

Technische Universität München
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Kryo-Elektronentomographie an
in vitro Translationssystemen

Karoline Bopp

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
Prüfer der Dissertation: 1: Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Die Dissertation wurde am 09.04.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 25.06.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	1
Abstract.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1. <i>In vitro</i> Proteinsynthese	5
1.1.1. Prinzipien	6
1.1.2. Kontinuierliche zellfreie Systeme.....	7
1.1.3. Anwendungen	8
1.2. Strukturelle Analyse von heterogenen Systemen.....	11
1.2.1. Mustererkennung.....	14
1.2.2. 3D Mittelung von Subtomogrammen.....	16
1.3. Modellproteine	18
1.3.1. 20S Proteasom.....	18
1.3.2. Tripeptidyl-Peptidase II	20
1.3.3. Aktin.....	22
1.4. Die α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexe	24
1.5. Aufgabenstellung.....	27
2. Elektronenmikroskopie & Tomographie.....	29
2.1. Präparation von biologischen Proben	29
2.2. Transmissionselektronenmikroskopie	30
2.2.1. Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops	30
2.2.2. Bildentstehung.....	32
2.3. Kryo-Elektronentomographie	34
2.3.1. Dosisverteilung und Strahlenschädigung.....	35
2.3.2. Automatisierte Datenakquisition.....	36
2.3.3. Alignierung der Projektionen und tomographische Rekonstruktion.....	37
2.3.4. Das <i>Missing Wedge</i> Problem.....	39
3. Materialien und Methoden.....	41
3.1. Materialien	41

3.1.1.	Medien	41
3.1.2.	Puffer und Lösungen	41
3.1.3.	Bakterienstämme	42
3.1.4.	Plasmide.....	42
3.1.5.	Antikörper	43
3.1.6.	Kits.....	44
3.1.7.	Chemikalien	44
3.1.8.	Geräte	44
3.2.	Molekularbiologische Methoden.....	45
3.2.1.	DNA-analytische Methoden.....	45
3.2.2.	Kultivierung von <i>E. coli</i>	45
3.2.3.	Präparation von Plasmid DNA	46
3.2.4.	Transformation von <i>E. coli</i>	46
3.2.5.	Subklonierung von DNA durch Restriktion	46
3.3.	Proteinchemische Methoden	47
3.3.1.	<i>In vitro</i> Expression	47
3.3.2.	Proteinanalytische Methoden.....	49
3.3.3.	Proteinreinigung.....	51
3.3.4.	Aktivitätstests	52
3.4.	Elektronenmikroskopie	53
3.4.1.	Negativkontrastierung.....	53
3.4.2.	Mikroskopie von negativ kontrastierten Proben	54
3.4.3.	Kryopräparation.....	54
3.4.4.	Kryo-Elektronentomographie.....	54
3.5.	Bildbearbeitung	55
3.5.1.	Rekonstruktion von Kryo-Elektronentomogrammen.....	55
3.5.2.	Detektion von Makromolekülen in Kryo-Elektronentomogrammen	55
3.5.3.	Mittelung von Makromolekülen aus Kryo-Elektronentomogrammen	56
4.	Ergebnisse und Diskussion	59
4.1.	<i>In vitro</i> Expression funktioneller Modellproteine.....	60
4.1.1.	<i>In vitro</i> Expression des 20S Proteasoms im bakteriellen System	60

4.1.2.	<i>In vitro</i> Expression des 20S Proteasoms im eukaryotischen System	60
4.1.3.	Expression, Assemblierung und Visualisierung von TPP II.....	60
4.1.4.	Visualisierung von Aktin	60
4.2.	Lokalisierung des 20S Proteasoms in Tomogrammen von Lysaten	60
4.3.	Struktur des 20S Proteasoms aus <i>M. mazei</i>	60
4.4.	Der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplex aus <i>T. acidophilum</i>	60
5.	Ausblick.....	60
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	60
7.	Literaturverzeichnis	60
	Danksagung.....	113

Zusammenfassung

Für die klassischen Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen werden große, sehr zeitintensive Anstrengungen für deren heterologe Expression und anschließende Reinigung unternommen. Alle Verfahren sind dabei auf Proteine limitiert, die in relativ großen Mengen löslich und korrekt gefaltet exprimierbar sind. Weiterhin muss ihre assemblierte dreidimensionale (3D) Struktur robust gegenüber den biochemischen Prozeduren für die Isolation und Reinigung sein. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass labile Komplexe und schwache oder transiente Interaktionspartner nicht erfasst werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode für die schnelle Bereitstellung von 3D Kryo-EM-Strukturen mit moderater Auflösung entwickelt, bei der die Reinigung der Proteine vermieden werden kann. Es wurde untersucht, ob eine Kombination aus *in vitro* Proteinsynthese und Kryo-Elektronentomographie die funktionelle und strukturelle Analyse von Proteinkomplexen in einer quasi nativen Umgebung ermöglicht. Dazu wurden drei Modellproteine, das 20S Proteasom aus dem mesophilen Archaeon *Methanosarcina mazei*, Tripeptidyl-Peptidase II aus *Drosophila melanogaster* und murines Aktin mit unterschiedlichen, charakteristischen Strukturen herangezogen. 20S Proteasomen sind zylinderförmige Komplexe mit einem Molekulargewicht von circa 700 kDa, die aus vier gestapelten Ringen mit je sieben Untereinheiten des α - oder β -Typs aufgebaut sind. TPP II existiert als spindelförmiger, 6 MDa großer, homooligomerer Makrokomplex, der aus zwei segmentierten Strängen aus je 10 Dimeren gebildet wird. Beide Enzyme sind Schlüsselkomponenten im Proteinabbau, wobei das bisher nur in Eukaryoten identifizierte Enzym TPP II die durch das eukaryotische 26S Proteasom generierten Peptide weiter degradiert. Filamentöses F-Aktin besteht aus zwei Protofilamenten und bildet als Bündel die zentrale Komponente des eukaryotischen Zytoskeletts.

Die Untereinheiten aller drei Modellproteine wurden in prokaryotischen oder eukaryotischen Lysaten *in vitro* exprimiert und assemblierten zu makromolekularen, aktiven Komplexen. Nach der Expression des jeweiligen Zielproteins wurden die Lysate vitrifiziert und tomographiert. Die korrespondierenden Tomogramme zeigten eindeutig

20S Proteasomen, sowie Bündel von Aktinfilamenten. TPP II Spindeln konnten nach Größenfraktionierung der Lysate ebenfalls detektiert werden. Im ersten Schritt der Strukturbestimmung des 20S Proteasoms aus *M. mazei* wurden die Partikel in Kryo-Elektronentomogrammen mit Hilfe eines Mustererkennungsalgorithmus aufgrund ihrer strukturellen Signatur lokalisiert. Dabei wurde die Verlässlichkeit der automatisierten Selektion der Partikel überprüft. Subvolumen der Tomogramme, die potentielle 20S Proteasomen enthielten, wurden in einem 3D Einzelpartikelverfahren analysiert. Die aus der 3D Mittelung resultierende Kryo-EM-Struktur des 20S Proteasoms aus *M. mazei* wurde bis 3 nm aufgelöst und zeigt alle für 20S Proteasomen bekannten morphologischen Details: die vier gestapelten Ringe, die siebenfache Rotationssymmetrie und Dimensionen von 15 nm Höhe und 11 nm Durchmesser.

Die etablierte Strategie wurde zur Analyse des putativen α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes des thermophilen Archaeons *Thermoplasma acidophilum* angewendet. Die Untereinheiten sind in vier einzelnen offenen Leserahmen (ORF) kodiert und zu einem Operon zusammengefasst und zeigen signifikante Sequenzhomologien zu bakteriellen und eukaryotischen Komponenten des Multienzymkomplexes. Alle vier Proteine wurden im bakteriellen Lysat koexprimiert und assemblierten zum Multienzymkomplex. Die gemittelte 2D EM-Struktur aus gereinigten, negativ kontrastierten Komplexen zeigt eine fünffache Symmetrie und hat einen Durchmesser von 19 nm. Es handelt sich dabei sehr wahrscheinlich um das Enzym Dihydrolipoyl-Acyltransferase, welches die zentrale Komponente des Multienzymkomplexes bildet.

Abstract

For classical protein structure determination, much time-consuming effort is spent on their heterologous expression and purification. Conventional methods are limited to highly expressible, soluble and correctly folding proteins. Furthermore the assembled three-dimensional (3D) structure has to be robust to withstand the ensuing biochemical isolation and purification procedures. As a consequence, semi-stable complexes or weak and transient interaction partners cannot be covered.

In this study a method was established which uses expedited means to provide 3D cryo-electron density maps of modest resolution without protein purification. The combination of *in vitro* protein synthesis and cryo-electron tomography has been explored as a mean for the functional and structural analysis of protein complexes in a more close to native state. As working models, we utilized three protein complexes with different characteristic structures: the 20S proteasome from the mesophilic archaeon *Methanosarcina mazei*, tripeptidyl peptidase II from *Drosophila melanogaster* and actin from mouse. 20S proteasomes are cylinder shaped complexes with a molecular weight of 700 kDa build of four stacked rings which consist of seven α - or β -type subunits. TPP II exists as a spindle-shaped, 6 MDa homooligomeric complex, composed of two segmented strands, each consisting of 10 dimers. Both enzymes are key components of the proteolytic pathway, whereas the eukaryotic TPP II cleaves peptides that have been generated by the 26S proteasome. Filamentous actin consists of two protofilaments and forms bundles that represent a major component of the eukaryotic cytoskeleton.

Upon *in vitro* expression of their particular subunits utilizing either pro- or eukaryotic lysates, all model proteins assembled correctly into their macromolecular structures and were functionally active. Tomograms of the corresponding vitrified lysates after expression of the target protein clearly show 20S proteasomes, as well as bundles of actin filaments. TPP II spindles could also be detected after size fractionation of the corresponding lysate. For structure determination of the 20S proteasome of *M. mazei*, the particles were detected based on their structural signature using a pattern recognition algorithm. The reliability of the automated particle selection was assessed. Sub-volumes

of the tomograms containing potential individual 20S proteasomes were extracted *in silico* and subjected to 3D averaging. The resulting cryo-EM structure of the 20S proteasome of *M. mazei* with a resolution of 3 nm shows all characteristic morphological features known for proteasomes, namely four stacked rings and seven-fold rotational symmetry, with a height of 15 nm and 11 nm in diameter.

The established strategy was applied to structural analysis of the putative 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complex of the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. These proteins are encoded by a single 4-gene operon showing significant sequence identity with the bacterial and eukaryotic components building the multienzyme complex. All four subunits were expressed *in vitro* utilizing the bacterial lysate and integrated into the complex. Structures determined by 2D averaging electron microscopy of negatively stained purified complexes displayed five-fold symmetry and a diameter of 19 nm. Most likely, the structure consists only of the probable dihydrolipoyl acyltransferase that constitutes the central component of the multienzyme complex.

1. Einleitung

Proteine sind die häufigste zelluläre Komponente und haben strukturelle, metabolische und regulatorische Funktionen innerhalb und außerhalb von Zellen. Proteine dominieren alle zellulären Prozesse, daher ist das Verständnis bezüglich ihrer molekularen Mechanismen, Struktur und Funktion grundlegend, um zelluläres Leben zu verstehen. Nur die wenigsten Proteine können allein eine spezifische Funktion erfüllen, und jedes Protein interagiert durchschnittlich mit etwa neun anderen Proteinen (Sali *et al.* 2003). Nur wenige makromolekulare Komplexe sind robust gegenüber biochemischen Prozeduren zur Isolation und Reinigung. Viele Proteine assemblieren nur vorübergehend und haben schwache oder transiente Interaktionspartner. Daher ist es von großem Interesse, die zu analysierenden Proteine in ihrer physiologischen Form zu untersuchen. Dafür sollten Methoden verwendet werden, die den zellulären Kontext annähernd erhalten und Reinigungsprozeduren vermeiden.

1.1. *In vitro* Proteinsynthese

Für die strukturelle Analyse von Proteinen werden diese meist in heterologen Expressionssystemen synthetisiert. Die am häufigsten angewendete Methode ist hierbei die rekombinante Produktion des Zielproteins mit Hilfe des gut charakterisierten *Escherichia coli* (*E. coli*) Expressionssystems. Hierfür sind zunächst einige zeitintensive experimentelle Schritte wie DNA-Klonierung, DNA-Transformation in Zellen und die Überexpression des gewünschten Proteins in Zellen notwendig. Die Überexpression ist im höchsten Ausmaß nicht-physiologisch, unabhängig davon, welches Protein *in vivo* oder *in vitro* synthetisiert werden soll. Neben der Aminosäuresequenz beeinflussen viele zusätzliche Faktoren wie Temperatur, Kofaktoren oder Chaperone die Faltung des neu synthetisierten Polypeptides in seine native Konformation. Obwohl die Proteinsynthese in *E. coli* sehr effizient ist und anteilig bis zu 50% des gesamten zellulären Proteins erreichen kann, scheitert die Expression im bakteriellen Zytosol für viele Proteine. Eines der Hauptprobleme ist dabei die Produktion von Aggregaten. Dabei wird die effiziente Faltung einer Vielzahl von prokaryotischen sowie eukaryotischen Proteinen in ihre

native Konformation bei der *in vivo* Expression nicht unterstützt (Baneyx und Mujacic 2004). Dies kann verschiedene Gründe haben wie die Anwesenheit von inhibitorischen Faktoren, welche mit dem Faltungsprozess interferieren, die Abwesenheit von Faktoren, die diesen unterstützen oder eine Kombination aus beidem. Um die Expression eines Proteins zu verbessern, werden vor allem zwei Strategien verfolgt: die Anpassung der Expressionsbedingungen oder die Adaption des Zielproteins. Hierbei können z. B. auf DNA-Ebene Gene von verschiedenen Spezies verwendet oder die *codon usage* des Plasmids auf das bakterielle System angepasst werden. Zellfreie Expressionssysteme, die sehr simpel und gut kontrollierbar sind, bieten viele Möglichkeiten, verschiedene Ansätze beider Strategien schnell und einfach miteinander zu kombinieren.

1.1.1. Prinzipien

Das Konzept der zellfreien Proteinbiosynthese wurde bereits in den 50er Jahren entdeckt (Littlefield *et al.* 1955). Revolutionär war die Entwicklung eines zellfreien *E. coli* Translationssystems von Nirenberg und Matthaei, dass nachdem endogene mRNA durch Inkubation bei physiologischen Temperaturen entfernt wurde, mit exogenen Polyribonukleotiden (mRNA oder synthetischer RNA) programmiert werden konnte (Nirenberg und Matthaei 1961). Zubay und Kollegen verwendeten erstmals DNA statt mRNA als *template* für eine gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion für die Proteinsynthese (DeVries und Zubay 1967).

Zellfreie Systeme werden generell aus Rohzelleextrakten präpariert. Diese sind Überstände einer Zentrifugation (S30 Fraktion bzw. S100 Fraktion ergänzt durch isolierte Ribosomen), welche frei von endogener DNA und mRNA sind, aber Ribosomen, alle Enzyme, Translationsfaktoren und tRNAs für die Proteinsynthese beinhalten. Für eine erhöhte Effizienz werden die Lysate mit essentiellen Nukleotiden, Aminosäuren, Salzen und Energie-regenerierenden Systemen ergänzt. Um die Produktion von biologisch aktiven Proteinen zu erhöhen, werden zusätzlich zu den intrinsischen Chaperonsystemen des Lysates weitere Chaperone supplementiert (Kolb *et al.* 2000; Mattingly *et al.* 2000). Heute stammen die gängigen und meist verwendeten Systeme von *E. coli* Extrakten (EC), Reticulozyten aus Kaninchen (RRL) und

Weizenkeimen (WG). Die Lysate können mit mRNA (ungekoppelte Reaktion) oder DNA (gekoppelte Transkription und Translation) programmiert werden. In bakteriellen Lysaten kann die endogene RNA-Polymerase die Transkription der mRNA übernehmen, wobei Transkription und Translation gekoppelt ablaufen. Eukaryotische Extrakte werden aus zytoplasmatischen Fraktionen präpariert und besitzen daher keine endogene, aktive RNA-Polymerase. Jedoch kann nach Zugabe einer exogenen, vorzugsweise viralen Polymerase (T7 oder SP6) mRNA von DNA-Plasmiden synthetisiert werden, wobei man von kombinierter Transkriptions- und Translations-Reaktion spricht. Die viralen Polymerasen werden auch in den prokaryotischen Systemen verwendet. Das DNA-*template* muss zusätzlich zur Information des Zielgens spezifische regulatorische Elemente wie den Promotor und das Translationsinitiationssignal (Shine-Dalgarno oder Kozak-Sequenz), die Ribosomenbindestelle, ein Start-Kodon und die Transkription- und Translation-terminierenden Sequenzen enthalten. Dabei können Plasmide wie auch PCR-Produkte für die zellfreie Proteinsynthese verwendet werden (Spirin 2002; Spirin und Swartz 2007).

1.1.2. Kontinuierliche zellfreie Systeme

Typischerweise werden in einer Standard *in vitro* Translation im *batch* Format in wenigen Stunden einige Mikrogramm Protein exprimiert (Roche 2003). Die Proteinmengen können in Ausnahmefällen sogar im Bereich von Milligramm liegen (Kim *et al.* 2006). Dabei wurden im Laufe der Jahre viele Optimierungen erreicht, wie z. B. die Verwendung von *E. coli* Stämmen mit verminderter Proteaseaktivität (Michel-Reydellet *et al.* 2005), verbesserte Präparationsmethoden von WG Lysaten (Madin *et al.* 2000; Sawasaki *et al.* 2002b; Endo und Sawasaki 2004) und die Entwicklung von Energie-regenerierenden Systemen (Jewett und Swartz 2004; Calhoun und Swartz 2005). Obwohl diese Expressionsraten zwar für bestimmte wissenschaftliche Untersuchungen ausreichend sind, lassen sich meistens keine präparativ nutzbaren Mengen synthetisieren. Limitierend ist hierbei die Lebensdauer des Systems, wobei die unzureichende Versorgung mit für die Reaktion wichtigen Komponenten und die Ansammlung von störenden Reaktionsprodukten eine kritische Rolle spielen. Die Lösung des Problems stellt die Unterteilung in eine Reaktionskammer und eine

Energiekammer durch eine permeable Ultrafiltrationsmembran dar (Spirin *et al.* 1988). Dadurch werden hochmolekulare Komponenten der Reaktion wie Ribosomen, tRNAs, Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und andere Enzyme in der Reaktionskammer gehalten und Reaktionsprodukte (Phosphat, Nukleotidmonophosphat) abgetrennt. Weiterhin erfolgt eine kontinuierliche Versorgung von Verbrauchsmaterial wie Aminosäuren und Nukleotiden durch Diffusion (*continuous exchange*) oder aktiv durch Fluss (*continuous flow*). Mit den *continuous exchange* zellfreien Systemen werden bei periodischer Zugabe von mRNA Synthesezeiten von 24 h bis zu mehreren Tagen erreicht. Dabei können sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Lysate verwendet werden (Kigawa *et al.* 1999; Sawasaki *et al.* 2002a). Abhängig von der Wahl des Lysates werden Proteinkonzentrationen von 1 - 5 mg/ml exprimiert, die Ausbeuten durch die Vergrößerung der Reaktionsvolumina betragen bis zu 150 mg Protein (Martin *et al.* 2001; Betton 2003).

1.1.3. Anwendungen

Die Methodik der zellfreien Proteinsynthese leistete große Beiträge zum heutigen Wissen der molekularen Grundlagen der Proteinsynthese, wie beispielsweise der Entschlüsselung des genetischen Codes. Zusätzlich ermöglichen zellfreie Expressionssysteme eine Reihe von technologischen Applikationen. Verglichen mit den Limitationen der klassischen zellbasierenden Proteinexpressionsmethoden, bietet die zellfreie Proteinsynthese ein sehr breites Anwendungsspektrum. Zunächst ist die *in vitro* Translation ein einfaches und flexibles System, um DNA innerhalb von wenigen Stunden in korrekt gefaltetes Protein umzusetzen, wobei ausschließlich das Zielprotein exprimiert wird. Hierbei lässt die Methodik viel Spielraum für die Anpassung auf die jeweilige Anwendung. An erster Stelle steht dabei die Wahl des passenden pro- oder eukaryotischen Systems. Zurzeit sind EC basierende Lysate die am meisten verwendeten und effizientesten Extrakte für zellfreie Expressionssysteme. Obwohl nahezu jede genetische Information in ein Polypeptid translatiert werden kann, ist die effiziente Faltung in ein aktives Protein die eigentliche Herausforderung, insbesondere für die Synthese eukaryotischer Proteine mit mehreren Domänen, Disulfidbrücken sowie

co- und posttranslationalen Modifikationen. WG und RRL Lysate als eukaryotische Systeme sind dabei für die Expression und Faltung eukaryotischer Proteine besser angepasst. Verglichen mit EC Lysaten kann man eine erhöhte Löslichkeit und Funktionalität des synthetisierten Proteins erwarten.

Da Zellysate nicht durch eine Zellwand begrenzt sind, bieten sie als offene Systeme die Möglichkeit, Reaktionsbedingungen sehr einfach und schnell anzupassen. Diesbezüglich können die Synthesebedingungen für individuelle Proteine zum Beispiel durch Veränderung von Reaktionstemperatur, Reaktionszeit oder die Supplementierung von Additiven optimiert werden. Hierzu zählen oxidative Reagenzien, Kofaktoren, Substratanaloga, Liganden oder sogar Chaperone, die für ein definiertes Milieu sorgen und damit die korrekte Faltung, Assemblierung und Funktionalität des Zielproteins unterstützen (Spirin 2004). Allein die Veränderung der Redoxbedingungen in der Reaktion kann bei Proteinen, die Disulfidbrücken enthalten, zu erhöhter Löslichkeit des Translationsproduktes führen (Kawasaki *et al.* 2003). Obwohl in allen Systemen intrinsische Chaperone vorhanden sind, wird oft erst durch Zugabe von zusätzlichen Chaperonen die Synthese von aktivem Protein erhöht oder überhaupt erreicht. So kann beispielsweise eukaryotisches Aktin in *E. coli* erfolgreich translatiert werden, jedoch erst die Zugabe des Chaperonins TRiC führt zur korrekten Faltung im prokaryotischen System (Stemp *et al.* 2005). Durch die Supplementierung von RRL und WG Lysaten mit Mikrosomen, sollen co- und posttranslationale Modifikationen des Zielproteins wie Phosphorylierung, Glykosylierung oder Signalpeptid Spaltung möglich werden (Spirin 2002).

Ein großer Vorzug der *in vitro* Expression ist die Synthese einer großen Auswahl von Proteinen. Hierzu zählen beispielsweise physiologisch von der Zelle nicht tolerierte wie toxische, apoptotische oder proteolytisch sensitive Proteine. Weiterhin wird die Expression von Membranproteinen (Klammt *et al.* 2006) und solchen, die im Normalfall in *inclusion bodies* aggregieren, möglich. Außerdem erlaubt sie die Expression von unidentifizierten, offenen Leserahmen, funktionell instabilen oder schlecht exprimierbaren Genen, sowie Genen, die für instabile Produkte kodieren. Die Möglichkeit, sehr einfach mehrere *templates* gleichzeitig zu translatieren, erlaubt Untersuchungen, die die Koexpression von Proteinen benötigen (Spirin 2002).

Die *in vitro* Expression findet eine Hauptanwendung in der funktionellen Analyse von Genomen durch direkte Expression von genomischen Bibliotheken und in dem Aufbau und *screening* von Proteinbibliotheken (IVEC) (King *et al.* 1997; Woodrow *et al.* 2006). Die Verwendung von PCR-Produkten, die sehr schnell aus cDNA synthetisiert werden, und die schnelle Proteinexpression innerhalb weniger Stunden gewährleisten den Hochdurchsatz des *screenings*. Weiterhin werden *screenings* einer großen Anzahl von Mutanten oder von technisch hergestellten Proteinen möglich. Eine Voraussetzung für die meisten Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen ist eine gewisse Mindestmenge des Zielproteins. Durch die aufgeführten Optimierungen sind die Protein-Ausbeuten bei der *in vitro* Translation für manche Applikationen schon heute ausreichend, müssen aber noch weiter gesteigert werden. Weiterhin bieten zellfreie Expressionssysteme die Möglichkeit, Proteinmodifikationen, welche von intakten Zellen physiologisch nicht toleriert werden, einzuführen. Die selektive Markierung des Zielproteins durch Inkorporation von nicht natürlichen zytotoxischen Aminosäuren wie Selenomethionin (Kigawa *et al.* 2002) oder stabilen Isotop- (^{13}C , ^{15}N) markierten Aminosäuren (Kigawa *et al.* 1999) ermöglicht die Anwendung der *in vitro* Expression bei Methoden wie der Röntgenstrukturanalyse (Wada *et al.* 2003) und NMR (Vinarov *et al.* 2006).

Das Ziel eines relativ neuen Teilgebietes der synthetischen Biologie ist die Entwicklung einer artifiziellen Minimalzelle (Luisi 2002). Klassischerweise werden hierzu die molekularen Komponenten und Gene für die funktionelle Proteinsynthese in ein synthetisches Kompartiment wie Liposomen oder Lipidvesikel eingeschlossen. Noireaux und Libchaber haben nach diesem Prinzip mit einem EC Lysat erfolgreich das wasserlösliche α -Hämolysin in Liposomen synthetisiert und damit durch die Selbstassemblierung des Proteins eine selektive permeable Pore für den Energietransport geschaffen (Noireaux und Libchaber 2004; Noireaux *et al.* 2005). Dies eröffnet auf der einen Seite die Möglichkeit von Studien über lipidlösliche integrale Membranproteine. Darüber hinaus stellt diese Methodik einen wichtigen Schritt hin zu einem genau kontrollierbaren, quasi zellulären System zur Proteinsynthese dar. Dabei ermöglicht dieses System hohe Ausbeuten und gleichzeitig die Untersuchung des Proteins in einer physiologischen Umgebung durch den „zellulären“ Kontext.

Zusammenfassend ist die *in vitro* Proteinsynthese eine Technologie, die einen Beitrag zur Lösung von vielen wissenschaftlichen und biotechnologischen Fragen leistet.

1.2. Strukturelle Analyse von heterogenen Systemen

Für die strukturelle Charakterisierung von Proteinen steht heutzutage eine große Auswahl von Methoden zur Verfügung (Sali *et al.* 2003; Robinson *et al.* 2007). Die Röntgenkristallographie ist die produktivste und genaueste Möglichkeit zur Strukturaufklärung von Proteinen mit Auflösungen von wenigen Angström. So wurden die meisten Strukturen der Proteindatenbanken durch die Röntgenkristallographie gefolgt von der NMR-Spektroskopie gelöst (Henrick *et al.* 2007). Für die Röntgenkristallographie sind dabei große Mengen hochreinen Proteins und die Formierung von periodischen Strukturen guter Qualität, den Kristallen, notwendig. Daher ist diese Methode limitiert auf Proteine, die in heterologen Expressionssystemen in großen Mengen exprimiert werden und löslich und korrekt gefaltet sind. Weiterhin müssen sie robust gegenüber den biochemischen Prozeduren für die Isolation und Reinigung sein, was im Umkehrschluss bedeutet, dass schwache oder transiente Interaktionspartner nicht erfasst werden.

Die kryo-elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse erlaubt strukturelle Studien von makromolekularen Komplexen mit moderater Auflösung im Bereich von 1-3 nm (Frank 2002). Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse und der NMR-Spektroskopie erfordert diese geringere Mengen des zu untersuchenden Proteins. Weiterhin kann die Einzelpartikelanalyse eine gewisse Heterogenität der Probe bewältigen. Eine extrem hohe Reinheit des Präparats ist nicht erforderlich, da Klassifizierungen eine Art von *in silico* Reinigung ermöglichen. Außerdem sind die Proben in Lösung im Gegensatz zur kristallinen Form zugänglich für Interaktionspartner wie Substrate oder Liganden. Die Mittelung von Einzelmolekülprojektionen erfolgt mit Hilfe von Korrelationsverfahren. Trotz der Vorteile der Einzelpartikelanalyse bezüglich der Heterogenität der Präparation ist es wünschenswert, Strukturaufklärung von Proteinkomplexen in einem quasi zellulären Kontext zu betreiben.

Die Kryo-Elektronentomographie (KET) ist eine Methodik der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie, bei der das Präparat im Mikroskop inkremental um eine Achse gekippt und bei verschiedenen Projektionsrichtungen aufgenommen wird (detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 2). Die KET ermöglicht im Gegensatz zu den vorher aufgeführten Techniken die strukturelle und funktionelle Analyse von sehr heterogenen Systemen. Dabei können sogar komplexe Systeme wie die vollständige Zelle mit molekularer Auflösung von zurzeit ca. 4-5 nm abgebildet werden (Grünewald *et al.* 2003b). So ist es möglich, makromolekulare Komplexe *in situ* zu studieren, wobei die Struktur erhalten bleibt. Allerdings hat die zelluläre KET auch gewisse Limitationen. Um nach Crowther eine gute Auflösung zu erreichen, müssen möglichst viele Projektionen über den maximalen Winkelbereich aufgenommen werden (Crowther *et al.* 1970). Gleichzeitig muss die Elektronendosis beschränkt bleiben, um das Präparat nicht zu zerstören, trotzdem muss das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) der Projektionen so hoch sein, dass diese aligniert werden können. Die Elektronendosis und der Bildkontrast limitieren daher die Anzahl der Projektionen einer Kippserie und damit nach Crowther die erreichbare Auflösung eines Objekts mit einer bestimmten Dicke. So können Präparate bis maximal 0,5 μm Dicke tomographiert werden, was die zelluläre KET intakter biologischer Strukturen zunächst auf Viren (Grünewald *et al.* 2003a; Cyrklaff *et al.* 2005), eine Reihe von Prokaryoten (Kürner *et al.* 2005) und flache eukaryotische Zellen (Medalia *et al.* 2002) beschränkt.

Schon vor einiger Zeit konnte von Walz und Kollegen gezeigt werden, dass die Mittelung von Einzelpartikeln aus Tomogrammen zu hochaufgelösten 3D Strukturen führt (Walz 1997; Walz *et al.* 1997a; Walz *et al.* 1997b). In diesen Arbeiten wurden aufgereinigte, vitrifizierte Proteinkomplexe tomographiert. Durch Mittelung von Subtomogrammen wurden 3D Daten mit einer Auflösung von etwa 3 nm generiert. Eine Weiterentwicklung der Algorithmen, die die Verzerrung der Tomogramme durch den *Missing Wedge*-Effekt berücksichtigen, wurde erfolgreich zur Strukturaufklärung des Env Oberflächenkomplexes von murinen Leukemia-Viren verwendet (Förster *et al.* 2005). Weiterhin wurde die Struktur von Kernporenkomplexen aus Präparationen von isolierten, aktiven Zellkernen aus dem eukaryotischen Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* mit einer Auflösung von ca. 6 nm bestimmt (Beck *et al.* 2004; Beck *et al.* 2007).

In beiden Fällen wurde eine makromolekulare Struktur wie der Env Komplex und der Kernporenkomplex aus einem sehr heterogenen Tomogramm des Virus beziehungsweise des Kerns extrahiert.

Für die Strukturaufklärung durch Mittelung von Einzelpartikeln von makromolekularen Komplexen aus dem zellulären Kontext sind einige Voraussetzungen notwendig. Um zu einer moderaten Auflösung durch Einzelpartikelmittelung zu kommen, müssen zunächst ausreichend viele Partikel eines Typs vorhanden sein. Für die Zielstrukturen der oben genannten Beispiele ist diese Bedingung erfüllt. Für einige Proteine wie zum Beispiel Ribosomen ist dies ebenfalls der Fall, viele Proteine werden allerdings zellzyklusabhängig oder überhaupt nur in sehr geringen Mengen exprimiert. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, wäre die heterologe Expression des Zielproteins in der Zelle. Allerdings sind die gängigen Zellen für die heterologe Expression, wie z. B. *E. coli*, zu dick für die KET. Zelllysate als alternative Expressionssysteme zu intakten Zellen erlauben ebenfalls die gezielte, heterologe Überexpression eines Proteins, dessen Struktur aufgeklärt werden soll. Dabei sollte es möglich sein, für die KET geeignete dünne Präparate herzustellen.

Weiterhin müssen die zu mittelnden Proteine korrekt identifiziert werden können. Dies stellt in Kryo-Elektronentomogrammen, die aufgrund der geringen Dosis ein niedriges SNR haben, eine große Herausforderung dar, ist aber prinzipiell möglich. Weiterhin sind Tomogramme und damit auch die einzelnen Partikel durch den *Missing Wedge*-Effekt verzerrt und damit noch schwieriger zu detektieren und zu unterscheiden. Dies zeigt sich beispielsweise bei der manuellen Auswahl der Env Komplexe. Da diese an den unteren und oberen Polen aufgrund der Verzerrung durch den *Missing Wedge* schwierig zu erkennen waren, wurden wahrscheinlich nur 50% für die Mittelung ausgewählt (Förster 2005). Abgesehen von leicht erkennbaren Strukturen, wie Membranen oder filamentösen Strukturen, ist es nur bedingt möglich, große Proteinkomplexe manuell zu detektieren. Die Schwierigkeit liegt darin, dass Partikel einer Spezies verschieden orientiert im Tomogramm vorliegen und daher nicht als gleich zu erkennen sind. Außerdem ist die manuelle Analyse subjektiv, kaum reproduzierbar und aufgrund der großen Datenmengen sehr zeitintensiv. Eine objektive Lokalisierung und Detektion von bekannten Makromolekülen in verrauschten Kryo-

Elektronentomogrammen ist nur mit Hilfe von automatischen Mustererkennungsalgorithmen realisierbar.

