . .	40
4.9	Klonierungs- und Expressionsstrategie . . . . .	41
4.9.1	Klonierung des Ribozym GIR <sub>1</sub> aus <i>D. iridis</i> in Helix 9 der 23S rRNA . . . . .	41
4.10	Darstellung des 70S·EF-G·GDP·FA-Komplexes . . . . .	41
4.11	Elektronenmikroskopie . . . . .	42
4.11.1	Aufbau des Elektronenmikroskops . . . . .	44
4.11.2	Bildentstehung im TEM . . . . .	44
4.11.3	Probenpräparation . . . . .	45
4.11.3.1	Proben für die Negativkontrastierung . . . . .	45
4.11.3.2	Proben für die Kryo-Elektronenmikroskopie . . . . .	46
4.11.4	Datensammlung . . . . .	46
4.11.4.1	Negativkontrastierung . . . . .	46
4.11.4.2	Kryo-Elektronenmikroskopie . . . . .	47
4.11.4.3	Digitalisierung der Daten . . . . .	47
4.11.5	Datenprozessierung . . . . .	47
4.11.5.1	Die Kontrasttransferfunktion . . . . .	48
4.11.5.2	Auswahl der Micrographen . . . . .	48
4.11.5.3	Partikelbilderelektion . . . . .	49
4.11.5.4	Sortierung und Volumenrekonstruktion . . . . .	49
4.11.5.5	Bestimmung der Auflösung . . . . .	50
4.11.5.6	Docking . . . . .	51
5	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	53
5.1	Mechanismus der Translokationsreaktion . . . . .	53
5.2	Das Ribozym GIR <sub>1</sub> in Helix 9 der 23S rRNA . . . . .	75
5.2.1	Expression mutierter Ribosomen in An- und Abwesenheit des Antibiotikums Kanamycin . . . . .	75
5.2.2	Zeitabhängigkeit der Expression mutierter Ribosomen . . . . .	79
5.2.3	Aufreinigung mutierter Ribosomen mit dem Ribozym GIR <sub>1</sub> in Helix 9 . . . . .	81

5.2.4	Kryo-EM mutierter Ribosomen mit dem Ribozym GIR <sub>1</sub> in Helix 9 . . . . .	85
5.2.4.1	Datenerhebung . . . . .	85
5.2.4.2	Sortierung . . . . .	86
5.2.5	Diskussion . . . . .	91
6	Zusammenfassung . . . . .	95
7	Summary . . . . .	99
I	<i>Anhang</i> . . . . .	103
A	2D-Strukturen klonierter RNAs . . . . .	105
B	Material . . . . .	109
B.0.6	Bakterienstämme . . . . .	109
B.0.7	Chemikalien . . . . .	110
B.0.8	DNA-Oligonukleotide . . . . .	112
B.0.9	Enzyme . . . . .	115
B.0.10	Geräte . . . . .	116
B.0.11	Software . . . . .	117
B.0.12	Expressionsstämme . . . . .	118
C	Danksagung . . . . .	129
D	Lebenslauf . . . . .	131
E	Selbständigkeitserklärung . . . . .	133
	Literaturverzeichnis . . . . .	135

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

<b>Abb. 1</b>	Schema der Translation in Prokaryonten . . . . .	6
<b>Abb. 2</b>	Vergleich ribosomal gebundenen EF-Gs mit EF-G·GDP	9
<b>Abb. 3</b>	Interaktionen ribosomaler Elemente mit EF-G . . . . .	9
<b>Abb. 4</b>	Stabilisierung des RSR durch EF-G . . . . .	10
<b>Abb. 5</b>	Schematischer Aufbau des <i>twintrons</i> aus <i>D. iridis</i> . . . . .	12
<b>Abb. 6</b>	Die <i>branching reaction</i> . . . . .	13
<b>Abb. 7</b>	Die Konformationen des Ribozyms GIR <sub>1</sub> . . . . .	15
<b>Abb. 8</b>	Gradientenprofil der aus <i>E. coli</i> präparierten Ribosomen	26
<b>Abb. 9</b>	Präparativer Gradient für Ribosomen aus <i>E. coli</i> . . . . .	27
<b>Abb. 10</b>	Gradientenprofil von Ribosomen aus <i>B. subtilis</i> . . . . .	30
<b>Abb. 11</b>	Vergleichendes Gradientenprofil von Ribosomen aus <i>B. subtilis</i> . . . . .	31
<b>Abb. 12</b>	Dissoziierender präparativer Gradient für Ribosomen aus <i>B. subtilis</i> . . . . .	32
<b>Abb. 13</b>	Produktsequenz der ersten PCR . . . . .	42
<b>Abb. 14</b>	Produktsequenz der zweiten PCR . . . . .	42
<b>Abb. 15</b>	Klonierungsstrategie . . . . .	43
<b>Abb. 16</b>	Dichteverteilung bei Negativkontrastierung und Ein- bettung in amorphes Eis . . . . .	46
<b>Abb. 17</b>	Wachstumskurve mit Sägezahnprofil . . . . .	75
<b>Abb. 18</b>	Analytischer Sucrosegradient (10-30 %) . . . . .	76
<b>Abb. 19</b>	Nachweis des MStags in Helix 98 . . . . .	77
<b>Abb. 20</b>	Nachweis des Ribozyms GIR <sub>1</sub> in Helix 9 . . . . .	77
<b>Abb. 21</b>	Denaturierendes 4 % PAA-Gel zur Darstellung der ri- bosomalen RNA aus cr7oS . . . . .	78
<b>Abb. 22</b>	Wachstumskurve: Zeitabhängigkeit der Expression . .	79
<b>Abb. 23</b>	Zeitabhängigkeit der Expression: Nachweis des MStags in Helix 98 . . . . .	80
<b>Abb. 24</b>	Zeitabhängigkeit der Expression: Nachweis des Ribo- zyms GIR <sub>1</sub> in Helix 9 . . . . .	81
<b>Abb. 25</b>	Aufreinigung mutierter Ribosomen über den MS2 tag .	82
<b>Abb. 26</b>	Analytischer Sucrosegradient (10 - 30 %) . . . . .	83
<b>Abb. 27</b>	Nachweis des Ribozyms GIR <sub>1</sub> in Helix 9 aufgereinigter Ribosomen . . . . .	83
<b>Abb. 28</b>	Nachweis des MStags in Helix 98 aufgereinigter Ribo- somen . . . . .	84
<b>Abb. 29</b>	Denaturierendes 4 % PAA-Gel zur Darstellung der rR- NA aufgereinigter Ribosomen. . . . .	84
<b>Abb. 30</b>	<i>Negative staining</i> aufgereinigter Ribosomen . . . . .	85
<b>Abb. 31</b>	Verteilung der Partikelbilder nach den Sortierungen .	87



Abb. 32	Volumenvergleich der Subpopulationen 1 und 5 . . . . .	89
Abb. 33	Volumenvergleich der Subpopulationen 3 und 5 . . . . .	90
Abb. 34	RNase P RNA von <i>E. coli</i> mit verlängerter Helix P <sub>1</sub> . . .	106
Abb. 35	RNase P RNA von <i>T. thermophilus</i> mit verlängerter Helix P <sub>1</sub> . . . . .	106
Abb. 36	RNase P RNA von <i>B. subtilis</i> mit verlängerter Helix P <sub>1</sub>	107
Abb. 37	RNase P RNA von <i>B. subtilis</i> in zirkulär permutierter Form . . . . .	107
Abb. 38	6S RNA von <i>A. aeolicus</i> . . . . .	108
Abb. 39	Ribozym GIR1 von <i>D. iridis</i> . . . . .	108

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tab. 1	Abkürzungen und Einheiten . . . . .	3
Tab. 2	Zusammensetzung prokaryontischer und eukaryonti- scher Ribosomen . . . . .	8
Tab. 3	Verwendete Medien . . . . .	20
Tab. 4	Plasmidpräparationen . . . . .	22
Tab. 5	Puffer für die Überexpression und Aufreinigung des MS2-GST-Fusionsproteins . . . . .	23
Tab. 6	Zusammensetzung der Coomassie-Reagenz . . . . .	24
Tab. 7	Puffer für Ribosomenpräparation . . . . .	25
Tab. 8	Puffer für Ribosomen aus <i>E. coli</i> . . . . .	26
Tab. 9	Gradienten-Puffer für Ribosomen aus <i>E. coli</i> . . . . .	27
Tab. 10	Puffer für die Aufreinigung mutierter Ribosomen . . .	28
Tab. 11	Puffer für Ribosomen aus <i>B. subtilis</i> . . . . .	29
Tab. 12	Gradienten-Puffer für Ribosomen aus <i>B. subtilis</i> . . . .	30
Tab. 13	Puffer für ribosomale Untereinheiten aus <i>B. subtilis</i> . . .	31
Tab. 14	Agarosegele . . . . .	33
Tab. 15	Polyacrylamidgele . . . . .	33
Tab. 16	Denaturierendes Polyacrylamid-Gel, 4% PAA. . . . .	34
Tab. 17	Natives Kompositgel . . . . .	34
Tab. 18	Puffer für natives Kompositgel . . . . .	35
Tab. 19	Nukleinsäuremengen je Extinktionseinheit . . . . .	36
Tab. 20	Standard-Protokoll für einen DNase I-Verdau . . . . .	40
Tab. 21	Kryo-elektronenmikroskopische Daten . . . . .	86
Tab. 22	Verteilung der Partikelbilder nach der ersten Sortierung	86
Tab. 23	Verteilung der Partikelbilder nach der zweiten Sortierung	88
Tab. 24	Verteilung der Partikelbilder nach der dritten Sortierung	89
Tab. 25	Bakterienstämme . . . . .	109
Tab. 26	Chemikalien . . . . .	112

<b>Tab. 27</b>	Klonierungsprimer . . . . .	113
<b>Tab. 28</b>	Interne Primer . . . . .	114
<b>Tab. 29</b>	Externe Primer . . . . .	115
<b>Tab. 30</b>	Enzyme . . . . .	115
<b>Tab. 31</b>	Geräte . . . . .	117
<b>Tab. 32</b>	Software . . . . .	117
<b>Tab. 33</b>	Expressionsstämme . . . . .	127

## ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

---

Å	Angstrom [0,1 nm]
A <sub>254</sub>	Absorption bei 254 nm
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorption bei 280 nm
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
aa-tRNA	aminoacylierte <i>transfer</i> RNA
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
<i>B. sub.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
c	Konzentration [mol/L]
CCD	engl. <i>charge-coupled device</i>
CTF	engl. <i>contrast transfer function</i>
d	Schichtdicke [mm]
<i>D. iridis</i>	<i>Didymium iridis</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
dYT-Medium	Vollmedium
e	Elektron
E	Extinktion
ε	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-G	Elongationsfaktor G
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
FA	Fusidinsäure
FEG	engl. <i>field emission gun</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung (9,81 m / s <sup>2</sup> )
FSC	engl. <i>fourier shell correlation</i>
GDP	Guanosin-5-Diphosphat
GDPNP	nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon

## 2 Abkürzungen und Einheiten

GTP	Guanosin-5-Triphosphat
GIR	Gruppe I Ribozym
h	Stunde(n)
HEG	engl. <i>homing endonuclease gene</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
k	kilo [1000]
K	Kelvin
keV	engl. <i>kiloelectron volt</i>
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
mRNA	<i>messengerRNA</i>
ncRNA	engl. <i>non-coding RNA</i>
nm	Nanometer
NT	Nukleotid(e)
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte/Extinktion bei 260 nm
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte/Extinktion bei 600 nm
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
P <sub>o</sub>	Pixelgrößer digitalisierter Bilder
P <sub>c</sub>	Pixelgröße des Scanners oder der Kamera
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
RBS	engl. <i>ribosomal binding site</i>
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RSR	engl. <i>ratchet-like subunit rearrangement</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
S	Svedberg-Einheit [ $10^{-13}$ s]
s	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
u	Unit(s) (Einheit für Enzymaktivität)
V	Volumen; Primärvergrößerung des Mikroskops
vol %	Volumenprozent
v / v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
wt	Wildtyp
w / v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

**Tab. 1:** Abkürzungen und Einheiten



## EINLEITUNG

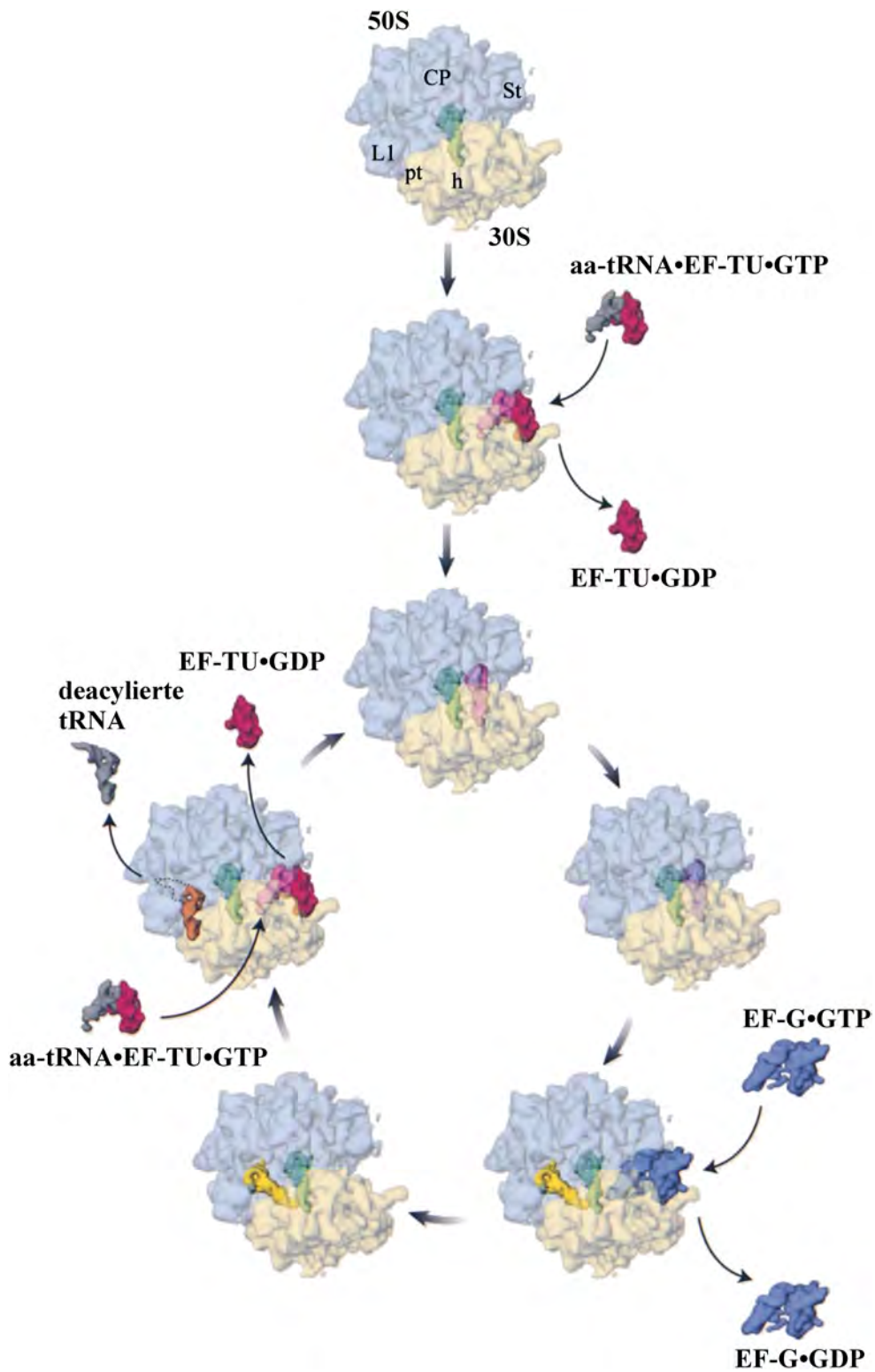
---

### 2.1 Das Ribosom

Ein zentraler Prozess jeglicher Zellphysiologie ist die Ribosom-vermittelte Proteinbiosynthese (Translation). Ribosomen sind makromolekulare Maschinen bestehend aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, die in der Grundstruktur ihrer eukaryontischen und prokaryontischen Form weitgehend übereinstimmen. Evolutionäre Unterschiede zeigen sich aber vor allem im peripheren Bereich der Struktur, da die eukaryontischen Proteine trotz einer Homologie zu den prokaryontischen zusätzliche Domänen aufweisen. Die ribosomale RNA eukaryontischer Ribosomen ist länger und enthält Expansionssequenzen, also zusätzliche Sequenzen im Vergleich mit der rRNA der Prokaryonten. Die 5,8S rRNA der Eukaryonten weist eine Homologie zum 5'-Ende der 23S rRNA auf und ist basengepaart mit der 28S rRNA. Die genaue Zusammensetzung beider Ribosomen-Typen ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Translation läuft im eukaryontischen und im prokaryontischen System nach dem gleichen Schema ab (Abbildung 1) und übersetzt die genetische Information in Form einer *messengerRNA* (mRNA) in eine Aminosäurekette (Polypeptid). Dabei werden Aminosäuren (AS) von *transferRNA*(tRNA)-Molekülen zum Ribosom transportiert und entsprechend der vorgegebenen mRNA-Nukleotidsequenz in die naszierende AS-Kette eingebaut. In der Nukleotidsequenz bilden Gruppen von drei RNA-Bausteinen jeweils ein Codon, das für die Bindung einer tRNA bzw. dem Einbau einer AS kodiert. Auf dem Ribosom werden drei tRNA-Bindestellen unterschieden: A- (*acceptor*), P- (*peptidyl*) und E-Stelle (*exit*). Der komplexe Vorgang der Translation unterteilt sich in vier Phasen:

1. Initiation
2. Elongation
3. Termination
4. Recycling



**Abb. 1:** Schema der Translation in Prokaryoten.

Die große Untereinheit ist blau und die kleine Untereinheit gelb dargestellt. Indiziert sind die zentrale Protuberanz (CP), der L7/L12-stalk (St) und der L1-stalk (L1) auf der 50S Untereinheit, der Kopf (h) und die Plattform (pt) der 30S Untereinheit. Die tRNAs der drei Bindungsstellen sind farbig markiert: A-Stelle (pink), P-Stelle (grün), E-Stelle (gelb).  $aa-tRNA \cdot EF-Tu \cdot GTP$ : ternärer Komplex aus aminoacylierter tRNA, EF-Tu und GTP.  $EF-Tu \cdot GDP$ : binärer Komplex aus EF-Tu und GDP.  $EF-G \cdot GTP$ : binärer Komplex aus EF-G und GTP.  $EF-G \cdot GDP$ : binärer Komplex aus EF-G und GDP. Zeichnung adaptiert nach [3]



Die Elongationsphase ist ein sich zyklisch wiederholender Vorgang, der mit jedem Zyklus zu einer Verlängerung der naszierenden Peptidkette um eine Aminosäure führt.

Zu Beginn eines solchen Zyklus wird die naszierende Peptidkette durch eine tRNA (*peptidyl*-tRNA) in der ribosomalen P-Stelle getragen, während in der freien A-Stelle ein mRNA-Codon präsentiert wird. In die vakante A-Stelle kann nun ein ternärer Komplex binden, der aus einer aminoacylierten tRNA (aa-tRNA), einem Elongationsfaktor (EF-Tu bei den Prokaryonten, eEF<sub>1A</sub> bei den Eukaryonten) sowie dem Kofaktor GTP besteht. Bei passender Codon-Anticodon-Komplementarität wird über eine Konformationsänderung des Ribosoms die Hydrolyse des an EF-Tu gebundenen GTP-Moleküls stimuliert [44, 51, 52, 62]. Nach erfolgter GTP-Hydrolyse dissoziiert der binäre Komplex EF-Tu·GDP vom Ribosom und die aa-tRNA wird vollständig in die ribosomale A-Stelle eingepasst. In der anschließenden Peptidyltransferase-Reaktion wird die naszierende Peptid-Kette auf die in der A-Stelle gebundene aa-tRNA übertragen und somit die Kette um eine Aminosäure verlängert. Nach diesem Schritt befindet sich das Ribosom im prä-translokationalen Zustand (PRE-Zustand), mit einer *peptidyl*-tRNA in der A-Stelle und einer deacylierten-tRNA in der P-Stelle.

In der folgenden Translokation wird das Ribosom aus dem PRE-Zustand in den post-translokationalen Zustand (POST-Zustand) überführt. Dabei werden die *peptidyl*-tRNA und die deacylierte tRNA zusammen mit der gebundenen mRNA aus der A- und P-Stelle in die P- und E-Stelle transloziert. Die Translokationsreaktion wird von einem weiteren Elongationsfaktor (EF-G bei den Prokaryonten, eEF<sub>2</sub> bei den Eukaryonten) katalysiert und durch die Hydrolyse von GTP beschleunigt [49, 50]. Der Elongationsfaktor G ändert nach Bindung an das Ribosom und GTP-Hydrolyse seine Konformation [18, 39] und stabilisiert das Ribosom in einer verdrehten Konformation (siehe Abbildungen 2, 3, 4). Die 30S Untereinheit hat sich im Uhrzeigersinn gegen die große Untereinheit verdreht, was als *ratchet-like subunit rearrangement* (RSR) bezeichnet wird [16]. Ribosomale Komplexe mit einer deacylierten tRNA und EF-G zeigten zusätzlich zum RSR eine Verdrehung der Kopfdomäne der kleinen Untereinheit [12, 59].

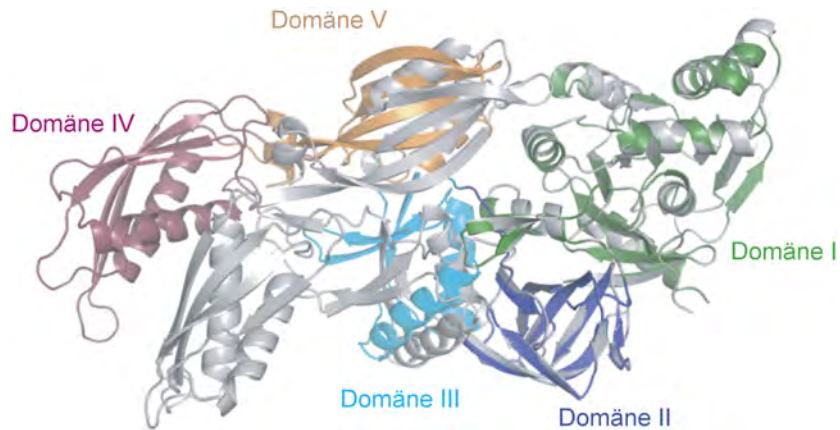
Das hochflexible Ribosom zeigt auch vor der Bindung von EF-G das RSR und wechselt zwischen verschiedenen Konformationen, die miteinander im Gleichgewicht stehen [38]. Die im PRE-Zustand gebundenen tRNAs fluktuieren zwischen klassischen (A/A und P/P) und hybriden (A/P und P/E) tRNA-Bindestellen (der erste bzw. zweite Buchstabe indiziert die Kontaktstellen auf Ebene der kleinen bzw. großen ribosomalen Untereinheit) [7, 36]. Des Weiteren konnte eine Bewegung des *L1-stalks* gezeigt werden, der den Ellbogen der P/E-tRNA bindet [2, 27].

Ribosom	Prokaryonten		Eukaryonten		
	70S		80S		
Untereinheit	30S	50S	40S	60S	
rRNAs	16S (1542 nt)	23S (2904 nt)	18S (1874 nt)	28S (4718nt)	5,8S (160 nt)
		5S (120 nt)		5S (120 nt)	
Proteine	21	33	33	49	

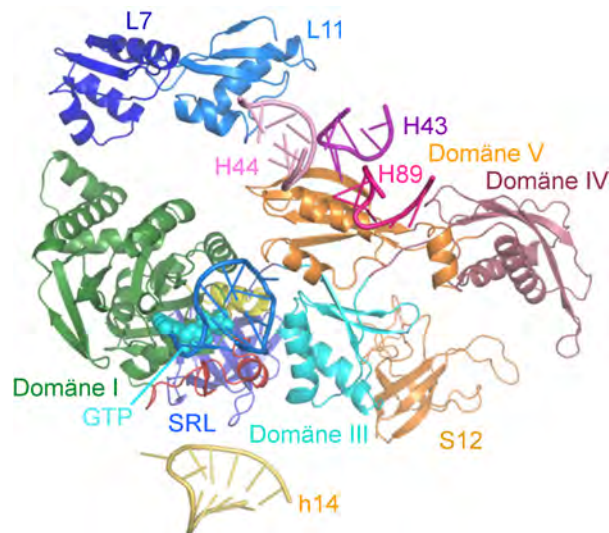
Tab. 2: Zusammensetzung prokaryontischer und eukaryontischer Ribosomen.

Das RSR, das auch in Abwesenheit von EF-G auftritt, ist für die Translokation essentiell [22], die zwar auch in Abwesenheit des Faktors auftritt, allerdings mit einer um vier Größenordnungen verringerten Geschwindigkeit [19].

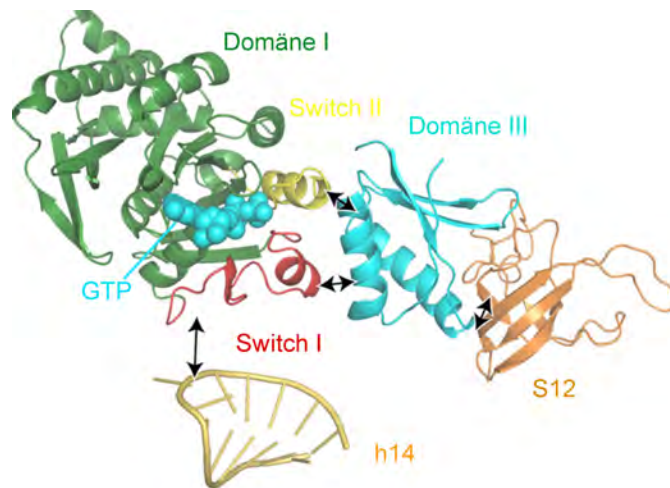
Trotz intensiver Studien in den letzten Jahren ist die exakte Funktion des Elongationsfaktors G neben der Stabilisierung des RSR größtenteils unbekannt und der Mechanismus, wie die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird ist noch nicht verstanden. Ebenso ist bisher unklar, wie die beobachteten Strukturänderungen im Ribosom (RSR und Bewegung der Kopfdomäne der kleinen Untereinheit) mit der gerichteten Bewegung der tRNAs durch das Ribosom in Zusammenhang stehen bzw. welche ribosomalen Konformationszustände welchen tRNA-Bindungsmodi zugeordnet werden können.



**Abb. 2:** Vergleich ribosomal gebundenen EF-Gs mit EF-G-GDP.  
 Die Überlagerung des ribosomal gebundenen EF-G-GMPPNP-Komplexes mit der Kristallstruktur von EF-G-GDP in grau [28] mit Domäne I als Bezugspunkt. Deutlich zu erkennen ist die unterschiedliche Position der Domäne IV. Zeichnung adaptiert nach [12].



**Abb. 3:** Interaktionen ribosomaler Elemente mit EF-G.  
 Interaktionen der Domänen I, III und IV von EF-G (GTP-Zustand) aus *T. thermophilus* mit dem Ribosom im rotierten Zustand. Domänen von EF-G sind indiziert. **SRL**: Sarcin-Ricin-Loop, **h14**: Helix 14 der 16S rRNA, **H43**, **H44**, **H89**: Helices 43,44 und 89 der 23S rRNA, **S12**: ribosomales Protein S12 der kleinen Untereinheit, **L7**, **L11**: ribosomale Proteine L7 und L11 der großen Untereinheit. Zeichnung adaptiert nach [12].



**Abb. 4:** Stabilisierung des RSR durch EF-G.

Interaktionen der Domäne III und der Switch-Regionen I und II stabilisieren das Ribosom im rotierten Zustand. Domänen von EF-G und ribosomale Elemente sind wie in Abbildung 3 bezeichnet. Zeichnung adaptiert nach [12].

## 2.2 Nicht-kodierende Ribonukleinsäuren

Ribonukleinsäuren (RNAs) sind Bestandteil der Ribosomen und erfüllen in Form von *messengerRNA* (mRNA) und *transferRNA* (tRNA) eine wichtige Funktion als Vermittler zwischen den DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Genen und ihren Produkten, den Proteinen.

Bis zu Beginn der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts waren keine weiteren Funktionen von RNA-Molekülen bekannt. Erst in den 80er und 90er Jahren wurden katalytisch aktive RNAs entdeckt, die in Abwesenheit von Proteinen ihre katalytische Aktivität entfalten können. Zu dieser Gruppe zählen z. B. die Introns der Gruppe I und II und die ubiquitär vorkommende RNase P. Die prokaryontische RNase P besteht aus einer großen RNA-Untereinheit (~400 Nukleotide) und einer Proteinuntereinheit, die für die katalytische Aktivität *in vivo* essentiell ist. Die RNase P RNA zeigt *in vitro* unter Hochsalzbedingungen katalytische Aktivität in Abwesenheit des Proteins. Die eukaryontische RNase P enthält ebenfalls eine RNA-Untereinheit, jedoch bis zu 10 Proteinuntereinheiten.

Zu Beginn des neuen Jahrtausends wurden zunehmend neue nicht-kodierende RNAs (engl. *non-coding RNAs*, ncRNAs) identifiziert, unter anderem *riboswitches*, die mittels unterschiedlicher Konformationen die Aktivität des stromabwärts gelegenen Gens regulieren können. Dadurch können sich Bakterien an unterschiedliche Umweltbedingungen anpassen. *Riboswitches* bestehen häufig aus zwei Domänen, einer Aptamer-Domäne und einer Expressionsplattform. Die Aptamer-Region bindet dabei einen Liganden,

der die Konformationsänderung in der Expressionsplattform bewirkt [33]. Neben diesen ligandenabhängigen *riboswitches* gibt es auch solche, die ihre Konformation temperaturabhängig ändern (RNA Thermometer, [40]).

In Bakterien sind zudem kleine (< 100 Nt) *antisense* ncRNAs weit verbreitet, die häufig mit dem 5'-UTR (= 5'-*untranslated region*) spezifischer mRNAs basenpaaren und auf diese Weise die ribosomale Bindungsstelle (engl. *ribosomal binding site*, RBS) blockieren und dadurch die Expression des jeweiligen Gens reprimieren [9]. Zu den proteinbindenden regulatorischen Ribonukleinsäuren zählt die bakterielle 6S RNA, die in der stationären Phase, also bei Nährstoffmangel, an die *housekeeping* RNA-Polymerase bindet und so die Transkription an zahlreichen DNA-Promotoren unterdrückt.

Das in dem Schleimpilz *Didymium iridis* gefundene Ribozym GIR<sub>1</sub> zählt zu den Gruppe I-ähnlichen Introns und wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

### 2.3 Das Ribozym GIR<sub>1</sub>

Der Schleimpilz *Didymium iridis* lebt als Parasit auf totem organischen Material oder anderen Organismen, die dadurch zerstört werden. Eine Besonderheit des Schleimpilzes besteht darin, dass die rDNA als lineares extrachromosomales Molekül vorliegt. Das Gen für die RNA der kleinen ribosomalen Untereinheit wird von einem ~1,4 kb großen *twin-ribozyme intron* (kurz: *twintron*) nach dem Uracil-Rest 956 unterbrochen [15].

Das *twintron* besteht aus einem Intron der Gruppe I, einem der Gruppe I ähnlichen Intron und der mRNA einer Homing Endonuklease (engl. *homing endonuclease gene*, HEG), die wiederum ein kleines Intron mit einer Größe von 51 Nukleotiden trägt. Das Intron der Gruppe I wird als GIR<sub>2</sub> bezeichnet und das der Gruppe I ähnliche Intron als GIR<sub>1</sub>. Dabei steht die Abkürzung GIR für Gruppe I Ribozym (engl. *group I ribozyme*). Die Nummerierung der beiden Introns ergibt sich aus der Reihenfolge, in der diese transkribiert werden. Direkt im Anschluss an GIR<sub>1</sub> ist der *open reading frame* (ORF) der Homing Endonuklease kodiert, und beide werden 5' und 3' von Sequenzen des Ribozyms GIR<sub>2</sub> eingerahmt. Als Folge werden bei der Transkription durch die RNA-Polymerase I zunächst der 5'-Bereich von GIR<sub>2</sub>, dann GIR<sub>1</sub>, der ORF und schließlich der 3'-Bereich von GIR<sub>2</sub> synthetisiert. Der allgemeine Aufbau des *twintrons* ist in Abbildung 5 gezeigt.

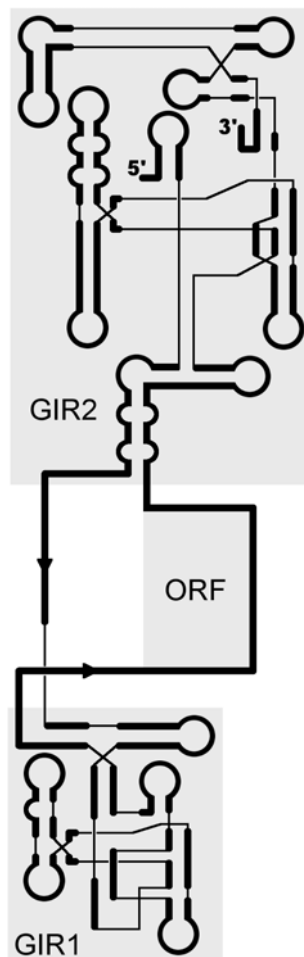
Das Ribozym GIR<sub>2</sub> agiert als konventionelles Intron der Gruppe I und ist zuständig für das Spleißen und Zirkularisieren des Introns und die Ligation beider Exons. Das Ribozym GIR<sub>1</sub> spaltet Intron-intern und ist für die Reifung der mRNA zuständig. Dabei kann GIR<sub>1</sub> verschiedene Reaktionen katalysieren.

1. Die natürliche Reaktion wird als *branching reaction* bezeichnet (siehe Abbildung 6). Bei dieser Reaktion greift die 2'-Hydroxygruppe des Uracils an Position 232 die Phosphorsäurediesterbindung zwi-

schen Guanin-229 und Cytosin-230 (engl. *internal processing site*, IPS) als Nukleophil an. Als Folge dieser Reaktion entsteht ein Strangbruch mit einer 3'-Hydroxygruppe an Guanin-229 und einer nur drei Nukleotide umfassenden, lassoartigen Struktur (engl. *tiny lariat*) am neugebildeten 5'-Ende. Die lassoartige Struktur entsteht durch eine 2',5'-Phosphorsäurediesterbindung zwischen Cytosin-230 und Uracil-232. Diese natürlicherweise stattfindende Reaktion ist *in vitro* vollständig reversibel. Die Rückreaktion, bei der die neugebildete 3'-Hydroxygruppe als Nukleophil agiert, wird als Ligation bezeichnet.

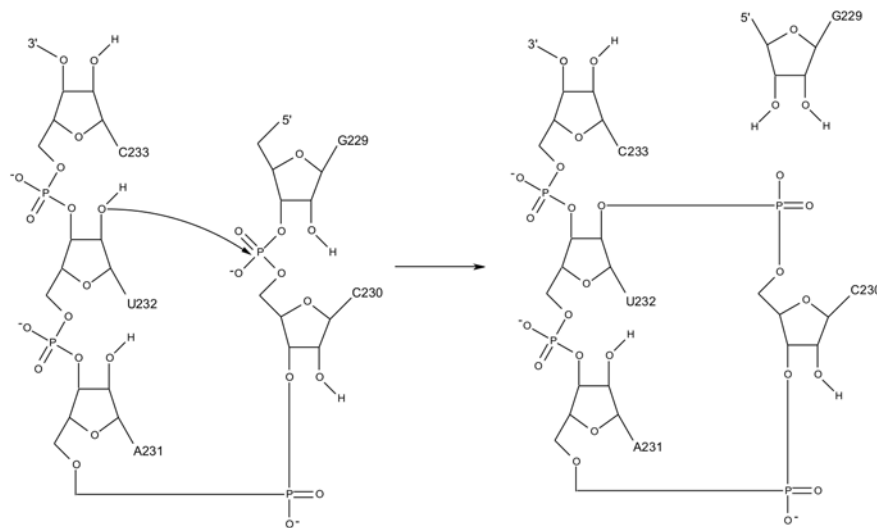
- Die von GIR<sub>1</sub> nur *in vitro* katalysierte Hydrolyse zwischen Guanin-229 und Cytosin-230 ist komplett irreversibel.

Die kodierte Homing Endonuklease katalysiert die Rekombinationsereignisse auf DNA-Ebene, die zur Verbreitung des Introns führen.



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau des *twintrons* aus *D. iridis*.

Das Intron der Gruppe I (GIR<sub>2</sub>), das Gruppe-I-ähnliche Intron (GIR<sub>1</sub>) und der *open reading frame* ORF sind indiziert. Zeichnung adaptiert nach [25].



**Abb. 6:** Die *branching reaction*.

Der nukleophile Angriff der 2'-Hydroxygruppe des Uracil-Restes 232 (Pfeil) führt zum Strangbruch zwischen Guanin-229 und Cytosin-230. Dadurch bildet sich die lassoartige Struktur der Reste 230 bis 232 über eine 2',5'-Phosphorsäurediesterbindung aus. Zeichnung adaptiert nach [42].

Die Prozessierung des gesamten *twintrons* kann auf drei verschiedene Arten erfolgen.

- Die erste mögliche Reaktionsabfolge umfasst
  - a) die Spaltung der 5'-Spleißstelle (Entstehung des 5'-Endes von GIR2),
  - b) Spaltung der 3'-Spleißstelle und Exonligation (Freisetzung des 3'-Endes von GIR2),
  - c) die Prozessierung des Introns, um eine funktionelle mRNA zu erhalten (*branching reaction* durch GIR1).

Sowohl das Exon als auch das Intron profitieren von dieser Reihenfolge der Ereignisse, die während der Wachstumsphase vorherrschend ist.

- Die zweite Prozessierungsmöglichkeit führt zu einem zirkulären Intron und nicht ligierten Exons. Dabei wird
  - a) die 3'-Spleißstelle durch GIR2 hydrolysiert,
  - b) die 5'-Spleißstelle von der entstandenen 3'-Hydroxygruppe angegriffen und
  - c) es entsteht ein zirkuläres Intron und zwei Exons mit linearem 3'- bzw. 5'-Ende.

Das Ribozym GIR1 ist in dem zirkulären *twintron* nicht aktiv, das über diesen Prozessierungsweg verbreitet werden könnte.

- Als dritte Möglichkeit ergibt sich die Akkumulation der rRNA als Vorläufermolekül mit einer Größe von 7,5 kb. Dabei maturiert GIR<sub>1</sub> die mRNA über die beschriebene *branching reaction* ohne vorherige Aktivität von GIR<sub>2</sub>. Diese Art der Intron-Prozessierung, die zur Expression der Homing Endonuklease führt, jedoch nicht zur Bildung funktioneller rRNA, könnte der Regulation der Ribosomen-Synthese in Hungerzeiten dienen.

Die verschiedenen Reaktionswege legen nahe, dass die Aktivität der beiden Ribozyme zellulär reguliert wird.

Introns der Gruppe I falten sich während der Transkription in ihre aktive Form. Bei der Transkription des *twintrons* entsteht wie oben beschrieben zunächst das 5'-Ende von GIR<sub>2</sub>, dann GIR<sub>1</sub> und der ORF der Homing Endonuklease und schließlich das 3'-Ende von GIR<sub>2</sub>. Wäre GIR<sub>1</sub> direkt nach seiner Transkription ein aktives Ribozym, so würde die mRNA maturiert werden, bevor das *twintron* aus der rRNA gespleißt wurde. Die Folge könnte eine Inaktivierung des Spleißvorgangs sein, da möglicherweise die für die Faltung der GIR<sub>2</sub>-Domäne notwendige räumliche Nähe der 5'- und 3'-terminalen Bereiche des *twintrons* (siehe Abbildung 5) verloren gehen würde. Die Ausbildung der Haarnadelstruktur HEG P<sub>1</sub> stromabwärts der IPS (siehe Abbildung 7) verhindert die Aktivität des Ribozyms GIR<sub>1</sub> während der Transkription. Nach dem Vorgang des Spleißens durch GIR<sub>2</sub> lagert sich das Ribozym GIR<sub>1</sub> in seine aktive Form um und die *branching reaction* läuft wie in Abbildung 6 gezeigt ab. Im Anschluss an diese Reaktion bildet sich die Haarnadelstruktur in der 5'-UTR der mRNA wieder aus und verhindert so die Umkehrung der Reaktion. Die *in vitro* gezeigte Ligationsreaktion kann dadurch *in vivo* nicht ablaufen.

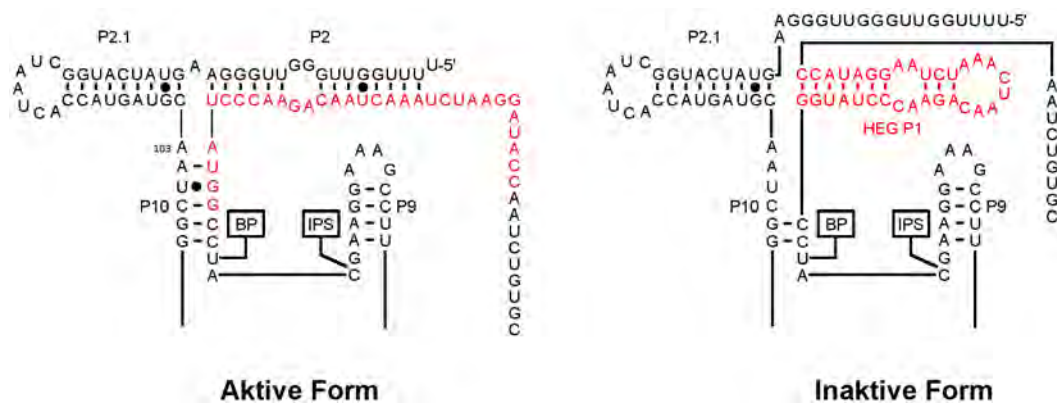
Die mRNAs proteinkodierender Gene werden von der RNA-Polymerase II synthetisiert. Das *twintron* wird jedoch von der RNA-Polymerase I transkribiert. Die durch GIR<sub>1</sub> am 5'-Ende maturierte mRNA muss also noch weiter verändert werden, um als Templat für die Proteinbiosynthese zu dienen. Der vollständige Ablauf am *twintron* lässt sich folgendermaßen beschreiben:

1. Spleißen des Introns durch GIR<sub>2</sub>.
2. Maturierung des 5'-Endes der mRNA durch Ausbildung der lassoartigen Struktur (*branching reaction* durch GIR<sub>1</sub>). Diese ersetzt die m<sup>7</sup>G-Kappe der mRNA.
3. Das 3'-Ende wird durch eine noch nicht charakterisierte Reaktion maturiert.
4. Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes.
5. Spleißen des kleinen Introns innerhalb der mRNA. Dieser noch nicht näher beschriebene Vorgang wird aufgrund der konventionellen Spleiß-



signale wahrscheinlich durch die zelluläre Spleißungsmaschinerie bewerkstelligt [41].

