



Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie



**Untersuchungen zur Substrattranslokation  
in das 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum***

Karin Christa Felderer





Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie



**Untersuchungen zur Substrattranslokation  
in das 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum***

Karin Christa Felderer

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. Horst Kessler  
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister  
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Die Dissertation wurde am 03.11.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.01.2006 angenommen.



---

There is no sadder sight in the world than to see  
a beautiful theory killed by a brutal fact.  
*Thomas Henry Huxley (1825-1895), brit. Zoologe*



---

**INHALT**

|  |            |
|--|------------|
| <b>Abbildungen.....</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>Tabellen.....</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>Abkürzungen.....</b>  | <b>XII</b> |
| <b>1 Zusammenfassungen.....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1 Zusammenfassung .....  | 1          |
| 1.2 Summary.....   | 3          |
| <b>2 Einleitung .....</b>  | <b>5</b>   |
| 2.1 Das 20S Proteasom.....   | 6          |
| 2.1.1 Vorkommen und Zusammensetzung .....  | 6          |
| 2.1.2 Molekularer Aufbau .....   | 7          |
| 2.1.3 Katalytischer Mechanismus .....  | 9          |
| 2.1.4 Inhibierung mit clasto-Lactacystin $\beta$ -Lacton .....                   | 12         |
| 2.1.5 Translokation von Substratmolekülen.....                                   | 13         |
| 2.2 Methoden zur Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen in<br>Proteinen ..... | 14         |
| 2.2.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie .....                                  | 15         |
| 2.2.2 Röntgenstrukturanalyse.....  | 17         |
| 2.2.3 Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie.....                          | 19         |
| 2.2.4 Röntgenkleinwinkelstreuung .....   | 20         |
| 2.3 Enzymkinetik .....   | 22         |
| 2.4 Aufgabenstellung .....   | 25         |
| <b>3 Material und Methoden .....</b>   | <b>27</b>  |
| 3.1 Material.....  | 27         |
| 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....                                   | 27         |
| 3.1.2 Geräte.....  | 30         |
| 3.1.3 Kits und Standards .....   | 33         |
| 3.1.4 Enzyme und Antikörper .....  | 34         |
| 3.1.5 Bakterienstämme und Medien .....   | 35         |
| 3.1.6 Puffer und Lösungen .....  | 37         |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.1.6.1    | Lösungen für molekularbiologische Arbeitsmethoden .....   | 37        |
| 3.1.6.2    | Lösungen für biochemische Arbeitsmethoden .....   | 37        |
| 3.1.6.3    | Lösungen für immunologische Arbeitsmethoden .....   | 40        |
| 3.1.7      | <i>Plasmide</i> .....   | 41        |
| 3.1.8      | <i>Primer</i> .....   | 42        |
| <b>3.2</b> | <b>Kulturbedingungen von <i>E.coli</i></b> .....  | <b>44</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Molekularbiologische Methoden</b> .....  | <b>44</b> |
| 3.3.1      | <i>Herstellung chemisch kompetenter E.coli-Zellen</i> .....   | 44        |
| 3.3.2      | <i>Hitzeschocktransformation</i> .....  | 44        |
| 3.3.3      | <i>Zielgerichtete Mutagenese</i> .....  | 45        |
| 3.3.4      | <i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli</i> .....  | 46        |
| 3.3.5      | <i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i> .....   | 47        |
| 3.3.6      | <i>Restriktionsverdau von DNA</i> .....   | 47        |
| 3.3.7      | <i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....  | 48        |
| 3.3.8      | <i>DNA-Sequenzierung</i> .....  | 48        |
| <b>3.4</b> | <b>Biochemische Methoden</b> .....  | <b>49</b> |
| 3.4.1      | <i>Expression von Strukturgenen</i> .....   | 49        |
| 3.4.1.1    | Rekombinante Expression des 20S Proteasoms aus<br>Thermoplasma acidophilum in E.coli mit IPTG-Induktion ..... | 49        |
| 3.4.1.2    | Rekombinante Expression des 20S Proteasoms aus<br>Thermoplasma acidophilum in E.coli mit Autoinduktion .....  | 50        |
| 3.4.1.3    | Rekombinante Expression von GFP in E.coli mit<br>IPTG-Induktion .....   | 50        |
| 3.4.2      | <i>Zellaufschluss von E.coli</i> .....  | 51        |
| 3.4.3      | <i>Hitzefällung der E.coli Proteine</i> .....   | 51        |
| 3.4.4      | <i>Ni-Affinitätschromatographie</i> .....   | 52        |
| 3.4.5      | <i>Gelfiltration</i> .....  | 53        |
| 3.4.6      | <i>Automatisierte Aufreinigung mittels ÄKTA 3D-Kit</i> .....  | 54        |
| 3.4.7      | <i>Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)</i> .....   | 55        |
| 3.4.7.1    | SDS-PAGE .....  | 55        |
| 3.4.7.2    | Native PAGE .....   | 56        |
| 3.4.7.3    | Blaue native PAGE .....   | 57        |
| 3.4.7.4    | Coomassie-Heiß-Färbung .....  | 57        |
| 3.4.8      | <i>Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen</i> .....   | 58        |
| 3.4.8.1    | Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD .....  | 58        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 3.4.8.2     | Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten.....                            | 58        |
| 3.4.9       | <i>Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen</i> .....                                   | 60        |
| <b>3.5</b>  | <b>Immunologische Methoden</b> .....  | <b>60</b> |
| 3.5.1       | <i>Elektroblotting (Western Blot)</i> .....   | 60        |
| 3.5.2       | <i>Detektion mittels Farbstoffreaktion</i> .....  | 61        |
| 3.5.3       | <i>Detektion mittels Chemilumineszenz</i> .....   | 61        |
| <b>3.6</b>  | <b>Bestimmung der enzymatischen Aktivität</b> .....   | <b>62</b> |
| <b>3.7</b>  | <b>Ent- und Rückfaltung der Modellsubstrate</b> .....   | <b>63</b> |
| 3.7.1       | <i>Cytochrom c</i> .....  | 64        |
| 3.7.2       | <i>GFP</i> .....  | 64        |
| <b>3.8</b>  | <b>Bildung der „Host-Guest“ Komplexe</b> .....  | <b>65</b> |
| 3.8.1       | <i>Bildung der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c</i> .....                                  | 65        |
| 3.8.2       | <i>Bildung der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP</i> .....  | 66        |
| 3.8.3       | <i>Kontrollen</i> .....   | 66        |
| <b>3.9</b>  | <b>Spektroskopische Untersuchung der „Host-Guest“ Komplexe</b> .....                            | <b>67</b> |
| <b>3.10</b> | <b>Transmissions-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse</b> ....                       | <b>67</b> |
| 3.10.1      | <i>Probenpräparation und elektronenmikroskopische Aufnahmen</i> .....                           | 68        |
| 3.10.2      | <i>Einzelpartikelanalyse der negativ kontrastierten Proben</i> .....                            | 68        |
| 3.10.3      | <i>Einzelpartikelanalyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben</i> .69                 |           |
| <b>3.11</b> | <b>Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse</b> .....   | <b>70</b> |
| 3.11.1      | <i>Kristallisation</i> .....  | 70        |
| 3.11.2      | <i>Datensammlung</i> .....  | 71        |
| 3.11.3      | <i>Strukturlösung</i> .....   | 71        |
| <b>3.12</b> | <b>Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie</b> .....                                       | <b>71</b> |
| <b>3.13</b> | <b>Röntgenkleinwinkelstreuung</b> .....   | <b>71</b> |
| <b>4</b>    | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>73</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Mutagenese des 20S Proteasoms</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>4.2</b>  | <b>Expression und Isolierung des 20S Proteasoms</b> .....                                       | <b>74</b> |
| 4.2.1       | <i>Expression und Isolierung des Wildtyps und der <math>\Delta T1A\beta</math>-Mutante</i> .... | 74        |
| 4.2.2       | <i>Expression und Isolierung aller übrigen Mutanten des 20S Proteasoms</i> .....                | 77        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| <b>4.3</b>  | <b>Expression und Isolierung von GFP</b> .....   | <b>83</b>  |
| <b>4.4</b>  | <b>Ent- und Rückfaltung der Modellsubstrate</b> .....  | <b>85</b>  |
| 4.4.1       | <i>Cytochrom c</i> .....   | 85         |
| 4.4.2       | <i>GFP</i> .....   | 87         |
| <b>4.5</b>  | <b>Bestimmung der Extinktionskoeffizienten</b> .....   | <b>89</b>  |
| <b>4.6</b>  | <b>Herstellung der „Host-Guest“ Komplexe</b> .....   | <b>90</b>  |
| 4.6.1       | <i>„Host-Guest“ Komplexe des inhierten 20S Proteasoms</i> .....  | 91         |
| 4.6.2       | <i>„Host-Guest“ Komplexe der <math>\Delta T1A\beta</math>-Mutante des 20S Proteasoms</i> ..                | 93         |
| <b>4.7</b>  | <b>PAGE-Analyse der „Host-Guest“ Komplexe</b> .....  | <b>95</b>  |
| <b>4.8</b>  | <b>Spektroskopische Analyse der „Host-Guest“ Komplexe</b> .....  | <b>98</b>  |
| <b>4.9</b>  | <b>Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse</b> .....   | <b>100</b> |
| 4.9.1       | <i>Negativ kontrastierte Proben</i> .....  | 100        |
| 4.9.1.1     | Alignierung der Einzelpartikel .....   | 101        |
| 4.9.1.2     | Multivariate statistische Analyse und Klassifizierung .....  | 103        |
| 4.9.1.3     | Differenz der Mittelungen .....  | 104        |
| 4.9.1.4     | Analyse der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP.....   | 106        |
| 4.9.1.5     | Analyse der gemischten Proben .....  | 107        |
| 4.9.2       | <i>In vitrifiziertem Eis eingebettete Proben</i> .....   | 109        |
| 4.9.2.1     | Alignierung der Einzelpartikel .....   | 110        |
| 4.9.2.2     | Multivariate statistische Analyse .....  | 112        |
| 4.9.2.3     | Differenz der Mittelungen .....  | 112        |
| <b>4.10</b> | <b>Röntgenkristallographie</b> .....   | <b>114</b> |
| 4.10.1      | <i>Kristallisation und Datensammlung</i> .....   | 114        |
| 4.10.2      | <i>Struktur der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c</i> .....  | 116        |
| 4.10.3      | <i>Vergleich der Strukturen der „Host-Guest“ Komplexe und des Wildtyps</i> .....                           | 117        |
| <b>4.11</b> | <b>Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie</b> .....  | <b>120</b> |
| 4.11.1      | <i>Vergleich der Massenspektren des 20S Proteasoms und der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c</i> ..... | 120        |
| 4.11.2      | <i>Vergleich der Massenspektren der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c und mit GFP</i> .....            | 121        |
| <b>4.12</b> | <b>Röntgenkleinwinkelstreuung</b> .....  | <b>123</b> |
| <b>4.13</b> | <b>Proteolytische Aktivität der Mutanten des 20S Proteasoms</b> .....                                      | <b>125</b> |
| <b>5</b>    | <b>Diskussion</b> .....  | <b>135</b> |
| 5.1         | <b>Expression und Isolierung des 20S Proteasoms und GFPs</b> .....   | <b>135</b> |

---

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| <b>5.2</b> | <b>Herstellung der „Host-Guest“ Komplexe .....</b>                                    | <b>136</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Instabilität der <math>\Delta T1A\beta</math>-Mutante des 20S Proteasoms .....</b> | <b>137</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Mechanismus der Substrattranslokation ins 20S Proteasom .....</b>                  | <b>138</b> |
| 5.4.1      | <i>Stöchiometrie der „Host-Guest“ Komplexe.....</i>                                   | <i>138</i> |
| 5.4.2      | <i>Lokalisation der Substrate innerhalb der „Host-Guest“<br/>Komplexe.....</i>        | <i>139</i> |
| 5.4.3      | <i>Strukturelle Änderungen des 20S Proteasoms bei der<br/>Translokation .....</i>     | <i>140</i> |
| <b>5.5</b> | <b>Ausblick .....</b>   | <b>142</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literatur .....</b>  | <b>145</b> |
|            | <b>Danksagung.....</b>  | <b>155</b> |

**ABBILDUNGEN**

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Abb. 2.1: | Model der Struktur des 26S Proteasoms, zusammengesetzt aus der dreidimensionalen Rekonstruktion elektronenmikroskopischer Aufnahmen des 26S Proteasoms aus <i>Drosophila melanogaster</i> und der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus <i>Thermoplasma acidophilum</i> . | 6  |
| Abb. 2.2: | Schematische Darstellung der Organisation der Untereinheiten im 20S Proteasom.   | 7  |
| Abb. 2.3: | 20S Proteasom aus dem Archaeobakterium <i>Thermoplasma acidophilum</i> , basierend auf den Daten der Röntgenstrukturanalyse. a) Aufsicht auf die $\alpha$ -Ringe, b) Seitenansicht und c) Querschnitt entlang der siebenzähligen Achse.  | 8  |
| Abb. 2.4: | Röntgenkristallstruktur der beiden Untereinheiten des 20S Proteasoms aus <i>Thermoplasma acidophilum</i> .   | 9  |
| Abb. 2.5: | Mechanismus der autokatalytischen Prozessierung des Propeptids zur Generierung der katalytisch aktiven $\beta$ -Untereinheit des 20S Proteasoms.   | 10 |
| Abb. 2.6: | Katalytischer Mechanismus der Proteolyse durch das 20S Proteasom.  | 11 |
| Abb. 2.7: | Mechanismus der Inhibierung von 20S Proteasomen mit Lactacystin.   | 12 |
| Abb. 2.8: | Reaktionsgleichung einer enzymatisch katalysierten Reaktion nach MICHAELIS-MENTEN.   | 22 |
| Abb. 2.9: | Allgemeiner Mechanismus der Substratinhibierung bei zwei möglichen Substratbindestellen im Enzym.  | 24 |
| Abb. 4.1: | 1 % Agarosegel des Restriktionsverdaus der Plasmid-DNA aller verwendeter Mutanten des 20S Proteasoms.  | 74 |
| Abb. 4.2: | Chromatogramm des Laufs der Ni-Affinitätssäule HisTrap™ HP zur Aufreinigung des Wildtyp 20S Proteasoms.  | 75 |
| Abb. 4.3: | 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen aus der Ni-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des 20S Proteasom Wildtyps.  | 76 |
| Abb. 4.4: | Chromatogramm des Laufs der Gelfiltration zur Aufreinigung des 20S Proteasom Wildtyps.   | 76 |
| Abb. 4.5: | 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen nach der Gelfiltration zur Aufreinigung des 20S Proteasom Wildtyps.  | 77 |
| Abb. 4.6: | Chromatogramme der automatisierten Aufreinigung der vier Mutanten S95A $\alpha$ , Q98A $\alpha$ , E99A $\alpha$ und R115A $\alpha$ mittels des ÄKTA-3D-Kits.   | 79 |

---

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Abb. 4.7:  | 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen aus der automatisierten Aufreinigung der vier Mutanten S95A $\alpha$ , Q98A $\alpha$ , E99A $\alpha$ und R115A $\alpha$ mittels des ÄKTA 3D-Kits. ....  | 80 |
| Abb. 4.8:  | 4-20 % Tris-Glycin PAGE der verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms. a) SDS-PAGE; b) Nativ-PAGE.....  | 81 |
| Abb. 4.9:  | Elektronenmikroskopische Abbildung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mutanten des 20S Proteasoms.....   | 82 |
| Abb. 4.10: | Chromatogramm des Laufs der Ni-Affinitätsäule HisTrap™ zur Aufreinigung von His <sub>6</sub> -GFP. ....   | 83 |
| Abb. 4.11: | 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen aus der Ni-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von His <sub>6</sub> -GFP.....  | 84 |
| Abb. 4.12: | Chromatogramm des Laufs der Gelfiltration zur Aufreinigung von His <sub>6</sub> -GFP.....   | 84 |
| Abb. 4.13: | 12 %SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen nach der Gelfiltration zur Aufreinigung von His <sub>6</sub> -GFP. ....  | 85 |
| Abb. 4.14: | Absorptionsspektren von Cytochrom c in 2 M Guanidinhydrochlorid nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei verschiedenen Temperaturen.....  | 86 |
| Abb. 4.15: | Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz von GFP unter den Bedingungen der "Host-Guest" Komplex Bildung.....  | 87 |
| Abb. 4.16: | Emissionsspektren von nativem, entfaltetem und rückgefaltetem GFP nach Anregung bei 395 nm und relative Fluoreszenzen der Proben beim Emissionsmaximum.....   | 88 |
| Abb. 4.17: | Kalibrationsgerade zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Cytochrom c bei 409 nm. ....   | 90 |
| Abb. 4.18: | Prinzip der Herstellung von "Host-Guest" Komplexen.....   | 91 |
| Abb. 4.19: | Chromatogramm der Gelfiltration zur Isolierung der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c.....  | 92 |
| Abb. 4.20: | Chromatogramm der Gelfiltration zur Isolierung der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP. ....   | 92 |
| Abb. 4.21: | Chromatogramme der beiden Gelfiltrationsläufe zur Isolierung der Kontrollen ohne Erwärmung auf 60 °C und somit ohne Entfaltung der Substrate.....   | 93 |
| Abb. 4.22: | Ausschnitt aus den Chromatogrammen a) zur versuchten Isolierung der "Host-Guest" Komplexe der inaktiven $\Delta$ T1A $\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und b) der $\Delta$ T1A $\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms in Puffer..... | 94 |

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 4.23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der negativ kontrastierten Fraktionen aus den Gelfiltrationsläufen nach versuchter Bildung von „Host-Guest“ Komplexen der $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und des frisch aufgereinigten $\Delta T1A\beta$ -20S Proteasoms.....      | 95  |
| Abb. 4.24: 4-20 % Tris-Glycin Gele und Western Blots mit anschließender immunologischer Identifikation der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c bzw. GFP.....   | 97  |
| Abb. 4.25: Absorptionsspektrum der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c.....  | 98  |
| Abb. 4.26: a) Extinktionsspektrum und b) Emissionsspektrum der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP.....  | 99  |
| Abb. 4.27: Ausschnitt aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme der negativ kontrastierten Kontrolle Proteasom, tiefpassgefiltert bei der ersten Nullstelle der Kontrast-Transfer-Funktion.....  | 101 |
| Abb. 4.28: Zweidimensionale Alignierungen in Translation und Rotation der negativ kontrastierten Einzelpartikel mit der aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus <i>Thermoplasma acidophilum</i> berechneten Projektion der dreidimensionalen Elektronendichte in Seitenansicht als Referenz..... | 102 |
| Abb. 4.29: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der negativ kontrastierten Proben.....   | 103 |
| Abb. 4.30: Vorgehen zur Generierung einer kumulativen elektronenmikroskopischen Mittelung mit einheitlicher Orientierung der Partikel in Bezug auf deren Rotation um die zentrale Zylinderachse der 20S Proteasomen am Beispiel der Kontrolle Proteasom.....  | 104 |
| Abb. 4.31: Kumulative Mittelungen der Einzelpartikel mit negativer Kontrastierung in einheitlicher Orientierung.....  | 104 |
| Abb. 4.32: Elektronenmikroskopische Mittelungen und Differenzbilder der verschiedenen Proben mit negativer Kontrastierung.....  | 105 |
| Abb. 4.33: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der negativ kontrastierten "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP unter Verwendung einer Maske.....  | 106 |
| Abb. 4.34: Mittelungen der aus der multivariaten statistischen Analyse mit Maske erhaltenen Klassen der negativ kontrastierten "Host-Guest" Komplexe mit GFP.....   | 107 |
| Abb. 4.35: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der negativ kontrastierten gemischten Proben unter Verwendung einer Maske.....   | 108 |
| Abb. 4.36: Mittelungen der aus der multivariaten statistischen Analyse mit Maske erhaltenen Klassen der gemischten Proben mit negativer Kontrastierung.....   | 108 |

- Abb. 4.37: Ausschnitt aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Kontrolle Cytochrom c. a) Defokus  $-3,5 \mu\text{m}$ ; b) Defokus  $-2,5 \mu\text{m}$ . ..... 109
- Abb. 4.38: Zweidimensionale Multi-Referenz-Alignierungen in Translation und Rotation der in Eis eingebetteten Einzelpartikel mit den Projektionen der aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* berechneten dreidimensionalen Elektronendichte in Auf- und Seitenansicht als Referenz. .... 110
- Abb. 4.39: Erneute zweidimensionale Alignierungen in Translation und Rotation der in Eis eingebetteten Einzelpartikel in Seitenansicht. .... 111
- Abb. 4.40: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben. .... 112
- Abb. 4.41: Elektronenmikroskopische Mittelungen und Differenzbilder der verschiedenen in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben. .... 113
- Abb. 4.42: Typische Kristalle der "Host-Guest" Komplexe mit Cytochrom c (a) und GFP (b). .... 114
- Abb. 4.43: Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* und der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c. .... 116
- Abb. 4.44: Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* und der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c in der Porenregion der  $\alpha$ -Ringe. a) Pore der  $\alpha$ -Ringe aus der Vorkammer nach außen hin betrachtet. b) Detail eines die Pore begrenzenden Loops von schräg unten aus der Vorkammer heraus mit experimenteller Elektronendichte. .... 117
- Abb. 4.45: Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* und der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c an der Innenseite der Vorkammer des 20S Proteasoms. .... 118
- Abb. 4.46: Elektrostatische Potentiale an den Oberflächen der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* und der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c. a) Aufsicht auf den  $\alpha$ -Ring; b) Innere Oberfläche der zentralen Kammer; c) Innere Oberfläche der Vorkammer in Richtung des  $\alpha$ -Rings; d) Innere Oberfläche der Vorkammer in Richtung des  $\beta$ -Rings. 119
- Abb. 4.47: Tandem-Massenspektren des nativen 20S Proteasoms (A), der "Host-Guest" Komplexe mit Cytochrom c (B) und eines Gemischs bestehend aus 20S Proteasomen und Cytochrom c im Verhältnis 1:10 (C). .... 120

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 4.48: Tandem-Massenspektren der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (A und B) und GFP (C und D). Gezeigt sind die Ausschnitte der Spektren im Bereich der Peaks, die nach Abspaltung einer (A und C) bzw. zweier (B und D) $\alpha$ -Untereinheiten resultieren. ....                                       | 122 |
| Abb. 4.49: SAXS Steukurven des nativen und inhibierten 20S Proteasoms sowie der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c und GFP. ....   | 123 |
| Abb. 4.50: Experimentelle SAXS Streukurve des nativen 20S Proteasoms und berechnete Streukurve aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus <i>Thermoplasma acidophilum</i> . ....  | 124 |
| Abb. 4.51: Experimentelle SAXS Streukurve der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP und berechnete Streukurven aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus <i>Thermoplasma acidophilum</i> ohne Substrat, mit einem GFP-Molekül in der zentralen Kammer und mit einem GFP-Molekül in einer der Vorkammern. .... | 124 |
| Abb. 4.52: AMC-Kalibrationskurve zur Ermittlung der in den Aktivitätstests freigesetzten Konzentration an AMC. ....   | 125 |
| Abb. 4.53: Aktivitätsmessung des 20S Proteasom Wildtyps durch Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz während des Abbaus des fluorogenen Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC bei verschiedenen Substratkonzentrationen. ....   | 126 |
| Abb. 4.54: Vergleich des Substratumsatzes in Abhängigkeit der Substratkonzentration bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC durch den Wildtyp und die Glycin 127 $\alpha$ - und Glycin 128 $\alpha$ -Mutanten des 20S Proteasoms. ....  | 127 |
| Abb. 4.55: Vergleich des Substratumsatzes in Abhängigkeit der Substratkonzentration bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC durch den 20S Proteasom Wildtyp und die Mutanten bei denen Arginin 115 und dessen potentiellen Bindungspartner gegen Alanin ausgetauscht wurden. ....   | 128 |
| Abb. 4.56: Nichtlineare Regression zur Berechnung der kinetischen Konstanten des 20S Proteasoms bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC am Beispiel des Wildtyps. ....  | 129 |
| Abb. 4.57: Nichtlineare Regression zur Berechnung der kinetischen Konstanten des 20S Proteasoms bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC mit der R115A $\alpha$ -Mutante. ....   | 129 |
| Abb. 4.58: Vergleich der kinetischen Konstanten $K_M$ und $k_{kat}$ der verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms beim Abbau des Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC. ....  | 132 |

## TABELLEN

|           |   |
|-----------|---|
| Tab. 2.1: | Übersicht über die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden zur Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen in Proteinen. . 15      |
| Tab. 3.1: | Verwendete Bakterienstämme und deren Genotyp. .... 35   |
| Tab. 3.2: | Verwendete Plasmide und deren Antibiotikaresistenz. .... 41   |
| Tab. 3.3: | Sequenzen der verwendeten Primer für die zielgerichtete Mutagenese. .... 42   |
| Tab. 3.4: | Sequenzen der Sequenzierungsprimer. .... 43   |
| Tab. 3.5: | Reaktionsgemisch für die zielgerichtete Mutagenese zur Generierung verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms. .... 45                               |
| Tab. 3.6: | Programm des Thermocyclers für die zielgerichtete Mutagenese in zwei Stufen. .... 46  |
| Tab. 3.7: | Reaktionsgemische für den Restriktionsverdau der verwendeten Plasmide zur Überprüfung der Transformation. .... 47                                   |
| Tab. 3.8: | Einstellungen zur Aufnahme der elektronenmikroskopischen Abbildungen negativ kontrastierter und in vitrifiziertem Eis eingebetteter Proben. .... 68 |
| Tab. 4.1: | Ermittelte Absorptionen und berechnete molare Extinktionskoeffizienten des 20S Proteasoms und der Modellsubstrate Cytochrom c und GFP. .... 89      |
| Tab. 4.2: | Proben für die elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalyse. .... 100  |
| Tab. 4.3: | Anzahl der Partikel je Probe für die Einzelpartikelanalyse mit negativer Kontrastierung. .... 102   |
| Tab. 4.4: | Anzahl der Partikel je Probe für die Einzelpartikelanalyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben. .... 111                                 |
| Tab. 4.5: | Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken des Datensatzes der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c. .... 115                |
| Tab. 4.6: | Kinetische Konstanten des Abbaus von Suc-LLVY-AMC durch den Wildtyp und die verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms. .... 131                     |

## ABKÜRZUNGEN

### Allgemeine Abkürzungen

|                       |   |
|-----------------------|---|
| A                     | Ampere  |
| Å                     | Angström, $10^{-10}$ m  |
| AFM                   | engl. <i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie                   |
| AMC                   | 7-Amino-4-methylcoumarin  |
| Amp                   | Ampicillin  |
| APS                   | Ammoniumperoxodisulfat  |
| ATP                   | Adenosin-5'-Triphosphat   |
| AU                    | engl. <i>arbitrary units</i> , beliebige Einheit                                |
| $A_\lambda$           | Absorption bei der Wellenlänge $\lambda$  |
| BCIP/NBT              | 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat / Nitro blue Tetrazolium                       |
| bp                    | engl. <i>base pair</i> , Basenpaar  |
| BSA                   | engl. <i>Bovine Serum Albuminum</i> , bovines Serumalbumin                      |
| bzw.                  | beziehungsweise   |
| c                     | Konzentration   |
| ca.                   | circa   |
| Cam                   | Chloramphenikol   |
| CCD                   | engl. <i>charge coupled device</i>  |
| CID                   | engl. <i>collision-induced dissociation</i> , kollisionsinduzierte Dissoziation |
| Cyt c                 | Cytochrom c   |
| d                     | Schichtdicke  |
| Da                    | Dalton (1 Da = 1 g/mol)   |
| dest.                 | destilliert   |
| DESY                  | Deutsches Elektronen-Synchrotron  |
| DMSO                  | Dimethylsulfoxid  |
| DNA                   | engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure                     |
| ds                    | engl. <i>double stranded</i> , doppelsträngig                                   |
| DTT                   | 1,4-Dithiothreitol  |
| $\varepsilon_\lambda$ | molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge $\lambda$                    |

---

|                  |   |
|------------------|---|
| <i>E.coli</i>    | <i>Escherichia coli</i>   |
| ECL              | engl. <i>enhanced chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz                                 |
| EDTA             | Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure   |
| EM               | engl. <i>electron microscopy</i> , Elektronenmikroskop(ie)  |
| EMBL             | engl. <i>European Molecular Biology Laboratory</i>  |
| ESI-MS           | engl. <i>electrospray ionization mass spectrometry</i> , Elektrospray Ionisations Massenspektrometrie |
| ESRF             | engl. <i>European Synchrotron Radiation Facility</i>  |
| <i>et al.</i>    | <i>et alteri</i>  |
| ExPASy           | engl. <i>Expert Protein Analysis System</i>   |
| FPLC             | engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>   |
| FWHM             | engl. <i>full width at half maximum</i> , Halbwertsbreite   |
| g                | Gramm   |
| GFP              | engl. <i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein                                |
| h                | Stunde  |
| HASYLAB          | Hamburger Synchrotronstrahlungslabor  |
| HEPES            | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure   |
| HGC              | „Host-Guest“ Komplex  |
| His <sub>6</sub> | Hexahistidin  |
| HMW              | engl. <i>high molecular weight</i> , hohes Molekulargewicht   |
| HPLC             | engl. <i>high performance liquid chromatography</i>   |
| IMAC             | engl. <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>  |
| IPTG             | Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid  |
| k                | als Vorsilbe: kilo (10 <sup>3</sup> )   |
| k <sub>kat</sub> | katalytische Konstante  |
| K <sub>M</sub>   | MICHAELIS-Konstante   |
| l                | Liter   |
| LB               | Luria-Bertani-Medium  |
| μ                | als Vorsilbe: mikro (10 <sup>-6</sup> )   |
| M                | molar (mol/l)   |
| M                | als Vorsilbe: mega (10 <sup>6</sup> )   |

|                 |  |
|-----------------|--|
| M <sub>w</sub>  | Molekulargewicht   |
| m               | Meter  |
| m               | als Vorsilbe: milli (10 <sup>-3</sup> )  |
| MCP             | engl. <i>microchannel-plate</i> , Mikrokanalplatte   |
| Milli-Q         | deionisiertes Wasser   |
| min             | Minute   |
| MOPS            | Morpholinopropansulfonsäure  |
| MPI             | Max-Planck-Institut  |
| MS/MS           | Tandem-Massenspektrometrie   |
| MWCO            | engl. <i>molecular weight cut-off</i> , Molekulargewichts-Ausschlussgrenze   |
| n               | als Vorsilbe: nano (10 <sup>-9</sup> )   |
| Ntn             | engl. <i>N-terminal nucleophile</i>  |
| OD <sub>λ</sub> | optische Dichte (Absorption) bei der Wellenlänge λ   |
| Pa              | Pascal   |
| PAGE            | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| PCR             | engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion  |
| PDB             | engl. <i>protein data bank</i> , Protein Datenbank ( <a href="http://www.rcsb.org/pdb/">http://www.rcsb.org/pdb/</a> ) |
| PEG             | Polyethylenglykol  |
| pH              | negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Hydroxid-Ionen in wässriger Lösung                     |
| PP              | Polypropylen   |
| PS              | Polystyrol   |
| PVDF            | Polyvinylidenfluorid   |
| rpm             | engl. <i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute   |
| RT              | Raumtemperatur   |
| S               | Svedberg   |
| s               | Sekunde  |
| SAXS            | engl. <i>small angle x-ray scattering</i> , Röntgenkleinwinkelstreuung   |
| SDS             | Natriumdodecylsulfat   |
| SIB             | engl. <i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>   |
| SLS             | engl. <i>Swiss Light Source</i>  |

---

|              |   |
|--------------|---|
| SNOM         | engl. <i>scanning near field optical microscopy</i> , optische Nahfeldmikroskopie   |
| ss           | engl. <i>single stranded</i> , einzelsträngig                                       |
| Suc-LLVY-AMC | N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4-methylcoumarin                     |
| TAE          | Tris-Acetat-EDTA-Puffer   |
| TBS          | engl. <i>tris-buffered-saline</i> , Tris gepufferte isotonische Salzlösung          |
| TBS-T        | Tris bepufferte isotonische Salzlösung, versetzt mit Tween 20                       |
| TEM          | engl. <i>transmission electron microscopy</i> , Transmissions Elektronenmikroskopie |
| TEMED        | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin  |
| Tet          | Tetracyclin   |
| TOF          | engl. <i>time of flight</i> , Flugzeit  |
| Tris         | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| ™            | Trademark   |
| U            | Unit (internationale Enzymeinheit)  |
| UV           | ultraviolettes Licht  |
| V            | Volt  |
| v/v          | engl. <i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen                                |
| Vis          | sichtbares Licht  |
| w/v          | engl. <i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen                                |
| wt           | Wildtyp   |
| x g          | x-fache Erdbeschleunigung g ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )                            |

### **Aminosäuren**

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

### **Nukleobasen**

|   |         |
|---|---------|
| A | Adenin  |
| C | Cytosin |
| G | Guanin  |
| T | Thymin  |

---

Teile dieser Arbeit wurden Veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung:

M. Sharon, S. Witt, K. Felderer, B. Rockel, W. Baumeister, and C. Robinson (2005)  
20S proteasome keep substrates in store for continual degradation. Eingereicht PNAS.

K. Felderer, M.R. Groves, E. Pohl, and W. Baumeister and S. Witt (2005)  
Crystallization and preliminary X-ray analysis of host-guest complexes of the 20S  
proteasome. Manuskript in Vorbereitung.

K. Felderer, M.R. Groves, W. Baumeister and S. Witt (2005) Feeding of a giant with  
one tooth: The role of a single arginine residue for substrate translocation into the 20S  
Proteasome. Manuskript in Vorbereitung.



# 1 ZUSAMMENFASSUNGEN

## 1.1 Zusammenfassung

Das 20S Proteasom ist eine etwa 700 kDa schwere multikatalytische Protease, die ubiquitär in allen drei Lebensbereichen vorkommt. In Eukaryonten bildet es in Kombination mit den 19S Kappenkomplexen 26S Proteasomen, die zentralen proteolytischen Elemente des ATP-abhängigen Proteasom-Ubiquitin-Systems.

20S Proteasomen sind zylinderförmige Komplexe bestehend aus insgesamt 28 Untereinheiten, die aus vier gestapelten Ringen mit je 7 Untereinheiten aufgebaut sind. 14 dieser Untereinheiten werden als  $\alpha$ - und 14 als  $\beta$ -Untereinheiten bezeichnet, wobei die äußeren Ringe des 20S Proteasoms aus  $\alpha$ -, die inneren aus  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Der Zylinder ist von einem zentralen Kanal durchzogen, der sich an den Kontaktstellen der vier Ringe zu drei Kammern aufweitet, zwei Vorkammern und einer zentralen Kammer, in der sich die katalytisch aktiven Zentren befinden. Zum Abbau bestimmte entfaltete Proteine müssen in der Lage sein die 1,3 nm schmale Pore in den äußeren  $\alpha$ -Ringen zu passieren und durch die Vorkammer und eine weitere Einschnürung in die zentrale katalytische Kammer zu gelangen, wo sie in Peptide bestehend aus 7 bis 9 Aminosäuren gespalten werden.

Während die Röntgenkristallstrukturen von 20S Proteasomen aus einer Vielzahl von Organismen gelöst und der Mechanismus der Proteolyse aufgeklärt wurden, ist der der Substrattranslokation zugrunde liegende Mechanismus und die Funktion der beiden Vorkammern noch weitgehend ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden „Host-Guest“ Komplexe des mit *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton irreversibel inhibierten 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* mit Cytochrom c und GFP hergestellt. 20S Proteasomen und GFP wurden hierfür rekombinant in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt. Zur Komplexbildung wurde das jeweilige Substrat unter milden Bedingungen, die die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des 20S Proteasoms nicht beeinflussen, entfaltet und mit den inaktivierten 20S Proteasomen inkubiert. Anschließend wurden die Bedingungen so geändert, dass sich die Substrate zurückfalten, woraufhin der Anteil an Substratmolekülen, der sich innerhalb der 20S Proteasomen befindet, nicht mehr in der Lage ist die Kammern der 20S Proteasomen durch die schmale Öffnung zu verlassen.

Die Bildung der „Host-Guest“ Komplexe des inhibierten 20S Proteasoms konnte durch die Messung der Absorption des Eluats der Gelfiltration sowie durch SDS-, native und blaue native PAGE mit anschließender immunologischer Detektion der Substratmoleküle bewiesen werden. Untersuchungen an Kontrollen, bei denen die Substratmoleküle vor der Inkubation mit den 20S Proteasomen nicht entfaltet wurden,

schließen eine unspezifische Bindung der Substratmoleküle an die äußere Oberfläche der 20S Proteasomen aus.

Anschließend wurden die Komplexe mittels verschiedener biophysikalischer Methoden untersucht. Durch elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse mit negativer Kontrastierung konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP im Vergleich zu verschiedenen Kontrollen zusätzliche Masse befindet. Dies konnte durch Analyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben bestätigt werden, wobei hier auch im Falle von Cytochrom c als Substrat zusätzliche Masse zu erkennen war. Eine genaue Lokalisation der Substratmoleküle war aufgrund der geringen Auflösung des vorliegenden Datensatzes nicht möglich. Die Klassifizierung der Partikel mit negativer Kontrastierung deutet jedoch auf eine eher asymmetrische Belegung der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP hin. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung gestützt. Die Streukurven der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c unterscheiden sich nicht von denjenigen des Wildtyps. Diejenigen mit GFP als Substrat können am besten durch ein Modell mit einem GFP-Molekül in einer der Vorkammern des 20S Proteasoms angenähert werden.

Die Analyse der „Host-Guest“ Komplexe mittels Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie konnte zeigen, dass sich nach Abspaltung einer  $\alpha$ -Untereinheit im Tandem-Massenspektrum drei Cytochrom c- und zwei GFP-Moleküle innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe befinden.

Anhand der Röntgenkristallstruktur der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c, die mit einer Auflösung von 3,4 Å gelöst wurde, konnten einige Aminosäuren identifiziert werden, deren Orientierung sich im „Host-Guest“ Komplex von derjenigen im nativen 20S Proteasom unterscheidet. Dabei handelt es sich zum einen um die beiden Glycine 127 und 128 der  $\alpha$ -Untereinheiten, die sich in einem Loop befinden, der die Pore der 20S Proteasomen bildet und die somit eine potentielle Rolle beim „Gating“ spielen könnten. Zum anderen handelt es sich um Arginin 115 der  $\alpha$ -Untereinheit, dessen Seitenkette im nativen 20S Proteasom in die Vorkammer ragt, während es im „Host-Guest“ Komplex Wasserstoffbrückenbindungen mit Serin 95 und Glutamat 99 ausbildet. Dies hat einen drastischen Effekt auf das elektrostatische Potential der inneren Oberfläche der Vorkammern, die im Komplex geladen und im nativen 20S Proteasom eher neutral sind. Der Einfluss dieser Aminosäuren auf die Aktivität der 20S Proteasomen wurde durch die Analyse der Enzymkinetik verschiedener Mutanten beim Abbau des fluorogenen Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC untersucht. Hieraus ergaben sich interessante Einblicke in die Vorgänge während der Substrattranslokation in das 20S Proteasom.

## 1.2 Summary

The 20S proteasome is a 700 kDa multicatalytic protease which is ubiquitously distributed in all three domains of life. In eukaryotes it is capped by one or two 19S regulatory particles, forming the 26S proteasome, which is the proteolytic core of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome-system.

20S proteasomes are cylinder shaped complexes composed of 28 subunits, 14 of the  $\alpha$ - and 14 of the  $\beta$ -type, which form a stack of four heptameric rings. The two outer rings are formed by  $\alpha$ -subunits, sandwiching the two inner rings, built by the  $\beta$ -subunits. The cylinder is traversed by a central channel which widens into three cavities, two antechambers and one central chamber which harbours the active sites. Unfolded polypeptides destined for degradation must wind their way through a system of internal cavities and constrictions until they reach the active sites in the central cavity, where they are cleaved resulting in peptides consisting of 7 to 9 amino acids.

While the x-ray structures of 20S proteasomes from several organisms have been solved and the catalytic mechanism of protein degradation by the 20S proteasome has been extensively studied, the mechanisms of substrate translocation into the 20S proteasome and the function of the two antechambers are still an objective of investigations.

In the course of this work “host-guest” complexes of the 20S proteasome from *Thermoplasma acidophilum* with cytochrome c and GFP have been formed. 20S proteasomes and GFP were recombinantly overexpressed using *E.coli* and purified to homogeneity. Complexes are formed by thermally and chemically denaturing the substrates under conditions, which do not alter the structural and functional state of the *Thermoplasma acidophilum* 20S proteasome. Unfolded substrates are then incubated with 20S proteasomes. Cleavage of the unfolded protein during the time scale of the experiment is prevented by specific irreversible inhibition of the proteasome prior to complex formation. Subsequently conditions are changed to refold the substrates whereupon the portion of guests located within the internal cavities of the 20S proteasomes are trapped, since they are incapable of passing the narrow pore in the  $\alpha$ -rings.

The successful formation of “host-guest” complexes using the inhibited 20S proteasomes could be confirmed by monitoring the absorbance of the eluate after size exclusion chromatography. Furthermore, SDS-, native and blue native PAGE followed by immunological detection of the substrate molecules proves the presence of either cytochrome c or GFP within the 20S proteasomes. Investigations of controls without unfolding of the substrates prior to incubation with 20S proteasomes could exclude unspecific binding of the substrates at the outer surfaces of the 20S proteasomes.

The “host-guest” complexes were analyzed using a variety of biophysical methods. Electron microscopy followed by single particle analysis of negatively stained samples

showed the presence of additional masses within the inner cavities of the “host-guest” complexes with GFP as compared to several controls. This could be confirmed by the analysis of particles embedded in vitrified ice. Using cryo-EM additional masses were also visible within the “host-guest” complexes with cytochrome c. The definite localization of the substrates is not possible due to limited resolution of the obtained dataset. Classification of the negatively stained particles indicates asymmetric occupancy of the “host-guest” complexes with GFP. This finding is supported by the results of the small angle x-ray scattering experiments. Scattering curves of the “host-guest” complexes with cytochrome c are indistinguishable from those of the native and the inhibited 20S proteasomes. The scattering curves of the “host-guest” complexes with GFP can be fitted best by a model with one GFP-molecule located in one of the antechambers of the 20S proteasome.

Electrospray ionization mass spectrometry of the “host-guest” complexes revealed that after dissociation of one  $\alpha$ -subunit a maximum of three cytochrome c and two GFP molecules can be identified within the complexes in the tandem spectra.

The x-ray structure of the “host-guest” complexes with cytochrome c was solved to 3.4 Å resolution. Comparing this structure with the structure of the native 20S proteasome could reveal that several amino acids change their orientation upon substrate translocation. Two neighbored glycines at positions 127 and 128 of the  $\alpha$ -subunits located in loops forming the pore of the  $\alpha$ -rings perform an upwards flipping movement upon substrate translocation, thus being putatively involved in gating. Furthermore arginine 115 of the  $\alpha$ -subunits points towards the empty antechamber in the native structure, but is engaged in hydrogen bonds with serine 95 and glutamate 99 in the complexes. This has a cooperative effect on the electrostatic potential of the inner surfaces of the antechambers, which are charged in the “host-guest” complexes but rather neutral in the native 20S proteasome. The influence of these amino acids on the activity of the 20S proteasomes was analyzed by enzyme kinetics of the degradation of the fluorogenic tetrapeptide by several mutants. This provided interesting insights into the events occurring during substrate translocation.

## 2 EINLEITUNG

Proteine gehören zu den Grundbausteinen jeder Zelle und nehmen wegen der enormen Vielzahl an Aufgaben, die sie im Organismus bewältigen, eine herausragende Rolle ein (nach Jöns Jakob Berzelius, griech. *protos*: "erstes, wichtigstes" und *proteuo*: "ich nehme den ersten Platz ein"). Sie erfüllen als Enzyme die Funktion biologischer Katalysatoren, sind an der Regulation des Zellstoffwechsels und der Interaktion zwischen Zellen beteiligt und dienen dem Aufbau spezifischer Strukturen. Die Ausbildung und der Erhalt der nativen Struktur und damit auch die Funktion von Proteinen in der Zelle werden durch eine ständige Qualitätskontrolle, bestehend aus einem Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, Faltung und Proteinabbau, gewährleistet.

Der gezielte Proteinabbau ermöglicht die Entsorgung von Proteinen, die aufgrund von Fehlern in der Transkription bzw. Translation, oder durch Oxidation und andere Stressfaktoren wie z.B. Hitze missgefaltet oder geschädigt sind und andernfalls zur Aggregation neigen würden [Witt und Baumeister, 2002]. Zudem stellen proteolytische Enzyme ein wichtiges Instrument der Zellen zur schnellen und irreversiblen Steuerung der Lebensdauer regulatorischer Proteine und somit deren Konzentration dar [Hilt und Wolf, 1996]. Eine weitere wichtige Aufgabe in höheren Eukaryoten ist die Generierung immunokompetenter Peptide durch den Abbau von Antigenen [Goldberg, *et al.*, 1995].

Die Proteolyse muss dabei selektiv verlaufen, um einen unkontrollierten Abbau von Proteinen zu verhindern. In eukaryotischen Zellen haben sich hierzu im Laufe der Evolution zwei qualitativ unterschiedliche Wege etabliert. Zum einen findet der Proteinabbau innerhalb spezialisierter Zellorganellen, den Lysosomen, statt. Zum Abbau bestimmte Proteine werden über spezifische Mechanismen in die Lysosomen eingeschleust, wo sie von hochreaktiven Proteasen mit niedrigem pH-Optimum gespalten werden [Harter und Wieland, 1996]. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Proteine aus dem extrazellulären Raum. Für den Abbau der zelleigenen Proteine im Cytoplasma und im Kern existiert ein zweiter, intrazellulärer Proteinabbauweg, der über einen ATP-abhängigen Enzymkomplex, das 26S Proteasom, verläuft.

Das 26S Proteasom ist in der Lage selektiv Proteinsubstrate zu spalten, die kovalent mit Ubiquitin markiert wurden [Hochstrasser, 1996]. Für die Aufklärung der Mechanismen des Proteasom-Ubiquitin-Systems bekamen Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose 2004 den Nobelpreis für Chemie verliehen. Das 26S Proteasom ist eine 2,5 MDa schwere Proteinabbaumaschinerie, die aus ca. 35 verschiedenen Untereinheiten besteht. Es ist aus zwei Teilkomplexen aufgebaut (siehe Abb. 2.1). Im Inneren des zylinderförmigen Kernstücks, dem 20S Proteasom, befinden sich die aktiven Zentren für die Proteolyse. An den beiden Stirnseiten sitzen asymmetrisch die

beiden 19S Kappenkomplexe, deren Aufgabe die Erkennung, Entfaltung und Einschleusung der ubiquitinierten Proteinsubstrate ist [Coux, *et al.*, 1996].

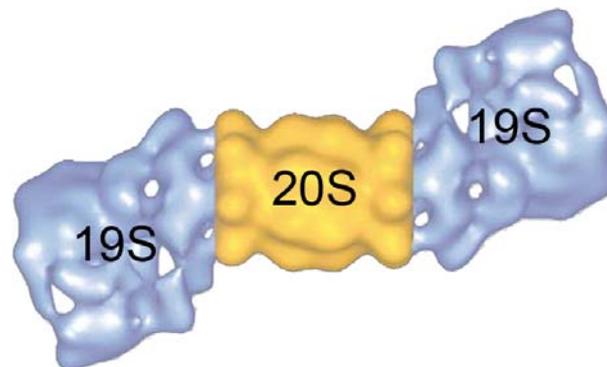


Abb. 2.1: Model der Struktur des 26S Proteasoms, zusammengesetzt aus der dreidimensionalen Rekonstruktion elektronenmikroskopischer Aufnahmen des 26S Proteasoms aus *Drosophila melanogaster* und der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* [Walz, *et al.*, 1998].

Während sich das Vorkommen des 26S Proteasoms auf Eukaryonten beschränkt, konnte dessen zentraler Komplex, das 20S Proteasom auch in Archebakterien [Dahlmann, *et al.*, 1989] und Eubakterien [Tamura, *et al.*, 1995] nachgewiesen werden.

## 2.1 Das 20S Proteasom

Das 20S Proteasom (EC 3.4.99.46), ein hochmolekularer multikatalytischer Enzymkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 700 kDa, ist ubiquitär in allen drei Domänen vertreten und nimmt in einigen Geweben eukaryontischer Organismen bis zu 1 % des gesamten löslichen Zellproteins ein [Tanaka, *et al.*, 1986].

Im Folgenden werden das Vorkommen und die Zusammensetzung der Untereinheiten, der molekulare Aufbau, der katalytische Mechanismus und die Inhibierung des 20S Proteasoms näher beschrieben.

### 2.1.1 Vorkommen und Zusammensetzung

Mit der zunehmenden Anzahl sequenzierter Genome scheint sich abzuzeichnen, dass Proteasomen ubiquitär und essentiell für Eukaryonten [Heinemeyer, 2000], ubiquitär aber nichtessentiell für Archebakterien [Ruepp, *et al.*, 1998] und selten und nichtessenziell für Bakterien [Knipfer und Shrader, 1997] sind. Die molekulare Architektur des 20S Proteasoms ist von Archaea bis hin zum Menschen hoch konserviert, während die Komplexität der Zusammensetzung der Untereinheiten zunimmt [Baumeister und Lupas, 1997]. Das prokaryontische Enzym ist, von wenigen Ausnahmen abgesehen, aus nur zwei Typen von Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , aufgebaut. Das eukaryontische Enzym dahingegen besteht typischerweise aus 14 verschiedenen Untereinheiten, welche aufgrund ihrer Sequenzhomologie in Untereinheiten des  $\alpha$ - und

$\beta$ -Typen klassifiziert werden [Groll, *et al.*, 1997]. In höheren Eukaryonten mit adaptivem Immunsystem erhöht sich die Komplexität durch Austausch der konstitutiv exprimierten aktiven  $\beta$ -Untereinheiten gegen induzierbare homologe Untereinheiten [Rechsteiner, *et al.*, 2000]. Ein Vergleich der verfügbaren Sequenzen von Untereinheiten des Proteasoms zeigte, dass die beiden Typen,  $\alpha$  und  $\beta$ , aus einer Genduplikation hervorgingen, die früh in der Evolution stattfand [Hughes, 1997; Zwickl, *et al.*, 1992]. So weisen z.B. die beiden Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* eine Sequenzhomologie mit 24 % Identität auf.

### 2.1.2 Molekularer Aufbau

Trotz der zunehmenden Komplexität der Zusammensetzung der Untereinheiten ist die Quartärstruktur des 20S Proteasoms aus allen drei Domänen hoch konserviert. Die 28 Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* bilden einen 14,8 nm langen zylindrischen Enzymkomplex, der aus vier gestaffelten Ringen mit siebenzähliger Symmetrie aufgebaut ist und einen äußeren Durchmesser von 11,3 nm hat [Pühler, *et al.*, 1992] (siehe Abb. 2.2). Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass die beiden äußeren Ringe des 20S Proteasoms aus  $\alpha$ -Untereinheiten, die beiden inneren Ringe aus  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sind [Grziwa, *et al.*, 1991].

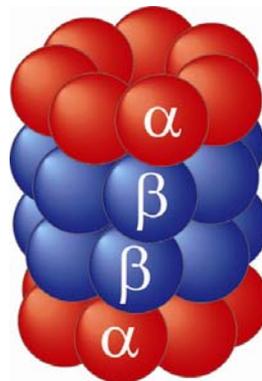


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Organisation der Untereinheiten im 20S Proteasom. Die 28 Untereinheiten bilden einen Zylinder bestehend aus vier gestaffelten Ringen mit siebenzähliger Symmetrie. Die beiden äußeren Ringe bestehen aus  $\alpha$ -, die beiden inneren Ringe aus  $\beta$ -Untereinheiten.

Die Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* [Löwe, *et al.*, 1995] (PDB Eintrag: 1PMA) lieferte weitere wichtige Informationen zur Struktur und Funktion des Enzymkomplexes. Der Zylinder ist von einem zentralen Kanal durchzogen, dessen Zugang durch eine 1,3 nm enge Pore in den  $\alpha$ -Ringen beschränkt wird (siehe Abb. 2.3). Die beiden  $\beta$ -Ringe schließen eine zentrale Kammer, mit einem Durchmesser von ca. 5 nm ein, in der sich die aktiven Zentren des 20S Proteasoms befinden. Die zentrale Kammer ist durch schmale Einschnürungen mit zwei Vorkammern verbunden. Diese befinden sich jeweils zwischen einem  $\alpha$ - und einem

$\beta$ -Ring und sind etwas kleiner als die zentrale Kammer. In prokaryontischen 20S Proteasomen mit je 14 identischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind die Ringe homomer und es liegt eine  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  Stöchiometrie vor. 20S Proteasomen aus Eukaryonten enthalten 14 verschiedene Untereinheiten, die jeweils in zweifacher Ausführung vertreten sind und innerhalb des Komplexes eine genau definierte Position einnehmen. Somit ergibt sich eine  $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$  Stöchiometrie und die Symmetrie reduziert sich von D7 im 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* auf C2 in Eukaryonten [Groll, *et al.*, 1997].

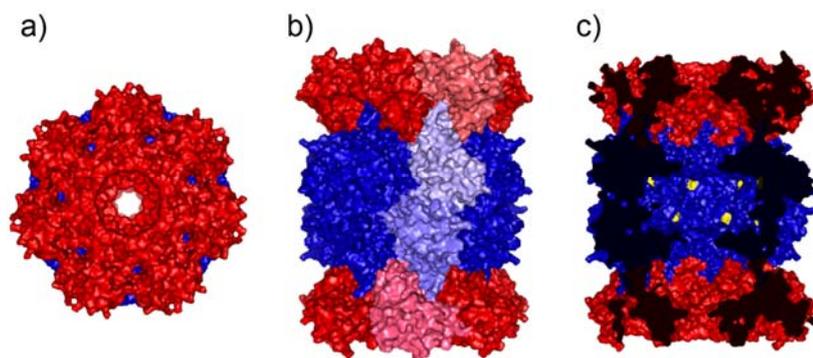


Abb. 2.3: 20S Proteasom aus dem Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum*, basierend auf den Daten der Röntgenstrukturanalyse [Löwe, *et al.*, 1995] (PDB-Eintrag: 1PMA). a) Aufsicht auf die  $\alpha$ -Ringe. Die schmale Pore, die zur Aufnahme von Substraten dient, ist deutlich zu erkennen, b) Seitenansicht und c) Querschnitt entlang der siebenzähligen Achse. Der zentrale Kanal öffnet sich an den Kontakten der Ringe zu zwei Vorkammern und einer zentralen Kammer, in der sich die aktiven Zentren befinden. ( $\alpha$ -Untereinheiten sind rot,  $\beta$ -Untereinheiten blau und die aktiven Zentren gelb dargestellt).

Ein weiterer Unterschied zwischen prokaryontischen und eukaryontischen 20S Proteasomen ist die Anzahl der proteolytisch aktiven Zentren. Während in Prokaryonten 14 identische  $\beta$ -Untereinheiten vorliegen, die alle aktiv sind, ist dies bei Eukaryonten lediglich bei drei der  $\beta$ -Untereinheiten der Fall, womit die Anzahl der aktiven Zentren bei nur sechs liegt.

Für die beiden Systeme wurden unterschiedliche Mechanismen der Substratbindung postuliert. Die Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* weist eine 1,3 nm schmale Pore in den Ringen der  $\alpha$ -Untereinheiten auf [Löwe, *et al.*, 1995]. Mittels elektronenmikroskopischer Analyse von 20S Proteasomen, die mit Nanogold<sup>TM</sup>-markierten Insulin B-Ketten inkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass Substrate über diesen Weg in das 20S Proteasom gelangen [Wenzel und Baumeister, 1995]. Im Gegensatz dazu ist aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* kein solcher Zugang ersichtlich [Groll, *et al.*, 1997]. Die N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten interagieren hier und verschließen den Zugang zum inneren Kanal, während sie im archaeobakteriellen 20S Proteasom ungeordnet sind und die Pore somit offen erscheint. In Eukaryonten kann der Zugang zu den aktiven Zentren durch die Bindung regulatorischer Komplexe wie der 19S Kappen

oder anderer Aktivatoren an die  $\alpha$ -Ringe ermöglicht werden [Pickart und VanDemark, 2000].

Die hohe Sequenzhomologie der katalytisch aktiven  $\beta$ - und der inaktiven  $\alpha$ -Untereinheiten spiegelt sich auch in deren Struktur wider [Groll, *et al.*, 1997; Löwe, *et al.*, 1995]. Beide Arten von Untereinheiten bestehen aus einer vierlagigen  $\alpha + \beta$ -Struktur mit zwei antiparallelen fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblättern, die auf einer Seite von zwei, auf der anderen Seite von drei  $\alpha$ -Helices flankiert werden (siehe Abb. 2.4). In der  $\beta$ -Untereinheit ist der Stapel aus  $\beta$ -Faltblättern an einem Ende von vier *hairpin loops* bedeckt, während sich auf der anderen Seite eine Spalte bildet, in der das aktive Zentrum liegt. Im assemblierten 20S Proteasom zeigt diese Spalte in Richtung der zentralen Kammer. Die  $\alpha$ -Untereinheiten unterscheiden sich hiervon hauptsächlich durch eine  $\alpha$ -Helix H0, die von dem im Vergleich zur  $\beta$ -Untereinheit verlängerten N-Terminus gebildet wird und die Spalte zwischen den  $\beta$ -Faltblättern verschließt. Diese Helices liegen im 20S Proteasom auf der Stirnseite des Zylinders und sind derart orientiert, dass sie von der Pore aus strahlenförmig zum äußeren Rand hin zeigen.

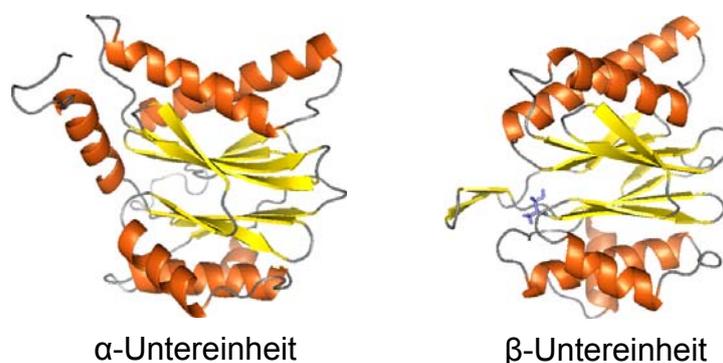


Abb. 2.4: Röntgenkristallstruktur der beiden Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* [Löwe, *et al.*, 1995] (PDB-Eintrag 1PMA). Zwei Stapel bestehend aus je fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern werden auf beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices eingeschlossen. Das aktive Zentrum (Threonin 1) der  $\beta$ -Untereinheit in der Spalte seitlich der Faltblätter ist in blau als Stabmodell dargestellt. Bei der  $\alpha$ -Untereinheit wird diese Spalte von einer  $\alpha$ -Helix verschlossen.

Wie sich herausstellte ist diese Art der Faltung typisch für die Proteinsuperfamilie der Ntn-Hydrolasen (*N-terminal nucleophile*) [Brannigan, *et al.*, 1995], die sich durch den ihnen gemeinen Mechanismus des nucleophilen Angriffs und der autokatalytischen Prozessierung auszeichnen.

### 2.1.3 Katalytischer Mechanismus

Mittels gerichteter Mutagenese [Seemüller, *et al.*, 1995] und Analyse der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms, das mit Acetyl-Leu-Leu-Norleucin inhibiert wurde [Löwe, *et al.*, 1995], konnte das N-terminale Threonin der  $\beta$ -Untereinheit als das aktive Zentrum identifiziert werden. Solch eine einzelne Aminosäure, die nicht nur als katalytisches Nukleophil, sondern deren Aminogruppe

zudem auch als primärer Protonenakzeptor dient, ist charakteristisch für Ntn-Hydrolasen (*N-terminal nucleophile*) [Brannigan, *et al.*, 1995]. Bei anderen Vertretern dieser Familie wird diese Rolle von Serin oder Cystein eingenommen. Zudem ist allen Ntn-Hydrolasen gemein, dass sie als inaktive Vorläufer gebildet und erst durch die Abspaltung eines Propeptids und die Freisetzung der Aminogruppe des katalytischen Nucleophils aktiviert werden. Das Propeptid der  $\beta$ -Untereinheit des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* besteht aus acht Aminosäuren [Zwickl, *et al.*, 1994]. Länge und Zusammensetzung variieren jedoch von Organismus zu Organismus stark, wobei die Schnittstelle konserviert ist [Seemüller, *et al.*, 1996].

Die Prozessierung des Propeptids verläuft autokatalytisch (siehe Abb. 2.5). Dabei erfolgt ein nukleophiler Angriff des Sauerstoffs der Hydroxygruppe von Threonin 1 auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung zwischen Threonin 1 und Glycin -1. Die Nucleophilie der Seitenkette des Threonins wird sehr wahrscheinlich durch Protonentransfer auf ein Wassermolekül erhöht, das in der Röntgenkristallstruktur aufgelöst ist. Das entstehende tetraedrische Intermediat reagiert durch Spaltung der C-N-Bindung zu einem Ester, der unter Freisetzung der aktiven  $\beta$ -Untereinheit und des Propeptids hydrolysiert wird [Ditzel, *et al.*, 1998]. Das nun N-terminale Threonin der  $\beta$ -Untereinheit fungiert als katalytisch aktives Zentrum des 20S Proteasoms und ist in der Lage Substrate zu spalten.

