

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

Strukturelle Charakterisierung von *Thermoplasma acidophilum*
mittels Kryo-Elektronentomographie

Christine Kofler

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. H. Kessler
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Die Dissertation wurde am 24.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 26.10.2006 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vi
Abstract	vii
1 Einleitung	1
1.1 Die Archaea	1
1.2 <i>T. acidophilum</i> als Modellorganismus	2
1.3 Das Genom und Proteom von <i>T. acidophilum</i>	5
1.4 Cytoskelettähnliche Strukturen in <i>T. acidophilum</i>	7
1.5 Zielsetzung und Fragestellung	8
2 Elektronenmikroskopie und Tomographie	11
2.1 Transmissionselektronenmikroskopie	11
2.1.1 Aufbau eines Transmissions-Elektronenmikroskopes	11
2.1.2 Wechselwirkungen zwischen hochenergetischen Elektronen und Materie	16
2.1.3 Das Streuproblem	16
2.1.4 Elastische Streuung	18
2.1.5 Inelastische Streuung	19
2.2 Kontrastentstehung im Elektronenmikroskop	21
2.2.1 Der Abbildungsprozess	21
2.2.2 Kontrastübertragungsfunktion, Phasen- und Amplitudenkontrast . .	22
2.2.3 Streuabsorptionskontrast	23
2.3 Präparation von biologischen Proben	23
2.3.1 Negativkontrastierung	24
2.3.2 Kryo-Präparation	24
2.3.3 Strahlschädigung vitrifizierter Proben	25
2.4 Kryo-Elektronentomographie	27
2.4.1 Projektionstheorem, Crowther-Kriterium	27
2.4.2 Tomographische Rekonstruktion	30
2.4.3 Limitationen bei der Elektronentomographie	32
2.4.4 Automatisierte Datenaquisition	34
3 Charakterisierung von <i>T. acidophilum</i>	35
3.1 Einführung	35
3.2 Material und Methoden	37

3.2.1	Kultur von <i>T. acidophilum</i> unter aeroben Bedingungen	37
3.2.2	Flüssigkultur von <i>T. acidophilum</i> bei anaeroben Bedingungen und Überdruck	38
3.2.3	Untersuchungen im Thermomikroskop	38
3.2.4	Vorbehandlung der Zellen für die Kryo-Präparation	39
3.2.5	Kryo-Präparation von ganzen <i>T. acidophilum</i> Zellen	40
3.2.6	Datenaufzeichnung und Rekonstruktion von Kryo-Elektronentomogrammen	41
3.3	Ergebnisse und Diskussion	42
3.3.1	Einfluss der Temperatur auf die Zellgestalt	42
3.3.2	Einfluss der Kultivierung auf die Zellgestalt	42
4	Ein archaeales Aktin-Homolog aus <i>T.acidophilum</i>	51
4.1	Einführung	51
4.2	Material und Methoden	56
4.2.1	Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung	56
4.2.2	Immungold-Markierung an Dünnschnitten	57
4.2.3	Hetereologe Expression und Aufreinigung von Ta0583	57
4.2.4	Polymerisationsassays	58
4.2.5	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse	58
4.3	Ergebnisse	60
4.3.1	Filamente in Kryo-Elektronentomogrammen und Dünnschnitten von <i>T. acidophilum</i>	60
4.3.2	Immungold-Markierung an Dünnschnitten von <i>T. acidophilum</i> -Zellen	64
4.3.3	Ta0583 in <i>T. acidophilum</i>	64
4.3.4	Polymerisationsassays mit Ta0583	66
4.3.5	Biochemische Charakterisierung von Ta0583	67
4.3.6	Kristallstruktur von Ta0583	69
4.4	Diskussion	72
5	Auftrennung von cytosolischen Proteinen mittels FFE	75
5.1	Einführung	75
5.2	Theorie der FFE	77
5.3	Material und Methoden	79
5.3.1	Präparation des Zellysats für die FFE	79
5.3.2	FFE	80
5.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	81
5.3.4	Massenspektrometrie	82
5.3.5	Dot-Blot	82
5.3.6	Bestimmung der proteolytischen Aktivität des 20S Proteasoms	83
5.3.7	Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung	83
5.4	Ergebnisse und Diskussion	84
5.4.1	IEF des Zellysats	85
5.4.2	Detektion von bekannten Proteinkomplexen	87
5.4.3	Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Fraktionen	89
5.4.4	Massenspektrometrische Analyse von Fraktion 55	92