Die 5'-Kappen-analoge Struktur, die Polyadenylierung und das Spleißsignal innerhalb des ORF für die Homing Endonuklease ermöglichen die Einschleusung dieser durch RNA-Polymerase I transkribierten mRNA in zelluläre Transportwege, die zur Proteinbiosynthese im Cytoplasma führen. Der Nachweis der maturierten mRNA im Cytoplasma und die Assoziation an Ribosomen sind in der Literatur beschrieben [58], das Protein lässt sich jedoch nur indirekt über einen Aktivitätsassay nachweisen [26].



**Abb. 7:** Die Konformationen des Ribozyms GIR1.

Die katalytisch aktive und inaktive Konformation des Ribozyms GIR1. Die Haarnadelstruktur (HEG P<sub>1</sub>) ist Teil der 5'-UTR und verhindert die Aktivität vor dem Spleißvorgang und nach der *branching reaction*. Der *branch point* (BP) und die *internal processing site* (IPS) sind indiziert.

Basierend auf biochemischen Daten und der großen Ähnlichkeit des Ribozyms GIR1 mit Introns der Gruppe I ist ein Strukturmodell für GIR1 entwickelt worden, das die Besonderheiten von GIR1 berücksichtigt [6]. Die Hauptunterschiede zu den Introns der Gruppe I sind das Fehlen einer Helix P<sub>1</sub>, ein neuer Pseudoknoten in Helix P<sub>15</sub> und die Ausbildung der lassoartigen Struktur durch die *branching reaction* (Abbildung 6). Das gegenwärtige Modell zeigt drei helikale Strukturen, von denen die P<sub>3</sub>-P<sub>9</sub>-Domäne (Helices P<sub>3</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>8</sub> und P<sub>9</sub>) und die P<sub>10</sub>-P<sub>15</sub>-Domäne (Helices P<sub>10</sub> und P<sub>15</sub>) parallel zueinander verlaufen. Die P<sub>4</sub>-P<sub>6</sub>-Domäne (Helices P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub> und P<sub>6</sub>) verläuft leicht gekippt zu den anderen helikalen Domänen. Die Helices P<sub>2</sub> und P<sub>2.1</sub> sind in dem Modell nicht berücksichtigt. Die vorgeschlagene Struktur zeigt große Ähnlichkeit zu der Kristallstruktur des *Azoarcus* sp. tRNA<sup>Ile</sup> Introns [1], die der Konformation des Introns beim zweiten Schritt der Spleißung entspricht. Inwieweit dieses Modell der Wirklichkeit entspricht sollte im Rahmen dieser Arbeit mittels Kryo-Elektronenmikroskopie geklärt werden.



## ZIEL DES PROJEKTS

---

### 3.1 Mechanismus der Translokationsreaktion

Das Ribosom durchläuft während der Proteinbiosynthese unterschiedliche Konformationszustände. Die genaue Beschreibung dieser Konformationen hilft dem Verständnis dieses zentralen Prozesses jeglichen Lebens. Wird ein Ribosom während der Proteinbiosynthese während eines bestimmten Schrittes angehalten und lassen sich diese Ribosomen von anderen Ribosomen abtrennen, so können diese einer kryo-elektronenmikroskopischen Analyse zugeführt werden. Viele Prozesse der Proteinbiosynthese werden durch Proteinkofaktoren ermöglicht, deren Aktivität durch die Hydrolyse von Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) reguliert wird. Der von diesen Faktoren katalysierte Prozess lässt sich anhalten oder zumindest verzögern, indem einem *in vitro* translatierenden Ribosom statt des GTPs das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GDPNP zur Verfügung gestellt wird. Der Sauerstoff-Ester zwischen der zweiten und der dritten Phosphat-Gruppe ist bei dieser Verbindung durch einen schwer hydrolysierbaren Stickstoff-Ester ersetzt. Die von dem Faktor katalysierte Reaktion wird in Gegenwart von GDPNP extrem verlangsamt, infolgedessen der Faktor im ribosomengebundenen Zustand arretiert und somit die Proteinbiosynthese unterbrochen wird. Eine weitere Möglichkeit, das Ribosom während der Translationsreaktion anzuhalten, besteht darin, den Faktor mithilfe eines Antibiotikums am Ribosom festzuhalten. Die so präparierten Ribosomen-Komplexe können aufgereinigt und einer kryo-elektronenmikroskopischen Analyse zugeführt werden. So wurde zum Beispiel die Struktur eines ribosomalen Komplexes, bestehend aus 70S Ribosomen von *Thermus thermophilus*, dem Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) und dem Antibiotikum Kirromycin, kryoelektronenmikroskopisch gelöst [52]. Mithilfe des GDPNPs konnte ein Komplex aus 70S Ribosomen von *Thermus thermophilus* und dem Elongationsfaktor G kryoelektronenmikroskopisch strukturell aufgeklärt werden [12]. Der Elongationsfaktor G kann verschiedene Konformationen annehmen. So liegt er vor der Hydrolyse des gebundenen Kofaktors GTP in einer anderen Konformation vor als nach der Hydrolyse. Die Domänen III, IV und V ändern ihre Position gegenüber den Domänen I und II und es wird der GTP-Zustand des Faktors vom GDP-Zustand unterschieden. Im beschriebenen Komplex [12] liegt der Faktor im GTP-Zustand vor. Zur Beschreibung der Unterschiede zum GDP-Zustand wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Komplex von 70S Ribosomen aus *T. thermophilus* mit dem Elongationsfaktor G und GTP in Gegenwart des Antibiotikums Fusidinsäure aus dem Pilz *Fu-*

*sodium coccineum* gebildet. Das Antibiotikum ermöglicht zwar die Hydrolyse des GTPs, verhindert aber die Dissoziation des Faktors vom Ribosom. Dieser Komplex wurde im Rahmen dieser Arbeit kryo-elektronenmikroskopisch analysiert.

### 3.2 Strukturaufklärung funktioneller RNAs

Die als nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) bezeichneten Ribonukleinsäuren erfüllen mannigfaltige Aufgaben (siehe Kapitel 2.2 und 2.3). Die Strukturaufklärung von ncRNAs mittlerer Größe (~ 100-400 Nt) erweist sich nicht zuletzt wegen ihrer konformativen Flexibilität häufig als schwierig. Die Kristallisation führt oft zu Artefakten in Form von Dimeren oder erst gar nicht zur Kristallbildung. Die Visualisierung mittels Elektronenmikroskopie erweist sich im Größenbereich von ncRNAs (~ 30-150 kDa) ebenfalls als schwierig, da Moleküle erst ab einem Molekulargewicht von ~400 kDa sicher identifizierbar sind. Gründe dafür sind, dass

1. kleinere RNAs oft in Gegenwart von Magnesiumionen, die für die RNA-Faltung benötigt werden, zur Aggregation neigen und
2. vor allem wenig strukturelle *Referenzpunkte* besitzen, anhand derer ihre Orientierung identifiziert und sortiert werden kann.

Die Verankerung der zu analysierenden ncRNA in einem größeren und rigiderem Molekül bekannter Struktur stellt eine interessante Strategie dar, um ncRNA einer kryo-elektronenmikroskopischen Strukturaufklärung zugänglich zu machen. Die kovalente Verknüpfung einer tRNA mit Helix 98 der 23S rRNA von *E. coli* und anschließende Visualisierung der für eine tRNA typischen Form (*L-shape*) mittels Kryo-Elektronenmikroskopie ermöglichte 1999 die genaue Lokalisation der ribosomalen Helix [54]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene ncRNAs (siehe Abbildungen 34 bis 39 im Anhang) mit unterschiedlichen Helices der 23S rRNA von *E. coli* kovalent verknüpft, um die Struktur dieser Ribonukleinsäuren aufzuklären. Tabelle 33 im Anhang gibt eine Übersicht über alle klonierten Stämme. Das 70S Ribosom von *E. coli* diente dabei als Träger (Plattform) für die jeweilige ncRNA.

## MATERIALIEN UND METHODEN

---

### 4.1 Synthetische DNA-Oligonukleotide

#### 4.1.1 *Primer für PCR und Sequenzierungen*

Die für die Polymerasekettenreaktion (Kapitel 4.7.3) verwendeten Primer lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen wurden Primer für präparative PCRs benötigt, deren Produkte anschließend aufgereinigt (Kapitel 4.6.4) und für Klonierungen eingesetzt wurden (Klonierungsprimer, siehe Tabelle 27 im Anhang). Diese Primer dienten vor allem dazu, Mutationen und spezifische Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in DNA-Sequenzen einzuführen und wurden auch für qualitative PCRs zum Nachweis von Mutationen in der 23S rRNA benötigt (interner Primer).

Die für die 23S rRNA spezifischen Primer (Analytische Primer, siehe Tabelle 29 im Anhang) dienten dem Nachweis von Insertionen in der ribosomalen RNA (externe Primer) und wurden für Sequenzierungen eingesetzt.

### 4.2 Bakterielle Zellkultur

#### 4.2.1 *Kultivierung in Flüssigmedium*

Die Anzucht von *E. coli* und *B. subtilis* Zellen für Plasmid- und Ribosomenpräparationen erfolgte in autoklavierten Nährmedien (siehe Tabelle 3), die im Bedarfsfall unmittelbar vor Gebrauch mit dem zur Selektion benötigten Antibiotikum versetzt wurden.

#### 4.2.2 *Kultivierung auf Agarplatten*

Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren je Liter 12 g Agar hinzugefügt. Diese Art der Kultivierung diente der Gewinnung von Einzelkolonien. Dazu wurde mit einem Drigalski-Spatel eine Transformationsreaktion oder wenige Mikroliter einer Flüssigkultur, bzw. mit einer Impföse etwas Material einer Tiefkühlkultur (Glycerol-Stock), auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei der benötigten Temperatur bis ausreichend große Einzelklone gewachsen waren.

Name	Substanz	Menge
<b>dYT-Medium</b>	Trypton	16,0 g
	Hefeextrakt	10,0 g
	Natriumchlorid	5,0 g
	RNase-freies Wasser	ad 1 L
<b>LB-Medium</b>	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	Natriumchlorid	10,0 g
	RNase-freies Wasser	ad 1 L

**Tab. 3:** Verwendete Medien

Der pH-Wert des LB-Mediums wurde vor dem Autoklavieren mit Natronlauge [1 M] auf 7,5 eingestellt.

#### 4.2.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Voraussetzung für die Aufnahme größerer Moleküle wie Plasmide durch Bakterien ist die entsprechende Permeabilität der Zellmembran.

In einem 1-Liter-Erlenmeyerkolben wurden 500 mL LB-Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C oder 30°C (Stämme, die bereits das Plasmid pCl857 tragen) und 180 rpm im Warmluftschüttler inkubiert. Die Zellen wurden bei einer Wachstumsdichte von  $OD_{600} \approx 0,6$  geerntet. Die Kultur wurde zunächst 10 min in Eiswasser gekühlt und dann 10 min bei 2700 g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 100,0 mL eiskalter Calciumchlorid-Lösung [100 mM  $CaCl_2$ ] resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Das durch die anschließende Zentrifugation (10 min bei 2700 g und 4°C) erhaltene Zellpellet wurde in 10,0 mL Calciumchlorid-Lösung [75 mM  $CaCl_2$ , 25% Glycerin] resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100,0 bis 200,0  $\mu$ L aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 4.2.4 Transformation

Das Einschleusen autonom replizierender Plasmide in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Die dafür präparierten *E. coli* Zellen (siehe Kapitel 4.2.3) können nur die zirkulär geschlossene Form der Plasmide replizieren. Als Selektionsmarker dienen plasmidal kodierte Antibiotikaresistenzen.

Zur Durchführung einer Transformation wurden kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. 40,0  $\mu$ L kompetente Zellen wurden mit 100 ng Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und anschlie-

ßend 45 s auf 30°C erwärmt, um dann noch einmal 2 min auf Eis abgekühlt zu werden. Nach Zugabe von 500,0 µL LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurde der Ansatz 60 min bei 30°C unter starkem Schütteln inkubiert. Aliquots dieser Kultur wurden dann auf Agarplatten mit Selektionsmarker ausgestrichen und im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Die beschriebene Hitzeschock-Transformation und die Inkubation wurden bei maximal 30°C durchgeführt, um die Expression plasmidaler Ribosomen zu verhindern.

#### 4.2.5 Konservierung von Zellen

Zur Herstellung der mehrere Jahre haltbaren glycerol-haltigen Kulturen wurden 700 µL Zellkultur mit 300 µL autoklaviertem Glycerol (50%) gemischt und bei -80°C zur Lagerung eingefroren.

### 4.3 Plasmidpräparation

Kulturen für Plasmidpräparationen wurden in LB-Medium angezogen. Dabei erfolgte das Animpfen der Übernachtskulturen (3 mL bis 20 mL) direkt aus einem Glycerol Stock oder mit einer Einzelkolonie des Stammes. Die auf diese Weise inokulierten Kulturen wurden bei 37°C oder bei 30°C (Stämme mit hitzeinduzierbarem Promotor) unter starkem Schütteln (mindestens 180 rpm) über Nacht im Warmluftschüttler inkubiert. Die so erhaltenen Kulturen wurden für kleine analytische Plasmidpräparationen direkt geerntet (1 Minute bei 16100 g und 4°C) oder für größere präparative Plasmidpräparationen mit frischem LB-Medium verdünnt (1:100 bis 1:500) und weiter inkubiert. Bei Selektion des Stammes mit Ampicillin wurde darauf geachtet, dass die Zellen vor der Verdünnung vom alten Medium abgetrennt wurden, um die sezernierte  $\beta$ -Lactamase zu entfernen. Nach 12 bis 16 h Inkubation wurden die Zellen je nach Größe der Kultur in Rotoren des Typs TA-10.250 oder JLA-9.1000 geerntet (20 min bei 9100 g und 4°C). Die Plasmidpräparationen wurden mit Anionentauschersäulen (modifiziertes Silicagel) durchgeführt, wobei die unterschiedlichen Affinitäten chromosomaler und plasmidaler DNA ausgenutzt werden. Die Aufreinigung richtet sich nach den Herstellerprotokollen. Die Einteilung der Plasmidpräparationen ist Tabelle 4 zu entnehmen.

#### 4.4 Überexpression und Aufreinigung des MS2-GST-Fusionsproteins

Das MS2-GST-Fusionsprotein wurde für die Aufreinigung mutierter Ribosomen über den MS2 tag in Helix 98 (siehe Kapitel 4.5.4) benötigt. Überexpression und Aufreinigung richteten sich nach dem Protokoll der Referenz [64]. Der Stamm *BL21/pGST-MS2* wurde in LB-Medium in Gegenwart von Ampicillin bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer  $OD_{600}$  von ~0,6

Kulturvolumen	Name	Hersteller
3 bis 6 mL	Mini-Prep	Fermentas
bis 50 mL	Midi-Prep	Qiagen
300 bis 500 mL	Maxi-Prep	Qiagen
1 bis 2 L	Giga-Prep	Qiagen

Tab. 4: Plasmidpräparationen

inkubiert. Die Kultur wurde dann im Wasserbad auf 20°C abgekühlt und die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM. Die Inkubation unter Expressionsbedingungen erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur (~22°C). Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation (10 min bei 4000 g) geerntet. Das Pellet wurde in 25 mL Lysis-Puffer I je Liter Kultur resuspendiert, die Zellen bei Raumtemperatur in 5 min bei 4000 g erneut pelletiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zellpellets wurden vor ihrem Aufschluss innerhalb von 10 min im Wasserbad aufgetaut und in 25 mL Lysis-Puffer II je Liter Kultur resuspendiert. Nach Zugabe von 125 µL DNase I [2u/µL] (Ambion) je Liter Kultur wurde die Zellsuspension 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde durch wiederholte Zentrifugation bei 9600 g und 25°C geklärt. Die vollständige Klärung des Überstandes erfolgte mittels Zentrifugation bei 25000 rpm im MLA-80-Rotor bei 25°C für 3 min und anschließende Filtration durch Filter mit der Porengröße 1,2 µm und 0,45 µm.

Glutathion-Sepharose (1 x PBS-Bedingungen) und das Lysat wurden gemischt und 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose mitsamt dem Lysat in eine Säule (PD-10, GE Healthcare) überführt und der Durchfluss gesammelt. Die Sepharose wurde mit 100 mL 1 x PBS je Liter Kultur gewaschen. Das Fusionsprotein wurde dann mit 20 mL Elutionspuffer je Liter Kultur eluiert. Das Eluat wurde dreimal gegen Puffer L (1xPBS mit 20 % Glycerol) dialysiert und die Konzentration des Proteins nach Bradford bestimmt. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Name	Substanz	Konzentration
Elutionspuffer	Tris-HCl	50 mM, pH 8,0
	reduziertes Glutathion	10 mM

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*



Name	Substanz	Konzentration
<b>Lysis-Puffer I</b>	Tris-HCl	20 mM, pH 7,5
	KCl	150 mM
	Lysozym	1mg/mL
	Glycerol	5 %
	DTT	2 mM
<b>Lysis-Puffer II</b>	Tris-HCl	20 mM, pH 7,5
	BugBuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen)	1 x konzentriert
	Complete Protease Inhibitor, EDTA-free (Roche)	1 Tbl./50 mL
	KCl	150 mM
	Lysozym	1mg/mL
	Glycerol	5 %
	DTT	2 mM
	<b>1 x PBS</b>	Kaliumchlorid
Kalium- <i>di</i> -hydrogenphosphat		1,8 mM
Natriumchlorid		140 mM
<i>di</i> -Natrium-hydrogenphosphat		10 mM
<b>Puffer L</b>	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Kalium- <i>di</i> -hydrogenphosphat	1,8 mM
	Natriumchlorid	140 mM
	<i>di</i> -Natrium-hydrogenphosphat	10 mM
	Glycerol	20 %

**Tab. 5:** Puffer für die Überexpression und Aufreinigung des MS2-GST-Fusionsproteins

#### 4.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung nach Bradford basiert auf der Reaktion des Farbstoffs Coomassie-Blau mit basischen Aminosäuren. Das Absorptionsmaximum des Proteins verschiebt sich auf 595 nm und mit

Hilfe einer Kalibrierkurve für BSA (engl. *bovine serum albumin*) kann die Konzentration abgeschätzt werden.

Jeweils 100  $\mu\text{L}$  Proteinlösung der entsprechenden BSA-Konzentration oder der Probe werden mit 1 mL Coomassie-Reagenz (siehe Tabelle 6) versetzt und gemischt. Nach einer exakt zweiminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration der Probe kann anhand der Kalibrierkurve abgeschätzt werden. Die Konzentration der Probe sollte dabei im linearen Bereich der Kalibrierkurve liegen.

Substanz	Menge
20 mg Coomassie blue G [Serva Blau G]	20,0 mg
Ethanol [96%]	25,0 mL
o-Phosphorsäure [85 %]	50,0 mL
RNase-freies Wasser	ad 500,0 mL

**Tab. 6:** Zusammensetzung der Coomassie-Reagenz.

Das fertige Reagenz wurde nach der Filtration durch einen Faltenfilter bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

#### 4.5 Ribosomenpräparation

Kulturen für Ribosomenpräparationen wurden in dYT-Medium angezogen. Zunächst wurde eine Vorkultur (3 mL) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C (nativer Promotor (P<sub>1</sub>+P<sub>2</sub>) oder kein Plasmid) oder 30°C (hitzeinduzierbarer Promotor  $\lambda_{\text{PL}}$ ) unter starkem Schütteln im Warmluftschüttler inkubiert. Zweimaliges Verdünnen der Kultur mit frischem Medium auf OD<sub>600</sub>~0,01 und jeweiliges Wachstum bis zu einer OD<sub>600</sub>~1,0 ergab eine Wachstumskurve mit Sägezahnmuster, was zu einem gleichmäßigeren Wachstum der Zellen führte. Die so erhaltene Kultur wurde erneut mit frischem Medium auf OD<sub>600</sub>~0,01 verdünnt. Im Falle des nativen Promotors erfolgte die Inkubation bei 37°C unter starkem Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~0,8, so dass die Zellen für eine Ribosomenpräparation geerntet werden konnten. Wurden mutierte Ribosomen unter Kontrolle des hitzeinduzierbaren Promotors exprimiert, so erfolgte die Inkubation unter starkem Schütteln zunächst bei 30°C (Repressionsbedingungen). Nach Erreichen einer Wachstumsdichte von ~0,1 wurde die Inkubation bei 42°C (Expressionsbedingungen) bis zu einer Wachstumsdichte OD<sub>600</sub> von ~0,8 fortgesetzt. Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur 10 min unter Schütteln im Eisbad gekühlt. Mittels Zentrifugation bei 4000 g und 4°C für 10 min im TA-10.250 oder im JLA-9.1000 wurden die Zellen pelletiert. Das Pellet wurde in Lysispuffer resuspendiert (8,0 mL je Liter Kultur) und nach Zugabe von

120,0 µL Lysozym-Stammlösung je Liter Kultur bei -80°C eingefroren. Für eine Ribosomenpräparation aus *B. subtilis* wurde das Zellpellet direkt bei -80°C eingefroren.

Name	Substanz	Konzentration
<b>Lysis-Puffer</b>	Tris-HCl	20 mM, pH 8,2
	KCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	6 mM
	Sucrose	16 %
<b>Lysozym-Stammlösung</b>	Lysozym	50,0 mg/mL
	Tris-HCl	10 mM, pH 8,0

Tab. 7: Puffer für Ribosomenpräparation

#### 4.5.1 Präparation von Ribosomen aus *E.coli*

Die gefrorene Zellsuspension (siehe Kapitel 4.5) wurde langsam auf Eis aufgetaut. Der Zellaufschluss erfolgte durch einen dreifachen Gefrier-Tau-Zyklus (20 min bei -20°C / Auftauen auf Eis für 10 min). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation im TA-10.250 bei 9400 g und 4°C in 15 min abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend im TA-10.250 bei 10000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde im TLA-100.4 bei 28000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Die Konzentration des so erhaltenen S30-Lysats wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm bestimmt (siehe Kapitel 4.6.3). Anschließend wurden 3,0-mL Sucrose-Kissen in Ultra-Clear Centrifuge Tubes (14 x 95 mm; Beckmann) mit S30-Lysat überschichtet und im SW40Ti-Rotor bei 34000 rpm und 4°C für 20 h zentrifugiert. Das Pellet, das die "rohen" 70S Ribosomen (crude 70S = cr70S) enthält, wurde in 1 x Tico (siehe Tabelle 8) resuspendiert. Die Konzentration der Ribosomensuspension wurde auf Basis der Korrelation  $1 \text{ OD}_{260} = 24 \frac{\text{pmol}}{\text{mL}}$  bestimmt.

#### 4.5.2 Nicht-dissoziierender analytischer Gradient für Ribosomen aus *E. coli*

Die Intaktheit der Ribosomen wurde mittels eines analytischen Gradienten unter nicht-dissoziierenden Bedingungen überprüft. Dazu wurde 1 OD<sub>260</sub> cr70S (siehe Kapitel 4.5.1) auf einen Sucrose-Gradienten (5 mL, 10-30% Sucrose, 6 mM Mg<sup>2+</sup>, siehe Tabelle 8) aufgetragen und bei 44000 rpm und 4°C für 2 h im MLS-50-Rotor zentrifugiert. Die Gradienten wurden mit dem Gradient Master ip (BIOCOMP) gemischt (Programm: SW50:10-30%

(w/v) Sucrose; short: 0:48/86,5/22). Anschließendes Auspumpen im Piston Gradient Fractionator (Biocomp) mit gleichzeitiger Messung der Absorption bei 254 nm ( $A_{254}$ ) ergab das Gradientenprofil (siehe Abbildung 8).

Name	Substanz	Konzentration
Sucrose-Kissen	HEPES-KOH	20 mM, pH 7,6
	MgCl <sub>2</sub>	6 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	500 mM
	Sucrose	20,0 %
	β-Mercaptoethanol	5 mM
1 x Tico	HEPES-KOH	20 mM, pH 7,6
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	6 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	30 mM
	β-Mercaptoethanol	4 mM

Tab. 8: Puffer für Ribosomen aus *E. coli*

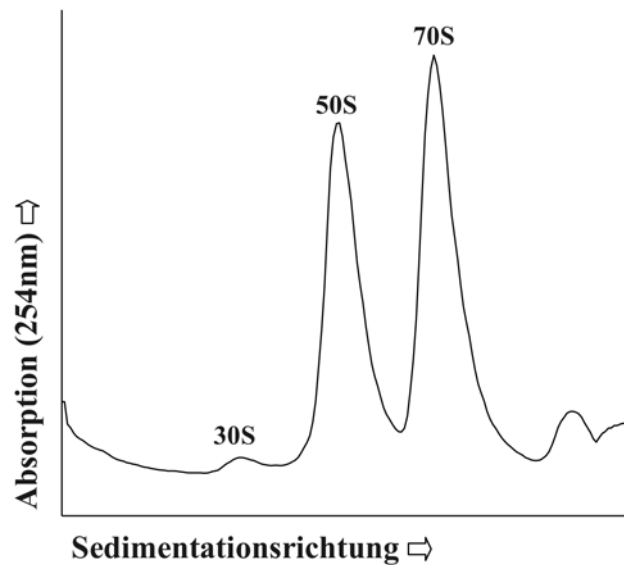


Abb. 8: Gradientenprofil der aus *E. coli* präparierten Ribosomen

#### 4.5.3 Präparation von Untereinheiten und 70S Ribosomen aus *E. coli*

Die Auftrennung der cr70S (siehe Kapitel 4.5.1) erfolgte mittels eines präparativen Gradienten unter nicht-dissozierenden Bedingungen (6 mM Mg<sup>2+</sup>, 10-30 % Sucrose). Der dazu benötigte Gradient (Ultra-Clear Centrifuge Tubes,

25 x 89 mm, Beckmann) wurde im Gradient Master ip (BIOCOMP) gemischt (Programm: SW28:10-30% (w/v) Sucrose; short:1:32/76,0/25). Die Zentrifugation erfolgte im SW28-Rotor bei 18000 rpm und 4°C für 18 h. Die Fraktionierung des Gradienten ermöglichte die Auftrennung in die Untereinheiten und 70S Ribosomen (siehe Abbildung 9), die anschließend jeweils im SW40Ti-Rotor bei 145000 g und 4°C in einer 20-stündigen Zentrifugation pelletiert wurden. Die Untereinheiten und die 70S Ribosomen wurden in 1 x Tico resuspendiert und die Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 4.5.1).

Name	Substanz	Konzentration
<b>10%ige Sucrose</b>	HEPES-KOH	20 mM, pH 7,6
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	6 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	30 mM
	Sucrose	10 %
	β-Mercaptoethanol	4 mM
<b>30%ige Sucrose</b>	HEPES-KOH	20 mM, pH 7,6
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	6 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	30 mM
	Sucrose	30 %
	β-Mercaptoethanol	4 mM

Tab. 9: Gradienten-Puffer für Ribosomen aus *E. coli*

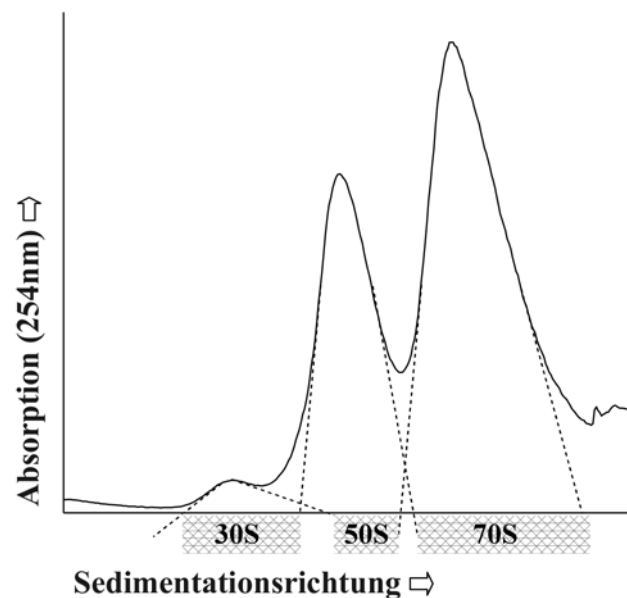


Abb. 9: Präparativer Gradient für Ribosomen aus *E. coli*

4.5.4 *Aufreinigung mutierter Ribosomen*

Mutierte Ribosomen, die neben der Insertion in Helix 9 den MS2 *tag* in Helix 98 tragen, können mittels dieses *tags* aufgereinigt werden [64]. Die Aufreinigung erfolgte über GStrap FF Säulen der Firma Amersham Bioscience mit einem Säulenvolumen von 1 mL. Vor dem Binden des MS2-GST Fusionsproteins wurde die Säule mit 6 Säulenvolumen Bindungspuffer equilibriert. Nicht gebundenes Fusionsprotein wurde mit 3 Säulenvolumen Bindungspuffer von der Säule gewaschen. Die auf die Konzentration des Bindungspuffers eingestellten cr70S wurden auf die Säule geladen und nicht gebundene 70S (Wildtyp-Ribosomen) wurden mit 5 Säulenvolumen Bindungspuffer von der Säule gewaschen (*Wasch-Peak*). Die Elution der mutierten Ribosomen erfolgte mit 6 Säulenvolumen Elutionspuffer. Das gleichzeitige Messen der  $A_{254}$  ermöglichte die Detektion der mutierten Ribosomen (*Elutions-Peak*). Die Fraktionen des *Elutions-Peak* wurden vereinigt und mit Amicon Ultra-15 (Millipore) oder Amicon® Ultra - 4 (Ultracel - 100k) der Firma MILLIPORE nach dem Protokoll des Herstellers aufkonzentriert.

Name	Substanz	Konzentration
<b>Bindungspuffer</b>	Tris-HCl	20 mM, pH 7,5 (4°C)
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	100 mM
<b>Elutionspuffer</b>	Tris-HCl	50 mM, pH 7,5 (4°C)
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	NH <sub>4</sub> Cl	100 mM
	reduziertes Glutathion	2 mM
<b>1 x PBS</b>	Kaliumchlorid	2,7 mM
	Kalium- <i>di</i> -hydrogenphosphat	1,8 mM
	Natriumchlorid	7 mM
	<i>di</i> -Natrium-hydrogenphosphat	10 mM

**Tab. 10:** Puffer für die Aufreinigung mutierter Ribosomen

4.5.5 *Präparation von Ribosomen aus B. subtilis*

Zur Präparation von Ribosomen aus *B. subtilis* wurde das Protokoll der Referenz [5] modifiziert. Das Zellpellet (siehe Kapitel 4.5) wurde in gefrorenem Zustand in einen im Eisbad stehenden Mörser überführt. Nach Zugabe

der doppelten Menge Alcoa wurde das Zellpellet 8 min gemörser. Anschließend wurden 5,0 mL S30-Puffer<sup>+</sup> hinzugegeben und 5 min gemörser. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden mitsamt des Alcoas in ein 50 mL-Falcon-Tube überführt und im TA-10.250-Rotor 20 min bei 9400 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 30 mL-Beckmann-Röhrchen gegeben und im TA-10.250 für 15 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation im SW55-Rotor bei 30000 g und 4°C in 30 min abgetrennt. In einem Ultra-Clear Centrifuge Tube (14 x 95mm; Beckmann) wurden 3,0 mL Sucrose-Kissen mit diesem S30-Lysat überschichtet und die cr70S durch 20-stündige Zentrifugation im SW40Ti-Rotor bei 34000 rpm (~145000 g) und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in S30-Puffer resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

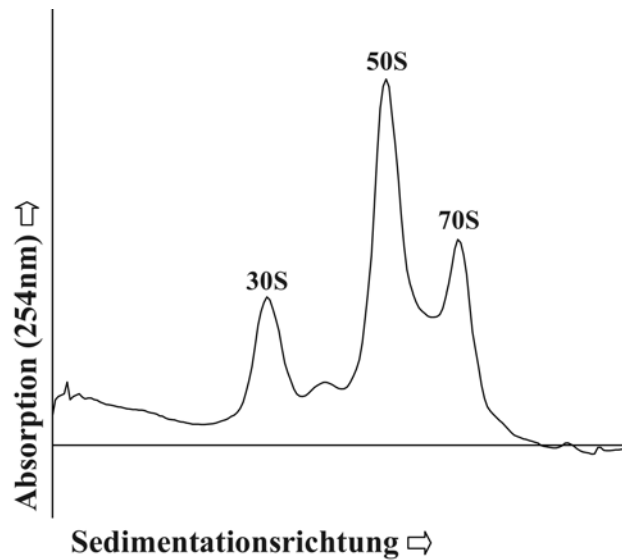
Name	Substanz	Konzentration
<b>S30-Puffer</b>	Tris-Acetat	10 mM, pH 8,2
	K(OAc)	60 mM
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	14 mM
	DTT	1 mM
<b>S30-Puffer<sup>+</sup></b>	Tris-Acetat	10 mM, pH 8,2
	K(OAc)	60 mM
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	14 mM
	DTT	5 mM
<b>Sucrose-Kissen</b>	Tris-Acetat	10 mM, pH 8,2
	K(OAc)	60 mM
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	14 mM
	DTT	1 mM
	Sucrose	37,7 %

**Tab. 11:** Puffer für Ribosomen aus *B. subtilis*

#### 4.5.6 Nicht-dissozierender analytischer Gradient für Ribosomen aus *B. subtilis*

Die Intaktheit der präparierten cr70S (siehe Kapitel 4.5.5) wurde mittels eines analytischen Gradienten überprüft. Der dazu eingesetzte Gradient (14 mM Mg<sup>2+</sup>, 5-40 % Sucrose, Ultra-Clear Centrifuge Tubes, 25 x 89 mm, Beckmann) wurde mit 1 OD<sub>260</sub> cr70S beladen. Die Auftrennung erfolgte mittels Zentrifugation für 2 h im MLS-50-Rotor bei 44000 rpm und 4°C. Die

Fraktionierung im Piston Gradient Fractionator (Biocomp) mit gleichzeitiger Messung der  $A_{254}$  ergab das Gradientenprofil (siehe Abbildung 10).



**Abb. 10:** Gradientenprofil von Ribosomen aus *B. subtilis* unter nicht-dissozierenden Bedingungen [14 mM  $Mg^{2+}$ ].

Name	Substanz	Konzentration
5 %ige Sucrose	Tris-Acetat	10 mM, pH 8,2
	K(OAc)	60 mM
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	14 mM
	DTT	1 mM
	Sucrose	5 %
40 %ige Sucrose	Tris-Acetat	10 mM, pH 8,2
	K(OAc)	60 mM
	Mg(OAc) <sub>2</sub>	14 mM
	DTT	1 mM
	Sucrose	40 %

**Tab. 12:** Gradienten-Puffer für Ribosomen aus *B. subtilis*

#### 4.5.7 Präparation von 30S Untereinheiten aus *B. subtilis*

Die Präparation von 30S Untereinheiten aus den cr70S (siehe Kapitel 4.5.5) ist über eine Dichtegradientenzentrifugation unter dissozierenden Bedingungen (1 mM  $Mg^{2+}$ ; 5-40 % Sucrose) möglich. Im analytischen Maßstab



erfolgte die Auftrennung 1 OD<sub>260</sub> cr70S im SW50-Rotor (44000 rpm, 4°C, 2 h; siehe Abbildung 11). Für die präparative Darstellung wurden 100 OD<sub>260</sub> je Gradient im SW32Ti-Rotor (19000 rpm, 4°C, 17,5 h) aufgetrennt (siehe Abbildung 12). Die anschließende Fraktionierung im Piston Gradient Fractor (Biocomp) ermöglichte die Isolierung und anschließende Pelletierung der 30S Untereinheiten im SW40Ti-Rotor (36000 rpm, 4°C, 20 h). Nach der Resuspendierung in 1 x UE-Puffer wurde die Konzentration bestimmt.

Name	Substanz	Konzentration
1 x UE-Puffer	Tris-Acetat	20 mM, pH 7,5
	NH <sub>4</sub> Cl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	β-Mercaptoethanol	2 mM

Tab. 13: Puffer für ribosomale Untereinheiten aus *B. subtilis*

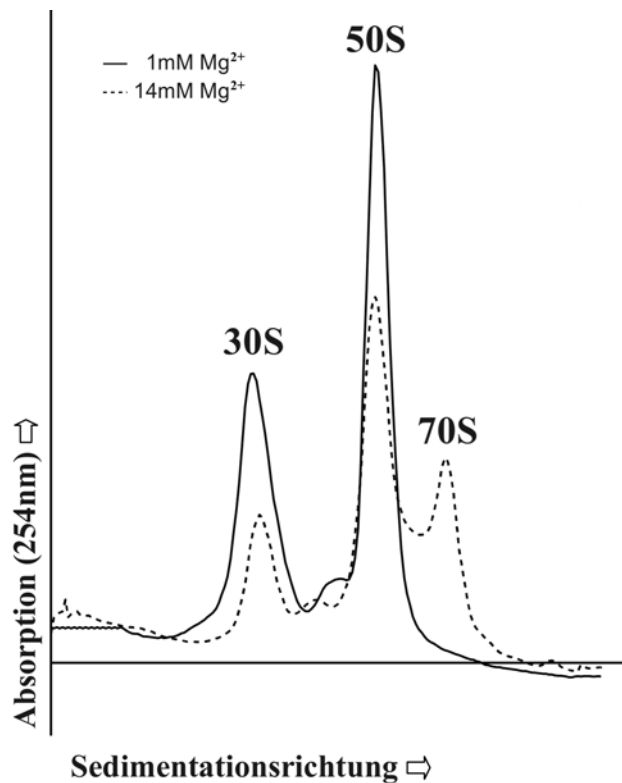
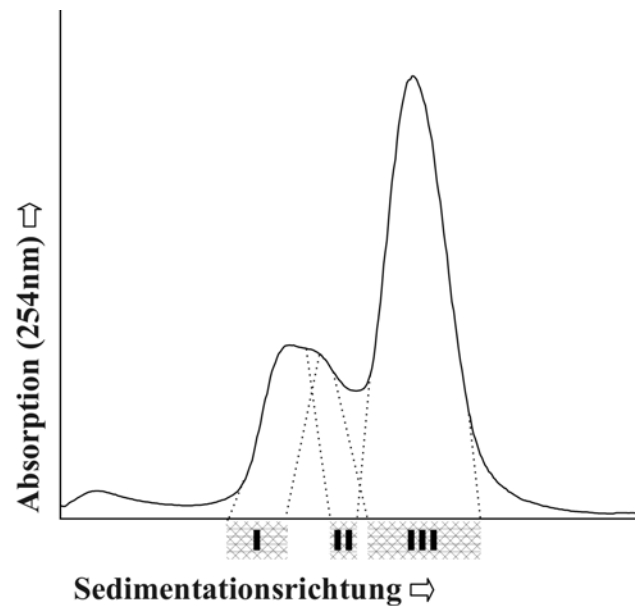


Abb. 11: Vergleichendes Gradientenprofil von Ribosomen aus *B. subtilis*.  
Vergleich der Gradientenprofile unter dissoziierenden Bedingungen [1 mM Mg<sup>2+</sup>] und nicht-dissoziierenden Bedingungen [14 mM Mg<sup>2+</sup>].



**Abb. 12:** Dissoziierender präparativer Gradient der Ribosomen aus *B. subtilis*.  
 Präparation der Untereinheiten unter dissoziierenden Bedingungen [1 mM  $Mg^{2+}$ ]. I: 30S Untereinheiten, II: 30S und 50S Untereinheiten, III: 50S Untereinheiten

## 4.6 Nukleinsäure-Techniken

### 4.6.1 Gelelektrophorese

Als Gelsysteme wurden Agarose-Gele und Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Der Vernetzungsgrad der Polymerbildner entscheidet darüber, welche Größen von Molekülen getrennt werden können.

#### 4.6.1.1 Agarose-Gele

Diese Art der Gele ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlichster Größe. Die jeweils einzusetzende Agarose-Konzentration und die Fragmentlängen, die mit den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylencyanol ko-migrieren, sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Agarose-Gele wurden standardmäßig für die PCR-Analytik und die Auftrennung von Restriktionsverdaus eingesetzt. Als Lösungs- und als Laufmittel diente 1xTBE. Während der Gelelektrophorese wurde die Stromstärke konstant gehalten. Die Zugabe von SYBR SAFE zum Gel ermöglichte die Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht (254 nm). Mit auf das Gel aufgetragene Marker ermöglichten eine Größenabschätzung der DNA-Fragmente.

Agarose [w/v]	Fragmentlänge	Bromphenolblau	Xylencyanol
0,5 %	1,0 bis 30 kb	1,0 kb	10,0 kb
0,7 %	0,8 bis 12 kb	0,7 kb	6,0 kb
1,0 %	0,5 bis 7 kb	0,3 kb	3,0 kb
1,2 %	0,4 bis 6 kb	0,2 kb	1,5 kb
1,5 %	0,2 bis 3 kb	0,12 kb	1,0 kb
2,0 %	0,1 bis 2 kb	<0,1 kb	0,8 kb

Tab. 14: Agarosegele

#### 4.6.1.2 Polyacrylamid-Gele

Die Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE) wurde eingesetzt, um RNA-Moleküle qualitativ zu überprüfen und bei Bedarf anschließend aufzureinigen. Für die Auftrennung von RNA-Molekülen werden in der Regel denaturierende Bedingungen verwendet, die durch den Einsatz von Harnstoff in einer Konzentration von 8 M erzeugt werden. Unter denaturierenden Bedingungen werden die Nukleinsäuren abhängig von ihrer Kettenlänge getrennt. Tabelle 15 zeigt den Migrationshintergrund der Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol für verschiedene Acrylamidgele.