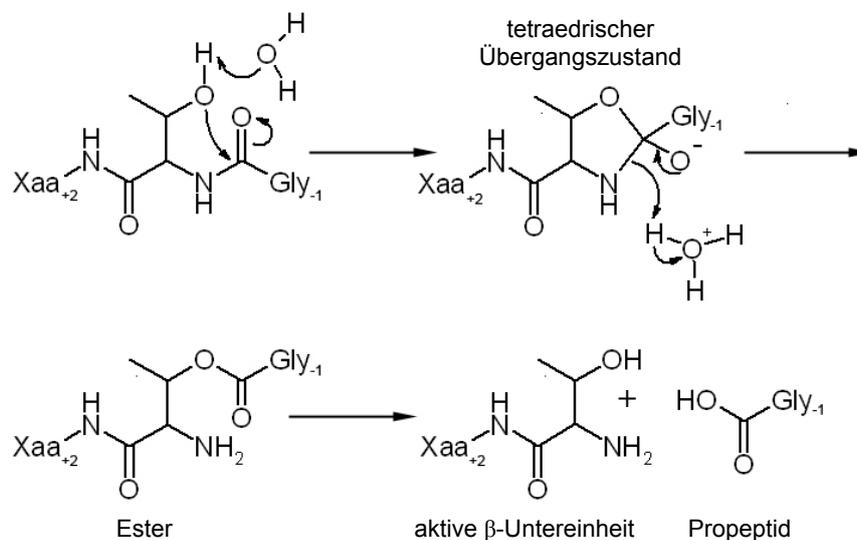


Abb. 2.5: Mechanismus der autokatalytischen Prozessierung des Propeptids zur Generierung der katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheit des 20S Proteasoms. Durch nukleophilen Angriff des Sauerstoffs der Hydroxygruppe des Threonin 1 am Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand. Dieser reagiert durch Spaltung der C-N-Bindung zum Ester weiter, der wiederum durch Hydrolyse gespalten wird.

Der erste Schritt der Hydrolyse besteht aus einem Protonentransfer von der Hydroxygruppe des Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheit zu dessen Aminogruppe, wobei aus

sterischen Gründen vermutlich ein Wassermolekül als Vermittler dient (siehe Abb. 2.6). Der dadurch stark nukleophil wirkende Sauerstoff des Threonins kann am Carbonylkohlenstoff einer Peptidbindung des Substrats angreifen, wodurch sich ein tetraedrischer Übergangszustand ausbildet. Dieser reagiert durch Spaltung der C-N-Bindung und unter Freisetzung der Aminkomponente des Produkts zu einem Acyl-Enzym-Zwischenprodukt. Durch Hydrolyse desselben werden schließlich die Carboxykomponente des Produkts und die aktive  $\beta$ -Untereinheit gebildet. Letztere steht nun für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung.

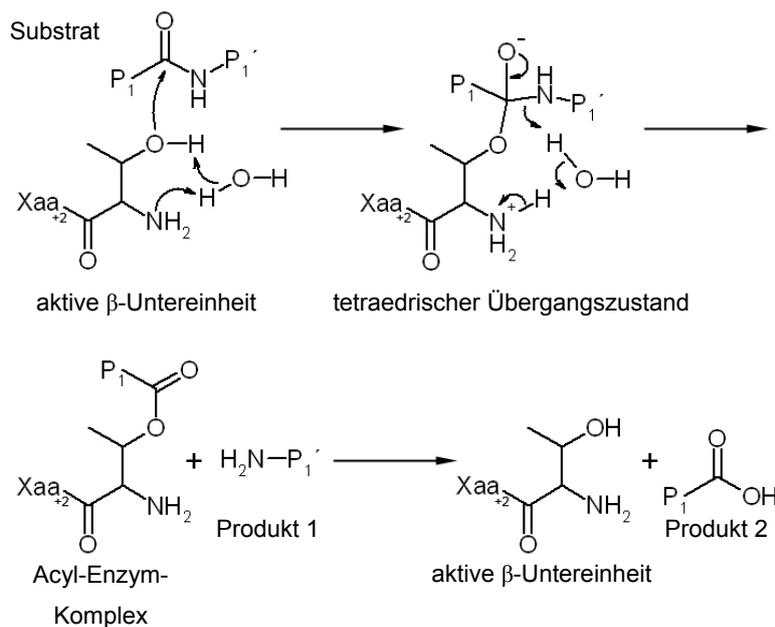


Abb. 2.6: Katalytischer Mechanismus der Proteolyse durch das 20S Proteasom. Durch Protonenübertragung von der Hydroxygruppe des Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheit des 20S Proteasoms auf dessen Aminogruppe wird der nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung des Substrats initiiert. Das sich bildende tetraedrische Intermediat wird durch Spaltung der C-N-Bindung in einen Acyl-Enzym-Komplex umgewandelt, wobei die Aminokomponente des Produkts freigesetzt wird. Die Carboxykomponente sowie die aktive  $\beta$ -Untereinheit entstehen aus diesem Komplex durch Esterhydrolyse.

Durch intensives Studium der katalytischen Aktivitäten verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms aus verschiedenen Archaeen, Bakterien und Eukaryonten konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus der Proteolyse unabhängig vom jeweiligen Mechanismus gleich verläuft [Witt und Baumeister, 2002].

Tauscht man das aktive Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms durch Serin aus, so bleibt die Hydrolyserate für kleine fluoreszenzmarkierte Substrate unverändert [Seemüller, *et al.*, 1995], der Abbau größerer Peptide und Proteine läuft jedoch deutlich langsamer ab [Kisselev, *et al.*, 2000]. Zudem sind bei dieser Mutante nur 50 % der Propeptide prozessiert. Im Gegensatz dazu sind die Propeptide von

20S Proteasomen, deren aktives Zentrum durch Cystein ausgetauscht wurde, nahezu vollständig prozessiert. Diese Mutante ist jedoch nicht in der Lage Substrate zu spalten [Seemüller, *et al.*, 1996].

Neben dem N-terminalen Threonin sind noch weitere Aminosäuren für die proteolytische Aktivität von Nöten (Glu 17, Lys 33, Asp 166). Deren Funktion bei der Katalyse bedarf jedoch noch der Aufklärung [Heinemeyer, *et al.*, 1997].

#### 2.1.4 Inhibierung mit *clasto*-Lactacystin $\beta$ -Lacton

Das 20S Proteasom spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Konzentration von Proteinen, die bei verschiedensten Prozessen mitwirken. Deshalb ist es von enormer Wichtigkeit geeignete Inhibitoren zu finden, um diese Prozesse beeinflussen zu können. Zudem eignen sich spezifische Inhibitoren zur Analyse der Funktion von Enzymen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 20S Proteasomen mit Lactacystin inhibiert, um zu verhindern, dass Substrate, die innerhalb der zentralen Kammern des 20S Proteasoms eingeschlossen wurden, abgebaut werden.

Im Gegensatz zu den meisten synthetischen Inhibitoren, wie z.B. Peptidaldehyden oder 3,4-Dichloroisocoumarin, ist Lactacystin in der Lage, spezifisch den Abbau von Proteinen durch das 20S Proteasom zu unterbinden, während der lysosomale Proteinabbau ungehindert abläuft [Craiu, *et al.*, 1997]. Der Naturstoff Lactacystin wurde ursprünglich aus *Streptomyces* isoliert [Omura, *et al.*, 1991].

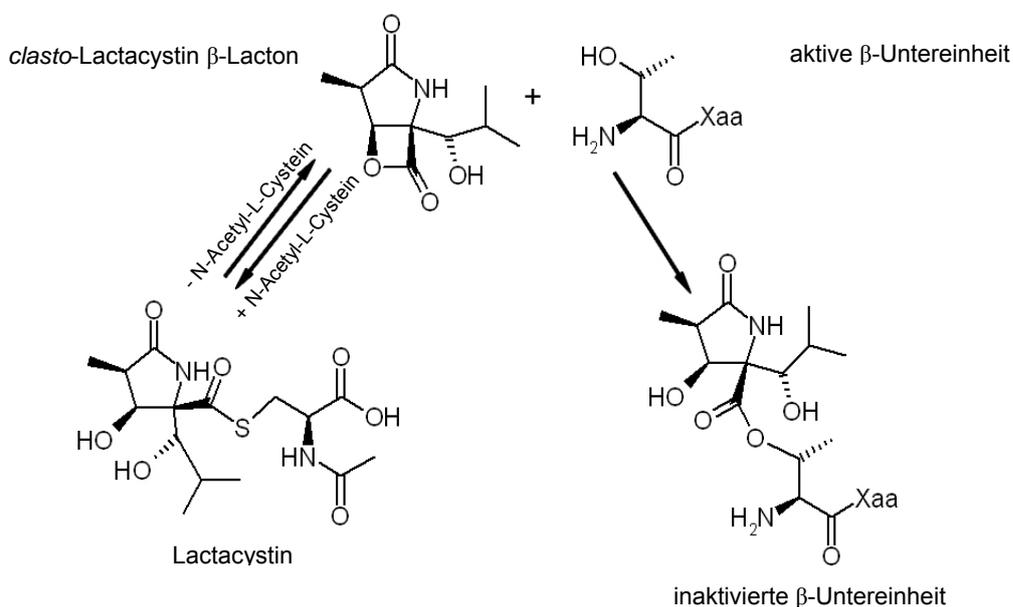


Abb. 2.7: Mechanismus der Inhibierung von 20S Proteasomen mit Lactacystin. Lactacystin wird in einer Lactonisierungsreaktion unter Abspaltung von N-Acetyl-Cystein in das aktive *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton umgewandelt, welches mit der nukleophilen Hydroxygruppe des Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheit des 20S Proteasoms reagiert (Acylierung). Diese werden dadurch inaktiviert, da die Hydroxygruppe des Threonin 1 nun nicht mehr als Nukleophil agieren kann.

Dabei reagiert Lactacystin nicht unmittelbar mit dem Proteasom, sondern lagert sich durch Cyclisierung und Abspaltung von N-Acetylcystein zum aktiven *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton um, welches in der Lage ist das 20S Proteasom durch Acylierung der nukleophilen Hydroxylfunktion des Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheit zu deaktivieren [Dick, *et al.*, 1996] (siehe Abb. 2.7 ). So behandelte 20S Proteasomen sind irreversibel inhibiert, da das N-terminale Threonin nicht mehr als Nukleophil agieren kann.

### 2.1.5 Translokation von Substratmolekülen

Zum Abbau bestimmte Substratmoleküle müssen durch die Pore in den  $\alpha$ -Ring und durch eine Vorkammer entlang des Kanals in die zentrale Kammer gelangen, in der sich die aktiven Zentren befinden [Wenzel und Baumeister, 1995]. Um dies zu ermöglichen bedarf es einer vorherigen Entfaltung des Substrats durch regulatorische Komplexe, die an einer oder beiden Enden des 20S Proteasoms binden [Baumeister, *et al.*, 1998]. Die 19S regulatorischen Komplexe, die in Eukaryonten zusammen mit dem 20S Proteasom das 26S Proteasom bilden, sind in der Lage ubiquitinierte Substrate zu entfalten und anschließend in das 20S Proteasom zu transferieren. 20S Proteasomen, die aus Eukaryonten isoliert werden, liegen in einer latenten Form vor, deren Pore durch N-terminale Segmente der  $\alpha$ -Untereinheiten verschlossen ist [Groll, *et al.*, 2000]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl diese latenten 20S Proteasomen als auch aktivierte 26S Proteasomen Substrate, die nativ ungeordnet sind, mit gleicher Rate abbauen können [Liu, *et al.*, 2003]. Dies bedeutet, dass diese Substrate in der Lage sind die Pore zu öffnen und in das Innere des 20S Proteasoms zu gelangen. Zudem zeigte sich, dass mehr als eine Polypeptidkette gleichzeitig in das 20S Proteasom gelangen kann, da sowohl bei latenten als auch bei aktiven Proteasomen endoproteolytische Aktivität festgestellt wurde [Liu, *et al.*, 2003].

Durch die Analyse von Gensequenzen konnte ein Homologes der 19S regulatorischen Komplexe, die ATPase PAN (*proteasome activating nucleotidase*), auch in Archaeen gefunden werden [Zwickl, *et al.*, 1999]. Diese ist imstande, die Substratdegradation durch das 20S Proteasom zu stimulieren. Proteolytische Aktivität gegenüber entfalteten Proteinen liegt jedoch auch ohne deren Zutun vor. Anders als im eukaryontischen System verschließen die N-terminalen Reste der  $\alpha$ -Untereinheiten die Pore nicht, obwohl sie konserviert vorliegen [Groll und Huber, 2003]. Komplexe zwischen PAN und dem 20S Proteasom sind sehr schwer zu isolieren und möglicherweise nur transient vorhanden [Wilson, *et al.*, 2000].

Trotz der Vielzahl an Untersuchungen zu *Gating* und Translokation in Eukaryonten ist das Wissen um die Mechanismen der Translokation von Polypeptidketten in das Innere des 20S Proteasoms aus Prokaryonten lückenhaft. Experimentelle Daten über den stimulierenden Effekt von PAN auf die Proteolyse durch das 20S Proteasom sind nicht in der Lage Einblicke in die Geschehnisse innerhalb des 20S Proteasoms zu geben, während sich Substrate auf dem Weg zu den aktiven Zentren befinden. Die einzigen

hierzu publizierten experimentellen Daten stützen sich auf die statistische Analyse von AFM-Aufnahmen (*atomic force microscopy*), bei denen zwei verschiedene Konformere des 20S Proteasoms mit offener bzw. geschlossener Pore gefunden wurden [Osmulski und Gaczynska, 2000]. Durch Zugabe von Substrat stieg der Anteil der Partikel mit offener Pore an, während in dessen Abwesenheit hauptsächlich geschlossene 20S Proteasomen vorlagen. Diese Ergebnisse konnten jedoch bislang nicht durch weitere experimentelle Daten gestützt werden.

### **2.2 Methoden zur Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen in Proteinen**

In den vergangenen Jahren wurden große Anstrengungen unternommen die Sequenz des Genoms einer Vielzahl von Organismen zu entschlüsseln. Anhand dieser ist es möglich alle Gene und somit die Sequenz aller potentiellen Proteine, die darin codiert sind, zu bestimmen.

Allein das Wissen um die Aminosäuresequenz eines Proteins lässt jedoch trotz starker Bemühungen im Bereich der Bioinformatik keine sicheren Schlüsse auf deren, für die Funktion eines Proteins entscheidende, Struktur zu. Die Strukturaufklärung ist somit ein bedeutender Schritt zum Verständnis der Funktion von Proteinen. Aufgrund der Komplexität der Struktur-Funktionsbeziehung von Proteinen erfordert deren Analyse den Einsatz verschiedenster biophysikalischer und biochemischer Methoden.

In Tab. 2.1 sind die verschiedenen Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse der Translokation von Substraten in das 20S Proteasom herangezogen wurden, sowie deren Prinzip und die erreichbare Auflösung aufgelistet. Zudem sind die Anforderungen an die Probe und der Grund für die Verwendung der jeweiligen Methode angegeben. Diese aufgeführten Methoden werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

Tab. 2.1: Übersicht über die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit angewandten Methoden zur Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen in Proteinen.

|  | <b>Prinzip</b>   | <b>erreichbare Auflösung</b>                                 | <b>Voraussetzung</b>   | <b>Verwendung im Rahmen dieser Arbeit</b>  |
|--|--|--|--|--|
| <b>Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)</b>             | Absorption und Beugung von Elektronen durch dünne Proben         | biolog. Proben neg. kontrastiert: ca. 1,5 nm; kryo: ca. 1 nm | Proteine oder Komplexe mit Molekulargewichten ab ca. 250-500 kDa; einige µg Probe                        | Beweis der „Host-Guest“ Komplexbildung und Lokalisation der Substrate  |
| <b>Röntgenstrukturanalyse</b>                                | Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen                 | atomare Auflösung  | Proteine in Form eines Einkristalls (erfordert hohe Reinheit und Homogenität der Probe); einige mg Probe | Identifikation von Strukturänderungen der „Host-Guest“ Komplexe im Vergleich zum nativen 20S Proteasom und Identifikation der beteiligten Seitenketten |
| <b>Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS)</b> | Auftrennung ionisierter Proben nach Masse-Ladungsverhältnis      | m/z-Werte bis ca. 150 000; m/Δm <sub>50%</sub> 3000-7000     | Proteine oder Komplexe in Lösung; einige µg Probe  | Analyse der Stöchiometrie von 20S Proteasomen und Substraten in „Host-Guest“ Komplexen   |
| <b>Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)</b>                     | Beugung von Röntgenstrahlen an monodispersen Partikeln in Lösung | ca. 2-3 nm möglich; zeitliche Auflösung < ms                 | Proteine oder Komplexe von einigen kDa bis zu mehreren MDa in Lösung (ca. 1-15 mg/ml); einige mg Probe   | Analyse von Strukturänderungen der „Host-Guest“ Komplexe im Vergleich zum nativen 20S Proteasom; Lokalisation der Substrate                            |

### 2.2.1 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) [Baumeister und Steven, 2000] [van Heel, *et al.*, 2000] [Ruprecht und Nield, 2001] eignet sich hervorragend zur Analyse der Struktur von Makromolekülen ab einem Molekulargewicht von ca. 250-500 kDa. Dabei muss das Protein weder in kristalliner Form noch in großen Mengen vorliegen. Aus diesem Grund findet diese Methode insbesondere für Proteine oder Proteinkomplexe, deren Röntgenstrukturanalyse sich schwierig gestaltet, Anwendung. Die dreidimensionale Struktur von Makromolekülen kann durch Einzelpartikelanalyse einer Vielzahl von zweidimensionalen Projektionen, die die Partikel in verschiedenen Orientierungen zeigen, rekonstruiert werden, wobei eine Auflösung von bis zu 5 Å erreichbar ist [Baumeister und Steven, 2000].

Im Transmissions-Elektronenmikroskop wird eine Probe im Hochvakuum mit monoenergetischen Elektronen durchstrahlt. Je nach Dicke und Dichte des Präparats

werden die Elektronen verschieden stark gestreut, sodass eine entsprechende Intensitätsverteilung der austretenden Elektronen die Struktur des Objekts widerspiegelt.

Die meist stark wasserhaltigen Proben müssen für die Durchführung der Messungen so präpariert werden, dass sie in dem für die Elektronenmikroskopie notwendigen Hochvakuum untersucht werden können. Als Probenträger dienen Kupfernetzchen (*grids*), auf denen ein ca. 10 nm dicker Kohlefilm abflotiert wird und die unmittelbar vor der Präparation in einem *Plasmacleaner* hydrophilisiert werden. Proteine, die auf diesem Kohlefilm adsorbiert sind, können in der elektronenmikroskopischen Aufnahme nur schwer oder gar nicht erkannt werden. Es ist jedoch möglich sie durch ein Schwermetallsalz zu kontrastieren. Der entstehende Bildkontrast stammt im Wesentlichen von den stark streuenden Schwermetallatomen, die das Protein umgeben (negative Kontrastierung; *negative staining*) [Brenner und Horne, 1959]. So präparierte Proben sind relativ beständig gegenüber Strahlenschäden. Die Auflösung ist jedoch durch die Korngröße des verwendeten Schwermetallsalzes limitiert und liegt für Uranylacetat bei ca. 1,5 nm. Zudem werden Makromoleküle durch die bei der Adsorption am Kohlefilm auftretenden Kräfte und die Zerstörung der sie umgebenden Hydrathülle während der Präparation abgeflacht. Um Artefakte, die auf die Kontrastierung zurückzuführen sind, zu vermeiden und Proteine in einer möglichst nativen Umgebung abzubilden, können sie in vitrifiziertem Eis eingebettet und in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kryohalter im Mikroskop untersucht werden (*Cryo-EM*) [Taylor und Glaeser, 1974]. Ein Dehydrieren der Probe ist hierbei nicht notwendig, da der Dampfdruck von Wasser bei Temperaturen unter  $-100\text{ °C}$  vernachlässigbar ist. Die Proteinsuspension wird auf ein Grid aufgebracht und das Grid in flüssiges Ethan eingeschossen (*plunge-freezing*) [Dubochet, *et al.*, 1988]. Das umgebende Wasser muss dabei amorph erstarren, da die Bildung von kristallinem, kubischem Eis die Ultrastruktur von Proteinen zerstören und zudem große Teile des Elektronenstrahls absorbieren würde. Diese Proben sind sehr viel anfälliger für Strahlenschäden als negativ kontrastierte, weshalb mit deutlich niedrigeren Elektronendosen gearbeitet werden muss.

Ein Transmissions-Elektronenmikroskop besteht aus einer Leuchtquelle, an der freie Elektronen erzeugt und anschließend in einem Hochspannungsfeld auf dieselbe Geschwindigkeit beschleunigt werden. Daraufhin werden die Elektronen von einem Kondensator in der Nähe der Objektebene fokussiert und über Ablenkspulen auf den gewünschten Teil des Präparats gerichtet (*beam shift*). Während der Großteil der beschleunigten Elektronen die Probe ohne Interaktion mit derselben durchläuft, werden einige Elektronen am elektrischen Potential der Probe gebeugt und durch eine Objektivlinse mit dem ungebeugten Primärstrahl zur Interferenz gebracht (Phasenkontrast). Das so entstehende Bild kann durch weitere Ablenkspulen in der Bildebene verschoben werden (*image shift*). Die Wechselwirkung zwischen den beschleunigten Elektronen und der Probe besteht sowohl aus elastischer Streuung, bei der die kinetische Energie der Elektronen unverändert bleibt, als auch aus inelastischer

Streuung, bei der ein Teil der kinetischen Energie der Elektronen auf die Probe übergeht und die für Strahlungsschäden verantwortlich ist. Elastisch gestreute Elektronen enthalten Information über die Probe und liefern den Kontrast des Bildes, während inelastisch gestreute Elektronen wegen ihrer unterschiedlichen kinetischen Energie durch die Linsen unterschiedlich abgelenkt werden und somit das Bild verschmieren. Um dies zu vermeiden, kann das Mikroskop mit einem Energiefilter ausgestattet werden, der inelastisch gestreute Elektronen eliminiert und somit die Intensität des Bildes verringert und den Kontrast erhöht [Grimm, *et al.*, 1996].

Da biologische Proben in vitrifiziertem Eis sehr anfällig für Strahlungsschäden sind, weisen deren Abbildungen ein sehr niedriges Signal-Rausch-Verhältnis auf. Eine gängige Methode die Lokalisation von eiseingebetteten Partikeln zu erleichtern, ist die Aufnahme von Fokuspaaren [Ludtke und Chiu, 2003]. Dabei wird dieselbe Stelle mit geringer Dosis zunächst mit geringem und anschließend mit höherem Defokus abgebildet. Das zweite Bild ist erheblich kontrastreicher und dient zur Lokalisation der einzelnen Partikel, während das erste Bild höhere Auflösung bietet und zur weiteren Analyse der Einzelpartikel mittels Alignierung, Klassifizierung etc. herangezogen wird.

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie hat sich trotz der im Vergleich zur Röntgenstrukturanalyse niedrigeren Auflösung zu einer für die Strukturbiologie unverzichtbaren Methode entwickelt, da sie für nahezu alle makromolekularen Systeme ab einer Größe von 250-500 kDa anwendbar ist. Der einfachen Präparation mittels negativer Kontrastierung durch Schwermetallsalze und der dadurch erleichterten Identifikation von Einzelpartikeln stehen die höhere Auflösung und die Abwesenheit von Artefakten durch das Kontrastmittel in der Kryo-Elektronenmikroskopie gegenüber.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms, in deren Inneren sich verschiedene Substratmoleküle befinden, sowohl mit negativer Kontrastierung als auch in vitrifiziertem Eis eingebettet elektronenmikroskopisch untersucht, um die Komplexbildung zu verifizieren und Rückschlüsse auf die Lokalisation der Substrate zu ziehen.

### **2.2.2 Röntgenstrukturanalyse**

Die am häufigsten angewandte Methode, um die dreidimensionale Struktur von Proteinen mit atomarer Auflösung zu bestimmen, ist die Röntgenstrukturanalyse. Dabei werden Röntgenstrahlen an einem Proteinkristallgitter gebeugt und anschließend aus dem beobachteten Beugungsmuster die Kristallstruktur berechnet. Diese Methode wird in zahlreichen Lehrbüchern [Drenth, 1999] [Blundell und Johnson, 1976] [Stout und Jensen, 1989] ausführlich behandelt. Im Folgenden werden lediglich die Grundprinzipien kurz erläutert.

Voraussetzung für die Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse ist das Vorliegen des Proteins in Form eines hoch geordneten Kristalls. Um dies zu erreichen, muss die Probe hohen Anforderungen an Reinheit und Homogenität genügen. Zur Erzeugung von

Proteinkristallen gibt es eine Reihe von Methoden, wobei die Dampfdiffusion am häufigsten angewandt wird [McPherson, 1990]. Bei dieser Methode wird eine hochkonzentrierte Proteinlösung mit einer Fällungslösung (Präzipitat) auf einem Deckgläschen vermischt und anschließend auf eine Platte mit Vertiefung, die die Fällungslösung in höherer Konzentration enthält, aufgesetzt. Der Konzentrationsgradient zwischen dem Tropfen, der das Protein enthält, und dem Reservoir wird über die Dampfphase ausgeglichen, was zu einem Aufkonzentrieren des Proteins bis zur Übersättigung führt. Im Idealfall hat dies ein geordnetes Abscheiden des Proteins aus der Lösung, also die Kristallisation des Proteins, zur Folge. Die genauen Bedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, Art des Fällungsmittels, Temperatur usw.) sind dabei jedoch nicht vorhersagbar und das Finden derselben beruht in der Regel auf dem Prinzip von *trial and error*.

Kristalle können als periodische, dreidimensionale Aneinanderreihung einer Elementar- oder Einheitszelle beschrieben werden, die durch die Längen ihrer drei Achsen ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) und deren eingeschlossene Winkel ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) charakterisiert ist. Elementarzellen, die eine interne Symmetrie aufweisen, können durch eine kleinere, so genannte asymmetrische Einheit und die zugehörigen Symmetrieeoperationen beschrieben werden. Es existieren sieben verschiedene Kristallsysteme: triklone, monokline, orthorhombische, tetragonale, trigonale, hexagonale und kubische. Zusammen mit den jeweilig erlaubten Symmetrieeoperationen ergeben sich 230 Raumgruppen, von denen jedoch nur 65 enantiomorph und somit auf die chiralen Bausteine der Biomoleküle anwendbar sind.

Trifft nun Röntgenstrahlung auf solch einen hoch geordneten Kristall, so regt ihr oszillierendes elektrisches Feld die Elektronen der einzelnen Atome im Proteinkristall zu Schwingungen gleicher Frequenz an. Die Elektronen senden ihrerseits als oszillierende Dipole eine Sekundärstrahlung gleicher Frequenz, aber mit um  $180^\circ$  verschobener Phase aus. Im Normalfall, d.h. für leichte Atome wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff, können die beobachteten Streueffekte als Beugung an freien Elektronen betrachtet werden. In Analogie zur Beugung von sichtbarem Licht verhält sich auch die Streuung von Röntgenstrahlen an einem Kristallgitter als würde sie an Gitterebenen reflektiert. Die Lage dieser Gitterebenen wird durch die Miller-Indizes ( $hkl$ ) angegeben, wobei die Gitterebene die  $x$ -Achse des Kristallgitters bei  $a/h$ , die  $y$ -Achse bei  $k/b$  und die  $z$ -Achse bei  $l/c$  schneidet. Dabei ist der Einfallswinkel ( $\Theta_{hkl} = 90^\circ - d_{hkl}$ , mit  $d_{hkl}$  als Abstand benachbarter Gitterebenen) gleich dem Ausfallswinkel, womit sich für die Ablenkung des gestreuten vom einfallenden Strahl ein Winkel von  $2\Theta_{hkl}$  ergibt. Konstruktive Interferenz liegt dann vor, wenn die BRAGG'sche Gleichung (2.1) erfüllt ist.

$$2d_{hkl} \sin\Theta_{hkl} = n\lambda \quad (2.1)$$

Betrachtet man eine isolierte Einheitszelle, an der sich eine Röntgenwelle bricht, so ergibt sich ein richtungsabhängiges, kontinuierliches Beugungsbild. Durch die periodische Anordnung der Einheitszelle im Kristall können diese Sekundärwellen jedoch nur in bestimmte Richtungen konstruktiv interferieren, wodurch punktförmige Reflexe entstehen, die ein charakteristisches Interferenzbild ergeben. Die Geometrie der Elementarzelle des Proteinkristalls kann aus den Winkeln abgeleitet werden, unter denen diese Reflexe auftreten. Die Struktur und die Anordnung der Moleküle innerhalb der Elementarzelle bestimmt die Intensität der gestreuten Strahlung und kann mittels verschiedener mathematischer Methoden aus ihnen berechnet werden.

Der Röntgenstrukturanalyse haben wir die Aufklärung zahlreicher Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung zu verdanken. Sie erfordert jedoch die Herstellung von Kristallen hoher Qualität. Für viele Proteine, vor allem für einen Großteil der in Wasser nicht löslichen Membranproteine oder für große Proteinkomplexe ist dies nicht ohne weiteres möglich. Die Herstellung der Kristalle erfordert das Screening einer Vielzahl von Bedingungen, wodurch die benötigte Menge an hochreinem und homogenem Protein sehr hoch ausfallen kann. Hinzu kommt, dass die meisten Proteine in ihrer natürlichen Umgebung in gelöster Form vorliegen und die Struktur im Kristall sich unter Umständen erheblich von der physiologisch relevanten Struktur des gelösten Proteins unterscheidet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms, in deren Inneren sich Substratproteine befinden, röntgenkristallographisch untersucht, um Konformationsänderungen von Aminosäureresten innerhalb des 20S Proteasoms während der Substrattranslokation zu identifizieren.

### 2.2.3 Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie

In der Massenspektrometrie werden Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ -Werte) getrennt. Diese Methode wird in der Biochemie hauptsächlich zur Identifikation von Proteinen durch tryptischen Verdau und Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit Datenbanken (*peptide-mass fingerprinting*) angewandt. In den letzten Jahren wurden jedoch neue Techniken entwickelt, die die Analyse von Komplexen mit mehreren hundert kDa und im Vergleich dazu relativ kleinen Massenunterschieden erlauben [Robinson, 2005]. Dies eröffnet die Möglichkeit, Struktur-Funktionsbeziehungen in Proteinkomplexen zu untersuchen.

Ein Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor, wobei für jeden dieser Bauteile verschiedene Geräte existieren, die auf unterschiedlichen Methoden basieren. Im Folgenden wird lediglich das Grundprinzip der im Rahmen dieses Projektes verwendeten Nanoflow-Elektrospray-Ionisation mit anschließender Tandem-Massenspektrometrie, die für makromolekulare Komplexe optimiert wurde [Sobott, *et al.*, 2002], näher erläutert.

Die Elektrospray-Ionisation wurde von John B. Fenn [Fenn, *et al.*, 1989] begründet, der für die Entwicklung dieser Methode den Nobelpreis für Chemie im Jahre 2002 erhielt. Die Probe gelangt über eine Kapillare, an die ein starkes elektrisches Feld angelegt wird, in die Ionisationskammer, wobei ein feiner Nebel aus geladenen Tröpfchen entsteht. Durch entgegenströmendes Gas werden die Tropfen eingeengt, bis die abstoßenden Coulombkräfte die Oberflächenspannung kompensieren und der Tropfen in kleinere Tröpfchen zerfällt („Coulomb-Explosion“). Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis das elektrische Feld an der Oberfläche der Tröpfchen stark genug ist, um Ionen aus den Tröpfchen in die Gasphase zu desorbieren. Diese Methode eignet sich wegen der relativ schonenden Bedingungen hervorragend zur Analyse biologischer Proben. Durch die Weiterentwicklung zur Nanoflow-Elektrospray-Ionisation können sogar nichtkovalente Bindungen innerhalb makromolekularer Komplexe erhalten werden [Wilm und Mann, 1996]. In der darauf folgenden Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) kann ein anhand seiner  $m/z$ -Werte definierter Teil der Ionen in einem ersten Massenanalysator ausgewählt und anschließend in einem zweiten aufgetrennt werden. Zudem befindet sich zwischen den beiden Analysatoren eine gasgefüllte Kollisionszelle, in der die selektierten Ionen kontrolliert dissoziieren (*collision-induced dissociation* CID). Der erste Massenanalysator besteht aus einem Quadrupolanalysator, dessen gegenüberliegende Elektroden das gleiche Potential besitzen, während zwischen benachbarten Elektroden eine Gleich- und eine Wechselspannung anliegen. Bei konstanter Frequenz wird das Verhältnis von Gleich- und Wechselspannung so gewählt, dass nur ein definierter Teil der Ionen mit bestimmten  $m/z$ -Werten passieren. Im zweiten Massenanalysator wird die je nach  $m/z$ -Wert unterschiedliche Geschwindigkeit und damit Flugzeit bis zum Erreichen des Detektors von Ionen derselben kinetischen Energie ausgenutzt (*time of flight* TOF). Als Detektor dient eine Mikrokanalplatte (*microchannel-plate* MCP), bei der die auftreffenden Ionen Sekundärelektronen generieren, die anschließend in ein digitales, zeitaufgelöstes Signal umgewandelt werden. Dieser Aufbau ermöglicht es, Ionen mit  $m/z$ -Werten von 120000 bis 150000 und einer Massenauflösung ( $m/\Delta m_{50\%}$  mit  $\Delta m_{50\%}$  = Peakbreite bei 50 % Peakhöhe; *full width at half maximum* FWHM) von 3000 bis 7000 zu untersuchen [Sobott, *et al.*, 2002]. Die Zuordnung der erhaltenen Peaks erfolgt durch Simulation der Spektren verschiedener Stöchiometrien und Ladungszustände und deren Übereinstimmung mit den experimentellen Daten [Tito, *et al.*, 2000].

Die hier beschriebene Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Bestimmung der Stöchiometrie von 20S Proteasomen und Substratmolekülen innerhalb der „Host-Guest“-Komplexe herangezogen.

### 2.2.4 Röntgenkleinwinkelstreuung

Eine weitere Methode zur Untersuchung makromolekularer Komplexe in Lösung ist die Röntgenkleinwinkelstreuung (*Small angle X-ray scattering* SAXS). Sie ist in der Lage nicht nur die molekulare Masse und den Trägheitsradius, sondern auch die grobe dreidimensionale Form von Partikeln mit Größen von 1–100 nm (entspricht einigen kDa

bis zu mehreren MDa) mit einer Auflösung von ca. 2-3 nm zu bestimmen [Svergun und Koch, 2002]. Zudem können durch spezielle Aufbauten, die ein rasches Mischen verschiedener Stoffe erlauben, Strukturänderungen mit einer zeitlichen Auflösung von ms-Bruchteilen bei verschiedenen Temperaturen verfolgt werden [Akiyama, *et al.*, 2002].

Analog zur Röntgenkristallographie macht sich diese Methode die Beugung von Röntgenstrahlen ( $\lambda \approx 0,15$  nm) an den Elektronen der Probe zunutze. Da bei der Röntgenkleinwinkelstreuung die Probe als Lösung vorliegt und die Position und Orientierung der Partikel rein statistisch verteilt sind, folgt eine isotrope Intensitätsverteilung der gestreuten Strahlen, die als Funktion des Streuvektors  $s = 4\pi \sin\Theta / \lambda$  aufgezeichnet wird. Der Streuwinkel, also der Winkel zwischen einfallendem und austretendem Strahl, beträgt dabei  $2\Theta$ . Für monodisperse Lösungen und Partikel, die nicht interagieren, ist die Verteilung der Intensitäten proportional zur über alle Orientierungen gemittelten Streuung eines einzelnen Partikels [Svergun und Koch, 2003]. Zur Analyse von Makromolekülen in Lösung werden zwei separate Messungen der Streuung, zum einen die der Lösung und zum anderen die des Lösungsmittels allein, durchgeführt. Unter der Annahme einer konstanten Streuung des Lösungsmittels ergibt sich die Streukurve der gelösten Teilchen als Differenz der beiden Messungen. Die erhaltenen Kurven aus den Messungen verschiedener Proteine unterscheiden sich hauptsächlich im Bereich sehr geringer Streuwinkel bis ca.  $2^\circ$  (entsprechend einer Auflösung von ca. 2-3 nm;  $s \approx 3$  nm<sup>-1</sup>), was im Wesentlichen auf deren unterschiedliche Form zurückzuführen ist. In diesem Bereich nimmt die Streuintensität rapide ab. Bei Streuwinkeln zwischen  $2^\circ$  und  $8^\circ$  (Auflösung ca. 2-0,5 nm;  $s \approx 3$ -12 nm<sup>-1</sup>) sind die Unterschiede bereits deutlich weniger ausgeprägt und bei größeren Streuwinkeln nicht mehr zu erkennen. Für die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins aus dessen eindimensionaler Streukurve wird üblicherweise ein *trial and error*-Ansatz verwendet, bei dem berechnete Streukurven für verschiedene plausible Modelle mit den experimentell bestimmten Werten verglichen werden [Svergun, *et al.*, 1995]. Es wurden jedoch auch verschiedene *ab initio* Interpretationsmethoden, wie die Bestimmung einer Hüllfunktion des Proteins basierend auf der Summation von Kugelflächenfunktionen (*spherical harmonics*) [Svergun, *et al.*, 1996], die Erzeugung eines Modells bestehend aus dicht gepackten Kugeln durch Monte-Carlo Simulation [Walther, *et al.*, 2000] oder die Kondensation eines Gases bestehend aus einer Kette von degenerierten Aminosäure-Platzhaltern (*dummy residues*) [Svergun, *et al.*, 2001], entwickelt. Die Verlässlichkeit dieser Methoden kann deutlich erhöht werden, wenn Vorkenntnisse oder Annahmen über die innere Symmetrie der vermessenen Partikel vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Röntgenkleinwinkelstreuung angewandt, um Strukturänderungen der „Host-Guest“ Komplexe im Vergleich zum nativen 20S Proteasom zu identifizieren und die Lokalisation der Substratmoleküle innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe zu bestimmen.

## 2.3 Enzymkinetik

Eine wichtige Methode zur Charakterisierung von Enzymen und zur Analyse des Einflusses verschiedenster Mutationen auf den Mechanismus des Enzyms sind die Bestimmung und der Vergleich verschiedenster kinetischer Konstanten mittels Enzymkinetik.

Der einfachste Fall einer enzymatisch katalysierten Reaktion besteht aus der Umsetzung eines einzelnen Substrats S über einen Enzym-Substrat-Komplex ES in ein Produkt P (siehe Abb. 2.8).

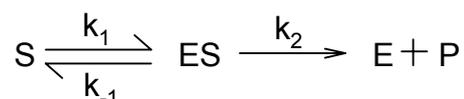


Abb. 2.8: Reaktionsgleichung einer enzymatisch katalysierten Reaktion nach MICHAELIS-MENTEN. Ein Substrat S bildet zusammen mit dem Enzym E einen Enzym-Substrat-Komplex, der unter Bildung des Produkts P und Freisetzung des Enzyms irreversibel zerfällt.

Durch die Annahme einer irreversiblen Reaktion ist es dabei für kinetische Betrachtungen unerheblich, ob ein oder mehrere Produkte gebildet werden. Dieses Modell gilt insbesondere für Isomerisierungs- und Spaltungsreaktionen, wie die in dieser Arbeit behandelte Proteolyse.

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion ist definiert als die Zunahme der Produktkonzentration im zeitlichen Verlauf und damit direkt proportional zur Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes, welche wiederum von der Konzentration der Reaktanden abhängt. Prinzipiell lassen sich Enzymreaktionen in drei Phasen unterteilen. Während einer kurzen Initiationsphase wird unter Verbrauch des freien Enzyms der Enzym-Substrat-Komplex gebildet, wobei die Geschwindigkeit der Produktbildung sehr gering ist. In der darauf folgenden Phase bleiben die Konzentrationen des Enzym-Substrat-Komplexes und die des Enzyms nahezu konstant, da ein Fließgleichgewicht vorliegt (*steady state*), in dem sich Bildung und Zerfall des Komplexes kompensieren. Die Geschwindigkeit des Umsatzes an Substrat und Bildung des Produktes ist maximal und verläuft, wie für eine Reaktion nullter Ordnung üblich, nahezu linear. In der letzten Phase der Reaktion ist das Substrat nahezu vollständig umgesetzt, es kommt zu einer Sättigung, da die Reaktionsgeschwindigkeit auf Null sinkt und der Enzym-Substrat-Komplex unter Freisetzung des Enzyms zerfällt [Biswanger, 2002].

In den meisten Fällen ist die Umsetzung des Substrats zum Produkt und nicht die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Daher bleibt das Fließgleichgewicht für einen ausreichend langen Zeitraum erhalten, um aus den während dieser Zeit ermittelten Messwerten charakteristische Konstanten der Reaktion zu berechnen. Durch Aufstellen der Differentialgleichungen und unter der Annahme eines Fließgleichgewichts kann ein Zusammenhang zwischen der

Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  und der Substratkonzentration hergestellt werden (siehe Gleichung (2.2); MICHAELIS-MENTEN-Kinetik).

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad \text{mit } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{und } v_{\max} = k_2 [E_0] = k_{\text{kat}} [E_0] \quad (2.2)$$

Die MICHAELIS-Konstante  $K_M$  entspricht der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit gerade der Hälfte des maximalen Wertes  $v_{\max}$  entspricht und ist somit ein Maß für die Affinität des Enzyms zu einem bestimmten Substrat. Die Ermittlung dieser Konstanten erfolgt durch Messen der Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Hierbei muss das Substrat im Überschuss vorliegen, damit die Substratkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt  $[S]$  gleich der zu Beginn eingesetzten Konzentration des Substrats gesetzt werden kann. Die katalytische Konstante oder *turnover number*  $k_{\text{kat}}$  gibt die Anzahl an Substratmolekülen an, die pro Enzymmolekül und Sekunde, bei maximaler Reaktionsgeschwindigkeit, in das Produkt umgewandelt werden.

Für komplexere Systeme wie z.B. das 20S Proteasom mit mehreren aktiven Zentren gelten diese Vereinfachungen nicht ohne weiteres. So konnte gezeigt werden, dass beim Abbau kleiner Peptide durch das 20S Proteasom Substrathemmung auftritt und die experimentell ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit deutlich unter den durch MICHAELIS-MENTEN-Kinetik bestimmten Werten liegt [Stein, *et al.*, 1996]. Eine allgemeine Methode, um die Parameter solcher Systeme, die von der klassischen MICHAELIS-MENTEN-Kinetik abweichen, zu bestimmen, beruht auf kinetischen Gleichungen höherer Ordnung (Gleichung (2.3)) [Bardsley, *et al.*, 1980].

$$\frac{v}{[E]} = \frac{\alpha_1 [S] + \alpha_2 [S]^2 + \dots + \alpha_n [S]^n}{1 + \beta_1 [S] + \beta_2 [S]^2 + \dots + \beta_n [S]^n} \quad (2.3)$$

Mittels nichtlinearer Regression kann diese Formel für verschiedene Werte von  $n$  an die experimentell ermittelten Daten angeglichen werden.

Ein vereinfachter Mechanismus der Substratinhibierung für zwei mögliche Substratbindestellen im Enzym ist in Abb. 2.9 dargestellt. Der Enzym-Substrat-Komplex reagiert entweder unter Freisetzung des Enzyms zum Produkt oder es erfolgt die Bindung eines weiteren Substratmoleküls, das wiederum, jedoch mit unterschiedlicher Rate, zum Produkt reagieren kann. Die kinetischen Konstanten können mittels Gleichung (2.3) mit  $n=2$  berechnet werden (siehe Gleichungen (2.4) bis (2.8)) [Stein, *et al.*, 1996].

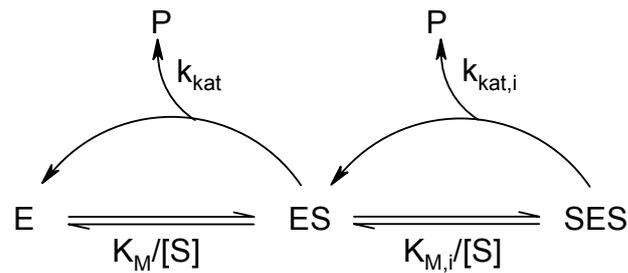


Abb. 2.9: Allgemeiner Mechanismus der Substratinhibition bei zwei möglichen Substratbindestellen im Enzym. Das Enzym bildet mit einem ersten Substrat einen Enzym-Substrat-Komplex ES, der mit der Geschwindigkeit  $k_{kat}$  unter Freisetzung des Enzyms zum Produkt reagieren kann. Darüber hinaus kann sich jedoch auch ein zweites Substrat anlagern, wodurch der Komplex SES gebildet wird, der ebenfalls, jedoch mit einer unterschiedlichen Geschwindigkeit  $k_{kat,i}$ , das Produkt bilden kann.

$$\frac{v}{[E]} = \frac{\alpha_1 [S] + \alpha_2 [S]^2}{1 + \beta_1 [S] + \beta_2 [S]^2} \quad (2.4)$$

$$\alpha_1 = \frac{k_{kat}}{K_M} \quad (2.5)$$

$$\alpha_2 = \frac{k_{kat,i}}{K_M K_{M,i}} \quad (2.6)$$

$$\beta_1 = K_M^{-1} \quad (2.7)$$

$$\beta_2 = (K_M K_{M,i})^{-1} \quad (2.8)$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aminosäurereste innerhalb des 20S Proteasoms identifiziert, die möglicherweise eine Rolle bei der Substrattranslokation spielen. Um deren Einfluss auf die katalytische Aktivität des 20S Proteasoms zu untersuchen, wurden die kinetischen Konstanten verschiedener Mutanten bestimmt und anschließend verglichen.

## 2.4 Aufgabenstellung

Während die Struktur und der grundlegende katalytische Mechanismus des 20S Proteasoms weitgehend geklärt sind, liegen bislang keine detaillierten Kenntnisse in Bezug auf die Translokation von Substraten zum katalytischen Zentrum vor. Zum Abbau bestimmte entfaltete Polypeptide müssen durch ein System aus internen Hohlräumen und Engstellen in die zentrale Kammer gelangen, in der sich die aktiven Zentren befinden. Die Funktion der Vorkammern ist dabei noch ungeklärt und es ist nicht bekannt, ob die Translokation der Substrate auf irgendeine Art reguliert ist.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Bildung von „Host-Guest“ Komplexen, in denen Substrate während der Translokation im Inneren des 20S Proteasoms eingeschlossen werden, und deren Analyse mittels verschiedener biochemischer und biophysikalischer Methoden einen Einblick in die Vorgänge bei der Substrattranslokation in das 20S Proteasom und die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym zu erhalten.



## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| <b>Chemikalie</b>   | <b>Abkürzung/Formel</b>                            | <b>Firma</b>         |
|---|--|----------------------|
| Acrylamid 30 %/Bisacrylamid 8,8 %                           | Protogel Ultra Pure                                | National Diagnostics |
| Agarose   |  | Sigma                |
| 7-Amino-4-methylcoumarin                                    | AMC  | Bachem               |
| Ammoniumperoxodisulfat                                      | APS  | Merck                |
| Ammoniumsulfat  | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$                       | Merck                |
| Ampicillin  | Amp  | Sigma                |
| Bacto Agar  |  | Difco                |
| Bacto Tryptone  |  | Difco                |
| Bacto Yeast Extract   |  | Difco                |
| Betain-Monohydrat   |  | Fluka                |
| Bovine Serum Albumin  | BSA  | Sigma                |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/<br>Nitro blue Tetrazolium | Fast™ BCIP/NBT                                     | Sigma                |
| Bromphenolblau  |  | Serva                |
| Calciumchlorid-Dihydrat                                     | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$          | Merck                |
| Chloramphenikol   | Cam  | AppliChem            |
| elasto-Lactacystin $\beta$ -Lacton                          |  | Sigma                |
| Coomassie Brilliant Blue R250                               |  | Serva                |
| Cytochrom c   | Cyt c  | Sigma                |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat                         | $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | Merck                |
| Dimethylsulfoxid  | DMSO   | Merck                |
| Dinatriumhydrogenphosphat                                   | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                          | Merck                |
| 1,4-Dithiothreitol  | DTT  | Merck                |
| Essigsäure, konz.   | HAc  | Merck                |

| <b>Chemikalie</b>   | <b>Abkürzung/Formel</b>              | <b>Firma</b> |
|---|--------------------------------------|--------------|
| Ethanol, abs.   | EtOH                                 | Merck        |
| Ethidiumbromid  | EtBr                                 | Merck        |
| Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure                         | Titriplex, EDTA                      | Merck        |
| Fotofilm Entwicklerlösung                                       | G153 Developer A                     | Agfa         |
| Fotofilm Fixierlösung   | G354 Rapid Fixer                     | Agfa         |
| Glukose   |                                      | Merck        |
| Glycin  | Gly, G                               | Sigma        |
| Glycerin 86-88 %  | 86-88 %                              | Merck        |
| Guanidin-Hydrochlorid   | GuHCl                                | Merck        |
| Imidazol  |                                      | Merck        |
| Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid                      | IPTG                                 | Biomol       |
| Kaliumchlorid   | KCl                                  | Merck        |
| Kaliumdihydrogenphosphat  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | Merck        |
| $\alpha$ -Laktose-Monohydrat                                    |                                      | Sigma        |
| Magermilchpulver Instant  | Naturaflor                           | Töpfer       |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat                                     | MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | Merck        |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat                                     | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | Sigma        |
| Methanol  | MeOH                                 | Merck        |
| Morpholinopropansulfonsäure                                     | MOPS                                 | Serva        |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin                                | TEMED                                | Serva        |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure                 | HEPES                                | Biomol       |
| Natriumacetat   | NaAc                                 | Merck        |
| Natriumazid   | NaN <sub>3</sub>                     |              |
| Natriumchlorid  | NaCl                                 | Merck        |
| Natriumdihydrogenphosphat                                       | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>     | Merck        |
| Natriumdodecylsulfat  | SDS                                  | Roth         |
| Nickelsulfat-Heptahydrat  | NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | Sigma        |
| N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4-methylcoumarin | Suc-LLVY-AMC                         | Bachem       |

| <b>Chemikalie</b>                | <b>Abkürzung/Formel</b> | <b>Firma</b>   |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|
| Polyethylenglykol-1000           | PEG-1000                | Fluka          |
| Polyethylenglykol-3350           | PEG-3350                | Fluka          |
| Polyethylenglykol-400            | PEG-400                 | Fluka          |
| Ponceau S                        |                         | Sigma          |
| <i>iso</i> -Propanol             | <i>i</i> -PrOH          | Merck          |
| Salzsäure, konz.                 | HCl                     | Merck          |
| Tetrazyklin                      | Tet                     | Sigma          |
| Tricine                          |                         | Calbiochem     |
| Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan | Tris-Base               | Riedel de Haen |
| Tween 20                         |                         | Fluka          |

| <b>Verbrauchsmaterial</b> | <b>Bezeichnung</b>                             | <b>Firma</b>         |
|---------------------------|--|----------------------|
| Chromatographiesäulen     | HisTrap <sup>TM</sup> HPLC                     | GE Healthcare        |
|                           | HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade           | GE Healthcare        |
| Deckgläschen              | siliziert, Ø: 22 mm, Dicke 0,22 mm             | Hampton Research     |
| Faltenfilter              | 595 1/2; Ø 240 mm                              | Schleicher & Schuell |
| Filtermembranen           | Supor <sup>®</sup> -450; Ø 47 mm; 0,45 µm      | Pall                 |
|                           | Supor <sup>®</sup> -200; Ø 47 mm; 0,2 µm       | Pall                 |
| Filterpapier              | Blotting Filter Paper; 2,5 mm                  | Invitrogen           |
| Impfeschlingen            | PS; 200 mm; 10 µl                              | Greiner bio-one GmbH |
| Konzentratoren            | Amicon <sup>®</sup> Ultra-15 versch. MWCO      | Millipore            |
|                           | Microcon <sup>®</sup> verschiedene MWCO        | Millipore            |
| Kristallisationsplatten   | Limbro <sup>®</sup> 24-well                    | Hampton Research     |
| Kryoloops                 | Mounted CryoLoops <sup>TM</sup> versch. Größen | Hampton Research     |
| Kryoröhrchen              | CryoTube <sup>TM</sup> Vials; 1,8 ml           | Nunc                 |
| Küvetten                  | Einmal Küvetten 1,5 ml PMMA                    | Roth                 |
| Mikrofiltereinheiten      | Nanosep <sup>®</sup> MF 0,2 µm                 | Millipore            |
| Mikrotiterplatten         | Microlon, 96K; 655080                          | Greiner bio-one GmbH |
|                           | Masterblock 96-well; 2 ml                      | Greiner bio-one GmbH |
| PCR-Reaktionsgefäße       | MicroAmp <sup>®</sup>                          | Applied Biosystems   |

| <b>Verbrauchsmaterial</b> | <b>Bezeichnung</b>                        | <b>Firma</b>     |
|---------------------------|---|------------------|
| Pipettenspitzen           | PP blau; 100-1000 µl                      | Peske            |
|                           | PP weiß; 1-200 µl                         | Peske            |
|                           | Kristall; 0,1-10 µl                       | Peske            |
| PVDF-Membran              | 0,2 µm Porengröße                         | Invitrogen       |
| Reaktionsgefäße           | 15 ml und 50 ml Gamma sterilisiert        | TPP              |
|                           | 1,5 ml und 2 ml                           | Eppendorf        |
| Röntgenfilme              | Hyperfilm <sup>TM</sup> ECL <sup>TM</sup> | GE Healthcare    |
| Spritzenaufsatzfilter     | Millex®-GS (0,22 µm)                      | Millipore        |
|                           | Millex®-GV (0,22 µm)                      | Millipore        |
| Vakuumfett                | Dow Corning 7 Release Compound            | Hampton Research |
| Zellophanfolien           | GelAir Cellophane Support                 | BioRad           |

### 3.1.2 Geräte

| <b>Gerät</b>                            | <b>Bezeichnung</b>                                     | <b>Firma</b>              |
|---|--|---------------------------|
| Agarose Gelelektrophorese-Apparatur     |  | MPI Werkstatt             |
| Autoklav                                |  | Tecnomara                 |
| Blockthermostat                         | BT200  | Kleinfeld<br>Labortechnik |
| Blot-Apparatur                          | TransBlot SemiDry Electrophoretic Transfer Cell-System | BioRad                    |
| Brutschrank                             |  | Haraeus                   |
| Cell-Disrupter                          | EmulsiFlex-C5  | Avestin                   |
| Eismaschine                             |  | Ziegra                    |
| Elektronenmikroskope                    | CM 12  | Philips                   |
|   | CM 20 FEG  | Philips                   |
| Fermenter                               | 100 l  | Bioengineering AG         |
| Filter- und Entgas-Apparatur für Puffer |  | Nalgene                   |

| <b>Gerät</b>             | <b>Bezeichnung</b>               | <b>Firma</b>             |
|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Fluoreszenzspektrometer  | LS 50 B                          | Perkin Elmer             |
|                          | FLUOstar Optima                  | BMG                      |
| Geltrockner              | GelAir Dryer                     | BioRad                   |
| FPLC                     | ÄKTA™ Purifier 10                | GE Healthcare            |
|                          | ÄKTA™ Explorer 10                | GE Healthcare            |
|                          | ÄKTA™ 3D-Kit                     | GE Healthcare            |
| Kristallzüchtungsschrank | WBK 120                          | Mytron                   |
| Kühlkabinett             |                                  | Schulz                   |
| Kulturschüttler          | Cellstar                         | Nunc                     |
|                          | Innova 3000                      | New Brunswick Scientific |
| Lichtmikroskop           | SZX9                             | Olympus                  |
| Magnetrührer             | Ika-combimag RCT                 | Ika Labortechnik         |
| Mikrowelle               | Micromat                         | AEG                      |
| Milli-Q Anlage           | PLUS Ultra Pure Water System     | Millipore                |
| PAGE Zubehör             | Mighty Small II-System (8x7 cm)  | GE Healthcare            |
|                          | Glasplatten 10x8 cm              | GE Healthcare            |
|                          | Aluplatten 10x8 cm               | GE Healthcare            |
|                          | Spacer; 0,75 mm                  | GE Healthcare            |
|                          | Kämme; 0,75 mm; 10 well          | GE Healthcare            |
|                          | Gießkammern (12 Gele)            | GE Healthcare            |
|                          | XCell Sure Lock™ Mini Cell       | Invitrogen               |
|                          | PCR-Thermocycler                 | PCR System 2400          |
| Peltier Element          | PTP 6 Peltier System             | Perkin Elmer             |
| Peristaltikpumpe         | EconoPump                        | BioRad                   |
| pH-Meter                 | pH525                            | WTW                      |
| Photometer               | UV/Vis Spectrometer Lambda 40    | Perkin Elmer             |
|                          | Novaspec® II                     | GE Healthcare            |
| Pipetten                 | 5 ml                             | Eppendorf                |
|                          | Pipetman 2, 10, 20, 100, 1000 µl | Gilson                   |

| <b>Gerät</b>         | <b>Bezeichnung</b>              | <b>Firma</b>       |
|----------------------|---------------------------------|--------------------|
| Quarz-Küvetten       | Suprasil® Typ 105.251-QS; 3 mm  | Hellma             |
|                      | Suprasil® Typ 100-QS; 1 mm      | Hellma             |
|                      | Suprasil® Typ 100-QS; 10 mm     | Hellma             |
| Röntgenfilm Kassette | Hypercassette™                  | GE Healthcare      |
| Schwenker            | Unimax 2010                     | Heidolph           |
| Sicherheitswerkbank  | antair BSK                      | GLW                |
| Spannungsquelle      | PowerPac 300                    | BioRad             |
|                      | E443                            | Consort            |
| Thermomixer          | 5436                            | Eppendorf          |
| Thermostat           | Polystat cc-1                   | Huber              |
| Ultraschall-Gerät    | Sonifier 250                    | Branson            |
| UV-Tisch             | Transilluminator                | Herolab            |
|                      | Image Reader                    | Herolab            |
| Vakuum-Konzentrator  | BA-VC-300 H                     | Bachhofer GmbH     |
| Vortexer             | Vortex Genie 2                  | Bender & Hobein    |
| Waage                |                                 | Santorius          |
| Wasserbad            | MT/2                            | Lauda              |
| Zentrifugen          | 5417R (Rotor: F 45-30-11)       | Eppendorf          |
|                      | Durchlaufzentrifuge (Fermenter) | Carl Padberg GmbH  |
|                      | Rotanta 46 RS                   | Hettich            |
|                      | Sorvall RC-SB (Rotor: SS-34)    | DuPont Instruments |
| Zentrifugenröhrchen  |                                 | Beckmann           |

### 3.1.3 Kits und Standards

| <b>Kit</b>   | <b>Firma</b>     |
|--|------------------|
| Additive Screen 2™   | Hampton Research |
| Additive Screen 3™   | Hampton Research |
| ECL (Enhanced Chemiluminescence) Western Blotting Detection Reagents Kit   | GE Healthcare    |
| Protein Assay Kit  | BioRad           |
| QIAprep Spin Miniprep Kit  | Qiagen           |
| QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit  | Stratagene       |
| <br>   |                  |
| <b>Standard</b>  | <b>Firma</b>     |
| 1 kb DNA Ladder (10,0 kb / 42 ng; 8,0 kb / 42 ng; 6,0 kb / 50 ng; 5,0 kb / 42 ng; 4,0 kb / 33 ng; 3,0 kb / 125 ng; 2,0 kb / 48 ng; 1,5,0 kb / 36 ng; 1,0 kb / 42 ng; 0,5 kb / 42 ng; bei 0,5 µg Marker pro Spur)   | NEB              |
| 100 bp DNA Ladder (1.517 bp / 45 ng; 1.200 bp / 35 ng; 1.000 bp / 95 ng; 900 bp / 27 ng; 800 bp / 24 ng; 700 bp / 21 ng; 600 bp / 18 ng; 500, 517 bp / 97 ng; 400 bp / 38 ng; 300 bp / 29 ng; 200 bp / 25 ng; 100 bp / 48 ng; bei 0,5 µg Marker pro Spur)  | NEB              |
| High Molecular Weight (HMW) Calibration Kit for Native Electrophoresis (Thyroglobulin 669 kDa / 7,6 µg; Ferritin 440 kDa / 5,0 µg; Katalase 232 kDa / 3,6 µg; Laktatdehydrogenase 140 kDa / 4,8 µg; BSA 67 kDa / 4,0 µg; bei 10 µl Marker pro Spur)  | GE Healthcare    |
| SDS-PAGE Standard Broad Range (Myosin 200 kDa, β-Galactosidase 116 kDa, Phosphorylase b 97,4 kDa, BSA 66 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Carbonatanhydrase 31 kDa, Sojabohnen Trypsininhibitor 21,5 kDa, Lysozym 14,5 kDa, Aprotinin 6,5 kDa; je 1 µg bei 10 µl Marker pro Spur)  | BioRad           |
| SeeBlue® Plus2 Pre-Stained (im Tris-Glycin Puffersystem: Myosin 250 kDa (blau), Phosphorylase 148 kDa (orange), BSA 98 kDa (blau), Glutamindehydrogenase 64 kDa (blau), Alkoholdehydrogenase 50 kDa (blau), Carbonatanhydrase 36 kDa (blau), Myoglobinrot 22 kDa (rot), Lysozym 16 kDa (blau), Aprotinin 6 kDa (blau), Insulin B-Kette 4 kDa (blau)) | Invitrogen       |

### 3.1.4 Enzyme und Antikörper

| <b>Enzym</b>  | <b>Firma</b> |
|---|--------------|
| DNaseI aus Rinderpankreas, grade II                               | Roche        |
| DpnI (10 U/ $\mu$ l)  | Stratagene   |
| Bestandteil des <i>QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits</i> |              |
| HindIII (20 U/ $\mu$ l)   | NEB          |
| KpnI (20 U/ $\mu$ l)  | NEB          |
| Lysozym aus Hühnereiweiß (58.100 U/mg)                            | Sigma        |
| PfuTurbo® DNA Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)                         | Stratagene   |
| Bestandteil des <i>QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits</i> |              |

| <b>Antikörper und verwendete Verdünnung</b>   | <b>Firma</b> |
|---|--------------|
| Anti-Cytochrom c; Maus IgG <sub>2b</sub> , monoklonal (1:500)                       | Santa Cruz   |
| Anti-GFP; Maus IgG <sub>2a</sub> , monoklonal (1:200)                               | Santa Cruz   |
| Anti-His; Kaninchen, polyklonal (1:1000)  | Santa Cruz   |
| Anti-Maus IgG; Ziege, polyklonal, gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:2000)      | Santa Cruz   |
| Anti-Maus IgG; Ziege, polyklonal, gekoppelt an Meerrettich Peroxidase (1:2000)      | Santa Cruz   |
| Anti-Kaninchen IgG; Ziege, polyklonal, gekoppelt an alkalische Phosphatase (1:2000) | Santa Cruz   |

### 3.1.5 Bakterienstämme und Medien

Tab. 3.1: Verwendete Bakterienstämme und deren Genotyp.

| <i>E. coli</i> Stamm | Genotyp   | Quelle  |
|----------------------|---|---|
| <b>BL21 (DE3)</b>    | F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)   | Invitrogen                                    |
| <b>KY2266</b>        | F <sup>-</sup> <i>araD</i> Δ( <i>argF-lac</i> )U169 <i>rpsL relA flbB deoC ptsF rbsR</i> Δ <i>hslVU1172::tet</i> Δ( <i>clpPX-lon</i> )1196:: <i>cat</i>                                       | P. Zwickl<br>[Kanemori, <i>et al.</i> , 1997] |
| <b>XL1 Blue</b>      | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]  | Stratagene                                    |
| <b>Top10</b>         | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZΔM15</i> Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7679 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i> | Invitrogen                                    |

LB (Luria-Bertani)-Medium:

|  |                     |  |
|--|---------------------|--|
| 10 g                                     | Bacto Tryptone      | Sterilisation im Autoklav<br>(20 Minuten 121 °C) |
| 5 g                                      | Bacto Yeast Extract |  |
| 10 g                                     | NaCl                |  |
| ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> |                     |  |

SOC-Medium:

|  |                     |   |
|--|---------------------|---|
| 20 g                                     | Bacto Tryptone      | Sterilisation im Autoklav<br>(20 Minuten 121 °C).   |
| 5 g                                      | Bacto Yeast Extract |   |
| 0,5 g                                    | NaCl                | Nach Abkühlen Zugabe von 5 ml 2 M<br>MgCl <sub>2</sub> (19 g MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O in 100 ml<br>H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ) und 20 ml 1 M Glukose (18 g in<br>100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ) |
| 10 ml                                    | 250 mM KCl          |   |
| ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> |                     |   |

ZY-5052-Vollmedium:

464,5 ml ZY-Medium  
0,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>  
10 ml 50x 5052  
25 ml 20x NPS

20x NPS:

0,5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
pH ca. 6,75  
sterilfiltrieren

ZY-Medium:

10 g Bacto Tryptone  
5 g Bacto Yeast Extract  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
Sterilisation im Autoklav  
(20 Minuten 121 °C)

50x 5052:

250 g Glycerin  
730 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
25 g Glukose  
100 g α-Laktose  
sterilfiltrieren

LB-Agar:

LB-Medium  
15 g/l Bacto Agar

Sterilisation im Autoklav (20 Minuten  
121 °C).