In Kryo-Elektronentomogrammen von Phantomzellen wurden mit einem korrelationsbasierten Algorithmus zwei Makromoleküle, das Thermosom und das 20S Proteasom, die strukturell ähnlich aufgebaut sind, detektiert und konnten unterschieden werden (Frangakis *et al.* 2002). Im Zytoplasma lebender Zellen liegen Proteindichten von ca. 100 - 400 mg/ml vor, ein Phänomen das als *macromolecular crowding* bezeichnet wird. Daher wird das durch die niedrige Dosis ohnehin schon geringe SNR weiter verschlechtert. Trotzdem wurde die korrelationsbasierte Mustererkennung erfolgreich auf Tomogramme von sehr dünnen prokaryotischen Zellen ausgeweitet (Ortiz *et al.* 2006). Damit ist es erstmals gelungen, 70S Ribosomen anhand ihrer strukturellen Signatur in Kryo-Elektronentomogrammen von *Spiroplasma melliferum* zu detektieren und ihre 3D Verteilung in der Zelle zu visualisieren. Die Proteinkonzentrationen von Lysaten für die *in vitro* Translation liegen weit unter den aufgeführten zellulären Dichten. Es sollte demnach möglich sein, das exprimierte Protein in Kryo-Elektronentomogrammen von vollständigen Lysaten zu detektieren.

1.2.1. Mustererkennung

Die Lokalisierung und Detektion von Makromolekülen in Tomogrammen mittels *template matching* erfolgt anhand ihrer strukturellen Signatur (Böhm *et al.* 2000; Frangakis *et al.* 2002). Der Algorithmus beruht auf einem korrelativen Vergleich einer Referenzstruktur mit dem Tomogramm. Die Korrelationsfunktion gibt die Ähnlichkeit eines Tomogrammelements zur Referenz an. Die Auswertung dieser Korrelationsfunktion führt im Idealfall zu einer eindeutigen Identifikation von bestimmten Makromolekülen und deren Orientierungen im Tomogramm.

Als Muster kommen sowohl atomare Strukturen, wie sie in der „Protein Data Bank“ (PDB) hinterlegt sind, als auch Kryo-EM Daten im mittleren Auflösungsbereich von 1-3 nm in Frage. Die meisten 3D Strukturen biologischer Makromoleküle sind mit Hilfe der Röntgenkristallographie aufgeklärt worden, aber auch die NMR-Spektroskopie und die Elektronenkristallographie haben die Strukturen der PDB ergänzt. Zur Erzeugung

von Referenzen für die Mustererkennung aus hoch aufgelösten Strukturdaten der PDB müssen diese an den Abbildungsmechanismus und die Auflösung des Elektronenmikroskops angepasst werden (Abbildung 1). Dafür wird aus den atomaren Koordinaten unter Berücksichtigung der Pixelgröße ein elektrostatisches Potential approximiert. Dieses Volumen wird mit einer approximierten Kontrasttransferfunktion (*contrast transfer function* CTF) mit entsprechendem Defokus gefaltet, die die abbildenden Eigenschaften des Mikroskops (Phasen- und Amplitudenkontrast) und die Modulationstransferfunktion (MTF) der Kamera berücksichtigt.

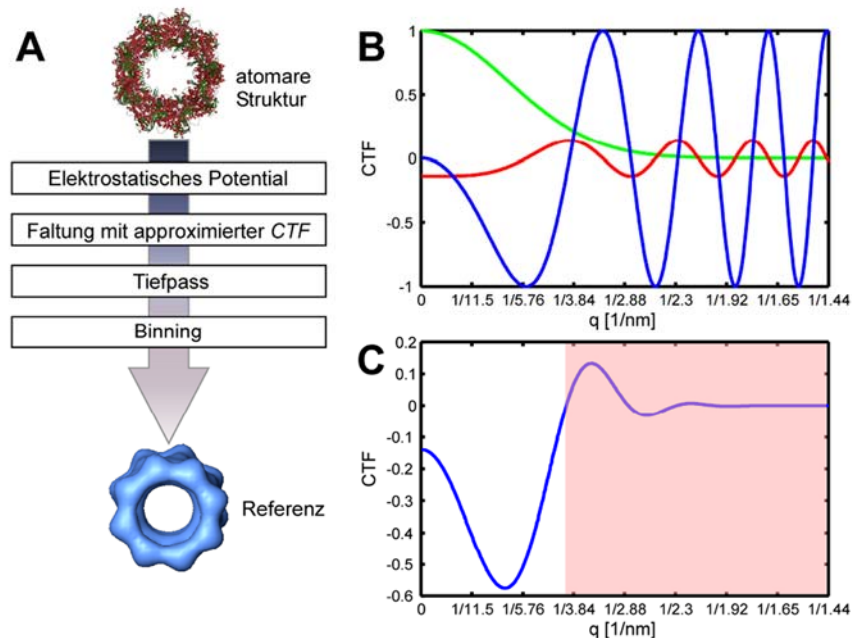


Abbildung 1: Referenzerzeugung für MOLMATCH

[A] Prozedur zur Erzeugung der Referenz für die KET aus atomaren Strukturdaten. [B] Funktionen, aus denen die effektive CTF zusammengesetzt ist: Phasenkontrasttransferfunktion (blau), Amplitudenkontrasttransferfunktion (rot) und Modulationstransferfunktion (grün). [C] Effektive CTF. Oberhalb der ersten Nullstelle (rot schattiert) wird die Funktion abgeschnitten (Förster 2005).

Zur Detektion von Makromolekülen in Tomogrammen sollte eine lokal normalisierte Korrelationsfunktion (LCF) verwendet werden, die kleine Referenzen in räumlich stärker ausgedehnten Umgebungen gut lokalisiert (Roseman 2000; Frangakis *et al.* 2002).

Die Korrelation wird dabei in einem begrenzten Gebiet durchgeführt, das der Form der Referenz angepasst ist. Innerhalb dieser Region wird das Tomogramm nichtlinear gefiltert, wodurch die variierenden Kontrastverhältnisse im Tomogramm ausgeglichen werden und die Detektionsqualität erhöht wird. Bei der 3D Korrelation werden nicht nur alle drei Positionen im 3D Raum abgefragt, sondern auch alle möglichen Orientierungen der Referenz in jeder dieser Positionen. Die 3D Korrelation berücksichtigt damit sechs Freiheitsgrade: die Positionskoordinaten x , y , z und die Eulerwinkel θ , ψ und φ . Bei der Mustererkennung in Tomogrammen werden die Grauwerte des Tomogramms und die generierten Grauwerte der Referenz verglichen. Der Korrelationskoeffizient (CC) gibt die Ähnlichkeit der Grauwertverteilung an. Erreicht der CC den Wert von 1, sind die Grauwertverteilungen an dieser Position identisch, bei einem CC von 0 sind sie unabhängig. Die weiterentwickelte Korrelationsfunktion von F. Förster berücksichtigt zusätzlich den *Missing Wedge*-Effekt, der zu einer anisotropen Auflösung der Partikel im Tomogramm führt (Hoppe 1969). Dafür wird die Korrelation auf den experimentell zugänglichen Winkelbereich beschränkt. Dies geschieht durch die Faltung der Referenz mit der *Pointspread function* (PSF). Diese beschreibt den fehlenden Frequenzbereich im Realraum in Abhängigkeit vom zugänglichen Kippwinkelbereich (Förster 2005).

1.2.2. 3D Mittelung von Subtomogrammen

Elektronenmikroskopische Aufnahmen vitrifizierter Proben sind durch die Elektronendosis limitiert und weisen neben dem Signal der gewünschten Struktur einen Rauschanteil auf. Um das Signal zu verstärken, werden in der Einzelpartikelanalyse Aufnahmen strukturell gleicher Proben kohärent gemittelt. Bei den kontrastschwachen, eiseingebetteten Präparaten werden viele tausend Einzelbilder benötigt, um die Strukturinformation aus dem Rauschen herauszuheben. Die Mikrographen der vitrifizierten Proben repräsentieren 2D Projektionen des Präparats. Die in den Bildern enthaltenen Makromoleküle werden manuell lokalisiert und den beliebig orientierten Einzelpartikeln muss nun eine Orientierung zugewiesen werden. Diese Orientierung setzt sich aus der Projektionsrichtung und der Rotation auf dem Objektträger zusammen und wird durch die drei Eulerwinkel beschrieben. Für eine vollständige 3D

Rekonstruktion der Struktur des Proteins muss das Objekt in den Mikrographen in verschiedenen Orientierungen vorliegen. Zusätzlich zur Drehung des Moleküls muss die laterale Position ermittelt und für die Mittelung korrigiert werden, da die manuelle Lokalisation der Partikel nur sehr ungenau ist. Insgesamt müssen für die Einzelpartikelanalyse also fünf Parameter, drei Winkel und zwei Translationsvektoren bestimmt und iterativ so lange korrigiert werden, bis sich keine Verbesserung der Korrelationskoeffizienten mehr ergibt (Van Heel 1987).

Gemäß dem *dose fractionation theorem* enthält ein Tomogramm die gleiche Signalmenge wie eine Projektion, die mit der gleichen Dosis erzeugt wurde (Hegerl und Hoppe 1976; McEwen *et al.* 1995). Daher ist es ebenso möglich, hochaufgelöste 3D Strukturen durch Mittelung von 3D Einzelpartikeln aus Tomogrammen zu erhalten. Der iterative Algorithmus zur Alignierung und Mittelung von Tomogrammen von F. Förster stellt eine Weiterentwicklung des Algorithmus von Walz *et al.* dar (Förster 2005; Förster *et al.* 2005). Die 3D Alignierung der Subtomogramme basiert auf der *constrained correlation function (CCF)*, wodurch der *Missing Wedge*-Effekt berücksichtigt werden kann. Die Alignierung wird in einem begrenzten Winkelbereich durch Abtasten ausgeführt, da dieses sehr aufwendig ist und für den gesamten Winkelbereich rechnerisch nicht möglich ist. Die CCF der Partikel mit der Referenz ist somit eine Funktion der drei Eulerwinkel und drei Translationsvektoren. Die Prozedur erfordert dabei eine Referenz mit Startwerten für die Orientierungen, die zum Beispiel durch die vorläufige Orientierung der durch die Mustererkennung detektierten Partikel gegeben ist. Die weitere Alignierung erfolgt dann iterativ. Die Referenz wird in die angenommenen Orientierung des Partikels rotiert und mit einem künstlichen *Missing Wedge* gewichtet, der demjenigen der Datensammlung entspricht. Durch die Verwendung eines Bandpassfilters, wird das Partikel maskiert. Diese Maskierung berücksichtigt die Verschiebungsvektoren und Winkel der vorherigen Iteration. Nun wird die Korrelationsfunktion CCF bestimmt. Aufgrund der Intensität des Korrelationspeaks kann die Orientierung des Partikels optimiert werden. Die Position des Peaks gibt Auskunft über die Auswanderung. Diese Parameter werden nun iterativ variiert bis die Alignierung idealerweise konvergiert.

Die beschriebene Prozedur tastet die Eulerwinkel nur in einem eingeschränkten Winkelbereich ab. Eine weitere Prozedur erlaubt das komplette Abtasten des Polarwinkels in einem Schritt und ermöglicht dessen separate Alignierung (Förster 2005). Sie erfordert eine vorläufige Alignierung der Partikel im Raum und bezüglich der beiden übrigen Eulerwinkel. Als erste Referenz dient ein zufällig ausgewähltes Partikel. Die Korrelation dieser Referenz und eines weiteren Partikels wird berechnet, das Partikel wird gemäß dem bestimmten Winkel rotiert und zur Referenz addiert. Der Prozess wird fortgesetzt, bis die Polarwinkel aller Partikel approximiert sind.

1.3. Modellproteine

Um die strukturelle Analyse von Proteinkomplexen in der Umgebung eines Zelllysats mittels KET zu testen, sollten verschiedene, charakteristische und strukturell gut definierte Modellproteine herangezogen werden.

1.3.1. 20S Proteasom

Das 20S Proteasom ist eine nicht lysosomale, multikatalytische Proteinase zum Abbau regulatorischer oder falsch gefalteter Proteine. Zusammen mit zwei 19S regulatorischen Komplexen bildet das katalytisch aktive 20S Partikel das eukaryotische 26S Proteasom zur selektiven, ATP-abhängigen Degradation von Ubiquitin-markierten Proteinen. In Prokaryoten und Archaea, die kein Ubiquitin-System besitzen, werden die 20S Proteasomen allein über homohexamere AAA ATPasen reguliert (für *reviews* siehe (Baumeister *et al.* 1998; Voges *et al.* 1999; Zwickl *et al.* 1999)). Generell sind 20S Proteasomen in allen drei Domänen des Lebens präsent. Dabei sind sie ubiquitär und essentiell für Eukaryoten, ubiquitär jedoch nicht essentiell für Archaea und selten und nicht essentiell für Bakterien (Knipfer und Shrader 1997; Ruepp *et al.* 1998; Heinemeyer 2000). Das archaeale 20S Proteasom wurde zuerst aus *Thermoplasma acidophilum* isoliert (Dahlmann *et al.* 1989). Das in dieser Arbeit untersuchte 20S Proteasom stammt aus dem mesophilen Archaeon *Methanosarcina mazei* (Medalia *et al.* 2006).

Die Struktur des 20S Proteasoms ist von den Archaea bis zu den Eukaryoten hoch konserviert, unterscheidet sich allerdings von den meisten Komplexen der Bakterien. So wurden in Bakterien zwei Typen von Proteasomen gefunden. HslV aus *E. coli* und seine Homologe formen in vielen Bakterien einen proteolytisch aktiven Kernkomplex aus zwei Ringen mit je sechs Untereinheiten (Bochtler *et al.* 1997). Dieser assoziiert direkt mit der HslU ATPase (Rohrwild *et al.* 1997; Wang *et al.* 2001). Ein zweiter Typ wurde nur in der Familie der Actinomycetales gefunden. Diese Proteasomen formen eine Struktur, deren Architektur nicht von der eukaryotischen und archaealen unterschieden werden kann (Tamura *et al.* 1995; Zühl *et al.* 1997b).

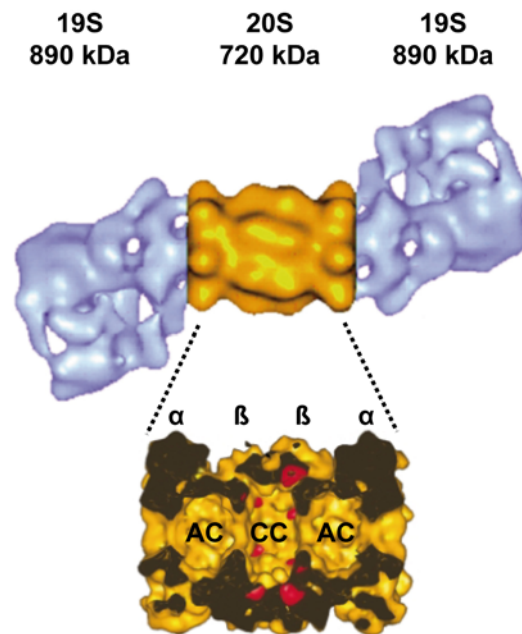


Abbildung 2: Struktur des Proteasoms

Oben: Modell aus der EM Dichte des 26S Proteasoms aus *Drosophila melanogaster* und einer aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* approximierten Dichte. Unten: Offene Seitenansicht des 20S Partikels erlaubt den Blick in die inneren Kavitäten, die roten Punkte markieren die aktiven Zentren. AC: Antechamber, CC: Catalytic Chamber (Löwe *et al.* 1995; Walz *et al.* 1998).

Diese hoch konservierte Struktur besteht aus 14 α -Typ- und 14 β -Typ-Untereinheiten mit Molekularmassen zwischen 20 und 35 kDa. Diese sind in vier heptamere Ringe geschichtet - zwei distale α - und zwei zentrale β -Ringe - und bilden einen Hohlzylinder (Abbildung 2). Die Strukturen der verschiedenen Domänen unterscheiden sich nun in

ihrer Komplexität. Archaeale 20S Komplexe bestehen typischerweise aus einer Typ α - und einer Typ β -Untereinheit, so auch das *Methanosarcina mazei* Proteasom (Deppenmeier *et al.* 2002), während eukaryotische Proteasomen aus sieben verschiedenen, sequenzhomologen Typ α - und Typ β -Untereinheiten geformt werden (Zwickl *et al.* 1999). Die β -Untereinheiten des 20S Proteasoms werden mit einer Propeptid-Sequenz am N-Terminus exprimiert. Die posttranslationale Prozessierung der β -Untereinheit, nämlich die autokatalytische Spaltung des Propeptids, führt zur Exposition des katalytischen N-terminalen Threonins der β -Untereinheiten und ist direkt mit der Assemblierung des 20S Proteasoms verknüpft (Seemüller *et al.* 1996; Zühl *et al.* 1997a). Die α -Untereinheiten des Proteasoms einiger Archaea sind im Gegensatz zu den α -Untereinheiten aus *Rhodococcus erythropolis* in der Lage α -only Ringe zu bilden, die β -Untereinheiten allein formen keine geordneten Strukturen (Zwickl *et al.* 1994; Zühl *et al.* 1997b; Maupin-Furlow *et al.* 1998; Wilson *et al.* 2000). Der vollständig assemblierte, zylindrische Komplex hat eine molekulare Masse von circa 700 kDa, ist 15 nm hoch und hat einen Durchmesser von 11 nm und umschließt einen zentralen Kanal mit drei Umgebun Kavitäten von jeweils circa 5 nm Durchmesser (Löwe *et al.* 1995; Groll *et al.* 1997). Die zwischen den zentralen β -Ringen liegende Hauptkammer ist proteolytisch aktiv, während die beiden angrenzenden Vorkammern inaktiv sind. Substrate werden durch den von den α -Untereinheiten gebildeten Kanal und eine Vorkammer in das aktive Zentrum transloziert. Die N-Termini der α -Untereinheiten können in Abhängigkeit von ihrer Konformation den Eingang blockieren oder für das Substrat freigeben (Groll und Huber 2003).

1.3.2. Tripeptidyl-Peptidase II

Tripeptidyl-Peptidase II (TPP II) ist eine Exopeptidase des Subtilisin-Typs der Serin-Proteasen, die in vielen eukaryotischen Zellen vertreten und unter den Organismen weit verbreitet ist. TPP II ist neben dem 26S Proteasom eine Hauptkomponente im Abbauprozess Ubiquitin-markierter Proteine. Die Aminopeptidase spaltet Tripeptide vom N-Terminus längerer Peptide, die aus dem 26S Proteasom entlassen wurden und anschließend von weiteren kleinen Peptidasen zu freien Aminosäuren abgebaut werden. Dabei hat das Enzym eine breite Substratspezifität, spaltet verschiedene Tripeptide mit

unterschiedlichen Geschwindigkeiten und hat weiterhin eine Endopeptidaseaktivität. Zusätzlich zu seiner Rolle im intrazellulären Proteinumsatz scheint TPP II noch etliche weitere Aufgaben in der Zelle zu haben. Unter bestimmten Bedingungen übernimmt es Aufgaben des 26S Proteasoms, es spielt eine Rolle bei Muskelsepsis, Apoptose und der Generierung von T-Zell Epitopen (Tomkinson und Lindas 2005).

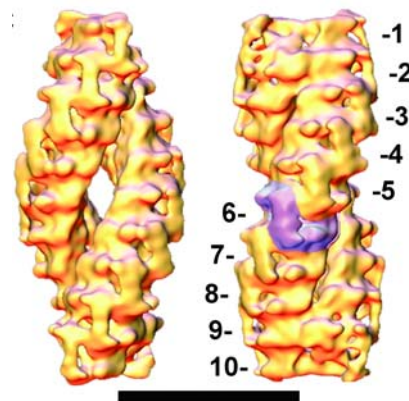


Abbildung 3: Struktur von TPP II

Oberflächendarstellung der 3D Struktur von TPP II in *navette* (links) und *dumbbell* (rechts) Orientierung. Die Nummern der Segmente sind angegeben, Segment 6 ist in lila dargestellt. Maßstab 30 nm (Abbildung aus (Rockel *et al.* 2005b)).

TPP II konnte bisher ausschließlich in eukaryotischen Zellen gefunden und isoliert werden. Der homooligomere Komplex ist in allen Fällen mit mindestens 1 MDa außerordentlich groß, wobei das Molekulargewicht der Untereinheit abhängig vom Organismus zwischen 138 kDa (Säugetiere) und 150 kDa (Pflanzen, Insekten und Würmer) liegt (Rockel *et al.* 2005a). Das Gen des in dieser Arbeit untersuchten TPP II stammt aus *Drosophila melanogaster* (Seyit *et al.* 2006). Die Struktur des 6 MDa großen *D. melanogaster* TPP II-Komplexes besteht aus 40 identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 150 kDa (Rockel *et al.* 2002; Rockel *et al.* 2005b). Die Kryo-EM-Analysen zeigen weiterhin, dass diese in zwei segmentierte Stränge aus jeweils zehn Dimeren assemblieren, die umeinander gedreht eine spindelförmige Struktur formen. Die Spindel hat Dimensionen von 28 nm entlang der longitudinalen und 60 nm entlang der transversalen Achse, die einzelnen Stränge sind je 12 nm breit und umschließen einen zentralen Kanal. Obwohl dies wahrscheinlich die *in vivo* präferierte Konformation

ist, existieren vor allem nach heterologer Expression in *E. coli* verschiedene Assemblierungszustände von Dimeren als kleinste Baueinheit, über Einzelstränge verschiedener Längen bis hin zur Spindel mit verlängerten Strängen. Die kritische Konzentration für die Spindelformierung beträgt bei *D. melanogaster* 0,03 mg/ml. Die höchste Stabilität und Aktivität besitzt die thermodynamisch favorisierte Form der Spindel aus 40 Untereinheiten, wobei die minimal aktive Form das Dimer ist (Seyit *et al.* 2006).

1.3.3. Aktin

Aktin ist das häufigste Protein eukaryotischer Zellen und ist von der Hefe bis zum Mensch hoch konserviert (Schmidt und Hall 1998). Aktin kann entweder als globuläres (G-Aktin) oder als filamentöses Multimer (F-Aktin) vorliegen, das aus einer Kette von G-Aktin Untereinheiten besteht. Die 3D Struktur von G-Aktin mit einer molekularen Masse von 43 kDa wurde im Komplex mit verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen, die die Polymerisierung verhindern, wie z.B. DNaseI, Gelsolin und Profilin, bestimmt (Kabsch *et al.* 1990; McLaughlin *et al.* 1993; Schutt *et al.* 1993; Chik *et al.* 1996). Jedes Aktinmolekül enthält ein Mg^{2+} Ion, das mit ATP oder ADP komplexiert ist. Die Röntgenstrukturanalyse zeigt, dass das aus 375 Aminosäuren aufgebaute Monomer aus zwei blattartigen Domänen besteht, die durch eine Spalte voneinander getrennt sind, in der das Ion und das Nukleotid über Ionen und Wasserstoffbindungen an Aminosäureseitenketten fixiert sind. Aufgrund von elektronenmikroskopischen und röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen ergibt sich für F-Aktin folgendes Modell: F-Aktin besteht aus zwei Protofilamenten, die umeinander gedreht sind und damit eine rechtsgängige Doppelhelix formen (Holmes *et al.* 1990). Der Abstand der Untereinheiten jedes Protofilaments beträgt circa 55 Å, die Helix hat einen Durchmesser von circa 7-9 nm und eine Länge von bis zu 20 µm mit einer Periodizität von 72 nm. Alle Untereinheiten in einem Aktinfilament besitzen die gleiche Polarität.

Mikrofilamente aus F-Aktin-Bündeln sind die zentrale Komponente des eukaryotischen Zytoskeletts. Sie bestimmen damit die Gestalt vieler eukaryotischer Zellen, sind verantwortlich für die Stabilität und aktive Bewegung der Zelle, sowie intrazelluläre

Prozesse wie beispielsweise die Muskelkontraktion oder Zytokinese. Um diese vielfältigen Funktionen in Zellen erfüllen zu können, unterliegt Aktin einem permanenten *turnover* von Polymerisierung zu F-Aktin Mikrofilamenten und Dissoziation in G-Aktin Monomere (Moseley und Goode 2006). Unter physiologischen Salzkonzentrationen ist das Gleichgewicht dieses Prozesses zugunsten der Polymerisierung zu Aktinfilamenten verschoben (Pardee und Spudich 1982). Ein Gleichgewicht zwischen Aktinmonomeren und Aktinfilamenten wird bei der kritischen G-Aktin Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ erreicht. Höhere Konzentrationen führen zu einer Polymerisation, während niedrigere zu einer Depolymerisation der Filamente führen. Die Polymerisierung ist dabei am Plus Ende des Filaments erheblich schneller als am Minus Ende (Wegner und Isenberg 1983). Die Steuerung der Polymerisation in der intakten Zelle mit konstanter Ionenkonzentration erfolgt über regulatorische Aktin-bindende Proteine.

Die effiziente und korrekte Faltung der Aktinuntereinheit benötigt das Chaperonin TRiC (Tian *et al.* 1995; Siegers *et al.* 1999). Obwohl die Architektur und Mechanismen von TRiC und dem bakteriellen Chaperonin GroEL sehr ähnlich sind, kann GroEL die Faltung von Aktin nicht vermitteln. Die rekombinante Expression von Aktin aus diversen Spezies führt zur Bildung von nicht nativem Aktin, das in Form von *inclusion bodies* aggregiert (Frankel *et al.* 1990). Stemp *et al.* nutzten ein bakterielles (EC) *in vitro* Expressionssystem zur Expression von murinem Aktin (Stemp *et al.* 2005). Entsprechend der Expression in der *E. coli* Zelle führte die Aktinsynthese in Abwesenheit des Chaperonins TRiC zu nicht nativen Proteinaggregaten. Die Supplementierung des EC Lysates mit dem Chaperonin TRiC führte zur Faltung und damit zur Produktion von circa $140 \mu\text{g/ml}$ ($3,2 \mu\text{M}$) nativem, löslichen G-Aktin, das aufgrund der physiologischen Salzkonzentrationen im Lysat in filamentöses F-Aktin polymerisierte.

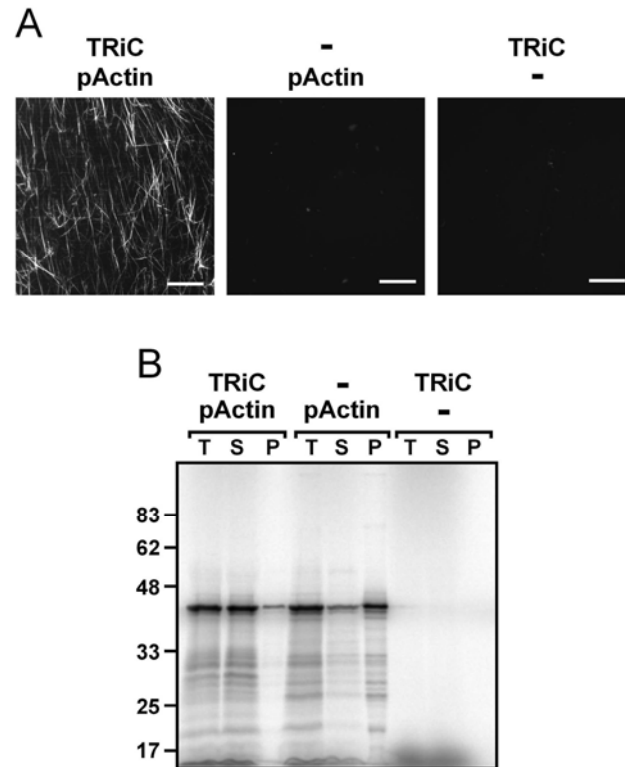


Abbildung 4: In *E. coli* exprimiertes Aktin polymerisiert in Gegenwart von TRiC in Filamente

[A] Fluoreszenzmikroskopie von Rhodamin-Phalloidin gefärbten bakteriellen *in vitro* Translationssystem nach der Expression von Aktin in An- bzw. Abwesenheit von TRiC. Maßstab 20 nm. [B] SDS-PAGE von Total (T), Überstand (S) und Pellet Fraktion von Aktin, das im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin und in An- bzw. Abwesenheit von TRiC hergestellt wurde (Abbildung aus (Stemp *et al.* 2005)).

1.4. Die α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexe

In aeroben Bakterien und Eukaryoten sind die α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexe für die oxidative Decarboxylierung von α -Ketosäuren verantwortlich, bei der die α -Ketosäure in mehreren Schritten unter NADH/H⁺-Gewinn decarboxyliert und der Säurerest auf Coenzym A übertragen wird (Perham 2000; Perham *et al.* 2002). Sie übernehmen damit eine zentrale Rolle im Metabolismus. Zur Familie dieser Multienzymmaschinen, gehören der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex und der Verzweigt-kettige- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex verbindet durch die

Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A die Glycolyse mit dem Citratzyklus. Der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex katalysiert die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat und die nachfolgende Umsetzung mit Coenzym A zu Succinyl-CoA im Citratzyklus. Der Verzweigtkettige- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplex ist verantwortlich für den zweiten großen Schritt im Abbauweg der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin.

Die drei Multienzymkomplexe beinhalten multiple Kopien von drei Enzymen: die α -Ketosäure-Dehydrogenase (E1), die Dihydrolipoyl-Acyltransferase (E2) und die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3). Während E3 immer identisch ist, liegen E1 und E2 in unterschiedlichen Isoformen vor, je nach Substrat, das umgesetzt werden soll. E2 bildet den strukturellen und katalytischen Kern der Multienzymkomplexe und formt hochsymmetrische, abhängig von Organismus und Substrat, octahedrale oder icosaedrische Multimere, an die E1 und E3 nicht kovalent gebunden sind (Mattevi *et al.* 1992; Izard *et al.* 1999). E1 formt abhängig von Organismus und Substrat Homodimere oder $\alpha_2\beta_2$ Heterotetramere, lediglich E3 tritt immer in Form eines Homodimers auf.

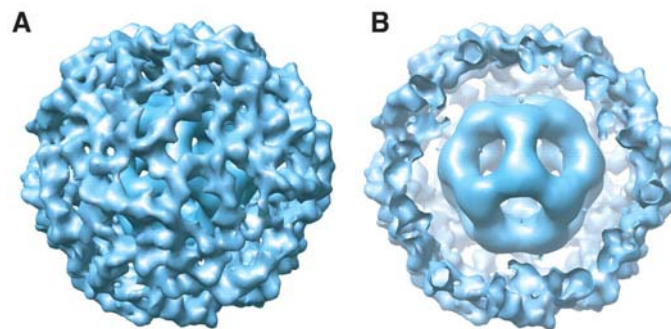


Abbildung 5: Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex aus *Bacillus stearothermophilus*
Oberflächendarstellung der E2E3 PDH Komplexes, offene Ansicht erlaubt den Blick auf den E2 Kernkomplex (Milne *et al.* 2006).

In Archaea übernimmt die Familie der α -Ketosäure-Ferredoxin-Oxidoreduktasen (FORs) die Oxidation von α -Ketosäuren (Danson 2007). Bisher konnte keine α -Ketosäure-Dehydrogenase-Aktivität in Archaea nachgewiesen werden, jedoch wurde das Enzym Dihydrolipoyl-Dehydrogenase in verschiedenen Archaea gefunden (Danson *et al.* 1984). Weiterhin wurde in den Genomen verschiedener Archaea ein Operon bestehend aus

vier einzelnen Genen identifiziert, die für Proteine kodieren, die signifikante Sequenzhomologien zu bakteriellen und eukaryotischen Komponenten der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexe aufweisen (Jolley *et al.* 2000; Heath *et al.* 2004). Al-Mailem *et al.* konnten die Transkription des Operons in *Halofax volcanii* zeigen, Proteomanalysen von *T. acidophilum* bestätigen die Translation aller vier Proteine des Operons ((Al-Mailem *et al.* 2008) und N. Sun, persönliche Mitteilung).

In dem thermophilen Organismus *T. acidophilum* sind die Proteine auf folgenden vier offenen Leserahmen (ORF) kodiert: Ta1435 (hypothetische Dihydrolipoyl-Dehydrogenase), Ta1436 (hypothetische Dihydrolipoyl-Acyltransferase), Ta 1437 (hypothetische 3-Methyl-2-Ketobutanoat-Dehydrogenase β -Untereinheit) und Ta1438 (hypothetische 3-Methyl-2-Ketobutanoat-Dehydrogenase α -Untereinheit). Nach rekombinanter Expression und Reinigung der einzelnen Untereinheiten aus *T. acidophilum* (Ta1435 bis Ta1438) führten Heath und Kollegen Assemblierungs- und Aktivitätsstudien der einzelnen Enzyme und des vollständigen Komplexes durch (Heath *et al.* 2004; Heath *et al.* 2007). Die einzelnen Untereinheiten haben Molekulargewichte von 43 kDa (E1 α , Ta1438), 37 kDa (E1 β , Ta1437), 46 kDa (E2, Ta1436) und 49 kDa (E3, Ta1435). E2 bildet im Fall von *T. acidophilum* einen strukturellen Kern aus 24 Untereinheiten, an den die beiden anderen Enzyme E1 und E3 gebunden sind. E3 bildet vor der Bindung Dimere. Der E1-Komplex besteht aus einem $\alpha_2\beta_2$ Heterotetramer, das eine katalytische Aktivität für verzweigte α -Ketosäuren und Pyruvat besitzt. Da der Multienzymkomplex, bestehend aus allen drei Enzymen, dieselbe Substratspezifität wie der E1-Komplex alleine besitzt, handelt es sich hierbei um einen Verzweigt-kettigen- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplex mit zusätzlicher Aktivität für Pyruvat. Weiterhin ist die Stöchiometrie des E2-Kerns und der heterotetramere Aufbau von E1 konsistent mit bekannten Strukturen von Verzweigt-kettigen- α -Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen aus Bakterien und Eukaryoten (Pettit *et al.* 1978; Aevansson *et al.* 1999; Heath *et al.* 2007).