Acrylamid [w/v]	Bromphenolblau	Xylencyanol
5 %	35 Basen	130 Basen
6 %	26 Basen	106 Basen
8 %	19 Basen	75 Basen
10 %	12 Basen	55 Basen
15 %	9 Basen	34 Basen
20 %	8 Basen	28 Basen
25 %	7 Basen	25 Basen

Tab. 15: Polyacrylamidgele

Eingesetzt wurden Gele mit den Abmessungen 10 x 10 cm und einer Dicke von 1 mm mit 10 Taschen.

Für die qualitative Analyse der ribosomalen RNA (rRNA) wurden vierprozentige Polyacrylamid(PAA)-Gele eingesetzt. Die Gelaufreinigung von T7-Transkriptionen erfolgte mit sechsprozentigen PAA-Gelen. Die Denaturierung der Proben wurde gewährleistet, indem die Proben mit TBE-Urea Sample Buffer (BIO RAD) versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel zunächst 3 min auf 70°C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt wurden. Tabel-

le 16 zeigt die Zusammensetzung eines vierprozentigen, denaturierenden PAA-Gels.

Acrylamid : Bisacrylamid = 19 : 1 [40%]	2,0 mL
10 x TBE	2,0 mL
Harnstoff	9,6 g
RNase-freies Wasser	zu 20,0 mL
TEMED	20,0 µL
APS [10%]	200,0 µL

**Tab. 16:** Denaturierendes Polyacrylamid-Gel, 4% PAA.

#### 4.6.1.3 Native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese wurde mit Kompositgelen durchgeführt, die 2,5 % Polyacrylamid und 0,5 % Agarose enthalten. Die Gelgröße betrug 10 x 10 cm bei 1,5 mm Dicke mit 10 Taschen. Tabelle 17 zeigt die Zusammensetzung eines nativen Kompositgels. Zu beachten ist bei der Herstellung, dass die Komponenten eins bis fünf erst miteinander gemischt werden, wenn die einprozentige Agarose-Lösung auf ~50°C abgekühlt ist. Anschließend erfolgt die zügige Mischung mit den übrigen Komponenten. Die Zusammensetzung des Lauf- und Ladepuffers ist in Tabelle 18 wiedergegeben.

1.	Acrylamid Bis = 37 : 1 [40%]	1,25 mL
2.	10 x THEM	2,0 mL
3.	RNase-freies Wasser	6,75 mL
4.	TEMED	10,0 µL
5.	APS [10%]	100,0 µL
6.	Agarose [1% in Wasser]	10,0 mL

**Tab. 17:** Natives Kompositgel

Name	Substanz	Konzentration
<b>10 x THEM</b>	Tris-Base	340 mM
<b>(10 x Laufpuffer)</b>	HEPES	660 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
	EDTA	1 mM

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

Name	Substanz	Konzentration
7 x Ladepuffer	Tris-HCl	20 mM, pH 7,5
	NH <sub>4</sub> Cl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	Sucrose	70 %
	Xylencyanol	0,28 %

**Tab. 18:** Puffer für natives Kompositgel

#### 4.6.2 Detektion der Nukleinsäuren

Entsprechend den jeweiligen Anforderungen wird zwischen unterschiedlichen Möglichkeiten zur Visualisierung der Nukleinsäuren in Agarosegelen und Polyacrylamidgelen unterschieden.

**1. Visualisierung von DNA-Fragmenten (analytische PCR und analytischer Restriktionsverdau):**

Agarosegel-Lösungen wurden mit  $\frac{1}{10.000}$  Volumen SYBR<sup>®</sup> Safe versetzt. Dies ermöglichte die Visualisierung der DNA-Fragmente mithilfe langwelligeren UV-Lichts. Die Nachweisgrenze liegt bei 100 pg je DNA-Bande.

**2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten (präparative PCR und präparativer Restriktionsverdau):**

Die Aufreinigung größerer DNA-Mengen nach einer PCR oder einem präparativen Verdau von Plasmiden oder PCR-Produkten erfolgte mithilfe von Kristallviolett, das elektrostatisch mit DNA interagiert. Dazu wurden das Gel und der Laufpuffer jeweils mit  $\frac{1}{1000}$  Volumen einer wässrigen Kristallviolett-Lösung [10 mg/mL] versetzt. Dies ermöglichte die Visualisierung der DNA bei Tageslicht, so dass der potentiell DNA-schädigende Einsatz von UV-Licht vermieden werden konnte. Nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden aus dem Gel und der Elution der DNA konnte das Kristallviolett mittels einer Ethanol-fällung abgetrennt werden.

**3. Visualisierung von RNA (analytisch):**

Die auf denaturierenden PAA-Gelen aufgetrennten RNA-Moleküle wurden mit Toluidinblau angefärbt. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese für 10 min in einer wässrigen Toluidinblau-Lösung (0,1 % (w/v)) geschwenkt. Die Entfärbung, in deren Verlauf die RNA-Banden erkennbar wurden, erfolgte durch Schwenken des Gels in einer

wässrigen Lösung, die 10% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure enthält.

#### 4. Aufreinigung von RNA (präparativ):

Die präparative Aufreinigung größerer RNA-Mengen erfolgte nach Auftrennung auf denaturierenden PAA-Gelen (siehe Kapitel 4.6.1.2). Visualisiert wurde die jeweilige RNA durch UV-*shadowing*. Dabei wird die Eigenschaft der RNA ausgenutzt, Licht der Wellenlänge 260 nm zu absorbieren. Die RNA erscheint als dunkler Schatten und kann nach Ausschneiden des entsprechenden Bereichs aus dem Gel eluiert werden.

#### 4.6.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Lambert-Beer'sche Gesetz ermöglicht die Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäurelösung mithilfe der gemessenen Extinktion  $E$  nach Gleichung 4.1.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (4.1)$$

Die Konzentration  $c$  der Lösung ist somit abhängig von der Extinktion  $E$ , dem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  und der Schichtdicke  $d$ . Gemessen wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und einer Schichtdicke von 1 cm in einer Quarzküvette. Tabelle 19 ist die Menge Nukleinsäure zu entnehmen, die einer Extinktionseinheit bei 260 nm entspricht.

Nukleinsäure [ $1 A_{260}$ ]	Menge [ $\mu\text{g/mL}$ ]
dsDNA	50
ssDNA	37
RNA	40

**Tab. 19:** Nukleinsäuremengen je Extinktionseinheit

Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation anhand des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen mit aromatischen Aminosäuren) abgeschätzt werden. Der Wert für das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  für eine reine DNA-Lösung beträgt 1,8 und der für eine reine RNA-Lösung 2,0.

#### 4.6.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Banden der mittels Kristallviolett detektierten PCR- oder Restriktionsverdau-Produkte (Kapitel 4.6.2) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe

des QIAquick® Gel Extraction Kit eluiert. Eine erforderliche Konzentrierung der Probe wurde mittels Ethanol-Fällung (Kapitel 4.6.7) vorgenommen.

#### 4.6.5 Isolierung von RNA aus Polyacrylamidgelen

Bei Bedarf wurden T7-Transkriptionen über denaturierende PAA-Gele (Kapitel 4.6.1.2) aufgereinigt. Dazu wurden die entsprechenden Banden nach der Detektion (Kapitel 4.6.2) aus dem Gel ausgeschnitten und mit Natriumacetat [1 M, pH 5,0] versetzt. Eluiert wurde die RNA unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C. Durch eine anschließende Ethanol-Fällung (Kapitel 4.6.7) wurden Salze entfernt und die RNA konzentriert.

#### 4.6.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Methode dient der Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit einem Volumenteil Phenol versetzt und auf einem Vortex-Rüttler kräftig gemischt. Im Fall von RNA-Lösungen wurde saures Phenol (pH 5,5) und bei DNA-Lösungen basisches Phenol eingesetzt. Die anschließende Zentrifugation bei 4°C und 16100 g für eine Minute führte zu einer Phasentrennung. Die denaturierten Proteine werden dabei in der unteren (organischen) Phase und in der Interphase angereichert. Zur Entfernung des Phenols aus der wässrigen Phase wurde diese anschließend analog dem ersten Schritt mit Chloroform ausgeschüttelt. Die sich anschließende Ethanol-Fällung (siehe Kapitel 4.6.7) diente der Konzentrierung der jeweiligen Nukleinsäure.

#### 4.6.7 Ethanol-Fällung

Die gebräuchlichste Methode zur Konzentrierung von Nukleinsäuren ist die Fällung mit Ethanol oder Isopropanol in Gegenwart monovalenter Salze in der Kälte. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit  $\frac{1}{10}$  Volumen Natriumacetat [3 M, pH 5,0] und einem 2,5-fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt und gut gemischt. In der Kälte (mindestens 30 min bei -20°C) wurde die Nukleinsäure ausgefällt und anschließend durch Zentrifugation bei 4°C und 16100 g für mindestens 30 min pelletiert. Ein anschließendes vorsichtiges Waschen des Pellets mit kaltem Ethanol [70 vol%] diente dem Zweck, Salze und andere niedermolekulare wasserlösliche Substanzen zu entfernen.

Bei großvolumigen Proben erfolgte die Fällung mit Isopropanol, da die Fällung bereits bei Zugabe eines 0,6 bis 0,8-fachen Volumens Isopropanol quantitativ erfolgt. Das Pellet wurde bei dieser Fällung ebenfalls mit Ethanol [70 vol%] gewaschen, um wasserlösliche Salze und Isopropanol zu entfernen. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in RNase-freiem bidestilliertem

Wasser gelöst und die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei Bedarf wie unter Kapitel 4.6.3 beschrieben.

## 4.7 DNA-Techniken

### 4.7.1 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen ermöglichen eine sequenzspezifische Spaltung von DNA. Die aus verschiedenen Organismen gewonnenen Endonukleasen erkennen Palindromsequenzen und es entstehen durch die Spaltung stumpfe (*blunt ends*) oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (*sticky ends*) mit 5'-Phosphat-Gruppen und 3'-Hydroxyl-Gruppen. Die Inkubation erfolgte nach den Herstellerangaben für das jeweilige Enzym. Die erhaltenen Produkte wurden wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben detektiert. Nach präparativem Verdau wurden die entsprechenden DNA-Banden wie in Kapitel 4.6.4 beschrieben aus dem Agarosegel isoliert.

### 4.7.2 Dephosphorylierung

Die für Ligationen einzusetzenden Vektoren wurden nach der Restriktionsspaltung (Kapitel 4.7.1) am 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors mit sich selbst zu verhindern. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn der Vektor nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde. Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz mit Dephosphorylierungspuffer (Roche) und Alkalischer Phosphatase (Roche) versetzt und noch einmal 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der geschnittene und dephosphorylierte Vektor mithilfe eines TBE-Agarosegels aufgereinigt und mittels Kristallviolett (Kapitel 4.6.2) detektiert. Die Extraktion aus dem Gel erfolgte wie in Kapitel 4.6.4 beschrieben.

### 4.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfachung (Amplifizierung) von DNA.

Für qualitative PCRs (z. B. Nachweis einer Insertion in plasmidal kodierter 23S rRNA) wurde die aus *Thermus aquaticus* stammende *Taq*-Polymerase eingesetzt.

Für Klonierungen verwendete DNA-Fragmente dürfen keine Mutationen enthalten. Hierbei kamen deshalb die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* oder die *Pwo*-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* zum Einsatz. Beide Polymerasen sind im Vergleich mit der *Taq*-Polymerase zwar langsamer, sie besitzen allerdings ein 3'-5'-Exonukleasezentrum, wodurch ein Korrekturlesen (*proofreading*) ermöglicht wird.



## 4.8 RNA-Techniken

### 4.8.1 T7-Transkription

Für die enzymatische Synthese von RNA-Molekülen wurde die RNA-Polymerase des Phagen T7 verwendet. Entsprechende, mit einem T7-Promotor ausgestattete Vektoren wurden wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben linearisiert. Die Transkription wurde mithilfe des T7-MEGAShortscript™ von Ambion nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz mit dem MegaClearKit der Firma Ambion gereinigt. Mittels saurer Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 4.6.6) wurden die Polymerase und andere Proteinkomponenten entfernt und die RNA wie in Kapitel 4.6.7 beschrieben ausgefällt und in RNase-freiem bidestilliertem Wasser gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung (Kapitel 4.6.3) wurde die Intaktheit der transkribierten RNA überprüft (Kapitel 4.6.1.2 und 4.6.2).

### 4.8.2 RNA-Isolierung

#### 4.8.2.1 Gesamt-RNA

Die Präparation zellulärer Gesamt-RNA ist eine einfache und schnelle Möglichkeit, die Intaktheit der ribosomalen RNA zu überprüfen, die ~80 % der zellulären RNA darstellt. Für diesen Zweck wurden  $\sim 10^8$  Bakterienzellen eingesetzt und die ribosomale RNA mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll präpariert. Der DNase I-Verdau (Kapitel 4.8.3), die Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 4.6.6) und die Ethanol-Fällung (Kapitel 4.6.7) wurden wie in den entsprechenden Kapiteln beschrieben durchgeführt.

#### 4.8.2.2 Ribosomale RNA

Für die Extraktion ribosomaler RNA (rRNA) wurden cr70S-Präparationen oder über Sucrose-Gradienten gereinigte 70S Ribosomen bzw. ribosomale Untereinheiten eingesetzt. Die ribosomenhaltige Lösung wurde mit der dreifachen Menge Trizol LS versetzt und auf einem Vortex-Rüttler durchmischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit Chloroform (80 % des ursprünglichen Volumens) versetzt, mit dem Vortex gemischt und anschließend 5 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die rRNA enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von Isopropanol (zweifache Menge des ursprünglichen Probenvolumens) und Natriumacetat [3 M, pH 5,0] (20 % des ursprünglichen Probenvolumens) wurde die RNA ausgefällt und mittels Zentrifugation für 10 min bei 10.000 g und 4°C pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit Ethanol [70 vol%] wurde das Pellet in RNase-freiem bidestillierten Wasser gelöst und eventuell enthaltene DNA-Verunreinigungen

mittels DNase I verdaut (siehe Kapitel 4.8.3). Die mit DNase I behandelte RNA-Lösung wurde wie in Kapitel 4.6.6 von Proteinen befreit und die RNA wie in Kapitel 4.6.7 beschrieben ausgefällt und gelöst.

#### 4.8.3 DNase I-Verdau

Zur Gewährleistung, dass RNA-Präparationen keine DNA enthalten, wurden sämtliche präparierten RNAs mit DNase I behandelt. DNase I ist eine unspezifische Endonuklease, die sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA zu Mono- und Oligonukleotiden abbaut. Tabelle 20 zeigt ein Standard-Protokoll für einen DNase I-Verdau, der 45 min bei 37°C inkubiert wurde. Die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 4.6.6) und die Fällung der RNA (Kapitel 4.6.7) wurde wie in den Kapiteln beschrieben durchgeführt.

	Volumen
RNA-Lösung	x µL [10,0 µg]
10xDNase I Puffer (Ambion)	10,0 µL
DNase I [2u/µL] (Ambion)	10,0 µL [20 u]
RNase-freies Wasser	ad 100,0 µL

**Tab. 20:** Standard-Protokoll für einen DNase I-Verdau

Das Volumen der RNA-Lösung (x µL) wurde der Konzentration angepasst. Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 45 min.

#### 4.8.4 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die zum Nachweis einer Mutation in der 23S rRNA eingesetzte RT-PCR wurde nach Herstellerangaben mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas durchgeführt. Die in diesem Kit enthaltene Reverse Transkriptase zeichnet sich durch eine komplette Inaktivierung der RNase H-Aktivität aus. Die RNase H spaltet RNA-Moleküle in DNA-RNA-Hybriden, so dass bei entsprechender Aktivität der Reversen Transkriptase ein positiver Nachweis ausbleiben kann, da Hybride zwischen RNA und DNA-Primer gespalten werden können. Für die Reaktion wurde entweder Gesamt-RNA (Kapitel 4.8.2.1) oder ribosomale RNA (Kapitel 4.8.2.2) eingesetzt, die in jedem Fall vor der RT-PCR mit DNase I behandelt wurde (Kapitel 4.8.3). Die so erhaltene cDNA konnte über einen längeren Zeitraum bei -20°C gelagert und für PCR-Reaktionen (Kapitel 4.7.3) eingesetzt werden.

## 4.9 Klonierungs- und Expressionsstrategie

Für eine kontrollierte Expression mutierter Ribosomen wurde der Vektor p278MS2 [64] gewählt, der das *rrnB*-Operon von *E. coli* unter der Kontrolle des hitzeinduzierbaren Promotors  $\lambda_{PL}$  kodiert. Die Expressionskontrolle ist allerdings nur bei gleichzeitiger Anwesenheit des Repressionsplasmides pCI857 möglich. Letzteres kodiert das thermolabile Repressorprotein cI857, das den  $\lambda_{PL}$  Promotor nur bei Temperaturen unterhalb von 37°C inhibiert. Wird die Inkubationstemperatur auf 42°C erhöht, so verliert das Repressorprotein seine Fähigkeit zur DNA-Bindung und das Gen wird exprimiert. Der Vektor p278MS2 exprimiert zudem eine 23S rRNA mit dem MS2 *tag* in Helix 98. Mithilfe dieses *tags* können mutierte Ribosomen von nativen Ribosomen getrennt werden (siehe Kapitel 4.5.4).

### 4.9.1 Klonierung des Ribozyms GIR<sub>1</sub> aus *D. iridis* in Helix 9 der 23S rRNA

Die kodierende Sequenz von GIR<sub>1</sub> wurde zunächst mithilfe der Primer GIR-1 und GIR-2 (siehe Tabelle 27) amplifiziert. Das daraus resultierende Amplifikat enthielt am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *KpnI* (fett gedruckt in Abbildung 13). Mit einer zweiten PCR, bei der das Produkt der ersten PCR als Templat diente, wurde mithilfe der Primer GIR-3 und GIR-4 (siehe Tabelle 27) am 3'-Ende die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *XmaIII* eingeführt (fett-kursiv gedruckt in Abbildung 14). Die so erhaltene DNA-Sequenz wurde in ein Fragment, das die Nukleotide 2006 bis 3497 des *rrnBs* umfasst und von Erkennungssequenzen für *XbaI* und *SphI* flankiert wird, eingefügt. Das *rrnB*-Fragment, das im Klonierungsvektor pET INS9 (P. Sergiev) vorliegt, weist singuläre Erkennungssequenzen für *KpnI* und *XmaIII* in Helix 9 auf [34]. Dieses *rrnB*-Fragment wurde dann in den Expressionsvektor p278MS2 kloniert und schließlich in den Stamm XL1-Blue transformiert (siehe Kapitel 4.2.4), der bereits das Repressionsplasmid pCI857 trug. Daraus resultierte der Stamm XL1-Blue/pCI857/p278MS2-GIR<sub>1</sub> in *H9*. Abbildung 15 zeigt eine schematische Übersicht der Klonierungsstrategie, die auch bei allen anderen im Rahmen dieser Arbeit klonierten ncRNAs angewendet wurde. Die zweidimensionale Struktur des klonierten Ribozyms GIR<sub>1</sub> ist im Anhang gezeigt (siehe Abbildung 39).

### 4.10 Darstellung des 70S·EF-G·GDP·FA-Komplexes

Die Präparation der Ribosomen von *T. thermophilus* sowie der ribosomalen Komplexe mit dem Elongationsfaktor G (EF-G) und dem Ko-Faktor GTP in Gegenwart des Antibiotikums Fusidinsäure erfolgte im Labor von Daniel Wilson (Gene Center Munich, Department of Chemistry and Biochemistry,

Ludwig-Maximilians-Universität München). Die dazu notwendigen biochemischen Arbeiten wurden von Agata Starosta, Alexandra Dönhöfer und Aleksandra Mikolajka durchgeführt.

```

AATGGTACCC GGCTGGCGGT TTGGTTGGGT TGGGAAGTAT CATGGCTAAT 50
CACCATGATG CAATCGGGTT GAACACTTAA TTGGGTAAA ACGGTGGGGG 100
ACGATCCCGT AACATCCGTC CTAACGGCGA CAGACTGCAC GGCCCTGCCT 150
CTTAGGTGTG TTCAATGAAC AGTCGTTCCG AAAGGAAGCA TCCGGTATCC 200
CAAGACAA 208

```

**Abb. 13:** Produktsequenz der ersten PCR.

Die Erkennungssequenz von *KpnI* ist fett gedruckt.

```

AATGGTACCC GGCTGGCGGT TTGGTTGGGT TGGGAAGTAT CATGGCTAAT 50
CACCATGATG CAATCGGGTT GAACACTTAA TTGGGTAAA ACGGTGGGGG 100
ACGATCCCGT AACATCCGTC CTAACGGCGA CAGACTGCAC GGCCCTGCCT 150
CTTAGGTGTG TTCAATGAAC AGTCGTTCCG AAAGGAAGCA TCCGGTATCC 200
CAAGACAATC AAACCGCCGG CCGATT 226

```

**Abb. 14:** Produktsequenz der zweiten PCR.

Die Erkennungssequenz von *KpnI* ist fett gedruckt, die von *XmaIII* fett-kursiv.

#### 4.11 Elektronenmikroskopie

In den letzten Jahren wurde die Kryo-Elektronenmikroskopie weiterentwickelt und hat sich im Bereich der Strukturaufklärung biologischer Moleküle als erfolgreiche Methode etabliert. Die von der Röntgenkristallstrukturanalyse erreichten Auflösungen rücken auch für die Kryo-EM immer mehr in greifbare Nähe [12], was auch der Weiterentwicklung der rechnergestützten Datenprozessierung zu verdanken ist. Im Vergleich mit anderen Methoden der Strukturaufklärung weist die Kryo-EM einige Vorteile auf. Die Röntgenkristallstrukturanalyse benötigt das zu untersuchende Material in Form von Kristallen, deren Gewinnung zum Teil zeitaufwendig und manchmal schwierig ist. Die Strukturanalyse mittels Kernresonanzspektroskopie ist nur kleineren Molekülen zugänglich und versagt bei größeren makromolekularen Komplexen wie dem Ribosom. Die Kryo-EM benötigt keine Kristalle und ist gerade für makromolekulare Komplexe ab einem Molekulargewicht von ~200 kDa sehr gut geeignet. Die Schockgefrierung der Probe in flüssigem Ethan verhindert die Eiskristallbildung wodurch die Probe, von der nur geringe Mengen benötigt werden, in einem quasi nativen Zustand erhalten bleibt.

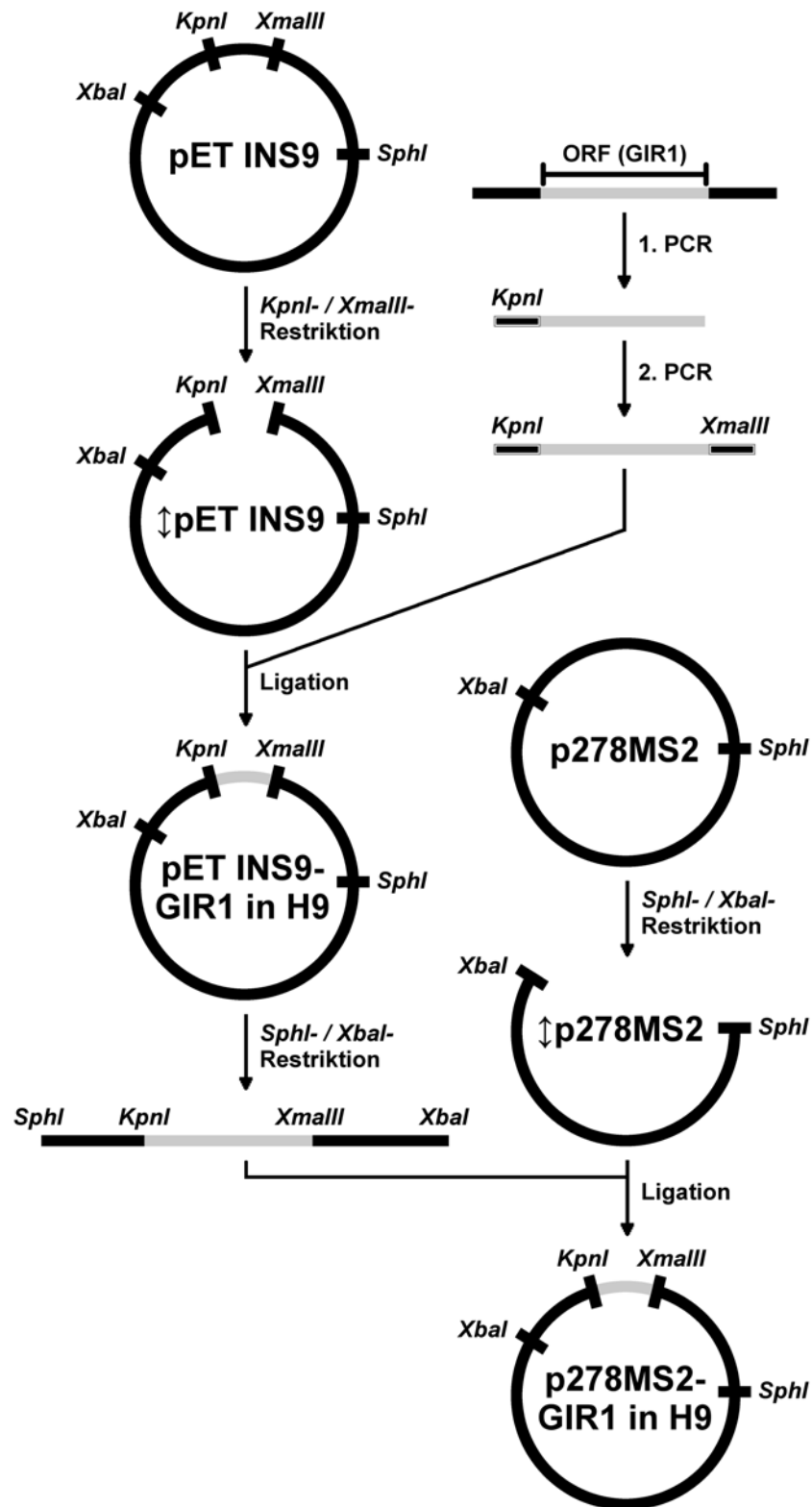


Abb. 15: Klonierungsstrategie.

Die Klonierung des Ribozym GIR1 in den Expressionsvektor p278MS2 mittels zweier PCRs zur Einführung der Erkennungssequenzen für *KpnI* und *XmaIII* über den Klonierungsvektor pET INS9. Indiziert sind ebenfalls die sites für *SphI* und *XbaI*. Geschnittene Vektoren sind gekennzeichnet (⤴). Genauere Erläuterungen im Text.

#### 4.11.1 Aufbau des Elektronenmikroskops

Das in dieser Studie eingesetzte Elektronenmikroskop gehört zu den Transmissionselektronenmikroskopen (engl. *transmission electron microscopy* TEM). Der Aufbau ist prinzipiell dem des Lichtmikroskopes vergleichbar. Anstelle der optischen werden magnetische Linsen eingesetzt, die jedoch nur als Sammellinsen wirken. Die von der Feldemissionskathode (engl. *field emission gun*, FEG) ausgesandten Elektronen sind hochkohärent und werden mit Spannungen von 300 kV beschleunigt. Die Aufnahmen können analog mit einer Plattenkamera oder digital mit einer CCD-Kamera gesammelt werden.

#### 4.11.2 Bildentstehung im TEM

Ganz allgemein lässt sich festhalten, dass das Bild im TEM von den Elektronen erzeugt wird, die das Objekt passieren. Dabei treten unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Probenmaterial auf.

1. elastische Streuung
2. inelastische Streuung
3. Absorption

Die **elastische Streuung** entsteht durch die Wechselwirkung eines positiv geladenen Kerns des Probenmaterials mit den Elektronen des Messstrahls. Diese Art der Streuung ist umso größer, je positiver der Kern ist und je langsamer die Elektronen des Messstrahls. Die Geschwindigkeit  $v$  der Elektronen ist abhängig von der gewählten Beschleunigungsspannung ( $v \approx \sqrt[3]{U_b}$ , mit  $U_b$  als Beschleunigungsspannung). Bei der gewählten Beschleunigungsspannung von 300 kV ist die Geschwindigkeit der Messstrahlelektronen sehr hoch und die Elektronen treten kaum in Wechselwirkung mit der Probe. Der Kontrastunterschied zwischen den verschiedenen Atomen, wie z.B. Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlenstoff ist sehr niedrig, so dass sich die Proteine der Probe (Ribosomen) kaum vom Hintergrund unterscheiden.

Die Interaktion der Elektronen des Messstrahls mit denen der Probe kann zu einem Energieverlust der Messstrahlelektronen führen. Diese unerwünschte **inelastische Streuung** führt zu einer Vergrößerung der Wellenlänge des Messstrahls, der dadurch inkohärent wird. Eine hohe Energieaufnahme des Probenmaterials von den Elektronen des Messstrahls, also die **Absorption** von Elektronen, führt zu einer Schädigung der Probe. Diese Schädigung soll möglichst gering gehalten werden, so dass unter *low dose* Bedingungen ( $\sim 20 \frac{e^-}{\text{\AA}^2}$ ) gearbeitet werden muss.

Ein ausreichend hoher Kontrast ist für eine Sichtbarkeit der Probe unerlässlich. Dieser Kontrast wird bei der Negativkontrastierung (engl. *negative staining*) durch die Schwermetallionen des Kontrastierungsmittels (wässrige, 2%ige Uranylacetat-Lösung) hervorgerufen. Die Schwermetallionen

lagern sich an der Außenhülle und in den Hohlräumen der Probe an und erscheinen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme als dunkler Hintergrund, während das Probenmaterial als heller Fleck zu erkennen ist. Der Vorteil des *negative staining* liegt im hohen Kontrast. Mit dieser Methode lassen sich allerdings keine Informationen über den inneren Aufbau des Probenmaterials gewinnen. Lediglich die äußere Form, die durch die angelagerten Schwermetallionen artifiziell verformt sein kann, ist erkennbar. Diese Methode dient hauptsächlich der Beurteilung einer Probe hinsichtlich folgender Aspekte:

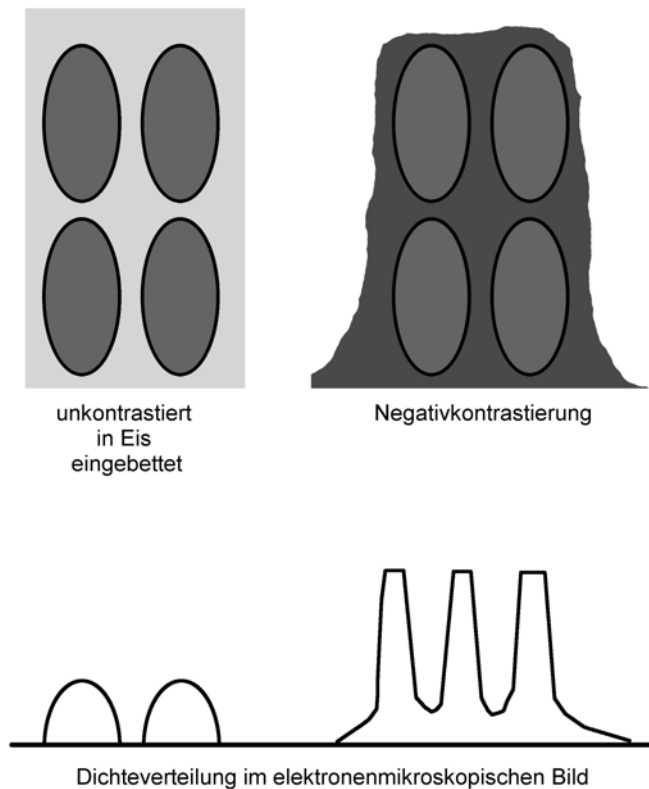
1. Konzentration
2. Zusammenlagerung (engl. *aggregation*) des Probenmaterials

Informationen über den inneren Aufbau eines Moleküls lassen sich nur dann gewinnen, wenn der Kontrast von diesem selbst erzeugt wird. Zu diesem Zweck wird die Probe für die Kryo-Elektronenmikroskopie in wässriger Lösung mit Hilfe flüssigen Ethans schockgefroren und diese bleibt in ihrem nativen Zustand erhalten. Der Siedepunkt flüssigen Ethans ist mit  $-188^{\circ}\text{C}$  zwar etwas höher als der von flüssigem Stickstoff ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), aber aufgrund seiner hohen Wärmekapazität von  $1,757 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}}$  verdampft Ethan nicht und bildet keine Dampfhülle um das Probenmaterial. Das in der Probe enthaltene Wasser erstarrt bei der schnellen Abkühlung ( $\sim 40.000 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{s}}$ ) im amorphen Zustand und die Kristallbildung bleibt aus. Da zur Reduzierung von Strahlenschäden durch Absorption der Strahlung unter *low dose* Bedingungen ( $\sim 20 \frac{\text{e}}{\text{\AA}^2}$ ) gearbeitet wird, ist der Kontrast um mehrere Größenordnungen geringer als der bei der Negativkontrastierung. Der Unterschied zwischen der Negativkontrastierung und der unkontrastierten Einbettung in amorphem Eis ist schematisch in Abbildung 16 dargestellt.

### 4.11.3 Probenpräparation

#### 4.11.3.1 Proben für die Negativkontrastierung

Auf Kupfernetzchen (*grids*) der Firma Quantifoil<sup>TM</sup>, die einen Kohlefilm mit Löchern (Lochgeometrie 3/3 oder 2/4) tragen, wurde manuell ein  $\sim 2$  nm dicker Kohlefilm aufgebracht und in einer Plasmareinigungskammer (*Plasma Cleaner PDC002*, Harrick, UK) wurde die Hydrophilie erhöht. Auf die so vorbereiteten *grids* wurden  $3,5 \mu\text{L}$  der wässrigen Probe aufgetragen und nach dem Entfernen überschüssiger Flüssigkeit erfolgte die Kontrastierung mit einer wässrigen Uranylacetat-Lösung (2%). Überschüssige Lösung wurde abgenommen und das Kupfernetzchen an der Luft getrocknet. Die so erhaltene Probe war für mehrere Wochen haltbar.



**Abb. 16:** Dichteverteilung bei Negativkontrastierung und Einbettung in amorphes Eis

#### 4.11.3.2 Proben für die Kryo-Elektronenmikroskopie

Für die Kryo-Elektronenmikroskopie wurden *grids* mit derselben Lochgeometrie wie bei der Negativkontrastierung eingesetzt (siehe Kapitel 4.11.3.1), allerdings war der zusätzliche dünne Kohlefilm von  $\sim 2$  nm Dicke maschinell aufgebracht worden. Die Behandlung in der Plasmareinigungskammer (*Plasma Cleaner PDC002*, Harrick, UK) zur Erhöhung der Hydrophilie erfolgte wie bei den *grids* für die Negativkontrastierung. Das Aufbringen der wässrigen Probe ( $3,5\mu\text{L}$ ) auf *grids* bei  $4^\circ\text{C}$  und  $100\%$  Luftfeuchtigkeit mit anschließender Schockgefrierung erfolgte im Vitrobot der Firma FEI. Die auf diese Weise präparierten *grids* wurden in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.11.4 Datensammlung

##### 4.11.4.1 Negativkontrastierung

Die Aufnahmen negativ kontrastierter Proben (siehe Kapitel 4.11.3.1) wurden am CM100 der Firma Philips bei 28.500facher Primärvergrößerung auf einer Tietz F114 Fastscan CCD Kamera mit einer Bildgröße von  $1024 \times 1024$  Pixeln (Pixelgröße =  $14\mu\text{m}$ ) gesammelt.



#### 4.11.4.2 *Kryo-Elektronenmikroskopie*

Die Kryo-elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden je nach Zielsetzung am Tecnai G2 Spirit oder am Tecnai G2 Polara erstellt.

Zur Erstellung von Initialstrukturen wurden zunächst Daten am Tecnai G2 Spirit bei 42.000facher Primärvergrößerung und einer Beschleunigungsspannung von 120 kV auf der Eagle CCD Kamera (FEI) gesammelt. Die Kamera erstellt Bilder der Größe 4096 x 4096 Pixeln mit einer Pixelgröße von 15  $\mu\text{m}$  auf dem Detektor.

Die Erstellung hochauflösender Strukturen erforderte die Datensammlung am Tecnai G2 Polara. Die Aufnahmen wurden bei 39.000facher Primärvergrößerung und einer Beschleunigungsspannung von 300 kV manuell mit einer Plattenkamera auf Planfilm (KODAK SO163) gesammelt.

#### 4.11.4.3 *Digitalisierung der Daten*

Die für hochauflösende Strukturen auf Planfilm gesammelten Aufnahmen (Micrographen) mussten zunächst digitalisiert werden. Dies geschah mit dem *Primescan D8200* der Firma HEIDELBERG mit einer Schrittweite von 4,76  $\mu\text{m}$ . Die Pixelgröße  $P_o$  der digitalisierten Bilder ist abhängig von der Pixelgröße  $P_c$  des Scanners und von der Primärvergrößerung  $V$  des Mikroskopes und ergibt sich aus Gleichung 4.2. Die Größe der Silberkristalle ( $\sim 0,5 \mu\text{m}$ ) auf dem Planfilm beeinflusst die Auflösung bei der gewählten Schrittweite von 4,76  $\mu\text{m}$  nicht.

$$P_o = \frac{P_c}{V} \quad (4.2)$$

Bei der gewählten Primärvergrößerung  $V$  des Mikroskopes von 39.000 (Tecnai G2 Polara) ergibt sich eine theoretische Pixelgröße  $P_o$  von 1,26  $\text{\AA}$ , die in der Realität aber nicht erreicht wird. Durch das niedrige Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise-ratio*, SNR) und Informationsverluste während der Datenprozessierung ist diese theoretische Auflösung nicht erreichbar. Die Mittelung der Strukturen über eine große Zahl von Partikelbildern (*single particle refinement*) erhöht das SNR und ermöglicht so Rekonstruktionen im subnanometer-Bereich.

#### 4.11.5 *Datenprozessierung*

Die Volumenrekonstruktion lässt sich in drei Schritte unterteilen, die in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben werden.

1. Identifizierung und *Ausschneiden* der potentiellen Ribosomenpartikel auf den digital vorliegenden Aufnahmen mit anschließender Abspeicherung als Einzelbilder (Partikelbilder)
2. Volumenrekonstruktion aus den erhaltenen Partikelbildern mittels eines iterativen Prozesses (*multiparticle refinement* [46]). Zu diesem

Zweck wurde das *System for Processing Image Data from Electron microscopy and related fields* (SPIDER [17]) eingesetzt. Die eingesetzten Skript-Programme enthalten alle benötigten Algorithmen.

3. Interpretation und Visualisierung (Chimera, UCSF) des erhaltenen Volumens.

#### 4.11.5.1 Die Kontrasttransferfunktion

Die Kontrasttransferfunktion (engl. *contrast transfer function*, CTF) moduliert die Bildinformationen im Ortsfrequenzraum. Es handelt sich um eine oszillierende Kurve um den Nullpunkt, deren Maxima und Minima den Höchstwert an Bildinformation liefern. Je mehr sich die oszillierende Kurve dem Nullpunkt nähert, desto weniger Information kann aus der jeweiligen Ortsfrequenz gewonnen werden. An den Nulldurchgängen liegt keine Information vor, so dass eine Übertragungslücke entsteht. Dieses Problem des Datenverlustes wird kompensiert, indem viele Bilder bei verschiedenen Defokuswerten aufgenommen werden, da sich die Nulldurchgänge bei verschiedenen Defokuswerten unterscheiden. Kryo-elektronenmikroskopische Aufnahmen können nicht im Fokus erstellt werden, da dann kein Kontrast existiert und das Objekt nicht zu erkennen wäre. Die Aufnahmen werden im starken Defokusbereich von  $-4\ \mu\text{m}$  bis  $-1,5\ \mu\text{m}$  erstellt, da der Kontrast nur vom Objekt selbst erzeugt wird (siehe auch Kapitel 4.11.2).

Ein weiterer Informationsverlust tritt bei hohen Ortsfrequenzen auf, da die *Einhüllende* der CTF die Oszillation bei höheren Ortsfrequenzen dämpft. Da hohe Ortsfrequenzen Informationen über Strukturdetails enthalten, wird versucht, die Informationen aus diesem Bereich mit dem *high frequency enhancement* zurückzugewinnen.

#### 4.11.5.2 Auswahl der Micrographen

Die nach dem Digitalisieren als *tif*-Dateien vorliegenden Micrographen mussten zunächst hinsichtlich ihrer Qualität beurteilt werden.

Die Stärke der Oszillation der Kontrasttransferfunktion (siehe Abschnitt 4.11.5.1) gibt Auskunft über den Grad an Information, der aus der jeweiligen Aufnahme gewonnen werden kann. Zur Beurteilung der Güte werden die Quadrate der Amplituden als Powerspektrum dargestellt. Dieses besteht aus hellen und dunklen Ringen, deren Form als Maß für die Güte eines Bildes herangezogen werden kann. Diese sogenannten Thonschen Ringe sollen konzentrisch sein. Die unterschiedliche Fokussierung in zwei senkrecht zueinander stehenden Ebenen (Astigmatismus) führt zu elliptischen Ringstrukturen. Eine Bewegung der Probe während der Aufnahme (engl. *drift*) ergibt in der senkrecht zur Bewegung stehenden Richtung abgeschnittene Ringstrukturen. In beiden Fällen sind die jeweiligen Aufnahmen zu verwerfen.

#### 4.11.5.3 Partikelbildersélection

Die nach den in Kapitel 4.11.5.2 genannten Kriterien ausgewählten Micrographen wurden mithilfe des Programms *em2em* in *mrc*-Dateien umgewandelt und mithilfe der *signature*-Software [11] wurden potentielle ribosomale Partikel auf den Micrographen identifiziert. Mit Hilfe der *SPIDER-Software* wurden die identifizierten Ribosomen als Einzelbilder (Partikelbilder) gespeichert und manuell gesichtet oder dem sogenannten *Autopicking* zugeführt. Bei diesem semiautomatischen Vorgang werden Partikelbilder ausgewählt, die in die Volumenrekonstruktion einfließen sollen.

#### 4.11.5.4 Sortierung und Volumenrekonstruktion

Wie man in den letzten Jahren festgestellt hat, ist ein Hauptproblem bei der Volumenrekonstruktion ribosomaler Komplexe die Heterogenität der Probe. Diese hat verschiedene Ursachen.

1. Die ribosomalen Komplexe sind eventuell zum Teil zerfallen.
2. Der ribosomale Komplex kann eine intrinsische Flexibilität aufweisen.
3. Die Ribosomen sind eventuell in die ribosomalen Untereinheiten dissoziiert.
4. Die Ribosomen können verschiedene Konformationen annehmen [55].