Nach Abkühlung des autoklavierten bzw. in der Mikrowelle geschmolzenen Agars auf ca. 50 °C wird der Selektivmarker (Ampicillin 100 µg/ml) zugesetzt und der Agar in Petrischalen gegossen.

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$  angesetzt und autoklaviert oder durch  $0,22\ \mu\text{m}$  *Millex®-GS* ( $0,22\ \mu\text{m}$ ) Spritzenaufsatzfilter bzw. Nalgene Flaschenaufsatzfilter bestückt mit Filtermembranen der Firma Pall ( $0,45\ \mu\text{m}$  bzw.  $0,2\ \mu\text{m}$ ) sterilfiltriert. Die zur chromatographischen Aufreinigung eingesetzten Puffer werden zusätzlich entgast.

#### 3.1.6.1 Lösungen für molekularbiologische Arbeitsmethoden

TAE-Puffer:

- 2 mM EDTA pH 8,0
- 20 mM Na-Acetat
- 40 mM Tris/Acetat pH 8,0

Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

Puffersystem:

TAE-Puffer

Gel:

1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer

6 x Auftragspuffer:

- 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
- 30 % (v/v) Glycerin

#### 3.1.6.2 Lösungen für biochemische Arbeitsmethoden

Stocklösungen für die rekombinante Expression von Strukturgenen

Ampicillin:

- 100 mg/ml Ampicillin in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$
- Lagerung bei  $-20\ ^\circ\text{C}$

Tetracyclin:

- 5 mg/ml Tetracyclin in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$
- Lagerung bei  $-20\ ^\circ\text{C}$

Chloramphenikol:

- 34 mg/ml Chloramphenikol
- in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$
- Lagerung bei  $-20\ ^\circ\text{C}$

IPTG:

- 1 M in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$
- Lagerung bei  $-20\ ^\circ\text{C}$

### Lösungen für die Ni-Affinitätschromatographie

#### Puffer A-HisTrap:

|        |                    |
|--------|--------------------|
| 20 mM  | Na-Phosphat pH 7,4 |
| 500 mM | NaCl               |
| 20 mM  | Imidazol           |

#### Puffer B-HisTrap:

|        |                    |
|--------|--------------------|
| 20 mM  | Na-Phosphat pH 7,4 |
| 500 mM | NaCl               |
| 500 mM | Imidazol           |

#### Stripping-Puffer:

|        |                    |
|--------|--------------------|
| 20 mM  | Na-Phosphat pH 7,4 |
| 500 mM | NaCl               |
| 50 mM  | EDTA pH 8,0        |

#### Ni<sup>2+</sup>-Ladepuffer:

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 400 mM | NiSO <sub>4</sub> |
|--------|-------------------|

### Lösungen für die Gelfiltration

#### Gelfiltrationspuffer:

|        |              |
|--------|--------------|
| 20 mM  | HEPES pH 7,5 |
| 150 mM | NaCl         |

### Lösungen für die SCHÄGGER-SDS-PAGE

#### 12 % Trenngel:

|         |                                     |
|---------|-------------------------------------|
| 36 ml   | 30 % Acrylamid ProtoGel             |
| 15 ml   | 6x Gelpuffer                        |
| 39 ml   | H <sub>2</sub> O <sub>Milli-Q</sub> |
| 267 µl  | 20 % (w/v) APS                      |
| 26,7 µl | TEMED                               |

#### 5 % Sammelgel:

|         |                                     |
|---------|-------------------------------------|
| 6 ml    | 30 % Acrylamid ProtoGel             |
| 6 ml    | 6x Gelpuffer                        |
| 24 ml   | H <sub>2</sub> O <sub>Milli-Q</sub> |
| 300 µl  | 20 % (w/v) APS                      |
| 30,0 µl | TEMED                               |

#### 6x Gelpuffer:

|       |                  |
|-------|------------------|
| 3 M   | Tris/HCl pH 8,45 |
| 0,3 % | SDS              |

#### 2x Probenpuffer:

|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| 0,2 % (w/v)         | Bromphenolblau  |
| 20 %                | Glycerin        |
| 100 mM              | Tris/HCl pH 6,8 |
| 200 mM              | DTT             |
| 4 % (w/v)           | SDS             |
| Lagerung bei -20 °C |                 |

## 10x Kathodenpuffer:

|           |           |
|-----------|-----------|
| 1 M       | Tris-Base |
| 1 M       | Tricine   |
| 1 % (w/v) | SDS       |

pH-Einstellung nicht nötig (ca. 8,25)

## 10x Anodenpuffer:

2 M Tris/HCl pH 8,9

Die angegebenen Mengen sind ausreichend zum Gießen von 12 Gelen im Format 8 x 7 cm.

## Lösungen für die Tris-Glycin SDS-PAGE

## 2x Tris-Glycin SDS Probenpuffer:

|                    |                 |
|--------------------|-----------------|
| 63 mM              | Tris/HCl pH 6,8 |
| 10 % (v/v)         | Glycerin        |
| 2 % (w/v)          | SDS             |
| 0,0025 % (w/v)     | Bromphenolblau  |
| Lagerung bei +4 °C |                 |

## 10x Tris-Glycin SDS Laufpuffer:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| 25 mM                                | Tris-Base |
| 192 mM                               | Glycin    |
| 0,1 % (w/v)                          | SDS       |
| pH-Einstellung nicht nötig (ca. 8,3) |           |

## Lösungen für die Tris-Glycin Native PAGE

## 2x Tris-Glycin Native Probenpuffer:

|                    |                 |
|--------------------|-----------------|
| 100 mM             | Tris/HCl pH 6,8 |
| 10 % (v/v)         | Glycerin        |
| 0,0025 % (w/v)     | Bromphenolblau  |
| Lagerung bei +4 °C |                 |

## 10x Tris-Glycin Nativer Laufpuffer:

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| 25 mM                                | Tris-Base |
| 192 mM                               | Glycin    |
| pH-Einstellung nicht nötig (ca. 8,3) |           |

## Lösungen für die Tris-Glycin Blaue Nativ PAGE

## 2x Tris-Glycin Blau Nativ Probenpuffer:

|                    |                                  |
|--------------------|----------------------------------|
| 100 mM             | Tris/HCl pH 6,8                  |
| 10 % (v/v)         | Glycerin                         |
| 0,0025 % (w/v)     | Bromphenolblau                   |
| 1 % (w/v)          | Coomassie R250<br>Brilliant Blue |
| Lagerung bei +4 °C |                                  |

## 10x Tris-Glycin Blau Nativ Kathodenpuffer:

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| 25 mM                                | Tris-Base                        |
| 192 mM                               | Glycin                           |
| 0,2 % (w/v)                          | Coomassie R250<br>Brilliant Blue |
| pH-Einstellung nicht nötig (ca. 8,3) |                                  |

### Lösungen für die Coomassie-Heiß-Färbung

#### Fixierlösung:

40 % (v/v) Ethanol abs.

10 % (v/v) Essigsäure

#### Entfärbelösung:

25 % (v/v) Ethanol abs.

8 % (v/v) Essigsäure

#### Färbelösung:

25 % (v/v) Ethanol abs.

8 % (v/v) Essigsäure

0,1 % (w/v) Coomassie R250  
Brilliant Blue

Der Farbstoff wird unter Rühren bei  
60 °C gelöst und filtriert.

### 3.1.6.3 Lösungen für immunologische Arbeitsmethoden

#### Transferpuffer:

50 mM Tris-Base

40 mM Glycin

0,037 % (w/v) SDS

20 % (v/v) Methanol

#### TBS:

150 mM NaCl

20 mM Tris/HCl pH 7,5

#### TBS-T:

150 mM NaCl

20 mM Tris/HCl pH 7,5

0,05 % (v/v) Tween 20

#### Blockierlösung:

150 mM NaCl

20 mM Tris/HCl pH 7,5

5 % (w/v) Magermilchpulver

### 3.1.7 Plasmide

Tab. 3.2: *Verwendete Plasmide und deren Antibiotikaresistenz.*

| Plasmid                                 | Resistenz | Quelle   |
|---|-----------|--|
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _α            | amp       | E. Seemüller [Seemüller, <i>et al.</i> , 1995] |
| pRSET5a_ΔT1AβHis <sub>6</sub> _α        | amp       | E. Seemüller [Seemüller, <i>et al.</i> , 1995] |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _S95Aα        | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _Q98Aα        | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _E99Aα        | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _R115Aα       | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _G127Aα       | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _G128Aα       | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _G127Fα       | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _G128Fα       | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _G127A/G128Aα | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pRSET5a_βHis <sub>6</sub> _G127F/G128Fα | amp       | Mutagenese (siehe Kapitel 3.3.3)               |
| pTrc99a_His <sub>6</sub> GFP            | amp       | P. Zwickl [Amann, <i>et al.</i> , 1988]        |

Bei allen Mutanten des 20S Proteasoms ist der C-Terminus der β-Untereinheit mit einem His<sub>6</sub>-tag fusioniert. Die insgesamt 14 His<sub>6</sub>-tag sind im vollständig assemblierten 20S Proteasom an den Außenseiten der zentralen β-Ringe positioniert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Fusion keinerlei Einfluss auf die proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms ausübt [Thess, *et al.*]. Die Mutante des 20S Proteasoms, die lediglich den His<sub>6</sub>-tag, jedoch keine weitere Mutation enthält, wird im Folgenden Wildtyp genannt.

Das Gen für GFP ist im verwendeten Plasmid N-terminal mit einem His<sub>6</sub>-tag fusioniert. Dies erlaubt die Aufreinigung der Proteine mittels Ni-Affinitätschromatographie.

### 3.1.8 Primer

Alle benötigten Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH synthetisiert und mittels HPLC gereinigt.

Primer für die zielgerichtete Mutagenese

Tab. 3.3: Sequenzen der verwendeten Primer für die zielgerichtete Mutagenese.

| Mutation       | Template                                     | Sequenz  |
|----------------|--|--|
| S95A $\alpha$  | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense 5'-GTGGACTTTGCCAGGATAG <u>CTG</u><br>CCCAGCAGGAAAAGGTAACG-3'       |
|                |  | antisense 5'-CGTTACCTTTTCCTGCTGGGCAG<br><u>CTATCCTGGCAAAGTCCAC</u>       |
| Q98A $\alpha$  | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense 5'-GCCAGGATAAGCGCCAGG <u>GCGG</u><br>AAAAGGTAACGTACGG-3'           |
|                |  | antisense 5'-CCGTACGTTACCTTTTCCG <u>CCTG</u><br>GGCGCTTATCCTGGC-3'       |
| E99A $\alpha$  | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense 5'-GGATAAGCGCCAGCAGG <u>CAAA</u><br>GGTAACGTACGGATCG-3'            |
|                |  | antisense 5'-CGATCCGTACGTTACCTTTG <u>CCT</u><br>GCTGGGCGCTTATCC-3'       |
| R115A $\alpha$ | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense 5'-GAGAATCTAGTTAAGG <u>CAGTTG</u><br>CTGACCAGATGCAGCAG-3'          |
|                |  | antisense 5'-CTGCTGCATCTGGTCAGCAACT<br><u>GCCTTAACTAGATTCTC</u> -3'      |
| G127A $\alpha$ | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense 5'-GCAGTACACACAGTACG <u>CTGGC</u><br>GTAAGGCCATACGGTGTATCG-3'      |
|                |  | antisense 5'-CGATACACCGTATGGCCTTACG<br>CCAG <u>CGTACTGTGTGTACTGC</u> -3' |
| G128A $\alpha$ | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense 5'-GCAGTACACACAGTACGGT <u>GCA</u><br>GTAAGGCCATACGGTGTATCG-3'      |
|                |  | antisense 5'-CGATACACCGTATGGCCTTACT<br><u>GCACCGTACTGTGTGTACTGC</u> -3'  |

| Mutation                 | Template                                     | Sequenz   |   |
|--------------------------|--|-----------|---|
| G127F $\alpha$           | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense     | 5'-GCAGTACACACAGTACTTTGGC<br>GTAAGGCCATACGGTGTATCG-3' |
|                          |  | antisense | 5'-CGATACACCGTATGGCCTTACG<br>CCAAAGTACTGTGTGTACTGC-3' |
| G128F $\alpha$           | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense     | 5'-GCAGTACACACAGTACGGTTTC<br>GTAAGGCCATACGGTGTATCG-3' |
|                          |  | antisense | 5'-CGATACACCGTATGGCCTTACG<br>AAACCGTACTGTGTGTACTGC-3' |
| G127A/G<br>128A $\alpha$ | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense     | 5'-GCAGTACACACAGTACGCTGCA<br>GTAAGGCCATACGGTGTATCG-3' |
|                          |  | antisense | 5'-CGATACACCGTATGGCCTTACT<br>GCAGCGTACTGTGTGTACTGC-3' |
| G127F/G<br>128F $\alpha$ | pRSET5a_ $\beta$ His <sub>6</sub> _ $\alpha$ | sense     | 5'-GCAGTACACACAGTACTTTTTCG<br>TAAGGCCATACGGTGTATCG-3' |
|                          |  | antisense | 5'-CGATACACCGTATGGCCTTACG<br>AAAAAGTACTGTGTGTACTGC-3' |

## Sequenzierungsprimer

Tab. 3.4: Sequenzen der Sequenzierungsprimer.

| Plasmid  | Sequenz                        |
|--|--------------------------------|
| pRSET_seq_for<br>bindet auf sense-Strang upstream der Gene für die $\alpha$ -<br>und $\beta$ -Untereinheit im Vektor pRSET5a     | 5'-TAATACGACTCACTATA<br>GGG-3' |
| pRSET_seq_rev<br>bindet auf antisense-Strang upstream der Gene für<br>die $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit im Vektor pRSET5a | 5'-TAGTTATTGCTCAGCGG<br>TGG-3' |
| pTrc99a_seq_for<br>bindet auf sense-Strang upstream des Gens für GFP<br>im Vektor pTrc99a  | 5'-CCGGCTCGTATAATGTG<br>TGG-3' |
| pTrc99a_seq_rev<br>bindet auf antisense-Strang upstream des Gens für<br>GFP im Vektor pTrc99a                                    | 5'-CTGCAGGTCGACTCTAG<br>AGG-3' |

## 3.2 Kulturbedingungen von *E.coli*

*Escherichia coli* wird in Flüssigkultur in LB-Medium und zum Selektieren einzelner Kolonien in Petrischalen auf LB-Agar kultiviert (siehe Kapitel 3.1.5).

Die Plasmide werden frisch transformiert und der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die, falls nicht anders angegeben, den Selektionsmarker Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml enthalten. Mit einer einzelnen Kolonie werden 3 bis 100 ml LB-Medium angeimpft, die wiederum 100 µg/ml Ampicillin enthalten. Kulturen mit geringerem Volumen werden in Falcon-Röhrchen inkubiert, während größere Volumina in Schüttelkolben mit Schikanen, die mit einem Viertel ihres Nennvolumens gefüllt sind, kultiviert werden. Die Kulturen werden, falls nicht anders angegeben, bei 37 °C mit 180 rpm 12 bis 16 Stunden geschüttelt und können anschließend zur Plasmidpräparation oder zum Animpfen einer Hauptkultur verwendet werden. Zur Herstellung von Glycerinkulturen werden autoklavierte Kryoröhrchen, die 1 ml Glycerin enthalten, mit 1 ml der Kultur versetzt und bei -80 °C eingefroren und aufbewahrt.

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

Die Zusammensetzung aller verwendeter Medien, Puffer und Lösungen ist in den Kapiteln 3.1.5 und 3.1.6.1 beschrieben.

### 3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung hitzekompetenter Zellen werden 8,5 ml LB-Medium mit 1,5 ml einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen Stammes angeimpft, sodass eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 vorliegt. Die Kultur wird unter Schütteln in Kolben ohne Schikanen bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 inkubiert und anschließend jeweils die Hälfte in zwei 2 l Kolben ohne Schikane, gefüllt mit 0,5 l LB-Medium, überimpft. Sobald unter Schütteln bei 37 °C eine OD<sub>600nm</sub> von 0,3 erreicht ist, werden die Zellen 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in vorgekühlten Zentrifugenbechern 10 Minuten bei 4500 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 200 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Die Zellen werden in 2 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und 3 Stunden auf Eis inkubiert. Die Suspension wird in vorgekühlten Eppendorf Reaktionsgefäßen zu 50 µl Anteilen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80 °C sind die Zellen für mehrere Monate kompetent lagerbar.

### 3.3.2 Hitzeschocktransformation

Das Einbringen von DNA in CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen, deren Herstellung in Kapitel 3.3.1 beschrieben ist, erfolgt durch Hitzeschock. Hierzu wird ein 50 µl Aliquot der

kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wird 30 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C erhitzt und anschließend 2 Minuten auf Eis gekühlt. Zur Regeneration werden 500  $\mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Auf LB-Agarplatten, die 100  $\mu\text{g/ml}$  des Selektionsmarkers Ampicillin enthalten, werden 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.3.3 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Generierung verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. Dabei wurde der *QuikChange®Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene verwendet, der alle benötigten Enzyme und Puffer enthält. Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH synthetisiert und mittels HPLC gereinigt.

Zunächst werden - gemäß den Angaben des Herstellers - zwei Primer konstruiert, die die gewünschte Mutation enthalten und zur selben Sequenz auf den gegenüberliegenden Strängen des Plasmids komplementär sind. Im ersten Schritt der Mutagenese wird eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die doppelsträngige Plasmid-DNA (dsDNA), die in der Regel als *supercoil* vorliegt, wird in einem Thermocycler bei 95 °C in einzelsträngige DNA (ssDNA) aufgetrennt. Beim Abkühlen auf 55 °C hybridisieren die Primer mit den einzelnen Plasmid-DNA-Strängen und durch die hitzebeständige PfuTurbo DNA-Polymerase entsteht bei 68 °C wieder ein doppelsträngiges Plasmid, wobei das Oligonukleotid mit der Mutation im frisch synthetisierten Strang erhalten bleibt. Im nächsten Zyklus dient auch dieser Strang als Matrize zur Synthese eines komplementären Gegenstücks, wodurch eine große Anzahl an DNA-Fragmenten, die die gewünschte Mutation aufweisen, erhalten werden kann.

Tab. 3.5: Reaktionsgemisch für die zielgerichtete Mutagenese zur Generierung verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms. Dieses wird für jeden der beiden Primer separat angesetzt. Die mit \* gekennzeichneten Reagenzien sind Bestandteile des *QuikChange®Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene.

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| Plasmid-dsDNA                                     | 1 $\mu\text{l}$                    |
| Reaktionspuffer (10x) *                           | 5 $\mu\text{l}$                    |
| Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )                  | 1 $\mu\text{l}$                    |
| dNTP Mix *  | 1 $\mu\text{l}$                    |
| PfuTurbo DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu\text{l}$ ) * | 1 $\mu\text{l}$                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>Milli-Q</sub>               | 41 $\mu\text{l}$                   |
| <b>Summe</b>                                      | <b>50 <math>\mu\text{l}</math></b> |

Die Effizienz der Methode kann durch die Aufteilung dieses Schritts in zwei Stufen deutlich erhöht werden [Wang und Malcolm, 1999]. Dabei werden zunächst 5 PCR-Zyklen mit zwei getrennten Reaktionsansätzen, die jeweils nur einen der beiden Primer enthalten, durchlaufen (siehe Tab. 3.5). Daraufhin werden 25 µl beider Ansätze vereinigt, erneut 1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase zugegeben und weitere 18 PCR-Zyklen durchgeführt. Das Programm des Thermocyclers ist in Tab. 3.6 wiedergegeben.

Tab. 3.6: Programm des Thermocyclers für die zielgerichtete Mutagenese in zwei Stufen.

|                 |       |                      |
|-----------------|-------|----------------------|
| 30 Sekunden     | 95 °C |                      |
| 30 Sekunden     | 95 °C |                      |
| 1 Minute        | 55 °C | Schritt 1: 5 Zyklen  |
| 4,5 Minuten     | 68 °C | Schritt 2: 18 Zyklen |
| ohne Zeitgrenze | 4 °C  |                      |

Anschließend wird dem Reaktionsgemisch 1 µl der Restriktionsendonuklease Dpn I zugegeben, die Lösung gut vermischt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym Dpn I spaltet spezifisch methylierte DNA (Erkennungssequenz: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'). Plasmid-DNA, die aus dam<sup>-</sup> *E.coli* Stämmen isoliert wurde, ist methyliert und unterliegt somit dem Verdau durch Dpn I. Plasmid-DNA, die *in vitro* synthetisiert wurde, ist unmodifiziert und wird somit von Dpn I nicht angegriffen. Die Inkubation des Reaktionsgemischs mit Dpn I führt demzufolge zu einem Verdau der Matrize und erhöht die Ausbeute der Plasmide mit der gewünschten Mutation [Nelson und McClelland, 1992]. Anschließend erfolgt, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, eine Hitzeschocktransformation in kompetente XL1 Blue Zellen. Zur weiteren Verwendung werden ca. 3 bis 5 Kolonien des Ausstrichs selektiert, deren Plasmid-DNA isoliert (siehe Kapitel 3.3.4) und mittels Sequenzierung (siehe Kapitel 3.3.8) auf die gewünschte Mutation hin überprüft. Bei positivem Ergebnis wird das gesamte Gen sequenziert, um unspezifische Mutationen auszuschließen.

### 3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Um eine Sequenzierung der Plasmide und deren Transformation in den Expressionsstamm durchführen zu können, muss die Plasmid-DNA in sehr reiner Form und salzfreier Lösung isoliert werden. Die angewandte Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen [Birnboim und Doly, 1979] und anschließender Adsorption der DNA an Kieselgel in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen [Vogelstein und Gillespie, 1979]. Hierzu wird der *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen verwendet, der alle benötigten Puffer und Materialien enthält.

Eine vereinzelte, frisch transformierte *E.coli*-Kolonie wird über Nacht in 3-5 ml LB-Selektivmedium bei 37 °C kultiviert. Die Zellen werden 10 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, und das Pellet gemäß dem *QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol* in RNase-haltigem Puffer resuspendiert und mit SDS-haltigem Puffer lysiert. Anschließend werden Proteine, chromosomale DNA, SDS und größere Zellbestandteile ausgefällt und abzentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt und bei hoher Salzkonzentration auf *QIAprep Spin Columns* aufgetragen wird. Hierbei erfolgt eine selektive Bindung der Plasmid-DNA an die Kieselgel-Membran, während andere Bestandteile des Lysats ausgewaschen werden. Die Elution erfolgt mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>Milli-Q</sub> und 50 µl des mitgelieferten Elutionspuffers. Auf diesem Wege können ca. 15 µg des Plasmids erhalten werden.

### 3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationen wässriger DNA-Lösungen werden durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Eine Absorption von 1,0 entspricht für doppelsträngige DNA in etwa einer Konzentration von 50 µg/ml.

### 3.3.6 Restriktionsverdau von DNA

Um die Aufnahme der Plasmids in die Zellen nach der Hitzeschocktransformation (siehe Kapitel.3.3.2) zu verifizieren, wird die isolierte Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.3.4) mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen behandelt, die sie sequenzspezifisch schneiden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie die entsprechenden Puffer stammen von der Firma New England Biolabs.

Tab. 3.7: Reaktionsgemische für den Restriktionsverdau der verwendeten Plasmide zur Überprüfung der Transformation. Alle mit \* gekennzeichneten Reagenzien wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

|                                     | <b>Kpn I-Verdau<br/>pRSET5a_βHis<sub>6</sub>_α<br/>(βHis-Fragment)<br/>3543/696 bp</b> | <b>Hind III-Verdau<br/>pRSET5a_βHis<sub>6</sub>_α<br/>(α-Fragment)<br/>3403/836 bp</b> | <b>Hind III-Verdau<br/>pTrc99a_His<sub>6</sub>GFP<br/>4269/649 bp</b> |
|-------------------------------------|--|--|---|
| Plasmid-DNA<br>(ca. 1 µg)           | 5 µl   | 5 µl   | 5 µl  |
| NEBuffer 1 *                        | 1 µl   | -  | -   |
| NEBuffer 2 *                        | -  | 1 µl   | 1 µl  |
| BSA (10x) *                         | 1 µl   | -  | -   |
| Hind III (20 U/µl) *                | -  | 0,5 µl   | 0,5 µl  |
| Kpn I (20 U/µl) *                   | 0,5 µl   | -  | -   |
| H <sub>2</sub> O <sub>Milli-Q</sub> | 2,5 µl   | 3,5 µl   | 3,5 µl  |
| <b>Summe</b>                        | <b>10 µl</b>   | <b>10 µl</b>   | <b>10 µl</b>  |

Die in Tab. 3.7 aufgeführten Reaktionsansätze werden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### 3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Fragmente des Restriktionsverdaus (siehe Kapitel 3.3.6) werden die Reaktionsmischungen mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Diese Methode nutzt die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der bei allen pH-Werten negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld aus. Je kleiner die Nukleinsäure, umso schneller wandert sie durch die elektrisch neutrale, feste Gelmatrix aus Agarose zur Anode, wobei die Basenzusammensetzung in der Regel keine Rolle spielt. Als Lauf- und Gelpuffer wird TAE-Puffer verwendet, in dem 1 % (w/v) Agarose durch Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst wird. Das Gel wird in Form einer horizontalen Platte gegossen.

Die Gelelektrophorese der DNA erfolgt bei einer konstanten Spannung von 80 V, sodass zusätzliche Wärmeentwicklung und somit das Schmelzen des Agarosegels verhindert wird.

Als DNA-Molekulargewichtsmarker kommen die 1 kb und 100 bp DNA Ladder (jeweils 0,5 µg pro Geltasche) der Firma New England Biolabs zum Einsatz (Fragmente siehe Kapitel 3.1.3).

Die DNA-Proben sowie der verwendete Standard werden mit einem Fünftel ihres Volumens 6x Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert.

Zur Visualisierung der Banden werden dem Laufpuffer auf der Anodenseite 20 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugesetzt und die Gele in einem UV-Transilluminator ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) fotografiert.

### 3.3.8 DNA-Sequenzierung

Zur automatischen, nichtradioaktiven Sequenzierung wird ca. 1 µg der isolierten Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.3.4) durch Zentrifugation im Vakuum getrocknet und zusammen mit etwa 10 µl des Primers (10 pmol/µl) zur Analyse an die Firma MWG Biotech AG geschickt. Dort wird die DNA mit Hilfe des *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Firma Applied Biosystems nichtradioaktiv sequenziert.

### 3.4 Biochemische Methoden

Die Zusammensetzung der im Text nicht näher spezifizierten Medien, Puffer und Lösungen ist in den Kapiteln 3.1.5 und 3.1.6.2 beschrieben.

#### 3.4.1 Expression von Strukturgenen

Unter der Expression von Strukturgenen versteht man generell die Vorgänge, bei denen die Nukleotidsequenz eines Gens durch Transkription und Translation zur Proteinbiosynthese führt. Aufgrund des unterschiedlichen Mengenbedarfs an Protein wurden verschiedene Methoden zur Expression der Strukturgene verwendet. Abgesehen vom Volumen der Kultur unterscheiden sich die Methoden in der Art der Induktion. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmiden pRSET5a und pTrc99a steht die Expression unter der Kontrolle eines starken Promotors und Terminators. Im Falle von pRSET5a stammen beide aus dem *E.coli* Bakteriophagen T7, während es sich bei pTrc99a um einen *trc*-Promotor, eine künstliche, hoch effiziente Kombination aus *trp*- und *lac*-Promotor, und die Terminatoren T1 und T2 des *E.coli* Gens *rrnB* handelt. Die Promotoren in beiden Plasmiden sind gefolgt von einem *lac*-Operator. Zudem befindet sich auf ihnen das *lacI*-Gen, das den *lac*-Repressor kodiert. Die Induktion kann zum einen durch Zugabe des nicht fermentierbaren Laktose-Analogons IPTG während der Phase des exponentiellen Wachstums erfolgen. Zum anderen ist eine Autoinduktion möglich, wobei sich im Medium aufeinander abgestimmte Mengen Glukose und Laktose befinden [Studier, 2005]. Glukose hemmt die Induktion durch Laktose, wodurch eine Induktion erst nach Sättigung der Kultur und nahezu vollständigem Konsum der Glukose erfolgt.

##### 3.4.1.1 Rekombinante Expression des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* in *E.coli* mit IPTG-Induktion

Die rekombinante Überexpression des 20S Proteasom Wildtyps (His<sub>6</sub>-tag am C-Terminus der  $\beta$ -Untereinheiten) aus *Thermoplasma acidophilum* in *E.coli* erfolgte aufgrund der großen benötigten Menge an reinem Protein in einem 80 l Fermenter. Als Expressionsstamm diente *E.coli* BL21 (DE3). Dabei wird mit einer, wie in Kapitel 3.2 beschrieben hergestellten, 100 ml Vorkultur eine zweite 1 l LB/Amp-Vorkultur in einem 2 l Kolben mit Schikanen angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. In einen 100 l Fermenter der Bioengineering AG werden 80 l LB-Medium gefüllt und über Nacht nach den Angaben des Herstellers autoklaviert. Am Fermentationstag werden dem Medium 8 g Ampicillin (Endkonzentration 100  $\mu$ g/ml) und anschließend die 1 l Vorkultur zugegeben. Die Kultur wird unter kräftigem Rühren bei ca. 200 rpm und Sauerstoffbegasung bei 37 °C inkubiert, bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bis 0,7 erreicht ist. Daraufhin werden zur Induktion der Expression 19,06 g IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugesetzt und weitere acht Stunden kultiviert. Anschließend

werden die Zellen mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge der Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH abgeerntet und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Die rekombinante Überexpression der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms erfolgte nach demselben Prinzip, jedoch in kleineren Volumina. Jeweils 500 ml LB-Medium in 2 l-Kolben mit Schikanen, das den Selektionsmarker Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  enthält, wurden mit 25 ml einer, wie in Kapitel 3.2 beschrieben hergestellten, Vorkultur angeimpft. Sobald unter Schütteln bei 37 °C eine  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,5 bis 0,7 erreicht ist, wird IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugegeben, um die Expression zu induzieren. Nach weiteren fünf Stunden bei 37 °C im Schüttler werden die Zellen durch 20minütige Zentrifugation bei 4000  $\times$  g abgeerntet, in 10 mM Tris-Cl pH 7,5 resuspendiert und anschließend erneut unter den oben beschriebenen Bedingungen abzentrifugiert. Die Lagerung der Zellen bis zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgt bei -20 °C.

#### 3.4.1.2 Rekombinante Expression des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* in *E.coli* mit Autoinduktion

Die übrigen Mutanten des 20S Proteasoms wurden zunächst nur für die Analyse ihrer Enzymkinetik benötigt, wofür geringere Mengen des reinen Proteins ausreichen. Deshalb erfolgte deren rekombinante Expression durch Autoinduktion in Kolben. Auch hier diente *E.coli* BL21 (DE3) als Expressionsstamm. Mit je 25 ml einer, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, hergestellten Vorkultur, werden je 500 ml ZYP-5052-Vollmedium, das Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  enthalten, in 2 l-Kolben mit Schikanen angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm im Schüttler ca. 50 Stunden inkubiert. Eine Zugabe von IPTG ist nicht nötig. Nach dieser Zeit werden die Zellen durch 20minütige Zentrifugation bei 4000  $\times$  g und 4 °C abgeerntet, in 10 mM Tris-Cl pH 7,5 resuspendiert und erneut, wie oben beschrieben, pelletiert. Bis zum Aufschluss der Zellen und der Aufreinigung des rekombinant hergestellten Proteins wird das Pellet bei -20 °C gelagert.

#### 3.4.1.3 Rekombinante Expression von GFP in *E.coli* mit IPTG-Induktion

Die rekombinante Expression von GFP aus *Aequorea victoria* wurde im *E.coli* Expressionsstamm KY2266 durchgeführt [Kanemori, *et al.*, 1997]. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Cycle 3 Mutante des GFP (F99S, M153T, V163A) kann in *E.coli* bei 37 °C stabil exprimiert werden und weist eine 18 mal höhere Fluoreszenzintensität als der Wildtyp auf [Cramer, *et al.*, 1996]. Zudem zeigt sie eine deutlich geringere Tendenz zu Aggregation [Fukuda, *et al.*, 2000]. Die zusätzliche Mutation Q80R des hier exprimierten Gens übt keinerlei Einfluss auf die Eigenschaften des GFP aus und ist aufgrund eines PCR-Fehlers in den meisten cDNA-Konstrukten des GFP vorhanden [Chalfie, *et al.*, 1994]. Zunächst wird eine 100 ml LB-Vorkultur, die die Antibiotika Ampicillin, Tetracyclin und Chloramphenikol (Endkonzentrationen: Amp: 50  $\mu\text{g/ml}$ ; Tet: 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Cam: 34  $\mu\text{g/ml}$ ) enthält, direkt von einer LB-Agarplatte oder

aus einem Glycerinstock angeimpft und 24 Stunden bei 30 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wird mit je 40 ml dieser Vorkultur 1 l LB-Medium, das nur die Selektionsmarker Ampicillin und Chloramphenikol in den oben angegebenen Endkonzentrationen enthält, in 2 l-Kolben mit Schikanen angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Sobald eine  $OD_{600nm}$  von 0,5 bis 0,7 erreicht ist, wird durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) die Expression induziert. Nach einer Expressionszeit von etwa 16 bis 18 Stunden werden die Zellen 20 Minuten bei 4000  $\times$  g und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in 10 mM Tris-Cl pH 7,5 resuspendiert und erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert. Die Lagerung der Zellen bis zum Zellaufschluss und der Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgt bei -20 °C.

### 3.4.2 Zellaufschluss von *E.coli*

Zur Isolierung der rekombinanten Proteine müssen diese zunächst durch Aufbrechen der Zellwände zugänglich gemacht werden. Hierzu wird die gewünschte Menge tiefgefrorenen Zellpellets auf Eis aufgetaut und dann pro 10 g Pellet in ca. 25 ml einer Lösung von ca. 10 mg/ml Lysozym, ca. 0,05 mg/ml DNase I und einer Tablette *Complete EDTA free Proteaseinhibitorcocktail* in 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert. Der Aufschluss größerer Mengen an Zellen erfolgt durch viermaliges Durchlaufen des eisgekühlten Celldisrupters *EmulsiFlex-C5* der Firma Avestin bei einem Druck von 125.000 kPa. Kleinere Volumina werden in einem Aufschlussgefäß auf Eis 3x 10 Minuten mittels Ultraschallpulsen im Sonifier 250 der Firma Branson (*duty cycle: 30 %; output control: 7*) aufgeschlossen.

Um die Lösung von noch unaufgeschlossenen Zellen und Organellen zu befreien, werden diese durch Zentrifugation bei 4500  $\times$  g für 30 Minuten und anschließend bei 35000  $\times$  g für 45 Minuten bei 4 °C pelletiert. Aus dem Überstand kann nun das zu isolierende Protein durch verschiedene Aufreinigungsschritte in reiner Form erhalten werden. Im Falle von GFP wird der Überstand direkt der weiteren Aufreinigung durch Ni-Affinitätschromatographie und Gelfiltration zugeführt, während zur Aufreinigung des 20S Proteasoms und dessen Mutanten zunächst eine Hitzefällung der *E.coli* Proteine durchgeführt wird.

### 3.4.3 Hitzefällung der *E.coli* Proteine

Da das 20S Proteasom, das in dieser Arbeit verwendet wurde, aus dem hitzebeständigen Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* stammt, kann ein Großteil der *E.coli* Proteine in einem ersten Aufreinigungsschritt durch Erwärmen der Proteinlösung ausgefällt werden, während das 20S Proteasom in Lösung verbleibt.

Zur Wahl der geeigneten Temperatur für die Hitzefällung wurden verschiedene Vorversuche unternommen [Felderer, 2002]. Aus diesen geht hervor, dass nach einer Hitzefällung für 20 Minuten bei 65 °C im Wasserbad und anschließender Zentrifugation für 30 Minuten bei 35000  $\times$  g die 20S Proteasomen nahezu vollständig im Überstand zu finden sind, während der Großteil der *E.coli* Proteine mit dem Pellet verworfen werden

kann. Der Überstand wird zur weiteren Aufreinigung mittels Ni-Affinitätschromatographie und Gelfiltration verwendet.

#### 3.4.4 Ni-Affinitätschromatographie

Unter Chromatographie versteht man alle Trennverfahren, bei denen sich das zu trennende Gemisch zwischen einer stationären und einer mobilen Phase verteilt. Bei dem hier angewendeten Verfahren der *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) werden wässrige Proteinlösungen mit Puffersystemen (mobile Phase) unter Druck über ein geeignetes Säulenmaterial (stationäre Phase) geschickt.

Die Ni-Affinitätschromatographie ist eine Variante der *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC), die eine schnelle Isolierung rekombinanter Proteine erlaubt, welche Oberflächenhistidine oder zur Erhöhung der Affinität eingeführte His-tags besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *HisTrap™ HP Columns* der Firma GE Healthcare mit Volumina von 1 und 5 ml verwendet. Diese enthalten als Säulenmaterial *Ni Sepharose™ High Performance*, eine hochvernetzte Agarose, an die mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladene Chelatgruppen gekoppelt sind.

Histidine sind in der Lage an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Chelat-Komplexe zu koordinieren, wodurch rekombinante His-tag Proteine auf der Säule verbleiben, während andere Bestandteile der Lösung ausgewaschen werden. Da die Seitenkette von Histidin aus einem Imidazol-Ring besteht, können die gebundenen Proteine durch steigende Imidazolkonzentration im Laufpuffer eluiert werden. Die Verwendung eines Gradienten erlaubt zudem eine Separierung nach verschiedenen Affinitäten. So werden unspezifisch gebundene Proteine bereits bei geringen Konzentrationen von Imidazol eluiert, wohingegen Proteine mit His-tag erst durch hohe Imidazolkonzentrationen von den Koordinationsstellen des  $\text{Ni}^{2+}$  verdrängt werden können. Aufgrund der sehr hohen Affinität des hier verwendeten Säulenmaterials ist eine geringe Imidazolkonzentration in der Auftragslösung und im Waschpuffer nötig, um unspezifische Bindung zu minimieren. Die hohe Salzkonzentration in den Puffern dient der Vermeidung elektrostatischer Wechselwirkungen.

Zur Aufreinigung der rekombinanten His-tag Proteine wurden, je nach Menge des aufgeschlossenen Zellpellets, eine oder mehrere, nach den Angaben des Herstellers regenerierte, 1 oder 5 ml HisTrap Säulen mit Puffer A-HisTrap äquilibriert. Die Überstände des Zellaufschlusses (GFP) bzw. der Hitzefällung (20S Proteasom) werden nach Zugabe von Imidazol (Endkonzentration 20 mM) und Natriumchlorid (Endkonzentration 500 mM) über *Millex®-GV* (0,22  $\mu\text{m}$ ) Spritzenaufsatzfilter der Firma Millipore sterilfiltriert und über eine *Ecno Pump* Peristaltikpumpe der Firma BioRad bei einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Diese wird daraufhin an das *ÄKTA™-Purifier 10 System* der Firma GE Healthcare, das in einem Kühlkabinett bei 10 °C installiert ist, angeschlossen und zunächst bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 15 Säulenvolumen Puffer A-HisTrap gespült. Anschließend werden die gebundenen Proteine durch einen Imidazolgradienten von 20 bis 500 mM über

15 Säulenvolumen eluiert, wobei Fraktionen von je 0,5 ml (1 ml Säule) bzw. 2 ml (5 ml Säule) gesammelt werden. Nach dem Spülen der Säule mit 5 Säulenvolumen Puffer B-HisTrap und 5 Säulenvolumen Puffer A-HisTrap wird diese nach den Angaben des Herstellers regeneriert und in 20 % Ethanol im Kühlschrank gelagert. Zur Identifikation der proteinhaltigen Fraktionen wird während des gesamten Laufs die Absorption des Eluats bei 280 nm und im Falle von GFP zusätzlich 395 nm (Absorptionsmaximum von GFP) aufgezeichnet. Die entsprechenden Fraktionen werden mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.4.7) analysiert und anschließend der Gelfiltration (Kapitel 3.4.5) zugeführt.

### 3.4.5 Gelfiltration

Das Trennprinzip der Gelfiltration (auch Gelpermeationschromatographie) beruht auf der unterschiedlichen, größenabhängigen Permeabilität verschiedener Partikel in Lösung in einem porösen Trägermaterial mit definierter Porengröße. Proteine können daher mit dieser Methode in Abhängigkeit ihrer Größe, und damit näherungsweise ihrer Masse, aufgetrennt werden. Da die Pufferionen der aufgetragenen Probe erst nach einem Säulenvolumen, also deutlich nach dem jeweiligen Protein, von der Gelfiltration eluiert werden und Proteine bei hohen Imidazolkonzentrationen instabil sind, bietet sich diese Methode besonders als zweiter Aufreinigungsschritt nach einer Ni-Affinitätschromatographie an.

Um rekombinante Proteine höchster Reinheit und Homogenität zu erhalten, wurden die vereinten Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie, die das gewünschte Protein enthalten, zunächst mittels *Amicon® Ultra-15* Konzentratoren auf ca. 2 ml aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.4.9). Für die Gelfiltration wurde eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule der Firma GE Healthcare verwendet. Die Steuerung des Laufs erfolgte mit dem *AKTA™-Purifier 10 System* desselben Herstellers bei 10 °C. Um eine möglichst reine Lösung von Cytochrom c, das von der Firma Sigma bezogen wurde, zu erhalten, wurde dieses in 20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl gelöst und ebenfalls einer Gelfiltration unterzogen.

Die Säule wird zunächst bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 5 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert und die aufkonzentrierte Probe mit einer Spritze in den Probenloop gefüllt, aus dem sie nach Beginn des Programms auf die Säule injiziert wird. Während des Laufs werden Fraktionen von je 1,5 ml gesammelt und zur Identifikation der proteinhaltigen Fraktionen die Absorption des Eluats bei 280 nm aufgezeichnet (bei Cytochrom c zusätzlich 409 nm und bei GFP zusätzlich 395 nm). Während des gesamten Laufs ist darauf zu achten, dass der vom Hersteller angegebene maximale Druck nicht überschritten wird. Nach Analyse mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.4.7) werden die entsprechenden Fraktionen vereint, die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 3.4.8) und die Lösung aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

### 3.4.6 Automatisierte Aufreinigung mittels ÄKTA 3D-Kit

Zur Aufreinigung der Mutanten des 20S Proteasoms wurde der *ÄKTAexplorer 10* in Kombination mit dem *ÄKTA 3D Kit* der Firma GE Healthcare, der in einem auf 10 °C eingestellten Kühlkabinett installiert ist, verwendet. Dies erlaubte eine schnelle und automatische Aufreinigung von bis zu sechs Proben in mehreren Schritten während eines Laufs. Um rekombinante Proteine analog zu der in den Kapiteln 3.4.4 und 3.4.5 beschriebenen Methode der Ni-Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration aufzureinigen, wurde die Anlage mit sechs 1 ml *HisTrap™ HP* Säulen und einer *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule ausgerüstet. Die Überstände nach der Hitze-fällung (siehe Kapitel 3.4.3) wurden durch Zugabe von Imidazol (Endkonzentration 20 mM) und Natriumchlorid (Endkonzentration 500 mM) an die Bedingungen des Puffer A-HisTrap angeglichen und anschließend über *Millex®-GV* (0,22 µm) Spritzenaufsatzfilter steril filtriert. Der Auftrag der Lysate auf die 1 ml *HisTrap™ HP* Säulen ist in das Programm integriert und erfolgte über eine Probenpumpe, die mit einem Luftsensor ausgestattet ist.

Prinzipiell erfolgt die Aufreinigung in den folgenden Schritten: Zunächst werden die bis zu sechs Lysate nacheinander auf die jeweiligen *HisTrap™ HP* Säulen aufgetragen und diese mit Puffer A-HisTrap gespült. Nachdem die letzte Probe geladen ist, wird die erste *HisTrap™ HP* Säule erneut mit Puffer A-HisTrap gespült und anschließend gebundenes Protein durch Stoßelution mit 500 mM Imidazol (100 % Puffer B-HisTrap) von der Säule gelöst. Ein Sensor verfolgt die Absorption des Eluats bei 280 nm und steuert die Umleitung des eluierten Proteins in einen 5 ml Loop, sobald ein gewählter Schwellwert der Absorption überschritten wird. Die *HisTrap™ HP* Säule wird mit Puffer A-HisTrap gespült und der gesammelte Proteinpeak im darauf folgenden Schritt auf die *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule aufgetragen. Das Eluat dieser Säule wird in je 2 ml Fraktionen in *96-well PP-Masterblock* Platten der Greiner bio-one GmbH gesammelt. Nach Beendigung des ersten Gelfiltrationslaufs erfolgt nacheinander die Elution der weiteren Proben nach demselben Prinzip.

Die Programmierung des Laufs wurde mit Hilfe des in der Steuerungssoftware UNICORN™ enthaltenen *Method Wizards* durchgeführt, wobei einige Modifikationen vorgenommen wurden. So wurde der Waschschrift vor der Stoßelution von den *HisTrap™ HP* Säulen zum einen mit 15 % Puffer B-HisTrap (entspricht 92 mM Imidazol) durchgeführt und zum anderen auf 15 Säulenvolumen verlängert, da sich in Vorversuchen zeigte, dass unter diesen Bedingungen lediglich Verunreinigungen, nicht aber 20S Proteasomen von der Säule gewaschen werden.

Nach Analyse der erhaltenen Fraktionen aus der Gelfiltration mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.4.7) werden die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen vereint, die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 3.4.8) und die Lösungen aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

### 3.4.7 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) beruht auf deren je nach Größe, Form und Ladung unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die Elektrophorese erfolgt in einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix aus Polyacrylamid, das durch die Polymerisierung einer Mischung aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid entsteht. Die Porengröße wird bestimmt durch die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese mit selbst gegossenen Gelen in vertikalen Gelkammern des *Mighty Small II*-Systems der Firma GE Healthcare mit 8 x 7 cm großen und 0,7 mm dicken Gelen durchgeführt. Zudem wurden 4-20 % *Tris-Glycine* Gele der Firma Invitrogen in der *XCell SureLock™ Mini-Cell* desselben Herstellers verwendet, bei denen die Elektrophorese, je nach Wahl des Proben- und Laufpuffers, sowohl denaturierend (SDS-PAGE) als auch nativ (native PAGE) durchgeführt werden kann.

#### 3.4.7.1 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE wird die zu analysierende Proteinmischung mit dem stark amphiphatischen Detergens Natrium-Lauroylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) denaturiert und solubilisiert, wobei nahezu alle nichtkovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört werden. Zur vollständigen Denaturierung enthält der Probenpuffer zudem Dithiothreitol (DTT) zur Reduktion der Disulfidbrücken. Da die meisten Polypeptide SDS in konstantem Gewichtsverhältnis binden (ca. ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren) und durch die stark negativ geladene SDS-Hülle in eine stäbchenartige Form gezwungen werden, ist die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode und somit die Laufstrecke im Gel proportional zur Molekülmasse. In der vorliegenden Arbeit wurde der Molekulargewichtsstandard *SDS-PAGE Standard Broad Range* der Firma BioRad (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.3) verwendet. Bei Gelen, mit denen anschließend ein Western Blot durchgeführt werden sollte, wurde *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained* der Firma Invitrogen (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.3) als Standard aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wird mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt, die sich durch ihre unterschiedliche Pufferzusammensetzung auszeichnen. Die selbst hergestellten Gele werden mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % nach dem SCHÄGGER-System gegossen [Schägger und von Jagow, 1987]. Die 4-20 % *Tris-Glycine* Gele der Firma Invitrogen beruhen auf dem LAEMMLI-System [Laemmli, 1970]. Bei beiden Systemen wird die aufgetragene Probe zunächst in einem Sammelgel (*stacking gel*) konzentriert, um von dort in das Trenngel (*separating gel*) zu wandern.

Zur Herstellung der 12 % SCHÄGGER-SDS Gele werden in einer Gießapparatur nacheinander je eine Aluminium- und eine Glasplatte, durch zwei Spacer getrennt, gestapelt und anschließend das Trenngel eingefüllt. Zur gleichmäßigen Polymerisation an der Grenzfläche werden die Gele vorsichtig mit *iso*-Propanol überschichtet. Nach

vollständiger Polymerisation des Trenngels wird das überstehende *iso*-Propanol abgegossen, mit Filterpapierstreifen getrocknet, die Grenzfläche mit destilliertem Wasser gespült, das Sammelgel eingefüllt und die Gelkämme eingesteckt.

Zu analysierende Proteinlösungen werden mit einem Probenvolumen 2x SCHÄGGER SDS-Probenpuffer, bzw. DTT (Endkonzentration 100 mM) und einem Probenvolumen 2x Tris-Glycin SDS-Probenpuffer, vermischt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Gele werden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers in die Apparaturen gesetzt und die Kammer im Falle der 4-20 % *Tris-Glycine* Gele mit 1x Tris-Glycin SDS Laufpuffer, im Falle der 12 % SCHÄGGER-Gele mit 1x Kathodenpuffer im oberen und 1x Anodenpuffer im unteren Pufferreservoir befüllt. Nach dem Pipettieren der Probe in die Kammern wird die Elektrophorese bei den 4-20 % *Tris-Glycine* Gelen mit einer konstanten Spannung von 125 V, bei den 12 % SCHÄGGER-Gelen mit konstanter Stromstärke von 25 mA pro Gel gestartet und abgebrochen, sobald das Bromphenolblau die untere Kante des Gels erreicht hat.

Die Gele werden entweder zur Visualisierung der Proteinbanden einer Coomassie-Heiß-Färbung (siehe Kapitel 3.4.7.4), oder zur immunologischen Proteinidentifikation einem Western Blot (siehe Kapitel 3.5.1) unterzogen.

#### 3.4.7.2 *Native PAGE*

Bei der nativen PAGE werden spezielle nicht denaturierende und nicht reduzierende Puffer eingesetzt, wodurch die Proteine im Gel entsprechend ihres Molekulargewichts/Nettoladungs-Verhältnisses aufgetrennt werden. Hierfür werden dieselben 4-20 % *Tris-Glycine* Gele wie für die SDS-PAGE, jedoch mit Nativ Proben- und Laufpuffer verwendet. Als Molekulargewichtsstandard diente das *High Molecular Weight (HMW) Calibration Kit for Native Electrophoresis* der Firma GE Healthcare (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.3).

Die Proteinlösungen werden mit einem Probenvolumen 2x Tris-Glycin-Nativ-Ladepuffer versetzt. Hierbei handelt es sich um den gleichen Ladepuffer wie bei der SDS-PAGE, er enthält jedoch weder SDS noch DTT. Die Proben werden vor dem Auftrag nicht aufgeköcht. Die Gele werden nach den Angaben des Herstellers in die Apparatur eingesetzt und die Kammer mit 1x Tris-Glycin Nativ Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Kammern pipettiert. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Spannung von 125 V durchgeführt und nach etwa fünf Stunden abgebrochen, sobald die Stromstärke auf einen konstanten Wert von ca. 6 bis 10 mA pro Gel abgesunken ist.

Anschließend kann zur Visualisierung der Proteinbanden im Gel einer Coomassie-Heiß-Färbung (siehe Kapitel 3.4.7.4) oder zur Proteinidentifikation durch Antikörper ein Western Blot (siehe Kapitel 3.5.1) durchgeführt werden.

### 3.4.7.3 Blaue native PAGE

Die blaue native PAGE ermöglicht es, Proteine, die unter den Bedingungen der nativen PAGE eine positive Nettoladung besitzen und daher zur Kathode und nicht durch das Gel in Richtung der Anode wandern, in ihrer nativen Form aufzutrennen. Dabei wird dem Probenpuffer und dem Kathodenpuffer Coomassie Brilliant Blue, ein anionischer Farbstoff, der an hydrophobe und kationische Bereiche des Proteins bindet, zugesetzt, um dem Protein eine negative Nettoladung zu verleihen [Schägger und von Jagow, 1991].

4-20 % *Tris-Glycine* Gele der Firma Invitrogen werden in die *XCell SureLock™ Mini-Cell*-Apparatur desselben Herstellers eingesetzt und die Kathodenseite mit 1x *Tris-Glycin Blau Nativ* Kathodenpuffer, die Anodenseite mit 1x *Tris-Glycin Nativ* Laufpuffer befüllt. Die Proteinlösungen werden mit einem Probenvolumen 2x *Tris-Glycin-Blau-Nativ-Probenpuffer* versetzt und in die Kammern des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 125 V. Nach ca. zwei Stunden wird der 1x *Tris-Glycin Blau Nativ* Kathodenpuffer gegen den farblosen 1x *Tris-Glycin Nativ* Laufpuffer ausgetauscht und die Elektrophorese nach ca. fünf Stunden, in denen die Stromstärke auf konstante 6 bis 10 mA pro Gel abgesunken ist, abgebrochen.

Die Gele können anschließend einer Coomassie-Heiß-Färbung (siehe Kapitel 3.4.7.4) oder einem Western Blot mit anschließender immunologischen Proteinidentifikation durch Antikörper (siehe Kapitel 3.5.1) unterzogen werden.

### 3.4.7.4 Coomassie-Heiß-Färbung

Zur Analyse der Polyacrylamidgele werden die Proteinbanden durch Behandlung mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei etwa 0,1 µg Protein pro Bande. Sollen native Gele gefärbt werden, sollte eine vielfache Proteinmenge verwendet werden.

Nach beendetem Lauf wird das Gel aus den beiden Platten herausgenommen und das Sammelgel vorsichtig mit einem Skalpell abgetrennt. Unter leichtem Schütteln wird das Gel 15 Minuten in Fixierungslösung inkubiert. Anschließend wird es in der Coomassie-Färbelösung ca. eine Minute im Mikrowellenofen aufgeköcht und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Zum Entfärben werden die Gele gründlich mit destilliertem Wasser abgespült und in der Entfärbelösung so lange inkubiert, bis der gewünschte Färbegrad erreicht ist. Zur Archivierung wird das Gel eingescannt und - nach Quellen in destilliertem Wasser - zum Trocknen im *GelAir Dryer* der Firma BioRad zwischen zwei *GelAir Cellophane Support*-Folien desselben Herstellers in einen Rahmen gespannt.

### 3.4.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration wässriger Lösungen wurde in den meisten Fällen durch die Färbemethode nach BRADFORD bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der Cytochrom c Lösungen wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten bei 409 nm, dem Absorptionsmaximum der kovalent gebundenen Häm-Gruppe am Cytochrom c, durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung der Proben für die Kleinwinkel-Röntgenstreuung wurden die Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm herangezogen, da die Genauigkeit der BRADFORD-Methode hierfür nicht ausreicht.

#### 3.4.8.1 Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD

Die Proteinkonzentration wässriger Lösungen wird mit dem *Protein Assay* der Firma BioRad bestimmt. Diese Methode basiert auf der Verschiebung des Absorptionmaximums einer Coomassie Brilliant Blue G250-haltigen Lösung von 465 auf 595 nm durch Komplexbildung zwischen den Sulfonat-Gruppen des Farbstoffs und den Seitenketten kationischer Aminosäuren in saurem Medium [Bradford, 1976]. Der Extinktionskoeffizient des sich bildenden Protein-Farbstoff-Komplexes ist über einen weiten Konzentrationsbereich hin konstant [Spector, 1978]. Als Proteinstandard zur Konzentrationsbestimmung wird eine BSA-Lösung bekannter Konzentration eingesetzt.

Zur Durchführung des Tests werden 800 µl Proteinlösung in geeigneter Verdünnung mit 200 µl Farbreagenz gut durchmischt und nach einer Inkubationsdauer von mindestens fünf Minuten, jedoch nicht länger als eine Stunde, die Absorption dieser Mischung bei 595 nm gegen eine nur Puffer und Farbstoff enthaltende Blindprobe gemessen. Zur Ermittlung der Kalibrationsgeraden werden parallel dazu sechs BSA-Proben mit Endkonzentrationen von 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 µg/ml in gleicher Weise hergestellt und vermessen. Alle Bestimmungen werden zweifach ausgeführt und die resultierenden Messwerte gemittelt. Die Konzentration der Proteinlösung ergibt sich durch Einsetzen des zugehörigen Wertes in die durch lineare Regression der Kalibrationskurve erhaltene Geradengleichung. Die Genauigkeit dieser Konzentrationsbestimmung hängt in erster Linie von der Ähnlichkeit des Färbeverhaltens der Proteine im Vergleich zu BSA ab.

#### 3.4.8.2 Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten

Bei Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$  eines Stoffes kann dessen Konzentration in Lösung  $c$  durch Messung der Absorption  $A_\lambda$  in einer Küvette mit Schichtdicke  $d$  und Anwendung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (3.1) mit hoher Genauigkeit bestimmt werden.

$$A_\lambda = c \cdot \epsilon_\lambda \cdot d \quad (3.1)$$

Zur Auswertung der Streukurven, die aus der Kleinwinkel-Röntgenstreuung resultieren, ist eine sehr genaue Kenntnis der Konzentration der vermessenen Proben nötig. Deshalb wurden die molaren Extinktionskoeffizienten des 20S Proteasoms, sowie der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c bzw. GFP, unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie, bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

Die Absorption eines denaturierten Proteins bei 280 nm ergibt sich aus der Summe der Absorptionen der vorhandenen Tyrosin-, Tryptophan- und Cystin-Reste [Edelhoch, 1967]. Somit kann der molare Extinktionskoeffizient eines denaturierten Proteins nach Gleichung (3.2) aus dessen Aminosäuresequenz berechnet werden.

$$\epsilon_{\lambda, \text{GuHCl}} = n_{\text{Tyr}} \epsilon_{\lambda, \text{Tyr}} + n_{\text{Trp}} \epsilon_{\lambda, \text{Trp}} + n_{\text{Cystin}} \epsilon_{\lambda, \text{Cystin}} \quad (3.2)$$

Diese Gleichung ist implementiert im Programm *ProtParam tool*, das Bestandteil des *ExPASy (Expert Protein Analysis System)* Proteomics Servers des Swiss Institute of Bioinformatics SIB [Gasteiger, *et al.*, 2003].

