



Fakultät für Chemie der Technischen Universität München

Max-Planck-Institut für Biochemie

Abteilungen für Molekulare Strukturbiologie und für Zelluläre Biochemie

Beschreibung der dreidimensionalen Organisation
von Ribosomen in intakten *Escherichia coli*-Zellen
mittels Kryoelektronentomographie

Thomas Hoffmann

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

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Die Dissertation wurde am 22.09.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 2.11.2015 angenommen.

I. Zusammenfassung

Die Proteintranslation findet an komplexen makromolekularen Maschinen, den Ribosomen statt. Mithilfe der Röntgenkristallographie war die Struktur des bakteriellen 70S Ribosoms aufgeklärt worden ¹. Weitere Untersuchungen translatierender bakterieller 70S Ribosomen haben ergeben, dass Ribosomen in Lösung geordnete Polysomen bilden können ². Jedoch ist bis heute nur wenig über die höhere Ordnung von Ribosomen in Zellen bekannt, welche diese bei der Translation von zytoplasmatischen Proteinen oder Membranproteinen einnehmen. Im Rahmen dieser Arbeit ist die dreidimensionale (3D) Ribosomenverteilung in schnell wachsenden *Escherichia coli*-Zellen mit modernsten wissenschaftlichen Methoden untersucht worden. Zur Anwendung kamen die Ionenätzung, die Kryoelektronentomographie mit Zweiachsenkipfung und die Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie. Der Prozessierungsablauf wurde um die Auswertung von Zweiachsenkippserien mit individueller Alignierung von Untervolumen erweitert. Die Expression von Membranproteinkonstrukten, welche den kotranslationalen Transport durch die Membran vorübergehend arretieren, hat die zelluläre Ribosomenverteilung, verändert. Die Zahl an Ribosomen in der Nähe der inneren Membran war durch die Membranproteinexpression erhöht worden. Durch die Mittelung von Untervolumen konnten ribosomenassoziierte Dichten neben den mRNA Ein- und Ausgängen, an der Bindestelle der Elongationsfaktoren, den tRNA-Bindestellen und am Ausgang der naszierenden Ketten gefunden werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen von translatierenden Polyribosomen überein. Die Analyse der 3D Orientierung von Ribosomen bestätigt die Existenz einer vorherrschenden Orientierung zwischen nahe benachbarten Ribosomenpaaren in Zellen, welche zuvor nur in Lösung beschrieben worden war. Diese Orientierung der Ribosomen war sowohl in membrangebundenen Polysomen als auch in Polysomen ohne Kontakt zur Membran gefunden worden. Eng benachbarte Ribosomen können auch direkte Verbindungen zueinander herstellen. Die Ribosomenstruktur, welche sich im Laufe der Zeit entwickelt hat, scheint eine effiziente Translation zu ermöglichen, da ein Ribosom, welches sich im Translationsarrest befindet, zu Nachbarribosomen Signale übermitteln kann.

II. Summary

Translation of proteins happens at complex macromolecular machines, the ribosomes. The whole ribosomal structure was elucidated via X-ray crystallography¹. Further examinations of translating bacterial 70S ribosomes revealed that ribosomes can form structurally ordered polysomes in solution². However, little is known about higher order ribosomal assemblies inside cells upon translation of cytoplasmic or membrane proteins. In this work the three-dimensional (3D) distribution of ribosomes inside fast growing *Escherichia coli* cells was examined, using state-of-the-art methods. Used were focused ion beam micromachining, cryo-electron tomography with dual-axis tilt and single-molecule fluorescence imaging. The processing procedure was expanded by the analysis of dual-axis tilt series with individual alignment of subtomograms. The expression of membrane protein constructs which stalled transiently cotranslational transport altered the cellular ribosome distribution. The number of ribosomes near the inner membrane was increased by the expression of membraneprotein. By subtomogram averaging ribosome associated densities beside the entry and exit site of mRNA, at the elongation factors binding site, tRNA binding sites and at the nascent chain exit site were found. These results are consistent with the imaging of translating polysomes. The analysis of 3D arrangements of ribosomes confirmed the existence of a predominant orientation between close neighbouring ribosome pairs in cells previously described only in solution. This orientation of ribosomes was detected in membrane-free as well as membrane-associated polysomes. Close adjacent ribosomes can form direct connections to each other. The ribosome structure evolved in the course of time seems to allow an efficient translation because a ribosome which is in translation arrest could send signals to a neighbouring ribosome.

III. Inhaltsverzeichnis

I. ZUSAMMENFASSUNG	II
II. SUMMARY	III
III. INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
IV. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
V. TABELLENVERZEICHNIS	XI
VI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
VII. PHYSIKALISCHE KONSTANTEN	XVII
1 EINLEITUNG	1
1.1 ESCHERICHIA COLI	1
1.2 70S RIBOSOM.....	2
<i>1.2.1 Peptidbindung und Transfer-RNAs im Ribosom.....</i>	<i>2</i>
1.2.1.1 tRNA Aufbau.....	3
1.2.1.2 Initiation der Polypeptidsynthese	4
1.2.1.3 Elongationsschritt der Polypeptidsynthese.....	4
1.2.1.4 Termination der Polypeptidsynthese.....	5
1.2.2 Weg der naszierenden Polypeptidkette durch das Ribosom.....	6
1.2.3 Ribosomenarretierung.....	8
1.2.4 Trans-Translation.....	10
1.2.5 Membrangebundenes Ribosom (MBR).....	11
1.2.6 Mannitolpermease.....	12
1.2.7 Polyribosom.....	13
1.3 CHAPERONE	14
1.4 OPTISCHE MIKROSKOPIE.....	16
1.4.1 Elektronenmikroskopie.....	17
1.4.1.1 Aufbau eines Elektronen Mikroskops.....	17
1.4.1.2 Auflösungsgrenze eines Elektronenmikroskops	20
1.4.1.3 Abbildungsfehler.....	21
1.4.1.4 Beeinflussung des Elektronenstrahls durch die Probe.....	22
1.4.1.5 Kontrastentstehung im Elektronenmikroskop	23
1.4.1.6 Vorbereitung von Kryoproben	25
1.4.1.7 Ausdünnen der Proben für die CET-Untersuchung	26

1.4.1.8	Kryoelektronentomographie	27
1.5	DATENPROZESSIERUNG.....	32
1.5.1	<i>Alignierung einer Bilderserie</i>	32
1.5.2	<i>CTF Korrektur.....</i>	32
1.5.3	<i>Alignierung der Kippserien</i>	33
1.5.4	<i>Rekonstruktion der Kippserien</i>	33
1.5.5	<i>Kombination der Kippserien einer Doppelachsenkipfung</i>	34
1.5.6	<i>Lokalisation der Zielobjekte in den Tomogrammen.....</i>	34
1.5.7	<i>Rekonstruktion der Untervolumen mit den ausgewählten Zielobjekten.....</i>	36
1.5.8	<i>Alignierung der Untervolumen</i>	36
1.5.9	<i>Klassifizierung der Untervolumen</i>	36
1.6	ZIEL DER ARBEIT	38
2	MATERIAL UND METHODEN.....	39
2.1	MATERIALIEN.....	39
2.1.1	<i>Einsatzstoffe.....</i>	39
2.1.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	39
2.1.1.2	<i>Lösungen, Puffer und Medien.....</i>	40
2.1.2	<i>Aufreinigungssysteme.....</i>	41
2.1.3	<i>Enzyme und Puffer.....</i>	41
2.1.4	<i>Oligonukleotide.....</i>	42
2.1.5	<i>Plasmide.....</i>	44
2.1.6	<i>Bakterienstämme.....</i>	44
2.2	GERÄTE.....	45
2.3	METHODEN	45
2.3.1	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	46
2.3.1.1	<i>Herstellung der MtlA188/384-Stop Konstrukte.....</i>	46
2.3.1.2	<i>Klonierung der SecM-Sequenz in pET29a MtlA Vektor</i>	47
2.3.1.3	<i>Plasmidisolation.....</i>	47
2.3.1.4	<i>Agarosegel.....</i>	47
2.3.1.5	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	48
2.3.1.6	<i>Restriktionsverdau.....</i>	49
2.3.1.7	<i>Dephosphorylierung und Ligation</i>	49
2.3.1.8	<i>Hitzeschock Transformation</i>	49
2.3.1.9	<i>Gekoppelte Transkriptions-Translationsreaktion und Flotationsanalyse</i>	50
2.3.2	<i>Zellkultur.....</i>	52
2.3.2.1	<i>Übernachtkultur</i>	52
2.3.2.2	<i>Langsam wachsende Zellkultur.....</i>	53

2.3.2.3	Schnell wachsende Zellkultur	53
2.3.2.4	Zellwachstum und Proteinexpression	54
2.3.2.5	Proben für CET	54
2.3.3	<i>Kryoelektronenmikroskopie</i>	55
2.3.4	<i>Computerbasierte Prozessierung</i>	58
2.3.4.1	Alignierung einer Bilderserie	59
2.3.4.2	Tomogramm Rekonstruktion	59
2.3.4.3	Maskenerstellung	60
2.3.4.4	Modell der inneren Membran	60
2.3.4.5	Mustererkennung	60
2.3.4.6	Abstandsberechnung	62
2.3.4.7	Rekonstruktion von Untervolumen	63
2.3.4.8	Alignierung	64
2.3.4.9	Klassifizierung	65
2.3.4.10	Konzentrationsbestimmung	68
2.3.4.11	Topologische Analyse	68
2.3.4.12	Lokale Auflösung	69
2.3.4.13	Prozessierung für GroEL/ES	69
2.3.5	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	70
3	ERGEBNIS	71
3.1	IN VITRO TRANSKRIPTIONS-TRANSLATIONSREAKTION	71
3.2	SEQUENZIERUNGEN	73
3.3	PROTEINEXPRESSION	74
3.3.1	<i>Proteinexpression von 4TM MtlA-Konstrukten</i>	74
3.3.2	<i>Proteinexpression von 6TM MtlA-Konstrukten</i>	75
3.4	ZELLWACHSTUM	76
3.4.1	<i>Wachstumskurven von 4TM MtlA-Konstrukten</i>	76
3.4.2	<i>Wachstumskurven von 6TM MtlA-Konstrukten</i>	77
3.5	AUSWIRKUNGEN DER MEMBRANPROTEINEXPRESSION AUF DIE MORPHOLOGIE VON E. COLI-ZELLEN	78
3.6	IONENÄTZUNG	79
3.7	ANALYSE DER 2D RIBOSOMENVERTEILUNG IN LEBENDEN E. COLI-ZELLEN MITTELS LOKALISATIONS-MIKROSKOPIE NACH PHOTOAKTIVIERUNG	80
3.8	GEGENÜBERSTELLUNG VON LANGSAM UND SCHNELL WACHSENDEN E. COLI-ZELLEN ..	83
3.9	REKONSTRUKTION VON DOPPELKIPPACHSENTOMOGRAMMEN	84

3.10 RIBOSOMENANALYSE.....	87
3.10.1 <i>Ribosomendetektion in Tomogrammen</i>	88
3.10.2 <i>Ribosomenkonzentration</i>	90
3.10.3 <i>Alignierung und Klassifizierung von Ribosomen</i>	93
3.10.3.1 <i>Relative Orientierung von Ribosomen im zellulären Kontext</i>	96
3.10.3.2 <i>Verbindung von Nachbarribosomen</i>	99
3.10.3.3 <i>Trisom – Polysom</i>	101
3.10.3.4 <i>Ribosomenverteilung</i>	103
3.10.3.5 <i>MBR</i>	106
3.10.3.6 <i>Elongationsfaktor</i>	109
3.10.3.7 <i>Naszierende Kette</i>	111
3.11 MAKROMOLEKÜL GROEL/ES	112
4 DISKUSSION	114
4.1 QUERVERNETZUNG DER MEMBRANVESIKEL.....	114
4.2 MTLA-EXPRESSION UND SECM-RIBOSOMARRETIERUNG.....	115
4.3 RIBOSOMENVERTEILUNG IN LEBENDEN <i>E. COLI</i>-ZELLEN	116
4.4 LANGSAM WACHSENDE <i>E. COLI</i>-ZELLEN	116
4.5 GEEIGNETE VORBEREITUNG DER <i>E. COLI</i>-ZELLEN FÜR DIE CET	117
4.6 TECHNISCHE ENTWICKLUNG IN DER TEM UND ANPASSUNG DES PROJEKTS	118
4.7 DETEKTION UND SELEKTION VON RIBOSOMEN	119
4.8 RIBOSOMENKONZENTRATION.....	120
4.9 RIBOSOMENKLASSIFIKATIONEN	121
4.9.1 <i>Nachbarribosomen</i>	121
4.9.2 <i>Trisom – Tetrasom - Polysom</i>	122
4.9.3 <i>MBRs</i>	123
4.9.4 <i>Elongationsfaktor</i>	125
4.9.5 <i>Naszierende Kette</i>	127
4.10 MAKROMOLEKÜL GROEL/ES	128
5 AUSBLICK.....	130
DANKSAGUNG	131
LITERATURVERZEICHNIS	133
ANHANG	142

A. CHEMIKALIENLISTE	142
B. GERÄTELISTE	144
C. VERBRAUCHSMATERIALLISTE	145
D. VERÖFFENTLICHTE TEILE DER DISSERTATION	146

IV. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.	<i>E. coli</i> 70S Ribosom (Abb. 1 A u. B aus ¹).....	2
Abb. 2.	mRNA in der 30S Untereinheit (Abb. 3 d u. e aus ¹²).....	3
Abb. 3.	Translokationsmodell (modifizierte Abb. 4 a-e aus ¹⁵).....	5
Abb. 4.	Polypeptidkette am Tunnelausgang (Abb. 11 aus ¹⁷).....	7
Abb. 5.	SecM Arretierung (modifizierte Abb. 4 aus ²⁰)	9
Abb. 6.	SecM-Konstrukte.....	10
Abb. 7.	Translokon gebundenes Ribosom (modifizierte Abb. 1 b-d aus ²³)	11
Abb. 8.	MtlA (Abb. 7 a aus ²⁵).....	12
Abb. 9.	Polyribosom (Abb. 5 modifiziert aus ²)	13
Abb. 10.	Chaperone in Eubakterien (modifizierte Abb. 2 A aus ³³).....	15
Abb. 11.	GroEL-GroES Chaperonin ³⁴	15
Abb. 12.	Elektronenmikroskopaufbau (A: Abb. 20.2 aus ⁴⁷ ; B: Abb. 4.1 aus ⁵⁰).....	18
Abb. 13.	CTF.....	25
Abb. 14.	Ionenätzung.....	26
Abb. 15.	Crowther-Kriterium (Abb. 3 aus ⁷⁴)	29
Abb. 16.	Einfach- und Doppelkippachsentomographie (Abb. 4 aus ⁷⁴).....	30
Abb. 17.	Alignierung einer Bilderserie.....	31
Abb. 18.	Mustererkennung (Abb. 6 aus ⁷⁴)	35
Abb. 19.	FIB (Bilder aus Film von Dr. Julio Ortiz).....	56
Abb. 20.	Automatisierte Datenaufzeichnung bei der CET ¹¹¹	57
Abb. 21.	Doppelkippachsentomographie (modifizierte Bilder aus Film von Dr. Julio Ortiz)	58
Abb. 22.	Prozessierungsübersicht	67
Abb. 23.	MtlA Insertion in Membranen	72
Abb. 24.	CET einer Transkriptions-Translationsreaktion	73
Abb. 25.	Eingesetzte MtlA-Konstrukte	73
Abb. 26.	4TM MtlA-Expression	75
Abb. 27.	6TM MtlA-Expression	76
Abb. 28.	4TM Wachstumskurven	77
Abb. 29.	6TM Wachstumskurven	78

Abb. 30.	Tomogrammschnitte durch langsam wachsende <i>E. coli</i> -Zellen mit verschiedenen 4TM Plasmiden.....	79
Abb. 31.	FIB <i>Wedges</i>	80
Abb. 32.	Ribosomenverfolgung mit PALM.....	81
Abb. 33.	Ribosomenverteilung und Ribosomengeschwindigkeit.....	82
Abb. 34.	Langsam und schnell wachsende <i>E. coli</i> -Zellen.....	83
Abb. 35.	Tomogramme.....	85
Abb. 36.	Untervolumenalignierung.....	86
Abb. 37.	Untervolumen.....	86
Abb. 38.	Tomogramm einer <i>E. coli</i> -Zelle.....	87
Abb. 39.	Ribosomenselektion induzierte Zelle.....	90
Abb. 40.	Referenzfrei 3D alignierte und gemittelte Ribosomendichte.....	95
Abb. 41.	Ribosomentopologie in <i>E. coli</i> -Zellen.....	98
Abb. 42.	Hierarchisches Clustering.....	100
Abb. 43.	Nachbarribosomen.....	101
Abb. 44.	Trisom.....	102
Abb. 45.	Tetrasom.....	103
Abb. 46.	Ribosomenverteilung.....	105
Abb. 47.	MBR.....	106
Abb. 48.	Lokale Auflösung MBR.....	107
Abb. 49.	Einpassung des Atommodells in die Elektronendichte des MBRs.....	108
Abb. 50.	Disomen von MBRs.....	108
Abb. 51.	Polysomen an der Membran.....	109
Abb. 52.	Elongationsfaktor.....	111
Abb. 53.	Ribosomaler Tunnelausgang.....	112
Abb. 54.	GroEL/ES-Klassen.....	113
Abb. 55.	GroEL/ES-Mittelung.....	113
Abb. 56.	Projektverlauf.....	119
Abb. 57.	Bedeutung der 3D Organisation von 70S Ribosomen.....	127

V. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.	Aufreinigungssysteme	41
Tab. 2.	Enzyme	42
Tab. 3.	Primer	43
Tab. 4.	Plasmide	44
Tab. 5.	Bakterienstämme	45
Tab. 6.	Zelluläre Ribosomenkonzentration	91
Tab. 7.	Ribosomenkonzentration an der Membran	93
Tab. 8.	Klassifikationen	96

VI. Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional (engl. <i>three-dimensional</i>)
Abb.	Abbildung
ASF	A-Stellen-Finger (engl. <i>A-site finger</i>)
A-Tasche	Aminoacyl-Tasche
bp	Basenpaare (engl. <i>base pair</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement (engl. <i>charge-coupled device</i>)
CEM	Kryoelektronenmikroskopie (engl. <i>cryo-electron microscopy</i>)
CET	Kryoelektronentomographie (engl. <i>cryo-electron tomography</i>)
CMOS	ergänzender Metall-Oxid-Halbleiter (engl. <i>complementary metal-oxide-semiconductor</i>)
Conc.	Konzentration (engl. <i>concentration</i>)
CP	Protuberanz (engl. <i>central protuberance</i>)
CTF	Kontrastübertragungsfunktion (engl. <i>contrast transfer function</i>)
CTF _Z	zytosolischen Transkriptionsfaktoren
DED	Elektronen detektierender Detektor (engl. <i>direct electron detectors</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleinacid</i>)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	Beugungsmuster (engl. <i>diffraction pattern</i>)
DQE	Quantenwirkungsgrad (engl. <i>detective quantum efficiency</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF	Elongationsfaktor
EF-G	Elongationsfaktor-G
EM	Elektronenmikroskopie
engl.	Englisch
E-Tasche	Ausgangstasche (engl. <i>Exit-Tasche</i>)
FEG	Feldemissionskathode (engl. <i>Field Emission Gun</i>)
FIB	fokussierter Ionenstrahl (engl. <i>Focused Ion Beam</i>)
HSP	Hitze-Schock-Protein (engl. <i>Heat Shock protein</i>)
IF	Initiationsfaktor
MBR	Membran gebundenes Ribosom (engl. <i>membrane bound ribosome</i>)
Mem.	Membran (engl. <i>membrane</i>)
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	Boten RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MtlA	Mannitolpermease
NEB	New England Biolabs
NND	Verteilung des nächsten Nachbarn (engl. <i>next neighbour distribution</i>)
Nt	Nukleotid
N-terminal	Aminoterminale
PA-FPs	photoaktivierbare fluoreszierende Proteine
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALM	Lokalisationsmikroskopie nach Photoaktivierung (engl. <i>Photoactivated Localization Microscopy</i>)

Fortsetzung Abkürzungsverzeichnis

Part.	Partikel (engl. <i>particle</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein Datenbank (engl. <i>protein data bank</i>)
PSF	Punktverbreiterungsfunktion (engl. <i>Point-Spread Function</i>)
P-Tasche	Peptidyl-Tasche
PTC	Peptidyl-Transferase-Zentrum (engl. <i>peptidyl transferase center</i>)
PTS	Phosphotransferasesystems
REM	Rasterelektronenmikroskop
RF	Terminationsfaktor (engl. <i>release factor</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rib	Ribosomen
rRNA	Ribosomale RNA (engl. <i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SE	sekundär Elektronen
SecM	Sekretionsmonitor M (engl. <i>secretion monitor</i>)
SEM	Rasterelektronenmikroskop (engl. <i>scanning electron microscope</i>)
SIBS	Skalierungsindex basierte Segmentation (engl. <i>scaling index based segmentation</i>)
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (engl. <i>signal to noise ratio</i>)
SRP	Signal-Erkennungs-Teilchen (engl. <i>signal recognition particle</i>)
STED-Mikroskopie	Stimulierte-Emissions-Auslöschungs-Mikroskopie (engl. <i>stimulated emission depletion microscopy</i>)
STEM	Scanningtransmissionselektronenmikroskopie
Tab.	Tabelle
t-b	Ribosomenorientierung: oben zu unten (engl. <i>top-to-bottom</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TF	Triggerfaktor (engl. <i>Trigger Factor</i>)
TM	Transmembrandomäne
Tm	Schmelztemperatur (engl. <i>melting temperature</i>)
tmRNA	Transfer-Boten RNA (engl. <i>transfer messenger RNA</i>)
tmRNA	Transfer-mRNA (engl. <i>transfer-messenger RNA</i>)
top	Oben (engl. <i>top</i>)
TRAP	Translokon-Assoziierte-Proteine
tRNA	Transfer RNA (engl. <i>transfer RNA</i>)
t-t	Ribosomenorientierung: oben zu oben (engl. <i>top-to-top</i>)
u.	und
u. a.	unter anderem
VE	vollentsalzt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen (engl. <i>volume</i>)
v/v	Volumen / Volumen (engl. <i>volume / volume</i>)
z.B.	zum Beispiel
w/v	Masse / Volumen (engl. <i>weight / volume</i>)
w/w	Masse / Masse (engl. <i>weight / weight</i>)

Variablen

α	Aperturwinkel
λ	Wellenlänge
Δf	Fokussdifferenz
b	Binningfaktor
c	Lichtgeschwindigkeit
C_C	Aberrationskoeffizient
c_R	Ribosomenkonzentration
C_s	sphärischen Aberrationskoeffizienten
d	Auflösung
D	Probendurchmesser
d_R	Ribosomendurchmesser
E	kinetische Energie
E_0	Ruheenergie
e_0	Elementarladung
h	Planksche Wirkungsquantum
I_a	Stromstärke
I	Intensität
K	Kontrast
k_C	Crowther Kriterium
m	Meter
n	Brechungsindex
N	Partikelanzahl
NA	numerische Apertur
N_B	Anzahl an Bildern
N_R	Ribosomenzahl
p	Pixelgröße
r_R	Radius
r_{chr}	Zerstreuungskreisradius (engl. <i>disk of confusion</i>)
U	Beschleunigungsspannung
v	Geschwindigkeit
V_Z	Bildverzerrung
V_Z	Zytosolvolumen
$\Delta\gamma$	Kippwinkelinkrement (in Rad)
ΔI	Intensitätsunterschied
$\Delta\beta$	Kippwinkelinkrement (in Grad)
β_{max}	Kippwinkelbereich

Einheiten

C	Coulomb
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Da	Dalton
eV	Elektronenvolt
h	Stunde

Fortsetzung Einheiten

J	Joule
kg	Kilogramm
m	Meter
min	Minute
px	Pixel
s	Sekunde
vx	Voxel

Dimensionen

G	giga (10^9)
M	mega (10^6)
k	kilo (10^3)
m	milli (10^{-3})
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
p	pico (10^{-12})

Aminosäuren

Ala, A	L-Alanin
Arg, R	L-Arginin
Asn, N	L-Asparagin
Asp, D	L-Asparaginsäure
Cys, C	L-Cystein
Gln, Q	L-Glutamin
Glu, E	L-Glutaminsäure
Gly, G	L-Glycin
His, H	L-Histidin
Ile, I	L-Isoleucin
Leu, L	L-Leucin
Lys, K	L-Lysin
Met, M	L-Methionine
Phe, F	L-Phenylalanin
Pro, P	L-Prolin
Ser, S	L-Serin
Thr, T	L-Threonin
Trp, W	L-Tryptophan
Tyr, Y	L-Tyrosin
Val, V	L-Valin

Basen, Nukleotide

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
G	Guanin
GTP	Ganosintriphosphat
T	Thymin
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat

Elemente, Verbindungen, Proteine

•7 H ₂ O	Heptahydrat
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
C	Kohlenstoff
CK	Kreatinphosphatkinase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fMet	Formylmethionin
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
N	Stickstoff
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
O	Sauerstoff
P	Phosphor
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)

Fortsetzung Elemente, Verbindungen, Proteine

TAE	TRIS – Acetat – EDTA
TeaOAc	Tetraethylammoniumacetat
TCA	Trichloressigsäure (engl. <i>trichloroacetic acid</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

VII. Physikalische Konstanten

Plancksche Wirkungsquantum	h	$6,626 \times 10^{-34} \text{ Js} = 4,136 \times 10^{-15} \text{ eVs}$
Elementarladung	e_0	$1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$
Lichtgeschwindigkeit	c	$2,998 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$
Ruheenergie des Elektrons	e_0	$511 \text{ keV} = 8,19 \times 10^{-14} \text{ J}$
Ruhemasse des Elektrons	m_0	$9,109 \times 10^{-31} \text{ kg}$

Physikalische Konstanten wurden aus Williams, D. B. & Carter, C. B. *Transmission Electron Microscopy*. Springer (2009)³ und Kohl, H. & Reimer, L. *Transmission Electron Microscopy*. Springer (2008)⁴ übernommen.

1 Einleitung

Antoni van Leeuwenhoek entdeckte im 17. Jahrhundert Bakterien, nachdem er u.a. menschlichen Speichel unter einem selbstgebauten Lichtmikroskop untersucht hatte ⁵. Eine Bakterienzelle ist ein einfaches Lebewesen, welche alle zum Leben notwendigen Funktionen besitzt. Die bakterielle Erbinformation ist als ringförmiger Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Doppelstrang in der Bakterienzelle gespeichert. Nach der Erstellung einer Kopie der DNA (Replikation) wird durch Zellteilung ein DNA-Strang an die Tochterzelle vererbt. Die DNA codiert für Proteine, welche die Zelle produzieren kann. Dafür übersetzten zunächst RNA-Polymerasen die auf der DNA vorhandene Information in sogenannte Botenribonukleinsäure (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA; Transkription). Diese mRNA wird im Prozess der Translation von großen molekularen Maschinen, den Ribosomen, in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Diese Aminosäureketten ordnen sich in einer speziellen dreidimensionalen (3D) Konformation an, die in ihrer Sequenz begründet ist um ihre jeweiligen Funktionen in der Zelle zu übernehmen ⁶⁻⁸.

1.1 *Escherichia coli*

Bei *Escherichia coli* (*E. coli*) handelt es sich um ein zylindrisch-stäbchenförmiges Bakterium mit einer Länge von $\sim 4 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von $\sim 1,3 \mu\text{m}$. Die Zellhülle wird von der Zellmembran, die das Zytoplasma umschließt, dem Periplasma und der äußeren Membran aufgebaut. *E. coli* zeigt eine gramnegative Färbung. Das *E. coli*-Genom wurde vollständig sequenziert, was mitunter ein Grund für die Verwendung als Modellorganismus in der Biochemie ist. Das *E. coli*-Genom besteht aus einem zirkulären Doppelsträngigem DNA Molekül mit 4.639.221 Basenpaaren (bp), welches 4288 mögliche offene Leserahmen besitzt ⁹. Außerdem können Plasmide, welche für weitere spezielle Proteine codieren in die Zelle eingebracht werden. Mit den eingebrachten Plasmiden können der Bakterienzelle auch Antibiotikaresistenzen vermittelt werden, die eine Selektion auf das Plasmid zulassen ¹⁰. In dieser Arbeit wurden verschiedene Fragmente der Mannitolpermease (MtlA) in einen pET29a-Vektor unter Kontrolle des Laktose-Operons (*lac*) in BL21 *E. coli*-Zellen transfiziert. Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) startet die Expression der MtlA-Fragmente von eingebrachten Plasmiden in den *E. coli*-Zellen.

1.2 70S Ribosom

Ribosomen sind makromolekulare Komplexe mit Protein- und Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid*, RNA)-Anteil (Abb. 1). Bakterielle Ribosomen besitzen eine molare Masse von ~2,7 MDa und einen Svedberg Sedimentationskoeffizienten von 70. Daher werden bakterielle Ribosomen auch als 70S Ribosomen bezeichnet. Ein 70S Ribosom besteht aus einer großen (50S, ~1,6 MDa) und einer kleinen (30S, ~0,9 MDa) Untereinheit. Die große Untereinheit (50S) setzt sich aus der 23S ribosomalen RNA (rRNA), der 5S rRNA sowie 31 ribosomalen Proteinen zusammen. Die 23S rRNA besteht aus 2904 Nukleotiden (nt) und die 5S rRNA aus 120 nt. Die kleine ribosomale Untereinheit (30S) wird aus der 16S rRNA mit 1542 nt und 21 ribosomalen Proteinen aufgebaut

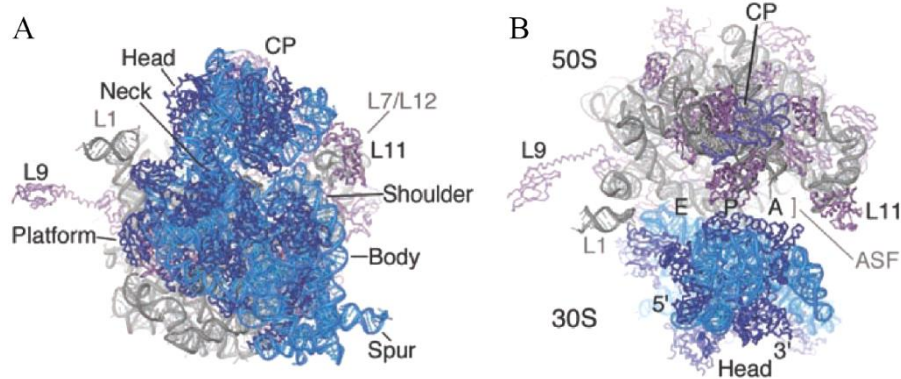


Abb. 1. ***E. coli* 70S Ribosom** (Abb. 1 A u. B aus ¹). (A) Blick auf die 30S Untereinheit. Proteine und rRNA der 30S Untereinheit sind dunkel bzw. hellblau dargestellt. Die Proteine und die 23S rRNA der 50S Untereinheit sind magenta bzw. grau abgebildet. Die 5S rRNA wird violett dargestellt. Strukturelle Eigenschaften der 30S Untereinheit wie, Kopf (engl. *head*), Hals (engl. *neck*), Plattform (engl. *platform*), Körper (engl. *body*), Schulter (engl. *shoulder*) und Ausläufer (engl. *spur*) sind indiziert. Von den 50S Struktureigenschaften sind L1 (Protein L1 / rRNA Arm), zentrale Protuberanz (engl. *central protuberance*, CP), A-Stellen Finger (engl. *A-site finger*, ASF) und L11 (Protein L11 / rRNA Arm) gekennzeichnet. Von den Proteinen L7/L12 und der Spitze des ASF sind nur die ungefähren Positionen in grau dargestellt, da diese in der Dichte nicht beobachtet werden konnten. (B) Abbildung (A) um 90° um die horizontale Achse gedreht.

1.2.1 Peptidbindung und Transfer-RNAs im Ribosom

Ribosomen bauen nach Vorlage der mRNA durch Dekodierung von jeweils drei RNA-Basen der mRNA in eine Aminosäure die Proteine auf (Abb. 2). Der Weg der mRNA durch das Ribosom wurde anhand mehrerer Kristallstrukturen von 70S Ribosomen mit unterschiedlichen mRNAs

aufgedeckt. Der Weg der mRNA beschreibt einen Bogen durch die kleine ribosomale Untereinheit (30S) ¹².

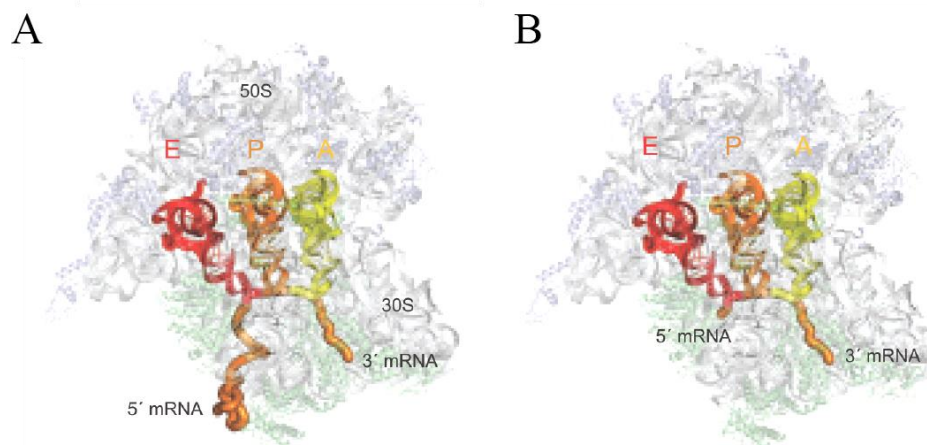


Abb. 2. **mRNA in der 30S Untereinheit** (Abb. 3 d u. e aus ¹²). Draufsichten auf den 70S Ribosomkomplex mit mRNA (orange). Die tRNAs sind abhängig von ihrer Position im Ribosom (grau) farblich hervorgehoben (rot: tRNA in der E-Tasche, orange in der P-Tasche und gelb in der A-Tasche). Markiert sind 50S- und 30S-Untereinheit, sowie 3'- und 5'-Ende der mRNA. (A) 70S Ribosom nach Translationsinitiation mit einer 59 Basen langen terminale Verlängerung der mRNA. (B) 70S Ribosom während der Elongation mit einer 59 Basen langen mRNA.

1.2.1.1 tRNA Aufbau

Das Ribosom besitzt ganz in der Nähe der mRNA drei Taschen, in denen transfer-RNAs (tRNA) gebunden werden können. Diese werden als Aminoacyl (A)-, Peptidyl (P)- und Ausgangs (engl. *exit* (E))-Tasche bezeichnet (Abb. 2). Eine tRNA wird aus RNA-Molekülen (zwischen 73 und 93 RNAs) aufgebaut ¹³ und bildet eine Kleeblatt ähnliche Sekundärstruktur aus. Die vier Arme des tRNA-Kleeblattes werden als Aminosäure-, TΨC-, Anticodon- und D-Arm bezeichnet. Der Aminosäurearm wird von einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit einer entsprechenden Aminosäure beladen, die später vom Ribosom in eine Polypeptidkette eingebaut wird. Der Anticodonarm enthält das Anticodon, welches aus drei zur mRNA revers kompatiblen RNAs besteht. Eine mit einer Aminosäure beladene tRNA kann in der A-Tasche eines Ribosoms gebunden werden, wenn das Anticodon zum mRNA-Codon passt. Anschließend wird zwischen der tRNA-gebundenen Aminosäure in der A-Tasche und einer tRNA-gebundenen Aminosäure in der P-Tasche eine Peptidbindung ausgebildet.

1.2.1.2 Initiation der Polypeptidsynthese

Bei der Initiation der Polypeptidsynthese bindet die kleine Untereinheit (30S) die Initiationsfaktoren (IF) 1 und 3. Dabei verhindert IF 3 die vorzeitige Bindung der 30S Untereinheit an die 50S Untereinheit und IF 1 verhindert die Bindung von tRNAs in der A-Tasche der 30S Untereinheit. Nun bindet die mRNA an die 30S Untereinheit und sucht das erste Startcodon (AUG), das in 3'-Richtung (unterhalb) von der Shine-Dalgarno-Sequenz liegt. Die Shine-Dalgarno-Sequenz besteht aus 4 bis 9 Purinen und ist 8 bis 13 Basen in 5'-Richtung (oberhalb) des ersten Startcodons lokalisiert. Außerdem interagiert die Shine-Dalgarno-Sequenz mit der 16S rRNA der kleinen Untereinheit. Die mit Formylmethionin beladenen Initiations-tRNA ($fMet-tRNA^{fMet}$) bindet an der P-Tasche unterstützt von Guanosinriphosphat (GTP) gebundenem IF 2. $fMet-tRNA^{fMet}$ ist die einzige bakterielle tRNA, die an der P-Tasche binden kann. Alle anderen tRNAs binden an der A-Tasche. Nach GTP-Hydrolyse und Dissoziation der IFen kann die große ribosomale Untereinheit (50S) angelagert werden. Jetzt ist der Komplex bereit für den Elongationszyklus ¹³.

1.2.1.3 Elongationsschritt der Polypeptidsynthese

Zu $fMet-tRNA^{fMet}$ in der P-Tasche lagern sich entsprechend dem mRNA-Codon in der A-Tasche eine passende Aminoacyl-tRNA zusammen mit GTP gebundenem Elongationsfaktor (EF)-Tu an. Der EF-Tu dient dem Korrekturlesen, sodass wenn die ersten beiden Basen des Codons nicht mit dem Anticodon komplementär sind die Aminoacyl-tRNA von der A-Tasche dissoziiert. EF-Tu nutzt die beiden GTP abhängigen Komplexe vor und nach der GTP-Hydrolyse zum Korrekturlesen (EF-Tu-GTP und EF-Tu-GDP). Mithilfe des EF-Ts kann EF-Tu-GDP zu EF-Tu-GTP regeneriert werden. Beim letzten Codon, der sogenannten Wobble-Base können Abweichungen vom idealen Anticodon toleriert werden ¹³. Nun wird unter der Katalyse der 23S rRNA der großen Untereinheit (50S) am Peptidyltransferasezentrum (engl. *peptidyl transferase center*, PTC) eine Peptidbindung zwischen $fMet$ in der P-Tasche und der Aminosäure der tRNA in der A-Tasche gebildet. Jetzt befindet sich das Ribosom im sogenannten Hybridzustand, da sich die deacetylierte tRNA in den P/E- und die Peptidyl-tRNA in den A/P-Taschen (Pretranslokationellerzustand) befindet (Abb. 3). Die erstgenannte Taschenposition (X/...) bezieht sich auf die kleine ribosomale Untereinheit (30S), die zweite Position (.../X) auf die große ribosomale Untereinheit (50S). Das Ribosom bewegt sich

nun unter Zuhilfenahme des EF-G und GTP-Hydrolyse um ein Codon (3 Basen) in 3'-Richtung, wobei die deacetylierte tRNA vollständig in die E-Tasche verschoben wird (E/E). Dieser Vorgang wird als Translokation bezeichnet. Untersuchungen mittels Kryoelektronenmikroskopie (engl. *cryo-electron microscopy*; CEM) haben aufgedeckt, dass die Ausbildung des Hybridzustandes im Ribosom mit einer ratschenähnlichen Bewegung der 30S Untereinheit verbunden ist. Mit Blick auf die der Umgebung zugewandten Seite der 30S Untereinheit bewegt sich dabei die 30S Untereinheit gegen den Uhrzeigersinn in Bezug zur 50S Untereinheit. Bei der Translokation dreht sich die kleine ribosomale Untereinheit (30S) gegen die große Untereinheit (50S). Die deacetylierte tRNA verlässt von der E-Tasche das Ribosom. Gleichzeitig wird die Peptidyl-tRNA ganz in die P-Tasche verschoben (P/P) (Posttranslokationellerzustand). Das Ribosom ist jetzt bereit für den nächsten Elongationszyklus.¹⁴

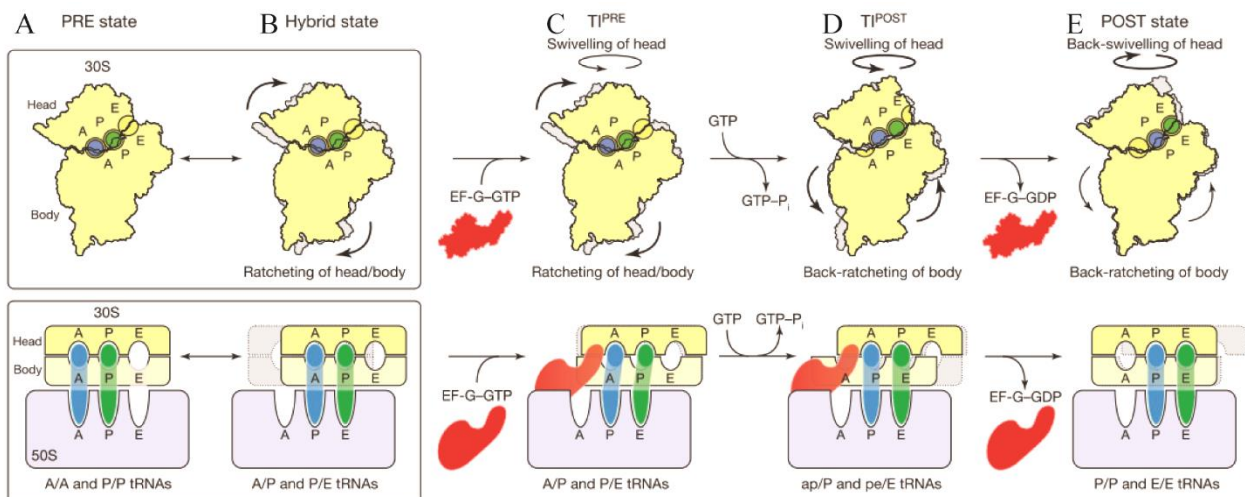


Abb. 3. **Translokationsmodell** (modifizierte Abb. 4 a-e aus¹⁵). Das Ribosom existiert in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen dem Grundzustand (A) mit den klassischen tRNA-Besetzungen (A/A und P/P) und dem Hybridzustand (B) mit tRNAs in A/P und P/E. (C) Die Bindung des EF-G zusammen mit GTP stabilisiert den gedrehten (engl. *ratcheted*) Zustand. (D) Eine schnelle GTP-Hydrolyse durch EF-G beschleunigt die Translokation. Die Domäne IV des EF-G entkoppelt die Rückdrehung von der rückläufigen Bewegung zurück in den klassischen Grundzustand. Es handelt sich hier um eine Art „Türstopper“-Funktion. Die vollständige Rückdrehung der 30S Untereinheit führt zum „Post-70S-EF-G“-Zustand (E). Rückdrehung des 30S-Kopfes stellt den klassischen Grundzustand her.

1.2.1.4 Termination der Polypeptidsynthese

Die Polypeptidsynthese wird durch das Auslesen eines Stop-Codons, wie UAA, UAG oder UGA, in der mRNA beendet. Der Polypeptidsynthese-Stop wird in Bakterien von drei Terminations-

faktoren (engl. *release factor*, RF) gesteuert: RF-1, RF-2 und RF-3. RF-1 erkennt die Stop-Codons UAG und UAA, RF-2 hingegen UGA. Zunächst wird die terminale Peptidyl-tRNA-Bindung hydrolysiert, indem die Peptidyltransferase die wachsende Polypeptidkette auf ein Wassermolekül überträgt. Anschließend erfolgt die Freisetzung der Polypeptidkette und der letzten tRNA. Schließlich dissoziiert das 70S Ribosom in die 30S und die 50S Untereinheit ¹³.

1.2.2 Weg der naszierenden Polypeptidkette durch das Ribosom

Die wachsende Polypeptidkette verlässt das Ribosom durch einen ca. 100 Å langen Tunnel in der 23S rRNA (Abb. 4). Die Tunnelwände werden hauptsächlich von rRNA der Domänen I-V der 23S rRNA gebildet. Im ribosomalen Tunnel gibt es eine Verengung, die von Teilen der ribosomalen Proteine L4 und L22 gebildet wird. Der Tunnelausgang ist von den ribosomalen Proteinen L19, L22, L23, L24, L29 und L31e umgeben ¹⁶⁻¹⁸.

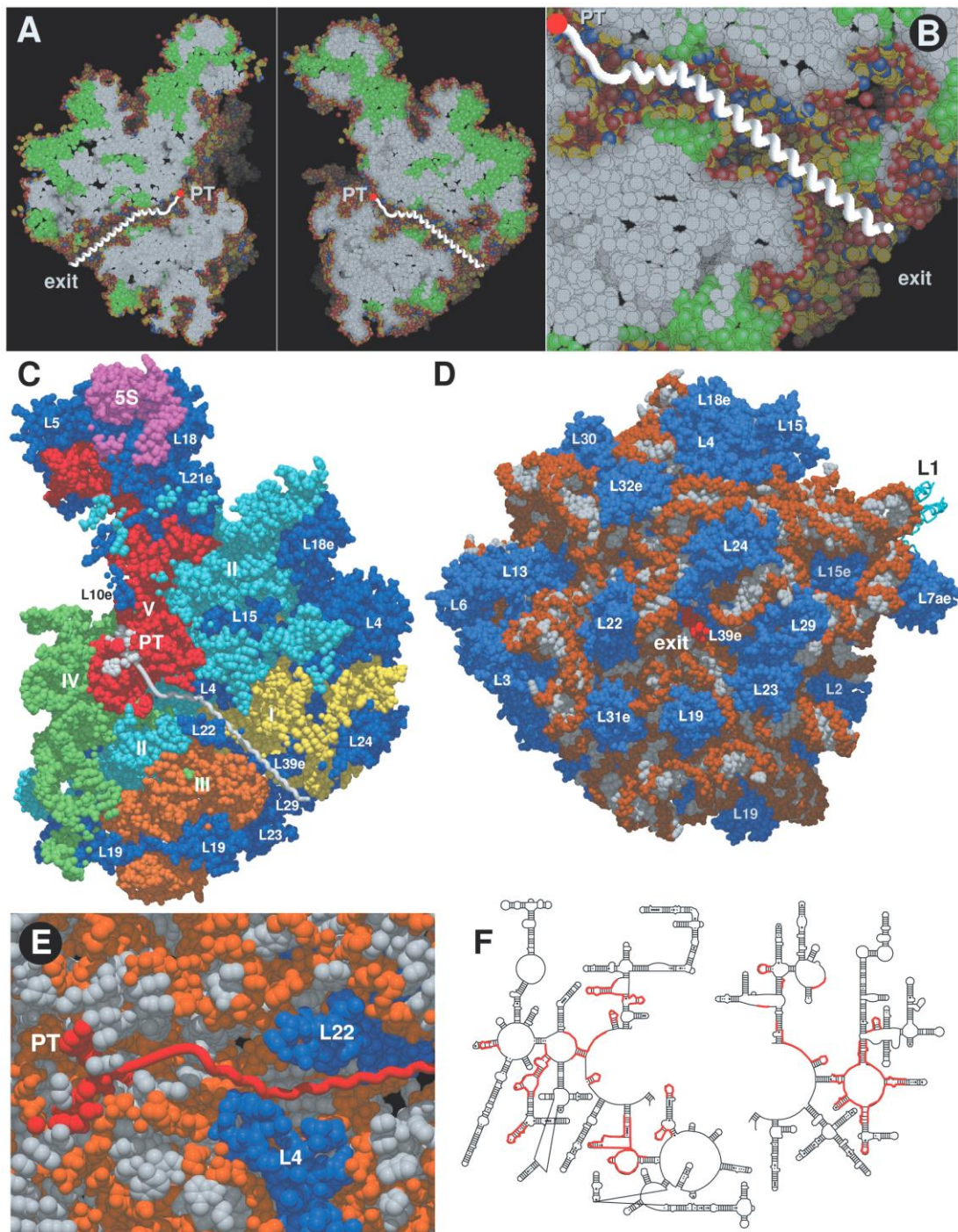


Abb. 4. **Polypeptidkette am Tunnelausgang** (Abb. 11 aus ¹⁷). Dargestellt sind ein aufgeklappter Schnitt durch die 50S Untereinheit (A) und eine Vergrößerung des möglichen Verlaufs einer Polypeptidkette (weiß) durch den ribosomalen Tunnel (B). (C) Die Tunneloberfläche ist anhand von Hauptstrangatomen abgebildet. Dabei werden Proteine und RNA-Domänen farblich differenziert dargestellt. Proteine werden blau, die RNA-Domäne I gelb, die RNA-Domäne II hellblau, die RNA-Domäne III orange, die RNA-Domäne IV grün, die RNA-Domäne V hellrot und die 5S RNA pink gezeigt. (D) Die Oberfläche der 50S Untereinheit ist mit raumfüllenden Atomen im Bereich des ribosomalen Tunnelausgangs dargestellt. (E) Blick auf die Engstelle, welche von den ribosomalen Proteinen L4 und L22 gebildet wird. (F) Sekundärstruktur der 23S rRNA in der Bestandteile des ribosomalen Tunnels rot gekennzeichnet sind.

1.2.3 Ribosomenarretierung

Eine besondere Aminosäuresequenz (F¹⁵⁰xxxxWIxxxxGIRAGP¹⁶⁶) des Sekretionsmonitorproteins (engl. *secretion monitor*, SecM) führt zu einer vorübergehenden Arretierung des Ribosoms an der mRNA. SecM ist ein periplasmatisches Protein, welches von einer polyzistronischen mRNA gefolgt von SecA translatiert wird. Das SecA-Protein sorgt in der Zelle für den aktiven Transport von Proteinen durch das Translokton und löst bei seiner Anwesenheit die Arretierung eines durch SecM arretierten Ribosoms auf. Herrscht in einer Zelle ein SecA-Mangel, so bleibt die Arretierung der durch die SecM-Sequenz blockierten Ribosomen erhalten. Gleichzeitig mit der Arretierung wird die Shine-Dalgarno-Sequenz von SecA auf der polyzistronischen mRNA für weitere Ribosomen zugänglich, wodurch SecA translatiert wird. Wenn wieder ausreichend SecA-Protein in der Zelle vorhanden ist, löst SecA die Ribosomenarretierung auf und die SecA-Translation wird demnach herunterreguliert. Das mithilfe des SecA-Proteins durch das Translokton geschleuste SecM-Protein wird im Periplasma von Proteasen abgebaut¹⁹. Die SecM-Sequenz interagiert im Ribosom mit ribosomalen Proteinen und rRNA, welche das ribosomale Tunnel bilden (Abb. 5). Dadurch wird die naszierende peptidyl-tRNA in der P-Tasche am PTC leicht verschoben, sodass der Abstand zur neu einzubauenden tRNA (bei SecM-Arretierung: tRNA-Pro¹⁶⁶) in der A-Tasche vergrößert wird und die Ausbildung einer neuen Peptidbindung am PTC zum Erliegen kommt²⁰. Kürzlich wurde gezeigt, dass durch die Anwendung einer Zugkraft die SecM-Arretierung von 70S Ribosomen gelöst werden kann. Die bei einer Proteinfaltung *in vivo* nahe des ribosomalen Tunnelausgangs erzeugte Zugkraft würde bereits ausreichen, die SecM-Arretierung von 70S Ribosomen aufzuheben²¹.

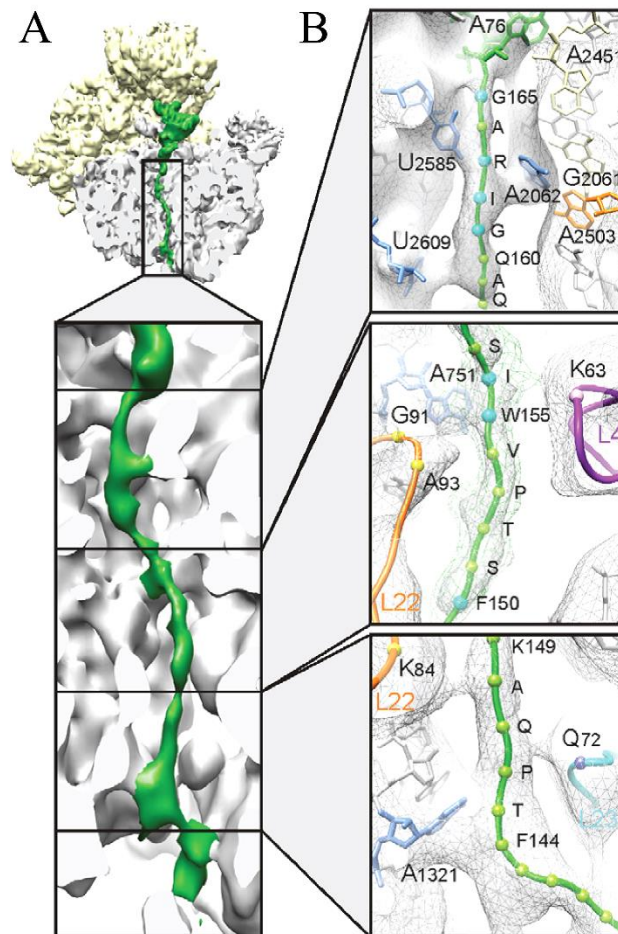


Abb. 5. **SecM Arrestierung** (modifizierte Abb. 4 aus ²⁰). (A) Querschnitt durch die 50S Untereinheit (grau), der eine SecM arretierte Peptidyl-tRNA (grün) im ribosomalen Tunnel zeigt. (B) Vergrößerte Darstellung des oberen-, mittleren- und unteren- Bereichs des ribosomalen Tunnels und des zentralen Kohlenstoffrückgrats der Peptidyl-tRNA (grün). Dichten aus der CEM-Untersuchung sind als graues Netz gezeigt. Für die SecM-Arretierung wichtige Atome des zentralen Kohlenstoffrückgrats der Peptidyl-tRNA sind blau markiert.

Die für die Arrestierung der Ribosomen verantwortliche Aminosäuresequenz kann am Ende eines zu translatierenden Proteins eingebaut werden, um eine vorübergehende Arrestierung der Ribosomen zu erreichen, die zur Ausbildung von Polysomen führt ². Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmide mit MtlA gefolgt von einer SecM-Sequenz hergestellt, die dann in *E. coli* eingebracht wurden, um nach deren Expression die Anzahl an membrangebundener Polysomen in der Zelle zu erhöhen (Abb. 6).

A MtlA_(n)-Stop



B MtlA_(n)-SecM-GFP



Abb. 6. **SecM-Konstrukte.** Gezeigt wird die schematische Darstellung der verwendeten SecM-Konstrukte. Zum einen wurde ein MtlA-Fragment mit Transmembrandomänen (rot) gefolgt von einem Stop-Codon (A) oder einer SecM-Sequenz (violett) verwendet (B).

1.2.4 Trans-Translation

Die Trans-Translation ist ein Prozess, der arretierte Ribosomen freisetzt und das translatierte Peptid für den Abbau markiert. Ribosomen werden oft an verkürzten mRNAs, seltenen Codons und einigen Terminationsstellen arretiert. Für die Trans-Translation ist in erster Linie eine kleine RNA, die Transfer-mRNA (engl. *transfer-messenger RNA*, tmRNA) verantwortlich. Die tmRNA, auch bekannt als 10Sa RNA oder SsrA besitzt sowohl transfer- als auch mRNA Aktivität. Nachdem ein translatierendes Ribosom an einer mRNA arretiert wurde, lagert sich eine mit Alanin beladenen tmRNA (alanyl-tmRNA) zusammen mit EF-Tu und GTP wie eine tRNA am arretierten Ribosom an. Dann wird das Alanin von der tmRNA auf die naszierende Polypeptidkette übertragen und die tmRNA translokiert im Ribosom von der A-Tasche zur P-Tasche. Anschließend wird die ursprüngliche mRNA freigesetzt und die tmRNA fungiert nun als Vorlage für die Translation. Nun wird die 10 Aminosäuren umfassende Markierungssequenz (ANDEN YALAA), für welche die tmRNA codiert gefolgt von einem Stop-Codon translatiert. Abschließend dissoziiert der Translationskomplex und das markierte Protein wird freigesetzt und durch Proteolyse abgebaut. Bei der tmRNA bedingten Proteolyse sind die plasmatischen Proteasen ClpXP und ClpAP, sowie die an der Membran lokalisierte Protease FtsH und die periplasmatische Protease Trp beteiligt. Die tmRNA findet sich in allen Eubakterien, so auch in *E. coli*. In *E. coli* ist die tmRNA nicht essentiell.