5.4.5	Homologievergleich und Strukturvergleich der OTCase aus <i>T. acidophilum</i> mit archaealen OTCasen	94
6	Visualisierung von Makromolekülen im zellulären Kontext	97
6.1	Einführung	97
6.2	Grundlagen der Mustererkennung	100
6.2.1	Erzeugung von Referenzen aus atomaren Strukturen	100
6.2.2	Die <i>T. acidophilum</i> -Proteinbibliothek	101
6.2.3	Mustererkennung mittels der lokal normierten Korrelationsfunktion	107
6.3	Material und Methoden	109
6.3.1	Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung	109
6.4	Ergebnisse und Diskussion	113
6.4.1	Mustererkennung in <i>T. acidophilum</i>	113
6.4.2	Identifikation makromolekularer Proteinkomplexe im zellulären Kontext	115
6.4.3	Einzelpartikel-Analyse der detektierten Partikel	117
6.4.4	Proteinatlas von <i>T. acidophilum</i>	118
7	Ausblick	123
	Abkürzungen	128
	Physikalische Konstanten	130
	Literaturverzeichnis	131
	Danksagung	152

Zusammenfassung

Ein Ziel der molekularen Strukturbiologie ist die Bereitstellung eines Proteinatlas, der Information über die räumliche Anordnung, die Konzentration und die Interaktionen von Proteinkomplexen in ihrer natürlichen ungestörten Umgebung enthält. Da nur im zellulären Kontext die Funktionen und die zugrunde liegenden Mechanismen, welche das Zusammenspiel der Makromoleküle steuern, verstanden werden können, benötigt man möglichst wenig-invasive Untersuchungsmethoden mit einer Auflösung im Nanometerbereich. Die zelluläre Kryo-Elektronentomographie ist momentan die einzige Abbildungstechnik, die es ermöglicht, dreidimensionale (3D) hochaufgelöste Einblicke in die supramolekulare Architektur von vitrifizierten Zellen *in toto* zu geben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden intakte Zellen des Archaeons *Thermoplasma acidophilum* mittels Kryo-Elektronentomographie untersucht mit dem Ziel, einen makromolekularen Atlas der Zelle zu erstellen.

Ein limitierender Faktor in der Elektronentomographie sind die Abmessungen des zu untersuchenden Objektes in Durchstrahlungsrichtung. Zudem reduziert die intrinsisch hohe Proteindichte im Cytoplasma (*Macromolecular Crowding*) den Bildkontrast, was die Identifikation einzelner Makromoleküle in der Rekonstruktion mit dem momentanen Stand der Technik erschwert bzw. unmöglich macht. Deshalb wurde *T. acidophilum* bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen kultiviert, um die geeignetste Morphologie für die tomographische Datenaufzeichnung und nachfolgende Mustererkennung zu finden. Es wurden anaerobe Bedingungen gefunden, unter denen sich zum Teil besonders flache Zellen ausbildeten. Bei diesen Studien wurden in mehreren Tomogrammen von *T. acidophilum* Bündel von Filamenten innerhalb der Zelle beobachtet. Datenbanksuchen lieferten einige potentielle Kandidaten im Genom von *T. acidophilum*, die solche filamentöse Strukturen ausbilden könnten. Unter anderem auch das Protein Ta0583, ein archaeales Aktin-Homolog, welches mittels Elektro-

nenmikroskopie und Röntgenstrukturanalyse weiter charakterisiert wurde.