1.5. Aufgabenstellung

Konventionelle Methoden für die strukturelle Analyse von makromolekularen Komplexen erfordern große Mengen löslichen, korrekt gefalteten und sehr reinen Proteins. Für die heterologe Proteinexpression wird meist das Bakterium *E. coli* herangezogen. Obwohl große Proteinmengen synthetisiert werden können, sind oft die Faltung und damit die Produktion von nativem Protein im bakteriellen Zytosol ineffizient. Sobald alle Parameter für die Proteinexpression optimiert sind, stellt sich die Frage nach der besten Reinigungsstrategie. Die gängigen biochemischen Methoden für die Isolierung und Reinigung von löslichen Proteinen scheitern sehr oft bei der Anwendung auf labile makromolekulare Komplexe. Daher sind klassische Methoden zur Strukturaufklärung von Proteinen auf leicht exprimierbare, korrekt faltende und assemblierende und sehr stabile Proteinkomplexe limitiert.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Strategie zur strukturellen Analyse von nicht gereinigten Proteinkomplexen, um die Limitationen bei der Proteinauswahl durch die gängigen Reinigungsprozeduren zu vermeiden. Dabei sollten zellfreie Expressionssysteme als Alternative zu zellbasierten Methoden für die Proteinproduktion strukturelle und funktionelle Studien von Proteinen in einer unbeeinflussten Umgebung ermöglichen. Die *in vitro* Translation bietet die Möglichkeit die genetische Information sehr schnell in natives Protein umzusetzen, wobei nur das Zielprotein exprimiert wird. Weiterhin ermöglichen Zellysate als offene Systeme die einfache Anpassung der Reaktionsbedingungen. Ein großer Vorteil ist die Möglichkeit der Synthese einer großen Auswahl von Proteinen wie z. B. Membranproteine, für die Zelle toxische oder apoptotische Proteine und solche, die in *inclusion bodies* aggregieren. Abhängig vom Verhalten des Zielproteins kann ein passendes eu- oder prokaryotisches Lysat verwendet werden. Die Entwicklung von kontinuierlichen zellfreien Systemen für prokaryotische als auch für eukaryotische Lysate ermöglicht die Proteinproduktion in größeren Mengen, welche wiederum für eine korrekte Assemblierung von verschiedenen Proteinen notwendig sein kann. Es sollten Modellproteine mit unterschiedlichen charakteristischen Strukturen *in vitro* exprimiert und mittels biochemischer Methoden die Integrität und Funktionalität sichergestellt werden. Nach

erfolgreicher Produktion des funktionellen Proteins sollte die Struktur mit Hilfe von Elektronenmikroskopie und Bildbearbeitungstechniken bestimmt werden. Im Gegensatz zur konventionellen Einzelpartikelanalyse, die relativ reine Proteinpräparationen benötigt, erlaubt die KET strukturelle Studien von individuellen makromolekularen Komplexen in heterogenen Systemen. Die Analyse der Lysate für die Strukturbestimmung des Zielproteins erfolgte daher mittels KET. Anhand ihrer strukturellen Signatur können Makromoleküle in Kryo-Elektronentomogrammen lokalisiert werden (Böhm *et al.* 2000; Frangakis *et al.* 2002). Diese Technik sollte zur Identifizierung der Zielproteine in Tomogrammen von Lysaten angewendet werden. Durch die Mittelung von Einzelpartikeln aus Tomogrammen ist es möglich, hochaufgelöste 3D Strukturen zu erhalten (Walz 1997; Walz *et al.* 1997a; Walz *et al.* 1997b). Eine 3D Mittelung der einzelnen, selektierten Partikel des Zielproteins in den Lysaten sollte zu einer Struktur mit moderater Auflösung führen. Anschließend sollte diese Strategie auf die Proteine Ta1435-38 aus *T. acidophilum*, die strukturell noch nicht charakterisiert sind, angewendet werden.

2. Elektronenmikroskopie & Tomographie

Das Prinzip eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) ist mit dem Lichtmikroskop vergleichbar: der Strahl wird an der Probe gestreut und anschließend durch ein Linsensystem zu einem Abbild des Präparats zusammengefügt. Da in der Elektronenmikroskopie statt Licht Elektronen für die Abbildung verwendet werden, müssen die Proben im TEM im Hochvakuum gehalten werden. Durch die kurze Wellenlänge der Elektronen liegt die Auflösung des TEMs deutlich höher als die eines Lichtmikroskops.

2.1. Präparation von biologischen Proben

Die Analyse im Elektronenmikroskop erfordert eine Präparation der Probe, die für das Hochvakuum geeignet ist. Daher müssen biologische Objekte in Lösungen oder Suspensionen fixiert werden. Dabei sollten im Idealfall der physiologischer Zustand und die Struktur der Probe erhalten bleiben.

Eine Möglichkeit ist die chemische Fixierung und Einbettung von biologischen Proben in Epoxidharze und die Kontrastierung mit Schwermetallionen. Durch diese, seit den 50er Jahren weit verbreitete Methode, wird jedoch die Struktur der Präparate verändert. Für die Negativkontrastierung von Proteinen werden diese mit Schwermetallsalzen wie Ammoniummolybdat, Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure überzogen (Brenner und Horne 1959). Dabei lagern sich die Schwermetallionen idealerweise an den negativen Oberflächenladungen der Probe an, wobei durch die starke Streuung der Elektronen ein sehr hoher Bildkontrast entsteht. Die Probe erscheint dabei hell, der Hintergrund dunkel. Ein Vorteil dieser Präparationsmethode ist die hohe Stabilität gegenüber Elektronenstrahlen. Weiterhin sind durch den Konzentrationseffekt bei der Adsorption an den Kohlefilm relativ geringe Proteinkonzentrationen (0,1 mg/ml) notwendig. Leider ist die Negativkontrastierung aufgrund der komplexen Wechselwirkung der Probe mit dem Kontrastmittel nicht artefaktfrei. Durch die Adsorption an den Kohlefilm kommt es zunächst zu einer Abflachung der Probe durch die Adsorptionskräfte und im Weiteren zu einer Dehydratisierung. Die Auflösung der

Abbildung wird durch die Korngröße des verwendeten Schwermetallsalzes limitiert. Trotzdem kann diese Präparationsmethode zur schnellen und einfachen Analyse von Proteinlösungen verwendet werden.

Die Kryofixierung von biologischen Proben in amorphem (vitrifiziertem) Eis ist heute die geeignetste Methode, um biologische Proben in einem möglichst nativen Zustand einzubetten. Die Anfänge wurden in den 70er Jahren von K. A. Taylor und R. M. Glaeser (Taylor und Glaeser 1974) gemacht und von J. Dubochet (Dubochet *et al.* 1988) weiterentwickelt. Dabei werden wässrige Lösungen unter Normaldruck extrem schnell, mit Abkühlgeschwindigkeiten von 10^6 K/s auf weniger als 140 K abgekühlt, so dass die Bildung von Eiskristallen nicht stattfinden kann: Das Eis befindet sich dann in einem Glaszustand. Die native Struktur von biologischen Proben in den Lösungen wird dabei quasi schockgefroren, eine Dehydratisierung wird vermieden und damit die Struktur in einem quasi nativen Zustand konserviert. In der Praxis werden die Proben auf ein Objekträgernetzchen (*grid*) mit löchrigem Kohlefilm aufgebracht und überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgezogen, so dass eine Eisdicke von weniger als 1 μm entsteht. Die Probe wird mittels einer Fallvorrichtung in flüssiges Ethan, das mit flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von circa 80 K gekühlt wird, „eingeschossen“. Alle weiteren Schritte wie Probenlagerung, Probentransfer und Mikroskopie im TEM erfordern eine Temperatur von 140-150 K, die durch Kühlung mit flüssigem Stickstoff erreicht wird.

2.2. Transmissionselektronenmikroskopie

2.2.1. Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops

Das grundlegende Prinzip und der Aufbau moderner TEMs basieren auf dem bereits in den 30er Jahren von E. Ruska entwickelten ersten Elektronenmikroskop (Abbildung 6).

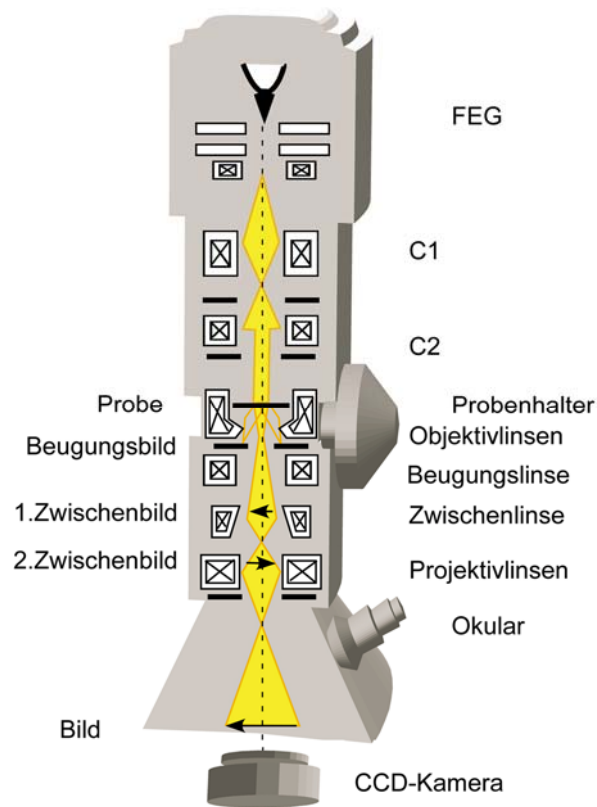


Abbildung 6: Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops

Schematischer Aufbau und Strahlengang eines TEMs. Die TEMs in Martinsried sind alle mit einer CCD-Kamera ausgerüstet (adaptiert nach (Schweikert 2004)).

Dem in dieser Arbeit verwendeten Mikroskop diente als Elektronenquelle eine Feldemissionskathode (FEG), die durch ihren Aufbau verglichen mit thermischen Wolfram- oder Lanthanhexaborid-Kathoden eine potenziell bessere Auflösung erzielt. Die FEG besteht aus einer sehr feinen Wolframspitze als Kathode und zwei Anoden (Extraktor- und Beschleunigungsanode). Aufgrund des geringen Radius der Spitze entsteht bei Anlegen eines positiven Potentials an der Extraktor-anode ein sehr starkes elektrisches Feld und die Elektronen können aus der Kathode tunneln. Dieser Elektronenstrahl besitzt eine sehr hohe örtliche und zeitliche Kohärenz, die zu einer hohen Auflösung führt. Durch die Kondensatorlinsensysteme C1 und C2 wird der Strahl im Idealfall parallel auf die Probe fokussiert. Durch die Wechselwirkung des Strahls mit dem Präparat wird ein Teil der Elektronen gestreut. Sehr stark gestreute Elektronen werden durch die Objektivblende ausgeblendet und tragen nicht zur Bildentstehung bei,

wirken aber kontrastverstärkend. Die schwächer gestreuten und ungestreuten Elektronen interferieren und werden durch das Objektivlinsensystem in einem Zwischenbild abgebildet. Da die Objektivlinse die erste vergrößernde Linse ist, werden alle Abbildungsfehler, die durch die Objektivlinse verursacht werden, vor allem sphärische und chromatische Abberation, durch die nachfolgenden anderen Linsen weiter vergrößert und dominieren daher die Abbildungseigenschaften des ganzen Systems. Durch das Zwischen- und Projektivlinsensystem wird das Zwischenbild vergrößert und auf einen Fluoreszenzschirm projiziert. Alternativ kann der Elektronenstrahl zur Abbildung der Elektronen auf eine CCD-Kamera (*charged coupled device*) umgeleitet werden. Die Elektronen werden dabei durch den Szintillator in Photonen umgewandelt, die über Glasfaserbündel auf einen CCD-Chip geleitet werden. Die Photonen werden hier wiederum in ein Elektronensignal umgewandelt, welches ausgelesen wird.

2.2.2. Bildentstehung

Ein Abbild im Elektronenmikroskop entsteht durch die Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der zu untersuchenden Probe. Treffen hochenergetische Elektronen auf eine nicht zu dicke, amorphe Probe, können sie die Probe entweder ungestört durchqueren oder die Elektronen wechselwirken mit den Atomen in der Probe und werden dadurch absorbiert oder gestreut. Dabei trägt die Absorption nur unwesentlich zum Bildkontrast bei, kann aber zu Artefakten in der Probe führen. Bei der Streuung unterscheidet man zwischen elastischer und inelastischer Streuung. Die inelastisch gestreuten Elektronen erfahren eine Energieabgabe an die Probe, aber lediglich eine geringe Ablenkung aus ihrer Bahn. Aufgrund des Energietransfers verursacht die inelastische Streuung ebenfalls eine Veränderung der Probe (Strahlschäden) und die gestreuten Elektronen liefern nur geringe Information über Strukturdetails. Die für die Bildentstehung wichtigsten Streuereignisse sind elastische Streuungen. Bei der elastischen Streuung werden die Elektronen stark aus ihrer Bahn abgelenkt, verlieren aber keine Energie. Die elastische Streuung trägt hauptsächlich zur Entstehung des Phasenkontrasts bei. Durch die Interferenz der gestreuten Elektronen

mit dem ungestreuten Elektronenstrahl entsteht der Bildkontrast. In dünnen (50-100 nm) biologischen Kryopräparaten entsteht das Bild hauptsächlich durch Phasenkontrast.

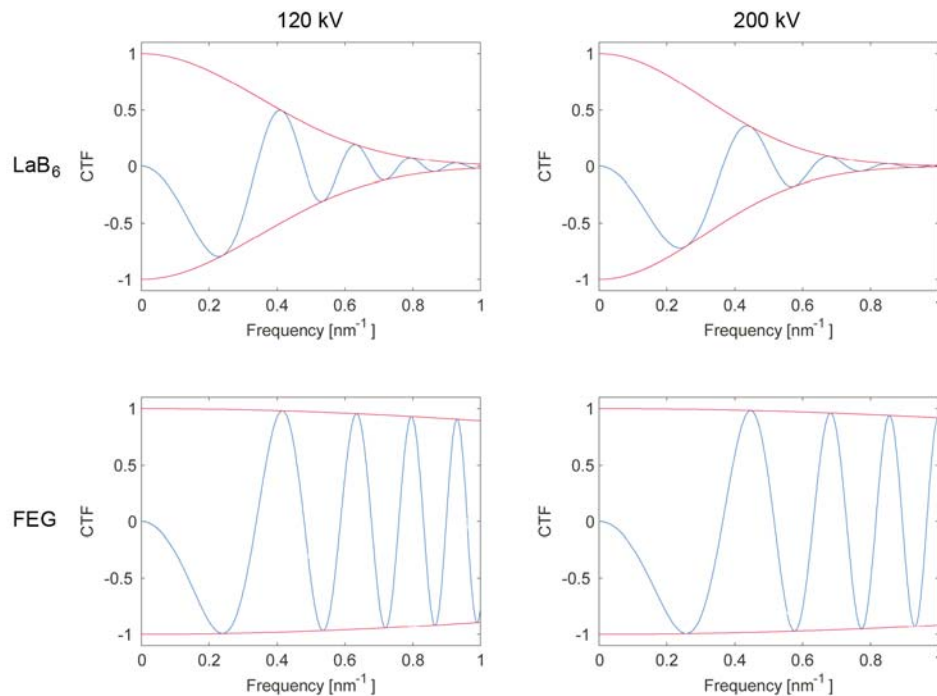


Abbildung 7: Abhängigkeit der CTF von Kohärenz und Beschleunigungsspannung

Die CTF ist in blau für Beschleunigungsspannungen von 120 kV bzw. 200 kV und LaB₆ bzw. FEG TEMs, die jeweiligen Einhüllenden sind in rot dargestellt. Der Defokus ist so gewählt, dass die erste Nullstelle der CTF bei (3 nm)⁻¹ liegt. Die höhere Kohärenz der FEG führt zu einem besseren Dämpfungsverhalten (adaptiert nach (Förster 2005)).

Die im Elektronenstrahl enthaltene Information über die untersuchte Probe wird beim Durchgang durch das Mikroskop verändert. Das aufgenommene Bild ist damit nicht direkt äquivalent mit der Projektion des elektrostatischen Potentials des Präparats. Zur Beschreibung des Abbildungsprozesses im Mikroskop wird die Kontrasttransferfunktion (CTF) eingeführt. Sie ist abhängig von der Kohärenz und Beschleunigungsspannung der Elektronenquelle, dem Fokuswert sowie den Eigenschaften der Elektronenoptik, ist aber unabhängig von der Probenstruktur (Abbildung 7). Kleinere Defokuswerte führen dabei zu einer Verschiebung der ersten Nullstelle der CTF zu höheren Frequenzen und damit zu einer höheren Auflösung bei geringerem Kontrast. Die höhere Kohärenz von FEGs im Vergleich zu thermischen

Elektronenquellen ermöglicht auch bei großen Defokuswerten einen hochfrequenten Kontrastübergang und damit das Arbeiten bei größeren Defokuswerten zur Kontrasterhöhung.

2.3. Kryo-Elektronentomographie

Die Tomographie ist ein Verfahren um die 3D Struktur eines Objekts aus seinen Projektionen zu ermitteln. Das Prinzip der Rekonstruktionsalgorithmen beruht auf einer theoretischen Arbeit von Radon, die besagt, dass ein 3D Objekt eindeutig aus seinen Projektionen rekonstruiert werden kann, wenn alle seine Projektionen bekannt sind (Radon 1917). Bei der Elektronentomographie wird das Objekt senkrecht zur optischen Achse gekippt während die Richtung des Elektronenstrahls unverändert bleibt. Aus den Projektionen, die bei verschiedenen Kippwinkeln aufgenommen wurden, kann die 3D Struktur des Objekts berechnet werden (Abbildung 8). Die erste 3D Rekonstruktion eines biologischen Objektes, die Struktur von Phagenschwänzen, wurde aus 2D Aufnahmen unter Ausnutzung der helikalen Symmetrie erstellt (De Rosier und Klug 1968).

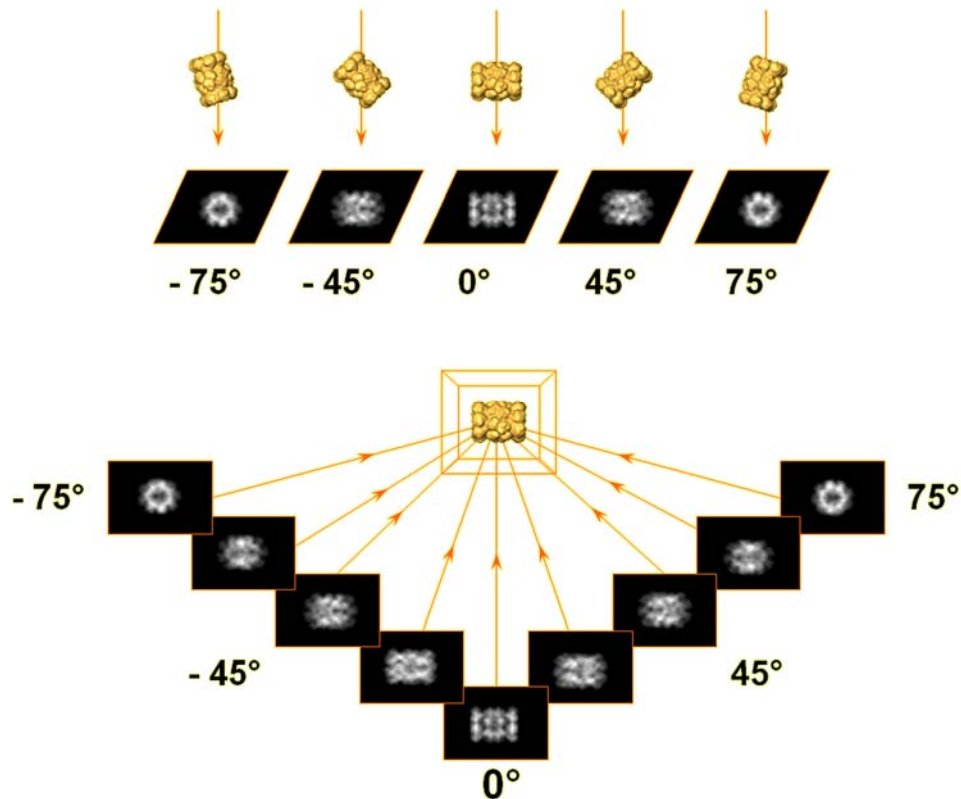


Abbildung 8: Prinzip der Tomographie

Mit Hilfe eines drehbaren Probenhalters werden Projektionen des Objekts aus verschiedenen Richtungen aufgenommen. Die einzelnen Projektionen werden erst gewichtet und anschließend in ein gemeinsames Rekonstruktionsvolumen zurückprojiziert (aus (Kofler 2007)).

2.3.1. Dosisverteilung und Strahlschädigung

Die hohe Strahlenempfindlichkeit von eiseingebetteten, biologischen Materialien ist eine wesentliche Limitierung der KET. Die strahlungsinduzierte Schädigung der Probe entsteht hauptsächlich durch inelastische Wechselwirkungen der Elektronen und den Probenatomen. Der Energietransfer führt zur Bildung von freien Radikalen, die durch Sekundärreaktionen zu makroskopisch sichtbaren Strahlschäden führen wie z. B. der Bildung von Blasen im amorphen Eis (Heide und Zeitler 1985). Da die Sekundärreaktion die thermisch aktivierte Diffusion der freien Radikale voraussetzt, kann der Strahlschaden durch Kühlung der Probe mit flüssigem Stickstoff (77K) eingedämmt werden. Die tolerierbare Elektronendosis (eingestrahlte Elektronenzahl pro Fläche) hängt von der Zielsetzung der Strukturuntersuchung und den chemischen

Eigenschaften der Probe ab. Deshalb wird in der Praxis bei Verfahren, die auf höchste Auflösung abzielen, wie Elektronenkristallographie oder Einzelpartikelanalyse, eine wesentlich geringere Elektronendosis verwendet als bei tomographischen Anwendungen. Für typische Proteinkomplexe sollte die Elektronendosis bei der Elektronenkristallographie weniger als $10 \text{ e}/^\circ\text{A}^{-2}$ betragen (Henderson 1995), während die Grenze bei der Einzelpartikelanalyse bei $10\text{-}20 \text{ e}/^\circ\text{A}^{-2}$ bei 120 kV liegt (Frank 2002). In der KET sollte die kumulierte Elektronendosis, abhängig von Probe und angestrebter Auflösung, den kritischen Bereich von $50\text{-}100 \text{ e}/^\circ\text{A}^{-2}$ nicht übersteigen, um die Strukturdetails nicht zu zerstören. Das *dose fractionation theorem* besagt, dass diese Elektronendosis theoretisch auf beliebig viele Projektionen verteilt werden kann (Hegerl und Hoppe 1976; McEwen *et al.* 1995). Das SNR des 3D Datensatzes entspricht dem SNR eines Bildes, in dem die Gesamtdosis steckt, das heißt der Signal Gehalt ist in beiden Fällen der gleiche.

2.3.2. Automatisierte Datenakquisition

Die automatisierte Datensammlung erleichtert und beschleunigt die Aufnahme von Projektionen und macht das Arbeiten unter Niedrigdosisbedingungen möglich (Dierksen *et al.* 1992; Dierksen *et al.* 1993; Koster *et al.* 1997). Mechanische Ungenauigkeiten des Probenhalters verursachen Verschiebungen der Probe während des Kippvorgangs. Das betrifft insbesondere die Auswanderung der Probe und den Fokuswert. Ein manuelles Ausgleichen wäre zeitaufwendig und dosisintensiv, was die automatisierte Datenakquisition unumgänglich macht. Die Datenaufnahme erfolgt dabei in drei Schritten:

1. *Tracking*: Nach der Aufnahme eines Bildes mit niedriger Elektronendosis wird mittels Kreuzkorrelation mit dem vorherigen Bild die laterale Auswanderung bestimmt und korrigiert.
2. *Autofocus*: Auf der Basis zweier Bilder mit unterschiedlicher Strahlkipfung wird die Auswanderung der Probe zwischen zwei aufeinander folgenden Kippwinkeln bezüglich der z-Achse korrigiert und der vorgegebene Defokuswert neu eingestellt (Koster *et al.* 1989; Ziese *et al.* 2003).

3. *Exposure*: In diesem letzten Schritt wird die eigentliche Projektion aufgenommen.

Durch die Verschiebung der *Autofocus*- und *Tracking*-Position entlang der Kippachse weg vom Probenort, wird keine zusätzliche Dosis auf die *Exposure*-Position gegeben. Im *Autofocus*- und *Tracking*-Modus wird die CCD-Kamera nicht vollständig ausgelesen, also eine geringere Abtastung verwendet als im *Exposure*-Modus, das zu einer Zeitersparnis führt. Idealerweise verteilt sich die Elektronendosis gleichmäßig über alle Projektionen. Die Dicke der Probe ist jedoch abhängig vom Kippwinkel. Damit verlängert sich der Weg der Elektronen durch die Probe bei höheren Kippwinkeln. Daher kann die Belichtungszeit im *Exposure*-Modus automatisch angepasst werden.

2.3.3. Alignierung der Projektionen und tomographische Rekonstruktion

Für die 3D Rekonstruktion müssen zunächst die Projektionen, die durch die mechanischen Ungenauigkeiten des Kippmechanismus verschoben sind, aligniert werden. Hierfür existieren zwei verbreitete Methoden: Alignierung mittels Kreuzkorrelation oder Markerpunkte (Lucic *et al.* 2005). Kreuzkorrelationsbasierte Methoden sind im Allgemeinen sehr rauschempfindlich. Für eiseingebettete Proben ist es daher üblich, die einzelnen Projektionen mit Hilfe von Markerpunkten zu alignieren (Lawrence 1992). Dabei wird die Position der Markerpunkte in allen Projektionen bestimmt und mit den Koordinaten eines Modells verglichen. Auf der Basis dieser Information wird ein Alignierungsmodell berechnet und der Fehler zwischen gemessenen und vorhergesagten Koordinaten als Funktion der lateralen Translation und dem Winkel der Kippachse minimiert.

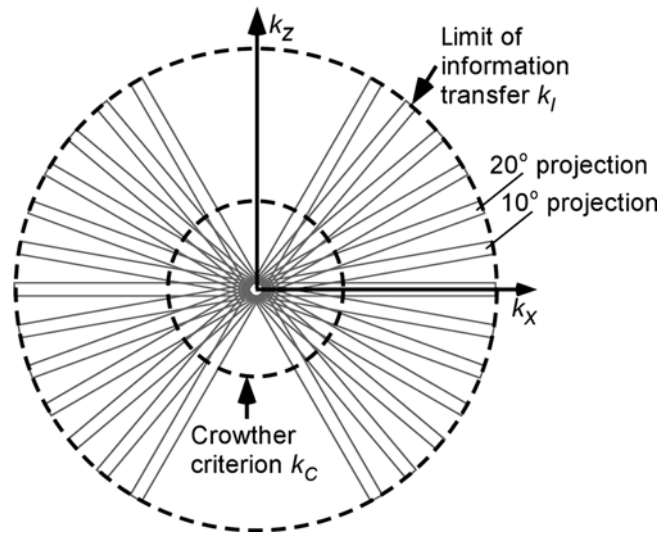


Abbildung 9: Veranschaulichung des Crowther-Kriteriums

Die Fourier-Transformierte jeder Projektion eines Objektes mit der Dicke D beinhaltet die Information eines Schnittes der Dicke $1/D$ im 3D Fourier-Raum. Die Strukturinformationen des Objekts werden außerhalb des *Missing Wedge* bis zur Crowther-Frequenz k_c homogen aufgenommen. Die darüber hinausgehende Information ist unvollständig (Lucic *et al.* 2005).

Die alignierten Projektionen können nun mit einem geeigneten Verfahren 3D rekonstruiert werden. In Pionierarbeiten von D. J. de Rosier und A. Klug wurde die 3D Rekonstruktion im Fourier-Raum durchgeführt (De Rosier und Klug 1968). Heute sind jedoch Rekonstruktionsverfahren für ET im Realraum üblich (Frank 2006). In dieser Arbeit wurde ausschließlich die gewichtete Rückprojektion zur Rekonstruktion der Tomogramme verwendet (Abbildung 8). Bei dieser Methode werden die einzelnen Projektionen in ein gemeinsames 3D Volumen zurückprojiziert. Problematisch hierbei ist, dass die Information über die Probe aufgrund des eingeschränkten Kippwinkelbereichs nur bis zur Crowther-Frequenz k_c homogen ist und niedrigere Frequenzen überbetont sind. Es entsteht eine Überlappung der tieffrequenten Informationen innerhalb des Crowther Kriteriums k_c (Abbildung 9). Deshalb müssen die Projektionen vor der Rückprojektion gewichtet werden. Dabei unterscheidet man zwei Verfahren, die beide im Fourier-Raum durchgeführt werden: analytisches oder exaktes Gewichten. Bei dem analytischen Gewichten gewichtet man die Fourier-Transformation der Projektion senkrecht zur Kippachse mit dem Betrag der Frequenz in dieser

Richtung. Die exakte Gewichtung erfordert die Angabe des Objektdurchmessers (Harauz und Van Heel 1986).

2.3.4. Das *Missing Wedge Problem*

Crowther *et al.* haben aus der Dicke eines Objekts (D) und der Anzahl der Projektionen (N), die über den ganzen Winkelbereich verteilt sein müssen, ein Kriterium für die erreichbare 3D Auflösung (r) einer Rekonstruktion abgeleitet (Crowther *et al.* 1970):

$$r = \frac{\Pi \times D}{N}$$

Diese gilt allerdings nur näherungsweise, da Tomogramme wie oben bereits angesprochen aufgrund des Kryo-Mikroskophalters immer in eingeschränkten Kippwinkelbereichen bis maximal 75° aufgenommen werden und der Informationsgehalt der einzelnen Projektionen durch Rauschen reduziert wird. Die fehlenden Projektionen der hohen Kippwinkel bilden im Fourier-Raum den so genannten *Missing Wedge*, einen Doppelkeil, der keine Informationen über das Objekt enthält (Abbildung 10). Bei der Rekonstruktion kommt es daher zu einer Elongation der Struktur in Richtung der z-Achse (Hoppe 1969). Durch die Ergänzung der Daten durch eine zweite um 90° gedrehte Kippserie lässt sich der *Missing Wedge* zu einer *Missing Pyramid* reduzieren (Penczek *et al.* 1995; Mastronarde 1997).

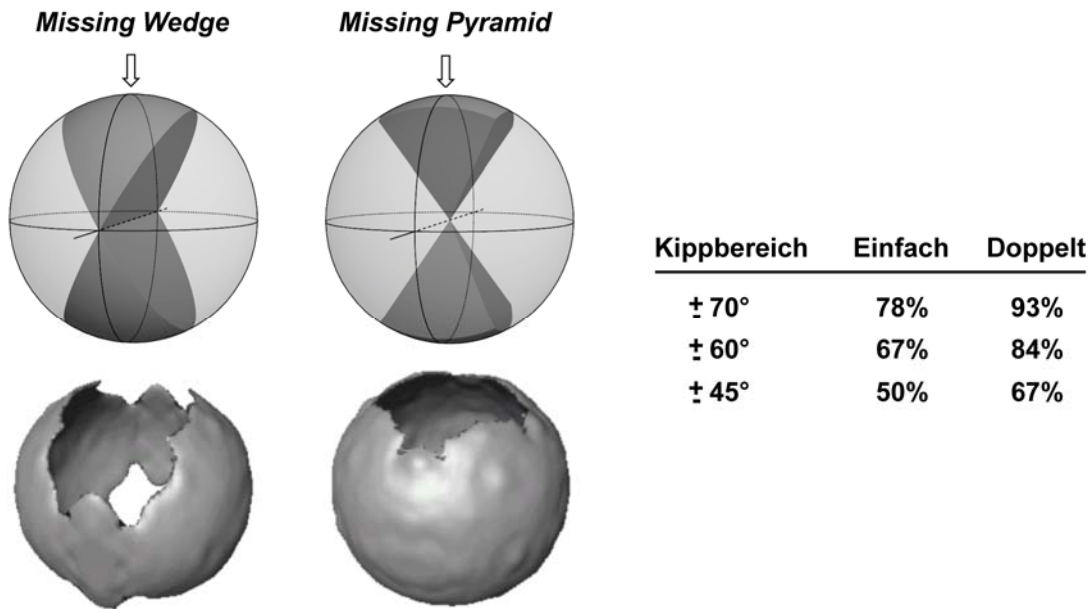


Abbildung 10: Das Missing Wedge Problem

Durch den Mikrophalter bedingt können Kippserien nur in einem beschränkten Winkelbereich aufgenommen werden. Oben: Bei der Einachsenkippung entsteht dabei im Fourier-Raum ein keilförmiger Bereich ohne Information (*Missing Wedge*). Dieser verkleinert sich bei der Zweiachsenkippung zu einer Pyramide (*Missing Pyramid*). Unten: Die fehlende Information ist im Realraum dargestellt. Tabelle: Prozentuale Anteile, die bei verschiedenen Kippwinkelbereichen im Fourier-Raum abgedeckt werden (adaptiert nach (Lucic *et al.* 2005)).

Um mittels KET eine hinreichend gute Auflösung zu erzielen, müssen also einerseits möglichst viele Projektionen über einen maximalen Winkelbereich verteilt aufgenommen werden, andererseits darf die kritische Elektronendosis nicht überschritten werden. Weiterhin sollte das SNR der Einzelprojektionen durch Fraktionierung der Gesamtdosis so hoch sein, dass die Projektionen einer Kippserie noch aligniert werden können. Eine Möglichkeit das SNR zu erhöhen, ist die dreidimensionale Mittelung von Partikeln aus Subtomogrammen.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Medien

LB-Medium: 0,5% Bacto Hefeextrakt, 2,0% Bacto Trypton, 10 mM NaCl

Die Medien wurden durch Erhitzen auf 121°C für 20 min sterilisiert.

SOC-Medium: 0,5% Bacto Hefeextrakt, 2,0% Bacto Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl

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

Selektion: Chloramphenicol 34 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Ampicillin 100 µg/ml

3.1.2. Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit MilliQ Wasser angesetzt. Puffer für chromatographische Aufreinigungen wurden entgast und filtriert (0,45 µm, Apparatur von Nalgene).