1.2.5 Membrangebundenes Ribosom (MBR)

Abhängig von ihrer jeweiligen Funktion müssen translatierte Proteine zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Transmembranproteine bzw. einzelne Domänen dieser Proteine müssen die Membran passieren, um in der Membran verankert zu werden. Bei der Translation eines Membranproteins kann eine aminoterminal (N-terminal) Signalsequenz translatiert werden. Sobald die N-terminale Signalsequenz das Ribosom verlassen hat, kann diese von einem Signalerkennungspartikel (engl. *signal recognition particle*, SRP) gebunden werden. Der gesamte SRP gebundene Translationskomplex (mRNA, Ribosom, tRNAs, Polypeptidkette, EF, GTP und diverse Faktoren) wird zur Membran transportiert. An der Membran wird das SRP vom SRP-Rezeptor, welcher in der Membran verankert ist, gebunden. Die naszierende Polypeptidkette wird dann an den Translokationskomplex weitergeleitet. Beim Translokationskomplex handelt es sich um einen Proteinkomplex, bestehend aus den Proteinen SecY, SecE und SecG, welcher es der naszierenden Polypeptidkette ermöglicht die Membran zu passieren. SRP und SRP-Rezeptor lösen sich vom Komplex. Die weiterlaufende Translation ermöglicht der Polypeptidkette die Translokation durch das SecYEG-Translokon. Auf der äußeren Membranseite kann die N-terminale Signalsequenz von einer Signalpeptidase abgespalten werden. Das am Translokonsitzende translatierende Ribosom ist über SecY an die Membran gebunden (Abb. 7).^{8,23,24}

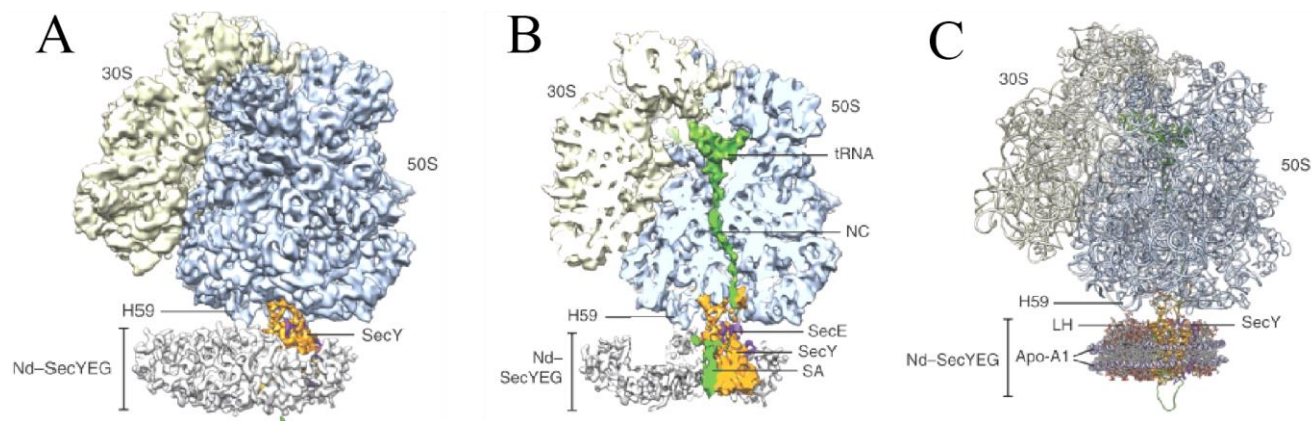


Abb. 7. **Translokon gebundenes Ribosom** (modifizierte Abb. 1 b-d aus ²³). (A) CEM-Rekonstruktion des 70S-Ribosom-Nanodisk-SecYEG Komplex mit naszierender Kette bei einer Auflösung von 7,1 Å. (B) Querschnitt senkrecht zur Membran durch (A). (C) Gesamtatommodell von (A) mit Proteinen und RNA in *Ribbon*-Darstellung und Phospholipiden in *Ball-Stock*-Darstellung.

Das Ribosom bildet Kontakte zu SecYE sowie zu Lipiden aus. Die zytoplasmatischen Proteinschleifen L8/9 und L6/7 von SecY reichen in den ribosomalen Tunnel hinein und kontaktiert die Helices H50-H53-H59 und H6-H24-H50. Außerdem kontaktieren diese beiden Protein-

schleifen L8/9 und L6/7 von SecY das ribosomale Protein L23. Ein weiterer Kontakt besteht zwischen dem C-Terminus von SecY und dem ribosomalen Protein L24 und den rRNA Helices H24-H50. Der N-Terminus von SecE kontaktiert die ribosomalen Proteine L23 und L29. Auch bestehen Kontakte zwischen der rRNA-Helix H59 sowie dem ribosomalen Protein L24 zu Lipidkopfguppen der Nanodisk.²³

1.2.6 Mannitolpermease

Mannitolpermease (MtlA) ist ein 68 Kilo Dalton (kDa) großes Transmembranprotein aus *E. coli*, welches über 6 Transmembrandomänen in der Membran verankert ist (Abb. 8). Als Teil des Phosphotransferasesystems (PTS) katalysiert MtlA den Phosphoenolpyruvat abhängigen Transport von Mannitol in das *E. coli* Zytoplasma. Für die Integration von MtlA in die Membran werden SRP, SRP-Rezeptor, SecYEG-Translocon und das integrale Membranchaperon YidC benötigt²⁵. In der vorliegenden Arbeit wurden durch die Expression von unterschiedlichen MtlA-Konstrukten in *E. coli*-Zellen von einem Plasmid die Anzahl an MBR in den *E. coli*-Zellen erhöht. Die verschiedenen MtlA-Konstrukte unterscheiden sich in der Zahl der enthaltenen Transmembrandomänen, sowie einer eventuell vorhandenen SecM-Sequenz.

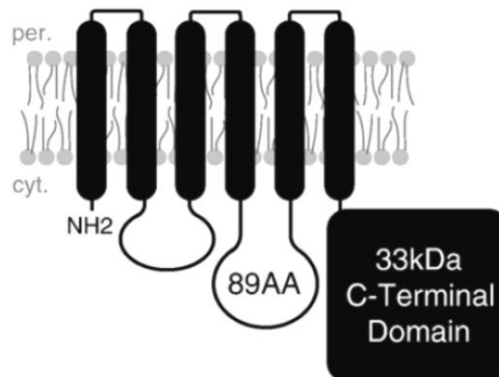


Abb. 8. **MtlA** (Abb. 7 a aus²⁵). Die Topologie des 637 Aminosäuren umfassenden MtlA-Proteins mit seinen 6 Transmembrandomänen zusammen mit der Lipiddoppelschicht der Membran wird gezeigt.

1.2.7 Polyribosom

Ein mRNA-Molekül kann gleichzeitig von mehreren translatierenden Ribosomen besetzt sein. Man spricht dann von einem Polyribosom oder Polysom. Dabei kann, nachdem ein Ribosom an der mRNA angelagert wurde und dieses Ribosom mit der Translation begonnen hat ein weiteres Ribosom an derselben mRNA angelagert werden. Dies ermöglicht eine effiziente Proteinexpression, da von einem einzigen mRNA-Molekül gleichzeitig mehrere Proteine translatiert werden. Polysomen wurden bereits in den 1960er Jahren im Transmissions-elektronenmikroskop beobachtet²⁶⁻³⁰. Viele dieser Untersuchungen wurden in kontrollierten künstlichen Umgebungen (*in vitro*) durchgeführt^{31,32}. In einer neueren Studie konnten die 3D Konformationen von *in vitro* erzeugten arretierten Polysomen aufgedeckt werden (Abb. 9). Die arretierten Polysomen nehmen pseudohelikale, pseudoplanare bzw. leicht variable Konformationen ein².

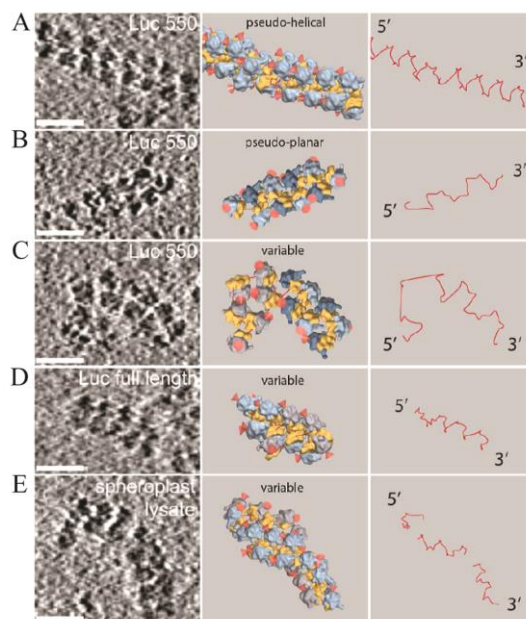


Abb. 9. **Polyribosom** (Abb. 5 modifiziert aus²). (A-E, links) Tomographische z-Schnitte von Polysomenorganisationen. (A-C) Polysomen aus *in vitro* Translationslysaten mit trunkierter Luciferase 550 mRNA, (D) mit terminierendem Vollängen Luciferase-Konstrukt und (E) aus Spheroplastenlysaten nach *in vivo* Expression von Luciferase-SecM-GFP. (Balkenlänge 50 nm). (A-E, Mitte) *Isosurface*-Modelle einzelner Ribosomen (50S, blau; 30S, gelb) wurden an entsprechenden experimentellen Positionen platziert. Ribosomen in *top-top* (t-t) Konfiguration werden hellblau, in *top-bottom* (t-b) Konfiguration werden dunkelblau dargestellt. Der Peptidaustritt der 50S Untereinheit wird durch einen roten Kegel markiert. Ribosomen, die nicht eindeutig einem Polysom zugeordnet werden konnten werden grau gezeigt. Die Organisationsklassen der Polysome sind über den Modellen angegeben. (A-E, rechts) Der wahrscheinlichste Weg der mRNA mit der kürzesten Distanz zwischen jedem Ribosom ist rot dargestellt. Der Verlauf der mRNA kann helikal (A), sinusoidal (B) oder flexibel (C-E) sein. Bei größerer Flexibilität kann der Verlauf der mRNA nur teilweise verfolgt werden.

1.3 Chaperone

Wenn eine translatierte Polypeptidkette das Ribosom am Tunnelausgang an der großen Untereinheit verlässt, kann es bereits von Chaperonen (Abb. 10) geschützt falten. Trigger Faktor (TF) ist ein Proteinkomplex, der in der Nähe des ribosomalen Tunnelausgangs bindet und die Polypeptidkette abschirmt, sodass sich ungehindert intramolekulare Proteinstrukturen ausbilden können.

Ist ein Protein nach dem durch TF geschützten Verlassen des Ribosoms nicht fertig gefaltet, kann es vom Hitzeschockprotein (Hsp) 70 System in der Faltung unterstützt werden. Dabei bindet DnaJ das ungefaltete bzw. teilweise gefaltete Protein. Danach bindet der gebildete Komplex an DnaK-ATP. DnaJ stimuliert die ATP-Hydrolyse durch DnaK, was zur festeren Bindung von DnaK-ADP an das ungefaltete Protein führt. In Bakterien stimuliert der Nukleotidaustauschfaktor GrpE die ADP-Freisetzung. Inzwischen kann das gebundene Protein sich falten. DnaK bindet ATP und dissoziiert dann vom Protein. Wurde das Protein nur teilweise gefaltet, kann es zur vollständigen Faltung an das Chaperoninsystem GroEL/ES (Hsp 60) übergeben werden.

GroEL (Abb. 11) besteht aus zwei heptameren Ringen (Untereinheiten: 57 kDa), die zwei Taschen besitzen. GroEL arbeitet asymmetrisch, da die beiden Ringe durch negative Allosterie gekoppelt sind. Das bedeutet, dass beide Ringe immer in einem anderen Zustand vorkommen. Einer der Ringe kann durch GroES verschlossen sein (cis-Ring). In dem anderen offenen Ring (trans-Ring) kann ein unvollständig gefaltetes Protein binden. Jede Untereinheit des trans-GroEL-Rings bindet ein ATP-Molekül. Ein GroES-Heptamer verschließt den mit einem unvollständig gefalteten Protein besetzten Ring, wobei sich sieben ADP und ein GroES-Heptamer vom cis-Ring ablösen. Nun befindet sich der mit einem unvollständig gefalteten Protein besetzte Ring im cis-, der unbesetzte Ring im trans-Zustand. Während der ATP-Hydrolyse am cis-Ring kann die Proteinfaltung für ca. 10 s stattfinden. Danach binden sieben ATP-Moleküle an den trans-Ring und veranlassen die Öffnung des cis-Rings, indem das GroES-Heptamer dissoziiert. Mit dem GroES-Heptamer lösen sich auch die sieben ADP-Moleküle des cis-Rings. Das gefaltete oder teilweise gefaltete Protein verlässt den Ring. Ein nur teilweise gefaltetes Protein kann sofort wieder in einem trans-Ring gebunden werden und der Faltungszyklus kann erneut durchlaufen werden.³³

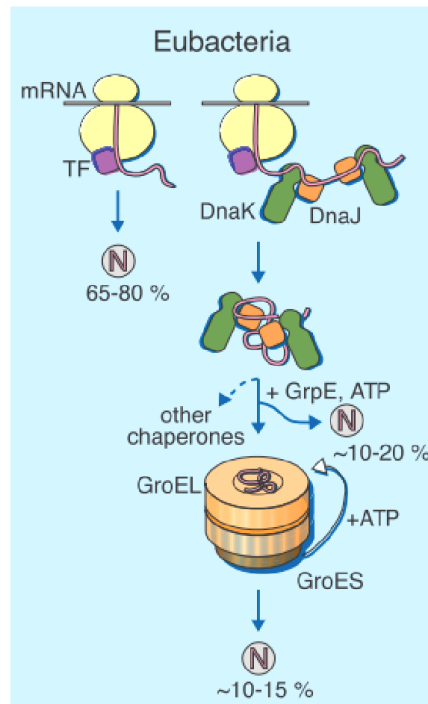


Abb. 10. **Chaperone in Eubakterien** (modifizierte Abb. 2 A aus ³³). Modell für Chaperon assistierte Faltung von neu synthetisierten Polypeptiden im Zytosol von Eubakterien.

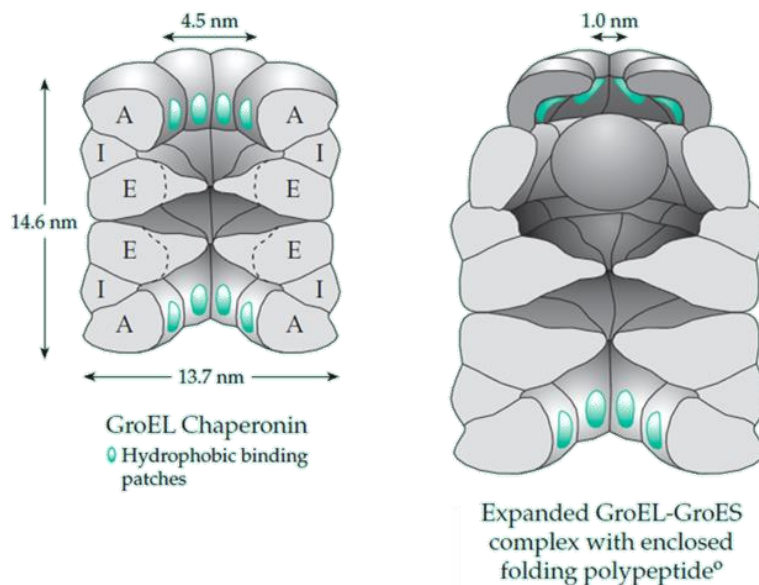


Abb. 11. **GroEL-GroES Chaperonin** ³⁴. Links: Schnitt durch das GroEL Chaperon. Der Doppelring besteht aus 14 Untereinheiten und besitzt eine siebenfache Rotationssymmetrie. Die apikale, intermediäre und equatoriale Domänen der Untereinheiten, sowie die Abmessungen sind angegeben. Rechts: Mit GroES-Heptamer verschlossenes elongiertes GroEL

1.4 Optische Mikroskopie

Das beschriebene *E. coli* Bakterium mit einer durchschnittlichen Länge von 4 μm und einem mittleren Querschnitt von 1,3 μm ist zu klein, als das man dieses mit dem menschlichen Auge direkt beobachten könnte³⁵. Bereits im 17. Jahrhundert konnte der niederländische Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) mithilfe eines Lichtmikroskops erstmals Bakterien beobachten⁵. Die optische Mikroskopie ermöglicht beispielsweise die morphologische Beobachtung einzelner Zellen³⁶ und auch einzelner Zellorganellen in eukaryotischen Zellen³⁷. Die Auflösung eines Lichtmikroskops ist bestimmt durch die Wellenlänge des verwendeten sichtbaren Lichtes (350-800 nm) und ist begrenzt durch die numerische Apertur der Objektbeleuchtung^{35,38}. Um spezifische Zellbestandteile oder einzelne Proteine abzubilden und um Interaktionen und dynamische Vorgänge besser visualisieren zu können verwendet man Methoden der Fluoreszenzmikroskopie. In einem Fluoreszenzmikroskop können durch einen Laser angeregte fluoreszierende Moleküle beobachtet werden. Einzelne Proteine wie beispielsweise das ribosomale Protein der kleinen Untereinheit 2 (rpsB) können mit einem fluoreszierenden Protein, wie mEos³⁹ markiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop lokalisiert werden. Spezielle fluoreszenzmikroskopische Verfahren (superauflösende Fluoreszenzmikroskopie, engl. *super resolution microscopy*) ermöglichen sogar Auflösungen jenseits der von Ernst Abbe postulierten Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops. Eine dieser suprauflösenden fluoreszenzmikroskopischen Techniken ist die Lokalisationsmikroskopie nach Photoaktivierung (engl. *photoactivated localization microscopy*, PALM). PALM verwendet photoaktivierbare fluoreszierende Proteine (PA-FPs), die durch Licht mit definierter Wellenlänge An- bzw. Ausgeschaltet werden können. Zu Beginn befinden sich alle PA-FPs in einem ausgeschalteten Zustand. Dann aktiviert ein kurzer Lichtblitz mit geringer Laserstärke aber mit einer bestimmten Wellenlänge in einem räumlich begrenzten Bereich einige PA-FPs. Durch die geringe Anregungsstärke werden, statistisch gesehen, nur räumlich so weit voneinander entfernt liegende PA-FPs angeregt, dass deren Fluoreszenzsignal nicht überlappt und diese dann eindeutig lokalisiert werden können. Mit fortschreitender Belichtung bleichen diese stochastisch verteilten PA-FPs aus. Danach wird die Anregungsintensität weiter gesteigert und der Prozeß wiederholt.⁴⁰

Im Zuge einer Zusammenarbeit mit Prof. Johan Elf (Uppsalla Universität, Schweden) wurden rpsB-Proteine in *E. coli*-Zellen mit mEos markiert. Durch Anwendung von PALM konnte der Weg,

den die markierten rpsB-Proteine in den untersuchten *E. coli*-Zellen genommen haben verfolgt werden und so eine Geschwindigkeitskarte der mEos markierten rpsB-Proteine erstellt werden.

1.4.1 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie (EM) ermöglicht nochmals höhere Auflösung als die supraauflösende Fluoreszenzmikroskopie. Mit geeigneten Proben kann sogar atomare Auflösung erzielt werden⁴¹. In einem Elektronenmikroskop herrscht wegen der starken Wechselwirkung der Elektronen mit Materie Hochvakuum. Untersuchungen an wässrigen Proben (wie in der Lichtmikroskopie) sind im Hochvakuum nicht möglich, da Flüssigkeiten bei niedrigen Drücken von bis zu 10^{-7} bar sofort verdampfen.^{4,42} Bei der CEM werden in amorphem Eis eingebettete Proben verwendet, um dieses Problem zu umgehen⁴². Die CEM eignet sich hervorragend zur Untersuchung von biologischen Proben, wie isolierten makromolekularen Proteinkomplexen⁴³ oder ganzen Zellen⁴⁴. Dank verbesserter Elektronenmikroskope und Kameras, welche Elektronen direkt detektieren, sind heutzutage Auflösungen im Subnanometerbereich, gerade bei isolierten makromolekularen Proteinkomplexen, möglich⁴⁵. Dünne ganze Zellen (< 500 nm) lassen sich mit der Technik der Kryoelektronentomographie (engl. *cryo-electron tomography*; CET) untersuchen^{46,47}. Jedoch bestimmt hier die Probendicke die erreichbare Auflösung. Die im Transmissionselektronenmikroskop zugängliche Probendicke ist abhängig von der mittleren freien Weglänge der Elektronen im Probenmaterial⁴. Bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV beträgt beispielsweise die inelastische mittlere freie Weglänge der Elektronen in Eis ca. 350 nm⁴⁸. Die Entwicklung der artefaktfreien Präparation von eiseingebetteten Proben mit einem fokussierten Ionenstrahl (Ionenätzung oder Ionendünnung) ermöglicht es heutzutage auch dickere Proben, wie beispielsweise *E. coli*-Zellen, bis hin zu menschlichen Zellen zu „dünnen“ und mit der CET zu untersuchen^{46,49}.

1.4.1.1 Aufbau eines Elektronen Mikroskops

Ein Elektronenmikroskop ähnelt im Aufbau einem klassischen Lichtmikroskop, welches auf den Kopf gestellt wurde (Abb. 12). Die Hauptbestandteile eines Elektronenmikroskops von oben nach

unten sind: die Elektronenquelle, ein Kondensorlinsensystem, Probenhalter, Objektiv-, Zwischen- und Projektivlinse und ein Detektor ⁴⁷.

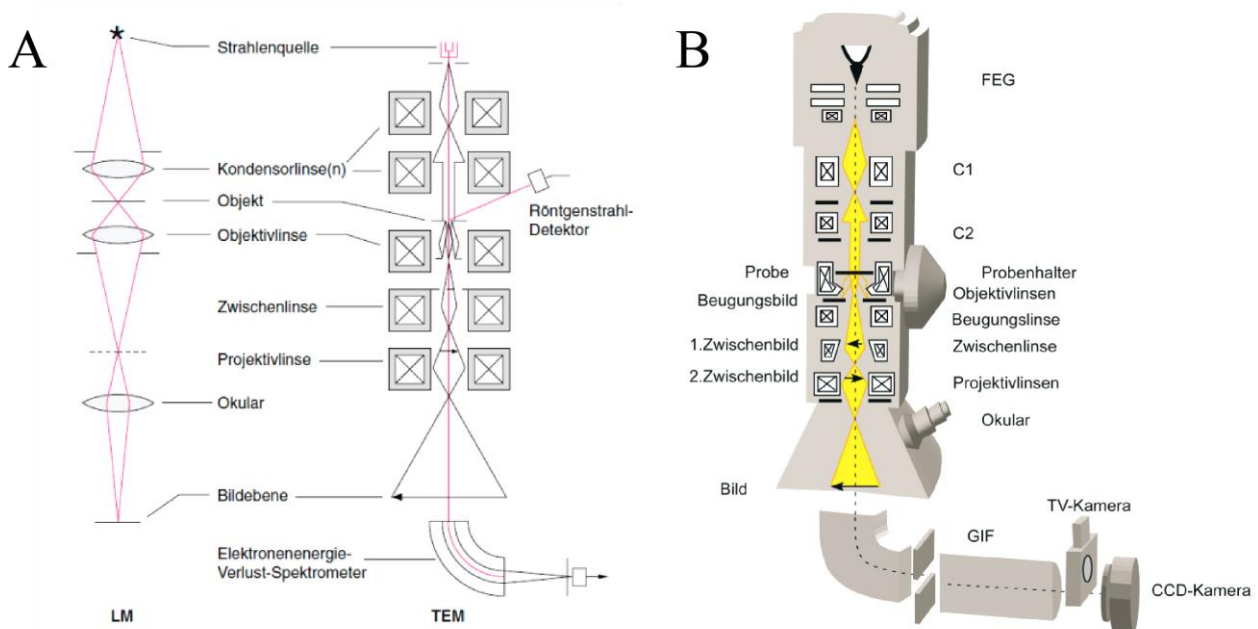


Abb. 12. **Elektronenmikroskopaufbau** (A: Abb. 20.2 aus ⁴⁷; B: Abb. 4.1 aus ⁵⁰). (A) Gegenüberstellung des schematischen Aufbaus eines Licht- (links) und eines Elektronenmikroskops (rechts). (B) Elektronenmikroskopaufbau mit Energiefilter und Kameras.

Moderne Elektronenmikroskope besitzen als Elektronenquelle meist eine sogenannte Feldemissionskathode (engl. *field emission gun* (FEG)), die einen kohärenten und hellen Elektronenstrahl erzeugt. Eine FEG besteht aus einer sehr feinen Spitze aus der man durch Anlegen einer Extraktionsspannung, Elektronen bewegt / extrahiert. Diese Elektronen, die den Elektronenstrahl bilden, werden an einer weiteren Anode mit einer hohen Spannung (z.B. 300 kV) beschleunigt und in das Linsensystem des Elektronenmikroskops geleitet ³. Um einen Elektronenstrahl zu manipulieren, verwendet man meist elektromagnetische Linsen. Eine elektromagnetische Linse besteht in der Regel aus einem weichen Eisenkern mit einer zentralen Bohrung, welche von elektrischen Spulen umgeben ist. Der Elektronenstrahl wird durch das Magnetfeld, welches die stromdurchflossenen Spulen erzeugen, abgelenkt. Die elektromagnetische Linse erwärmt sich durch die ständige Stromzufuhr, sodass diese mit einer Wasserkühlung ausgestattet ist ³. Das Kondensorlinsensystem besteht aus mindestens zwei Linsen (C1 und C2), was im wesentlichen den Durchmesser des initialen Elektronenstrahls bestimmt ³. Um eine möglichst optimale Beleuchtung über größere Objektbereiche zu erhalten, d.h. weder konvergierende noch

divergierende Strahlen, ist ein kohärenter (paralleler) Elektronenstrahl notwendig. Parallele Beleuchtung läßt sich entweder durch die sogenannte Köhlereinstellung⁵¹ oder durch eine weitere Kondensorlinse C3, welche zwischen der C2 Linse und der Probe positioniert ist, erreichen. Die Probe, montiert auf einem geeigneten Probenhalter kann mittels Mikromotoren im Elektronenmikroskop in x-, y- und z-Richtung bewegt werden. Die Probe befindet sich im Elektronenmikroskop inmitten der Objektivlinse. Durch die Probe stark gebeugte Elektronen können mithilfe der Objektivblende unterhalb der Probe ausgeblendet werden^{3,47,52}. Die Zwischenlinse bestimmt, ob auf dem Detektor das Bild der Probe (engl. *Image mode*) oder das Beugungsmuster (engl. *Diffraction mode* (DP)) abgebildet wird³. Mithilfe der Projektivlinse wird die Endvergrößerung eingestellt. Die Projektivlinse kann abhängig von der Mikroskopbauart auch aus mehreren elektromagnetischen Linsen bestehen. In einem Elektronenmikroskop können Vergrößerungen von unter 100-fach bis hin zu 10⁶-fach gewählt werden. Bei der Untersuchung von Makromolekülen und biologischen Proben genügen in der Regel Vergrößerungen bis zu 10⁵-fach⁴⁷. Mit einem im Strahlengang des Elektronenmikroskops nachfolgenden Energiefilter können Elektronen einer gewissen Energieverteilung selektiert werden, die dann auf den nachgeschalteten Detektor treffen. Beim Probendurchgang wird ein Teil der Elektronen inelastisch gestreut. Diese inelastisch gestreuten Elektronen können mithilfe des Energiefilters quasi herausgefiltert werden. Diese Selektion erhöht den Kontrast im aufgenommenen Bild^{3,47}. Die neuesten Kameras, wie die „Falcon“ von FEI oder die K2 von Gatan, können Elektronen direkt detektieren. Auf einem CMOS (engl. *complementary metal-oxide-semiconductor*)-Detektor wird beim Durchgang eines Elektrons die Spannungsänderung an einer Diode registriert und direkt ausgelesen. Der Detektor kann mehrmals pro Sekunde (40-100 mal) ausgelesen werden, sodass eine Serie von Bildern pro Belichtungszeit gespeichert werden kann. Je „dünner“ dieser Detektor ist, desto geringer ist die Gefahr, dass ein Elektron durch Rückstreuung zweimal registriert wird. Durch die direkte Registrierung der Elektronen ergibt sich zum einen eine höhere Sensitivität (gegenüber herkömmlichen CCDs (engl. *charge-coupled device*)) und zum anderen eine höhere Auflösung. Zusätzlich kann durch das schnelle Auslesen die Bilderserie auf eventuell auftretende Drift des Probenhalters oder der Probe (engl. *beam induced motion*) korrigiert werden.⁵³⁻⁵⁷

1.4.1.2 Auflösungsgrenze eines Elektronenmikroskops

Die Informationen, welche mit einem Mikroskop erhalten werden sind in Form der aufgenommenen bzw. betrachteten Bilder enthalten. Die maximale Auflösung, die aus einem Bild erhalten werden kann entspricht, der Größe von zwei Bildpixeln (Objektpixeln). Abhängig von der jeweiligen Fragestellung des Projekts sollte die gewählte Objektpixelgröße weniger als ein Drittel der gewünschten Auflösung betragen, um Interpolationsverluste gering zu halten. Die Objektpixelgröße wird durch die am Mikroskop eingestellte Vergrößerung bestimmt. Die Bildinformation kann nach Fouriertransformation als Summe von Sinus- und Exponentialtermen dargestellt werden. Terme mit einer Wellenlänge (λ), die kleiner als die doppelte Bildpixelgröße sind, beinhalten keine Information mehr, sodass die Anzahl der Terme beschränkt werden kann. Der Kehrwert dieser kleinstmöglichen Wellenlänge ($\lambda = 2$ Pixel) wird als Nyquist-Frequenz bezeichnet ^{47,58}.

In einem Mikroskop werden Objektpunkte wegen der Eigenschaften des optischen Systems (Linsen und Aperturen) als Beugungsscheibchen abgebildet ⁵⁹. So werden auch im Elektronenmikroskop scharfe Strukturmerkmale eines Objekts als Beugungsscheibchen in der hinteren Fokusebene abgebildet. Dieser Abbildungseffekt kann durch eine Punktverbreiterungsfunktion (engl. *point-spread function*, PSF) beschrieben werden. Zwei benachbarte Objekte werden als aufgelöst bezeichnet, wenn diese als getrennte Objekte wahrgenommen werden ⁵⁹. Für ein Elektronenmikroskop bestimmt sich die Auflösung (d) nach

$$(1) \quad d = \frac{0,61\lambda}{n \sin(\alpha/2)}$$

Nach Herrmann von Helmholtz (1821-1894) ergibt sich die Auflösung (d) eines Mikroskops durch die Wellenlänge des Lichts (λ), den Brechungsindex des Mediums (n) und den halben Öffnungswinkel (Aperturwinkel) der Objektivlinse ($\alpha/2$). Der Ausdruck $n \sin(\alpha/2)$ wird auch als numerische Apertur (NA) bezeichnet ⁴⁷. Die Wellenlänge (λ) eines Elektrons, welches mit 300 kV im Elektronenmikroskop beschleunigt worden ist, beträgt unter Berücksichtigung relativistischer Effekte 1,97 pm ^{3,4}. Die theoretische Auflösung für ein Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV kann mit der Wellenlänge ($\lambda = 1,97 \times 10^{-12}$ m) und der numerischen Apertur (NA $\sim 0,01$ ⁴⁷) aus Gleichung (1) berechnet werden.

$$(2) \quad d = \frac{0,61\lambda}{n \sin(\alpha/2)} = \frac{0,61\lambda}{NA} = \frac{0,61 \times 1,97 \cdot 10^{-12}m}{0,01} = 1,2 \cdot 10^{-10}m$$

Atomradien liegen in der Größenordnung von Ångström ($1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$). Daher kann mit einem Elektronenmikroskop bei der Analyse geeigneter Proben atomare Auflösung erzielt werden ⁴¹. Bei der Untersuchung von biologischen Proben ist die Auflösung hauptsächlich durch die Strahlenempfindlichkeit der Probe limitiert. Das Arbeiten mit gefrorenen biologischen Proben ermöglicht die Verwendung einer größeren Gesamtelektronendosis, da Strahlenschäden lokal in der Probe begrenzt bleiben ⁶⁰. Bei der Tomographie ist die maximal mögliche Auflösung zusätzlich abhängig von den Kippserienparametern, die in Abschnitt 1.4.1.8 detailliert beschrieben werden.

1.4.1.3 Abbildungsfehler

Abbildungsfehler oder Aberrationen sind Abweichungen von der idealen Abbildung durch ein „optisches“ System, hier ein Mikroskop ⁶¹.

Sphärische Aberration

Die sphärische Aberration beschreibt den Effekt, dass parallel einfallende Strahlen abhängig vom Abstand zum Linsenzentrum unterschiedlich stark gebeugt werden, was dazu führt, dass sich die Strahlen nicht mehr in einem Punkt treffen. Strahlen, welche die Linse weiter außen passieren, werden stärker gebeugt, sodass der Fokuspunkt dieser Strahlen vor dem eigentlichen Fokus zu liegen kommt. ³. Die bei sphärischer Aberration maximale Auflösung (d) kann durch den sphärischen Aberrationskoeffizienten (C_s) und die Wellenlänge (λ) beschrieben werden ⁶².

$$(3) \quad d = (C_s \lambda^3)^{\frac{1}{4}}$$

Astigmatismus

Bei Astigmatismus ist der abgebildete Elektronenstrahl nicht kreisrund, sondern elliptisch. Astigmatismus hat seine Ursache in asymmetrischen Linsen. Die durch die Asymmetrie hervorgerufene Bildverzerrung (V_z) kann durch den Aperturwinkel (α) und die Fokusdifferenz (Δf), beschrieben werden ^{3,47}.

$$(4) \quad V_z = \alpha \cdot \Delta f$$

Chromatische Aberration

Elektronen, welche auf die Probe treffen, besitzen idealerweise dieselbe Energie (bzw. Wellenlänge). Tatsächlich aber gibt es Abweichungen im Energiegehalt der Elektronen, welche durch Veränderungen der Elektronenquelle und / oder Schwankungen der Beschleunigungsspannung herrühren können. Elektronen mit geringerer Energie (längerer Wellenlänge) werden an elektromagnetischen Linsen stärker gebeugt, als Elektronen mit größerer Energie. Daher ergibt sich eine Aufweitung des Fokuspunkts. Dieser Abbildungsfehler wird als chromatische Aberration bezeichnet. Der Zerstreungskreisradius kann durch den chromatischen Aberrationskoeffizienten (C_C), den Aperturwinkel (α), die Ausgangsenergie (E_0) und die Energieänderung (ΔE) bestimmt werden ³.

$$(5) \quad r_{chr} = C_C \alpha \frac{\Delta E}{E_0}$$

1.4.1.4 Beeinflussung des Elektronenstrahls durch die Probe

Der auf der Probe auftreffende Elektronenstrahl kann mit den positiv geladenen Atomkernen und den negativ geladenen Elektronen der Atomhüllen der Probe wechselwirken.

Elastische Streuung

Wechselwirkt ein Strahlelektron mit der positiven Ladung eines Atomkerns der Probe, so wird das Strahlelektron abgelenkt ($\sim 0,1$ rad) und die Flugbahn des Strahlelektrons verändert. Je größer die positive Ladung des wechselwirkenden Probenatoms ist, desto größer ist die Änderung der Flugbahn des Strahlelektrons. Dieser Effekt wird bei der negativ Kontrastierung von Probenmolekülen mit Schwermetallen (z.B. Uranylacetat) ausgenützt. Auch die Geschwindigkeit des Strahlelektrons beeinflusst dessen Ablenkung. Je langsamer sich ein Strahlelektron bewegt, desto größer ist die Ablenkung ⁴⁷. Je höher die Beschleunigungsspannung (U), desto größer ist die Geschwindigkeit (v) des Strahlelektrons. Bei geringen Ablenkungen des Strahlelektrons erfährt

dieses einen zu vernachlässigenden Energieverlust, daher wird dieser Vorgang als „elastische Streuung“ bezeichnet ⁴⁷.

Inelastische Streuung

Ein Strahlelektron kann auch direkt mit den Elektronen der Probenatome wechselwirken. Dabei wird das Strahlelektron jedoch weitaus geringer abgelenkt ($\sim 10^{-5}$ rad), als bei der elastischen Streuung. Das Strahlelektron kann beim Auftreffen auf die Elektronenhülle eines Probenatoms auch Energie auf ein Probenelektron übertragen. Dadurch verringert sich die kinetische Energie des Strahlelektrons („inelastische Streuung“). Je dicker und je dichter eine Probe ist, desto größer ist der Anteil an inelastisch gestreuten Elektronen. Ein vor dem Detektor angebrachter Energiefilter erlaubt die Selektion von Elektronen in einem definierten Energiebereich, sodass ein Teil der inelastisch gestreuten Elektronen abgeschnitten wird und auf dem Detektor ein Bild mit größerem Kontrast aufgenommen werden kann ⁴⁷. Die Übertragung von Energie auf die Probe kann durch Ionisierung der Probe zu Strahlenschäden führen. Dies begrenzt die Strahlendosis, welche auf die Probe appliziert werden kann. Für leichte Atome (z.B. biologische Proben) sind die meisten Streuungsereignisse inelastisch. Dabei liegt das Verhältnis von inelastischer zur elastischen Streuung bei ca. drei zu eins ⁶³.

1.4.1.5 Kontrastentstehung im Elektronenmikroskop

Der Kontrast (K) beschreibt allgemein den Intensitätsunterschied (ΔI) zweier benachbarter Bereiche ³, z.B. zweier benachbarter Pixel in einem Bild.

$$(6) \quad K = \frac{(I_2 - I_1)}{I_1} = \frac{\Delta I}{I_1}$$

Der Bildkontrast im Transmissionselektronenmikroskop entsteht durch die Wechselwirkung der einfallenden Elektronen mit der Probe ³. Um diese Wechselwirkung zu charakterisieren kann sowohl die Teilchen- als auch die Wellenbeschreibung (Welle-Teilchen-Dualismus-Theorie von de Broglie) verwendet werden. Passiert der Elektronenstrahl die Probe, so kann sich dessen Amplitude und Phase ändern. In der EM werden Amplituden- und Phasenkontrast unterschieden.

Amplitudenkontrast

Der Amplitudenkontrast entsteht, wenn Elektronen durch Streuung derart abgelenkt werden, dass sie nicht mehr auf dem Detektor auftreffen und nicht mehr zum Signal beitragen, welches dadurch schwächer ausfällt. Je dicker eine Probe ist, desto mehr Probenatome sind vorhanden und desto wahrscheinlicher ist es, dass Elektronen gestreut werden. Stark gestreute Elektronen werden meistens von der Objektivapertur ausgeblendet. Diese Kontrastentstehung wird auch als Streukontrast (scattering contrast) bezeichnet^{4,52}.

Phasenkontrast

Jede Richtungsänderung eines Strahlelektrons ändert die Phase. Phasenkontrast entsteht durch Interferenz zweier Elektronenstrahlen mit unterschiedlichen Phasen, z.B. durch die Interferenz eines ungebeugten Elektronenstrahls und eines gebeugten Elektronenstrahls. Biologische Proben (z.B. *E. coli*-Zellen) bestehen hauptsächlich aus Atomen mit niedriger Ordnungszahl, wie Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Sauerstoff (O) und Phosphor (P). Dünne biologische Proben werden als schwache Phasenobjekte betrachtet. Für schwache Phasenobjekte gilt, dass sich die Amplitude nicht ändert, sondern nur die Phase. Phasenunterschiede können mit dem Auge, der Kamera und dem Photomaterial nicht wahrgenommen werden. Der Phasenkontrast ist abhängig vom gewählten Defokus und wird mit der Kontrastübertragungsfunktion (engl. *contrast transfer function*, CTF) beschrieben. Die CTF bildet Objektstrukturen mit unterschiedlichen Kontrastverhältnissen ab. Die CTF oszilliert und kann sowohl positive, wie auch negative Werte annehmen oder null sein (Abb. 13).^{3,47,58}

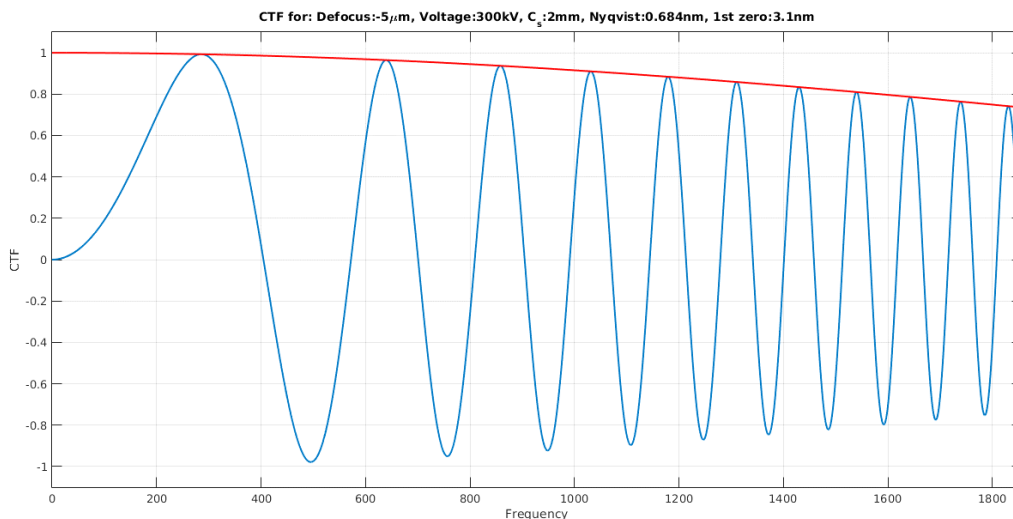


Abb. 13. CTF. Gezeigt ist die mit dem Matlab Skript „tom_ctf.m“ simulierte CTF für einen Defokuswert von $-5\ \mu\text{m}$, einer Pixelgröße von $0,342\ \text{nm/px}$, einer Bildgröße von $3712\ \text{px}$. Die erste Nullstelle befindet sich bei $3,1\ \text{nm}$ und beschreibt die Auflösungsgrenze ohne CTF-Korrektur.

1.4.1.6 Vorbereitung von Kryoproben

Proben für CET sind häufig biologische Objekte (z.B. *E. coli*-Zellen, Zelldicke $\sim 1,3\ \mu\text{m}$), die meist in wässriger Umgebung vorliegen und damit anfällig für Strahlungsschäden sind. Das Schockgefrieren dieser Proben erhält den nativen Zustand der Probe ⁴⁷, reduziert die Strahlungsempfindlichkeit der Probe und ermöglicht gleichzeitig die Aufrechterhaltung des Hochvakuums im Elektronenmikroskop ^{64,65}. Bis zu einer Objektstärke von $\sim 5\ \mu\text{m}$ kann die Probe direkt Schockgefroren werden. Dickere Proben kühlen beim Schockgefrieren langsamer ab als dünne Proben und es kann zur Ausbildung von Eiskristallen kommen. Die Entstehung von Eiskristallen kann die native Struktur der Probe zerstören und zu starker anisotroper Elektronenstreuung am Kristallgitter führen ^{42,66}. Um dennoch bei dickeren Proben amorphes Eis zu erhalten, kann auf die Technik des Hochdruckgefrierens (engl. *high pressure freezing*) zurückgegriffen werden ⁴⁷.

1.4.1.7 Ausdünnen der Proben für die CET-Untersuchung

In der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können Proben bis ca. 500 nm Dicke direkt untersucht werden. Massivere Proben müssen somit erst auf eine für die TEM geeignete Dicke gebracht werden. Eine Möglichkeit ist das Anfertigen von Kryoschnitten mit einem Kryomikrotom. Dabei wird die Probe mit einer Diamantklinge in sehr feine Scheiben geschnitten, deren Dicke im Bereich von 30-100 nm liegt⁴⁷. In Schnittrichtung wird dabei die Probe komprimiert (bis zu 30 %), was bei der Rekonstruktion von einzelnen Partikeln der Probe ebenfalls komprimierte Strukturen ergeben kann. Mit einem Korrekturfaktor kann die Kompression in Schnittrichtung angepasst werden, sodass ein realitätsnahes Abbild der Probe erzielt wird^{67,68}.

Eine kürzlich entwickelte Methode, um größere Proben für die TEM zugänglich zu machen, ist die Ionenätzung (engl. *focused ion beam micromachining*, FIB). Bei der Ionenätzung wird meist ein fokussierter Galliumionenstrahl verwendet, um Probenmaterial zu entfernen und so eine für die TEM geeignete Probendicke (< 500 nm) zu erhalten (Abb. 14).

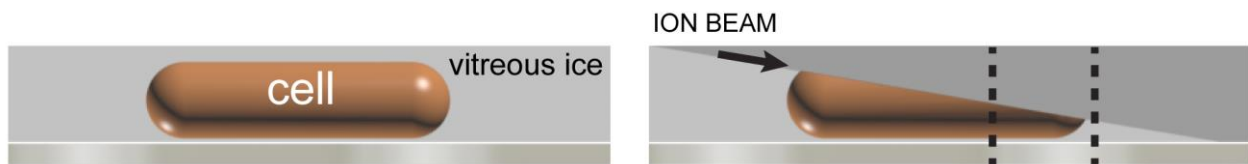


Abb. 14. **Ionenätzung.** Links: in amorphem Eis eingebettete *E. coli*-Zelle. Rechts: Mit Galliumionenstrahl geschnittene *E. coli*-Zelle. Im Bereich zwischen den beiden gestrichelten Linien ist die geschnittene Zelle dünn genug für die CET-Untersuchung

Bei der Ionenätzung kommt es im Gegensatz zum mechanischen Schneiden zu keiner Kompression der Probe, was einen erheblichen Vorteil dieser Methode darstellt. Für die Ionenätzung werden die Proben, wie für die Kryo-EM schockgefroren. Dabei sollte die initiale Probendicke 10 µm nicht überschreiten, da der Materialabtrag sonst zu lange dauern würde und es zu Strahlenschäden kommen kann. Die Ionenätzung wird in einem Rasterelektronenmikroskop (REM) durchgeführt⁴⁷. Das eingesetzte REM besitzt neben der senkrecht in der Mitte angebrachten Elektronenquelle eine seitlich geneigte Ionenquelle.

1.4.1.8 Kryoelektronentomographie

Ziel einer Tomographie ist eine dreidimensionale (3D) Rekonstruktion des im Elektronenmikroskop untersuchten Objekts. Zunächst gilt es bei niedriger Vergrößerung und geringer Dosis eine geeignete Probenstelle zu finden. Eine *E. coli*-Zelle, welche im Bereich des präparierten Keils teilweise über einem Loch im Kohlefilm des *grids* liegt, ist eine geeignete Probe. Voraussetzung zum Auffinden einer geeigneten Probenstelle bei niedriger Vergrößerung und geringer Dosis ist ein kontrastreiches Abbild der Probe. Für die 3D Rekonstruktion ist es notwendig, dass zu untersuchende Objekt in möglichst vielen räumlichen Orientierungen zu betrachten. Hierzu wird bei der Elektronentomographie das Objekt in Schritten (meist $1,5^\circ$ - 4° Inkrementen) um die Längsachse des Probenhalters gekippt (gängiger Kippwinkelbereich bis $\pm 70^\circ$) und Bilder aufgenommen^{47,69,70}. Kippwinkel über 70° werden in der Regel nicht verwendet, da zum einen die Objektdicke zunimmt und zum anderen der Halter bzw. Bereiche des *grids* ins Bild gelangen können. Der eingeschränkte Kippwinkelbereich (120° statt 180°) bedingt, dass nicht für alle Orientierungen der Probe Informationen in Form von Bildern (2D-Projektionen) vorliegen. Aus den aufgenommenen 2D-Projektionen kann durch Rekonstruktion ein 3D-Abbild (Tomogramm) der Probe erzeugt werden⁴⁷.

Parameter einer Kippserie

Bevor mit der Aufnahme einer Kippserie begonnen werden kann, müssen einige grundlegende Parameter, wie beispielsweise Vergrößerung, Defokus, Belichtungszeit und Kippwinkelinkrement abhängig von der zu untersuchenden Probe festgelegt werden. Die gewählte Vergrößerung bestimmt zum einen das Bildfeld und zum anderen die Pixelgröße, welche die maximal mögliche Auflösung festlegt⁷¹. Bei der Untersuchung von 70S Ribosomen sollen Domänen und assoziierte Faktoren erkannt werden. Die dazu benötigte Auflösung beträgt ca. 1 nm. Je kleiner die gewählte Pixelgröße ist, desto größer ist die Vergrößerung und dementsprechend kleiner das Blickfeld auf das Objekt. Bei der Untersuchung von ganzen Zellen ist es wünschenswert, einen möglichst großen Teil der Zelle im Tomogramm abzubilden, was gegen die Wahl einer sehr kleinen Pixelgröße spricht. Die Vergrößerung sollte demnach anhand der Fragestellung und der gewünschten Aussage unter Berücksichtigung der beschriebenen Gesichtspunkte gewählt werden.

Um auf den Bildern Strukturmerkmale der Probe erkennen zu können ist neben dem Kontrast auch das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal to noise ratio*, SNR) entscheidend ⁷⁰. Je größer die Elektronendosis ist, welche auf die Probe appliziert wird, desto größer ist das SNR ⁷². Das Rauschen beinhaltet alle Beiträge, die nicht von der untersuchten Probe stammen, wie z.B. das statistische Rauschen der Elektronenquelle ⁴⁷. Um die Elektronendosis zu kontrollieren, wurde bei konstant bleibender Elektronenstrahlstärke und Strahlöffnung lediglich die Belichtungszeit verändert. Dabei sollte die gewählte Belichtungszeit für das Bild bei 0° im Bereich von einer Sekunde liegen. Allgemein kann festgehalten werden, dass die Belichtungszeit möglichst kurz gewählt werden sollte. Aufgrund der zunehmenden Probendicken bei höheren Kippwinkeln sollte die Belichtungszeit abhängig vom Kippwinkel und damit der Probendicke erhöht werden, um ein ähnliches SNR in allen Bildern einer Kippserie zu erhalten ⁷³.

Als Richtwert pro Probenstelle gilt eine Gesamtdosis von $100 \text{ e}^- \text{ \AA}^{-2}$ ⁷⁰. Das Kippwinkelinkrement ($\Delta\beta$) und der Kippwinkelbereich (β_{\max}) bestimmen die Anzahl an Bildern (N_B), die pro Kippserie aufgenommen werden. Für ein konstantes Kippwinkelinkrement berechnet sich die Anzahl an Bildern wie folgt: ⁷³

$$(7) \quad N_B = \left(2 \frac{\beta_{\max}}{\Delta\beta} + 1\right)$$

Um die Bilder einer Kippserie alignieren zu können müssen Strukturmerkmale der Probe auf den Bildern zu erkennen sein. Dazu wird eine minimale Elektronendosis pro Bild benötigt. Bei Berücksichtigung der Gesamtelektronendosis kann daher das Kippwinkelinkrement nicht beliebig klein gewählt werden. Um eine Alignierung der Bilder selbst bei niedrigen Dosen zu ermöglichen, werden zur Probe Goldkugeln gegeben, die einen starken Kontrast ergeben und als Referenzpunkte bei der Alignierung verwendet werden ⁴⁷. Anhand des Kippwinkelinkrements ($\Delta\gamma$, in Rad) und dem Probendurchmesser (D) kann die Auflösung (d) der Rekonstruktion nach dem Crowther-Kriterium abgeschätzt werden ⁷³.

$$(8) \quad d = D \times \Delta\gamma$$

Für die Auflösung einer rekonstruierten Kippserie mit einem Kippwinkelinkrement von 2° einer Probe mit 350 nm Durchmesser ergibt sich nach Crowther eine Auflösung von 12 nm (Gleichung (9)).

$$(9) \quad d = D \times \Delta\gamma = D \times \Delta\beta \times \frac{\pi}{180} = 350nm \times 2 \times \frac{\pi}{180} = 12nm$$

Das Crowther-Kriterium (Abb. 15) gilt für eine ideale Kippserie eines sphärischen Objekts mit einem Kippwinkelbereich von 90° ⁷¹. Praktisch sind keine Aufnahmen bei hohen Kippwinkeln möglich. In der Praxis wird ein Bereich von $\pm 60^\circ$ verwendet. Die begrenzte Abtastung der Probe hat zur Folge, dass für bestimmte Bereiche der Rekonstruktion keine Information vorliegt. Dieser als „fehlender Keileffekt“ (engl. *Missing Wedge Effect*) bezeichnete Umstand führt zu einer Elongation rekonstruierter Objekte entlang der z-Achse im Realraum⁷⁰.

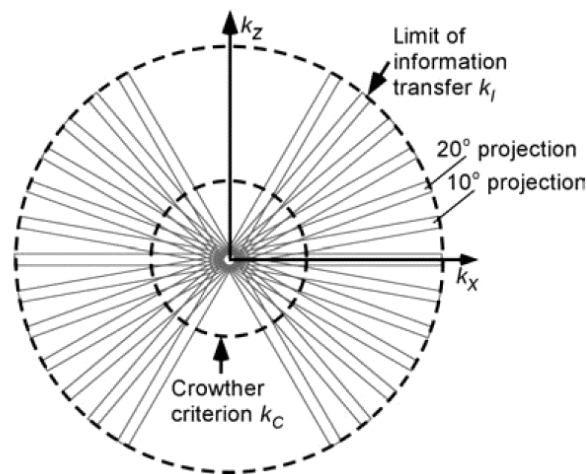


Abb. 15. **Crowther-Kriterium** (Abb. 3 aus⁷⁴). Gezeigt ist die Datenabtastung im Fourierraum. Die Projektion eines Objekts mit der Dicke d , entspricht im Fourierraum einem zentralen Schnitt mit der Dicke $1/d$. Daher ist die 3D Information der Probe außerhalb des *Missing Wedge* homogen bis zur Frequenz k_C , dem Crowther-Kriterium, verteilt.

Doppelkippachsenteomographie

Die Limitierung der Probenabtastung einer Einachsenkippserie resultiert in einem fehlenden Bereich der Rekonstruktion, der im Fourierraum die Form eines Keils besitzt (engl. *Missing Wedge*). Der aufgenommene Bereich der Probe kann erhöht werden, indem die Probe um 90° gedreht wird und eine zweite Kippserie derselben Probe aufgenommen wird. Dabei werden auch Probenbereiche aufgenommen, die in der ersten Kippserie nicht betrachtet wurden. Die Rekonstruktion der zweiten Kippserie besitzt analog zur Rekonstruktion der ersten Kippserie auch einen fehlenden keilförmigen Bereich, der 90° zum Keil der ersten Kippserie liegt (Abb. 16). Die

Kombination der Rekonstruktionen beider Kippserien verringert den fehlenden Bereich in der kombinierten Rekonstruktion, der nun die Form eines Kegels besitzt (engl. *Missing Cone*). Bei der Aufnahme zweier um 90° zueinander gedrehter Kippserien spricht man von Doppelkippachsentomographie (engl. *Dual-axis tilt tomography*).^{71,74-76}

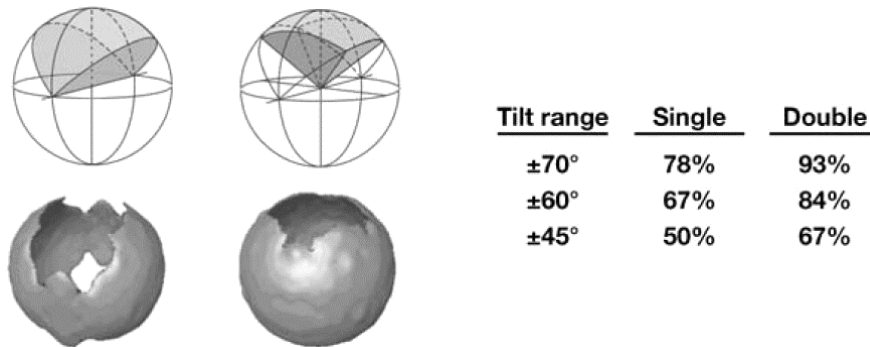


Abb. 16. **Einfach- und Doppelkippachsentomographie** (Abb. 4 aus⁷⁴) Die oberen beiden Darstellungen zeigen schematisch die Sektoren im Fourier Raum, die wegen des begrenzten Kippbereichs nicht abgetastet werden können. Bei einer Kippung um nur eine Achse besitzt der unabgetastete Bereich die Form eines Keils, bei Kippung um zwei Achsen besitzt er die Form eines Kegels. Die Tabelle (rechts) zeigt für verschiedene Kipp-schemata den prozentualen Anteil im Fourier Raum, welcher abgetastet werden kann. Die unteren beiden Darstellungen zeigen die abgetastete Information im Realraum.

Auch bei der Doppelkippachsentomographie darf die Gesamtdosis von $100 \text{ e}^- \text{ \AA}^{-2}$ nicht überschritten werden⁷⁰. Pro Kippserie steht dann nur eine Dosis von $50 \text{ e}^- \text{ \AA}^{-2}$ zu Verfügung. Damit ist das SNR in den einzelnen 2D Projektionen so niedrig, daß sowohl die Aufnahme als auch das Nachprozessieren erschwert ist. Erst die Entwicklung der Direktelektronendetektoren (engl. *direct electron detector*, DED) ermöglicht die Aufnahme zweier gleichwertiger Kippserien, verglichen mit herkömmlichen CCDs. Dies liegt am verbesserten Quantenwirkungsgrad (engl. *detective quantum efficiency*, DQE) dieser Kameras im Vergleich zu herkömmlichen CCD Kameras. Die DQE beschreibt die Signalkonvertierungsrate, welche aus dem quadrierten Verhältnis aus SNR des Ausgabesignals zum SNR des Eingangssignals berechnet wird. Je näher die DQE an eins ist, desto besser ist die Kamera³. Bei einer CCD Kamera erzeugt das auf die Kamera auftreffende Elektron zunächst ein optisches Signal, welches durch den Einsatz eines Szintillators erreicht wird. Schließlich wird das optische Signal in ein elektrisches Signal umgewandelt⁷⁷. Eine DED Kamera wandelt das auf die Kamera auftreffende Elektron direkt in ein elektrisches Signal um⁵³. DEDs, wie die Gatan K2 erlauben die Aufnahme einer ganzen Bilderserie (3840 px x 3712 px) mit kurzer Belichtungszeit pro Kippwinkel^{53,78}. Diese Bilderserie ersetzt die Aufnahme eines einzigen Bildes

mit langer Belichtungszeit, welche der Summe der Belichtungszeiten der Bilder einer Serie entsprechen würde (Abb. 17). Vorteil der aufgenommenen Bilderserie ist, dass die Einzelbilder der Serie zueinander aligniert werden können und so eventuell auftretende Drift des Probenhalters im Elektronenmikroskop korrigiert werden kann ⁷⁹. Für die Gatan K2 Kamera wurde die optimale Elektronendosis von $8\text{-}10\text{ e}^-/\text{px}^{-1}\text{s}^{-1}$ eingestellt ⁸⁰.