Um den molaren Extinktionskoeffizienten eines nativen Proteins zu bestimmen, wird die Absorption des nativen und des denaturierten Proteins (in 6 M Guanidin-Hydrochlorid, GuHCl) gemessen, wobei in beiden Lösungen eine identische Proteinkonzentration vorliegt. Sowohl für die native, als auch für die denaturierende Proteinlösung gilt das LAMBERT-BEER'sche Gesetz (Gleichung (3.1)) und mit  $c_{\text{nat}} = c_{\text{GuHCl}}$  und  $d_{\text{nat}} = d_{\text{GuHCl}}$  folgt für den molaren Extinktionskoeffizienten des nativen Proteins:

$$\epsilon_{\lambda, \text{native}} = \frac{A_{\lambda, \text{native}} \epsilon_{\lambda, \text{GuHCl}}}{A_{\lambda, \text{GuHCl}}} \quad (3.3)$$

Mit Hilfe dieser Methode wurden die molaren Extinktionskoeffizienten des 20S Proteasoms sowie der beiden Modellsubstrate Cytochrom c und GFP bei 280 nm bestimmt. Hierfür wurden Lösungen der Proteine verwendet, deren Konzentration (nach BRADFORD) zwischen 5 und 20 mg/ml lag. 50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden mit 150  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{Milli-Q}}$  bzw. 8 M Guanidin-Hydrochlorid vermischt und im Falle von GFP 10 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Messung der Absorption bei 280 nm erfolgte am UV/Vis-Spektrometer *Lambda 40* der Firma Perkin Elmer in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas *Suprasil®* Typ 100-QS der Firma Hellma mit einer Schichtdicke von 1 mm. Die molaren Extinktionskoeffizienten der „Host-Guest“ Komplexe wurden unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie als Summe ihrer Bestandteile berechnet. Die Konzentration der Lösungen des 20S Proteasoms und der „Host-Guest“ Komplexe kann nun durch Messung der Absorption bei 280 nm und Einsetzen in Gleichung (3.1) ermittelt werden.

Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Cytochrom c bei 409 nm wurde Cytochrom c aus Pferdeherz der Firma Sigma eingewogen und durch Verdünnung verschiedene Lösungen bekannter Konzentration hergestellt. Mittels Messung der Absorption dieser Lösungen bei 409 nm, dem Absorptionsmaximum der kovalent gebundenen Häm-Gruppe, wurde der molare Extinktionskoeffizient ermittelt. Mit dessen Hilfe ist es unter Verwendung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (Gleichung (3.1)) möglich, eine Konzentrationsbestimmung unbekannter Cytochrom c-Lösungen durchzuführen.

#### **3.4.9 Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen**

Für einige Anwendungen war es nötig, Proteinlösungen aufzukonzentrieren oder in einen anderen Puffer zu überführen. Hierzu wurden, je nach Volumen der aufzukonzentrierenden Lösung, *Microcon*® oder *Amicon*® *Ultra-15* Zentrifugens-Filtereinheiten der Firma Millipore mit unterschiedlichen Porengrößen nach Herstellerangaben verwendet. Die Funktionsweise dieser Konzentratoren beruht auf der Methode der Ultrafiltration, die die Trennung gelöster oder suspendierter Moleküle nach deren Molekülgröße und -form bewirkt. Substanzen, die größer sind als die Poren der verwendeten Membran, werden zurückgehalten, während kleinere Moleküle aufgrund des durch Zentrifugation angelegten Druckes durch die Membran hindurch gelangen können. Die Salzkonzentration der Proteinlösung bleibt dabei annähernd konstant. Ein Umpuffern der Probe ist durch mehrmaliges Aufkonzentrieren und Verdünnen mit dem gewünschten Puffer möglich.

### **3.5 Immunologische Methoden**

Zur spezifischen Identifikation einzelner Proteine in einem komplexen Proteingemisch, kann dieses zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran transferiert werden. Durch die Wahl geeigneter Bedingungen bleibt die Immunreaktivität erhalten und erlaubt somit die qualitative Bestimmung einzelner Proteine mit Hilfe immunologischer Methoden. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist in Kapitel 3.1.6.3 beschrieben.

#### **3.5.1 ElektrobloTTing (Western Blot)**

Unter Western Blot versteht man den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem Trenngel auf eine geeignete Trägermembran. Im Rahmen dieser Arbeit geschah dies durch Anlegen eines elektrischen Feldes im *TransBlot SemiDry Electrophoretic Transfer Cell-System* der Firma BioRad.

Wie in Kapitel 3.4.7 beschrieben, werden zwei, die gleichen Proben enthaltende, Polyacrylamidgele hergestellt, wovon eines der Coomassie-Heiß-Färbung (Kapitel 3.4.7.4) unterzogen wird und das zweite zur Durchführung des Western Blot dient. Die verwendete 0,2 µm PVDF Membran (Polyvinylidendifluorid) der Firma Invitrogen

muss aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität kurz in Methanol geschwenkt werden und wird anschließend zusammen mit dem Gel 15 Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Auf die mit Transferpuffer befeuchtete Anode der Zelle werden drei Lagen mit Transferpuffer getränktem, 2,5 mm dickem Filterpapier der Firma Invitrogen gelegt. Hierauf werden nacheinander die Membran, dann das Gel und anschließend weitere drei Lagen Filterpapier luftblasenfrei platziert. Die Orientierung des Gels auf der Membran ist zu markieren. Die Zelle wird mit dem als Kathode dienenden Deckel geschlossen und es wird 35 Minuten lang eine Spannung von 15 V angelegt. Nach dem Blot wird das Gel zur Kontrolle einer Coomassie-Heiß-Färbung (Kapitel 3.4.7.4) unterzogen. Die Membran wird zur immunologischen Proteinidentifikation mittels Farbstoffreaktion oder Chemilumineszenz verwendet. Falls kein vorgefärbter Marker bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet wurde, so können Proteinbanden auf der Membran durch Färbung mit *Ponceau S* der Firma Sigma nach Angaben des Herstellers gefärbt, markiert und anschließend wieder entfärbt werden.

### 3.5.2 Detektion mittels Farbstoffreaktion

Da das Trennmuster des Gels und die Immunreaktivität der Proteine nach dem Western Blot (Kapitel 3.5.1) auf der Membran erhalten bleiben, sind die Proteine nach dem Transfer einer Behandlung mit Antikörpern zugänglich, wodurch die Identifikation spezifischer Proteine ermöglicht wird. Zunächst werden hierzu unspezifische Proteinbindungsstellen der Membran durch Inkubation in der Blockierlösung für mindestens eine Stunde auf dem Schwenker bzw. über Nacht im Kühlschrank abgesättigt. Es folgen ein 15minütiger und zwei 5minütige Waschschrte in TBS-T. Nun wird die Membran eine Stunde in einer geeignet verdünnten Lösung des Primärantikörpers in TBS-T geschwenkt (siehe Kapitel 3.1.4). Nachdem die Membran, wie oben beschrieben, in TBS-T gewaschen wurde, wird sie für 30 Minuten in einer geeigneten Verdünnung des Sekundärantikörpers (siehe Kapitel 3.1.4), der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgt die Visualisierung durch langsames Schwenken der Membran in 10 ml  $H_2O_{\text{Milli-Q}}$ , in dem eine Tablette des *Fast<sup>TM</sup> BCIP/NBT* Alkalische Phosphatase Substrats der Firma Sigma aufgelöst wurde. Die Färbung der Banden, an die eine Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers erfolgte, beruht auf der Dephosphorylierung von BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat). Das entstehende Produkt reagiert in einer Redoxreaktion mit NBT (Nitrobluetetrazolium) zu zwei unlöslichen, blauvioletten Farbstoffen [Horwitz, *et al.*, 1966]. Sobald die Banden des zu detektierenden Proteins ausreichend gefärbt sind, wird die Entwicklung durch Spülen mit destilliertem Wasser abgebrochen.

### 3.5.3 Detektion mittels Chemilumineszenz

Die spezifische Detektion der Proteinbanden mittels Chemilumineszenz erfolgt zunächst analog zu der oben beschriebenen Detektion mittels Farbstoffreaktion (Kapitel 3.5.2). Der Sekundärantikörper ist jedoch mit einer Meerrettich Peroxidase gekoppelt

und zur Visualisierung der Banden werden die *ECL (Enhanced Chemiluminescence) Western Blotting Detection Reagents* der Firma GE Healthcare verwendet. Die Detektion basiert auf der Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diacylhydrazid, durch Wasserstoffperoxid in alkalischem Milieu. Wasserstoffperoxid wird in einer vorgelagerten, durch die Meerrettich Peroxidase katalysierten, Reaktion gebildet. Unter Lichtemission fällt das Luminol aus dem oxidierten, angeregten Zustand in den Grundzustand zurück [Isacson und Wettermark, 1974].

Die gewaschene Membran wird nach den Angaben des Herstellers kurz in der frisch zubereiteten 1:1-Mischung der beiden ECL Reagenzien des Kits inkubiert, in Frischhaltefolie gepackt und dann in einer Röntgenfilm-Kassette auf einem *Hyperfilm™ ECL™* Röntgenfilm der Firma GE Healthcare exponiert. Nach unterschiedlichen Belichtungszeiten werden die Filme mit *G153 Developer A* und *G354 Rapid Fixer* der Firma Agfa nach den Angaben des Herstellers entwickelt, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die Proteinbanden im Gel, an die eine Bindung des Sekundärantikörpers erfolgt, führen zu einer lokalen Schwarzfärbung des Films.

### 3.6 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Zur Untersuchung der Enzymkinetik der Mutanten des 20S Proteasoms wurde das fluorogene, synthetische Tetrapeptid N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4-methylcoumarinamid (Suc-LLVY-AMC) der Firma Bachem verwendet, das routinemäßig als Modellsubstrat für das 20 Proteasom benutzt wird [Seemüller, *et al.*, 1995]. Der in gebundener Form gequenchte Fluoreszenzfarbstoff AMC wird durch die Proteolyse der Peptidbindung zwischen Tyrosin und AMC freigesetzt, was eine Quantifizierung des Abbaus über die Zunahme der Fluoreszenzintensität ermöglicht. AMC besitzt in freier Form ein Absorptionsmaximum bei 380 nm und emittiert, nach Anregung bei dieser Wellenlänge, Licht der Wellenlänge 440 nm. Als Standard diente der freie Fluoreszenzfarbstoff AMC, der ebenfalls von der Firma Bachem bezogen wurde.

Die Messung der Fluoreszenz wurde mit dem *FLUOstar OPTIMA Platereader* der Firma BMG Labtech in *96-well* Mikroplatten der Firma Greiner-bio-one durchgeführt. Zur Anregung wurde mit Hilfe eines Filters Licht der Wellenlänge 390 nm verwendet, die Emission wurde hinter einem für Strahlen mit 460 nm Wellenlänge durchlässigen Filter detektiert. Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 60 °C und über einen Zeitraum von einer Stunde, wobei jede Probe in Abständen von 30 Sekunden vermessen wurde.

Suc-LLVY-AMC und AMC wurden in Konzentrationen von 1 und 10 mM in trockenem DMSO gelöst und aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Diese Lösungen wurden direkt vor der Durchführung der Messungen bis zur gewünschten Konzentration mit 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl verdünnt. Für die kinetischen Analysen

wurde das Substrat in Konzentrationen von 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200  $\mu\text{M}$  vorgelegt. Um zu gewährleisten, dass allenfalls eine maximale DMSO-Konzentration von 2,5 % im Ansatz vorliegt, wurden für die Konzentrationen von 0,5 bis 25  $\mu\text{M}$  die 1 mM Stocklösungen und für die Konzentrationen von 50 bis 200  $\mu\text{M}$  die 10 mM Stocklösungen verwendet. Die Proben wurden vor Beginn der Messung 15 Minuten im Fluoreszenzspektrometer auf 60 °C vorgewärmt. Nach Beginn der Messung wurden die Proben weitere 10 Minuten inkubiert und anschließend 1  $\mu\text{g}$  der jeweiligen Mutante des 20S Proteasoms (10  $\mu\text{l}$ ; 0,1 mg/ml) über eine im Spektrometer befindliche Pumpe injiziert. Das Endvolumen aller Ansätze betrug 200  $\mu\text{l}$ . Die Platte wurde nach der Injektion 30 Sekunden lang geschüttelt und die Fluoreszenz weitere 50 Minuten vermessen. Da die erhaltenen Messwerte erheblichen gerätebedingten Schwankungen von bis zu  $\pm 30\%$  unterworfen waren, wurde auf jeder Platte eine eigene AMC-Kalibrationsreihe mit Konzentrationen analog zu denjenigen des Substrats vermessen. Dies ermöglichte eine Quantifizierung des freigesetzten AMC. Als Blindwerte dienten Substratlösungen identischer Konzentrationen, denen jedoch kein Proteasom zugegeben wurde. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt und die erhaltenen Substratumsätze pro Zeiteinheit gemittelt.

Zur Auswertung der Rohdaten wurde zunächst von allen Messwerten der Aktivitäts- und AMC-Kalibrationsreihe der Blindwert der jeweiligen Substratkonzentration subtrahiert. Die so erhaltenen Werte der AMC-Kalibrationsreihe wurden über die Dauer der Messung gemittelt und eine Kalibrationskurve erstellt. Diese verlief bis zu einer AMC-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  linear und die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung konnte zur Berechnung der Konzentration des freigesetzten AMC verwendet werden, da die Werte der Aktivitätsmessung ausnahmslos im linearen Bereich lagen. Der Substratumsatz pro Zeiteinheit entspricht der Zunahme des freigesetzten AMC nach der Injektion des Proteasoms und konnte durch lineare Regression erhalten werden. Die Abhängigkeit des über je drei Messungen gemittelten Substratumsatzes pro Zeiteinheit von der eingesetzten Substratkonzentration wurde durch nichtlineares Fitting der Gleichung (2.4) mit Gewichtung nach den jeweiligen Standardabweichungen analysiert. Die kinetischen Konstanten ergaben sich mit Hilfe der Gleichungen (2.5) bis (2.8) aus den erhaltenen Koeffizienten.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft® Office Excel 2003, die linearen und nichtlinearen Kurvenfittings mit IgorPro 5.00 durchgeführt.

### **3.7 Ent- und Rückfaltung der Modellsubstrate**

Die Bildung von „Host-Guest“ Komplexen des 20S Proteasoms mit verschiedenen Substraten (siehe Kapitel 3.8) erfordert die Ent- und Rückfaltung des Substrats unter Bedingungen, die die Struktur und Funktion des 20S Proteasoms nicht verändern. Um diese Bedingungen zu ermitteln, wurden verschiedene Versuche zur Ent- und Rückfaltung von Cytochrom c und GFP durchgeführt.

#### 3.7.1 Cytochrom c

Cytochrom c besitzt durch eine kovalent gebundene Häm-Gruppe ein Absorptionsmaximum im Wellenlängenbereich zwischen 405 und 410 nm, dessen genaue Lage vom Faltungszustand des Proteins abhängt. Zur Untersuchung der Ent- und Rückfaltung von Cytochrom c wurden deshalb Absorptionsspektren einer Cytochrom c-Lösung bei verschiedenen Temperaturen und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten aufgenommen. Dabei wurde das UV/Vis-Spektrometer *Lambda 40* der Firma Perkin Elmer verwendet, das mit Hilfe des *PTP-6 Peltier Systems* der Firma DBS und dem *Polystat cc1* der Firma Huber eine Temperaturregelung der Küvetten erlaubt. 123,8 µl einer 10 mg/ml enthaltenden Cytochrom c-Lösung wurden mit 250 µl einer frisch hergestellten Lösung von Guanidin-Hydrochlorid und 626,8 µl 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl vermischt und in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas *Suprasil®* Typ 100-QS der Firma Hellma mit einer Schichtdicke von 1 mm pipettiert. Die Endkonzentrationen sind analog zu denjenigen bei der Herstellung der „Host-Guest“ Komplexe (siehe Kapitel 3.8.1). Als Blindwert diente eine Lösung, die lediglich den Puffer und Guanidin-Hydrochlorid in derselben Konzentration wie die Probe enthielt. Die Absorptionsspektren der Probe wurden von 300 bis 500 nm, in Intervallen von 0,1 nm und mit einer Geschwindigkeit von 240 nm/min aufgenommen.

#### 3.7.2 GFP

GFP besitzt ein intrinsisches Chromophor, das im nativen Protein grün fluoresziert, während es im entfalteten Protein gequencht vorliegt und somit keine Fluoreszenz auftritt. Die Ent- und Rückfaltung von GFP kann daher durch Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 509 nm, nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 395 nm, im zeitlichen Verlauf untersucht werden. Die Messungen erfolgten mit dem Fluoreszenzspektrometer *LS50B* der Firma Perkin Elmer, wobei die Temperatur in der Küvette mit Hilfe des *Polystat cc1* der Firma Huber eingestellt werden kann. 56 µl einer 10 mg/ml GFP Lösung werden in eine Fluoreszenz-Präzisions-Küvette aus Quarzglas *Suprasil®* Typ 105.251-QS mit einer Schichtdicke von 3 mm der Firma Hellma pipettiert und die Messung bei 20 °C gestartet. Nach fünf Minuten werden 50 µl einer frisch hergestellten 8 M Guanidinium-Hydrochlorid-Lösung zugegeben und nach weiteren fünf Minuten die Temperatur auf 60 °C erhöht. Der Ansatz wird 30 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgt Zugabe von 94 µl 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl. Nach weiteren zehn Minuten Inkubation wird die Temperatur auf 5 °C gesenkt und die Lösung durch Entnahme von 150 µl der Probe und darauf folgende Zugabe von 450 µl 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl auf 1/10 der ursprünglichen Konzentration verdünnt. Nach weiteren 30 Minuten wird die Messung abgebrochen. Die Konzentrationen von GFP und Guanidinium-Hydrochlorid entsprechen denen der jeweiligen Schritte bei der Bildung der „Host-Guest“ Komplexe (siehe Kapitel 3.8.2).

Anschließend erfolgte am selben Gerät die Aufnahme von Fluoreszenzspektren des entfalteten und des rückgefalteten GFP aus der Messung des zeitlichen Verlaufs. Als Probe des entfalteten GFP dienten 50 µl der Lösung, die nach Abkühlen auf 5 °C entnommen wurden. Diese wurde mit einer 3:1 Mischung bestehend aus 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl und 8 M Guanidin-Hydrochlorid auf 1/10 der ursprünglichen Konzentration verdünnt. Zur Aufnahme des Spektrums des rückgefalteten GFP wurde direkt die Probe nach der Messung des zeitlichen Verlaufs verwendet. Beide Proben enthalten GFP in einer Konzentration von 10 µM. Zur Quantifizierung der Rückfaltung wurde eine Lösung des nativen GFP derselben Konzentration vermessen. Bei allen drei Spektren wurden als Blindproben die Spektren von 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl mit den jeweiligen Anteilen an 8 M Guanidin-Hydrochlorid verwendet. Die Fluoreszenzspektren von 300 bis 700 nm wurden bei 5 °C mit einer Anregungswellenlänge von 395 nm und einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min aufgenommen.

### 3.8 Bildung der „Host-Guest“ Komplexe

Um die Vorgänge während der Translokation von Substraten in das 20S Proteasom zu untersuchen, wurden „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP gebildet, bei denen das Substrat im inneren Kammersystem inaktivierter 20S Proteasomen eingeschlossen wird. Dies geschieht durch Inkubation inaktivierter 20S Proteasomen mit einem Überschuss an Substrat, das vorher chemisch und thermisch entfaltet wurde, und anschließender Rückfaltung des Substrats durch Abkühlen und, im Falle von GFP, Verdünnung. Der Anteil des Substrats, der sich beim Rückfalten innerhalb des 20S Proteasoms befindet, ist nicht mehr in der Lage die inneren Kammern des 20S Proteasoms durch die schmalen Poren zu verlassen und es bilden sich stabile „Host-Guest“ Komplexe aus. Die erfolgreiche Bildung von „Host-Guest“ Komplexen des 20S Proteasoms mit Cytochrom c konnte bereits gezeigt werden [Huffman, *et al.*, 2003]. Dieses Prinzip wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Verwendung von GFP als Substrat ausgeweitet. Zudem wurde versucht „Host-Guest“ Komplexe der inaktiven  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom c zu bilden.

#### 3.8.1 Bildung der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c

Zur Bildung der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c werden 0,1 mg *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton frisch in DMSO gelöst, sofort mit 940 µl Proteasomlösung (5 mg/ml in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl) vermischt und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dies entspricht einem Überschuss von fünf Molekülen Inhibitor pro aktivem Zentrum der 20S Proteasomen. Parallel dazu werden 830 µl Cytochrom c-Lösung (10 mg/ml in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl) mit 1,677 ml 8 M Guanidin-Hydrochlorid und 3,153 ml 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl vermischt und 30 Minuten im Wasserbad bei 60 °C erwärmt. Anschließend

werden die beiden Lösungen vereinigt und weitere 30 Minuten bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Das molare Verhältnis von Cytochrom c zu 20S Proteasomen liegt bei 100:1. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Lösung eine Stunde auf Eis gekühlt und daraufhin in *Amicon® Ultra-15* Konzentratoren auf ca. 2 ml aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.4.9). Zur Isolierung der „Host-Guest“ Komplexe wird das überschüssige Substrat mittels Gelfiltration über eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule der Firma GE Healthcare abgetrennt. Die Steuerung des Laufs erfolgte wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben mit dem *ÄKTA™-Purifier 10 System* desselben Herstellers bei 10 °C. Die Absorption des Eluats wurde bei 280 und 409 nm aufgezeichnet.

Analog dazu, jedoch ohne vorherige Inhibierung des 20S Proteasoms wurde versucht, „Host-Guest“ Komplexe mit der inaktiven  $\Delta T1A\beta$ -Mutante herzustellen. Hierzu wurde lediglich 1/3 des oben beschriebenen Ansatzes verwendet.

#### **3.8.2 Bildung der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP**

Um „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP herzustellen, werden zunächst 0,1 mg *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton frisch in DMSO gelöst, sofort mit 940  $\mu$ l einer 5 mg/ml 20S Proteasom in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl enthaltenden Lösung vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu werden 1,875 ml GFP-Lösung (10 mg/ml in 20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl) mit 1,677 ml 8 M Guanidin-Hydrochlorid versetzt und 30 Minuten im Wasserbad bei 60 °C erwärmt. Nach Zugabe von 2,108  $\mu$ l auf 60 °C vorgewärmter Puffer (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl) und der Proteasomlösung mit dem Inhibitor wird die Lösung weitere fünf Minuten im Wasserbad bei 60 °C inkubiert, anschließend in 60 ml eisgekühlten Puffer (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl) gegossen und eine Stunde auf Eis gekühlt. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen einem 100fachen molaren Überschuss an GFP über 20S Proteasomen. Die Lösung wird in mehreren Schritten mit *Amicon® Ultra-15* Konzentratoren auf ca. 2 ml aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.4.9) und überschüssiges GFP über eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule der Firma GE Healthcare von den „Host-Guest“ Komplexen abgetrennt. Die Steuerung des Laufs erfolgte wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben mit dem *ÄKTA™-Purifier 10 System* desselben Herstellers bei 10 °C, wobei die Absorption des Eluats bei 280 und 395 nm aufgezeichnet wurde.

#### **3.8.3 Kontrollen**

Um den Einfluss eventueller unspezifischer Interaktionen der Substrate mit der äußeren Oberfläche der 20S Proteasomen zu untersuchen, wurden sowohl für Cytochrom c als auch für GFP Kontrollen zur Bildung der „Host-Guest“ Komplexe mit inhibierten 20S Proteasomen durchgeführt (Kontrolle Cyt c und Kontrolle GFP). Die Präparation und Isolierung dieser Kontrollen erfolgt analog zur Herstellung der Komplexe (siehe Kapitel 3.8.1 bzw. 3.8.2), jedoch lediglich mit einem Drittel des dort beschriebenen

Ansatzes und ohne Erwärmen der Lösung auf 60 °C. Die Substrate werden somit nicht entfaltet und sind nicht in der Lage in das Innere der 20S Proteasomen zu gelangen.

Für die elektronenmikroskopische Analyse der Komplexe wurde eine weitere Kontrolle hergestellt, die lediglich mit *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton inhibiertes 20S Proteasom enthält, das im Wasserbad 30 Minuten auf 60 °C erwärmt und anschließend über eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule der Firma GE Healthcare gereinigt wurde (Kontrolle Proteasom). Die Steuerung des Laufs erfolgte analog zur Isolierung der „Host-Guest“ Komplexe (siehe Kapitel 3.8.1) mit dem *ÄKTA™-Purifier 10 System* desselben Herstellers bei 10 °C.

### 3.9 Spektroskopische Untersuchung der „Host-Guest“ Komplexe

Zur spektroskopischen Analyse der „Host-Guest“ Komplexe wurde im Falle von Cytochrom c als Modellsubstrat deren Absorptionsspektrum, im Falle von GFP das Extinktions- und Emissionsspektrum der Komplexe aufgezeichnet.

Die Absorption der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (ca. 8 mg/ml in 20 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl) im Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm wurde in Präzisions-Küvetten aus Quarzglas *Suprasil®* Typ 100-QS der Firma Hellma mit einer Schichtdicke von 1 mm im UV/Vis-Spektrometer *Lambda 40* der Firma Perkin Elmer vermessen. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einer Geschwindigkeit von 240 nm/min in Intervallen von 0,1 nm aufgezeichnet, wobei das Spektrum der Blindprobe, die lediglich den Puffer enthält, vom Spektrum der „Host-Guest“ Komplexe subtrahiert wurde.

Die Fluoreszenzeigenschaften der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP wurden durch Aufzeichnung des Extinktionsspektrums bei einer Emissionswellenlänge von 509 nm und des Emissionsspektrums bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm untersucht. Hierzu wurde eine 5 mg/ml „Host-Guest“ Komplex mit GFP enthaltende Lösung in 20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl in Fluoreszenz-Präzisions-Küvette aus Quarzglas *Suprasil®* Typ 105.251-QS mit einer Schichtdicke von 3 mm der Firma Hellma pipettiert und die jeweiligen Spektren mit einer Geschwindigkeit von 100 nm/min im Fluoreszenzspektrometer *LS50B* der Firma Perkin Elmer in Intervallen von 0,5 nm bei Raumtemperatur vermessen.

### 3.10 Transmissions-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms und verschiedene Kontrollen elektronenmikroskopisch abgebildet und anschließend einer Einzelpartikelanalyse unterzogen, um die Bildung der Komplexe zu verifizieren und die Substrate innerhalb der 20S Proteasomen zu lokalisieren.

### 3.10.1 Probenpräparation und elektronenmikroskopische Aufnahmen

Negativkontrastierung und Einbettung der Proben in vitrifiziertem Eis sowie die Aufzeichnung der elektronenmikroskopischen Bilder wurden von Frau Oana Mihalache (MPI für Biochemie) durchgeführt. Die vorgenommenen Einstellungen sind in Tab. 3.8 zusammengefasst. Zudem wurden die verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms zur Sicherstellung deren vollständiger Assemblierung elektronenmikroskopisch abgebildet. Die Präparation dieser Proben mittels negativer Kontrastierung mit Uranylacetat und die Aufnahme der Bilder wurden hierbei von Frau Mirjam Beuttler (MPI für Biochemie) übernommen. Die Einstellungen entsprachen dabei den in Tab. 3.8 aufgeführten Werten, der Defokus lag jedoch bei  $-3\ \mu\text{m}$ .

Tab. 3.8: Einstellungen zur Aufnahme der elektronenmikroskopischen Abbildungen negativ kontrastierter und in vitrifiziertem Eis eingebetteter Proben.

|  | Negative Kontrastierung | Einbettung in vitrifiziertem Eis           |
|--|-------------------------|--|
| <b>Spannung</b>                          | 120 kV                  | 160 kV                                     |
| <b>Elektronenoptische Vergrößerung</b>   | 35000x                  | 27500x                                     |
| <b>Nachvergrößerung durch CCD Kamera</b> | 1,9x                    | 1,7x                                       |
| <b>Nominelle Vergrößerung</b>            | 66500x                  | 46750x                                     |
| <b>Pixelgröße Bild</b>                   | 24 $\mu\text{m}$        | 14 $\mu\text{m}$                           |
| <b>Pixelgröße Probe</b>                  | 3,61 Å                  | 2,99 Å                                     |
| <b>Defokus</b>                           | -1 $\mu\text{m}$        | -2,5 $\mu\text{m}$ bzw. -3,5 $\mu\text{m}$ |

Bei der negativen Kontrastierung wurden a) die „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP sowie b) die zugehörigen Kontrollen mit den beiden Substraten und ohne Substrat (Herstellung siehe Kapitel 3.8) und c) Gemische bestehend aus „Host-Guest“ Komplexen mit GFP und deren Kontrolle in verschiedenen Verhältnissen verwendet. Die Kryo-Elektronenmikroskopie mit Proben, die in vitrifiziertem Eis eingebettet sind, wurde für die beiden „Host-Guest“ Komplexe und deren jeweilige Kontrollen durchgeführt.

### 3.10.2 Einzelpartikelanalyse der negativ kontrastierten Proben

Zur Einzelpartikelanalyse der negativ kontrastierten Proben wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zunächst bei der ersten Nullstelle der Kontrast-Transfer-Funktion (ca. 2 nm) tiefpassgefiltert. Die automatisierte Selektion der Partikel wurde mit Hilfe des Programms *batchboxer* aus dem *EMAN* Softwarepaket [Ludtke, et

*al.*, 1999] durchgeführt. Dabei diente die Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag: 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995], die mit dem Programm *pdb2mrc* (ebenfalls Softwarepaket *EMAN*) in die dreidimensionale Elektronendichte mit einer Auflösung von 20 Å umgerechnet und anschließend in Seitenansicht projiziert wurde, als Referenz. Alle weiteren Schritte wurden mit Hilfe des EM-Softwarepakets durchgeführt [Hegerl, 1996]. Die automatisch selektierten Partikel wurden visuell überprüft und Bilder, die nicht dem Qualitätsstandard entsprachen (ungleichmäßige Stainverteilung, deformierte Partikel, ungenügende Zentrierung der Partikel etc.) bzw. 20S Proteasomen in der Aufsicht zeigen, aussortiert. Die resultierenden Bilder wurden in Translation und Rotation zweidimensional aligniert, wobei die oben beschriebene Projektion der Röntgenkristallstruktur in Seitenansicht als erste Referenz diente. Nach fünf Durchgängen wurden die Bilder erneut einzeln visuell überprüft um Partikel, die eine von der Referenz abweichende Orientierung einnehmen, auszusortieren. Jedes einzelne Bild im verbleibenden Stapel wurde durch Subtraktion des Mittelwertes und anschließende Division durch die Standardabweichung des jeweiligen Bildes normalisiert. Alle weiteren Vorgehensweisen sind im Kapitel 4.9.1 des Ergebnisteils beschrieben.

### 3.10.3 Einzelpartikelanalyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben

Um eine Einzelpartikelanalyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben durchzuführen, wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit einem Defokus von -3,5 µm auf die korrespondierenden Aufnahmen mit einem Defokus von -2,5 µm aligniert. Hierzu wurde das Programm *alignhuge* aus dem *EMAN* Softwarepaket [Ludtke, *et al.*, 1999] verwendet. Die einzelnen Partikel wurden mit Hilfe des Programms *boxer* (ebenfalls Softwarepaket *EMAN*) manuell aus den Abbildungen mit -3,5 µm Defokus selektiert und anschließend anhand ihrer Position aus den Aufnahmen mit -2,5 µm Defokus, die vorher bei der ersten Nullstelle der Kontrast-Transfer-Funktion tiefpassgefiltert wurden, extrahiert. Ein *phase-flipping* erschien nicht sinnvoll, da im vorliegenden Datensatz jenseits der ersten Nullstelle wenig Information vorhanden war. Falls nicht anders angegeben erfolgten alle weiteren Schritte unter Verwendung des EM-Softwarepakets [Hegerl, 1996]. Um Bilder mit 20S Proteasomen in Seitenansicht von denjenigen in Aufsicht zu separieren, wurde eine Multi-Referenz-Alignierung in Translation und Rotation durchgeführt. Als Referenz diente dabei die Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag: 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995], die mit dem Programm *pdb2mrc* (Softwarepaket *EMAN*) in die dreidimensionale Elektronendichte mit einer Auflösung von 20 Å umgerechnet und anschließend in Auf- und Seitenansicht projiziert wurde. Für alle weiteren Analysen wurden lediglich die Bilder mit Partikeln in Seitenansicht verwendet, die nochmals einer zweidimensionalen Alignierung mit der oben beschriebenen Projektion der Röntgenkristallstruktur in Seitenansicht unterworfen wurden. Die Bilder, die die Partikel in Aufsicht zeigten waren für die hier durchgeführte Analyse der Lokalisation von Substratmolekülen innerhalb der „Host-Guest“-Komplexe

nicht geeignet, da sie lediglich den zentralen Kanal von oben und nicht die einzelnen Kompartimente der 20S Proteasomen zeigen. Zudem lag ihre Anzahl deutlich unter derjenigen, die die 20S Proteasomen in Seitenansicht zeigen. Nach fünf Durchgängen wurden die Bilder einzeln durchgesehen, um eine korrekte Alignierung sicherzustellen und Partikel mit von der Referenz abweichender Orientierung auszusortieren. Anschließend wurden die einzelnen Bilder im verbleibenden Stapel durch Subtraktion des Mittelwerts und Division durch die Standardabweichung des jeweiligen Bildes normalisiert. Alle weiteren durchgeführten Analysen sind im Ergebnisteil Kapitel 4.9.2 beschrieben.

## 3.11 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Um mögliche Konformationsänderungen innerhalb des 20S Proteasoms und die daran beteiligten Aminosäurereste zu identifizieren, wurden die „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c und GFP kristallisiert und anschließend einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen.

### 3.11.1 Kristallisation

Zur Kristallisation der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c bzw. GFP wurde zunächst ein Screening um die Bedingungen der erfolgreichen Kristallisation des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* [Löwe, *et al.*, 1995] durchgeführt.

Alle Kristallisationsansätze wurden in *24-well Limbro*® Platten der Firma Hampton Research nach der Dampfdiffusionsmethode in hängenden Tropfen durchgeführt. Die Ränder der Reservoirs wurden mit *Dow Corning 7 Release Compound* desselben Herstellers gefettet. „Host-Guest“ Komplexe enthaltende Proteinlösungen wurden in 5 mM MOPS pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM NaN<sub>3</sub> umgepuffert, auf 7 mg/ml aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.4.8 und 3.4.9) und über *Nanosep*® MF Filtereinheiten der Firma Pall mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert. 1,5 µl dieser Lösungen wurden mit 0,5 µl einer 8 bis 13 % PEG-1000 und 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 enthaltenden Lösung auf einem silizierten Deckgläschen mit 22 mm Durchmesser und 0,22 mm Dicke der Firma Hampton Research vermischt und gegen 0,5 ml Reservoirlösung bestehend aus 15 % PEG-1000, 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert. Die Platten wurden bei 20 °C inkubiert und das Kristallwachstum über mehrere Wochen hin verfolgt. In weiteren Versuchen kamen verschiedene Präzipitanzen (PEG verschiedener Molekulargewichte, NaCl, Betain) variiert gegen verschiedene pH-Werte (5,5 bis 8,0) in unterschiedlichen Puffersystemen (Kaliumphosphat und HEPES) sowie verschiedene Additive (*Additive Screen 2*<sup>TM</sup> und *3*<sup>TM</sup> der Firma Hampton Research) zum Einsatz.

### 3.11.2 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte an der Beamline X06SA-PX der *Swiss Light Source* SLS, Villigen, Schweiz, und an der Beamline ID14 der *European Synchrotron Radiation Facility* ESRF, Grenoble, Frankreich, unter Verwendung von CCD-Detektoren (Mar345, MarResearch und ADSC, Quantum). Die Kristalle wurden mit *Mounted CryoLoops*<sup>™</sup> der Firma Hampton Research aus dem Tropfen gefischt und in einen Kryo-Puffer transferiert, der zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des Kristallisationspuffers 30 % (v/v) Glycerin enthält. Anschließend wurde der Loop auf dem Goniometerkopf fixiert und im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Die Kristalle wurden entlang einer Achse senkrecht zum Röntgenstrahl mit Winkelinkrementen von 0,25 bis 1 ° pro Bild rotiert.

### 3.11.3 Strukturlösung

Die Indizierung der aufgenommenen Daten und die Berechnung der Elektronendichten aus den Reflexamplituden der Diffraktionsbilder wurden von Frau Dr. Susanne Witt (MPI für Biochemie) und Herrn Dr. Matthew Groves (EMBL Outstation, Hamburg) durchgeführt. Dabei wurde zur Lösung des Phasenproblems die Methode des molekularen Ersatzes, mit der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag: 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995] als Modell, verwendet. Die Untereinheiten wurden als starre Einheiten behandelt.

## 3.12 Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie

Um das Verhältnis von 20S Proteasom zu Substrat in den „Host-Guest“ Komplexen mit Cytochrom c und GFP zu bestimmen, wurden diese mit Hilfe der Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie untersucht. Hierzu wurden die „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c bzw. GFP auf eine Konzentration von ca. 30 µM aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.4.9) und anschließend an Dr. Michal Sharon in der Arbeitsgruppe von Carol V. Robinson, Department of Chemistry, University of Cambridge, UK, gesandt, die die Aufnahme und Analyse der Spektren durchführte [Sharon, *et al.*, 2005]. Die Messung erfolgte an einem modifizierten QSTAR® XL Massenspektrometer der Firma Applied Biosystems, der für die Analyse von Proteinkomplexen großer molekularer Masse optimiert wurde [Sobott, *et al.*, 2002].

## 3.13 Röntgenkleinwinkelstreuung

Zur Identifikation möglicher Strukturänderungen der „Host-Guest“ Komplexe im Vergleich zum nativen 20S Proteasom und zur Bestimmung der Lokalisation der Substrate innerhalb des 20S Proteasoms, wurde die Methode der Kleinwinkel-Röntgenstreuung angewandt. Die Messung erfolgte im HASYLAB, Beamline X33 des European Molecular Biology Laboratory EMBL am Deutschen Elektronen Synchrotron

DESY, Hamburg, in Zusammenarbeit mit Dr. Dmitri Svergun und Dr. Manfred Rössele (EMBL Outstation, Hamburg).

Vermessen wurden Proben der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP und die jeweiligen Kontrollen (siehe Kapitel 3.8) sowie natives 20S Proteasom und mit *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton inhibiertes 20S Proteasom in Konzentrationen von 0,5 bis 15 mg/ml. Die Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Proteine (siehe 4.5) bestimmt, da die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD für die Auswertung der Röntgenkleinwinkelstreuung nicht ausreicht. Um Strahlenschädigung oder Aggregation der Probe während der Messung zu minimieren, wurden die Proben direkt vor der Messung mit DTT (Endkonzentration 2 mM) versetzt. Als Molekulargewichtsstandard dient eine frische Lösung von BSA in bekannter Konzentration. Zur möglichst präzisen Bestimmung der Streukurve des gelösten Proteins, wurde vor und nach jeder Messung der Proteinlösung, die Streukurve des Puffers aufgenommen. Die Streuung des Proteins ergab sich aus der Differenz der Streuung der Proteinlösung und derjenigen des Puffers. Die Auswertung der erhaltenen Streukurven wurde von Dr. Dmitri Svergun durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

Zur Untersuchung der Vorgänge während der Substrattranslokation in das 20S Proteasom wurden „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP hergestellt, bei denen das Substrat im Inneren des irreversibel inhibierten 20S Proteasoms zurückgefaltet und somit am Austritt gehindert wird. Hierzu mussten zunächst die benötigten Substrate und Enzyme bereitgestellt werden. Die Ergebnisse der Mutagenese zur Generierung der Mutanten des 20S Proteasoms sind in Kapitel 4.1, diejenigen der Expression und Isolierung der Mutanten des 20S Proteasoms und des GFP in den Kapiteln 4.2 und 4.3 beschrieben. Eine weitere Voraussetzung für die Bildung der „Host-Guest“ Komplexe ist die Untersuchung der Ent- und Rückfaltung von Cytochrom c und GFP, die im Kapitel 4.4 behandelt wird. In Kapitel 4.5 werden die Ergebnisse der Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten behandelt. Kapitel 4.6 beinhaltet die Ergebnisse der Bildung von „Host-Guest“ Komplexen und die darauf folgenden Kapitel befassen sich mit deren Analyse mittels Gelelektrophorese (Kapitel 4.7), Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie (Kapitel 4.8), Elektronenmikroskopie (Kapitel 4.9), Röntgenkristallographie (Kapitel 4.10), Massenspektrometrie (Kapitel 4.11) und Röntgenkleinwinkelstreuung (Kapitel 4.12). Die Ergebnisse der Analyse der proteolytischen Aktivität verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms sind in Kapitel 4.13 aufgeführt.

### 4.1 Mutagenese des 20S Proteasoms

Basierend auf der Röntgenkristallstruktur der „Host-Guest“ Komplexe (siehe Kapitel 4.10) wurden Mutanten des 20S Proteasoms hergestellt, bei denen Aminosäuren, die möglicherweise eine Rolle bei der Translokation spielen, gegen Alanin ausgetauscht wurden. Diese Mutanten wurden anschließend einer Analyse der Enzymkinetik unterzogen. Abb. 4.1 zeigt das Agarosegel des Restriktionsverdau der Plasmide aller verwendeten Mutanten des 20S Proteasoms nach der zielgerichteten Mutagenese.

Die zu erwartenden Fragmente nach dem Kpn I-Verdau sind 3543 bp und 696 bp lang, diejenigen nach dem Hind III-Verdau 3403 bp und 836 bp. Banden im Bereich dieser Größen fanden sich für den jeweiligen Restriktionsverdau aller Mutanten im Gel. Das Vorhandensein der gewünschten, sowie die Abwesenheit weiterer unerwünschter Mutationen konnte durch Sequenzierung der Plasmide bewiesen werden.

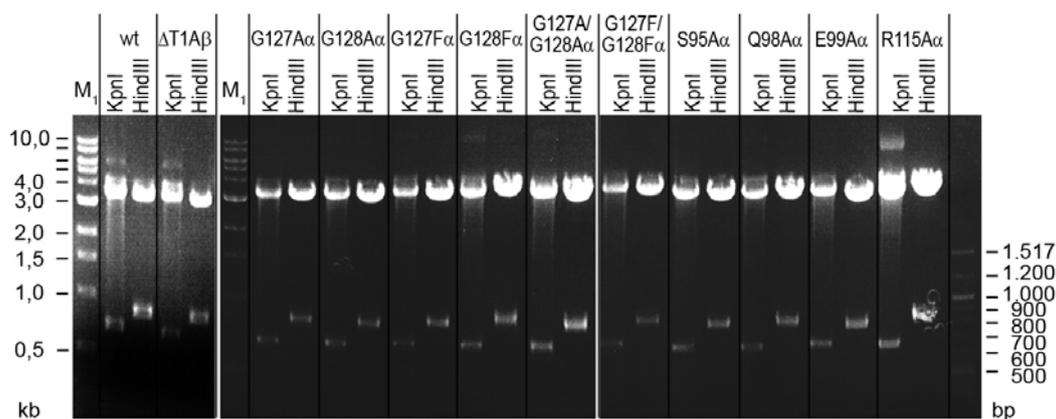


Abb. 4.1: 1 % Agarosegel des Restriktionsverdaus der Plasmid-DNA aller verwendeter Mutanten des 20S Proteasoms. Die zu erwartenden DNA-Fragmente sind in allen Fällen deutlich zu erkennen.

## 4.2 Expression und Isolierung des 20S Proteasoms

Die Expression und Isolierung der verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung verschiedener Methoden durchgeführt. Der Wildtyp und die  $\Delta T1A\beta$ -Mutante wurden in Kulturen exprimiert, denen zur Induktion IPTG zugesetzt wurde. Die Isolierung erfolgte durch zwei aufeinander folgende chromatographische Reinigungsschritte. Alle übrigen Mutanten wurden mit Autoinduktion exprimiert und einer automatisierten Aufreinigung, ebenfalls in zwei chromatographischen Reinigungsschritten, unterzogen. Kapitel 4.2.1 behandelt die Expression und Isolierung des Wildtyps und der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante, die Expression und Isolierung aller übrigen Mutanten des 20S Proteasoms wird in Kapitel 4.2.2 beschrieben.

### 4.2.1 Expression und Isolierung des Wildtyps und der $\Delta T1A\beta$ -Mutante

Die Expression des 20S Proteasom Wildtyps erfolgte in einem Fermenter befüllt mit 80 l Kultur, die mit 1 l Vorkultur angeimpft wurden. Bei der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante wurden zur Expression 10 2 l-Kolben, die jeweils mit 500 ml Kultur gefüllt und mit 25 ml Vorkultur angeimpft wurden, verwendet. In beiden Fällen stieg die  $OD_{600nm}$  nach etwa drei bis fünf Stunden auf 0,5 bis 0,7 an, woraufhin die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert werden konnte. Nach weiteren sechs bis acht Stunden wurden die Kulturen abgeerntet, wobei durchschnittlich ca. 400 g Zellpellet aus der 80 l- und in etwa 10 g aus der 5 l-Kultur gewonnen wurden.

Zur Isolierung der rekombinanten Proteine wurden die Zellen aufgeschlossen und ein Großteil der *E.coli*-Proteine durch Hitzefällung und anschließende Zentrifugation entfernt. Im Falle des Wildtyp 20S Proteasoms wurde für eine Aufreinigung jeweils nur die Hälfte des Zellpellets aus 80 l Kultur verwendet. Die weitere Aufreinigung mittels

Ni-Affinitätschromatographie und Gelfiltration lieferte bei beiden Mutanten des 20S Proteasoms qualitativ vergleichbare Ergebnisse, weshalb die einzelnen Schritte im Folgenden exemplarisch für den Wildtyp angegeben werden.

Das steril filtrierte Lysat, dessen NaCl- und Imidazolkonzentration denjenigen des Puffer A-HisTrap entsprechen, wurde in zwei Teilen auf je zwei miteinander verbundene 5 ml *HisTrap*<sup>TM</sup> HP Säulen geladen.

Abb. 4.2 zeigt das Chromatogramm des Laufs dieser 2x5 ml Säule, wobei die Absorption des Eluats bei 280 nm, sowie der prozentuale Anteil von Puffer B-HisTrap im Laufpuffer gegen das Elutionsvolumen aufgetragen wurden.

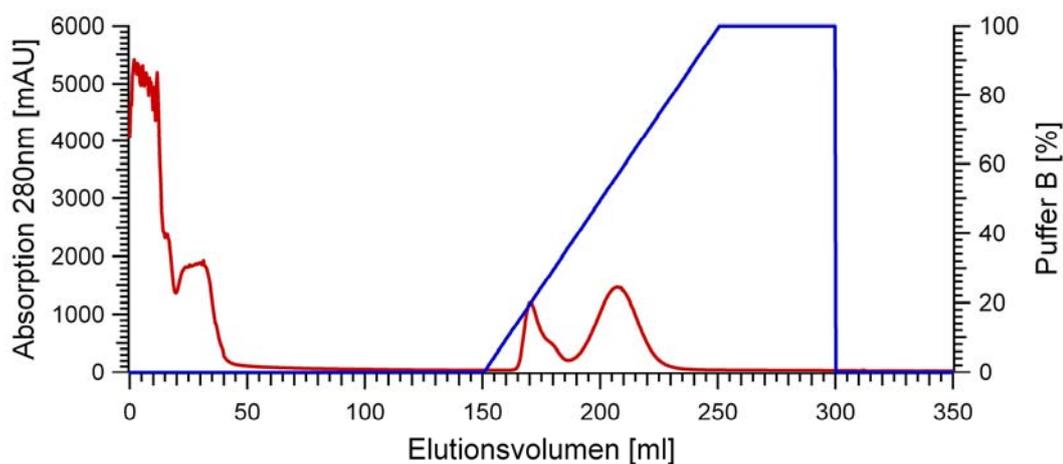


Abb. 4.2: Chromatogramm des Laufs der Ni-Affinitätssäule *HisTrap*<sup>TM</sup> HP zur Aufreinigung des Wildtyp 20S Proteasoms (— Absorption bei 280 nm; — Anteil Puffer B in %). Das Lysat aus ca. 100 g Zellpellet wurde auf ein Säulenvolumen von 2x5 ml geladen. Während des Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B-HisTrap über 10 Säulenvolumen treten 2 Proteinpeaks bei ca. 20 und 50 % Puffer B-HisTrap auf.

Während des Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B-HisTrap treten zwei Maxima der Absorption bei 280 nm, einer bei etwa 20 % Puffer B-HisTrap (116 mM Imidazol) und der zweite bei ca. 50 % Puffer B-HisTrap (260 mM Imidazol), auf. Die Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese auf deren Gehalt an 20S Proteasomen und Verunreinigungen überprüft (siehe Abb. 4.3).

Hieraus wird deutlich, dass der erste Peak überwiegend aus Verunreinigungen besteht, während bei den Fraktionen des zweiten Peaks eine intensive Bande bei ca. 25 kDa zu sehen ist. Diese ist auf die Untereinheiten des 20S Proteasoms ( $\alpha$ : 25,8 Da und  $\beta$ His<sub>6</sub>: 23,1 Da) zurückzuführen, die im verwendeten Gel nicht voneinander getrennt werden können.

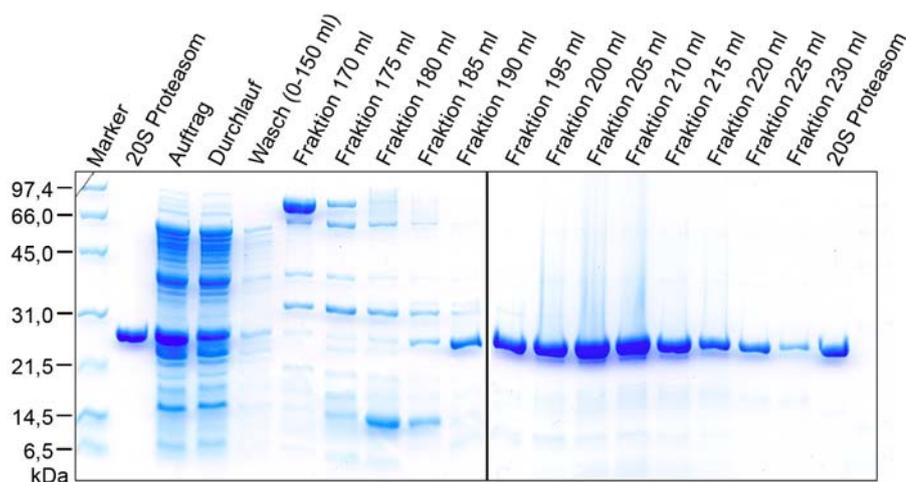


Abb. 4.3: 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen aus der Ni-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des 20S Proteasom Wildtyps. Die Fraktionen von 170 bis 185 ml enthalten hauptsächlich Verunreinigungen, während die folgenden Fraktionen im Wesentlichen 20S Proteasomen beinhalten (M: SDS-PAGE Standard Broad Range, BioRad; 20S Proteasom: 0,5 mg/ml, aus früherer Aufreinigung; von Auftrag und Durchlauf wurden jeweils 5, von allen übrigen Proben 10  $\mu$ l aufgetragen).

Um die 20S Proteasomen weiter aufzureinigen und sie von eventuell nicht vollständig assemblierten Untereinheiten abzutrennen, wurden die Fraktionen von 190 bis 230 ml vereinigt und anschließend über eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule weiter aufgereinigt. Das Chromatogramm dieser Gelfiltration, bei der die Absorption des Eluats bei 280 nm gegen das Elutionsvolumen ab der Injektion der Probe auf die Säule aufgetragen wurde, ist in Abb. 4.4 dargestellt.

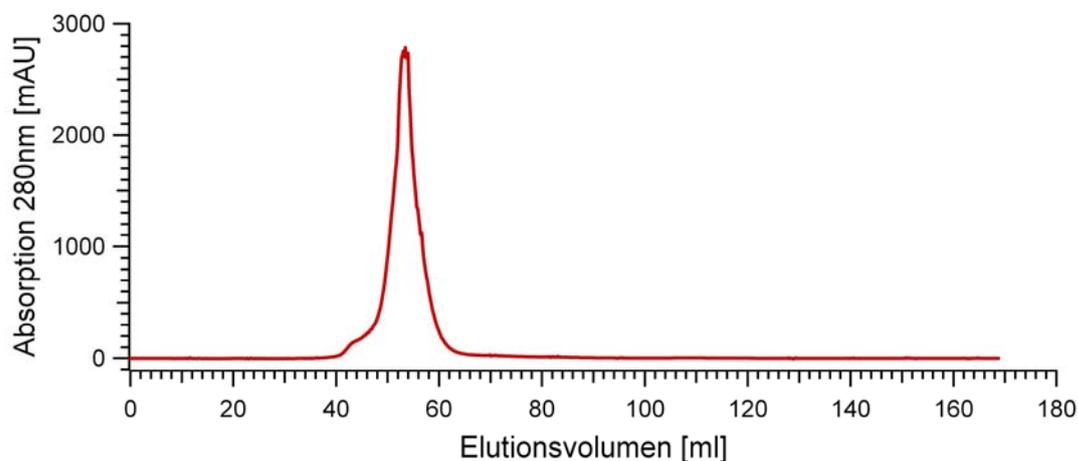


Abb. 4.4: Chromatogramm des Laufs der Gelfiltration zur Aufreinigung des 20S Proteasom Wildtyps. Zu Beginn des Laufs (Elutionsvolumen 0 ml) werden die vereinigten Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie auf die Säule gespült. Es resultiert ein Peak mit einem Maximum bei ca. 53 ml und einer Schulter zwischen ca. 40 und 45 ml.

Die Absorption des Eluats bei 280 nm weist ein Maximum bei ca. 53 ml Elutionsvolumen mit einer Schulter zwischen ca. 40 und 45 ml auf. Die Reinheit des 20S Proteasoms in den erhaltenen Fraktionen wird erneut mittels SDS-PAGE überprüft (siehe Abb. 4.5). Bei allen untersuchten Fraktionen tritt im Gel eine sehr intensive Bande um 25 Da auf, die, wie oben beschrieben, von den Untereinheiten des 20S Proteasoms stammt. Die Fraktionen von 46,5 bis 60 ml wurden vereinigt und aliquotiert bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Eine weitere Aufreinigung der 20S Proteasomen ist aufgrund ihrer hohen Reinheit und Homogenität nicht nötig.

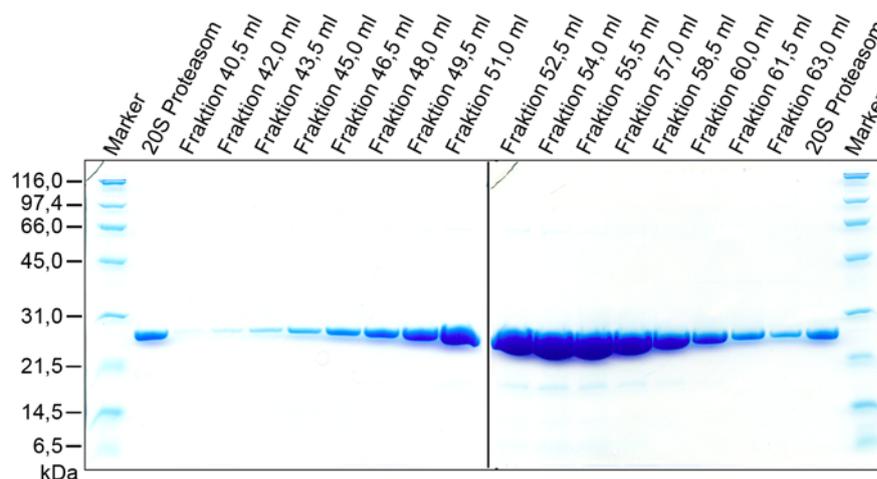


Abb. 4.5: 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen nach der Gelfiltration zur Aufreinigung des 20S Proteasom Wildtyps (Marker: SDS-PAGE Standard Broad Range, BioRad; 20S Proteasom: 0,5 mg/ml, aus früherer Aufreinigung; von jeder Probe wurden je 10  $\mu\text{l}$  aufgetragen).

Insgesamt konnten aus einem 80 l Fermenter, aus dem durchschnittlich etwa 400 g Zellpellet gewonnen wurden, ca. 150 mg reiner 20S Proteasom Wildtyp isoliert werden. Dies entspricht einer Ausbeute von ca. 1,9 g/l Kultur. Aus 5 l Kultur zur Expression der  $\Delta\text{T1A}\beta$ -Mutante wurden durchschnittlich ca. 12 g Zellpellet und daraus in etwa 5 mg reines Protein isoliert. Die Ausbeute liegt mit ca. 1,0 g/l Kultur unter derjenigen des Wildtyps.

#### 4.2.2 Expression und Isolierung aller übrigen Mutanten des 20S Proteasoms

Basierend auf den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms (siehe Kapitel 4.10) wurden verschiedene Mutanten des 20S Proteasoms hergestellt (siehe Kapitel 4.1), um den Einfluss einzelner Aminosäuren auf den Abbau von Substraten zu untersuchen. Da zunächst nur die Enzymkinetik dieser Mutanten analysiert wurde und hierfür lediglich geringe Mengen der jeweiligen 20S Proteasomen nötig waren, erfolgte die Expression in je zwei 2 l-Kolben befüllt mit 500 ml ZYP-5052-Vollmedium. Dies erlaubt eine Autoinduktion durch aufeinander abgestimmte Mengen an Glukose und Laktose. Nach ca. 50 Stunden Inkubation wurden

die Kulturen abgeerntet, wobei aus 1 l jeweils ca. 10 g Zellpellet gewonnen werden konnten.

Zur Isolierung des rekombinanten Proteins wurden die Zellen aufgeschlossen. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde direkt zur automatisierten Aufreinigung über eine Ni-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer Gelfiltration, mittels des *ÄKTA 3D-Kit* der Firma GE Healthcare verwendet. Da die Ergebnisse der Aufreinigung aller verwendeten Mutanten qualitativ vergleichbar sind, wird im Folgenden exemplarisch die Aufreinigung der vier Mutanten S95A $\alpha$ , Q98A $\alpha$ , E99A $\alpha$  und R115A $\alpha$  beschrieben.

Abb. 4.6 zeigt die Chromatogramme der automatisierten Aufreinigung dieser vier Mutanten. Der Auftrag der verschiedenen Substrate auf die jeweiligen *HisTrap*<sup>TM</sup>-Säulen und das anschließende Waschen dieser Säulen mit Puffer A ist in Abb. 2.1 a) zu sehen. Daraufhin werden die *HisTrap*<sup>TM</sup>-Säulen mit 15 %-Puffer B gewaschen und die Proben durch Stoßelution mit 100 %-Puffer B von den Säulen gelöst und eluiert. Der grau unterlegte Bereich in den vergrößerten Darstellungen kennzeichnet den Teil des Elutionspeaks, der zunächst in einem Loop gesammelt und anschließend, markiert durch den schwarzen Pfeil, auf die *HiLoad 16/60 Superdex 200* injiziert wurde (siehe Abb. 4.6 b) - e)). Bei allen Proben tritt ca. 50 bis 60 ml nach der Injektion ein Peak mit maximaler Absorption bei 280 nm auf. Zur Analyse der einzelnen Fraktionen auf deren Gehalt an 20S Proteasom und dessen Reinheit wurden diese einer SDS-PAGE unterzogen (siehe Abb. 4.7).