Die Abtrennung zerfallener ribosomaler Komplexe und ribosomaler Untereinheiten ist auf biochemischem Wege weitestgehend möglich. Die Separierung ribosomaler Konformationen und flexibler Zustände des ribosomalen Komplexes ist auf diesem Wege allerdings nicht durchführbar. Als Problem erweist sich diese Heterogenität bei der Volumenrekonstruktion *in silico* deshalb, da eine Mittelung über alle Partikel vorgenommen wird (*single particle* Methode). Dabei wird davon ausgegangen, dass alle Partikel zu einer Probenart gehören, der Datensatz also homogen ist. Da dies aus den oben erwähnten Gründen jedoch niemals der Fall ist, ist eine dreidimensionale Sortierung (*multiparticle refinement* [46]) erforderlich, da diese die Auftrennung verschiedener Konformationen und flexibler Zustände ermöglicht. Bei dieser Sortierung werden alle Partikelbilder zunächst mit einer Referenz verglichen (*template matching*). In einem iterativen Vorgang werden die Bilder in einem immer kleineren Winkelbereich gedreht (engl. *angular refinement*), um diejenige Referenz-Projektion zu finden, die diesem Partikelbild am ähnlichsten ist. Dieses *Alignment* der Partikelbilder auf die Referenz wird als innere Schleife des *multiparticle refinements* bezeichnet. Wenn keine oder kaum noch Bewegung der Partikelbilder zu beobachten ist, so kann in einer äußeren Schleife eine weitere Referenz zu dem Datensatz hinzugefügt werden. Die Winkelsuche, also die Drehung der Partikelbilder, beginnt von neuem und der Datensatz trennt sich auf die zwei vorgegebenen Referenzen

auf. Die Winkelsuche wird nun wiederum mit immer kleineren Schritten durchgeführt, bis sich zwei stabile Populationen von Partikelbildern ergeben. Eine stabile Population ist erkennbar an geringer Änderung der Orientierungsparameter (Winkel und Translation) im vorgegebenen Bereich. In der äußeren Schleife können nun Partikelbilder entfernt und/oder eine weitere Referenz hinzugefügt werden, so dass die Winkelsuche wieder von neuem beginnen kann. Das Hinzufügen neuer Referenzen in der äußeren Schleife erfolgt so lange, wie sich der Datensatz in unterschiedliche Populationen auftrennt. Dadurch können die erhaltenen Volumenrekonstruktionen immer weiter verfeinert werden und es werden feinere Unterschiede zwischen den Populationen erkennbar.

Die Verfeinerung der Rekonstruktionen wird bei verschiedenen Pixelgrößen durchgeführt. Dabei wird mit vierfach verkleinerten (dezimierten) Partikelbildern mit einer Pixelgröße von  $5,04 \text{ \AA}$  gestartet, bei der nur grobe Details berücksichtigt werden. So können etwa bei dieser Pixelgröße faktortragende und faktorlose Ribosomen getrennt werden. Die Sortierung bei dieser Pixelgröße spart zudem sehr viel Rechenzeit ein. Je niedriger die Pixelgröße, desto mehr Details können zwar unterschieden werden, aber umso mehr Rechenzeit wird auch für die einzelnen Verfeinerungsrunden benötigt. Für höher aufgelöste Strukturen im subnanometer-Bereich müssen Informationen bei hohen Raumfrequenzen wieder hergestellt werden (*high frequency enhancement*). Durch Vergleich mit hoch aufgelösten Kristallstrukturen kann eine Filterfunktion bestimmt werden, die zur Verstärkung der hohen Frequenzen herangezogen wird. Die Verfeinerung guter Populationen getrennt vom restlichen Datensatz ermöglicht das Arbeiten bei niedrigen Pixelgrößen und erlaubt das Auftrennen in Subpopulationen, die sich nur geringfügig unterscheiden.

#### 4.11.5.5 Bestimmung der Auflösung

Die Auflösung (engl. *resolution*) einer erhaltenen Volumenrekonstruktion wurde mithilfe der *Fourier Shell Correlation* (FSC) ermittelt [60]. Dazu wurden die Partikelbilder der jeweiligen Volumenrekonstruktion zufällig in zwei Hälften geteilt (gerade und ungerade Partikelbilder-Nummern) und für beide Hälften ein Volumen rekonstruiert. Die Übereinstimmung der Raumfrequenzen im Fourier-Raum beider Volumenrekonstruktionen wurde miteinander verglichen. Die Auflösung ergibt sich dann nach Gleichung 4.3 aus der Raumfrequenz  $k$ , bei der ein FSC-Wert von 0,5 abgelesen wird [32]. Dies ist eine von mehreren Möglichkeiten, die Auflösung zu bestimmen und wurde im Rahmen dieser Arbeit angewandt.

$$\text{Auflösung} = \frac{\text{Pixelgröße}}{k_{0,5}} \quad (4.3)$$

#### 4.11.5.6 *Docking*

Die Interpretation der erhaltenen Elektronendichten erforderte das einpassen (engl. *docking*) bekannter Kristallstrukturen in die Dichten. Dieses *docking* wurde für den 70S·EF-G·GDP·FA-Komplex von Paul C. Whitford aus dem Arbeitskreis von Karissa Y. Sanbonmatsu (Theoretical Biology and Biophysics Group, Theoretical Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, USA) durchgeführt. Das angewendete Verfahren ist ein neuentwickelter Algorithmus (MDFIT, [63]). Bei diesem flexiblen *docking* werden molekulare Dynamiken berücksichtigt.



## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---

### 5.1 Mechanismus der Translokationsreaktion

Der in Kapitel 3.1 erwähnte bakteriostatische Effekt der Fusidinsäure wurde ausgenutzt, um einen Komplex zu isolieren, der aus 70S Ribosomen von *T. thermophilus*, EF-G, GDP und Fusidinsäure (FA) besteht. Der erhaltene Komplex (70S·EF-G·GDP·FA) ergab in der kryo-elektronenmikroskopischen Analyse zwei bisher nicht erkannte Subpopulationen innerhalb der ribosomalen Komplexe mit EF-G. Die stärker besetzte Subpopulation zeigte eine Verdrehung (engl. *swivelling*) des 30S-Kopfes bei gleichzeitigem *unratcheting* des 30S-Körpers. Die tRNA hielt dabei Kontakt mit der P-Stelle des Kopfes während gleichzeitig eine Interaktion mit der E-Stelle der 30S Plattform zu beobachten war. Es handelt sich hier also um eine neue *hybrid site* innerhalb der kleinen Untereinheit, die von der Domäne IV des Elongationsfaktors G stabilisiert wird. Diese neue Position eines translozierenden Ribosoms wurde als *pe/E hybrid site* bezeichnet und ist eines der fehlenden Puzzleteile innerhalb der Translokationsreaktion.

Die Ergebnisse sind im Detail in der auf den folgenden Seiten wiedergegebenen Veröffentlichung ([doi:10.1038/nature09547](https://doi.org/10.1038/nature09547)) erläutert.

# Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites

Andreas H. Ratje<sup>1,2</sup>, Justus Loerke<sup>1</sup>, Aleksandra Mikolajka<sup>3,4</sup>, Matthias Br nner<sup>1</sup>, Peter W. Hildebrand<sup>1</sup>, Agata L. Starosta<sup>3</sup>, Alexandra D nh fer<sup>3</sup>, Sean R. Connell<sup>5</sup>, Paola Fucini<sup>5</sup>, Thorsten Mielke<sup>1,6</sup>, Paul C. Whitford<sup>7</sup>, José N. Onuchic<sup>8</sup>, Yanan Yu<sup>9</sup>, Karissa Y. Sanbonmatsu<sup>7</sup>, Roland K. Hartmann<sup>2</sup>, Pawel A. Penczek<sup>10</sup>, Daniel N. Wilson<sup>3,4</sup> & Christian M. T. Spahn<sup>1</sup>

**The elongation cycle of protein synthesis involves the delivery of aminoacyl-transfer RNAs to the aminoacyl-tRNA-binding site (A site) of the ribosome, followed by peptide-bond formation and translocation of the tRNAs through the ribosome to reopen the A site<sup>1,2</sup>. The translocation reaction is catalysed by elongation factor G (EF-G) in a GTP-dependent manner<sup>3</sup>. Despite the availability of structures of various EF-G-ribosome complexes, the precise mechanism by which tRNAs move through the ribosome still remains unclear. Here we use multiparticle cryoelectron microscopy analysis to resolve two previously unseen subpopulations within *Thermophilus thermophilus* EF-G-ribosome complexes at subnanometre resolution, one of them with a partly translocated tRNA. Comparison of these substates reveals that translocation of tRNA on the 30S subunit parallels the swivelling of the 30S head and is coupled to unratcheting of the 30S body. Because the tRNA maintains contact with the peptidyl-tRNA-binding site (P site) on the 30S head and simultaneously establishes interaction with the exit site (E site) on the 30S platform, a novel intra-subunit 'pe/E' hybrid state is formed. This state is stabilized by domain IV of EF-G, which interacts with the swivelled 30S-head conformation. These findings provide direct structural and mechanistic insight into the 'missing link' in terms of tRNA intermediates involved in the universally conserved translocation process.**

After peptide-bond formation, pre-translocational (PRE) ribosomes carry a peptidyl-tRNA at the A site and a deacylated tRNA at the P site<sup>1,3,4</sup>. This is a highly dynamic state of the ribosome, which fluctuates between classical states with A tRNA and P tRNA and hybrid states with A/P tRNAs (A/P denotes that the tRNA is in the A site on the 30S subunit and the P site on the 50S subunit) and P/E tRNAs<sup>5-8</sup>. Hybrid state formation is coupled to spontaneous rotation of the 30S subunit relative to the 50S subunit<sup>9-11</sup> and is stabilized by the binding of EF-G<sup>12-14</sup>. The ratchet-like subunit rearrangement induced by EF-G and eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) also includes a swivel movement of the head that is roughly orthogonal to the inter-subunit rotation of the ribosomal subunits<sup>14-16</sup>. EF-G catalyses translocation of the hybrid-state tRNAs on the 30S subunit to form a post-translocational (POST) state ribosome with tRNAs located at classical P and E sites. The translocation process is accelerated by the GTPase activity of EF-G stimulated by the ribosome<sup>17,18</sup>. However, it is still not known how tRNAs are translocated with respect to the 30S subunit and how the messenger RNA is advanced by one codon.

Structural snapshots of the translocation process come from cryoelectron microscopy and X-ray analysis of EF-G bound to ribosome complexes<sup>12-14,19</sup>. Despite considerable effort<sup>12,20-22</sup>, no direct structural information is available for ribosomal PRE complexes simultaneously

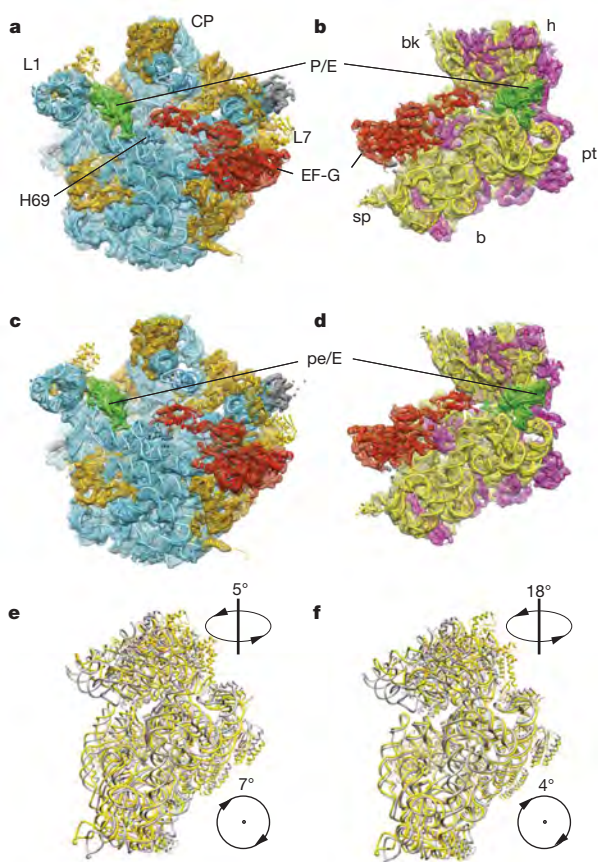
containing EF-G and an A tRNA. It seems that this state is too dynamic and transient to be captured, resulting in either a POST state containing EF-G or a PRE state without EF-G bound<sup>20,22</sup>. Indeed, the stable EF-G-bound POST state determined by X-ray crystallography reveals a non-ratcheted ribosome with tRNAs in classical P/P and E/E sites<sup>19</sup>. Therefore, structural insights into intermediate states of translocation—that is, ratcheted ribosomal EF-G complexes—have used complexes without an A-site peptidyl-tRNA<sup>12-14</sup>.

In this study we used the antibiotic fusidic acid (FA) to stall EF-G on the 70S ribosome. FA permits the hydrolysis of GTP by EF-G but prevents the associated changes in EF-G that normally accompany hydrolysis<sup>19</sup>. After complex formation and the collection of cryoelectron microscopy data, we employed multiparticle refinement to resolve the heterogeneity of the data (Supplementary Fig. 1). In the first phase of multiparticle refinement a large population of particle images of ribosomes containing EF-G was obtained that yielded a structure in a ratcheted conformation. As refinement progressed to higher resolution, the presence of intrinsic conformational heterogeneity necessitated a second phase of multiparticle refinement, resulting in two final reconstructions of the 70S-EF-G-GDP-FA complex (Fig. 1), at resolutions of 7.6 Å and 7.8 Å (using a 0.5 Fourier shell correlation cut-off criterion), respectively (Supplementary Fig. 2). Both maps have density attributed to EF-G, but they show significant conformational differences (Supplementary Movies 1 and 2): specifically, the substates are distinguished by different degrees of subunit ratcheting and positioning of the L1 protuberance, and also by the swivel movement of the head of the 30S subunit relative to the body/platform (Fig. 1e, f, Supplementary Figs 3 and 4, and Supplementary Table 1). Unlike previous cryoelectron microscopy and X-ray structures of ribosome-EF-G complexes, movement of the head and body/platform of the 30S subunit is uncoupled: in substate I, the 30S subunit is ratcheted by about 7° relative to the 50S subunit, but there is only a modest (roughly 5°) swivelling of the 30S head. In contrast, the 30S in substate II is only ratcheted by about 4°, but there is a very large (roughly 18°) swivel of the head (Supplementary Table 1).

The identification of two different ratcheted substates within the 70S-EF-G-GDP-FA complex prompted us to investigate whether such intrinsic heterogeneity also exists in our previous 70S-EF-G-GMPPNP cryoelectron microscopy data set<sup>14</sup>. Additional multiparticle refinement did indeed reveal that the 70S-EF-G-GMPPNP complex could be subdivided into two substates that seemed to be equivalent to those identified in the 70S-EF-G-GDP-FA complex (Supplementary Fig. 5 and Supplementary Table 1). Our findings here provide evidence supporting the emerging energy-landscape model that allows the sampling of several metastable conformations for a defined ribosomal

<sup>1</sup>Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Charit  – Universitätsmedizin Berlin, Ziegelstrasse 5–9, 10117-Berlin, Germany. <sup>2</sup>Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, 35037 Marburg, Germany. <sup>3</sup>Gene Center and Department of Biochemistry, Ludwig-Maximilians-Universität, Feodor-Lynenstrasse 25, 81377 München, Germany. <sup>4</sup>Center for Integrated Protein Science, Ludwig-Maximilians-Universität München, 81377 München, Germany. <sup>5</sup>Frankfurt Institute for Molecular Life Sciences, Institute of Organic Chemistry and Chemical Biology, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 7, D-60438 Frankfurt am Main, Germany. <sup>6</sup>UltraStrukturNetzwerk, Max Planck Institute for Molecular Genetics, 14195 Berlin, Germany. <sup>7</sup>Theoretical Biology and Biophysics Group, Theoretical Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico 87545, USA. <sup>8</sup>Center for Theoretical Biological Physics and Department of Physics, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093, USA. <sup>9</sup>Florida State University, Department of Computer Science, Tallahassee, Florida 32306, USA. <sup>10</sup>The University of Texas – Houston Medical School, 6431 Fannin, Houston, Texas 77030, USA.

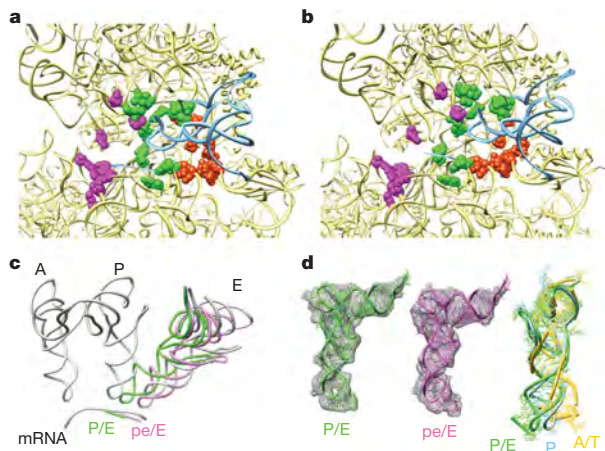




**Figure 1 | Substates I ( $TI^{PRE}$ ) and II ( $TI^{POST}$ ) of the 70S-EF-G-GDP-FA complex.** **a–d**, Cryoelectron microscopy maps of  $TI^{PRE}$  (**a, b**) and  $TI^{POST}$  (**c, d**) of the 70S-EF-G-GDP-FA complex are shown in mesh form with docked models in ribbon representation: EF-G (red), tRNA (green), 23S/5S rRNA (blue), 50S ribosomal proteins (orange), 16S rRNA (yellow) and the 30S ribosomal proteins (magenta). The maps are shown from the 30S side with the 30S subunit computationally removed (**a, c**) and from the 50S side with the 50S subunit computationally removed (**b, d**). CP, central protuberance; bk, beak; sp, spur; pt, platform; h, head; b, back; L1 and L7, ribosomal proteins L1 and L7, respectively; H69, helix 69 of 23S rRNA. **e, f**, The 30S subunit of  $TI^{PRE}$  (**e**) and  $TI^{POST}$  (**f**) (yellow) is compared with the 30S subunit of the POST state<sup>19</sup> (grey) by aligning the respective 50S subunits. Arrows with numbers indicate the direction and magnitude (Supplementary Table 1) of the inter-subunit rotation and the head-swivel from the unrotated state to  $TI^{PRE}$  or  $TI^{POST}$ , respectively.

complex<sup>8</sup>. The subnanometre resolution of the 70S-EF-G-GDP-FA subpopulations enabled the visualization of secondary structure and thus the generation of molecular models (Fig. 1) by applying our newly developed MDFIT algorithm (see Methods). Comparison with available structures reveals that substate I is similar in conformation to the ratcheted substate of the PRE complex<sup>9,10</sup> (Supplementary Table 1) and also that the tRNA is bound in a hybrid P/E site (Fig. 2a). We therefore consider substate I to be related to a pre-translocational intermediate ( $TI^{PRE}$ ).

In contrast, substate II of the 70S-EF-G-GDP-FA complex represents a novel conformational state of the 70S ribosome. The anticodon stem-loop (ASL) of the tRNA has moved by 8–10 Å compared with the P/E position of  $TI^{PRE}$  as it maintains strong association with the P-site components of the head and follows the large 18° swivel movement of the head (Fig. 2b and Supplementary Movie 3). Because the tRNA interacts simultaneously with P-site components of the head as well as E-site components of the platform, it can be thought of as a 30S

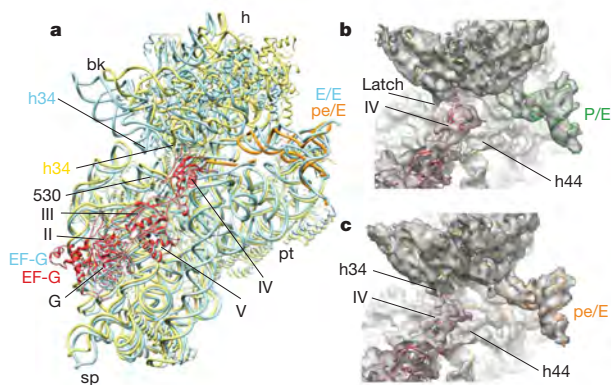


**Figure 2 | Localization and conformation of the tRNA of substates I ( $TI^{PRE}$ ) and II ( $TI^{POST}$ ).** **a, b**, Close-up of the tRNA-binding regions of the 30S subunit of  $TI^{PRE}$  (**a**) and  $TI^{POST}$  (**b**). The 30S subunit and tRNAs are shown as yellow and blue ribbons, respectively; ribosomal residues that contact A, P and E tRNA (magenta, green and orange) are shown as spheres. **c**, In a common 50S alignment, the P/E tRNA (green) of  $TI^{PRE}$  and the pe/E tRNA (magenta) of  $TI^{POST}$  together with their respective mRNA codons are compared with mRNA and classical A, P and E tRNA positions (grey). **d**, Density for the tRNAs (wire mesh) with molecular models for the P/E tRNA of  $TI^{PRE}$  (left, green) and the pe/E tRNA of  $TI^{POST}$  (middle, magenta). On the right, the model for P/E tRNA (green), which is essentially the same as that for pe/E-tRNA (root mean squared deviation 1.5 Å), is compared with a classical P tRNA (blue) and an A/T tRNA (yellow) by alignment of the acceptor-stem, D-stem and T-stem loops.

intra-subunit hybrid site (Fig. 2b). Moreover, because the contacts of the CCA end of the tRNA with the E site on the 50S subunit remain unaffected, we extend the previous nomenclature of hybrid sites<sup>7</sup> and refer to this newly identified state as a pe/E hybrid state (P site on head and E site on platform of the 30S subunit, and E site on the 50S subunit).

The ASL of the pe/E tRNA together with the bound mRNA codon is very close to the position of a fully translocated E/E tRNA (Fig. 2c and Supplementary Movie 4). Apparently, head-swivelling coupled with partial unratcheting of the body/platform of the 30S subunit leads to tRNA translocation, suggesting that substate II of the 70S-EF-G-GDP-FA complex is related to a post-translocational intermediate state ( $TI^{POST}$ ). We note that although the intermediate states visualized here contain only one tRNA, a second tRNA (ap/P) can be superimposed on the  $TI^{POST}$  state without steric interference with the binding position of EF-G (Supplementary Fig. 6). Thus, the structures presented here seem to be valid models for translocation intermediates (see also Supplementary Information for further discussion), but structures of translocation intermediates with two tRNAs will be necessary for the validation of these predictions. The presence of the ratchet-like subunit rearrangement in the yeast 80S-eEF2-sordarin complex<sup>15</sup> hints that translocation in prokaryotes and eukaryotes may use related intermediate conformations. This structure showed a strong head swivel comparable to that of bacterial  $TI^{POST}$  combined with a strong inter-subunit rotation of bacterial  $TI^{PRE}$ . Thus, the conformation of the 80S-eEF2-sordarin complex<sup>15</sup>, although obtained by classical single-particle methods, may present a further intermediate between  $TI^{PRE}$  and  $TI^{POST}$ .

Whereas the P/E and pe/E tRNAs are in a twisted conformation (Fig. 2d), the overall conformations of EF-G in  $TI^{PRE}$  and  $TI^{POST}$  are remarkably similar to each other (Fig. 1) and to that observed in the cryoelectron microscopy reconstruction of the 70S-EF-G-GMPPNP<sup>14</sup> as well as in the recent X-ray structure of EF-G-GDP-FA bound to a POST-state ribosome<sup>19</sup> (Fig. 3a). However, one difference between the two EF-G-GDP-FA substates relates to the interaction patterns of domain IV of EF-G: in the  $TI^{PRE}$  state, domain IV does not seem to



**Figure 3** | EF-G stabilizes the swivelled head movement in the  $T1^{POST}$  state. **a**, Comparison of the position of FA-stalled EF-G and the 30S subunit between  $T1^{POST}$  and the POST-state 70S-EF-G-GDP-FA complex<sup>19</sup>. All shown components of the POST-state 70S-EF-G-GDP-FA complex<sup>19</sup> are depicted as blue ribbons. The 30S, EF-G and pe/E tRNA of  $T1^{POST}$  are represented by yellow, red and orange ribbons, respectively. **b**, **c**, Close-up of the decoding region and domain IV of EF-G in the same orientation as in **a**. The surfaces of  $T1^{PRE}$  (**b**) and  $T1^{POST}$  (**c**) are transparent with molecular models in ribbon representation (30S subunit, yellow; EF-G, red, P/E tRNA, green; pe/E tRNA, orange). The arrows mark the closed latch between helix h34 and the 530 region of  $T1^{PRE}$  (**b**) and the interaction between h34 and domain IV of EF-G within  $T1^{POST}$ .

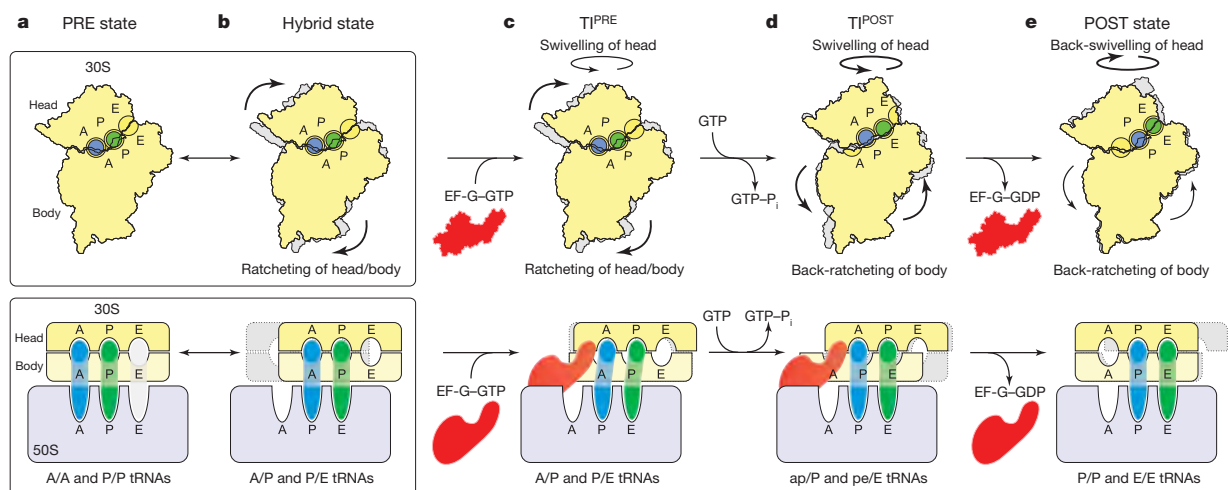
interact significantly with the ribosome (Fig. 3b), whereas a small shift in the binding position of EF-G and the large swivel of the head facilitate a more extensive interaction of domain IV of EF-G with helix h34 of the 16S rRNA in the  $T1^{POST}$  state (Fig. 3c). Together, h34 and the nucleotide 530 region of 16S rRNA form the so-called latch of the mRNA entry channel. Because of the head-swivel in the  $T1^{POST}$  state, h34 has moved about 12 Å away from the 530 region, leading to an opening of the latch (Fig. 3c) similar to that observed previously when eEF2 was trapped on the yeast 80S ribosome with sordarin<sup>15</sup>. This may facilitate the movement of the mRNA-tRNA<sub>2</sub> complex. Consistent

with this observation, transient protection of h34 by EF-G against chemical modification during the translocation reaction has been reported previously<sup>23</sup>. The direct interaction of domain IV of EF-G with h34 may therefore bias the energy landscape of the ribosome towards  $T1^{POST}$ .

Until now, intermediate states of inter-subunit rotation have been considered to be intermediates on the pathway to the fully rotated state<sup>16</sup>. The present findings implicate unratcheting (in combination with the large swivel of the 30S head), rather than ratcheting, as being coupled to the translocation movement of the tRNAs and the mRNA with respect to the 30S subunit. Collectively, the insights gained from the structures of the  $T1^{PRE}$  and  $T1^{POST}$  states enable us to provide a structural explanation for the process of translocation in a model in which tRNA movements are facilitated by head-swivel, ratcheting and unratcheting motions of the ribosome (Fig. 4). These motions may be influenced by the GTPase reaction on EF-G; a network of interactions involving domain III and the ordered switch I region of EF-G and the  $\gamma$ -phosphate of GTP was proposed to stabilize the rotated state of the 30S subunit<sup>14</sup>. Accordingly, fast GTP hydrolysis by EF-G<sup>17</sup> could destabilize the direct and indirect interactions of switch I of EF-G with the maximally rotated 30S subunit<sup>14,24</sup>, therefore increasing the propensity of the 30S subunit to rotate backwards. The unratcheting motion produces a counter-movement of the body/platform with respect to the head, thereby reducing the distance that the tRNAs have to travel during translocation. Intra-subunit hybrid states allow the 30S subunit to maintain partial contacts with the tRNAs at any time of the translocation reaction. In the context of the ribosome's functioning during translocation as a Brownian ratchet machine<sup>25</sup>, our model suggests that EF-G acts as a dynamic pawl, decoupling the unratcheting motions of the ribosome from the transition of hybrid-state tRNAs back into classical states. EF-G thereby provides directionality and accelerates translocation of the tRNAs by means of several intermediate inter-subunit and intra-subunit hybrid states into the classical P/P and E/E sites of the POST state.

## METHODS SUMMARY

Tight-coupled 70S ribosomes from *Thermus thermophilus* were isolated by sucrose-gradient centrifugation and incubated with EF-G in the presence of GTP and FA. The resulting complexes were flash-frozen and imaged under low-dose conditions



**Figure 4** | Model for translocation. **a**, **b**, The PRE ribosome exists in a dynamic equilibrium between base states with classical A/A and P/P tRNAs (**a**) and rotated states with hybrid A/P and P/E tRNAs<sup>6,7,9-11</sup> (**b**). **c**, Binding of EF-G-GTP to PRE state (**a**) or hybrid state (**b**) stabilizes the ratcheted state<sup>12</sup> as observed in  $T1^{PRE}$ . **d**, Fast GTP hydrolysis by EF-G<sup>17</sup> accelerates translocation by means of an unlocking step on the 30S subunit<sup>18</sup>. Domain IV of EF-G uncouples unratcheting from the reverse movement of the A/P and P/E tRNAs

back into classical states; that is, a doorstop function. Through a head-swivelling and unratcheting motion, the tRNAs move from aa/P and pp/E into the 30S intra-subunit ap/P and pe/E hybrid states. **e**, Complete unratcheting of the 30S subunit leads to the POST-state 70S-EF-G complex<sup>19</sup>. Back-swivelling of the 30S head re-establishes tRNAs in the classical (pp/P) P and E (ee/E) states. Translocation is completed by the dissociation of EF-G-GDP.

with the use of an FEI Polara G2 electron microscope. The collected data were digitized and processed with multiparticle refinement protocols implemented in SPIDER<sup>26</sup>. To interpret the resulting cryoelectron microscopy maps in molecular terms, a newly developed algorithm (MDFIT)<sup>27</sup> that integrates molecular simulation with experimental maps was employed.

**Full Methods** and any associated references are available in the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Received 5 February; accepted 30 September 2010.**

- Frank, J. & Spahn, C. M. The ribosome and the mechanism of protein synthesis. *Rep. Prog. Phys.* **69**, 1383–1417 (2006).
- Schmeing, T. M. & Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature* **461**, 1234–1242 (2009).
- Shoji, S., Walker, S. E. & Fredrick, K. Ribosomal translocation: one step closer to the molecular mechanism. *ACS Chem. Biol.* **4**, 93–107 (2009).
- Ramakrishnan, V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**, 557–572 (2002).
- Moazed, D. & Noller, H. F. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**, 142–148 (1989).
- Munro, J. B., Altman, R. B., O'Connor, N. & Blanchard, S. C. Identification of two distinct hybrid state intermediates on the ribosome. *Mol. Cell* **25**, 505–517 (2007).
- Blanchard, S. C. *et al.* tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 12893–12898 (2004).
- Munro, J. B., Sanbonmatsu, K. Y., Spahn, C. M. & Blanchard, S. C. Navigating the ribosome's metastable energy landscape. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 390–400 (2009).
- Agirrezabala, X. *et al.* Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by spontaneous ratcheting of the ribosome. *Mol. Cell* **32**, 190–197 (2008).
- Julian, P. *et al.* Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 16924–16927 (2008).
- Fischer, N. *et al.* Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. *Nature* **466**, 329–333 (2010).
- Valle, M. *et al.* Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**, 123–134 (2003).
- Frank, J. & Agrawal, R. K. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**, 318–322 (2000).
- Connell, S. R. *et al.* Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors. *Mol. Cell* **25**, 751–764 (2007).
- Spahn, C. M. *et al.* Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* **23**, 1008–1019 (2004).
- Zhang, W., Dunkle, J. A. & Cate, J. H. Structures of the ribosome in intermediate states of ratcheting. *Science* **325**, 1014–1017 (2009).
- Rodnina, M., Savelsbergh, A., Katunin, V. I. & Wintermeyer, W. Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* **385**, 37–41 (1997).
- Savelsbergh, A. *et al.* An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol. Cell* **11**, 1517–1523 (2003).
- Gao, Y. G. *et al.* The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science* **326**, 694–699 (2009).
- Penczek, P. A., Frank, J. & Spahn, C. M. A method of focused classification, based on the bootstrap 3D variance analysis, and its application to EF-G-dependent translocation. *J. Struct. Biol.* **154**, 184–194 (2006).
- Agrawal, R. K. *et al.* EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. *Nature Struct. Biol.* **6**, 643–647 (1999).
- Scheres, S. H. *et al.* Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nature Methods* **4**, 27–29 (2007).
- Matassova, A. B., Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. Elongation factor G-induced structural change in helix 34 of 16S rRNA related to translocation on the ribosome. *RNA* **7**, 1879–1885 (2001).
- Ticu, C. *et al.* Conformational changes in switch I of EF-G drive its directional cycling on and off the ribosome. *EMBO J.* **28**, 2053–2065 (2009).
- Spirin, A. S. The ribosome as a conveying thermal ratchet machine. *J. Biol. Chem.* **284**, 21103–21119 (2009).
- Schuetz, J. C. *et al.* GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding. *EMBO J.* **28**, 755–765 (2009).
- Whitford, P. C. *et al.* Accommodation of aminoacyl-tRNA into the ribosome involves reversible excursions along multiple pathways. *RNA* **16**, 1196–1204 (2010).

**Supplementary Information** is linked to the online version of the paper at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature).

**Acknowledgements** The present work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; SFB 740 TP A3 and TP Z1, SP 1130/2-1 to C.M.T.S., FU579 1-3 to P.F., HA 1672/7-5 to R.K.H. and WI3285/1-1 to D.N.W.), the European Union 3D-EM Network of Excellence (to C.M.T.S.), the European Union and Senatsverwaltung für Wissenschaft, Forschung und Kultur Berlin (UltraStructureNetwork, Anwenderzentrum) and US National Institutes of Health (NIH; grant GM 60635 to P.A.P.), the Cluster of Excellence 'Macromolecular complexes' at the Goethe University Frankfurt (DFG Project EXC 115 to P.F. and S.C.), and the Human Frontiers of Science Program Young Investigators Award HFSP67/07 (to P.F.). We thank the New Mexico Computing Application Center for generous time on the Encanto Supercomputer. P.C.W. is currently funded by a LANL Director's Fellowship. This work was also supported by the Center for Theoretical Biological Physics sponsored by the National Science Foundation (NSF; grant PHY-0822283) with additional support from NSF-MCB-0543906, the LANL LDRD program and NIH grant R01-GM072686.

**Author Contributions** A.M., A.L.S. and A.D. prepared the complexes. A.H.R. and T.M. collected the cryoelectron microscopy data. A.H.R., J.L., M.B., S.R.C. and C.M.T.S. did the image processing. P.C.W., Y.Y., J.O. and K.Y.S. developed and employed the MDFIT method. P.W.H. participated in docking and analysed the FA-binding site. A.H.R., R.K.H., S.R.C., P.F., P.A.P., D.N.W. and C.M.T.S. discussed the results and wrote the paper.

**Author Information** The electron density maps and models of the Tl<sup>PRE</sup> and the Tl<sup>POST</sup> complexes have been deposited in the 3D-EM database with accession numbers EMD-1798 and EMD-1799, and in the Protein Data Bank database with PDB IDs 2xxy, 2xtg, 2xux and 2xuy. Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints). The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of this article at [www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature). Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M.T.S. ([christian.spahn@charite.de](mailto:christian.spahn@charite.de)) or D.N.W. ([wilson@lmb.uni-muenchen.de](mailto:wilson@lmb.uni-muenchen.de)).

## METHODS

**Formation of the EF-G-70S-GDP-FA complex.** The *fusA* gene, encoding EF-G, was cloned from *Thermus thermophilus* HB8 genomic DNA into pET-46 Ek/LIC vector using primers (TthEFG\_for, 5'-GCG CGC CCG GTG GTG ATG CAG CTC TTC CTG GGC TCC GCC CTG AAG AAC-3'; TthEFG\_rev, 5'-GTT CTT CAG GGC GGA GCC CAG GAA GAG CTG CAT CAC CAC CGG GCG CGC-3') in accordance with the manufacturer's instructions (Novagen) and expressed in BL21 (DE3) cells. Recombinant EF-G protein was then purified with a Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetate affinity column, followed by gel filtration in a buffer containing 10 mM Tris pH 7.8, 100 mM NaCl and 10 mM 2-mercaptoethanol. Tight-coupled 70S ribosomes were purified from exponential-phase *T. thermophilus* cells by using sucrose-density-gradient centrifugation, as described previously for 30S subunits<sup>28</sup>. As observed previously, the ribosomes contained a co-purified tRNA<sup>14,29</sup>. Binding of EF-G to 70S ribosomes was done by incubating 20 μM purified EF-G protein for 15 min with 5 μM *T. thermophilus* 70S ribosomes, 500 μM GTP and 500 μM FA at 65 °C, in a buffer containing 10 mM HEPES-KOH pH 7.8, 30 mM MgCl<sub>2</sub> and 75 mM NH<sub>4</sub>Cl. The occupancy of EF-G in the complexes was about 60–70%, as judged by centrifugal binding assay<sup>28</sup>.

**Cryoelectron microscopy and image processing.** Ribosomal complexes were diluted to a concentration of 30 nM and subsequently frozen onto Quantifoil grids using a Vitrobot (FEI) device. Micrographs were collected on a Tecnai G2 Polara (FEI) at 300 kV and a magnification of ×39,000 under low-dose conditions (19 e<sup>-</sup> Å<sup>-2</sup>) and scanned on a D8200 PrismaScan drum scanner (Heidelberger Druckmaschinen) with a step size of 4.758 μm, corresponding to 1.26 Å on the specimen scale.

The Contrast Transfer Function defocus values for the micrographs were determined with CTFind<sup>30</sup>. Ribosomal projection images were automatically identified with the program Signature<sup>31</sup> and were subsequently screened visually or automatically. From the selected projections, a reconstruction was generated by projection matching procedures and refined with the SPIDER software package<sup>32</sup>. The complete data set comprised 586,848 projection images collected from 677 micrographs at a defocus range of 1.3–4.8 μm. During the later refinement rounds, positivity of the reference volumes was enforced, the power spectrum of the cryoelectron microscopy map was scaled to the power spectrum of a model density derived from the atomic coordinates of the X-ray structure of the 70S ribosome<sup>33</sup>, and the map was subsequently low-pass filtered according to the current resolution estimate.

After a first phase of multiparticle refinement<sup>20,26,34,35</sup>, performed with three-times or two-times decimated pictures, we obtained a major subpopulation (52%; 303,665 particle images) that had strong EF-G density (Supplementary Fig. 1). However, as refinement progressed and the resolution reached the subnanometre range the data set was deemed heterogeneous. Parts of the 30S subunit, especially the head domain, became partly disordered. A second phase of multiparticle refinement was therefore employed, leading to the subdivision of the data into two further substates having EF-G (Supplementary Fig. 1). Both data subsets were further refined individually at full image size. The final reconstructions of substate I (113,214 particle images) and substate II (156,332 particle images) reached resolutions of 7.8 Å and 7.6 Å, respectively (Supplementary Fig. 2).

Using a similar strategy we revisited the previous data set (362,361 particle images; 371 micrographs) of the 70S-EF-G-GMPPNP complex<sup>14</sup>. In a first phase of multiparticle refinement a major population (118,991 particle images) was further sorted by a second phase of multiparticle refinement resulting in substate I (58,911 particle images) and substate II (38,055 particle images). The resolutions of the maps were 9.6 Å and 10.5 Å, respectively. As the resolution for the reconstructions of the 70S-EF-G-GMPPNP complex was significantly lower (as a result of the smaller size data set) than the resolutions obtained for the 70S-EF-G-GDP-FA complex, we restricted the comparison to a dissection of only the global conformational changes, such as ratcheting and head swivelling.

Nevertheless, this analysis suggests that the 70S-EF-G-GMPPNP complex coexists in two substates that resemble TI<sup>PRE</sup> and TI<sup>POST</sup> of the 70S-EF-G-GDP-FA complex (Supplementary Fig. 5 and Supplementary Table 1). The ratio of particles within each of the two substates of the 70S-EF-G-GMPPNP complex is inverted with respect to the 70S-EF-G-GDP-FA complex: in the 70S-EF-G-GMPPNP complex the particle ratio of TI<sup>PRE</sup> and TI<sup>POST</sup> is about 3:2 (58,911:38,055), whereas in the 70S-EF-G-GDP-FA complex the ratio is about 2:3 (113,214:156,332). This means that most of the ribosomes in the 70S-EF-G complex stalled with a non-hydrolysable GTP analogue are in TI<sup>PRE</sup> (substate I), having a fully ratcheted 30S subunit but only a modest head swivel. However, in the 70S-EF-G complex stalled with GTP and FA, TI<sup>POST</sup> dominates and here an intermediate inter-subunit rotation is coupled with a large head swivel instead (Supplementary Figs 4 and 5 and Supplementary Table 1).

**Structure-based simulation fitting (MDFIT).** To determine atomic models consistent with the cryoelectron microscopy densities, we employed structure-based

molecular simulation<sup>27,36,37</sup> together with an energetic term developed in ref. 38, which incorporates the correlation between the simulated and experimental electron density throughout the simulation. Tama and co-workers<sup>38</sup> developed a similar method, which used a standard explicit solvent force field, as opposed to the structure-based force field. The advantage of the structure-based force field is that, because the potential energy function is defined by the X-ray structure, MDFIT retains tertiary contacts present in the X-ray structure without special constraints. Furthermore, because MDFIT explicitly includes all non-hydrogen atoms, there are no atomic clashes and proper stereochemistry is maintained in all fits.