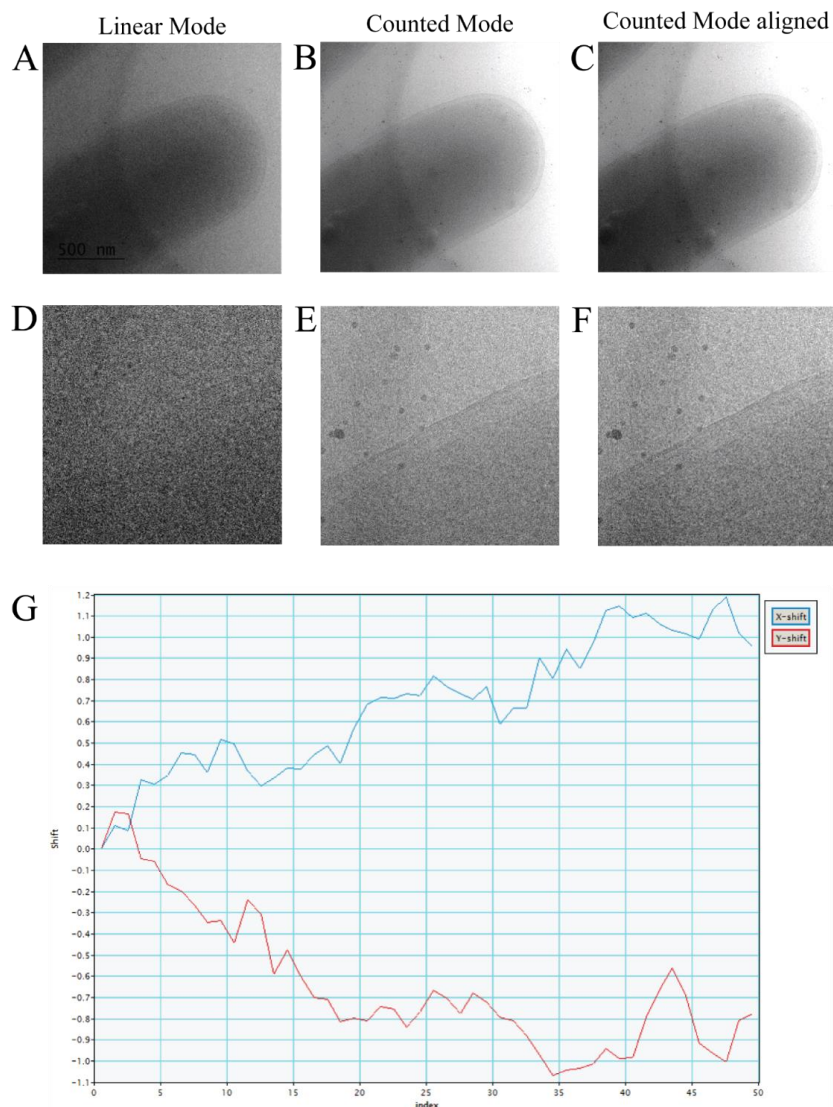


Abb. 17. **Alignierung einer Bilderserie.** (A-F) Gezeigt sind Bilder einer BL21 *E. coli*-Zelle, die mit 11.724-facher Vergrößerung, einer Pixelgröße von $0,426\text{ nm}$, einem Defokus von $-9\text{ }\mu\text{m}$, einer Dosis von $\sim 36\text{ e}^-/\text{\AA}^2$ auf einer Gatan K2 Summit Kamera im „Linear Mode“ (A,D) bzw. im „Counted Mode“ (B,E) mit einer Gesamtbelichtungszeit von 2 s aufgenommen wurden. Der „Linear Mode“ nimmt ein Bild mit der gewählten Belichtungszeit von 1250 n 2 s auf. Der „Counted Mode“ hingegen nimmt eine Bilderserie (50 Bilder) mit der eingestellten Gesamtbelichtungszeit von 2 s auf. (C,F) Abgebildet ist die alignierte Bilderserie. (D-F) Gezeigt wird der gleiche und vergrößerte Ausschnitt der aufgenommenen BL21 *E. coli*-Zelle, um den Effekt der Alignierung der Bilderserie zu verdeutlichen. (G) Dargestellt sind die Verschiebungen der Einzelbilder der Bilderserie in X- (blau) und Y-Richtung (rot).

1.5 Datenprozessierung

Die Datenprozessierung gliedert sich in die folgenden Schritte: Alignierung der Bilderserien, Rekonstruktion der Kippserien, Kombination der Kippserien der Zweiachsenkipfung, Lokalisation der Zielobjekte in den Tomogrammen, Rekonstruktion der Untervolumen mit den ausgewählten Zielobjekten, wiederholte Alignierung und Klassifizierung der Untervolumen mit den Zielobjekten mit schrittweise angepasster Partikelliste. Als Zielobjekte wurde das 70S Ribosom sowie GroEL ausgewählt.

1.5.1 Alignierung einer Bilderserie

Mit zunehmendem Kippwinkel des Probenhalters nimmt die vom Elektronenstrahl zu durchdringende Strecke durch die Probe zu. Um in einer Kippserie Bilder mit möglichst gleichbleibender Qualität zu erhalten, werden daher die Belichtungszeiten in Abhängigkeit zum Kippwinkel erhöht. Aus der Fotografie ist bekannt, dass bei Aufnahmen mit langer Belichtungszeit (z.B. Nachtaufnahmen), die Kamera ruhig gehalten werden muss, da ansonsten ein unscharfes Bild aufgenommen wird ⁸¹. Analog verhält es sich bei der EM, nur dass hier meist der Probenhalter mit der Probe driftet. Die Aufnahme einer Bilderserie mit kurzen Belichtungszeiten der Einzelbilder anstelle nur eines Bildes mit langer Belichtungszeit bietet den Vorteil, dass eventuell auftretende Drift korrigiert werden kann ⁸⁰. Hierzu werden die Einzelbilder durch die Berechnung von Kreuzkorrelationskoeffizienten zueinander aligniert und das resultierende optimierte Bild abgespeichert ⁸².

1.5.2 CTF Korrektur

Die Bilder sind die Projektionen des elektrostatischen Potentials des untersuchten Objekts gefaltet mit der CTF. Die CTF selbst ist eine vom Fokus abhängige oszillierende Funktion, die sowohl positive als auch negative Werte annehmen kann. Strukturdetails von untersuchten Objekten werden abhängig vom Vorzeichen der CTF mit invertiertem Kontrast abgebildet. Bereiche mit invertiertem Kontrast können durch Multiplikation mit „-1“ korrigiert werden. Ist die CTF Null, so wird keine Information übertragen und es entstehen Informationslücken. Die Lage der Nullstellen

der CTF ist abhängig vom gewählten Fokus, sodass durch die Kombination von Datensätzen mit unterschiedlichen Fokuswerten diese Informationslücken aufgefüllt werden können. ^{47,70}

1.5.3 Alignierung der Kippserien

Vor dem Schockgefrieren der Probe werden Goldkügelchen mit definiertem Durchmesser mit auf das *grid* gegeben. Die Goldkügelchen können vor der Probe auf das *grid* gegeben werden oder zusammen mit der Probe. Die Goldkügelchen sind auf den Einzelbildern einer Kippserie gut zu erkennen und werden zur Alignierung der Kippserie verwendet. Daher werden die Goldkügelchen auch als Goldmarker bezeichnet. Per Hand oder in einem semiautomatisierten Verfahren, welches abhängig von der verwendeten Software ist (Imod ⁸³, TOM ⁸⁴), können die Goldmarker identifiziert werden. Bei der Rekonstruktion von Kippserien einer Doppelachskippung werden die Goldmarker zunächst für jede Kippserie individuell identifiziert. Es empfiehlt sich jedoch für den gleichen Goldmarker in den beiden Kippserien die gleiche Markernummer zu vergeben, was eine spätere Zuordnung erleichtert. Auf Grundlage der gewählten Goldmarker werden die Bilder (2D Projektionen) einer Kippserie aligniert.

1.5.4 Rekonstruktion der Kippserien

Die optimierten und alignierten 2D Projektionen einer Kippserie werden rückprojiziert, sodass aus der Kombination aller 2D Projektionen eine 3D Struktur des untersuchten Objekts entsteht. Dabei wird häufig die Methode der gewichteten Rückprojektion verwendet. Bei der Rückprojektion werden die 2D Projektionen „ausgewischt“, um die Rückprojektionskörper zu bilden. Um das Objekt zu rekonstruieren, werden die Rückprojektionskörper summiert. Eine einzige Rückprojektion berechnet nur eine Näherung des zu rekonstruierenden Objekts. Die Qualität der Rückprojektion nimmt mit steigender Anzahl an 2D Projektionen zu. Die Rückprojektion kann als Faltung des originalen Objekts mit der PSF beschrieben werden. Um eine wirklichkeitsgetreue Rekonstruktion zu erhalten, wird die rückprojizierte Dichte korrigiert. Dazu wird eine Funktion verwendet, die invers zur PSF ist. Bei der gewichteten Rückprojektion wird die Fouriertransformierte der rückprojizierten Dichte durch die Transferfunktion dividiert. Für den Spezialfall einer Einachsenkippserie mit konstantem Kippwinkelinkrement wird die Fouriertransformierte der

Rückprojektionen mit der Gewichtungsfunktion multipliziert. Die Gewichtungsfunktion beschreibt den Radius des Fourierraumes senkrecht zur Kippachse.⁷¹

Für eine initiale Rekonstruktion werden die Daten zunächst komprimiert rekonstruiert. Hierzu werden benachbarte Pixel summiert. Wenn die Größe der 2D Projektionen halbiert wird, beispielsweise von 3712 px x 3712 px auf 1856 px x 1856 px, spricht man von einem „binning“ mit dem Faktor 1, wobei sich die Pixelgröße im Vergleich zu den Ausgangsprojektionen verdoppelt. Die Rekonstruktion eines „gebinnten“ Datensatzes nimmt weniger Speicherressourcen in Anspruch, was die Rechenzeit verkürzt und die benötigte Rechenleistung verringert. In dem gebinnten Tomogramm kann bereits nach Zielmolekülen und Strukturen gesucht werden (1.5.6), die dann zur weiteren Analyse mit niedrigerem „binning“ bzw. „ungebinnt“ in einem kleineren Volumen rekonstruiert werden⁸⁵.

1.5.5 Kombination der Kippserien einer Doppelachsenkipfung

Die Doppelkippachsantomographie erhöht die Information, die über das untersuchte Objekt vorliegt. Besonders bei der Untersuchung von Filamenten und Membranen, die teilweise im unabgetasteten Bereich einer Einachsenkippsreihe liegen, bietet diese Technik Vorteile⁸⁶. Um die beiden Kippserien zu kombinieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Zum einen kann eine einzige gewichtete Rückprojektion mit den 2D Projektionen beider orthogonaler Kippserien durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, zunächst beide Kippserien getrennt voneinander zu rekonstruieren und anschließend beide Tomogramme zu kombinieren. Beim direkten Vergleich dieser beiden Methoden hat sich gezeigt, dass die getrennte Rekonstruktion und anschließende Kombination der Tomogramme zu einem besseren Ergebnis führt⁷⁶.

1.5.6 Lokalisation der Zielobjekte in den Tomogrammen

Nachdem die 3D Rekonstruktionen der untersuchten Objekte vorliegen, gilt es diese zu analysieren. Wegen der limitierten Auflösung in Tomogrammen wird der Fokus der Tomogrammanalyse zunächst auf Makromoleküle, wie beispielsweise Ribosomen⁸⁷, Proteasomen⁴⁴ oder die GroEL-Chaperone gelegt, die aufgrund ihrer Größe identifizierbar sind. Mit einem kreuzkorrelations-

basiertem Mustererkennungsalgorithmus und einer Referenzstruktur können Makromoleküle ab ~500 kDa in den Tomogrammen lokalisiert werden ⁸⁸. Der verwendete Mustererkennungsalgorithmus berechnet die Ähnlichkeit zwischen der Referenzstruktur und Subvolumina des Tomogramms. Die Referenzstruktur wird voxelweise durch das 3D Tomogramm verschoben und Kreuzkorrelationskoeffizienten im Fourierraum berechnet. Ein Voxel ist ein 3D Bildpunkt in einem 3D Bild ⁸⁹. Nun wird das erhaltene Korrelationsvolumen normiert, indem das Korrelationsvolumen voxelweise durch die lokale Standardabweichung der Grauwerte in der Umgebung mit definiertem Radius dividiert wird. Die im Tomogramm zu lokalisierenden Makromoleküle sind beliebig orientiert, sodass die Kreuzkorrelationsberechnung mehrmals mit verschiedenen Orientierungen der Referenzstruktur durchgeführt wird. Am Ende wird der größte Kreuzkorrelationswert, d.h. die beste Übereinstimmung von Referenz und Subvolumen, dem jeweiligen Voxel des Korrelationsvolumens zugeordnet. Der verwendete Mustererkennungsalgorithmus berücksichtigt auch den *Missing Wedge*-Effekt, welcher zu der typischen Verzerrung des rekonstruierten Volumens in Elektronenstrahlrichtung führt. Um die Rechenzeiten zu reduzieren, können die Kreuzkorrelationsberechnungen für die Subvolumina parallelisiert berechnet werden. ⁷⁰

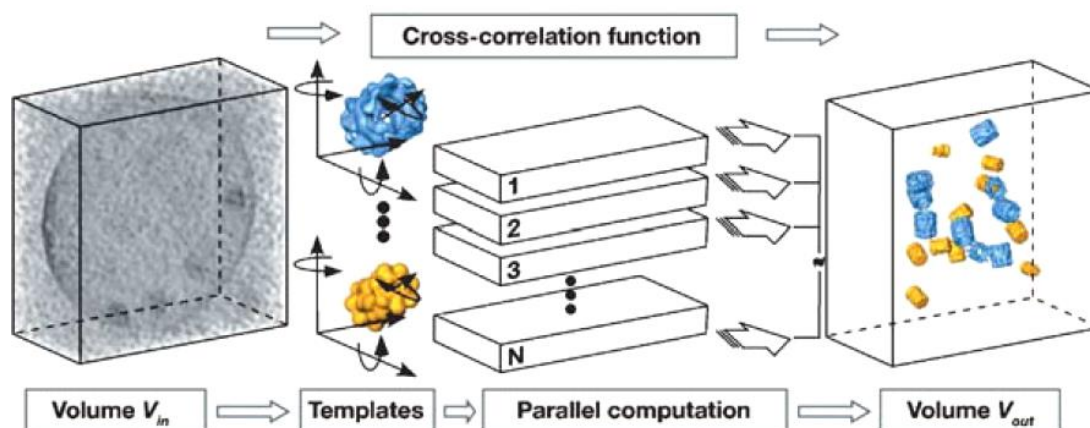


Abb. 18. **Mustererkennung** (Abb. 6 aus ⁷⁴). Makromoleküle können anhand ihrer Referenzstruktur mithilfe eines kreuzkorrelationsbasierten Mustererkennungsalgorithmus in den rekonstruierten 3D Volumina identifiziert werden. Die Referenzstruktur stammt oft von Röntgenbeugungsanalysen oder Kernspinresonanzuntersuchungen der Makromoleküle. Eine Parallelisierung der computerbasierten Berechnung verkürzt die Rechenzeit. Als Ergebnis der Mustererkennung werden die Positionen und Orientierungen möglicher Zielmoleküle im 3D Volumen erhalten.

1.5.7 Rekonstruktion der Untervolumen mit den ausgewählten Zielobjekten

Mit den Tomogrammpositionen als Zentrum, an denen ein Zielmolekül lokalisiert wurde, wird ein kubisches Untervolumen (engl. *subvolume*) „ungebinnt“ oder mit niedrigem „binning“ rekonstruiert. Dabei wird die Größe des kubischen Untervolumens so gewählt, dass die Zielstruktur und deren nächste Umgebung im Untervolumen enthalten sind. Die Rekonstruktion einzelner „ungebinnter“ Untervolumen benötigt weitaus weniger Rechenleistung und Ressourcen als die Rekonstruktion des gesamten „ungebinnten“ Tomogramms. Daher bewirkt die Rekonstruktion der Untervolumen eine Zeitersparnis oder ermöglicht erst die Betrachtung der „ungebinnten“ Daten.⁸⁷

1.5.8 Alignierung der Untervolumen

Da die Zielmoleküle bzw. Zielstrukturen in den Tomogrammen beliebig orientiert sind müssen diese zunächst aligniert werden, bevor sie miteinander verglichen werden können. Für die Alignierung werden die Zielmoleküle zunächst gleich orientiert. Dann wird die Translation bestimmt, um die Zielmoleküle zu überlagern. Die Untervolumen mit den alignierten Zielmolekülen werden dann überlagert, sodass man eine gemittelte Dichte des Zielmoleküls erhält. Diese gemittelte Dichte besitzt ein größeres SNR als die einzelnen Untervolumen, was auch eine höhere Auflösung bedingt⁹⁰. Die Verwendung einer Referenz kann zu einem gewissen Teil die gemittelte Dichte beeinflussen. Um den Einfluss der Referenz, zu umgehen wurde eine referenzfreie Alignierung entwickelt⁵⁸. Anstelle der Referenz wird eine gemittelte Dichte aus nicht alignierten Untervolumen verwendet⁹¹. Existiert von einem Zielmolekül keine Struktur, so kann die referenzfreie Alignierung durchgeführt werden.

1.5.9 Klassifizierung der Untervolumen

Eine verbesserte Auflösung bei der Mittelung der Untervolumen wird nur erreicht, wenn eine Vielzahl an Untervolumen mit nahezu identischen Zielmolekülen gemittelt wird. Da die Zielmoleküle meist in vielen unterschiedlichen Situationen beobachtet werden, ist es nötig, ähnliche Zielmoleküle zu gruppieren. Dieser Prozess wird als Klassifizierung bezeichnet. Zunächst werden die Klassenzentren berechnet. Dann werden die Untervolumen aligniert und dem zu ihm

ähnlichsten Klassenzentrum zugeordnet. Dieser Schritt wird so oft wiederholt, bis die Klassen konvergieren oder die gesetzte Anzahl an Wiederholungen erreicht wurde. Es kann auch eine fokussierte Klassifizierung durchgeführt werden. Dabei werden die Untervolumen mit einer Maske multipliziert, die nur Daten innerhalb der Maske berücksichtigt. Somit kann mit der gewählten Lokalisation der Maske die Klassifizierung auf ein Merkmal, z.B. ein gebundener Kofaktor des Zielmoleküls fokussiert werden⁹². Um die aus Klassifizierungen erhaltenen gemittelten Dichten miteinander vergleichen zu können, kann ein hierarchisches Clustering durchgeführt werden. Das Ergebnis des hierarchischen Clusterings ist ein Dendrogramm, das auf der x-Achse die Klassen und auf der y-Achse die Ähnlichkeit gegenüberstellt. Je größer der y-Wert ist, bei dem die Separation von zwei Klassen(-gruppen) ermittelt wurde, desto unterschiedlicher sind die Klassen(-gruppen). Mit der Wahl eines Grenzwertes, bis zu dem die Klassen getrennt werden sollen, können ähnliche Klassen gruppiert werden⁵⁸.

Die Alignierung und anschließende Klassifizierung der Untervolumen wird iterativ so lange durchgeführt, bis die Auflösung des Klassenmittels einer Unterklasse stagniert.

1.6 Ziel der Arbeit

Das zentrale Dogma der Biologie / Biochemie ist der Informationsfluss von der DNA über RNA (Transkription) in ein Protein (Translation) ⁹³. Bei der Erforschung der Translation wurden die Ribosomen als zentraler Ort der Proteinsynthese entdeckt. Bis heute sind Ribosomen Gegenstand wissenschaftlicher Forschung ⁹⁴. Mithilfe von biochemischen und strukturellen Untersuchungen, wie Röntgenbeugung und Elektronenmikroskopie konnten der Aufbau und die Funktionsweise von Ribosomen so wie beteiligte Faktoren aufgedeckt werden. Viele dieser Untersuchungen wurden in kontrollierten künstlichen Umgebungen (*in vitro*) durchgeführt ^{31,32}. Die Erforschung der Ribosomen in ihrer natürlichen Umgebung, einem lebendem Organismus (*in vivo*) gestaltet sich schwierig, weil hierfür nur wenige anspruchsvolle Techniken zur Verfügung stehen. Eine dieser Techniken ist die CET. Mit der Entwicklung der Ionenätzung mit einem fokussiertem Ionenstrahl (FIB) können heute *in vivo* Proben präpariert und untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist die dreidimensionale (3D) Analyse von Ribosomen in intakten *E. coli*-Zellen. Dabei wird ein Hauptaugenmerk auf die Organisation der Ribosomen (Polysome) und assoziierter Faktoren in der Zelle gelegt. Ferner sollen Erkenntnisse, die aus *in vitro* Untersuchungen bekannt sind mit der *in vivo* Analyse bestätigt werden.

2 Material und Methoden

Nachfolgend wurden die für diese Arbeit eingesetzten Materialien und Geräte aufgelistet, sowie die angewendeten Methoden beschrieben. Dabei wurde auf die explizite Auflistung der in einem Standardlabor vorhandenen Ausstattung verzichtet.

2.1 Materialien

Die verwendeten Materialien wurden in Einsatzstoffe, Aufreinigungssysteme (*Kits*), Enzyme und zugehörige Enzypuffer, speziell konzipierte Oligonukleotide, Plasmide und Bakterienstämme gegliedert.

2.1.1 Einsatzstoffe

Die verwendeten Einsatzstoffe wurden in Chemikalien und Lösungen unterteilt. Die Lösungen wurden weiter in Puffer und Medien untergliedert. Die Lösungen, Puffer bzw. Medien wurden selbst hergestellt. Alle bei der Zellkultur eingesetzten flüssigen Einsatzstoffe wurden autoklaviert bzw. bei temperaturempfindlichen Inhaltsstoffen steril filtriert.

2.1.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden überwiegend von den Firmen Sigma, Merck, Invitrogen, Serva, Fluka, Roth, BioMol, VWR oder Roche bezogen. Die Reinheit der eingesetzten Chemikalien war *pro analysi* (*p.a.*), wenn keine weiteren Angaben gemacht wurden. Die Chemikalienliste befindet sich im Anhang (A).

2.1.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Standardmäßig wurde VE-H₂O als Lösungsmittel verwendet und wird im Folgenden nicht mehr explizit angegeben. Wurde ein anderes Lösungsmittel verwendet, wird dieses aufgeführt.

Lösungen

- 1 mM **18-L-Aminosäuremix** (enthält 18 L-Aminosäuren ohne Cys und Met (Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val) in einer Konzentration von 1 mM für jede Aminosäure)
- 1 mM **20-L-Aminosäuremix** (enthält jede der 20 L-Aminosäuren (Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val) in einer Konzentration von 1 mM für jede Aminosäure)
- **Fixierlösung:** 35 % (v/v) Eisessig, 10 % (v/v) Ethanol
- 20 % Glukose
- 100 mM PMSF in Ethanol
- 2,5 M Saccharose
- **Ponceau Färbelösung:** 0,1 % (w/v) Ponceau S, 5 % (v/v) Eisessig

Puffer

Der pH-Wert des Puffers wurde auf den im Methodenteil angegebenen Wert mit der entsprechenden Säure oder Base, abhängig von den bereits im Puffer vorhandenen Ionen eingestellt.

- **5 x M 9 salt:** (Feststoffgemisch): 74,00 % (w/w) Na₂HPO₄•7 H₂O, 17,34 % (w/w) KH₂PO₄, 2,89 % (w/w) NaCl, 5,78 % (w/w) NH₄Cl⁹⁵.
- **SDS-Ladepuffer:** 133 mM TRIS, 10 mM EDTA, 11,68 % (w/v) Glycerin, 3,33 % (w/v) SDS, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM DTT
- **50 x TAE- Puffer:** 24,2 % (w/v) TRIS, 5,71 % (v/v) Eisessig, 3,72 % (w/v) EDTA

- **1 x TAE- Puffer:** 0,484 % (w/v) TRIS, 0,112 % (v/v) Eisessig, 0,074 % (w/v) EDTA
- **TBS:** 50mM TRIS pH 8,0, 150mM NaCl
- **2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) pH 6,8**
- **2 M TRIS pH 8,8**

Medien

- **LB-Medium:** 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, Autoklavieren
- **LB-Agar:** LB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar
- **M9-Medium:** 0,03 % (w/v) L-Alanin, 2 mM MgSO₄, 1,13 % (w/v) 5 x M 9 Salz ⁹⁵, Sterilfiltrieren

2.1.2 Aufreinigungssysteme

Zur DNA-Isolierung aus Gelen und zur Plasmidisolierung aus Bakteriensuspensionen wurden Aufreinigungssysteme der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) verwendet.

Aufreinigungssystem	Hersteller (Ort, Land)
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega (Mannheim, Deutschland)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim, Deutschland)
Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega (Mannheim, Deutschland)

Tab. 1. **Aufreinigungssysteme.** Die verwendeten Aufreinigungssysteme für DNA mit Herstellerangaben wurden aufgelistet.

2.1.3 Enzyme und Puffer

Nachfolgend werden die eingesetzten Enzyme, Puffer sowie Herstellerangaben aufgeführt.

Enzym / Puffer	Hersteller (Ort, Land)
10 x NEB DNA-Ligase-Puffer	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
10 x NEB Puffer 1	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
10 x NEB Puffer 2	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
10 x NEB Puffer 3	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)

Enzym / Puffer	Hersteller (Ort, Land)
10 x NEB Puffer 4	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
5 x Herculase Puffer	Agilent (Karlsruhe, Deutschland)
BamHI	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
DpnI	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
Herculase	Agilent (Karlsruhe, Deutschland)
Lysozym	Serva (Heidelberg, Deutschland)
NcoI	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
Phosphatase	Roche (Mannheim, Deutschland)
SpeI	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	MPI Core Facility (Martinsried, Deutschland)

Tab. 2. **Enzyme.** Aufgelistet wurden die eingesetzten Enzyme und Puffer, sowie deren Hersteller.

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden, wenn nicht im Labor bereits vorhanden bei Metabion International AG (Lena-Christ-Strasse 44/I, 82152 Martinsried) bestellt. Der T7 Promotor Primer und der T7 Terminator Primer wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die angegebene Schmelztemperatur (T_m) der Primer unter Berücksichtigung des Salzanteils wurde mit der „Sequence Manipulation Suite“⁹⁶ ermittelt.

Name	Funktion	Sequenz (5' → 3')	T_m [°C]
MtlA_fL_1284_FW	Primer für MtlA ab nt 1284	CACTCACCGTGACCTGACC	50
MtlA_fL_1651_FW	Primer für MtlA ab nt 1651	GCGGTGCCACACGGTACG	52
MtlA_fL_239_FW	Primer für MtlA ab Nukleotid nt 239	TCGGTGCCATCACCACCATG	51
MtlA_fL_641_FW	Primer für MtlA ab nt 641	TCTTCCTGATTGAAGCTAACCCAG	51
MtlA_fL_929_FW	Primer für MtlA ab nt 929	GTGCTTACTTCGCTAACATCGC	50
MtlA ₁₈₈ Fw1	Einbau SpeI-Schnittstelle	ATCCTGTTCTactCAACGCCATT	51

Name	Funktion	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
MtlA ₁₈₈ Fw2	Einbau SpeI-Schnittstelle	ATCCTGTTCCtactagtCGCCATT	51
MtlA ₁₈₈ Rev1	Einbau SpeI-Schnittstelle	AATGGCGTTGagtAGGAACAG	47
MtlA ₁₈₈ Rev2	Einbau SpeI-Schnittstelle	AATGGCGactagtAGGAACAGGAT	51
MtlA ₁₈₉ SecMFw	Einbau von A nach T ⁵⁶⁶	TCCTGTTCCCTaACTAGTCAATTCAGC	51
MtlA ₁₈₉ SecMRev	Einbau von A nach T ⁵⁶⁶	GCTGAATTGACTAGtTAGGAACAGGA	51
MtlA ₃₈₄ Fw1	Einbau SpeI-Schnittstelle	TTGCCTGTGAactCGGTATGGGTTCC	56
MtlA ₃₈₄ Fw2	Einbau SpeI-Schnittstelle	TTGCCTGTGAactagtTATGGGTTCC	53
MtlA ₃₈₄ Rev1	Einbau SpeI-Schnittstelle	GGAACCCATACCGagtTCACAGGCAA	56
MtlA ₃₈₄ Rev2	Einbau SpeI-Schnittstelle	GGAACCCATAaactagtTCACAGGCAA	53
MtlA ₃₈₅ SecMFw	Einbau von A nach A ¹¹⁵⁴	TCGTTGCCTGTGAcACTAGTCAATTCAGC	56
MtlA ₃₈₅ SecMRev	Einbau von A nach A ¹¹⁵⁴	GCTGAATTGACTAGTgTCACAGGCAACGA	56
T7 Promotor	Primer T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	43
T7 Terminator	Primer T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	46
Anti-10Sa-RNA	Inaktivierung tmRNA	TTAAGCTGCTAAAGCGTAGTTTTTCGTCGT TTGCGACTA	64

Tab. 3. **Primer.** Aufgelistet wurden alle verwendeten Primer mit Funktion, Nukleotidsequenz (5' → 3') und T_m (in°C).

2.1.5 Plasmide

Plasmide, die im Rahmen dieser Doktorarbeit von Thomas Hoffmann hergestellt wurden, erhalten in nachfolgender Auflistung den Vermerk „TH“.

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle
pBAD 33 Titin-SecM-GFP	<i>P. pyralis</i> Luciferase-SecM-GFP	NK (Hartl Labor)
pET29a MtlA	<i>E. coli</i> MtlA	Müller Labor
pET29a MtlA ₁₈₈ -Stop	<i>E. coli</i> MtlA188	RA
pET29a MtlA ₁₈₉ -SecM-GFP	<i>E. coli</i> MtlA189-SecM-GFP	TH
pET29a MtlA ₃₈₄ -Stop	<i>E. coli</i> MtlA384	RA
pET29a MtlA ₃₈₅ -SecM-GFP	<i>E. coli</i> MtlA385-SecM-GFP	TH

Tab. 4. **Plasmide.** Zusammengestellt wurde eine Übersicht über die verwendeten Plasmide mit Bezeichnung, Beschreibung des/r codierten Proteins/e und der Quelle des Plasmids (NK: Dr. Niti Kumar, RA: Dr. Raluca Antonoaea, TH: Thomas Hoffmann, Hartl Labor: Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl am Max-Planck-Institut (MPI) für Biochemie in Martinsried, Müller Labor: Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Müller an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in Freiburg).

2.1.6 Bakterienstämme

Die hergestellten Plasmide wurden jeweils in den BL21 (DE3) als auch den DH5 α F' - *E. coli*-Stamm transformiert. Die BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen wurden zur Proteinexpression und die DH5 α F' *E. coli*-Zellen zur Plasmidlagerung verwendet. Der mEos tragende BL21 (DE)-Stamm wurde im Labor von Johan Elf in Uppsalla (Schweden) mittels Phagentransduktion durch Prune Leroy auf Grundlage des BL21 (DE) pET29a MtlA₃₈₅-SecM-GFP hergestellt.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hdsS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ in5	NEB (Frankfurt am Main, Deutschland)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) rpsB mEos, pET29a MtlA ₃₈₅ -SecM-GFP	fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] Δ hdsS λ DE3 = λ sBamHIo Δ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δ in5; enthält mEos gelabeltes rpsB Protein für PALM-Analyse und pET29a MtlA ₃₈₅ -SecM-GFP Plasmid	Johan Elf Lab (Uppsalla)
<i>E. coli</i> DH5 α F'	F' endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Novagen (Darmstadt, Deutschland)
<i>E. coli</i> MC4100	F' [araD139] _{B/r} Δ (argF-lac)169* &lambda ⁻ e14-flhD5301 Δ (fruK-yeiR)725 (fruA25) \ddagger relA1 rpsL150(strR) rbsR22 Δ (fimB-fimE)632(::IS1) deoC1	Hartl Labor ⁹⁷

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> TY0	MC4100, ompT::kan zhd-33::Tn10 rpsE	Müller Labor ⁹⁸

Tab. 5. **Bakterienstämme.** Die *E. coli*-Stämme mit Genotyp und Quelle wurden aufgeführt. Müller Labor: Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Müller an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in Freiburg.

2.2 Geräte

Für die biochemischen Arbeiten wurde die standardmäßig in einem biochemischen Labor vorhandenen Instrumente (wie beispielsweise diverse Pipetten, Messzylinder, Bechergläser, Schottflaschen, diverse Plastikröhrchen, Filter (0,22 µm) usw.) verwendet. Die über die gängige Laborausstattung hinausgehenden Geräte und eingesetzten Verbrauchsmaterialien wurden im Anhang in der Geräteliste (B) bzw. der Verbrauchsmaterialliste (C) aufgeführt.

Initiale Kryo-EM Untersuchung an langsam wachsenden *E. coli*-Zellen wurden an einem 300 kV Elektronenmikroskop (FEI Tecnai Polara) mit Energiefilter (Gatan Inc. GIF 2002) und CCD-Kamera (2k x 2k) durchgeführt. Für die Kryo-EM Untersuchung von schnell wachsenden *E. coli*-Zellen wurden ein Zweistrahlelektronenmikroskop (FIB / SEM, Quanta 3D FEG von FEI, mit 360° drehbarem Kryoprobehalter (entwickelt am MPI für Biochemie) und Quorum PP2000T Kryoladekammer) und ein 300 kV TEM (Titan Krios, FEI mit Energiefilter (GIF Quantum 965, Gatan Inc.) und direkt Elektronendetektor (K2, Gatan Inc.)) verwendet. Zur Prozessierung der Daten wurden die Rechnerressourcen des MPI für Biochemie (lokale Server und Cluster) herangezogen.

2.3 Methoden

Für die Kryo-EM Untersuchung wurden *E. coli*-Zellen verwendet, die in reichem Medium⁹⁹ angezogen wurden. Diese *E. coli*-Zellen enthielten ein Plasmid, welches es ermöglichte ein Transmembranproteinfragment gefolgt von einer SecM-Sequenz²⁰ in den Zellen zu exprimieren, um so die Anzahl an MBRs in den Bakterienzellen zu erhöhen. Die gewachsenen *E. coli*-Zellen wurden auf einem *grid* in flüssigem Ethan schockgefroren⁴⁷. Die *E. coli*-Zellen waren für die Kryo-EM Analyse zu dick. Daher wurden diese Proben vor der TEM-Analyse zunächst an ausgewählten Bereichen ausgedünnt. Zum Ausdünnen wurde ein Zweistrahlelektronenmikroskop verwendet, mit

dessen Galliumionenstrahl die *E. coli*-Zellen unter Kryobedingungen an ausgewählten Bereichen keilförmig ausgedünnt wurden⁴⁹. Die ausgedünnten Proben wurden schließlich in ein 300 kV TEM transferiert, in welchem Zweiachsenkippserien aufgenommen wurden. Aus den aufgenommenen 2D Projektionen wurden durch Computer basierte Prozessierung ein 3D Bild der untersuchten *E. coli*-Zelle erstellt. In diesem 3D Bild wurden anschließend Ribosomen lokalisiert und analysiert.

2.3.1 Molekularbiologische Methoden

Ausgehend von einem pET29a-Vektor, in dessen Polylinker die DNA-Sequenz der Mannitolpermease (MtlA) eingebaut worden war¹⁰⁰, wurden Konstrukte mit den ersten vier (MtlA₁₈₈-Stop, MtlA₁₈₈-SecM-GFP), sowie allen sechs (MtlA₃₈₄-Stop, MtlA₃₈₅-SecM-GFP) MtlA Transmembrandomänen (TM) ohne und mit SecM-Sequenz hergestellt (2.1.5).

2.3.1.1 Herstellung der MtlA_{188/384}-Stop Konstrukte

In einen pET29a-Vektor in dessen Polylinker die DNA-Sequenz des MtlA-Proteins^{25,101} eingebaut worden war (2.1.5), wurde mittels PCR eine SpeI-Schnittstelle nach vier bzw. sechs Transmembrandomänen eingefügt. Die SpeI-Schnittstelle ist einmalig im pET29a-Vektor, sodass dieser pET29a-Vektor durch SpeI-Verdau linearisiert werden konnte. Der linearisierte pET29a-Vektor wurde zusammen mit einem dephosphorylierten DNA-Strang mit komplementären Enden religiert. Der dephosphorylierte DNA-Strang codierte für die SecM-Sequenz gefolgt von grün fluoreszierendem Protein (GFP). Die SecM-GFP Sequenz stammte aus dem pBAD 33 Titin-SecM-GFP Vektor (2.1.5), der freundlicherweise von Frau Dr. Niti Kumar zur Verfügung gestellt worden war. Die SpeI-Schnittstelle wurde mit den Primern MtlA₁₈₈ bzw. MtlA₃₈₄ (2.1.4) so positioniert, dass ein Stop-Codon neun Aminosäuren nach MtlA₁₈₈ (MtlA₁₈₈-LVNSA RPSG-Stop) bzw. zehn Aminosäuren nach MtlA₃₈₄ (MtlA₃₈₄-ELVNS ARPSG-Stop) eingefügt wurde. Die MtlA-Stop Konstrukte wurden von Frau Dr. Raluca Antonoae und Herrn Andreas Scaia hergestellt.

2.3.1.2 Klonierung der SecM-Sequenz in pET29a MtlA Vektor

Durch Einfügen eines Adenins nach Thymin⁵⁶⁶ in MtlA188-Stop wurde mit dem Primerpaar MtlA₁₈₉SecMFw/Rev (2.1.4) das Konstrukt MtlA189-SecM-GFP mittels PCR (2.3.1.5) hergestellt. Analog dazu erfolgte durch Einfügen eines Adenins nach Adenin¹¹⁵⁴ mit dem Primerpaar MtlA₃₈₅SecMFw/Rev (2.1.4) die Herstellung des Konstrukts MtlA385-SecM-GFP.

2.3.1.3 Plasmidisoliation

Benötigte Plasmide wurden aus *E. coli* Übernachtskulturen mittels Mini- bzw. Midi-Prep-Kit von Promega (2.1.2) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Übernachtskulturen wurden zuvor in LB-Medium (2.1.1.2) mit entsprechenden Antibiotika (50 mg/mL Kanamycin für pET29a Vektor und 25 mg/mL Kanamycin, 17 mg/mL Chloramphenicol für mEos markierte BL21 (DE) *E. coli*-Zellen mit pET29a Vektor) mit der gewünschten *E. coli* Kultur angeimpft und über Nacht inkubiert (37°C, 200 rpm). Die DNA-Konzentrationen der isolierten Plasmide wurden mit einem Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Aufgereinigte Plasmide wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.1.4 Agarosegel

DNA aus isolierten Plasmiden und PCRen wurde in Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt⁹⁵. Die Agarosegele wurden mit unterschiedlicher Agarosekonzentration, die zwischen 1 % und 2 % (w/v) Agarose lagen hergestellt. Für ein Agarosegel wurde die Agarose in 50 mL 1 x TAE Puffer (2.1.1.2) in der Mikrowelle gelöst, danach mit 1 : 10,000 SYBR[®] Safe (Endkonzentration 1 x) versetzt und schließlich zusammen mit einem Kamm in einen seitlich abgeschlossenen Gelschlitten zum Abkühlen gegeben. Nachdem der Kamm entfernt worden war, konnten die Geltaschen mit Proben DNA, welche zuvor mit 6 x DNA-Ladepuffer (Endkonzentration 1 x) gemischt worden war, beladen werden. Zusätzlich zur Proben DNA wurden ein 100 bp-Marker und ein 1 kb-Marker zum Größenvergleich auf das Agarosegel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Trennung wurde bei 70 V, Raumtemperatur (RT) für ungefähr 45 Minuten (min), bzw. bis das erwünschte Trennungsergebnis erreicht wurde, durchgeführt. Das Trennergebnis wurde auf einer Gel-

dokumentationsanlage (B) festgehalten⁹⁹. Sollte die aufgetrennte DNA weiterverwendet werden, so wurde eine präparative Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die DNA Proben in sich einmal wiederholender Reihenfolge auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde das Agarosegel vor der ersten sich wiederholenden Probe auseinander getrennt. Der eine Agarosegelteil wurde zur Analyse in der Geldokumentationsanlage verwendet, aus dem anderen Agarosegelteil wurden mit einem Skalpell die weiterhin benötigten DNA-Banden ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden mit dem PCR Clean-Up-System (2.1.2) aufgereinigt (präparatives Agarosegel).

2.3.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit gezielter Mutagenese wurden Basenpaare im pET29a MtlA Plasmid mithilfe der PCR durch die Verwendung geeigneter Primerpaare (siehe 2.1.4 ~Fw und ~Rev) an definierten Stellen verändert⁹⁵. So wurde die SpeI-Schnittstelle (5' ACTTAG 3') durch zwei aufeinanderfolgende PCRs in das pET29a MtlA Plasmid nach der vierten bzw. sechsten TM eingeführt. Ein typischer 50 µL PCR-Ansatz enthielt DNA-Template (30-100 ng/µL), Desoxy-ribonukleotidtriphosphate (dNTPs: 0,25 mM dATP, 0,25 mM dTTP, 0,25 mM dGTP, 0,25 mM dCTP), 5'-Primer (0,2 µM), 3'-Primer (0,2 µM), Polymerase (Herculase: 0,1 U/µL), Polymerasepuffer (1 x) und ddH₂O. Der PCR-Ansatz wurde in einem Thermocycler (B) mit einem typischen PCR-Temperaturprogramm inkubiert. Ein PCR-Temperaturprogramm setzt sich aus initialer Denaturierung (95°C, 5 min), mehrfacher Wiederholung (25 x) des PCR-Zykluses, bestehend aus Denaturierung (95°C, 40 sek.), Primeranlagerung (engl. *primer annealing*; ($T_m - 10^\circ\text{C}$), 1 min) und Elongation (72°C, ($v_{\text{Polymerase}} [\text{sek./kb}] \times \text{DNA-Größe} [\text{kb}]$)), sowie der finalen Elongation (72°C, 20 min) zusammen. Die *Annealing*-Temperatur wurde 10°C unterhalb der niedrigsten T_m der eingesetzten Primer (2.1.4) gewählt. Die Zeit für die Elongation im PCR-Zyklus kann aus der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerase ($v_{\text{Polymerase}} [\text{sek./kb}]$) und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stranges ([kb]) berechnet werden. In den Produktinformationen zu den Polymerasen sind vom Anbieter empfohlene Elongationszeiten, abhängig von der Größe der zu amplifizierenden DNA-Vorlage angegeben. Die Analyse der PCR-Reaktionen erfolgte anhand von Agarosegelen (2.3.1.4).

2.3.1.6 Restriktionsverdau

Benötigte DNA-Fragmente wurden durch Verdau mit Endonukleasen (2.1.3) hergestellt. Nach der eingefügten SpeI-Schnittstelle wurde ein SecM-GFP-Fragment in die pET29a MtlA SpeI Vektoren eingebaut. Dazu wurde der pET29a MtlA SpeI Vektor mit SpeI (NEB) nach NEB-Protokoll verdaut (NEB-Puffer 2, 1 h, 37°C, 300 rpm), wobei der pET29a MtlA SpeI Vektor linearisiert wurde, da die SpeI-Schnittstelle im Vektor nur einmal vorkam. Das einzubauende SecM-GFP-Fragment wurde ebenfalls aus dem Verdau mit SpeI (NEB-Puffer 2, 1 h, 37°C, 300 rpm) aus dem pBAD33 Titin-SecM-GFP Vektor (2.1.5) ausgeschnitten. Alle DNA-Fragmente wurden mittels präparativer Agarosegele (2.3.1.4) aufgereinigt.

2.3.1.7 Dephosphorylierung und Ligation

Um ein DNA-Fragment (*Insert*) in einen Vektor einzubauen, mussten die beiden DNA-Stücke zuvor mit dem/n gleichen Restriktionsenzym/en verdaut werden, um entsprechende zueinanderpassende DNA-Enden an den zu ligierenden DNA-Stücken zu erhalten (2.3.1.6). Eines der beiden DNA-Stücke wurde mit Phosphatase (2.1.3) dephosphoryliert (1 h, 37°C), um eine chemisch adäquate Verbindung zu ermöglichen¹⁰².

Die zu kombinierenden DNA-Stücke wurden mithilfe der T4-DNA-Ligase verbunden (1 x T4-DNA-Ligase Puffer (NEB), 40 U T4-DNA-Ligase (MPI Core Facility), *Insert*, Vektor und ddH₂O für 30 min bei 22°C). *Insert* und Plasmid wurden im molaren Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 10 eingesetzt.

2.3.1.8 Hitzeschock Transformation

Plasmide wurden in chemisch- oder elektrokompetente *E. coli*-Zellen nach Standardprotokollen eingebracht⁹⁵. Plasmide aus PCR-Reaktionen wurden vor der Transformation zunächst mit DpnI inkubiert (50 µL PCR-Ansatz mit 10 U DpnI für 2 h bei 37°C), um methylierte parentale DNA abzubauen.

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (~50 µL Zellsuspension) wurden auf Eis aufgetaut. Danach wurden 10 µL Ligationsansatz bzw. 50 ng Plasmid-DNA zu den *E. coli*-Zellen gegeben. Dieser

Transformationsansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert und danach der Hitzeschock durchgeführt (bei 42°C für 1,5 min). Unmittelbar nach dem Hitzeschock wurde 1,0 mL LB-Medium zu dem Transformationsansatz pipettiert, wonach der Ansatz bei 37°C inkubiert wurde (für 1 h bei 350 rpm). Schließlich wurde der Transformationsansatz auf Antibiotika (Kanamycin) enthaltenden LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert ⁹⁵.

Um den Einbau der SecM-GFP-DNA zu bestätigen, wurde die nach der Transformation isolierte Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen NcoI und BamHI verdaut und auf einem Agarosegel analysiert (2.3.1.4). Bei erfolgtem SecM-GFP-DNA-Einbau sollte nach dem Doppelverdau mit NcoI und BamHI ein ausgeschnittenes DNA-Fragment (~0,9 kbp für MtlA₁₈₉-SecM-GFP bzw. ~1,5 kbp für MtlA₃₈₅-SecM-GFP) zu detektieren sein. Die NcoI-Schnittstelle befand sich im vorderen Bereich der MtlA-DNA und die BamHI-Schnittstelle in der GFP-DNA der SecM-GFP-DNA. Ist die SecM-GFP-DNA gegenläufig eingebaut, wird ein kürzeres DNA-Fragment detektiert (~0,5 kbp für MtlA₁₈₉-GFP-SecM bzw. ~1,1 kbp für MtlA₃₈₅-GFP-SecM). Bei nicht erfolgtem SecM-GFP-DNA-Einbau wird die Plasmid-DNA lediglich linearisiert. Bei den Klonen mit erfolgreichem SecM-GFP-DNA-Einbau wurde dieser durch Sequenzierung der MtlA-SecM-DNA bestätigt. Etwaige auftretende Mutationen wurden durch gezielte Mutagenese mit entsprechenden Primerpaaren behoben (2.3.1.5).

2.3.1.9 Gekoppelte Transkriptions-Translationsreaktion und Flotationsanalyse

Ausgehend von den Plasmiden, welche für die MtlA_{188/384}-Stop-Konstrukte (2.3.1.1) codieren wurde eine gekoppelte Transkriptions-Translationsreaktion durchgeführt. Die auf dem Plasmid für ein MtlA-Konstrukt codierende DNA wurde von der T7 RNA Polymerase in mRNA übersetzt (Transkription ⁶). Bei der anschließenden Translation ⁶ wurde ausgehend von der erzeugten mRNA durch 70S Ribosomen das entsprechende MtlA-Proteinkonstrukt hergestellt. Wurden zu der gekoppelten Transkriptions-Translationsreaktion noch invertierte Membranvesikel mit Translokons gegeben, so wurde das MtlA-Konstrukt kotranslational in die Vesikel translokiert ²⁵. Anschließend konnten diese Vesikel mittels Flotationsanalyse charakterisiert werden.

Aufreinigung von CTF_Z und 70S Ribosomen und INV

Der Zellextrakt mit den zytosolischen Transkriptionsfaktoren (CTF_Z) sowie die 70S Ribosomen wurden aus MC4100 hergestellt^{103 104}. Die invertierten Membranvesikel wurden aus *E. coli* TY0⁹⁸ aufgereinigt¹⁰⁵.

Transkriptions-Translationsreaktion

Für die gekoppelte Transkriptions-Translationsreaktion wurde für einen 50µL Reaktionsansatz aus 5 µL Kompensationspuffer pH 7,5 (260 mM TeaOAc, 580 mM KAc, 88 mM MgAc₂, 8 mM Spermidin), 5 µL 18-L-Aminosäuremix (18 Aminosäuren, jede 1 mM: Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), 9,56 µL Reaktionsmix (50 mM ATP, 10 mM GTP, 10 mM CTP, 10 mM UTP, 50 µM Met, 50 µM Cys, 16 % PEG 6000, 50 µM DTT, 25 mM PEP, 0,4 M Kreatinphosphat), 0,2 µL 10 µg/mL Kreatinphosphatkinase, 10 µL CTF_Z¹⁰³, 2 µL 10 µM 70S Ribosomen¹⁰³ und 1 µL 1,0 g/L anti-10SA DNA, 2 µL T7 RNA Polymerase, 2 µL ³⁵S-Met und 7,25 µL ddH₂O auf Eis zusammengestellt^{105,106}. Zum Reaktionsansatz wurden 4 µL MtlA-Plasmid gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert, sodass die Transkription und Translation ablaufen konnte. Es wurden sowohl Plasmide, welche für die MtlA-Fragmente codieren, als auch für das Vollängen MtlA-Protein verwendet. Nun wurden invertierte Membranvesikel (INV)¹⁰⁵ und / oder INV-Puffer pH 7,5 (250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 50 mM TeaOAc) mit einem gemeinsamen Volumen von 2 µL zugegeben. Mit der Zugabe der invertierten Membranvesikel konnte die Translokation beginnen¹⁰⁴. Das radioaktive ³⁵S-Met wurde während der Translation in das synthetisierte MtlA-Konstrukt eingebaut, sodass dieses durch Autoradiographie⁴⁷ detektiert werden konnte⁹⁸.

Für die Präparation von Proben für die CET wurde eine Transkriptions-Translationsreaktion ohne ³⁵S-Met, dafür mit normalem, nicht radioaktivem ³²S-Met angesetzt, anschließend mit 10 nm Goldpartikeln gemischt und auf einem EM-grid in flüssigem Ethan schockgefroren.

Flotationsanalyse

Für eine Probe wurden in ein 120.2 TLA Zentrifugenröhrchen 65 µL 2,5 M Saccharose vorgelegt, in welches dann 40 µL eines Reaktionsansatzes einer gekoppelten Transkriptions-Translationsreaktion gegeben wurden. Das Zentrifugenröhrchen wurde kurz auf dem *Vortex*

gemischt, sodass eine gute Durchmischung gewährleistet war. Anschließend wurde die Probe im Zentrifugenröhrchen vorsichtig zunächst mit 200 μL 1,25 M Saccharose und dann mit 100 μL 0,25 M Saccharose überschichtet. Die Probe wurde bei 100.000 rpm für 90 min bei 4°C in einem TLA 120.2 Rotor (Beckman Coulter) zentrifugiert.¹⁰⁷

Danach wurden vorsichtig von oben viermal je 100 μL abgenommen und separat gehandhabt. Zu jeder der Fraktionen wurden 100 μL 10 %iger TCA gegeben. Anschließend wurden die Fraktionen für mindestens 30 min auf Eis inkubiert, um die Proteine zu präzipitieren. Im Anschluss wurden die Proteinpellets als auch das Pellet im Zentrifugenröhrchen in je 15 μL SDS-Ladepuffer gelöst. Abschließend wurden die Proben auf einem 13 %igen SDS-Gel⁹⁵ aufgetrennt und mittels Autoradiographie die Proteine detektiert¹⁰⁸.

2.3.2 Zellkultur

Für die Kryo-EM Untersuchung und die durchgeführten biochemischen Analysen wurden immer ausgehend von einer gemeinsamen *E. coli*-Zellkultur eine mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierte Kultur, bei der ein MtlA-Proteinfragment exprimiert wurde, mit einer nicht induzierten Kultur verglichen.

2.3.2.1 Übernachtkultur

Zunächst wurde eine LB-Agarplatte mit Antibiotika (entsprechend der in den *E. coli*-Zellen enthaltenen Antibiotikaresistenzen) mit den zu kultivierenden *E. coli*-Zellen aus einem Glycerolstock ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit *E. coli*-Zellen von dieser Agarplatte eine Übernachtkultur angeimpft. Dazu wurden 8 mL LB-Medium (für schnelles Wachstum) oder 5 mL M9-Medium (für langsames Wachstum) mit Antibiotika (50 mg/mL Kanamycin für pET29a Vektor und 25 mg/mL Kanamycin, 17 mg/mL Chloramphenicol für mEos markierte BL21 (DE) *E. coli*-Zellen mit pET29a Vektor) verwendet und bei 37°C über Nacht inkubiert (200 rpm).

2.3.2.2 Langsam wachsende Zellkultur

Mit den pelletierten (5040 g, 5 min, RT) *E. coli*-Zellen aus 1 mL der langsam wachsenden Übernachtskultur (2.3.2.1) wurde eine weitere 200 mL Übernachtskultur (M9-Medium mit Antibiotika) angeimpft und bei 37°C (200 rpm) über Nacht inkubiert. *E. coli*-Zellen die in Minimalmedien, wie M9-Medium angezogen werden, besitzen eine Generationszeit von ~60 Minuten¹⁰⁹. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Die gesamten *E. coli*-Zellen wurden pelletiert (3403 g, 10 min, RT). Die pelletierten *E. coli*-Zellen wurden in M9-Medium mit 1 % Glukose, 0,1 mM 20-L-Aminosäuremix und entsprechendem Antibiotika (vgl. 2.3.2.1) mit einer OD₆₀₀ von 0,5 resuspendiert und in zwei gleich große Aliquote aufgeteilt. Beide Aliquote wurden für 5 min bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde zu einem der beiden Aliquote IPTG (c_{End} 1 mM) gegeben, um die Expression des MtlA-SecM-GFP-Proteinkonstrukts zu starten. Aus diesen *E. coli*-Kulturen (37°C, 200 rpm) wurden zu festgelegten Zeitpunkten die Proben für die CET Untersuchungen bzw. Wachstums- und Expressionsanalysen gezogen.

2.3.2.3 Schnell wachsende Zellkultur

Ausgehend von der schnell wachsenden Übernachtskultur (2.3.2.1) wurde eine 20 mL Kultur (LB-Medium mit Antibiotika) angeimpft (Start-OD₆₀₀: 0,05) und bei 37°C (200 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Nun wurde die Hälfte des Kulturvolumens durch frisches LB-Medium mit Antibiotika ersetzt und die Kultur erneut bis zu einer OD₆₀₀ 0,3 angezogen. Dieser Austausch des Kulturmediums wurde noch dreimal wiederholt. Nach dem letzten Mediumaustausch wurde die Zellkultur bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 angezogen und in zwei gleich große Aliquote aufgeteilt. Zu einem der beiden Aliquote wurde IPTG (c_{End} 1 mM) zugegeben, um die Expression des MtlA-SecM-GFP-Proteinkonstrukts zu starten. Aus diesen *E. coli*-Kulturen (37°C, 200 rpm) wurden zu festgelegten Zeitpunkten die Proben für die Kryo-EM Untersuchungen bzw. Wachstums- und Expressionsanalysen gezogen. *E. coli*-Zellen, die in Vollmedien, wie LB-Medium angezogen werden, besitzen eine Generationszeit von 20-30 Minuten¹⁰⁹.

2.3.2.4 Zellwachstum und Proteinexpression

Eine *E. coli*-Zellkultur mit OD₆₀₀ 0,5 wurde in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Einem dieser Teile wurde IPTG (c_{End} 1 mM) zur Expression des MtlA-SecM-GFP-Proteinfragments zugegeben. Beide Zellkulturen wurden bei 37°C inkubiert (200 rpm) und in festgelegten Zeitintervallen (Δt 10 min) wurden Proben (je 1 mL) für die OD₆₀₀-Bestimmung und die Proteinexpression entnommen. Von den Proben für das Zellwachstum wurden am Photometer (Spektrophotometer UV-VIS DU640) die OD₆₀₀-Werte ermittelt und Wachstumskurven (3.4) aus diesen Werten erstellt. Die Proben für die Proteinexpression wurden jeweils mit 10 μ L ³⁵S-Methionin versetzt und für 5 min weiter inkubiert (37°C, 300 rpm). Das radioaktiv markierte Methionin wurde während der Inkubationszeit in neu synthetisierte Proteine eingebaut, sodass diese später mittels Autoradiographie detektiert werden konnten. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen pelletiert (5 min, 20.000 g, RT) und mit 50 μ L 10 % Trichloressigsäure (TCA) gewaschen. Die Zellpellets wurden in je 25 μ L SDS-Ladepuffer (pH 7,0) resuspendiert und mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert (13 %iges Trenngel, Stromstärke (I_a): konstant 27 mA für 40 min). Es wurde jeweils die gleiche Menge an *E. coli*-Zellen bezogen auf die kleinste gemessene OD₆₀₀ der ersten Probennahme pro Geltasche geladen (erstes Aliquot der induzierten Probe: 12 μ L). Die Proteine auf dem Gel wurden anschließend mit Fixierlösung (20 min, RT) fixiert, das Gel mit VE-H₂O gewaschen und auf einem Whatman-Filterpapier getrocknet (76°C, 45 min). Anschließend wurden die Proteinbanden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht ⁴⁷.