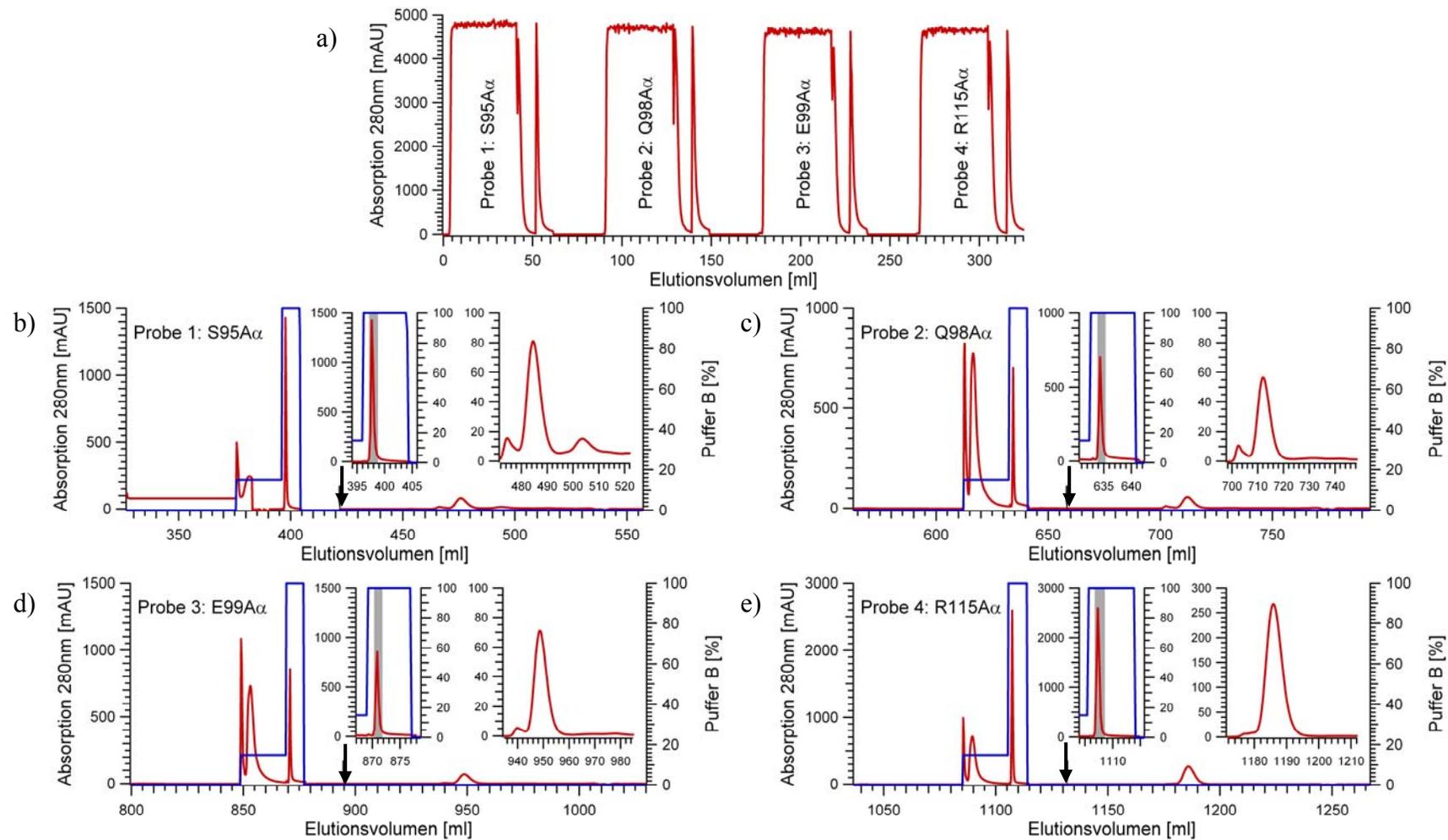


Abb. 4.6: Chromatogramme der automatisierten Aufreinigung der vier Mutanten S95A $\alpha$ , Q98A $\alpha$ , E99A $\alpha$  und R115A $\alpha$  mittels des ÄKTA-3D-Kits. (— Absorption bei 280 nm; — Anteil Puffer B in %). a) Laden der vier Lysate aus je ca. 10 g Zellpellet auf die jeweiligen HisTrap-Säulen. b)-e) Stoßelution der gebundenen Proteine von den HisTrap™-Säulen und nachfolgende Aufreinigung über HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade. Die grau unterlegte Fläche im vergrößerten Ausschnitt kennzeichnet die Fraktion des Elutionspeaks, die anschließend weiter aufgetrennt wurde. Die eluierten Peaks sind ebenfalls vergrößert dargestellt. Der schwarze Pfeil markiert den Zeitpunkt der Injektion dieser Probe auf die Gelfiltration.

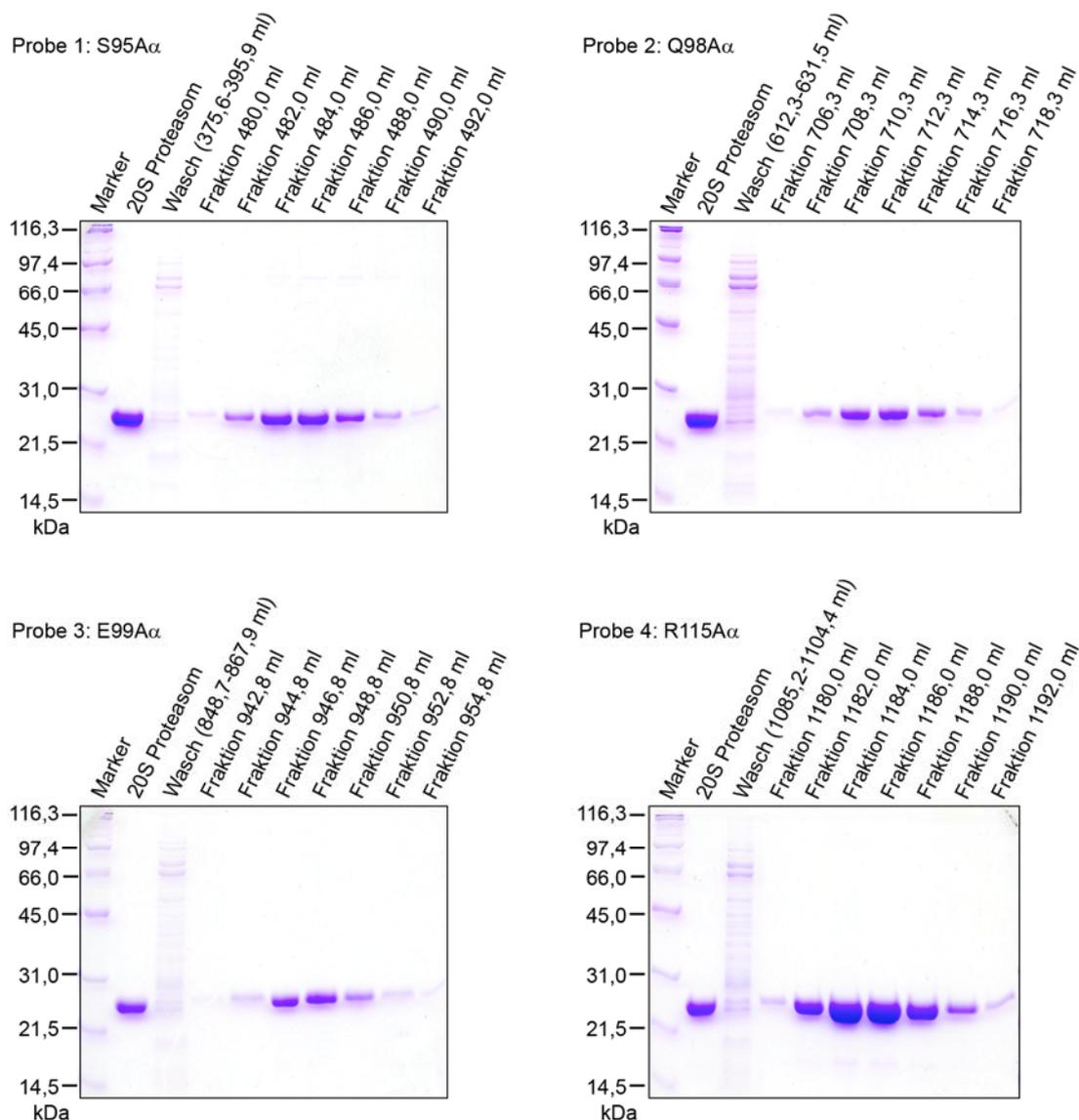


Abb. 4.7: 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen aus der automatisierten Aufreinigung der vier Mutanten S95A $\alpha$ , Q98A $\alpha$ , E99A $\alpha$  und R115A $\alpha$  mittels des ÄKTA 3D-Kits (Marker: SDS-PAGE Standard Broad Range, BioRad; 20S Proteasom: 0,5 mg/ml, aus früherer Aufreinigung; von jeder Probe wurden 10  $\mu$ l aufgetragen).

Bei allen vier Mutanten weisen die Fraktionen des Peaks mit maximaler Absorption bei 280 nm im SDS-Gel eine Bande bei ca. 25 kDa auf, die auf die Untereinheiten des 20S Proteasoms ( $\alpha$ : 25,8 kDa und  $\beta$ His<sub>6</sub>: 23,1 kDa) zurückzuführen ist. Diese beiden Spezies können im verwendeten Gel nicht voneinander getrennt werden. Verunreinigungen sind nicht zu erkennen und das Elutionsvolumen der einzelnen Proben von der HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade-Säule entspricht dem des Wildtyps. Durchschnittlich konnten aus 1 l Kultur ca. 3 bis 5 mg reines Protein gewonnen werden.

Um eine vollständige Assemblierung der Mutanten des 20S Proteasoms zu überprüfen wurden diese einer Analyse mittels SDS- und Nativ-PAGE unterzogen (siehe Abb. 4.8).

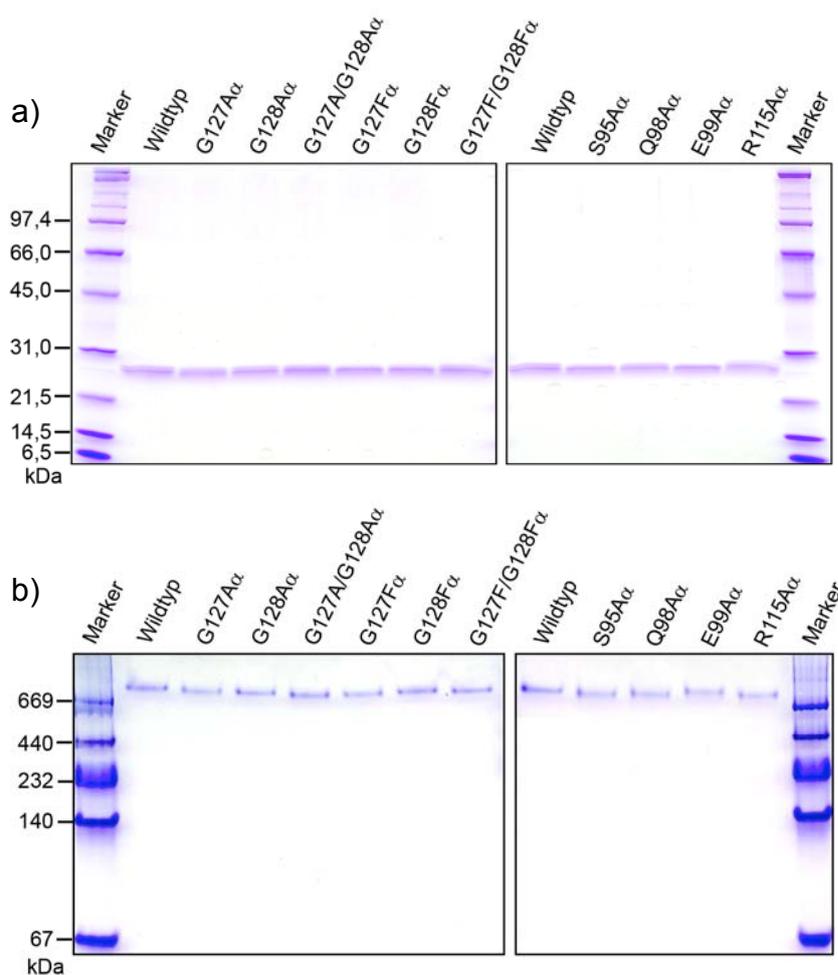


Abb. 4.8: 4-20 % Tris-Glycin PAGE der verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms. a) SDS-PAGE (Marker: SDS-PAGE Standard Broad Range, BioRad); b) Native-PAGE (Marker: High Molecular Weight (HMW) Calibration Kit for Native Electrophoresis, GE Healthcare). Es wurde je 1  $\mu$ g Protein pro Bande geladen.

Die Untereinheiten des 20S Proteasoms ( $\alpha$ : 25,8 kDa und  $\beta$ His<sub>6</sub>: 23,1 kDa) erscheinen bei allen Mutanten im SDS-Gel als eine Bande bei ca. 25 kDa, während im nativ-Gel je eine Bande bei ca. 700 kDa zu erkennen ist. Diese Ergebnisse lassen auf die Bildung eines 28-mers schließen.

Um dies zu Bestätigen und die molekulare Architektur der einzelnen Partikel zu identifizieren wurden die Proben negativ kontrastiert und von Frau Mirjam Beuttler (MPI für Biochemie, Martinsried) elektronenmikroskopisch abgebildet (siehe Abb. 4.9).

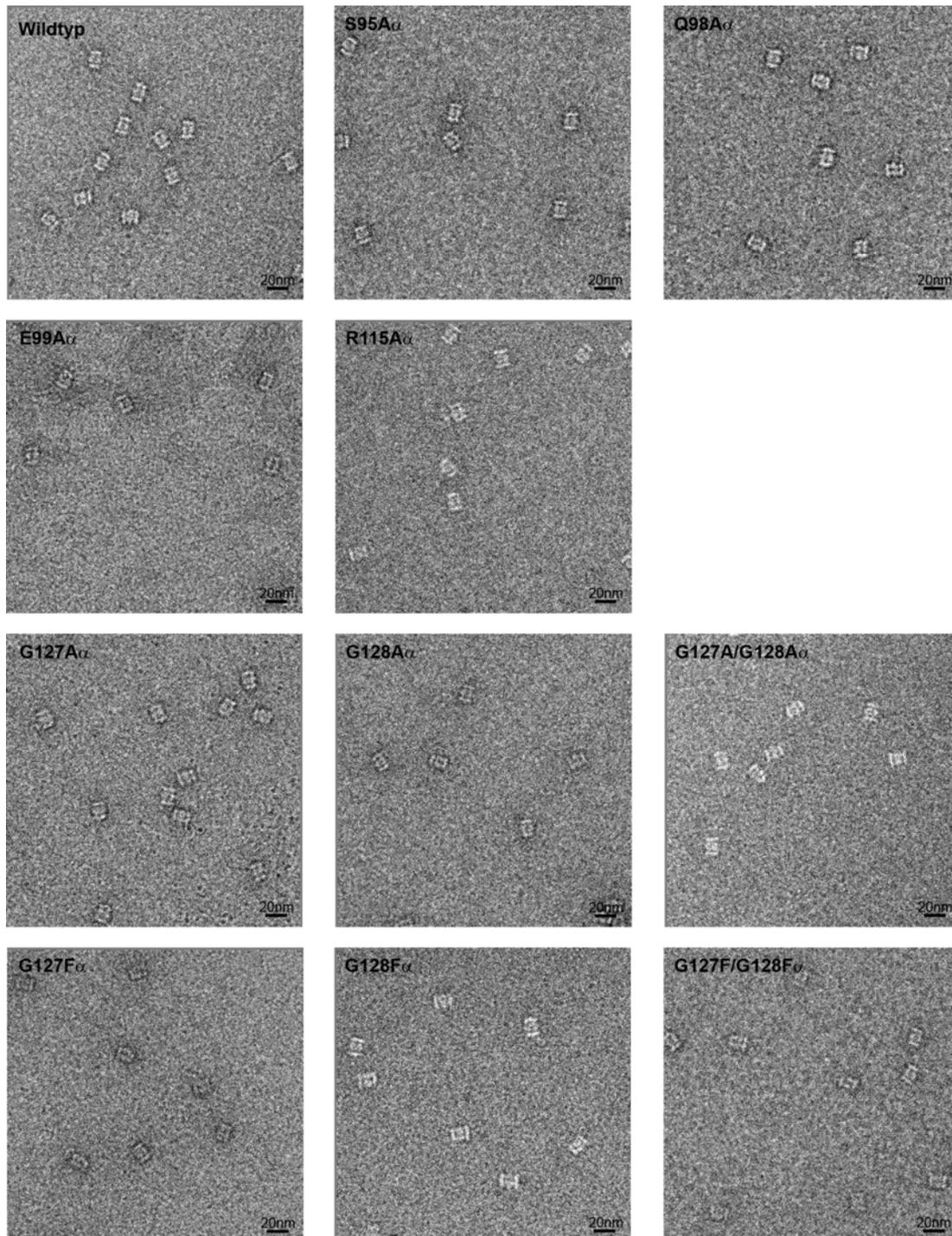


Abb. 4.9: Elektronenmikroskopische Abbildung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mutanten des 20S Proteasoms. Die Partikel wurden mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Bei allen Mutanten sind die ca. 15 nm langen und ca. 12 nm breiten 20S Proteasomen, sowie die vier Ringe, aus denen sie aufgebaut sind, deutlich zu erkennen. Die Proben wurden von Frau Mirjam Beuttler präpariert und abgebildet.

Bei allen Mutanten, sowie dem Wildtyp sind Partikel mit einer Länge von ca. 15 nm und einer Breite von ca. 11 nm zu erkennen. Dies entspricht den Dimensionen des 20S Proteasoms in der Seitenansicht. Zudem ist deren Aufbau aus vier Ringen deutlich zu erkennen, wodurch von einer vollständigen Assemblierung ausgegangen werden kann.

### 4.3 Expression und Isolierung von GFP

Die Expression von His<sub>6</sub>-GFP erfolgte in 10 2 l-Kolben, die jeweils mit 1 l Medium gefüllt und mit 40 ml Vorkultur angeimpft wurden. Nach ca. 2 bis 3 Stunden stieg die OD<sub>600nm</sub> auf 0,5 bis 0,7 an, woraufhin die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert werden konnte. Nach weiteren 16 bis 18 Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Kulturen abgeerntet, wobei aus 10 l Kultur ca. 40 g Zellpellet gewonnen wurden.

Zur Isolierung des His<sub>6</sub>-GFP wurden die Zellen aus insgesamt 30 l Kultur aufgeschlossen. Die Salzkonzentration des Überstand nach der Zentrifugation wurde durch Zugabe von NaCl und Imidazol an diejenige des Puffer A-HisTrap angeglichen und das Lysat auf zwei miteinander verbundene 5 ml HisTrap™ HP Säulen geladen.

Abb. 4.10 zeigt das Chromatogramm des Laufs dieser 2x5 ml Säule, wobei die Absorption des Eluats bei 280 nm und 395 nm, sowie der prozentuale Anteil von Puffer B-HisTrap im Laufpuffer gegen das Elutionsvolumen aufgetragen wurden.

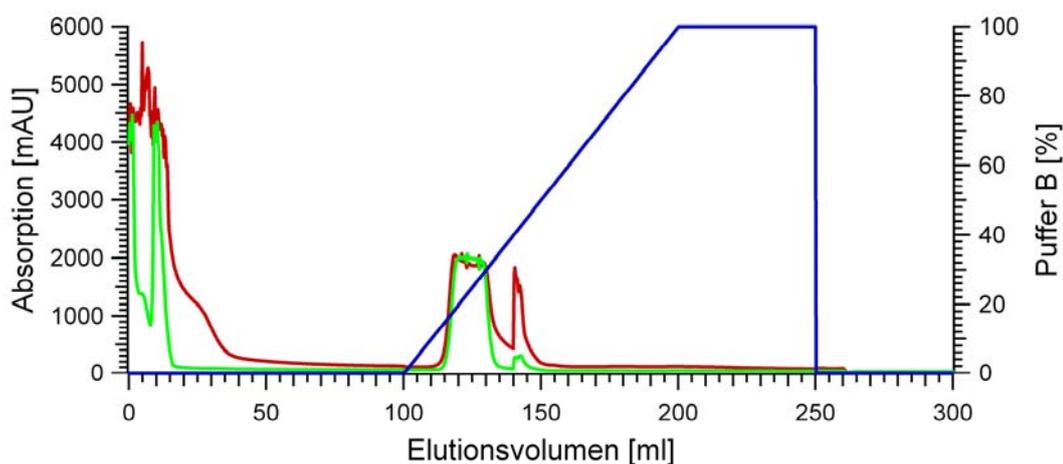


Abb. 4.10: Chromatogramm des Laufs der Ni-Affinitätsäule HisTrap™ zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>-GFP (— Absorption bei 280 nm; — Absorption bei 395 nm; — Anteil Puffer B in %). Das Lysat aus ca. 120 g Zellpellet wurde auf ein Säulenvolumen von 2x5 ml geladen. Während des Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B-HisTrap über 10 Säulenvolumen tritt ein Proteinpeak zwischen ca. 15 und 30 % Puffer B-HisTrap auf. Der Peak bei ca. 40 % Puffer B ist ein Artefakt, das auf eine kurze Unterbrechung des Laufs zurückzuführen ist.

Während des Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B wird bei ca. 15 bis 30 % Puffer B ein Peak von der Säule eluiert, der sowohl bei 280 nm (Proteine), als auch bei 395 nm

(GFP) absorbiert. Ein weiterer Peak bei ca. 40 % Puffer B ist auf eine kurze Unterbrechung des Laufs zurückzuführen und stellt somit ein Artefakt dar.

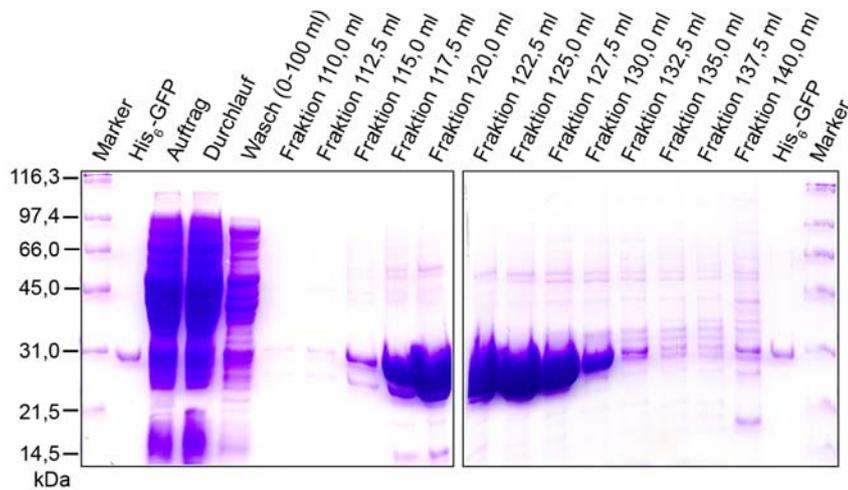


Abb. 4.11: 12 % SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen aus der Ni-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>-GFP. Die Fraktionen von 117,5 bis 132,5 ml enthalten hauptsächlich His<sub>6</sub>-GFP (M: SDS-PAGE Standard Broad Range, BioRad; His<sub>6</sub>-GFP: 0,5 mg/ml, aus früherer Aufreinigung; es wurden je 10 µl der Proben aufgetragen).

Zur Analyse der Fraktionen auf deren Gehalt an His<sub>6</sub>-GFP wurden diese einer SDS-PAGE unterzogen (siehe Abb. 4.11). Aus den Gelen wird ersichtlich, dass der Peak von ca. 15 bis 30 % Puffer B im Wesentlichen His<sub>6</sub>-GFP mit geringfügigen Verunreinigungen enthält.

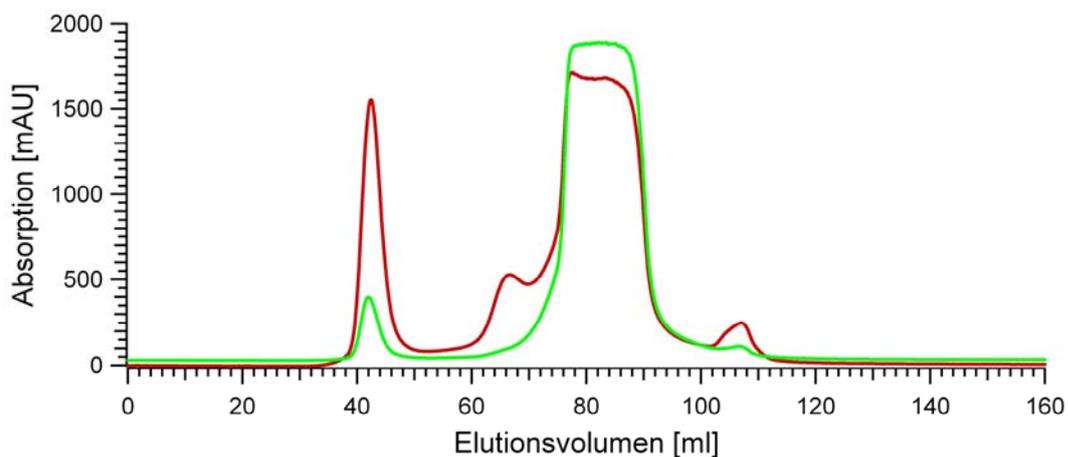


Abb. 4.12: Chromatogramm des Laufs der Gelfiltration zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>-GFP (— Absorption bei 280 nm; — Absorption bei 395 nm). Zu Beginn des Laufs werden die vereinigten Fraktionen der Ni-Affinitätschromatographie auf die Säule injiziert. Es resultieren mehrere Peaks zwischen 40 und 110 ml, wobei derjenige mit maximaler Absorption bei 395 nm zwischen 75 und 90 ml liegt.

Um diese abzutrennen wurden die Fraktionen von 117,5 bis 132,0 ml vereinigt, auf ca. 4 ml aufkonzentriert und in zwei aufeinander folgenden Läufen je 2 ml dieser Probe mittels Gelfiltration weiter aufgereinigt. Zur Überprüfung der Reinheit des His<sub>6</sub>-GFP in den einzelnen Fraktionen wurden diese mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 4.13).

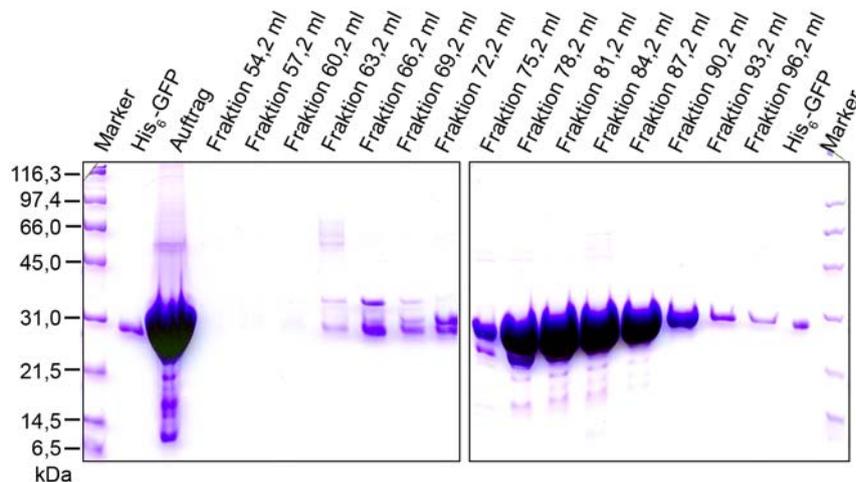


Abb. 4.13: 12 %SCHÄGGER-SDS-PAGE der Fraktionen nach der Gelfiltration zur Aufreinigung von His<sub>6</sub>-GFP. (Marker: SDS-PAGE Standard Broad Range, BioRad; His<sub>6</sub>-GFP: 0,5 mg/ml, aus früherer Aufreinigung; vom Auftrag wurden 2,5  $\mu$ l, von allen übrigen Proben je 10  $\mu$ l aufgetragen).

Die Fraktionen von 78,2 bis 96,2 ml enthielten das His<sub>6</sub>-GFP in ausreichend reiner Form, da die Verunreinigungen, die bei den Fraktionen von 78,2 bis 84,2 ml zu sehen sind, im Vergleich zur Menge an His<sub>6</sub>-GFP vernachlässigbar gering sind. Aus den 30 l Kultur konnten ca. 110 mg Protein gewonnen werden, was einer Ausbeute von ca. 3,7 mg/l Kultur entspricht.

#### 4.4 Ent- und Rückfaltung der Modellsubstrate

Um eine Translokation der beiden Modellsubstrate Cytochrom c und GFP in das 20S Proteasom zu ermöglichen, ist eine vorherige Entfaltung nötig, da nur ungefaltete Substrate in der Lage sind die 1,3 nm schmale Öffnung der äußeren Ringe des 20S Proteasoms zu passieren. Zur Bildung der „Host-Guest“ Komplexe werden diese Substrate anschließend innerhalb des inhibierten 20S Proteasoms zurückgefaltet. Deshalb wurde eine vorherige Untersuchung der Ent- und Rückfaltung der beiden Modellsubstrate Cytochrom c und GFP, unter den Bedingungen, die bei der Herstellung der „Host-Guest“ Komplexe herrschen, durchgeführt.

##### 4.4.1 Cytochrom c

Cytochrom c besitzt eine über zwei Cysteine (Cys14, Cys17) kovalent an das Proteinrückgrad gebundene Häm-Gruppe, deren spektrale Eigenschaften Aussagen über den Faltungszustand des Proteins erlauben. Durch Bestrahlung von Cytochrom c mit

Licht im Wellenlängenbereich von 405 bis 410 nm kann ein Elektron des ausgedehnten aromatischen Systems des Porphyrins von einem bindenden  $\pi$ -Orbital in ein antibindendes  $\pi^*$ -Orbital angeregt werden. Im UV/Vis-Spektrum erscheint bei der jeweiligen Wellenlänge eine sehr intensive Soret-Bande. Die Intensität des  $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs, und somit die Lage des Absorptionsmaximums, ist abhängig vom Oxidationszustand und der Ligandierung des Eisenions im Häm [Babul und Stellwagen, 1972].

Die Ent- und Rückfaltung von Cytochrom c unter den Bedingungen, die auch zur Herstellung der „Host-Guest“ Komplexe Verwendung fanden, wurden durch die Aufnahme der Absorptionsspektren einer Lösung von Cytochrom c in 2 M Guanidinhydrochlorid von 300 bis 500 nm bei verschiedenen Temperaturen und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht.

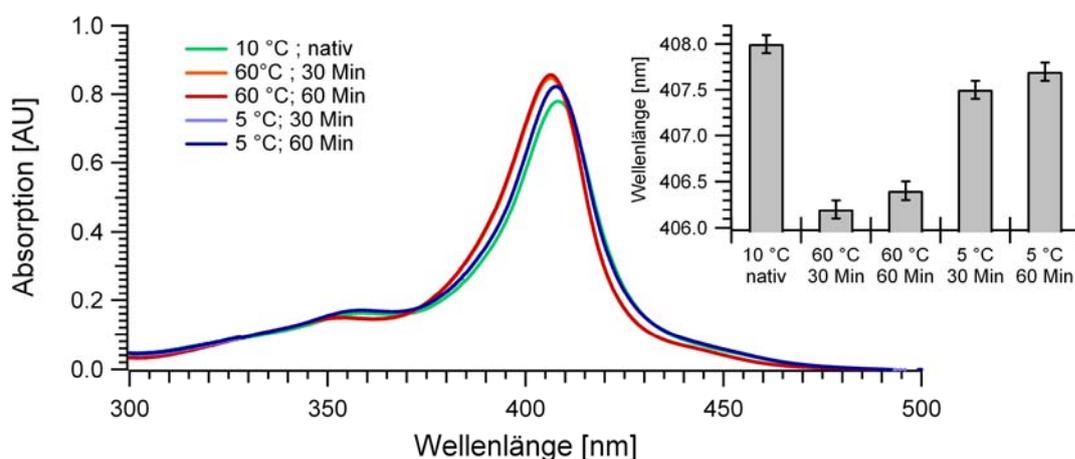


Abb. 4.14: Absorptionsspektren von Cytochrom c in 2 M Guanidinhydrochlorid nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei verschiedenen Temperaturen. Die Lösung wurde zunächst bei 10 °C vermessen, woraufhin sie 60 Minuten bei 60 °C und anschließend weitere 60 Minuten bei 5 °C inkubiert wurde. Nach je 30 und 60 Minuten bei der jeweiligen Temperatur wurden weitere Spektren aufgenommen. Das Balkendiagramm zeigt die Wellenlängen der Absorptionsmaxima.

Abb. 4.14 zeigt die Absorptionsspektren einer frischen Lösung von Cytochrom c bei 10 °C, nach 30 und 60-minütiger Inkubation bei 60 °C und nach anschließender Abkühlung der Lösung auf 5 °C für 30 und 60 Minuten. Im Balkendiagramm sind die jeweiligen Wellenlängen dargestellt, bei denen maximale Absorption auftritt. Beim nativen Cytochrom c ist dies bei 408,0 nm der Fall. Inkubiert man die Lösung 30 bzw. 60 Minuten bei 60 °C, so ist eine deutliche Verschiebung der Soret-Bande auf 406,2 bzw. 406,4 nm festzustellen. Zudem erfolgt eine leichte Intensivierung der Absorption bei dieser Wellenlänge. Nach Abkühlung der Lösung auf 5 °C und Inkubation für 30 bzw. 60 Minuten sinkt die Intensität der Absorption wieder und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zurück auf Wellenlängen von 407,5 bzw. 407,7 nm. Hieraus wird deutlich, dass Cytochrom c unter den gewählten Bedingungen ent- und rückgefaltet werden kann.

#### 4.4.2 GFP

Das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*) GFP besteht aus einem zylindrischen 11-strängigen  $\beta$ -Barrel mit kurzen  $\alpha$ -Helices und Loops an beiden Seiten. Eine zentrale  $\alpha$ -Helix durchzieht das  $\beta$ -Barrel [Yang, *et al.*, 1996]. Auf dieser befindet sich ein intrinsisches Chromophor, das in einer posttranslationalen autokatalytischen Reaktion durch Zyklisierung des Polypeptidrückgrates von Ser 65, Tyr 66 und Gly 67 gebildet wird [Reid und Flynn, 1997]. GFP besitzt zwei charakteristische Absorptionsmaxima, eines bei 395 nm und ein weniger intensives bei 475 nm. Nach Anregung bei diesen Wellenlängen emittiert GFP grünes Licht mit einem Emissionsmaximum bei ca. 509 nm. In der nativen, fluoreszierenden Form ist das Chromophor durch die  $\beta$ -Faltblätter und die kurzen  $\alpha$ -Helices von umgebendem Wasser abgeschirmt und in ein dichtes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen eingebettet. Fluoreszenz tritt nur auf, wenn GFP in seiner nativen tertiären Struktur vorliegt, da durch Denaturierung des Proteins das Chromophor für Wasser zugänglich und dessen Fluoreszenz gequenchet ist [Enoki, *et al.*, 2004]. Aus diesem Grund eignet sich die Messung der Fluoreszenz von GFP zur Untersuchung der Ent- und Rückfaltung des Proteins.

Zur Analyse der Ent- und Rückfaltung von GFP unter Bedingungen analog denjenigen zur Bildung der „Host-Guest“ Komplexe, wurde der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität bei 509 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 395 nm aufgezeichnet (siehe Abb. 4.15).

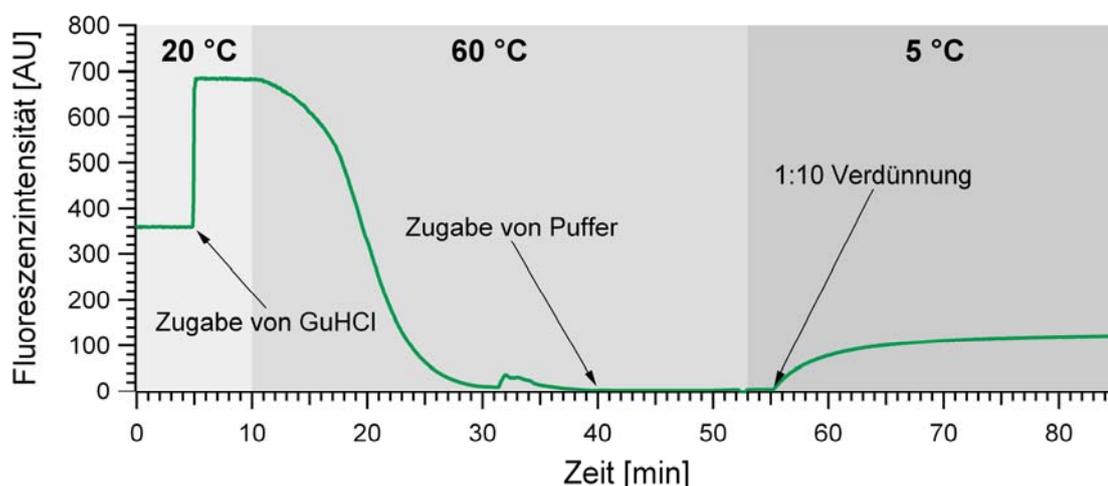


Abb. 4.15: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz von GFP unter den Bedingungen der "Host-Guest" Komplexbildung. Die Fluoreszenz der GFP-Lösung steigt nach Zugabe von Guanidin-Hydrochlorid sprunghaft an und sinkt durch Erwärmen auf 60 °C auf Null ab. Durch rasches Abkühlen auf 5 °C und Verdünnung auf 1/10 der Ursprungskonzentration steigt die Fluoreszenz wieder an.

Zu Beginn der Messung befindet sich in der Küvette eine Lösung von GFP mit konstanter Fluoreszenzintensität, die nach Zugabe von Guanidin-Hydrochlorid sprunghaft ansteigt, was vermutlich auf verringertes Quenching der Fluoreszenz

zurückzuführen ist. Durch Erwärmen der Lösung auf 60 °C sinkt die Fluoreszenz der Lösung sigmoidal auf Null ab, wodurch von einer Entfaltung des GFP ausgegangen werden kann. Nach 40 Minuten wird Puffer zugegeben, wobei die Fluoreszenzintensität weiterhin bei Null liegt. Dieser Schritt entspricht der Zugabe des inhibierten 20S Proteasoms bei der Bildung der „Host-Guest“ Komplexe. Die Konzentration an Guanidin-Hydrochlorid beträgt nach diesem Schritt 2 M. Nach weiteren 10 Minuten wird die Lösung auf 5 °C abgekühlt und 5 Minuten später auf 1/10 verdünnt, wodurch die Konzentration des Guanidin-Hydrochlorids auf 0,2 M reduziert wird und eine hyperbolische Zunahme der Fluoreszenz zu verzeichnen ist. Da Fluoreszenz bei GFP nur auftritt, wenn das Protein seine native Tertiärstruktur einnimmt, kann von einer Rückfaltung des GFP ausgegangen werden.

Zur Quantifizierung des Grades der Rückfaltung wurden Proben des entfalteten und rückgefalteten GFP aus der oben beschriebenen Messung auf die selbe Konzentration gebracht und deren Emissionsspektren unter Anregung bei 395 nm vermessen. Zusätzlich wurde das Spektrum einer Lösung von nativem GFP, dessen Konzentration derjenigen der übrigen Proben entsprach, aufgezeichnet (siehe Abb. 4.16).

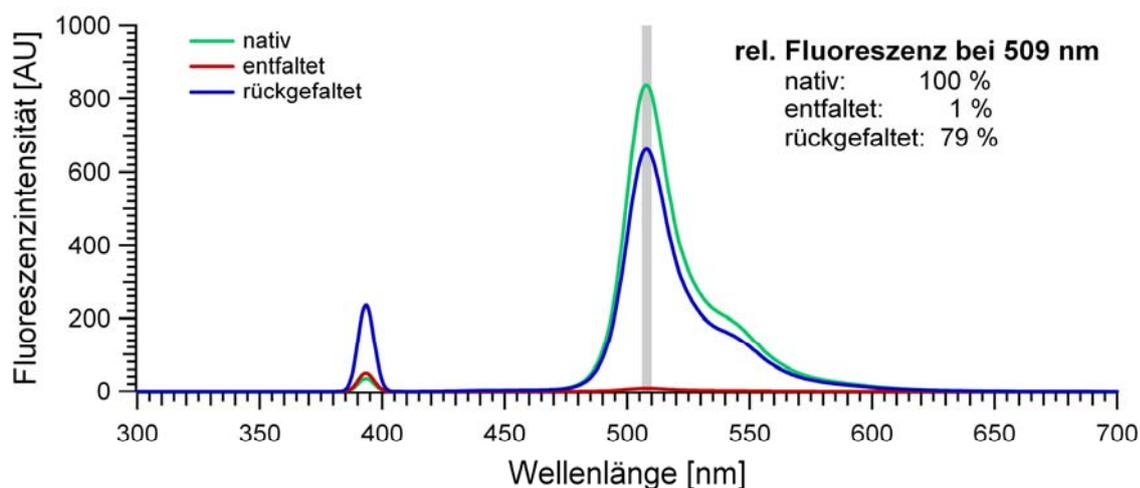


Abb. 4.16: Emissionsspektren von nativem, entfaltetem und rückgefaltetem GFP nach Anregung bei 395 nm und relative Fluoreszenzen der Proben beim Emissionsmaximum. Die Proben des ent- und rückgefalteten GFP stammen aus der Messung des zeitlichen Verlaufs der Ent- und Rückfaltung von GFP (siehe Abb. 4.15). Alle Proben enthalten GFP in einer Konzentration von 10  $\mu$ M.

Die relative Fluoreszenz des rückgefalteten GFP am Emissionsmaximum lässt auf eine mindestens 79 %ige Rückfaltung des GFP in seine native Form schließen. Die Peaks bei 395 nm sind auf die Streuung des Anregungsstrahls in der Probe zurückzuführen. Die Intensität dieser Streuung ist beim rückgefalteten GFP deutlich größer als bei den beiden anderen Proben. Dies ist vermutlich auf die Aggregation ent- oder missgefalteter GFP-Moleküle in der Lösung zurückzuführen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass GFP unter den gewählten Bedingungen ent- und in ausreichendem Maße rückgefaltet werden kann.

## 4.5 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die Auswertung der Streukurven aus der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (siehe Kapitel 4.12) erfordert eine sehr genaue Bestimmung der Konzentration der jeweiligen Proteinlösung. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD ist hierfür nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden die molaren Extinktionskoeffizienten des 20S Proteasoms und der beiden Modellsubstrate Cytochrom c und GFP bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Hierfür wurde die Absorption von Licht der Wellenlänge 280 nm der nativen und der denaturierten Proteine bei identischer Proteinkonzentration vermessen. Die molaren Extinktionskoeffizienten der denaturierten Untereinheiten des 20S Proteasoms, sowie der denaturierten Modellsubstrate His<sub>6</sub>-GFP und Cytochrom c bei 280 nm wurden nach Gleichung (3.2) aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms *ProtParam tool* (Bestandteil des *ExPASy (Expert Protein Analysis System) Proteomics Servers* des Swiss Institute of Bioinformatics SIB) berechnet [Gasteiger, *et al.*, 2003]. Der molare Extinktionskoeffizient des 20S Proteasoms wurde als 14-fache Summe der Werte für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit berechnet. Die gemessenen Absorptionen der nativen ( $A_{280\text{nm,native}}$ ) und der denaturierten ( $A_{280\text{nm,GuHCl}}$ ) Proteine, sowie die jeweiligen berechneten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{280\text{nm,native}}$  und  $\epsilon_{280\text{nm,GuHCl}}$ ) sind in Tab. 4.1 aufgeführt.

Tab. 4.1: Ermittelte Absorptionen und berechnete molare Extinktionskoeffizienten des 20S Proteasoms und der Modellsubstrate Cytochrom c und GFP. Die molaren Extinktionskoeffizienten des denaturierten GFP und Cytochrom c sowie der denaturierten Untereinheiten des 20S Proteasoms ( $\alpha$ :  $14080 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ;  $\beta\text{His}_6$ :  $11520 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) wurden mit Hilfe des Programms *ProtParam tool* (*ExPASy Proteomics Server* [Gasteiger, *et al.*, 2003]) berechnet. Derjenige des 20S Proteasoms ergab sich aus der Summe seiner Bestandteile. Die molaren Extinktionskoeffizienten der nativen Proteine wurden mit Hilfe der Gleichung (3.3) berechnet.

|  | $A_{280\text{nm,native}}$ | $A_{280\text{nm,GuHCl}}$ | $\epsilon_{280\text{nm,GuHCl}}$<br>[ $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ] | $\epsilon_{280\text{nm,nativ}}$<br>[ $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ] |
|--|---------------------------|--------------------------|--|--|
| <b>20S Proteasom</b><br>$\alpha_7(\beta\text{His}_6)_7(\beta\text{His}_6)_7\alpha_7$ | 0,075                     | 0,055                    | 358400   | 488727   |
| <b>Cyt c</b>   | 0,428                     | 0,355                    | 10810  | 13033  |
| <b>His<sub>6</sub>GFP</b>  | 0,227                     | 0,195                    | 19770  | 23014  |

Die molaren Extinktionskoeffizienten der nativen „Host-Guest“ Komplexe wurden durch Addition der molaren Extinktionskoeffizienten ihrer Bestandteile (unter der Annahme einer 1:1 Stöchiometrie) berechnet. Hieraus konnte anschließend durch Messen der Absorption einer Lösung unbekannter Konzentration des jeweiligen Proteins bei 280 nm die Konzentration unter Verwendung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (siehe Gleichung (3.1)) bestimmt werden.

Zur Konzentrationsbestimmung von Cytochrom c-Lösungen wurde der molare Extinktionskoeffizient von Cytochrom c bei 409 nm, dem charakteristischen Absorptionsmaximum dieses Proteins, bestimmt. Hierzu wurde die Absorption von Licht der Wellenlänge 409 nm verschiedener Lösungen von Cytochrom c bekannter Konzentration vermessen. Die erhaltenen Messwerte sind in Abb. 4.17 gegen die Konzentration von Cytochrom c aufgetragen.

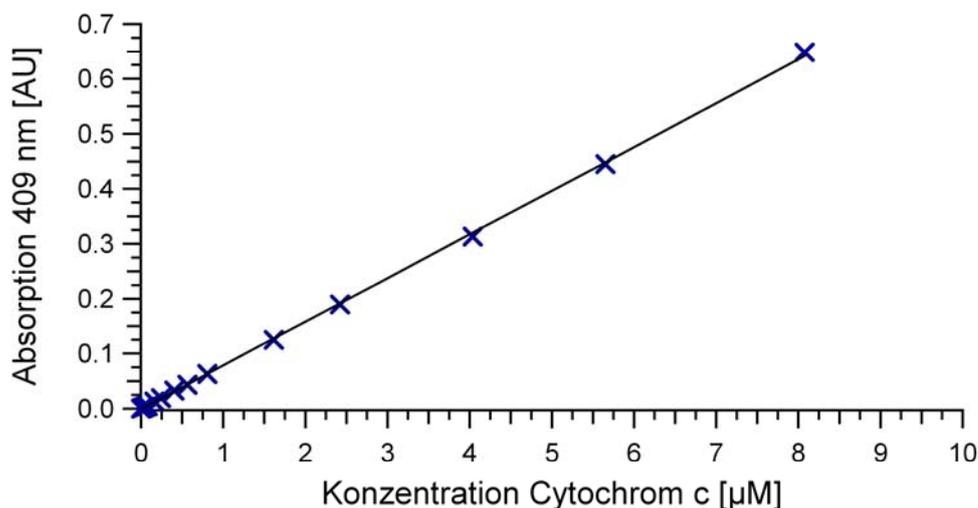


Abb. 4.17: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Cytochrom c bei 409 nm. Die Absorption von Licht der Wellenlänge 409 nm verschiedener Lösungen bekannter Konzentration ist gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Aus der durch lineare Regression gewonnenen Steigung der Kalibrationsgeraden wurde der molare Extinktionskoeffizient berechnet.

Durch lineare Regression lässt sich die Steigung der Kalibrationsgeraden und aus dieser mit Hilfe des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes (Schichtdicke  $d$ : 1 cm) der molare Extinktionskoeffizient von Cytochrom c  $\epsilon_{409\text{nm,native}}$  zu  $79547 \pm 321 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  bestimmen.

## 4.6 Herstellung der „Host-Guest“ Komplexe

Zur Untersuchung der Vorgänge bei der Substrattranslokation in das 20S Proteasom wurden „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms hergestellt, in deren Inneren Modellsubstrate eingeschlossen werden. Dabei wurde die publizierte Methode der Komplexbildung zwischen 20S Proteasomen und Cytochrom c [Huffman, *et al.*, 2003] optimiert und auf die Verwendung von GFP als weiteres Modellsubstrat ausgeweitet.

Das Prinzip der Bildung dieser „Host-Guest“ Komplexe ist in Abb. 4.18 dargestellt. Der jeweilige „Guest“, Cytochrom c oder GFP, wird unter milden Bedingungen, die die Funktion des 20S Proteasoms nicht beeinträchtigen, entfaltet und anschließend mit dem „Host“, 20S Proteasomen, die irreversibel mit *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton inhibiert wurden bzw. deren aktives Zentrum gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, inkubiert. Das Verhältnis von „Host“ zur „Guest“ beträgt hierbei 100:1 um zu gewährleisten, dass

die 20S Proteasomen mit Substrat gesättigt sind. Anschließend werden die Substratproteine zurückgefaltet, woraufhin der Anteil an Substrat, der sich zu diesem Zeitpunkt innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen befindet, am Austritt aus denselben gehindert wird, da nur entfaltete Proteine in der Lage sind die 1,3 nm schmale Öffnung in der  $\alpha$ -Ringe zu passieren. Die Ergebnisse der Vorversuche zur Ent- und Rückfaltung von Cytochrom c und GFP sind in Kapitel (siehe Kapitel 4.4) beschrieben.

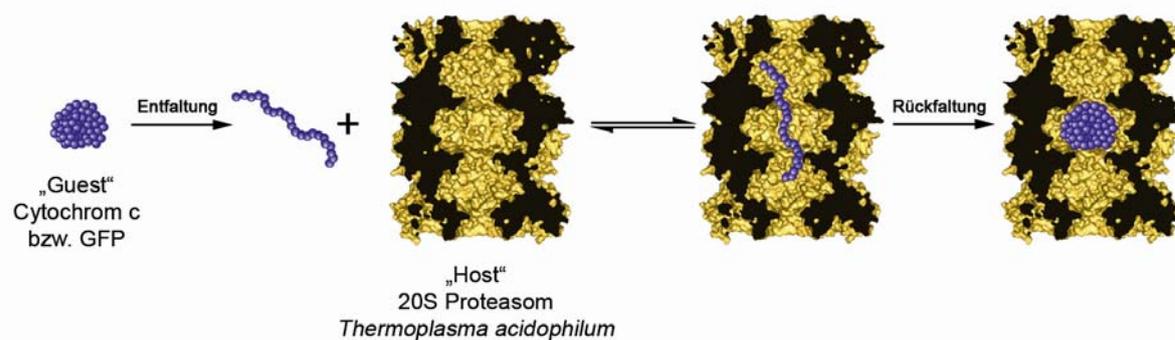


Abb. 4.18: Prinzip der Herstellung von "Host-Guest" Komplexen. Das jeweilige Substrat wird zunächst unter milden Bedingungen entfaltet und anschließend mit inhibierten 20S Proteasomen inkubiert, wobei das Substrat in 100fachem Überschuss vorliegt. Durch Rückfaltung des Substrats entstehen „Host-Guest“ Komplexe, da Substrat, das sich innerhalb des 20S Proteasoms zurückfaltet, nicht mehr in der Lage ist die inneren Kammern des 20S Proteasoms zu verlassen.

Überschüssiges Substrat wird daraufhin mittels Gelfiltration über eine *Hi/Load 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule abgetrennt. Durch Messung der Absorption des Eluats bei 280 nm, 409 nm (Cytochrom c) und 395 nm (GFP) können die Fraktionen, die Cytochrom c, GFP und 20S Proteasomen bzw. deren „Host-Guest“ Komplexe mit den jeweiligen Modellsubstraten enthalten, identifiziert werden.

#### 4.6.1 „Host-Guest“ Komplexe des inhibierten 20S Proteasoms

Die Bildung von „Host-Guest“ Komplexen der irreversibel mit *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton inhibierten 20S Proteasomen wurde sowohl mit Cytochrom c als auch mit GFP als „Guest“ durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse der Vorversuche zur Ent- und Rückfaltung von Cytochrom c und GFP (siehe Kapitel 4.4) zugrunde gelegt, um geeignete Bedingungen für die Bildung der Komplexe zu gewährleisten. Die jeweiligen Chromatogramme zur Isolierung derselben sind in Abb. 4.19 und Abb. 4.20 dargestellt.

Sowohl mit Cytochrom c als auch mit GFP als Substrat wird während der Elution der 20S Proteasomen bei ca. 53 ml, zusätzlich zur Absorption bei 280 nm, Licht der Wellenlängen 409 nm (Cytochrom c) bzw. 395 nm (GFP), den charakteristischen Absorptionsmaxima der beiden Proteine, absorbiert.

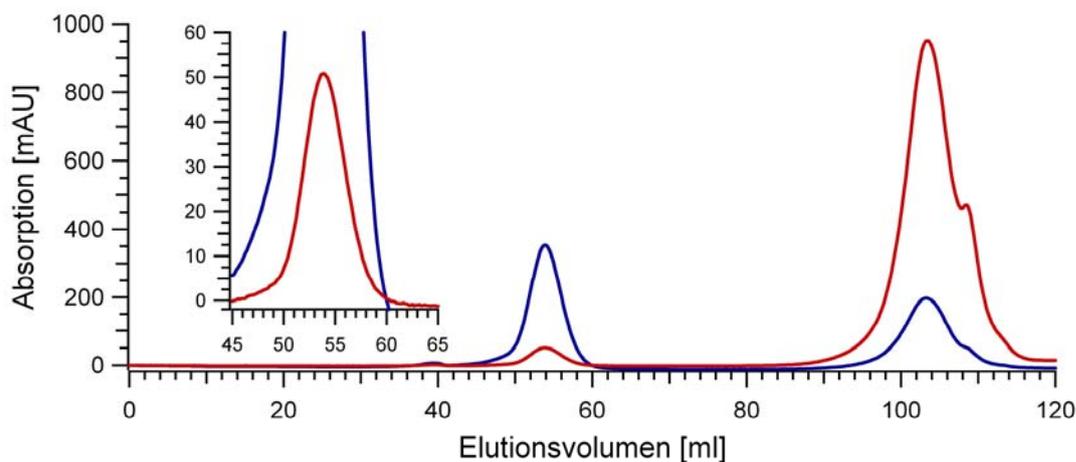


Abb. 4.19: Chromatogramm der Gelfiltration zur Isolierung der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (— Absorption bei 280 nm; — Absorption bei 409 nm). Während der Elution der 20S Proteasomen nach ca. 53 ml tritt Absorption bei 280 und 409 nm auf (siehe vergrößerter Bereich). Überschüssiges Cytochrom c wird nach ca. 104 ml eluiert.

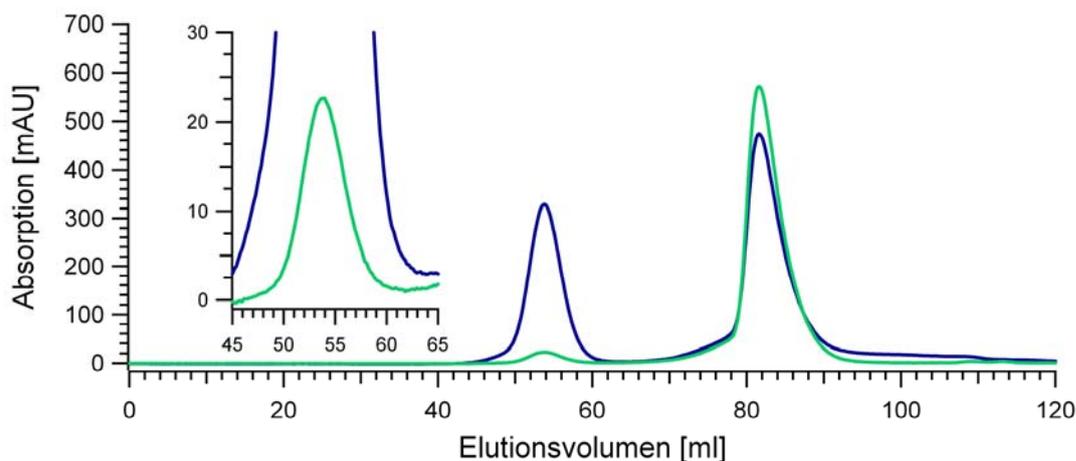


Abb. 4.20: Chromatogramm der Gelfiltration zur Isolierung der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP (— Absorption bei 280 nm; — Absorption bei 395 nm). Die Elution der 20S Proteasomen erfolgt bei ca. 53 ml, wobei Licht der Wellenlängen 280 und 395 nm absorbiert wird (siehe vergrößerter Bereich). Freies GFP verlässt die Säule nach ca. 82 ml.

Die Chromatogramme der jeweiligen Kontrollen, bei denen der Komplexbildungsansatz nicht auf 60 °C erwärmt wurde und somit keine vorherige Entfaltung der Substratproteine erfolgte sind in Abb. 4.21 dargestellt.

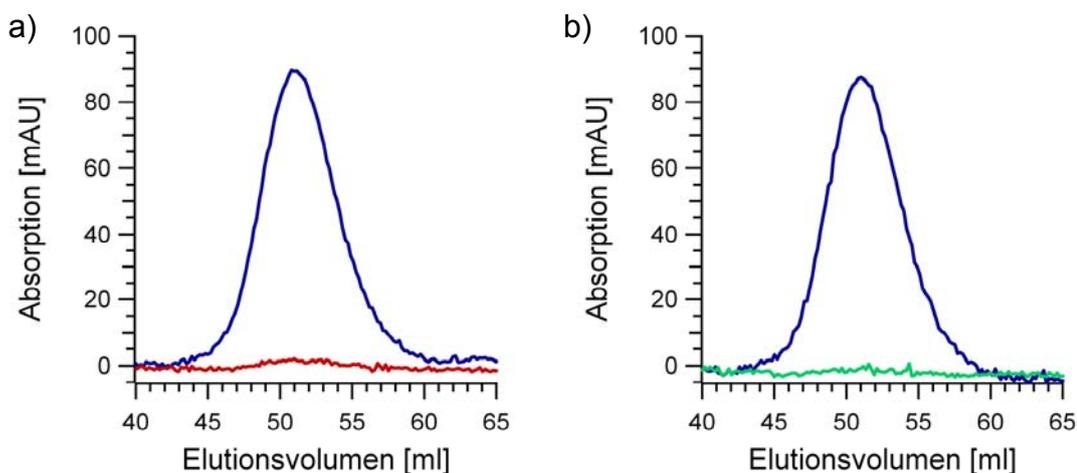


Abb. 4.21: Chromatogramme der beiden Gelfiltrationsläufe zur Isolierung der Kontrollen ohne Erwärmung auf 60 °C und somit ohne Entfaltung von a) Cytochrom *c* und b) GFP (— Absorption bei 280 nm; — Absorption bei 409 nm; — Absorption bei 395 nm). Gezeigt ist der Ausschnitt mit Elutionsvolumen von 40 bis 65 ml, währenddessen die 20S Proteasomen eluiert werden. Zusätzlich zum Peak der Absorption bei 280 nm ist keine Absorption bei 409 bzw. 395 nm zu verzeichnen.

Während der Elution der 20S Proteasomen nach ca. 52 ml tritt Absorption bei 280 nm, nicht jedoch bei den charakteristischen Absorptionsmaxima von Cytochrom *c* (409 nm) und GFP (395 nm) auf. Eine unspezifische Bindung der Substrate an der Oberfläche der 20S Proteasomen bei der Bildung der „Host-Guest“ Komplexe kann somit ausgeschlossen werden. Die Bildung von „Host-Guest“ Komplexen verlief sowohl mit Cytochrom *c* als auch mit GFP als Substrat erfolgreich.

#### 4.6.2 „Host-Guest“ Komplexe der $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms

Um einen möglichen Einfluss des kovalent gebundenen Inhibitors *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton auf die Bildung der „Host-Guest“ Komplexe und deren weitere Analyse zu untersuchen, wurde die  $\Delta T1A\beta$ -Mutante zur Bildung von „Host-Guest“ Komplexen herangezogen. Bei dieser Mutante wurde das katalytisch aktive Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheit durch Alanin ersetzt. Zudem wurde die Sequenz, die für das Propeptid kodiert, deletiert. Abb. 4.22 a zeigt den Ausschnitt des Chromatogramms der Gelfiltration zur Isolierung der „Host-Guest“ Komplexe, währenddessen die 20S Proteasomen eluiert werden. Bei ca. 50 ml tritt ein maximaler Peak der Absorption von Licht der Wellenlänge 280 nm auf (Peak II). Eine signifikante Absorption bei 409 nm, dem Absorptionsmaximum von Cytochrom *c*, und somit eine Ausbildung von „Host-Guest“ Komplexen, ist jedoch nicht zu erkennen. Der Peak der Absorption bei 280 nm nach ca. 50 ml Elutionsvolumen (Peak II) wird flankiert von zwei weiteren Peaks deutlich geringerer Intensität, bei ca. 41 (Peak I) und 64 ml (Peak III). Während Peak I und II auch im Elutionsprofil der frisch aufgereinigten  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms (siehe Abb. 4.22 b) zu erkennen ist, scheint Peak III in Abhängigkeit

der Reaktionsbedingungen während der Bildung der „Host-Guest“ Komplexe aufzutreten.

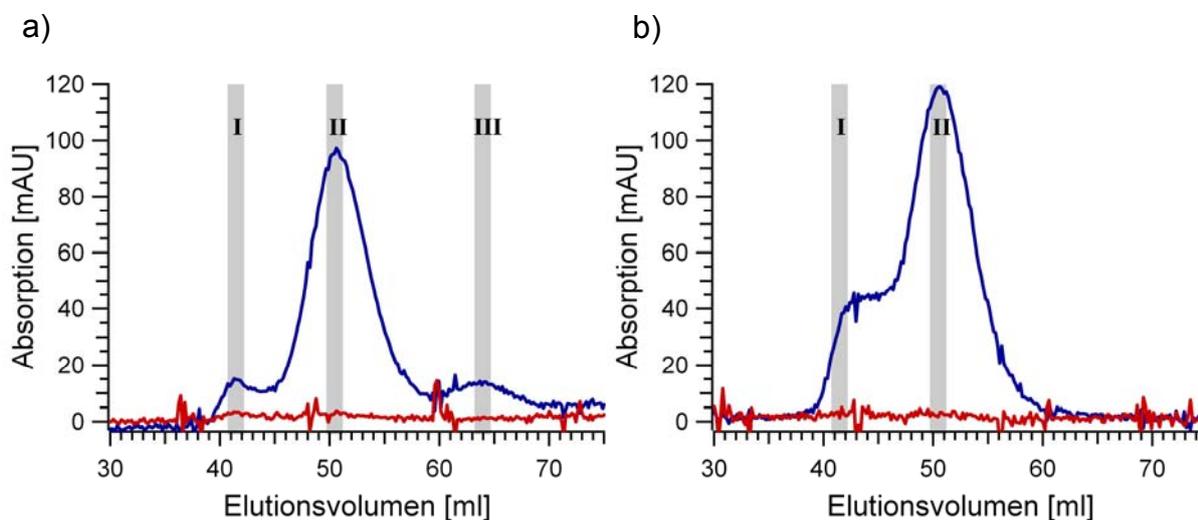


Abb. 4.22: Ausschnitt aus den Chromatogrammen a) zur versuchten Isolierung der „Host-Guest“ Komplexe der inaktiven  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und b) der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms in Puffer (— Absorption bei 280 nm; — Absorption bei 409 nm). Während in b) lediglich zwei Peaks der Absorption bei 280 nm erkennen sind, tritt in a) ein zusätzlicher Peak bei höherem Elutionsvolumen auf. Eine signifikante Absorption bei 409 nm ist nicht zu verzeichnen. Die grau unterlegten Flächen kennzeichnen die Fraktionen, die elektronenmikroskopisch untersucht wurden (siehe Abb. 4.23).