We began the MDFIT procedure with a structure-based potential energy function defined by the classical unratcheted conformation. To induce hybrid-state formation and subunit pivoting we introduced the energetic term based on the correlation between the simulated cryoelectron microscopy map and the experimentally determined cryoelectron microscopy map. Specifically, the potential energy function is

$$V = V^{\text{SB}} + V^{\text{map}} = V^{\text{SB}} - W \sum_{ijk} \rho_{ijk}^{\text{sim}} \rho_{ijk}^{\text{exp}} \quad (1)$$

where  $W$  is the energetic weight of the map and  $\rho_{ijk}^{\text{exp}}$  and  $\rho_{ijk}^{\text{sim}}$  are the normalized experimental and simulated electron densities at voxel  $(i,j,k)$ , respectively. The quantity  $V^{\text{SB}}$  is the structure-based potential energy function. To calculate the simulated map, each atom is described by a Gaussian function of width 5 Å with the tail truncated at 1% of the peak value. Here, because the structure-based forcefield has 1 unit (all calculations were in reduced units) of stabilizing energy per atom (by construction), we set  $W$  to a comparable value of 150,000. The contributions to the force due to  $V^{\text{map}}$  were updated every 200 time steps. Fitting simulations employed Langevin dynamics. All simulations were performed with code based on Gromacs version 4.0.5 (refs 39, 40). Calculations were performed on the Encanto Supercomputer. The structure-based force field is freely available online (<http://smog.ucsd.edu>).

**Structural models.** The crystallographic structure of the 70S ribosome in complex with EF-G<sup>19</sup> (PDB IDs 2WRI and 2WRJ) was used as an initial structure for MDFIT. Proteins without side chains in the X-ray structure were removed. The carboxy-terminal domain of ribosomal protein L7 from PDB entry 1RQU<sup>41</sup> was inserted by hand, before fitting. The E-site tRNA was also removed from the initial X-ray structure in accordance with the cryoelectron microscopy map. The P-site tRNA was included in the fitting process. To facilitate fitting of the tRNA molecule into a P/E conformation, stabilizing interactions between the tRNA and the ribosome were removed. Stabilizing interactions between EF-G and the ribosome (due to their proximity in the crystal structure) were also excluded from the calculations, as were stabilizing interactions between L7 and all other components in the system. Further, crystallographic interactions found between the 3'-CCA end of the E-site tRNA with the E site of the 50S subunit were reintroduced as short-range (of the type 6-12; see refs 27, 36, 37) attractive interactions between the 3'-CCA end of the fitted tRNA and the E site of the 50S subunit. Introducing these interactions ensured that the 3'-CCA end of the P/E tRNA was in a conformation identical to that of a classically bound E-site tRNA, although because these interactions were short-range they only affected the process once the major rearrangements in the tRNA had already been achieved. Codon-anti-codon interactions were restrained by harmonic interactions with minima corresponding to the classical configuration.

The tRNA-ribosome-EF-G crystal structure was first manually aligned in VMD<sup>42</sup>, as a single rigid unit, to the map of TI<sup>PRE</sup>. The first round of fitting was performed with the TI<sup>PRE</sup> map after subjecting it to a 4-Å Gaussian low-pass filter. This filter decreased noise, effectively smoothing the energetic profile associated with  $V^{\text{map}}$ , which permitted more rapid fits. After 10<sup>6</sup> integration steps, the fit was continued for an additional 10<sup>6</sup> steps with  $V^{\text{map}}$  based on the TI<sup>PRE</sup> map filtered at 2 Å. The TI<sup>POST</sup> map, filtered at 2 Å, was then fitted, using the TI<sup>PRE</sup> 4-Å fitted structure as the initial structure.

28. Sharma, M. R. *et al.* Interaction of Era with the 30S ribosomal subunit implications for 30S subunit assembly. *Mol. Cell* **18**, 319–329 (2005).
29. Yusupov, M. M. *et al.* Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883–896 (2001).
30. Mindell, J. A. & Grigorieff, N. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **142**, 334–347 (2003).
31. Chen, J. Z. & Grigorieff, N. SIGNATURE: a single-particle selection system for molecular electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **157**, 168–173 (2006).
32. Frank, J. *et al.* SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Struct. Biol.* **116**, 190–199 (1996).
33. Selmer, M. *et al.* Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**, 1935–1942 (2006).
34. Spahn, C. M. & Penczek, P. A. Exploring conformational modes of macromolecular assemblies by multiparticle cryo-EM. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 623–631 (2009).

35. Connell, S. R. *et al.* A new tRNA intermediate revealed on the ribosome during EF4-mediated back-translocation. *Nature Struct. Mol. Biol.* **15**, 910–915 (2008).
36. Whitford, P. C. *et al.* An all-atom structure-based potential for proteins: bridging minimal models with all-atom empirical forcefields. *Proteins* **75**, 430–441 (2009).
37. Whitford, P. C. *et al.* Nonlocal helix formation is key to understanding S-adenosylmethionine-1 riboswitch function. *Biophys. J.* **96**, L7–L9 (2009).
38. Orzechowski, M. & Tama, F. Flexible fitting of high-resolution x-ray structures into cryoelectron microscopy maps using biased molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **95**, 5692–5705 (2008).
39. Lindahl, E., Hess, B. & van der Spoel, D. J. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Model.* **7**, 306–317 (2001).
40. Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D. & van Drunen, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **91**, 43–56 (1995).
41. Bocharov, E. V. *et al.* From structure and dynamics of protein L7/L12 to molecular switching in ribosome. *J. Biol. Chem.* **279**, 17697–17706 (2004).
42. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38 (1996).

## Supplemental Results and Discussion

### Molecular structures of sub-states I (TI<sup>PRE</sup>) and II (TI<sup>POST</sup>)

In order to generate pseudo-atomic models for sub-states I (TI<sup>PRE</sup>) and II (TI<sup>POST</sup>) we employed the MDFIT method to flexibly dock the X-ray structure of the 70S ribosome in complex with EF-G<sup>1</sup> into the cryo-EM density maps. The resulting models fit the density well (**Fig. 1**). In order to quantify the fit, we calculated FSC curves between our final cryo-EM maps and density derived from the corresponding atomic coordinates (**supp. Fig. S2**). The 0.5 cutoff of these FSC curves for the TI<sup>PRE</sup> and TI<sup>POST</sup> is at 8.0 Å and 7.5 Å, respectively, and thus comparable to the nominal resolution of the cryo-EM maps. Nevertheless, it is important to note that the resolution of the map is in the sub-nanometer range and therefore, small, local changes in the model are not necessarily reliable. Thus, it is reassuring that the pseudo-atomic models contain large-scale conformational changes of the ribosomes (intersubunit rotation, head swivel, movement of the L1 protuberance and the stalk base region) but are locally very close to the X-ray structures of the *T. thermophilus* ribosome<sup>1,2</sup>. For example the root mean square deviation (r.m.s.d.) values of the phosphate atoms for the main body of the 23S rRNA between the X-ray structure of the POST 70S•EF-G complex<sup>1</sup> and the TI<sup>PRE</sup> and TI<sup>POST</sup> are only 0.9 Å and 0.7 Å, respectively. This appears to be negligible compared to the nominal resolution of 7.6 - 7.8 Å of the cryo-EM maps. Also the head domains and the body/platform domains of the 30S subunits are locally essentially unchanged as reflected by r.m.s.d. values for the 16S rRNA of 1.0 – 1.1 Å. Only the comparison of the head domains of the POST 70S•EF-G complex<sup>1</sup> and the TI<sup>POST</sup> gives a slightly elevated r.m.s.d. value of 1.7 Å for the respective 16S rRNA phosphate atoms. As this value can be reduced to 1.1 Å when nucleotides 930-1044 constituting the 30S beak are left out for the comparison, there may be some smaller rearrangement of this region in addition to the large swivel movement of the head.

The MDFIT method essentially resulted in a rigid body fit for EF-G for both the TI<sup>PRE</sup> and the TI<sup>POST</sup> maps, i.e. the conformation of EF-G was hardly changed compared to the X-ray structure of the POST 70S•EF-G complex<sup>1</sup>. In contrast, significant changes can be observed for the tRNA structure present in the TI<sup>PRE</sup> and the TI<sup>POST</sup> complexes. The phosphate atoms of residues 2-72 of the tRNA have an r.m.s.d. value of 3.4 Å when the P-site tRNA of the POST 70S•EF-G complex<sup>1</sup> is compared with the pp/E tRNA of the TI<sup>PRE</sup> and comparison with the pe/E tRNA of the TI<sup>POST</sup> produces a r.m.s.d. value of 2.2 Å. The difference to the E-site tRNA of the POST 70S•EF-G complex<sup>1</sup> is even larger, as revealed by r.m.s.d. values of 4.6 Å when compared to either the pp/E tRNA of the TI<sup>PRE</sup> or the pe/E tRNA of the TI<sup>POST</sup>. Although the pp/E and the pe/E tRNA are different in conformation to the

classical P and E site tRNAs, they appear to be quite similar when compared with one other (r.m.s.d. value of 1.5 Å). Thus, the tRNA likely moves essentially as a rigid body during the partial translocation from the pp/E site of the  $Tl^{PRE}$  to the pe/E site of the  $Tl^{POST}$  (**Supp. Mov 1-4**). This tRNA movement can be described as a pivot at the CCA end, which is bound to its binding site on the 50S E-site. The L1 protuberance contacts the elbow of the tRNA in both states and has shifted to an intermediate position in the  $Tl^{POST}$  to accommodate the tRNA movement (**supp. Fig. S4**).

The conformational change of the pp/E tRNA and the pe/E tRNA relative to the structure of the classical P tRNA can be described by a kink at the junction of the anticodon stem and the D stem (**Fig. 2d**) since the tRNA models align very well at the acceptor stem, D-stem loop and T-stem loop (r.m.s.d. values of 0.8 Å and 0.9 Å for the pp/E-tRNA and pe/E-tRNA, respectively). As in the case of the A/T tRNA<sup>3</sup>, the pp/E and pe/E tRNAs are bent at the junction between D stem and anticodon stem, however, they bend in the opposite direction (**Fig. 2d**). Compared to the structure of the classical P-tRNA the kink in the pp/E-tRNA and the pe/E-tRNA moves the anticodon region by about 11-12 Å towards the E-site region. Thus, the conformational change present in both the pp/E- and pe/E-tRNAs suggests an active role for tRNA during the translocation step.

### Structure of FA-stalled EF-G

The structures of EF-G•GDP•FA appear identical or at least very similar in both the  $Tl^{PRE}$  and the  $Tl^{POST}$  (**Fig. 1; supp. Fig. S7**). Compared to the structures of vacant EF-G•GDP<sup>4-6</sup>, the fusidic acid stalled EF-G adopts an opened-up conformation<sup>7,8</sup> where domains IV and V are moved as a rigid body relative to domains I and II. Furthermore, domain III is found rotated independently of domains IV and V. Thus, the overall structure of EF-G is essentially identical to our previous sub-nanometer resolution cryo-EM structure of ribosome-bound EF-G•GMPPNP<sup>9</sup> and to the recent X-ray structure of EF-G•GDP•FA bound to the POST 70S ribosome<sup>1</sup> (**Fig. 3a**). It is remarkable that the overall domain arrangement of ribosome-bound EF-G is hardly influenced by the ratchet-like subunit rearrangement (RSR) of the ribosome. However, in contrast to the structure of ribosome-bound EF-G•GMPPNP<sup>9</sup>, we do not observe density for the switch 1 region of EF-G in the GTP state position. Instead, we observe some unassigned, fragmented density close to helix 14 of 16S rRNA. Thus, in agreement with biochemical data<sup>10</sup> and similar to kirromycin-stalled EF-Tu<sup>3,11</sup>, the switch 1 region is likely to be in a dynamic, partially disordered state. It is not even clear if there is a defined GDP conformation for the switch 1 region of EF-G since it is disordered in X-ray structures of vacant EF-G<sup>4-6</sup> as well as in the recent X-ray structure of EF-G•GDP•FA bound to the POST 70S ribosome<sup>1</sup>.

The switch 1 region of EF-G in the GTP state links domains I and III by non-covalent interactions and has therefore been implicated in the conformational rearrangement of domain III of EF-G<sup>9</sup>. Although the switch 1 region of EF-G appears disordered in the present EF-G•GDP•FA, there is density connecting domains I and III close to the position of the switch 1 region in the GTP state (**supp. Fig. S7**). As this additional density is surrounded by EF-G residues implicated in FA binding<sup>4,12</sup>, we tentatively assigned this density to FA. In order to corroborate this assignment, we searched for potential small molecule-binding sites on EF-G using Ligsite<sup>13</sup>, a tool for predicting protein binding sites. Using default parameters (a grid space of 1.0Å, a probe radius of at least 5.0Å), one of the two most probable binding locations for FA falls right into the cryo-EM density between EF-G domains I and III, whereas the second site is not supported by cryo-EM density (**supp. Fig. S7**). After our analysis had been completed, the X-ray structure of EF-G•GDP•FA bound to the POST 70S ribosome became available<sup>1</sup> identifying the same binding site for FA on EF-G. Together with the recent visualisation of kirromycin<sup>11</sup>, our analysis demonstrates that cryo-EM at sub-nanometer resolution is capable of identifying the ribosomal binding sites of antibiotics.

FA stabilizes the rotated state of domain III thereby preventing the conformational change of EF-G to the GDP state and the subsequent dissociation of EF-G from the ribosome. In this sense, there is some parallelism between the action of FA and the stalling of EF-Tu by kirromycin<sup>3,11</sup>. However, unlike kirromycin, ribosome binding of EF-G appears to be required for FA binding because in the presence of FA several GTPase cycles of EF-G can occur before the drug stalls the factor on the ribosome<sup>14</sup>. Because the binding site for FA is created by the ribosome-driven rotation of domain III of EF-G and because the switch I of EF-G in the GTP conformation shields the FA binding site, there is probably only a short time window during the EF-G cycle during which the drug can successfully bind. It is interesting that FA acts analogous to the anti-fungal antibiotic sordarin. Sordarin also targets the active, ribosome-induced conformation of eEF2 and stabilizes the rotated position of domain III, albeit from a distinct binding site located between domains III, IV and V<sup>15,16</sup>.

### Intermediate states of tRNA translocation with superimposed A-tRNA

During translocation two tRNAs are moved from the A- and P-sites to the P- and E-sites respectively. Thus, authentic translocation intermediates contain two tRNAs. However, despite considerable effort<sup>7,17-19</sup>, it has been possible so far to obtain direct structural information about EF-G•70S complexes with two tRNAs only when the complex was in the POST state with a non-ratcheted ribosome and tRNAs are present in classical P/P- and E/E-sites (e.g. the recent X-ray structure<sup>1</sup>). Therefore, structural insights into intermediate states of translocation, i.e. ratcheted ribosomal EF-G complexes, have utilised complexes without an A-site peptidyl-tRNA<sup>7-9</sup>, since at least an anticodon stem-loop bound to the A-site is



required to complete translocation<sup>20</sup>. Such complexes appear to be valid model for translocation intermediates as EF-G binding and GTPase activity are hardly influenced by the absence of the A-tRNA<sup>21,22</sup>.

Nevertheless, it is important to consider, if the conclusions for translocation intermediates can be extrapolated to an authentic complex containing two tRNAs. In the case of our  $TI^{POST}$  this is possible, because the head swivel and the back-rotation of the body/platform leads to a juxtaposition of the ribosomal residues of the head that contact A-tRNA and ribosomal residues of the body that contact P-tRNA (**Fig. 2b**). Thus in addition to the observed pe/E site a potential ap/P site is formed. Moreover, in the  $TI^{POST}$  the distance between the tip of domain IV of EF-G and the pe/E tRNA is  $\sim 27 \text{ \AA}$  - similar to the equivalent distance of  $31 \text{ \AA}$  between EF-G and the E/E tRNA as observed in the POST EF-G•70S complex<sup>1</sup> that accommodates an additional intervening P/P tRNA. Thus, a second tRNA occupying a hypothetical ap/P position can be superimposed into the  $TI^{POST}$  without steric interference with the binding position of EF-G (**supp. Fig. S6a**). In contrast, inclusion of a second tRNA in a hypothetical A/P hybrid state in the  $TI^{PRE}$  is incompatible with the observed location of domain IV of EF-G, which is positioned in the decoding region. However, the ribosome conformation of the  $TI^{PRE}$  as well as the position of the pp/E tRNA is corroborated by the strong similarity with the rotated sub-state of the PRE complex. Thus, we consider it possible that domain IV of EF-G is repositioned in the  $TI^{PRE}$  and that in the transient initial binding mode EF-G adopts a more closed conformation. It is also possible that the A-tRNA is moved more towards the P/E tRNA. The distance between the tip of domain IV of EF-G and the pp/E tRNA is  $19 \text{ \AA}$  and this is could be still large enough to place a second tRNA inbetween without major steric clashes (**supp. Fig. S6b**). Structures of translocation intermediates with two tRNAs will be necessary to validate these predictions.

### Translocation intermediates and the role of GTP hydrolysis

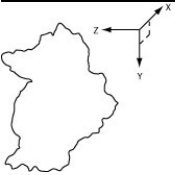
Spontaneous ribosomal inter-subunit rotation and tRNA hybrid site formation within the PRE complex has been suggested to be a reflection of an energy landscape that allows sampling of several metastable conformations for a defined ribosomal complex<sup>23</sup>. We have shown here that the 70S•EF-G•GDP•FA complex and also the 70S•EF-G•GMPPNP complex (**supp. Fig. S5; supp. Table 1**) exist in at least two major sub-states, i.e. the  $TI^{PRE}$  and  $TI^{POST}$ . Therefore, our findings here provide supportive evidence for the emerging energy landscape model of ribosomal function and show that ratcheted 70S•EF-G complexes exhibit intrinsic conformational heterogeneity as well. Although the sub-states of the 70S•EF-G•GMPPNP complex are generally similar to the sub-states of the 70S•EF-G•GDP•FA complex (**supp. Fig. S5; supp. Table 1**), there is an interesting difference in the relative population of both states. The majority of ribosomes in the 70S•EF-G complex stalled using a

non-hydrolyzable GTP analogue are in the  $TI^{PRE}$ , whereas in the 70S•EF-G complex stalled using GTP and fusidic acid (FA), the  $TI^{POST}$  dominates.

It was noted early on that FA-stalled complexes show a smaller ratchet-like subunit rearrangement than GMPPNP-stalled complexes<sup>8</sup>. Our observation is in overall agreement with these previous single-particle reconstructions as the 4° intersubunit rotation of the  $TI^{POST}$  dominating the FA-stalled complex is smaller than the 7° intersubunit rotation of the  $TI^{PRE}$  dominating the GMPPNP-stalled complex (**supp. Table 1**). Apparently, there are subtle differences in the interaction of EF-G•GMPPNP and EF-G•GDP•FA with the ribosome, respectively, that influence the energy landscape of the ribosome, although at the present resolution the overall EF-G conformation appears to be very similar. We are therefore tempted to speculate that the GTPase reaction of EF-G followed by release of Pi leads to a preference of the  $TI^{POST}$  over the  $TI^{PRE}$ . This would be in agreement with the finding that release of Pi and tRNA<sub>2</sub>-mRNA translocation have been shown to be much slower than GTP hydrolysis<sup>24</sup>. Furthermore, the putative influence of GTP hydrolysis/Pi release on the energy landscape of the ribosome provides a structural explanation for the acceleration of tRNA translocation by GTP hydrolysis<sup>25</sup>. We previously suggested that a network of interactions between the rotated 30S subunit and the  $\gamma$ -phosphate of GTP, *via* domain III of EF-G and its ordered switch I region, stabilizes the rotated conformation of the ribosome<sup>9</sup>. Accordingly, flipping-out of the switch I region upon GTP hydrolysis<sup>10</sup> will reduce the stabilization effect on the rotated 70S conformation, as seen in the  $TI^{PRE}$ , and will allow reverse-rotation of the 30S subunit to the partially ratcheted state, as seen in the  $TI^{POST}$ . Ultimately, regardless of the timing of release of Pi, the loss of the  $\gamma$ -phosphate allows EF-G to adopt the low affinity GDP state, which dissociates from the POST state ribosome.

## Supplemental Table 1

Table 1: Quantification of ribosomal intersubunit rotation and head swiveling



	body/platform (global rotation versus 50S subunit)	head (global rotation versus 50S subunit)	head (swivel movement relative to 30S body)
<i>T. thermophilus</i> 70S•EF-G•GDP•FA TI <sup>PRE</sup>	7° 6° / -3° / 1° <i>0.73 / 0.87</i>	11° 8° / -6° / 2° <i>0.38 / 0.89</i>	5° 1° / -3° / 2°
<i>T. thermophilus</i> 70S•EF-G•GDP•FA TI <sup>POST</sup>	4° 3° / -3° / 1° <i>0.80 / 0.87</i>	21° 2° / -17° / 10° <i>0.65 / 0.82</i>	18° 3° / -9° / 6°
<i>T. thermophilus</i> 70S•EF-G• GMPPNP TI <sup>PRE</sup>	7° 6° / -3° / 1° <i>0.71 / 0.84</i>	11° 8° / -8° / 2° <i>0.66 / 0.85</i>	5° 1° / -5° / 2°
<i>T. thermophilus</i> 70S•EF-G• GMPPNP TI <sup>POST</sup>	5° 3° / -3° / 1° <i>0.80 / 0.86</i>	19° 6° / -13° / 7° <i>0.69 / 0.80</i>	15° 4° / -5° / 4°
<i>E. coli</i> EMDB-1540 <sup>a</sup> PRE (classical)	2° 0° / 0° / 0° <i>n.d.</i>	2° 0° / 0° / 0° <i>n.d.</i>	2° 0° / 0° / 0°
<i>E. coli</i> EMDB-1541 <sup>a</sup> PRE (rotated)	8° 6° / -4° / 1° <i>n.d.</i>	10° 7° / -3° / 1° <i>n.d.</i>	3° 0° / 0° / 0°

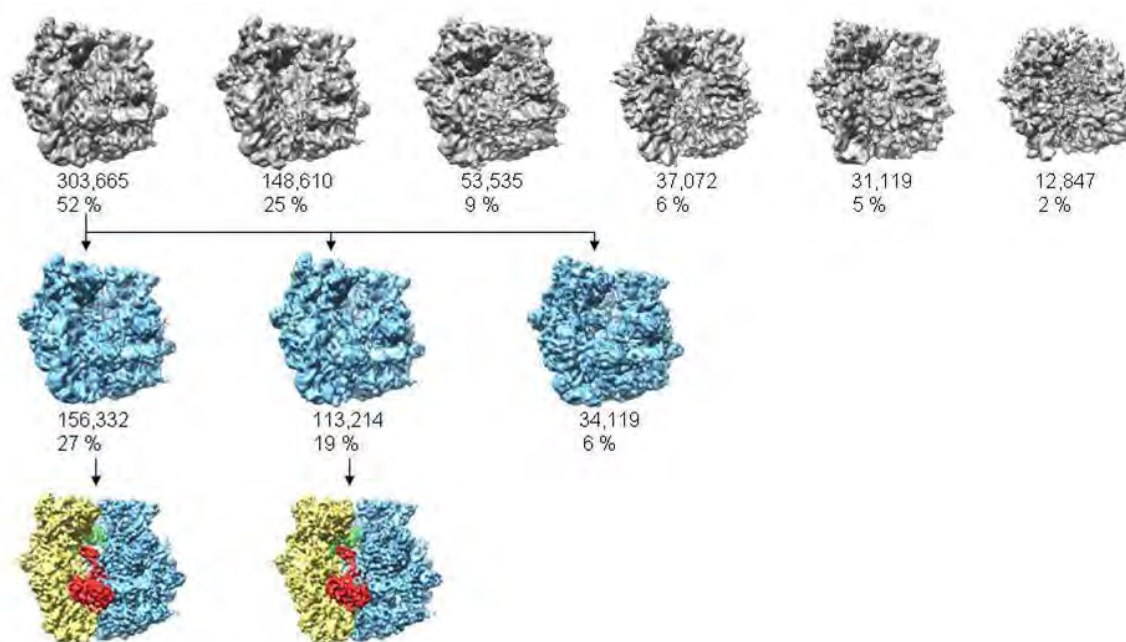
The rotational parameters required aligning the entire 30S head, or body/platform domains to the same feature in the 70S-fMet-tRNA complex<sup>26</sup> were calculated after the various structures were aligned based on their 50S subunits. The coordinate system is the same as in previous comparisons<sup>9,15,27</sup>. The angle in the upper row is the maximal rotation angle determined in UCSF Chimera with the *fit in map* tool. The angles in the middle row,  $\alpha/\beta/\gamma$ , are determined with SPIDER and describe rotations around the x-, y- and z-axis, as defined in the cartoon outline of the 30S subunit. The values given describe the transformation from the 70S-fMet-tRNA reference structure to the indicated structures. The values in the lower row (Italics) are the respective cross-correlation coefficient before/after alignment.

<sup>a</sup> Orientation parameters for the spontaneous inter-subunit rotation of the *E. coli* PRE complex<sup>28</sup> were calculated using maps deposited in the EM database (identifiers EMDB-1540 and EMDB-1541) after adjustment of the scale.

## Supplemental References

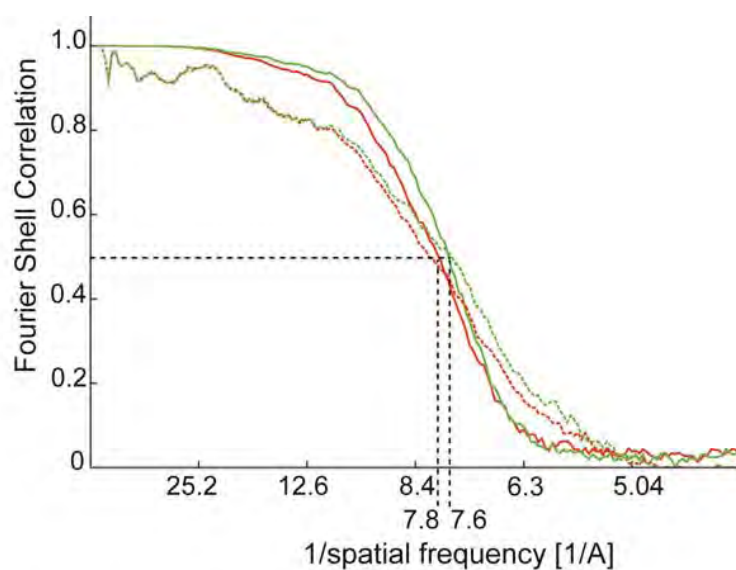
- 1 Gao, Y. G. et al., The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science* 326, 694 (2009).
- 2 Selmer, M. et al., Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* 313, 1935 (2006).
- 3 Schmeing, T. M. et al., The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science* 326, 688 (2009).
- 4 Laurberg, M. et al., Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J.Mol.Biol.* 303, 593 (2000).
- 5 A, A. Evarsson et al., Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *Embo J* 13, 3669 (1994).
- 6 Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T. A., and Moore, P. B., The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *Embo J* 13, 3661 (1994).
- 7 Valle, M. et al., Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* 114, 123 (2003).
- 8 Frank, J. and Agrawal, R.K., A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406, 318 (2000).
- 9 Connell, S. R. et al., Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors. *Mol Cell* 25, 751 (2007).
- 10 Ticu, C. et al., Conformational changes in switch I of EF-G drive its directional cycling on and off the ribosome. *EMBO J* 28, 2053 (2009).
- 11 Schuette, J. C. et al., GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding. *EMBO J* 28, 755 (2009).
- 12 Hansson, S. et al., Structural insights into fusidic acid resistance and sensitivity in EF-G. *J Mol Biol* 348, 939 (2005).
- 13 Huang, B. and Schroeder, M., LIGSITEcsc: predicting ligand binding sites using the Connolly surface and degree of conservation. *BMC Struct Biol* 6, 19 (2006).
- 14 Seo, H. S. et al., EF-G-dependent GTPase on the ribosome. conformational change and fusidic acid inhibition. *Biochemistry* 45, 2504 (2006).
- 15 Spahn, C. M. et al., Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J* 23, 1008 (2004).
- 16 Jorgensen, R. et al., Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase. *Nat Struct Biol* 10, 379 (2003).
- 17 Penczek, P. A., Frank, J., and Spahn, C. M., A method of focused classification, based on the bootstrap 3D variance analysis, and its application to EF-G-dependent translocation. *J Struct Biol* 154, 184 (2006).
- 18 Agrawal, R.K. et al., EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. *Nature Struct.Biology.* 6, 643 (1999).
- 19 Scheres, S. H. et al., Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nat Methods* 4, 27 (2007).
- 20 Joseph, S. and Noller, H.F., EF-G-catalyzed translocation of anticodon stem-loop analogs of transfer RNA in the ribosome. *EMBO Journal* 17, 3478 (1998).
- 21 Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., and Wintermeyer, W., Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* 385, 37 (1997).

- 22 Wilden, B., Savelsbergh, A., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W., Role and timing of  
GTP binding and hydrolysis during EF-G-dependent tRNA translocation on the  
ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13670 (2006).
- 23 Munro, J. B., Sanbonmatsu, K. Y., Spahn, C. M., and Blanchard, S. C., Navigating  
the ribosome's metastable energy landscape. *Trends Biochem Sci* 34, 390 (2009).
- 24 Rodnina, M., Savelsbergh, A., Katunin, V.I., and Wintermeyer, W., Hydrolysis of GTP  
by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* 385, 37  
(1997).
- 25 Savelsbergh, A. et al., An elongation factor G-induced ribosome rearrangement  
precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol Cell* 11, 1517 (2003).
- 26 Gabashvili, I.S. et al., Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å  
resolution. *Cell* 100, 537 (2000).
- 27 Spahn, C. M. et al., Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the  
ribosome and the mechanism of tetracycline resistance. *Mol Cell* 7, 1037 (2001).
- 28 Agirrezabala, X. et al., Visualization of the hybrid state of tRNA binding promoted by  
spontaneous ratcheting of the ribosome. *Mol Cell* 32, 190 (2008).
- 29 Spahn, C. M. and Penczek, P. A., Exploring conformational modes of macromolecular  
assemblies by multiparticle cryo-EM. *Curr Opin Struct Biol* 19, 623 (2009).



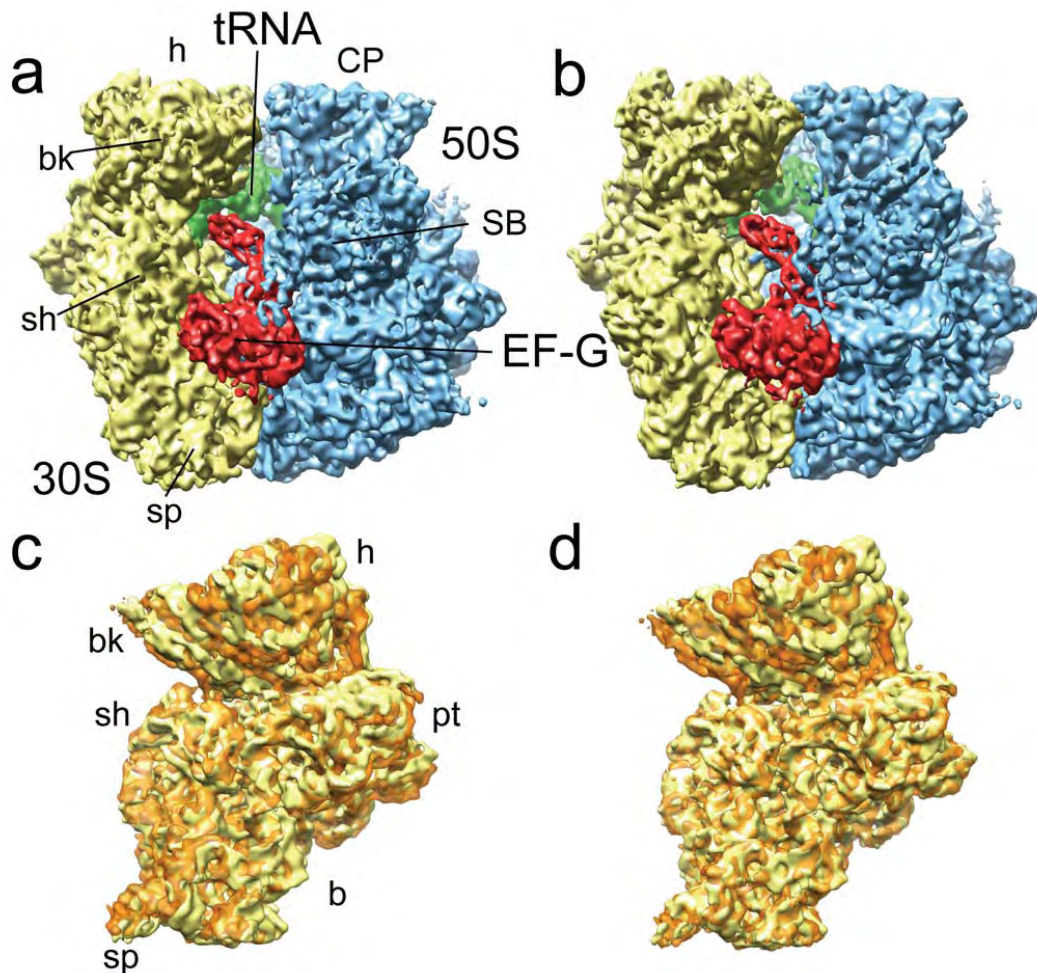
### Supp. Fig. S1: Multi-particle refinement strategy

Multi-particle refinement<sup>11,17,29</sup> was used to account for conformational heterogeneity of the *T. thermophilus* 70S•EF-G•GDP•FA complex. Initially, the data set was sorted into up to six subpopulations. After a first phase of multiparticle refinement, we obtained a major population of particle images (52 %; 303,665). Although the corresponding structure had strong EF-G density, limited resolution pointed to conformational heterogeneity of the data set. Therefore, we proceeded with the second phase of multiparticle refinement, leading to a further subdivision of the subset obtained in the first phase into two major populations of particle images (27 % and 19 % of the complete data set, respectively). Each was subsequently refined individually to yield the two final maps at 7.6 and 7.8 Å resolution, respectively. The resulting cryo-EM maps of the ribosomal complexes are shown in side views. Numbers and percentages indicate total particle projections and fractions of the whole data set, respectively.



**Supp. Fig. S2: Resolution curves of the TI<sup>PRE</sup> and TI<sup>POST</sup> complexes**

The resolution curves of cryo-EM maps of the TI<sup>PRE</sup> (red) and the TI<sup>POST</sup> (green) are shown. The standard FSC curves (solid lines) indicate that the resolution of the TI<sup>PRE</sup> (red) and the TI<sup>POST</sup> based on the 0.5 FSC cut-off, is 7.8 Å and 7.6 Å, respectively. FSC curves between the cryo-EM maps and density derived from the pseudo-atomic models (dashed lines) show that the agreement between the maps and the models is in the same order as the nominal resolution.

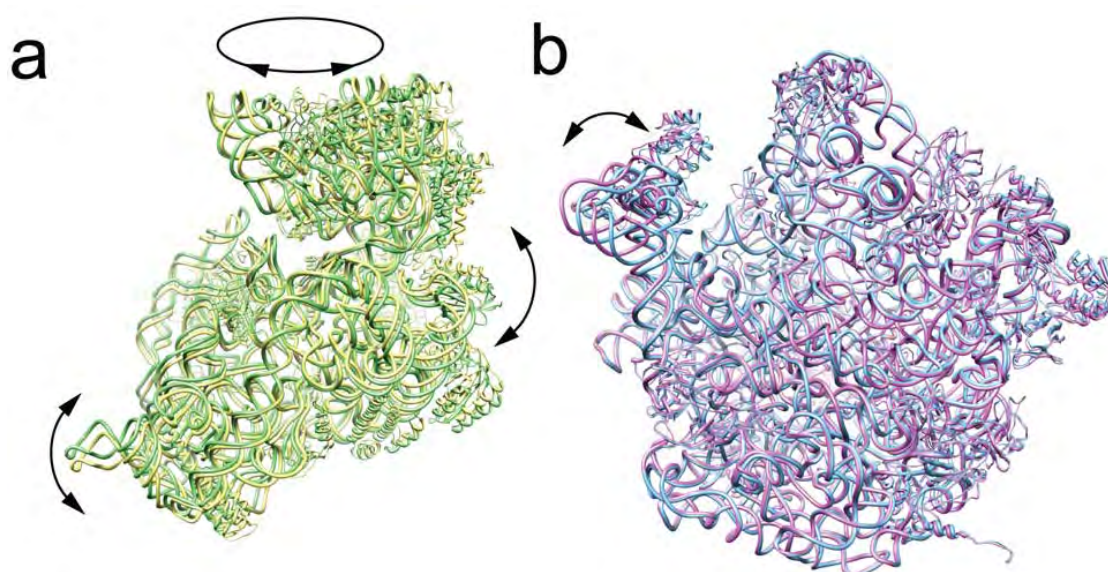


**Supp. Fig. S3: Cryo-EM reconstructions of sub-states I ( $TI^{PRE}$ ) and II ( $TI^{POST}$ ) of the 70S•EF-G•GDP•FA complex**

**a,b,** The cryo-EM maps of sub-state I ( $TI^{PRE}$ ) (a) and sub-state II ( $TI^{POST}$ ) (b) of the 70S•EF-G•GDP•FA complex are shown from the L7-stalk-site. The ribosomal 30S subunit is marked yellow, the 50S subunit blue, EF-G red and the tRNA green.

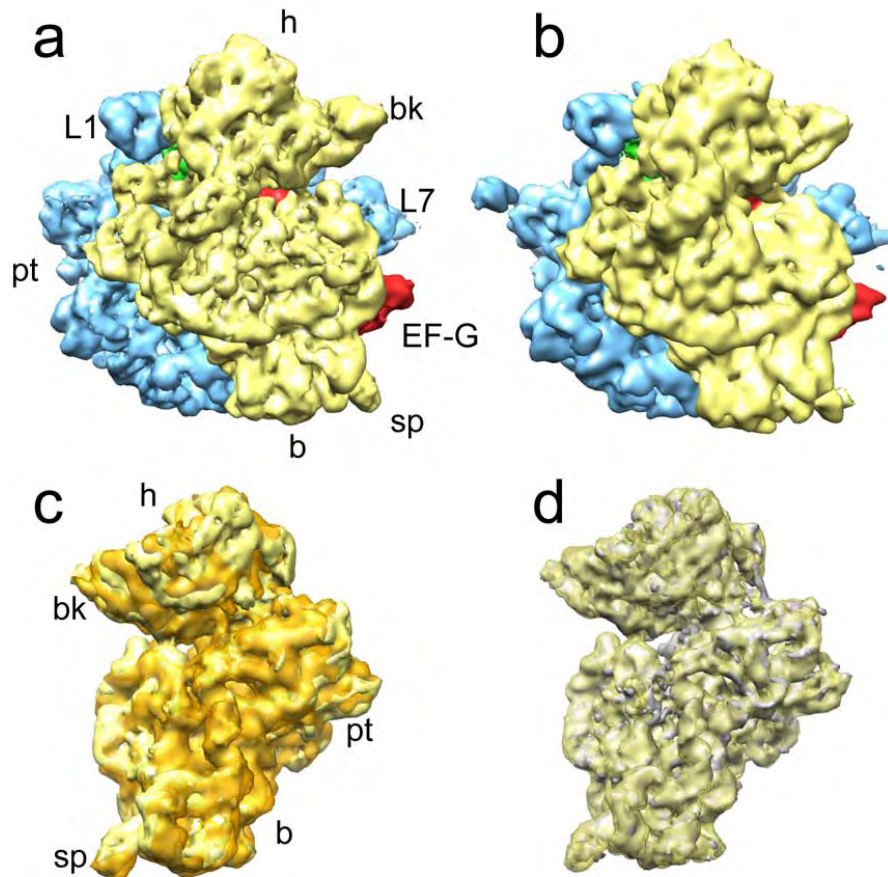
**c,** Comparison of sub-states I and II of the 30S with the maps aligned at the 50S subunit indicating the difference in terms of ratcheting and **d,** aligned at the body/platform domains of the 30S subunit highlighting differences in head swiveling. The 30S of sub-state I ( $TI^{PRE}$ ) is rendered in transparent orange, while the 30S of sub-state II ( $TI^{POST}$ ) is in solid yellow.





**Supp. Fig. S4: Comparison of  $TI^{PRE}$  (sub-states I) and  $TI^{POST}$  (sub-states II) of the 70S•EF-G•GDP•FA complex**

**a, b,** Comparative molecular models of 30S (a) and 50S (b) subunits in the  $TI^{PRE}$  (sub-state I) and  $TI^{POST}$  (sub-state II) conformation, represented in ribbon mode. Color code: 30S  $TI^{PRE}$ , green; 30S  $TI^{POST}$ , yellow; 50S  $TI^{PRE}$ , blue; 30S  $TI^{POST}$ , magenta. Arrows highlight the inter-subunit rotation, the head swivel (a) and the movement of the L1 protuberance (b).

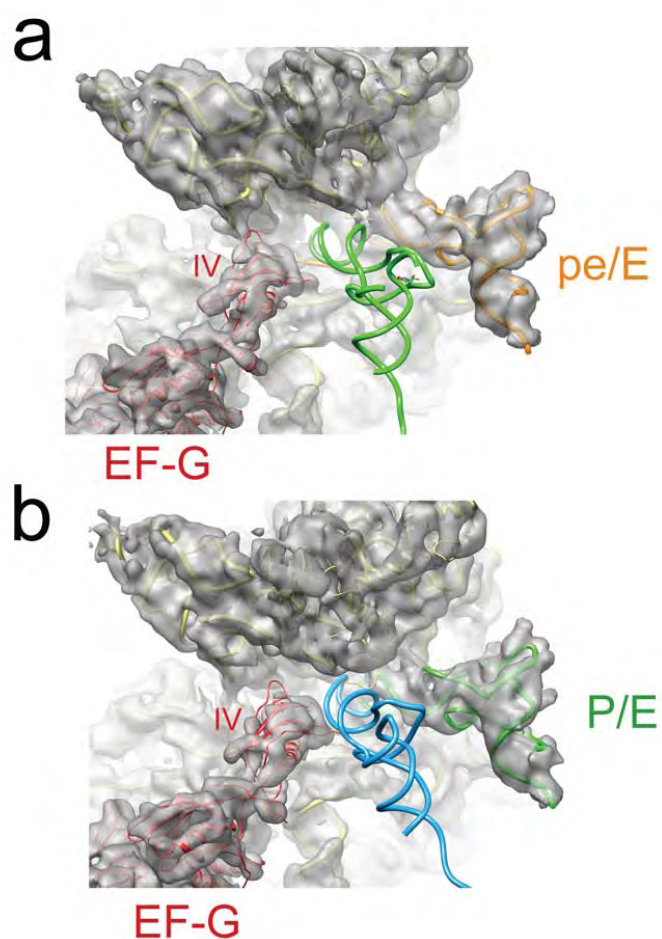


**Supp. Fig. S5: Cryo-EM reconstructions of sub-states I and II of the 70S•EF-G•GMPPNP complex**

**a,b,** The cryo-EM maps of sub-state I ( $TI^{PRE}$ ) (a) and sub-state II ( $TI^{PRE}$ ) (b) of the 70S•EF-G•GMPPNP complex are shown from the 30S. The ribosomal 30S subunit is marked yellow, the 50S subunit blue, EF-G red and the tRNA green.