T. acidophilum bietet sich als Modellsystem an, um mittels Kryo-Elektronentomographie und Mustererkennung die makromolekulare Architektur der Zelle zu untersuchen, da bereits mehrere Proteinstrukturen aus diesem Organismus bekannt sind und zusätzliche Informationen aus Genom- und Proteomanalyse verfügbar sind. Mit Hilfe der *Free-Flow* Elektrophorese wurden cytoplasmatische Proteine aus *T. acidophilum*, gemäß ihres isoelektrischen Punktes in zahlreiche Fraktionen aufgetrennt und anschließend elektronenmikroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert. Mit dieser Vorgehensweise wurde ein in *T. acidophilum* noch unbekannter hochmolekularer Proteinkomplex, die Ornithin Transcarbamoylase, gefunden. Dieser Proteinkomplex, bzw. die Struktur des homologen Proteins aus *Pyrococcus furiosus*, sowie das 70S Ribosom, das Thermosom und drei Proteasen (20S Proteasom, Tricorn und VAT) wurden mit Hilfe eines Mustererkennungsalgorithmus, der auf Kreuzkorrelation beruht, anhand ihrer strukturellen Signatur im Tomogramm einer Zelle lokalisiert.

Abstract

One aim of molecular structural biology is to provide a macromolecular atlas that describes the spatial arrangements, concentrations and interactions of specific subsets of protein complexes in the unperturbed cellular environment. Such atlases would be most beneficial for analysing protein interaction networks in a cellular context. At present, cryo-electron tomography is the only available imaging technique capable of allowing a glimpse into the three-dimensional (3D) supramolecular architecture of vitrified cells *in toto* with a resolution in the nanometre range.

In this work, intact cells of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* were investigated by cryo-electron tomography with the objective of generating a protein atlas on a macromolecular level.

A limiting factor for electron tomography is the size of the investigated object. In addition, the intrinsic high protein density within the cytoplasm ('macromolecular crowding') reduces the image contrast, which hampers the identification of single macromolecules in the tomographic reconstructions using state-of-the-art techniques. For this reason, *T. acidophilum* was cultured under various growth conditions to obtain the most suitable morphology for recording tomographic data and for subsequent template matching. Cells grown under anaerobic conditions turned out to be particularly flat. During these studies, filaments forming bundles inside the cell could be observed in several tomograms. Databank searches revealed multiple potential candidates in the genome of *T. acidophilum* that could be responsible for such filamentous structures, including the protein Ta0583, an archaeal actin homolog, which was further characterised by electron microscopy and by X-ray crystallography.

T. acidophilum is well suited as a model system to study the macromolecular architecture of the cell with cryo-electron tomography and pattern recognition, since several protein struc-

tures have been solved from this organism. Other benefits include the completely sequenced genome and ongoing proteomics studies. To carry out structural proteomic analysis on *T. acidophilum*, cell lysates were fractionated using free-flow electrophoresis. This technique separates the cytoplasmic proteins into numerous fractions according to their respective isoelectric points. Single fractions were then investigated by electron microscopy and mass spectrometry. With this approach, it was possible to identify the hitherto unknown macromolecular protein complex ornithine carbamoyltransferase in *T. acidophilum*. The structure of the homologous protein from *Pyrococcus furiosus*, as well as the 70S ribosome, the thermosome and three proteases (20S proteasome, tricorn and VAT) were mapped inside the tomogram of an intact cell by means of a pattern recognition algorithm based on cross correlation.