TAE: 40 mM Tris Acetate 1 mM EDTA, pH 8,0

SDS-Sammelgel: 5% Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), 130 mM Tris (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% Ammoniumpersulfat

SDS-Trenngel: 10-15% Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), 0,75 M Tris (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% Ammoniumpersulfat

SDS-2x Probenauftragspuffer: 200 mM Tris (pH 6,8), 10% SDS, 10% Glycerin, 10% β-Mercaptoethanol, 0,02% Bromphenolblau

SDS-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Coomassiefärbelösung: 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250, 40% Ethanol, 10% Essigsäure

Coomassieentfärbelösung: 40% Ethanol, 10% Essigsäure

Nativ-Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin

Nativ-2x Probenauftragspuffer: 200 mM Tris (pH 6,8), 10% SDS, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol

PonceauS: 0,2% PonceauS, 3% Trichloressigsäure

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,4 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4

PBST: 0,1% Tween20 in PBS

AP-Puffer: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

3.1.3. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5αF'	F'/endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Na1r) relA1 D(lacZYA-argF)U169(m80lacZDM15)	Novagen
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

3.1.4. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pRSETA.Mma	Proteasom α-Untereinheit aus <i>M. mazei</i> Zur Expression in <i>E. coli</i> Lysaten	Noa Medalia
pET-22b.MmβHis	Proteasom β-Untereinheit aus <i>M. mazei</i> mit His Taq am 5'Ende Zur Expression in <i>E. coli</i> Lysaten	(Medalia <i>et al.</i> 2006)
pET-28a.Mma	Proteasom α-Untereinheit aus <i>M. mazei</i> Zur Subklonierung	(Medalia <i>et al.</i> 2006)
pET-30a.TPP	Tripeptidyl-Peptidase II aus <i>D. melanogaster</i> Zur Subklonierung	(Seyit <i>et al.</i> 2006)
pRSET6a.mouse.actin	Murines β-Actin Zur Expression in <i>E. coli</i> Lysaten	(Siegiers <i>et al.</i> 1999)
pIVEX1.3WG.Mma	Proteasom α-Untereinheit aus <i>M. mazei</i> Zur Expression in Weizenkeim Lysaten	diese Arbeit

pIVEX1.3WG.MmβHis	Proteasom β -Untereinheit aus <i>M. mazei</i> mit His Taq am 5' Ende Zur Expression in Weizenkeim Lysaten	diese Arbeit
pIVEX1.3WG.TPP	Tripeptidyl-Peptidase II aus <i>D. melanogaster</i> Zur Expression in Weizenkeim Lysaten	diese Arbeit
pACYCDuet-1.Ta1435, 1436	Ta1435- (in MCS1) und Ta1436- (in MCS2) Untereinheiten aus <i>T. acidophilum</i> Zur Expression in <i>E. coli</i> Lysaten	Na Sun
pETDuet-1.TA1437, 1438	Ta1437- (in MCS1) und Ta1438- (in MCS2) Untereinheit aus <i>T. acidophilum</i> mit His Taq am 5'Ende von Ta 1437 Zur Expression in <i>E. coli</i> Lysaten	Na Sun

Konstruktion von pIVEX1.3WG.Mm α : Die kodierende Region der α -Untereinheit aus pET-28a.Mm α wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und SalI ausgeschnitten und mit den ebenso restringierten Vektor pIVEX 1.3 WG ligiert.

Konstruktion von pIVEX1.3WG.Mm β HIS: Die kodierende Region der β -Untereinheit mit His Taq aus pET-22b.Mm β wurde mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und SalI ausgeschnitten und mit den ebenso restringierten Vektor pIVEX 1.3 WG ligiert.

Konstruktion von pIVEX1.3WG.TPP: Die kodierende Region von TPP II aus pET-30b.TPP wurde mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und NotI ausgeschnitten und mit den ebenso restringierten Vektor pIVEX 1.3 WG ligiert.

3.1.5. Antikörper

Antikörper	Spezies	Referenz
Primärantikörper		
anti-Proteasom-α (<i>T.a.</i>)	Kaninchen	Peter Zwickl
anti-Proteasom-β (<i>T.a.</i>)	Kaninchen	Peter Zwickl
anti-TPP II (<i>D.m.</i>)	Kaninchen (Eurogentec)	Jürgen Peters
Zweitantikörper		
anti-Kaninchen IgG-HRP	Ziege	Sigma A9169

3.1.6. Kits

Ni-NTA Spin Kit	Qiagen
RTS 100 <i>E. coli</i> HY Kit	Roche
RTS 500 <i>E. coli</i> HY Kit	Roche
RTS 100 <i>Wheat Germ</i> CECF Kit	Roche
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

3.1.7. Chemikalien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien waren wenn nicht anderweitig erwähnt von Fluka, Calbiochem, Merck, Sigma-Aldrich, Roth, und Roche.

3.1.8. Geräte

Gerät	Hersteller
Chromatographie	
Anlage: SMART	Pharmacia Biotech
Superose 6 PC 3.2/30	Amersham
Einschussapparatur	Eigenbau, R. Gatz
Elektronenmikroskop CM20	Philips
Image reader	
FLA-2000	Fuji
LAS-3000	Fuji
Fluorometer	
SFM25	Kontron Instr.
Fluostar Optima	BMG
Kryo-Probenhalter	Gatan
UV/VIS Spektrometer	
Lambda 2	Perkin Elmer
Lambda 40	Perkin Elmer

MilliQ PLUS Ultra Pure Water System	Millipore
pH-Meter: pH525	WTW
Plasmacleaner	Harrick
RTS ProteoMaster Instrument	Roche
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zentrifugen:	
JDSHF	Eppendorf
Rotanta 46 RS	Hettich

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. DNA-analytische Methoden

3.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren wurden durch UV-VIS Spektroskopie bei Wellenlängen von 260 und 280 nm an einem Lambda 40-Spektrometer (Perkin Elmer) bestimmt.

3.2.1.2. Agarosegelelektrophorese

Die analytische und präparative Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in ethidiumbromidhaltigen (1 µg/ml) 1%igen TAE gepufferten Agarosegelen. Die Fraktionierung der Proben versetzt mit Ladepuffer erfolgte bei 100 V in TAE Laufpuffer.

3.2.2. Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* wurde wie in *The QIAexpressionist* beschrieben durchgeführt (Qiagen 2003).

3.2.3. Präparation von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Hilfe von „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.4. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen mit Plasmid DNA oder dem Ligationsansatz versetzt und auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock (1 min, 42 °C). Nach Inkubation auf Eis wurden die transformierten Bakterien in SOC-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Selektivplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positive Klone wurden in Flüssigmedium kultiviert.

3.2.5. Subklonierung von DNA durch Restriktion

Die kodierenden Bereiche der Plasmide wurden durch Restriktionsverdau gewonnen, wobei alle Restriktionen nach Angaben des Enzymherstellers (New England Biolabs) durchgeführt wurden. Um Religationen des Zielvektors zu vermeiden, wurde dessen 5'-Phosphat dephosphoryliert. Die Reaktion wurde mit dem Enzym CIP (*calf intestinal phosphatase*) nach Angaben des Herstellers (37 °C, 1 h) durchgeführt. Nach elektrophoretischer Trennung der DNA-Fragmente erfolgte die Elution mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Für Ligationen wurden der entsprechend restringierte Zielvektor und das zu inserierende Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Die Ligation erfolgte in T4-DNA-Ligationspuffer mit 40 U T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (NEB). Nach Transformation und Plasmidpräparation positiver Klone wurde die DNA durch Restriktions- und Sequenzanalyse (MWG) überprüft.

3.3. Proteinchemische Methoden

Die Expressionen und proteinchemischen Analysen des 20S Proteasoms exprimiert im *rapid translation system* (RTS) von Roche „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ oder „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ und TPP II im „RTS 100 *Wheat Germ* CECF Kit“ wurden in Zusammenarbeit mit Markus Stemp, Abteilung Prof. F.U. Hartl durchgeführt. Aktin wurde wie in Stemp *et al.* beschrieben exprimiert und analysiert (Stemp *et al.* 2005).

3.3.1. *In vitro* Expression

Alle *in vitro* Translationen wurden von Plasmiden mit T7 Promotor mit dem RTS von Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Protein Expressionen in prokaryotischen Systemen wurde das „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ oder das „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ verwendet. Als eukaryotisches Expressionssystem wurde das gekoppelte „RTS 100 *Wheat Germ* CECF Kit“ benutzt. Die erfolgreiche Proteinexpression wurde durch radioaktive Reaktionen unter Zugabe von [³⁵S]-Met getestet. Zur Analyse des löslichen und unlöslichen Translationsproduktes wurden Aliquots der Reaktionen zentrifugiert (20.000 x g, 30 min, 4 °C, Eppendorf JDSHF), in Überstand und Pellet Fraktion separiert und je 1 µl mittels SDS PAGE analysiert. Weiterhin wurde 1 µl der löslichen Fraktion durch native PAGE auf Assemblierung des Komplexes geprüft.

3.3.1.1. 20S Proteasom

Die Expression der α- und β-Untereinheit des 20S Proteasoms aus *M. mazei* erfolgte zunächst im bakteriellen „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ unter Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin ([³⁵S]-Met) für 1 h bei 30 °C (Eppendorf Thermomixer comfort). Hierbei wurden die Plasmide pRSETA.Mmα und pET-22b.MmβHis (freundlicherweise von N. Medalia zur Verfügung gestellt) jeweils separat und koexprimiert. Weiterhin wurden beide Plasmide im „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ mittels RTS ProteoMaster Instrument koexprimiert (Roche, 24 h, 30 °C, 120 rpm). Die Lysate wurden bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung bei -20°C gelagert. Die Expression im eukaryotischen „RTS 100 *Wheat Germ* CECF Kit“ erfolgte von den Plasmiden

pIVEX1.3WG.Mma und pIVEX1.3WG.Mm β His für 24 h bei 24 °C und 900 rpm (Eppendorf Thermomixer comfort) mit oder ohne Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin ($[^{35}\text{S}]$ -Met).

3.3.1.2. TPP II

TPP II aus *D. melanogaster* wurde im eukaryotischen „RTS 100 Wheat Germ CECF Kit“ von dem Plasmid pIVEX1.3WG.TPP für 24 h bei 20 °C und 900 rpm mit oder ohne Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin ($[^{35}\text{S}]$ -Met) translatiert.

3.3.1.3. Aktin

Murines Aktin wurde wie in Stemp *et al.* beschrieben exprimiert (Stemp *et al.* 2005). In Kürze: Die Translation wurde im bakteriellen „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ in Anwesenheit des Chaperonins TRiC durchgeführt. Die Filamentbildung wurde durch Rhodamin-Phalloidin-Färbung und anschließender Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert.

3.3.1.4. ORFs TA1435 - TA1438

Der hypothetische α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplex aus *T. acidophilum* wurde im bakteriellen „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ unter Zugabe von radioaktiv markiertem Methionin ($[^{35}\text{S}]$ -Met) für 1 h bei 30 °C exprimiert. Hierbei wurden die Plasmide pACYCDuet-1.Ta1435, 1436 und pETDuet-1.Ta1437, 1438 (freundlicherweise von N. Sun zur Verfügung gestellt) jeweils separat und koexprimiert. Weiterhin wurden beide Plasmide im „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ mittels RTS ProteoMaster Instrument koexprimiert (Roche, 24 h, 30 °C, 120 rpm).

3.3.2. Proteinanalytische Methoden

3.3.2.1. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (Biorad) spektrophotometrisch bei $\lambda=595$ nm bestimmt (Lambda 40, Perkin Elmer). Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

3.3.2.2. Aceton-Fällung

Proteinlösungen wurden durch Aceton-Fällung konzentriert und wenn vorhanden von Polyethylenglycol gereinigt. Dafür wurden die Proben 1:10 mit eiskaltem Aceton versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation pelletiert (20.000 x g, 20 min, 4 °C). Das präzipitierte Protein wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.3.2.3. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Die Herstellung 10-15%-iger diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgele, in denen die Auftrennung der Proteine standardmäßig durchgeführt wurde, erfolgte nach der Beschreibung in *Current Protocols* (Ausubel *et al.* 2007). Die Proben wurden mit SDS-Probenauftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 130 V ca. 2 h in SDS-Elektrophoresepuffer. Als Größenstandard wurde der „See Blu™ Pre-Stained Standard“ von Novex verwendet, mit Proteinen der folgenden Molekulargewichte (nach Angaben des Herstellers): 250 kDa, 98 kDa, 64 kDa, 50 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 16 kDa, 6 kDa, 4 kDa. Die Gele wurden mit Coomassie fixiert und gefärbt. Unspezifischer Hintergrund wurde mit Entfärbelösung ausgewaschen. Radioaktivmarkierte Proteine wurden durch *Phosphoimaging* (FLA-2000, Fuji) und der AIDA Software visualisiert und quantifiziert.

3.3.2.4. Native PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen erfolgte in Tris-Glycin Gradientengelen (4-20%) von Invitrogen. Die Proben wurden mit Nativ-Probenauftragspuffer versetzt und bei 130 V ca. 2 h in Nativ-Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Als Größenstandard diente der Marker „HMV Native Marker Kit“ von GE Healthcare mit Proteinen der folgenden Molekulargewichte (nach Angaben des Herstellers): 669 kDa, 440 kDa, 232 kDa, 140 kDa, 66 kDa. Die Visualisierung der Proteine erfolgte wie unter 3.2.2.3 beschrieben mittels Coomassie-Färbung oder *Phosphoimaging*.

3.3.2.5. Western Blot

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran-Membran BA-S85, Schleicher & Schull) erfolgte in einer Tank Blot Apparatur (XCell II, Invitrogen). Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer Stromdichte von 0,8 mA/cm². Ein erfolgreicher Transfer konnte durch Verwendung eines gefärbten Standards bzw. durch eine Ponceau-S Färbung überprüft werden.

3.3.2.6. Antikörper Detektion

Unspezifische Bindestellen der Membranen wurden mit 1,5% Gelatine-PBS abgesättigt (1 h, RT). Die Inkubation der Primär- und Sekundärantikörper wurde in den jeweiligen Verdünnungen in PBST durchgeführt (1 h, RT). Als Sekundärantikörper dienten Meerrettich Peroxidase-Konjugate. Nach den jeweiligen Antikörperinkubationen wurde 4 x 5 min in PBST gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels des ECL-Westernblot-Systems (Amersham) über die Chemolumineszenz der Meerrettich-Peroxidase-Reaktion im UV-Bereich (428 nm). Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte mit dem Image Reader (LAS-3000, Fuji). Eine Quantifizierung der Proteinbanden wurde mit Hilfe der Software des Herstellers (AIDA) durchgeführt.

3.3.3. Proteinreinigung

3.3.3.1. Ni-NTA Reinigung des 20S Proteasoms

Die Ni-NTA Reinigung erfolgte mit dem „Ni-NTA Spin Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Nach erfolgreicher Translation des 20S Proteasoms im „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ wurden 500 µl des Reaktionsansatzes durch Zentrifugation (20.000 x g, 30 min, 4 °C) in lösliche- und Pellet-Fraktion getrennt. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen und das Protein wurde zweimal gewaschen (50 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 300 mM NaCl₂, 10 mM Imidazol). Die Elution erfolgte stoßweise in 100 µl Schritten (50 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 300 mM NaCl₂, 500 mM Imidazol bzw. 1 M Imidazol). Die Fraktionen wurden per Aktivitätstest, SDS- und nativ- PAGE analysiert.

3.3.3.2. Größenfraktionierung von 20S Proteasom Lysaten

Die Größenfraktionierung von Lysaten nach Translation von 20S Proteasomen im „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ erfolgte mit einer Superose 6 Säule (Superose 6 PC 3.2/30, Amersham) an einer SMART Anlage (Pharmacia Biotech). Die Säule wurde in 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT äquilibriert. 20 µl des Reaktionsansatzes wurden zentrifugiert (20.000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand auf die Säule aufgetragen und Fraktionen von 50 µl (EC) bzw. 100 µl (WG) gesammelt. Die Fraktionen wurden per Western Blot und Elektronenmikroskopie nach Negativkontrastierung untersucht.

3.3.3.3. Größenfraktionierung von TPP II Lysaten

Die Fraktionierung von Lysaten nach Translation von TPP II im „RTS 100 Wheat Germ CECF Kit“ erfolgte mit einer Superose 6 Säule (Superose 6 PC 3.2/30, Amersham,) an einer SMART Anlage (Pharmacia Biotech). Die Säule wurde mit 80 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 5% Glycerin, 2 mM DTT äquilibriert. 30 µl des Reaktionsansatzes wurden zentrifugiert (20.000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand auf die Säule aufgetragen und

Fraktionen von 100 μ l gesammelt. Diese wurden per Western Blot, Aktivitätstest und Elektronenmikroskopie analysiert.

3.3.3.4. Ni-NTA Reinigung des Ta 1435-1438 Komplexes

Die Ni-NTA Reinigung erfolgte mit dem „Ni-NTA Spin Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Nach Koexpression der Gene für alle vier Untereinheiten im RTS 500 *E. coli* HY Kit wurden 500 μ l des Reaktionsansatzes durch Zentrifugation (20.000 \times g, 30 min, 4 °C) in lösliche- und Pellet-Fraktion getrennt. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen und das Protein wurde dreimal gewaschen (50 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 300 mM NaCl₂, 10 mM Imidazol). Die Elution erfolgte stoßweise in 100 μ l Schritten (50 mM NaH₂PO₄ pH 7,5, 300 mM NaCl₂, 250 mM Imidazol bzw. 500 mM Imidazol). Die Fraktionen wurden per SDS-PAGE, Massenspektrometrie und Elektronenmikroskopie analysiert.

3.3.4. Aktivitätstests

3.3.4.1. 20S Proteasom Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Peptidaseaktivität des translatierten 20S Proteasoms in den Lysaten bzw. in den Fraktionen der Ni-NTA-Säule wurde die Freisetzung des Fluorophors 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) aus dem fluorogenen Tetrapeptid Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Bachem) kontinuierlich verfolgt. Die finale Konzentration des Peptids in einem 100 μ l Ansatz war 100 μ M in Puffer (50 mM Tris, pH 7,5). Für die Kalibrierung wurde 100 μ M AMC, als Hintergrundkontrolle wurde 100 μ M Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in Puffer mit den den Elutionen entsprechenden Imidazolkonzentrationen, verwendet. 90 μ l der Elutionen der Ni-NTA-Säule wurden vermessen. Der Aktivitätstest wurde in einem Fluorometer bei λ Excitation 320 nm und λ Emission 460 nm bei 37 °C in einer 96 well Platte durchgeführt (Fluostar Optima, BMG).

3.3.4.2. TPP II Aktivitätstest

Die Bestimmung der Exopeptidaseaktivität von TPP II erfolgte durch Messung der Freisetzung des Fluorophors 7-amindo-4-methylcoumarin (AMC) aus dem fluorogenen Peptid Ala-Ala-Phe-AMC (Bachem). Die Konzentration des Peptids betrug 200 μM in 50 μl gepuffertem Ansatz (100 mM NaPO_4 , pH 7,5, 1 mM DTT, 5% Glycerin, 5% Me_2SO , 0,1 mM Bestatin). Die 50 μl Reaktionen wurden nach 1 bis 10 min mit 450 μl 100 mM Tris pH 9,5, 1% SDS gestoppt. Für die Kalibrierung wurde 2 μM AMC, als Hintergrundkontrolle wurde 200 μM Ala-Ala-Phe-AMC in Puffer verwendet. Es wurden 2 μl des löslichen Teils der Reaktion bzw. 5-10 μl der Fraktionen der Superose 6 Säule vermessen. Der Aktivitätstest wurde in einem SFM25 Fluorometer (Kontron Instruments) bei λ Excitation 320 nm und λ Emission 460 nm durchgeführt.

3.4. Elektronenmikroskopie

3.4.1. Negativkontrastierung

Mit kontinuierlichem Kohlefilm beschichtete Kupfer-*grids* (PLANO W. Plannet GmbH, 100 \times 400 mesh) wurden für 30 s mit einem Plasmacleaner hydrophilisiert (Harrick Scientific Corporation, NY, USA). Die Lysate nach der Translation wurden 1:10 in Translationspuffer (Roche) verdünnt. 5 μl der Verdünnung wurde für 1 min auf dem *grid* adsorbiert. Das *grid* wurde dreimal mit Tris pH 7,5 gewaschen und überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier (Typ 1, Nr. 1001 090, Whatman) abgezogen. Der verbleibende Flüssigkeitsfilm wurde für 30 s mit 2% (w/v) ungepufferter Uranylacetat-Lösung (pH 4) negativ kontrastiert. Die überstehende Uranylacetat-Lösung wurde mit Filterpapier vom *grid* abgesaugt und das *grid* an der Luft getrocknet. Fraktionen von Säulen wurden angemessen verdünnt eingesetzt und gegebenenfalls dreimal gewaschen.

3.4.2. Mikroskopie von negativ kontrastierten Proben

Die Proben wurden an einem CM20 TEM (Philips, Eindhoven, Niederlande) bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV bei Raumtemperatur mikroskopiert. Die einzelnen Bilder wurden mit einer 2048 × 2048 Pixel oder 4096 × 4096 CCD-Kamera (TVIPS, Gauting, Deutschland) bei 2 µm Defokus und verschiedenen Vergrößerungen aufgezeichnet. Die Selektion und Mittelung von Einzelpartikeln erfolgte dabei mit `tom_av2_particlepickergui.m` und `tom_av2_alignment` des TOM Paketes (Nickell *et al.* 2005) implementiert in MATLAB (The MathWorks, Natick, MA).

3.4.3. Kryopräparation

Quantifoil R 2/1 Kupfer-*grids* (400x100 Cu-mesh, 100 Holey Carbon Film R2/1, Quantifoil Micro Tools GmbH) wurden für 10 s mit einem Plasmacleaner (Harrick Scientific Corporation, NY, USA) hydrophilisiert und mit Pinzetten aufgenommen. Zur Alignierung der Projektionen für die tomographische Rekonstruktion wurde 4 µl kolloidales Gold (Durchmesser ca. 10 nm) auf der Kohleseite des *grids* aufgetragen. Nachdem die Goldsuspension eingetrocknet war, wurden 3 µl Lysat nach der Translation zupipettiert. Die Pinzette wurde in die Einschussapparatur (Eigenbau Rudolf Gatz, MPI für Biochemie) eingespannt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines Filterpapiers (Typ 1, Nr. 1001 090, Whatman) abgezogen und das *grid* in flüssigem Ethan vitrifiziert. Die Proben wurden in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Datenaufnahme gelagert.

3.4.4. Kryo-Elektronentomographie

Die vitrifizierten Proben wurden an einem CM20 TEM (Philips, Eindhoven, Niederlande) mit einer Beschleunigungsspannung von 160 kV (FEG), ausgestattet mit einer 2048 × 2048 Pixel CCD-Kamera (TVIPS, Gauting, Deutschland), analysiert. Die vitrifizierten *grids* wurden unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einen Kryo-Probenhalter (Gatan, Inc. Pleasanton, CA, USA) eingesetzt und in das Mikroskop eingebaut. Kippserien wurden unter Niedrigdosisbedingungen aufgezeichnet. Die

Projektionen wurden bei einem nominellen Defokus von 3 μm und einer effektiven Vergrößerung von 36.000-fach aufgenommen. Daraus ergab sich die erste Nullstelle der CTF bei ca. 2,9 nm und einer Pixelgröße auf Objektebene von 0,412 nm. Alle Kippserien deckten einen Winkelbereich von -60° bis $+60^\circ$ ab, wobei das Inkrement 3° betrug. Die Belichtungszeit wurde mit dem reziproken Wert des Kosinus des Kippwinkels variiert. Für die Belichtungszeit bei einem Kippwinkel von 0° wurden 0,1 s gewählt.

3.5. Bildbearbeitung

3.5.1. Rekonstruktion von Kryo-Elektronentomogrammen

Die einzelnen Projektionen wurden durch manuelles Markieren der Goldmarker auf einen gemeinsamen Ursprung aligniert. Die Lokalisierung der Goldmarker erfolgte dabei mit der graphischen Benutzeroberfläche (GUI) `tom_setmark.m` des TOM Paketes (Nickell *et al.* 2005), implementiert in MATLAB (The MathWorks, Natick, MA). Die 3D Rekonstruktion der Tomogramme wurde mit dem EM-Programmpaket (Hegerl 1996) unter Verwendung der exakt gewichteten Rückprojektion durchgeführt. Die 2-fach gebinnnten Projektionen wurden in ein Volumen von $512 \times 512 \times 256$ Voxeln rekonstruiert. Für Abbildungen wurden circa 6 nm dicke XY-Schnitte der Rekonstruktion projiziert. Für die Abstandsmessung der Aktinfilamente wurde das Powerspektrum des Filamentbereiches bestimmt. Aus dem Abstand der Reflexe zum Ursprung wurde die Dicke der Filamente berechnet.

3.5.2. Detektion von Makromolekülen in Kryo-Elektronentomogrammen

Zur Lokalisierung von Makromolekülen in Kryo-Elektronentomogrammen wurde der korrelationsbasierte Mustererkennungsalgorithmus MOLMATCH verwendet, der Partikel aufgrund ihrer strukturellen Signatur erkennt (Förster 2005). Um die Rechenzeit zu verkürzen, wurde die Mustererkennung in zweifach gebinnnten Tomogrammen mit $512 \times 512 \times 256$ Voxeln und einer Pixelgröße von 1,64 nm durchgeführt. Die Referenzen wurden aus EM-Dichten oder aus atomaren Strukturen aus der *Protein Data Bank* (PDB)

generiert. Dabei wurden diese auf die Pixelgröße 1,64 nm angepasst und auf eine Auflösung von 3,5 nm (erste Nullstelle der CTF bei 2,9 nm) tiefpaßgefiltert. Weiterhin benötigte MOLMATCH jeweils ein Volumen mit einer kugelförmigen Maske, die die Proteindichte vollständig umschloss und ein Volumen, das die PSF enthielt, um den *Missing Wedge* zu berücksichtigen. Die Referenzen wurden mit der Maske multipliziert und vor der Korrelation mit der PSF gefaltet. Das Tomogramm wurde unter Verwendung von MOLMATCH mit den Referenzen korreliert. Die Eulerwinkel wurden mit einem Winkelinkrement von 10° abgetastet. Die beiden resultierenden Volumen enthielten zum einen die Korrelationskoeffizienten (CCC) von Partikeln aus dem Tomogramm mit der Referenz und die dazugehörigen Translations- und Winkelkoordinaten im Tomogramm.

3.5.3. Mittelung von Makromolekülen aus Kryo-Elektronentomogrammen

Die Analyse der Korrelationsfunktion und die Prozessierung von Einzelpartikel-Subtomogrammen wurden in MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) mit dem TOM, *av3 for TOM* und EM-Software-Paket durchgeführt (Hegerl 1996; Nickell *et al.* 2005). Die verwendeten Prozeduren des *av3 for TOM*-Paketes wurden von F. Förster entwickelt (Förster 2005; Förster *et al.* 2005). Die Extraktion der ersten 300 Maxima erfolgte mit *av3_createmotl.m*. Dabei wurde nach jedem extrahierten CCC der zugehörige Peak entsprechend der Größe der Referenz maskiert, um eine mehrfache Detektion der Partikel zu vermeiden (16 nm für das 20S Proteasom und GroEl und 25 nm für das 70S Ribosom). Für diese 300 höchsten Korrelationskoeffizienten jedes Tomogramms wurde eine Liste mit CCC-Werten, Koordinaten und den korrespondierenden Euler-Winkeln angelegt. Die Treffer wurden in der 3D Rekonstruktion dargestellt und jeder Peak visuell mit *tom_chooser.m* analysiert. Dabei wurden zunächst unspezifische Korrelationen mit zum Beispiel Gold oder Kohlefilm aussortiert.

Die Koordinaten und Orientierungen der Partikel wurden für die Rekonstruktion von Subtomogrammen von potentiellen 20S Proteasomen (88 x 88 x 88 Voxel) in voller Auflösung (0,412 nm Pixelgröße) verwendet (*av3_recparticles*). 20S Proteasomen wurden manuell durch visuelle Inspektion aller rekonstruierten Subtomogramme mit

eva_shift.inp oder automatisch aufgrund des CCC-Wertes ausgewählt. Zum Vergleich der Korrelationswerte verschiedener Tomogramme wurden die CCCs mit Hilfe der Mittelwerte der Tomogramme normalisiert.

Für die 3D Alignierung der Subtomogramme der ausgewählten Partikel wurde die iterative Prozedur av3_trans_rot_alig.m verwendet, welche den *Missing Wedge*-Effekt der Partikel berücksichtigt. Die erste Referenz für die Alignierung der einzelnen Partikel wurde durch Mittelung aller selektierten Partikel mit av3_average_exact.m generiert. Für die iterative Alignierung mit av3_trans_rot_alig.m wurden als Startparameter die initialen Translationsvektoren und Eulerwinkel der Partikel aus MOLMATCH verwendet. Die Referenz wurde in diese Orientierung des Einzelpartikels rotiert und vor der Kreuzkorrelation mit einem künstlichen *Missing Wedge* gewichtet (Parameter aus der Datensammlung). Aufgrund der Intensität des Kreuzkorrelationspeaks wurde die Orientierung des Einzelpartikels optimiert, während die Position des Peaks Auskunft über die Auswanderung gab. Die Konvergenz dieses Algorithmus wurde mit der Prozedur av3_motlanalyze.m überprüft. Einzelne Partikel wurden während der Prozedur aufgrund der Höhe ihres Korrelationspeaks ausgeschlossen (*dynamic thresholding*). Dies resultierte in einer Reduktion der automatisch selektierten Partikel auf 329 20S Proteasomen für die finale Mittelung. Um auszuschließen, dass die Referenz für MOLMATCH die Mittelung beeinflusst, wurde der Eulerwinkel ϕ , der die Symmetrieachse des 20S Proteasoms beschreibt, randomisiert. Durch die Prozedur av3_phialig.m konnte der Eulerwinkel ϕ separat aligniert werden, wobei der gesamte Winkelbereich in einem Schritt abgetastet wurde. Dies führte zu einer Zentrierung und einer verbesserten Alignierung der Partikel in weiteren Iterationen von av3_trans_rot_alig.m. Die Alignierung wurde durch wiederholtes Anwenden zur Konvergenz gebracht. Für die Darstellung der finalen Mittelung wurde die siebenfache Rotationssymmetrie herausgehoben.

Die Auflösung der gemittelten Struktur wurde mit der Fourier-Ring-Korrelation (FRK) bestimmt (Saxton und Baumeister 1982). Dazu wurden die Partikel willkürlich in zwei Gruppen aufgeteilt und aus den selektierten Partikeln zwei getrennte Mittelungen berechnet. Für die Berechnung der radialen Korrelationsfunktion wurden 14 Schalen im Fourier-Raum miteinander verglichen. Als Auflösungskriterium wurde der Wert bei

einem Fourier-Ring Korrelationskoeffizienten (FRKK) von 0,5 angenommen. Die Daten wurden nicht CTF-korrigiert, da aufgrund des geringen SNR in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen die CTF nicht genau bestimmt werden konnte.

4. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Strategie zur strukturellen Analyse von makromolekularen Proteinkomplexen entwickelt. Um auch labile Assemblierungen und transiente Interaktionspartner zu erfassen, sollte die Strukturaufklärung hierbei in einer möglichst nativen Umgebung vorgenommen werden. Deshalb sollte die Isolierung des Zielproteins vermieden werden.

Eine Kombination aus *in vitro* Proteinsynthese und KET schafft die Voraussetzungen für dieses Vorhaben. Die *in vitro* Translation erlaubt im Gegensatz zur zellulären Proteinsynthese die gezielte, heterologe Expression jedes gewünschten Zielproteins, wobei die offenen Systeme sehr viel Spielraum zur einfachen und schnellen Anpassung der Expressionsbedingungen lassen. Die KET ermöglicht die Abbildung solcher heterogenen Systeme, wobei fortgeschrittene Bildbearbeitungsmethoden zur Strukturermittlung des Zielproteins führen können.

Um diese Methode zu testen, wurden drei charakteristische, makromolekulare Komplexe, das 20S Proteasom, die Tripeptidyl-Peptidase II sowie Aktin als Modellproteine herangezogen. Die Vorgehensweise zur Erzeugung von 3D Strukturen mittlerer Auflösung ist in Abbildung 11 dargestellt. Das Zielprotein sollte zunächst in einem geeigneten zellfreien Expressionssystem synthetisiert und auf Assemblierung und Funktionalität geprüft werden. Die Strukturaufklärung des Modellproteins wurde nun ohne Reinigung im ganzen Lysat vorgenommen. Dazu wurden Kryoelektronentomogramme der Lysate aufgenommen, die Zielstruktur extrahiert und 3D gemittelt.

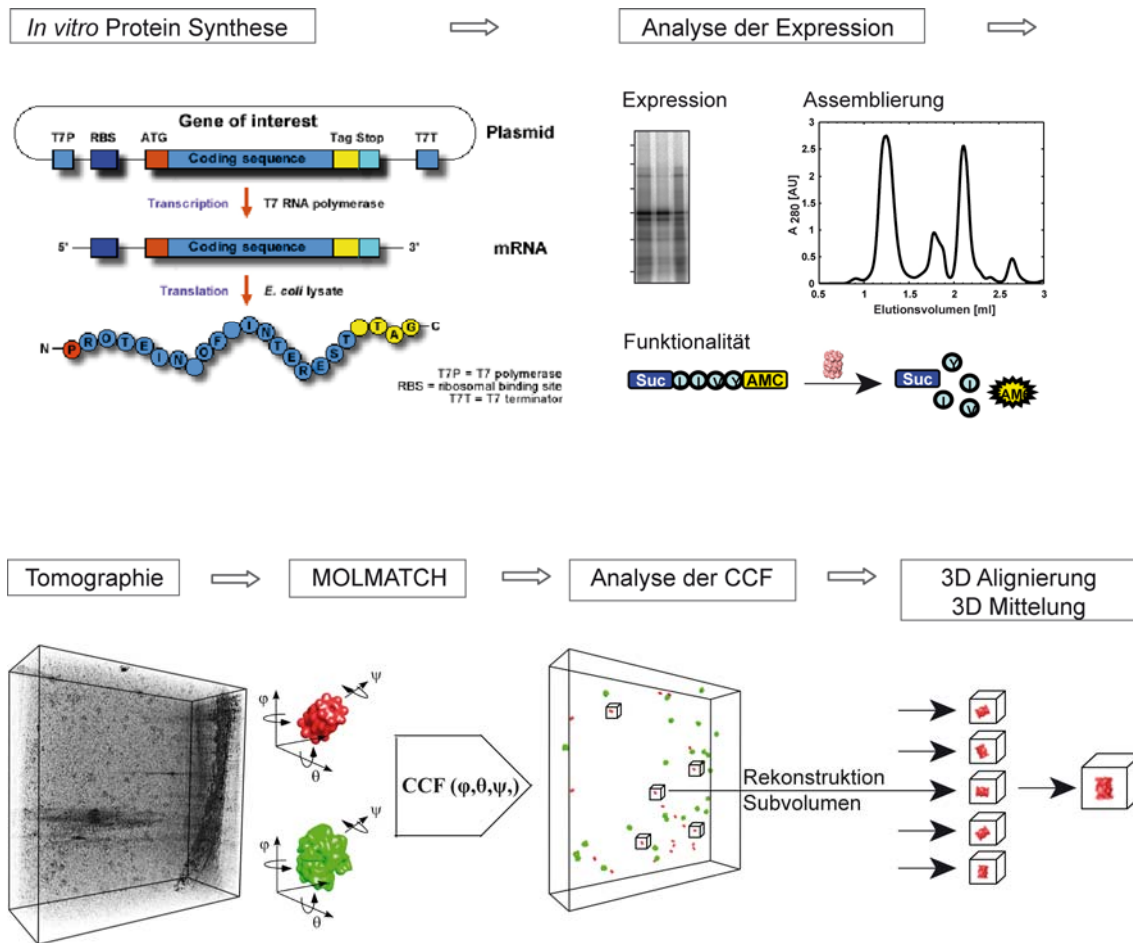


Abbildung 11: Von der *in vitro* Translation über die Tomographie zur Strukturbestimmung

Nach erfolgreicher Expression des Zielproteins musste die Assemblierung und Funktionalität überprüft werden. In Kryo-Elektronentomogrammen vollständiger Lysate wurde das Zielprotein aufgrund seiner strukturellen Signatur mit Hilfe eines korrelationsbasierten Mustererkennungsalgorithmus detektiert und lokalisiert. Zur Erzeugung einer Struktur des Zielproteins wurden Subtomogramme iterativ gemittelt (Teile der Abbildung sind dem RTS *application manual* von Roche entnommen).