2.3.2.5 Proben für CET

Die für die CET vorgesehenen *E. coli*-Zellen wurden pelletiert (5040 g, 5 min, 4°C) und anschließend in M9-Minimal-Medium ⁹⁵ mit einer OD₆₀₀ von 3,0 resuspendiert. Die resuspendierten *E. coli*-Zellen wurden mit dem gleichen Volumen einer 2,5-fach konzentrierten Goldsuspension (Biocell, 10 nm) verdünnt. Als Objektträger wurden runde Metallnetzchen (engl. *grids* (Quantifoil R2/1)) aus Kupfer mit einer Maschengröße von 200 μ m verwendet. Bei der Untersuchung von kleinen Objekten, wie isolierten Molekülkomplexen werden engere Maschengrößen als bei großen Objekten, wie ganzen Zellen verwendet. Die *grids* wurden in einem Plasmareiniger (engl. *Plasma Cleaner*) beglimmt (15 sek.), um den dünnen Kohlefilm mit 2 μ m

großen Löchern zu reinigen und die Hydrophilität zu erhöhen. Auf die beglimmten *grids* wurden 3 μL der 2,5-fach konzentrierten Goldsuspension (Biocell, 10 nm) aufgebracht und getrocknet. Dann wurden 4 μL der vorbereiteten *E. coli*-Zellen auf das in einem *plunger* (engl.; manuelle Fallkolbenstange) eingespannte *grid* aufgetragen, von hinten mit einem Filterpapier (Whatman) abgezogen und sofort in flüssigem Ethan schockgefroren. Anstelle des mauellen *plungers* kann auch ein automatisierter *plunger*, wie der Virtobot von FEI¹¹⁰ verwendet werden. Flüssiges Ethan wird durch Kondensation von Ethangas, welches mit flüssigem Stickstoff auf ungefähr 77 K (-196°C) gekühlt wird, erzeugt^{64,65}. Durch die hohe Kühlrate von Ethan ($\sim 10^5 \text{ C s}^{-1}$) entsteht amorphes Eis⁴⁷. Die CET-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung in einer *Gridbox* in flüssigem Stickstoff bei -140°C gelagert, um eine Devitrifikation zu vermeiden^{47,69}.

2.3.3 Kryoelektronenmikroskopie

Ausdünnen der CET-Proben durch Ionenätzung

Die schockgefrorenen *grids* mit den *E. coli*-Zellen wurden unter Kryobedingungen ($\vartheta < -140^\circ\text{C}$ ⁶⁹) in einen stabilisierenden Kupfermetallring mit Aussparung (*Autogrid*) mittels eines kleinen Kupferrings („Clip-Ring“) befestigt, um die dünne Eisschicht des *grids* vor mechanischer Beanspruchung beim Transfer in und aus den Elektronenmikroskopen zu schützen⁴⁹. Der mit einem *grid* beladene Kupfermetallring wurde im FIB-Transferschiffchen (engl. *Shuttle*) fixiert (Abb. 19). Ebenfalls unter Kryobedingungen wurde das *Shuttle* auf die vorgekühlte FIB-Bühne (engl. *Stage*) platziert. Das *grid* wurde unter Zuhilfenahme des Oberflächenbildes aus sekundär Elektronen (SE), durch Justierung des *Shuttles* ausgerichtet. Dann wurden die Probenstellen an denen die Probe gedünnt werden sollte ausgewählt^{46,49}. Unter flachem Winkel (7° - 9°) wurden parallele Doppelkeile (Breite $\sim 25 \mu\text{m}$, Höhe $\sim 5 \mu\text{m}$ (vgl. Abb. 31), Keil: engl. *Wedge*) in der Mitte der *grids* geschnitten. Für das Öffnen der Probe wurde ein starker Galliumionenstrahl (300 pA) verwendet. Die Kanten des Keils wurden abschließend mit einem schwächeren Galliumionenstrahl (100 pA) poliert, um verbliebene Probenreste und Verunreinigungen zu entfernen. Der Schnitfortschritt und die Positionierung der Keile wurden mit Oberflächenbildern (SE) kontrolliert. Je nach Probenqualität konnten bis zu zehn Doppelkeile auf einem *grid* geschnitten werden. Das Entladen des FIB-*Shuttles* wurde analog dem Ladevorgang unter Kryobedingungen

durchgeführt. Das *grid* mit Kupfermetallring wurde ausgebaut und in geeigneten Plastikboxen bis zur weiteren Untersuchung im Kryo-TEM in flüssigem Stickstoff gelagert.

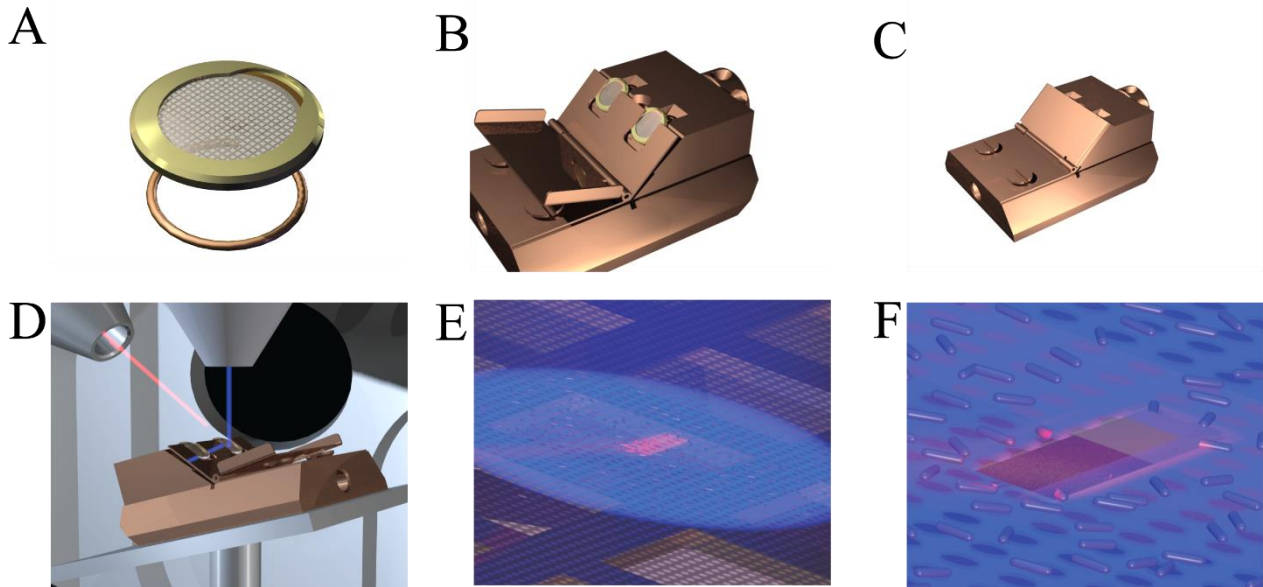


Abb. 19. **FIB** (Bilder aus Film von Dr. Julio Ortiz). (A) Dargestellt ist ein EM-*grid* im Autogridring und anzubringendem Clipping. (B) Offenes FIB-*Shuttle* mit zwei geladenen EM-*grids*. (C) Für den Transfer geschlossenes FIB-*Shuttle*. (D) Beladenes FIB-*Shuttle* im Rasterelektronenmikroskop (REM; engl. *scanning electron microscope*, SEM). Senkrecht von oben trifft der zur Bilderzeugung verwendete Elektronenstrahl (blau) auf die Probe. Von schräg links trifft in flachem Winkel ein fokussierter Galliumionenstrahl (rot) auf die Probe, um einen *Wedge* in die Probe zu schneiden. (E) Ausgewählte Probenstelle, an der ein *Wedge* geschnitten werden soll. Das Probenmaterial in dem rot eingefärbten rechteckigen Bereich wird entfernt. (F) Blick auf die obere *Wedge*-Kante an der linken Seite des eingebrachten Loches in der Probe.

Aufnahme von Kippserien im Kryotransmissionselektronenmikroskop

Von den langsam gewachsenen *E. coli*-Zellen wurden mit dem 300 kV Elektronenmikroskop (FEI Tecnai Polara) mit Energiefilter (Gatan Inc. GIF 2002) und CCD-Kamera (2k x 2k) Einachsenkippserien unter Kryobedingungen aufgenommen. Der Energiefilter ließ nur Elektronen in einem engen Bereich (20 eV) passieren, sodass Bilder mit hohem Kontrast aufgenommen wurden. Für die Aufnahme eines Bildes werden vier Schritte durchgeführt: (i) Kippen der Probe, (ii) Kompensation der Bildwanderung, (iii) Fokussierung und (iv) Aufnahme des Bildes / der Bilderserie (Abb. 20). Beim Kippen der Probe, kann sich die Probenposition verändern. Um diese Veränderung zu korrigieren, wurde ein Bild auf der „Verfolgerstelle“ (engl. *Tracking*) aufgenommen und mit dem vorherigen *Tracking*-Bild verglichen. Dann wurden mehrere Bilder auf der Fokusstelle aufgenommen und der gewählte Fokus eingestellt (engl. *focus*). Schließlich wurde

auf der Probenstelle das Bild bzw. die Bilderserie von der Probe aufgenommen. Die Probenstelle wird auch als Aufnahmebereich (engl. *exposure*) bezeichnet. Durch die Trennung der *Tracking*- und *Focus*-Stelle von der *Exposure*-Stelle konnte die auf die Probe applizierte Elektronendosis reduziert werden ¹¹¹. *Tracking*-, *Focus*- und *Exposure*-Stelle sollten nach Möglichkeit entlang der Kippachse liegen (Abb. 20), um Verschiebungen zu minimieren. Meist werden *Tracking*- und *Focus*-Stelle identisch gewählt. Diverse Software-Programme, wie TOM ⁸⁴ oder SerialEM ⁸³ ermöglichen die automatisierte Aufnahme von Tomogrammen, indem diese vier Schritte iterativ ausgeführt werden.

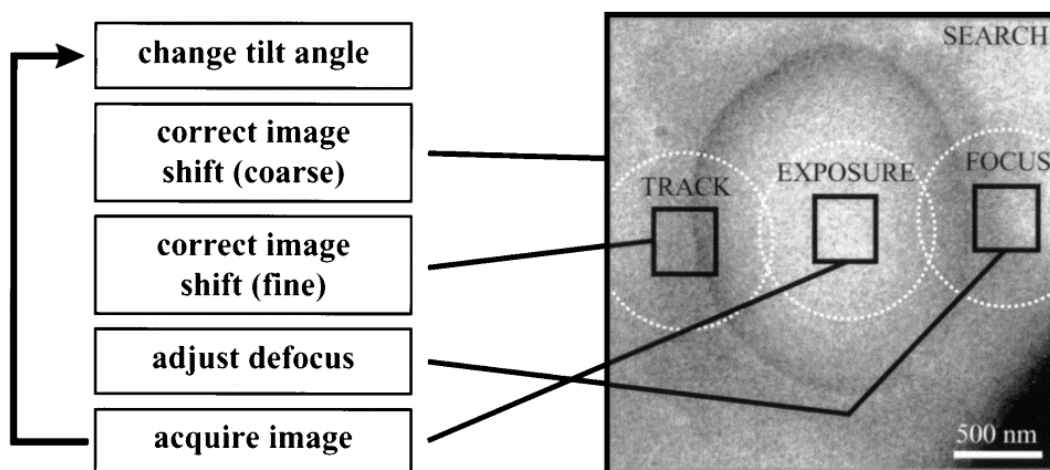


Abb. 20. **Automatisierte Datenaufzeichnung bei der CET** ¹¹¹. Vier Schritte wurden pro Kippwinkel durchgeführt: (i) Kippen der Probe, (ii) Kompensation der Bildwanderung, (iii) Fokussierung und (iv) Aufnahme des Bildes. Die Positionierung von *Tracking*-, *Focus*- und *Exposure*-Stelle entlang der Kippachse wird gezeigt.

Kippserien von den langsam wachsenden *E. coli*-Zellen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 300 kV, bei 18.000-facher Vergrößerung mit einer ungebinnten Pixelgröße von 0,713 nm/px in einem Kippwinkelbereich von $\pm 60^\circ$, mit einem Winkelinkrement von 2° , bei einem Defokus von $-9 \mu\text{m}$ und einer Gesamtdosis von $100 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ aufgenommen.

Aufnahme von Zweiachsenkippserien im Kryotransmissionselektronenmikroskop

Die am FIB vorbereiteten *Autogrids* wurden unter Kryobedingungen in das FEI Titan Kryo-TEM geladen, welches Zweiachsenkippserien erlaubt. Kippserien von *E. coli*-Zellen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 300 kV, bei 42.000-facher Vergrößerung mit einer ungebinnten Pixelgröße von 0,342 nm/px in einem Kippwinkelbereich von $\pm 60^\circ$, mit einem Winkelinkrement

von 2° , bei einem Defokus von $-5 \mu\text{m}$ und einer Gesamtdosis pro Kippserie von $\sim 50 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ aufgenommen. Die Bildanzahl (N_B) pro Kippserie mit einem Kippwinkelbereich (β_{max}) von 60° und einem Kippwinkelinkrement ($\Delta\beta$) von 2° beträgt nach Formel (7) 61 Bilder. Werden die im Defokus aufgenommenen Bilder nicht CTF korrigiert, so begrenzt der gewählte Defokuswert die maximal erreichbare Auflösung⁷⁰. Für die zweite Kippserie wurde nach der Aufnahme der ersten Kippserie das *Autogrid* im Probenhalter des Kryo-TEMs um 90° gedreht. Dann wurde von derselben *E. coli*-Zelle eine zweite Kippserie mit den gleichen Einstellungen wie bei der ersten Kippserie aufgenommen (Abb. 21).

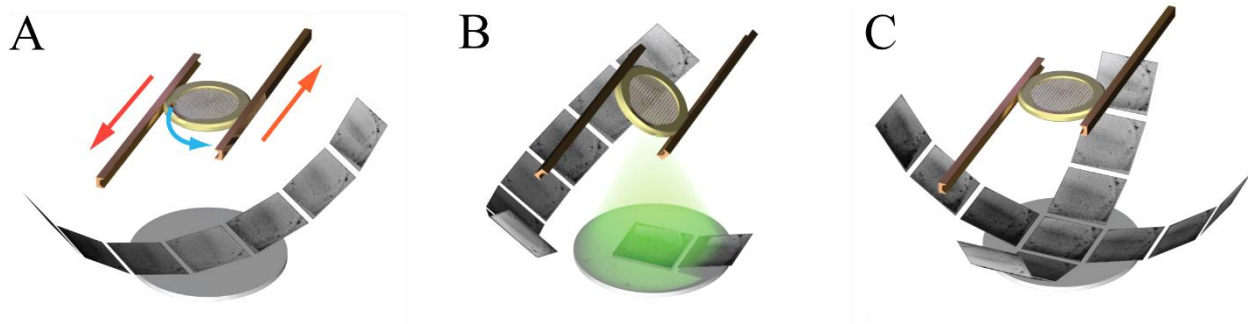


Abb. 21. **Doppelkippachsentomographie** (modifizierte Bilder aus Film von Dr. Julio Ortiz). (A) Nach der Aufnahme der ersten Kippserie wird das *grid* im Elektronenmikroskop durch entgegengesetzte Bewegung der Probenaufnahme (rote Pfeile) um 90° rotiert (blauer Pfeil). (B) Aufnahme der zweiten Kippserie. (C) Orthogonale Kippserien einer Doppelkippachsentomographie.

2.3.4 Computerbasierte Prozessierung

Als Basis für die Datenprozessierung wurden Linux-Rechner sowie Linux-Cluster des MPI für Biochemie verwendet. Es wurden hauptsächlich das Tom Software Paket⁸⁴, PyTom Software⁹⁰, Imod⁸³ sowie Matlab¹¹² verwendet. Für die Visualisierung von Elektronendichtekarten wurden EM¹¹³, Eman¹¹⁴, Amira¹¹⁵, Chimera¹¹⁶ bzw. 3dsMax¹¹⁷ verwendet. Gespeichert wurden alle Daten für ein Tomogramm in einem fortlaufend nummerierten Ordner. Relevante Datenprozessierungsergebnisse wurden in entsprechenden Unterordnern in dem nummerierten Hauptordner gespeichert. Die beiden Kippserien einer Doppelkippachsen-tomographie wurden zunächst als einzelne Kippserien behandelt.

2.3.4.1 Alignierung einer Bilderserie

Die aufgenommene Bilderserie für einen Kippwinkel wurden mit dem Tom Software Paket ⁸⁴ aligniert. Einzelbilder von besonders schlechter Qualität bzw. mit fehlerhaften Bereichen, wurden ganz aus der Bilderserie entfernt. Anschließend wurden die rechteckigen 2D Projektionen auf ein quadratisches Format mit einer Kantenlänge von 3712 px zugeschnitten und im EM-Format gespeichert. Außerdem wurde eine Histogrammkorrektur vorgenommen, um den Kontrast in den 2D Projektionen zu verbessern ¹¹⁸. Die Bilder der zweiten Kippserie wurden um 90° bezüglich zur ersten Kippserie rotiert, um in der für die Rekonstruktion geeigneten Position vorzuliegen. Abschließend wurde noch eine CTF-Korrektur der 2D Projektionen durchgeführt und die korrigierten Projektionen in einem eigenen Ordner separat gespeichert.

2.3.4.2 Tomogramm Rekonstruktion

In den alignierten 2D Projektionen einer Kippserie wurden Goldmarker mit der Imod-Software ⁸³ manuell identifiziert. Die alignierten 2D Projektionen einer Kippserie wurden mithilfe der identifizierten Goldmarker aligniert. Die daraus resultierende Markerdatei wurde ins EM-Format umgewandelt. Für eine erste Beurteilung des Tomogramms wurde eine Rekonstruktion mit Imod durchgeführt und gespeichert. Dann wurde mit dem Tom Software Paket und der Markerdatei das Tomogramm rekonstruiert. Vor der Rekonstruktion wurden die Markerpositionen bezüglich Rotations- und Vergrößerungsänderung optimiert. Im optimalen Fall sollten die Marker gleichmäßig im Tomogramm verteilt sein, damit die Alignierung über das gesamte Tomogramm gleich ist. Tatsächlich jedoch nimmt die aufgenommene *E. coli*-Zelle einen Großteil des Tomogramms ein, sodass für die Marker nur am Rand der Zelle Platz ist. Deshalb ist die Alignierung für Bereiche, die weiter von den Markern entfernt liegen etwas ungenauer. Die Verwendung der Tom Software ermöglicht im Gegensatz zu Imod eine Rekonstruktion mit gewichteter Rückprojektion. Die Tomogramme wurden dreifach gebinnt rekonstruiert und in z-Richtung geschnitten. Das Schneiden in z-Richtung verkleinert das Volumen auf die Probengröße und beschleunigt damit nachfolgende Prozessierungsschritte. Die beiden Kippserien einer Zweiachsenkippserie wurden zunächst getrennt voneinander rekonstruiert. Dann wurden die beiden Tomogramme einer Zweiachsenkippserie mithilfe von Alignierungsparametern aus Imod überlagert und die Überlagerung mit dem Tom Software Paket verfeinert.

2.3.4.3 Maskenerstellung

Im Tomogramm wurde das Zytosol der *E. coli*-Zelle, welches die gesuchten Ribosomen enthält, mit der Amira-Software ¹¹⁵ manuell segmentiert. Für Tomogramme der langsam wachsenden *E. coli*-Zellen wurde auch die innere Membran segmentiert. Diese zeitaufwendig erzeugten Masken wurden im *mrc*-Format gespeichert. Mithilfe der Zytosolmaske konnte der Suchbereich für die anschließende Mustererkennung eingeschränkt werden. Dadurch verkürzte sich die Rechenzeit, welche für die Mustererkennung aufgewendet werden musste. Außerdem konnte anhand der Maske und der Voxelgröße das Volumen des Zytosols bestimmt werden.

2.3.4.4 Modell der inneren Membran

In den Tomogrammen von den langsam wachsenden *E. coli*-Zellen sind die Zellmembranen wegen des *Missing Wedge* nicht durchgängig zu erkennen. Eine *E. coli*-Zelle besitzt eine stabförmige Morphologie ¹⁰⁹, sodass die Zellmembran im Querschnitt senkrecht zur Längsachse der Zelle fast kreisrund ist. Mithilfe eines entwickelten Matlab-Skripts ¹¹² wurde in den Querschnitten senkrecht zur Längsachse entlang der Zelle eine Ellipse in die vorhandene Segmentierung der inneren Zellmembran eingepasst. Durch Zusammenfügen der einzelnen Ellipsen wurde ein vollständiges Modell der inneren Zellmembran einer *E. coli*-Zelle erhalten, welches später zur Abstandsberechnung der Ribosomen zur inneren Membran verwendet werden konnte.

2.3.4.5 Mustererkennung

In den rekonstruierten Tomogrammen (Abb. 38) waren die Ribosomen als nahezu kugelförmige schwarze Objekte zu erkennen. Deshalb wurden zunächst die Ribosomen durch eine computerbasierte Suche mit einer Kugel in der Größe des 70S Ribosoms gesucht. Anschließend wurde parallel dazu eine Suche mit der bereits bekannten 70S Ribosomenstruktur durchgeführt. Die Suche nach Ribosomen wurde nur im Zytosol durchgeführt, welches durch die erstellte Maske festgelegt wurde.

Geometrische Mustererkennung

Das Erscheinungsbild der 70S Ribosomen in dem dreifach gebinnten Tomogramm als dunkle Kugel ermöglicht es die Ribosomen mittels geometrischer Mustererkennung (engl. *Sphere Masking*) zu lokalisieren. Dazu wurde ein Matlab-Skript auf Grundlage einer Skalierungsindex basierten Segmentation (engl. *scaling index based segmentation*, SIBS) entwickelt ⁸⁷. Zunächst wurde eine Kugel mit entsprechendem Radius (in Voxel) vorgegeben, mit der dann im Tomogramm nach Übereinstimmungen mit dunklen Voxeln gesucht wurde. Der benötigte Radius (r_R) konnte aus dem Durchmesser des Ribosoms (d_R), dem Binningfaktor (b) und der ungebinnten Voxelgröße (p) berechnet werden.

$$(10) \quad r_R = \frac{d_R}{2(p \times 2^b)} = \frac{25nm}{2(0,342nm/vx \times 2^3)} = 4,6vx$$

Mustererkennung mit bekannter Struktur

Die Struktur des 70S Ribosoms wurde durch Röntgenbeugungsanalyse aufgedeckt ¹. Die bekannte 70S Ribosomenstruktur wurde auf eine niedrigere Auflösung (3 nm), ähnlich der im rekonstruierten Tomogramm zu erwartenden Auflösung gefiltert. Außerdem wurde die Voxelgröße, des als Referenz dienenden gefilterten 70S Ribosoms an die Voxelgröße im dreifach gebinnten Tomogramm (2,74 nm/vx) angepasst. Die Lokalisation der 70S Ribosomen wurde mithilfe der PyTom-Software ⁹⁰ durchgeführt. Für die Mustererkennung (engl. *Template Matching*) wurden dem PyTom-Skript folgende Parameter vorgegeben: Speicherort von Tomogramm, Referenz, Maske und Winkeldatei. Anhand der Winkeldatei wurde die Abtastung durchgeführt. Außerdem wurde die Lage der Kippachsen, sowie der *Missing Wedge* für beide Kippserien einer Doppelkippachsantomographie angegeben. Als Ergebnis des *Template Matchings* wurden zwei Volumen, mit gleicher Größe wie das rekonstruierte Tomogramm erhalten. Die Voxelwerte des einen Volumens haben die berechneten Kreuzkorrelationswerte, die des anderen Volumens die gefundenen Winkel, welche die Orientierung des gefundenen Ribosoms beschreiben, beinhaltet. Mit einem Matlab-Skript konnten die Ergebnisse des *Template Matchings* in eine Liste konvertiert werden, welche die Nummer des gefundenen Partikels, dessen Kreuzkorrelationswert, die Partikelposition im Tomogramm (x-, y-, z-Koordinate in Voxel), sowie dessen Orientierung (Winkel: φ , ψ und θ in Grad) enthält. Diese Liste wurde als „Motivliste“ (engl. *motive list*) bezeichnet. Da die erhaltenen Kreuzkorrelationswerte allein nicht erkennen ließen, bis zu welchem

Wert die Ribosomen richtig erkannt worden waren, wurde ein zweites *Template Matching*, diesmal mit dem gespiegelten Tomogramm und der 70S Ribosomenreferenz, durchgeführt. Das 70S Ribosom ist ein heterogenes Makromolekül und besitzt keine interne Symmetrie ¹. Das gespiegelte Tomogramm enthält nur gespiegelte Ribosomen. Die Kreuzkorrelationswerte für die gespiegelten 70S Ribosomen, im gespiegelten Tomogramm, waren generell niedriger, als die Kreuzkorrelationswerte für die richtigen 70S Ribosomen, im ursprünglichen Tomogramm. Ribosomen können anhand der Kreuzkorrelationskurven identifiziert werden.

Für die sich anschließende Rekonstruktion von Untervolumen wurden die beiden angewendeten Mustererkennungsmethoden kombiniert. Das *Sphere Masking* findet die Ribosomen ohne die Verwendung einer Referenz, welche detaillierte Strukturinformationen enthält. Allerdings wurde die Kugel nicht immer genau über der tatsächlichen Mitte des Ribosoms platziert. Deshalb wurde zur genauen Zentrierung des detektierten Ribosoms das Zentrum aus dem *Template Matching* verwendet. Dazu wurde innerhalb der Kugel, die ein Ribosom markiert, nach dem höchsten Kreuzkorrelationswert gesucht, der dann die Mitte des gefundenen Ribosoms festlegt. Das initiale Auffinden eines Ribosoms wurde ohne die Verwendung von *a priori* Strukturinformation erreicht.

2.3.4.6 Abstandsberechnung

Um die Verteilung der gefundenen Ribosomen in einer *E. coli*-Zelle zu beschreiben konnte die innere Zellmembran als Anhaltspunkt verwendet werden. Mit einem Matlab-Skript ¹¹² konnte der kürzeste Abstand der Ribosomen zur inneren Zellmembran auf Grundlage der Positionen der Ribosomen und der Lage des Modells der inneren Zellmembran bzw. der äußeren Grenze der Zytosolmaske berechnet werden. Eine weitere Möglichkeit den Abstand der gefundenen Ribosomen zur inneren Membran zu bestimmen, konnte anhand der Zytosolmaske, einer erweiterten Zytosolmaske und den Positionen der Ribosomen ermittelt werden. Dazu wurde die Zytosolmaske manuell an den Grenzen erweitert, an denen keine innere Membran lag. Dann wurden mit einer Standard Matlab-Funktion („*bwdist*“) die Abstände jedes Maskenpunkts der erweiterten Zytosolmaske zum Maskenrand bestimmt. Nun konnte eine Maske erzeugt werden, die nur Maskenpunkte mit einem Abstand bis zu 25 nm von der Maskengrenze enthielt. Durch Multiplikation der Zytosolmaske mit der erzeugten 25 nm-Maske wurde eine Maske erzeugt,

welche nur Bereiche in Membrannähe enthielt. Dann konnten mithilfe der Ribosomenpositionen die Ribosomen in Membrannähe ausgewählt werden.

2.3.4.7 Rekonstruktion von Untervolumen

Nachdem die Positionen der Ribosomen im Tomogramm bekannt waren wurden diese genauer betrachtet. Alle folgenden Prozessierungsschritte wurden in Matlab¹¹² mit selbst entwickelten Tom-Skripten⁸⁴ durchgeführt. Dazu wurden einfach gebinnete kubische Untervolumen mit festgelegter Größe (Kantenlänge 128 vx und Voxelgröße 0,684³ nm/vx) um die gefundenen Ribosomen herum rekonstruiert. Die Rekonstruktion der Untervolumen wurde für beide Kippserien einer Doppelkippachsantomographie getrennt durchgeführt. So konnten die beiden rekonstruierten Untervolumen für ein Partikel aufeinander aligniert werden. Bei der Alignierung wurde lediglich eine Translationsanpassung vorgenommen. Dabei wurden nur die Untervolumen der zweiten, um 90° rotierten Kippserie verschoben. Die Alignierung konnte so von der begrenzten Zahl an Goldmarkern am Rand der *E. coli*-Zellen durch die Verwendung der Untervolumen auch auf die zytoplasmatischen Bereiche des Tomogramms erweitert werden. Da die Ribosomen, welche die Zentren der Untervolumen bilden, über die gesamte *E. coli*-Zelle verteilt sind (vgl. Abb. 35) ist das auf Untervolumen basierende Alignment quasi ubiquitär für ein Tomogramm im Bereich der tomographierten *E. coli*-Zelle. Die Untervolumen der zweiten Kippserie wurden um die durch die Translation neu gefundenen Zentren nochmal rekonstruiert. Dann wurden unter Berücksichtigung der *Missing Wedges*, die ebenfalls mit den gefundenen Translationen optimiert worden waren, die zueinander gehörenden Untervolumen zusammengeführt. Die Alignierung wurde nun nochmals zwischen den Untervolumen der ersten Kippserie und den optimierten Untervolumen der zweiten, um 90° gedrehten Kippserie durchgeführt. Die aus der Alignierung ermittelten Translationen sollten für benachbarte Untervolumen ähnlich sein. Als benachbart wurden Untervolumen innerhalb eines 25 vx umfassenden Radiuses im rekonstruierten Tomogramm angesehen. Translationen von Untervolumen, die von denen benachbarter Untervolumen stark abwichen wurden durch die gemittelte Translation der benachbarten Untervolumen ersetzt. Die abschließend optimierten Translationen, welche auf die optimierten Untervolumen der zweiten um 90° gedrehten Kippserie anzuwenden waren, wurden in einer Liste gespeichert. Dann wurden unter Berücksichtigung der Translationen aus der Optimierung sowie

der *Missing Wedges*, welche ebenfalls mit den gefundenen Translationen optimiert worden waren, die zueinander gehörenden Untervolumen erneut zusammengeführt. Aus den zusammengeführten Untervolumen wurde ein Gesamtvolumen zusammengesetzt, welches die gesamte untersuchte *E. coli*-Zelle umfasst. Mit diesem neu zusammengesetzten Volumen wurde das *Template Matching* nochmals wiederholt, um die optimierten Orientierungen der gefundenen Ribosomen zu erhalten.

2.3.4.8 Alignierung

Referenz basierte Alignierung

Bei der Referenz basierten Alignierung wurde die bekannte Struktur des zu untersuchenden Zielmoleküls verwendet, um die Zielmoleküle in den Untervolumen zu alignieren. Dem PyTom-Alignierungsprogramm wurden in einer *xml*-Datei die Informationen zu den Untervolumen, die Referenz, eine Maske, der Partikeldurchmesser des Zielmoleküls (in Å) und die Voxelgröße der Untervolumen und der Referenz (in Å³/vx) zur Verfügung gestellt. Zu jedem Untervolumen wurde der Speicherort, Winkel (ϕ , ψ und θ) und Translationskoordinaten (x-, y- u. z-Koordinaten) aus dem *Template Matching*, sowie die *Missing Wedges* für beide Kippserien des Doppelkippachsentomogramms angegeben. Ferner wurden Programmparameter festgelegt, wie Anzahl an durchzuführender Wiederholungen des Alignments (meist 10 Iterationen), die Maximal zulässige Verschiebung (10 Voxel), das Abtastungswinkelinkrement (3 Grad) und die Frequenzgrenzen für den Bandbreitenfilter (30 Å⁻¹). Der verwendete Bandbreitenfilter (engl. *band pass*) war ein sogenannter Tiefpassfilter, der hohe Frequenzen, ab der angegebenen Frequenz abschnitt. So konnte der Einfluss des hochfrequenten Rauschens auf die Auflösung minimiert werden ⁷¹. Für jede Iteration wurden für die gefundenen Alignierungsparameter eine gemittelte Struktur, die tiefpassgefilterte Struktur und die invertierte und gefilterte Struktur gespeichert. Außerdem wurde die bestimmte Auflösung (in Å) für die gemittelte Struktur in den Dateinamen der Struktur geschrieben. Zusätzlich wurden für jede Iteration die *Missing Wedges*, FSC-Werte und eine aktualisierte Skriptdatei geschrieben. Die FSC-Werte für gerade und ungerade Partikelnummern wurden für die Auflösungsrechnung benötigt. Die aktualisierte Skriptdatei für die Iteration ermöglichte die Fortsetzung der Alignierung, wenn die Anzahl an Iterationen erhöht werden sollte, oder die Alignierung, z.B. nach einem Clusterneustart, abgebrochen wurde ⁹⁰.

Referenzfreie 3D Alignierung

Bei dem verwendeten PyTom-Skript für die referenzfreie 3D Alignierung wurde eine initiale Referenz durch Mittelung von 10 % der Zielmoleküle in den Untervolumen erzeugt. Bei der referenzfreien 3D Alignierung werden zunächst die Untervolumen aligniert und danach die alignierten Untervolumen 3D gemittelt. Diese beiden Schritte werden bis zu einer vorgegebenen Grenze wiederholt. Das PyTom-Skript für die referenzfreie 3D Alignierung benötigte dieselben Informationen, wie das PyTom-Skript für Referenz basierte Alignierung. Als Referenz für die referenzfreie 3D Alignierung wurde die durch Mittelung erzeugte initiale Referenz verwendet. Die Informationen zu den Untervolumen wurden allerdings in einer separaten *xml*-Datei bereitgestellt, der sogenannten Partikelliste. Für jede Iteration wurden für die gefundenen Alignierungsparameter eine gemittelte Struktur und die tiefpassgefilterte Struktur gespeichert. Die für die gemittelte Struktur bestimmte Auflösung (in Å) wurde in den Dateinamen der Struktur geschrieben. Zusätzlich wurden für jede Iteration die FSC-Werte und eine aktualisierte Partikelliste geschrieben.

91

2.3.4.9 Klassifizierung

Die in einer Zelle beobachteten Zielmoleküle befanden sich in vielen unterschiedlichen Situationen. Um eine hochaufgelöste Struktur des Zielmoleküls zu erhalten war es ausschlaggebend, nur sehr ähnliche Zielmoleküle zu mitteln. Dazu wurden ähnliche Zielmoleküle in Klassen zusammengefasst und gemittelt. Die Klassifizierung der Zielmoleküle wurde mit der PyTom-Software ⁹⁰ durchgeführt. Die Rechenoperationen waren wie bei der Alignierung parallelisiert, sodass diese auf einem Computercluster ausgeführt werden konnten und weniger Rechenzeit benötigten. Ein auf dem Computercluster ausführbares Skript enthielt die benötigten Informationen, wie zu verwendendes PyTom-Skript (*calculate_correlation_matrix.py*), Partikelliste, Maskenspeicherort und Grenzfrequenz für den Bandbreitenfilter (30 \AA^{-1}). Die Partikelliste enthielt die Informationen zu den Untervolumen, wie in Punkt 2.3.4.8 beschrieben. Das Ergebnis ist eine Korrelationsmatrix im *csv*-Format, die jedes Zielmolekül eines Untervolumens, mit allen Untervolumen aus der Partikelliste verglich. Die Größe der Korrelationsmatrix ($N \times N$) entsprach der Anzahl an Partikeln in der Partikelliste (N). Die erzeugte Korrelationsmatrix konnte mit einem PyTom-Skript (*classifyCPCA.py*) ausgelesen werden. Dieses Skript benötigte die Partikelliste, den

Namen für die zu erzeugende Ausgabedatei im *xml*-Format, die Korrelationsmatrix, die Anzahl an zu verwendenden Eigenvektoren (10 Eigenvektoren), die Anzahl an zu erzeugenden Klassen und den Namen für die zu erzeugenden Klassenmittelungen. In dieser Arbeit wurden zehn oder mehr Klassen, abhängig von der Anzahl an Partikeln in der Partikelliste gewählt. Die Anzahl an Partikeln pro Klasse ließ sich abschätzen, indem der Quotient aus Anzahl der zu klassifizierenden Partikel und Klassenanzahl gebildet wurde. Es wurde eine Partikelliste erzeugt, die für jedes klassifizierte Partikel einen Eintrag für die zugeordnete Klasse enthielt. Außerdem wurden für jede Klasse das ungefilterte (Klassenmittelname_ Klassennummer.em) und das tiefpassgefilterte (Klassenmittelname_ Klassennummer_bp.em) Klassenmittel erzeugt. Das PyTom-Skript „extractClassesFrom ParticleList.py“ führte ausgewählte Klassen in einer neuen Partikelliste zusammen. Für dieses PyTom-Skript wurden die Partikelliste mit Klassennummern, die Nummern der Klassen, welche zusammengeführt werden sollten und der Name für die neue Partikelliste benötigt.

Die Anzahl der zu klassifizierenden Partikel war begrenzt, da die Korrelationsmatrix im Arbeitsspeicher gelesen und verarbeitet werden musste und daher nicht beliebig groß werden konnte. Ab einer Partikelanzahl von mehr als 10.000 Partikeln pro Partikelliste, wurde diese in zwei annähernd gleich große Partikellisten unterteilt und die Klassifizierung getrennt durchgeführt. Um anschließend die erhaltenen Klassen der beiden Klassifizierungen miteinander zu vergleichen konnte ein hierarchisches Clustering herangezogen werden. Das hierarchische Clustering wurde mit einem Matlab-Skript (tree_cluster.m) durchgeführt. Dazu wurden die Klassenmittel, die miteinander verglichen werden sollten, mit fortlaufender Nummer am Dateinamenende in einen Unterordner im Arbeitsverzeichnis kopiert. Im „tree_cluster.m“-Skript wurden die Parameter editiert. Es wurden unter anderem der Pfad zu den Klassenmitteln, deren Format (.em), die Anzahl der Klassenmittel, der Pfad zur verwendeten Maske, die Grenzfrequenz für den Bandbreitenfilter (30 \AA^{-1}), der Ausgabeordner und der Grenzwert für das hierarchische Clustering festgelegt. Im Ausgabeordner wurden eine Matlab-Datei mit allen Ergebnissen und eine Textdatei mit der Reihenfolge der Klassennummern gespeichert. Außerdem wurde in Matlab automatisch ein Dendrogramm angezeigt, welches auch als Bilddatei gespeichert werden konnte. Klassen, die anhand des Dendrogramms zusammengeführt werden sollten, konnten mit dem PyTom-Skript „extractClassesFromParticleList.py“, wie oben beschrieben, in einer Partikelliste zusammengefasst werden.

Das nachfolgende Schema (Abb. 22) zeigt die Schritte der optimierten Datenprozessierung.

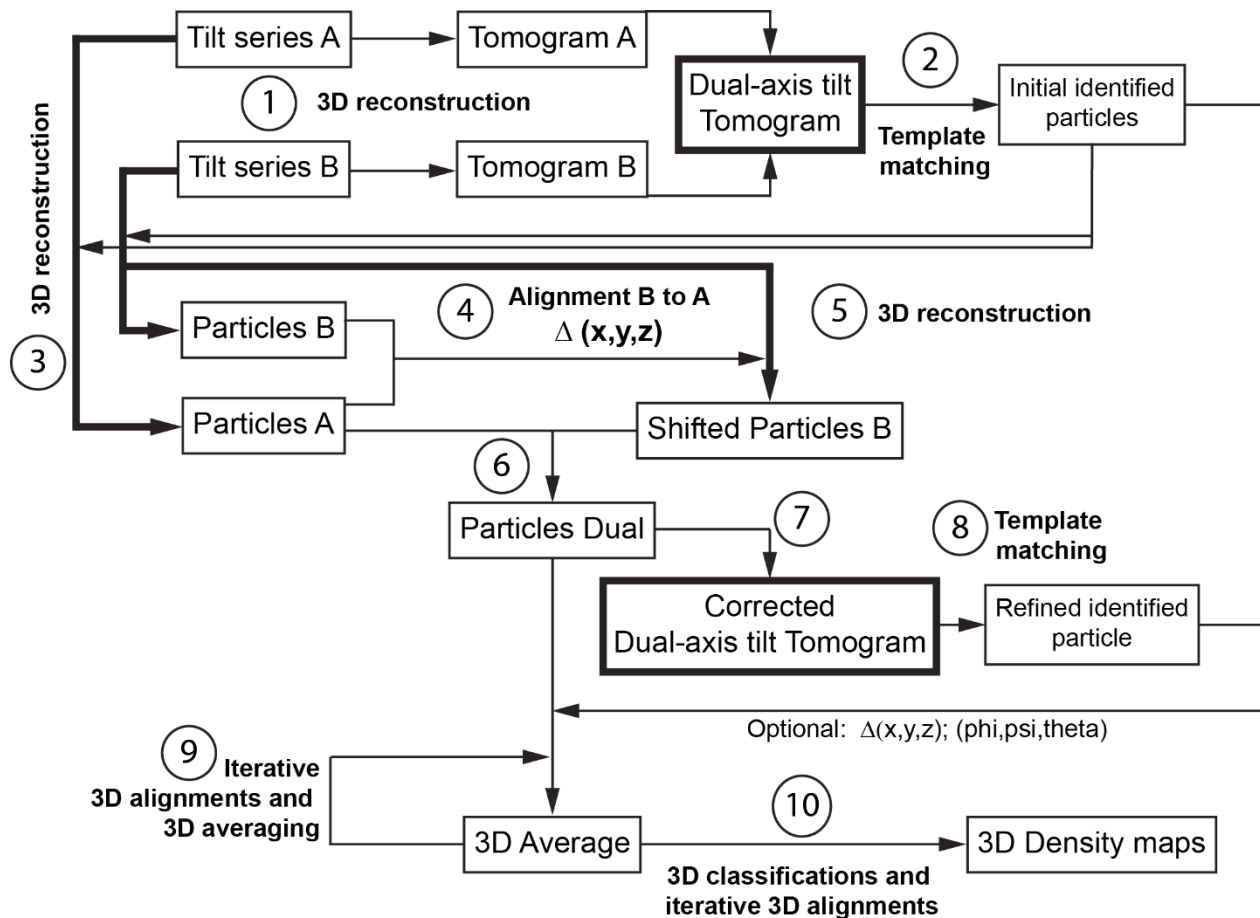


Abb. 22. **Prozessierungsübersicht.** Das Diagramm zeigt den optimierten Prozessierungsverlauf. Zunächst wurden die beiden Kippserien rekonstruiert und danach zusammengeführt (①). Anschließend wurden mittels Kombination aus *Sphere-* und *Template Matching* die Ribosomen im Tomogramm lokalisiert (②). Danach wurden kubisch Untervolumen um die gefundenen Ribosomen für die beiden Kippserien (A und B) einer Zweiachsenkippsreihe rekonstruiert (③). Die Partikel der zweiten Kippserie (B) wurden auf die der Ersten (A) aligniert (④). Mit den gefundenen Verschiebungen (engl. *shifts*) wurden die Partikel der zweiten Kippserie (B) neu rekonstruiert (⑤). Die neu rekonstruierten Partikel (B *shifted*) wurden mit den Partikeln der ersten Kippserie (A) zusammengeführt (⑥). Aus den zusammengeführten Partikeln („*dual*“) wurde das korrigierte Tomogramm der Zweiachsenkippsreihe aufgebaut (⑦). Das *Template Matching* konnte mit dem korrigierten Tomogramm wiederholt werden, um verbesserte Winkel für die Orientierung der Ribosomen zu erhalten (⑧). Die gefundenen Ribosomen konnten nun iterativ aligniert und gemittelt werden, um eine 3D Dichte der gemittelten Ribosomen zu erhalten (⑨). Durch anschließende wiederholte Klassifikationen und Alignierungen konnten die Ribosomen gemäß den gesetzten Schwerpunkten analysiert werden (⑩)

2.3.4.10 Konzentrationsbestimmung

Die Ribosomenkonzentration (c_R) in einer tomographierten *E. coli*-Zelle wurde aus der Anzahl an Ribosomen (N_R) und dem Volumen des segmentierten Zytoplasmas (V_Z) berechnet.

$$(11) \quad c_R = \frac{N_R}{V_Z}$$

Die Ribosomenanzahl wurde anhand der beim *Template Matching* richtig erkannten Ribosomen aus den erstellten Graphen abgelesen. Dazu wurden nur Ribosomen aus dem ursprünglichen Tomogramm ausgewählt, die vor dem Schnittpunkt der Kreuzkorrelationskurven lagen. Aus der manuell erstellten Maske für das Zytoplasma konnte deren Volumen ermittelt werden, welches für die Ribosomenkonzentrationsberechnung benötigt wurde.

2.3.4.11 Topologische Analyse

Bei der topologischen Analyse wurden die Distanzen, die relativen Positionen und die gegenseitige Orientierung von Partikeln untersucht. Grundlage hierfür waren die Position im Tomogramm und die Orientierung, bezüglich einer Referenz der zu untersuchenden Partikel. Die Partikelposition wurde aus der Mustererkennung erhalten und konnte durch eine Alignierung auf eine Referenz verbessert werden. Die Orientierung wurde durch drei Winkel (φ , ψ und θ) beschrieben. Durch die Rotationen des Partikels um die angegebenen Winkel wurde das Partikel in die Orientierung der Referenz überführt. Dabei beschrieb der Winkel φ eine Rotation um die z-Achse, der Winkel ψ um die x' -Achse und der Winkel θ um die z'' -Achse. Die Kennzeichnung „‘“ bezeichnete die neue Achse nach einer ausgeführten Rotation. In dieser Arbeit wurden die 70S Ribosomen von *E. coli*-Zellen analysiert. Ribosomen können eine höher geordnete Konformation ausbilden, die Polyribosomen. Mit dem etablierten Algorithmus, der die Verteilung des nächsten Nachbarn (engl. *next neighbour distribution*, NND) beschreibt², konnten die Ribosomen analysiert werden. Bei der NND konnte der nächste Nachbar eindeutig durch einen Distanzvektor und einen relativen Winkelsatz, bestehend aus drei Winkeln: φ , ψ und θ beschrieben werden. Der Distanzvektor beschrieb die Entfernung vom Schwerpunkt des zentralen Ribosoms hin zum Schwerpunkt des Nachbarribosoms. Des Weiteren wurde anhand der Partikellisten für Ribosomen die durchschnittliche Zahl an Nachbarribosomen eines jeden Ribosoms berechnet. Anschließend

wurde der Abstand für das nächstgelegene Nachbarribosom, sowie der Abstand zu allen Nachbarribosomen ermittelt.

Zusätzlich wurden anhand der Partikel- (0), „Motiv“-listen (0) für Ribosomen, welche u.a. die Informationen über die Positionen und Orientierungen der gefundenen Ribosomen enthalten, Polysomen mit einer graphbasierten PyTom-Software gesucht ¹¹⁹. Dabei wird die 3D Anordnung benachbarter Ribosomen analysiert und basierend auf Vorkenntnissen aus Untersuchungen von Polysomen ein möglicher mRNA-Verlauf vorgeschlagen.

2.3.4.12 Lokale Auflösung

Die lokale Auflösung wurde mit dem Programm „Bsoft“ ermittelt ¹²⁰. Für das Programm Bsoft wurden folgende Parameter benötigt: Die Boxgröße, sie betrug meist 1/8 der Untervolumengröße (hier $128 \text{ vx} : 8 = 16 \text{ vx}$), die Ausgabeoption („verbose 7“), die Voxelgröße in Ångström ($6,84 \text{ Å vx}^{-1}$), eine Maske, welche den Bereich in dem die lokale Auflösung berechnet wurde festlegt, die maximal zu erwartende Auflösung in Ångström (20 Å), die FSC, für welche die Auflösung bestimmt werden sollte (0,5), die beiden Halbdatensätze für „gerade“ und „ungerade“ Partikel und den Ausgabedateinamen mit Pfad.

2.3.4.13 Prozessierung für GroEL/ES

Die Prozessierung für GroEL/ES wurde für vier Tomogramme (T2, T5, T16, T17) durchgeführt. Auf Grundlage der alignierten Untervolumen der Ribosomenprozessierung wurde ein zweifach gebinntes Gesamtvolumen, welches die gesamte tomographierte *E. coli*-Zelle umfasste analog zu 2.3.4.7 erstellt. Anhand der Partikelliste für Ribosomen wurden diese aus dem zweifach gebinnten Gesamtvolumen durch eine Kugel mit gemittelter Hintergrunddichte ersetzt. Das Matlab-Skript zum Ersetzen von Partikeln in Tomogrammen durch manuell selektierte gemittelte Grauwerte wurde von Florian Beck zur Verfügung gestellt. In dem resultierenden, um die Ribosomen bereinigten Gesamtvolumen wurde ein *Template Matching* mit der Struktur des asymmetrischen GroEL-GroES-(ADP)7-Chaperonin-Komplex („Gewehrkegelform“, engl. *bullet*, PDB 1AON ¹²¹) durchgeführt. Aus den ersten 500 möglichen GroEL/ES-Partikeln wurde visuell eine Vorauswahl

durchgeführt. Dann wurden die ausgewählten möglichen GroEL/ES-Partikel für die beiden Kippserien einer Doppelkippachsenteomographie getrennt rekonstruiert, analog zu den Ribosomen. Anschließend wurden zusammengehörende GroEL/ES-Partikel aufeinander aligniert. Die resultierenden GroEL/ES-Partikel wurden referenzfrei 3D aligniert, klassifiziert und ausgewählte Klassen referenzfrei 3D aligniert.

2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die mit dem Fluorophor mEos2 markierten kleinen ribosomalen Untereinheiten von B21 *E. coli*-Zellen mit MtlA-Fragment wurden mittels Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie von Dr. Fredrik Persson in der Arbeitsgruppe von Prof. Johan Elf in Uppsalla (Schweden) lokalisiert. Dazu war der Fluorophor mEos2 N-terminal vom ribosomalen Protein S2, der kleinen Untereinheit in das Genom der *E. coli*-Zellen eingebaut worden. Mithilfe von zeitlich aufgelöster Lokalisation, konnten die markierten Proteine verfolgt werden und anhand des zurückgelegten Weges, deren Geschwindigkeit ermittelt werden.¹²²⁻¹²⁵

3 Ergebnis

In dieser Arbeit wurden BL21 *E. coli*-Zellen mit pET29a-Vektoren sowohl in Minimal- als auch in Vollmedium angezogen und mittels CET mit Fokus auf die 3D Ribosomenverteilung untersucht. Von den pET29a-Vektoren konnten Konstrukte eines Transmembranproteins (4TM und 6TM von MtlA) unter T7-Promoterkontrolle exprimiert werden. Die schockgefrorenen *E. coli*-Zellen wurden, für die in Vollmedium angezogenen Zellen mittels Ionenätzung für die CET vorbereitet. Für die CET wurde das zum derzeitigen Zeitpunkt modernste Elektronenmikroskop (Titan Krios, FEI) mit DED (K2 Summit, Gatan) verwendet, welches die Aufnahme von Zweiachsenkippsreihen erlaubt. Das Tom-Softwarepaket wurde um Funktionen zur Auswertung von Zweiachsenkippsreihen erweitert. Außerdem wurde eine auf der Alignierung von Untervolumen basierende Optimierung der Tomogrammalignierung entwickelt. Die Analyse der Ribosomen wurde bezüglich benachbarter Ribosomen und interagierender Faktoren, wie z.B. dem Elongationsfaktor durchgeführt.

3.1 *In vitro* Transkriptions-Translationsreaktion

Bevor eine Untersuchung ganzer Zellen erfolgte, sollte durch *in vitro* Versuche die Insertion des MtlA-Transmembranproteins in isolierte und invertierte Membranvesikel mit CET bestätigt werden. Dazu wurden gekoppelte Transkriptions-Translationsreaktionen durchgeführt, bei denen das gesamte MtlA-Protein translatiert worden war. Mit den gekoppelten *in vitro* Transkriptions-Translationsreaktionen wurde die zugegebene MtlA-DNA zu MtlA-mRNA transkribiert, um anschließend von aufgereinigten 70S *E. coli* Ribosomen in das MtlA-Protein translatiert zu werden. Das MtlA-Protein (Abb. 23, *) wurde bei der Zugabe von invertierten Membranvesikeln, wie in der Literatur beschrieben ²⁵, in diese inseriert. Ein anschließender Proteinverdau durch Proteinase K zeigt die Protektion der durch die Membran geschützten MtlA-Transmembrandomänen (Abb. 23 **) als ~30 kDa großes Fragment. Dies bestätigt die Insertion des MtlA-Proteins in die invertierten Membranvesikel.

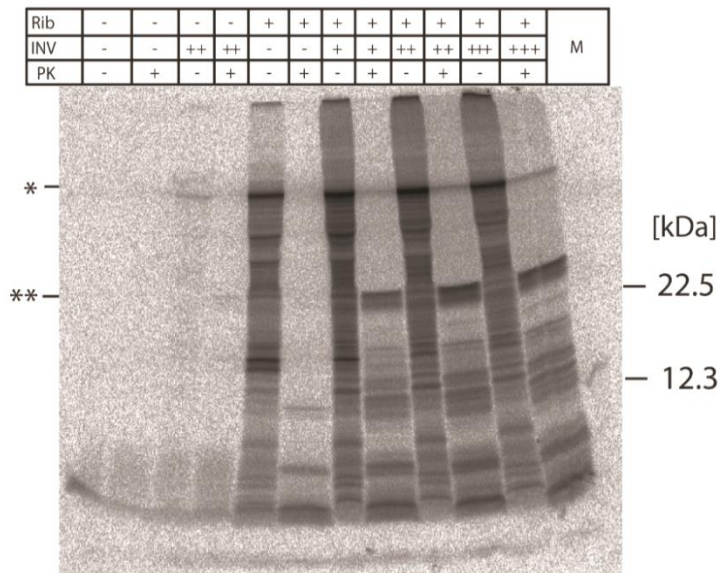


Abb. 23. **MtlA Insertion in Membranen.** Gezeigt wird die SDS-PAGE einer gekoppelten *in vitro* Transkriptions-Translations-Reaktion mit vollständigem, radioaktiv markiertem MtlA-Protein mit variierenden Bestandteilen. Ohne Ribosomen wurde kein MtlA-Protein translatiert. Wenn invertierte Membranvesikel zugegeben wurden, zeigte ein nachfolgender Proteinase K-Verdau die Protektion verschiedener Fragmente (u. a. ~30 kDa Fragment).

Für die sich anschließende CET sollten aus den gekoppelten Transkriptions-Translationsreaktionen die invertierten Membranvesikel mit den insertierten MtlA-Proteinen isoliert werden. Die Aufreinigung der invertierten Membranvesikel wurde durch Flotation in einem Saccharosegradienten durchgeführt. Zunächst wurde eine SDS-PAGE aus der Flotationsanalyse angefertigt, um das MtlA-Protein zu detektieren. Bei der Flotationsanalyse konnten keine Banden auf dem Gel detektiert werden. Bei CET-Analysen von Proben aus oberen Fraktionen von Flotationsanalysen waren keine Vesikel zu erkennen. Daher wurden direkt aus einer gekoppelten Transkriptions-Translationsreaktion ohne ^{35}S -Met, Proben für eine CET-Analyse eingefroren. In den rekonstruierten Tomogrammen sind mehrere Vesikel und Ribosomen in unmittelbarer Nähe zueinander zu sehen (Abb. 24). Es wird vermutet, dass invertierte Membranvesikel über Ribosomen auf einer gemeinsamen mRNA verbunden sein könnten, was eine Flotation der Membranvesikel verhindert. Da die Aufreinigung der Membranvesikeln schwierig ist, wurde entschieden, MBRs direkt in *E. coli*-Zellen zu untersuchen.

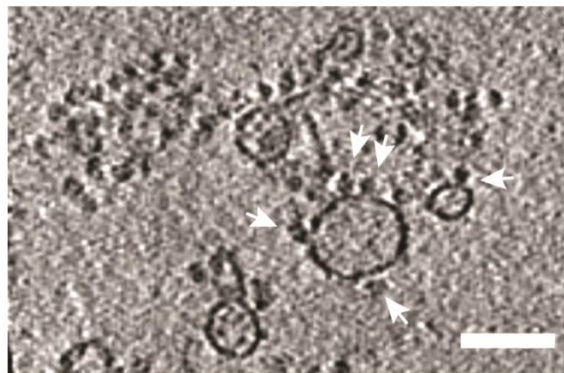


Abb. 24. **CET einer Transkriptions-Translationsreaktion.** In dem gezeigten Tomogrammquerschnitt sind invertierte Membranvesikel und Ribosomen zu sehen. MBRs sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Translatiert wurde das vollständige MtlA-Protein. Balken 100 nm.

3.2 Sequenzierungen

Für die Expression von Fragmenten des MtlA-Proteins in *E. coli*-Zellen, wurden verschiedene MtlA-DNAs (Abb. 25, 4TM und 6TM mit und ohne SecM-Sequenz) in pET29a-Vektoren eingebaut. Diese Vektoren wurden dann in *E. coli*-Zellen transformiert. Der korrekte Einbau der jeweiligen MtlA-DNA in die pET-Vektoren wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Es konnte für alle verwendeten MtlA-Konstrukte mit und ohne SecM-Sequenz die Richtigkeit anhand von DNA-Sequenzierungen bestätigt werden.

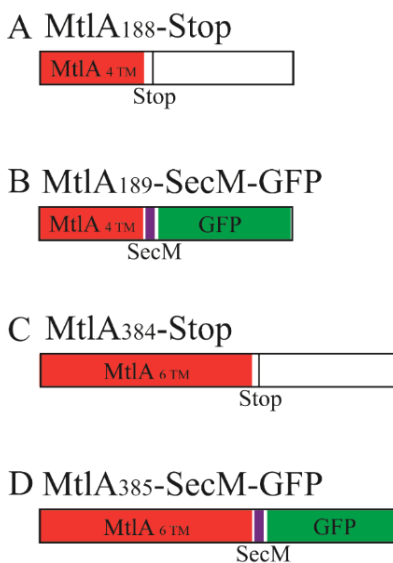


Abb. 25. **Eingesetzte MtlA-Konstrukte.** Gezeigt sind die MtlA-Konstrukte mit 4 (A, B) und 6 (C, D) Transmembrandomänen mit (B, D) und ohne (A, C) SecM-Sequenz.

3.3 Proteinexpression

Die Expression von MtlA-Konstrukten, die Transmembrandomänen enthalten, soll die Anzahl an MBRs in *E. coli*-Zellen erhöhen. Der zusätzliche Einbau einer SecM-Sequenz, die zu einer temporären Arretierung MBRs an der Membran führt soll genau diesen Zustand der Ribosomen für die CET erhalten. Von den pET29a-Vektoren wurden MtlA-Konstrukte in BL21 *E. coli*-Zellen nach Induktion mit IPTG exprimiert. Die Gesamtproteinexpression in BL21 *E. coli*-Zellen wurde für zwei MtlA-Konstrukte (4TM und 6TM) mit und ohne SecM-Sequenz mittels Autoradiographie untersucht.