1. Einleitung

1.1 Die Archaea

Die Archaeen (früher Archaeobakterien genannt) wurden erst Ende der siebziger Jahre anhand von RNA-Sequenzvergleichen von Carl Woese als eigenständige Domäne, neben den Bacteria und Eukarya, eingeführt [Woese und Fox 1977]. Sie wurden früher wegen ihres Erscheinungsbilds den Bacteria zugeordnet. Die Archaea nehmen eine Sonderstellung unter den Lebewesen ein, da sie sowohl Gemeinsamkeiten mit den Eukarya, als auch mit den Bacteria aufweisen [Howland 2000]. Archaeen haben, wie es für Prokaryoten typisch ist, keinen membranumschlossenen Zellkern, sondern die DNA liegt als ringförmiges Chromosom im Cytoplasma vor. Sie besitzen kein Endomembransystem und keine energieliefernden Organellen wie Mitochondrien oder Chloroplasten. Einige weitere Merkmale grenzen die Archaea von den beiden anderen Domänen ab, wie z.B. der Aufbau ihrer Zellwand oder ihrer Plasmamembran. Diese bestehen nicht aus Peptidoglykan, wie bei den Bakterien, sondern aus dem Peptidoglykananalogon Pseudopeptidoglykan. Die Membranlipide der Archaea enthalten veretherte Isoprenyl-Seitenketten anstelle von veresterten Fettsäuren, was als Schutz vor den meist extremen Lebensbedingungen diskutiert wird [Kates 1993]. Ähnlichkeiten zu den Eukarya zeigen die Archaea vor allem in der Informationsprozessierung, wie der Transkription, Translation und Replikation [Olsen und Woese 1997, Saito und Tomita 1999]. Die Archaea verwenden wie auch die Eukaryoten bei der Transkriptionsinitiation eine TATA-Box, wodurch die Homologie der archaealen und eukaryotischen Transkriptionsmaschinerien verdeutlicht wird [Langer *et al.* 1995]. Mit den Bacteria hingegen teilen die Archaea Merkmale wie die geringe Größe, ein zirkuläres Chromosom und eine fehlende Zellkompartimentierung. Außerdem zeigen beide Domänen die kompakte Organisation von Genen in Operons oder Clustern [Keeling *et al.* 1994], sowie erstaunliche Ähnlichkeiten in vielen zentralen Stoffwechselwegen und Transportproteinen [Kates 1993].

Die meisten bekannten Vertreter der Archaea bewohnen extreme Lebensräume wie heiße

Quellen, schwarze Raucher oder Salzseen. Archaeen, die bei Temperaturen über 85°C vorkommen, werden als hyperthermophil bezeichnet. Mesophile Arten gedeihen in einem Temperaturbereich zwischen 20°C und 45°C. Psychrophile (kälteliebende) Archaeen weisen ihr optimales Wachstum unter 20°C auf. Halophile Arten wachsen in salzreichen Habitaten, zum Teil benötigen sie Salzkonzentrationen nahe der Sättigung [Larsen und Grant 1989]. Methanogene Archaeen produzieren Methan unter anaeroben Bedingungen. Archaeen, die bei niederen pH-Werten gedeihen, werden als acidophil bezeichnet. Die Domäne der Archaea lässt sich in vier Reiche unterteilen: die Korarchaeota, die Crenarchaeota, die Euryarchaeota und die kürzlich entdeckten Nanoarchaeota (vgl. Abb. 1.1). Die Korarchaeota zweigen im phylogenetischen Dendrogramm in der Nähe der Wurzel ab. Diese hyperthermophilen Mikroorganismen wurden in sehr heißen Quellen gefunden. Bislang scheiterten alle Versuche zur Kultivierung dieser Organismen. Sie konnten nur auf molekularbiologischer Ebene, durch 16S rRNA Analyse, identifiziert werden [Pace 1997]. Das Reich der Crenarchaeota enthält sowohl hyperthermophile, wie *Thermoproteus*, *Sulfolobus* und *Pyrodictium*, als auch psychrophile Archaea. Das Reich der Euryarchaeoten besteht aus acht Ordnungen: Methanopyrales, Methanococcales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Thermococcales, Archaeoglobales, Thermoplasmatales und Halobacteriales. Organismen der Euryarchaeota sind vornehmlich methanogen, wie *Methanococcus*-*Methanobacterium* und *Methanosarcina*, und halophil, wie *Halococcus* und *Halobacterium*. *Thermoplasma*, *Ferroplasma* wie auch *Picrophilus* gehören zu den Thermoplasmatales, die innerhalb der Euryarchaeota ihre eigene Ordnung bilden. Zwei Arten von *Thermoplasma*, *Thermoplasma acidophilum* (*T. acidophilum*) und *Thermoplasma volcanium*, sind bekannt [Seegerer *et al.* 1988]. Im Jahre 2002 wurden die Archaea um ein neues Phylum, der Nanoarchaeoten, erweitert [Huber *et al.* 2002]. Die bisher einzige bekannte Art *Nanoarchaeum equitans* wächst symbiotisch auf *Ignicoccus islandicus*. Momentan stellen die winzigen, kokkenförmigen Organismen, mit einem Zelldurchmesser von nur 400 nm, die kleinste bekannte Archaeen-Art dar. Mit einer Genomgröße von 490 kbp bewegen sich diese Zellen am unteren theoretischen Limit für zelluläre Mikroorganismen [Huber *et al.* 2003].