Die entsprechenden Fraktionen (in Abb. 4.22 grau unterlegt) wurden von Frau Oana Mihalache elektronenmikroskopisch abgebildet (siehe Abb. 4.23). Peak I, der in beiden Fällen bei einem Elutionsvolumen von ca. 41 ml auftritt, beinhaltet sowohl bei der frisch aufgereinigten  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms, als auch nach versuchter Bildung von „Host-Guest“ Komplexen dieser Mutante mit Cytochrom c Aggregate, sowie 20S Proteasomen, die in einigen Fällen zweidimensionale Kristalle ausbilden. Die elektronenmikroskopische Abbildung von Peak II zeigt in beiden Fällen voll assemblierte 20S Proteasomen in Seitenansicht und Aufsicht, wobei die Anzahl der Partikel in Seitenansicht jedoch deutlich überwiegt. Bei Peak III, der lediglich nach der versuchten „Host-Guest“ Komplexbildung der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom c, nicht aber beim frisch aufgereinigten  $\Delta T1A\beta$ -20S Proteasom beobachtet wird, können in der elektronenmikroskopischen Abbildung einige voll assemblierte 20S Proteasomen identifiziert werden. Den Großteil dieser Fraktion bilden jedoch verschiedene andere Partikel kleinerer Dimensionen, die möglicherweise aus Bruchstücken der 20S Proteasomen bestehen.

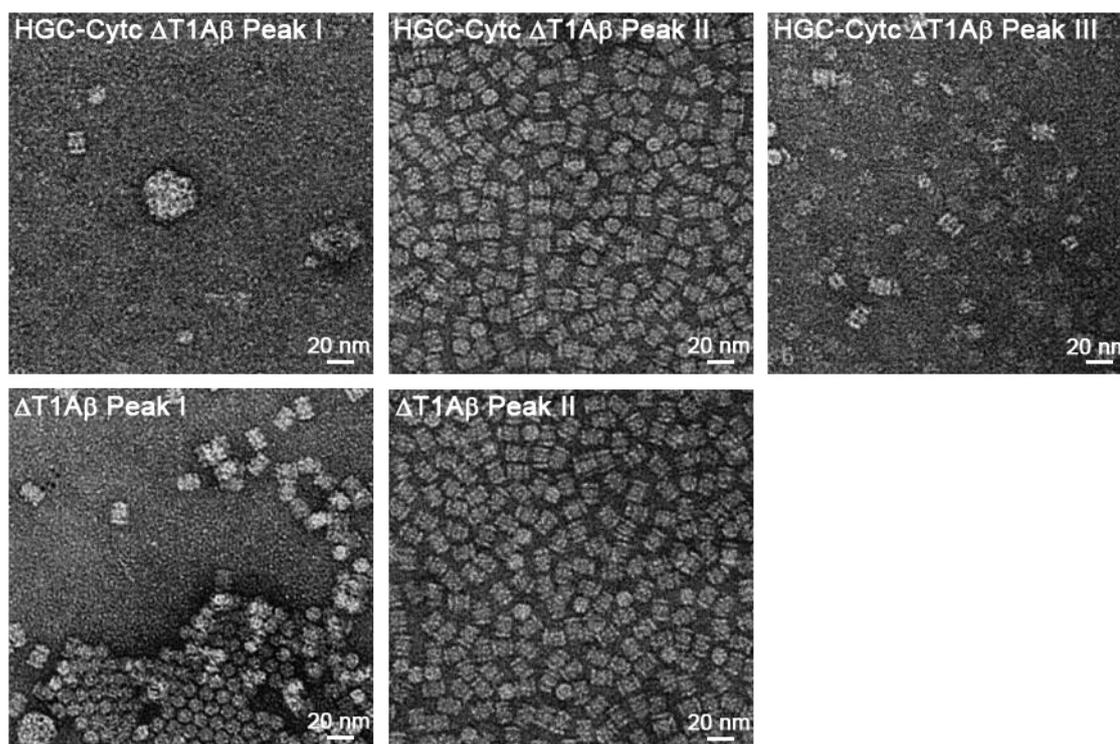


Abb. 4.23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der negativ kontrastierten Fraktionen aus den Gelfiltrationsläufen nach versuchter Bildung von „Host-Guest“ Komplexen der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom *c* und des frisch aufgereinigten  $\Delta T1A\beta$ -20S Proteasoms (siehe Abb. 4.22). Die Proben wurden von Frau Oana Mihalache präpariert und abgebildet. Peak I enthält in beiden Fällen Aggregate, sowie 20S Proteasomen, die teilweise zweidimensionale Kristalle bilden. Peak II besteht ausschließlich aus voll assemblierten 20S Proteasomen und Peak III enthält eine Mischung aus 20S Proteasomen, sowie kleinere Partikel.

Der Versuch zur Bildung von „Host-Guest“ Komplexen der inaktiven  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom *c* schlug fehl. Die elektronenmikroskopische Untersuchung legt nahe, dass dies auf die Instabilität der verwendeten Mutante zurückzuführen ist, die unter den gewählten Bedingungen zerfällt. Von einer weiteren Analyse dieses Sachverhalts wurde im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

#### 4.7 PAGE-Analyse der „Host-Guest“ Komplexe

Die Chromatogramme der Gelfiltrationen im Anschluss an die Bildung der „Host-Guest“ Komplexe des inhibierten 20S Proteasoms mit Cytochrom *c* bzw. GFP (siehe Kapitel 4.6) machen deutlich, dass der jeweilige „Guest“ zusammen mit dem 20S Proteasom von der Säule eluiert wird. Um die gebildeten Komplexe biochemisch nachzuweisen wurden diese einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (denaturierend, nativ und blau nativ) mit anschließender immunologischer Identifikation von Cytochrom *c* bzw. GFP mittels spezifischer monoklonaler Antikörper unterzogen.

In Abb. 4.24 sind die Coomassie gefärbten Gele, sowie die zugehörigen Western Blots abgebildet. Diese wurden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern aus Maus gegen Cytochrom c bzw. GFP und anschließend mit polyklonalen Antikörpern aus Ziege gegen Maus Immunoglobulin, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Beim Coomassie-gefärbten SDS-Gel ist im Falle der 20S Proteasomen, sowie der „Host-Guest“ Komplexe und der Kontrollen mit Cytochrom c bzw. GFP eine Bande bei ca. 25 kDa zu erkennen, die auf die beiden Untereinheiten der 20S Proteasomen ( $\alpha$ : 25,8 kDa und  $\beta$ His<sub>6</sub>: 23,1 kDa) zurückzuführen ist. Cytochrom c bildet eine Bande bei ca. 12 kDa und GFP ist als Bande bei ca. 28 kDa zu erkennen. Diese beiden Banden sind bei den „Host-Guest“ Komplexen nicht auszumachen. Die Western Blots mit anschließender immunologischer Identifikation des Cytochrom c bzw. GFP zeigen jedoch deutlich, dass das jeweilige Modellsubstrat in den Komplexen detektiert werden kann, während 20S Proteasomen und die jeweiligen Kontrollen den spezifischen Antikörper nicht binden und somit keine Schwarzfärbung des Fotofilms auftritt.

Ähnlich verhält es sich bei den Nativ-Gelen, die in Abb. 4.24 b) dargestellt sind. Auch hier ist im Coomassie gefärbten Gel bei den „Host-Guest“ Komplexen keine Bande zu erkennen, die auf die beiden Modellsubstrate zurückgeführt werden kann. 20S Proteasomen sowie Komplexe und Kontrollen weisen lediglich eine Bande bei ca. 700 kDa auf und GFP erscheint unterhalb der Markerbande mit 67 kDa. Cytochrom c ist im Gel nicht zu erkennen, da es einen isoelektrischen Punkt von pH 10,4 besitzt [Barlow und Margoliash, 1966] und aufgrund seiner positiven Nettoladung unter den Bedingungen des nativen Gels (pH 8,3) zur Kathode und nicht durch das Gel zur Anode wandert. Aus diesem Grund tritt auch im Western Blot, der mit dem spezifischen Antikörper gegen Cytochrom c behandelt wurde, keine Bande in der Spur mit Cytochrom c auf. Es ist jedoch eine deutliche Schwarzfärbung der Bande, bestehend aus den „Host-Guest“ Komplexen des 20S Proteasoms mit Cytochrom c, zu erkennen, während alle anderen Proben diesen Antikörper nicht binden. Bei den Western Blots, die mit dem Antikörper gegen GFP behandelt wurden, färbt sich der Fotofilm sowohl an der Stelle der Bande des GFP, als auch an derjenigen der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP, schwarz.

Da eine native Gelelektrophorese bei pH 8,3 aus den oben genannten Gründen nicht geeignet ist um Cytochrom c im Gel nachzuweisen, wurde die Methode der blauen nativ-PAGE angewandt (siehe Abb. 4.24 c). Im Coomassie gefärbten blau nativ-Gel und in den beiden Western Blots, die mit Antikörpern gegen Cytochrom c bzw. GFP behandelt wurden sind die beiden Modellsubstrate Cytochrom c und GFP deutlich zu erkennen. Die Banden des 20S Proteasoms, der „Host-Guest“ Komplexe und der zugehörigen Kontrollen sind im Coomassie gefärbten Gel jedoch nur schwach zu sehen, obwohl hier im Vergleich zu den anderen Gelen die zweifache Menge Protein auf das Gel geladen wurde. Bei den Western Blots ist keine Schwarzfärbung des Fotofilms an den Stellen der Banden der „Host-Guest“ Komplexe zu erkennen.

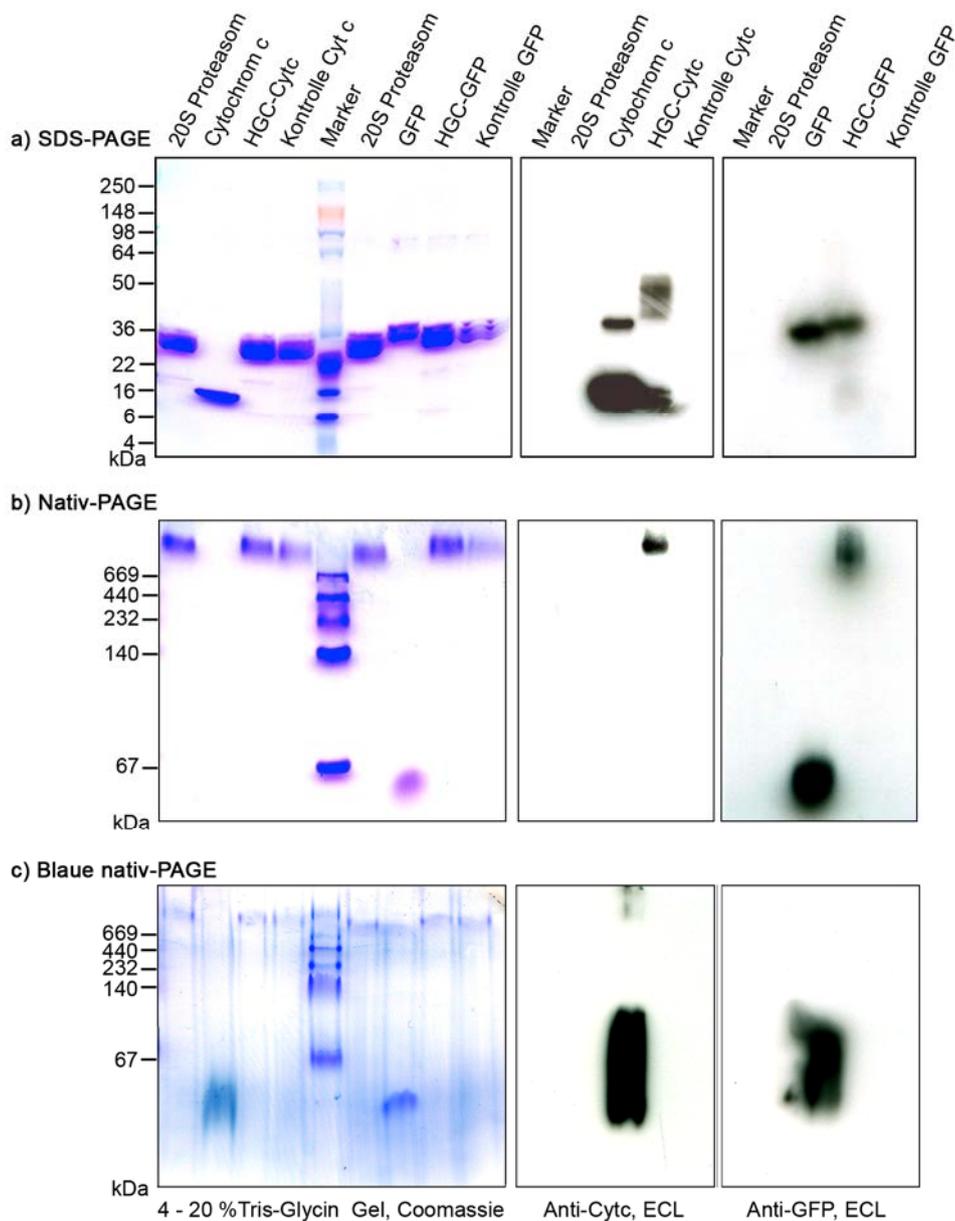


Abb. 4.24: 4-20 % Tris-Glycin Gele und Western Blots mit anschließender immunologischer Identifikation der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c bzw. GFP. a) SDS-PAGE; b) Nativ-PAGE und c) blaue nativ-PAGE. Zusätzlich wurden Cytochrom c bzw. GFP und 20S Proteasomen sowie die Kontrollen der Komplexbildung ohne vorherige Entfaltung der Substrate aufgetragen (Marker SDS-PAGE: SeeBlue® Plus2 Pre-Stained, Invitrogen; Marker Nativ und blaue nativ-PAGE: High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis, GE Healthcare). Die immunologische Identifikation von Cytochrom c bzw. GFP erfolgte durch Behandlung der Western Blots mit monoklonalen Antikörpern aus Maus gegen das jeweilige Protein, gefolgt von einer Inkubation der Blots in, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, Antikörpern aus Ziege gegen Maus IgG und Detektion der Banden mittels Chemilumineszenz. Für die Coomassie-Färbung des SDS und nativ-Gels wurden je Bande 5 mg, beim blau nativen Gel 10 mg 20S Proteasom bzw. Komplex und Kontrolle und 5 mg GFP bzw. Cytochrom c aufgetragen. Für die Western Blots wurden je 25 mg der Komplexe, der Kontrollen und der 20S Proteasomen und 1 mg GFP bzw. Cytochrom c verwendet.

Insgesamt wird aus der PAGE-Analyse deutlich, dass die „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c bzw. GFP den jeweiligen „Guest“ enthalten, während dies bei den zugehörigen Kontrollen nicht der Fall ist. Die erfolgreiche Bildung von „Host-Guest“ Komplexen konnte daher biochemisch bewiesen werden.

#### 4.8 Spektroskopische Analyse der „Host-Guest“ Komplexe

Die spektroskopischen Eigenschaften der beiden Modellsubstrate Cytochrom c und GFP wurden bereits zur Identifikation der „Host-Guest“ Komplexe im Eluat der Gelfiltrationen im Anschluss an die Bildung derselben ausgenutzt (siehe Kapitel 4.6). Zusätzlich ermöglichen sie durch Vergleich mit den Ergebnissen der Ent- und Rückfaltungsexperimente (siehe Kapitel 3.7) einen Hinweis auf den Faltungszustand des jeweiligen Modellsubstrats innerhalb der Komplexe. Hierzu wurden das Absorptionsspektrum der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (siehe Abb. 4.25) und die Extinktions- und Emissionsspektren der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP (siehe Abb. 4.26) aufgenommen.

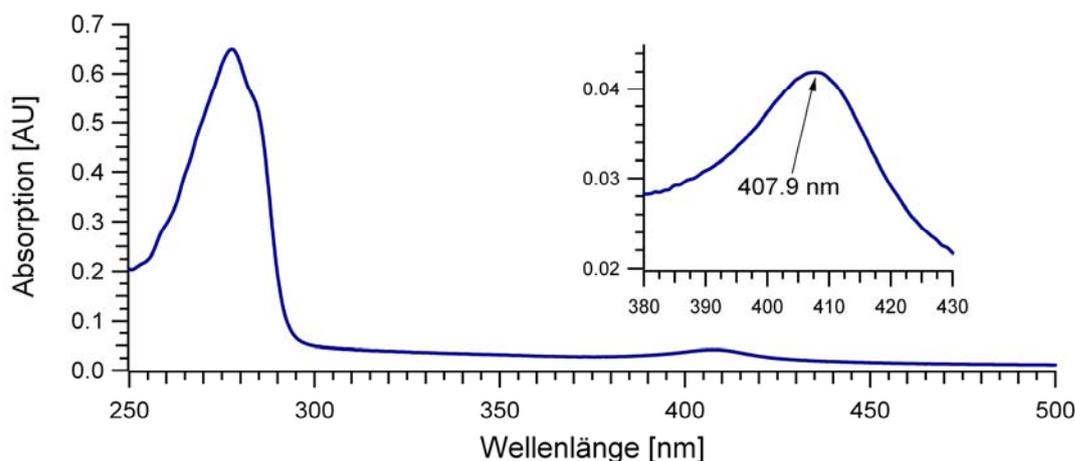


Abb. 4.25: Absorptionsspektrum der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c. Zusätzlich zur maximalen Absorption der Probe bei 280 nm tritt ein lokales Maximum bei 407,9 nm auf (siehe vergrößerter Bereich).

Das Absorptionsspektrum der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom weist ein Maximum bei 280 nm auf, das auf die in den Proteinen enthaltenen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin zurückzuführen ist. Zusätzlich tritt ein weiteres lokales Maximum der Absorption bei der Wellenlänge 407,9 nm auf, das auf die Anwesenheit von Cytochrom c schließen lässt. Durch Vergleich der Lage dieses Maximums mit den Werten, die aus den Ent- und Rückfaltungsexperimenten mit Cytochrom c gewonnen wurden (siehe Kapitel 3.7.1), kann auf eine Rückfaltung des Cytochrom c geschlossen werden.

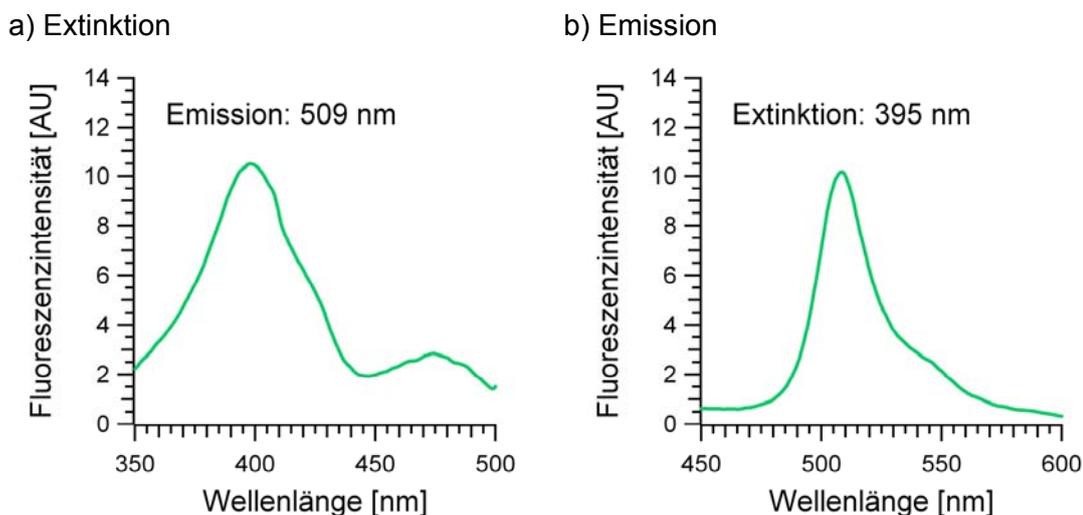


Abb. 4.26: a) Extinktionsspektrum und b) Emissionsspektrum der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP. Maximale Emission von Licht der Wellenlänge 509 nm tritt nach Anregung bei 398,0 nm auf. Daneben existiert ein weiteres lokales Maximum der Extinktion bei 474,0 nm. Nach Anregung bei 395 nm folgt Emission von Licht mit Maximum bei der Wellenlänge 508,5 nm.

Das Extinktionsspektrum der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP (siehe Abb. 4.26 a) macht deutlich, dass die Emission von Licht der Wellenlänge 509 nm nach Anregung bei 398,0 nm einen maximalen Wert erreicht. Ein weiteres lokales Maximum geringerer Intensität tritt nach Anregung bei 474,0 nm auf. Nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 395 nm weist das Emissionsspektrum, das in Abb. 4.26 b dargestellt ist, ein Maximum bei 508,5 nm auf. Bei ca. 540 nm ist eine Schulter zu erkennen. Die genannten Werte entsprechen denjenigen der verwendeten Cycle 3 Mutante des GFP in seiner nativen Form [Patterson, *et al.*, 1997] und deuten somit auf eine Rückfaltung von GFP innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe hin.

Die spektroskopischen Analysen der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c bzw. GFP lassen darauf schließen, dass die jeweiligen Substrate innerhalb der 20S Proteasomen im gefalteten Zustand vorliegen.

## 4.9 Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse

Die „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP sowie verschiedene Kontrollen (siehe Tab. 4.2) wurden im Rahmen dieser Arbeit elektronenmikroskopisch untersucht, um die Bildung der Komplexe zu verifizieren und die Lokalisation der Substrate innerhalb der 20S Proteasomen zu analysieren.

Die Ergebnisse der Einzelpartikelanalyse der negativ kontrastierten Proben sind in Kapitel 4.9.1, diejenigen der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben in Kapitel 4.9.2 beschrieben.

*Tab. 4.2: Proben für die elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalyse. Alle aufgeführten Proben wurden mit negativer Kontrastierung untersucht. Die mit \* gekennzeichneten Proben wurden zusätzlich in vitrifiziertem Eis eingebettet.*

| <b>Bezeichnung</b>  | <b>Probe</b>   |
|---------------------|--|
| HGC-Cytc *          | „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (siehe Kapitel 3.8.1) |
| HGC-GFP *           | „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP (siehe Kapitel 3.8.2)         |
| Kontrolle Cytc *    | Kontrolle mit Cytochrom c aber ohne Erhitzen auf 60 °C (siehe Kapitel 3.8.3)   |
| Kontrolle GFP *     | Kontrolle mit GFP aber ohne Erhitzen auf 60 °C (siehe Kapitel 3.8.3)           |
| Kontrolle Proteasom | Kontrolle ohne Substrat aber mit Erhitzen auf 60 °C (siehe Kapitel 3.8.3)      |
| Mix HGC-GFP 50 %    | Gemisch bestehend aus 50 % HGC-GFP und 50 % Kontrolle GFP                      |
| Mix HGC-GFP 80 %    | Gemisch bestehend aus 80 % HGC-GFP und 20 % Kontrolle GFP                      |

### 4.9.1 Negativ kontrastierte Proben

Für die Einzelpartikelanalyse mit negativer Kontrastierung wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei der ersten Nullstelle der Kontrast-Transfer Funktion (ca. 2 nm) tiefpassgefiltert. Aus den gefilterten Aufnahmen wurden die Partikel anschließend automatisch selektiert. Als Referenz diente dabei die zweidimensionale Projektion der dreidimensionalen Elektronendichte mit einer Auflösung von 20 Å in Seitenansicht, die aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag: 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995] berechnet wurde.

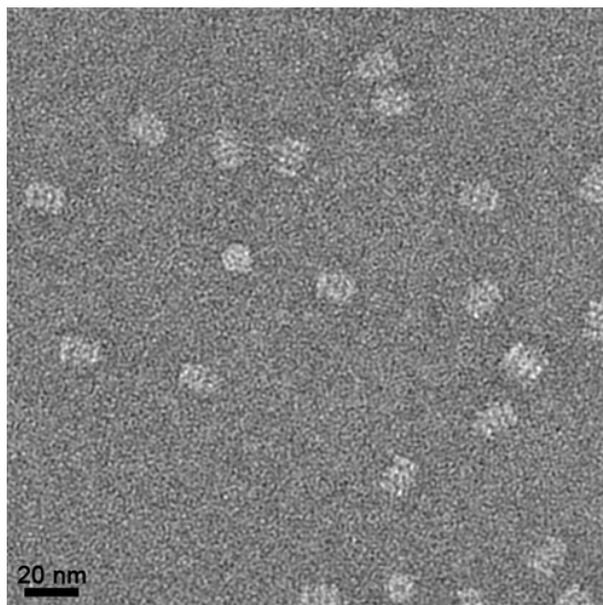


Abb. 4.27: Ausschnitt aus der elektronenmikroskopischen Aufnahme der negativ kontrastierten Kontrolle Proteasom, tiefpassgefiltert bei der ersten Nullstelle der Kontrast-Transfer-Funktion.

In Abb. 4.27 ist eines der Originalbilder der „Kontrolle Proteasom“ dargestellt. Aufgrund der Abwesenheit des Kontrastierungsmittels an der Stelle der Partikel erscheinen diese im Vergleich zum Hintergrund als helle Strukturen.

#### 4.9.1.1 Alignierung der Einzelpartikel

Nach visueller Überprüfung der selektierten Bilder wurden diese in fünf Zyklen in Translation und Rotation zweidimensional aufeinander aligniert. Als erste Referenz diente die oben beschriebene Seitenprojektion der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (siehe Abb. 4.28). Die Mittelung der alignierten Bilder eines Zyklus diente anschließend als Referenz für den nächsten Zyklus. Bei allen Proben ergab sich ein Mittelungsbild das die zylinderförmigen 20S Proteasomen in Seitenansicht zeigt. Der molekulare Aufbau aus vier gestapelten Ringen ist deutlich zu erkennen.

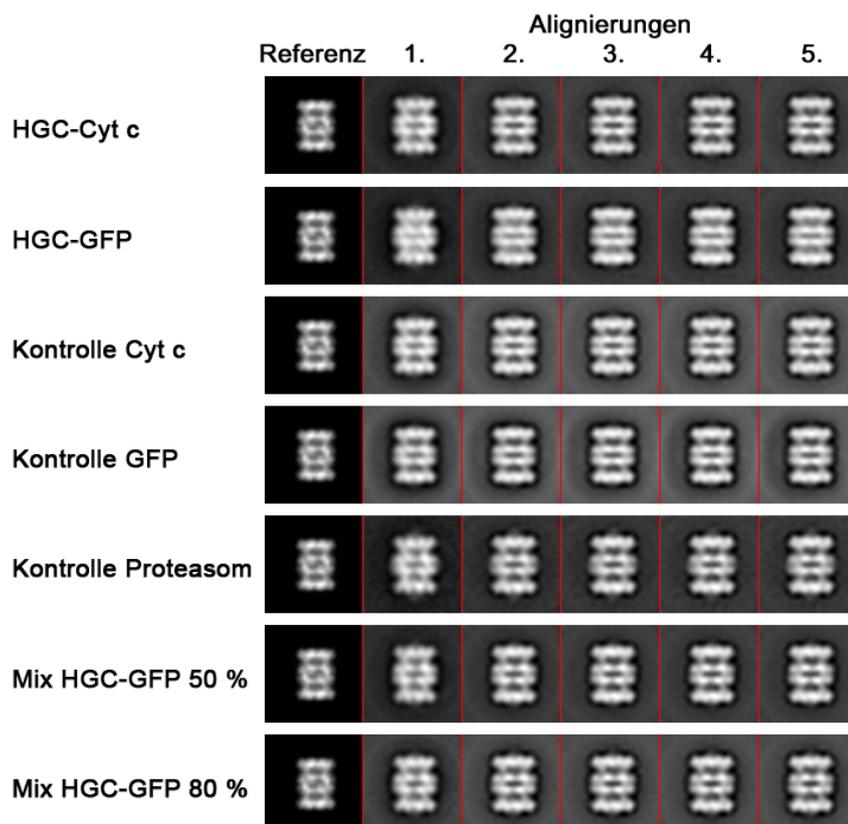


Abb. 4.28: Zweidimensionale Alignierungen in Translation und Rotation der negativ kontrastierten Einzelpartikel mit der aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag 1PMA [Löwe, et al., 1995]) berechneten Projektion der dreidimensionalen Elektronendichte in Seitenansicht als Referenz.

Die erhaltenen Bilderstapel wurden anschließend erneut visuell überprüft, um Partikel mit einer von der Referenz abweichenden Orientierung auszusortieren. In Tab. 4.3 ist die Anzahl der nach diesem Schritt verbleibenden Einzelpartikel je Probe angegeben.

Tab. 4.3: Anzahl der Partikel je Probe für die Einzelpartikelanalyse mit negativer Kontrastierung.

| Probe    | HGC-Cyt c | HGC-GFP | Kontrolle Cyt c | Kontrolle GFP | Kontrolle Proteasom | Mix GFP 50 % | Mix GFP 80 % |
|----------|-----------|---------|-----------------|---------------|---------------------|--------------|--------------|
| Partikel | 4300      | 5373    | 4796            | 5832          | 1540                | 5137         | 2635         |

Jedes einzelne Bild im verbleibenden Stapel aus Bildern der Einzelpartikel wurde mittels Subtraktion des Mittelwertes und anschließende Division durch die Standardabweichung des jeweiligen Bildes normiert.

#### 4.9.1.2 Multivariate statistische Analyse und Klassifizierung

Die alignierten und normierten Bilderstapel wurden anschließend einer multivariaten statistischen Analyse unterzogen [van Heel und Frank, 1981]. Die resultierenden Eigenvektoren sind in Abb. 4.29 dargestellt. Der erste Eigenvektor weist bei allen Proben ein Schachbrettmuster auf und beschreibt eine Rotation der Partikel mit 7-zähliger Symmetrie um deren Zylinderachse. Die vierten Eigenvektoren der beiden gemischten Proben der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP und der zugehörigen Kontrolle beschreiben die An- bzw. Abwesenheit zusätzlicher Masse innerhalb der Kompartimente der 20S Proteasomen. In ähnlicher Form tritt dieser Eigenvektor auch bei den „Host-Guest“ Komplexen mit Cytochrom c (5. Eigenvektor) und GFP (8. Eigenvektor) auf, nicht jedoch bei den Kontrollen.

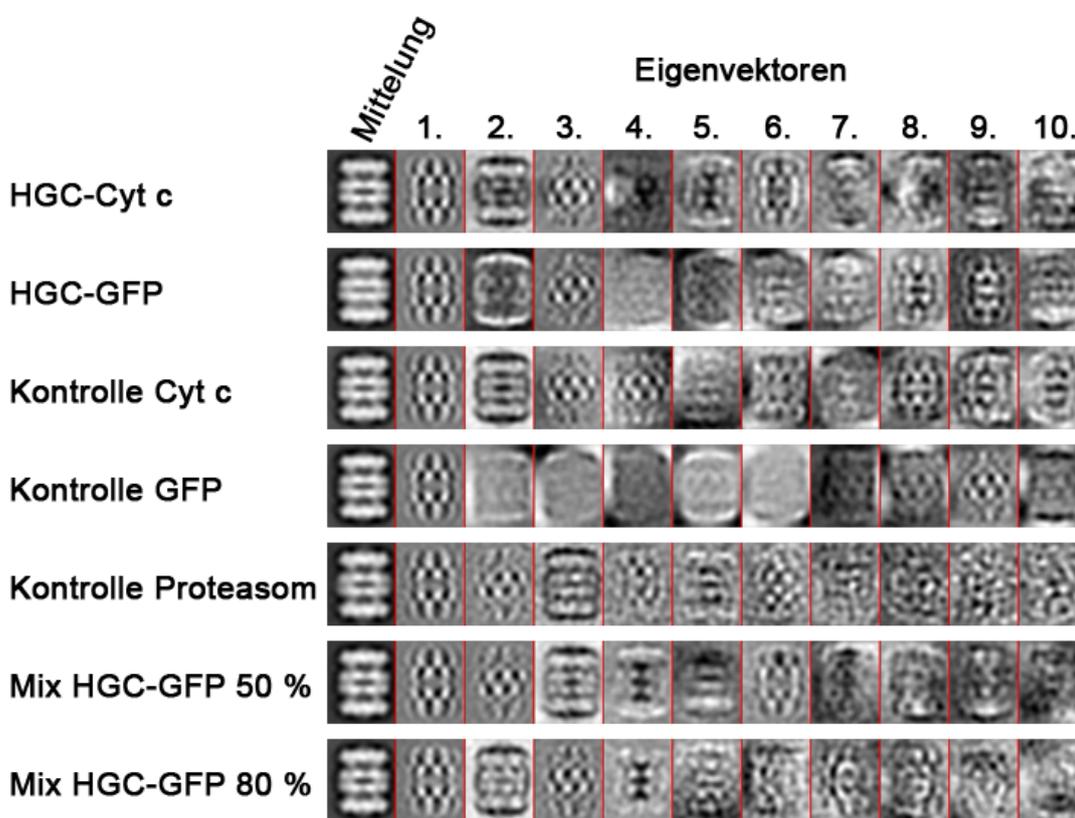


Abb. 4.29: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der negativ kontrastierten Proben. Der erste Eigenvektor resultiert aus der Rotation der Partikel um deren Zylinderachse. Der vierte Eigenvektor der „Mix“-Proben, sowie in ähnlicher Form der 5. Eigenvektor der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c und der 8. Eigenvektor der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP beschreiben die An- bzw. Abwesenheit zusätzlicher Massen innerhalb der Kammern des 20S Proteasoms.

Unter Verwendung des ersten Eigenvektors wurden die Einzelpartikel jeder Probe in zwei Klassen aufgeteilt, die sich in der Rotation der Partikel um deren Zylinderachse unterscheiden. Die beiden Klassen konnten durch 180° Rotation einer Klasse um die

zentrale Achse senkrecht zur Bildebene zur Deckung gebracht werden. Dieses Vorgehen wurde bereits bei den ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen des 20S Proteasoms angewandt [Baumeister, *et al.*, 1988].

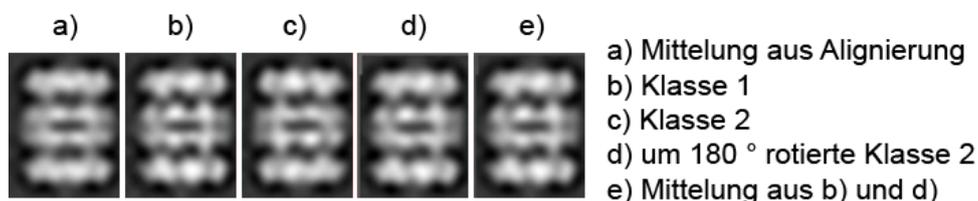


Abb. 4.30: Vorgehen zur Generierung einer kumulativen elektronenmikroskopischen Mittelung mit einheitlicher Orientierung der Partikel in Bezug auf deren Rotation um die zentrale Zylinderachse der 20S Proteasomen am Beispiel der Kontrolle Proteasom (siehe Tab. 4.2).

In Abb. 4.30 sind die ursprüngliche Mittelung der alignierten Bilder, die Mittelungen der beiden Klassen, die um 180° rotierte Mittelung einer der beiden Klassen sowie die kumulative Mittelung der beiden Klassen nach Rotation einer der Klassen am Beispiel der Kontrolle Proteasom (siehe Tab. 4.2) dargestellt. Die kumulativen Mittelungen aller Proben mit einheitlicher Orientierung sind in Abb. 4.31 abgebildet. Die beiden Vorkammern und die zentrale Kammer der 20S Proteasomen an den Kontaktstellen der vier Ringe sind in allen Proben deutlich zu erkennen, wobei der Kontrast zwischen den Kammern und dem umgebenden Proteasom im Falle der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP deutlich geringer ausfällt als bei den übrigen Proben.

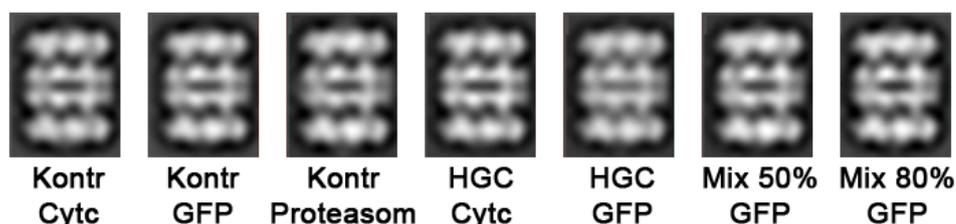


Abb. 4.31: Kumulative Mittelungen der Einzelpartikel mit negativer Kontrastierung in einheitlicher Orientierung.

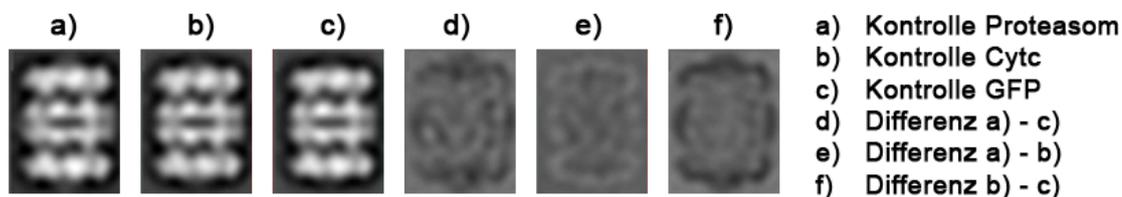
Auf diese Weise erhaltene alignierte Bilderstapel und deren Mittelungen dienen anschließend zur weiteren Analyse der verschiedenen Proben.

#### 4.9.1.3 Differenz der Mittelungen

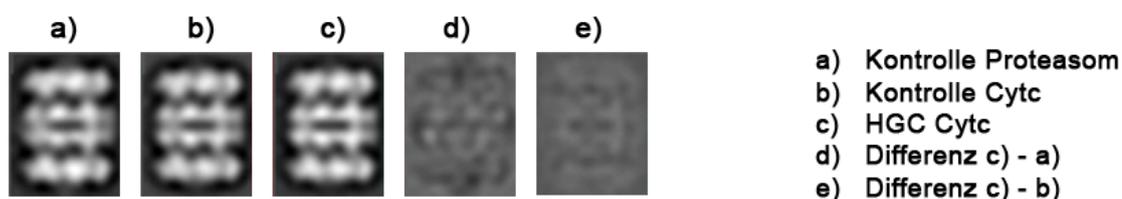
Aus den kumulativen Mittelungsbildern der verschiedenen Proben mit einheitlicher Orientierung der Partikel wurden Differenzbilder berechnet um die Substrate innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms zu lokalisieren. Abb. 4.32 zeigt die Mittelungen und die Differenzbilder der Kontrollen untereinander, der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c bzw. GFP und der jeweiligen Kontrollen sowie diejenigen

der gemischten Proben bestehend aus „Host-Guest“ Komplexen und der zugehörigen Kontrolle mit der Kontrolle GFP. Zur Darstellung aller Mittelungen sowie der durch Subtraktion derselben erhaltenen Differenzbilder wurde jeweils dieselbe Grauskala verwendet.

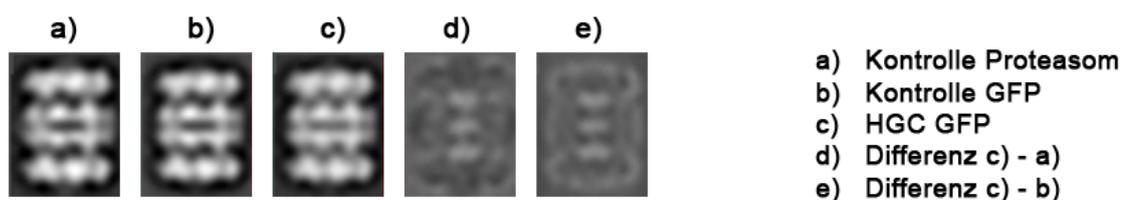
#### Kontrollen



#### „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c



#### „Host-Guest“ Komplexe mit GFP



#### Mix HGC-GFP und Kontrolle

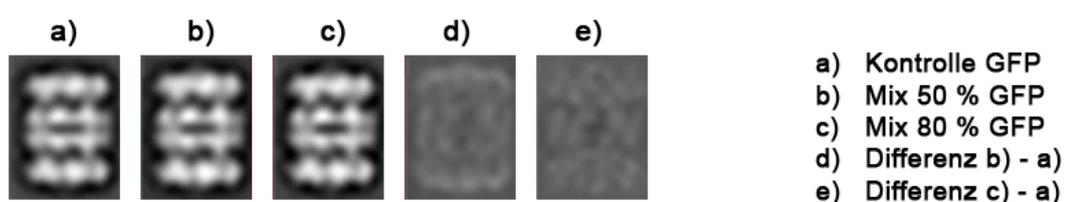


Abb. 4.32: Elektronenmikroskopische Mittelungen und Differenzbilder der verschiedenen Proben mit negativer Kontrastierung. Alle Bilder sind im selben Grauskalabereich dargestellt. Die Differenzbilder zwischen den gemittelten „Host-Guest“ Komplexen mit GFP und den zugehörigen Kontrollen weisen im Bereich der zentralen Kammern der 20S Proteasomen auf die Anwesenheit zusätzlicher Masse hin. Bei allen anderen Proben sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Hieraus wird deutlich, dass die Kontrollen untereinander sich im Bereich der Partikel nicht signifikant unterscheiden. Lediglich die Verteilung des Kontrastierungsmittels Uranylacetat um die Partikel herum weist geringfügige Unterschiede auf. Die Mittelungen der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c weist ebenfalls keinen deutlichen Unterschied zu den zugehörigen Kontrollen auf. Im Gegensatz dazu sind in den Differenzbildern, die durch Subtraktion der Mittelungen der Kontrollen von

denjenigen der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP gewonnen wurden, drei helle Flächen im Bereich der Kammern der 20S Proteasomen zu erkennen. Diese lassen auf die Anwesenheit zusätzlicher Massen, bzw. die Abwesenheit von Kontrastierungsmittel, innerhalb der 20S Proteasomen schließen. Die weitere Analyse der Mittelungen der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP durch multivariate Statistik und Klassifizierung ist in Kapitel 4.9.1.4 beschrieben.

Die Mittelung der „Mix“-Proben, bei denen „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP und die zugehörige Kontrolle GFP in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurden, zeigen keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle GFP. Mittels multivariater statistischer Analyse und Klassifizierung wurden diese Proben weitergehend untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Kapitel 4.9.1.5 erläutert.

Aus den Differenzbildern der Mittelungen lässt sich ableiten, dass sich im Falle der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP zusätzliche Masse innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen befinden. Dies lässt auf eine erfolgreiche Komplexbildung schließen.

#### 4.9.1.4 Analyse der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP

Wie im vorhergehenden Kapitel 4.9.1.3 beschrieben, deuten die Differenzbilder der elektronenmikroskopischen Mittelung der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP und der zugehörigen Kontrollen auf zusätzliche Massen innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen hin. Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation der Substrate innerhalb der 20S Proteasomen wurde eine multivariate statistische Analyse der Bilderstapel der „Host-Guest“ Komplexe durchgeführt. Es wurde lediglich ein rechteckiger Bereich entlang des zentralen Kanals der Partikel betrachtet. Der restliche Bereich wurde durch Verwendung einer Maske ausgeblendet. Die erhaltenen Eigenvektoren sind in Abb. 4.33 dargestellt.



Abb. 4.33: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der negativ kontrastierten „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP unter Verwendung einer Maske.

Unter Verwendung aller zehn Eigenvektoren wurden die Einzelpartikel einer Klassifizierung in zehn Klassen unterzogen. Die Mittelungen der jeweiligen Klassen sind in Abb. 4.34 dargestellt. Die drei inneren Kammern der 20S Proteasomen erscheinen in den verschiedenen Klassen in unterschiedlichen Grauwerten. Bei Klasse 7

scheinen sowohl die zentrale Kammer, als auch die beiden Vorkammern mit Kontrastierungsmittel gefüllt zu sein, während Klasse 5 in allen drei Kammern zusätzlich Massen enthält. In Klasse 2 erscheint die obere Vorkammer deutlich dunkler als die untere, wohingegen bei Klasse 3 das Gegenteil der Fall ist. Zusätzlich treten zwischen den einzelnen Klassen noch weitere Unterschiede auf. So unterscheiden sich zum Beispiel Klasse 1 und 2 in der Helligkeit der  $\alpha$ -Untereinheiten der 20S Proteasomen.

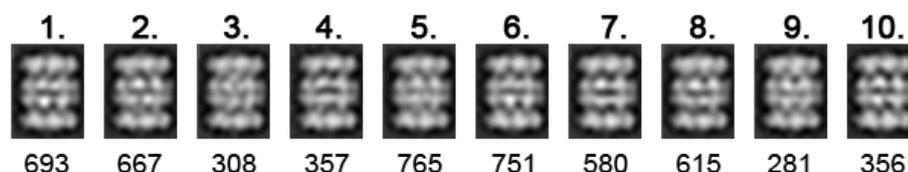


Abb. 4.34: Mittelungen der aus der multivariaten statistischen Analyse mit Maske erhaltenen Klassen der negativ kontrastierten „Host-Guest“ Komplexe mit GFP. Die Anzahl der jeweiligen Partikel pro Mittelung ist unter den Bildern angegeben.

Inwieweit diese Beobachtungen auf eine Inhomogenität der Probe bzw. eine asymmetrische Verteilung der Substrate innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe zurückzuführen ist, oder ob es sich um Effekte aus der Probenpräparation und der elektronenmikroskopischen Aufnahme handelt, kann nicht eindeutig geklärt werden. Die Untersuchung der negativ kontrastierten „Host-Guest“ Komplexe mit GFP weisen auf zusätzliche Massen innerhalb der 20S Proteasomen hin, eine eindeutige Aussage über die Verteilung der Substrate innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen ist jedoch nicht möglich.

#### 4.9.1.5 Analyse der gemischten Proben

Die elektronenmikroskopischen Mittelungen der gemischten Proben, bei denen die „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP und die zugehörige Kontrolle GFP in verschiedenen Verhältnissen vorliegen, wiesen keinerlei signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle GFP auf (siehe Kapitel 4.9.1.3).

Um zu überprüfen, ob der Stapel aus Einzelpartikelbildern in „Host-Guest“ Komplexe und zugehörige Kontrollen aufgetrennt werden kann, wurde eine multivariate statistische Analyse durchgeführt. Dabei wurde die in Kapitel 4.9.1.4 beschriebene Maske verwendet, die die Betrachtung eines rechteckigen Bereichs entlang des zentralen Kanals der Partikel erlaubt. Die erhaltenen Eigenvektoren sind in Abb. 4.35 dargestellt.

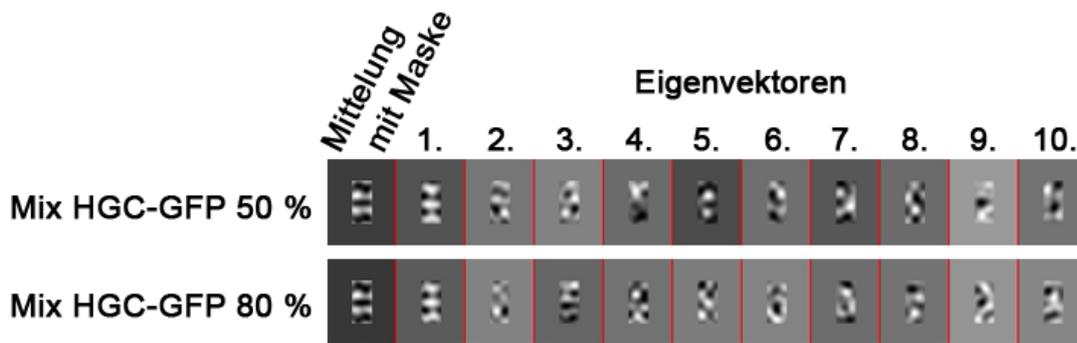


Abb. 4.35: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der negativ kontrastierten gemischten Proben unter Verwendung einer Maske. Der erste Eigenvektor beschreibt vermutlich die An- bzw. Abwesenheit zusätzlicher Masse innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen.

Unter Verwendung des jeweils ersten Eigenvektors, der die An- bzw. Abwesenheit zusätzlicher Massen innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen zu beschreiben scheint, wurden die Bilderstapel in je fünf Klassen separiert. Die Mittelungen der einzelnen Klassen sind in Abb. 4.36 dargestellt.

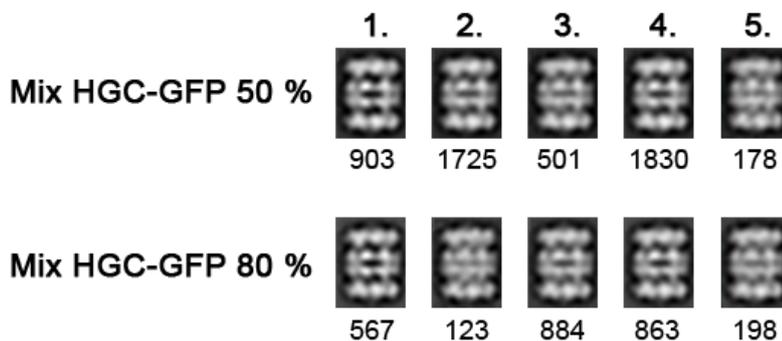


Abb. 4.36: Mittelungen der aus der multivariaten statistischen Analyse mit Maske erhaltenen Klassen der gemischten Proben mit negativer Kontrastierung. Die Anzahl der jeweiligen Partikel pro Mittelung ist unter den Bildern angegeben.

Die einzelnen Klassen der gemischten Proben mit verschiedenen Anteilen an „Host-Guest“ Komplexen mit GFP unterscheiden sich deutlich in den Grauwerten innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen. Eine eingehendere Analyse bzw. Quantifizierung der Ergebnisse aus der Klassifizierung der gemischten Proben erschien vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Analyse der „Host-Guest“ Komplexen mit GFP (siehe Kapitel 4.9.1.4) als nicht sinnvoll, da auch hier unterschiedliche Grauwerte innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen festgestellt werden konnten.

Insgesamt lassen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der negativ kontrastierten Proben auf zusätzliche Massen innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe mit

GFP schliessen. Weitere Aussagen bezüglich der Lokalisation der Substrate waren jedoch aus den oben genannten Gründen nicht möglich.

#### 4.9.2 In vitrifiziertem Eis eingebettete Proben

Zusätzlich zur Analyse der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit negativer Kontrastierung wurden die in Tab. 4.2 beschriebenen Proben mittels Einbettung in vitrifiziertem Eis untersucht. Dies erlaubt die elektronenmikroskopische Abbildung und Analyse der Einzelpartikel in nahezu nativer Umgebung ohne störende Einflüsse des Kontrastierungsmittels und der Trocknung.

Die einzelnen Partikel in Seitenansicht und in Aufsicht wurden manuell aus Abbildungen mit  $-3,5\ \mu\text{m}$  Defokus selektiert und anschließend aus den Aufnahmen mit  $-2,5\ \mu\text{m}$  Defokus, die bei der ersten Nullstelle der Kontrast-Transfer-Funktion (ca.  $2,7\ \text{nm}$ ) tiefpassgefiltert wurden, extrahiert. In Abb. 4.37 ist ein solches Fokuspaar am Beispiel der Kontrolle Cytochrom c dargestellt.

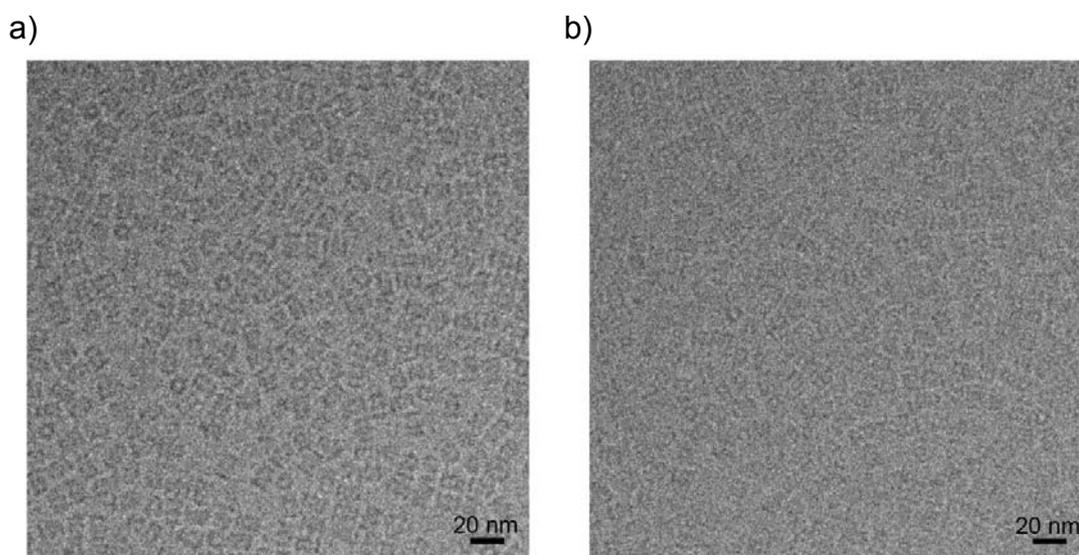


Abb. 4.37: Ausschnitt aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Kontrolle Cytochrom c. a) Defokus  $-3,5\ \mu\text{m}$ ; b) Defokus  $-2,5\ \mu\text{m}$ .

Im Gegensatz zur elektronenmikroskopischen Aufnahme mit negativer Kontrastierung (Vgl. Abb. 4.27) resultiert hier der Kontrast direkt aus der höheren Dichte der Partikel, wodurch Proteine als dunkle Strukturen vor dem hellen Hintergrund des vitrifizierten Eises erscheinen.

4.9.2.1 *Alignierung der Einzelpartikel*

Die selektierten Partikel wurden anschließend einer Multi-Referenz-Alignierung in Translation und Rotation in fünf Zyklen unterzogen (siehe Abb. 4.38). Als erste Referenz diente die dreidimensionale Elektronendichte mit einer Auflösung von 20 Å, die aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag: 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995] berechnet und in Auf- und Seitenansicht projiziert wurde. Die Mittelung der alignierten Bilder eines Zyklus dient im darauf folgenden Zyklus als Referenz.

Bei allen Proben ist in der Seitenansicht der Aufbau der 20S Proteasomen aus vier gestapelten Ringen deutlich zu erkennen. An den Kontaktstellen der vier Ringe sind die zentrale Kammer und die beiden Vorkammern zu sehen. Die Mittelung der Partikel, die auf die Projektion der Elektronendichte aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms in Aufsicht aligniert wurden, lässt lediglich bei der Kontrolle Cytochrom c eindeutig auf die siebenfache Symmetrie der Partikel schließen. Bei den übrigen Proben ist dies nicht ohne weiteres der Fall, was vermutlich an dem hohen Anteil an Partikeln in Seitenansicht liegt, die auf diese Referenz aligniert wurden.

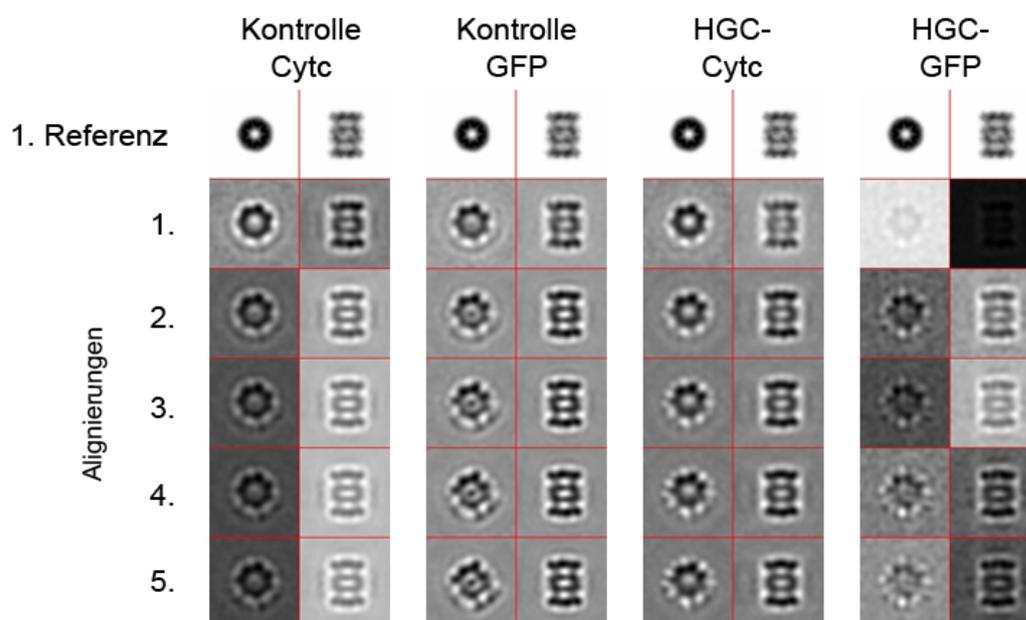


Abb. 4.38: Zweidimensionale Multi-Referenz-Alignierungen in Translation und Rotation der in Eis eingebetteten Einzelpartikel mit den Projektionen der aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* berechneten dreidimensionalen Elektronendichte in Auf- und Seitenansicht als Referenz.

Für die folgende Analyse wurden lediglich die Bilder mit Partikeln in Seitenansicht verwendet, da bei ihnen die drei inneren Kammern der 20S Proteasomen separat sichtbar sind und sich diese Ansicht somit zur Untersuchung der Lokalisation der Substratmoleküle innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe eignet.

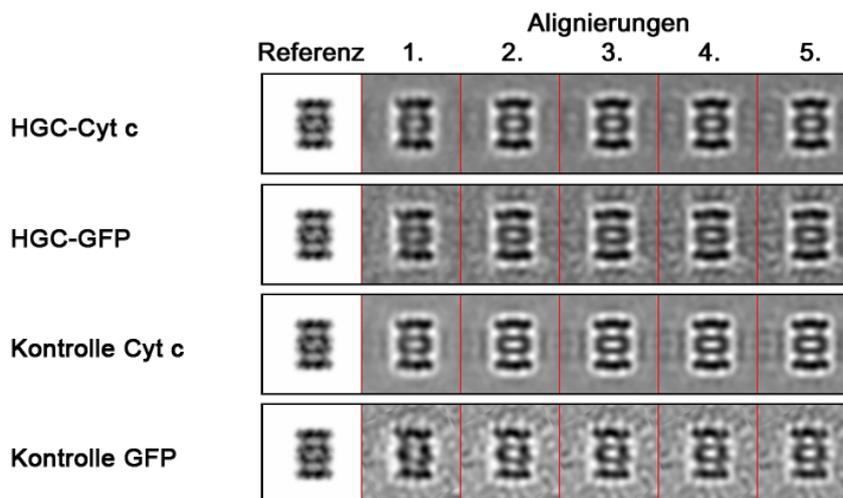


Abb. 4.39: Erneute zweidimensionale Alignierungen in Translation und Rotation der in Eis eingebetteten Einzelpartikel in Seitenansicht. Die Seitenprojektion der aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* berechneten dreidimensionalen Elektronendichte diente als erste Referenz

Die jeweiligen Bilder wurden aus dem Gesamtstapel extrahiert und nochmals einer zweidimensionalen Alignierung in Translation und Rotation in fünf Zyklen unterzogen. Als erste Referenz diente die oben beschriebene Projektion der Röntgenkristallstruktur in Seitenansicht. Die gemittelten Bilder nach den jeweiligen Alignierungszyklen sind in Abb. 4.39 dargestellt.

Anschließend wurden die vier Bilderstapel einzeln durchgesehen und Bilder, die Partikel mit einer von der Referenz abweichenden Orientierung oder ungenügender Zentrierung zeigen, aussortiert. Die nach diesem Schritt verbleibende Anzahl an Einzelpartikelbildern ist in Tab. 4.4 aufgeführt.

Tab. 4.4: Anzahl der Partikel je Probe für die Einzelpartikelanalyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben.

| Probe    | HGC-Cyt c | HGC-GFP | Kontrolle Cytc | Kontrolle GFP |
|----------|-----------|---------|----------------|---------------|
| Partikel | 2774      | 3322    | 3957           | 4119          |

Jedes einzelne Bild im verbleibenden Stapel aus Bildern der Einzelpartikel wurde mittels Subtraktion des Mittelwertes und anschließende Division durch die Standardabweichung normiert.

#### 4.9.2.2 Multivariate statistische Analyse

Die nach Alignierung und Normierung erhaltenen Bilderstapel wurden einer multivariaten statistischen Analyse unterzogen [van Heel und Frank, 1981]. In Abb. 4.40 sind die resultierenden Eigenvektoren dargestellt.