4.1. *In vitro* Expression funktioneller Modellproteine

4.1.1. *In vitro* Expression des 20S Proteasoms im bakteriellen System

Das erste Modellprotein war das 20S Proteasom des mesophilen Archaeons *M. mazei*. Wie die meisten archaealen 20S Proteasom-Komplexe besteht auch das 670 kDa schwere *M. mazei* 20S Proteasom aus einer Typ α - und einer Typ β -Untereinheit, die Molekulargewichte von circa 27 kDa und circa 23 kDa besitzen (Medalia *et al.* 2006). Diese wurden von N. Medalia auf zwei verschiedenen Plasmiden mit T7 Promotor kodiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dabei folgt der β -Untereinheit ein His₆-Tag am 3'-Ende.

Um zu prüfen, ob beide Untereinheiten des *M. mazei* 20S Proteasoms *in vitro* exprimierbar sind, wurden sie zunächst im bakteriellen (EC) *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ im *batch* Format (siehe Kapitel 1.1.2) synthetisiert (Abbildung 12). Die Reaktion erfolgte in Gegenwart von radioaktiv markiertem Methionin in einem 50 μ l Ansatz für eine Stunde bei 30°C, wobei die Plasmide separat sowie koexprimiert wurden. Anschließend wurde der lösliche und unlösliche Teil der Reaktion durch Zentrifugation getrennt. Mit SDS-PAGE wurden die radioaktiv markierten Translationsprodukte bei circa 25 kDa nachgewiesen (Abbildung 12 A). Allerdings können die Untereinheiten in diesem Gelsystem nicht gut voneinander getrennt werden. Weiterhin werden bei Expression der β -Untereinheit auch kürzere Translationsprodukte gebildet, die wahrscheinlich auf alternative Start *Codons* in der Gensequenz oder unvollständige Translationen zurückzuführen sind. Durch die anschließende Quantifizierung der radioaktiven Bandenintensitäten in löslichen und unlöslichen Fraktionen nach der Koexpression der α - und β -Untereinheit zeigt sich, dass mit circa 80% der größte Teil des translatierten Proteins in löslicher Form vorliegt (Abbildung 12 B).

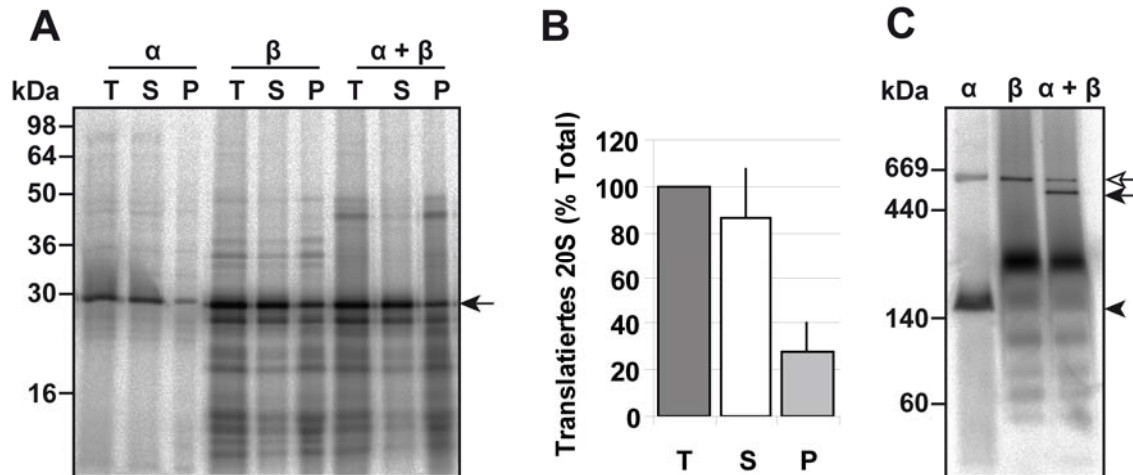


Abbildung 12: Expression des 20S Proteasoms in Gegenwart von $[^{35}\text{S}]$ -Methionin

Die proteasomalen Untereinheiten wurden im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ in Gegenwart von $[^{35}\text{S}]$ -Methionin separat und koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. [A] Das SDS-PAGE-Gel zeigt die Verteilung der beiden Untereinheiten nach Separation der Reaktion (T), des löslichen (S) und des unlöslichen (P) Teils. Pfeil: α - und β -Untereinheit. [B] Quantifizierung der Verteilung nach der Koexpression beider Untereinheiten des 20S Proteasoms durch Phosphoimaging. [C] Kontinuierliche native PAGE des löslichen Teils der korrespondierenden Lysate. Leerer Pfeil: GroEL, gefüllter Pfeil: 20S Proteasom, Pfeilspitze: α -Ringe.

Kontinuierliche native Gele zeigen bei allen Expressionen ein Signal bei circa 669 kDa (Abbildung 12 C). Dies ist auf die Anwesenheit des Chaperonins GroEL (circa 800 kDa) im bakteriellen Lysat zurückzuführen, welches die synthetisierten, ungefalteten Polypeptidketten bindet. Das radioaktive Signal existiert daher bei der SDS-PAGE von vielen Reaktionen im bakteriellen Expressionssystem.

Die separate Expression der α -Untereinheit ergibt in kontinuierlichen sowie diskontinuierlichen nativen Gelen eine Bande circa bei dem 140 kDa Markerprotein. Diese repräsentiert die Bildung von α -Einzel- und Doppel-Ringen bei der Abwesenheit der β -Untereinheiten. Auch bei der separaten Expression der β -Untereinheiten, sowie der Koexpression mit der α -Untereinheit zeigen kontinuierliche native Gele ein Signal zwischen 140 und 440 kDa. Dieses ist allerdings in diskontinuierlichen Gelen nicht vorhanden (nicht dargestellt). Weiterhin konnten keine Hinweise gefunden werden, dass die β -Untereinheiten alleine geordnete Strukturen ähnlich der α -Untereinheit

formen. Die Gründe für das Auftreten des Signals wurden daher nicht weiter untersucht.

Nur nach der Koexpression beider Plasmide zeigen die nativen Gele eine Bande zwischen der 440 kDa und der 669 kDa Markerbande unterhalb des GroEL Signals. Diese repräsentiert den assemblierten 20S Proteasom-Komplex. Im Gegenzug verschwindet das Signal der α -Ringe, die in Gegenwart der β -Untereinheit ausschließlich im Komplex integriert vorkommen.

Zur Steigerung der Konzentration und Ausbeute des 20S Proteasoms wurden alle weiteren Translationen im CECF System (siehe Kapitel 1.1.2) mit dem „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ durchgeführt (Abbildung 13). Dabei erfolgte die Proteinsynthese für 24 h in einem Volumen von 1 ml. Um die Komplexbildung nachzuweisen, sollte die proteolytische Aktivität des exprimierten 20S Proteasoms überprüft werden. Als Substrat diente das fluorogene, synthetische Tetrapeptid Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, dessen Hydrolyse durch die Messung der freigesetzten Fluoreszenz verfolgt werden kann. Die Aktivität konnte in vollständigen Lysaten nicht bestimmt werden, da das Substrat aufgrund von endogenen Proteasen der Lysate unspezifisch hydrolysiert wurde.

Um diese Problematik zu umgehen und zu zeigen, dass die synthetisierten Untereinheiten einen korrekt assemblierten, aktiven Komplex formen, wurde das 20S Proteasom über den His₆-Tag an der β -Untereinheit mit einer Ni-NTA-Säule gereinigt (Abbildung 13). Dafür wurde der lösliche Teil der Reaktion auf eine „Ni-NTA Spin Kit“-Säule aufgetragen und die gebundenen Proteine mit 500 mM Imidazol-haltigem Puffer stoßeluiert.

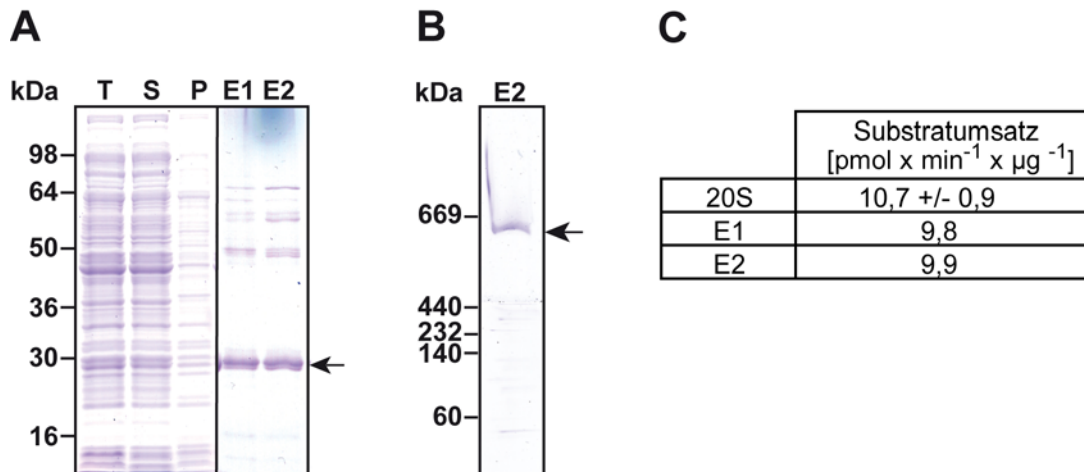


Abbildung 13: Ni-NTA Reinigung des *M. mazei* 20S Proteasoms

Die proteasomalen Untereinheiten wurden im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. Die 20S Proteasomen wurden mit einer Ni-NTA-Säule aus der löslichen Fraktion isoliert. [A] SDS-PAGE von Reaktion (T), Überstand (S) und Pellet (P) Fraktion der Lysate und den Elutionen E1 und E2 der Ni-NTA-Säule. Pfeil: α - und β -Untereinheiten. [B] Native PAGE der Elution E2. Pfeil: 20S Proteasom. [C] Hydrolyse des Peptidsubstrats Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC durch die *M. mazei* 20S Proteasomen in den Elutionen E1 und E2 der Ni-NTA-Säule. (20S) Als Kontrolle wurden verschiedene Konzentrationen gereinigter 20S Proteasomen (freundlicherweise bereitgestellt von N. Medalia) verwendet.

Abbildung 13 A zeigt die SDS-PAGE-Analyse nach Separation der Reaktion, sowie deren löslichen und unlöslichen Teils und der ersten beiden Elutionen der Ni-NTA-Säule. Das Bandenmuster unterscheidet sich vor und nach der Translation des 20S Proteasoms nicht, da das Lysat einige Proteine mit dem Molekulargewicht ähnlich der proteasomalen Untereinheiten enthält. In den Eluaten sind zwei kaum getrennte Banden von circa 25 kDa zu sehen, die die α - und β -Untereinheiten des Komplexes repräsentieren. Diese sind in den Spuren des Lysates von anderen Proteinen überdeckt. Die Elutionen zeigen allerdings weitere Banden, die noch bestehende Verunreinigungen durch Proteine des Lysates in den Fraktionen andeuten.

Nach Separation der Elution durch native Gele zeigen diese eine Bande im hochmolekularen Bereich zwischen 440 kDa und 669 kDa (Abbildung 13 B). Diese entspricht dem bereits detektierten Molekulargewicht des radioaktiv markierten 20S Proteasoms (siehe Abbildung 12 C). Außerdem migrierten *M. mazei* 20S Proteasom-Komplexe, die in *E. coli* heterolog exprimiert und anschließend gereinigt wurden auf der

gleichen Höhe (Proteasomen freundlicherweise bereitgestellt von N. Medalia, nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen für eine erfolgreiche Reinigung des *in vitro* translatierten *M. mazei* 20S Proteasom-Komplexes.

Die Intensitäten der 20S Proteasom-Banden der Eluate wurden densitometrisch quantifiziert (Abbildung 13 A) und mit gereinigtem *M. mazei* 20S Proteasomen definierter Konzentrationen verglichen (freundlicherweise bereitgestellt von N. Medalia, nicht gezeigt). Dadurch wurde die Proteinmenge der *in vitro* translatierten und durch die Ni-NTA-Säule gereinigten 20S Proteasomen bestimmt. Für die ersten beiden Elutionen ergibt sich eine Ausbeute von circa 55 µg 20S Proteasomen.

Weiterhin wurde die proteolytische Aktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt. Wie erwartet zeigt der Durchlauf aufgrund der endogenen Proteasen Aktivität, in den Waschfraktionen kann jedoch keine Aktivität mehr detektiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass die gemessenen Aktivitäten der Eluate auf die *in vitro* translatierten, korrekt assemblierten 20S Proteasom-Komplexe zurückzuführen sind. Aus den gemessenen Daten und den bestimmten 20S Proteasom-Proteinmengen in den Eluaten kann der Substratumsatz der 20S Proteasomen mit ca. $9,8 \text{ pmol} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ berechnet werden (Abbildung 13 C). Dieser wurde mit dem Substratumsatz definierter Mengen von *M. mazei* 20S Proteasomen, die aus *E. coli* gereinigt wurden, verglichen (freundlicherweise bereitgestellt von N. Medalia). Das *in vitro* exprimierte 20S Proteasom zeigt annähernd die gleiche Aktivität wie die 20S Proteasomen, die in *E. coli* Zellen heterolog exprimiert wurden. Die Abweichungen liegen im Bereich von 10% und ergeben sich aus der Summe von Messungenauigkeiten bei der Quantifizierung im Gel, allgemeinen Pipettierfehlern und eventuell dem Zerfall der Proteasomen im Laufe der Reinigung.

Um die Vollständigkeit der Assemblierung der Untereinheiten zu 20S Proteasom-Komplexen zu prüfen, wurde der lösliche Teil des Lysates nach der Translation der *M. mazei* 20S Proteasomen mit Superose 6 FPLC separiert. Alle Fraktionen wurden durch Western Blot auf die Anwesenheit der beiden Untereinheiten analysiert. Diese wurden durch spezifische Antikörper gegen die jeweilige Untereinheit nachgewiesen (freundlicherweise bereitgestellt von P. Zwickl). Abbildung 14 zeigt das

Chromatogramm der Gelfiltration und die Western Blots gegen die beiden Untereinheiten.

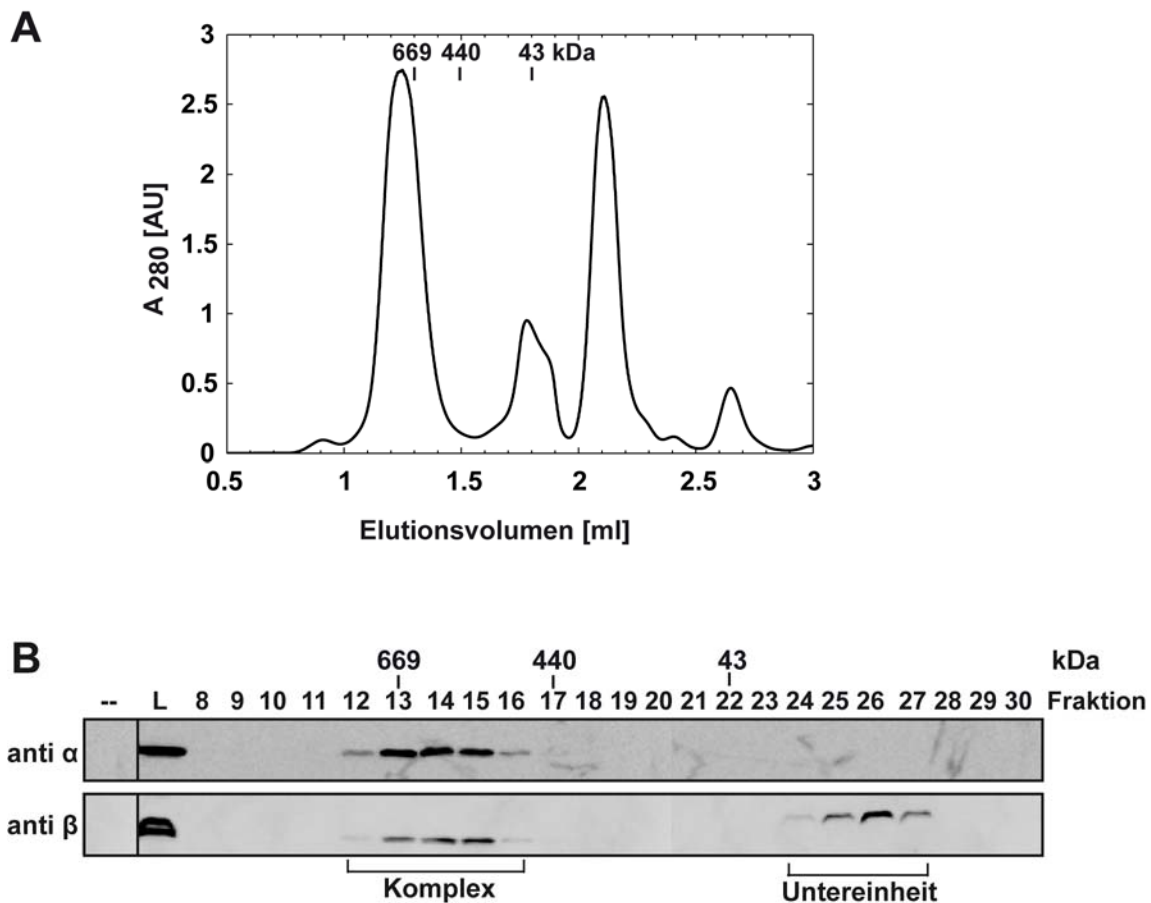


Abbildung 14: Qualitative Analyse der Assemblierung des *M. mazei* 20S Proteasoms

Die proteasomalen Untereinheiten wurden im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. Der lösliche Überstand wurde auf die Superose 6 Säule geladen. [A] Elutionsprofil der Superose 6 FPLC. [B] Western Blot-Analyse der Fraktionen mit Antikörpern gegen die α - und β -Untereinheit des 20S Proteasoms. (--) Kontrolle: Lysat vor der Translation, (L) löslicher Überstand nach der Translation, der geladen wurde.

Die α - sowie die β -Untereinheit konnten in den Immunoblots im hochmolekularen Bereich nachgewiesen werden. Nur die β -Untereinheit wurde zusätzlich im niedermolekularen Bereich detektiert, liegt also auch als freie Untereinheit vor. Die exprimierten α -Untereinheiten wurden alle in den Komplex eingebaut.

Da jede im Lysat detektierte α -Untereinheit zum 20S Proteasom-Komplex korrespondiert, kann die Menge der 20S Proteasom-Komplexe in Lysaten über Western Blot-Analyse gegen die α -Untereinheit berechnet werden. Dazu wurden die Bandenintensitäten definierter Konzentrationen von gereinigten 20S Proteasomen und des löslichen Teils des Lysates quantifiziert und verglichen. Im prokaryotischen System konnten mindestens 210 $\mu\text{g/ml}$ (285 nM) 20S Proteasom-Komplex translatiert werden (hier nicht gezeigt, siehe Kapitel 4.1.2). Die Gesamtproteinkonzentration des Reaktionsansatzes wurde quantifiziert. Sie bleibt annähernd konstant und beträgt vor und nach der Translation circa 20 mg/ml.

4.1.2. *In vitro* Expression des 20S Proteasoms im eukaryotischen System

Abhängig vom Zielprotein kann die Wahl eines eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystems entscheidend für die Produktionsausbeuten des löslichen Translationsproduktes sein. Um zu prüfen, ob die Translation des archaealen 20S Proteasoms durch die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems gesteigert werden kann, wurde ein Lysat auf der Basis von Weizenkeimen (WG) getestet. Für die Expression des 20S Proteasoms aus *M. mazei* in den eukaryotischen Lysaten wurde die Gensequenz in den entsprechenden Vektor subkloniert. Für alle Translationen wurde das „RTS 100 Wheat Germ CECF Kit“ verwendet.

Die Expression der Untereinheiten, die Assemblierung des Komplexes und dessen Aktivität wurden, wie für die Expression im prokaryotischen Lysat beschrieben, untersucht. Die radioaktiv markierten Expressionsprodukte wurden durch SDS- und native PAGE analysiert (Abbildung 15).

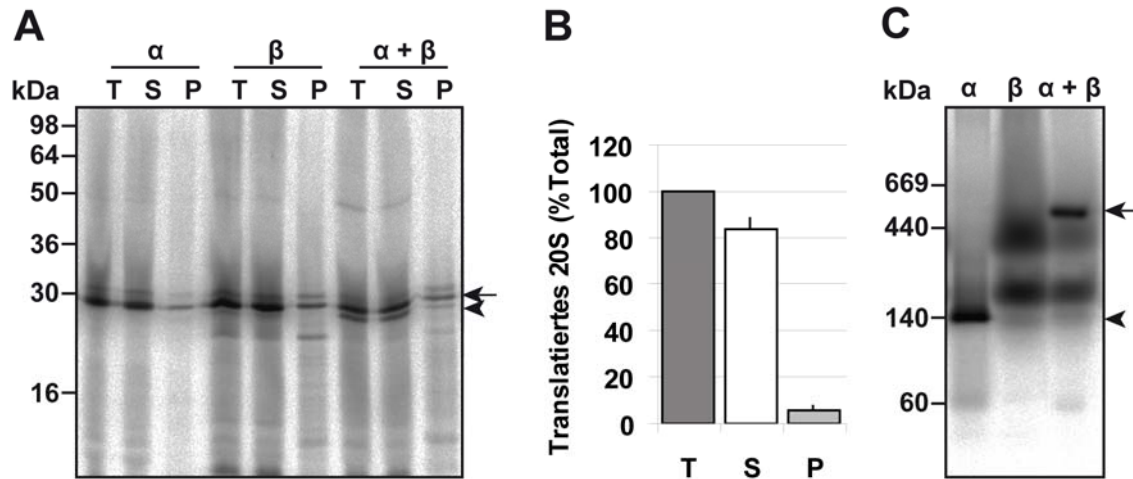


Abbildung 15: Expression des 20S Proteasoms in Gegenwart von [35S]-Methionin

Die Untereinheiten wurden im eukaryotischen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 WG CECF Kit“ in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin separat und koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. [A] Das SDS-PA-Gel zeigt die Verteilung der proteasomalen Untereinheiten nach Separation der Reaktion (T), des löslichen (S) und unlöslichen (P) Teils. Pfeil: α - und β -Untereinheit. Pfeilspitze: prozessierte β -Untereinheit [B] Quantifizierung der Verteilung nach der Koexpression beider Untereinheiten des 20S Proteasoms durch Phosphoimaging. [C] Kontinuierliche native PAGE des löslichen Teils der korrespondierenden Lysate. Pfeil: 20S Proteasom, Pfeilspitze: α -Ringe.

Die Plasmide können im eukaryotischen System ebenfalls separat und koexprimiert werden, wobei in diesem Fall der lösliche Anteil mit knapp 90% etwas höher ausfällt (Abbildung 15 A, B). Bei Koexpression der beiden Untereinheiten zeigt die SDS-PAGE eine zusätzliche Bande unterhalb der α - bzw. β -Bande. Diese könnte durch die posttranslationale Prozessierung der β -Untereinheit bei Einbau in den Komplex entstehen.

Auch bei der Expression der α -Untereinheit im eukaryotischen System erscheint in kontinuierlichen nativen Gelen eine Bande nahe dem 140 kDa Markerprotein, die die gebildeten α -Einzel- und Doppel-Ringe repräsentiert (Abbildung 15 C). Bei der Koexpression beider Untereinheiten kommt es nicht mehr zur Bildung der α -Ringe. Weiterhin zeigen die nativen Gele nach der Koexpression die Bande des 20S Proteasom-Komplexes.

Nach Reinigung des löslichen Translationsproduktes mit einer Ni-NTA-Säule kann in SDS-PA-Gelen eine Bande von ca. 25 kDa detektiert werden, die die Untereinheiten repräsentiert. Western Blot-Analysen gegen die α -Untereinheit der Fraktionen zeigen allerdings, dass der größte Teil der exprimierten α -Untereinheit nicht an die Ni-NTA-Säule bindet. Durch die Ni-NTA-Säule können demnach nur sehr geringe Mengen Komplex gereinigt werden. Dementsprechend niedrig sind auch die gemessenen proteasomalen Aktivitäten in den Eluaten (nicht gezeigt).

Nach Auftrennung des löslichen Teils der Reaktion durch Superose 6 FPLC (Abbildung 16 A) zeigen Immunoblots gegen die beiden Untereinheiten jedoch Signale im hochmolekularen Bereich (Abbildung 16 B). Demnach assembliert das translatierte Protein zu vollständigen 20S Proteasomen. Auch nach der Expression im eukaryotischen Lysat liegen keine freien α -Untereinheiten im Lysat vor.

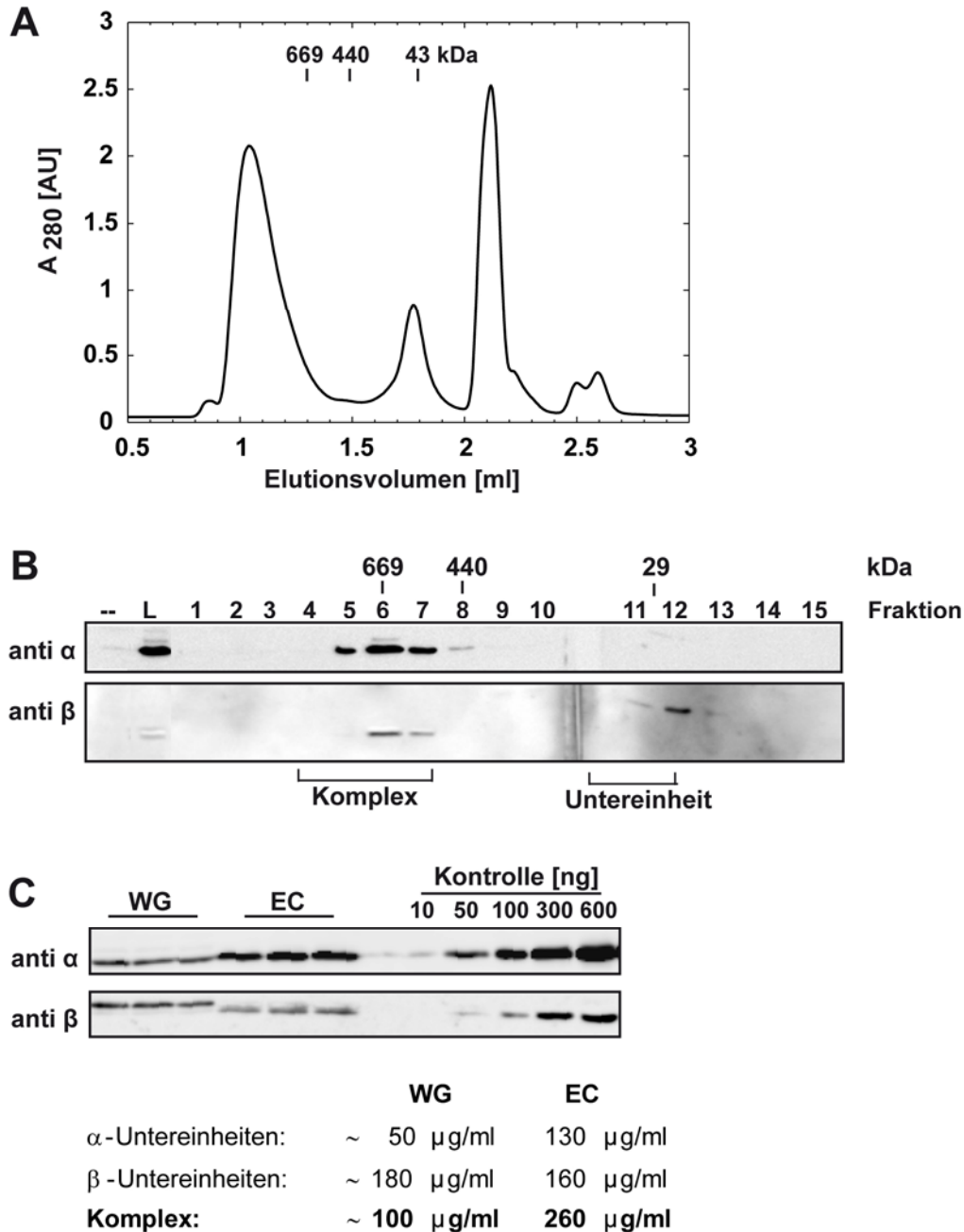


Abbildung 16: Qualitative Analyse der Assemblierung der *M. mazei* 20S Proteasomen nach Expression in WG Lysaten und quantitative Analyse der Expression der verschiedenen Lysate. (A und B) Die Untereinheiten wurden im eukaryotischen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 WG CECF Kit“ koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. Der lösliche Überstand wurde auf die Superose 6 Säule geladen. [A] Elutionsprofil der Superose 6 FPLC. [B] Western Blot-Analyse der Fraktionen mit Antikörpern gegen die α- und β-Untereinheit des 20S Proteasoms. (--) Kontrolle: Lysat vor der Translation, (L) löslicher Überstand nach der Translation, der geladen wurde. [C] Western Blot-Analyse gegen die α- und β-Untereinheit von EC und WG Gesamtlysaten nach Koexpression. Kontrolle: gereinigte 20S Proteasomen (N. Medalia). Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert und die Menge der vollständigen 20S Proteasom-Komplexe in den Lysaten berechnet.

Die Menge der exprimierten 20S Proteasom-Komplexe in den verschiedenen Lysaten kann über Western Blot-Analyse berechnet werden (Abbildung 16 C). Dafür wurden die Bandenintensitäten der verschiedenen Lysate und von gereinigten 20S Proteasomen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von N. Medalia) quantifiziert. Bei Translationen in EC Lysaten wird 260 µg/ml (380 nM) 20S Proteasom-Komplex exprimiert. Dabei variieren die Mengen je nach Translationsreaktion leicht (300 nM siehe Expression in Kapitel 4.1.1). In WG Lysaten kann nur circa 100 µg/ml vollständig assembliertes 20S Proteasom produziert werden. Es zeigt sich, dass für die Expression des archaealen *M. mazei* 20S Proteasoms das prokaryotische Expressionssystem das effizientere ist. Ein direkter Vergleich ist dennoch schwierig. Zwar wurden die Reaktionen alle im CECF Format durchgeführt, ein Unterschied bestand allerdings im Volumen der Reaktionen und der Reaktionstemperaturen. Für die Synthese im eukaryotischen System wurden sogar die vom Hersteller optimierten Vektoren verwendet. Allerdings wurden im prokaryotischen System die Expressionen von den verwendeten nicht optimierten pET bzw. pRSET Vektoren und den optimierten Vektoren verglichen. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden (nicht gezeigt). Natürlich könnten die Expressionsmengen aufgrund der Herkunft des hier exprimierten 20S Proteasoms aus Archaea höher sein. Eine eindeutige Aussage kann an dieser Stelle jedoch nicht getroffen werden.

4.1.3. Expression, Assemblierung und Visualisierung von TPP II

Als zweites Modellprotein diente die Tripeptidyl-Peptidase II (TPP II) aus *D. melanogaster*. Es handelt sich hierbei um ein Protein, dessen 150 kDa große Untereinheiten zu einem homooligomeren Komplex bestehend aus 40 Untereinheiten mit einem Gesamtmolekulargewicht von 6 MDa assemblieren. Das prokaryotische Expressionsplasmid wurde freundlicherweise von G. Seyit zur Verfügung gestellt.

Die *in vitro* Expression wurde zunächst in prokaryotischen EC Lysaten durchgeführt. Diese resultiert allerdings trotz der Verwendung des CECF Systems in einer sehr geringen Menge translatierten Proteins, von dem große Teile in unlöslichen Aggregaten vorliegen (nicht gezeigt). Die klassische Überexpression in *E. coli* Zellen führt

ausschließlich zu unlöslichem Protein in Form von *inclusion bodies*, durch Herabsetzen der Kultivierungstemperatur der Zellen kann die Ausbeute des löslichen Proteins signifikant erhöht werden (Seyit 2006; Seyit *et al.* 2006). Die Herabsetzung der Reaktionstemperatur von 30 °C auf 20 °C führt auch bei der *in vitro* Expression zu einer geringen Erhöhung des löslichen Anteils (nicht gezeigt). Weiterhin wurde die proteolytische Aktivität der Lysate vor und nach der Translation von TPP II gegenüber dem fluorogenen, synthetischen Tetrapeptid Ala-Ala-Phe-AMC bestimmt. Nach der Translation im bakteriellen Lysat können nur sehr geringe spezifische Aktivitäten für TPP II gemessen werden (Abbildung 17 C).