1.2 *T. acidophilum* als Modellorganismus

T. acidophilum, ein thermophiles sowie azidophiles Archaeon, wurde erstmals aus Proben isoliert, die aus wärmeproduzierenden Kohleabraumhalden entnommen wurden [Darland *et al.* 1970]. Das Wachstum erfolgt im Temperaturbereich von 37 - 65°C, im pH-

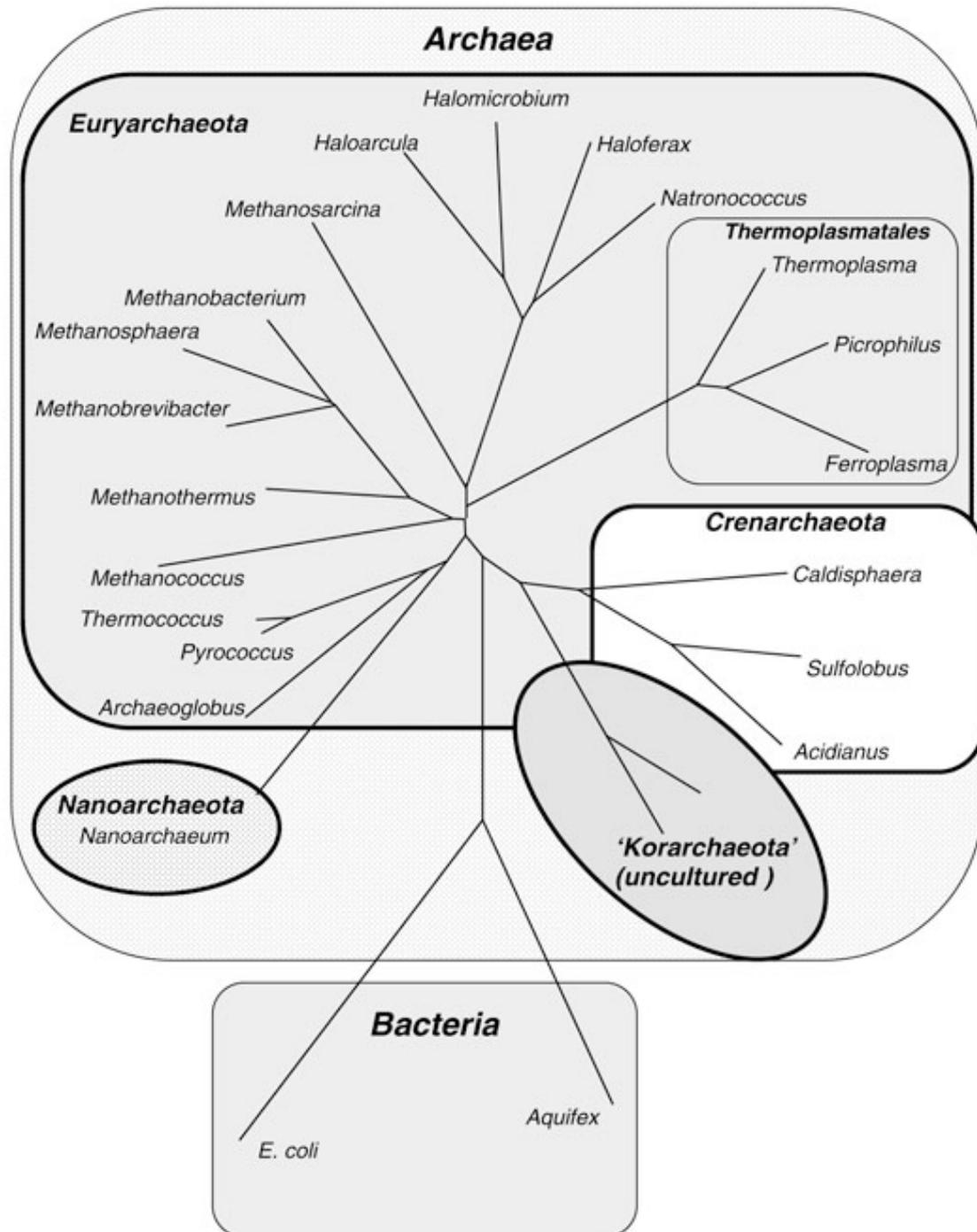


Abbildung 1.1: Phylogenetischer Stammbaum der Archaeen basierend auf dem Sequenzvergleich von 16S rRNA [Golyshina und Timmis 2005].