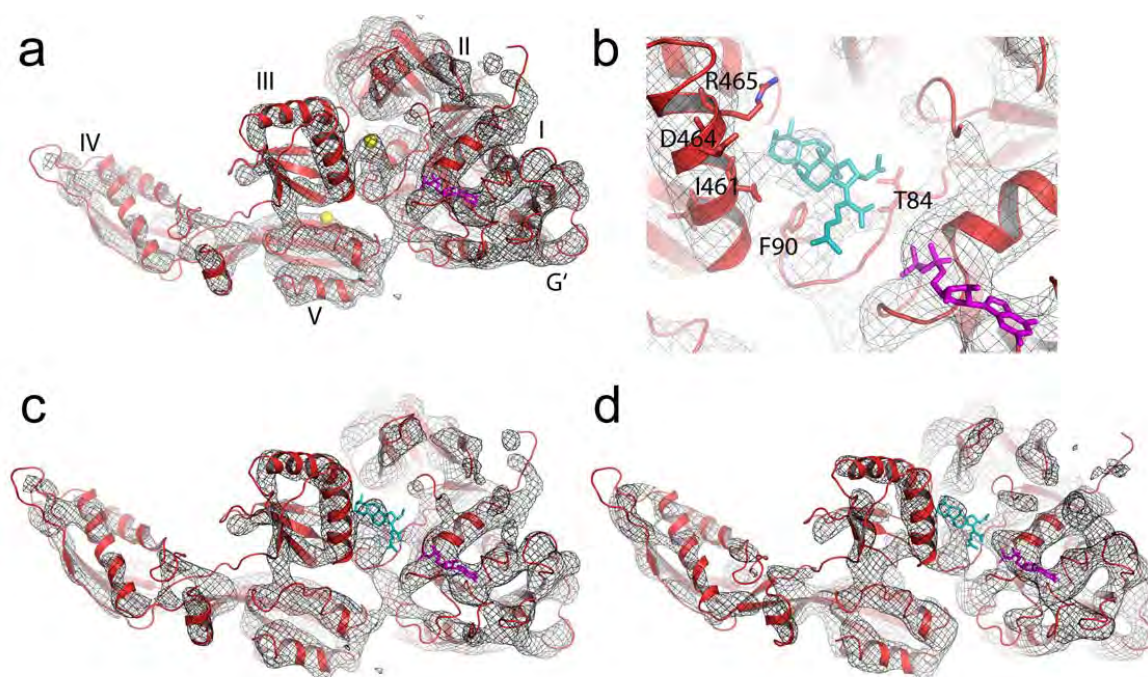
**c,** Comparison of sub-states I and II of the 30S with the maps aligned at the 50S subunit indicating the difference in degrees of ratcheting. The 30S of sub-state I ( $TI^{PRE}$ ) is in solid yellow, while the 30S of sub-state II ( $TI^{POST}$ ) is rendered in transparent orange.

**d,** Comparison of sub-state I ( $TI^{PRE}$ ) of the 70S•EF-G•GMPPNP complex (transparent yellow) with sub-state I ( $TI^{PRE}$ ) of the 70S•EF-G•GDP•FA complex (grey) indicating the overall similarity between the  $TI^{PRE}$  sub-states..



**Supp. Fig. S6: Docking of a second tRNA into TI<sup>PRE</sup> and TI<sup>POST</sup>**

a,b, Close-up on the decoding region of the 30S subunit showing the relative positions of domain IV of EF-G and the tRNA binding sites. The surfaces of TI<sup>POST</sup> (a) and TI<sup>PRE</sup> (b) are transparent with molecular models in ribbons representation (30S subunit, yellow; EF-G, red). In (a) the pe/E-tRNA is coloured orange and the superposition of an ap/P-tRNA is green, whereas in (b) the P/E-tRNA is coloured green and the superposition of an A/P-tRNA is blue. The tRNA had to be shifted from the decoding center of the A-site towards the P/E tRNA in order to avoid overlap with domain IV of EF-G. Note the close proximity between domain IV of EF-G and the A/P-tRNA in (b), whereas in (a) there is no steric clash between domain IV of EF-G and the ap/P-tRNA.



**Supp. Fig. S7: The structure of EF-G and the fusidic acid (FA) binding site**

The molecular model for MDFIT docked EF-G (red ribbon) is shown superposed with the corresponding region of the cryo-EM density maps (black mesh). FA is in cyan, GDP in magenta.

**a**, Result of the Ligsite search<sup>13</sup> indicating the two most likely ligand binding sites (shown as yellow balls) for a small molecule such as FA. The analysis of binding pockets yields the same results for the  $TI^{PRE}$  and  $TI^{POST}$ .

**b**, The inset shows a close-up view of the two ligands present in the EF-G structure in the  $TI^{POST}$  state. Nearby residues known to be important for binding of FA<sup>4,12</sup> are labelled.

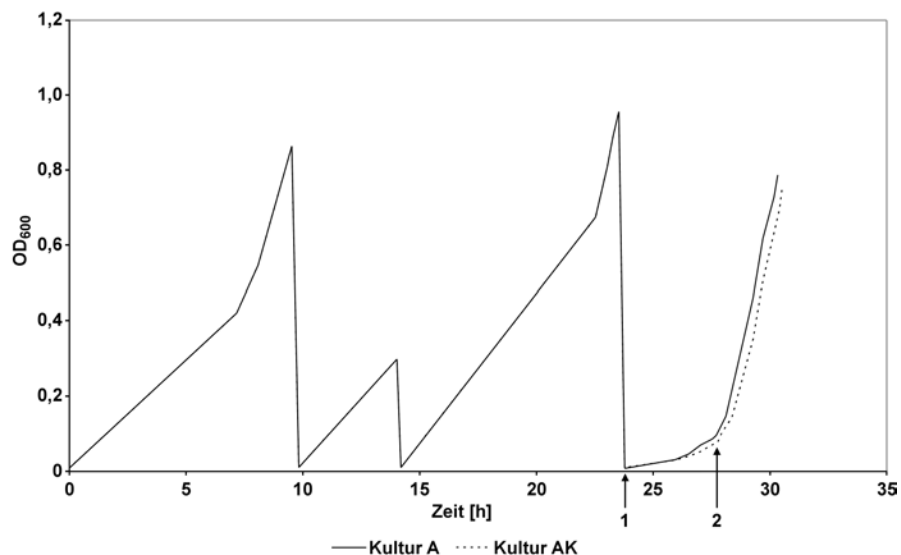
**c,d**, Comparison of the structure of ribosome-bound EF-G for the  $TI^{PRE}$  (c) and  $TI^{POST}$  (d).

## 5.2 Das Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9 der 23S rRNA

Der Stamm *XL1-Blue/pcl857/p278MS2-GIR<sub>1</sub> in H9* (siehe Kapitel 4.9.1) wurde unter verschiedenen Bedingungen kultiviert, um optimale Expressionsbedingungen für mutierte 70S Ribosomen zu finden.

### 5.2.1 Expression mutierter Ribosomen in An- und Abwesenheit des Antibiotikums Kanamycin

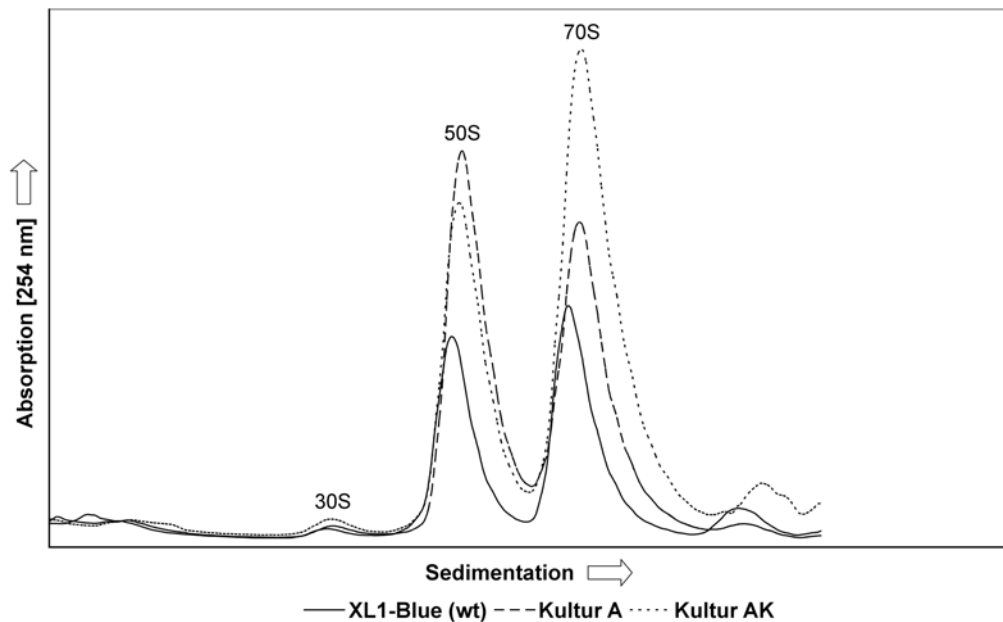
Im Stamm *XL1-Blue/pcl857/p278MS2-GIR<sub>1</sub> in H9* ist die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin auf dem Expressionsvektor *p278MS2-GIR<sub>1</sub> in H9* und jene gegen Kanamycin auf dem Repressionsvektor *pcl857* kodiert. Um zu testen, ob Kanamycin die Expression mutierter Ribosomen beeinflusst, wurde der Stamm in An- und Abwesenheit dieses Antibiotikums induziert. Dazu wurden die Zellen zunächst in Gegenwart beider Antibiotika unter Repressionsbedingungen (30°C) und starkem Schütteln mehrfach mit frischem dYT-Medium verdünnt, so dass die Wachstumskurve ein Sägezahnprofil darstellt (siehe Abbildung 17). Die dritte Verdünnung erfolgte für **Kultur A** mit Medium, das nur Ampicillin enthielt, und für Kultur **AK** mit Medium, in dem nach wie vor beide Antibiotika vorhanden waren. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,1 wurde durch Temperaturwechsel auf 42°C die Expression mutierter 23S rRNA induziert. Beide Kulturen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~0,8 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie in Kapitel 4.5 beschrieben geerntet und die Ribosomen wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben präpariert.



**Abb. 17:** Wachstumskurve mit Sägezahnprofil.

(1) Verdünnung mit dYT-Medium, das nur Ampicillin (**Kultur A**) oder Ampicillin und Kanamycin (**Kultur AK**) enthielt. (2) Induktion der Expression durch Temperaturwechsel von 30°C auf 42°C.

Die Intaktheit der Ribosomen wurde mittels eines analytischen Sucrosegradienten überprüft (siehe Abbildung 18). Dabei stellte sich heraus, dass die Ribosomen des *E. coli* Wildtyps **XL1-Blue (wt)** und der **Kultur AK** mehr intakte 70S Ribosomen als ribosomale Untereinheiten besitzen. Die Ribosomen der **Kultur A** zeigten einen höheren Anteil an 50S Untereinheiten im Vergleich zu 70S Ribosomen. Die Ribosomen der **Kultur A** schienen somit instabiler zu sein. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Inkubationen des Stammes *XL1-Blue/pcl857/p278MS2-GIR1 in H9* in Gegenwart beider Antibiotika durchgeführt.



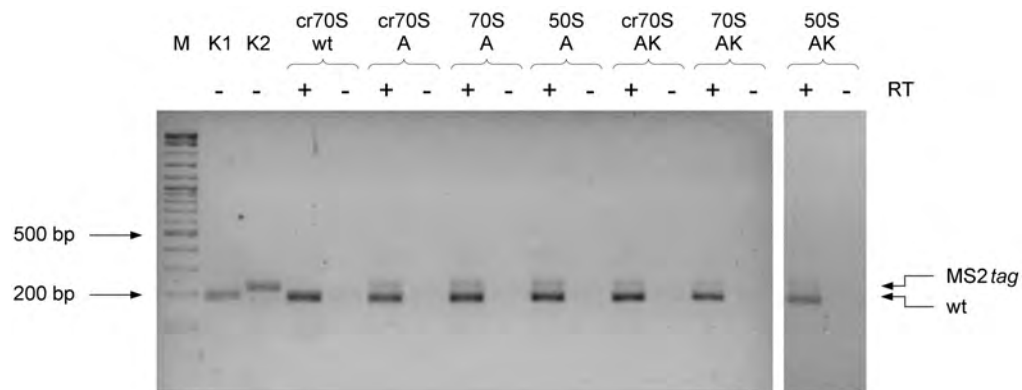
**Abb. 18:** Analytischer Sucrosegradient (10-30 %). Gradientenprofile der **Kultur A** (Ampicillin) und **Kultur AK** (Ampicillin und Kanamycin) im Vergleich mit dem Wildtyp (**XL1-Blue (wt)**)

Die Expression der mutierten Ribosomen wurde mittels RT-PCR überprüft (siehe Kapitel 4.8.4). Der Nachweis des *MS2tags* in Helix 98 wurde mit externen Primern (H98-2702-do und H98-2900-up, siehe Tabelle 29 und Kapitel 4.1.1) durchgeführt. Die RT-PCR zeigt für beide Expressionskulturen (**A** und **AK**) zusätzlich zur Wildtyp-Bande eine Bande für 23S rRNA mit insertiertem *MS2 tag* (siehe Abbildung 19).

Der Nachweis des Ribozyms *GIR1* in *H9* ist mit einem internen *reverse* Primer (*GIR-2* als *reverse* Primer und Primer *H9-NEU* als *forward* Primer, siehe Tabellen 27, 29 und Kapitel 4.1.1) möglich. Eine Bande für das Ribozym *GIR1* in Helix 9 war bei ~230 bp zu erkennen. Allerdings war in allen Ansätzen, auch beim Wildtyp, zusätzlich ein Nebenprodukt von ~100 bp zu erkennen (siehe Abbildung 20).

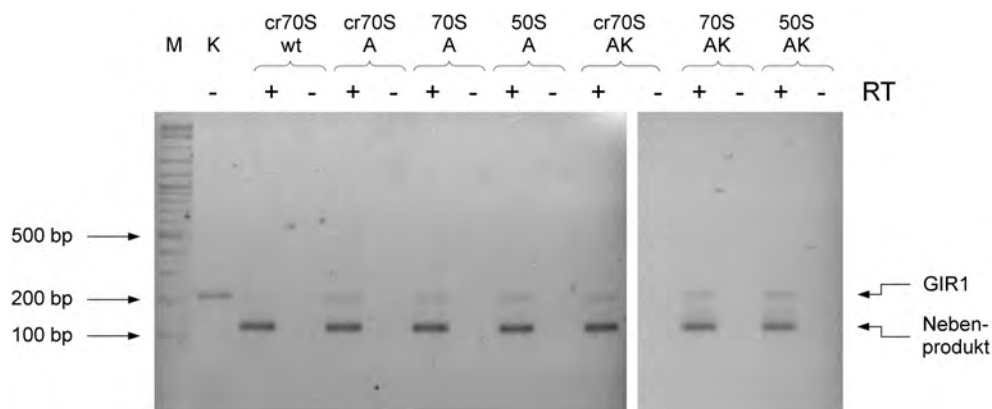
Die Intaktheit der ribosomalen RNA wurde mittels eines denaturierenden PAA-Gels überprüft. Die rRNAs beider Kulturen zeigten weder eine

Fragmentierung noch einen Unterschied zur ribosomalen RNA des *E. coli* Wildtyps (siehe Abbildung 21).



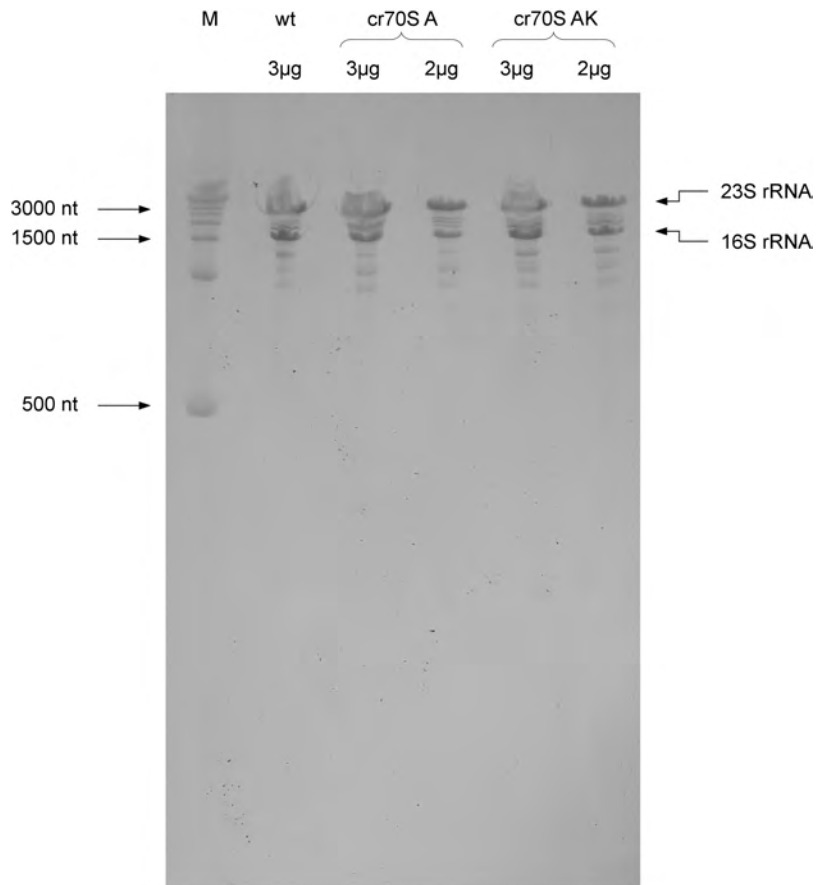
**Abb. 19:** Nachweis des MStags in Helix 98.

RT-PCR mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) zum Nachweis des MS2 tags in Helix 98 mit externen Primern. Eingesetzt wurden **cr70S**, Monosomen (**70S**) und (**50S**) Untereinheiten der Kulturen A (Ampicillin) und **AK** (Ampicillin und Kanamycin) im Vergleich zum Wildtyp (**wt**, Negativkontrolle), p278MS2 als Positivkontrolle des Wildtyps (**K1**), p278MS2-GIR<sub>1</sub> in H9 als Positivkontrolle der Mutante (**K2**). PCR-Produkte, die den Wildtyp (199 Bp) und 23S rRNA mit insertiertem MS2 tag (231 Bp) repräsentieren, sind indiziert. **M**, DNA-Größenmarker (2logLeiter, NEB).



**Abb. 20:** Nachweis des Ribozyms GIR<sub>1</sub> in Helix 9.

RT-PCR mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) zum Nachweis des Ribozyms GIR<sub>1</sub> in Helix 9 mit internem Primer. Eingesetzt wurden **cr70S**, Monosomen (**70S**) und **50S** Untereinheiten der Kulturen A (Ampicillin) und **AK** (Ampicillin und Kanamycin) im Vergleich zum Wildtyp (**wt**, Negativkontrolle), p278MS2-GIR<sub>1</sub> in H9 als Positivkontrolle (**K**). Das Nebenprodukt (~100 bp) sowie das Amplifikat, das 23S rRNAs mit insertiertem Ribozym GIR<sub>1</sub> entspricht, sind markiert. **M**, DNA-Größenmarker (2logLeiter, NEB). Weitere Details im Text.

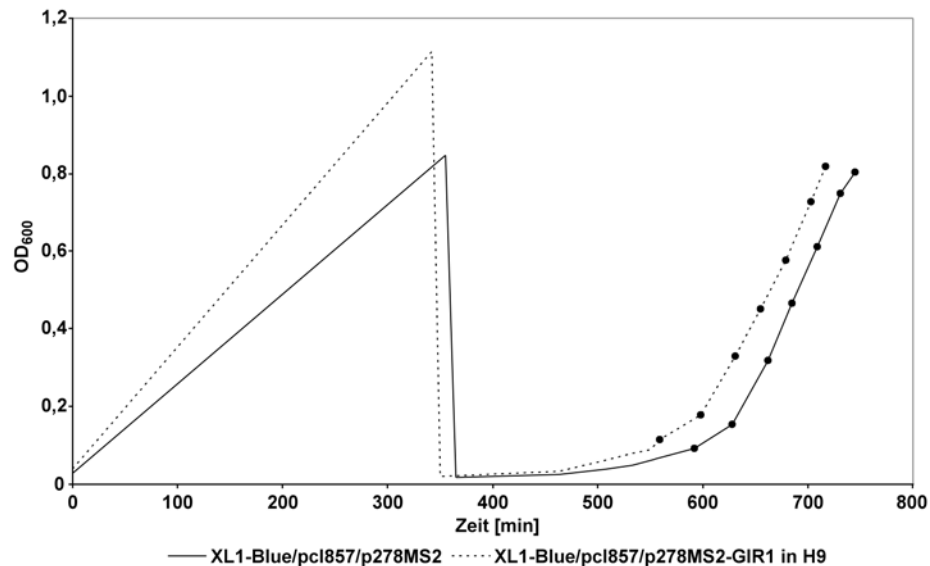


**Abb. 21:** Denaturierendes 4 % PAA-Gel zur Darstellung der ribosomalen RNA aus cr70S.  
 Vergleich der rRNA aus Kultur **A** (Ampicillin) und Kultur **AK** (Ampicillin und Kanamycin) mit der rRNA des Wildtyps (**wt**). **M**, RNA-Größenmarker (Millenium Marker™, Ambion)



## 5.2.2 Zeitabhängigkeit der Expression mutierter Ribosomen

Für die Bestimmung des Expressionsgrades mutierter Ribosomen wurden vor und nach der Induktion zu bestimmten Zeitpunkten Proben der Kultur entnommen (siehe Abbildung 22) und die RNA präpariert (siehe Kapitel 4.8.2.1). Als Kontrolle diente der Stamm *XL1-Blue/pcl857/p278MS2*, der nur den *MS2 tag* in Helix 98 exprimiert. Die erste Probenahme nach Induktion erfolgte nach 30-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 42°C ohne Schütteln. Anschließend wurde wieder im Luftschtüller bei 42°C inkubiert.

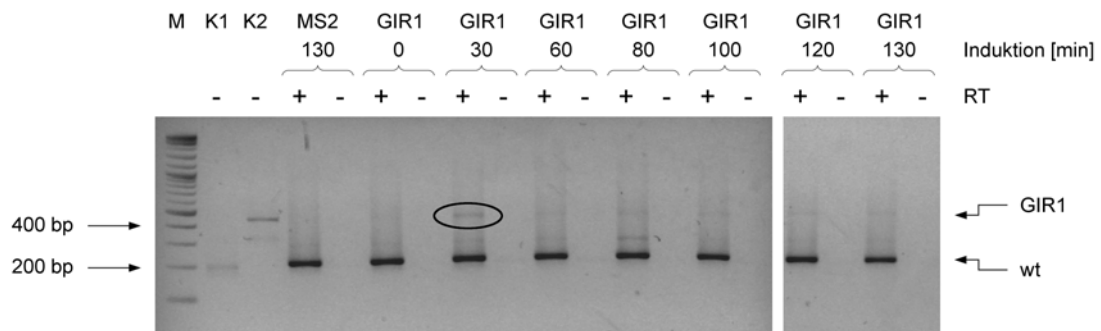


**Abb. 22:** Wachstumskurve: Zeitabhängigkeit der Expression.  
Die Zeitpunkte der Probenahme sind markiert (●).

Anhand der Intensität des PCR-Produkts, das mutierten Ribosomen mit *MS2 tag* in Helix 98 zugeordnet werden kann, ist eine Abschätzung der Expressionszunahme möglich. Nach 30 min Inkubation war im Fall der Mutante ein deutliches PCR-Produkt in der für den *MS2tag* erwarteten Größe zu erkennen (Abbildung 23). Anschließend nahm die Intensität dieser Bande ab, um nach 130 min Induktion wieder etwas stärker zu werden. Im Vergleich zur Mutante zeigte der Kontrollstamm eine stetige Zunahme der Intensität dieser PCR-Bande (siehe Abbildung 23).



Der Nachweis mutierter Ribosomen, die zusätzlich zum MS2 *tag* in Helix 98 das Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9 exprimieren, war mithilfe externer Primer möglich. Die cDNA wurde mit dem Primer H9-3' synthetisiert. Die anschließende PCR mit den Primern H9-40do und Primer H9-236up ergab für Ribosomen, die das Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9 tragen, ein Produkt von 425 Bp. Die höchste Intensität dieses PCR-Produktes tritt nach 30 Minuten Induktion im Wasserbad auf (siehe Abbildung 24). In Abwesenheit der GIR<sub>1</sub>-Insertion betrug die Größe des PCR-Produktes nur 197 bp.



**Abb. 24:** Zeitabhängigkeit der Expression: Nachweis des Ribozyms GIR<sub>1</sub> in Helix 9.

RT-PCR mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) zum Nachweis des Ribozyms GIR<sub>1</sub> in Helix 9 mit externen Primern in der Gesamt-RNA des Kontrollstammes (MS2) und der Mutante (GIR<sub>1</sub>). Die für native 23S rRNA (197 Bp) und solche mit GIR<sub>1</sub>-Insertion in H9 (425 Bp) erwarteten Amplifikate sind indiziert. Die ovale Umrandung markiert den Zeitpunkt der stärksten Expression mutierter Ribosomen mit dem Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9. p278MS2 diente als Positivkontrolle (K<sub>1</sub>) für den Kontrollstamm, p278MS2-GIR<sub>1</sub> in H9 als Positivkontrolle (K<sub>2</sub>) für die Mutante und die 2logLeiter (NEB) als DNA-Größenmarker M.

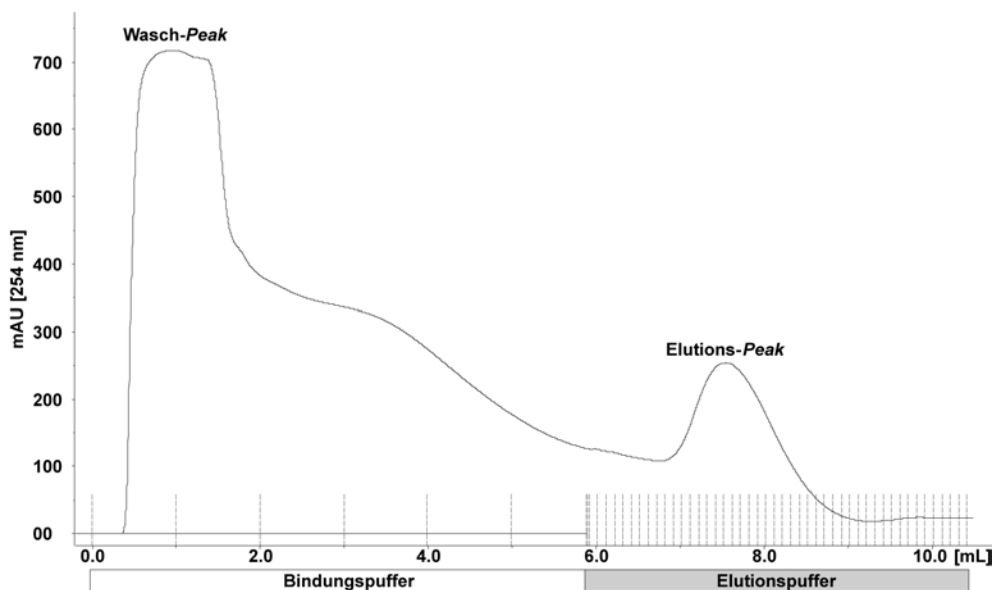
Sowohl der MS2*tag* in Helix 98 als auch das Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9 waren nach 30 min Induktion im Wasserbad nachweisbar. Dies war für das GIR<sub>1</sub>-spezifische Produkt auch der Zeitpunkt der höchsten Intensität (Abb. 24). Mit weiterer Induktion nahm die Intensität beider PCR-Produkte ab, wobei allerdings der MS2 *tag* in Helix 98 im Gegensatz zum Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9 nach 130 min wieder nachweisbar war (siehe Abbildungen 23 und 24). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Experimenten eine Induktionsdauer von 30 min nicht überschritten.

### 5.2.3 Aufreinigung mutierter Ribosomen mit dem Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9

Der Stamm *XL1-Blue/pcl857/p278MS2-GI1 in H9* wurde wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben kultiviert. Die Induktion im Wasserbad für 30 min ohne Schütteln erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4. Anschließend wurden die Zellen

geerntet (Kapitel 4.5). Die gefrorene Zellsuspension wurde in einem gekühlten Mörser mit 3 g Alcoa versetzt und die Ribosomen wie in Kapitel 4.5.5 beschrieben präpariert.

Die mutierten Ribosomen wurden *via* MS2 *tag* von den nativen Ribosomen getrennt (siehe Kapitel 4.5.4). Die Fraktionen des Elutions-Peaks (siehe Abbildung 25) mit der höchsten Absorption wurden vereinigt ( $\sim 0,3$  OD<sub>260</sub> Ribosomen insgesamt) und mittels eines Sucrosegradienten (10 bis 30 %) in die Untereinheiten und Monosomen getrennt. Aus den Fraktionen mit den jeweils höchsten Absorptionen (siehe Abbildung 26) wurde die RNA präpariert und für RT-PCRs zum Nachweis des Ribozyms GIR1 in Helix 9 und des MS2tags in Helix 98 eingesetzt.



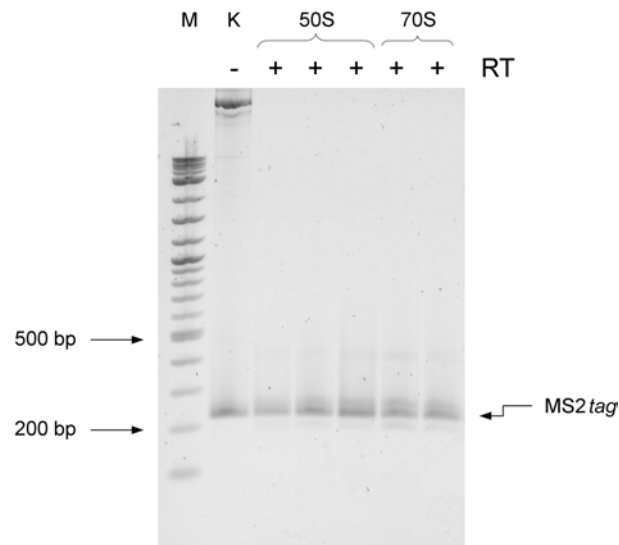
**Abb. 25:** Aufreinigung mutierter Ribosomen über den MS2 *tag*. 300 OD<sub>260</sub> cr70S des Stammes *XL1-Blue/pcl857/p278MS2-GIR1 in H9* wurden über den MS2 *tag* aufgereinigt (Säule: GStrap FF 1 mL der Firma Amersham Bioscience).

Die rRNA eluierter Ribosomen zeigte weder eine Fragmentierung noch einen Unterschied zur ribosomalen RNA des Wildtyps (siehe Abbildung 29).

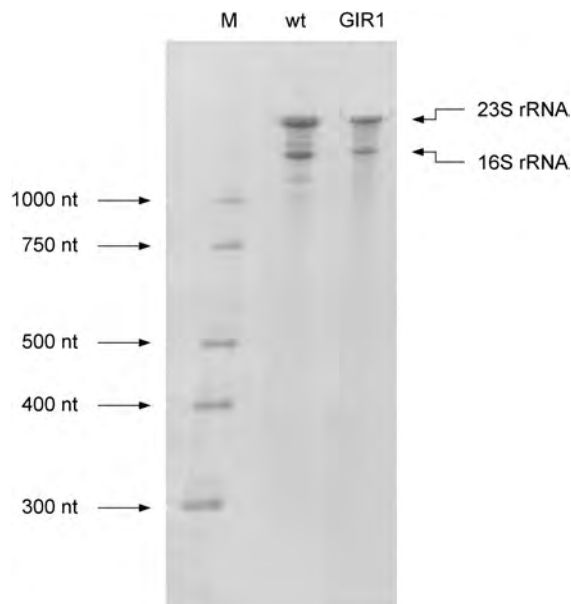
Die RT-PCR mit externen Primern für Helix 98 ergab ein 231 bp großes PCR-Produkt für den MS2 *tag* (siehe Abbildung 28). Die RT-PCR mit externen Primern für Helix 9 zeigte ein deutliches PCR-Produkt mit der Größe von 425 bp, das dem insertierten Ribozym GIR1 zuzuordnen ist (siehe Abbildung 27). Zusätzlich war ein Produkt mit der Größe von  $\sim 200$  bp für 23S rRNA ohne GIR1-Insertion zu erkennen.

Alle eluierten Ribosomen trugen den MS2 *tag* in Helix 98 der 23S rRNA (siehe Abbildung 28), während Helix 9 nur zu  $\sim 30$  % das Ribozym GIR1 enthielt (siehe Abbildung 27). Dieser Anteil wurde als ausreichend für eine





**Abb. 28:** Nachweis des *MStags* in Helix 98 aufgereinigter Ribosomen. RT-PCR mit (+) und ohne (-) Reverse Transkriptase (RT) zum Nachweis des *MS2 tags* in **50S** Untereinheiten und Monosomen (**70S**) unter Verwendung der externen Primer H98-2702-do und H98-2900-up; p278MS2 diente als Positivkontrolle (**K**) die 2logLeiter (NEB) als DNA-Größenmarker (**M**). Die PCR-Bande für das *M2tag* (231 bp, **MS2tag**) ist markiert.



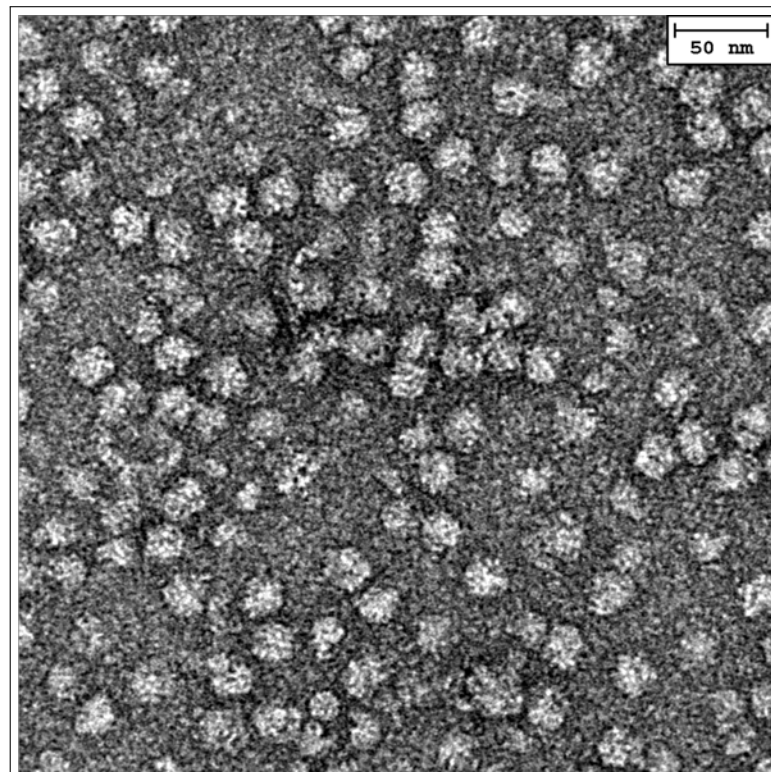
**Abb. 29:** Denaturierendes 4 % PAA-Gel zur Darstellung der rRNA aufgereinigter Ribosomen. Vergleich der rRNA aufgereinigter Ribosomen mit (**GIR1**) und ohne (**wt**) *GIR1*-Insertion in Helix 9.

#### 5.2.4 Kryo-EM mutierter Ribosomen mit dem Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9

##### 5.2.4.1 Datenerhebung

Der Stamm *XL1-Blue/pcl857/p278MS2-GI1 in H9* wurde wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben kultiviert und die Ribosomen analog dem in Kapitel 4.5.5 beschriebenen Protokoll mit den Puffern für Ribosomen von *E. coli* (siehe Tabelle 8) präpariert und aufgereinigt (siehe Kapitel 4.5.4) bis genügend Material für die Elektronenmikroskopie zur Verfügung stand. Für die Aufreinigung wurden jeweils 300 OD<sub>260</sub> cr70S eingesetzt. Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden vereinigt und mithilfe der Amicon<sup>®</sup> Ultra - 4 (Ultracel - 100k) der Firma MILLIPORE nach dem Protokoll des Herstellers aufkonzentriert. Schließlich waren 0,8 OD<sub>260</sub> aufgereinigter Ribosomen mit einer Konzentration von 2,83 OD<sub>260</sub>/mL (~68 pmol/mL) in einem Volumen von 300 µL verfügbar.

Die Negativkontrastierung (Kapitel 4.11.3.1) der Ribosomen-Lösung zeigte bei einer für die Kryo-Elektronenmikroskopie optimalen Konzentration definierte Einzelpartikel (siehe Abbildung 30), so dass mit der Herstellung von grids wie in Kapitel 4.11.3.2 beschrieben begonnen werden konnte.



**Abb. 30:** *Negative staining* aufgereinigter Ribosomen.

Ribosomen sind deutlich als helle Partikel vor dem dunklen Hintergrund zu erkennen.

Für die Rekonstruktion der mutierten Ribosomen mit dem Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9 und dem MS<sub>2</sub> *tag* in Helix 98 wurden Daten am Tecnai G2 Spirit gesammelt. Die erste manuelle Auswahl der erhaltenen Einzelbilder (Partikelbilder) zeigte, dass lediglich 8,5 % der Partikelbilder wegen offensichtlicher Defekte vor der Rekonstruktion aussortiert werden mussten. Auf die manuelle Vorauswahl der Partikelbilder wurde aus diesem Grund verzichtet, infolgedessen die Sortierung und Volumenrekonstruktion mit allen gesammelten Partikelbildern durchgeführt wurde. Tabelle 21 gibt eine Übersicht über die gesammelten Daten.

70S•GIR <sub>1</sub> in H9•MS <sub>2</sub> <i>tag</i> in H98	
Beschleunigungsspannung	120keV
Micrographen	208
Partikelbilder	159.074

**Tab. 21:** Kryo-elektronenmikroskopische Daten

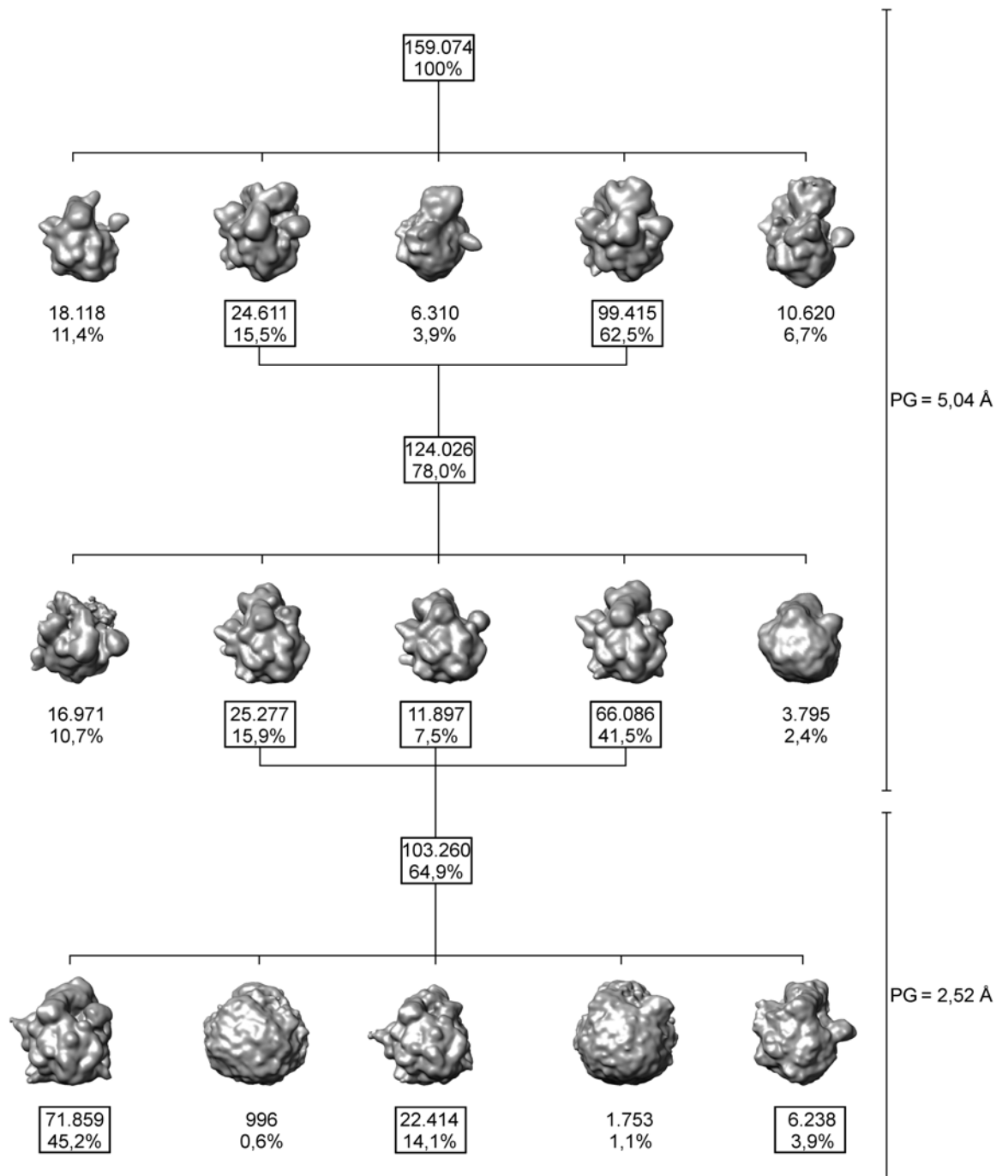
#### 5.2.4.2 Sortierung

Die Partikelbilder wurden zuerst zweifach verkleinert (dezimiert) und bei einer Pixelgröße von 5,04 Å sortiert. Diese Sortierung ergab fünf Subpopulationen, von denen die Subpopulationen 2 und 4 zusätzliche Elektronendichten in Helix 9 (Ribozym GIR<sub>1</sub>) und 98 (MS<sub>2</sub> *tag*) zeigten. Tabelle 22 zeigt die Verteilung der Partikelbilder und Abbildung 31 (oberer Teil) gibt die Verteilung graphisch wieder.