Um die Ausbeute des löslichen, aktiven Proteins zu erhöhen, wurde das eukaryotische Expressionssystem auf der Basis von Weizenkeimen herangezogen. Die Gensequenz wurde in den entsprechenden eukaryotischen Vektor subkloniert und die Expression im eukaryotischen „RTS 100 Wheat Germ CECF Kit“ durchgeführt.

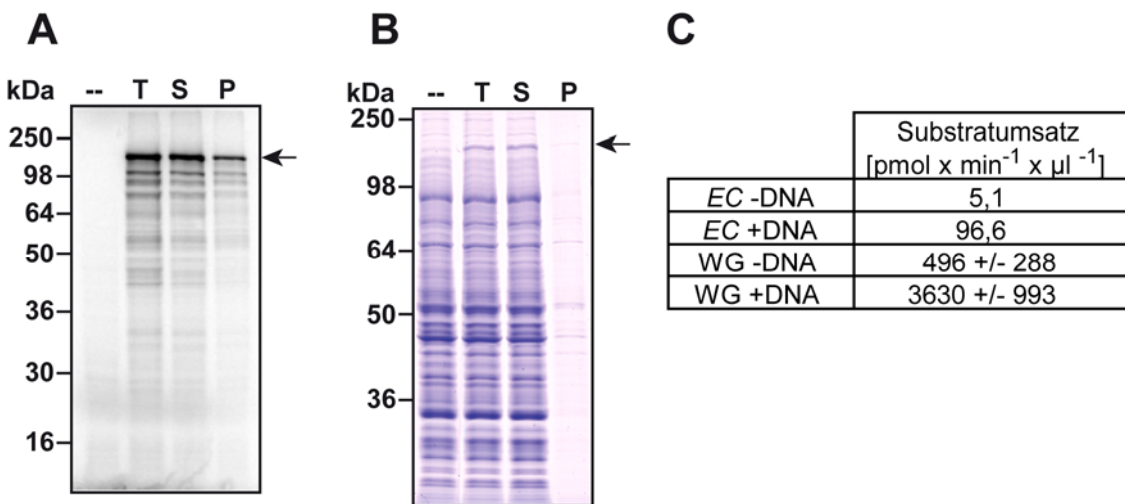


Abbildung 17: Expression von TPP II im eukaryotischen Lysat

TPP II wurde im eukaryotischen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 WG CECF Kit“ in Gegenwart [A] und Abwesenheit [B] von ^{35}S -Methionin exprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. [A] SDS-PAGE zeigt die Verteilung von TPP II in Reaktion (T), Überstand (S) und Pellet (P) Fraktionen nach Translation in Gegenwart von ^{35}S -Methionin. (--) Kontrolle: Reaktion ohne DNA [B] Zu A korrespondierendes Coomassie gefärbtes SDS-PA Gel. [C] Hydrolyse des Peptidsubstrats Ala-Ala-Phe-AMC durch TPP II, das in EC und WG Lysaten translatiert wurden, bzw. endogen vorhanden war. Die Aktivitäten wurden in den löslichen Teilen der Lysate bestimmt.

Um zu prüfen, ob die relativ große Untereinheit vollständig *in vitro* exprimierbar ist, erfolgte die Reaktion zunächst in Gegenwart von radioaktiv markiertem Methionin in einem 50 µl Ansatz für eine Stunde bei 20°C. Nach der Separation der Lysate durch SDS-PAGE zeigt sich nach der Expression eine deutliche Bande zwischen 98 kDa und 250 kDa (Abbildung 17 A), die die 150 kDa großen, radioaktiv markierten Untereinheiten repräsentiert. Allerdings werden auch kürzere Translationsprodukte gebildet, die wahrscheinlich auf alternative Start-Codons in der Gensequenz oder auf unvollständige Translation zurückzuführen sind. Weiterhin liegt circa 90% des synthetisierten Proteins in löslicher Form vor.

Die Menge der translatierten Untereinheit kann durch die Verwendung des eukaryotischen Expressionssystems so stark gesteigert werden, dass die Überexpressionsbande bereits beim vollständigen Lysat durch Coomassie Färbung der Gele zwischen 98 kDa und 250 kDa sichtbar wird (Abbildung 17 B). Die Proteinkonzentration des eukaryotischen Reaktionsansatzes bleibt während der Translation dennoch annähernd konstant und beträgt circa 20 mg/ml. Im Gegensatz zur Expression des archaealen 20S Proteasoms, hat im Falle des eukaryotischen TPP II die Wahl des passenden eukaryotischen Lysates massive Auswirkungen auf die Expressionsmenge und die Löslichkeit des Proteins.

Nach der Translation zeigen die Lysate spezifische proteolytische Aktivitäten gegenüber Ala-Ala-Phe-AMC, die vor allem auf das translatierte Protein zurückzuführen sind (Abbildung 17 C). Allerdings besitzt das WG Lysat auch geringe endogene Aktivität, die in nicht translatierenden Lysaten nachgewiesen werden kann. Verglichen mit den gemessenen Aktivitäten der EC Lysate nach der Translation von TPP II zeigen die WG Lysate nach der Translation eine mindestens 35-fach höhere Aktivität. Über die spezifische Aktivität von TPP II kann die Menge des translatierten TPP II der WG Reaktion grob abgeschätzt werden. Vollständig assemblierte TPP II Spindeln besitzen eine spezifische Aktivität von $6.576 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$, die Aktivität der Tetramere liegt bei 54% der Spindelaktivität (Seyit 2006). Nimmt man für das translatierte TPP II eine Spindelform an, ergibt sich dabei eine Menge von 50 µg/ml im WG Lysat; geht man von Tetrameren aus, so errechnet sich die doppelte Menge. Damit konnte die kritische

Konzentration für die Spindelformierung des *D. melanogaster* TPP II von 0,03 mg/ml erreicht werden (Seyit *et al.* 2006).

Trotzdem konnte an dieser Stelle kein Rückschluss auf den Assemblierungszustand des exprimierten Proteins gezogen werden, da TPP II bereits in der Form eines Dimers geringe Aktivität besitzt (Seyit *et al.* 2006). Daher wurde der lösliche Teil der WG Reaktion durch Superose 6 FPLC nach Größe aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen per Western Blot und Aktivitätstest analysiert. Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm der Gelfiltration und die Western Blots und Aktivitätsmessungen der einzelnen Fraktionen. TPP II kann mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (freundlicherweise von J. Peters bereitgestellt) in allen Fraktionen detektiert werden und bildet daher sehr wahrscheinlich verschiedene oligomere Formen. Dabei zeigen die Fraktionen mit Molekulargewichten von mehr als 1 MDa die höchsten proteolytischen Aktivitäten. Wie oben erwähnt besitzt bereits das Tetramer mit circa 600 kDa 54% der spezifischen Aktivität, beim Hexamer mit 900 kDa erhöht sich dieser Wert auf 69%. Für die Fraktionen größer als 669 kDa wurden daher über die gemessenen Aktivitäten und die spezifische Aktivität der vollassemblierten Spindel die Konzentration von TPP II in den Fraktionen approximiert. In den Fraktionen vier und fünf liegen demnach circa 10 µg/ml bzw. 7 µg/ml TPP II in Form von Spindeln vor.

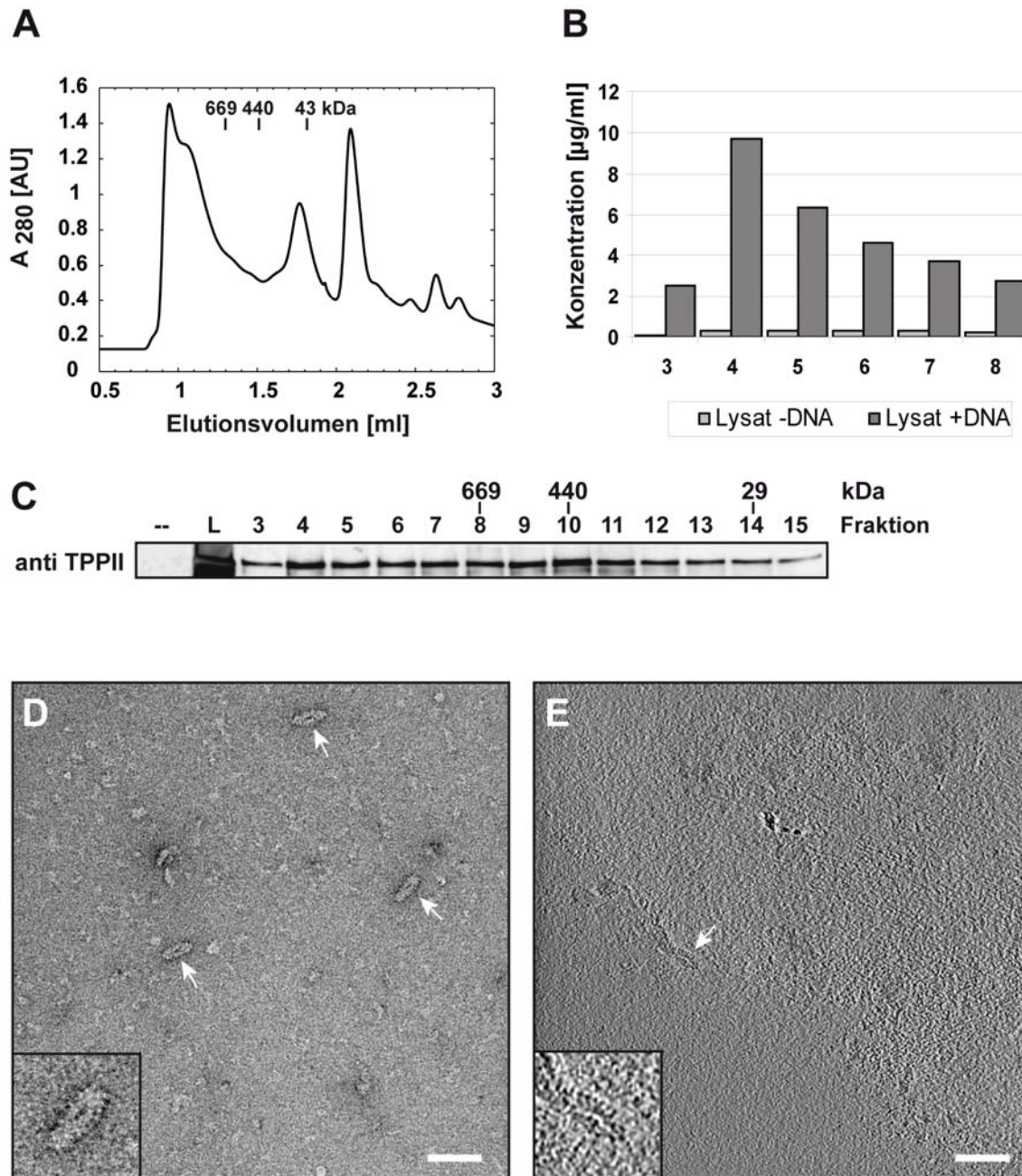


Abbildung 18: Assemblierung von TPP II

TPP II wurde im eukaryotischen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 WG CECF Kit“ exprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. Der lösliche Teil wurde auf die Superose 6 Säule geladen. [A] Superose 6 FPLC Elutionsprofil. [B] Aus den Aktivitäten berechnete Konzentrationen von TPP II in den Fraktionen. [C] Western Blot der Fraktionen. (–) Kontrolle: Lysat vor der Translation. (L) löslicher Überstand nach der Translation. [D] Mikrograph von Fraktion 5 nach Negativkontrastierung. [E] 2 nm dicker XY-Schnitt aus einem rekonstruierten Kryo-Tomogramm der Fraktion 5. Maßstab entspricht 100 nm. Pfeile: TPP II Spindeln. Inset: vergrößerte Partikel.

In Kryo-Elektronentomogrammen von unfraktionierten eukaryotischen Lysaten sind nach der Translation von TPP II hauptsächlich 80S Ribosomen zu sehen (nicht gezeigt). Neben den Ribosomen kommen einige wenige größere Assemblierungen vor, die wahrscheinlich oligomere Formen wie Tetramere oder Oktamere des TPP II repräsentieren. Leider können keine vollständig assemblierten TPP II Spindeln gefunden werden. Daher wurden zusätzlich die Fraktionen höchster Aktivität der Gelfiltrationssäule durch Elektronenmikroskopie nach Negativkontrastierung und KET analysiert. In Abbildung 18 D und E sind nach beiden Präparationsverfahren deutlich vollassemblierte TPP II Spindeln zu sehen. Durch Addition von *crowding* Reagenzien wie PEG 1000 wurde versucht, die Assemblierung der Spindel zu forcieren. Die vollständigen Lysate wurden anschließend negativ kontrastiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei kann eine geringe Anzahl von Spindeln gefunden werden (nicht gezeigt). Diese Menge ist allerdings sehr wahrscheinlich ebenfalls nicht ausreichend, um Spindeln in Kryo-Elektronentomogrammen vollständiger Lysaten zu detektieren.

Das eukaryotische Protein TPP II mit 150 kDa großen Untereinheiten und einem Gesamtmolekulargewicht von 6 MDa kann demnach erfolgreich *in vitro* exprimiert werden. Die Untereinheiten assemblieren anschließend in verschiedene oligomere Formen sowie in die hocholigomere vollaktive Spindelform. Zur Strukturaufklärung durch Mittelung von TPP II Komplexen wären aufgrund der geringen Anzahl der Spindeln pro Tomogramm sehr viele Tomogramme notwendig, um auf eine ausreichende Menge Partikel für eine 3D Mittelung zu kommen.

4.1.4. Visualisierung von Aktin

Murines Aktin wurde wie in Stemp *et al.* beschrieben im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ in Gegenwart des Chaperonins TRiC exprimiert (Stemp *et al.* 2005). Die Supplementierung des prokaryotischen Lysates mit TRiC führte zur Faltung und damit zur Produktion von nativem, löslichen G-Aktin in Mengen, die über der kritischen G-Aktin Konzentration lagen. Aufgrund der physiologischen Salzkonzentrationen im Lysat ist das Gleichgewicht zwischen

Aktinmonomer und Aktinfilament zugunsten von F-Aktin verschoben (Pardee und Spudich 1982). Die Polymerisierung des nativen G-Aktins zu filamentösem F-Aktin wurde durch Rhodamin-Phalloidin-Färbung überprüft (Stemp *et al.* 2005).

Kryo-Elektronenmikroskopieaufnahmen des löslichen Teils von EC Lysaten nach der Expression von murinem Aktin in Gegenwart von TRiC zeigen eindeutig filamentöse Strukturen, die in Kontrolllysaten (ohne DNA) nicht auftreten. Diese Filamente formten sehr unterschiedlich lange, meist dickere Bündel, die aufgrund ihres Umfangs sogar teilweise für die Tomographie ungeeignet waren (nicht gezeigt). Auch in der intakten Zelle existiert Aktin selten als einzelnes Filament, sondern assoziiert in dickere Bündel, die das Zytoskelett bilden (Medalia *et al.* 2002). Der Assemblierungsprozess der negativ geladenen Filamente in Bündel kann *in vitro* selbständig aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit multivalenten Kationen oder speziellen Proteinen wie zum Beispiel Fascin geschehen (Stokes und DeRosier 1991; Kwon *et al.* 2006). Die Regulierung des konstanten Auf- und Abbaus geschieht in der Zelle durch spezifische, Aktin-bindende Proteine, die mit den Filamenten interagieren, aber im prokaryotischen Lysat nicht vorhanden sind. Dies erklärt möglicherweise die unkontrollierte Aggregation der Aktinfilamente und das Auftreten der unterschiedlich dicken Bündel in den Lysaten.

Die Übersichtsprojektion in Abbildung 19 zeigt zwei nebeneinander liegende, mit circa 50 nm Durchmesser vergleichsweise dünne und sehr lange Bündel. Im XY-Schnitt des Tomogramms sind die einzelnen Filamente in den Bündeln gut zu erkennen.

Der Abstand der Reflexe des Powerspektrums des Filamentbereiches wurde mit 8,1 nm berechnet (Abbildung 19 B). Dieser Wert korreliert sehr gut mit dem bekannten Helixdurchmesser von 7-9 nm für Aktinfilamente (Holmes *et al.* 1990). Die Aktinuntereinheiten in den Filamentbündeln konnten mit Hilfe des Mustererkennungsalgorithmus MOLMATCH lokalisiert werden. Als Referenz diente eine periodische Einheit, die wie von Holmes *et al.* beschrieben aus der Kristallstruktur des monomeren G-Aktins erzeugt wurde (Holmes *et al.* 2003). Die Referenz besteht aus 13 Monomeren und entspricht damit einer halben helikalen Drehung. Diese Referenz wurde mit dem Teil des Tomogramms korreliert, das die Bündel beinhaltete. Die Maxima der *local constrained correlation function* (LCCF) der Kryo-Elektronentomogramme mit der Referenz wurden im Tomogramm visuell dargestellt.

Die detektierten Aktinuntereinheiten waren überwiegend entlang des Filamentbündels orientiert.

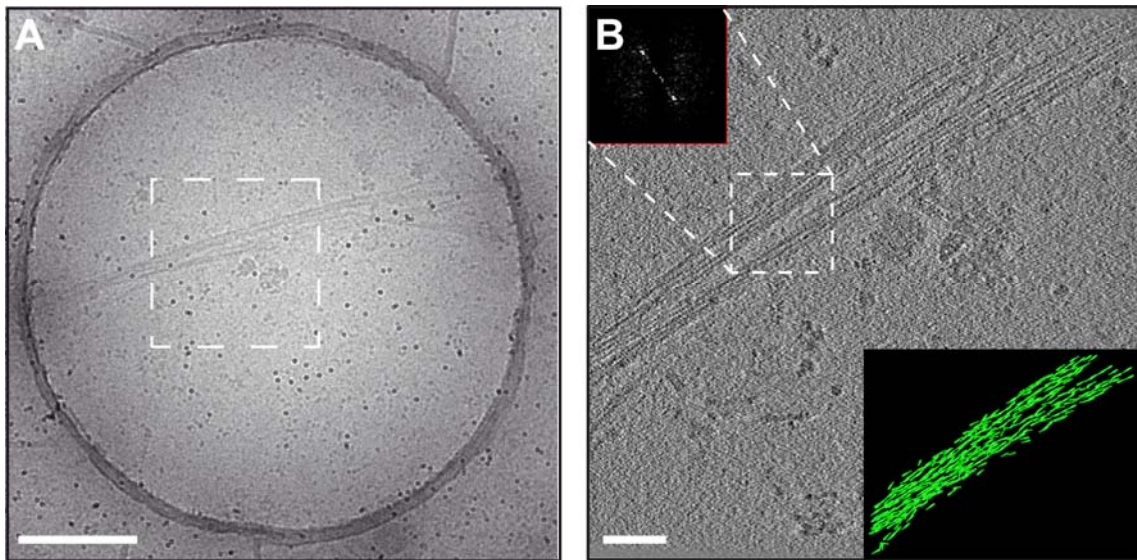


Abbildung 19: Tomographie von Aktin exprimierenden Lysaten

Murines Aktin wurde wie in Stemp *et al.* beschrieben im bakteriellen „RTS 100 E. coli HY Kit“ in Anwesenheit des Chaperonins TRiC exprimiert (Stemp *et al.* 2005). Der lösliche Teil der Lysate wurde vitrifiziert und durch Kryo-EM bzw. KET analysiert. [A] 2D Übersichtsaufnahme der gefundenen Filamente. Der Maßstab entspricht 500 nm. Das Tomogramm wurde in dem markierten Bereich aufgenommen. [B] XY-Schnitt aus dem rekonstruierten Tomogramm, das zwei Aktinbündel zeigt. Der Maßstab entspricht 100 nm. Inset oben: Powerspektrum für die eingekreiste Box. Inset unten: Die Filamente wurden visualisiert, indem die durch MOLMATCH gefundenen Maxima der LCCF durch die Referenz ersetzt wurden.

Die Tatsache, *in vitro* native Aktin Filamentbündel zu exprimieren und in Tomogrammen von heterogenen Lysaten periodische Einheiten von wenigen Nanometern zu identifizieren, ermöglicht weiterführende strukturelle Studien. Dazu könnte das Lysat sehr einfach mit exogenen Faktoren, wie zum Beispiel Aktinbindenden Proteinen, supplementiert und deren Auswirkung auf die Filamentbildung untersucht werden.

4.2. Lokalisierung des 20S Proteasoms in Tomogrammen von Lysaten

Die strukturellen Studien des 20S Proteasoms des mesophilen Archaeons *M. mazei* wurden in EC Lysaten durchgeführt. Dies hatte vor allem zwei Gründe. Das *E. coli* Homolog des 20S Proteasoms unterscheidet sich strukturell deutlich von den archaealen 20S Proteasomen (Wang *et al.* 2001; Zwickl *et al.* 2002). Weiterhin wurden bei der *in vitro* Expression in EC Lysaten höhere Konzentrationen des 20S Proteasoms aus *M. mazei* erreicht (siehe Kapitel 4.1.2).

Es wurden Kryo-Elektronentomogramme von EC Lysaten vor und nach der Expression von *M. mazei* 20S Proteasomen aufgenommen. Um die makromolekularen Komplexen in Kryo-Elektronentomogrammen eindeutig erkennen zu können, wurde der Reaktionsansatz nach Expression des 20S Proteasoms 1:2 verdünnt eingesetzt.

Abbildung 20 zeigt die null Grad Projektion (A) und ein XY-Schnitt (B) eines typischen Tomogramms. Während in der Projektion trotz der geringen Eisdicke von circa 100 nm keine Strukturen zu erkennen sind, werden in Tomogrammen von Lysaten die makromolekularen Komplexe deutlich sichtbar. In Tomogrammen von nicht-translatierenden Lysaten sind vor allem globuläre Strukturen zu sehen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die 70S Ribosomen repräsentieren (nicht gezeigt). In Tomogrammen, die von Lysaten nach der Expression von 20S Proteasomen aufgenommen wurden, sind zusätzlich tonnenförmige Partikel zu erkennen, die in der Negativkontrolle (Lysate ohne DNA) nicht detektiert wurden (Abbildung 20 B). Weiterhin zeigen die Tomogramme der Lysate extrem viele kleine unidentifizierbare Partikel.

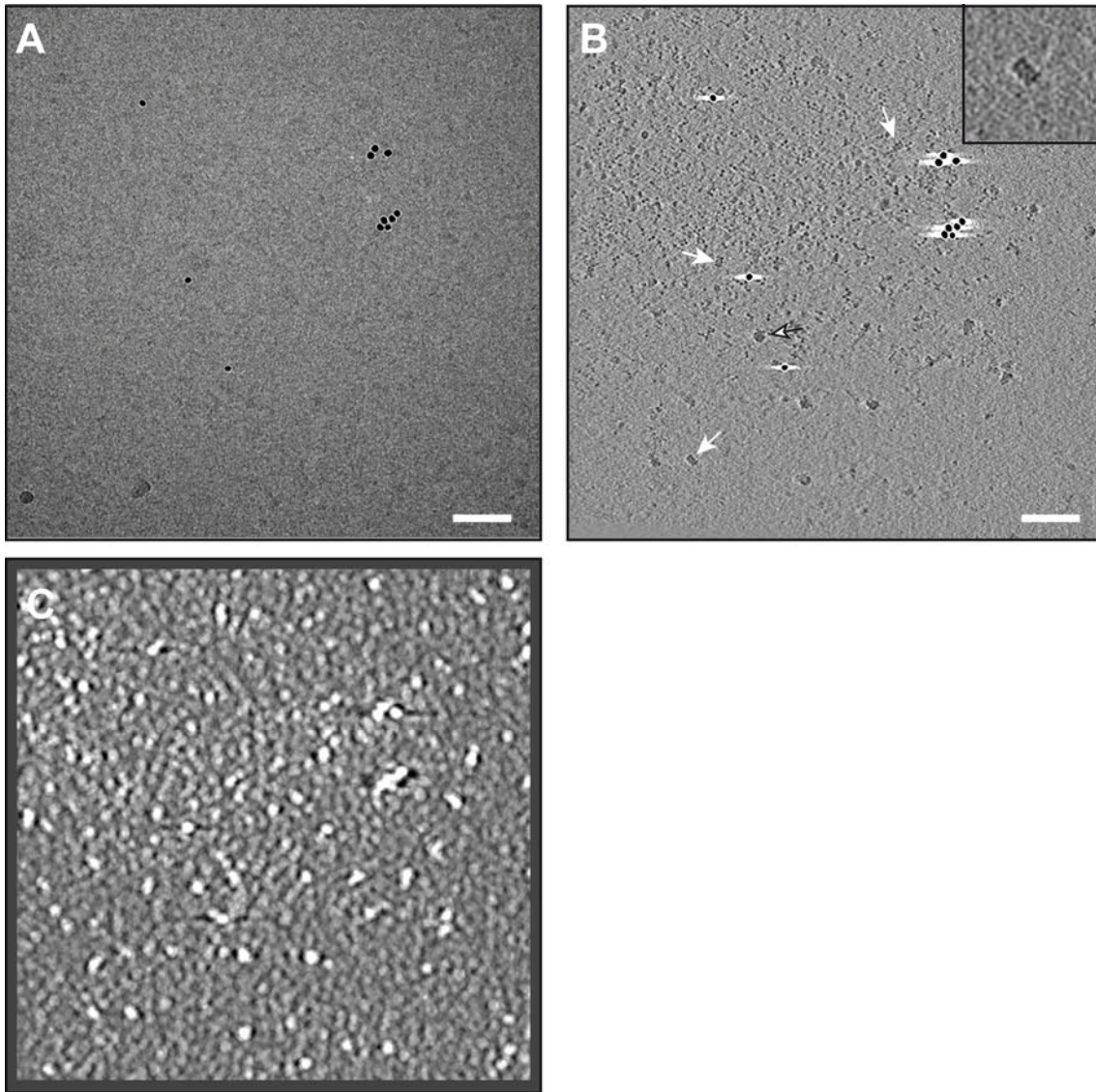


Abbildung 20: Tomographie von Lysaten nach der Expression des 20S Proteasoms aus *M. mazei*

Die proteasomalen Untereinheiten wurden im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ koexprimiert. Der lösliche Teil der Reaktion wurde vitrifiziert und tomographiert. [A] TEM Bild von EC Lysat (0° Projektion). [B] 6 nm dicker XY-Schnitt aus dem rekonstruierten Tomogramm. 20S Proteasomen sind mit weißen Pfeilen, ein 70S Ribosom mit einem schwarzweißen Pfeil gekennzeichnet. Der Maßstab entspricht 100 nm. Inset: vergrößertes 20S Proteasom. [C] Korrespondierender XY-Schnitt durch das maskierte LCCF-Volumen für das 20S Proteasom.

Für die objektive Lokalisation des heterolog exprimierten 20S Proteasoms in den Kryoelektronentomogrammen wurde der Mustererkennungsalgorithmus MOLMATCH verwendet. Die Referenz für das 20S Proteasom wurde aus der Kristallstruktur aus *T. acidophilum* erzeugt (Löwe *et al.* 1995). Es wurde die LCCF von Kryoelektronentomogrammen und der Referenz berechnet (Abbildung C) und jeweils die ersten 300 Maxima visuell inspiziert. Kontrastreiche Strukturen wie z. B. die Goldmarker korrelierten aufgrund ihrer hohen Dichte und ähnlichen Größe ebenfalls mit der Referenzstruktur und wurden manuell gelöscht.

Zur Diskriminierung von falsch positiven Partikeln wurden die Korrelationsfunktionen analysiert. Die CCCs wurden als Histogramm aufgetragen (Abbildung 21 A). Idealerweise würde man eine Gauß-Verteilung hoher CCC erwarten, die oberhalb eines Hintergrunds von unspezifischen Detektionen liegt. Bei allen ausgewerteten Tomogrammen trat eine Überlagerung von unspezifischen mit korrekten Detektionen auf. Das Problem lag in der Heterogenität der Lysate und damit der unspezifischen Korrelation mit der Referenz, wobei die Anzahl von Korrelationsmaxima mit niedrigem CCC stieg. Als Konsequenz zeigte die Verteilung der CCCs nun eine Kurve, bei der eine Gauß-Verteilung nicht eindeutig erkennbar war. Damit wurde eine Auswahl korrekter 20S Proteasom Partikel aufgrund ihrer CCC als einziges Kriterium schwierig.

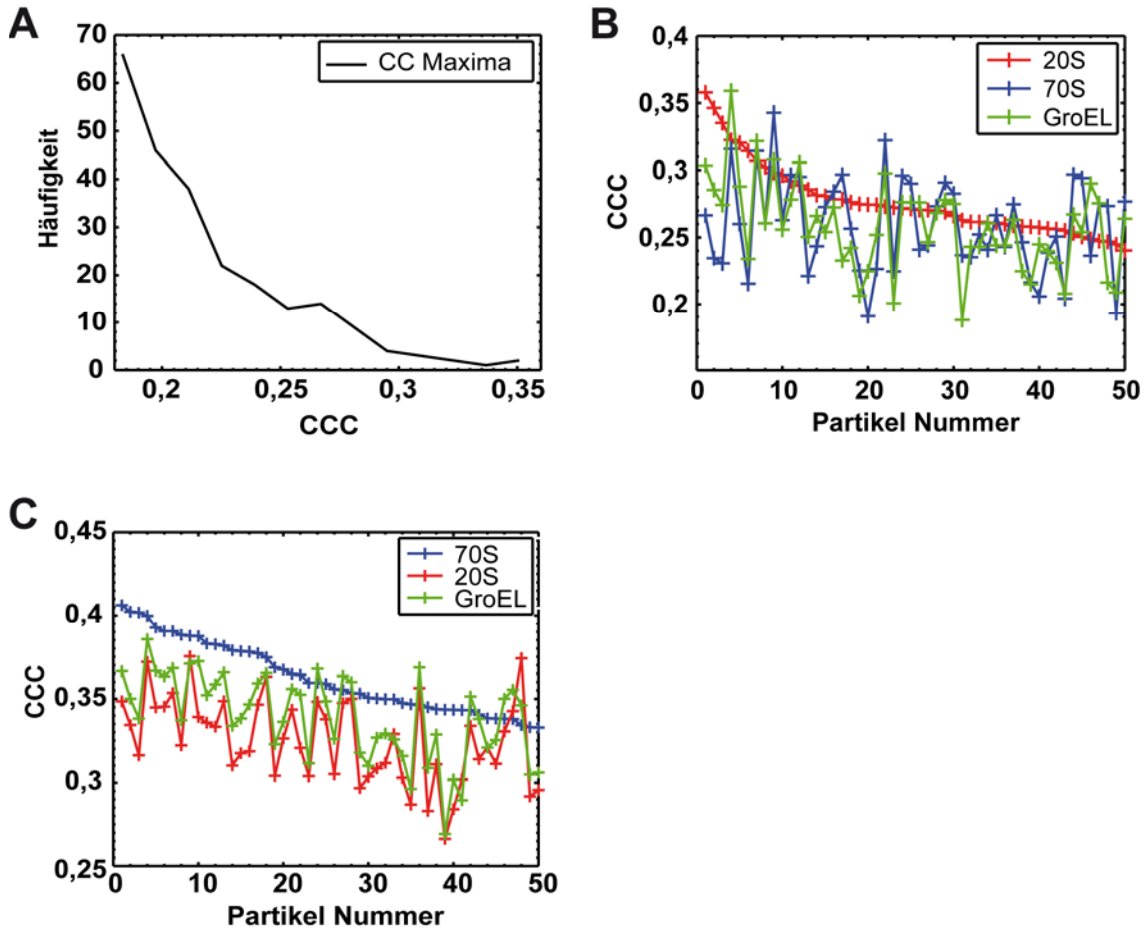


Abbildung 21: Korrelation verschiedener Referenzen mit Tomogrammen

[A] Histogramm der Korrelationskoeffizienten der 20S Proteasom-Referenz mit einem Tomogramm von EC Lysat nach der Translation des 20S Proteasoms. [B] CCC der ersten 50 Maxima der LCCF des Tomogramms 20S Proteasomen exprimierender Lysate mit der 20S Proteasom-Referenz (rot). Diese werden mit den örtlich korrespondierenden CCCs der beiden anderen Referenzen verglichen. [C] CCC der ersten 50 Maxima der LCCF des Tomogramms nicht exprimierender Lysate mit der 70S Ribosom Referenz werden mit den örtlich korrespondierenden CCCs der beiden anderen Referenzen verglichen.

Um die Wahrscheinlichkeit korrekt positive 20S Proteasomen zu selektieren, zu erhöhen, wurde zusätzlich nach 70S Ribosomen als dominante Spezies und dem endogenen, dem 20S Proteasom strukturell ähnlichen Chaperonin GroEL gesucht (Gabashvili *et al.* 2000; Ranson *et al.* 2001). Nun wurden die LCCFs dieser verschiedenen Referenzen mit den Tomogrammen analysiert. Es stellt sich heraus, dass die meisten Partikel eines Tomogramms mit allen drei Referenzen detektiert werden, allerdings mit unterschiedlich hohen CCCs. Die abgeschätzte Anzahl der als 20S Proteasom in Frage

kommenden Partikel beträgt pro Tomogramm 50. Deshalb wurden die ersten 50 Maxima der LCCF für das Proteasom und die örtlich korrespondierenden Maxima der LCCF für das 70S Ribosom und GroEL bezüglich ihrer CCCs verglichen (Abbildung 21 B). Es zeigt sich, dass abhängig vom Tomogramm, zwischen 60% und 70% dieser Maxima für die Korrelation mit der 20S Proteasom-Referenz den höheren CCC haben. Die visuelle Inspektion dieser Partikel bestätigt, dass es sich bei diesen nicht um 70S Ribosomen handelt. Jedoch ist es schwierig, aufgrund dieser subjektiven Betrachtung zu entscheiden, ob es sich bei den ausgewählten Partikeln nicht um das strukturell ähnliche Chaperonin GroEL handelt. Allerdings sind die prokaryotischen Chaperone im Gegensatz zur *in vivo* Situation in den verwendeten Lysaten stark unterrepräsentiert. So beträgt die Konzentration des Chaperonins GroEL im Lysat circa 0,1 μM bzw. 0,03 μM im finalen Reaktionsansatz für die *in vitro* Translation (Agashe *et al.* 2004; Stemp 2007). Die Menge des exprimierten 20S Proteasoms in der Reaktion liegt mit mindestens 0,3 μM 10-fach über der Menge von GroEL (siehe Kapitel 4.1.2). Demnach handelt es sich bei den mit der 20S Proteasom-Referenz korrelierenden Partikeln mit höherer Wahrscheinlichkeit um 20S Proteasomen als um das bei mittlerer Auflösung strukturell ähnliche GroEL.