Bereich von pH 0.5 bis pH 4.5 und bei Temperaturen um 59°C [Belly *et al.* 1973], bei einem pH-Wert von pH 1.5 optimal [König und Stetter 1989, Madigan *et al.* 2001]. In der Nähe des neutralen pH-Wertes lysieren die Zellen [Smith *et al.* 1973]. Der Organismus ist fakultativ anaerob, d.h. er benutzt Sauerstoff für die Zellatmung, kann aber auch unter anaeroben Bedingungen durch Schwefelatmung wachsen. In morphologischer Hinsicht ähnelt *T. acidophilum* den Mycoplasmen, da es keine Zellwand besitzt. Der Organismus wird von einer einzigen 5 - 10 nm dicken, dreischichtigen Plasmamembran umgeben. Trotz des Fehlens einer starren Zellwand sind manche *T. acidophilum*-Zellen mit einem Flagellum ausgestattet (vgl. Abb. 1.2) und beweglich [Black *et al.* 1979]. Um den extremen Bedingungen von hoher Temperatur und hohem Säuregehalt zu widerstehen, haben die Zellen eine Plasmamembran mit besonderer chemischer Struktur entwickelt. Die Membran beinhaltet Tetraetherlipide, die Mannose- und Glukoseeinheiten enthalten, und Glykoproteine. Der hydrophobe Teil der Lipide baut sich aus isoprenoiden, langkettigen und gesättigten Kohlenwasserstoffen auf. Die Etherbindungen sind bei extremen pH-Werten sehr stabil. *T. acidophilum* wurde aus heißen Quellen in Japan [Yasuda *et al.* 1995a], Solfatare-Feldern¹ in Italien, marinen hydrothermalen Systemen im Atlantik [Seegerer *et al.* 1988] und selbsterhitzenden Kohleabraumhalden in den Vereinigten Staaten [Darland *et al.* 1970] isoliert. Im Kohleabfall sind Kohlefragmente, Pyrit und organische Substanzen enthalten. Die organischen Verbindungen werden im Stoffwechsel des heterotrophen Mikroorganismus umgesetzt.

T. acidophilum zeichnet sich dadurch aus, dass Makromoleküle, die an der Proteinsynthese, an der Faltung und am Proteinabbau beteiligt sind, in ähnlicher Form auch in höher entwickelten Organismen wieder zu finden sind. Einige dieser Proteinkomplexe sind in ihrer Quartärstruktur hoch konserviert, während die Komplexität der Zusammensetzung der Untereinheiten zunimmt. Deshalb stellen sie ein ideales Modellsystem für die Erforschung komplexer Systeme von hochentwickelten Lebewesen dar. So besteht z.B. das 20S Proteasom, ein aus 28 Untereinheiten aufgebautes, tonnenförmiges, proteolytisches Makromolekül von *T. acidophilum* aus lediglich zwei verschiedenen Untereinheiten. Wohingegen das 20S Proteasom von *Rhodococcus erythropolis* (Bacteria) aus vier unterschiedlichen Untereinheiten gebildet wird und das eukaryotische 20S Proteasom aus 14 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist [Baumeister und Lupas 1997].