Subpopulation	1	2	3	4	5
Partikelbilder	18.118	24.611	6.310	99.415	10.620
Anteil	11,4%	15,5%	3,9%	62,5%	6,7

**Tab. 22:** Verteilung der Partikelbilder nach der ersten Sortierung bei einer Pixelgröße von 5,04 Å. Angegeben sind die absoluten Zahlen und der prozentuale Anteil am gesamten Datensatz (159.074 Partikelbilder).





**Abb. 31:** Verteilung der Partikelbilder nach den Sortierungen.

Die Verteilung der Partikelbilder nach der ersten (oberer Teil), der zweiten (mittlerer Teil) und der dritten Sortierung (unterer Teil). Die jeweiligen Pixelgrößen (PG) sind angegeben. Die Umrahmungen indizieren neben der Ausgangspopulation die jeweils wichtigen Subpopulationen. Angegeben sind jeweils die absoluten Zahlen der zugeordneten Partikelbilder bzw. ihr prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation.

Die Partikelbilder der Subpopulationen 2 und 4 wurden vereinigt (124.026 Partikelbilder) und erneut bei einer Pixelgröße von 5,04 Å sortiert. Der

Datensatz wurde wiederum in fünf Subpopulationen unterteilt, deren Verteilungen in Tabelle 23 und in Abbildung 31 (mittlerer Teil) wiedergegeben sind.

Die vierte Subpopulation der zweiten Sortierung mit 66.086 Partikelbildern zeigte deutlich zusätzliche Elektronendichten in Helix 9 (Insertion des Ribozyms GIR<sub>1</sub>) und Helix 98 (MS2 *tag*) der 23S rRNA. Subpopulation 2 mit 25.277 Partikelbildern zeigte ebenfalls zusätzliche Elektronendichten in Helix 9 und Helix 98 der 23S rRNA, die jedoch weniger deutlich ausgeprägt waren. Das aus den Partikelbildern der dritten Subpopulation (11.897 Partikelbilder) rekonstruierte Volumen wies keine zusätzlichen Dichten für die genannten Helices auf. Die Partikel der Subpopulation 1 (16.971 Partikelbilder) ergaben ein unvollständiges 70S Volumen, während Subpopulation 5 (3.795 Partikelbilder) nur Artefakte (z.B. Eiskristalle) enthielt.

Subpopulation	1	2	3	4	5
Partikelbilder	16.971	25.277	11.897	66.086	3.795
Anteil	10,7 %	15,9 %	7,5 %	41,5 %	2,4 %

**Tab. 23:** Verteilung der Partikelbilder nach der zweiten Sortierung bei einer Pixelgröße von 5,04 Å. Angegeben sind die absoluten Zahlen und der prozentuale Anteil am gesamten Datensatz (159.074 Partikelbilder).

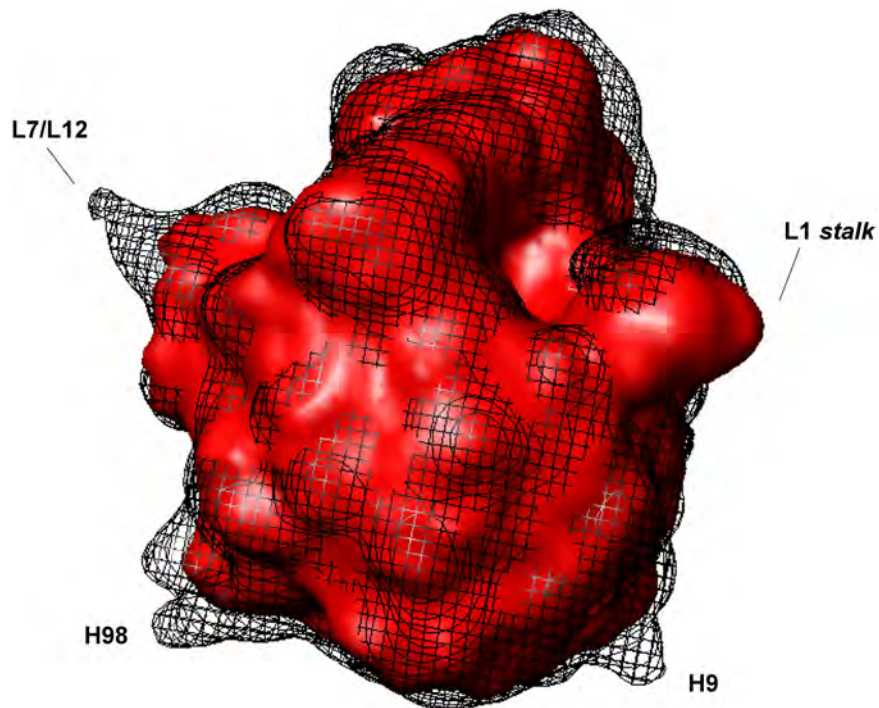
Die Partikelbilder der Subpopulationen 2,3 und 4, die alle ein vollständiges 70S Volumen ergaben, wurden vereinigt (103.260 Partikelbilder) und bei einer Pixelgröße von 2,52 Å sortiert. Bei dieser Pixelgröße wurden feinere Strukturunterscheidungen und somit eine bessere Auftrennung in Subpopulationen mit zusätzlichen Elektronendichten in beiden, einer oder keiner der Helices 9 und 98 möglich.

Die Partikelbilder wurden erneut in fünf Subpopulationen aufgetrennt, wobei die erste Subpopulation mit 71.859 Partikelbildern ein 70S Volumen mit zusätzlichen Elektronendichten in Helix 9 (Insertion des Ribozyms GIR<sub>1</sub>) und Helix 98 (MS2 *tag*) der 23S rRNA bei einer Auflösung von ~18,4 Å ergab. Diese Subpopulation enthielt 45,2 % aller Partikelbilder. Die Rekonstruktion der dritten Subpopulation (14,1 % der Partikelbilder) zeigte ein 70S Volumen mit nur geringen zusätzlichen Elektronendichten in den Helices 9 und 98 bei einer Auflösung von ~21 Å. Die fünfte Subpopulation mit 3,9 % der Partikelbilder ergab ein 70S Ribosom, das in keiner der beiden Helices zusätzliche Elektronendichten zeigte. Die Subpopulationen 2 und 4 enthielten lediglich Artefakte. Die Abbildungen 32 und 33 zeigen die rekonstruierten Volumen der Subpopulationen 1 und 3 (schwarze Maschen) jeweils im Vergleich mit der Volumenrekonstruktion der fünften Subpopulation (rote Oberfläche). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ungefähr 45 % der über den MS2 *tag* aufgereinigten Ribosomen zusätzliche Elektronendichten so-

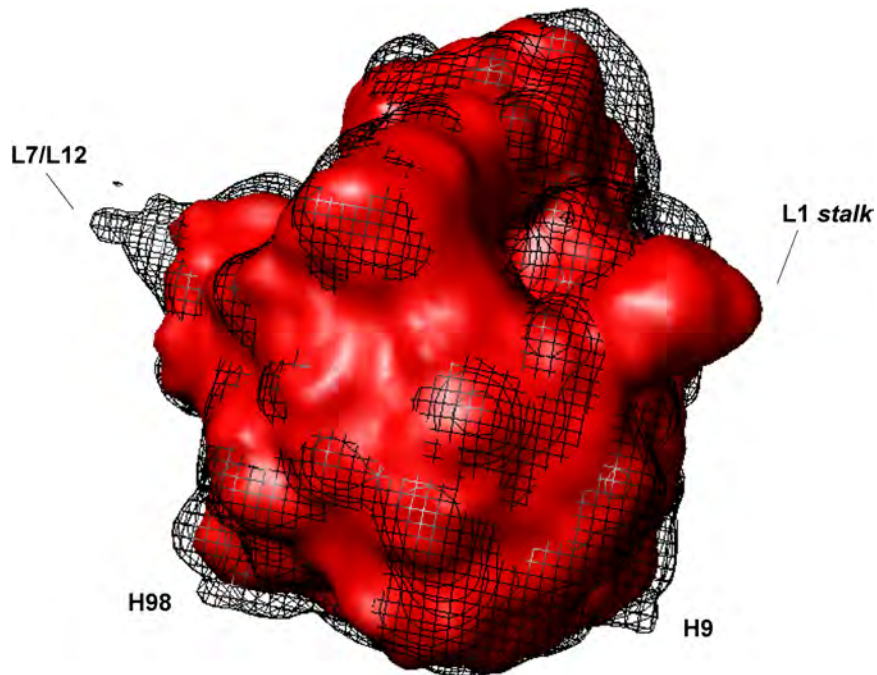
wohl in Helix 98 (MS2 *tag*) als auch in Helix 9 (Ribozym GIR<sub>1</sub>) zeigten.

Subpopulation	1	2	3	4	5
Partikelbilder	71.859	996	22.414	1.753	6.238
Anteil	45,2 %	0,6 %	14,1 %	1,1 %	3,9 %

**Tab. 24:** Verteilung der Partikelbilder nach der dritten Sortierung bei einer Pixelgröße von 2,52 Å. Angegeben sind die absoluten Zahlen und der prozentuale Anteil am gesamten Datensatz (159.074 Partikelbilder).



**Abb. 32:** Volumenvergleich der Subpopulationen 1 (schwarze Maschen) und 5 (glatte rote Oberfläche). Das Volumen der Subpopulation 1 zeigt deutlich zusätzliche Elektronendichten in den Helices 9 (H9) und 98 (H98). Der L1-stalk und der L7/L12-stalk sind indiziert



**Abb. 33:** Volumenvergleich der Subpopulationen 3 (schwarze Maschen) und 5 (glatte rote Oberfläche). Das Volumen der Subpopulation 3 zeigt im Vergleich zu Subpopulation 5 nur geringe zusätzliche Elektronendichten in den Helices 9 (**H9**) und 98 (**H98**). Der **L1-stalk** und der **L7/L12-stalk** sind indiziert

### 5.2.5 Diskussion

Der Einsatz des hitzeinduzierbaren Promotors  $\lambda P_L$  vermeidet den Zusatz chemischer Induktoren zur Expression des zu kontrollierenden Gens. Diese Art der Induktion wird daher häufig zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* verwendet. Die Expression des gewünschten Gens wird während der Inkubation bei 30°C durch das Protein cI857 unterdrückt. Bei einer Temperaturerhöhung auf 42°C wird jedoch die Repression aufgehoben, da das Repressorprotein cI857 aufgrund einer Ala66Thr-Mutation eine thermolabile Struktur besitzt [30]. Für den Einsatz des  $\lambda P_L$  Promotors und dessen Repressorprotein wurden verschiedene Strategien konzipiert. Nach Remaut et. al [48] werden ein Expressionsplasmid mit dem gewünschten Gen und ein Repressionsplasmid (pCI857) eingesetzt. Für die Expression mutierter Ribosomen wurde der Vektor p278MS2 [64] eingesetzt, der als Selektionsmarker die Ampicillin-Resistenz trägt. Das auf diesem Vektor kodierte *rrnB*-Operon trägt in Helix 98 der 23S rRNA den MS2 *tag*, der zur Aufreinigung der exprimierten Ribosomen genutzt werden kann. Die Induktion durch den Temperaturwechsel auf 42°C führt bei *E. coli* zu doppeltem Stress. Zum einen werden mutierte, eventuell nicht funktionelle Ribosomen exprimiert, zum anderen muss die Zelle durch verschiedene Mechanismen vor den Auswirkungen der erhöhten Temperatur geschützt werden. Zu diesem Zweck werden innerhalb weniger Minuten nach dem Temperaturwechsel unter Kontrolle des Faktors  $\sigma_{32}$  Hitzeschockproteine exprimiert [8, 13, 20, 37]. Die Hitzeschockproteine erfüllen verschiedene Aufgaben, wie zum Beispiel Schutz der DNA und RNA [43] und Modifizierung der tRNAs, um die Codon-Anticodon Interaktionen zu stabilisieren und die Hitzeresistenz der tRNA zu erhöhen [57]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* während der Inkubation bei erhöhter Temperatur Gene herabreguliert werden, die ribosomale Bestandteile kodieren [21]. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Expression von Genen, die Ribosomen-abbauende Proteasen kodieren [4, 14, 24]. Veränderungen des Plasmids bis hin zum Verlust von Plasmiden wurden ebenfalls beschrieben [23, 29, 31, 53, 61]. So kann die Induktion des Stammes *XL1-Blue/pCI857/p278MSs-GIR1 in H9* in Abwesenheit des Antibiotikums Kanamycin zum Verlust des Plasmids pCI857 führen, das die Kanamycin-Resistenz kodiert. Die geringere Stabilität der Ribosomen in Abwesenheit von Kanamycin lässt sich nur dahingehend erklären, dass aufgrund des Verlustes des Repressorplasmids pCI857 eine stärkere Expression mutierter 50S Untereinheiten stattfand, die aufgrund der Insertionen instabilere Monosomen bilden. Eine stärkere Expression war jedoch nicht nachweisbar (siehe Abbildung 19). Die RT-PCR mit externen Primern für Helix 9 und 98 zeigt die stärkste Expression mutierter Ribosomen mit beiden Insertionen nach 30-minütiger Induktionsdauer (siehe Abbildungen 23 und 24).

Die anschließende Abnahme mutierter 23S rRNA könnte auf die in der Literatur gezeigte Plasmid-Instabilität [29, 31] zurückzuführen sein. Eine andere Möglichkeit ist die gezielte Fragmentierung mutierter 23S rRNA bei gleichzeitiger Entfernung der Fremd-RNA-Insertionen durch zelleigene RNasen. Die fragmentierte 23S rRNA könnte dabei durchaus ihre Funktionalität behalten, wie für die natürlicherweise fragmentierte 23S rRNA in Monosomen von *S. typhimurium* gezeigt wurde [35]. Die nach 30-minütiger Induktion präparierten und aufgereinigten Ribosomen stellten eine reine Fraktion hinsichtlich des MS2 tags in Helix 98 dar (siehe Abbildung 28). Sowohl die große Untereinheit als auch die Monosomen waren jedoch eine Mischpopulation in Bezug auf Helix 9 (siehe Abbildung 27). Nur ~30 % trugen das Ribozym GIR1. Dies deutet auf posttranskriptionale Veränderungen der 23S rRNA hin, die sich durch die erwähnte Fragmentierung der 23S rRNA zur Entfernung störender Elemente erklären ließe. Die fragmentierte rRNA müsste jedoch anschließend wieder ligiert werden, da sonst die bei der RT-PCR mit externen Primern für Helix 9 auftretende Wildtyp-Bande nicht erklärbar wäre (siehe Abbildung 27). Der Nachweis unterschiedlich großer 23S rRNA ist mit einem denaturierenden PAA-Gel nicht möglich, da der Größenunterschied zwischen nativer und mutierter 23S rRNA lediglich ~220 Nukleotide (Größe der Insertion) beträgt (siehe Abbildungen 21 und 29). Der verstärkte Abbau ribosomaler Proteine während erhöhter Inkubationstemperaturen [4, 14, 24] könnte ein weiterer Grund für die geringe Ausbeute mutierter Ribosomen sein. Der an sich schon geringe Anteil mutierter 23S rRNA (~10 bis 20 % laut RT-PCR mit Gesamt-RNA, siehe Abbildungen 23 und 24) wird offensichtlich unter den Bedingungen eines vermehrten Abbaus ribosomaler Proteine kaum für die Assemblierung großer Untereinheiten genutzt. Zusätzlich wird offenbar die Insertion aus Helix 9 entfernt, was zu den gezeigten Mischpopulationen führt. Die Strategie von Tabandeh et al. [56], nach der eine kurzzeitige Induktion bei 42°C und anschließende Inkubation bei 37°C zu einer besseren Ausbeute an rekombinantem Protein führt, könnte auch im Falle mutierter Ribosomen zu einer höheren Ausbeute führen. Das Gleiche könnte für eine langsame Temperaturerhöhung von 30°C auf 42°C gelten, da sich die Zellen so besser an den Hitzeschock anpassen könnten [10].

Die dreimalige Sortierung der gesammelten Daten ergab ein 70S-Volumen bei ~18,4 Å Auflösung mit deutlich erkennbaren zusätzlichen Elektronendichten in den Helices 9 (Ribozym GIR1) und 98 (MS2 tag), wobei jene in Helix 98 größer ist. Im Vergleich zum Wildtyp enthält Helix 98 zwar nur 32 zusätzliche Nukleotide, trägt aber nach der Aufreinigung noch das MS2-GST-Fusionsprotein mit einer Größe von ~39,8 kDa. Im Gegensatz dazu befindet sich in Helix 9 eine Insertion mit 228 Nukleotiden (~76 kDa) und die zusätzliche Dichte ist demnach viel zu klein. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen würde eine Flexibilität des Ribozyms zu einer diffusen, *verschmierten* Dichte führen. Zum anderen ist es aber auch möglich,

dass die Population noch Partikelbilder mit fragmentierter Elektronendichte für Helix 9 enthält.

In einem weiteren Schritt müsste eine auf Helix 9 ausgerichtete Sortierung (*focused classification* [45]) der Partikelbilder aus der ersten und dritten Subpopulation durchgeführt werden. Dabei wird durch Maskierung der Volumen nur der interessante Teil in Helix 9 zur Sortierung herangezogen, so dass die Populationen homogener werden. Die zur Zeit noch rudimentäre zusätzliche Elektronendichte in Helix 9 würde dann deutlicher hervortreten und auch an Größe zunehmen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Ribosomen mit zwei Insertionen möglich ist, wenn die Ausbeute mit ~45 % der aufgereinigten Ribosomen auch äußerst gering ist, zumal die aufgereinigten Ribosomen nur ungefähr 10 - 20 % der Gesamtpopulation darstellen. Die Auflösung der erhaltenen Volumenrekonstruktion ist für eine präzise Interpretation der Struktur des Ribozyms GIR<sub>1</sub> ungeeignet, bietet jedoch vielversprechende Evidenzen für die Präsenz des Ribozyms in Helix 9 der 23S rRNA. Die für eine Interpretation benötigte hochauflösende Struktur im subnanometer-Bereich erfordert die Sammlung hochauflösender Daten mit dem Tecnai G2 Polara, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vorgenommen werden konnte.





ZUSAMMENFASSUNG

---

Die am Ribosom erfolgende Proteinbiosynthese unterteilt sich in die vier Schritte Initiation, Elongation, Termination und Recycling. Die Elongationsphase als zyklisch ablaufender Vorgang beinhaltet die Anlieferung aminoacylierter tRNAs in die A-Stelle des Ribosoms, die Bildung einer neuen Peptidbindung und die Translokation der tRNAs im Komplex mit der gebundenen mRNA. In Prokaryonten wird die Translokation vom Elongationsfaktor G (EF-G) katalysiert, dessen Aktivität von der Hydrolyse des Kofaktors GTP abhängt. Trotz der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen EF-G-Ribosomen-Komplexe und biochemischer Studien ist der genaue Vorgang der Translokation noch unbekannt. Der Beitrag des Elongationsfaktors G, der tRNAs und der verschiedenen Konformationen des Ribosoms zur Translokation ist in molekularen Details noch nicht verstanden worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag zum Verständnis dieses Vorgangs geleistet werden. Dazu wurde ein Komplex aus 70S Ribosomen von *T. thermophilus* mit EF-G und GTP in Gegenwart von Fusidinsäure gebildet und kryoelektronenmikroskopisch untersucht. Fusidinsäure ermöglicht zwar die für die Translokation benötigte GTP-Hydrolyse, verhindert aber Konformationsänderungen im EF-G und so dessen Dissoziation vom Ribosom. Der kryoelektronenmikroskopisch gesammelte Datensatz konnte mithilfe des *multiparticle refinements* in zwei bisher nicht gesehene Konformationen des Ribosoms mit 7,8 Å Auflösung für die erste Subpopulation und 7,6 Å Auflösung für die zweite Subpopulation aufgetrennt werden. Beide Subpopulationen enthalten Elektronendichte für EF-G und eine tRNA, zeigen aber signifikante Unterschiede in ihrer Konformation.

Die erste der beiden Subpopulationen zeigt eine Verdrehung (engl. *ratcheting*) der 30S Untereinheit gegen die große Untereinheit um 7° mit einer gleichzeitigen Drehbewegung des Kopfes (engl. *swivelling*) ungefähr senkrecht zum *ratcheting* um 5° relativ zur Körper/Plattform-Region der kleinen Untereinheit. Im Gegensatz dazu ist die 30S Untereinheit in der zweiten der beiden Subpopulationen nur um 4° gegen die große Untereinheit verdreht, der Kopf jedoch um 18° gegenüber der Körper/Plattform-Region gedreht. Die hochaufgelösten Strukturen ermöglichten die Visualisierung von Sekundärstrukturen und die Erzeugung molekularer Modelle mit dem neu entwickelten Algorithmus MDFFIT, einem flexiblen Einpassen (engl. *docking*) von Kristallstrukturen unter Berücksichtigung molekularer Dynamiken. Dabei zeigte sich, dass die Konformation der ersten Subpopulation vergleichbar ist mit der in der Literatur beschriebenen Konformation des PRE-Zustands und dass sich die tRNA in der hybriden Bindung zwischen der P- und der E-Stelle befindet (P/E). Dies führt zu der Annahme, dass es

sich bei der ersten Subpopulation um ein pre-translokationales Intermediat ( $TI^{PRE}$ ) handelt.

Die zweite Subpopulation zeigt das Ribosom und die tRNA dagegen in einer neuen Konformation. Der *Anticodon-Stem-Loop* (ASL) der tRNA hat sich im Vergleich mit dem  $TI^{PRE}$  um 8 - 10 Å in Richtung der E-Stelle bewegt, während gleichzeitig der Kontakt mit den P-Stellen-Komponenten des Kopfes der kleinen Untereinheit aufrechterhalten wird, indem die tRNA der starken Drehbewegung des Kopfes folgt. Diese gleichzeitige Interaktion mit P-Stellen-Komponenten des Kopfes und E-Stellen-Komponenten der Körper/Plattform-Region der kleinen Untereinheit kann als hybrides Intermediat innerhalb der 30S Untereinheit angesehen werden. Gleichzeitig bleibt der Kontakt mit der E-Stelle der 50S Untereinheit bestehen, so dass die übliche Nomenklatur zur Bezeichnung der tRNA-Position innerhalb des Ribosoms erweitert werden muss. Die neue hybride Bindung wird als pe/E bezeichnet (P-Stelle auf dem Kopf und E-Stelle auf der Plattform der 30S Untereinheit/E-Stelle auf der 50S Untereinheit). Gemeinsam mit dem gebundenen mRNA Codon kommt der ASL der Position einer komplett translozierten tRNA sehr nahe und diese Konformation einer partiell translozierten tRNA stellt ein post-translokationales Intermediat ( $TI^{POST}$ ) auf dem Weg zur vollständigen Translokation dar.

Im Gegensatz zu den verdrillten Konformationen der tRNA im  $TI^{PRE}$  und  $TI^{POST}$  unterscheidet sich die Grundstruktur des Elongationsfaktors G in beiden Subpopulationen nur unwesentlich. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich allerdings in Domäne IV des Faktors, die im  $TI^{POST}$  in Kontakt mit Helix 34 der 16S rRNA tritt. Dieser Kontakt wird ermöglicht, indem EF-G seine Position im Vergleich zum  $TI^{PRE}$  leicht verändert hat und Helix 34 der starken Drehbewegung des Kopfes gefolgt ist. Dadurch ändert Helix 34 seine Position um 12 Å und kann nicht mehr mit der Region 530 der 16S rRNA interagieren. Als Folge davon wird der mRNA-Eingangskanal geöffnet und die Translokation des mRNA-tRNA<sub>2</sub>-Komplexes ermöglicht. Bis jetzt wurden intermediäre Zustände der Untereinheiten-Rotation als Intermediate auf dem Weg zur vollständigen Verdrehung betrachtet. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Bewegung der tRNAs und letztendlich deren Translokation abhängig ist von einer Rückrotation der Untereinheiten und der Drehbewegung des Kopfes der kleinen Untereinheit. Dabei führt die schnelle GTP-Hydrolyse zu einer Destabilisierung der maximalen Untereinheiten-Rotation, da direkte und indirekte Kontakte der *switchI*-Region von EF-G mit der maximal rotierten 30S Untereinheit beeinflusst werden könnten und eine Rückrotation erleichtern. Im Kontext des Ribosoms, das als brown'sche molekulare Maschine beschrieben werden kann, wirkt EF-G wie eine Sperrklinke, die die Rückrotation der 30S Untereinheit von der Translokation entkoppelt und auf diese Weise die Translokation über mehrere intermediäre Zustände der tRNAs zwischen und innerhalb der Untereinheiten in die klassisch gebundenen Positionen

(P/P und E/E) fördert und dirigiert.

Die in den letzten Jahren vermehrt entdeckten ncRNAs erfüllen vielfältige biologische Aufgaben und die Kenntnis ihrer dreidimensionalen Struktur ist oftmals ein wichtiger Schritt zum Verständnis ihrer Funktionsweise. Da die meist kleinen ncRNAs nur schlecht den klassischen Strukturanalyseverfahren zugänglich sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine andere Möglichkeit zur Aufklärung der Struktur gesucht. Die Verankerung kleiner RNA-Moleküle auf größeren Molekülen mit bekannter Struktur ermöglicht die Lokalisation der fixierten RNA. Die bei der Kryo-Elektronenmikroskopie eingesetzte Schockgefrierung konserviert zudem die RNA in einem quasi nativen Zustand und verhindert die Bildung von Artefakten, wie sie bei der Kristallbildung für die Röntgenkristallographie auftreten können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene ncRNAs (RNase P RNA von *E. coli*, *B. subtilis* und *T. thermophilus*, die 6S RNA von *A. aeolicus* und das Ribozym GIR<sub>1</sub> von *D. iridis*) in unterschiedliche Helices (9, 25, 45 und 98) der 23S rRNA von *E. coli* insertiert, um die Struktur der jeweiligen ncRNA mittels Kryo-Elektronenmikroskopie zu analysieren. Das 70S Ribosom von *E. coli*, dessen Struktur weitgehend bekannt ist, wurde dabei als Plattform benutzt. Die Expression mutierter Ribosomen erfolgte in einem hitzeinduzierbarem System mittels Temperaturwechsel auf 42°C in unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen. Die gleichzeitige Expression nativer und mutierter 23S rRNA in diesem hitzeinduzierbaren System erforderte die Abtrennung der mutierten von den nativen Ribosomen. Dies war über den in Helix 98 der mutierten 23S rRNA insertierten MS2 *tag* möglich.

Der über eine RT-PCR geführte Nachweis mutierter Ribosomen verlief im Fall der ncRNAs meist negativ, während sich der MS2 *tag* schon in cr70S, die eine Mischung nativer und mutierter Ribosomen darstellten, nachweisen ließ. So trugen aufgereinigte Ribosomen zu 100 % den MS2 *tag* in Helix 98, während die zusätzlich insertierte ncRNA kaum oder gar nicht nachweisbar war.

Ein deutlicher RT-PCR-Nachweis mutierter Ribosomen, die sowohl den MS2 *tag* als auch eine ncRNA trugen, gelang nur im Fall der Insertion des Ribozyms GIR<sub>1</sub> in Helix 9. Die Induktion durfte allerdings nur über einen Zeitraum von 30 min erfolgen und führte zu einer 10 - 20%igen Expression mutierter 23S rRNA. Die Aufreinigung der cr70S über den MS2 *tag* in Helix 98 ergab Ribosomen, die zu 100 % diesen *tag* in Helix 98 trugen, aber nur zu ~30% das Ribozym GIR<sub>1</sub> in Helix 9. Die zusätzliche Insertion in Helix 9, die eventuell die Funktion des Ribosoms beeinträchtigt, wurde durch bisher nicht verstandene Mechanismen auf zellulärer Ebene aus dem Ribosom entfernt.

Die kryo-elektronenmikroskopische Analyse der über den MS2 *tag* aufgereinigten Ribosomen ergab, dass bei etwa 45 % der Partikel zusätzliche Elektronendichten sowohl in Helix 9 als auch Helix 98 vorhanden waren. Die

Auflösung der erhaltenen Volumenrekonstruktion ist mit  $18,4 \text{ \AA}$  allerdings viel zu niedrig, um eine präzise Interpretation der Struktur des Ribozyms vorzunehmen. Die Voraussetzungen für die Erstellung einer hochauflösenden Struktur, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden konnte, sind allerdings erfüllt.

SUMMARY

---

Protein biosynthesis is carried out by the ribosome and can be divided into four steps: initiation, elongation, termination and recycling. The elongation phase, a cyclic process, comprises the delivery of aminoacylated tRNAs to the A-site, peptide bond formation and translocation of tRNAs together with bound mRNA. In prokaryotes, translocation is catalysed by elongation factor G (EF-G) in a GTP-dependent manner. The exact mechanism of translocation is still unclear, although many biochemical studies have addressed this functional aspect of translation and high resolution structures of ribosomal complexes containing EF-G have become available. The intricate interplay of EF-G, tRNAs and different conformational states of the ribosome during translocation is far from being fully understood in mechanistic terms.

As a result of this PhD work, novel insight into the mechanism of translation has been gained. Starting point was the formation and purification of ribosomal complexes consisting of 70S ribosomes from *T. thermophilus* bound to EF-G in its GDP form stalled with fusidic acid; the antibiotic allows GTP hydrolysis but inhibits conformational changes of EF-G and dissociation of EF-G from the ribosome. Such particles, further containing a deacylated tRNA, were analyzed by cryo-electron microscopy (cryo-EM).

The collected cryo-EM data could be divided by multiparticle refinement into two, as yet undetected subpopulations within EF-G:ribosome complexes with 7.8 Å resolution for the first and 7.6 Å resolution for the second subpopulation. Both subpopulations show density for EF-G and one tRNA, but represent different conformational states.

The first subpopulation showed a 50S:30S ratcheting of  $\sim 7^\circ$  with a modest swiveling of the 30S head of  $\sim 5^\circ$ . In contrast, a smaller ratcheting of only  $4^\circ$  is observed for the second subpopulation, but in this case the swivelling of the 30S head is increased to  $18^\circ$ . The high resolution of the structures enabled the visualization of secondary structures and the generation of molecular models with the new developed algorithm MDFIT which allows for the flexible docking of crystal structures considering molecular flexibilities. It could be shown that the conformation of the first subpopulation is comparable to ribosomes in the PRE-state, with the tRNA in a hybrid position between P- and E-site (P/E) as described in the literature. Accordingly, this subpopulation has been proposed to represent a pre-translocational intermediate ( $TI^{PRE}$ ).

The second subpopulation shows the ribosome and the tRNA in a new conformation. In comparison with the  $TI^{PRE}$  state, the anticodon stem-loop (ASL) has moved about 8–10 Å towards the E-site while maintaining contact

with P-site components of the 30S head, enabled by the tRNA following the movement of the head. The simultaneous interaction with P-site components of the 30S head and E-site components of the 30S body/platform is the hallmark of this newly identified intersubunit hybrid site within the small subunit. As the contact with the E-site of the 50S subunit is maintained, the previous nomenclature describing hybrid sites has to be extended. This new tRNA binding state is referred to as the pe/E hybrid position: the tRNA forms P-site contacts with the 30S head and E-site contacts with the 30S platform, while being positioned at the E-site on the 50S side. The ASL together with the bound mRNA is very close to a fully translocated tRNA and the conformation of the partially translocated tRNA is considered to be a post-translocational intermediate ( $TI^{POST}$ ). In contrast to the twisted conformations of the tRNA, EF-G shows only slight positional differences within both subpopulations. A significant difference is seen for domain IV of EF-G which gets in contact with helix 34 of 16S rRNA in the  $TI^{POST}$  state. This contact is made possible by a small shift of the position of EF-G and by helix 34 following the movement of the head. The position of helix 34 has changed by 12 Å while interaction with the 530 region of 16S rRNA is disrupted. As a result, the mRNA entry channel is opened and translocation of the mRNA-tRNA<sub>2</sub>-complex is enabled.

So far, intermediate states of inter-subunit rotation were considered to be intermediates on the pathway to the fully rotated state. The present findings show that movement of tRNAs and translocation is dependent on back-ratcheting of the subunits and swiveling of the 30S head. We propose that fast GTP hydrolysis influences the interaction of the switch I region of EF-G with the 30S subunit, leading to a destabilization of the fully ratcheted state to enable back rotation. Based on the model of the ribosome acting as a Brownian ratchet machine during translocation, EFG is suggested to act as a dynamic pawl, decoupling the unratcheting motions of the ribosome from the transition of hybrid state tRNAs back into their classical states. Thereby, EF-G provides directionality and accelerates translocation of the tRNAs via several intermediate inter- and intra-subunit hybrid states into the classical P/P and E/E sites of the POST state.

The numerous non-coding RNAs (ncRNAs) discovered in recent years exert a plethora of biological functions. The knowledge of their three-dimensional structure is important towards understanding their mode of function. However, many ncRNAs have turned out to be not amenable to X-ray crystallography. Here we pursued the approach to express ncRNAs as part of the 23S rRNA in order to anchor and expose these ncRNAs on the structurally well-characterized ribosomal surface for structural analyses by cryo-electron microscopy. The use of cryo-electron microscopy combined with shock-freezing of the samples preserves the native state of the ncRNA and avoids generation of artefacts as they are possible in X-ray crystallography.

Several different ncRNAs (RNase P RNA of *E. coli*, *B. subtilis* and *T. thermophilus*, 6S RNA of *A. aeolicus* and the ribozyme GIR1 of *D. iridis*) were covalently linked to distinct helices of 23S rRNA (helices 9, 25, 45 and 98) of *E. coli* to elucidate the structure of the inserted RNA molecule using the 70S ribosome as a platform of known structure. Expression of mutated ribosomes was explored in different *E. coli* strains using a heat-inducible promoter system. This approach required to separate the simultaneously expressed native ribosomes from the mutant ones. This was possible by purification via an MS2 tag which was inserted into helix 98 of mutated ribosomes.

Using RT-PCR, it was impossible in most cases to detect significant levels of 23S rRNA carrying the ncRNA insertion, while detection of the MS2 tag was always possible in cr70S fractions representing a mixture of native and mutated ribosomes. Ribosomes purified via the MS2 tag were pure fractions of ribosomes carrying the MS2 tag, but the ncRNA insertions were hardly or not at all detectable.

A distinct detection of mutant ribosomes carrying both the MS2 tag and the ncRNA was only feasible in the case of the ribozyme GIR1 inserted into helix 9 of 23S rRNA. The corresponding strain had to be induced for only 30 minutes, resulting in expression of mutated 23S rRNA to a level of 10-20% of total cellular 23S rRNA. Affinity purification of corresponding cr70S preparations resulted in ribosomes all carrying the MS2 tag in helix 98, but only ~30% also harboured the ribozyme GIR1 in helix 9. In general, the additional insertion in helix 9 seems to disturb the function of the ribosome, leading to excision of the inserted ncRNA and/or degradation of mutant 23S rRNA as part of as yet unknown cellular defense mechanisms.

Cryo-EM analysis of affinity-purified ribosomes resulted in a volume with additional density for helix 9 (ribozyme GIR1) and helix 98 (MS2 tag) in ~45% of the particle images. The resolution of 18.4 Å achieved so far is too low for a detailed structural interpretation, but provides the basis for the collection of a data set that is sufficient to generate a high resolution structure.