3.3.1 Proteinexpression von 4TM MtlA-Konstrukten

Die Gesamtproteinexpression in BL21 *E. coli*-Zellen (Abb. 26) mit pET29a Vektor, welcher für die 4TM umfassenden MtlA-Fragmente ohne (A) oder mit (B) SecM-Sequenz codiert, wurde anhand von radioaktiv markierten Proteinen beobachtet. Bei der Expression des MtlA-Fragments ohne SecM-Sequenz (MtlA188-Stop) war bei den induzierten Proben (+) eine prominente Proteinbande zu erkennen (Abb. 26 A). Diese Proteinbande nahm bis zum zweiten Messpunkt (20 min) zu, danach war nur ein geringer Zuwachs zu verzeichnen. Deshalb wurde für die CET-Proben eine Expressionszeit von 20 min gewählt. Der einzige Unterschied zwischen den gegenübergestellten Proben (+ und - IPTG) war die Expression des MtlA-Fragments. Bei der prominenten Proteinbande handelte es sich höchstwahrscheinlich um das exprimierte MtlA-Fragment. Die Gesamtproteinexpression war bei den Probenpaaren (- und + IPTG) für die ersten beiden Messpunkte annähernd gleich. Für die folgenden Messpunkte war die Gesamtproteinexpression für die nicht induzierten Proben (- IPTG) größer, als für die induzierten (+ IPTG), bei denen überwiegend das MtlA188-Stop Fragment exprimiert wurde. Anders verhielt es sich bei der Gegenüberstellung der Probenpaare für die Expression des MtlA-Fragments mit SecM-Sequenz (MtlA189-SecM). Hier war die Gesamtproteinexpression bei den induzierten Proben (+ IPTG) deutlich geringer als bei den nicht induzierten (- IPTG). Für das MtlA189-SecM konnten keine Proteinbanden zugeordnet werden, da diese nicht zu erkennen waren (Abb. 26 B).

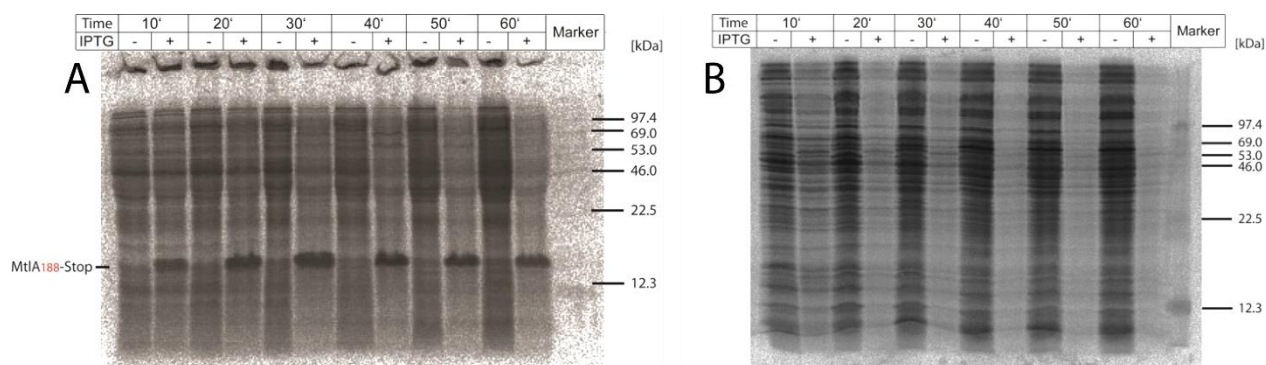


Abb. 26. **4TM MtlA-Expression.** Gezeigt wird die Gesamtproteinexpression für BL21 *E. coli*-Zellen mit pET29a Vektor, welcher für die 4TM umfassenden MtlA-Fragmente ohne (A) oder mit (B) SecM-Sequenz codiert. Die Proteinexpression wurde in Zeitintervallen von 10 min nach Induktion beobachtet, wobei jeweils induzierte (+ IPTG) und nicht induzierte (- IPTG) Zellen gegenübergestellt wurden.

3.3.2 Proteinexpression von 6TM MtlA-Konstrukten

Die Beobachtung der Gesamtproteinexpression in BL21 *E. coli*-Zellen (Abb. 27) mit pET29a Vektor, welcher für das 6TM umfassenden MtlA-Fragmente ohne (A) oder mit (B) SecM-Sequenz codiert, wurde anhand von radioaktiv markierter Proteinen analog durchgeführt. Bei der Expression des MtlA-Fragments ohne SecM-Sequenz (MtlA384-Stop) war bei den induzierten Proben (+ IPTG) eine prominente Proteinbande zu erkennen (Abb. 27 A). Diese Proteinbande nahm bis zum zweiten Messpunkt (20 min) zu, danach war nur ein geringer Zuwachs zu verzeichnen. Deshalb wurde für die CET-Proben eine Expressionszeit von 20 min gewählt. Der einzige Unterschied zwischen den gegenübergestellten Proben (+ und - IPTG) war die Expression des MtlA-Fragments in den induzierten Proben. Bei der prominenten Proteinbande handelte es sich höchstwahrscheinlich um das exprimierte MtlA-Fragment. Die Gesamtproteinexpression war bei den Probenpaaren für jeden Messpunkt annähernd gleich. Anders verhielt es sich bei der Gegenüberstellung der Probenpaare (+ und - IPTG) für die Expression des MtlA-Fragments mit SecM-Sequenz (MtlA385-SecM). Hier war die Gesamtproteinexpression bei den induzierten Proben deutlich geringer als bei den nicht induzierten. Für das MtlA385-SecM- und das MtlA385-SecM-GFP Fragment waren schwache Proteinbanden zu erkennen (Abb. 27 B). Die Banden für das MtlA385-SecM-GFP Fragment waren wesentlich schwächer als für das MtlA385SecM.

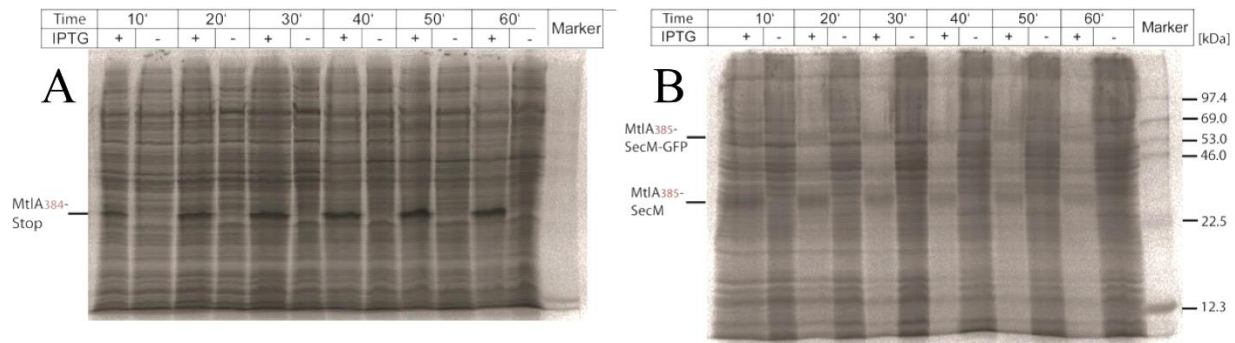


Abb. 27. **6TM MtlA-Expression.** Gezeigt wird die Gesamtproteinexpression für BL21 *E. coli*-Zellen mit pET29a Vektor, welcher für die 6TM umfassenden MtlA-Fragmente ohne (A) oder mit (B) SecM-Sequenz codiert. Die Proteinexpression wurde in Zeitintervallen von 10 min nach Induktion beobachtet, wobei jeweils induzierte (+) und nicht induzierte (-) Zellen gegenübergestellt wurden.

Für beide MtlA-Fragmentlängen (4TM und 6TM) zeigte sich im Fall einer eingeführten SecM-Sequenz eine Reduktion der Gesamtproteinexpression in den *E. coli*-Zellen. Dies war sehr wahrscheinlich auf die SecM-Sequenz zurückzuführen. In den Gesamtproteinexpressionen der MtlA-Konstrukte ohne SecM-Sequenz war in beiden Fällen eine vermehrte Expression eines Proteins zu beobachten. Bei diesem Protein handelt es sich sehr wahrscheinlich um das jeweilige MtlA-Stop-Protein.

3.4 Zellwachstum

Nachdem im vorherigen Punkt die Expression der MtlA-Konstrukte untersucht worden war, soll nun der Einfluss der MtlA-Expression der verschiedenen Konstrukte auf das Zellwachstum analysiert werden. Dafür wurden Wachstumskurven von BL21 *E. coli*-Zellen, in denen u.a. zwei MtlA-Konstrukte (4TM und 6TM) mit und ohne SecM-Sequenz exprimiert wurden angefertigt.

3.4.1 Wachstumskurven von 4TM MtlA-Konstrukten

Im Folgenden werden zunächst die Wachstumskurven für BL21 *E. coli*-Zellen mit pET29a Vektoren, welche für 4TM MtlA-Fragmente codieren gezeigt. Parallel zu den Proben für die Proteinexpression wurden die Proben für die Wachstumskurven genommen. Aus den Wachstumskurven (Abb. 28) ist ersichtlich, dass die nicht induzierten (- - -) *E. coli*-Zellen besser als die

induzierten (—) wachsen. Das Wachstum der Zellen, in denen MtlA-Fragmente mit SecM-Sequenz exprimiert worden waren (—), kam fast zum Erliegen.

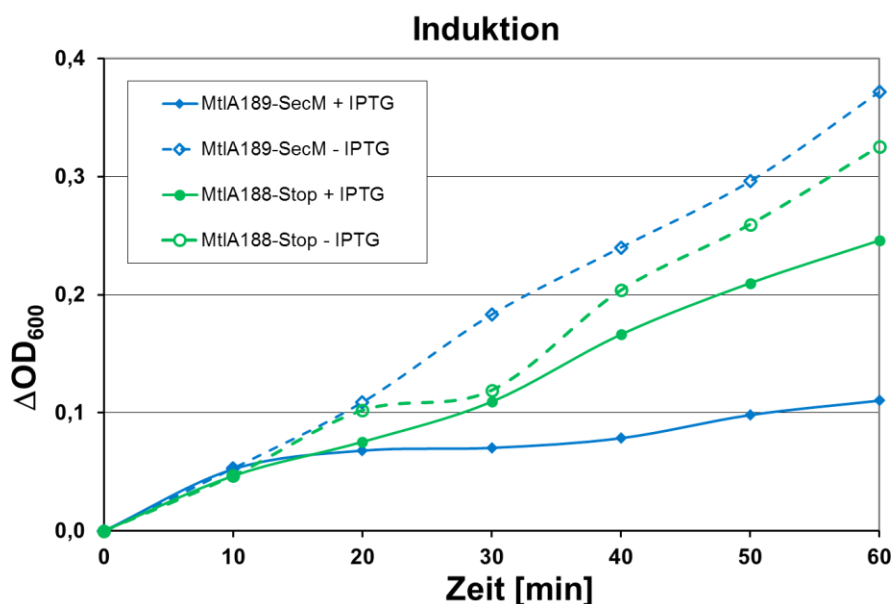


Abb. 28. **4TM Wachstumskurven.** Die Wachstumskurven der BL21 *E. coli*-Zellen mit Plasmiden, welche für 4TM umfassenden MtlA-Fragmente codieren sind gezeigt. Dabei wachsen die nicht induzierten Proben (- -) schneller, als die induzierten (—).

3.4.2 Wachstumskurven von 6TM MtlA-Konstrukten

Analog zu den Wachstumskurven der BL21 *E. coli*-Zellen mit pET29a Vektoren, welche für 4TM MtlA-Fragmente codieren, wurden auch Wachstumskurven für BL21 *E. coli*-Zellen mit pET29a Vektoren, welche für 6TM MtlA-Fragmente codieren angefertigt. Wie vorher wurden parallel zu den Proben für die Proteinexpression die Proben für die Wachstumskurven genommen. Die Wachstumskurven für *E. coli*-Zellen mit 6TM MtlA-Fragmente (Abb. 29) zeigten ein ähnliches Ergebnis wie die Wachstumskurven für *E. coli*-Zellen mit 4TM MtlA-Fragmente. Aus den Wachstumskurven war ersichtlich, dass die nicht induzierten (- -) *E. coli*-Zellen besser als die induzierten (—) wuchsen. Das Wachstum der Zellen, in denen MtlA-Fragmente mit SecM-Sequenz exprimiert worden waren (—), kam fast zum Erliegen.

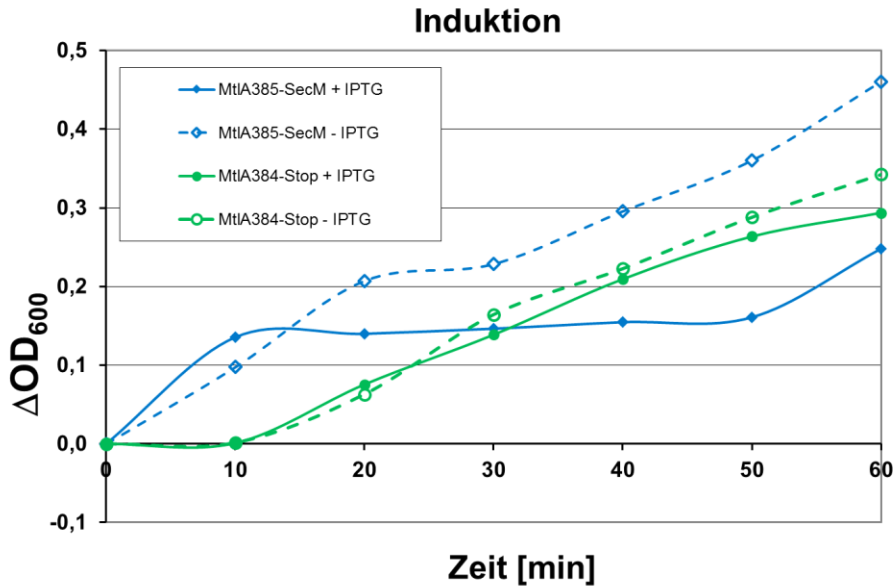


Abb. 29. **6TM Wachstumskurven.** Die Wachstumskurven der BL21 *E. coli*-Zellen mit Plasmiden, welche für 6TM umfassenden MtlA-Konstrukte codieren sind gezeigt. Dabei wuchsen die nicht induzierten Proben (- -) besser, als die induzierten (—).

Die Analyse der Wachstumskurven für beide MtlA-Konstruktängen (4TM und 6TM) hat für beide Längen zu dem Ergebnis geführt, dass Konstrukte mit SecM-Sequenz, bei denen das MtlA-SecM-Fragment exprimiert worden war zu einem nahezu stagnierenden Zellwachstum, bereits nach 20-minütiger Expression führen. Proben für die CET-Untersuchung wurden nach 20-minütiger MtlA-Fragmentexpression schockgefroren. Die Expression der MtlA-SecM-Fragmente soll die Anzahl der MBRs in den *E. coli*-Zellen erhöhen.

3.5 Auswirkungen der Membranproteinexpression auf die Morphologie von *E. coli*-Zellen

Anfangs wurde mit langsam wachsenden *E. coli*-Zellen gearbeitet. Langsam wachsende *E. coli*-Zellen besitzen eine geringere Dicke als schnell wachsende Zellen und können direkt unter dem Transmissionselektronenmikroskop beobachtet werden. Eine Plasmid tragende *E. coli*-Zelle, in der kein Protein vom Plasmid exprimiert wurde zeigt intakte Membranen und vereinzelt sind auch Ribosomen zu erkennen (Abb. 30 A). Fragmentation der inneren Membran in Zellpolnähe findet in einer *E. coli*-Zelle statt, wenn ein Membranproteinfragment exprimiert wurde, hier MtlA188-Stop (Abb. 30 B). Wird in einer *E. coli*-Zelle ein Membranproteinfragment gefolgt von einer SecM-

Sequenz exprimiert so sind nur wenige kleine Vesikel zu erkennen, dafür aber eine erhöhte Anzahl an Ribosomen im Bereich des Zellpols (Abb. 30 C).

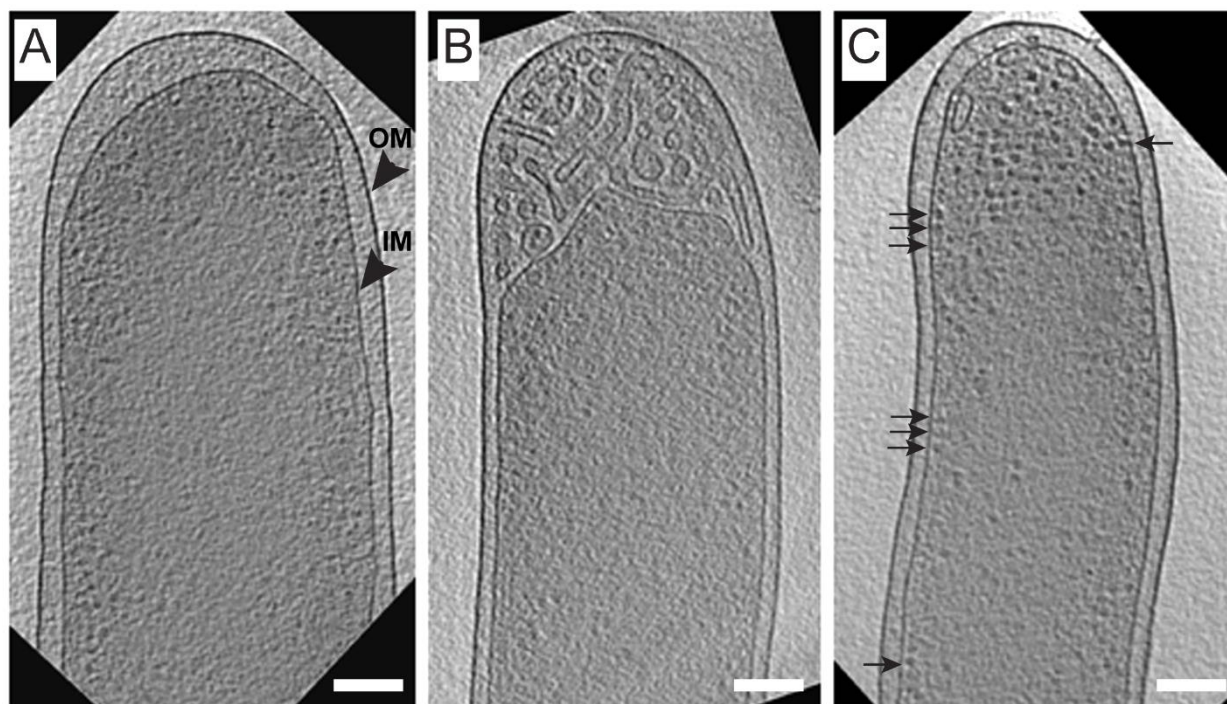


Abb. 30. **Tomogrammschnitte durch langsam wachsende *E. coli*-Zellen mit verschiedenen 4TM Plasmiden.** (A) Nicht induzierte *E. coli*-Zelle mit intakten Membranen. (B) *E. coli*-Zelle, in der das MtlA188-Stop-Fragment exprimiert wurde. (C) *E. coli*-Zelle, in der das MtlA189-SecM-Konstrukt exprimiert wurde.

3.6 Ionenätzung

Die in Minimalmedium angezogenen langsam wachsenden *E. coli*-Zellen haben gezeigt, dass eine Analyse von Ribosomen in diesen Zellen möglich ist. Proteine werden in der Praxis nicht in Bakterienzellen exprimiert, die unter Nährstoffeinschränkung wachsen. Daher war es vor allem interessant die Ribosomenanalyse in schnell wachsenden *E. coli*-Zellen durchzuführen, die nicht dieser Einschränkung unterliegen. Schnell wachsende *E. coli*-Zellen sind allerdings wesentlich dicker, als langsam wachsende *E. coli*-Zellen und können nicht direkt mittels CET untersucht werden. Die Anwendung der neu etablierten Technik der Ionenätzung für Kryoproben ermöglicht die CET auch bei dicken Proben. Bei der Ionenätzung werden dicke Kryoproben mithilfe eines fokussierten Ionenstrahls kompressionsfrei ausgedünnt. Für die Ionenätzung besitzt das Autogrid, welches das *grid* stabilisiert, eine Aussparung, um ein Ausdünnen der Probe unter flachem Winkel

(7°-9°) zu ermöglichen (Abb. 31 A). In der abgebildeten Masche des *grids* sind schockgefrorene BL21 *E. coli*-Zellen, sowie der präparierte Doppelkeil zu sehen (Abb. 31 B). Auf einem vergrößerten Bild eines präparierten Doppelkeils sind die Löcher (Lochdurchmesser: 2 µm, Lochabstand: 1 µm) des Kohlefilms zu erkennen (Abb. 31 C). Die Schnittgeometrie des Doppelkeils wurde gewählt, da sie die Positionierung der *Tracking*- und der *Fokus*-Stelle für die Aufnahme der zweiten Kippserie entlang der zweiten Kippachse ermöglicht. Die angedachte Orientierung der Kippachsen für die sich anschließende CET wurde durch die beiden Linien (schwarz (1) und weiß (2)) dargestellt. Die Tomogramme wurden anschließend im TEM aufgenommen.

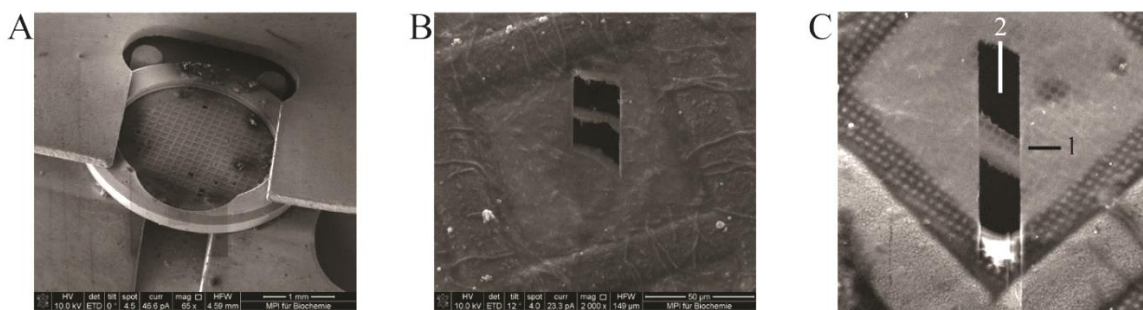


Abb. 31. **FIB Wedges.** Gezeigt werden SEM Bilder von Kryoproben, die mit dem Elektronenstrahl des REM erzeugt wurden. Das im *Autogridring* stabilisierte *grid* mit schockgefrorenen BL21 *E. coli*-Zellen vor dem Ausdünnen ist im FIB-Transferschiffchen montiert (A). Blick auf eine Masche des *grids* nach dem Anfertigen eines Doppelkeils (B). Vergrößerte Ansicht eines präparierten Doppelkeils mit angedeuteter Orientierung der beiden Kippachsen (1, 2) für die Doppelkippachsantomographie (C).

3.7 Analyse der 2D Ribosomenverteilung in lebenden *E. coli*-Zellen mittels Lokalisationsmikroskopie nach Photoaktivierung

Die Ribosomenverteilung in Zellen kann nicht nur mit CET analysiert werden. Eine andere Methode ist die Fluoreszenzmikroskopie. Bei der Fluoreszenzmikroskopie können mit einem Fluorophor markierte Proteine sogar in lebenden Zellen beobachtet werden. Durch eine Kooperation mit Prof. Dr. Johan Elf von der Uppsalla Universität in Schweden konnte die Lokalisationsmikroskopie nach Photoaktivierung (engl. *photoactivated localization microscopy*, PALM) mit Ribosomen durchgeführt werden. Dazu wurden die Ribosomen von *E. coli*-Zellen mit dem Fluorophor mEos markiert. Hierzu war das mEos-Protein in das Genom der verwendeten

E. coli-Zellen eingebaut worden. So konnte der Weg eines Ribosoms in einer *E. coli*-Zelle verfolgt werden. Es wurden die gleichen *E. coli*-Zellen verwendet, wie für die CET.

Die Ribosomen konnten in den BL21 *E. coli*-Zellen mittels PALM verfolgt werden (Abb. 32 A). Die Zelllängen vor und nach Induktion des MtlA189-SecM-Konstrukts betragen $\sim 4 \mu\text{m}$ und die Zellbreiten $1,2 \mu\text{m}$ (Abb. 32 B, C). Daraus ergibt sich ein durchschnittliches Zellvolumen von $\sim 4,3 \mu\text{m}^3$, indem das Volumen einer Kugel (Radius: $0,6 \mu\text{m}$) und eines Zylinders (Radius: $0,6 \mu\text{m}$; Länge: $3 \mu\text{m}$) berechnet wird. Die Wege der verfolgten Ribosomen sind in einer Einheitszelle dargestellt (Abb. 32 D).

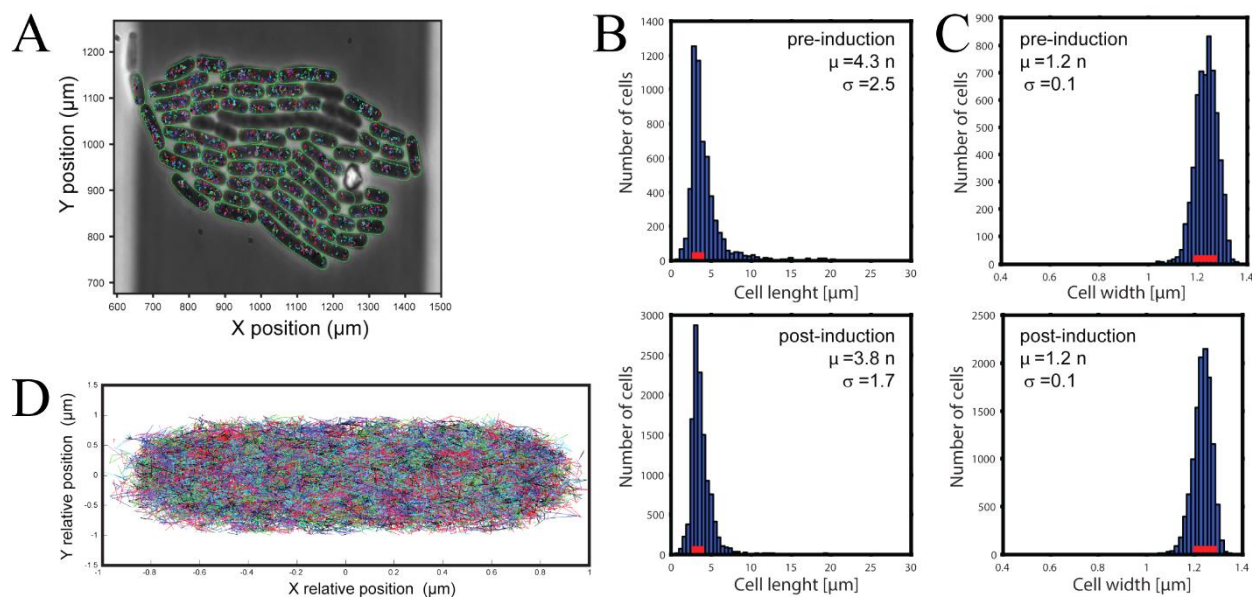


Abb. 32. **Ribosomenverfolgung mit PALM.** (A) Phasenkontrastbild von *E. coli*-Zellen in einer Mikrofluidikammer mit mEos markierten Ribosomen, deren Weg mittels PALM verfolgt wurde. (B) Zelllängen und (C) Zellbreiten vor und nach der Induktion des MtlA189-SecM (4 TM)-Konstrukts. Der für die weitere Analyse gewählte Bereich ist rot gekennzeichnet. (D) Einheitszelle mit den Wegen der verfolgten Ribosomen (jeder Weg in einer anderen Farbe) aus den gewählten Zelldaten, deren Koordinaten auf die Einheitszelle umgerechnet worden sind.

Ebenso wurden Zellen vor und nach Expression des 6TM umfassenden MtlA-Fragments mit SecM-Sequenz untersucht (MtlA385-SecM). Vor der Expression des MtlA-Fragments befand sich ein Großteil der Ribosomen im zentralen Zellbereich oder an den Zellpolen (Abb. 33 oben links). Die Beweglichkeit der Ribosomen vor Induktion war im gesamten Zytoplasma ähnlich, auch in der Nähe der Membran (Abb. 33 oben rechts). Nach erfolgter MtlA-Expression waren überwiegend Ribosomen an den Zellpolen zu sehen (Abb. 33 unten links). Die Beweglichkeit der Ribosomen nach Induktion war stärker auf das zentrale Zytoplasma beschränkt (Abb. 33 unten rechts). Nach

der Induktion war die Ribosomenbeweglichkeit in Membrannähe deutlich geringer als vor der Induktion. Um eine möglichst große Zahl an Ribosomen im Tomogramm zu erhalten wurden für die Auswahl der Tomogramme meist Regionen um die Zellpole ausgewählt.

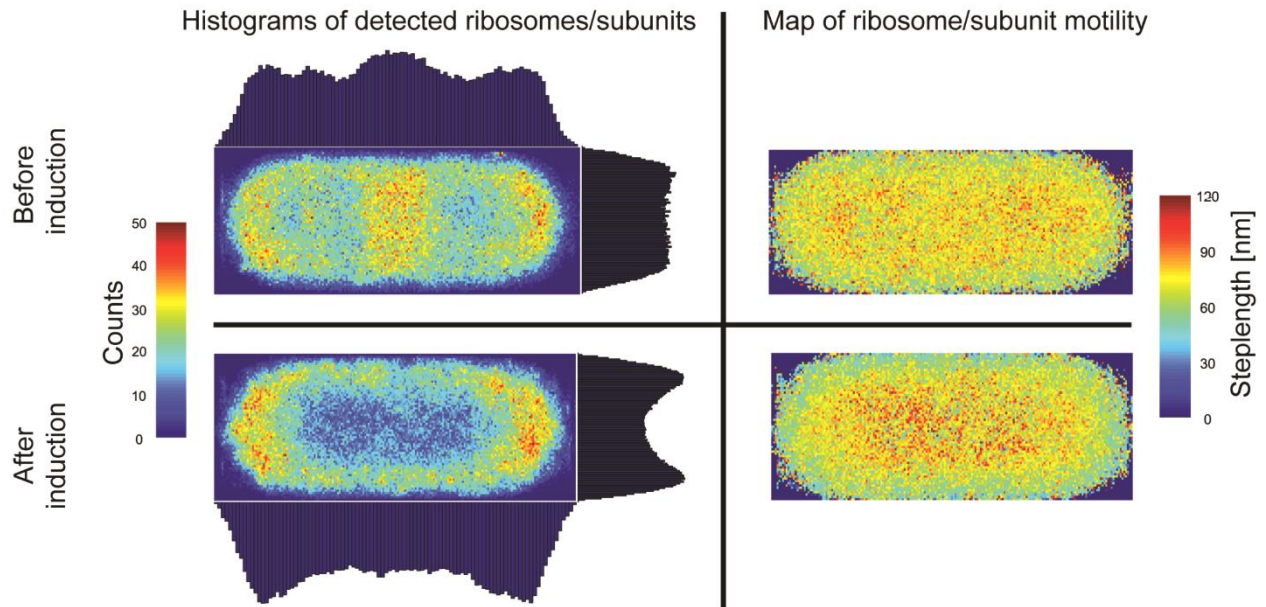


Abb. 33. **Ribosomenverteilung und Ribosomengeschwindigkeit.** In der oberen Zeile wurden Zellen vor und in der unteren Zeile nach der Expression des MtlA385-SecM-Fragments (6 TM) mit PALM analysiert. Die linke Spalte zeigt die Ribosomenverteilung in der Zelle farblich nach Häufigkeit geordnet. Seitlich dazu wird die Häufigkeit der Ribosomenverteilung in Abhängigkeit zu den Abmessungen der Zellen ohne Berücksichtigung der Pole dargestellt. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Ribosomen in der Zelle bewegen, wird farblich codiert in der rechten Spalte veranschaulicht.

In speziell für die PALM-Analyse angefertigten Mikrofluidkammern in Prof. Johan Elf's Labor konnten Bakterienzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und gleichzeitig das Medium ausgetauscht werden. So wurde beobachtet, dass die verwendeten BL21 *E. coli*-Zellen mit MtlA385-SecM-Plasmid in LB-Medium normal wuchsen. Im Lichtmikroskop konnten mehrere Zellteilungen beobachtet werden. Nach Induktionsstart durch Zugabe von 1mM IPTG verlangsamte sich das Zellwachstum drastisch und es wurden keine Zellteilungen mehr beobachtet. Nachdem das MtlA385-SecM-Konstrukt für 2 h exprimiert worden war, wurde das Medium ausgetauscht und das IPTG entfernt. Danach begannen die Zellen wieder zu wachsen und es konnten Zellteilungen beobachtet werden.

3.8 Gegenüberstellung von langsam und schnell wachsenden *E. coli*-Zellen

Zu Beginn der Arbeit wurden langsam wachsende *E. coli*-Zellen für die CET verwendet. Langsam wachsende BL21 *E. coli*-Zellen wurden mit nur einer zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle (Alanin) kultiviert. Diese Zellen hatten einen Durchmesser von ~500 nm und waren an der Grenze, bei der eine Transmissionselektronentomographie eben noch möglich war. Nach der Etablierung der Ionenätzungstechnik unter Kryobedingungen konnten schnell wachsende *E. coli*-Zellen mittels CET untersucht werden. Die schnell wachsenden *E. coli*-Zellen konnten nach den gängigen Kultivierungsprotokollen angezogen werden, wie sie beispielsweise für die Expression eines Proteins im Labor verwendet werden. Die schnell wachsenden *E. coli*-Zellen (Abb. 34 D) hatten ungefähr den doppelten Zelldurchmesser als die langsam wachsenden *E. coli*-Zellen (Abb. 34 B). Beide Tomogramme haben ein ähnliches Aussehen und vergleichbare Qualität. In den schnell wachsenden, wie auch den langsam wachsenden *E. coli*-Zellen konnten Ribosomen detektiert und analysiert werden.

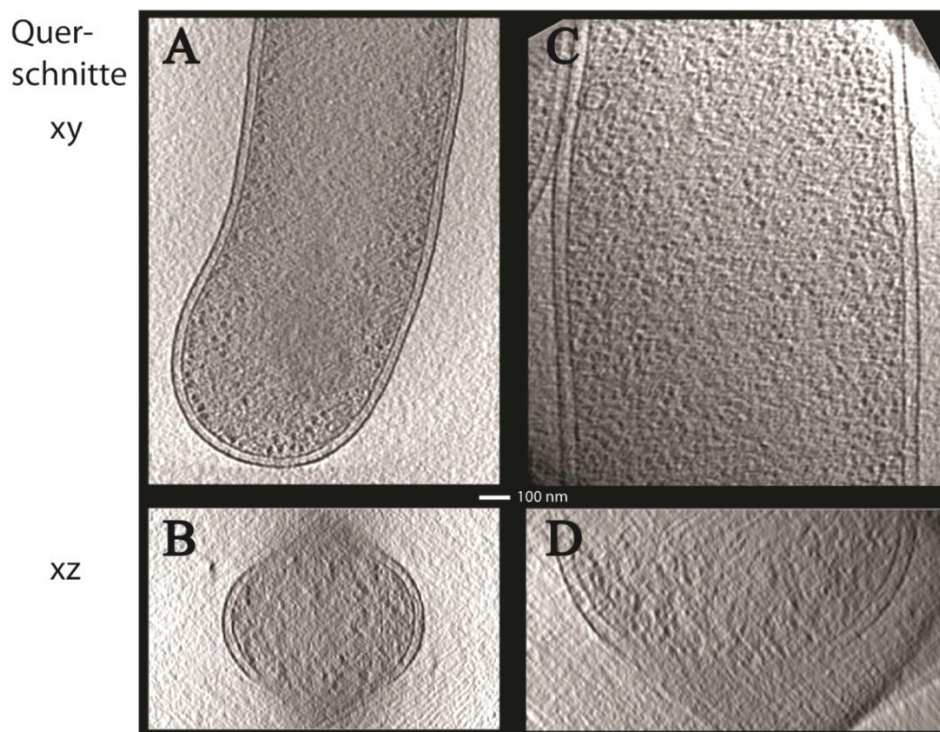


Abb. 34. **Langsam und schnell wachsende *E. coli*-Zellen.** Gezeigt sind Querschnitte (xy- (A, C) und xz-(B, D) Ebene) durch eine langsam (A, B) und eine schnell (C, D) wachsende *E. coli*-Zelle. Die schnell wachsende Zelle wurde mittels Ionenätzung gedünnt. Beide Tomogramme sind Einachsenskippserien und wurden auf dem FEI Tecnai Polara mit CCD-Kamera aufgenommen.

3.9 Rekonstruktion von Doppelkippachsentomogrammen

Wie aus der Gegenüberstellung der langsam und der schnell wachsenden *E. coli*-Zellen (Abb. 34) ersichtlich ist, nimmt die schnell wachsende Zelle (Abb. 34 C, D) den Großteil des Tomogramms und damit der Probe ein. Ein Teil der Probe kann wegen des *Missing Wedge* nicht abgetastet werden. Um möglichst viele Informationen über die Probe zu erhalten, kann ein zweites Tomogramm von der 90° um die vertikale Achse gedrehten Probe aufgenommen werden. Das neue Titan Krios Elektronenmikroskop von FEI erlaubt diese 90°-Drehung der Probe im Probenhalter des Elektronenmikroskops. Zusätzlich erlaubt der Einsatz von DED Kameras eine Reduktion der applizierten Elektronendosis pro Tomogramm. Dadurch können nun mit derselben Dosis, mit der zuvor ein Tomogramm mit einer CCD Kamera aufgenommen worden war, zwei gleichwertige Tomogramme einer Zweiachsenkippserie aufgenommen werden. Die beiden Kippserien einer Zweiachsenkippserie können kombiniert werden und liefern ein fast isotropes Abbild der Probe¹²⁶. Anhand der Goldmarkerpositionen wurden die beiden Kippserien einer Zweiachsenkippserie zunächst getrennt voneinander rekonstruiert. Dann wurden die beiden Tomogramme anhand der entsprechenden Goldmarkerpositionen kombiniert. Querschnitte durch die rekonstruierten Tomogramme einer Zweiachsenkippserie sind in Abb. 35 gezeigt. Der *Missing Wedge* Effekt ist an den Zellmembranen deutlich zu erkennen. In der Rekonstruktion der ersten Kippserie (Abb. 35 A) sind die Zellmembranen, welche senkrecht zur Kippachse orientiert sind, nicht zu erkennen. Bei der Rekonstruktion der zweiten Kippserie (Abb. 35 B) sind die Zellmembranen, die hier parallel zur Kippachse orientiert sind, eindeutig zu identifizieren. Die Kombination der beiden Kippserien (A und B) führt die Informationen zusammen und gibt ein nahezu isotropes Bild der Probe wieder (Abb. 35 C).

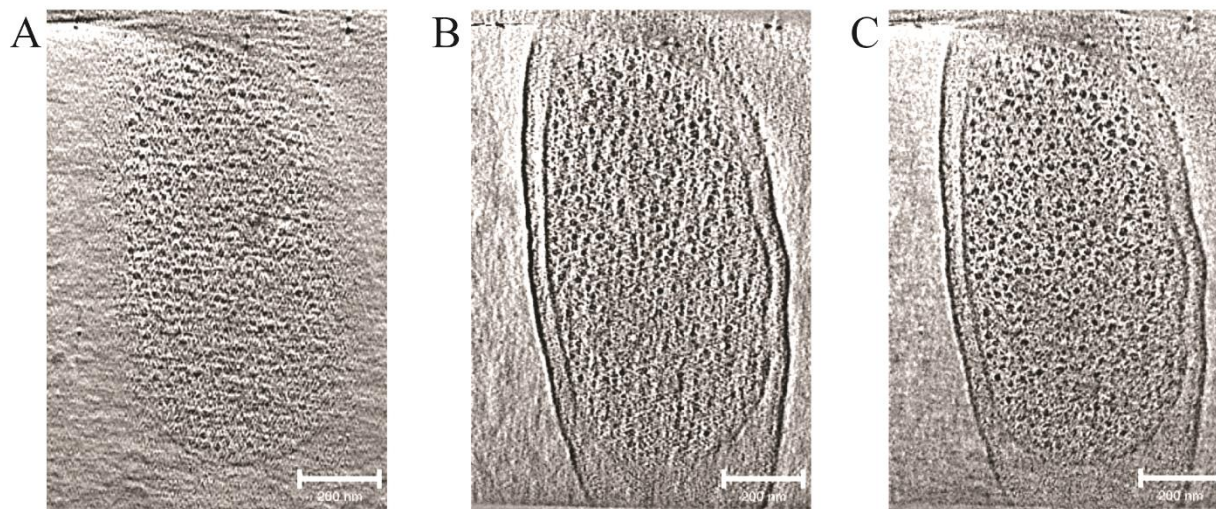


Abb. 35. **Tomogramme.** Querschnitte (parallel zur x-y-Ebene) durch die dreifach gebintten 3D Rekonstruktionen der Ersten (A), der Zweiten (B) und der kombinierten Kippserie (C) einer Zweiachsenkippsreihe. Der *Missing Wedge* Effekt ist anhand der Zellmembranen deutlich zu erkennen. In der Rekonstruktion der ersten Kippserie (A) sind die Zellmembranen nicht zu erkennen, in der Rekonstruktion der zweiten Kippserie (B) jedoch eindeutig. Die Kombination der beiden Kippserien (A und B) führt die Informationen zusammen.

Wegen der Größe der schnell wachsenden *E. coli*-Zelle im Tomogramm bleibt nur am Rand Platz für Goldmarker, welche vor dem Einfrieren zur Probe gegeben worden sind. Anhand der Positionen dieser Goldmarker wurden die beiden Kippserien zunächst getrennt voneinander rekonstruiert. Goldmarker, die in beiden Kippserien identifiziert werden konnten, ermöglichten es, die beiden Kippserien aufeinander zu alignieren. Im Bereich des Zytoplasmas, der einen sehr großen Bereich des Tomogramms einnimmt, sind keine Goldmarker enthalten. Für eine Alignierung der beiden orthogonalen Kippserien einer Zweiachsenkippsreihe, wäre es wünschenswert auch Referenzpunkte innerhalb der Zelle zu haben. Daher wurden die Ribosomen in den rekonstruierten Untervolumen als Referenzpunkte innerhalb der *E. coli*-Zelle herangezogen. Untervolumen, mit einem als Ribosom identifizierten zentralen Partikel wurden für jede Kippserie der Zweiachsenkippsreihe getrennt rekonstruiert. Diese Untervolumen wurden so groß gewählt, dass die nähere Umgebung der zentralen Partikel in diesen Untervolumen enthalten ist. Somit ist jedes Untervolumen wegen der wechselnden Umgebung einzigartig und kann zur Alignierung herangezogen werden. Die translationale Alignierung entsprechender Untervolumen wurde in die Prozessierungsabfolge implementiert. Die Alignierung legt jetzt nicht mehr nur die Goldmarkerpositionen zugrunde, sondern wurde auf alle Bereiche, von denen Untervolumen rekonstruiert worden sind erweitert. Für die hier verwendeten Tomogramme entsprach dies dem gesamten Zytoplasma der *E. coli*-Zelle. Die bei der Alignierung berechneten Translationsvektoren konnten grafisch dargestellt werden, um

einen optischen Eindruck des Alignments zu erhalten (Abb. 36 A). Außerdem konnte die Verschiebungsweite in Abhängigkeit ihrer auftretenden Häufigkeit in Form eines Histogramms gezeigt werden (Abb. 36 B).

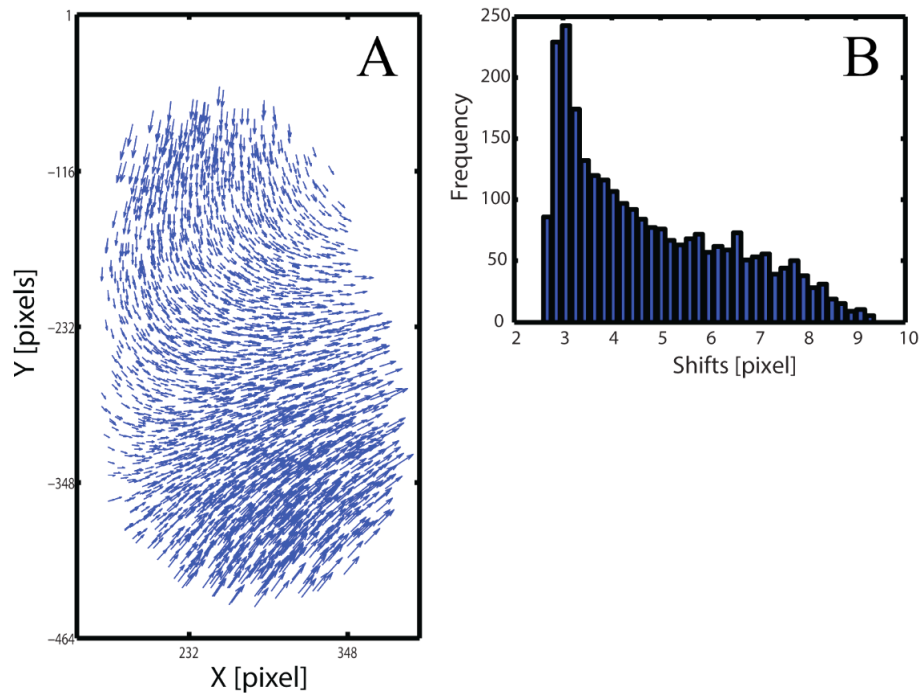


Abb. 36. **Untervolumenalignierung.** (A) Die skalierten Translationsvektoren der Untervolumen des Tomogramms aus Abb. 35 werden dargestellt. (B) Histogramm der Vektorlängen der Translationsvektoren, zeigt die Häufigkeit der berechneten Verschiebungen abhängig von der Verschiebungslänge in Pixeln.

Translationsvektoren, deren Richtung deutlich von der Richtung des lokalen Vektorfeldes abweicht, wurden durch den durchschnittlichen lokalen Translationsvektor ersetzt. Die translatierten Untervolumen der zweiten Kippserie konnten nun mit den Untervolumen der ersten Kippserie kombiniert werden (Abb. 37).

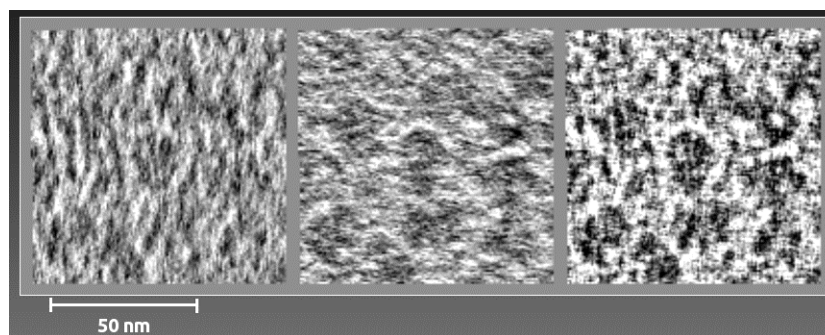


Abb. 37. **Untervolumen.** Gezeigt sind Querschnitte (parallel zur x-y-Ebene) einander entsprechenden Untervolumen eines Partikels, hier ein Ribosom. Links: Ribosom aus der ersten Kippserie; Mitte: Ribosom aus der translatierten zweiten Kippserie; Rechts: Ribosom aus den kombinierten Untervolumen.

Die Ribosomen sind in schnell wachsenden *E. coli*-Zellen fast gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abb. 35 C). Da die Untervolumen auch die nähere Umgebung der Ribosomen enthalten, kann aus einer Kombination der zusammengeführten Untervolumen einer Zweiachsenkippsreihe die gesamte *E. coli*-Zelle erhalten werden. In dem durch individuelle Translation der Untervolumen verbesserten Tomogrammausschnitt der *E. coli*-Zelle (Abb. 38 B) können strukturelle Details noch besser erkannt werden, was zu einem verbesserten Ergebnis führt.

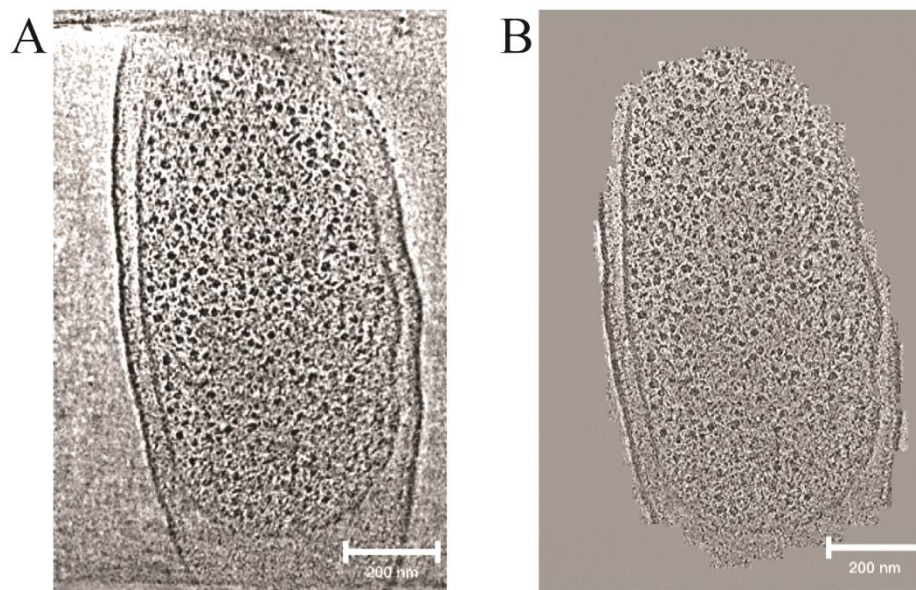


Abb. 38. **Tomogramm einer *E. coli*-Zelle.** Gegenübergestellt werden die kombinierte Kippserie (A) und der aus den translatierten Untervolumen zusammengesetzte Tomogrammausschnitt der *E. coli*-Zelle (B), jeweils dreifach gebinnt. Strukturelle Details sind im Tomogrammausschnitt der *E. coli*-Zelle (B) besser, als in der kombinierten Kippserie (A) zu erkennen.

3.10 Ribosomenanalyse

Der Fokus der Tomogrammanalyse lag auf den 70S Ribosomen der *E. coli*-Zellen. Zunächst wurden die 70S Ribosomen in den Tomogrammen identifiziert. Danach wurden die Ribosomen anhand ihrer Eigenschaften gruppiert und analysiert. Die Eigenschaften konnten beispielsweise die Entfernung und Orientierung zum nächsten Ribosom, die Bindung an die innere Zellmembran oder die Bindung eines Faktors (z.B. Elongationsfaktor) sein.

3.10.1 Ribosomendetektion in Tomogrammen

Für die strukturelle Charakterisierung der Ribosomen stehen insgesamt 17 Doppelkippachsentomogramme zur Verfügung. Davon stammen vier Doppelkippachsentomogramme (T1-T4) von nicht induzierten BL21 *E. coli*-Zellen und 13 von induzierten BL21 *E. coli*-Zellen (T5-T17). Am Beispiel vom Doppelkippachsentomogramm T5 wird die Ribosomendetektion gezeigt. Im Doppelkippachsentomogramm T5 wurde mit Mustererkennungsalgorithmen eine Vielzahl an Partikeln ausgewählt, welche als mögliche Ribosomen analysiert wurden. Da die Ribosomen in den rekonstruierten Tomogrammen (vgl. Abb. 38 B) als nahezu kugelförmige hoch kontrastierte Objekte zu erkennen sind, wurden die Ribosomen mittels einer computerbasierten Suche mit einer Kugel in der Größe des 70S Ribosoms gesucht. Um sicherzustellen, dass die Kugel das Zentrum eines möglichen Ribosoms trifft, wurde parallel eine Ribosomensuche auf Grundlage der bereits bekannten 70S Ribosomenstruktur durchgeführt. Am Ende wurden die Ribosomenzentren der auf der 70S Ribosomenstruktur basierenden Ribosomensuche, welche innerhalb der platzierten Kugel liegen als Zentrum eines möglichen Ribosoms verwendet. Für T5 wurden so 4.000 mögliche Ribosomen ausgewählt. Um den Grenzwert für eine richtige Zuordnung des gewählten Partikels als Ribosom festzulegen, wurden exemplarisch zwei Methoden durchgeführt. **(i)** Ein Partikel konnte anhand der normalisierten Kreuzkorrelationskurven (Abb. 39 A blau und rot) als Ribosom identifiziert werden. Die Kreuzkorrelationskurven wurden aus den Kreuzkorrelationen zwischen den Partikeln aus dem ursprünglichen Tomogramm (blau) bzw. den Partikeln aus dem gespiegelten Tomogramm (rot) und der gefilterten 70S Ribosomenstruktur erstellt. Je näher der Kreuzkorrelationswert an eins ist, desto ähnlicher ist das analysierte Partikel der Vergleichsstruktur. Die Kreuzkorrelationskurven werden erhalten, wenn die Kreuzkorrelationswerte in stetig abnehmender Reihenfolge in ein Diagramm gegen die Partikelzahl aufgetragen werden. Solange die blaue Kreuzkorrelationskurve über der roten Kreuzkorrelationskurve liegt, kann mit großer Sicherheit angenommen werden, dass es sich bei diesen Partikeln um Ribosomen handelt. Ab dem Schnittpunkt der beiden Kreuzkorrelationskurven kann eine Zuordnung als Ribosom nicht mehr eindeutig getroffen werden. **(ii)** Eine weitere Methode gewählte Partikel als Ribosomen richtig zu identifizieren führt über die Auflösung von Partikelgruppen. Dazu wurden die ausgewählten Partikel nach abnehmendem Kreuzkorrelationswert bezüglich der 70S Ribosomenstruktur in Gruppen zu je 200 Partikeln zusammengefasst. Die Partikel einer Gruppe wurden referenzfrei 3D aligniert und danach 3D gemittelt. Die gemittelten Dichten der Gruppen eins bis acht sind klar als

Ribosomen erkennbar. Ab Gruppe neun nahm der Anteil an falsch positiven Partikeln in einer Gruppe zu und das Gruppenmittel verlor an Details und Auflösung (Abb. 39 C). Die bei der Berechnung des Gruppenmittels erhaltene Auflösung für eine FSC 0,3 wurde ebenfalls grafisch dargestellt (Abb. 39 A grün). Ab dem deutlichen Abfall der Auflösung ab Gruppe zehn war die Zuordnung eines Partikels als Ribosom nicht mehr gegeben. Dieser Grenzwert liegt in der Nähe des Schnittpunkts der beiden Kreuzkorrelationskurven (Methode (i)). Anstelle der Auflösung kann auch die Ähnlichkeit zwischen den gemittelten Gruppendichten und der gefilterten 70S Ribosomenreferenzstruktur zur Identifizierung von Ribosomen genutzt werden. Dazu wurden für jede Gruppe die Korrelation aus der gemittelten Gruppendichte und der gefilterten 70S Ribosomenreferenzstruktur berechnet. Es wurde eine Kreuzkorrelationskurve erstellt und die Fläche unter dieser Kreuzkorrelationskurve ermittelt. In der Grafik (Abb. 39 B blau) sind die ermittelten Flächenwerte als Graph gezeigt. Beim Vergleich der Flächenkorrelationskurve mit der Auflösungskurve (Abb. 39 B grün) ist zu erkennen, dass beide Kurven im gleichen Bereich eine große Steigungsänderung zeigen und zur Auswahl desselben Grenzwertes führten. Wird dieser Bereich als Grenze für die Selektion von Ribosomen herangezogen, so können für das gezeigte Beispiel (T5) 1800 Ribosomen gewählt werden. Das entspricht den Gruppen eins bis neun. Die gezeigten referenzfreien 3D alignierten und gemittelten Dichten für die Gruppen (Abb. 39 C) zeigen für die ausgewählten Gruppen (1-9) deutlich ein Ribosom. Eine visuelle Inspektion der hohen schlecht aufgelösten Klassen hatte gezeigt, dass noch vereinzelt Ribosomen in diesen Klassen enthalten sein können.