¹*solfatarata* lat. für Schwefelgrube

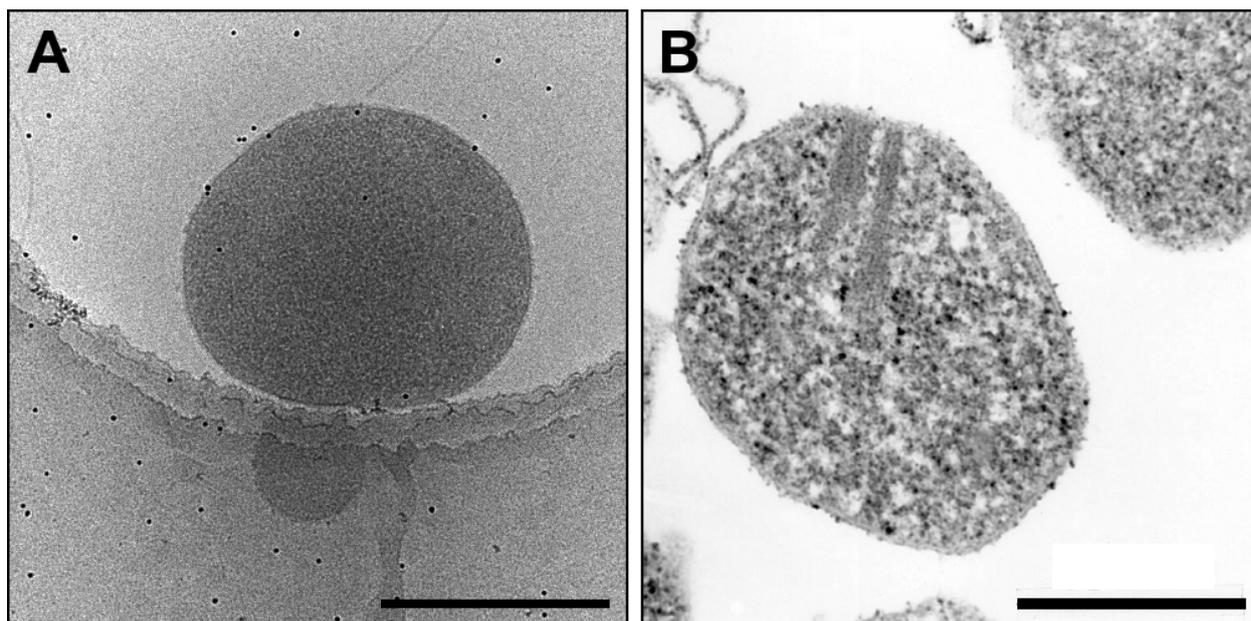


Abbildung 1.2: **A** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer eiseingebetteten *T. acidophilum*-Zelle des Stamms 122-1B2 (DSM 1782). Neben der Zelle sind ein Flagellum und 10 nm großen Goldmarker, die für die Alignment verwendet werden, zu erkennen. **B** Dünnschnitte von in Kunstharz eingebetteten *T. acidophilum*-Zellen des Stamms HO-10. Im Cytoplasma sind ausgedehnte „kristalline“ Strukturen zu erkennen (adaptiert nach [Yasuda *et al.* 1995a]). Der Balken entspricht jeweils 500 nm.

1.3 Das Genom und Proteom von *T. acidophilum*

Der Begriff Proteom wurde im Jahr 1994 von M. Wilkins *et al.* [Wilkins *et al.* 1996] geprägt. Er stellt das Gegenstück zu dem Begriff Genom (Gesamtheit aller Gene eines Organismus) dar und bezeichnet das zu einem bestimmten Zeitpunkt unter genau definierten Bedingungen vorkommende gesamte Proteinkomplement eines Organismus. Im Gegensatz zum statischen, gut definierten Genom ist das Proteom dynamisch, das sich abhängig von Zellzyklus, von Umwelteinflüssen (Nährstoffsituation, Temperatur, Druck, Stress etc.) oder vom Gewebetyp in höheren Organismen stark unterscheiden kann. Die Kenntnis über die Abfolge der Nukleotide in einem Genom gibt nur einen ersten Überblick über das funktionelle Potential eines Organismus. Um dieses auf molekularer Ebene zu verstehen, muss man sich auf das Niveau der Proteine begeben und diese in ihrer Gesamtheit studieren.