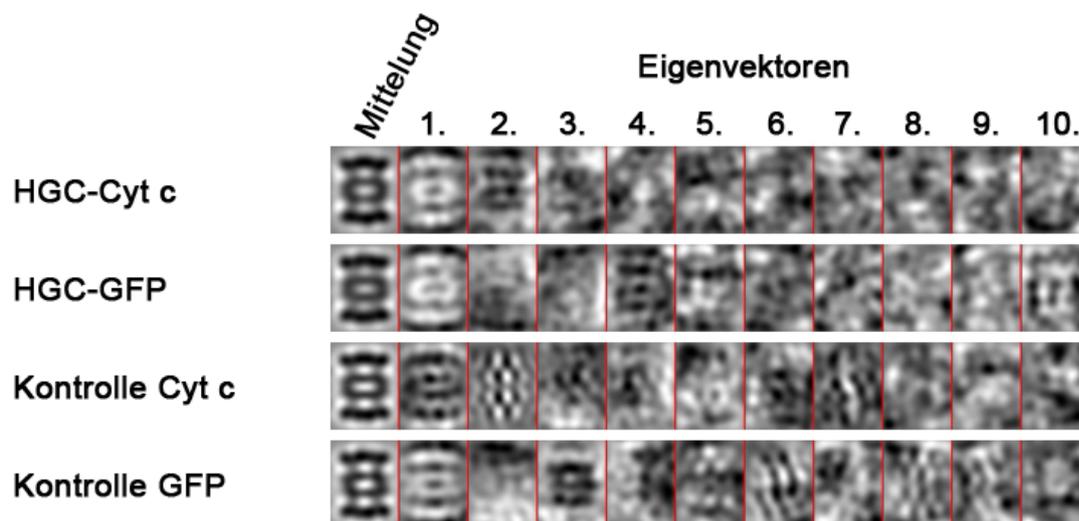


Abb. 4.40: Eigenvektoren aus der multivariaten statistischen Analyse der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben.

Lediglich die Kontrolle Cytochrom c weist einen Eigenvektor mit Schachbrettmuster (Eigenvektor 2) auf, der die Rotation der Partikel mit 7-zähliger Symmetrie um deren Zylinderachse beschreibt. Bei allen übrigen Proben ist solch ein Eigenvektor nicht zu erkennen, was vermutlich auf die zu geringen Auflösung der Bilder zurückzuführen ist. Aus diesem Grund ist eine Klassifizierung der Einzelpartikel zur Generierung einer Mittelung mit einheitlicher Orientierung der Partikel, wie sie für die negativ kontrastierten Proben durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 4.9.1.2), im Falle der in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben nicht möglich.

#### 4.9.2.3 Differenz der Mittelungen

Aus den Mittelungen der alignierten und normierten Bildern der Einzelpartikel wurden zur Untersuchung der Lokalisation der Substratmoleküle innerhalb der „Host-Guest“-Komplexe Differenzbilder berechnet. Diese sind in Abb. 4.41 dargestellt, wobei für alle Bilder dieselbe Skalierung der Grauswerte verwendet wurde.

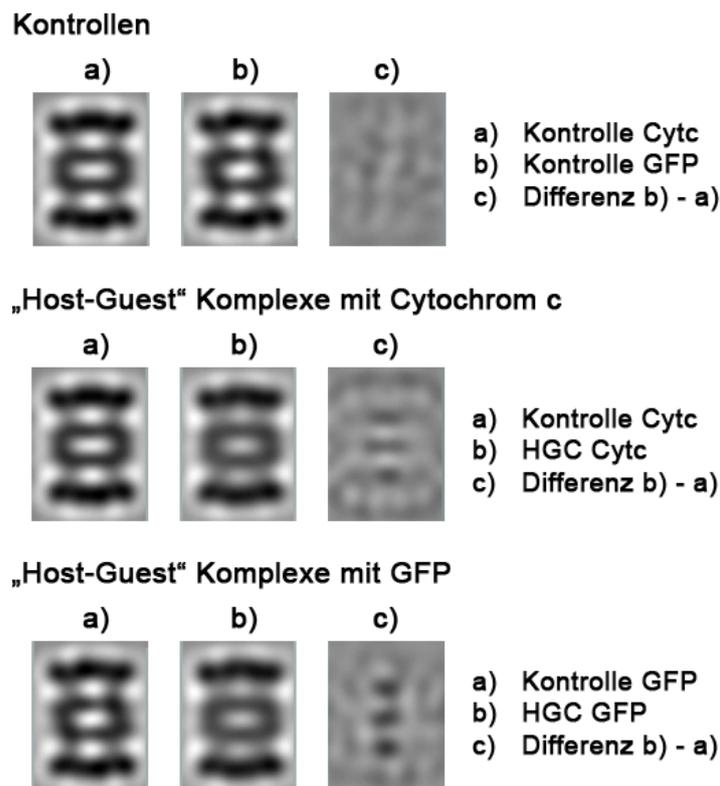


Abb. 4.41: Mittelungen und Differenzbilder der verschiedenen in vitrifiziertem Eis eingebetteten Proben. Alle Bilder sind im selben Grauskalabereich dargestellt. Die Differenzbilder zwischen den gemittelten „Host Guest“ Komplexen mit GFP bzw. Cytochrom c und den zugehörigen Kontrollen weisen im Bereich der zentralen Kammern der 20S Proteasomen auf die Anwesenheit zusätzlicher Masse hin. Bei den beiden Kontrollen untereinander sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Aus den gemittelten Bildern der jeweiligen Proben ist ersichtlich, dass die drei Kammern in den „Host-Guest“ Komplexen deutlich dunkler erscheinen als in den jeweiligen Kontrollen. Dies ist auf die Anwesenheit zusätzlicher Masse innerhalb der Kompartimente der 20S Proteasomen zurückzuführen. Die Differenzbilder, bei denen die Mittelung der zugehörigen Kontrollen von derjenigen der „Host-Guest“ Komplexe subtrahiert wurde zeigen sowohl mit Cytochrom c, als auch mit GFP als Substrat zusätzliche Massen innerhalb aller drei Kammern der 20S Proteasomen. Im Differenzbild der beiden Kontrollen untereinander sind keine dunkleren Flächen, die auf zusätzliche Massen schließen lassen zu erkennen. Eine weitere Analyse der Einzelpartikel erschien aufgrund der geringen Auflösung der Bilder als nicht sinnvoll.

Die Einzelpartikelanalyse beweist die Anwesenheit der Substratmoleküle im Inneren der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms. Eine Aussage über die Lokalisierung in Bezug auf die verschiedenen Kammern ist jedoch mit dem vorliegenden Datensatz nicht möglich.

## 4.10 Röntgenkristallographie

Um mögliche Konformationsänderungen des 20S Proteasoms während der Translokation von Substraten zu untersuchen und die daran beteiligten Aminosäuren zu identifizieren, wurden die „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP röntgenkristallographisch untersucht. Die Auswertung der Daten und die Strukturlösung wurden von Frau Dr. Susanne Witt (MPI für Biochemie, Martinsried) und Herrn Dr. Matthew Groves (EMBL Outstation, Hamburg) durchgeführt.

### 4.10.1 Kristallisation und Datensammlung

Zur Kristallisation der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP in hängenden Tropfen wurde ein Screening um die Bedingungen, die zur Kristallisation des Wildtyps verwendet wurden [Löwe, *et al.*, 1995], durchgeführt.

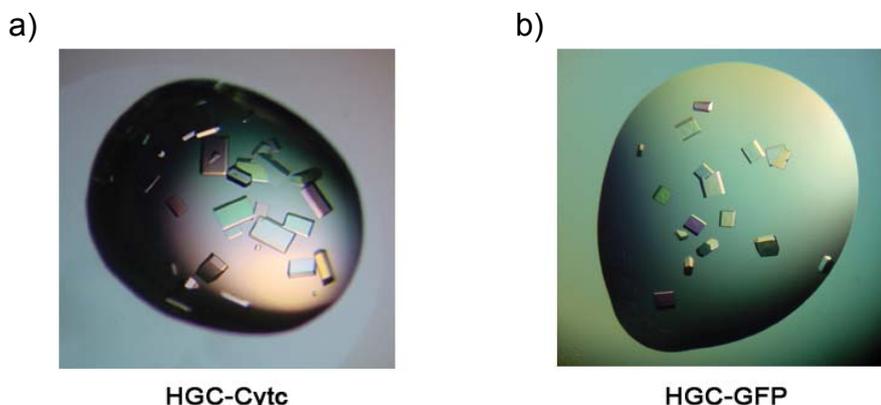


Abb. 4.42: Typische Kristalle der "Host-Guest" Komplexe mit Cytochrom c (a) und GFP (b). Die Tropfen haben einen Durchmesser von ca. 1,5 mm.

Dabei stellte sich heraus, dass PEG-1000 Konzentrationen von 10 bis 12 % im 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5 Kristallisationspuffer reproduzierbar zu Kristallen mit Dimensionen von bis zu 0,2 x 0,3 x 0,3 mm führten. Abb. 4.42 zeigt typische Kristalle der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c und GFP.

Die Kristalle der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c lieferten nach Bestrahlung mit Synchrotronstrahlung Streubilder mit einer maximalen Auflösung von 3,2 Å, während mit GFP als Modellsubstrat lediglich eine maximale Auflösung von 4,2 Å erreicht werden konnte. In weiteren Versuchen wurden dem oben genannten Kristallisationspuffer diverse Additive zugesetzt sowie weitere Bedingungen wie PEG mit unterschiedlichen Molekulargewichten, Natriumchlorid, Betain variiert mit verschiedenen pH-Werten in unterschiedlichen Puffersystemen zur Kristallisation verwendet. Mit den hieraus erhaltenen Kristallen konnten jedoch keine Streubilder mit höheren Auflösungen erzielt werden.

Die röntgenkristallographische Untersuchung der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP erfordert eine weitere Optimierung der Kristallisations- und Einfrierbedingungen, da die gegenwärtig erreichte Auflösung von 4,2 Å nicht ausreicht um Änderungen der Orientierung einzelner Aminosäuren, die im selben Größenbereich liegen, zu identifizieren.

Tab. 4.5: Datensammlungs- und Prozessierungsstatistiken des Datensatzes der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c. Die Werte für die äußerste Auflösungsschale sind in runden Klammern angegeben.

|   |   |
|---|---|
| Wellenlänge [Å]                             | 0,97910                                       |
| Auflösung [Å]                               | 3,2   |
| Raumgruppe                                  | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> |
| Gitterkonstanten der Einheitszelle [Å, °]   | a = 116,3; b = 206,9; c = 310,2; α = 90       |
| Volumen der Einheitszelle [Å <sup>3</sup> ] | 7426112,5                                     |
| Atome je Einheitszelle                      | 388388  |
| Anzahl der beobachteten Reflexe             | 5731560                                       |
| Anzahl der unabhängigen Reflexe             | 122772  |
| Kriterium für beobachtete Reflexe           | I / σ(I) > 1                                  |
| Vollständigkeit [%]                         | 99,7 (100 % Multiplizität 5,3)                |
| R <sub>merge</sub> [%]                      | 0,145 (0,494)                                 |
| I / σ(I)                                    | 10,8 (1,6)                                    |

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$$

Alle folgenden Angaben beziehen sich auf die „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c, deren Streubilder mit maximaler Auflösung von 3,2 Å zur Strukturlösung verwendet wurden.

Die Kristalle der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c konnten der monoklinen Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> mit den Gitterkonstanten der Einheitszelle a = 116,3 Å, b = 206,9 Å, c = 310,2 Å und α = 90° zugeordnet werden. Die Analyse der Matthews-Parameter [Matthews, 1968] ergab für 28 Moleküle (ein 20S Proteasom) in der asymmetrischen Einheit einen Matthews-Koeffizienten von 2,9 Å<sup>3</sup>Da<sup>-1</sup>, entsprechend einem Solvenzgehalt von 52,3 %. In Tab. 4.5 sind die Ergebnisse der Datenprozessierung der Kristalle bestehend aus „Host-Guest“ Komplexen mit Cytochrom c aufgelistet.

#### 4.10.2 Struktur der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c

Die Strukturlösung der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c erfolgte durch die Methode des molekularen Ersatzes, wobei die Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag: 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995] als Modell diente und die Untereinheiten des 20S Proteasoms als starre Einheiten betrachtet wurden.

Die Gesamtstruktur der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms entspricht derjenigen des 20S Proteasom Wildtyps. Es befindet sich zwar zusätzliche Elektronendichte im Inneren der 20S Proteasomen, diese Dichte kann jedoch nicht eindeutig dem Substrat zugeordnet werden.

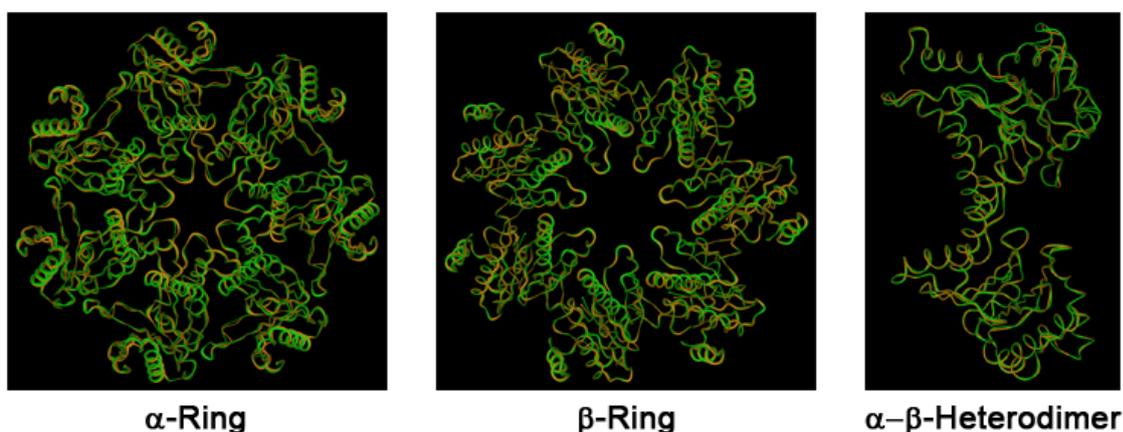


Abb. 4.43: Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (orange, PDB-Eintrag 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995] und der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (grün). Die Gesamtstruktur des „Host-Guest“ Komplexes entspricht demjenigen des Wildtyps. Es lassen sich jedoch einige signifikante Unterschiede in den Feinstrukturen der  $\alpha$ -Untereinheiten feststellen.

Abb. 4.43 zeigt die Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (orange) [Löwe, *et al.*, 1995] und derjenigen der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c (grün). Dargestellt sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringe bestehend aus je 7 Untereinheiten des  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Typs in Aufsicht sowie ein Heterodimer bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit in Seitenansicht.

Während sich die beiden Strukturen in den  $\beta$ -Ringen nicht signifikant unterscheiden, weist die Struktur der „Host-Guest“ Komplexe im Vergleich zum Wildtyp in der Feinstruktur einige Unterschiede auf. Diese werden im folgenden Kapitel näher behandelt.

### 4.10.3 Vergleich der Strukturen der „Host-Guest“ Komplexe und des Wildtyps

Durch Vergleich der beiden Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasom Wildtyps (1PMA [Löwe, *et al.*, 1995]) und des „Host-Guest“ Komplexes mit Cytochrom c konnten einige Aminosäurereste, deren Orientierung sich in beiden Strukturen unterscheidet, identifiziert werden.

Die Überlagerung der beiden Röntgenkristallstrukturen im Bereich der Pore in den  $\alpha$ -Ringen (siehe Abb. 4.44) zeigt deutlich, dass die Positionen zweier benachbarter Glycine (G 127 und G 128) im Komplex nach oben verschoben sind. Während der Carbonylsauerstoff der Peptidbindung zwischen den beiden Glycinen in der nativen, leeren Struktur von der Pore weg orientiert ist, weist er bei Substratbindung nach oben in Richtung der Pore.

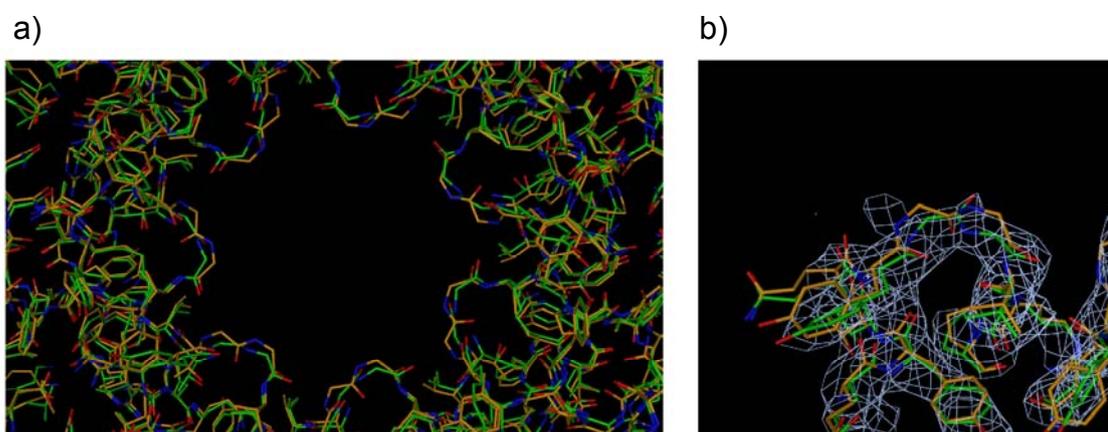


Abb. 4.44: Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (orange, PDB-Eintrag 1PMA) [Löwe, *et al.*, 1995] und der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (grün) in der Porenregion der  $\alpha$ -Ringe. a) Pore der  $\alpha$ -Ringe aus der Vorkammer nach außen hin betrachtet. b) Detail eines die Pore begrenzenden Loops von schräg unten aus der Vorkammer heraus mit experimenteller Elektronendichte. Die Orientierung der beiden Glycine G 127 und G 128 unterscheidet sich in beiden Strukturen deutlich voneinander.

Ein weiterer signifikanter Unterschied der Strukturen lässt sich im Inneren der Vorkammern beobachten. Der Aminosäurerest von Arginin 115 ragt in der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasom Wildtyps in die Vorkammer hinein, wohingegen es im „Host-Guest“ Komplex mit Cytochrom c Wasserstoffbrücken mit Serin 95 und Glutamat 99 ausbildet (siehe Abb. 4.45).

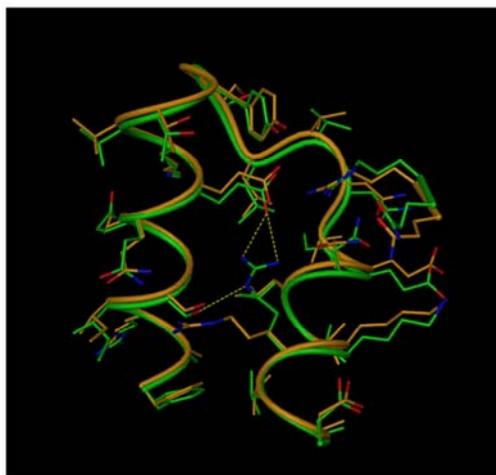


Abb. 4.45: Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (orange, PDB-Eintrag 1PMA) [Löwe, et al., 1995] und der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (grün) an der Innenseite der Vorkammer des 20S Proteasoms. Arginin 115 bildet im „Host-Guest“ Komplex Wasserstoffbrücken mit Serin 95 und Glutamat 99 aus, während es im nativen 20S Proteasom in die Vorkammer hineinragt.

Zusätzlich zur veränderten Orientierung einiger einzelner Aminosäuren in den „Host-Guest“ Komplexen im Vergleich zum nativen 20S Proteasom weisen die Komplexe ein deutlich unterschiedliches elektrostatisches Potential in den Vorkammern auf.

In Abb. 4.46 sind die aus den Röntgenkristallstrukturen berechneten Oberflächen mit den jeweiligen elektrostatischen Potentialen der internen Kammern des Wildtyp 20S Proteasoms denjenigen des „Host-Guest“ Komplexes mit Cytochrom c gegenübergestellt. Während sich die Ladungsverteilung innerhalb der zentralen Kammer und in Aufsicht auf den  $\alpha$ -Ring in Abhängigkeit von Ab- oder Anwesenheit des Substrates kaum ändert, sind bei den Inneren Oberflächen der Vorkammer deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Komplex zu erkennen. Bei der nativen, leeren Struktur des 20S Proteasoms gleichen sich die positiven und negativen Ladungen an der Oberfläche der Vorkammer aus. In Anwesenheit von Substrat beim „Host-Guest“ Komplex erhält die innere Oberfläche in Richtung des  $\alpha$ -Rings eine deutlich negative, diejenige in Richtung des  $\beta$ -Rings eine deutlich positive Ladung. Dieser Effekt kann durch die oben beschriebene unterschiedliche Orientierung des Aminosäurerestes von Arginin 115 erklärt werden.

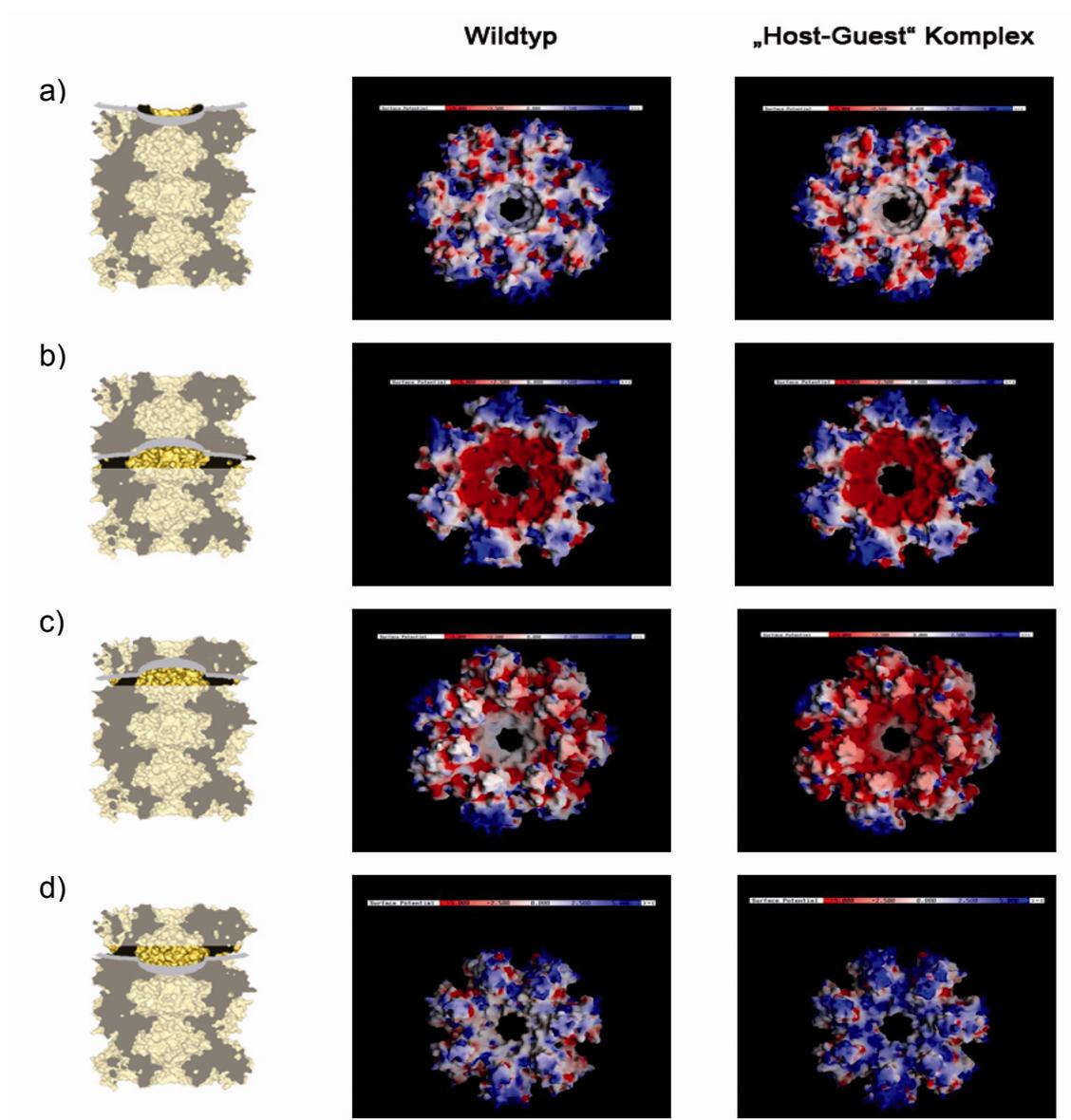


Abb. 4.46: Elektrostatistische Potentiale an den Oberflächen der Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (links, PDB-Eintrag 1PMA) [Löwe, et al., 1995] und der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom *c* (rechts). a) Aufsicht auf den  $\alpha$ -Ring; b) Innere Oberfläche der zentralen Kammer; c) Innere Oberfläche der Vorkammer in Richtung des  $\alpha$ -Rings; d) Innere Oberfläche der Vorkammer in Richtung des  $\beta$ -Rings. Negative Ladungen sind rot, positive blau dargestellt.

Um den Einfluss der Aminosäurereste, die im „Host-Guest“ Komplex mit Cytochrom *c* eine vom Wildtyp unterschiedliche Orientierung aufweisen, auf die Substrattranslokation weiter zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten des 20S Proteasoms hergestellt (siehe Kapitel 4.1) und deren proteolytische Aktivität vermessen. Die Ergebnisse der enzymkinetischen Analysen dieser Mutanten sind in Kapitel 4.13 beschrieben.

## 4.11 Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Stöchiometrie, die in den „Host-Guest“ Komplexen des 20S Proteasoms mit Cytochrom c bzw. GFP vorliegt, wurden diese einer Analyse mittels Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie unterzogen. Hierfür wurden die Proben an Dr. Michal Sharon (Department of Chemistry, University of Cambridge, UK) gesandt, die die Aufnahme und Analyse der Spektren durchführte [Sharon, *et al.*, 2005]. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Analyse kurz zusammengefasst.

### 4.11.1 Vergleich der Massenspektren des 20S Proteasoms und der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c

Die Tandem-Massenspektren der nativen 20S Proteasomen, der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c und eines Gemisch aus 20S Proteasomen und Cytochrom c (1:10) sind in Abb. 4.47 dargestellt.

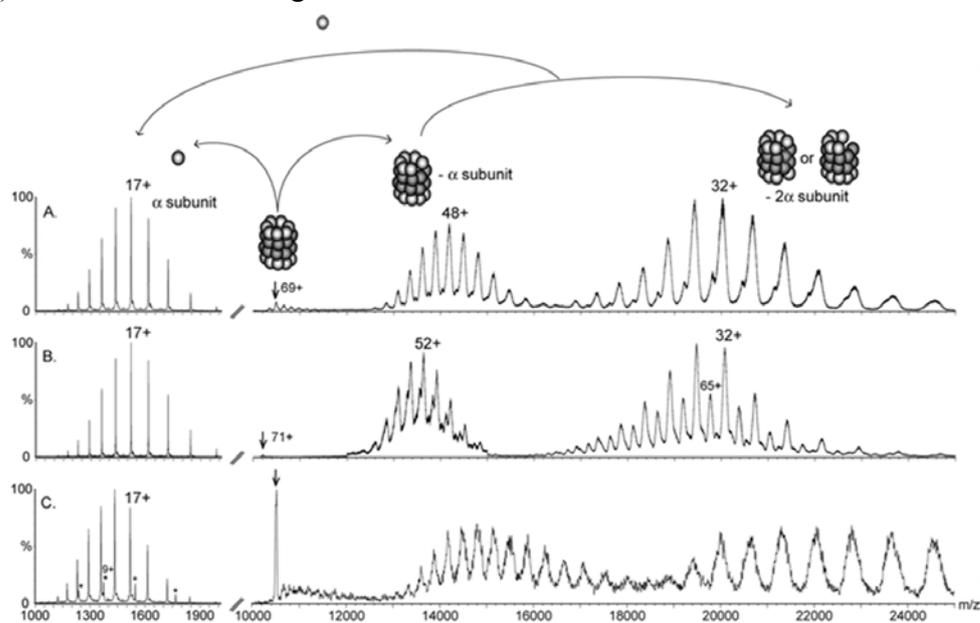


Abb. 4.47: Tandem-Massenspektren des nativen 20S Proteasoms (A), der "Host-Guest" Komplexe mit Cytochrom c (B) und eines Gemischs bestehend aus 20S Proteasomen und Cytochrom c im Verhältnis 1:10 (C). Die Ladungszustände, die im ersten Massenanalysator zur weiteren Auftrennung ausgewählt wurden, sind mit einem Pfeil markiert. Die 20S Proteasomen dissoziieren in allen drei Fällen unter Abspaltung einer bzw. zweier  $\alpha$ -Untereinheiten. Bei dem Gemisch aus 20S Proteasomen und Cytochrom c wird zusätzlich Cytochrom c abgespalten (mit \* gekennzeichnet). Der Bereich zwischen 12.000 und 25.000 in C wurde dreifach vergrößert dargestellt [Sharon, *et al.*, 2005].

In allen drei Fällen treten Peaks mit relativ niedrigen Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 1.000 bis 2.000 auf, die auf einzelne  $\alpha$ -Untereinheiten zurückzuführen sind. Diese stammen aus der Dissoziation der 20S Proteasomen unter Bildung von  $\alpha_{13}\beta_{14}$  (m/z 12.000 bis 16.000) und  $\alpha_{12}\beta_{14}$  (m/z 17.000 bis 25.000) Partikeln.

Die Peaks des nativen 20S Proteasoms nach Abspaltung einer bzw. zweier  $\alpha$ -Untereinheiten sind deutlich breiter als die entsprechenden Peaks der „Host-Guest“ Komplexe. Dies ist vermutlich auf die größere Anzahl von Wasser und Puffermolekülen innerhalb der 20S Proteasomen zurückzuführen [Nettleton, *et al.*, 1998]. Überdies treten bei den „Host-Guest“ Komplexen im Bereich des Spektrums mit hohen m/z-Werten zusätzliche Peaks auf, die der Anwesenheit der Substrate zugeschrieben werden können.

Das Massenspektrum des Gemischs bestehend aus 20S Proteasomen und Cytochrom c unterscheidet sich von demjenigen der „Host-Guest“ Komplexe deutlich in der Breite der Peaks. Darüber hinaus kann bei niedrigen m/z-Werten die Dissoziation von  $\alpha$ -Untereinheiten und Cytochrom c beobachtet werden, während im Falle der „Host-Guest“ Komplexe lediglich die  $\alpha$ -Untereinheiten zu sehen sind. Die Peakverbreiterung und die Abspaltung von hoch geladenem Cytochrom c kann auf Substratmoleküle zurückgeführt werden, die unspezifisch an den äußeren Oberflächen der 20S Proteasomen gebunden sind. Substratmoleküle, die sich innerhalb der 20S Proteasomen befinden, sind nicht geladen und werden daher im Massenspektrometer nicht detektiert. Da im Falle der „Host-Guest“ Komplexe keine Peaks beobachtet werden können, die auf Cytochrom c zurückzuführen sind, kann eine unspezifische Bindung der Substratmoleküle ausgeschlossen werden.

#### 4.11.2 Vergleich der Massenspektren der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c und mit GFP

In Abb. 4.48 sind die Ausschnitte der Massenspektren der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c (A und B) und GFP (C und D) dargestellt, die die Peaks der Spezies nach Abspaltung einer (A und C) bzw. zweier (B und D)  $\alpha$ -Untereinheiten enthalten. Die Masse der dominierenden Serie von Ladungszuständen im  $-\alpha$ -Bereich der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c (Abb. 4.48 A) entspricht derjenigen eines Komplexes mit drei Molekülen Cytochrom c (mit C markierte Peaks). Zusätzlich können im Spektrum Spezies mit einem und zwei gebundenen Cytochrom c-Molekülen identifiziert werden (mit B markierte Peaks), wobei eine genaue Zuordnung zu einer der beiden Spezies aufgrund überlappender Peaks nicht möglich ist. Peaks der 20S Proteasomen, die keinerlei Substrat enthalten sind mit A gekennzeichnet. Bei den „Host-Guest“ Komplexen mit GFP liegen im  $-\alpha$ -Bereich (siehe Abb. 4.48 C) hauptsächlich Spezies mit zwei GFP-Molekülen (markiert mit G) vor. Zusätzlich treten Peaks der 20S Proteasomen ohne GFP (markiert mit A) auf.

In den  $-2\alpha$ -Bereichen der Spektren sind in beiden Fällen Peaks zu erkennen, deren Massen denjenigen der Monomere (M:  $\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}$ ) und Dimere (D:  $[\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}]_2$ ) des 20S Proteasoms nach Abspaltung zweier  $\alpha$ -Untereinheiten entsprechen. Im Falle der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c (Abb. 4.48 B) treten zusätzlich Peaks geringer Intensität auf, die auf die Bindung von zwei (markiert mit \*) und drei (markiert mit +) Cytochrom c-Molekülen zurückgeführt werden können. Im entsprechenden Abschnitt des Spektrums der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP

(siehe Abb. 4.48 D) sind zwei Hüllkurven eingezeichnet, deren Peaks nicht vollständig von den Peaks der Monomere und der Dimere getrennt werden können. Diejenige im  $m/z$ -Bereich um 19.000 (markiert mit x) ist auf die Bindung eines GFP-Moleküls, die im  $m/z$ -Bereich um 22.000 (markiert mit ^) auf die Bindung zweier GFP-Moleküle zurückzuführen.

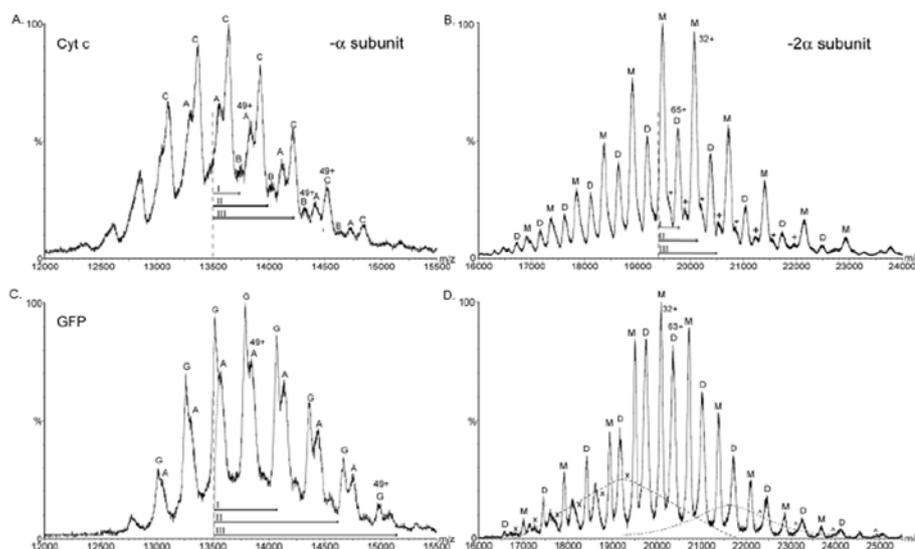


Abb. 4.48: Tandem-Massenspektren der "Host-Guest" Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c (A und B) und GFP (C und D). Gezeigt sind die Ausschnitte der Spektren im Bereich der Peaks, die nach Abspaltung einer (A und C) bzw. zweier (B und D)  $\alpha$ -Untereinheiten resultieren. Die gestrichelte Linie mit den Balken kennzeichnet die simulierten Zunahmen des  $m/z$ -Wertes der 20S Proteasomen, die durch Bindung von einem, zwei und drei Substratmolekülen resultieren. Kennzeichnung der Peaks: A:  $\alpha_{13}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}$ ; B:  $\alpha_{13}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}$  (Cyt c) bzw. (Cyt c)<sub>2</sub>; C:  $\alpha_{13}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}$  (Cyt c)<sub>3</sub>; G:  $\alpha_{13}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}$  (GFP)<sub>2</sub>; M:  $\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}$ ; D: [ $\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}$ ]; \*:  $\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}(\text{Cyt c})_2$ ; +:  $\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}(\text{Cyt c})_3$ ; x:  $\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}(\text{GFP})$  (Hüllkurve im  $m/z$ -Bereich um 19.000); ^:  $\alpha_{12}\beta_{14}(\text{Inhibitor})_{14}(\text{GFP})_2$  (Hüllkurve im  $m/z$ -Bereich um 22.000) [Sharon, et al., 2005].

Sowohl in der  $-\alpha$  als auch in der  $-2\alpha$ -Region der Spektren der „Host-Guest“ Komplexe können somit Spezies identifiziert werden, die bis zu drei Moleküle Cytochrom c und zwei Moleküle GFP enthalten. Deren Anteil in der  $-2\alpha$ -Region ist jedoch sehr gering. Durch Extrapolation dieser Ergebnisse auf den Zustand der „Host-Guest“ Komplexe vor der Abspaltung der  $\alpha$ -Untereinheiten ergäbe sich eine maximale Belegung der 20S Proteasomen mit vier Cytochrom c-Molekülen und drei GFP-Molekülen [Sharon, et al., 2005]. Dies setzt jedoch eine symmetrische Belegung der beiden Vorkammern des 20S Proteasoms in den Komplexen und die konzertierte Abspaltung der ersten  $\alpha$ -Untereinheit und eines Substrates voraus.

## 4.12 Röntgenkleinwinkelstreuung

Zur Identifikation möglicher Strukturänderungen der „Host-Guest“ Komplexe im Vergleich zum nativen 20S Proteasom und zur Untersuchung der Lokalisation der Substrate innerhalb der 20S Proteasomen, wurden „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom *c* bzw. GFP, sowie native und inhierte 20S Proteasomen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Die Messungen wurden im HASYLAB, Beamline X33 des European Molecular Biology Laboratory EMBL am Deutschen Elektronen Synchrotron DESY, Hamburg in Zusammenarbeit mit Dr. Dmitri Svergun und Dr. Manfred Rössele (EMBL Outstation, Hamburg) durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Daten übernahm Dr. Dmitri Svergun.

Die Streukurven der nativen 20S Proteasomen, der mit *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -Lacton inhibierten 20S Proteasomen und der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom *c* unterschieden sich nur geringfügig voneinander, während diejenige der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP sich im Bereich um  $s = 1$  deutlich von allen anderen unterscheidet (siehe Abb. 4.49). Aufgetragen wurde jeweils der Logarithmus der Intensität gegen den Streuvektor  $s = 4\pi \sin\Theta / \lambda$ , wobei der Streuwinkel  $2\Theta$  ist und die Wellenlänge  $\lambda$  0,15 nm beträgt.

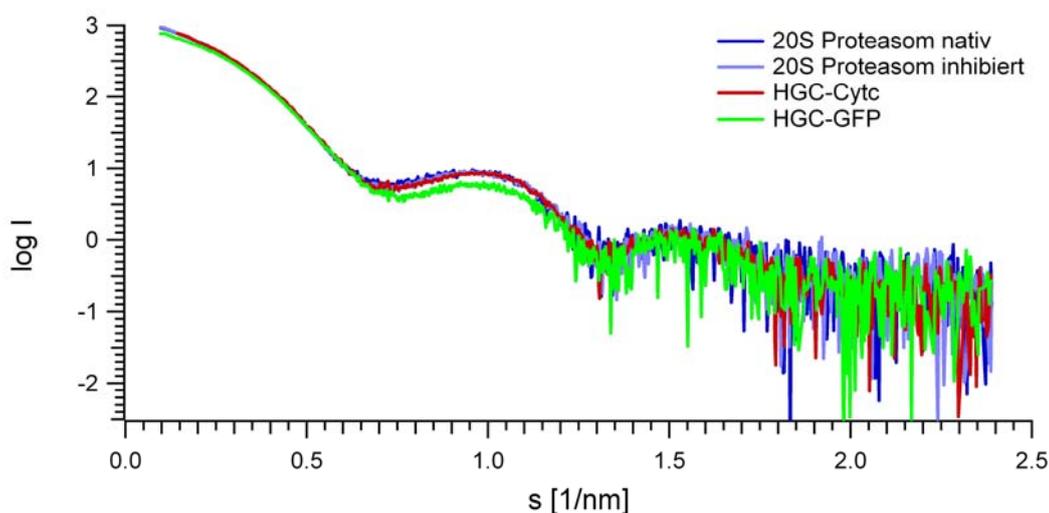


Abb. 4.49: SAXS Streukurven des nativen und inhierten 20S Proteasoms sowie der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom *c* und GFP. Aufgetragen ist der Logarithmus der Streuintensität gegen den Streuvektor  $s = 4\pi \sin\Theta / \lambda$  mit dem Streuwinkel  $2\Theta$  und der Wellenlänge  $\lambda = 0,15$  nm. Die Intensitäten wurden durch die Intensität des Primärstrahls und die Konzentration der Lösung geteilt. Zur besseren Veranschaulichung der Unterschiede wurde ein Offset verwendet um die Kurven bei kleinen Streuvektoren zur Deckung zu bringen.

In Abb. 4.50 ist exemplarisch die Streukurve des nativen 20S Proteasoms und die berechnete Streukurve aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag 1PMA [Löwe, *et al.*, 1995]) dargestellt. Die beiden Kurven stimmen weitgehend miteinander überein. Geringfügige Abweichungen

sind vermutlich auf Unterschiede in der Struktur der 20S Proteasomen im Kristall und in Lösung zurückzuführen.

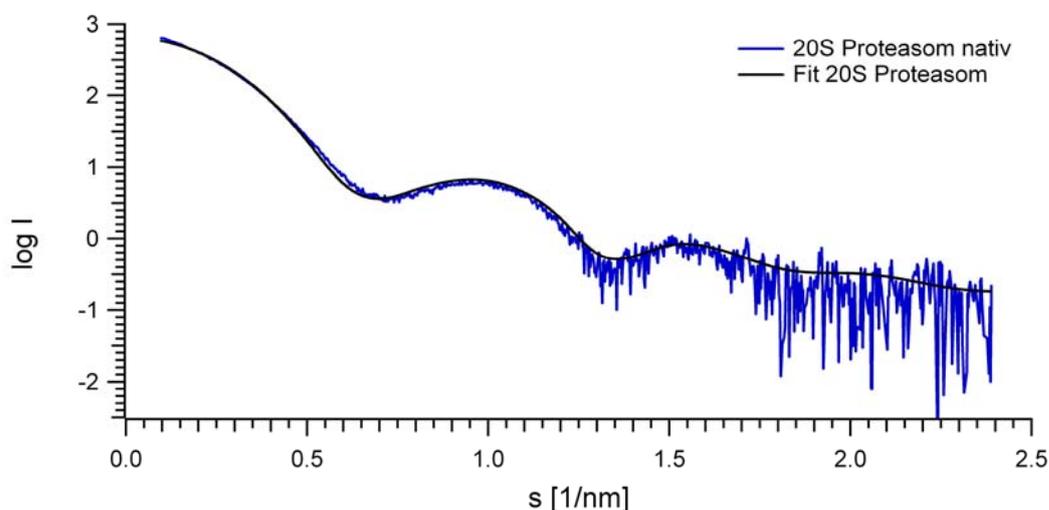


Abb. 4.50: Experimentelle SAXS Streukurve des nativen 20S Proteasoms und berechnete Streukurve aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag 1PMA [Löwe, et al., 1995]). Die beiden Kurven stimmen größtenteils überein. Geringfügige Abweichungen sind vermutlich auf die unterschiedliche Struktur der 20S Proteasomen im Kristall und in Lösung zurückzuführen.

Die experimentell ermittelte Streukurve der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP weicht von der aus der Röntgenkristallstruktur berechneten Kurve signifikant ab, wie in Abb. 4.51 zu sehen ist.

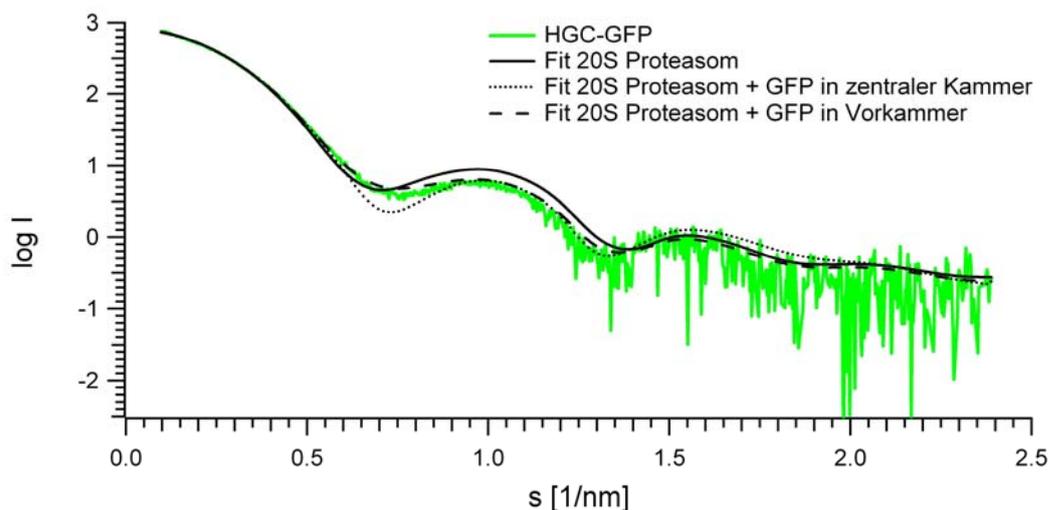


Abb. 4.51: Experimentelle SAXS Streukurve der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP und berechnete Streukurven aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag 1PMA [Löwe, et al., 1995]) ohne Substrat, mit einem GFP-Molekül (*Aequorea victoria* PDB-Eintrag 1EMB [Brejc, et al., 1997]) in der zentralen Kammer und mit einem GFP-Molekül in einer der Vorkammern. Letztere stellt die beste Näherung an die Messwerte dar.

Die berechnete Streukurve eines Modells, bestehend aus der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* (PDB-Eintrag 1PMA [Löwe, *et al.*, 1995]), in dessen Vorkammer die Röntgenkristallstruktur eines GFP-Moleküls aus *Aequorea victoria* (PDB Eintrag 1EMB [Brejc, *et al.*, 1997]) eingefügt wurde, gibt zwar den gemessenen Kurvenverlauf um  $s = 1$  wieder, weicht aber im Bereich um  $s = 0,7$  deutlich von den experimentellen Daten ab. Dahingegen stellt die theoretische Streukurve des Modells mit einem GFP-Molekül in einer der Vorkammern des 20S Proteasoms eine gute Näherung der experimentell ermittelten Daten dar. Somit weisen die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung auf eine asymmetrische Lokalisation der GFP-Moleküle innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms hin.

### 4.13 Proteolytische Aktivität der Mutanten des 20S Proteasoms

Bei der Röntgenkristallstrukturanalyse der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c (siehe Kapitel 4.10) wurden verschiedene Aminosäurereste identifiziert, die bei Anwesenheit von Substraten eine vom Wildtyp 20S Proteasom abweichende Orientierung einnehmen. Um den Einfluss dieser Aminosäurereste auf die Aktivität der 20S Proteasomen zu untersuchen, wurden diese durch gerichtete Mutagenese gegen andere Aminosäuren ausgetauscht und anschließend die proteolytische Aktivität dieser Mutanten vermessen. Als Substrat diente das fluorogene, synthetische Tetrapeptid N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4-methylcoumarinamid (Suc-LLVY-AMC), das sich bereits in früheren Anwendungen bewährte [Seemüller, *et al.*, 1995].

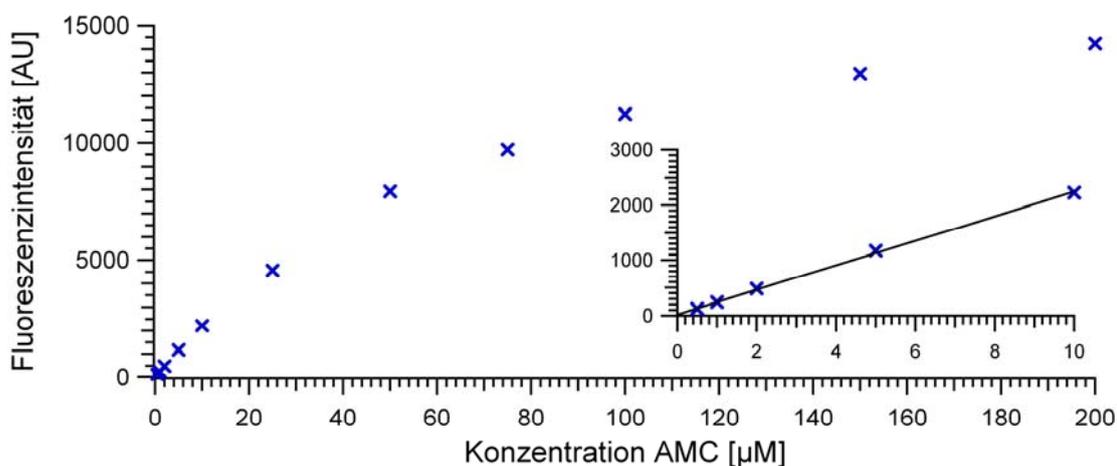


Abb. 4.52: AMC-Kalibrationskurve zur Ermittlung der in den Aktivitätstests freigesetzten Konzentration an AMC. Bis zu einer AMC-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  steigt die Fluoreszenz linear an. In diesem Bereich (siehe vergrößerter Bereich) wurde eine lineare Regression durchgeführt.

Zur Quantifizierung der gemessenen Fluoreszenzen wurde für jede einzelne Messung eine separate AMC-Kalibrationskurve aufgenommen. In Abb. 4.52 ist exemplarisch eine dieser Kurven abgebildet. Es wird deutlich, dass die Fluoreszenz bis zu einer

AMC-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  linear zunimmt. Da die gemessenen Werte der Aktivitätsmessungen eine Fluoreszenzintensität von 2000 AU nicht übersteigen, konnte die durch lineare Regression der Werte bis  $10 \mu\text{M}$  erhaltene Geradengleichung zur Berechnung der Konzentration an freigesetztem AMC verwendet werden.

Abb. 4.53 zeigt exemplarisch den Kurvenverlauf der Aktivitätsmessung bei verschiedenen Substratkonzentrationen am Beispiel des 20S Proteasom Wildtyps.

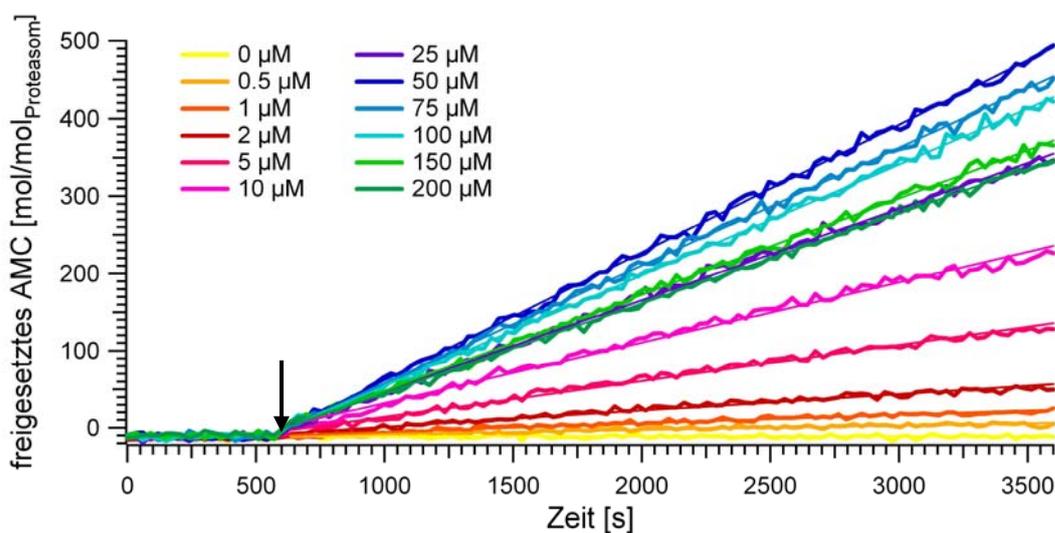


Abb. 4.53: Aktivitätsmessung des 20S Proteasom Wildtyps durch Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenz während des Abbaus des fluorogenen Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Nach 10 Minuten wurde  $1 \mu\text{g}$  des 20S Proteasoms injiziert (Pfeil). Die ermittelten Werte wurden mit Hilfe der AMC-Kalibrationsgeraden (siehe Abb. 4.52) in die Stoffmenge an freigesetztem AMC pro Stoffmenge 20S Proteasom umgerechnet.

Durch die Zugabe des 20S Proteasoms nach 10 Minuten wird die Reaktion gestartet und die Fluoreszenz aller Substrat enthaltender Proben steigt während der gesamten verbleibenden Dauer der Messung linear an. Es liegt ein Fließgleichgewicht (*steady state*) vor.

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei der jeweiligen Substratkonzentration wurde durch lineare Regression der gemessenen Kurven nach der Injektion der 20S Proteasomen berechnet und über drei Messungen gemittelt. Die Standardabweichung der gemittelten Werte wurde nach Gleichung (4.1) berechnet, da sich hieraus in allen Fällen ein größerer Wert ergab, als dies durch Berechnung der Standardabweichung mittels Fehlerfortpflanzung aus den Standardabweichungen der einzelnen Werte der Fall war. Die Abweichung der einzelnen Messwerte von der linearen Funktion ist also deutlich geringer, als die Schwankung der Steigung der linearen Regression zwischen den einzelnen Messungen.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (4.1)$$

In Abb. 4.54 sind die Substratumsätze des Wildtyps und der Mutanten, bei denen die Aminosäuren Glycin 127 und Glycin 128 der  $\alpha$ -Untereinheiten, die sich in einem Loop befinden, der die Pore in den  $\alpha$ -Ringen säumt (siehe Kapitel 4.10.3), gegen Alanin bzw. Phenylalanin ausgetauscht wurden, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufgetragen.

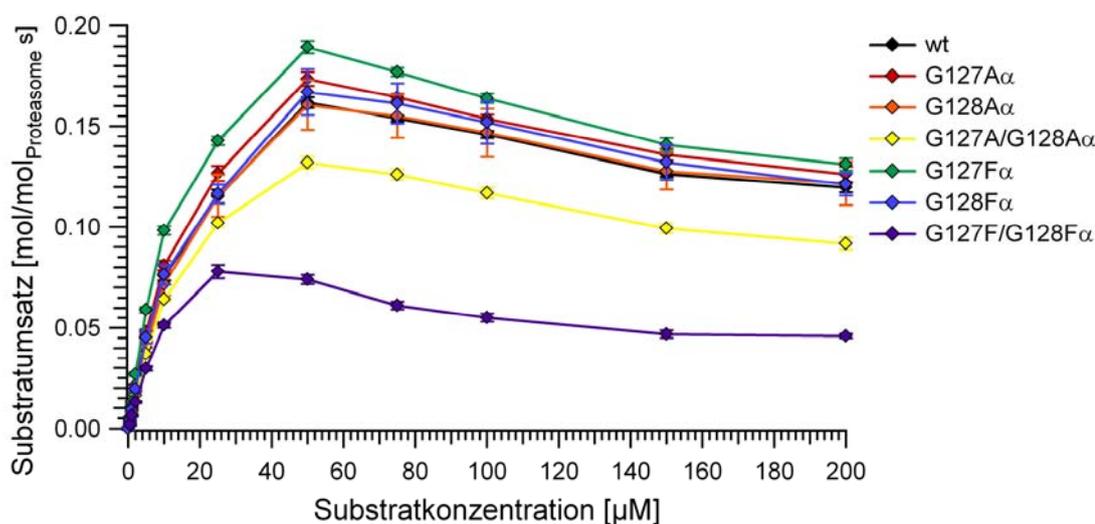


Abb. 4.54: Vergleich des Substratumsatzes in Abhängigkeit der Substratkonzentration bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC durch den Wildtyp und die Glycin 127 $\alpha$ - und Glycin 128 $\alpha$ -Mutanten des 20S Proteasoms. Der Wildtyp und die Einzelmутanten weisen vergleichbare Aktivitäten auf, während die beiden Doppelmутanten weniger aktiv sind. Dabei liegt die Aktivität der G127F/G128F $\alpha$ -Mutante deutlich unter derjenigen der G127A/G128A $\alpha$ -Mutante (Fehlerbalken: Messwert  $\pm$  Standardabweichung).

Hieraus wird deutlich, dass der Wildtyp und die Mutanten, bei denen jeweils eines der Glycine gegen Alanin bzw. Phenylalanin ausgetauscht wurde, beim Abbau von Suc-LLVY-AMC vergleichbare Aktivitäten aufweisen. Die Doppelmутante bei der beide Glycine gegen Alanine ausgetauscht wurden ist etwas weniger aktiv als der Wildtyp und die Einzelmутanten. Die deutlich geringste Aktivität ist bei der Mutante zu verzeichnen, bei der beide Glycine gegen Phenylalanine ausgetauscht wurden. Bei allen Mutanten des 20S Proteasoms tritt Substrathemmung auf. Während die Reaktionsgeschwindigkeit bei der G127F/G128F $\alpha$ -Mutante ab einer Substratkonzentration von 25  $\mu$ M absinkt, ist dies bei allen übrigen hier behandelten Mutanten ab einer Substratkonzentration von 50  $\mu$ M der Fall.

Der Vergleich der Substratumsätze in Abhängigkeit von der Substratkonzentration beim Abbau von Suc-LLVY-AMC durch die Mutanten des 20S Proteasoms, bei denen

Arginin 115 der  $\alpha$ -Untereinheiten und seine potentiellen Wasserstoffbrückenbindungspartner Serin 95, Glutamin 98 und Glutamat 99 gegen Alanin ausgetauscht wurden, ist in Abb. 4.55 dargestellt.

Während die Mutanten S95A, Q98A und E99A des 20S Proteasoms in ihrer Aktivität dem Wildtyp entsprechen, weist die Mutante, bei der das Arginin 115 gegen Alanin ausgetauscht wurde eine deutlich geringere Aktivität als der Wildtyp auf. Alle hier beschriebenen Mutanten des 20S Proteasoms zeigen ab einer Substratkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  Substrathemmung, wobei dieses Phänomen bei der R115A-Mutante am wenigsten ausgeprägt ist.

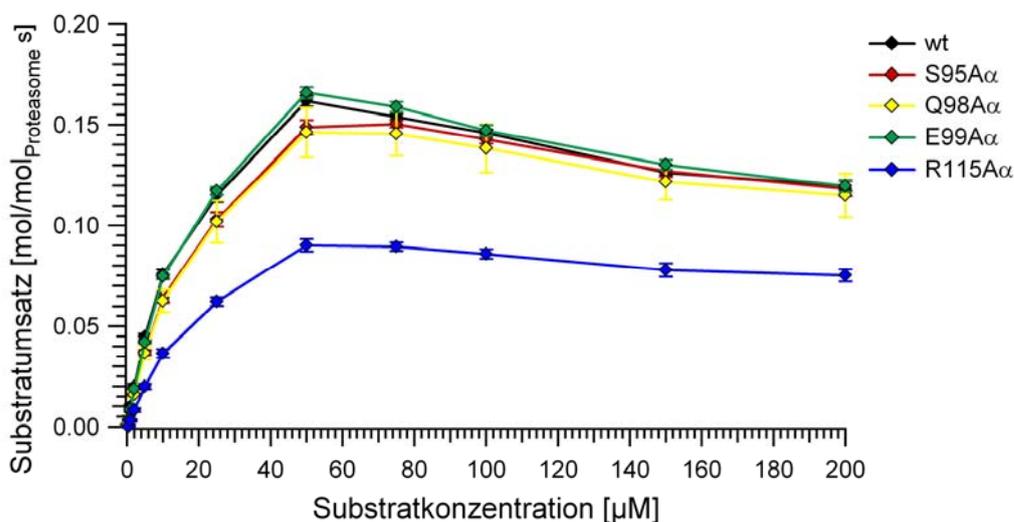


Abb. 4.55: Vergleich des Substratumsatzes in Abhängigkeit der Substratkonzentration bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC durch den 20S Proteasom Wildtyp und die Mutanten, bei denen Arginin 115 und dessen potentiellen Bindungspartner gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die Mutante R115A weist eine deutlich geringere Aktivität auf als die übrigen Mutanten und der Wildtyp, die sich sehr ähnlich verhalten (Fehlerbalken: Messwert  $\pm$  Standardabweichung).

Zur Berechnung der kinetischen Konstanten wurden die ermittelten Messwerte mittels nichtlinearer Regression an Gleichung (2.3) angeglichen. Hierfür wurde das Programm IgorPro 5.00 verwendet, das die Koeffizienten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$  mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet und die jeweiligen Standardabweichungen angibt. Die Messwerte mit Fehlerbalken ( $\pm$  Standardabweichung) und die gefitteten Kurven mit  $n = 1$ ,  $n = 2$  und  $n = 3$  sind in Abb. 4.56 am Beispiel des 20S Proteasom Wildtyps dargestellt.

Hieraus wird deutlich, dass für die durch das 20S Proteasom katalysierte Spaltung des fluorogenen Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC, die Vereinfachungen der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik nicht gelten, da die Kurve mit  $n = 1$  den Verlauf der Messwerte nur ungenügend wiedergibt. Die beiden Kurven mit  $n = 2$  und  $n = 3$  unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander und stellen eine gute Annäherung an die gemessenen Werte dar. Die Substratumsätze bei der Spaltung von Suc-LLVY-AMC durch die übrigen

Mutanten des 20S Proteasoms zeigen eine qualitativ ähnliche Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Daher wurde zur Bestimmung der kinetischen Konstanten eine nichtlineare Regression nach Gleichung (2.4) mit  $n = 2$  durchgeführt.