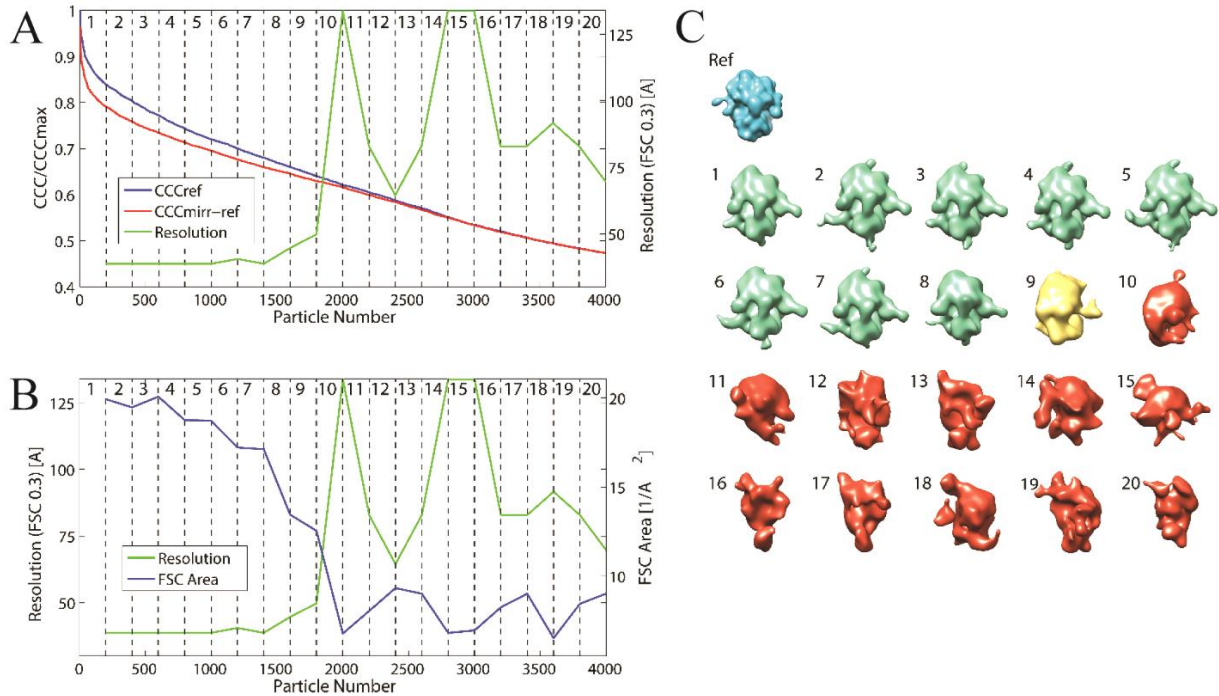


Abb. 39. **Ribomenselektion induzierte Zelle.** Gezeigt werden zwei Methoden, um 70S Ribosomen in den dreifach gebintten Tomogrammen zu detektieren. (i) normalisierte Kreuzkorrelationskurven (A) für Ribosom (blau) und gespiegeltes Ribosom (rot), ab dem Schnittpunkt der beiden Kurven ist eine eindeutige Identifizierung von 70S Ribosomen nicht mehr gegeben. (ii) Die anhand der Mustererkennung vorselektierten möglichen Ribosomen wurden in Gruppen von 200 Partikeln nach abnehmendem Kreuzkorrelationswert, bezogen auf die 70S Ribosomenreferenzstruktur aufgeteilt und innerhalb einer Gruppe referenzfrei 3D aligniert und 3D gemittelt (C). Die für die einzelnen Gruppen bestimmte Auflösung bei FSC 0,3 (grün) wurde grafisch dargestellt (A). Ab der sprunghaft abnehmenden Auflösung (ab Gruppe zehn) war eine Ribosomenidentifizierung nicht mehr sicher gewährleistet. Zusätzlich konnten die gemittelten Gruppendichten mit der gefilterten 70S Ribosomenreferenz-struktur korreliert werden. Die Fläche unter dem Korrelationsgraphen für eine FSC 0,3 (blau) wurde zusammen mit der ermittelten Auflösung (grün) dargestellt (B). Der Abfall der Korrelationsflächenfunktion (B, blau), fiel mit dem Abfall der Auflösung (B, grün) zusammen, sodass beide zum gleichen Grenzwert für die Detektion von Ribosomen führen.

Die Ribomenselektion wurde auch für ein Tomogramm (T2) einer nicht induzierten Probe durchgeführt. Die Ribosomen konnten analog zum oben gezeigten Beispiel detektiert werden.

3.10.2 Ribosomenkonzentration

Nach der Detektion der Ribosomen in den 17 Doppelkippachsantomogrammen können nun die Konzentrationen der Ribosomen in den *E. coli*-Zellen ermittelt werden. Dazu wird neben der Anzahl an detektierten Ribosomen je Tomogramm auch das Volumen des jeweiligen Zytosols benötigt. Das zytoplasmatische Volumen wurde aus der händisch erstellten Zytosolmaske und der bekannten Voxelgröße ermittelt. Die Zahl an Ribosomen (23,8 k) wurde anhand der Kreuz-

korrelationskurven ermittelt. Schließlich wurde die zelluläre Ribosomenkonzentration aus der Ribosomenanzahl und dem zytoplasmatischen Volumen berechnet. Im Mittel beträgt die Ribosomenkonzentration 46 μM . Letztlich ist noch der durchschnittliche zytosolische Volumenanteil angegeben, der von Ribosomen in den *E. coli*-Zellen eingenommen wird ($\sim 13,5\%$). Das Volumen für ein Ribosom wurde aus der alignierten und gemittelten Dichte aus 23,8 k Ribosomen berechnet (4900 nm^3).

Tomogram	Sampled cytoplasmic volume [μm^3]	Identified 70S ribosomes	Ribosome concentration		Sampled volume occupied by 70S ribosomes [%]
			[70S rib/ μm^3]	[μM]	
T1	0.03869	800	20677	34	10,1
T2	0.04166	1200	28802	48	14,1
T3	0.23397	NA	NA	NA	NA
T4	0.16609	NA	NA	NA	NA
T5	0.10909	1800	16500	27	8,1
T6	0.08329	2800	33619	56	16,5
T7	0.14186	3600	25377	42	12,4
T8	0.06771	1800	26583	44	13,0
T9	0.04797	NA	NA	NA	NA
T10	0.21175	NA	NA	NA	NA
T11	0.13981	2200	15736	26	7,7
T12	0.05132	2000	38974	65	19,1
T13	0.05912	NA	NA	NA	NA
T14	0.10330	4000	38722	64	19,0
T15	0.34794	NA	NA	NA	NA
T16	0.03976	1200	30183	50	14,8
T17	0.08371	2400	28671	48	14,0
	TOTAL:	23800			
	MEAN\pmSTD:		27622\pm7851	46\pm13	13,5\pm3,8

Tab. 6. **Zelluläre Ribosomenkonzentration.** Für die tomographierten *E. coli*-Zellbereiche wurde aus dem ermittelten Zytoplasmavolumen und den identifizierten 70S Ribosomen die zelluläre Ribosomenkonzentration berechnet. Für jedes der 17 analysierten Doppelkippachsentomogramme sind das Zytoplasmavolumen, die Zahl der identifizierten Ribosomen, die berechnete Ribosomenkonzentration und der prozentuale Volumenanteil von Ribosomen im Zytoplasma angegeben. NA: nicht analysiert.

Unter Zuhilfenahme des handsegmentierten Zytoplasolvolumens konnte mit einem Matlab-Skript das membrannahe Zytoplasolvolumen, mit einem Abstand von bis zu 25 nm zur Zellmembran für jedes Tomogramm ermittelt werden. Der prozentuale Anteil des membrannahen Zytoplasols am tomographierten Zytoplasolvolumen wurde aus dem Verhältnis von membrannahem Zytoplasolvolumen zum gesamten Zytoplasolvolumen berechnet (Tab. 7). Mit den Positionen der Ribosomen und dem membrannahen Zytoplasolvolumen können die membrannahen Ribosomen gefunden werden. Die visuell selektierten MBRs konnten in das Verhältnis mit allen Ribosomen bzw. den Ribosomen in

Membrannähe gesetzt werden. Aus den Ribosomenzahlen und den bestimmten Volumina (Zytosol und membrannahes Zytosol) konnten Ribosomenkonzentrationen berechnet werden.

Tomo-gram	Vol. Cytoplasm [μm^3]	Vol. Near Mem. [μm^3]	Vol. Near Mem. of Vol. Cytoplasm [%]	All Part.	Part. Near Mem.	Part. Near Mem. of All Part. [%]	Conc. All Part. in Cytoplasm [$\text{part}/\mu\text{m}^3$]	[μM]
T1	0.03869	0.01627	42.06	800	322	40.25%	20677	34
T2	0.04166	0.01420	34.07	1200	296	24.67%	28802	48
T3	0.23397	0.03256	13.92	NA	NA	NA	NA	NA
T4	0.16609	0.02876	17.32	NA	NA	NA	NA	NA
T5	0.10909	0.02051	18.80	1800	477	26.50%	16500	27
T6	0.08329	0.01389	16.67	2800	462	16.50%	33619	56
T7	0.14186	0.02609	18.39	3600	588	16.33%	25377	42
T8	0.06771	0.01144	16.89	1800	354	19.67%	26583	44
T9	0.04797	0.00478	9.97	NA	NA	NA	NA	NA
T10	0.21175	0.02651	12.52	NA	NA	NA	NA	NA
T11	0.13981	0.01923	13.76	2200	465	21.14%	15736	26
T12	0.05132	0.01265	24.64	2000	468	23.40%	38974	65
T13	0.05912	0.14283	241.60	NA	NA	NA	NA	NA
T14	0.10330	0.02088	20.21	4000	1039	25.98%	38722	64
T15	0.34794	0.32780	94.21	NA	NA	NA	NA	NA
T16	0.03976	0.01323	33.28	1200	563	46.92%	30183	50
T17	0.08371	0.01536	18.35	2400	557	23.21%	28671	48
Mean / Total:			20.48	23800	5591	25.87	27622±7851	46±13
- IPTG:			26.84	2000	618	32.46	24740±5745	41±10
+ IPTG:			18.53	21800	4973	24.40	28263±8390	47±14

Tomo-gram	MBR	MBR of all Part. [%]	MBR of Near Mem. Part. [%]	Conc. Mem Near Part. in Vol. Near Mem. [$\text{part}/\mu\text{m}^3$]	[μM]	Conc. MBR in Vol. Near Mem. [$\text{part}/\mu\text{m}^3$]	[μM]
T1	6	0.75%	1.86%	19789	33	369	1
T2	13	1.08%	4.39%	20851	35	916	2
T3	21	NA	NA	NA	NA	2334	4
T4	23	NA	NA	NA	NA	1426	2
T5	47	2.61%	9.85%	23257	39	2292	4
T6	64	2.29%	13.85%	33269	55	4609	8
T7	51	1.42%	8.67%	22539	37	1955	3
T8	29	1.61%	8.19%	30955	51	2536	4
T9	0	NA	NA	NA	NA	0	0
T10	158	NA	NA	NA	NA	5960	10
T11	0	0.00%	0.00%	24177	40	0	0
T12	33	1.65%	7.05%	37011	61	2610	4
T13	6	NA	NA	NA	NA	42	0
T14	50	1.25%	4.81%	49761	83	2395	4
T15	115	NA	NA	NA	NA	351	1
T16	15	1.25%	2.66%	42552	71	1134	2
T17	69	2.88%	12.39%	36268	60	4493	7
Mean / Total:	700	1.53	6.70	30948±9804	51±16	1979±1736	3±3
- IPTG:	63	0.92	3.13	20320±751	34±1	682±237	1±0.4
+ IPTG:	637	1.66	7.50	33310±9250	55±15	2244±1512	4±3

Legende der Tab. 7 auf der nächsten Seite

Tab. 7. **Ribosomenkonzentration an der Membran.** Aufgelistet sind für jedes Tomogramm das Zytosolvolumen, das Zytosolvolumen innerhalb von 25 nm Abstand zur Zellmembran, der Anteil des zytosolnahen Volumens am Zytosol, die Gesamtzahl der identifizierten Ribosomen, die Zahl der Ribosomen, die sich in Membrannähe befinden, der Anteil der membrannahen Ribosomen bezogen auf alle Ribosomen, die Gesamtribosomenkonzentration, die Zahl der selektierten MBR, der Anteil der MBR in Beziehung zu allen Ribosomen und den membrannahen Ribosomen, sowie die lokalen Konzentrationen der membrannahen Ribosomen und der MBR.

Die visuell ausgewählten MBRs beinhalten für die nicht induzierten Proben (T1-T4), in denen kein MtlA-Konstrukt exprimiert wurde (- IPTG), durchschnittlich 0,9 % aller Ribosomen, bzw. 3,1 % der membrannahen Ribosomen. Bei den induzierten Proben (T5-T17, + IPTG) machten die MBR 1,7 % aller Ribosomen bzw. 7,5 % der membrannahen Ribosomen aus. Die durchschnittliche lokale Ribosomenkonzentration in Membrannähe ist bei den induzierten Proben (55 μM) größer, als bei den nicht induzierten Proben (34 μM). Ähnlich verhalten sich die Konzentrationen der MBRs in Membrannähe. Die Konzentration der MBR in Membrannähe für die induzierten Proben beträgt 1 μM und für die nicht induzierten Proben 4 μM . Die Expression eines Transmembranproteins mit SecM-Sequenz erhöht die Ribosomenzahl in Membrannähe. Die Gesamtribosomenkonzentration ist für die induzierten Proben mit 47 μM nur geringfügig größer als die der nicht induzierten Proben (41 μM).

3.10.3 Alignierung und Klassifizierung von Ribosomen

Nach der Ribosomenselektion steht nun ein Datensatz von 23,8 k Ribosomen zur weiteren Analyse bereit. Die Ribosomen des Datensatzes wurden referenzfrei 3D aligniert. Als Bezugsdichte für die referenzfreie 3D Alignierung war eine Ribosomendichte in der sogenannten *top*-Orientierung herangezogen worden. Dies erleichterte einen Vergleich mit anderen Ergebnissen aus vorangegangenen Studien ². Die alignierte und gemittelte Dichte aller Ribosomen (Abb. 40 A) zeigt in der Draufsicht unstrukturierte und stöchiometrische Dichten am Ein- und Ausgang der mRNA. Diese Dichten waren zu erwarten, da bei dicht gepackten Ribosomen in einer Zelle Polysomen auftreten können. In einem Polysom sitzen mehrere Ribosomen auf einer mRNA und translatieren diese. Bei den zur mRNA benachbarten Dichten wird es sich höchstwahrscheinlich um Nachbarribosomen handeln. Dies wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden. Außerdem sind Dichten am ribosomalen Tunnelausgang, der L7-L12-Protuberanz, der Elongationsfaktorenbindestelle und den tRNA-Bindungsstellen zu erkennen. Die aufgeführten Betrachtungsschwerpunkte (Domänen) sollten durch anschließende Klassifikationen gezielt

untersucht werden. Die Masken um diese Betrachtungsschwerpunkte sind in der Draufsicht, sowie der Ansicht von rechts gezeigt (Abb. 40 B). 3D Dichten können durch 2D Querschnitte (parallel zur x-y-Ebene mit definierten z-Abständen) dargestellt werden (Abb. 40 C). Die oberste Zeile zeigt die Querschnitte durch die gemittelte Dichte der 23,8 k Ribosomen, wobei die Betrachtungsschwerpunkte gekennzeichnet sind (Pfeile). Die Querschnitte der Maske zur Klassifizierung des linken (5'-) Nachbarn sind in der zweiten Zeile zu sehen. Zeile drei zeigt die referenzfrei 3D alignierte und gemittelte Dichte einer Gruppe von Ribosomen mit einem linken (5'-) Nachbarn. Diese Gruppe war aus der Klassifizierung nach dem linken (5'-) Nachbarn erhalten worden. Bei dem linken (5'-) Nachbarn handelt es sich, wie deutlich zu erkennen ist, um ein anderes 70S Ribosom. Die letzte Zeile zeigt ein Modell für ein zentrales 70S Ribosom, welches ein weiteres 70S Ribosom als 5'-Nachbarn besitzt. Aus einem hierarchischen Clustering basierend auf Klassifikationen mit Fokus auf einen 5'-Nachbarn ergab sich, dass 40,7 % eine strukturierte Dichte in der 5'-Domäne (t-in), 7,8 % ein deutlich zu erkennendes 5'-Nachbarribosom (t-t) und 51,5 % keine prominente Dichte (t-out) besitzen (Abb. 40 D). Ein repräsentativer Querschnitt durch jede der genannten Gruppen (t-in, t-t u. t-out) aus dem hierarchischen Clustering ist ebenso gezeigt.

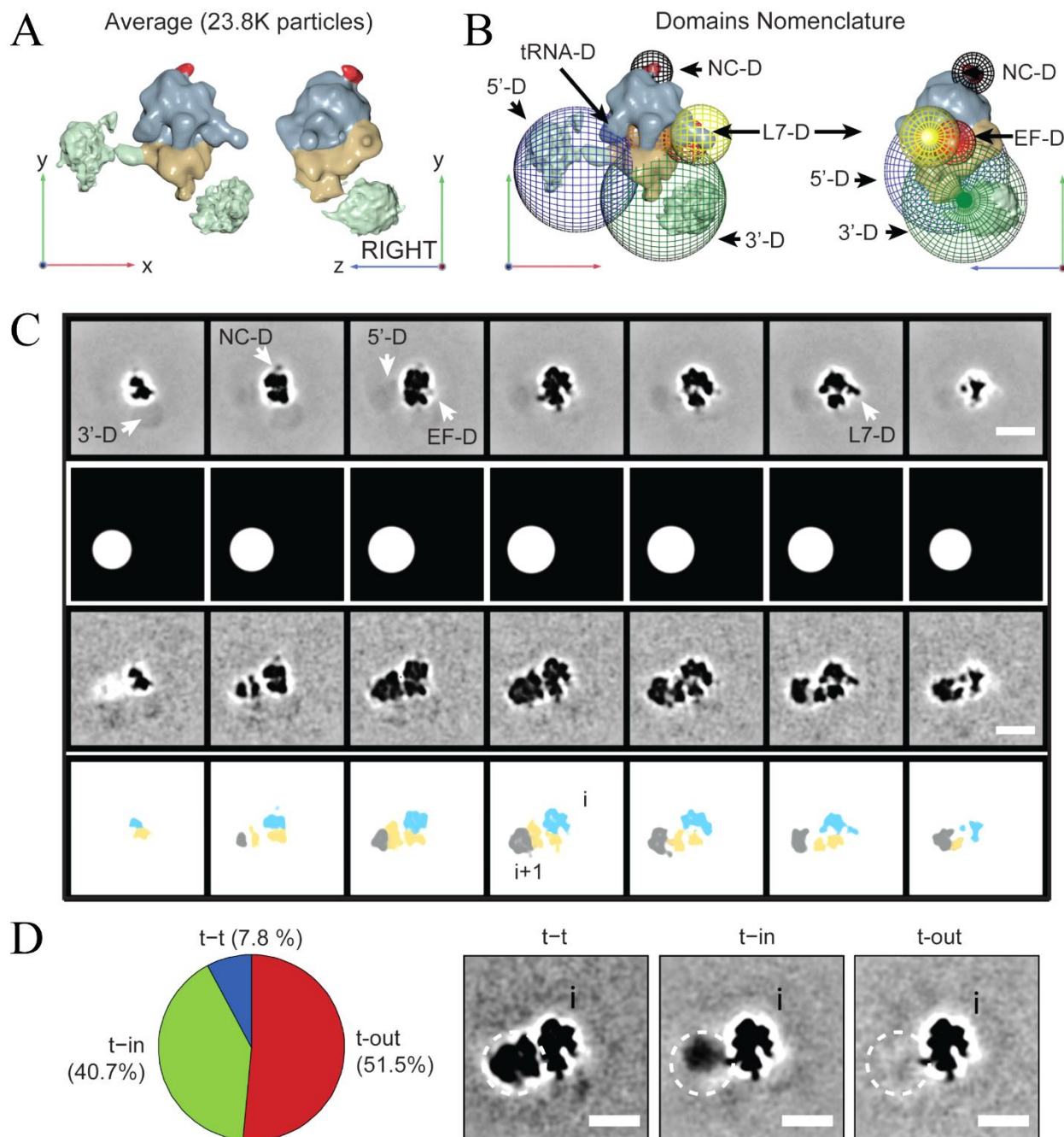


Abb. 40. **Referenzfrei 3D alignierte und gemittelte Ribosomendichte.** (A) Darstellung der referenzfrei 3D alignierten und gemittelten Dichte aus 23,8 k selektierten Ribosomen. Gezeigt werden die Draufsicht (engl. *top view*) und die Ansicht von rechts (engl. *right view*). (B) Masken in Netzdarstellung um Betrachtungsschwerpunkte (Domänen) sind in Draufsicht und Ansicht von rechts dargestellt. (C) Querschnitte (parallel zur x-y-Ebene mit definierten z-Abständen) durch die gemittelte Dichte aus 23,8 k Ribosomen, die 5'-Maske, eine Klasse von Ribosomen mit 5'-Nachbarn und die Modelldarstellung eines Ribosoms mit 5'-Nachbarn. (D) Basierend auf einem hierarchischen Clustering werden die Häufigkeit von drei Klassen (t-t, t-in und t-out), sowie representative Querschnitte der gemittelten Dichten der jeweiligen Klassen, welche anhand der Ähnlichkeit der 5'-Domäne klassifiziert worden sind, gezeigt. Weißer Balken: 25 nm.

Anhand der Klassifikationen mit den ausgewählten Masken (Abb. 40 B) konnten Partikelgruppen gefunden werden, die Dichten in den entsprechenden Masken aufwiesen. Die Partikelgruppen wurden abhängig von ihrem Ursprungstomogramm aufgesplittet und in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 8) aufgelistet. Einen 5'-Nachbarn in der *top-to-top* (*t-t*) Konformation haben ca. 8 % aller klassifizierten Ribosomen. Eine Dichte an der Bindungsstelle der Elongationsfaktoren zeigen rund 42 % aller Ribosomen. Klassen, die eine sehr gute Dichte an der Bindungsstelle der Elongationsfaktoren besitzen beinhalten ~14 % der Ribosomen.

Tomogram	Classified 70S ribosomes	70S-70S (5p)		MBR		Occupied EF-D 70S	
			[% of 70S]		[% of 70S]		[% of 70S]
T1	800	59	7.38%	6	0.75%	171	21.38%
T2	1200	82	6.83%	13	1.08%	228	19.00%
T3	NA	NA	NA	21	NA	NA	NA
T4	NA	NA	NA	23	NA	NA	NA
T5	1800	153	8.5%	47	2.61%	256	14.22%
T6	2800	190	6.79%	64	2.29%	277	9.89%
T7	3600	259	7.19%	51	1.42%	390	10.83%
T8	1800	184	10.22%	29	1.61%	206	11.44%
T9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T10	NA	NA	NA	158	NA	NA	NA
T11	2200	131	5.95%	NA	NA	231	10.50%
T12	2000	127	6.35%	33	1.65%	248	12.40%
T13	NA	NA	NA	6	NA	NA	NA
T14	4000	278	6.95%	50	1.25%	426	10.65%
T15	NA	0	NA	114	NA	NA	NA
T16	1200	78	6.5%	15	1.25%	220	18.33%
T17	2400	323	13.46%	70	2.92%	319	13.29%
TOTAL:	23800	1864		700		2972	
MEAN:			7.83%		1.53%		13.81%

Tab. 8. **Klassifikationen.** Aufgelistet sind (i) die Gesamtzahl der gewählten Ribosomen, die anhand der fokussierten Klassifikationen ermittelten Anteile (ii) der 5'-Nachbarribosomen, (iii) der selektierten MBRs und (iv) der Ribosomen mit Dichte an der Elongationsfaktorbindungsstelle für jedes Tomogramm.

3.10.3.1 Relative Orientierung von Ribosomen im zellulären Kontext

Nachdem durch eine Klassifizierung Nachbarribosomen gefunden wurden soll nun im Folgenden die relative Orientierung benachbarter Ribosomen zueinander untersucht werden. Dicht gepackte Ribosomen können, wenn sie auf einer gemeinsamen mRNA sitzen ein Polysom bilden. In diesem Polysom können die Nachbarribosomen eine spezifische Orientierung zueinander besitzen ², z.B

t-t oder *top-to-bottom* (*t-b*). Nun wurde die Topologie benachbarter Ribosomen auf Grundlage der Partikelliste, welche die Positionen und Orientierungen der Ribosomen enthält analysiert. Zunächst wurden die Distanzvektoren vom Massezentrum eines Ribosoms zum Massezentrum eines benachbarten Ribosoms berechnet. Dann wurden abhängig von der Ribosomenorientierung des Ribosoms am Vektoranfang (Zentrum) bezüglich einer verwendeten Referenz die berechneten Distanzvektorendpunkte in eine Grafik eingetragen. Häufiger vorkommende Distanzvektorendpunkte wurden farblich gekennzeichnet. Wegen der Vielzahl an Datenpunkten in dieser Grafik wurde eine 2D Wahrscheinlichkeitsverteilung auf die x-y- und die x-z-Darstellung der Grafik im verwendeten Koordinatensystem angewendet. Die graphische Auswertung (Abb. 41) für ein Tomogramm (T2) ergab zwei bevorzugte Positionen (rote Bereiche) für benachbarte Ribosomen. Eine Position befand sich bezogen auf das zentrale Ribosom in der Draufsicht (engl. *top view*) links, die andere rechts, leicht nach unten versetzt (Abb. 41 A). Die Analyse von allen Tomogrammen manifestierte diese beiden Positionen (Abb. 41 B). Eine Modellansicht, in denen das zentrale Ribosom mit angedeutetem mRNA-Verlauf und die Distanzvektorendpunkte der beiden häufigsten Positionen der Nachbarribosomen eingetragen sind, veranschaulicht die Lage der Nachbarribosomen (Abb. 41 C). Da die linke Position der Nachbarribosomen auf der 5'-Seite der mRNA des zentralen Ribosoms liegt, wird dieses Nachbarribosom als 5'-Nachbarribosom oder „i+1“ bezeichnet. Die rechte Position der Nachbarribosomen befindet sich nahe der 3'-Seite der mRNA des zentralen Ribosoms und wird analog als 3'-Nachbarribosom oder „i-1“ bezeichnet². Die topologische Analyse, sowie das entsprechende Modell wird auch für die Vorderansicht gezeigt (Abb. 41 D-F). Für die topologische Analyse der Orientierung wurden zwei Graphen erstellt. Der erste Graph zeigte die Winkelverteilung von φ und ψ , der zweite Graph von φ und θ . Die Häufigkeit der auftretenden Winkelverteilungen wurde analog zu den Distanzvektoren farblich gekennzeichnet. Die φ - ψ Grafik (Abb. 41 G) zeigt überwiegend Winkelverteilungen, die typisch für die *t-t*-Orientierung sind. Bei der topologischen Analyse von 70S Ribosomen *in vitro* waren hauptsächlich zwei Orientierungen (*t-t* u. *t-b*) für benachbarte Ribosomen gefunden worden (Abb. 41 I). Dabei liegen die 30S Untereinheiten benachbarter Ribosomen gegenüber. Der Unterschied der beiden Orientierungen besteht in einer ca. 180° Rotation um die x-Achse des gewählten Koordinatensystems². Im Gegensatz zur Ribosomenorientierung *in vitro* gibt es die *t-b* Orientierung benachbarter Ribosomen in *E. coli*-Zellen nur selten. Die Nachbarribosomen um ein zentrales Ribosom kommen sowohl an der 5'- als auch an der 3'-Seite hauptsächlich in *t-t*-Orientierung vor.

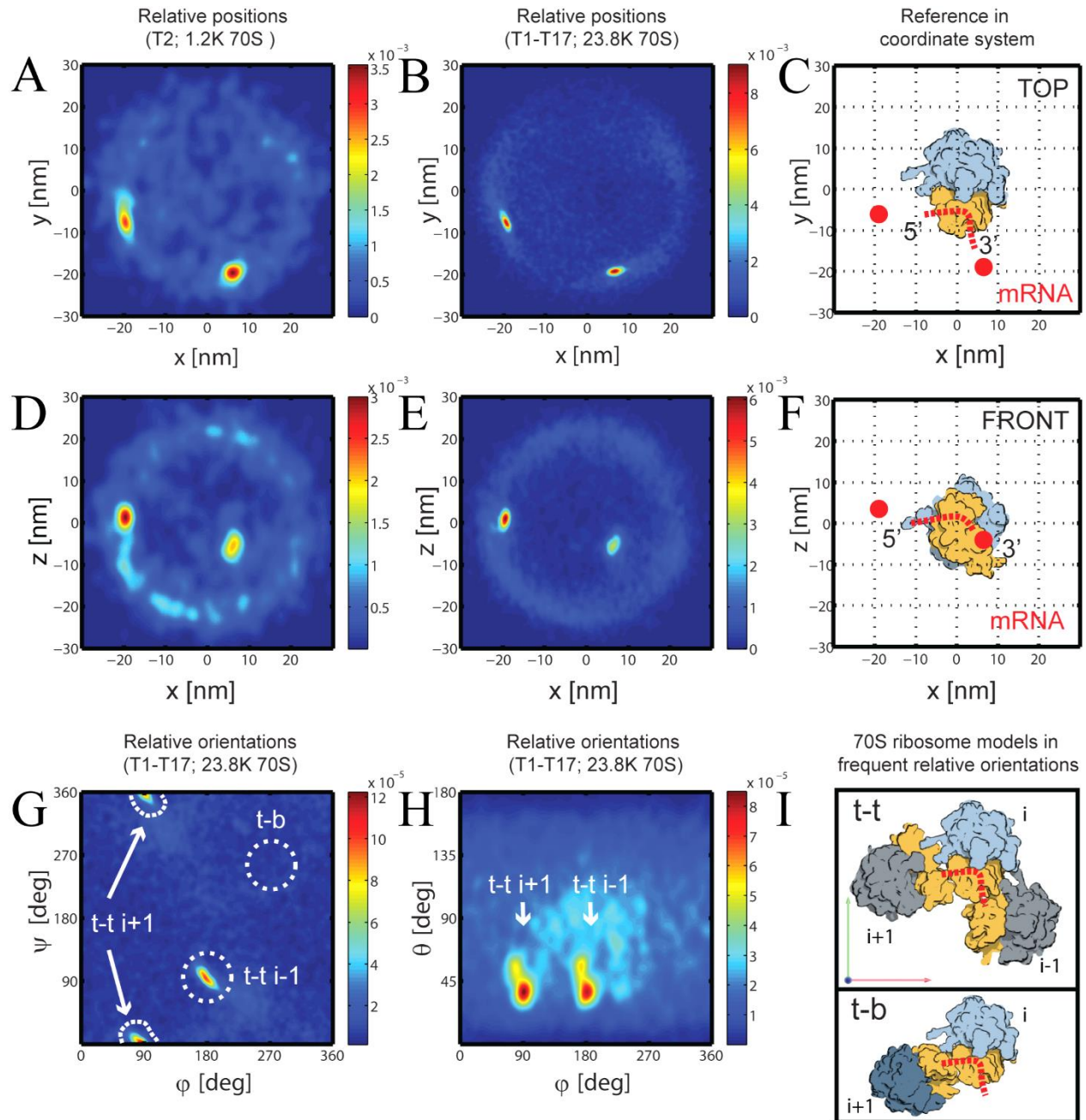


Abb. 41. **Ribosomentopologie in *E. coli*-Zellen.** Relative Positionen der nächsten Nachbarn sind für ein Tomogramm einer *E. coli*-Zelle (A, D), als auch für alle analysierten Tomogramme (B, E) in Draufsicht (*top view*) und Vorderansicht (*front view*) gezeigt. Modellansichten, in denen das zentrale Ribosom mit angedeutetem mRNA-Verlauf und die Distanzvektorendpunkte der beiden häufigsten Positionen der Nachbarribosomen eingetragen sind, veranschaulichen die Lage der nächsten Ribosomen. (C) zeigt das Ribosomenmodell für die Draufsicht und (F) für die Vorderansicht. (G) zeigt die relativen Orientierungen benachbarter Ribosomen für die ϕ - ψ Winkel. Die Winkelwerte für die beschriebenen Orientierungen t-t und t-b² sind eingetragen. (H) stellt die relativen Orientierungen benachbarter Ribosomen für die ϕ - θ Winkel dar. (I) Modelle benachbarter Ribosomen für die t-t-Orientierung (oben) und die t-b-Orientierung (unten).

3.10.3.2 Verbindung von Nachbarribosomen

Nachdem die relative Orientierung aller benachbarter Ribosomen betrachtet wurde, wird der Fokus nun auf Verbindung von Nachbarribosomen gelegt. Dazu wurden alle Klassifizierungen mit Fokus auf das 5'-Nachbarribosom mittels eines hierarchischen Clusterings zusammengeführt und analysiert. Klassen unterhalb eines Grenzwertes von 0,2 wurden zu einer Klassengruppe zusammengefasst und farblich im Dendrogramm hervorgehoben (Abb. 42 A). Die gemittelten Dichten der gefundenen fünf Klassen mit 5'-Nachbarribosomen wurden überlagert (Abb. 42 B). Die 5'-Nachbarribosomen der Klassen weisen unterschiedliche Orientierungen im Bezug zum zentralen Ribosom auf. Die Dichten für die Klassengruppenmittel sind in verschiedenen Farben dargestellt (Abb. 42 C). Die 5'-Nachbarribosomen in allen Klassengruppen kommen in t-t-Orientierung vor. Alle Dichten der Klassengruppenmittel zeigen neben der Dichte für das 5'-Nachbarribosom weitere Dichtefragmente. Die Klassengruppenmittel tt-1, tt-2 und tt-5 zeigen ein Dichtefragment an ähnlicher Stelle, an der ein 3'-Nachbarribosom zu erwarten wäre. Diese Beobachtung wurde anhand einer nachfolgenden Klassifizierung mit Fokus auf ein 3'-Nachbarribosom untersucht. Eine genauere Betrachtung des 5'-Nachbarribosoms und des zentralen Ribosoms hat gezeigt, dass beide durch eine oder zwei Dichtebrücken miteinander verbunden sein können. Das Überlagern der bekannten 70S Ribosomenstruktur, welche mittels Röntgenbeugung erhalten wurde, mit der Dichte für das zentrale Ribosom zeigt, dass die beiden Verbindungen höchstwahrscheinlich durch die L1 Protuberanz (engl. *protuberance*, L1P) und das flexible L9 Protein^{1,127} gebildet werden. In den letzten beiden Bildern (Abb. 42 D, E) werden die interribosomalen Verbindungen zwischen den Nachbarribosomen für die Klassen tt-1 und tt-3 gezeigt. Bei der Klasse tt-1 kann eine Dichte im Bereich des L9 Proteins des zentralen Ribosoms als Verbindung ausgemacht werden (Abb. 42 D). Bei der Klasse tt-3 werden die interribosomalen Verbindungen von zwei Kontakten, wahrscheinlich durch das ribosomale Protein L9 und die L1P des zentralen Ribosoms, hergestellt (Abb. 42 E). Nachbarribosomen, die Verbindungen zueinander aufweisen liegen eng nebeneinander.

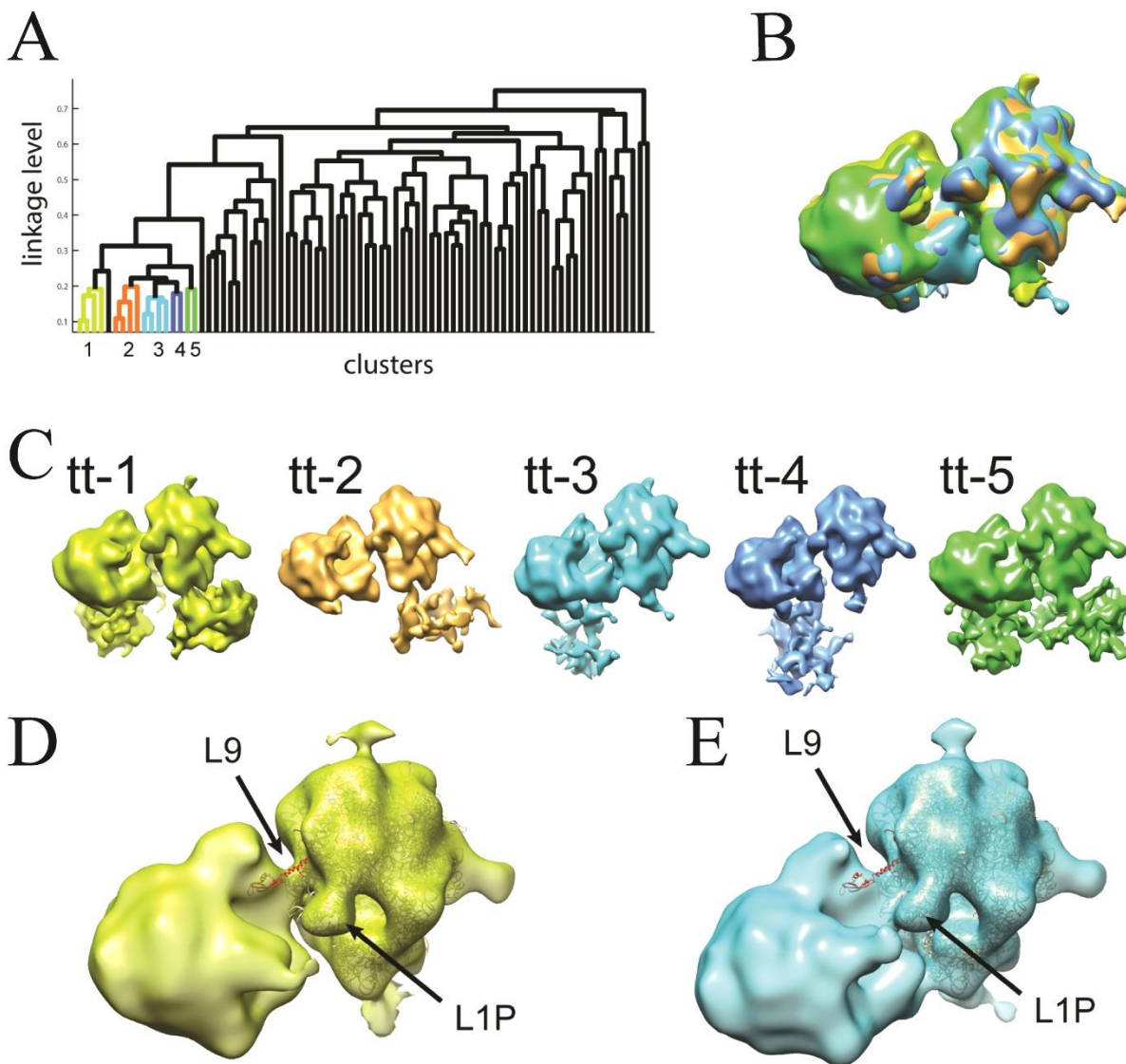


Abb. 42. **Hierarchisches Clustering.** (A) Im Dendrogramm des hierarchischen Clusterings der Klassifikation mit Fokus auf das 5'-Nachbarribosom sind unterschiedliche Klassen mit 5'-Nachbarribosomen farblich hervorgehoben. (B) Überlagerung von fünf Klassen mit 5'-Nachbarribosom. (C) Die Dichten der fünf Klassenmittel (tt-1 – tt-5) aus (B) mit 5'-Nachbarribosom in t-t-Orientierung sind entsprechend ihrer Farbe dargestellt. (D) Blick auf die interribosomale Verbindung der Klasse tt-1. Positionen des L9 und L1P des zentralen Ribosoms sind angezeigt. (E) Interribosomale Verbindungen der Klasse tt-3.

Um einen Eindruck vom durchschnittlichen Abstand benachbarter Ribosomen zu erhalten wurde zunächst die Anzahl an Nachbarribosomen und dann der Abstand zum nächsten Nachbarribosom ermittelt. Die Analyse der nächsten Nachbarribosomen um ein Ribosom in einem Tomogramm einer schnell wachsenden Zelle (T2) hat ergeben, dass jedes Ribosom im Durchschnitt 4,5 Nachbarribosomen hat (Abb. 43 A). Die durchschnittliche Entfernung zum nächsten Nachbarribosom beträgt ~ 24 nm (Abb. 43 B). Eine fast gleichbleibend große Anzahl an Ribosomen

haben Nachbarribosomen ab einem Abstand von ~ 26 nm (Abb. 43 C). Diese Zahlen bestätigen den optischen Eindruck, dass die Ribosomen in den *E. coli*-Zellen dicht gepackt sind.

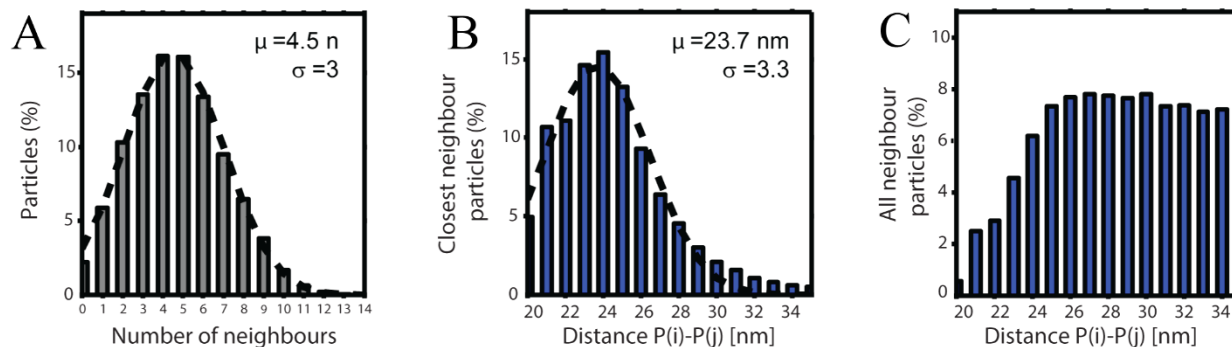


Abb. 43. **Nachbarribosomen.** (A) Zeigt die Anzahl an Nachbarribosomen eines Tomogramms (T2) einer schnell wachsenden Zelle, die jedes Ribosom durchschnittlich besitzt. Über die Verteilung der Nachbarribosomen konnte eine Gaußkurve gelegt werden. Diese ergab, dass jedes Ribosom im Durchschnitt 4,5 Nachbarribosomen besitzt. (B) Dargestellt ist der durchschnittliche Abstand (~ 24 nm) bezüglich der Massezentren der Ribosomen zum nächsten Nachbarribosom innerhalb eines Radius von 35 nm. (C) Zeigt die Abstände aller Nachbarribosomen um ein Ribosom.

3.10.3.3 Trisom – Polysom

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass benachbarte Ribosomen in geringem Abstand zueinander in den *E. coli*-Zellen vorkommen. Einige Ribosomen besitzen sogar direkte Verbindungen zu Nachbarribosomen. Nun werden das Vorkommen und die Größe von Polysomen in *E. coli*-Zellen untersucht. Bei der 5'-Nachbarribosomenklassifizierung waren in einigen Klassen (tt-1, tt-2 und tt-5) Dichtefragmente in der Nähe der 3'-Nachbarribosomenposition gesehen worden (Abb. 42 C). Daher wurde eine 3'-Nachbarribosomenklassifizierung durchgeführt. Die Klassifizierung ergab u.a. eine Klasse von 249 Partikeln, die um ein zentrales Ribosom sowohl ein 5'-Nachbarribosom, als auch ein deutlich erkennbares 3'-Nachbarribosom besitzt. Diese Ribosomenanordnung wird als Trisom bezeichnet. Im Trisom sind die Ribosomen zueinander in der t-t-Orientierung ausgerichtet. Im Querschnitt (parallel zur x-y-Ebene) des Trisoms konnten die drei Ribosomen eindeutig visuell identifiziert werden (Abb. 44 A). Danach wurde die lokale Auflösung des Trisoms ermittelt (Abb. 44 B). Die lokale Auflösung ist für das zentrale Ribosom (i) am größten ($\sim 3,0$ nm) und für die beiden Nachbarribosomen ($i+1$ (5') u. $i-1$ (3')) etwas niedriger ($\sim 3,5$ nm).

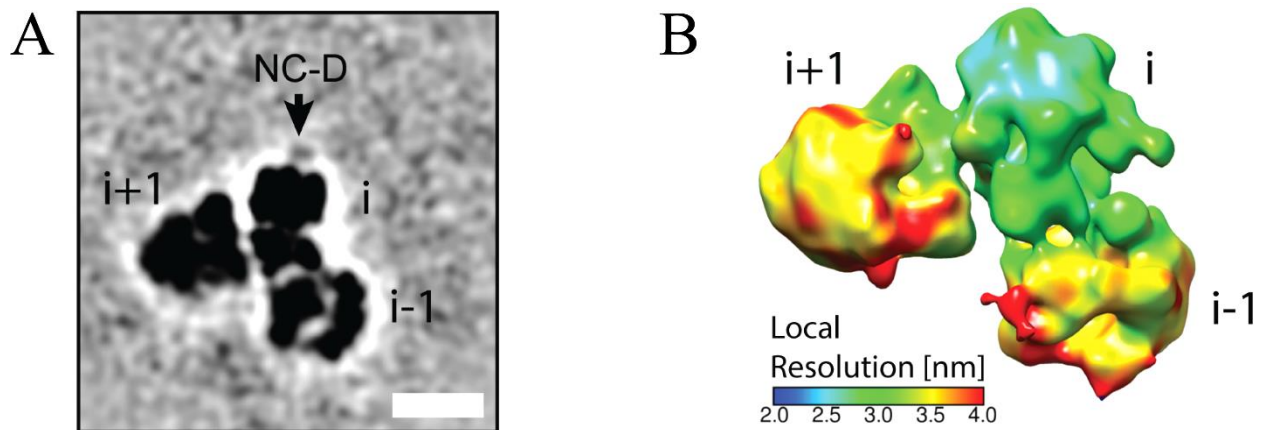


Abb. 44. **Trisom.** Die 5'-Nachbarrisomenklassifizierung gefolgt von einer 3'-Nachbarrisomenklassifizierung der 70S Ribosomen ergab eine Klasse, die Nachbarrisomen in diesen beiden prominenten Positionen ($i+1$ u. $i-1$) besitzt. Dargestellt ist der Querschnitt durch dieses Trisomklassenmittel (A) sowie die lokale Auflösung im Trisomklassenmittel (B). Weißer Balken: 25 nm.

Ein anderer Weg Polysomen zu finden, besteht in der Nutzung einer speziell entwickelten graphbasierten Software. Diese Software berechnet auf Grundlage der Ribosomenpositionen und deren Orientierungen den wahrscheinlichsten Weg einer mRNA. Dabei wird auch auf Vorkenntnisse von Polysomenverläufen aus *in vitro* Proben zurückgegriffen. Als Ergebnis wird der wahrscheinlichste mRNA-Verlauf und die Zahl von Ribosomen im Polysom vorgeschlagen. Die graphbasierte Software konnte kurze Polysomen, aus bis zu vier Ribosomen bestehend finden. Ein Beispiel eines Tetrasomes ist in Abb. 45 gezeigt. Das Tetrasom wird 3D durch Ribosomenmodelle mit mRNA, welche in die exakte Position und Orientierung der ursprünglich gefundenen Ribosomen platziert wurden, dargestellt. Durch zusätzliche dargestellte 2D Querschnitte wird die genaue Positionierung des Tetrasomenmodells gezeigt (Abb. 45 C-F). Außerdem können mit den 2D Querschnitten zum Tetrasom benachbarte Ribosomen deutlich gezeigt werden (Abb. 45 A, B).

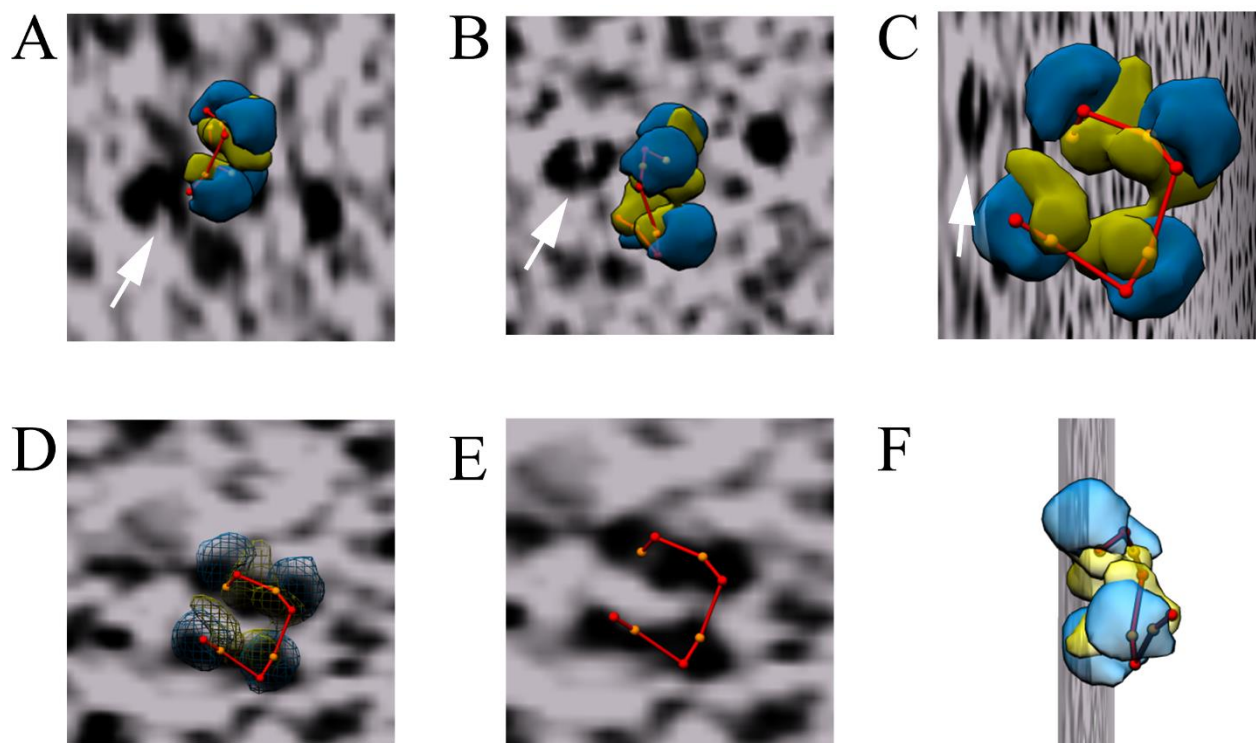


Abb. 45. **Tetrasom.** Ribosomenmodelle mit mRNA (50S UE blau, 30S UE gelb, mRNA rot) wurden an den Ribosomenpositionen des mittels graphbasierter Software gefundenen Tetrasomes platziert. (A) zeigt 2D Querschnitt des Tomogramms mit der Dichte eines benachbarten Ribosoms (weißer Pfeil) neben dem 3D Tetrasomenmodell. (B) Darstellung wie (A) in ca. 90° gedrehter Ansicht. (C) Schnittfläche des Gezeigten 2D Querschnitts (A, B) mit dem 3D Tetrasomenmodell. (D) 3D Tetrasomenmodell in Netzdarstellung und ein 2D Querschnitt durch das Tetrasom. (E) Gleicher 2D Querschnitt wie in (D) zusammen mit mRNA des Tetrasoms. (F) Schnittfläche des gezeigten 2D Querschnitts (D, E) mit dem 3D Tetrasomenmodell.

3.10.3.4 Ribosomenverteilung

Bis jetzt wurde das Augenmerk der Ribosomenanalyse vor allem auf benachbarte Ribosomen gelegt. Jetzt soll die Membran etwas in den Vordergrund rücken und der Abstand der Ribosomen zur inneren Zellmembran der *E. coli*-Zellen betrachtet werden. In dieser Arbeit wurden langsam und schnell wachsende *E. coli*-Zellen verwendet. Das Zellwachstum ist abhängig vom verwendeten Medium. Langsam wachsende BL21 *E. coli*-Zellen wurden mit nur einer zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle (Alanin) kultiviert. Das langsame Wachstum führte zu elongierten dünneren *E. coli*-Zellen, die ohne die Ionenätzung im TEM untersucht werden konnten. In den Tomogrammen wurden die inneren Zellmembranen segmentiert. Für langsam wachsende *E. coli*-Zellen wurde das Modell der inneren Zellmembran durch Ellipsoidanpassung extrapoliert. Um einen Eindruck der Ribosomenverteilung in der Zelle zu erhalten, wurden die Abstände der

lokalisierten Ribosomen zur inneren Zellmembran berechnet. Die Abstandsberechnung wurde für Zellen ohne (blau) und mit (rot) Expression des 6TM MtlA-SecM-Konstrukts durchgeführt. Ebenso wurde die Abstandsberechnung der Ribosomen für langsam und schnell wachsende BL21 *E. coli*-Zellen durchgeführt. Bei schnell wachsenden *E. coli*-Zellen wurden die inneren Membranen durch die Grenzen der Zytosolmasken bestimmt. Die erhaltenen Abstände wurden in einem Histogramm dargestellt (Abb. 46 D, H). In den schnell wachsenden *E. coli*-Zellen befanden sich rund 1,4-mal so viele Ribosomen als in den langsam wachsenden. Für beide Wachstumsgeschwindigkeiten ähnlich ist allerdings der Abstand der Ribosomen zur inneren Membran. Im Falle der Expression des 6TM MtlA-SecM-Konstrukts befinden sich jeweils mehr Ribosomen in Membrannähe als ohne Expression.

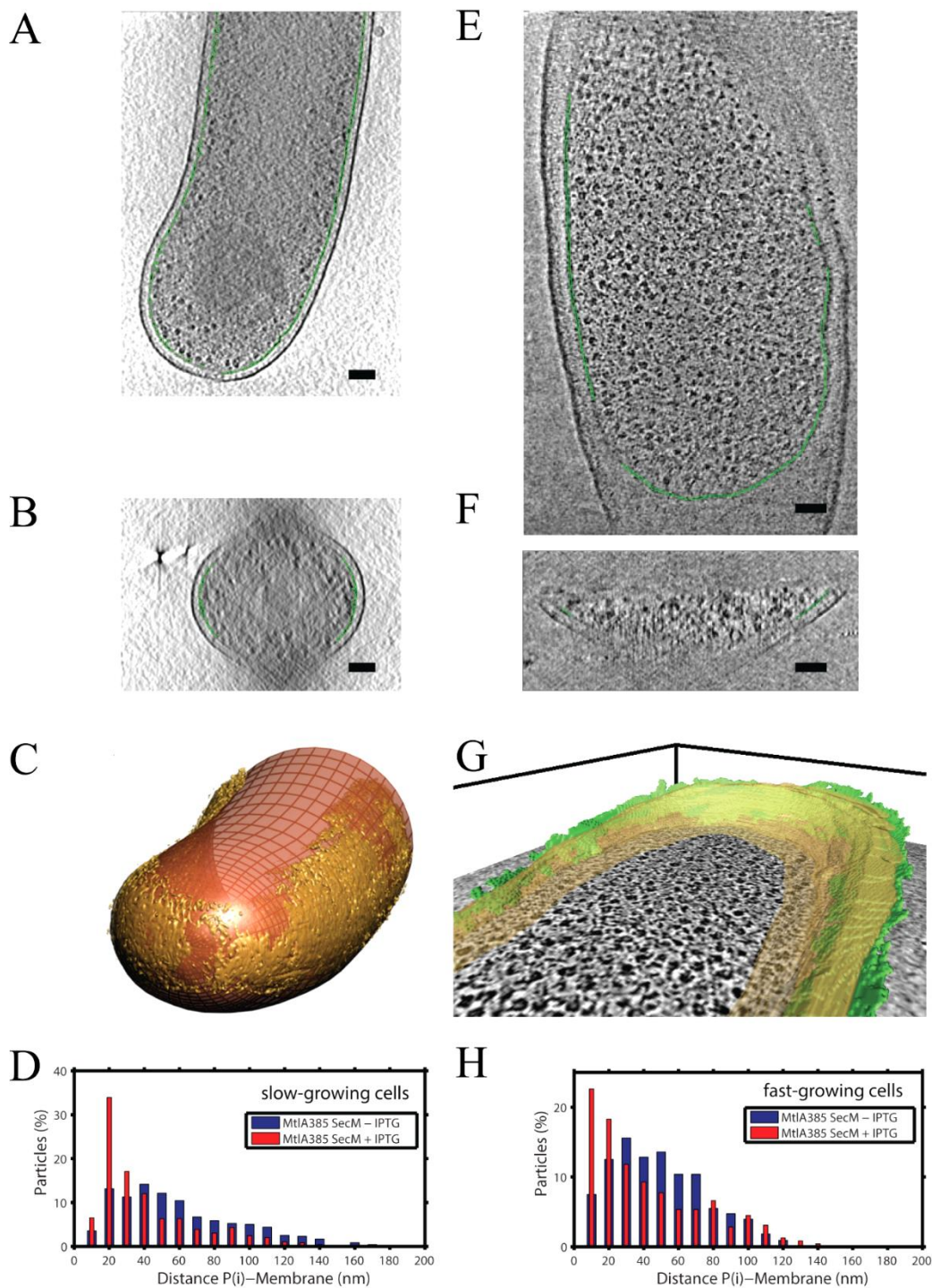


Abb. 46. **Ribosomenverteilung.** Abgebildet sind Querschnitte parallel zur x-y- (A, E) und parallel zur x-z-Ebene (B, F) von langsam (A, B) und schnell (E, F) wachsenden BL21 *E. coli*-Zellen. Die segmentierten inneren Membranen sind grün dargestellt. Balken: 100 nm. (C) Oberflächenansicht der segmentierten inneren Membran (gelb) einer langsam wachsenden *E. coli*-Zelle, sowie der mittels Ellipsoidanpassung extrapolierten inneren Membran (orange). (D) Perspektivische Oberflächenansicht der segmentierten inneren Membran (grün) und des membranahnen Volumens mit einem Abstand von bis zu 25 nm (gelb) einer schnell wachsenden *E. coli*-Zelle, sowie eines XY-Querschnitts durch das Tomogramm. Ribosomenabstand zur inneren Membran für langsam (D) und schnell (H) wachsende *E. coli*-Zellen mit (rot) und ohne (blau) Induktion des MtlA385-SecM-Konstrukts.

3.10.3.5 MBR

Den Fokus der Betrachtung nun auf die Membran zu legen wirft die Frage auf, ob bei der Expression eines MtlA-Transmembranfragments MBRs in den *E. coli*-Zellen gefunden werden können. Die visuelle Inspektion hatte gezeigt, dass einige MBRs in den Tomogrammen zu finden waren. Membrannahe Ribosomen wurden zunächst manuell selektiert. Dabei wurden nur Bereiche der Tomogramme berücksichtigt, an denen die innere Membran gut zu erkennen war. Durch zweimalige Wiederholung von referenzfreier 3D Alignment und Klassifikation, gefolgt von der Auswahl der besten Gruppen von MBRs, konnte eine gemittelte Dichte der MBRs erhalten werden. Anschließend wurden aus dem gewählten Datensatz durch visuelle Kontrolle falsch zur Membran orientierte Ribosomen entfernt. Die verbleibenden 700 MBRs wurden gemittelt (Abb. 47). In der Oberflächenansicht von rechts (Abb. 47 B rechts) ist eine Dichte (rot) in Form einer kleinen Erhebung auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran zu erkennen.