# ANHANG



2D-STRUKTUREN KLONIRTER RNAS

---

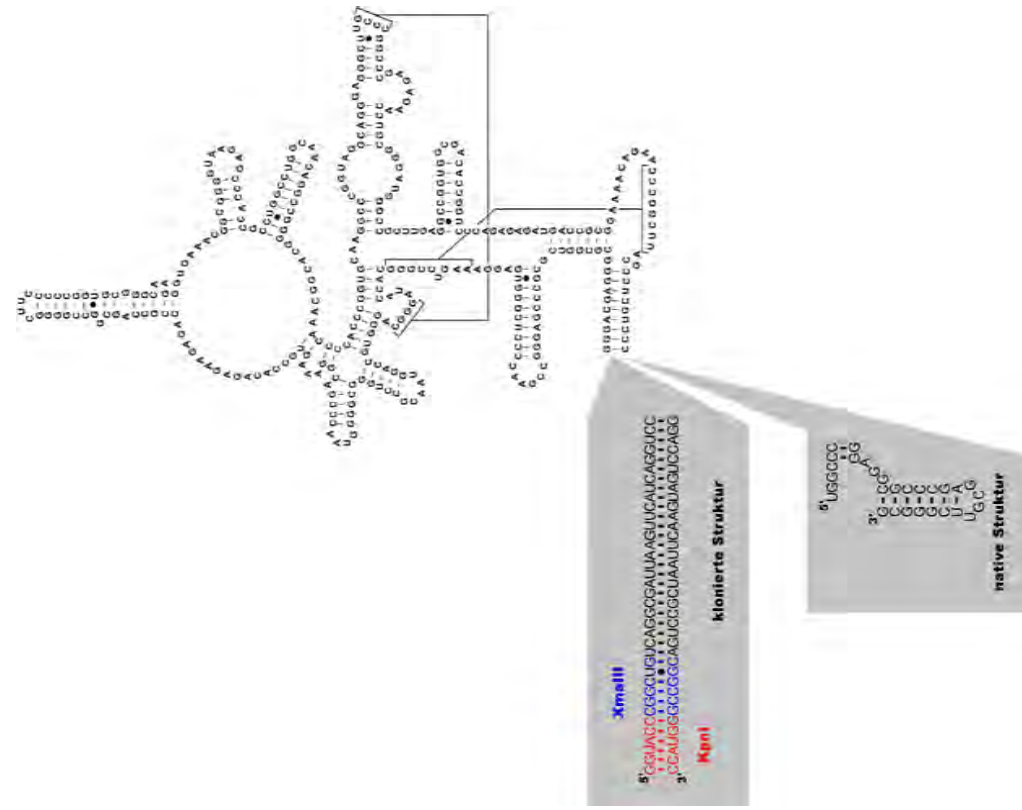


Abb. 35: RNase P RNA von *T. thermophilus* mit verlängerter Helix P1

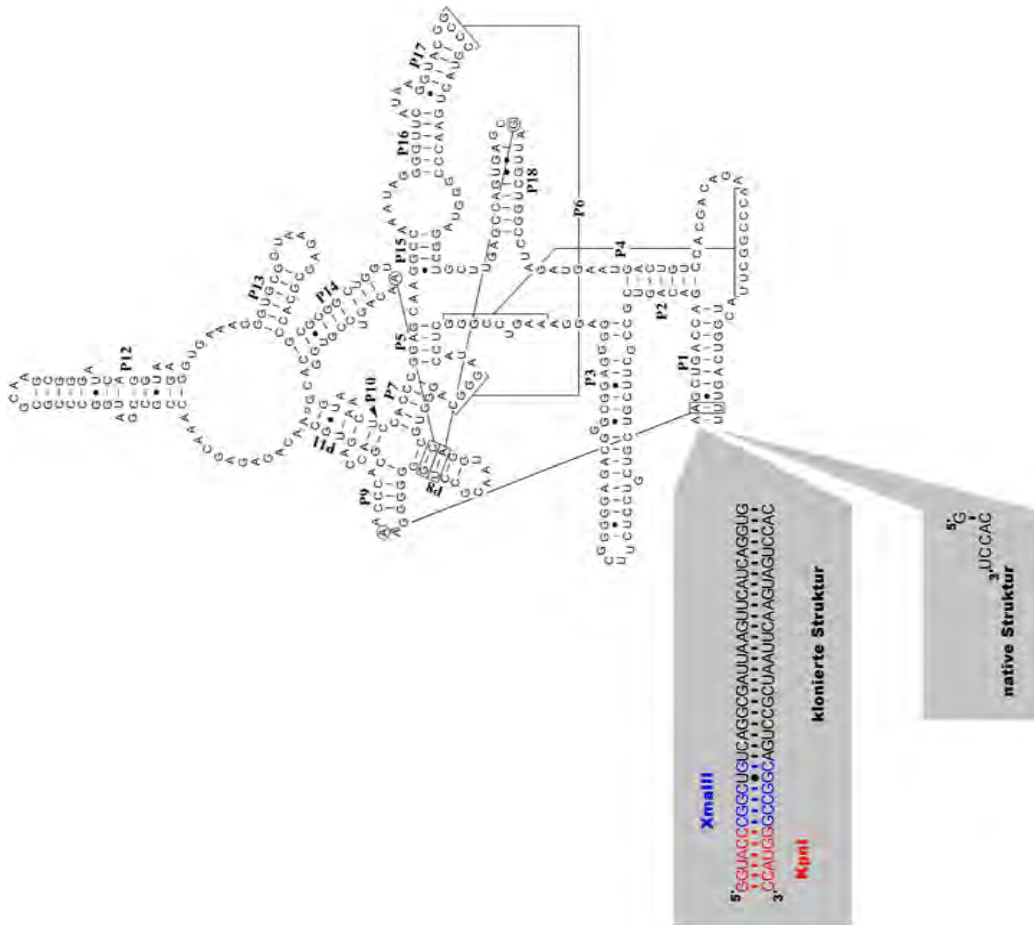


Abb. 34: RNase P RNA von *E. coli* mit verlängerter Helix P1

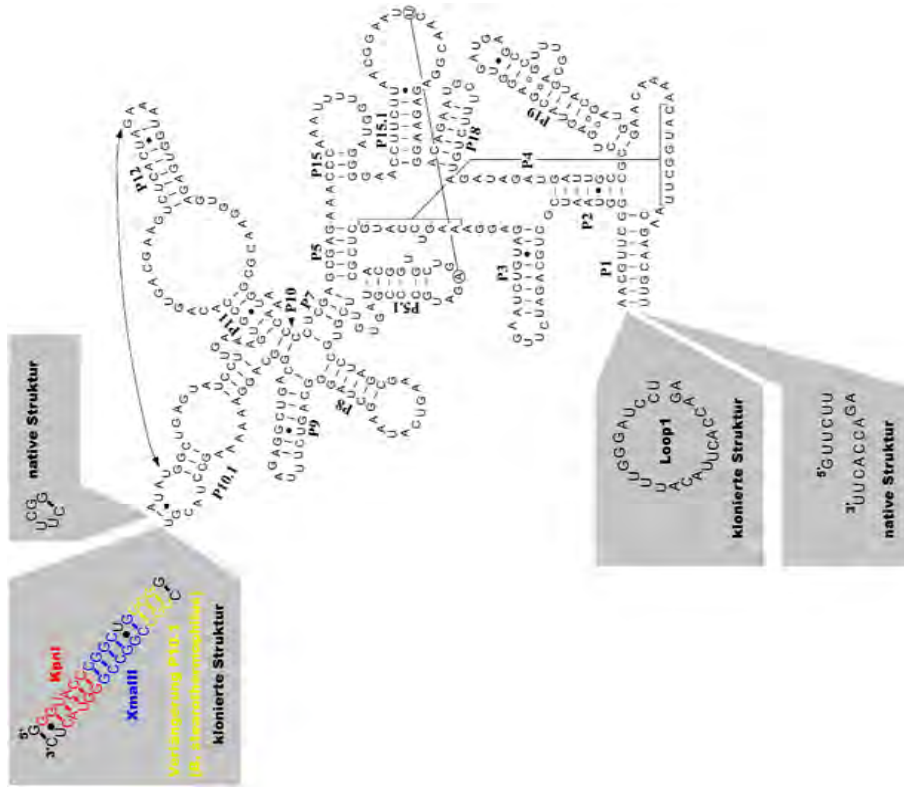


Abb. 37: RNase P RNA von *B. subtilis* in zirkulär permutierter Form

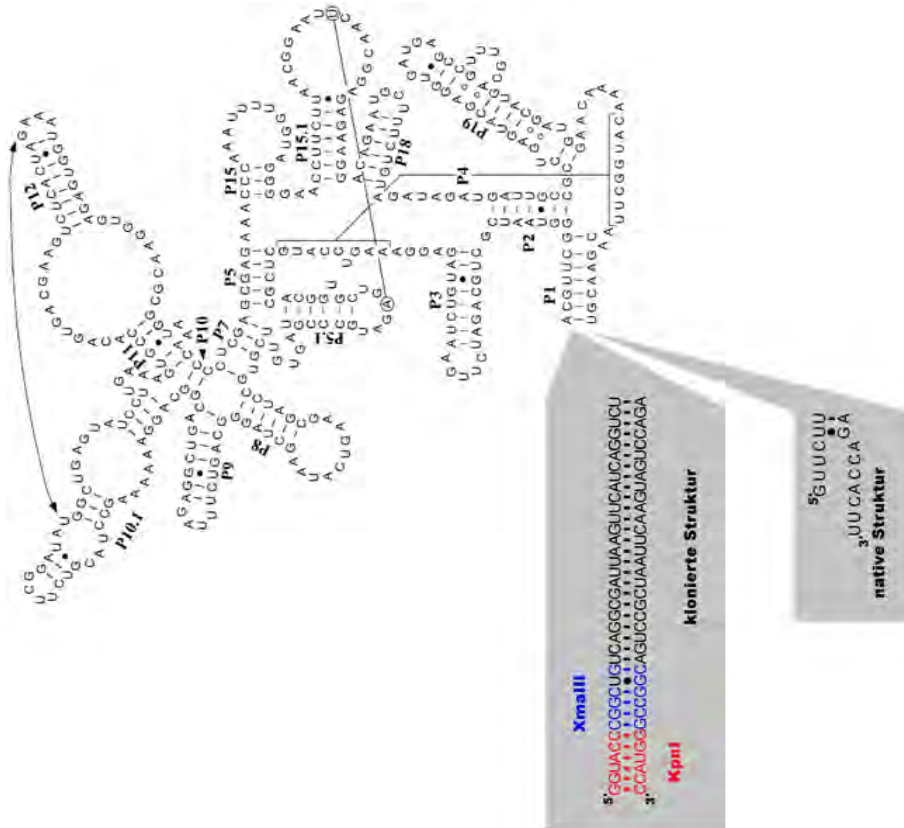


Abb. 36: RNase P RNA von *B. subtilis* mit verlängerter Helix P1



## MATERIAL

## b.o.6 Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp
<i>B. subtilis</i> W168 (wt)	<i>rpoB18</i>
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG <math>\Phi</math>8odlacZ <math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169, hsdR17(<i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i>), <math>\lambda</math>-</i>
<i>E. coli</i> DH10 (TOP10)	F <sup>-</sup> <i>mcrA <math>\Delta</math> (mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\phi</math>lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 nupG recA1 araD139 <math>\Delta</math>(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 <math>\lambda</math><sup>-</sup></i>
<i>E. coli</i> JV500A	<i>thr-1 araD139 <math>\Delta</math>(gpt-proA)62 lacY1 tsx-33 supE44 galK2 hisG4 rpsL31 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1 sulA211 rnc14 (rnc::<i>Tn10</i>)</i>
<i>E. coli</i> TA542	$\Delta$ <i>rrnE <math>\Delta</math>rrnB <math>\Delta</math>rrnA <math>\Delta</math>rrnH <math>\Delta</math>rrnG::cat <math>\Delta</math>rrnC::cat <math>\Delta</math>rrnD::cat <math>\Delta</math>recA56/pTRNA66 pHKrrnC</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44F' [::<i>Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> <math>\Delta</math>(lacZ)M15]hsdR17(<i>r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup></i>)</i></i>

Tab. 25: Bakterienstämme

## b.o.7 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Roth
Acrylamid/Bis 19:1 (30%)	BioRad
Acrylamid/Bis 29:1 (40%)	BioRad
Acrylamid/Bis 37,5:1 (25%)	BioRad
Agar	Bacto
Agarose	Invitrogen, Serva
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin, Na-Salz	Roth
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA	Ambion
CoomassieBrilliantBlue	Sigma-Aldrich
D(+)-Glukose	Fluka
DTT((1, 4-Dithio-DL-threitol))	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DNase I (RNase-frei)	Ambion
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethanol, vergällt	Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
Fotoentwickler	KODAK
Fotofixierer	KODAK
Glycerin	Merck
Guanidin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Bacto
HEPES	Calbiochem
Isopropanol	Merck
Kaliumacetat	Merck

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*



Substanz	Hersteller
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxyd	Merck
Kanamycinmonosulfat	Sigma-Aldrich
Magnesiumacetat-tetrahydrat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
Megaclear-Kit	Ambion
β-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natrium-dihydrogenphosphat·H <sub>2</sub> O	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid	Merck
Natriumperiodat	Sigma-Aldrich
Pepton	Bacto
Phenol	Roth
Phenol/Chloroform	Roth
Schwefelsäure, 95%	Roth
TBE Urea sample buffer	BioRad
10xTBE-Puffer	Invitrogen
TEMED	Invitrogen
Tetracyclin	Invitrogen
Titriplex III (EDTA)	Merck
Toluidine Blue	Sigma-Aldrich
Trichlormethan	Roth
Tris(hydroxymethylaminomethan)	Merck
Tris(hydroxymethylaminomethan)-hydrochlorid	Merck
TritonX-100	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
Trizol LS	Invitrogen
Trypton	Bacto

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

Substanz	Hersteller
Tween-20	Sigma-Aldrich
Urea (ultrapure)	Invitrogen
RNase-freies Wasser	Gibco Ultrapure (UP)
Wasserstoffperoxid	Roth
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

Tab. 26: Chemikalien

## b.o.8 DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Erkennungssequenz
6S-5'	AATGGTACCCGGCTGCTTAAGGTCT GCCCTGTTCGTG	KpnI
6S-3'	ATACGGCCGCTTAAGGTCCGCCCTG CCGCAGTG	XmaIII
GIR-1	AATGGTACCCGGCTGGCGGTTTGGT TGGGTTGGGAAGTAT	KpnI
GIR-2	TTGTCTTGGGATACCGGATGCTTCC	
GIR-3	TTAATGGTACCCGGCTGGCGGT	KpnI
GIR-4	TTACGGCCGGCGGTTTGATTGTCTT GGGATACCGGATGCTTCC	XmaIII
GIR-5	AATACTAGTGCGGTTTGGTTGGGTT GGGAAGTAT	SpeI
GIR-6	AATACTAGTGCGGTTTGGTTGTCTT GGGATACCGGATGCTTCC	SpeI
L1-Bsub-5'	ACCACTTACATTTGGGATCCTAACG TTCGGGTAATCGCTGC	

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

Name	Sequenz (5'-3')	Erkennungssequenz
L1-Bsub-3'	TAGGATCCCAAATGTAAGTGGTCTA ACGTTCTGTAAGCCATGT	
P1-Bsub-5'	AATGGT <u>ACCCGG</u> CTGTCAGGCGATT AAGTTCATCAGGTCTAACGTTCTGGG TAATCGCTGCAGATC	KpnI
P1-Bsub-3'	ATACGGCCGTCAGGCGATTAAGTTC ATCAGGTCTAACGTTCTGTAAGCCA TGTTTTGTTCC	XmaIII
P1-Coli-5'	AATGGT <u>ACCCGG</u> CTGTCAGGCGATT AAGTTCATCAGGTGAAGCTGACCAG ACAGTCGCCGCTTC	KpnI
P1-Coli-3'	ATACGGCCGTCAGGCGATTAAGTTC ATCAGGTGAAACTGACCGATAAGCC GGTTCCTGTC	XmaIII
P1-Thermus-5'	AATGGT <u>ACCCGG</u> CTGTCAGGCGATT AAGTTCATCAGGTCCGGGACGAGGG CGCGGT	KpnI
P1-Thermus-3'	ATACGGCCGTCAGGCGATTAAGTTC ATCAGGTCCGGGACGAGGCGTAAGC	XmaIII
P10.1-Bsub-5'	AATGGT <u>ACCCGG</u> CTGGCCGATATGG CTGAGTATCCTTGAAAGTG	KpnI
P10.1-Bsub-3'	AATCGGCCGCGGACGTAGGCTTTT TTCCTGCCG	XmaIII

**Tab. 27:** Klonierungsprimer.

Die Erkennungssequenzen sind unterstrichen. Primer, die auch als interne Primer für die RT-PCR eingesetzt wurden, sind fettgedruckt.

Name	Sequenz (5'-3')	Nachweis der
RT-P <sub>1</sub>	GGCCGTCAGGCGATTAAGTT	Insertion via P <sub>1</sub>
RT-P <sub>10.1</sub>	GCGGACGTAGGCTTTTTTCC	Insertion via P <sub>10.1</sub>
6S-RT <sub>5</sub>	GCTTAAGGTCTGCCCTGTTCGTG	6S RNA
6S-RT <sub>3</sub>	GTCCGCCCTGCCGCAGTG	6S RNA

**Tab. 28:** Interne Primer.  
Analytische Primer, die spezifisch für die insertierte Sequenz sind.

Name	Sequenz (5'-3')	Helix der 23S rRNA
H <sub>9</sub> -NEU	CCGAATGGGGAAACCCAG	9
H <sub>9</sub> NEU down	GAAAGAAACATCTTCGGGTTGTGAG	9
H <sub>9</sub> -40-do	CAGAGGCGATGAAGGACGTGC	9
H <sub>9</sub> -236-up	GAATCTCGGTTGATTCTTTTTCC	9
Helix 9-5'	TGAAGGACGTGCTAATCTGCG	9
Helix 9-3'	CGCCGCTACTGGGGGAAT	9
H <sub>9</sub> -out-3	GGTTCGCCTCATTAACCTATG	9
H <sub>25</sub> -460-do	CCGTGAGGGAAAGGCGAAAAG	25
H <sub>25</sub> -650-up	GCCCAGTTAAGACTCGGTTTCC	25
Helix 25-5'	CCAGTACCGTGAGGGAAAGG	25
Helix 25-3'	GCCCAGTTAAGACTCGGTTTC	25
H <sub>25</sub> -out-3	GCTACAGAATATAAGTCGCTGAC	25
H <sub>25</sub> -NEU	ACCGTGTACGTACAAGCAGTG	25

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*

Name	Sequenz (5'-3')	Helix der 23S rRNA
<b>H45-1116-do</b>	CCTGCGCGGAAGATGTAACGG	45
H45-1280-up	CCCGCTTTATCGTTACTTATG	45
<b>Helix 45-5'</b>	CTCACTGGTCGAGTCGGC	45
Helix 45-3'	CCGGCGCGAGGGCTTTTC	45
H45-out-3	TTACTTATGTCAGCATTTCGCACTTC	45
<b>H45 NEU</b>	CTAAACCATGCACCGAAGCTG	45
<b>H98-2702-do</b>	GCCAATGGCACTGCCCGGTAGC	98
H98-2900-up	TAAGCCTCACGGTTCATTAG	98

**Tab. 29:** Externe Primer.

Für die 23S rRNA spezifische Primer, die auch für Sequenzierungen eingesetzt wurden (fettgedruckt).

#### b.o.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
Restriktionsenzym <i>KpnI</i>	MBI Fermentas
Restriktionsenzym <i>SphI</i>	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>SpeI</i>	New England Biolabs
Restriktionsenzym <i>XbaI</i>	MBI Fermentas
Restriktionsenzym <i>XmaIII</i>	New England Biolabs
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene, Heidelberg
<i>Pwo</i> -Polymerase	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
T <sub>4</sub> DNA-Ligase	Gibco BRL, Eggenstein

**Tab. 30:** Enzyme

## b.o.10 Geräte

Gerät	Hersteller
Allegra 25R (Zentrifuge)	Beckmann
Amicon-Filter	Millipore
Autoklav	H + P
Brutschrank	Memmert
Elektrophoresekammer SE 260	Amersham
Elektronenmikroskop Polara	FEI Company
Feinwaagen	Satorius, Adventurer
Cool Pix 45000 Digitalkamera	Nikon
Geltrocknungsrahmen	Roth
Gradientmaster 107	BioComp
Kryo-Station	FEI Company
Laborbedarf, diverses	Roth; Cotech
Laborflaschen	Schott
Magnetrührer KMO <sub>2</sub> , MR 3001	Heidolph, Kiker Labortechnik
Mikrowelle Microwave 800	Severin
Mini VE Vertical Electrophoresis System	Amersham
Netzgeräte EPS 301 / EP 3501	Amersham Pharmacia
Optima Max (Zentrifuge)	Beckmann
PC, PC-Cluster	SUN Microsystems
PCR Mastercycler Personal	Eppendorf
pH-Meter 510	Cyberscan
Photometer DU 800	Beckmann Coulter
Photometer DU-600	Beckmann Coulter
Pipetten	Eppendorf
Piston Gradient Fractionator	BioComp
Primescan D-8200 Drum Scanner	Heidelberg
Primestation	Heidelberg
Reinstwasseranlage	Milli-Q Millipore
Rotoren:	Beckman-Coulter
SW28, SW40 Ti, 50.2 Ti, TA-10-250, MLS-50, MLA-80, TLA-100.4	
Schüttler Vortex-Genie	Bender&Hobein
<i>Fortsetzung auf der nächsten Seite</i>	

Gerät	Hersteller
Tischzentrifugen: 5415 D, 5415 R	Eppendorf
Typhoon Imager	Amersham
Ultrazentrifugenbecher	Beckmann
UV Handlampe 254/366nm	Benda
UV-Transilluminator	Ultra Violet Products
Wasserbad DC 10	Thermo Haake
Whatman-Folie Cellophane Support	BioRad

Tab. 31: Geräte

b.o.11 *Software*

Chimera, UCSF	University of California [47]
ctffind.com	HHMI, Brandeis
em2em	Image Science Software, Berlin
Linux CentOS 5.2	CentOS.org
IRIS Explorer	Numerical Algorithms
Microsoft Office	Microsoft Corporation
Signature	HHMI, Brandeis
SPIDER 9, SPIDER 14, Web14	Wadsworth Center, Albany

Tab. 32: Software

b.o.12 *Expressionsstämme*

<i>E. coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
DH10	pcl857 p278MS2	MS2 tag	120 min	·Ribosomen präpariert und über den MS2 tag aufgereinigt; ·Eluat enthielt ausschließlich mutierte Ribosomen mit MS2 tag in Helix 98.
DH10	pcl857 pLK35	<i>E. coli rnpB</i> via P1 in H9	150 min	·Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>E. coli rnpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.
DH10	pcl857 pLK35	<i>E. coli rnpB</i> via P1 in H25	150 min	·Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>E. coli rnpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.
DH10	pcl857 pLK35	<i>E. coli rnpB</i> via P1 in H45	190 min	·Anteil 70S (Monosomen) < 50S; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>E. coli rnpB</i> RNA mit externen Primern in cr70S, 70S und 50S nicht möglich.

*Fortsetzung auf der nächsten Seite*



<i>E.coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
DH10	pcl857 pLK35	<i>E. coli rnpB</i> via P <sub>1</sub> in H45	190 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>E. coli rnpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
DH10	pcl857 p278MS2	MS2 <i>tag</i> in H98 6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H9	120 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· dYT-Medium ohne Kanamycin;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA in cr70S mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
DH10	pcl857 p278MS2	MS2 <i>tag</i> in H98 6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H9	105 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· dYT-Medium mit Kanamycin;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA in cr70S mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
DH10	pcl857 pLK35	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H9	150 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
DH10	pcl857, p278MS2	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H9	110 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· RT-PCR-Nachweis der 6S RNA in cr70S mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>E. coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
DH10	pcl857 pLK35	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H25	150 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>·RT-PCR-Nachweis der inserierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
DH10	pcl857 pLK35	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H45	190 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Anteil 70S (Monosomen) &lt; 50S;</li> <li>·RT-PCR-Nachweis der inserierten 6S RNA mit externen Primern in cr70S, 70S und 50S nicht möglich.</li> </ul>
DH10	pcl857 pLK35	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H45	150 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>·RT-PCR-Nachweis der inserierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
DH5 $\alpha$	p278MS2	MS2 tag in H98	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Inkubation bei 37°C;</li> <li>·Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>·RT-PCR-Nachweis des MS2 tags mit externen Primern möglich.</li> </ul>
DH5 $\alpha$	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H9	130 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Ribosomen präpariert;</li> <li>·RT-PCR-Nachweis der inserierten 6S RNA in cr70S mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>E.coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
TA542	pSTL102	<i>E. coli rmpB</i> via P1 in H25	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>E. coli rmpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
TA542	pSTL102	<i>E. coli rmpB</i> via P1 in H45	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>E. coli rmpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich</li> </ul>
TA542	pSTL102	<i>B. sub. rmpB</i> via P1 in H25	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>B. sub. rmpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>E. coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
TA542	pSTL102	<i>B. sub. rnpB</i> via P1 in H45	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>B. sub. rnpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
TA542	pSTL102	<i>B. sub. rnpB</i> via P10.1 in H45	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>B. sub. rnpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
TA542	pSTL102	<i>T. th. rnpB</i> via P1 in H45	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>T. th. rnpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>E.coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
TA542	pSTL102	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H9	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
TA542	pSTL102	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H25	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
TA542	pSTL102	6S RNA ( <i>A. aeolicus</i> ) in H45	keine Induktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Inkubation bei 37°C;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>
JV500A	pcI857, p278MS2	MS2 tag in H98 <i>B. sub. mmpB</i> via P10.1 in H9	120 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Gesamt-RNA nach 120-minütiger Induktion präpariert;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis der insertierten <i>B. sub. mmpB</i> RNA mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>E. coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
JV500A	p278MS2	MS2 <i>tag</i> in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H9	keine Induktion	·Gesamt-RNA bei einer Wachstumsdichte von $OD_{600} \approx 0,8$ präpariert; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.
JV500A	pcl857 p278MS2	MS2 <i>tag</i> in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H9	120 min	·Gesamt-RNA nach 120-minütiger Induktion präpariert; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.
JV500A	pcl857 p278MS2	MS2 <i>tag</i> in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H9	240 min	·Ribosomen präpariert und über den MS2 <i>tag</i> aufgereinigt; ·100 % der eluierten Ribosomen [2 % der cr70S] trugen den MS2 <i>tag</i> , aber nur ~50 % zusätzlich die 6S RNA; ·Northern Blot zeigte Signal für 6S RNA in H9.
JV500A	pcl857 p278MS2	MS2 <i>tag</i> in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H9	125 min	·Ribosomen präpariert und über den MS2 <i>tag</i> aufgereinigt; ·100 % der eluierten Ribosomen [0,3 % der cr70S] trugen den MS2 <i>tag</i> , aber nur ~50 % zusätzlich die 6S RNA.
JV500A	pcl857 p278MS2	MS2 <i>tag</i> in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H9	125 min	·Ribosomen präpariert und 70S über den MS2 <i>tag</i> gereinigt; ·100 % der eluierten Ribosomen [0,5 % der 70S] trugen den MS2 <i>tag</i> , aber nur ~30 % zusätzlich die 6S RNA.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>E.coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
JV500A	p278MS2	MS2 tag in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H25	keine Induktion	·Gesamt-RNA bei einer Wachstumsdichte von $OD_{600} \approx 0,8$ präpariert; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.
JV500A	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H25	120 min	·Gesamt-RNA nach 120-minütiger Induktion präpariert; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.
JV500A	p278MS2	MS2 tag in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H45	keine Induktion	·Ribosomen präpariert und über den MS2 tag aufgereinigt; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.
JV500A	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H45	120 min	·Gesamt-RNA nach 120-minütiger Induktion präpariert; ·Nachweis der 6S RNA mit externen Primern nicht möglich.
XL1-Blue	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 6S RNA ( <i>A. aeo-licus</i> ) in H9	130 min	·Ribosomen präpariert; ·RT-PCR-Nachweis der insertierten 6S RNA in cr70S mit externen Primern nicht möglich.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>E.coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
XL1-Blue	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 Ribozym GIR1 ( <i>D. iridis</i> ) in H9	160 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· dYT-Medium ohne Kanamycin;</li> <li>· Präparation der Ribosomen;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis des Ribozyms GIR1 in cr70S, 70S und 50S mit internem Primer möglich.</li> </ul>
XL1-Blue	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 Ribozym GIR1 ( <i>D. iridis</i> ) in H9	155 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· dYT-Medium mit Kanamycin;</li> <li>· Präparation der Ribosomen;</li> <li>· RT-PCR-Nachweis des Ribozyms in cr70S, 70S und 50S mit internem Primer möglich.</li> </ul>
XL1-Blue	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 Ribozym GIR1 ( <i>D. iridis</i> ) in H9	130 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· dYT-Medium mit Kanamycin;</li> <li>· Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>· Deutlichster Nachweis des Ribozyms nach 30 min Induktion mit externem Primer.</li> </ul>
XL1-Blue	pcl857 p278MS2	MS2 tag in H98 Ribozym GIR1 ( <i>D. iridis</i> ) in H9	30 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>· dYT-Medium mit Kanamycin;</li> <li>· Ribosomen präpariert und über den MS2 tag aufgereinigt;</li> <li>· 100 % der eluierten Ribosomen trugen den MS2 tag, aber nur ~30 % zusätzlich das Ribozym GIR1.</li> </ul>

Fortsetzung auf der nächsten Seite



<i>E.coli</i> Stamm	Plasmide	Insertion	Induktion	Kommentar/Ergebnis
XL1-Blue	pcl857 p278MS2	Ribozym in H98	GIR1 135 min	<ul style="list-style-type: none"> <li>·dYT-Medium mit Kanamycin;</li> <li>·Gesamt-RNA zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten präpariert;</li> <li>·Nachweis des Ribozyms mit externen Primern nicht möglich.</li> </ul>

**Tab. 33:** Expressionsstämme.

Die Induktion erfolgte durch einen Temperaturwechsel bei der Inkubation auf 42°C



## DANKSAGUNG

---

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Roland K. Hartmann für die gute wissenschaftliche Betreuung, die Diskussionen, die stete fachliche Unterstützung sowie die Geduld und Ratschläge, wenn Projekte mal nicht so liefen wie erhofft.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Christian M. T. Spahn für die freundliche Aufnahme in seinem Labor, die ständige fachliche Unterstützung und die Möglichkeit zur Einarbeitung in die Kryo-Elektronenmikroskopie. Geschätzt habe ich seine Eigenschaft, sich immer Zeit für mich zu nehmen und ein offenes Ohr für Probleme und fachliche Fragen zu haben.

Allen Kollegen in Marburg und Berlin danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Eure tatkräftige Unterstützung im Labor und ein freundliches Wort am Rande haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke!

Ein Dank auch an alle Freunde innerhalb und außerhalb des Labors, die meine Launen während dieser Zeit ertragen haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Zu guter Letzt ein großes Dankeschön an meine Familie, die mir vieles erst ermöglicht und mich unterstützt hat, wenn ich wieder mal am Rande der Verzweiflung war.



LEBENS LAUF

---

Andreas Heinrich Ratje

Geburtsdatum	21.01.1976
Geburtsort	Bremerhaven
1982 - 1986	Grundschule Geestenseth
1986 - 1988	Orientierungsstufe Bad Bederkesa
1988 - 1995	Niedersächsisches Internatsgymnasium Bad Bederkesa
1995	Abitur (Allgemeine Hochschulreife)
1995 - 1998	Ausbildung zum Chemielaboranten im Alfred-Wegener- Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven
1998 - 1999	Angestellt als Chemielaborant im Alfred-Wegener- Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven
1999 - 2003	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
2001	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
2003	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

- 11/2003 - 04/2004      Praktikum im Rahmen des Praktischen Jahres für Pharmazeuten im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. R. K. Hartmann am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg
- 05/2004 - 09/2004      Praktikum im Rahmen des Praktischen Jahres für Pharmazeuten in der Apotheke im alten Feld in Bad Bederkesa
- 12/2004                      Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
- 01/2005                      Erteilung der Approbation zum Apotheker
- seit 15.01.2005              Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. K. Hartmann am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg

## SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

---

### Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

- Strukturaufklärung ribosomaler Komplexe mittels Kryo-EM**
- **Mechanismus der Translokationsreaktion**
  - **ribosomal verankerte ncRNAs**

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 29.11.2010

---

**Andreas Heinrich Ratje**





## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] Adams, P. L., Stahley, M. R., Gill, M. L., Kosek, A. B., Wang, J., and Strobel, S. A. (2004). Crystal structure of a group I intron splicing intermediate. *RNA*, **10**:1867–1887. (Zitiert auf Seite 15.)
- [2] Agirrezabala, X., Lei, J., Brunelle, J. L., Ortiz-Meoz, R. F., Green, R., and Frank, J. (2008). Visualization of the Hybrid State of tRNA Binding Promoted by Spontaneous Ratcheting of the Ribosome. *Molecular Cell*, **32**:190–197. (Zitiert auf Seite 7.)
- [3] Agrawal, R. K., Spahn, C. M., Penczek, P., Grassucci, R. A., Nierhaus, K. H., and Frank, J. (2000). Visualization of tRNA movements on the *Escherichia coli* 70S ribosome during the elongation cycle. *J Cell Biol*, **150**:447–460. (Zitiert auf Seite 6.)
- [4] Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., and Vassylyev, D. G. (2004). Structural Basis for Transcription Regulation by Alarmone ppGpp. *Cell*, **117**:299–310. (Zitiert auf Seite 91 and 92.)
- [5] Barrera, A. and Pan, T. (2004). Interaction of the *Bacillus subtilis* RNase P with the 30S ribosomal subunit. *RNA*, **10**:482–492. (Zitiert auf Seite 28.)
- [6] Beckert, B., Nielsen, H., Einvik, C., Johansen, S. D., Westhof, E., and Masquida, B. (2008). Molecular modelling of the GIR1 branching ribozyme gives new insight into evolution of structurally related ribozymes. *The EMBO Journal*, **27**:667–678. (Zitiert auf Seite 15.)
- [7] Blanchard, S. C., Kim, H. D., Gonzalez, R. L., Puglisi, J. D., and Chu, S. (2004). tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**:12893–12898. (Zitiert auf Seite 7.)
- [8] Bloom, M., Skelly, S., Van Bogelen, R., Neidhardt, F., Brot, N., and Weissbach, H. (1986). In Vitro Effect of the *Escherichia coli* Heat Shock Regulatory Protein on Expression of Heat Shock Genes. *Journal of Bacteriology*, **166**:380–384. (Zitiert auf Seite 91.)
- [9] Bouvier, M., Sharma, C. M., Mika, F., Nierhaus, K. H., and Vogel, J. (2008). Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol Cell*, **32**:827–837. (Zitiert auf Seite 11.)
- [10] Caspeta, L., Flores, N., Pérez, N. O., Bolivar, F., and Ramirez, O. T. (2009). The Effect of Heating Rate on *Escherichia coli* Metabolism, Physiological Stress, Transcriptional Response, and Production of Temperature-

- Induced Recombinant Protein: A Scale-Down Study. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**:468–482. (Zitiert auf Seite 92.)
- [11] Chen, J. Z. and Grigorieff, N. (2007). Signature: a single-particle selection system for molecular electron microscopy. *J Struct Biol*, **157**:168–173. (Zitiert auf Seite 49.)
- [12] Connell, S. R., Takemoto, C., Wilson, D. N., Wang, H., Murayama, K., Terada, T., Shirouzu, M., Rost, M., Schüler, M., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Mielke, T., Fucini, P., Yokoyama, S., and Spahn, C. M. T. (2007). Structural Basis for Interaction of the Ribosome with the Switch Regions of GTP-Bound Elongation Factors. *Molecular Cell*, **25**:751–764. (Zitiert auf Seite 7, 9, 10, 17, and 42.)
- [13] Dartigalongue, C., Missiakas, D., and Raina, S. (2001). Characterization of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  Regulon. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**:20866–20875. (Zitiert auf Seite 91.)
- [14] Dong, H., Nilsson, L., and Kurland, C. G. (1995). Gratuitous Overexpression of Genes in *Escherichia coli* Leads to Growth Inhibition and Ribosome Destruction. *Journal of Bacteriology*, **177**:1497–1504. (Zitiert auf Seite 91 and 92.)
- [15] Einvik, C., Elde, M., and Johansen, S. (1998). Group I twintrons: Genetic elements in myxomycete and schizopyrenid amoeboflagellate ribosomal DNAs. *Journal of Biotechnology*, **64**:63–74. (Zitiert auf Seite 11.)
- [16] Frank, J. and Agrawal, R. K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature*, **406**:318–322. (Zitiert auf Seite 7.)
- [17] Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., and Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, **116**:190–199. (Zitiert auf Seite 48.)
- [18] Gao, Y. G., Selmer, M., Dunham, C. M., Weixlbaumer, A., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2009). The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science*, **326**:694–699. (Zitiert auf Seite 7.)
- [19] Gavrilova, L. P., Kostiashkina, O. E., Koteliansky, V. E., Rutkevitch, N. M., and Spirin, A. S. (1976). Factor-free ("non-enzymic") and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol*, **101**:537–552. (Zitiert auf Seite 8.)
- [20] Grossman, A. D., Straus, D. B., and Walter, W. A. (1987).  $\sigma^{32}$  synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, pages 179–184. (Zitiert auf Seite 91.)

- [21] Harcum, S. W. and Haddadin, F. T. (2006). Global transcriptome response of recombinant *Escherichia coli* to heat-shock and dual heat-shock recombinant protein induction. *Journal Of Industrial Microbiology*, **33**:801–814. (Zitiert auf Seite 91.)
- [22] Horan, L. H. and Noller, H. F. (2007). Intersubunit movement is required for ribosomal translocation. *PNAS*, **104**:4881–4885. (Zitiert auf Seite 8.)
- [23] Hortacsu, A. and Ryu, D. D. Y. (1990). Optimal Temperature Control Policy for a Two-Stage Recombinant Fermentation Process. *Biotechnology Progress*, **6**:403–407. (Zitiert auf Seite 91.)
- [24] Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., and Nyström, T. (2002). Regulation of  $\sigma$  factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes & Development*, **16**:1260–1270. (Zitiert auf Seite 91 and 92.)
- [25] Johansen, S., Einvik, C., and Nielsen, H. (2002). DiGIR<sub>1</sub> and NaGIR<sub>1</sub>: naturally occurring group I-like ribozymes with unique core organization and evolved biological role. *Biochimie*, **84**:905–912. (Zitiert auf Seite 12.)
- [26] Johansen, S., Elde, M., Vader, A., Haugen, P., Haugli, K., and Haugli, F. (1997). In vivo mobility of a group I twintron in nuclear ribosomal DNA of the myxomycete *Didymium iridis*. *Molecular Microbiology*, **24**:737–745. (Zitiert auf Seite 15.)
- [27] Julian, P., Konevega, A. L., Scheres, S. H. W., Lazaro, M., Gil, D., Wintermeyer, W., Rodnina, M. V., and Valle, M. (2008). Structure of ratcheted ribosomes with tRNAs in hybrid states. *PNAS*, **105**:16924–16927. (Zitiert auf Seite 7.)
- [28] Laurberg, M., Kristensen, O., Martemyanov, K., Gudkov, A. T., Nagaev, I., Hughes, D., and Liljas, A. (2000). Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J Mol Biol*, **303**:593–603. (Zitiert auf Seite 9.)
- [29] Lee, I. Y., Seo, D. J., and Lee, S. B. (1992). Influence of Plasmid Properties on Fermentation Parameters of Recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2**:35–40. (Zitiert auf Seite 91 and 92.)
- [30] Lieb, M. (1981). A Fine Structure Map of Spontaneous and Induced Mutations in the Lambda Repressor Gene, Including Insertions of IS Elements. *Mol Gen Genet*, **184**:364–371. (Zitiert auf Seite 91.)
- [31] Lim, H. and Jung, K. (1998). Improvement of Heterologous Protein Productivity by Controlling Postinduction Specific Growth Rate in Recombinant *Escherichia coli* under Control of the P<sub>L</sub> Promoter. *Biotechnology Progress*, **14**:548–553. (Zitiert auf Seite 91 and 92.)

- [32] Malhotra, A., Penczek, P., Agrawal, R. K., Gabashvili, I. S., Grassucci, R. A., Jünemann, R., Burkhardt, N., Nierhaus, K. H., and Frank, J. (1998). *Escherichia coli* 70 S ribosome at 15 Å resolution by cryo-electron microscopy: localization of fMet-tRNA<sup>fMet</sup> and fitting of L1 protein. *J Mol Biol*, **280**:103–116. (Zitiert auf Seite 50.)
- [33] Mandal, M. and Breaker, R. R. (2004). Gene regulation by riboswitches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**:451–463. (Zitiert auf Seite 11.)
- [34] Matadeen, R., Sergiev, P., Leonov, A., Pape, T., Van Der Sluis, E., Mueller, F., Osswald, M., Von Knoblauch, K., Brimacombe, R., Bogdanov, A., Van Heel, M., and Dontsova, O. (2001). Direct Localization by Cryo-electron Microscopy of Secondary Structural Elements in *Escherichia coli* 23 S rRNA which Differ from the Corresponding Regions in *Haloarcula marismortui*. *JMB*, **307**:1341–1349. (Zitiert auf Seite 41.)
- [35] Mattatall, N. R., Daines, D. A., Liu, S., and Sanderson, K. E. (1996). *Salmonella typhi* Contains Identical Intervening Sequences in All Seven *rrl* Genes. *Journal of Bacteriology*, **178**:5323–5326. (Zitiert auf Seite 92.)
- [36] Moazed, D. and Noller, H. F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, **342**(6246):142–148. (Zitiert auf Seite 7.)
- [37] Morita, M. T., Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). Dynamic interplay between antagonistic pathways controlling the  $\sigma^{32}$  level in *Escherichia coli*. *PNAS*, **97**:5860–5865. (Zitiert auf Seite 91.)
- [38] Munro, J. B., Sanbonmatsu, K. Y., Spahn, C. M. T., and Blanchard, S. C. (2009). Navigating the ribosome's metastable energy landscape. *Trends in biochemical sciences*, **34**:390. (Zitiert auf Seite 7.)
- [39] Munro, J. B., Wasserman, M. R., Altman, R. B., Wang, L., and Blanchard, S. C. (2010). Correlated conformational events in EF-G and the ribosome regulate translocation. *Nat Struct Mol Biol*, pages 1–9. (Zitiert auf Seite 7.)
- [40] Narberhaus, F., Waldminghaus, T., and Chowdhury, S. (2006). RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev*, **30**:3–16. (Zitiert auf Seite 11.)
- [41] Nielsen, H., Beckert, B., Masquida, B., and Johansen, S. D. (2008). The GIR1 Branching Ribozyme. *Ribozymes and RNA catalysis* (eds. D.M. Lilley and F. Eckstein), RSC Publishing, Cambridge, UK, page 229–252. (Zitiert auf Seite 15.)
- [42] Nielsen, H., Westhof, E., and Johansen, S. (2005). An mRNA Is Capped by a 2', 5' Lariat Catalyzed by a Group I-Like Ribozyme. *Science*, **309**. (Zitiert auf Seite 13.)

- [43] Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A., and Rhodius, V. A. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor,  $\sigma^{32}$ , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes & Development*, **20**:1776–1789. (Zitiert auf Seite 91.)
- [44] Ogle, J. M., Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Tarry, M. J., Carter, A. P., and Ramakrishnan, V. (2001). Recognition of cognate transfer RNA by the 30s ribosomal subunit. *Science*, **292**:897–902. (Zitiert auf Seite 7.)
- [45] Penczek, P. A., Frank, J., and Spahn, C. M. (2006). A method of focused classification, based on the bootstrap 3D variance analysis, and its application to EF-G-dependent translocation. *J Struct Biol*, **154**:184–194. (Zitiert auf Seite 93.)
- [46] Penczek, P. A., Grassucci, R. A., and Frank, J. (1994). The ribosome at improved resolution: new techniques for merging and orientation refinement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles. *Ultra-microscopy*, **53**:251–270. (Zitiert auf Seite 47 and 49.)
- [47] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). Ucsf chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**:1605–1612. (Zitiert auf Seite 117.)
- [48] Remaut, E., Stanssens, P., and Fiers, W. (1983). Inducible high level synthesis of mature human fibroblast interferon in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, **11**:4677–4688. (Zitiert auf Seite 91.)
- [49] Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., and Wintermeyer, W. (1997). Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature*, **385**:37–41. (Zitiert auf Seite 7.)
- [50] Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Mohr, D., Peske, F., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2003). An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol Cell*, **11**:1517–1523. (Zitiert auf Seite 7.)
- [51] Schmeing, T. M. and Ramakrishnan, V. (2009). What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*, **461**:1234–1242. (Zitiert auf Seite 7.)
- [52] Schuette, J. C., Murphy, F. V., Kelley, A. C., Weir, J. R., Giesebrecht, J., Connell, S. R., Loerke, J., Mielke, T., Zhang, W., Penczek, P. A., Ramakrishnan, V., and Spahn, C. M. T. (2009). GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding. *The EMBO Journal*, **28**:755–765. (Zitiert auf Seite 7 and 17.)

- [53] Siegel, R. and Ryu, D. D. Y. (1985). Kinetic Study of Instability of Recombinant Plasmid pPLc23trpAl in *E. coli* Using Two-Stage Continuous Culture System. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**:28–33. (Zitiert auf Seite 91.)
- [54] Spahn, C. M. T., Grassucci, R. A., Penczek, P., and Frank, J. (1999). Direct three-dimensional localization and positive identification of RNA helices within the ribosome by means of genetic tagging and cryo-electron microscopy. *Structure*, **7**:1567–1573. (Zitiert auf Seite 18.)
- [55] Spahn, C. M. T. and Penczek, P. A. (2009). Exploring conformational modes of macromolecular assemblies by multiparticle cryo-EM. *Current Opinion in Structural Biology*, **19**:623–631. (Zitiert auf Seite 49.)
- [56] Tabandeh, F., Shojaosadati, S. A., Zomorodipour, A., Khodabandeh, M., Sanati, M. H., and Yakhchali, B. (2004). Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, **26**:245–250. (Zitiert auf Seite 92.)
- [57] Tsui, H. T., Feng, G., and Winkler, M. E. (1996). Transcription of the *mutL* Repair, *miaA* tRNA Modification, *hfq* Pleiotropic Regulator, and *hflA* Region Protease Genes of *Escherichia coli* K-12 from Clustered  $E\sigma^{32}$ -Specific Promoters during Heat Shock. *Journal of Bacteriology*, **178**:5719–5731. (Zitiert auf Seite 91.)
- [58] Vader, A., Nielsen, H., and Johansen, S. (1999). In vivo expression of the nucleolar group I intron- encoded I-Dir I homing endonuclease involves the removal of a spliceosomal intron. *The EMBO Journal*, **18**:1003–1013. (Zitiert auf Seite 15.)
- [59] Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003). Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell*, **114**:123–134. (Zitiert auf Seite 7.)
- [60] van Heel, M. and Harauz, G. (1988). Biological macromolecules explored by pattern recognition. *Scanning Microsc Suppl*, **2**:295–301. (Zitiert auf Seite 50.)
- [61] Villaverde, A., Benito, A., Viaplana, E., and Cubarsi, R. (1993). Fine Regulation of *c1857*-Controlled Gene Expression in Continuous Culture of Recombinant *Escherichia coli* by Temperature. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, **59**:3485–3487. (Zitiert auf Seite 91.)
- [62] Voorhees, R. M., Schmeing, T. M., Kelley, A. C., and Ramakrishnan, V. (2010). The mechanism for activation of GTP hydrolysis on the ribosome. *Science*, **330**:835–838. (Zitiert auf Seite 7.)

- [63] Whitford, P. C., Geggier, P., Altman, R. B., Blanchard, S. C., Onuchic, J. N., and Sanbonmatsu, K. Y. (2010). Accommodation of aminoacyl-tRNA into the ribosome involves reversible excursions along multiple pathways. *RNA*, 16:1196–1204. (Zitiert auf Seite 51.)
- [64] Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B., and Green, R. (2004). The Active Site of the Ribosome Is Composed of Two Layers of Conserved Nucleotides with Distinct Roles in Peptide Bond Formation and Peptide Release. *Cell*, 117:589–599. (Zitiert auf Seite 21, 28, 41, and 91.)