Weiterhin wurden Tomogramme von nicht translatierenden Lysaten mit den drei Referenzen korreliert und die CCCs verglichen (Abbildung 21 C). Die Korrelationsmaxima, die mit allen drei Referenzen identifiziert wurden, haben die gleichen Koordinaten. Demnach können die Partikel im Tomogramm auch in diesem Fall mit allen verwendeten Referenzen lokalisiert werden. Jedoch sind wie erwartet die CCCs der meisten Maxima für die 70S Ribosom-Referenz höher als für die anderen beiden Referenzen. Dies bestätigt das Ergebnis der visuellen Inspektion der Tomogramme, dass die 70S Ribosomen die dominierende Spezies dieser Lysate sind. Von den ersten 50 Maxima der 70S Korrelationsfunktion haben 90% höhere CCCs zum 70S Ribosom als zu den anderen beiden Referenzen (Abbildung 21 C). Die verbleibenden Maxima haben keinen signifikant höheren CCC zur GroEL-Referenz. Nur von zwei Maxima sind die CCCs zur 20S Proteasom-Referenz, als auch zur GroEL-Referenz höher, was in der strukturellen Ähnlichkeit der Komplexe begründet liegt. Berücksichtigt man des Weiteren, dass 20S Proteasomen exprimierende Lysate, im

Gegensatz zu nicht translatisierenden Lysaten für die Tomographie 1:2 verdünnt wurden, ist die mit 0.03 μM ohnehin schon geringe Menge von GroEL im Tomogramm vernachlässigbar.

4.3. Struktur des 20S Proteasoms aus *M. mazei*

Die Lokalisierung und Detektion der 20S Proteasomen in Kryoelektronentomogrammen von EC Lysaten nach der Translation mit MOLMATCH wurde wie oben beschrieben auf 11 Tomogramme angewendet. Um mit dem Problem der unspezifischen Korrelation der Partikel in heterogenen Proben mit der Referenz umzugehen, wurden zwei alternative Strategien für die Selektion der 20S Proteasomen angewendet.

Für einen eher subjektiven Ansatz wurden Subvolumen der Tomogramme der ersten 300 Maxima der LCCF, die jeweils ein Partikel enthielten, mit voller Auflösung rekonstruiert. Die Partikel wurden visuell inspiziert wobei 306 20S Proteasomen eindeutig identifiziert und manuell ausgewählt wurden (Abbildung 22). Dabei konnten auch Partikel mit niedrigem CCC als 20S Proteasom identifiziert werden, eine Auswahl ist in Abbildung 22 B dargestellt. Die tatsächliche Anzahl von 20S Proteasomen ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit unterrepräsentiert, da die Partikel durch den *Missing Wedge* verzerrt und daher abhängig von der Orientierung im Tomogramm schwer zu erkennen sind. Obwohl 20S Proteasomen visuell nur schwierig von dem strukturell ähnlichen Chaperonin GroEL unterschieden werden können, kann man aufgrund der vernachlässigbaren Mengen des endogenen Proteins davon ausgehen, dass es sich bei den ausgewählten Partikeln mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um GroEL handelt. Dies trifft ebenfalls für die zweite Strategie zu, Partikel ausschließlich aufgrund der Höhe ihrer CCCs auszuwählen. Bei der Wahl des Grenzwertes müssen die unterschiedlichen SNRs der Tomogramme berücksichtigt werden. Um die CCCs der verschiedenen Tomogramme vergleichen zu können, wurden sie deshalb auf den jeweiligen CCC Mittelwert des Tomogramms normalisiert. Es wurden 429 Partikel ausgewählt, deren normalisierter Koeffizient oberhalb von 1,1 lag (Abbildung 22 A).

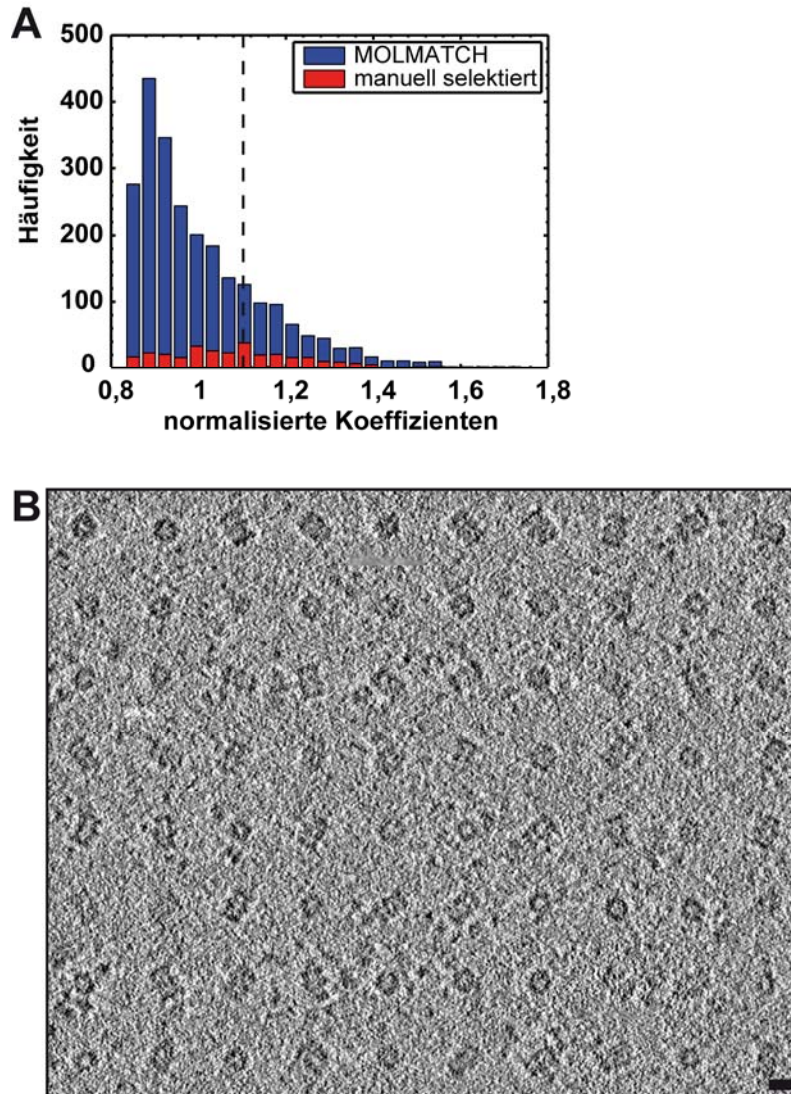


Abbildung 22: Auswahl von 20S Proteasomen aus Kryo-Elektronentomogrammen

[A] Histogramm der normalisierten Koeffizienten der 20S Proteasom-Referenz aus 11 Tomogrammen von EC Lysaten nach der Translation des 20S Proteasoms (blaue Balken). Es sind die Häufigkeiten gegen die normalisierten Koeffizienten aufgetragen. In rot sind die manuell selektierten Partikel dargestellt (Strategie 1). Die gestrichelte Linie stellt den *threshold* für die automatische Selektion dar (Strategie 2). [B] Galerie von XY-Schnitten aus verschiedenen Tomogrammen, die 20S Proteasomen in Aufsicht und von der Seite zeigen. Die Auswahl wurde manuell getroffen (Strategie 1). Maßstab 12 nm.

Um nochmals zu prüfen, ob es sich bei den selektierten Partikeln um 20S Proteasomen handelt, wurden Tests durchgeführt, die die Ergebnisse aus Kapitel 4.2 (Abbildung 21) bestätigen. Sie werden daher nur kurz aufgeführt. Werden die objektiv ausgewählten Partikel gegen eine 70S Ribosom-, eine GroEL- sowie eine 20S Proteasom-Referenz

aligniert, zeigen diese höhere Korrelationswerte zur 20S Proteasom-Referenz als zu den anderen beiden (nicht gezeigt). Die Tests in Kapitel 4.2 zeigen, dass es sich bei den ersten 50 Partikeln der einzelnen Tomogramme in den meisten Fällen mit hoher Wahrscheinlichkeit um 20S Proteasomen handelt. Im Durchschnitt wurden durch die automatische Prozedur die ersten 40 Partikel jedes Tomogramms ausgewählt. Da es sich demnach in den meisten Fällen um 20S Proteasomen handelt, konvergiert die Alignierung gegen eine 70S Ribosom-Referenz nicht, jedoch gegen die 20S Proteasom-Referenz zu einer 3D Dichte, die konsistent mit der 20S Proteasom-Struktur ist. Zusätzlich wurden die ausgewählten Partikel in ein neues Volumen kopiert, das abermals mit Referenzen für das 70S Ribosom, das 20S Proteasom und GroEL korreliert wurde. Die resultierenden CCCs des Volumens und der 20S Proteasom-Referenz waren wie erwartet signifikant höher als die CCCs der anderen beiden Referenzen (nicht gezeigt).

Als initiale Referenz für die Alignierung der durch die beiden Strategien selektierten Partikel wurde die gemittelte Dichte aller Partikel mit den aus MOLMATCH extrahierten Koordinaten und Winkelsätzen erzeugt. Diese wurde iterativ weiter verfeinert. Im Falle der aufgrund der Höhe des CCC objektiv ausgewählten Partikel wurde die Höhe des Grenzwertes dynamisch angepasst, wodurch nur noch 323 Partikel zur finalen Mittelung beitrugen.

Beide durchgeführten Alignierungen und Mittelungen von circa 300 Partikeln aus 11 Tomogrammen ergaben eine Struktur mit der Auflösung von 3 nm, die mittels Fourier-Ring-Korrelation bestimmt wurde (Abbildung 23 A). Bedingt durch den Defokus der Mikrographen entspricht dieser Wert der maximal erreichbaren Auflösung ohne CTF Korrektur (gegeben durch die erste Nullstelle der CTF). Die Selektion der Partikel deckte in beiden Fällen ein breites Spektrum an Orientierungen im Tomogramm ab, es war lediglich eine leicht präferierte Orientierung der longitudinalen Achse der 20S Proteasomen senkrecht zum Elektronenstrahl festzustellen (Abbildung 23 B). Die gemittelte Struktur ist damit nahezu isotrop abgetastet. In Abbildung 23 sind daher repräsentativ der Auflösungsstest und die Orientierungen der durch Strategie 2 objektiv selektierten Partikel dargestellt.

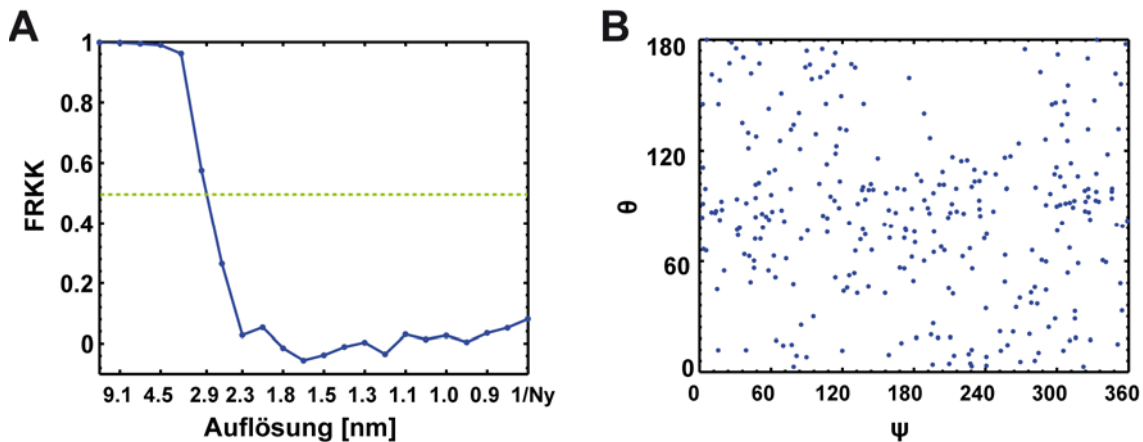


Abbildung 23: Auflösung der finalen Mittelung und Orientierung der Partikel, die objektiv ausgewählt wurden

[A] Auflösungstest für die gemittelte Struktur durch Fourier-Ring-Korrelation. Gemäß des 0,5-Kriteriums ergibt sich eine Auflösung von 3 nm. [B] Auftrag der Eulerwinkel θ und ψ . Die Orientierungen der Partikel verteilen sich über den gesamten Winkelbereich. Die Struktur ist nahezu isotrop abgetastet und fast unabhängig vom *Missing Wedge*-Effekt.

Beide Mittelungen sind konsistent mit der bekannten Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *T. acidophilum*. Sie zeigen Details, wie z. B. die vier Ringe, die in der Referenz für MOLMATCH nicht vorhanden waren. Die resultierende Struktur der objektiv ausgewählten Partikel ist repräsentativ in Abbildung 24 gezeigt. Obwohl die Auflösungen der Strukturen mit 3 nm gleich sind, erscheinen die Details dieser Mittelung subjektiv betrachtet etwas deutlicher, als bei der manuellen Auswahl der Partikel. Zwischen den beiden Partikelsets sind 170 Partikel identisch (circa 54%). Diese Unterschiede ergeben sich durch die Vor- und Nachteile der Selektionsstrategien. Bei der visuellen Inspektion werden viele 20S Proteasomen aufgrund der Schwierigkeiten bei der Identifikation der Partikel nicht ausgewählt. Die objektive Selektion aufgrund der Höhe des CCCs geschieht im Gegensatz dazu unabhängiger von der Orientierung des Partikels. Allerdings ist das Risiko, falsch positive Partikel auszuwählen, erheblich höher.

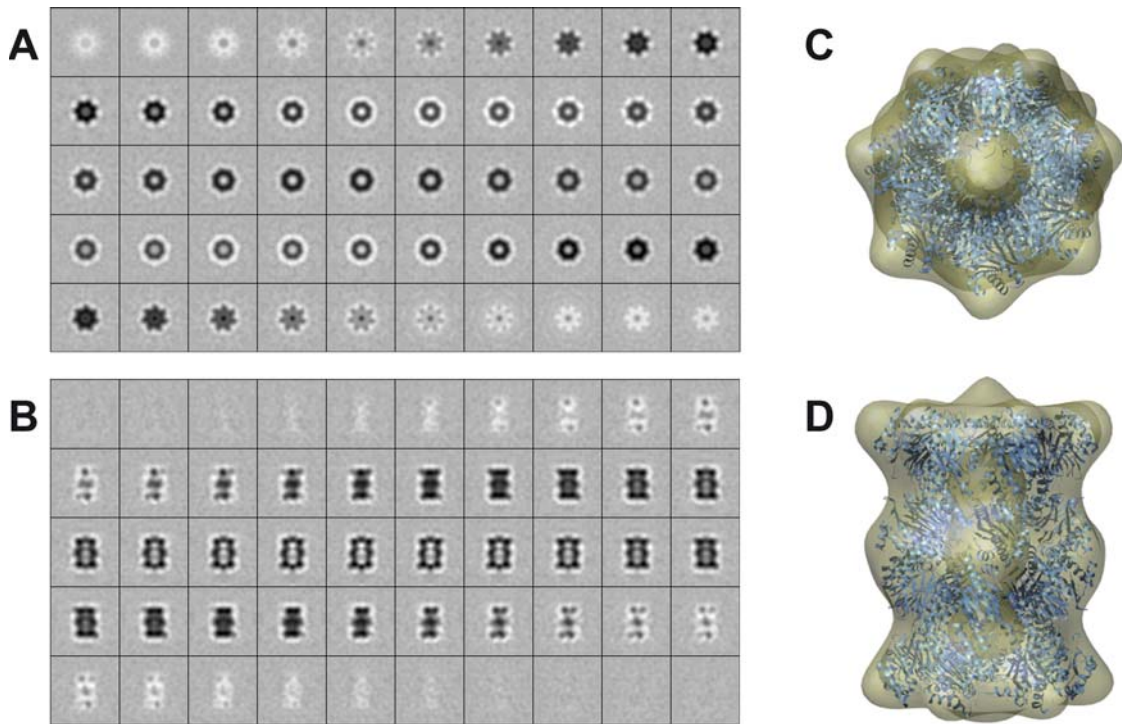


Abbildung 24: Finale Kryo-EM-Struktur des *M. mazei* 20S Proteasoms

(A, B) Sequentielle XY-Schnitte [A] und XZ-Schnitte [B] durch die gemittelte Struktur des 20S Proteasoms aus *M. mazei* nach Korrelationsmittelung von 320 Einzelpartikeln, die aus 11 Tomogrammen selektiert wurden. Für die Darstellung wurde die ermittelte siebenfache Symmetrie herausgehoben. Maßstab 10 nm. (C, D) Zwei orthogonale Ansichten der *isosurface* Darstellung der gemittelten Struktur aus *M. mazei*, in die die Kristallstruktur aus *T. acidophilum* eingefügt wurde.

Die gemittelte Struktur der 20S Proteasomen aus *M. mazei* zeigt eindeutig eine siebenfache Rotationssymmetrie, die nicht durch die für MOLMATCH verwendete Referenz, deren Symmetrie durch die Reduktion der Auflösung vollständig gelöscht wurde, beeinflusst war (Abbildung 24). Weiterhin wurde die Mittelung ohne Herausheben einer Symmetrie durchgeführt. Die ermittelte Symmetrie entstand demzufolge aus den Partikeln. Dies wurde durch Randomisierung des Winkels φ und erneuter Mittelung bestätigt. Die ermittelte siebenfache Symmetrie wurde für die Darstellung herausgehoben. Die Dimensionen der gemittelten *M. mazei* Struktur entsprachen mit 11 nm \times 15 nm den bereits gelösten 20S Proteasom-Strukturen aus anderen Organismen. Im Gegensatz zur Kristallstruktur des *T. acidophilum* 20S

Proteasoms besitzt die gemittelte Struktur eine zusätzliche Dichte an den apikalen Domänen, die auch bei Rasterkraftmikroskopie-Analysen beobachtet wurde (M. Beuttler, persönliche Mitteilung). Dabei könnte es sich um die Aminosäurereste der α -Untereinheit handeln, die in der Kristallstruktur nicht aufgelöst wurden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die entwickelte Strategie eine funktionelle und strukturelle Analyse von Proteinkomplexen in einer physiologischen Umgebung erlaubt. Dabei liefern vollständig automatisierte und dadurch sehr objektive Prozeduren bei der Bildbearbeitung qualitativ gleiche Ergebnisse wie die manuelle Auswahl der Partikel nach der Mustererkennung. Dadurch kann zügig eine Struktur mit moderater Auflösung erhalten werden.

4.4. Der α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplex aus *T. acidophilum*

Die entwickelte Strategie wurde zu Analyse eines makromolekularen Komplexes aus *T. acidophilum* angewendet. Es handelt sich dabei möglicherweise um das archaeale Homolog des α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes.

Die vier Gensequenzen des Operons Ta1435-1438 aus *T. acidophilum* wurden von N. Sun auf zwei verschiedenen Plasmiden mit T7 Promotor in tandem kloniert und freundlicherweise bereitgestellt. Dabei folgte der Sequenz von Ta1437 ein His₆-Tag am 3'-Ende.

Die beiden Plasmide wurden im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ in Gegenwart von radioaktiv markiertem Methionin separat und koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Fraktionen der Reaktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 25 A). Es zeigen sich Banden auf Höhe der erwarteten Molekulargewichte der einzelnen Proteine: 37 kDa (hypothetische 3-Methyl-2-Ketobutanoat-Dehydrogenase β -Untereinheit, E1 β , Ta1437), 43 kDa (hypothetische 3-Methyl-2-Ketobutanoat-Dehydrogenase α -Untereinheit, E1 α , Ta1438), 46 kDa (hypothetische Dihydrolipoyl-Acyltransferase, E2, Ta1436) und 49 kDa (hypothetische Dihydrolipoyl-Dehydrogenase, E3, Ta1435). Damit sind die separate sowie die *in vitro*

Koexpression aller vier Untereinheiten möglich. Im Gegensatz dazu konnte bei allen bisherigen Expressionsversuchen mit diesen Vektoren in *E. coli* Zellen das Protein Ta1435 nicht detektiert werden (N. Sun, persönliche Mitteilung).

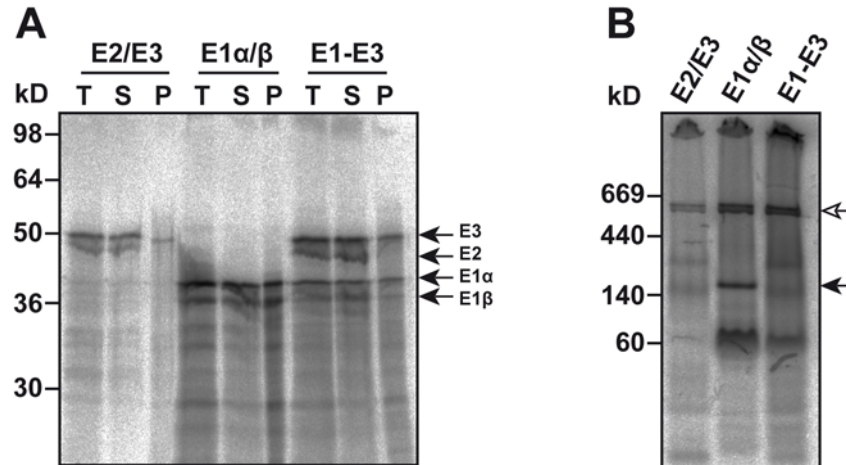


Abbildung 25: Expression von Ta1435-1438 im prokaryotischen Lysat in Gegenwart von $[^{35}\text{S}]$ -Methionin

Die vier Untereinheiten, die auf zwei Plasmiden kodiert sind, wurden im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 100 *E. coli* HY Kit“ in Gegenwart von $[^{35}\text{S}]$ -Methionin separat und koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. [A] Das SDS-PA-Gel zeigt die Verteilung der Untereinheiten nach Separation der Reaktion (T), des löslichen (S) und unlöslichen (P) Teils. [B] Kontinuierliche native PAGE des löslichen Teils der korrespondierenden Lysate. Gefüllter Pfeil: $\alpha_2\beta_2$ E1 Tetramer. Leerer Pfeil: GroEL.

Nach der *in vitro* Expression liegt der größte Teil aller Proteine in löslicher Form vor (Abbildung 25 A). Im Fall der hypothetischen Dihydrolipoyl-Acyltransferase (E2) können überhaupt keine Aggregate detektiert werden. Die lösliche Fraktion nach Expression der E2- und E3-Untereinheiten zeigt in kontinuierlichen nativen Gelen ein Signal in der Tasche (Abbildung 25 B). Dies spricht für die Komplexbildung des circa 1,1 MDa großen Dihydrolipoyl-Acyltransferase-Kernpartikels (E2), an den der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase Komplex (E3) gebunden sein könnte (Heath *et al.* 2007). Bei Expression der E1 α - und E1 β -Untereinheiten zeigt die lösliche Fraktion im nativen Gel eine Bande ungefähr auf der Höhe des 140 kDa Markerproteins, die bei der Koexpression beider Plasmide nicht mehr existiert. Es handelt sich dabei sehr wahrscheinlich um das 3-Methyl-2-Ketobutanoat-Dehydrogenase (E1) $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer mit einem Molekulargewicht von 160 kDa (Heath *et al.* 2004), das bei

Koexpression mit E2 und E3 in den Komplex eingebaut wird. Bei Koexpression der beiden Plasmide findet sich daher wiederum ein Signal in der Tasche. Jedoch bleibt unklar, ob auch E3 in den Multienzymkomplex eingebaut wird.

Zur Steigerung der Konzentration und der Ausbeute wurden alle vier Proteine im „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ koexprimiert. Dabei werden die Proteine so stark translatiert, dass nach Separation der Lysate durch SDS-PAGE im Coomassie gefärbten Gel zwei zusätzliche Banden auf Höhe von circa 50 und 40 kDa auftreten (Abbildung 26 A). Dabei repräsentiert die 50 kDa Bande wahrscheinlich die E2 oder E3-Untereinheiten. Durch die zahlreichen anderen Proteinbanden kann hier keine klare Aussage getroffen werden. Die zweite Bande repräsentiert wahrscheinlich das E1 α -Protein. Das Signal der kleinsten Untereinheit kann an dieser Stelle nicht gefunden werden. Es zeigt sich abermals, dass der größte Teil des Proteins löslich ist.

Um die Assemblierung der einzelnen Untereinheiten zu Komplexen zu überprüfen, wurde das lösliche Translationsprodukt mit einer Ni-NTA-Säule gereinigt und die Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 26 A). In den Elutionen zeigen sich fünf Banden, die mittels Massenspektrometrie analysiert wurden. Bei den drei Banden zwischen 50 und 36 kDa handelt es sich um die drei Untereinheiten E1 α , E1 β und E2. Die Untereinheit E3 kann mittels *Liquid chromatography-mass spectrometry* ebenfalls im Eluat identifiziert werden. Da nur das Protein E1 β einen His₆-Tag trägt, gehören die koelutierenden Proteine zum vollständig assemblierten Komplex. Damit konnte gezeigt werden, dass alle vier exprimierten Proteine zusammen den Multienzymkomplex bilden.

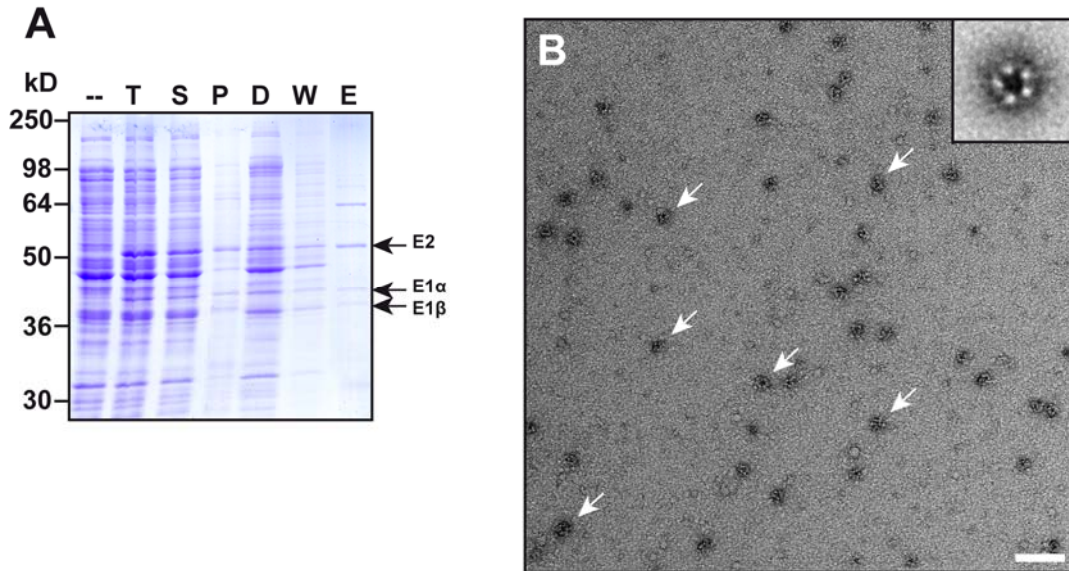


Abbildung 26: Expression, Reinigung und Struktur des *T. acidophilum* Komplexes

Die Untereinheiten wurden im bakteriellen *in vitro* Expressionssystem „RTS 500 *E. coli* HY Kit“ koexprimiert. Die löslichen und unlöslichen Bestandteile der Reaktion wurden durch Zentrifugation getrennt. Die lösliche Fraktion wurde auf die Ni-NTA-Säule aufgetragen. [A] SDS-PAGE von Reaktion (T), Überstand (S) und Pellet (P) Fraktion und den Fraktionen der Ni-NTA-Reinigung. (D) Durchlauf fraktion, (W) Waschfraktion, (E) Elution mit 500 mM Imidazol. Die Banden der Elution wurden massenspektrometrisch analysiert, E1 α , E1 β und E2 konnten identifiziert werden. [B] Elektronenmikroskopische Aufnahme der negativ kontrastierten Elution. Der Maßstab entspricht 100 nm. Pfeile: für die 2D Mittelung selektierte Partikel. Inset: 2D Mittelung von 72 Einzelpartikeln. Die Partikel besitzen eine fünffache Rotationssymmetrie, einen Durchmesser von 19 nm und in der Mitte eine Öffnung, die mit Kontrastmittel gefüllt ist.

Da bisher keine Strukturen des synthetisierten Komplexes aus *T. acidophilum* bekannt sind, wurde zunächst das durch die Ni-NTA-Säule gereinigte Protein negativ kontrastiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Die Mikrographen zeigen größtenteils globuläre Partikel, die ungefähr einen Durchmesser von 20 nm haben und in der Mitte eine Öffnung besitzen. Je nach Orientierung der Partikel lässt sich eine fünffache Rotationssymmetrie erkennen. Für eine 2D Mittelung wurden 72 Partikel manuell selektiert, aligniert und gemittelt. Die gemittelte *T. acidophilum* Struktur bestätigt die fünffache Rotationssymmetrie und die mittige Öffnung, der Durchmesser beträgt 19 nm. An dieser Stelle kann allerdings keine Aussage über die dritte Dimension des Proteinkomplexes getroffen werden. In anderen Organismen wurde gezeigt, dass nur der E2 Kern, der Enzymkomplex Dihydrolipoyl-Acyltransferase, geordnete Strukturen bildet. Im Falle einer icosaedrischen Assemblierung zeigt sich je nach

Ansicht eine fünffache Symmetrie (Stoops *et al.* 1997; Izard *et al.* 1999). Weiterhin betragen die Durchmesser der bekannten icosaedrischen Strukturen für den Dihydrolipoyl-Acyltransferase-Komplex abhängig vom Organismus circa 23 nm. Die aus den anderen beiden Enzymkomplexen (E1 und E3) gebildete Hülle ist weniger geordnet und kann daher nicht so hoch aufgelöst werden. Der Durchmesser des Multienzymkomplexes vergrößert sich durch die Hülle auf circa 50 nm (Zhou *et al.* 2001; Milne *et al.* 2002; Gu *et al.* 2003; Milne *et al.* 2006). Aufgrund der Größe und der ermittelten Symmetrie der Struktur des *T. acidophilum* Komplexes, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um den Dihydrolipoyl-Acyltransferase-Enzymkomplex des Multienzymkomplexes handelt. Die Bindung der E1- und E3-Subkomplexe ist demnach vermutlich schwach und damit lediglich transient (Heath *et al.* 2007). Daher kann der vollständig assemblierte Multienzymkomplex, bestehend aus allen vier Untereinheiten zwar isoliert werden, jedoch ist er nach der Reinigung nicht stabil.

Die Mittelung zeigt wahrscheinlich die Struktur des Dihydrolipoyl-Acyltransferase-Enzymkomplexes, die zum Beispiel durch Einzelpartikelverfahren weiter analysiert werden könnte. Der aus allen vier Untereinheiten bestehende Komplex könnte durch die in dieser Arbeit entwickelte Strategie analysiert werden. Durch die nun bekannte Struktur des E2-Kernkomplexes könnten die assemblierten Komplexe in Kryoelektronentomogrammen vollständiger Lysate detektiert werden.

5. Ausblick

Um die spezifischen Funktionen von Proteinen und im weiteren Verlauf deren Zusammenspiel bei der Erfüllung zellulärer Prozesse zu verstehen, sollten diese in einer möglichst nativen Umgebung untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Strategie zur Durchführung struktureller Studien von Proteinen in Zellysaten als quasi native Umgebung entwickelt. Dazu wurde eine Kombination aus *in vitro* Translation, Kryo-Elektronentomographie von Zellysaten nach der Expression und fortgeschrittenen Bildbearbeitungsmethoden etabliert.

Die Arbeiten mit den verschiedenen Modellproteinen zeigen, dass die strukturelle und funktionelle Analyse sehr stark von der Expression und Assemblierung der Proteine abhängt. Dabei führen sowohl die Wahl des passenden Translationssystems als auch die Adaption der Reaktionsbedingungen zu einer erheblichen Steigerung der Gesamtproteinmenge und vor allem des nativen Anteils des Proteins. Des Weiteren müssen die Proteine in ihre oligomeren Formen assemblieren, wobei nun die Anzahl der makromolekularen Komplexe in den Lysaten kritisch für die Strukturaufklärung ist. Für den 20S Proteasom-Komplex aus *M. mazei* kann nach der Expression im prokaryotischen Lysat eine Kryo-EM-Struktur mit einer Auflösung von 3 nm erzeugt werden.

Das Konzept wurde anschließend auf den hypothetischen α -Ketosäure-Dehydrogenase-Multienzymkomplex aus *T. acidophilum* angewendet. Im Gegensatz zur Expression in *E. coli* Zellen können bei der *in vitro* Expression im EC Lysat alle vier Untereinheiten erfolgreich exprimiert werden. Die 2D Mittelung von gereinigten, negativ-kontrastierten Komplexen repräsentiert sehr wahrscheinlich die Kernstruktur des Multienzymkomplexes, den Dihydrolipoyl-Acyltransferase-Enzymkomplex, der aus multiplen Kopien der E2 Untereinheit gebildet wird. Die Struktur des Enzymkomplexes zeigt eine fünffache Rotationssymmetrie, hat einen Durchmesser von circa 19 nm und besitzt in der Mitte eine Öffnung. Sie könnte z. B. durch Einzelpartikelverfahren weiter analysiert werden. Zusätzlich sollte jedoch die Struktur des Multienzymkomplexes aufgeklärt werden. Die biochemische Analyse des isolierten Proteins zeigt eindeutig, dass es sich um den vollständig assemblierten Multienzymkomplex handelt, in den alle

vier Untereinheiten integriert sind. Da dieser nach der Reinigung offensichtlich sehr instabil ist, könnte er durch die in dieser Arbeit entwickelte Strategie, die die Reinigung von Proteinen vermeidet, analysiert werden. Der Multienzymkomplex könnte mit Hilfe der charakteristischen Struktur des Dihydrolipoyl-Acyltransferase-Komplexes in Kryoelektronentomogrammen vollständiger Lysate lokalisiert werden.