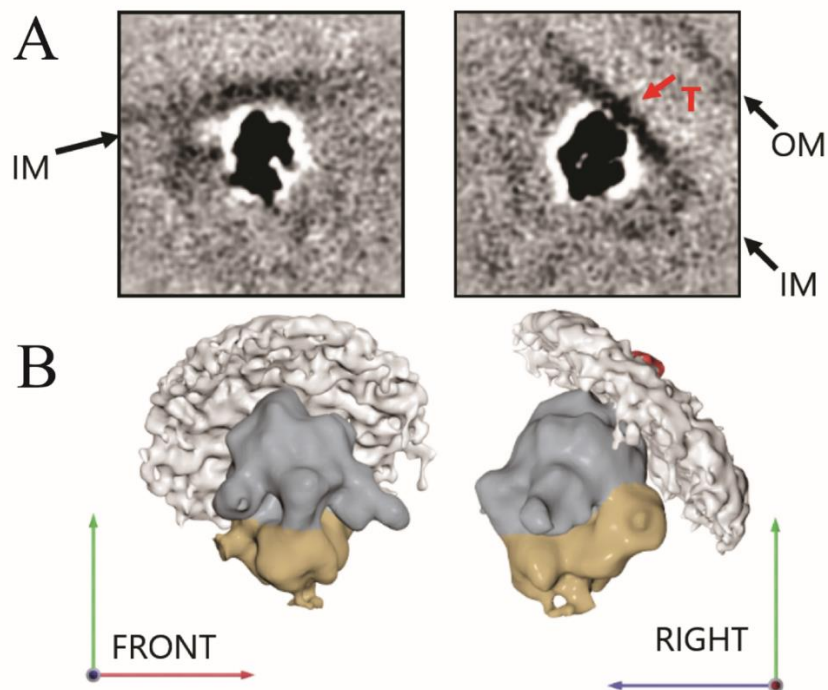


Abb. 47. **MBR**. Dargestellt ist die gemittelte Dichte von 700 MBRs mit einer $FSC_{0,5}$ von 3,0 nm in der Draufsicht und aus der Ansicht von rechts. Oben sind Querschnitte durch die Dichte (A) und unten die Oberflächenansicht gezeigt (B). Farbcode: 50S UE blau, 30S UE gelb, Membran weiß, prominente Dichte: rot.

Durch Aufteilung des MBRs-Datensatzes in zwei Halbdatsätze konnte die lokale Auflösung der referenzfreien 3D alignierten und gemittelten Dichte der MBRs berechnet werden. Die lokale

Auflösung ist mit 3,0 nm für das MBR am größten. Im Bereich der Membran nimmt die Auflösung auf ca. 4 nm ab (Abb. 48).

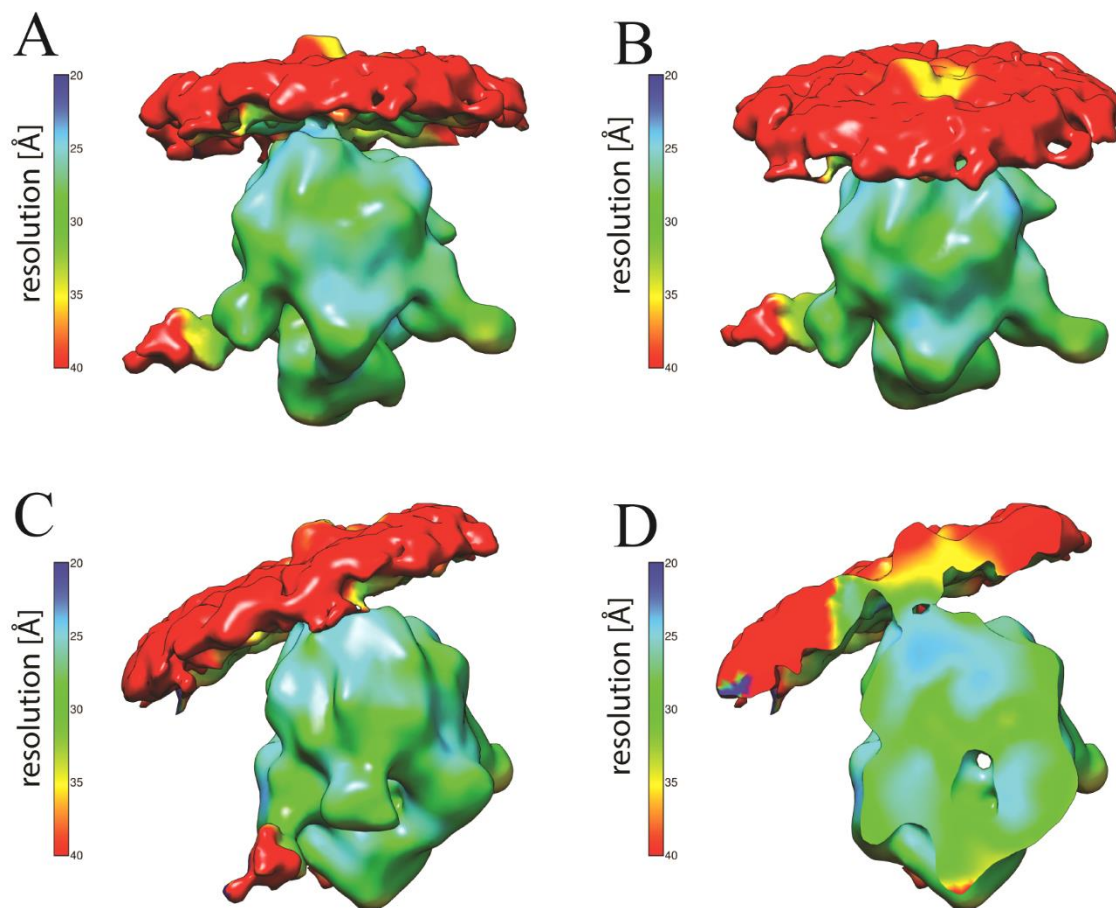


Abb. 48. **Lokale Auflösung MBR.** Gezeigt wird die lokale Auflösung der gemittelten Dichte der MBRs in Oberflächenansichten von vorne (A), von vorne oben (B) und von rechts (C), sowie als Querschnitt (D). Die Auflösung ist in Å angegeben.

Zur weiteren Analyse wurde die *in vitro* Struktur des SecYEG-Translokons gebundenen 70S Ribosoms (PDB 3J00), welches durch CEM und anschließende Einzelpartikelanalyse in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Beckmann am Genzentrum in München erhalten worden war, in die *in situ* Dichte des MBRs, welche in dieser Arbeit erzeugt worden ist, eingepasst (Abb. 49). Trotz der begrenzten Auflösung der *in situ* Struktur (~3 nm) stimmen beide Dichten gut überein. Die Lage der Membranumgebung (*Nanodisk*) der hoch aufgelösten Einzelpartikelstruktur und der Zellmembran bezüglich des MBR ist ähnlich. Auch die Verbindungen zum Translokons liegen an den gleichen Stellen.

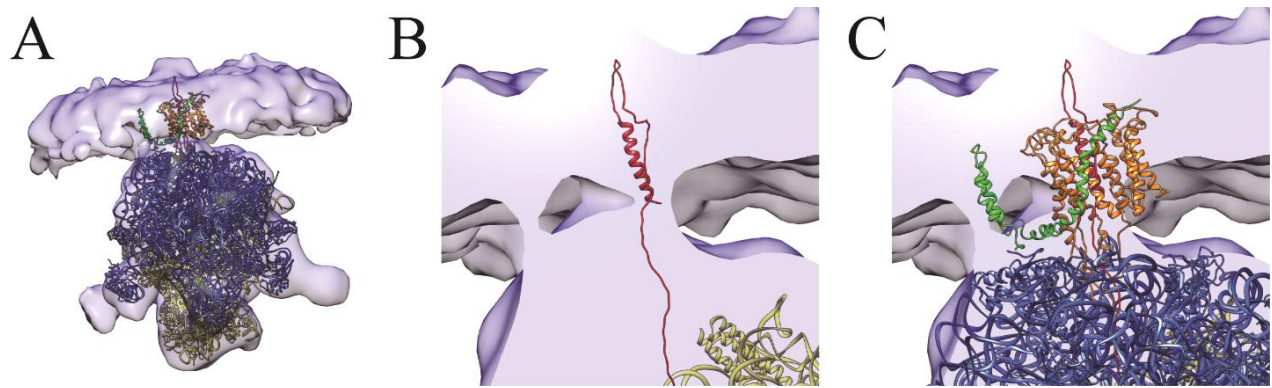


Abb. 49. **Einpassung des Atommodells in die Elektronendichte des MBRs.** (A) Gezeigt ist die Einpassung des hoch aufgelösten Modells des über das Translokons an die Membran gebundenen 70S Ribosoms in die Elektronendichte des MBRs. (B) Vergrößerte Darstellung des Kontaktbereiches zwischen Ribosom und Translokons der Elektronendichtekarte. Zusätzlich ist die naszierende Kette (rot) mit Signalsequenz (Helix) aus dem hoch aufgelösten Modell eingefügt worden. (C) Vergrößerte Darstellung (B) mit hoch aufgelöstem Modell des Translokons und Teilen des 70S Ribosoms.

Bei der Klassifizierung der MBR wurde eine Klasse von membrangebundenen Disomen gefunden. Dabei zeigt das rechte Ribosom des MBR-Disoms eine klare Verbindung zur Membran (Abb. 50). Das linke Ribosom besitzt eine schwächere Verbindung zur Membran.

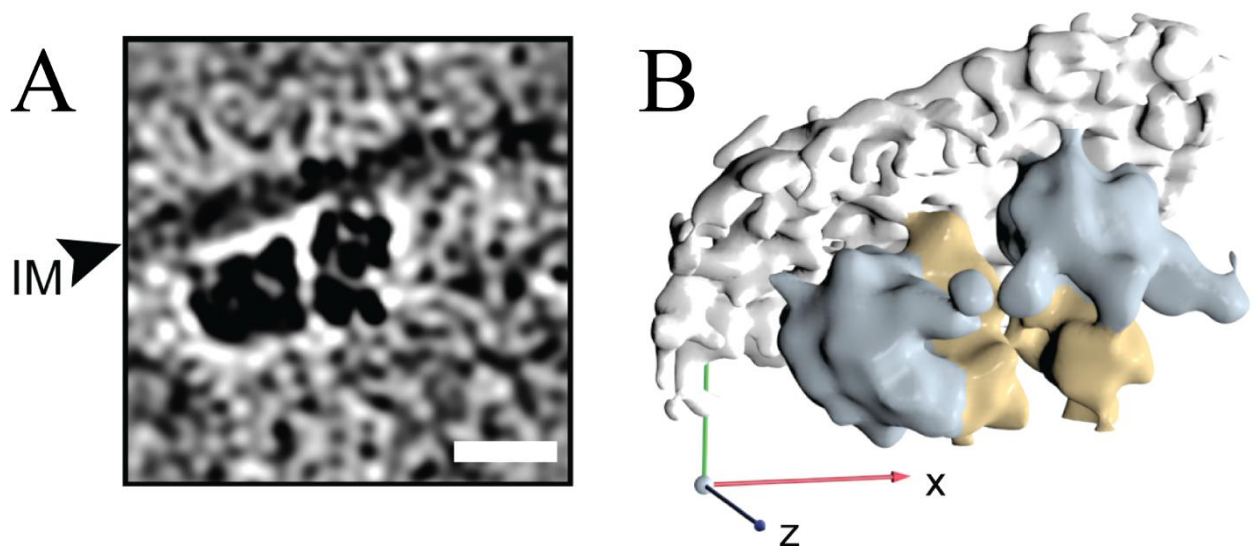


Abb. 50. **Disomen von MBRs.** Die gemittelte Dichte von membrangebundenen Disomen in t-t-Orientierung ist als Querschnitt (A) sowie in Oberflächenansicht (B) gezeigt. Balken: 25 nm.

Mit der Kenntnis über die Nachbarschaft eines jeden Ribosoms einer Zelle lässt sich ein Modell der Zelle mit Ribosomen erstellen. In dieses Zellmodell wurden die innere Membran, soweit diese segmentiert werden konnte, die Disomen, sowie die MBR eingetragen (Abb. 51 A, B). Für die Ribosomen wurde jeweils ein farblich gestaltetes Modell in der Orientierung und an der Position

platziert, an der das entsprechende Ribosom in der Zelle identifiziert worden war. In diesem Modell ließen sich so Cluster von MBR in der Zelle erkennen (z.B. weiße Ellipse in Abb. 51 A). An den Positionen der gefundenen MBR-Cluster konnten dann im Tomogramm ein genauerer Blick auf die Cluster geworfen werden (Abb. 51 C). Bei diesen Clustern handelt es sich sehr wahrscheinlich um membrangebundene Polysomen (Abb. 51 D).

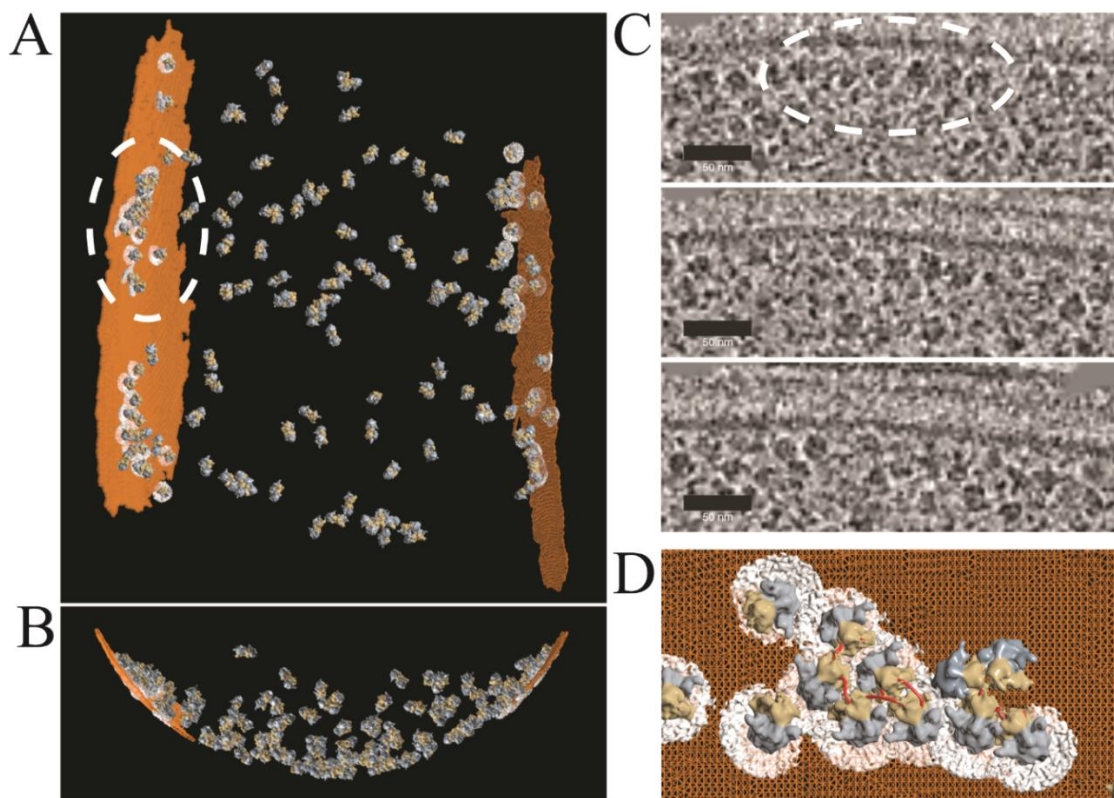


Abb. 51. **Polysomen an der Membran.** Ein Ribosomenmodell wurde an den Stellen und in der Orientierung platziert, wo Disomen und MBR in einer Zelle identifiziert worden waren. Dazu wurde die innere Membran der Zelle (orange), soweit diese segmentiert werden konnte, hinzugefügt. (A) zeigt die Draufsicht auf das erzeugte Zellmodell auf x - y -Ebene und (B) die Sicht auf die x - z -Ebene. So konnten dicht gepackte Ribosomenansammlungen in Membrannähe erkannt werden. (C) Stellt drei Ausschnitte von Querschnitten aus dem Tomogramm dar, die jeweils eine Reihe an eng benachbarter MBR besitzen. Balken 100 nm. (D) MBRs-Cluster, bei dem es sich um ein membrangebundenes Polysom handeln könnte. Der mögliche Verlauf der mRNA ist eingezeichnet (rot). Farbcode: 50S UE blau, 30S UE gelb, innere Membran orange / im Ribosomenmodell weiß.

3.10.3.6 Elongationsfaktor

Nach der Betrachtung der Ribosomenumgebung wird im Folgenden der Fokus auf Faktoren gelegt, welche direkt mit dem Ribosom interagieren. Dies sind z.B. die Elongationsfaktoren, an deren

Bindungsstelle Dichtefragmente in der alignierten und gemittelten Dichte aller Ribosomen gesehen worden waren (Abb. 40 B). Mit dem 23,8 k Ribosomen umfassenden Datensatz wurde eine weitere Klassifizierung mit Fokus auf die Bindungsstelle der Elongationsfaktoren durchgeführt. Mittels eines hierarchischen Clusterings wurden die Klassen mit einer Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle zusammengeführt (Abb. 52 A). Die Klassen mit und ohne Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle wurden getrennt gemittelt (Abb. 52 B, C). Die gemittelte Dichte ohne Elongationsfaktor zeigt an den Positionen, an denen 5'- bzw. 3'-Nachbarribosomen zu erwarten wären leicht erhöhte Dichtewerte (Abb. 52 C). Bei der gemittelten Dichte mit Elongationsfaktor ist nur ein sehr gering erhöhter Dichtewert an der 5'-Nachbarribosomenposition zu verzeichnen (Abb. 52 B). Dies könnte darauf schließen lassen, dass ein gebundener Elongationsfaktor nur dann am zentralen Ribosom beobachtet werden kann, wenn sich kein 3'-Nachbarribosom in unmittelbarer Nähe zum zentralen Ribosom befindet.

In die gemittelten Dichten dreier Klassen (EF-D-1 - 3) wurde die Struktur des EF-Tu-70S (PDB 4v69¹²⁸) eingepasst (Abb. 52 D-F). Die zusätzliche Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle stimmt in der Klasse EF-D-1 sehr gut mit der Struktur des Elongationsfaktors (EF-Tu, rot) überein. In der Klasse EF-D-2 (Abb. 52 E) ist die Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle größer und separierter als bei EF-D-1. Die Klasse EF-D-3 enthält keinen Elongationsfaktor, da keine Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle vorhanden ist. Insgesamt zeigen ~58 % der Ribosomen eine Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle.

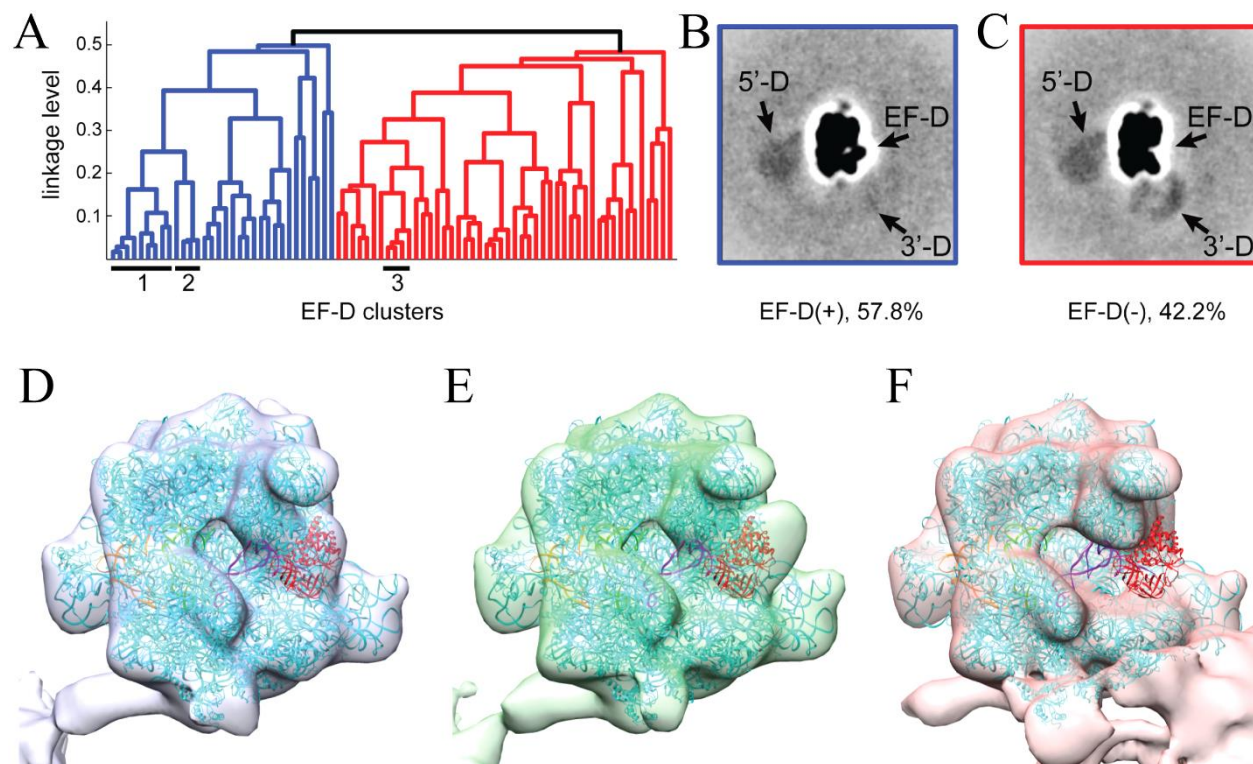


Abb. 52. **Elongationsfaktor.** (A) Hierarchisches Clustering der Klassifikationen mit Fokus auf die Elongationsfaktorenbindungsstelle. Querschnitte durch die gemittelten Dichten für die Klassen mit (B; blau) und ohne (C; rot) Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle. (D-F) Gemittelte Dichten von Klassen (EF-D-1 - 3), in welche die Struktur des EF-Tu-70S (PDB 4v69) eingepasst worden ist. Der EF-Tu ist rot, die tRNA an der P-Stelle türkis hervorgehoben. Die Klasse EF-D-1 enthält 2972 Partikel (D, 12,5 %, hellblau), die Klasse EF-D-2 1149 Partikel (E, 4,8 %, hellgrün) und die Klasse EF-D-3 1158 Partikel (F, 4,9 %, hellrot).

3.10.3.7 Naszierende Kette

Neben den Klassifikationen auf die Elongationsfaktorenbindungsstelle waren weitere Klassifikationen mit Fokus auf den Bereich des ribosomalen Tunnelausgangs durchgeführt worden. Hier verlässt die naszierende Polypeptidkette das Ribosom und kann mit diversen Faktoren wie z.B. SRP oder Trigger-Faktor interagieren¹²⁹⁻¹³¹. Die Klassifikationen fokussiert auf den Bereich des Tunnelausgangs der 50S Untereinheit ergaben Dichten um den Tunnelausgang mit verschiedenen Größen und Morphologien. Diese Dichten könnten von naszierenden Polypeptidketten und / oder assoziierten Proteinen wie beispielsweise Chaperonen in unterschiedlichen Konformationen stammen.

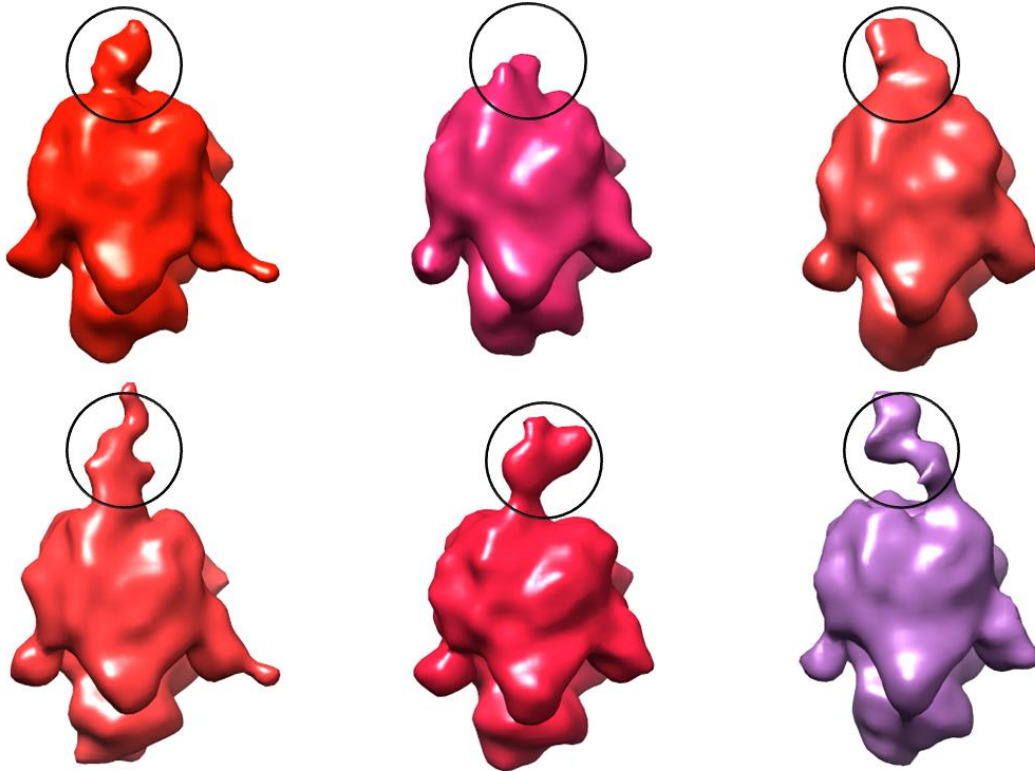


Abb. 53. **Ribosomaler Tunnelausgang.** Dargestellt sind sechs verschiedene Klassenmittel einer Klassifikation fokussiert auf den ribosomalen Tunnelausgang. Der Kreis hebt die unterschiedlichen Dichten hervor.

3.11 Makromolekül GroEL/ES

Es stellt sich nach der ausgiebigen Betrachtung der Ribosomen die Frage, ob Ribosomen die einzigen Makromoleküle sind, die in den Doppelkippachsantomogrammen gefunden werden können. Bei genauer Betrachtung der Doppelkippachsantomogramme sind Dichten aufgefallen, die kleiner als Ribosomen sind und in mindestens einer Ansicht ein rundes Erscheinungsbild besitzen. Bei diesen Makromolekülen handelt es sich definitiv nicht um Ribosomen. Das Chaperonin GroEL/ES besitzt eine fassähnliche Form und ist ein relativ großes Makromolekül. Deshalb wurde versucht, neben den Ribosomen auch andere Makromoleküle zu detektieren. Dazu wurden vier Doppelkippachsantomogramme im Bereich der *E. coli*-Zelle unter Zuhilfenahme der rekonstruierten Untervolumen mit einem möglichen Ribosom im Zentrum zweifach gebinnt erzeugt. In diesen Doppelkippachsantomogrammen wurden die Stellen, an denen Ribosomen gefunden worden waren mit einer kugelförmigen gemittelten Durchschnittsdichte des jeweiligen Tomogramms ersetzt. Die kugelförmige Durchschnittsdichte ersetzt dabei das gesamte Ribosom,

sodass bei einem nachfolgenden *Template Matching* die Stellen an denen sich Ribosomen befinden keine hohen Kreuzkorrelationswerte erhalten. Anschließend wurde in dem resultierenden, um die Ribosomen bereinigten Doppelkippachsentomogramm ein *Template Matching* mit der Struktur des asymmetrischen GroEL-GroES-(ADP)7-Chaperonin-Komplexes durchgeführt. Die besten 500 Partikel in jedem Doppelkippachsentomogramm wurden ausgewählt und eine visuelle Vorauswahl getroffen. Dann wurden die Untervolumen der GroEL/ES-Partikel analog zu den Ribosomen rekonstruiert und aligniert. Insgesamt wurden 466 mögliche GroEL/ES-Partikel selektiert und referenzfrei 3D aligniert (Abb. 54). Durch Klassifikation in 20 Klassen und anschließende referenzfreie 3D Alignierung konnte eine gute Klasse von 177 GroEL/ES-Partikeln mit einer $FSC_{0,5}$ 3,4 nm erhalten werden (Abb. 55).

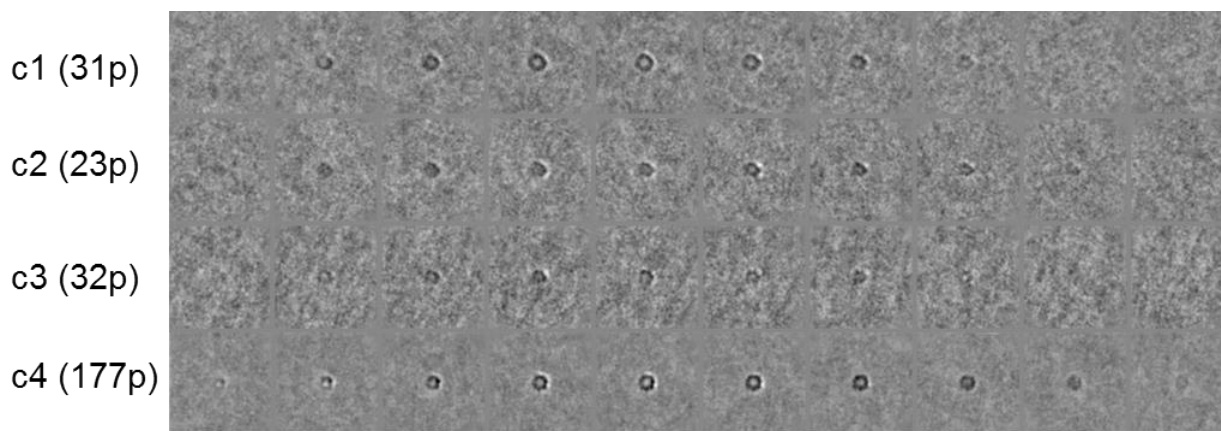


Abb. 54. **GroEL/ES-Klassen.** Gezeigt werden die Querschnitte (parallel zur x-y-Ebene mit definierten z-Abständen) durch die gemittelten Klassendurchschnitte für vier Klassen. Nach der Klasse (cx) wird die Partikelanzahl der Klasse angegeben (xp).

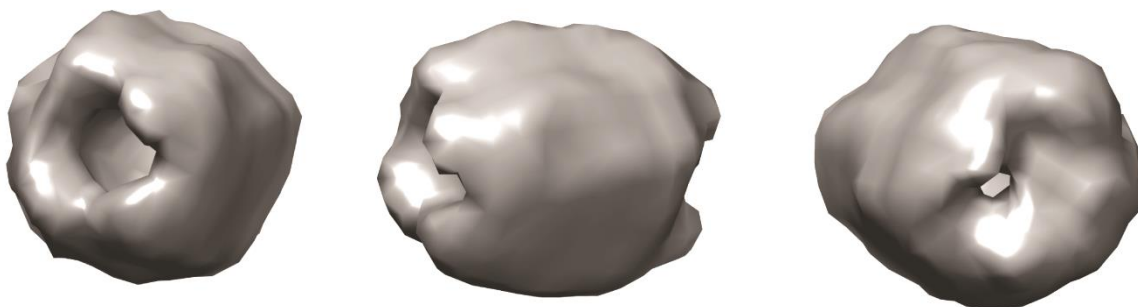


Abb. 55. **GroEL/ES-Mittelung.** Vorder-, Seit- und Rückansicht der 3D gemittelten Dichte (c4) aus 177 Partikeln mit einer $FSC_{0,5}$ 3,4 nm.

4 Diskussion

Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen werden die getroffenen projektbezogenen Entscheidungen erklärt, die biologisch relevanten Aussagen erläutert und deren Bedeutung diskutiert. Außerdem wird die technische Entwicklung, die in der CET vollzogen wurde und eine direkte Anwendung in dieser Arbeit gefunden hat betrachtet.

4.1 Quervernetzung der Membranvesikel

In dieser Arbeit wurden Ribosomen untersucht. Ein Augenmerk lag dabei auf der Analyse von MBRs. *In vitro* konnten MBRs an invertierte Membranvesikel durch eine gekoppelte Transkriptions-Translationsreaktion des MtlA-Proteins hergestellt werden. Die Insertion der MtlA-Proteine in die Membranvesikel konnte durch die Protektion von Proteinfragmenten nach einem Proteinase K-Verdau bestätigt werden (Abb. 23). Die Aufreinigung dieser mit MBR besetzten invertierten Membranvesikel mittels Flotation konnte nicht erreicht werden. Proben für die CET wurden direkt aus den *in vitro* Transkriptions-Translationsreaktionen genommen. Die CET-Analysen dieser Proben zeigten mehrere mit Ribosomen besetzte Vesikel, sowie Ribosomen im Bereich zwischen den Vesikeln (Abb. 24). Es ist denkbar, dass zwei Ribosomen, welche auf einer gemeinsamen mRNA entlanglaufen an zwei unterschiedlichen Vesikeln gebunden sind. Diese Vesikel wären dann über die mRNA durch die beiden Ribosomen miteinander verbunden. Eine Flotation der Vesikel könnte durch diese Verbindung verhindert werden. Dies könnte erklären, warum in den durchgeführten Experimenten eine Flotation der mit Ribosomen besetzten invertierten Membranvesikel nicht möglich war. Es wurde entschieden im weiteren Verlauf dieser Arbeit, direkt MBRs in *E. coli*-Zellen zu analysieren. In Vollmedium angezogene schnell wachsende *E. coli*-Zellen sind zu dick für eine TEM-Untersuchung. Erst in Minimalmedium angezogene langsam wachsende Zellen bzw. durch Ionenätzung gedünnte schnell wachsende Zellen ermöglichen eine TEM-Untersuchung.

4.2 MtlA-Expression und SecM-Ribosomarretierung

Die Expression von MtlA-Konstrukten mit Transmembrandomänen soll die Anzahl an MBRs in *E. coli*-Zellen erhöhen. Der zusätzliche Einbau einer SecM-Sequenz am Ende des MtlA-Fragments, welche zu einer temporären Arretierung membrangebundener Ribosomen an der Membran führt, soll genau diesen Zustand der Ribosomen für die CET erhalten.

Die Expression der MtlA-Fragmente mit 4TM bzw. 6TM ohne SecM-Sequenz hat für beide Fälle gezeigt, dass nach bereits 20-minütiger Proteinexpression fast die maximale MtlA-Expression erreicht wurde, die auch im weiteren Verlauf der MtlA-Expression annähernd konstant bleibt (Abb. 26 A bzw. Abb. 27 A). Deswegen wurden die Proben für die CET nach 20-minütiger MtlA-Fragmentexpression gezogen.

Bei der Expression der MtlA-Fragmente mit 4TM bzw. 6TM gefolgt von der SecM-Sequenz ist die Gesamtproteinmenge deutlich geringer als im nicht induzierten Vergleich (Abb. 26 B bzw. Abb. 27 B). Dies zeigt, dass bei der Expression der MtlA-SecM-Fragmente weniger Ribosomen für die Translation der Proteine in der Zelle zur Verfügung stehen, als in den nicht induzierten Vergleichsproben. Deshalb kann abgeleitet werden, dass die temporäre Ribosomenarretierung der SecM-Proteinsequenz sowohl für die 4TM als auch die 6TM MtlA-SecM-Fragmente funktioniert. Außerdem unterstützt das Ergebnis der Wachstumskurven, eine funktionelle SecM-Arretierung der Ribosomen. Zellen, in denen das MtlA-SecM-Konstrukt exprimiert wurde, waren deutlich langsamer gewachsen, als Zellen in denen MtlA-Stop-Konstrukte exprimiert worden sind. Das Wachstumsverhalten konnte zusätzlich durch lichtmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden. Nach Expression des MtlA-Konstrukts verlangsamte sich das Zellwachstum stark. Nachdem aber das IPTG entfernt worden war, konnte erneut Zellwachstum beobachtet werden. Die Expression des MtlA-Konstrukts ist demnach nicht lethal für *E. coli*-Zellen.

Die Bestimmung der lokalen Ribosomenkonzentrationen in Membrannähe für *E. coli*-Zellen mit und ohne Expression von MtlA-SecM-Fragmenten ergab (Tab. 7), dass die Ribosomenkonzentrationen mit Expression (55 μM) höher sind als ohne (34 μM). Auch die Zahl der manuell selektierten Ribosomen war generell in Doppelkippachsentomogrammen von *E. coli*-Zellen mit exprimierten MtlA-SecM-Fragmenten größer als bei Zellen in denen kein MtlA-SecM-Konstrukt exprimiert worden war (Tab. 7). Diese beiden Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die

Expression von MtlA-SecM-Konstrukten mit Transmembrandomänen die Anzahl an MBRs in *E. coli*-Zellen erhöht.

4.3 Ribosomenverteilung in lebenden *E. coli*-Zellen

Die PALM ermöglichte es mit dem Fluorophor mEos markierte Ribosomen in lebenden *E. coli*-Zelle zu verfolgen. Die PALM-Analyse von *E. coli*-Zellen ergab, dass Ribosomen hauptsächlich in der Zellmitte und an den Zellpolen anzutreffen waren (Abb. 33). Dazwischen befanden sich Bereiche, in denen weniger Ribosomen erkennbar waren. Hier befindet sich wahrscheinlich die DNA der Bakterienzelle. Diese beobachtete Ribosomenverteilung in *E. coli*-Zellen wurde bereits in der Literatur beschrieben^{132,133}. In *E. coli*-Zellen wird generell eine Trennung von DNA und Ribosomen beobachtet. Dabei sind die Ribosomen überwiegend an den Zellpolen und in der Mitte der *E. coli*-Zellen anzutreffen. Zwischen den Zellpolen und der Zellmitte wurde die DNA einer *E. coli*-Zelle beobachtet. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass in den ribosomenarmen Bereichen zwischen den Zellpolen und der Zellmitte die DNA der *E. coli*-Zelle lokalisiert ist.

Nach der Expression eines MtlA-Konstrukts befanden sich die Ribosomen überwiegend im Bereich der Zellpole. Damit möglichst viele MBRs in den Tomogrammen enthalten sind, wurden überwiegend von Zellpolen Doppelkippachsentomogramme aufgenommen.

4.4 Langsam wachsende *E. coli*-Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit langsam wachsenden *E. coli*-Zellen gearbeitet, da diese dünn genug für eine CET-Untersuchung waren. In langsam wachsenden *E. coli*-Zellen waren nur wenige Ribosomen im Zytosol zu erkennen (Abb. 30 A). Die Expression eines Transmembranproteinfragments (MtlA188-Stop) führte zu keiner deutlichen Zunahme der erkennbaren Ribosomen. Langsam wachsende Zellen wurden in M9 Minimalmedium angezogen in dem die Kohlenstoffquelle auf Alanin beschränkt war. In *E. coli*-Zellen mit langsamen Zellwachstumsraten ist die Ribosomenzahl niedriger, als in Zellen mit hohen Wachstumsraten¹³⁴. Deshalb sind in langsam wachsenden *E. coli*-Zellen im Vergleich zu schnell wachsenden Zellen weniger Ribosomen zu erwarten. Zusätzlich war eine Fragmentation der inneren Zellmembran in viele

kleine Vesikel zu beobachten (Abb. 30 B). Diese Membranfragmentation schränkte die Analyse von MBRs, was ein Ziel dieser Arbeit war, erheblich ein. Die Fragmentation der inneren Membran wurde bereits für die Expression des Chemotaxisrezeptors beschrieben¹³⁵. Die Zelle versucht den Überschuss an Chemotaxisrezeptoren in der Membran unterzubringen. Dabei bilden sich Einstülpungen der Zellmembran aus. Durch Interaktionen zwischen den Chemotaxisrezeptoren können diese Membraneinstülpungen stabilisiert werden. Letztendlich kann dieser Prozess auch zur Abspaltung von Vesikeln führen. Dieser Prozess war bei der Expression des MtlA188-Stop-Konstrukts in langsam wachsenden *E. coli*-Zellen beobachtet worden. Die Expression eines, mit einer SecM-Sequenz endenden, Transmembranproteinkonstrukts (MtlA189-SecM) erhöhte die Ribosomenzahl in den langsam wachsenden *E. coli*-Zellen (Abb. 30 C). Die Zahl an MBRs und die Bildung von Polysomen kann also durch die Expression eines Membranproteinkonstrukts mit einer Arretierungssequenz erhöht werden.

Langsam wachsende *E. coli*-Zellen werden einem Stress in Form einer Nährstofflimitation ausgesetzt. In der Biochemie werden Proteine standardmäßig in schnell wachsenden *E. coli*-Zellen exprimiert¹³⁶, die keiner Nährstofflimitation unterliegen. Für die Ribosomenuntersuchung in schnell wachsenden *E. coli*-Zellen spricht, dass die schnell wachsenden *E. coli*-Zellen eine intensive Proteintranslation betreiben¹³⁷ und viele Forschungsstudien in schnell wachsenden *E. coli*-Zellen angefertigt worden sind^{138,139}. Nachteil der schnell wachsenden *E. coli*-Zellen ist ihre Dicke, die sie nicht direkt für die CET zugänglich macht. Die kürzlich neu etablierte Technik der Ionenätzung ermöglicht die Verwendung von schnell wachsenden *E. coli*-Zellen für eine CET-Analyse. Die Zytosole der schnell wachsenden *E. coli*-Zellen sind dicht mit Ribosomen gepackt (Abb. 34 C, D). Die hohe Ribosomenzahl ermöglicht eine Ribosomenanalyse durch Subvolumenmittelung mit einer überschaubaren Anzahl an Tomogrammen. Aus diesem Grund wurde nun die Ionenätzung und schnell wachsende *E. coli*-Zellen verwendet.

4.5 Geeignete Vorbereitung der *E. coli*-Zellen für die CET

Mit der CET können Proben bis zu einer Dicke von ~500 nm untersucht werden. *E. coli*-Zellen sind mit einer Dicke von ~1,3 µm zu dick für die CET. Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen in Minimalmedium (M9) mit nur einer Kohlenstoffquelle (Alanin) verlangsamt das Zellwachstum. Die langsam wachsenden Zellen verändern ihre Morphologie dahin gehend, dass sie dünner und

elongierter sind als schnell wachsende Zellen (Abb. 34). Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurden die langsam gewachsenen *E. coli*-Zellen als Proben verwendet. Mit dem zur Verfügung stehenden Transmissionselektronenmikroskop (FEI Polara) mit Energiefilter und CCD-Kamera wurden Einachsenkippserien aufgenommen. Die Dünnschnitten der langsam wachsenden *E. coli*-Zellen hatten eine Dicke von ca. 500 nm, sodass man sich bereits am Grenzbereich einer CET befand. *E. coli*-Zellen versuchen immer das bestmögliche Zellwachstum abhängig von ihrem Nährstoffangebot zu erreichen¹³⁹. Daher ist es naheliegend, *E. coli*-Zellen in ihrem bevorzugten Wachstumsumfeld zu untersuchen. Das bedeutet, dass schnell wachsende *E. coli*-Zellen untersucht werden sollten. Die neu etablierte Technik der Ionenätzung macht dies möglich. Die Ionenätzung erlaubt im Gegensatz zu einem Kryomikrotom, das kompressionsfreie Schneiden von Kryoproben. Die Proben, welche mithilfe der Ionenätzung hergestellt wurden, waren dünner als die Proben der langsam wachsenden *E. coli*-Zellen. Diese dünnere Probendicke hat sich vorteilhaft auf die Tomogrammqualität ausgewirkt.

4.6 Technische Entwicklung in der TEM und Anpassung des Projekts

Die Nutzung der Ionenätzung zum kompressionsfreien Schneiden von Kryoproben war nur eine der Entwicklungen, die im Feld der TEM während der Anfertigung dieser Arbeit stattgefunden haben. Von der Firma FEI wurde eine neue Generation eines Transmissionselektronenmikroskops, das „Titan Krios“ auf den Markt gebracht¹⁴⁰. Das „Titan Krios“ besitzt im Vergleich zu einem „Polara“ ein zusätzliches Linsensystem (C3), welches eine parallele Beleuchtung der Probe mit dem Elektronenstrahl ermöglicht. Eine möglichst parallele Probenbeleuchtung führt zu bestmöglichem Kontrast im aufgenommenen Bild. Das „Titan Krios“ ist mit einem DED ausgestattet (Falcon-Kamera von FEI), der eine höhere DQE als eine CCD-Kamera besitzt. Kurz darauf wurde ein DED entwickelt (Gatan K2), welcher die Aufnahmen von Bilderserien anstelle von Einzelbildern mit gleicher Belichtungszeit ermöglicht. Mithilfe der alignierten Einzelbilder kann eine eventuell auftretende Drift der Probe korrigiert werden, was zu einer Verbesserung der aufgenommenen Daten führt. Zusätzlich ist die „Gatan K2“ Kamera nach einem Energiefilter montiert, der für dickere Proben (hier Bakterienzellen) den Vorteil besitzt, inelastisch gestreute Elektronen herauszufiltern und den Bildkontrast zu erhöhen. Das „Titan Krios“ bietet außerdem eine besondere Probenaufnahme, die es ermöglicht die Probe im Elektronenmikroskop horizontal

um 90° zu drehen. Diese Probendrehung ermöglicht die Aufnahme von Zweiachsenkippserien und erhöht den abgetasteten Bereich der Probe. Die finalen Tomogramme für diese Arbeit wurden mit dem „Titan Krios“ mit Energiefilter auf der „Gatan K2“ Kamera als Doppelkippachsen-tomogramme aufgenommen. Für die anschließende Auswertung der Zweiachsenkippserien wurde die Tom Software entsprechend erweitert. In Abb. 56 ist die Chronologie von Entwicklungen in der CET und die Anwendung diverser Techniken, welche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt worden sind, schematisch dargestellt. Der Zugriff auf die aktuellste Technik ermöglichte es, die bestmögliche Datenqualität zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, was mit modernster Technik in der zellulären CET heutzutage möglich ist.

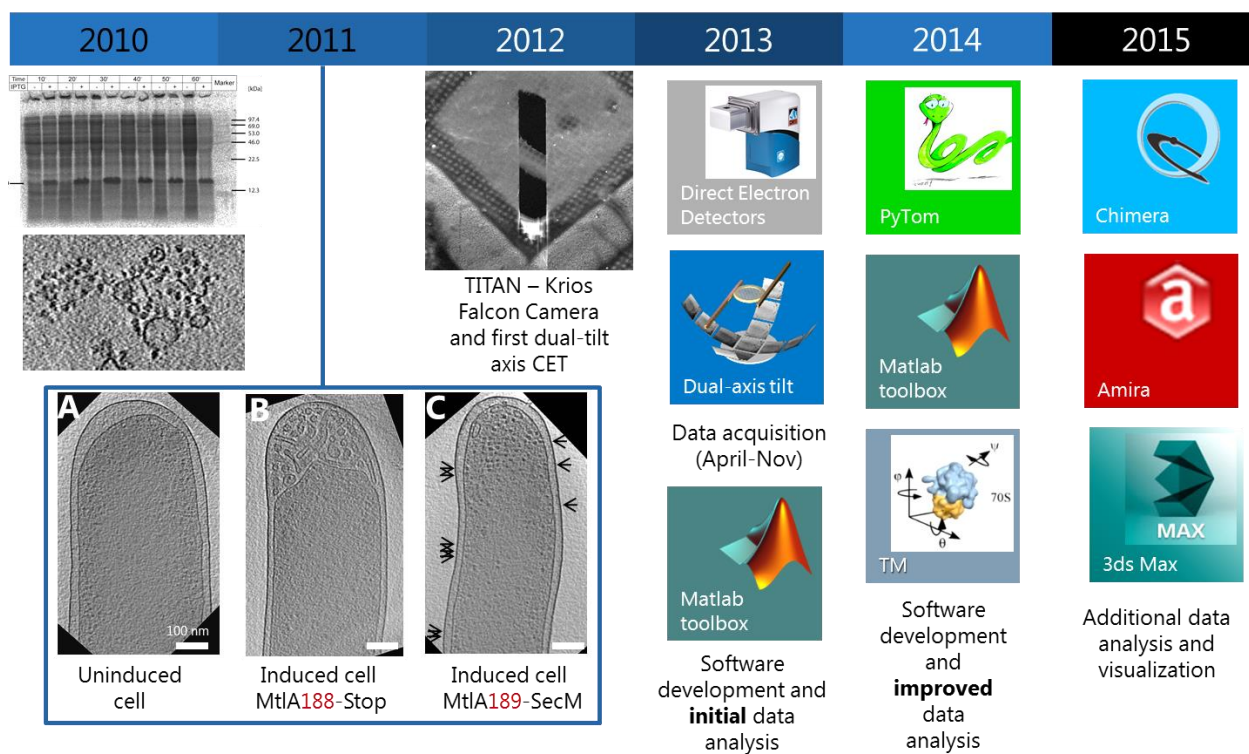


Abb. 56. **Projektverlauf.** Zeitlicher Verlauf des Projekts, dargestellt mit Piktogrammen.

4.7 Detektion und Selektion von Ribosomen

In den durch translationale Untervolumenalignierung optimierten 17 Doppelkippachsen-tomogrammen wurde mit Mustererkennungsalgorithmen zunächst nach Ribosomen gesucht. Anhand von Kreuzkorrelationskurven wurden Ribosomen selektiert. Die Methode der Ribosomenselektion nach Kreuzkorrelationswerten konnte durch die Aufteilung der möglichen

Ribosomen nach abnehmendem Kreuzkorrelationswert in Gruppen zu 200 Partikeln und anschließende Analyse der Gruppen bestätigt werden. Die Gruppen eins bis neun wurden als Ribosomen enthaltende Gruppen ausgewählt. Die gezeigten referenzfrei 3D alignierten und gemittelten Dichten für die Gruppen (Abb. 39 C) zeigen für die ausgewählten Gruppen (1-9) deutlich ein Ribosom. Dies zeigt, dass die Selektionsgrenze für die Auswahl von Ribosomen richtig gesetzt worden ist. Die übrigen Gruppen zeigen eine gestreckte bis globuläre Dichte. Diese Gruppen könnten noch vereinzelt 70S Ribosomen enthalten, jedoch ist der überwiegende Anteil dieser Partikel kein 70S Ribosom. Bei niedrigen Kreuzkorrelationswerten werden in der Regel Stellen eines Tomogramms gewählt, an denen ein stärkerer Kontrastübergang zu beobachten ist. Dies könnten filamentöse Strukturen, Membranen oder andere große Proteinkomplexe sein. Soll sichergestellt werden, dass es sich bei den gewählten Partikeln mit niedrigen Kreuzkorrelationswerten um ein 70S Ribosom handelt, kann eine visuelle Betrachtung des entsprechenden Partikels durchgeführt werden ⁸⁷. Im Fall der GroEL/ES-Selektion war der gesamte Datensatz visuell inspiziert worden.

4.8 Ribosomenkonzentration

Mit der ermittelten Ribosomenzahl und dem berechneten Zytoplasma-Volumen konnten die Ribosomenkonzentrationen für jedes Doppelkippachsentomogramm berechnet werden. Die Ribosomenkonzentrationen (Tab. 7) für die nicht induzierten Zellen waren etwas kleiner ($41 \mu\text{M}$, $20.320 \text{ rib}/\mu\text{m}^3$) als bei induzierten Zellen ($47 \mu\text{M}$, $33.310 \text{ rib}/\mu\text{m}^3$). Die hier ermittelte Gesamtribosomenkonzentration liegt bei $46 \mu\text{M}$ (Tab. 6) oder $28.000 \text{ rib}/\mu\text{m}^3$. Die gemittelte *E. coli*-Zelllänge betrug $\sim 4 \mu\text{m}$ und entspricht damit dem in der Literatur angegebenen Wert. Aus den gemittelten Abmessungen der *E. coli*-Zelle kann das durchschnittliche Zellvolumen ($\sim 4,3 \mu\text{m}^3$) berechnet werden. Der überwiegende Teil der Doppelkippachsentomogramme wurde an Zellpolen aufgenommen, wo eine erhöhte Ribosomenzahl zu erwarten war ¹³³. Unter der Annahme, dass die Gesamtribosomenkonzentration in der Zelle ca. halb so groß ist wie die ermittelte lokale Ribosomenkonzentration ($28.000 \text{ rib}/\mu\text{m}^3$) ergibt sich für eine *E. coli*-Zelle eine Ribosomenzahl von ~ 60.000 . Diese Ribosomenzahl stimmt mit dem Literaturwert, der auf Abschätzungen basierend auf dem RNA-Gehalt der *E. coli*-Zelle bei einer Generationszeit von 24-30 min basiert, überein ¹³⁴. Da die durchschnittliche Ribosomenkonzentration für die gesamte *E. coli*-Zelle aus den

tomographierten Zellausschnitten nicht genau zu ermitteln ist, kann keine genauere Aussage zur Gesamtribosomenkonzentration der Zelle getroffen werden. Um die Gesamtribosomenkonzentration der Zelle zu bestimmen, müssten Tomogramme von der gesamten Zelle vorliegen. Schnell wachsende *E. coli*-Zellen müssen vor einer CET-Untersuchung gedünnt werden, was zur Folge hat, dass Teile der Zelle z.B. durch Ionenätzung weggeschnitten werden. Es kann also keine mittels Ionenätzung gedünnte *E. coli*-Zelle vollständig tomographiert werden. Eine Ermittlung der Gesamtribosomenkonzentration einer Probe von *E. coli*-Zellen könnte aus der Aufnahme einer Vielzahl von Tomogrammen erreicht werden, die an verschiedenen Stellen (z.B. an Zellpolen, an Zellmitten) der *E. coli*-Zellen aufgenommen werden. Liegt eine geeignet große Menge dieser Tomogramme vor, so könnte eine statistische Aussage zur Gesamtribosomenzahl getroffen werden.

Für die Ribosomen in Membrannähe wurden lokale Ribosomenkonzentrationen bestimmt. Bei den induzierten *E. coli*-Zellen ist die Ribosomenkonzentration in Membrannähe größer als bei den nicht induzierten Zellen. Die Expression eines Transmembranproteins mit SecM-Sequenz erhöht die Ribosomenzahl in Membrannähe. Visuell ist dieser Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten schnell wachsenden *E. coli* Zellen bei der Vielzahl an Ribosomen im Zytosol nicht abzuschätzen.

4.9 Ribosomenklassifikationen

Die in den Tomogrammen identifizierten Ribosomen wurden referenzfrei 3D aligniert und mit Fokus auf die Stellen, an denen unstrukturierte Dichten gefunden worden waren klassifiziert. Der Fokus der Klassifikationen wurde auf 5'- und 3'-Nachbarribosomen, MBRs, Bindungsstelle der Elongationsfaktoren, sowie den Bereich des ribosomalen Tunnelausgangs gelegt. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Klassifikationen diskutiert.

4.9.1 Nachbarribosomen

Klassifikationen mit Fokus auf den 5'-Nachbarn zeigten eindeutig Ribosomen als Nachbarn (Abb. 40 D). Anschließend wurde eine Analyse der Positionen und Orientierungen der

Nachbarribosomen durchgeführt. Die Betrachtung der Ribosomenpositionierung zeigt sehr deutlich, dass fast ausschließlich Nachbarribosomen in 5'- und 3'-Position vorkommen (Abb. 41 B, E). Die Analyse der Nachbarribosomorientierungen ergab, dass die Nachbarribosomen überwiegend in t-t-Orientierung vorliegen (Abb. 41 G, H). In einer vorangegangenen *in vitro* Studie waren benachbarte Ribosomen in t-t als auch t-b Orientierung gefunden worden². Das Auffinden von nur einer der erwarteten Orientierung (t-t) sollte demnach für die Zelle einen Vorteil im Gegensatz zur anderen (t-b) bieten. In einem Polysom mit überwiegend t-t-Orientierung der Ribosomen würde man eine pseudohelikale Orientierung erwarten (Abb. 9 A). Bei einer pseudohelikalen Orientierung verläuft die mRNA in einer Art Helix. Vermutlich bietet dieser pseudohelikale mRNA-Verlauf Vorteile für die Zelle. Ein Vorteil könnte sein, dass in der pseudohelikalen Anordnung der Ribosomen der Abstand zwischen naszierenden Ketten benachbarter Ribosomen maximiert wird². Der größere Abstand erschwert die Interaktionen naszierender Ketten, die zu Proteinfehlfaltungen oder Proteinaggregationen in der *E. coli*-Zelle führen könnten³³.

4.9.2 Trisom – Tetrasom - Polysom

Nach der Klassifizierung mit Fokus auf die 5'-Nachbarribosomen wurden Klassen gefunden, die neben einer Dichte an der 5'-Nachbarribosomposition auch eine Dichte an der 3'-Nachbarribosomposition zeigten. Deshalb wurde nach der 5'-Nachbarribosomenklassifikation eine Klassifikation mit Fokus auf die 3'-Nachbarribosomen durchgeführt. Durch diese aufeinanderfolgenden Klassifikationen konnte eine Klasse von Trisomen isoliert werden (Abb. 44). Die Ribosomen in einem Trisom befinden sich zueinander in t-t-Orientierung. Bei der visuellen Begutachtung der gefundenen Trisomen, wurden mehrere Trisomen gefunden, die zwei gemeinsame Ribosomen hatten und so ein Tetrasom gebildet haben. Die Trisomen sind oft Teil von visuell detektierbaren Polysomen. Die Polysomen sind für Bereiche, in denen die Ribosomen eng aufeinander liegen visuell gut zu verfolgen. In Bereichen, in denen der Ribosomenabstand auf dem Polysom zunimmt, ist der Verlauf des Polysoms aufgrund der hohen Ribosomenzahl im Zytoplasma schwer zu verfolgen. Mit durchschnittlich 4,5 Nachbarribosomen und einem nächsten Nachbarribosom in einem Abstand von ~24 nm ist das Zytoplasma dicht mit Ribosomen gepackt

(Abb. 43), sodass nur sehr eng nebeneinanderliegende Ribosomen sicher als zu einem Polysom gehörend identifiziert werden können.