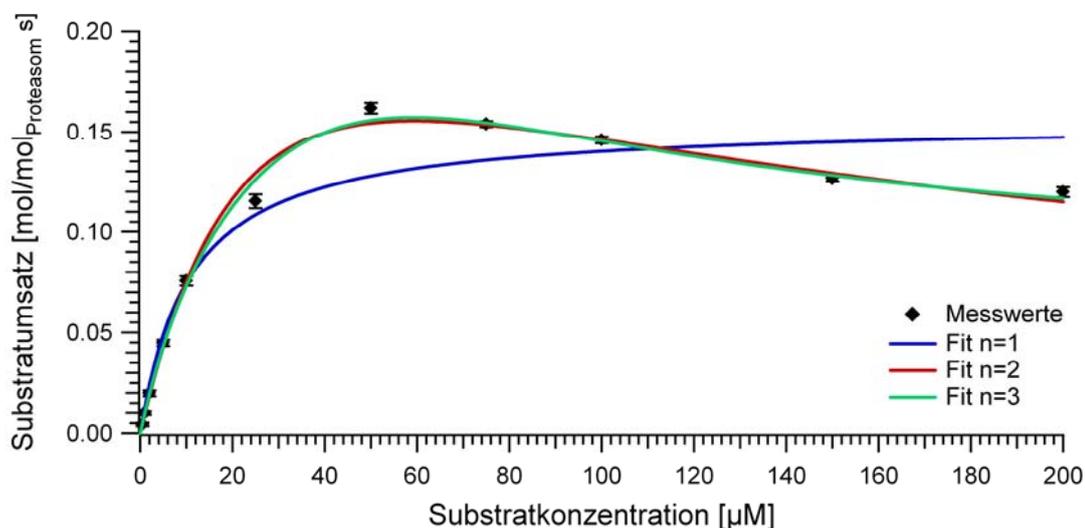


Abb. 4.56: Nichtlineare Regression zur Berechnung der kinetischen Konstanten des 20S Proteasoms bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC am Beispiel des Wildtyps. Zum Kurvenfitting wurde Gleichung (2.3) mit  $n = 1, 2$  und  $3$  verwendet. Die Kurve mit  $n = 1$  gibt den Kurvenverlauf nur ungenügend wieder. Die Kurven mit  $n = 2$  und  $n = 3$  unterscheiden sich nur geringfügig und stellen eine gute Näherung an die gemessenen Werte dar (Fehlerbalken: Messwert  $\pm$  Standardabweichung).

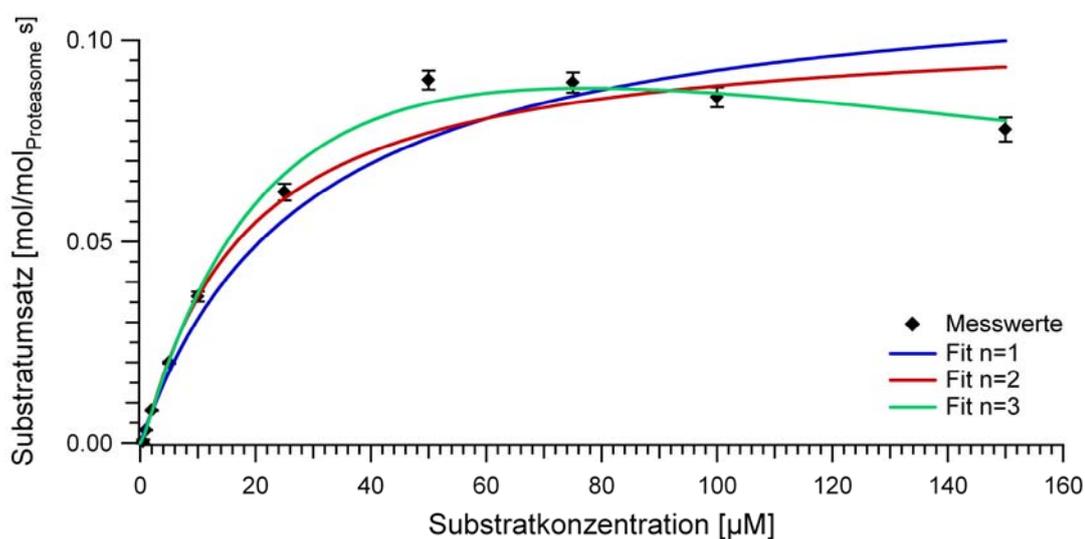


Abb. 4.57: Nichtlineare Regression zur Berechnung der kinetischen Konstanten des 20S Proteasoms bei der Proteolyse von Suc-LLVY-AMC mit der R115A $\alpha$ -Mutante. Während die Kurven mit  $n = 1$  und  $n = 2$  keine akzeptable Näherung der Messwerte darstellen, kann der experimentelle Kurvenverlauf mit  $n = 3$  relativ gut angenähert werden (Fehlerbalken: Messwert  $\pm$  Standardabweichung).

Eine Ausnahme bildet die R115 $\alpha$ -Mutante, bei der die Verwendung des Koeffizient  $n = 3$  eine etwas bessere Annäherung an die ermittelten Werte ergibt als  $n = 2$  (siehe Abb. 4.57).

In Tab. 4.6 sind die kinetischen Konstanten für den Abbau von Suc-LLVY-AMC durch den 20S Proteasom Wildtyp und die untersuchten Mutanten angegeben. Diese wurden aus den vier Konstanten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$ , die aus der nichtlinearen Regression nach Gleichung (2.4) mit  $n = 2$  resultieren, berechnet (siehe Gleichungen (4.3) bis (4.6)). Die Fehler der kinetischen Konstanten ergaben sich durch GAUSS'sche-Fehlerfortpflanzung nach Gleichung (4.2).

$$\sigma_{f(x)} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f(x)}{\partial x_i} \right)^2 \sigma_{x_i}^2} \quad (4.2)$$

$$K_M = \frac{1}{\beta_1} \quad \sigma_{K_M} = \sqrt{\left( \frac{1}{\beta_1^2} \right)^2 \sigma_{\beta_1}^2} \quad (4.3)$$

$$k_{\text{kat}} = \frac{\alpha_1}{\beta_1} \quad \sigma_{k_{\text{kat}}} = \sqrt{\left( \frac{1}{\beta_1} \right)^2 \sigma_{\alpha_1}^2 + \left( \frac{\alpha_1}{\beta_1^2} \right)^2 \sigma_{\beta_1}^2} \quad (4.4)$$

$$K_{M,i} = \frac{\beta_1}{\beta_2} \quad \sigma_{K_{M,i}} = \sqrt{\left( \frac{1}{\beta_2} \right)^2 \sigma_{\beta_1}^2 + \left( \frac{\beta_1}{\beta_2^2} \right)^2 \sigma_{\beta_2}^2} \quad (4.5)$$

$$k_{\text{kat},i} = \frac{\alpha_2}{\beta_2} \quad \sigma_{k_{\text{kat},i}} = \sqrt{\left( \frac{1}{\beta_2} \right)^2 \sigma_{\alpha_2}^2 + \left( \frac{\alpha_2}{\beta_2^2} \right)^2 \sigma_{\beta_2}^2} \quad (4.6)$$

Tab. 4.6: Kinetische Konstanten des Abbaus von Suc-LLVY-AMC durch den Wildtyp und die verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms. Die Werte wurden nach Gleichung (4.3) bis (4.6) aus den Koeffizienten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  und  $\beta_2$  berechnet, die aus der nichtlinearen Regression nach Gleichung (2.4) mit  $n = 2$  resultieren.

|                                       | $K_M$ [ $\mu\text{M}$ ] | $\sigma_{K_M}$ [ $\mu\text{M}$ ] | $k_{\text{kat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $\sigma_{k_{\text{kat}}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $K_{M,i}$ [ $\mu\text{M}$ ] | $\sigma_{K_{M,i}}$ [ $\mu\text{M}$ ] | $k_{\text{kat},i}$ [ $\text{s}^{-1}$ ] | $\sigma_{k_{\text{kat},i}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ] |
|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|-----------------------------|--------------------------------------|--|---|
| <b>wt</b>                             | 32,048                  | 3,965                            | $3,225 \cdot 10^{-1}$                | $4,181 \cdot 10^{-2}$                         | 112,764                     | 44,641                               | $-9,795 \cdot 10^{-17}$                | $4,485 \cdot 10^{-2}$                           |
| <b>G127A<math>\alpha</math></b>       | 29,373                  | 2,749                            | $3,281 \cdot 10^{-1}$                | $3,177 \cdot 10^{-2}$                         | 122,840                     | 52,732                               | $6,112 \cdot 10^{-18}$                 | $5,577 \cdot 10^{-2}$                           |
| <b>G128A<math>\alpha</math></b>       | 38,204                  | 12,802                           | $3,445 \cdot 10^{-1}$                | $1,183 \cdot 10^{-1}$                         | 104,840                     | 160,002                              | $1,696 \cdot 10^{-18}$                 | $1,189 \cdot 10^{-1}$                           |
| <b>G127A/G128A<math>\alpha</math></b> | 29,773                  | 1,484                            | $2,596 \cdot 10^{-1}$                | $1,310 \cdot 10^{-2}$                         | 109,340                     | 34,860                               | $7,281 \cdot 10^{-18}$                 | $3,341 \cdot 10^{-2}$                           |
| <b>G127F<math>\alpha</math></b>       | 23,081                  | 1,539                            | $3,209 \cdot 10^{-1}$                | $2,271 \cdot 10^{-2}$                         | 141,643                     | 55,856                               | $2,081 \cdot 10^{-17}$                 | $5,904 \cdot 10^{-2}$                           |
| <b>G128F<math>\alpha</math></b>       | 29,866                  | 3,927                            | $2,905 \cdot 10^{-1}$                | $3,951 \cdot 10^{-2}$                         | 159,490                     | 252,079                              | $9,683 \cdot 10^{-17}$                 | $2,232 \cdot 10^{-1}$                           |
| <b>G127F/G128F<math>\alpha</math></b> | 83,401                  | 46,505                           | $5,228 \cdot 10^{-1}$                | $2,924 \cdot 10^{-1}$                         | 7,190                       | 4,193                                | $2,492 \cdot 10^{-2}$                  | $9,827 \cdot 10^{-3}$                           |
| <b>S95A<math>\alpha</math></b>        | 32,079                  | 2,375                            | $2,620 \cdot 10^{-1}$                | $2,009 \cdot 10^{-2}$                         | 193,282                     | 206,952                              | $4,202 \cdot 10^{-17}$                 | $1,532 \cdot 10^{-1}$                           |
| <b>Q98A<math>\alpha</math></b>        | 49,484                  | 5,113                            | $3,762 \cdot 10^{-1}$                | $4,099 \cdot 10^{-2}$                         | 73,532                      | 15,927                               | $1,659 \cdot 10^{-2}$                  | $2,245 \cdot 10^{-2}$                           |
| <b>E99A<math>\alpha</math></b>        | 41,569                  | 2,408                            | $3,679 \cdot 10^{-1}$                | $2,190 \cdot 10^{-2}$                         | 97,873                      | 21,706                               | $7,108 \cdot 10^{-18}$                 | $2,818 \cdot 10^{-2}$                           |
| <b>R115A<math>\alpha</math></b>       | $8,153 \cdot 10^{-1}$   | $4,219 \cdot 10^{-1}$            | $1,768 \cdot 10^{-18}$               | $1,243 \cdot 10^{-3}$                         | 17,292                      | 12,145                               | $1,042 \cdot 10^{-1}$                  | $7,079 \cdot 10^{-2}$                           |

Zur Veranschaulichung der Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten des 20S Proteasoms sind in Abb. 4.58 die jeweiligen Werte für  $K_M$  und  $k_{kat}$  mit den zugehörigen Fehlerbalken ( $\pm$  Standardabweichung) relativ zum Wildtyp dargestellt.

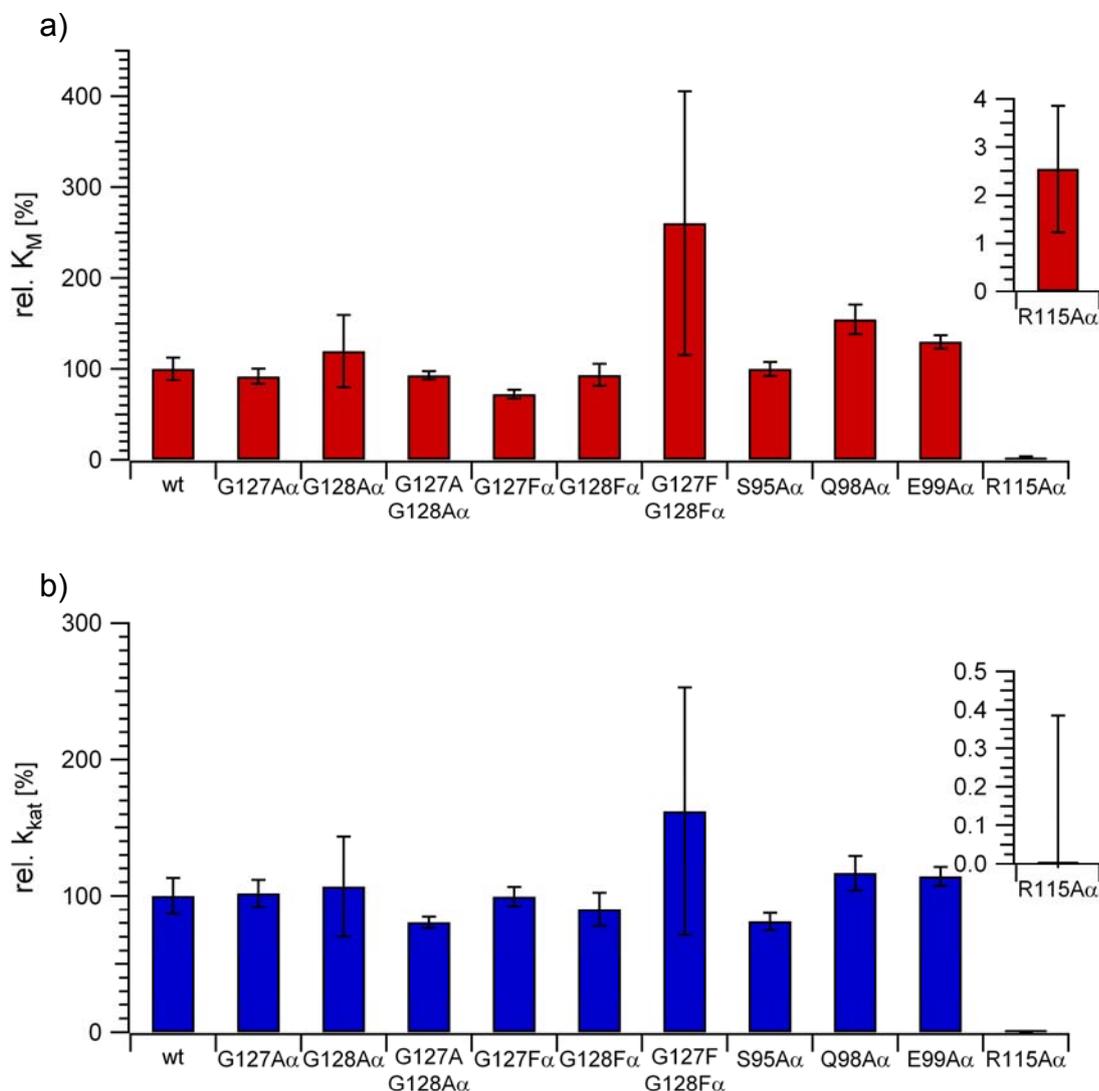


Abb. 4.58: Vergleich der kinetischen Konstanten  $K_M$  und  $k_{kat}$  der verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms beim Abbau des Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC. Alle Werte sind relativ zum Wildtyp angegeben (Fehlerbalken: Messwert  $\pm$  Standardabweichung). Die Mutante R115A $\alpha$  unterscheidet sich wesentlich von allen anderen Mutanten und dem Wildtyp, deren kinetische Konstanten in etwa im selben Bereich liegen.

Mit Ausnahme der R115A $\alpha$ -Mutante liegen die  $K_M$  und  $k_{kat}$ -Werte der Mutanten des 20S Proteasoms und dessen Wildtyps beim Abbau des fluorogenen Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC im selben Bereich. Die G127F/G128F $\alpha$ -Mutante weist zwar bei beiden Konstanten im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Werte auf, eine definitive Aussage ist jedoch aufgrund des großen Fehlers, dem diese Werte unterliegen, nicht

möglich. Ein eindeutiger Unterschied zu allen anderen Mutanten lässt sich bei der R115A $\alpha$ -Mutante feststellen, deren  $K_M$ -Wert bei lediglich 2,5 % desjenigen des Wildtyps liegt. Die katalytische Konstante  $k_{kat}$  dieser Mutante liegt nahezu bei Null mit einem Fehlerbereich von  $\pm 0,4$  % des  $k_{kat}$ -Wertes des Wildtyps.

Bei Betrachtung der  $K_{M,i}$ - und  $k_{kat,i}$ -Werte wird deutlich, dass die  $K_{M,i}$ -Werte der G127F/G128F $\alpha$ - und der R115A $\alpha$ -Mutante erheblich niedriger ausfallen als diejenigen der übrigen Mutanten. Eine Analyse der übrigen  $K_{M,i}$ - und der  $k_{kat,i}$ -Werte der verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms erscheint aufgrund der hohen Fehler, mit denen diese behaftet sind, wenig sinnvoll.

Die Analyse der Enzymkinetik der verschiedenen Mutanten des 20S Proteasoms beim Abbau des fluorogenen Tetrapeptids machte deutlich, dass die Mutanten bei denen die beiden Glycine 127 und 128 der  $\alpha$ -Untereinheiten gegen Alanin bzw. Phenylalanin ausgetauscht wurden eine deutlich geringere Aktivität aufweisen als der Wildtyp. Selbiges gilt für die R115A $\alpha$ -Mutante. Aufgrund der räumlichen Trennung dieser Aminosäuren vom aktiven Zentrum kann davon ausgegangen werden, dass sich der Einfluss dieser Aminosäurereste auf die Substrattranslokation auswirkt.



## 5 DISKUSSION

Das 20S Proteasom ist ein zylinderförmiger proteolytischer Enzymkomplex, aufgebaut aus einem Stapel von vier Ringen, bestehend aus je sieben Untereinheiten. Die beiden äußeren Ringe werden aus  $\alpha$ -, die beiden inneren aus  $\beta$ -Untereinheiten gebildet. Der Komplex ist von einem zentralen Kanal durchzogen, der sich an den Kontakten der vier Ringe zu drei Kammern ausweitet. In der zentralen Kammer befinden sich die katalytisch aktiven Zentren, die aus den N-terminalen Threoninen 1 der  $\beta$ -Untereinheiten bestehen.

Während die atomare Struktur einer Vielzahl von 20S Proteasomen aus unterschiedlichen Organismen gelöst wurde und der grundlegende katalytische Mechanismus der Proteolyse weitgehend geklärt ist, liegen bislang keine detaillierten Kenntnisse die Translokation von Substraten betreffend vor. Die genaue Funktion der Vorkammern ist ebenfalls nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* gebildet, bei denen die entfalteten Modellsubstrate Cytochrom c bzw. GFP im Inneren inaktivierter 20S Proteasomen zurückgefaltet und somit am Austritt gehindert wurden. Die anschließende Untersuchung dieser Komplexe mittels einer Vielzahl biochemischer und biophysikalischer Methoden ermöglichte die Analyse der Lokalisation der Substratmoleküle innerhalb der 20S Proteasomen, der Stöchiometrie der „Host-Guest“ Komplexe und der strukturellen Änderungen im 20S Proteasom während der Substrattranslokation. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

### 5.1 Expression und Isolierung des 20S Proteasoms und GFPs

Die rekombinante Überexpression und die Isolierung des Wildtyps und der Mutanten des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* in *E.coli* verlief in allen Fällen erfolgreich (siehe Kapitel 4.2). Der *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) und der Vektor pRSET5a erwiesen sich als ideales stabiles Expressionssystem, da *E.coli* kein eigenes Proteasom enthält und die 20S Proteasomen aus *Thermoplasma acidophilum* und dessen Mutanten in ausreichenden Ausbeuten stabil exprimiert werden konnten. Bei Induktion der Expression mit IPTG in LB-Medium wurden 1 mg (Schüttelkolben) bis 2 mg (Fermenter) reinen Proteins pro Liter Kultur gewonnen. Diese Ausbeute konnte durch Verwendung von ZY-5052 Vollmedium und Autoinduktion bei der Expression der Mutanten des 20S Proteasoms auf 3 bis 5 mg reines Protein pro Liter Kultur erhöht werden.

GFP wurde unter Verwendung des Vektors pTrc99a im *E.coli* Stamm KY2266 mit Induktion durch IPTG exprimiert. Hierbei handelte es sich nicht um den Wildtyp aus *Aequoria Victoria*, sondern um die so genannte Cycle 3-Mutante (F99S, M153T,

V163A) [Crameri, *et al.*, 1996]. Zusätzlich weist die hier exprimierte Sequenz die Mutation Q80R auf, die keinerlei Einfluss auf die Eigenschaften des GFP hat und in den meisten cDNA-Konstrukten des GFP vorhanden ist [Chalfie, *et al.*, 1994]. Die Cycle 3 Mutante von GFP ist im Gegensatz zum Wildtyp in *E.coli* bei 37 °C exprimierbar und hat eine vergleichsweise geringere Tendenz zur Aggregation [Fukuda, *et al.*, 2000]. Dieses System erwies sich mit Ausbeuten von ca. 3,7 mg reinem Protein pro Liter Kultur als sehr geeignet (siehe Kapitel 4.3).

## 5.2 Herstellung der „Host-Guest“ Komplexe

Eine Voraussetzungen zur erfolgreichen Bildung der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP ist die Ent- und Rückfaltung der Substrate. Aus diesem Grunde wurden Vorversuche unternommen, in denen der Faltungszustand des jeweiligen Modellsubstrats unter den Bedingungen, die bei der Komplexbildung vorlagen, untersucht wurde. Im Falle von Cytochrom c konnte dies durch die Verschiebung des Maximums der charakteristischen Soret-Bande beobachtet werden. Diese verschiebt sich bei Entfaltung des Proteins in 2 M Guanidin-Hydrochlorid bei 60 °C um ca. 2 nm hin zu niedrigeren Wellenlängen und erreicht bei Rückfaltung nahezu den Wert des nativen Cytochrom c. Hierbei reicht zur Rückfaltung ein Abkühlen der Lösung auf Eis aus (siehe Kapitel 4.4.1). Beim GFP spiegelt sich der Faltungszustand in der Fluoreszenz wieder. Diese sinkt durch Inkubation bei 60 °C in 2 M Guanidin-Hydrochlorid auf Null ab und kann bei der anschließenden Rückfaltung zu 79 % wiedergewonnen werden. Hierzu ist die Abkühlung der Lösung auf Eis sowie eine Verdünnung der Lösung auf ein Zehntel der ursprünglichen Konzentration nötig (siehe Kapitel 4.4.2). Dies ermöglicht die Bildung von „Host-Guest“ Komplexen, bei denen entfaltetes Substrat innerhalb inaktiver 20S Proteasomen zurückgefaltet und somit am Austritt gehindert wird.

Die Bildung der „Host-Guest“ Komplexe der irreversibel inhibierten 20S Proteasomen verlief sowohl mit Cytochrom c, als auch mit GFP als Substrat erfolgreich. Bei der Gelfiltration im Anschluss an die Komplexbildung tritt während der Elution der 20S Proteasomen zusätzlich Absorption bei den jeweiligen Absorptionsmaxima der Substratmoleküle auf, während dies bei entsprechenden Kontrollen ohne Entfaltung der Substratmoleküle nicht der Fall ist (siehe Kapitel 4.6.1). Untermuert werden diese Ergebnisse durch die Analyse der „Host-Guest“ Komplexe mittels SDS-, nativ und blau nativ PAGE mit anschließender immunologischer Detektion der Substratmoleküle. Diese können in den „Host-Guest“ Komplexen eindeutig identifiziert werden, während sie in den Kontrollen nicht detektierbar sind (siehe Kapitel 4.7). Zudem beweist die spektroskopische Analyse der „Host-Guest“ Komplexe, dass die Substratmoleküle im gefalteten Zustand vorliegen (siehe Kapitel 4.8). Mit GFP als Substrat weisen die „Host-Guest“ Komplexe Extinktions- und Emissionsspektren analog zum Wildtyp GFP auf, das Absorptionsspektrum der Komplexe mit Cytochrom c enthält ein lokales Maximum analog zum nativen Cytochrom c.

Versuche zur Bildung von „Host-Guest“ Komplexen der inaktiven  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom c schlugen fehl, da die Proteasomen unter den bei der Komplexbildung herrschenden Bedingungen instabil sind. Dies wird im folgenden Kapitel näher diskutiert.

### 5.3 Instabilität der $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms

Bei Versuchen zur „Host-Guest“ Komplexbildung der inaktiven  $\Delta T1A\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms mit Cytochrom c stellte sich heraus, dass diese unter den Bedingungen, die bei der Komplexbildung herrschen, instabil zu sein scheint (siehe Kapitel 4.6.2). Bei der Gelfiltration des Ansatzes zur Komplexbildung konnte keine Elution des Substrats zusammen mit den 20S Proteasomen detektiert werden. Stattdessen wurde eine Spezies identifiziert, die bei höheren Volumina als die 20S Proteasomen von der Säule eluiert wird. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Fraktionen sind einige voll assemblierte 20S Proteasomen sowie eine Vielzahl anderer Partikel kleinerer Dimensionen zu erkennen, die vermutlich aus Bruchstücken der 20S Proteasomen bestehen. Einige Partikel scheinen aus nur zwei Ringen, andere aus einem und wieder andere aus noch kleineren Bestandteilen aufgebaut zu sein. Da auch in den Fraktionen, die die voll assemblierten 20S Proteasomen enthalten, keine zusätzliche Absorption beim charakteristischen Absorptionsmaximum von Cytochrom c auftritt und somit keine Komplexbildung stattgefunden hat, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante um 20S Proteasomen handelt, die weitaus weniger stabil sind als der Wildtyp. Möglicherweise handelt es sich um ein dynamisches Gleichgewicht zwischen voll assemblierten 20S Proteasomen und deren Bestandteilen. Substrate, die innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen zurückgefaltet werden, verlassen diese sobald die 20S Proteasomen disassemblieren. Konformationsänderungen in 20S Proteasomen, deren katalytisch aktives Zentrum Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheit mutiert wurde, konnten bereits röntgenkristallographisch nachgewiesen werden [Groll, *et al.*, 2003]. Die Struktur der T1G $\beta$ -Mutante des 20S Proteasoms aus *Archaeoglobus fulgidus* lässt im Vergleich zur Struktur des Wildtyps eine 4,5 Å breite Spalte zwischen den beiden  $\beta$ -Ringen erkennen. Die Kontaktflächen zwischen den  $\beta$ -Ringen sind strukturell weitgehend ungeordnet. Die Autoren dieser Arbeit begründen ihre Befunde mit der Tatsache, dass die T1G $\beta$ -Mutante aufgrund des fehlenden Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheit nicht in der Lage ist deren Propeptid abzuspalten und die vorliegende Spezies somit ein spätes Intermediat der Assemblierung darstellt. Die Ergebnisse mit der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante, die ohne Propeptid exprimiert wird, legte die Vermutung nahe, dass bereits die Abwesenheit des Threonin 1 eine Instabilität des Komplexes hervorruft. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, die bei der Analyse der Assemblierung des 20S Proteasoms aus *Rhodococcus erythropolis* gewonnen wurden (persönliche Kommunikation mit Dr. Susanne Witt). Dabei stellte sich heraus, dass Mutationen in der  $\beta$ - $\beta$ -Kontaktfläche zur Bildung von Halbproteasomen führen. Zudem nimmt das Threonin 1 der  $\beta$ -Untereinheiten bei diesen Mutanten eine sich vom Wildtyp unterscheidende Position ein. Dieser Effekt, jedoch mit vertauschter Ursache und

Wirkung, tritt möglicherweise auch bei der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante aus *Thermoplasma acidophilum* auf, bei der eine Mutation des aktiven Zentrums die Störung der  $\beta$ - $\beta$ -Kontaktfläche zur Folge haben könnte. Versuche zur Kristallisation der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante unter den Bedingungen, die beim Wildtyp und den „Host-Guest“-Komplexen zur erfolgreichen Bildung von Kristallen führten, schlugen fehl. Dies deutet ebenfalls auf eine sich vom Wildtyp unterscheidende Konformation dieser Mutante hin. Weitere Kristallisationsversuche bzw. elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalysen zur Untersuchung der Struktur der  $\Delta T1A\beta$ -Mutante wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt und stehen noch aus.

## 5.4 Mechanismus der Substrattranslokation ins 20S Proteasom

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenste biochemische und biophysikalische Methoden angewandt, um Einblicke in den Mechanismus der Substrattranslokation in das 20S Proteasom zu erhalten. In Eukaryonten übernehmen die regulatorischen 19S Kappenkomplexe die Erkennung und Entfaltung von ubiquitinierten Substraten und regulieren somit den Zugang zu den aktiven Zentren der 20S Proteasomen. Da jedoch in den Zellen auch 20S Proteasomen ohne die 19S Kappenkomplexe vorliegen und diese in der Lage sind nativ ungeordnete Substrate abzubauen [Liu, *et al.*, 2003], erscheint eine Regulation der Translokation in die 20S Proteasomen sehr wahrscheinlich. Selbiges gilt für 20S Proteasomen in Prokaryonten, bei denen Bindungen mit regulatorischen Komplexen schwer nachzuweisen sind und möglicherweise nur transient vorliegen [Wilson, *et al.*, 2000]. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Analysen der „Host-Guest“-Komplexe des irreversibel inhibierten 20S Proteasoms mit Cytochrom c und GFP und die Erkenntnisse, die sich daraus in Bezug auf die Substrattranslokation ins 20S Proteasom ergeben, diskutiert. Dabei wird zunächst auf die Stöchiometrie der „Host-Guest“-Komplexe eingegangen (Kapitel 5.4.1). Daraufhin wird die Lokalisation der Substrate innerhalb der 20S Proteasomen behandelt (Kapitel 5.4.2) und abschließend wird auf die strukturellen Änderungen eingegangen, die sich im 20S Proteasom während der Substrattranslokation vollziehen (Kapitel 5.4.3).

### 5.4.1 Stöchiometrie der „Host-Guest“-Komplexe

Zur Untersuchung der Stöchiometrie, in der 20S Proteasomen und Cytochrom c bzw. GFP in den jeweiligen „Host-Guest“-Komplexen vorliegen wurden diese mittels Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie analysiert (siehe Kapitel 4.11). Da die Komplexe unter Bedingungen, bei denen die Protein-Protein Wechselwirkungen erhalten bleiben, komplizierte, nicht interpretierbare Spektren mit überlappenden Peaks ergaben, wurden sie einer Tandem-Massenspektrometrie unterzogen. Dabei entstehen Spezies, von denen eine bzw. zwei  $\alpha$ -Untereinheiten abgespalten wurden. Bei beiden Spezies konnten maximal drei Cytochrom c und zwei GFP-Moleküle je 20S Proteasom detektiert werden. Der Anteil an 20S Proteasomen die Substrat enthalten ist bei der

Spezies nach Abspaltung zweier  $\alpha$ -Untereinheiten jedoch sehr gering. Durch Extrapolation auf die intakten „Host-Guest“ Komplexe ergäbe sich eine maximale Belegung der 20S Proteasomen mit vier Cytochrom c und drei GFP-Molekülen. Dies setzt jedoch voraus, dass eine symmetrische Verteilung der Substrate innerhalb der 20S Proteasomen vorliegt und die Abspaltung der ersten  $\alpha$ -Untereinheit gleichzeitig die Abspaltung eines Substrates bewirkt. Da die Aufnahme der Massenspektren und deren Analyse nicht Gegenstand dieser Arbeit war, werden die Spektren hier nicht weiter diskutiert.

#### 5.4.2 Lokalisation der Substrate innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalyse der negativ kontrastierten Proben (siehe Kapitel 4.9.1) lassen zusätzliche Masse innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP, nicht aber mit Cytochrom c erkennen. Vermutlich ist dies auf das geringere Volumen der Cytochrom c-Moleküle zurückzuführen, die im Gegensatz zu den deutlich größeren GFP-Molekülen ein zusätzliches Eindringen des Kontrastierungsmittels in die inneren Kammern der 20S Proteasomen zulassen. Bei der multivariaten statistischen Analyse der Proben, bei denen „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mit GFP und die zugehörigen Kontrollen in verschiedenen Verhältnissen gemischt wurden, resultierte jeweils ein Eigenvektor, der die An- bzw. Abwesenheit zusätzlicher Massen innerhalb der Kompartimente des 20S Proteasoms beschreibt. Das Mischungsverhältnis der Proben konnte durch Klassifizierung mittels dieses Eigenvektors nicht erhalten werden. Das Auftreten dieses Eigenvektors deutet jedoch darauf hin, dass es sich bei der zusätzlichen Masse innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe mit GFP nicht um ein Artefakt aus der Kontrastierung handelt. Um störende Einflüsse des Kontrastierungsmittels zu umgehen wurden die Proben zusätzlich in vitrifiziertem Eis eingebettet. Die Anwesenheit zusätzlicher Masse innerhalb der Kammern des 20S Proteasoms in den „Host-Guest“ Komplexen konnte hiermit, sowohl mit GFP, als auch mit Cytochrom c als Substrat, verifiziert werden (siehe Kapitel 4.9.2). Die genaue Lokalisation der Substrate innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe ließ sich aufgrund der geringen Auflösung des vorliegenden Datensatzes mit dieser Methode jedoch nicht bestimmen. Multivariate statistische Analyse und Klassifizierung der negativ kontrastierten „Host-Guest“ Komplexe mit GFP weisen tendenziell auf eine asymmetrische Lokalisation der Substratmoleküle im 20S Proteasom hin. Ein einwandfreier Beweis ist jedoch nicht möglich, da störende Einflüsse des Kontrastierungsmittels nicht ausgeschlossen werden können.

Bei der röntgenkristallographischen Untersuchung der „Host-Guest“ Komplexe (siehe Kapitel 4.10) konnte zusätzliche Elektronendichte innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen detektiert werden. Es handelt sich jedoch um unzusammenhängende Dichtewolken und eine Zuordnung zu bestimmten Sequenzabschnitten der Substrate ist nicht möglich. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die Elektronendichte der Substratmoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Orientierung innerhalb der D7-symmetrischen 20S Proteasomen im Kristall herausmittelt.

Einen Hinweis auf asymmetrische Lokalisation der Substratmoleküle innerhalb der „Host-Guest“ Komplexe lieferte die Röntgenkleinwinkelstreuung (siehe Kapitel 4.12). Während die Streukurven der „Host-Guest“ Komplexe mit Cytochrom c sich nicht von denen des nativen und des inhibierten 20S Proteasoms unterscheiden und größtenteils dem Kurvenverlauf der aus der Röntgenkristallstruktur berechneten Streukurve entsprechen, ist dies bei den „Host-Guest“ Komplexen des 20S Proteasoms mit GFP nicht der Fall. Die erhaltenen Daten wurden mit den theoretischen Streukurven verschiedener Modelle, die aus den Röntgenkristallstrukturen des 20S Proteasoms und des GFPs berechnet wurden, verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die berechnete Streukurve eines Modells mit einem GFP-Molekül in einer der Vorkammern des 20S Proteasoms am besten mit den experimentell ermittelten Daten zur Deckung gebracht werden konnte. Somit deuten die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung auf eine asymmetrische Verteilung der GFP-Moleküle innerhalb der 20S Proteasomen hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten deutlich hervorgeht, dass sich die Substrate bei den „Host-Guest“ Komplexen in den Kammern der 20S Proteasomen befinden. Sowohl die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalyse, als auch diejenigen der Röntgenkleinwinkelstreuung lassen auf eine eher asymmetrische Verteilung der Substrate innerhalb der Kammern der 20S Proteasomen schließen. Eine eindeutige Aussage ist jedoch nicht möglich.

### 5.4.3 Strukturelle Änderungen des 20S Proteasoms bei der Translokation

Die Untersuchung der „Host-Guest“ Komplexe des 20S Proteasoms mittels elektronenmikroskopischer Einzelpartikelanalyse (siehe Kapitel 4.9) und Röntgenkleinwinkelstreuung (siehe Kapitel 4.12) ergab, dass sich die Gesamtstruktur der 20S Proteasomen im Komplex nicht von derjenigen des nativen Proteins unterscheidet. Die Röntgenkristallstruktur (siehe Kapitel 4.10) ermöglichte jedoch die Identifikation einzelner Aminosäuren, deren Orientierung im „Host-Guest“ Komplex von derjenigen im nativen 20S Proteasom abweicht.

Die beiden Glycine G 127 und G 128 der  $\alpha$ -Untereinheiten, die sich in den Loops befinden, die die Pore in den  $\alpha$ -Ringern flankieren, könnten möglicherweise eine Rolle beim *Gating* in das 20S Proteasom spielen. Im „Host-Guest“ Komplex sind sie im Vergleich zur nativen Struktur der 20S Proteasomen nach oben hin verschoben und leicht verdreht. Die Aktivität beim Abbau des synthetischen, fluorogenen Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC durch die Mutanten, bei denen jeweils eine der beiden Aminosäuren gegen Alanin oder Phenylalanin ausgetauscht wurde, unterscheidet sich nicht wesentlich von derjenigen des Wildtyps (siehe Kapitel 4.13). Durch Austausch beider Glycine gegen Alanin ist jedoch eine etwas reduzierte Aktivität zu verzeichnen. Eine deutlich reduzierte Aktivität liegt vor, wenn beide Glycine gegen Phenylalanine ausgetauscht werden. Die Formeln zur Bestimmung der kinetischen Konstanten aus den

Koeffizienten der nichtlinearen Regression scheinen für die G127F/G128F $\alpha$ -Mutante nicht ohne weiteres anwendbar zu sein. Die MICHAELIS-Konstante, die als Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit definiert ist, sollte für diese Mutante nach Abb. 4.54 eher einen kleineren Wert annehmen als für die übrigen Mutanten und den Wildtyp. Der erhaltene Wert ist jedoch nahezu 2,5-mal so groß wie derjenige des Wildtyps und mit einem relativen Fehler von 56 % behaftet. Ähnlich verhält es sich mit der katalytischen Konstante  $k_{\text{kat}}$ . Die Anwendung der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik setzt voraus, dass der einfachste Fall einer enzymatisch katalysierten Reaktion (siehe Abb. 2.8) vorliegt, bei der Enzym und Substrat einen Komplex bilden, der anschließend unter Freisetzung des Enzyms und Bildung des Produkts zerfällt. Beim hier untersuchten Abbau von Substraten durch das 20S Proteasom ist dies jedoch nicht der Fall, da zusätzlich zur Proteolyse die Translokation der Substrate in Betracht gezogen werden muss. Trotz des großen räumlichen Abstands der mutierten Aminosäuren von den katalytisch aktiven Zentren des 20S Proteasoms ist ein deutlicher Einfluss der Mutationen auf die Aktivität festzustellen. Dies legt nahe, dass es sich bei der Substrattranslokation um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt und ermöglicht eine indirekte Untersuchung der Substrattranslokation durch Bestimmung der Aktivität. Eine Interpretation der kinetischen Konstanten scheint jedoch aufgrund der Abweichungen von den Voraussetzungen der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik nicht möglich. Inwieweit die verringerte Aktivität der Doppelmutanten der beiden Glycine auf ein gestörtes *Gating* zurückzuführen ist, oder ob es sich lediglich um sterische Hinderung des Substratzugangs in das 20S Proteasom handelt bleibt noch zu klären.

Ein weiterer signifikanter Unterschied der Röntgenkristallstruktur der „Host-Guest“-Komplexe mit Cytochrom c im Vergleich zum nativen 20S Proteasom liegt in der Orientierung des Arginin 115 der  $\alpha$ -Untereinheiten. Dieses befindet sich an der inneren Oberfläche der Vorkammern des 20S Proteasoms. Während die Seitenkette des Arginin 115 in der Röntgenkristallstruktur des Wildtyps in die Vorkammer hineinragt, bildet es in der Röntgenkristallstruktur der „Host-Guest“-Komplexe mit Cytochrom c Wasserstoffbrücken mit den Aminosäureresten des Serin 95 und Glutamat 99 der  $\alpha$ -Untereinheit aus. Dies führt zu einer drastischen Änderung des elektrostatischen Potentials an den inneren Oberflächen der Vorkammern des 20S Proteasoms. Während sich die negativen und positiven Ladungen im nativen 20S Proteasom weitestgehend ausgleichen ist in den „Host-Guest“-Komplexen die Oberfläche, die aus den  $\beta$ -Untereinheiten besteht und zur zentralen Kammer weist deutlich positiv, diejenige, die aus  $\alpha$ -Untereinheiten besteht und aus dem 20S Proteasom heraus weist deutlich negativ geladen. Da die Substrate des 20S Proteasoms, entfaltete Proteine, hauptsächlich hydrophob sind, stellt diese Generierung einer geladenen Oberfläche in den Vorkammern möglicherweise einen molekularen Mechanismus dar, der die Substrattranslokation in das 20S Proteasom kontrolliert indem die Translokation weiterer Substrate verhindert wird. Die proteolytische Aktivität beim Abbau des Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC der Mutante des 20S Proteasoms, bei der Arginin 115

der  $\alpha$ -Untereinheiten gegen Alanin ausgetauscht wurde, ist im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert (siehe Kapitel 4.13). Eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivität besitzen dahingegen 20S Proteasomen, bei der jeweils einer der potentiellen Wasserstoffbrückenbindungspartner in ein Alanin mutiert wurde. Die kinetischen Konstanten der R115A $\alpha$ -Mutante  $K_M$  und  $k_{kat}$  fallen deutlich geringer aus, als beim Wildtyp und allen anderen Mutanten des 20S Proteasoms. Da die ermittelten Werte jedoch nach Gleichung (2.3) mit  $n = 2$  berechnet wurden und diese sich als inadäquat zur Näherung der experimentellen Daten herausstellte, ist eine Interpretation der kinetischen Konstanten in diesem Fall nicht sinnvoll. Im Übrigen gelten hier dieselben Einschränkungen in Bezug auf die Anwendbarkeit der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik wie bei der Diskussion der kinetischen Konstanten der G127F/G128F $\alpha$ -Mutante. Es bleibt jedoch festzustellen, dass sich die Aktivität dieser Mutante definitiv von derjenigen des Wildtyps unterscheidet und dass dieser Unterschied aufgrund der großen räumlichen Distanz zwischen dem aktiven Zentrum und der Position des Arginin 115 aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine Störung der Substrattranslokation zurückzuführen ist. Der Austausch eines der potentiellen Wasserstoffbrückenbindungspartner gegen Alanin hat keinerlei Einfluss auf die Aktivität beim Abbau des Tetrapeptids. Vermutlich ist der Austausch von Serin 95 und Glutamat 99 nötig um einen Einfluss auf die Aktivität auszuüben. Untersuchungen mit Doppel- und Tripelmutanten stehen jedoch noch aus.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die Anwesenheit von Substrat innerhalb der 20S Proteasomen strukturelle Änderungen einiger Seitenketten des 20S Proteasoms zur Folge hat. Die beiden Glycine 127 und 128 der  $\alpha$ -Untereinheiten spielen möglicherweise eine Rolle beim *Gating* in das 20S Proteasom und Arginin 115 der  $\alpha$ -Untereinheiten fungiert eventuell als molekularer Schalter um die Substrattranslokation in das 20S Proteasom zu regulieren. Die Analyse verschiedener Mutanten, bei denen die genannten Aminosäuren gezielt ausgetauscht wurden, untermauert diese Hypothese, da bei ihnen eine deutlich geringere Aktivität festgestellt werden konnte.

## 5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Einblicke in die Vorgänge während der Translokation von Substraten in das 20S Proteasom gewonnen. Aufgrund der erlangten Daten konnte eine Hypothese über den Mechanismus der Substrattranslokation und die daran maßgeblich beteiligten Aminosäurereste aufgestellt werden. Um diese zu verifizieren sind im weiteren Verlauf des Projekts verschiedene Experimente geplant.

So soll die Bildung von „Host-Guest“ Komplexen des 20S Proteasoms auf weitere Modellsubstrate erweitert werden, um den Einfluss der Größe des Substrats auf dessen Translokation zu analysieren und sicherzustellen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um allgemeine Mechanismen der Translokation handelt, die unabhängig vom verwendeten Substrat Gültigkeit haben.

Zudem soll der Versuch unternommen werden, die Substrattranslokation mittels elektronenmikroskopischer Einzelpartikelanalyse mit goldmarkierten Substraten weiter zu untersuchen. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten mit der Insulin B-Kette [Wenzel und Baumeister, 1995] sollen hier jedoch Substrate im Größenbereich nativer Substrate untersucht werden, da bei ihnen potentielle regulatorische Effekte vermutlich eher eine Rolle spielen als bei kleineren Substraten.

Zur Untersuchung der Kräfte, die bei der Translokation von Substraten in das 20S Proteasom auftreten, sollen 20S Proteasomen immobilisiert und im AFM (*atomic force microscope*) mit Spitzen, an die Substrate gebunden sind, untersucht werden.

Methoden zur Untersuchung von Einzelmolekülen, wie SNOM (*scanning nearfield optical microscopy*) und konfokale Mikroskopie, haben sich bereits als sehr erfolgreich bei der Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen erwiesen [Ishijima und Yanagida, 2001]. Im Rahmen dieses Projekts sollen diese Methoden zur Untersuchung der Vorgänge bei der Substrattranslokation eingesetzt werden. Erste Versuche zur Fluoreszenzmarkierung des 20S Proteasoms und der Substrate wurden bereits unternommen.

Es konnten einige Aminosäuren identifiziert werden, die eine mögliche Rolle bei der Translokation von Substraten in das 20S Proteasom spielen. Erste enzymkinetische Untersuchungen verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms beim Abbau eines fluorogenen, synthetischen Tetrapeptids wurden bereits durchgeführt. Die Ausweitung dieser Untersuchungen auf weitere Mutanten und fluoreszenzmarkierte Substrate im Größenbereich nativer Substrate verspricht weitergehende Erkenntnisse in Bezug auf die Mechanismen der Substrattranslokation ins 20S Proteasom. Parallel dazu soll die Röntgenkristallstruktur der „Host-Guest“ Komplexe weiter verfeinert werden um weitere potentielle strukturelle Einflüsse der Substratbindung zu identifizieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mechanistischen Untersuchungen erwiesen sich als geeignet Einblicke in den komplexen Vorgang der Substrattranslokation in ein solch großes System wie das 20S Proteasom zu gewinnen. Möglicherweise lassen sich diese Methoden auch zur Analyse weiterer Transportvorgänge in molekularen Maschinen anwenden.



## 6 LITERATUR

- Akiyama, S., Takahashi, S., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Nishikawa, Y. und Fujisawa, T. (2002). Conformational landscape of cytochrome c folding studied by microsecond-resolved small-angle x-ray scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1329-1334.
- Amann, E., Ochs, B. und Abel, K. J. (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**, 301-315.
- Babul, J. und Stellwagen, E. (1972). Participation of the protein ligands in the folding of cytochrome c. *Biochemistry* **11**, 1195-1200.
- Bardsley, W. G., Leff, P., Kavanagh, J. und Waight, R. D. (1980). Deviations from Michaelis-Menten Kinetics - the Possibility of Complicated Curves for Simple Kinetic Schemes and the Computer Fitting of Experimental-Data for Acetylcholin-Esterase, Acid-Phosphatase, Adenosine-Deaminase, Arylsulfatase, Benzylamine Oxidase, Chymotrypsin, Fumarase, Galactose Dehydrogenase, Beta-Galactosidase, Lactate-Dehydrogenase, Peroxidase and Xanthine-Oxidase-D. *Biochemical Journal* **187**, 739-765.
- Barlow, G. H. und Margoliash, E. (1966). Electrophoretic behavior of mammalian-type cytochromes c. *J Biol Chem* **241**, 1473-1477.
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L. und Pfeifer, G. (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett* **241**, 239-245.
- Baumeister, W. und Lupas, A. (1997). The proteasome. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 273-278.
- Baumeister, W. und Steven, A. C. (2000). Macromolecular electron microscopy in the era of structural genomics. *Trends Biochem Sci* **25**, 624-631.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. und Seemüller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Biswanger, H. (2002). *Enzyme Kinetics, Principles and Methods* (Weinheim, Wiley-VCH)

Blundell, T. L. und Johnson, L. N. (1976). Protein Crystallography (London, Academic Press)

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Brannigan, J. A., Dodson, G., Duggleby, H. J., Moody, P. C., Smith, J. L., Tomchick, D. R. und Murzin, A. G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416-419.

Brejci, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M. und Remington, S. J. (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2306-2311.

Brenner, S. und Horne, R. W. (1959). A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta* **34**, 103-110.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

Coux, O., Tanaka, K. und Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801-847.

Craiu, A., Gaczynska, M., Akopian, T., Gramm, C. F., Fenteany, G., Goldberg, A. L. und Rock, K. L. (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* **272**, 13437-13445.

Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. und Stemmer, W. P. (1996). Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* **14**, 315-319.

Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R. und Baumeister, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. *FEBS Lett* **251**, 125-131.

Dick, L. R., Cruikshank, A. A., Grenier, L., Melandri, F. D., Nunes, S. L. und Stein, R. L. (1996). Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* **271**, 7273-7276.

Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D. H. und Groll, M. (1998). Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J Mol Biol* **279**, 1187-1191.

- Drenth, J. (1999). Principles of protein x-ray crystallography, Second edition edn (New York, Springer-Verlag)
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. und Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* **21**, 129-228.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **6**, 1948-1954.
- Enoki, S., Saeki, K., Maki, K. und Kuwajima, K. (2004). Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. *Biochemistry* **43**, 14238-14248.
- Felderer, K. (2002) Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum*, Diplomarbeit, Technische Universität München, München.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Fukuda, H., Arai, M. und Kuwajima, K. (2000). Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. *Biochemistry* **39**, 12025-12032.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. und Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788.
- Goldberg, A. L., Gaczynska, M., Grant, E., Michalek, M. und Rock, K. L. (1995). Functions of the proteasome in antigen presentation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 479-490.
- Grimm, R., Koster, A. J., Ziese, U., Typke, D. und Baumeister, W. (1996). Zero-loss energy filtering under low-dose conditions using a post-column energy filter. *Journal of Microscopy-Oxford* **183**, 60-68.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. und Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**, 1062-1067.
- Groll, M., Brandstetter, H., Bartunik, H., Bourenkow, G. und Huber, R. (2003). Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes. *J Mol Biol* **327**, 75-83.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. und Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463-471.

Groll, M. und Huber, R. (2003). Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 606-616.

Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B. und Kopp, F. (1991). Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett* **290**, 186-190.

Harter, C. und Wieland, F. (1996). The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochim Biophys Acta* **1286**, 75-93.

Hegerl, R. (1996). The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy. *J Struct Biol* **116**, 30-34.

Heinemeyer, W. (2000). Active sites and assembly of the 20S proteasome. In *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*, W. Hilt und D. H. Wolf, (Georgetown, Eureka.com/Landes Biosciences), pp. 48-70

Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. und Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**, 25200-25209.

Hilt, W. und Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* **21**, 96-102.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* **30**, 405-439.

Horwitz, J. P., Chua, J., Noel, M., Donatti, J. T. und Freisler, J. (1966). Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates. *J Med Chem* **9**, 447.

Huffman, H. A., Sadeghi, M., Seemuller, E., Baumeister, W. und Dunn, M. F. (2003). Proteasome-cytochrome c interactions: a model system for investigation of proteasome host-guest interactions. *Biochemistry* **42**, 8679-8686.

Hughes, A. L. (1997). Evolution of the proteasome components. *Immunogenetics* **46**, 82-92.

Isacson, U. und Wettermark, G. (1974). Chemiluminescence in Analytical-Chemistry. *Analytica Chimica Acta* **68**, 339-362.

Ishijima, A. und Yanagida, T. (2001). Single molecule nanobioscience. *Trends Biochem Sci* **26**, 438-444.

Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H. und Yura, T. (1997). Synergistic roles of HslVU and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma32 and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 7219-7225.

Kisselev, A. F., Songyang, Z. und Goldberg, A. L. (2000). Why does threonine, and not serine, function as the active site nucleophile in proteasomes? *J Biol Chem* **275**, 14831-14837.

Knipfer, N. und Shrader, T. E. (1997). Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **25**, 375-383.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Liu, C. W., Corboy, M. J., DeMartino, G. N. und Thomas, P. J. (2003). Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* **299**, 408-411.

Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.

Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. und Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* **128**, 82-97.

Ludtke, S. J. und Chiu, W. (2003). Focal pair merging for contrast enhancement of single particles. *J Struct Biol* **144**, 73-78.

Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**, 491-497.

McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem* **189**, 1-23.

Nelson, M. und McClelland, M. (1992). Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol* **216**, 279-303.

Nettleton, E. J., Sunde, M., Lai, Z., Kelly, J. W., Dobson, C. M. und Robinson, C. V. (1998). Protein subunit interactions and structural integrity of amyloidogenic transthyretins: evidence from electrospray mass spectrometry. *J Mol Biol* **281**, 553-564.

Omura, S., Fujimoto, T., Otoguro, K., Matsuzaki, K., Moriguchi, R., Tanaka, H. und Sasaki, Y. (1991). Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J Antibiot (Tokyo)* **44**, 113-116.

Osmulski, P. A. und Gaczynska, M. (2000). Atomic force microscopy reveals two conformations of the 20 S proteasome from fission yeast. *J Biol Chem* **275**, 13171-13174.

Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. und Piston, D. W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**, 2782-2790.

- Pickart, C. M. und VanDemark, A. P. (2000). Opening doors into the proteasome. *Nat Struct Biol* **7**, 999-1001.
- Pühler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Müller, S., Engel, A., Hegerl, R. und Baumeister, W. (1992). Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *Embo J* **11**, 1607-1616.
- Rechsteiner, M., Realini, C. und Ustrell, V. (2000). The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* **345 Pt 1**, 1-15.
- Reid, B. G. und Flynn, G. C. (1997). Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**, 6786-6791.
- Robinson, C. V. (2005). Watching and weighting--chaperone complexes in action. *Nat Methods* **2**, 331-332.
- Ruepp, A., Eckerskorn, C., Bogyo, M. und Baumeister, W. (1998). Proteasome function is dispensable under normal but not under heat shock conditions in *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* **425**, 87-90.
- Ruprecht, J. und Nield, J. (2001). Determining the structure of biological macromolecules by transmission electron microscopy, single particle analysis and 3D reconstruction. *Prog Biophys Mol Biol* **75**, 121-164.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231.
- Seemüller, E., Lupas, A. und Baumeister, W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* **382**, 468-471.
- Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Löwe, J., Huber, R. und Baumeister, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-582.
- Sharon, M., Witt, S., Felderer, K., Rockel, B., Baumeister, W. und Robinson, C. V. (2005). 20S proteasomes keep substrates in store for continual degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, eingereicht.
- Sobott, F., Hernandez, H., McCammon, M. G., Tito, M. A. und Robinson, C. V. (2002). A tandem mass spectrometer for improved transmission and analysis of large macromolecular assemblies. *Anal Chem* **74**, 1402-1407.

Spector, T. (1978). Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem* **86**, 142-146.

Stein, R. L., Melandri, F. und Dick, L. (1996). Kinetic characterization of the chymotryptic activity of the 20S proteasome. *Biochemistry* **35**, 3899-3908.

Stout, G. H. und Jensen, L. H. (1989). X-ray Structure Determination, a Practical Guide, 2nd edition edn (New York, John Wiley & Sons)

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-234.

Svergun, D., Barberato, C. und Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography* **28**, 768-773.

Svergun, D. I. und Koch, M. H. (2002). Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 654-660.

Svergun, D. I. und Koch, M. H. J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports on Progress in Physics* **66**, 1735-1782.

Svergun, D. I., Petoukhov, M. V. und Koch, M. H. (2001). Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys J* **80**, 2946-2953.

Svergun, D. I., Volkov, V. V., Kozin, M. B. und Stuhrmann, H. B. (1996). New developments in direct shape determination from small-angle scattering .2. Uniqueness. *Acta Crystallographica Section A* **52**, 419-426.

Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R. und Baumeister, W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol* **5**, 766-774.

Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L. und Goldberg, A. L. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem* **261**, 15197-15203.

Taylor, K. A. und Glaeser, R. M. (1974). Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science* **186**, 1036-1037.

Thess, A., Hutschenreiter, S., Hofmann, M., Tampe, R., Baumeister, W. und Guckenberger, R. (2002). Specific orientation and two-dimensional crystallization of the proteasome at metal-chelating lipid interfaces. *J Biol Chem* **277**, 36321-36328.

Tito, M. A., Tars, K., Valegard, K., Hajdu, J. und Robinson, C. V. (2000). Electrospray time-of-flight mass spectrometry of the intact MS2 virus capsid. *Journal of the American Chemical Society* **122**, 3550-3551.

van Heel, M. und Frank, J. (1981). Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy* **6**, 187-194.

van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E. V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M. und Patwardhan, A. (2000). Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Q Rev Biophys* **33**, 307-369.

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-619.

Walther, D., Cohen, F. E. und Doniach, S. (2000). Reconstruction of low-resolution three-dimensional density maps from one-dimensional small-angle X-ray solution scattering data for biomolecules. *Journal of Applied Crystallography* **33**, 350-363.

Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A. J. und Baumeister, W. (1998). 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol* **121**, 19-29.

Wang, W. Y. und Malcolm, B. A. (1999). Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange (TM) site-directed mutagenesis. *Biotechniques* **26**, 680-682.

Wenzel, T. und Baumeister, W. (1995). Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat Struct Biol* **2**, 199-204.

Wilm, M. und Mann, M. (1996). Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* **68**, 1-8.

Wilson, H. L., Ou, M. S., Aldrich, H. C. und Maupin-Furlow, J. (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**, 1680-1692.

Witt, S. und Baumeister, W. (2002). Proteasomes: Molecular Machines for Protein Degradation. In Biopolymers, A. Steinbüchel und S. R. Fahnenstock, (Weinheim, Wiley-VCH), pp. 439-464

Yang, F., Moss, L. G. und Phillips, G. N., Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246-1251.

Zwickl, P., Grziwa, A., Pühler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F. und Baumeister, W. (1992). Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for the

structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry* **31**, 964-972.

Zwickl, P., Kleinz, J. und Baumeister, W. (1994). Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol* **1**, 765-770.

Zwickl, P., Ng, D., Woo, K. M., Klenk, H. P. und Goldberg, A. L. (1999). An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. *J Biol Chem* **274**, 26008-26014.



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen herzlich bedanken, die durch ihre Hilfe und Unterstützung zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Wolfgang Baumeister danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit unter optimalen Bedingungen in seiner Abteilung durchführen zu können sowie für die großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am MPI für Biochemie, Martinsried, gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Susanne Witt für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, ihre kontinuierliche Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft, die Auswertung der röntgenkristallographischen Daten, die kritische Durchsicht dieser Arbeit, jede Menge Kekse, viel Spaß im Labor und vor allem ihre Freundschaft.

Bei Frau Dr. Beate Rockel möchte ich mich für die Betreuung und Unterstützung bei der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalyse, die Einführung in die Programme EM und EMAN, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und zahlreiche hilfreiche Diskussionen bedanken.

Frau Oana Mihalache danke ich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie, die Aufnahme von Bildmaterial und ihre Geduld beim Kampf mit den 20S Proteasomen in Eis.

Frau Mirjam Beuttler danke ich für elektronenmikroskopische Aufnahmen und zahlreiche Diskussionen.

Herrn Dr. Reiner Hegerl danke ich für seine Hilfe in allen Fragen rund um das EM-Programm und die Einzelpartikelanalyse.

Herrn Dr. Peter Zwickl danke ich für die Bereitstellung des GFP-Plasmids und für zahlreiche Ratschläge und Anregungen.

Herrn Dr. Dmitri Svergun und Herrn Dr. Manfred Rössle von der EMBL Outstation, Hamburg, danke ich für ihre Unterstützung bei der Aufnahme der SAXS-Daten und deren Auswertung.

Ehmke Pohl, Clemens Schulze-Briese und Joachim Diez an der Swiss Light Source, Villigen, Schweiz, danke ich für ihre Unterstützung bei der Aufnahme röntgenkristallographischer Daten.

Frau Dr. Michal Sharon aus der Arbeitsgruppe von Carol V. Robinson, Department of Chemistry, University of Cambridge, UK, danke ich für die Aufnahme und Auswertung von Massenspektren.

Herrn Dr. Matthew Groves von der EMBL Outstation, Hamburg, danke ich für die Auswertung röntgenkristallographischer Daten.

Bei meinen Praktikanten Kathleen Kintzel, Manuela Unsin und Carolin Fleischer bedanke ich mich für ihre Hilfe.

Frau Birgit Book und Frau Sabina von Polenz danke ich für die freundliche Hilfe in Bürokratiefragen und die Gummibären neben dem Faxgerät.

Den Mitarbeitern der Werkstatt, Rudolf Gatz, Thomas Matthes und Manfred Baumgartner danke ich für die schnelle Reparatur von Geräten aller Art und ihre Hilfe beim Projekt Fahrrad.

Thomas Weiss, Susanne Nakata, Elke Glasmacher, Sarah Breuer und Roland Knispel danke ich für das angenehme Arbeitsklima und ihren hohen Unterhaltungswert.

Verena Zinsberger, Tanja Zinsberger und meiner „großen Schwester“ Martina Werner danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit.

Meine Eltern danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotion.

Meiner Freundin Tanja danke dafür, dass sie mir in allen Phasen meiner Arbeit stets motivierend und verständnisvoll zu Seite stand.