Um die entwickelte Strategie zur schnellen Erzeugung von Kryo-EM-Strukturen mit moderater Auflösung weiter zu optimieren, sind verschiedene proteinchemische sowie technische Verbesserungen sinnvoll. Der erste Schritt wäre eine Optimierung der Expression des Zielproteins. Dabei muss einerseits eine höhere Produktionsmenge erzielt werden, wichtiger jedoch ist dabei die korrekte Faltung des Proteins in seine native Konformation. Die durchgeführten Arbeiten über die Tripeptidyl-Peptidase II zeigen, dass die Konzentration der nativen Untereinheit kritisch für die Assemblierung des Komplexes sein kann. Für die Optimierung der Expression können beispielsweise die *codon usage* angepasst, das passende pro- oder eukaryotische Lysat gewählt und die Reaktionsbedingungen bezüglich Zeit, Temperatur und Additiven verändert werden. Ein ganz anderer Ansatz wäre die Verwendung einer artifiziellen Minimalzelle wie sie von Noireaux und Libchaber konstruiert wurde (Noireaux und Libchaber 2004; Noireaux *et al.* 2005). Diese ermöglicht eine massive Proteinsynthese über mehrere Tage und gleichzeitig die Untersuchung des Proteins in einer physiologischen Umgebung durch den „zellulären“ Kontext. Für die korrekte Faltung und Assemblierung der Proteine könnten molekulare Komponenten wie Chaperone in das synthetische Kompartiment eingeschlossen werden.

Die Optimierung der Expression der Proteine führt zu einer höheren Anzahl der Zielstrukturen in Kryoelektronentomogrammen. Dadurch wären zunächst weniger Tomogramme für die 3D Mittelung des Proteins notwendig. Weiterhin wird durch die Überpräsenz der Zielstruktur eine Verdünnung des Lysates notwendig, wobei andere makromolekulare Komplexe des Lysates aus den Tomogrammen verdrängt werden. Dies führt im Fall des 20S Proteasoms in EC Lysaten dazu, dass die Menge des endogenen Chaperonins GroEL in den Tomogrammen vernachlässigbar wird. Dadurch verringert sich demnach automatisch die Menge falsch positiver Detektionen bei der Mustererkennung. Tomogramme von sowohl pro- als auch eukaryotischen Lysaten

zeigen Ribosomen als dominierende Spezies. Ein neu synthetisierter Proteinkomplex würde, unter der Voraussetzung, dass es sich strukturell von Ribosomen abhebt und mit einer gewissen Häufigkeit auftritt, im Lysat auffallen. Durch eine einfache Mittelung der neuen Partikelspezies könnte eine Referenz für weitere automatische Detektionen des strukturell unbekanntem Proteins generiert werden.

Zur Erzeugung von Strukturen durch 3D Mittelung von Subtomogrammen sollte die automatisierte, objektive Lokalisierung und Detektion der Zielstruktur zuverlässiger werden. Dafür muss einerseits die Qualität und die Auflösung der Tomogramme verbessert werden. Andererseits sollten die vorhandenen Prozeduren für die Mustererkennung weiterentwickelt und 3D Klassifizierungen angeschlossen werden, um ausschließlich die Zielstruktur aus den Lysaten herauszufiltern. Ein großes Problem der Partikelidentifikation mittels Korrelation ist das SNR (Förster 2005). Um dies in Kryo-Elektronentomogrammen zu steigern, sollten die Detektionssysteme, wie z.B. CCD-Kameras für die Aufzeichnung der Mikrographen, weiterentwickelt werden (Faruqi und Henderson 2007; Mooney 2007). Dies würde eine zuverlässige Bestimmung der CTF Parameter anhand der einzelnen Projektionen ermöglichen, die bei dem momentan erreichbaren SNR schwierig ist. Durch eine Korrektur der CTF könnten die kippwinkelabhängigen Fokusgradienten in den Tomogrammen ausgeglichen werden. Eine weitere Möglichkeit, den Informationsgehalt von Tomogrammen zu steigern, ist die Aufnahme von Doppelkippserien (Penczek *et al.* 1995; Mastronarde 1997). Da die Partikel dann weniger durch den *Missing Wedge* verzerrt sind, ist die Partikelidentifikation durch korrelationsbasierte Methoden nun fast unabhängig von deren Orientierung bezüglich der Kippachse, wodurch die Genauigkeit der Identifikation erheblich gesteigert werden kann. Eine 3D Klassifizierung der Partikel könnte die Auswahl falsch positiver Partikel zusätzlich verringern (Förster *et al.* 2008). Alle aufgeführten Optimierungen können letztendlich relativ schnell zu einer verlässlicheren, artefaktfreien und intakten 3D Struktur führen.

6. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AAA ATPase	<i>ATPases associated with various cellular activities</i>
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
CC	<i>correlation coefficient</i>
CCC	<i>constrained correlation coefficient</i>
CCD	<i>charged coupled device</i>
CCF	<i>constrained correlation function</i>
CTF	<i>contrast transfer function</i>
Da	Dalton
DNA	<i>desoxyribonucleid acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>In vitro</i> Expressionslysat basierend auf <i>E. coli</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ET	Elektronentomographie
FEG	<i>field emission gun</i>
FRK	Fourier-Ring-Korrelation
g	Gramm
h	Stunde
His ₆ -Tag	Hexahistidin Tag
KET	Kryo-Elektronentomographie
l	Liter
LCCF	<i>local constrained correlation function</i>
M	molar (mol/l)
min	Minute
MOLMATCH	<i>molecule matcher</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTF	<i>modulation transfer function</i>
Native PAGE	native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Triessigsäure-Granulat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

ORF	offener Leserahmen
PSF	<i>Pointsread function</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (<i>signal to noise ratio</i>)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TPP II	Tripeptidyl-Peptidase II
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
WG	<i>In vitro</i> Expressionslysats basierend auf <i>wheat germ</i>
XCF	<i>cross correlation function</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

7. Literaturverzeichnis

- A. Aevarsson, K. Seger, S. Turley, J. R. Sokatch und W. G. Hol (1999). "Crystal structure of 2-oxoisovalerate and dehydrogenase and the architecture of 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes." Nat Struct Biol **6**(8): 785-92.
- V. R. Agashe, S. Guha, H. C. Chang, P. Genevaux, M. Hayer-Hartl, M. Stemp, C. Georgopoulos, F. U. Hartl und J. M. Barral (2004). "Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed." Cell **117**(2): 199-209.
- D. M. Al-Mailem, D. W. Hough und M. J. Danson (2008). "The 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complex of *Haloferax volcanii*." Extremophiles **12**(1): 89-96.
- F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith und K. Struhl (2007). "Current Protocols in Molecular Biology."
- F. Baneyx und M. Mujacic (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." Nat Biotechnol **22**(11): 1399-408.
- W. Baumeister, J. Walz, F. Zuhl und E. Seemuller (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." Cell **92**(3): 367-80.
- M. Beck, F. Förster, M. Ecke, J. M. Plitzko, F. Melchior, G. Gerisch, W. Baumeister und O. Medalia (2004). "Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography." Science **306**(5700): 1387-90.
- M. Beck, V. Lucic, F. Förster, W. Baumeister und O. Medalia (2007). "Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography." Nature **449**(7162): 611-5.
- J. M. Betton (2003). "Rapid translation system (RTS): a promising alternative for recombinant protein production." Curr Protein Pept Sci **4**(1): 73-80.
- M. Bochtler, L. Ditzel, M. Groll und R. Huber (1997). "Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6070-4.
- J. Böhm, A. S. Frangakis, R. Hegerl, S. Nickell, D. Typke und W. Baumeister (2000). "Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: template matching applied to electron tomograms." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14245-50.

- S. Brenner und R. W. Horne (1959). "A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses." Biochim Biophys Acta **34**: 103-10.
- K. A. Calhoun und J. R. Swartz (2005). "Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism." Biotechnol Bioeng **90**(5): 606-13.
- J. K. Chik, U. Lindberg und C. E. Schutt (1996). "The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution." J Mol Biol **263**(4): 607-23.
- R. A. Crowther, D. J. De Rosier und A. Klug (1970). "The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy." Proceedings Of The Royal Society Of London **317**(1530): 319-340.
- M. Cyrklaff, C. Risco, J. J. Fernandez, M. V. Jimenez, M. Esteban, W. Baumeister und J. L. Carrascosa (2005). "Cryo-electron tomography of vaccinia virus." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2772-7.
- B. Dahlmann, F. Kopp, L. Kuehn, B. Niedel, G. Pfeifer, R. Hegerl und W. Baumeister (1989). "The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria." FEBS Lett **251**(1-2): 125-31.
- M. J. Danson (2007). "Central metabolism." Archaea: Molecular and Cell Biology: Chapter 12, pp 260-287. ASM Press, Washington, DC.
- M. J. Danson, R. Eisenthal, S. Hall, S. R. Kessel und D. L. Williams (1984). "Dihydrolipoamide dehydrogenase from halophilic archaeobacteria." Biochem J **218**(3): 811-8.
- D. J. De Rosier und A. Klug (1968). "Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs." Nature **217**(5124): 130-134.
- U. Deppenmeier, A. Johann, T. Hartsch, R. Merkl, R. A. Schmitz, R. Martinez-Arias, A. Henne, A. Wiezer, S. Baumer, C. Jacobi, H. Bruggemann, T. Lienard, A. Christmann, M. Bomeke, S. Steckel, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, R. Overbeek, H. P. Klenk, R. P. Gunsalus, H. J. Fritz und G. Gottschalk (2002). "The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea." J Mol Microbiol Biotechnol **4**(4): 453-61.
- J. K. DeVries und G. Zubay (1967). "DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase." Proc Natl Acad Sci U S A **57**(4): 1010-2.

- K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl und W. Baumeister (1993). "Towards automatic electron tomography II. Implementation of autofocus and low-dose procedures." Ultramicroscopy **49**(1-4): 109-120.
- K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl, A. J. Koster und W. Baumeister (1992). "Towards automatic electron tomography." Ultramicroscopy **40**(1): 71-87.
- J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell und P. Schultz (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." Q Rev Biophys **21**(2): 129-228.
- Y. Endo und T. Sawasaki (2004). "High-throughput, genome-scale protein production method based on the wheat germ cell-free expression system." J Struct Funct Genomics **5**(1-2): 45-57.
- A. R. Faruqi und R. Henderson (2007). "Electronic detectors for electron microscopy." Curr Opin Struct Biol **17**(5): 549-55.
- F. Förster (2005). "Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden." Doktorarbeit, Technische Universität München.
- F. Förster, O. Medalia, N. Zauberman, W. Baumeister und D. Fass (2005). "Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(13): 4729-34.
- F. Förster, S. Pruggnaller, A. Seybert und A. S. Frangakis (2008). "Classification of cryo-electron sub-tomograms using constrained correlation." J Struct Biol **161**(3): 276-86.
- A. S. Frangakis, J. Böhm, F. Förster, S. Nickell, D. Nicastro, D. Typke, R. Hegerl und W. Baumeister (2002). "Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14153-8.
- J. Frank (2002). "Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 303-19.
- J. H. Frank (2006). "Electron tomography: methods for three-dimensional visualization of structures in the cell."

- S. Frankel, J. Condeelis und L. Leinwand (1990). "Expression of actin in Escherichia coli. Aggregation, solubilization, and functional analysis." J Biol Chem **265**(29): 17980-7.
- I. S. Gabashvili, R. K. Agrawal, C. M. Spahn, R. A. Grassucci, D. I. Svergun, J. Frank und P. Penczek (2000). "Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 Å resolution." Cell **100**(5): 537-49.
- M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik und R. Huber (1997). "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." Nature **386**(6624): 463-71.
- M. Groll und R. Huber (2003). "Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 606-16.
- K. Grünewald, P. Desai, D. C. Winkler, J. B. Heymann, D. M. Belnap, W. Baumeister und A. C. Steven (2003a). "Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography." Science **302**(5649): 1396-8.
- K. Grünewald, O. Medalia, A. Gross, A. C. Steven und W. Baumeister (2003b). "Prospects of electron cryotomography to visualize macromolecular complexes inside cellular compartments: implications of crowding." Biophys Chem **100**(1-3): 577-91.
- Y. Gu, Z. H. Zhou, D. B. McCarthy, L. J. Reed und J. K. Stoops (2003). "3D electron microscopy reveals the variable deposition and protein dynamics of the peripheral pyruvate dehydrogenase component about the core." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7015-20.
- G. Harauz und M. Van Heel (1986). "Exact filter for general geometry three-dimensional reconstruction." Optik **35**: 146-156.
- C. Heath, A. C. Jeffries, D. W. Hough und M. J. Danson (2004). "Discovery of the catalytic function of a putative 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complex in the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*." FEBS Lett **577**(3): 523-7.
- C. Heath, M. G. Posner, H. C. Aass, A. Upadhyay, D. J. Scott, D. W. Hough und M. J. Danson (2007). "The 2-oxoacid dehydrogenase multi-enzyme complex of the

- archaeon *Thermoplasma acidophilum* - recombinant expression, assembly and characterization." Febs J **274**(20): 5406-15.
- R. Hegerl (1996). "The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy." J Struct Biol **116**(1): 30-4.
- R. Hegerl und W. Hoppe (1976). "Influence of electron noise on three-dimensional image reconstruction." Z. Naturforschung **31a**: 1717-1721.
- H. G. Heide und E. Zeitler (1985). "The physical behavior of solid water at low temperatures and the embedding of electron microscopical specimens." Ultramicroscopy **16**(2): 151-160.
- W. Heinemeyer (2000). "Active sites and assembly of the 20S proteasome." In Proteasomes: The World of Regulaory Proteolysis(W. Hilt und D. H. Wolf): 48-70. Eureka.com/Landes Bioscience, Georgetown.
- R. Henderson (1995). "The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules." Q Rev Biophys **28**(2): 171-93.
- K. Henrick, Z. Feng, W. F. Bluhm, D. Dimitropoulos, J. F. Doreleijers, S. Dutta, J. L. Flippen-Anderson, J. Ionides, C. Kamada, E. Krissinel, C. L. Lawson, J. L. Markley, H. Nakamura, R. Newman, Y. Shimizu, J. Swaminathan, S. Velankar, J. Ory, E. L. Ulrich, W. Vranken, J. Westbrook, R. Yamashita, H. Yang, J. Young, M. Yousufuddin und H. M. Berman (2007). "Remediation of the protein data bank archive." Nucleic Acids Res.
- K. C. Holmes, I. Angert, F. J. Kull, W. Jahn und R. R. Schroder (2003). "Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide." Nature **425**(6956): 423-7.
- K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard und W. Kabsch (1990). "Atomic model of the actin filament." Nature **347**(6288): 44-9.
- W. Hoppe (1969). "Das Endlichkeitspostulat und das Interpolationstheorem derdreidimensionalen elektronenmikroskopischen Analyse aperiodischer Sturkturen." Optik **29**: 617-621.
- T. Izard, A. Aevarsson, M. D. Allen, A. H. Westphal, R. N. Perham, A. de Kok und W. G. Hol (1999). "Principles of quasi-equivalence and Euclidean geometry govern the

- assembly of cubic and dodecahedral cores of pyruvate dehydrogenase complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1240-5.
- M. C. Jewett und J. R. Swartz (2004). "Mimicking the Escherichia coli cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis." Biotechnol Bioeng **86**(1): 19-26.
- K. A. Jolley, D. G. Maddocks, S. L. Gyles, Z. Mullan, S. L. Tang, M. L. Dyall-Smith, D. W. Hough und M. J. Danson (2000). "2-Oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes in the halophilic Archaea? Gene sequences and protein structural predictions." Microbiology **146 (Pt 5)**: 1061-9.
- W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai und K. C. Holmes (1990). "Atomic structure of the actin:DNase I complex." Nature **347**(6288): 37-44.
- T. Kawasaki, M. D. Gouda, T. Sawasaki, K. Takai und Y. Endo (2003). "Efficient synthesis of a disulfide-containing protein through a batch cell-free system from wheat germ." Eur J Biochem **270**(23): 4780-6.
- T. Kigawa, T. Yabuki, Y. Yoshida, M. Tsutsui, Y. Ito, T. Shibata und S. Yokoyama (1999). "Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins." FEBS Lett **442**(1): 15-9.
- T. Kigawa, E. Yamaguchi-Nunokawa, K. Kodama, T. Matsuda, T. Yabuki, N. Matsuda, R. Ishitani, O. Nureki und S. Yokoyama (2002). "Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis." J Struct Funct Genomics **2**(1): 29-35.
- T. W. Kim, D. M. Kim und C. Y. Choi (2006). "Rapid production of milligram quantities of proteins in a batch cell-free protein synthesis system." J Biotechnol **124**(2): 373-80.
- R. W. King, K. D. Lustig, P. T. Stukenberg, T. J. McGarry und M. W. Kirschner (1997). "Expression cloning in the test tube." Science **277**(5328): 973-4.
- C. Klammt, D. Schwarz, F. Lohr, B. Schneider, V. Dotsch und F. Bernhard (2006). "Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein." Febs J **273**(18): 4141-53.
- N. Knipfer und T. E. Shrader (1997). "Inactivation of the 20S proteasome in Mycobacterium smegmatis." Mol Microbiol **25**(2): 375-83.

- C. Kofler (2007). "Strukturelle Charakterisierung von *Thermoplasma acidophilum* mittels Kryo-Elektronentomographie." Doktorarbeit, Technische Universität München.
- V. A. Kolb, E. V. Makeyev und A. S. Spirin (2000). "Co-translational folding of an eukaryotic multidomain protein in a prokaryotic translation system." J Biol Chem **275**(22): 16597-601.
- A. J. Koster, W. J. d. Ruijter, A. v. d. Bos und K. D. v. d. Mast (1989). "Autotuning of a TEM using minimum electron dose." Ultramicroscopy **27**(3): 251-272.
- A. J. Koster, R. Grimm, D. Typke, R. Hegerl, A. Stoschek, J. Walz und W. Baumeister (1997). "Perspectives of molecular and cellular electron tomography." J Struct Biol **120**(3): 276-308.
- J. Kürner, A. S. Frangakis und W. Baumeister (2005). "Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*." Science **307**(5708): 436-8.
- H. J. Kwon, Y. Tanaka, A. Kakugo, K. Shikinaka, H. Furukawa, Y. Osada und J. P. Gong (2006). "Anisotropic nucleation growth of actin bundle: a model for determining the well-defined thickness of bundles." Biochemistry **45**(34): 10313-8.
- U. K. Laemmli (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.
- M. Lawrence (1992). "Least-squares method of alignment using markers." In: Electron tomography, Hrsg.: J. Frank; Plenum Press, New York 197-204.
- J. W. Littlefield, E. B. Keller, J. Gross und P. C. Zamecnik (1955). "Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat." J Biol Chem **217**(1): 111-23.
- J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister und R. Huber (1995). "Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution." Science **268**(5210): 533-9.
- V. Lucic, F. Förster und W. Baumeister (2005). "Structural studies by electron tomography: from cells to molecules." Annu Rev Biochem **74**: 833-65.
- P. L. Luisi (2002). "Toward the engineering of minimal living cells." Anat Rec **268**(3): 208-14.
- K. Madin, T. Sawasaki, T. Ogasawara und Y. Endo (2000). "A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants

- apparently contain a suicide system directed at ribosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(2): 559-64.
- G. A. Martin, R. Kawaguchi, Y. Lam, A. DeGiovanni, M. Fukushima und W. Mutter (2001). "High-yield, in vitro protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/ translation system." Biotechniques **31**(4): 948-50, 952-3.
- D. N. Mastrorade (1997). "Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution." J Struct Biol **120**(3): 343-52.
- A. Mattevi, G. Obmolova, E. Schulze, K. H. Kalk, A. H. Westphal, A. de Kok und W. G. Hol (1992). "Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex." Science **255**(5051): 1544-50.
- J. R. Mattingly, Jr., A. J. Yanez und M. Martinez-Carrion (2000). "The folding of nascent mitochondrial aspartate aminotransferase synthesized in a cell-free extract can be assisted by GroEL and GroES." Arch Biochem Biophys **382**(1): 113-22.
- J. A. Maupin-Furlow, H. C. Aldrich und J. G. Ferry (1998). "Biochemical characterization of the 20S proteasome from the methanoarchaeon *Methanosarcina thermophila*." J Bacteriol **180**(6): 1480-7.
- B. F. McEwen, K. H. Downing und R. M. Glaeser (1995). "The relevance of dose-fractionation in tomography of radiation-sensitive specimens." Ultramicroscopy **60**(3): 357-73.
- P. J. McLaughlin, J. T. Gooch, H. G. Mannherz und A. G. Weeds (1993). "Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing." Nature **364**(6439): 685-92.
- N. Medalia, M. Sharon, R. Martinez-Arias, O. Mihalache, C. V. Robinson, O. Medalia und P. Zwickl (2006). "Functional and structural characterization of the *Methanosarcina mazei* proteasome and PAN complexes." J Struct Biol **156**(1): 84-92.
- O. Medalia, I. Weber, A. S. Frangakis, D. Nicastro, G. Gerisch und W. Baumeister (2002). "Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography." Science **298**(5596): 1209-13.

- N. Michel-Reydellet, K. Woodrow und J. Swartz (2005). "Increasing PCR fragment stability and protein yields in a cell-free system with genetically modified *Escherichia coli* extracts." J Mol Microbiol Biotechnol **9**(1): 26-34.
- J. L. Milne, D. Shi, P. B. Rosenthal, J. S. Sunshine, G. J. Domingo, X. Wu, B. R. Brooks, R. N. Perham, R. Henderson und S. Subramaniam (2002). "Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine." Embo J **21**(21): 5587-98.
- J. L. Milne, X. Wu, M. J. Borgnia, J. S. Lengyel, B. R. Brooks, D. Shi, R. N. Perham und S. Subramaniam (2006). "Molecular structure of a 9-MDa icosahedral pyruvate dehydrogenase subcomplex containing the E2 and E3 enzymes using cryoelectron microscopy." J Biol Chem **281**(7): 4364-70.
- P. Mooney (2007). "Optimization of image collection for cellular electron microscopy." Methods Cell Biol **79**: 661-719.
- J. B. Moseley und B. L. Goode (2006). "The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism." Microbiol Mol Biol Rev **70**(3): 605-45.
- S. Nickell, F. Förster, A. Linaroudis, W. D. Net, F. Beck, R. Hegerl, W. Baumeister und J. M. Plitzko (2005). "TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography." J Struct Biol **149**(3): 227-34.
- M. W. Nirenberg und J. H. Matthaei (1961). "The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **47**: 1588-602.
- V. Noireaux, R. Bar-Ziv, J. Godefroy, H. Salman und A. Libchaber (2005). "Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles." Phys Biol **2**(3): P1-8.
- V. Noireaux und A. Libchaber (2004). "A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(51): 17669-74.
- J. O. Ortiz, F. Förster, J. Kürner, A. A. Linaroudis und W. Baumeister (2006). "Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition." J Struct Biol **156**(2): 334-41.
- J. D. Pardee und J. A. Spudich (1982). "Purification of muscle actin." Methods Enzymol **85 Pt B**: 164-81.

- P. Penczek, M. Marko, K. Buttle und J. Frank (1995). "Double-tilt electron tomography." Ultramicroscopy **60**(3): 393-410.
- R. N. Perham (2000). "Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions." Annu Rev Biochem **69**: 961-1004.
- R. N. Perham, D. D. Jones, H. J. Chauhan und M. J. Howard (2002). "Substrate channelling in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes." Biochem Soc Trans **30**(2): 47-51.
- F. H. Pettit, S. J. Yeaman und L. J. Reed (1978). "Purification and characterization of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 4881-5.
- Qiagen (2003). "The QIAexpressionist."
- J. Radon (1917). "Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten." Math. Phys. Klasse **69**: 262-277.
- N. A. Ranson, G. W. Farr, A. M. Roseman, B. Gowen, W. A. Fenton, A. L. Horwich und H. R. Saibil (2001). "ATP-bound states of GroEL captured by cryo-electron microscopy." Cell **107**(7): 869-79.
- C. V. Robinson, A. Sali und W. Baumeister (2007). "The molecular sociology of the cell." Nature **450**(7172): 973-82.
- Roche (2003). "RTS Application Manual for Cell-Free Protein Expression."
- B. Rockel, J. Bosch und W. Baumeister (2005a). "Structural Studies of Large Self-compartmentalizing Proteases." Protein Degradation, Vol.2: The Ubiquitin-Proteasom System: 183-214.
- B. Rockel, J. Peters, B. Kuhlmorgen, R. M. Glaeser und W. Baumeister (2002). "A giant protease with a twist: the TPP II complex from Drosophila studied by electron microscopy." Embo J **21**(22): 5979-84.
- B. Rockel, J. Peters, S. A. Muller, G. Seyit, P. Ringler, R. Hegerl, R. M. Glaeser und W. Baumeister (2005b). "Molecular architecture and assembly mechanism of Drosophila tripeptidyl peptidase II." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(29): 10135-40.
- M. Rohrwild, G. Pfeifer, U. Santarius, S. A. Muller, H. C. Huang, A. Engel, W. Baumeister und A. L. Goldberg (1997). "The ATP-dependent HslVU protease

- from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome." Nat Struct Biol **4**(2): 133-9.
- A. M. Roseman (2000). "Docking structures of domains into maps from cryo-electron microscopy using local correlation." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **56**(Pt 10): 1332-40.
- A. Ruepp, C. Eckerskorn, M. Bogyo und W. Baumeister (1998). "Proteasome function is dispensable under normal but not under heat shock conditions in *Thermoplasma acidophilum*." FEBS Lett **425**(1): 87-90.
- A. Sali, R. Glaeser, T. Earnest und W. Baumeister (2003). "From words to literature in structural proteomics." Nature **422**(6928): 216-25.
- T. Sawasaki, Y. Hasegawa, M. Tsuchimochi, N. Kamura, T. Ogasawara, T. Kuroita und Y. Endo (2002a). "A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products." FEBS Lett **514**(1): 102-5.
- T. Sawasaki, T. Ogasawara, R. Morishita und Y. Endo (2002b). "A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14652-7.
- W. O. Saxton und W. Baumeister (1982). "The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein." J Microsc **127**(Pt 2): 127-38.
- A. Schmidt und M. N. Hall (1998). "Signaling to the actin cytoskeleton." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 305-38.
- C. E. Schutt, J. C. Myslik, M. D. Rozycki, N. C. Goonesekere und U. Lindberg (1993). "The structure of crystalline profilin-beta-actin." Nature **365**(6449): 810-6.
- G. Schweikert (2004). "Quantitativer Vergleich der Strahlenschädigung biologischer Proben im Transmissions-Elektronenmikroskop bei Stickstoff und Helium Temperatur." Diplomarbeit, Technische Universität München.
- E. Seemüller, A. Lupas und W. Baumeister (1996). "Autocatalytic processing of the 20S proteasome." Nature **382**(6590): 468-71.
- G. Seyit (2006). "Structural Studies of Tripeptidylpeptidase II: Expression and Crystallization Trials." Doktorarbeit, Technische Universität München.

- G. Seyit, B. Rockel, W. Baumeister und J. Peters (2006). "Size matters for the tripeptidylpeptidase II complex from *Drosophila*: The 6-MDa spindle form stabilizes the activated state." J Biol Chem **281**(35): 25723-33.
- K. Siegers, T. Waldmann, M. R. Leroux, K. Grein, A. Shevchenko, E. Schiebel und F. U. Hartl (1999). "Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system." Embo J **18**(1): 75-84.
- A. Spirin (2002). "Cell-Free Translation Systems." Springer Verlag.
- A. Spirin und J. Swartz (2007). "Cell-free Protein Synthesis." WILEY-VCH Verlag.
- A. S. Spirin (2004). "High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins." Trends Biotechnol **22**(10): 538-45.
- A. S. Spirin, V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov und Y. B. Alakhov (1988). "A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield." Science **242**(4882): 1162-4.
- M. Stemp (2007). "Analysis of Chaperone Function in Multi-domain Protein Folding." Doktorarbeit, Universität Heidelberg.
- M. J. Stemp, S. Guha, F. U. Hartl und J. M. Barral (2005). "Efficient production of native actin upon translation in a bacterial lysate supplemented with the eukaryotic chaperonin TRiC." Biol Chem **386**(8): 753-7.
- D. L. Stokes und D. J. DeRosier (1991). "Growth conditions control the size and order of actin bundles in vitro." Biophys J **59**(2): 456-65.
- J. K. Stoops, R. H. Cheng, M. A. Yazdi, C. Y. Maeng, J. P. Schroeter, U. Klueppelberg, S. J. Kolodziej, T. S. Baker und L. J. Reed (1997). "On the unique structural organization of the *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex." J Biol Chem **272**(9): 5757-64.
- T. Tamura, I. Nagy, A. Lupas, F. Lottspeich, Z. Cejka, G. Schoofs, K. Tanaka, R. De Mot und W. Baumeister (1995). "The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*." Curr Biol **5**(7): 766-74.
- K. A. Taylor und R. M. Glaeser (1974). "Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals." Science **186**(4168): 1036-7.
- G. Tian, I. E. Vainberg, W. D. Tap, S. A. Lewis und N. J. Cowan (1995). "Specificity in chaperonin-mediated protein folding." Nature **375**(6528): 250-3.

- B. Tomkinson und A. C. Lindas (2005). "Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase." Int J Biochem Cell Biol **37**(10): 1933-7.
- M. Van Heel (1987). "Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction." Ultramicroscopy **21**(2): 111-23.
- D. A. Vinarov, C. L. Loushin Newman und J. L. Markley (2006). "Wheat germ cell-free platform for eukaryotic protein production." Febs J **273**(18): 4160-9.
- D. Voges, P. Zwickl und W. Baumeister (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." Annu Rev Biochem **68**: 1015-68.
- T. Wada, M. Shirouzu, T. Terada, Y. Ishizuka, T. Matsuda, T. Kigawa, S. Kuramitsu, S. Y. Park, J. R. Tame und S. Yokoyama (2003). "Structure of a conserved CoA-binding protein synthesized by a cell-free system." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **59**(Pt 7): 1213-8.
- J. Walz (1997). "Elektronentomographische Abbildung und dreidimensionale Mittelung von biologischen makromolekülen." Doktorarbeit, Technische Universität München.
- J. Walz, A. Erdmann, M. Kania, D. Typke, A. J. Koster und W. Baumeister (1998). "26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy." J Struct Biol **121**(1): 19-29.
- J. Walz, T. Tamura, N. Tamura, R. Grimm, W. Baumeister und A. J. Koster (1997a). "Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo." Mol Cell **1**(1): 59-65.
- J. Walz, D. Typke, M. Nitsch, A. J. Koster, R. Hegerl und W. Baumeister (1997b). "Electron Tomography of Single Ice-Embedded Macromolecules: Three-Dimensional Alignment and Classification." J Struct Biol **120**(3): 387-95.
- J. Wang, J. J. Song, M. C. Franklin, S. Kamtekar, Y. J. Im, S. H. Rho, I. S. Seong, C. S. Lee, C. H. Chung und S. H. Eom (2001). "Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism." Structure **9**(2): 177-84.
- A. Wegner und G. Isenberg (1983). "12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(16): 4922-5.

- H. L. Wilson, M. S. Ou, H. C. Aldrich und J. Maupin-Furlow (2000). "Biochemical and physical properties of the Methanococcus jannaschii 20S proteasome and PAN, a homolog of the ATPase (Rpt) subunits of the eucaryal 26S proteasome." J Bacteriol **182**(6): 1680-92.
- K. A. Woodrow, I. O. Airen und J. R. Swartz (2006). "Rapid expression of functional genomic libraries." J Proteome Res **5**(12): 3288-300.
- Z. H. Zhou, D. B. McCarthy, C. M. O'Connor, L. J. Reed und J. K. Stoops (2001). "The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14802-7.
- U. Ziese, W. J. Geerts, T. P. Van Der Krift, A. J. Verkleij und A. J. Koster (2003). "Correction of autofocusing errors due to specimen tilt for automated electron tomography." J Microsc **211**(Pt 2): 179-85.
- F. Zühl, E. Seemüller, R. Golbik und W. Baumeister (1997a). "Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome." FEBS Lett **418**(1-2): 189-94.
- F. Zühl, T. Tamura, I. Dolenc, Z. Cejka, I. Nagy, R. De Mot und W. Baumeister (1997b). "Subunit topology of the Rhodococcus proteasome." FEBS Lett **400**(1): 83-90.
- P. Zwickl, J. Kleinz und W. Baumeister (1994). "Critical elements in proteasome assembly." Nat Struct Biol **1**(11): 765-70.
- P. Zwickl, E. Seemüller, B. Kapelari und W. Baumeister (2002). "The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis." Advances in Protein Chemistry **59**: 187-222.
- P. Zwickl, D. Voges und W. Baumeister (1999). "The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **354**(1389): 1501-11.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2004 bis April 2008 in der Abteilung Molekulare Strukturbiologie des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried, durchgeführt. Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für das gute Arbeitsklima bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Abteilung anfertigen zu können, sowie für seine Unterstützung und Anregungen bei dem durchgeführten Projekt.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Hartl und Markus Stemp danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Markus für die Einweisung und Ratschläge im Labor.

Bei Julio Ortiz möchte ich mich besonders bedanken für die gute Betreuung und anregende Diskussionen.

Martin Beck, Florian Brandt und Christine Kofler danke ich für die tollen Jahre, interessante Diskussionen und das Beantworten aller Fragen.

Peter Zwickl, Istvan Nagy und Oana Mihalache danke ich für ihre kompetente Hilfe im Labor und wichtige Ratschläge bei der Auswertung der Arbeiten.

Günter Pfeifer und Jürgen Plitzko danke ich für ihre Hilfe beim Umgang mit den Elektronenmikroskopen.

Friedrich Förster und Reiner Hegerl danke ich für die Beantwortung meiner Fragen bezüglich der Bildverarbeitung.

Na Sun, Roland Knispel, Istvan Nagy, Noa Medalia, Peter Zwickl und Gönül Seyit danke ich für die Bereitstellung der Plasmide.

Beate Rockel und Jürgen Peters danke ich für die Hilfe mit TPPII.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit bedanke ich mich bei Julio Ortiz, Christine Kofler, Florian Brandt, Martin Beck, Andrew Leis und Roland Knispel.

Am meisten danke ich meiner Familie für die Unterstützung während meiner Ausbildung und Kay für seine Motivation, Ratschläge und vieles mehr.