Um Polysomen, deren Ribosomen nicht in direktem Kontakt miteinander stehen, detektieren zu können, wurde eine graphbasierte Software entwickelt. Mit der computergestützten Suche nach Polysomen konnten die anfangs erwähnten Tetrasomen gefunden werden. Ein Beispiel für ein Tetrasom ist in Abb. 45 gezeigt. Mithilfe der verwendeten Software konnte auch ein möglicher mRNA-Verlauf (rot) in das Tetrasom eingefügt werden. Das gezeigte Nachbarribosom (Abb. 45 weißer Pfeil) des Tetrasoms wurde von der Software als nicht mehr zum Tetrasom gehörig erkannt. Dies ist sehr wahrscheinlich, da auch bei visueller Inspektion die Orientierung des Nachbarribosoms ungünstig erscheint, da die mRNA des Tetrasoms eine starke Kurve machen müsste und über eine relativ weite Strecke frei liegen würde. Die graphbasierte Software zur Polysomen-detektion kann basierend auf Vorabinformationen Polysomen richtig erkennen. Die benötigten Vorabinformationen konnten aus der Analyse von Polysomen, aus anderen Proben erhalten werden. Die graphbasierte Software ist nur in der Lage Polysomen mit bereits bekannter Orientierung der Ribosomen zu finden. Das Auffinden von Polysomenorganisationen, die von der Vorabinformation abweichen, wie beispielsweise in einem weniger dicht mit Ribosomen gepacktem Polysom, ist schwierig. Die Software berechnet zu viele nahezu gleichwerteter Möglichkeiten für den Polysomenverlauf die alle in etwa gleichweit von den Vorabinformationen abweichen, sodass eine eindeutige Entscheidung nicht getroffen werden kann.

4.9.3 MBRs

Neben benachbarten Ribosomen wurden auch MBRs analysiert. Um einen Eindruck von der Ribosomenverteilung in einer *E. coli*-Zelle zu erhalten wurden die Abstände der Ribosomen zur inneren Membran bestimmt. Die Abstände wurden für langsam als auch für schnell wachsende *E. coli*-Zellen mit und ohne Expression eines MtlA-Konstrukts berechnet (Abb. 46 D, H). In den schnell wachsenden *E. coli*-Zellen sind wesentlich mehr Ribosomen enthalten als in den langsam wachsenden Zellen. Dies kann ziemlich sicher auf die Nährstofflimitation bei den langsam wachsenden *E. coli*-Zellen zurückgeführt werden. *E. coli*-Zellen versuchen immer das bestmögliche Zellwachstum abhängig vom jeweiligen Nährstoffangebot zu erzielen¹³⁹. Mehr Ribosomen bedeuten, dass in kürzerer Zeit mehr Proteine produziert werden können, die für das

Zellwachstum benötigt werden. Beim Vergleich von induzierten und nicht induzierten *E. coli*-Zellen bezüglich des Ribosomenabstands zur inneren Membran verhalten sich langsam und schnell wachsende Zellen ähnlich. Bei der Expression des MtlA-Konstrukts nimmt die Zahl an membrannahen Ribosomen zu. Die Insertion der Transmembranproteine in die Membran sichert der Zelle das Überleben, da hydrophobe TM im Zytosol aggregieren können^{141,142}.

Für die Analyse der MBR wurden zunächst membrannahe Ribosomen manuell selektiert. Dabei wurden nur Bereiche der Tomogramme berücksichtigt, an denen die innere Membran sehr gut zu erkennen war. Ein Teil der inneren Membranen der tomographierten Zellen befand sich im *Missing Cone* und war nicht zu erkennen. Deshalb wurden einige MBRs nicht gefunden. Generell wurden durch die strenge visuelle Selektion nur wenige der membrannahen Ribosomen als MBR ausgewählt. Durch referenzfreie 3D Alignierung und Klassifikation, gefolgt von der Auswahl der besten Gruppen von MBRs, konnte eine gemittelte Dichte der MBR (Abb. 47) erhalten werden. Die gemittelte Dichte des MBRs aus 700 Partikeln hat eine Auflösung (FSC_{0,5}) von ~3 nm (Abb. 48). Die Auflösung im Bereich der Membran um das Translokation liegt im Bereich des Ribosoms. Die Auflösung in der weiter vom Translokation entfernten Membran ist erwartungsgemäß niedriger (~4 nm), da die Lipide und Bestandteile der Membran sich wie in einer 2D Flüssigkeit bewegen⁶. Auf der periplasmatischen Seite der inneren Membran ist eine kleine Erhebung in der Dichte zu erkennen (Abb. 47 B rechts, rot eingefärbt). Dabei könnte es sich um translokierte Bereiche des Transmembranproteins und / oder assoziierte Proteine, wie die Leader Peptidase handeln^{143,144}. Falls die Erhebung in der Dichte von einem Transmembranprotein gebildet würde, müsste es sich um die exprimierten MtlA-Konstrukte handeln, da diese wegen der Expression vermehrt in der *E. coli*-Zelle vorliegen müssten. Das MtlA-Protein allerdings besitzt ausschließlich zwei längere Proteinbögen (engl. *loops*) und eine C-terminale Domäne, die von der inneren Membran weg ins Zytosol ragen (Abb. 8). Die verwendeten MtlA-Fragmente (4TM u. 6TM) umfassen maximal die beiden zytoplasmatischen *loops*, so dass von den MtlA-Fragmenten keine Bereiche ins Periplasma hineinreichen dürften.

Das hochaufgelöste Modell, das über das Translokation an die Membran gebundenen 70S Ribosoms, wurde in die Elektronendichte des MBRs eingepasst (Abb. 49 A). Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung von Modell und Elektronendichte. Trotz der limitierten Auflösung in der vorliegenden Rekonstruktion des MBRs gibt es eine gute Übereinstimmung zwischen der eingepassten hochaufgelösten *in vitro* Struktur des MBRs und der vorliegenden Elektronendichte.

Die naszierende Kette kommt genau in einem engen Elektronendichtearm zum liegen (Abb. 49 B). Auch das gesamte Translokons ist gut in die Elektronendichte eingepasst. Die *in situ* gefundene Bindung des 70S Ribosoms an das Translokons kommt tatsächlich auch so in *E. coli*-Zellen vor.

Auch eukaryotische 80S Ribosomen gebunden an Sec61-Translokons, dem Homologen des SecYEG Translokons, waren mittels CET untersucht worden^{85,145}. Sowohl das 70S-MBR besitzt wie das 80S-MBR Kontakte zum Translokons, die von Ribosomanteilen um den ribosomalen Tunnelausgang und dem gegenüberliegenden Translokons gebildet werden. Zusätzlich zu diesen Kontakten besitzt das 80S-MBR über das Expansionssegment 27 einen weiteren seitlichen Kontakt zur Membran. Dieser Kontakt ist bei den 70S-MBRs nicht zu sehen, da Expansionssegmente exklusiv bei Ribosomen höherer Organismen vorkommen. Bei den 80S-MBRs sind auf der Zytosol abgewandten Membranseite zwei Dichten zu sehen. Die kleinere der beiden Dichten wird den translokonsassoziierten Proteinen (TRAP), die andere der Oligosaccharyltransferase zugeordnet¹⁴⁵. Im Vergleich zu diesen Dichten ist bei den 70S-MBRs nur eine sehr kleine Dichte zu sehen, deren Position eher mit der des TRAPs zusammenpassen könnte.

Zur genaueren Betrachtung der MBR im zellulären Kontext wurde ein Modell der untersuchten *E. coli*-Zelle erzeugt. In diesem Modell wurden die innere Membran, die MBRs sowie gefundene Disomen dargestellt. So konnten an der Membran dichter gepackte Anordnungen von MBRs beobachtet werden (Abb. 51). Diese sind wahrscheinlich Teil eines Polysoms. Dies bedeutet, dass mehrere Ribosome eines Polysoms gleichzeitig an ein anderes Translokons in der Membran gebunden sein können, um Transmembranproteine in die Membran zu insertieren¹⁴⁶. Diese Aussage wird außerdem durch eine Klasse an membrangebundener Disomen in t-t-Orientierung unterstützt, die zeigt, dass zwei eng nebeneinanderliegende Ribosomen Kontakt zur inneren Membran haben (Abb. 50).

4.9.4 Elongationsfaktor

Vom Blick auf die ganze *E. coli*-Zelle wird der Fokus wieder auf das Ribosom gelegt, genauer auf die Bindungsstelle der Elongationsfaktoren. Die auf diese Stelle gerichtete Klassifikation hat zwei Klassenmittel, eines mit (~58 %) und das andere ohne (~42 %) Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle ergeben. Die Fortführung der Klassifikation ergab eine Klasse (EF-D-1), in deren

gemittelte Dichte die Struktur des Elongationsfaktors-Tu (EF-Tu) eingepasst worden ist (Abb. 52 D). Die Struktur des EF-Tus passt sehr gut mit der Elektronendichte zusammen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Klasse von Ribosomen den EF-Tu gebunden hat. Es wurde noch eine weitere Klasse (EF-D-2) gefunden, die ebenfalls eine Dichte an der Elongationsfaktorenbindungsstelle zeigt, allerdings etwas elongiert und leicht verschoben zur gerade beschriebenen EF-Tu-Klasse. Bei dieser weiteren Klasse könnte der EF-G oder auch ein RF gebunden haben.

Beide Klassenmittel zeigen leicht erhöhte Dichtewerte an der 5'-Nachbarribosomenposition (Abb. 52 B, C). Nur das Klassenmittel ohne Dichte an der Elongationsfaktorenbindestelle zeigt auch eine leichte Dichte an der 3'-Nachbarribosomenposition (Abb. 52 C). Daraus könnte man schließen, dass ein 3'-Nachbarribosom die Bindung eines Faktors an der Elongationsfaktorenbindestelle am zentralen Ribosom verhindert. In der gefundenen trisomalen Anordnung der Ribosomen befinden sich die Ribosomen in t-t-Orientierung. In den Trisomen, die meist Teil von Polysomen sind, besteht Kontakt zwischen dem zentralen Ribosom und dem 5'-Nachbarribosom. Dieser Kontakt wird über das ribosomale Protein L9 und / oder die L1 Protuberanz des zentralen Ribosoms hergestellt (Abb. 42 D, E). Bei einem Kontakt zum 5'-Nachbarribosom über das L9 Protein kommt dabei das L9 Protein nahe an der Elongationsfaktorenbindungsstelle zu liegen. Dadurch könnte der Zugang der Elongationsfaktoren zum 5'-Nachbarribosom blockiert werden (Abb. 57). Für den Einfluss des L9-Proteins auf die EF spricht auch, dass zur Strukturaufklärung des Ribosom-EF-G-Komplexes in *Thermus thermophilus* durch Kristallisation das ribosomale L9-Gen trunkiert worden war¹⁴⁷. Wird die Anlagerung der Elongationsfaktoren verhindert, kommt die Translation zum Erliegen. Dieser Einfluss des zentralen Ribosoms auf dessen 5'-Nachbarribosom kann nur zustande kommen, wenn die beiden Ribosomen einander sehr nahe kommen. Hierbei könnte es sich um einen Kontrollmechanismus der Zelle handeln, der bei zu dicht gepackten Ribosomen die Translation anhält. Entfernen sich die Nachbarribosomen genügend weit voneinander, sodass die Elongationsfaktoren wieder binden können, so wird die Translation fortgesetzt.

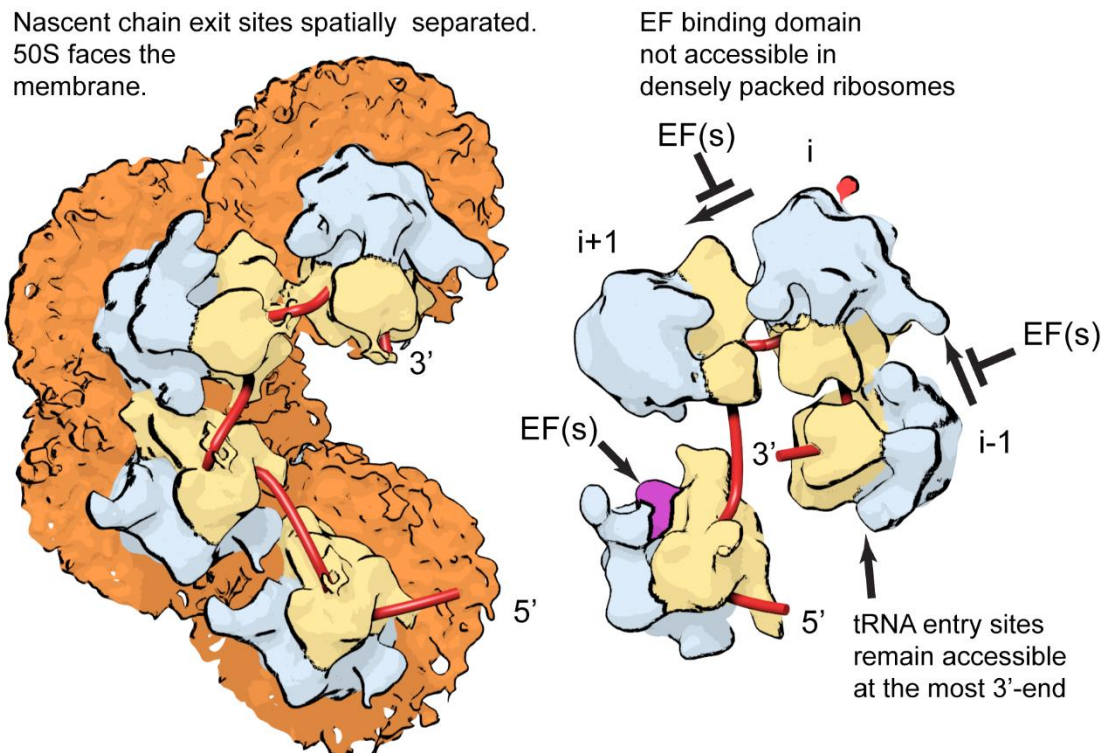


Abb. 57. **Bedeutung der 3D Organisation von 70S Ribosomen.** Modell eines membrangebundenen Polysoms (50S UE blau, 30S UE gelb) mit mRNA-Verlauf (rot). Das membrangebundene Polysom (links) entspricht einer Ribosomenanordnung in einem Tomogramm. Modell eines Trisoms mit einem weiteren Ribosom am 5'-Ende, welches EF gebunden hat (rechts). Mögliche Blockaden der Elongationsfaktorbindungsstellen durch das L9 Protein eines 3'-Nachbarribosoms sind angedeutet.

4.9.5 Naszierende Kette

Eine nicht ganz so dichte Packung von translatierenden Ribosomen hätte außerdem den Vorteil, dass die naszierenden Ketten weiter voneinander entfernt wären und eine Interaktion der naszierenden Ketten, die im ungünstigsten Fall zur Proteinaggregation führen könnte erschwert würde². Nun werden die naszierenden Ketten am ribosomalen Tunnelausgang genauer betrachtet. Dafür wurden Klassifikationen mit Fokus auf den ribosomalen Tunnelausgang durchgeführt. Es konnten verschiedene Konformationen von Dichten am ribosomalen Tunnelausgang beobachtet werden (Abb. 53). Die meisten Dichten befinden sich über dem Tunnelausgang. Hier handelt es sich sehr wahrscheinlich um naszierende Ketten. Da nicht nachgewiesen werden kann, welches Protein gerade vom jeweiligen Ribosom translatiert wird, können dazu keine weiteren Aussagen

getroffen werden. Bei einer der gezeigten Klassen (Abb. 53 rechts unten) ist eine Dichte etwas nach rechts vom Tunnelausgang versetzt zu sehen. Hierbei könnte es sich auch um einen mit der naszierenden Kette interagierenden Faktor handeln. Mit der naszierenden Kette könnten z.B. Trigger Faktor, Peptiddeformylase, Methionin-Amino-peptidase oder auch SRP, letzteres bei Proteinen mit N-terminaler Signalsequenz interagieren ¹²⁹⁻¹³¹.

4.10 Makromolekül GroEL/ES

Bei GroEL/ES handelt es sich um ein komplexes Makromolekül, welches die Faltung von nicht vollständig gefalteten Proteinen unterstützt. Neben GroEL/ES (Hsp 60-Chaperonsystem) gibt es in *E. coli*-Zellen noch weitere Chaperone, den Trigger Faktor und das Hsp 70- Chaperonsystem. Das GroEL/ES ist das größte der Chaperonsysteme in der Zelle, welches ein nicht vollständig gefaltetes Protein in einer seiner zylindrischen Kammern aufnehmen kann. Dort kann das unvollständig gefaltete Protein dann geschützt falten. Aufgrund der Größe des GroEL/ES-Komplexes soll dieser in Doppelkippachsenteomogrammen gesucht werden. In vier der Doppelkippachsenteomogramme wurde nach GroEL/ES gesucht. Dazu wurden diese Doppelkippachsenteomogramme im Bereich der *E. coli*-Zelle zweifach gebinnt rekonstruiert. Anschließend wurden die gefundenen Ribosomen durch kugelförmige gemittelte Durchschnittsdichten ersetzt. Jetzt wurde mittels *Template Matching* nach GroEL/ES gesucht. Für jedes der analysierten Doppelkippachsenteomogramme wurden die besten 500 möglichen GroEL/ES-Partikel visuell vorselektiert. Die gewählten GroEL/ES-Partikel wurden referenzfrei 3D aligniert und klassifiziert (Abb. 54). Nach der Klassifizierung wurde ein Klassenmittel von GroEL/ES-Partikeln mit einer Auflösung von ~3,4 nm erhalten (Abb. 55). Bei der visuellen Selektion waren runde bzw. faßähnliche Partikel ausgewählt worden. GroEL ist aber nicht das einzige Molekül in einer *E. coli*-Zelle, das in einer Querschnittsansicht dieses Erscheinungsbild besitzt. ClpX, ein Entfaltungsprotein, ebenso zylindrisch, besitzt nahezu den gleichen Durchmesser, wie GroEL, sodass eine Differenzierung dieser beiden Moleküle schwierig ist. ClpX ist nur ca. halb so lang wie GroEL, was zur Unterscheidung herangezogen werden kann. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Rotationssymmetrie der beiden Proteine: GroEL besitzt siebenfach Symmetrie und ClpX sechsfach Symmetrie. ¹⁴⁸ Bei der visuellen Selektion waren nur Partikel mit dem erwarteten Durchmesser ausgewählt worden. Eine explizite Unterscheidung zwischen GroEL und ClpX könnte durch

Einbeziehung der Symmetrie während der Alignierung erreicht werden. ClpX arbeitet mit der Protease ClpP zusammen. ClpP ist wie GroEL ein Doppelfaßprotein mit siebenfach Rotationssymmetrie. Die innere Kammer des ClpP hat einen Durchmesser von ~5,1 nm und besitzt damit einen wesentlich kleineren Durchmesser als das GroEL Protein (13,7 nm) ^{149,150}. Bei der Auswahl der GroEL-Partikel sollte sichergestellt werden, dass nur GroEL ausgewählt wird. Der Unterschied in der Rotationssymmetrie kann für die Unterscheidung von GroEL und ClpX herangezogen werden. Mit Fokus auf die Molekülgröße können GroEL und ClpP voneinander unterschieden werden.

5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Analyse von Makromolekülen, wie Ribosomen oder GroEL/ES in zellulären Proben mittels CET möglich ist. Die kürzlich neu etablierte Technik der Ionenätzung erlaubt es heute auch dickere Proben zu untersuchen. Die Ionenätzung macht nun auch Untersuchungen an komplexeren Organismen und höhere Zellen mittels CET möglich ¹⁵¹. Eine neue Herausforderung für die Zukunft wird es sein die Grenze der detektierbaren Strukturen immer weiter zu senken. Die jüngste Entwicklung auf dem Gebiet der EM, die Volta Phasenplatte erlaubt es nun bei 0 µm Defokus kontrastreiche Tomogramme aufzunehmen. Dies bietet den Vorteil, dass eine Auflösungslimitierung durch Defokussierung wegfällt und kleinere Objektstrukturen bereits in den Tomogrammen aufgelöst werden können. ⁸²

In ersten Vorversuchen wurden bereits Tomogramme von *E. coli*-Zellen mit der Phasenplatte aufgenommen, die vielversprechend aussehen. Die gesamte Prozessierung und Analyse dieser Tomogramme wurde jedoch noch nicht vollständig durchgeführt. Der Fokus soll hier auf der Analyse von kleineren Strukturen, wie GroEL/ES oder ClpX/P liegen. Für eine sichere Identifizierung der Zielmoleküle wären allerdings weitere Kontrollproben hilfreich. Durch die Expression des Zielmoleküls in einer Zelle, wo dann das Zielmolekül im Überschuss enthalten sein würde, könnte relativ einfach aus den vielen zur Verfügung stehenden Zielmolekülpartikeln eine gemittelte Dichte gebildet werden. Diese Zielmoleküldichte könnte dann zur Auffindung von Zielmolekülen und dem Vergleich mit anderen Proben verwendet werden.

Die enorme technische Weiterentwicklung auf dem Gebiet der CET, die während der Anfertigung dieser Arbeit stattgefunden hat verbesserte die Datenqualität und erweiterte das Probenspektrum. Heute scheint die einzig verbleibende Limitation für die CET das Einfrieren der Proben unter Ausbildung von amorphem Eis zu sein. Die zuspeichernde Datenmenge durch die Nutzung neuer DEDs für die Aufnahme von Bilderserien hat stark zugenommen. Dies stellt die Infrastruktur der lokalen EDV-Zentren vor neue Herausforderungen. Legt man jedoch die stetig schnelle Entwicklung auf dem Computer- und Softwarebereich zugrunde, so sollten in naher Zukunft praktikable Lösungen für die Speicherung und Prozessierung der Daten zur Verfügung stehen ¹⁵².

Danksagung

Als Teil der Abteilungen für molekulare Strukturbiologie und zellulärer Biochemie des Max-Planck-Instituts für Biochemie wurde mir ein umfassender Einblick in die Tiefen des Forscherlebens ermöglicht. Ich danke allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen aus beiden Abteilungen, die mich durch regen Austausch über den Forschungsalltag und darüber hinaus als vollständiges Mitglied beider Arbeitsgruppen integriert haben.

Ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Baumeister und Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl, die mir ermöglichten meine Doktorarbeit in diesem faszinierenden Arbeitsumfeld durchzuführen. Ich bedanke mich bei Ihnen beiden für all die Ideen und Hinweise, die mich erfolgreich durch diese Arbeit geleitet haben. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister danke ich außerdem für die Aufnahme in das Graduiertenprogramm: Elite Netzwerk Bayern (ENB) „Protein Dynamics in Health and Disease“, für die Teilnahme an diversen wissenschaftlichen Veranstaltungen und für die Übernahme der Doktorvaterschaft für diese Arbeit. Herrn Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl danke ich für die detaillierte Anleitung in biochemischen Fragestellungen und die Teilnahme an den Treffen der DFG-Forschergruppe 967 (Funktionen und Mechanismen von Liganden des ribosomalen Tunnelausgangs), die mir den Kontakt zu thematisch verbundenen Arbeitsgruppen eröffneten.

Ich danke allen ENB-Mitgliedern, besonder Dr. Kai Hell für die herzliche Aufnahme in ihren Kreis. Für den Spaß, den wir rund um unsere wissenschaftlichen Veranstaltungen hatten danke ich besonders: Dr. Julia Gallinger, Dr. Christoph Gallinger, Dr. Friederike Hög, Dr. Andreas Jungfer, Dr. Zdravko Kochovski, Dr. Kösem Süleyman, Dr. Christina Schusdzarra und Angela Oberhofer.

Meinem direkten Betreuer Dr. Julio Omar Ortiz danke ich für seine unermessliche Geduld (besonders bei bioinformatischen Problemen), Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und die Ratschläge für alle Lebenslagen, die mir entgegengebracht wurden – *Muchas gracias!*

Ich danke Dr. Friedrich Förster und Stefan Pfeffer für die vielen Diskussionen, Ratschläge und Hinweise, die mich durch meine Doktorarbeit begleitet haben.

Für die Unterstützung rund um die Elektronenmikroskopie bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Plitzko, Dr. Radostin Danev, Dr. Miroslava Schaffer, Dr. Lena F. Kourkoutis und Felix Bäuerlein.

Bei Fragen die Computer / Cluster betreffend und speziellen Programmen wurde ich von Dr. Reiner Hegerl, Dr. Matthias Eibauer, Dr. Thomas Hrabe, Dr. Yuxiang Chen, Dr. Antonnio Martinez

Sanchez, Florian Beck, Luis Kuhn-Cuellar und Inga Wolf vorbildlich unterstützt, herzlichen Dank hierfür.

Ich danke den Mitarbeiterinnen beider Sekretariate Evelyn Frey-Royston, Darija Pompino, Nathalie Leclercq und besonders Birgit Book für die hervorragende Betreuung und Anleitung in Bezug auf formale Anforderungen.

Den Mitarbeitern der Werkstatt, besonders Tim Laugks danke ich für die Lösung kleinerer und größerer technischer Probleme.

Ich danke allen, die sich während meiner Doktorarbeit mit mir das Büro geteilt haben und immer für eine gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben (Dr. Anne-Marie Schönege, Dr. Sarah Breuer, Ann-Victoria Mangold, Dr. Thomas Hrabe, Dr. Yuxiang Chen, Dr. Stefan Pfeffer, Dr. Pia Unverdorben, Dr. Carolin Fleischer, Nikolas Schrod, Tilak Gupta, Marc Wehmer und Ulrike Dittmann).

Für die Hilfe und die gute Atmosphäre im Labor bedanke ich mich besonders bei Dr. Raluca Antonoae, Dr. Niti Kumar, Andreas Scaia, Sneha Kumar, Dr. Mark Hipp, Dr. Karsten Klage, Dr. Young-Jun Choe, Dr. Jacob Verghese, Matthias Antonin, Emmanuel Burghardt, Albert Ries, Anastasia Jungclaus und der guten Seele im Labor Nadine Wischnewski.

Ich bedanke mich bei der Laufgruppe Hartl-Baumeister (Dr. Andreas Bracher, Dr. Florian Rößmann, Dr. Yujin Kim und Nikolas Schrod), die es mir ermöglicht hat Abstand zum Forschungsalltag zu bekommen und immer wieder mit neuer Energie mein Projekt voranzutreiben.

Ebenso bedanke ich mich bei den MPI-Salsaleros: Dr. Maria Gambetta, Dr. Dalia Gritenaite, Anna Kramer und besonders bei Dr. Matias Hernandez, die mich in die faszinierende Welt des Salsa eingeführt haben.

Ich danke der Stiftung „Fourmentin-Guilbert“, Herrn Dr. M. Eric Fourmentin und Herrn Dr. Damien Lariviere für die großzügige Unterstützung – *Merci beaucoup!*

An letzter Stelle danke ich besonders meiner Familie, meiner Oma Anna Dotzauer, meiner Großtante Emma Maier, meinem Bruder Dipl. Ing. (FH) Markus Hoffmann und meinen Eltern Margot und Walter Hoffmann für die uneingeschränkte Unterstützung, die ich in meinem bisherigen Leben von Ihnen erfahren habe und die mir meine Ausbildung und auch diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben – Vielen herzlichen Dank!

Literaturverzeichnis

- 1 Schuwirth, B. S. *et al.* Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**, 827-834, (2005).
- 2 Brandt, F. *et al.* The Native 3D Organization of Bacterial Polysomes. *Cell* **136**, 261-271 (2009).
- 3 Williams, D. B. & Carter, C. B. Transmission Electron Microscopy. *Springer*, (2009).
- 4 Kohl, H. & Reimer, L. Transmission Electron Microscopy. *Springer*, (2008).
- 5 Drews, G. Mikrobiologie. *Springer*, (2010).
- 6 Alberts, B., Wilson, J. & Hunt, T. Molecular biology of the cell. *Garland Science*, (2008).
- 7 Lodish, H. *et al.* Molecular Cell Biology. *W. H. Freeman*, (2007).
- 8 Pollard, T. D., Earnshaw, W. & Lippincott-Schwartz, J. Cell Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen. *Spektrum Akademischer Verlag*, (2007).
- 9 Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. & Clark, D. P. Brock Mikrobiologie. *Pearson Studium*, (2013).
- 10 Casali, N. & Preston, A. E. coli Plasmid Vectors - Methods and Applications. *Springer*, (2003).
- 11 Clark, D. P. & Pazdernik, N. J. Molecular Biology. *Elsevier*, (2013).
- 12 Yusupova, G., Jenner, L., Rees, B., Moras, D. & Yusupov, M. Structural basis for messenger RNA movement on the ribosome. *Nature* **444**, 391-394, (2006).
- 13 Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. *W. H. Freeman*, (2005).
- 14 Ishida, H. & Matsumoto, A. Free-Energy Landscape of Reverse tRNA Translocation through the Ribosome Analyzed by Electron Microscopy Density Maps and Molecular Dynamics Simulations. *PLoS ONE* **9**, e101951, (2014).
- 15 Ratje, A. H. *et al.* Head swivel on the ribosome facilitates translocation by means of intra-subunit tRNA hybrid sites. *Nature* **468**, 713-716, (2010).
- 16 Steitz, T. A. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**, 242-253, (2008).
- 17 Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**, 920-930 (2000).
- 18 Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920 (2000).
- 19 Nakatogawa, H., Murakami, A. & Ito, K. Control of SecA and SecM translation by protein secretion. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 145-150, (2004).
- 20 Bhushan, S. *et al.* SecM-Stalled Ribosomes Adopt an Altered Geometry at the Peptidyl Transferase Center. *PLoS Biol* **9**, e1000581 (2011).

- 21 Goldman, D. H. *et al.* Mechanical force releases nascent chain-mediated ribosome arrest in vitro and in vivo. *Science* **348**, 457-460, (2015).
- 22 Withey, J. H. & Friedman, D. I. A Salvage Pathway For Protein Synthesis: tmRNA and Trans-Translation. *Annual Review Microbiology* **57**, 101-123, (2003).
- 23 Frauenfeld, J. *et al.* Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 614-621 (2011).
- 24 Denks, K. *et al.* The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Mol Membr Biol* **31**, 58-84, (2014).
- 25 Wu, J. J. & Swartz, J. R. High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1778**, 1237-1250 (2008).
- 26 Warner, J. R., Rich, A. & Hall, C. E. Electron Microscope Studies of Ribosomal Clusters Synthesizing Hemoglobin. *Science* **138**, 1399-1403, (1962).
- 27 Slayter, H. S., Warner, J. R., Rich, A. & Hall, C. E. The Visualization Of Polyribosomal Structure. *Journal of Molecular Biology* **7**, 652-657 (1963).
- 28 Staehelin, T., Brinton, C. C., Wettstein, F. O. & Noll, H. Structure And Function Of E. Coli Ergosomes. *Nature* **199**, 865-870 (1963).
- 29 Wettstein, F. O., Staehelin, T. & Noll, H. Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: characterization of the ergosome. *Nature* **197**, 430-435 (1963).
- 30 Slayter, H., Kiho, Y., Hall, C. E. & Rich, A. An Electron Microscopic Study of Large Bacterial Polyribosomes. *J Cell Biol* **37**, 583-590, (1968).
- 31 Ramakrishnan, V. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell* **108**, 557-572, (2002).
- 32 Frank, J. The ribosome a macromolecular machine par excellence. *Chem. Biol.* **7**, R133-141 (2000).
- 33 Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858, (2002).
- 34 Metzler, D. E. Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. *Elsevier Academic Press*, (2003).
- 35 Povh, B. Anschauliche Physik. *Springer*, (2014).
- 36 Cypionka, H. Grundlagen der Mikrobiologie. *Springer*, (2010).
- 37 Mullock, B. M. & Luzio, J. P. The Biogenesis of Cellular Organelles. *Springer*, (2005).
- 38 Demtröder, W. Experimentalphysik. *Springer-Verlag*, (2013).
- 39 McKinney, S. A., Murphy, C. S., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W. & Looger, L. L. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein. *Nat. Methods* **6**, 131-133, (2009).
- 40 Hess, S. T., Girirajan, T. P. K. & Mason, M. D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* **91**, 4258-4272, (2006).

-
- 41 Wen, C., Wan, W., Li, F. H. & Tang, D. Restoring defect structures in 3C-SiC/Si (0 0 1) from spherical aberration-corrected high-resolution transmission electron microscope images by means of deconvolution processing. *Micron* **71**, 22-31, (2015).
- 42 Dubochet, J. *et al.* Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics* **21**, 129-228, (1988).
- 43 Bohn, S. *et al.* Localization of the regulatory particle subunit Sem1 in the 26S proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **435**, 250-254, (2013).
- 44 Asano, S. *et al.* A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons. *Science* **347**, 439-442, (2015).
- 45 Shang, Z. *et al.* High-resolution structures of kinesin on microtubules provide a basis for nucleotide-gated force-generation. *eLife* **3**, e04686, (2014).
- 46 Rigort, A. *et al.* Micromachining tools and correlative approaches for cellular cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology* **172**, 169-179 (2010).
- 47 Lottspeich, F. & Engels, J. W. Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, (2012).
- 48 Grimm, R. *et al.* Electron tomography of ice-embedded prokaryotic cells. *Biophys. J.* **74**, 1031-1042, (1998).
- 49 Rigort, A. *et al.* Focused Ion Beam Micromachining of Eukaryotic Cells for Cryoelectron Tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2012).
- 50 Förster, F. Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden. *Technische Universität München Doktorarbeit* (2005).
- 51 Benner, G. & Probst, W. Köhler illumination in the TEM: Fundamentals and advantages. *Journal of Microscopy* **174**, 133-142, (1994).
- 52 Egerton, R. Physical Principles of Electron Microscopy. *Springer*, (2005).
- 53 McMullan, G., Chen, S., Henderson, R. & Faruqi, A. R. Detective quantum efficiency of electron area detectors in electron microscopy. *Ultramicroscopy* **109**, 1126-1143, (2009).
- 54 McMullan, G. *et al.* Experimental observation of the improvement in MTF from backthinning a CMOS direct electron detector. *Ultramicroscopy* **109**, 1144-1147, (2009).
- 55 Campbell, Melody G. *et al.* Movies of Ice-Embedded Particles Enhance Resolution in Electron Cryo-Microscopy. *Structure* **20**, 1823-1828, (2012).
- 56 McMullan, G., Faruqi, A. R., Clare, D. & Henderson, R. Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. *Ultramicroscopy* **147**, 156-163, (2014).
- 57 Döring, E. *et al.* Handbuch Elektrotechnik: Grundlagen und Anwendungen für Elektrotechniker. *Springer*, (2013).
- 58 Frank, J. Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State. *Oxford University Press*, (2006).
- 59 Mondal, P. P. Fundamentals of Fluorescence Microscopy Exploring Life with Light. *Springer*, (2014).

- 60 van Heel, M. *et al.* Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Quarterly Reviews of Biophysics* **33**, 307-369, (2000).
- 61 Mulisch, M. & Welsch, U. Romeis - Mikroskopische Technik. *Spektrum Akademischer Verlag*, (2010).
- 62 Wade, R. H. A brief look at imaging and contrast transfer. *Ultramicroscopy* **46**, 145-156, (1992).
- 63 Henderson, R. Image contrast in high-resolution electron microscopy of biological macromolecules: TMV in ice. *Ultramicroscopy* **46**, 1-18, (1992).
- 64 Grassucci, R. A., Taylor, D. J. & Frank, J. Preparation of macromolecular complexes for cryo-electron microscopy. *Nat. Protocols* **2**, 3239-3246, (2007).
- 65 Bellare, J. R., Davis, H. T., Scriven, L. E. & Talmon, Y. Controlled environment vitrification system: An improved sample preparation technique. *J. Elec. Microsc. Tech.* **10**, 87-111, (1988).
- 66 Guo, F. & Jiang, W. Single Particle Cryo-electron Microscopy and 3-D Reconstruction of Viruses. *Methods in molecular biology* **1117**, 401-443, (2014).
- 67 Pierson, J., Ziese, U., Sani, M. & Peters, P. J. Exploring vitreous cryo-section-induced compression at the macromolecular level using electron cryo-tomography; 80S yeast ribosomes appear unaffected. *Journal of Structural Biology* **173**, 345-349, (2011).
- 68 Al-Amoudi, A., Studer, D. & Dubochet, J. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **150**, 109-121, (2005).
- 69 Lučić, V., Rigort, A. & Baumeister, W. Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology in situ. *J Cell Biol* **202**, 407-419, (2013).
- 70 Förster, F., Han, B.-G. & Beck, M. Methods in Enzymology **483** Cryo-EM, Part C: Analyses, Interpretation, and Case studies (ed Grant J. Jensen) 215-243, *Academic Press*, (2010).
- 71 Frank, J. Electron Tomography. *Springer*, (2006).
- 72 Lee, Z., Rose, H., Lehtinen, O., Biskupek, J. & Kaiser, U. Electron dose dependence of signal-to-noise ratio, atom contrast and resolution in transmission electron microscope images. *Ultramicroscopy* **145**, 3-12, (2014).
- 73 Grimm, R. *et al.* Electron Tomography of Ice-Embedded Prokaryotic Cells. *Biophys. J.* **74**, 1031-1042, (1998).
- 74 Lucić, V., Förster, F. & Baumeister, W. Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu Rev Biochem* **74**, 833-865 (2005).
- 75 Penczek, P., Marko, M., Buttle, K. & Frank, J. Double-tilt electron tomography. *Ultramicroscopy* **60**, 393-410 (1995).
- 76 Mastronarde, D. N. Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *Journal of Structural Biology* **120**, 343-352, (1997).
- 77 Faruqi, A. R. & Subramaniam, S. CCD detectors in high-resolution biological electron microscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics* **33**, 1-27, (2000).

-
- 78 Ruskin, R. S., Yu, Z. & Grigorieff, N. Quantitative characterization of electron detectors for transmission electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **184**, 385-393, (2013).
- 79 Shigematsu, H. & Sigworth, F. J. Noise models and cryo-EM drift correction with a direct-electron camera. *Ultramicroscopy* **131**, 61-69, (2013).
- 80 Li, X. *et al.* Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* **10**, 584-590, (2013).
- 81 Maschke, T. Digitale Kameratechnik: Technik digitaler Kameras in Theorie und Praxis. *Springer*, (2004).
- 82 Fukuda, Y., Laugks, U., Lučić, V., Baumeister, W. & Danev, R. Electron cryotomography of vitrified cells with a Volta phase plate. *Journal of Structural Biology* **190**, 143-154, (2015).
- 83 Kremer, J. R., Mastronarde, D. N. & McIntosh, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology* **116**, 71-76, (1996).
- 84 Nickell, S. *et al.* TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. *Journal of Structural Biology* **149**, 227-234, (2005).
- 85 Pfeffer, S. *et al.* Structure and 3D Arrangement of Endoplasmic Reticulum Membrane-Associated Ribosomes. *Structure* **20**, 1508-1518, (2012).
- 86 Winkler, H. & Taylor, K. A. Marker-free dual-axis tilt series alignment. *Journal of Structural Biology* **182**, 117-124, (2013).
- 87 Ortiz, J. O., Förster, F., Kürner, J., Linaroudis, A. A. & Baumeister, W. Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition. *Journal of Structural Biology* **156**, 334-341, (2006).
- 88 Frangakis, A. S. *et al.* Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 14153-14158, (2002).
- 89 Bertuch, M. Klötzchenwelten. *c't - Magazin für Computertechnik* **4**, 182 (2009).
- 90 Hrabe, T. *et al.* PyTom: A python-based toolbox for localization of macromolecules in cryo-electron tomograms and subtomogram analysis. *Journal of Structural Biology* **178**, 177-188, (2012).
- 91 Chen, Y., Pfeffer, S., Hrabe, T., Schuller, J. M. & Förster, F. Fast and accurate reference-free alignment of subtomograms. *Journal of Structural Biology* **182**, 235-245, (2013).
- 92 Chen, Y., Pfeffer, S., Fernández, José J., Sorzano, Carlos Oscar S. & Förster, F. Autofocused 3D Classification of Cryoelectron Subtomograms. *Structure* **22**, 1528-1537, (2014).
- 93 Clark, D. P. Molecular Biology: Das Original mit Übersetzungshilfen: Understanding the Genetic Revolution. *Spektrum Akademischer Verlag*, (2006).
- 94 Moore, P. B. The ribosome returned. *Journal of Biology* **8**, (2009).
- 95 Sambrook. Molecular Cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2012).
- 96 Stothard, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**, 1102-1104 (2000).

- 97 Agashe, V. R. *et al.* Function of Trigger Factor and DnaK in Multidomain Protein Folding: Increase in Yield at the Expense of Folding Speed. *Cell* **117**, 199-209, (2004).
- 98 Nishiyama, K.-i. *et al.* A Derivative of Lipid A Is Involved in Signal Recognition Particle/SecYEG-dependent and -independent Membrane Integrations. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 35667-35676, (2006).
- 99 Mülhardt, C. Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. *Springer Spektrum*, (2013).
- 100 Kuruma, Y., Nishiyama, K.-i., Shimizu, Y., Müller, M. & Ueda, T. Development of a Minimal Cell-Free Translation System for the Synthesis of Presecretory and Integral Membrane Proteins. *Biotechnology Progress* **21**, 1243-1251, (2005).
- 101 Werner, P. K., Saier, M. H. & Müller, M. Membrane insertion of the mannitol permease of *Escherichia coli* occurs under conditions of impaired SecA function. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 24523-24532 (1992).
- 102 Harvey, C. L., Gabriel, T. F., Wilt, E. M. & Richardson, C. C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. IX. Synthesis and properties of the deoxyribonucleic acid adenylate in the phage T4 ligase reaction. *J. Biol. Chem.* **246**, 4523-4530 (1971).
- 103 Koch, H.-G. *et al.* In Vitro Studies with Purified Components Reveal Signal Recognition Particle (SRP) and SecA/SecB as Constituents of Two Independent Protein-targeting Pathways of *Escherichia coli*. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 2163-2173 (1999).
- 104 Müller, M. & Blobel, G. In vitro translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 7421-7425 (1984).
- 105 Moser, Panahandeh, Holzapfel & Müller. In vitro analysis of the bacterial twin-arginine-dependent protein export. *Methods in molecular biology* **390**, 63-60 (2007).
- 106 Castro-Roa, D. & Zenkin, N. Bacterial Transcriptional Control **1276** *Methods in Molecular Biology* (eds Irina Artsimovitch & Thomas J. Santangelo). 81-99, *Springer*, (2015).
- 107 Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T. A., Hartmann, E. & Kalies, K.-U. Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *The EMBO Journal* **19**, 1900-1906, (2000).
- 108 Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C. & Koronakis, V. Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles. *J. Bacteriol.* **183**, 5364-5370 (2001).
- 109 Seyffert, W. Lehrbuch der Genetik. *Spektrum Akademischer Verlag*, (2003).
- 110 Iancu, C. V. *et al.* Electron cryotomography sample preparation using the Vitrobot. *Nat. Protocols* **1**, 2813-2819, (2007).
- 111 Koster, A. J. *et al.* Perspectives of Molecular and Cellular Electron Tomography. *Journal of Structural Biology* **120**, 276-308, (1997).
- 112 The MathWorks Inc. MATLAB and Statistics Toolbox Release 2015a (Natick, Massachusetts, United States).
- 113 Hegerl, R. The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy. *Journal of Structural Biology* **116**, 30-34, (1996).

-
- 114 Tang, G. *et al.* EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **157**, 38-46, (2007).
- 115 FEI Company (Hillsboro, Oregon, United States).
- 116 Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605-1612, (2004).
- 117 Autodesk Inc. (San Rafael, California, United States).
- 118 Pizer, S. M. Adaptive Histogram Equalization and Its Variations. *Computer Vision, Graphics, And Image Processing* **39**, 355-368 (1987).
- 119 Cuellar, L. K., Pfeffer, S., Chen, Y. & Forster, F. Automated detection of polysomes in cryoelectron tomography. *IEEE International Conference on Image Processing (ICIP)*, 2085-2089, (2014).
- 120 Heymann, J. B., Cardone, G., Winkler, D. C. & Steven, A. C. Computational Resources for Cryo-Electron Tomography in Bsoft. *Journal of Structural Biology* **161**, 232-242, (2008).
- 121 Xu, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)⁷ chaperonin complex. *Nature* **388**, 741-750 (1997).
- 122 Persson, F., Barkefors, I. & Elf, J. Single molecule methods with applications in living cells. *Current Opinion in Biotechnology* **24**, 737-744, (2013).
- 123 Persson, F., Lindén, M., Unoson, C. & Elf, J. Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. *Nat. Methods* **10**, 265-269, (2013).
- 124 Sanamrad, A., Persson, F. & Elf, J. Isotropic diffusion of the small ribosomal subunit in Escherichia coli. *arXiv:1205.5857 [q-bio.QM]* (2012).
- 125 Sanamrad, A. *et al.* Single-particle tracking reveals that free ribosomal subunits are not excluded from the Escherichia coli nucleoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11413-11418, (2014).
- 126 Guthrie, C. & Fink, G., R. Guide to Yeast Genetics and Molecular Cell Biology. *Academic Press*, (2002).
- 127 Fischer, N. *et al.* Structure of the E. coli ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature* **520**, 567-570, (2015).
- 128 Villa, E. *et al.* Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 1063-1068, (2009).
- 129 Bingel-Erlenmeyer, R. *et al.* A peptide deformylase-ribosome complex reveals mechanism of nascent chain processing. *Nature* **452**, 108-111, (2008).
- 130 Bornemann, T., Holtkamp, W. & Wintermeyer, W. Interplay between trigger factor and other protein biogenesis factors on the ribosome. *Nat Commun* **5**, (2014).
- 131 Becker, A. H., Oh, E., Weissman, J. S., Kramer, G. & Bukau, B. Selective ribosome profiling as a tool to study the interaction of chaperones and targeting factors with nascent polypeptide chains and ribosomes. *Nat. Protocols* **8**, 2212-2239, (2013).
- 132 Chai, Q. *et al.* Organization of Ribosomes and Nucleoids in Escherichia coli Cells during Growth and in Quiescence. *J. Biol. Chem.* **289**, 11342-11352, (2014).

- 133 Bakshi, S., Siryaporn, A., Goulian, M. & Weisshaar, J. C. Superresolution imaging of ribosomes and RNA polymerase in live *Escherichia coli* cells. *Molecular Microbiology* **85**, 21-38, (2012).
- 134 Bremer, H. & Dennis, P. P. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. **2**, 1553-1569, *ASM Press*, (1996).
- 135 Lefman, J. *et al.* Three-Dimensional Electron Microscopic Imaging of Membrane Invaginations in *Escherichia coli* Overproducing the Chemotaxis Receptor Tsr. *J. Bacteriol.* **186**, 5052-5061, (2004).
- 136 Costa, S., Almeida, A., Castro, A. & Domingues, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology* **5**, 63, (2014).
- 137 Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R. & Conway, T. Functional Genomics: Expression Analysis of *Escherichia coli* Growing on Minimal and Rich Media. *J. Bacteriol.* **181**, 6425-6440 (1999).
- 138 Jin, D. J., Cagliero, C., Martin, C. M., Izard, J. & Zhou, Y. N. The dynamic nature and territory of transcriptional machinery in the bacterial chromosome. *Frontiers in Microbiology* **6**, 497, (2015).
- 139 Bosdriesz, E., Molenaar, D., Teusink, B. & Bruggeman, F. J. How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentration to approximate growth-rate maximization. *FEBS Journal* **282**, 2029-2044, (2015).
- 140 Veesler, D. *et al.* Maximizing the potential of electron cryomicroscopy data collected using direct detectors. *Journal of Structural Biology* **184**, 193-202, (2013).
- 141 de Groot, N. S. & Ventura, S. Protein Aggregation Profile of the Bacterial Cytosol. *PLoS ONE* **5**, e9383, (2010).
- 142 Sabate, R., de Groot, N. S. & Ventura, S. Protein folding and aggregation in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **67**, 2695-2715, (2010).
- 143 Facey, S. J. & Kuhn, A. Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**, 55-66, (2004).
- 144 Papanastasiou, M. *et al.* The *Escherichia coli* Peripheral Inner Membrane Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**, 599-610, (2013).
- 145 Dudek, J. *et al.* Protein Transport into the Human Endoplasmic Reticulum. *Journal of Molecular Biology* **427**, 1159-1175, (2015).
- 146 Randall, L. L. & Hardy, S. J. S. Synthesis of Exported Proteins by Membrane-Bound Polysomes from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **75**, 43-53, (1977).
- 147 Selmer, M., Gao, Y. G., Weixlbaumer, A. & Ramakrishnan, V. Ribosome engineering to promote new crystal forms. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **68**, 578-583, (2012).
- 148 Glynn, S. E., Martin, A., Nager, A. R., Baker, T. A. & Sauer, R. T. Crystal structures of asymmetric ClpX hexamers reveal nucleotide-dependent motions in a AAA+ protein-unfolding machine. *Cell* **139**, 744-756, (2009).

-
- 149 Baker, T. A. & Sauer, R. T. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 15-28, (2012).
- 150 Wang, J., Hartling, J. A. & Flanagan, J. M. The Structure of ClpP at 2.3 Å Resolution Suggests a Model for ATP-Dependent Proteolysis. *Cell* **91**, 447-456, (1997).
- 151 Villa, E., Schaffer, M., Plitzko, J. M. & Baumeister, W. Opening windows into the cell: focused-ion-beam milling for cryo-electron tomography. *Current Opinion in Structural Biology* **23**, 771-777, (2013).
- 152 Häberlein, T. Technische Informatik. *Vieweg + Teubner Verlag / Springer Fachmedien* (2011).

Anhang

A. Chemikalienliste

Substanz	Hersteller (Ort, Land)
Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid : Bisacrylamid; 29 : 1; 40 %	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Agar	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Agarose LE	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ampicillin-Natriumsalz	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Anti-10Sa RNA	Metabion Int. AG (Martinsried, Deutschland)
Bacto-Agar	BD (Heidelberg, Deutschland)
Bacto-Hefeextrakt	BD (Heidelberg, Deutschland)
Bacto-Trypton	BD (Heidelberg, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bis-Tris	Fluka (Buchs, Schweiz)
Bromphenolblau, Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
BSA Standard	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Complete Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Roche (Basel, Schweiz)
Coomassie Protein Assay Reagent	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Cytidintriphosphat (CTP)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphatseptahydrat (Na ₂ HPO ₄ •7 H ₂ O)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Essigsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Fermentas (Schwerte, Deutschland)
Gene Ruler 100 b DNA Ladder	Fermentas (Schwerte, Deutschland)
Gene Ruler 1kb DNA Ladder (DNA-Längenstandardgemisch)	Fermentas (Schwerte, Deutschland)
D (+) Glukose (monohydrat)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Guanosintriphosphat (GTP)	Roche (Basel, Schweiz)
Goldsuspension (10 nm)	Biocell (Cardiff, England)
Herculase (DNA Polymerase)	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumacetat (KAc)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Substanz	Hersteller (Ort, Land)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kreatinphosphat	Roche (Basel, Schweiz)
Kreatinphosphatkinase (CK)	Roche (Basel, Schweiz)
L- ³⁵ S-Methionin	PerkinElmer (Rodgau, Deutschland)
L-Alanin (Ala, A)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Arginin (Arg, R)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Asparagin (Asn, N)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Asparaginsäure (Asp, D)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Cystein (Cys, C)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Glutamin (Gln, Q)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
L-Glutaminsäure (Glu, E)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Glycin (Gly, G)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
L-Histidin (His, H)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Isoleucin (Ile, I)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Leucin (Leu, L)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
L-Lysin (Lys, K)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Methionin (Met, M)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
6 x Loading Dye	Fermentas (Schwerte, Deutschland)
L-Phenylalanin (Phe, F)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Prolin (Pro, P)	Fluka (Buchs, Schweiz)
L-Serin (Ser, S)	Fluka (Buchs, Schweiz)
L-Threonin (Thr, T)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Tryptophan (Trp, W)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Tyrosin (Tyr, Y)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
L-Valin (Val, V)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
M9 Salz (5x)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Magermilchpulver	Biorad (München, Deutschland)
Magnesiumacetat (MgAc ₂)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ •7 H ₂ O)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder (Proteinleiter vorgefärbt)	Fermentas (Schwerte, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Phosphoenolpyruvat (PEP)	Roche (Basel, Schweiz)
Polyethylenglycol (PEG) 6000	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Substanz

Polyethylenglykol 6000 (PEG)
 Ponceau S
 1-Propanol
 Saccharose
 Spermidin
 Stickstoff, flüssiger
 SYBR® Safe DNA Gel Stain
 T7 RNA Polymerase
 Tetraethylammoniumacetat (TeaOAc)
 Trichloressigsäure (TCA)
 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
 (TRIS)
 Triton-X-100
 Tween-20
 Uridintriphosphat (UTP)

Hersteller (Ort, Land)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
 Merck (Darmstadt, Deutschland)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
 Linde (Hamburg, Deutschland)
 Life Technologies (Carlsbad, USA)
 Thermo Scientific (Waltham, USA)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
 Merck (Darmstadt, Deutschland)

 Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
 Calbiochem (La Jolla, USA)
 Roche (Basel, Schweiz)

B. Geräteliste**Gerät**

Autogrids
 Clipring-Werkzeug
 Eraser
 FIB Ladestation
 FLA 2000
 Gel-Dokumentationssystem
 BioCapt
 Gene Pulser Xcell
 Gradientendrehtisch Gradient
 Master
 Gridbox-Werkzeug
 Intelligent Dark Box
 Kryo-Boxen
 NanoDrop 1000 Spectrophotometer
 Piston Gradient Fractionator
 Safe Imager™ Blue-Light
 Transilluminator
 Spektrophotometer UV-VIS DU640
 Thermocycler PCR T3
 Tischzentrifugen 5415C und 5415R
 Titan Ladestation
 Ultrazentrifuge Optima Le-80K mit
 SW 41 Ti Rotoren
 Zentrifuge Avanti 30

Hersteller (Ort, Land)

MPI für Biochemie (Martinsried, Deutschland)
 FEI (Eindhoven, Niederlande)
 Raytest (Straubenhardt, Deutschland)
 MPI für Biochemie (Martinsried, Deutschland)
 Fuji-Film (Düsseldorf, Deutschland)
 MWG Biotech AG (Göttingen, Deutschland)

 Biorad (München, Deutschland)
 Biocomp (Pfinztal, Deutschland)

 FEI (Eindhoven, Niederlande)
 Fuji-Film (Düsseldorf, Deutschland)
 MPI für Biochemie (Martinsried, Deutschland)
 Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
 Biocomp (Pfinztal, Deutschland)
 Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

 Beckman (München, Deutschland)
 Biometra (Göttingen, Deutschland)
 Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
 FEI (Eindhoven, Niederlande)
 Beckmann (München, Deutschland)

 Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland)

C. Verbrauchsmaterialliste**Verbrauchsmaterial**

Clipringe

EM Grid: Quantifoil R0.6/1 (100

Holey Carbon Films, Cu 75x300
mesh)

EM Grid: Quantifoil R2/1 (100

Holey Carbon Films, Cu 200
mesh)

Whatman Rundfilter 40

Zentrifugenröhrchen (120.2 TLA)

Hersteller (Ort, Land)

FEI (Eindhoven, Niederlande)

Quantifoil (Großlobbichau, Deutschland)

Quantifoil (Großlobbichau, Deutschland)

Whatman (Kent, UK)

Beckmann (München, Deutschland)

D. Veröffentlichte Teile der Dissertation

Teile dieser Doktorarbeit wurden auf folgenden wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt:

- Poster
 - Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoae, Franz U. Hartl, Wolfgang Baumeister, Three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes, EMBO Conference Series: Protein Transport Systems, auf Sardinien (Italien), 16. 20.04.2011
 - Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoae, Franz U. Hartl, Wolfgang Baumeister, Three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes, CNRS - Jacques Monod Conferences 25th anniversary The Translating Ribosome: Toward Mature Proteins, in Roscoff (Frankreich), 2.-6.06.2012
 - Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoaea, F. Ulrich Hartl und Wolfgang Baumeister, Three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes studied by electron cryo-tomography, Keystone Symposia Structural Analysis Of Supramolecular Assemblies by Hybrid Methods, in Granlibakken (USA), 3.-7.03.2013
 - Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoaea, F. Ulrich Hartl und Wolfgang Baumeister, Three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes, EMBO From Structure to Function of Translocation Machines, in Dubrovnik (Kroatien), 13-17.04.2013
 - Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoaea, F. Ulrich Hartl und Wolfgang Baumeister Towards three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes, EMBO / FEBS Lecture Course: Protein interactions, assemblies and human disease auf Spetsai (Griechenland) 16.-26.09.2013
 - Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoaea, F. Ulrich Hartl und Wolfgang Baumeister, Three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes, in Girona (Spanien) Three Dimensional Electron Microscopy, Gordon Research Conference 22.-27.06.2014

-
- Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoaea, F. Ulrich Hartl und Wolfgang Baumeister, Three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes, 18th International Microscopy Congress, in Prag (Tschechien), 7.-12.09.2014
 - Thomas Hoffmann, Julio O. Ortiz, Raluca Antonoaea, F. Ulrich Hartl und Wolfgang Baumeister, Three-dimensional arrangements of membrane associated *E. coli* polysomes, 50th anniversary of Heinrich Wieland Prize, in München (Deutschland) 21.10.2014
 - Vortrag
 - Thomas Hoffmann, Three-dimensional analysis of membrane-bound ribosomes in intact *E. coli* cells, FOR 967 Symposium 6 on Functions and Mechanisms of Ribosomal Tunnel Exit Ligands, in Göttingen (Deutschland) 15.-16.09.2011
 - Thomas Hoffmann, Three-dimensional analysis of membrane-bound ribosomes in intact *E. coli* cells, Murnau Conference, in Murnau (Deutschland) 17.-20.10.2012
 - Thomas Hoffmann, Three-dimensional analysis of membrane-bound ribosomes in intact *E. coli* cells, FOR 967 Symposium 6 on Functions and Mechanisms of Ribosomal Tunnel Exit Ligands, in Kusel (Deutschland), 26.-27.02.2013