Das Genom von *T. acidophilum* des Stamms 122-1B2 (DSM² 1728) wurde im Jahr 2000 komplett sequenziert. Die 1507 offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) sind auf einem einzigen, 1.56 Mbp-langen, zirkulären Chromosom lokalisiert, die laut Vorhersage für 1482 Proteine kodieren. Der GC-Basenanteil der DNA liegt etwa bei 46% [Ruepp *et al.* 2000]. Obwohl in anderen *T. acidophilum*-Isolaten ein 15.2 kbp großes Plasmid gefunden wurde

²Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig-Stöckheim

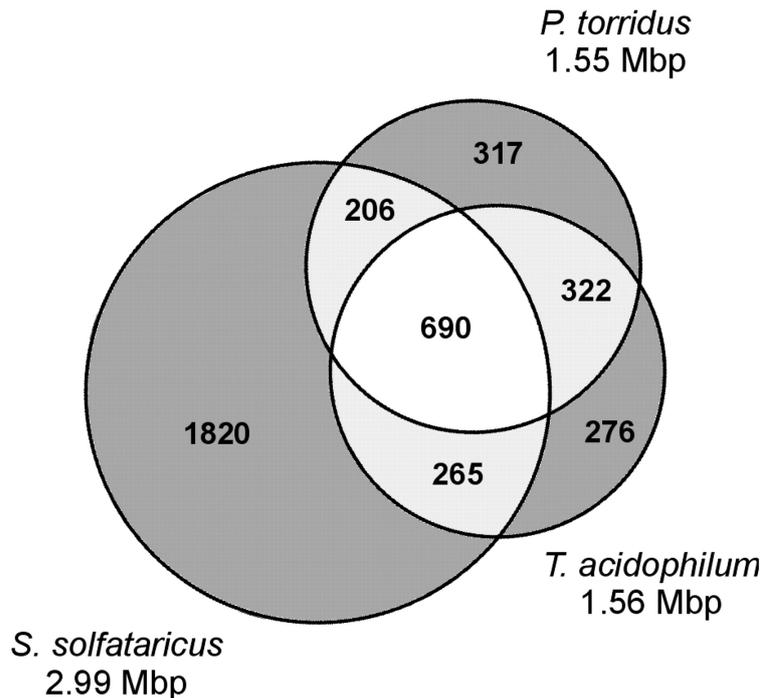


Abbildung 1.3: Häufigkeit von homologen ORFs in *T. acidophilum*, *P. torridus* und *S. solfataricus*. Die Fläche der Kreise ist proportional zu der Größe der Genome [Fütterer *et al.* 2004].

[Yasuda *et al.* 1995b], wurde im *T. acidophilum*-Stamm 122-1B2 keine extrachromosomale DNA detektiert. Über die Hälfte der Genomsequenz (55%) ist ähnlich zu annotierten Proteinen mit bekannter Funktion. Das Genom von *T. acidophilum* ist äußerst klein, was es interessant für die Proteomanalyse macht. Derzeit ist nur ein noch kleineres nichtparasitäres Genom bekannt, das von *Picrophilus torridus* [Fütterer *et al.* 2004]. Diese Mikroben zählen ebenfalls zur Ordnung der Thermoplasmatales und gedeihen bei einem pH-Wert um Null und bei Temperaturen von bis zu 65°C. Zwei Drittel aller Gene des *T. acidophilum*-Genoms sind homolog zum *P. torridus*-Genom (vgl. Abb. 1.3). Zudem zeigen die *T. acidophilum*-Gene eine erstaunlich hohe Homologie zu den Genen eines anderen, phylogenetisch entfernt verwandten Crenarchaeons, *Sulfolobus solfataricus* [Zillig *et al.* 1980], das in der selben ökologischen Nische wie *T. acidophilum* vorkommt. Die Funktion dieser homologen Gene, welche durch lateralen Gentransfer zwischen diesen Organismen ausgetauscht wurden [Nelson *et al.* 1999], betrifft weniger die grundlegenden Aufgaben in der Zelle, sondern vor allem ihre Fähigkeit zur Anpassung an diesen extremen Lebensraum [Ruepp *et al.* 2000]. Von besonderem Interesse ist auch die Tatsache, dass *T. acidophilum* ein großes Komplement an Genen besitzt, die bakteriellen Ursprungs sind.

Die Proteomik (*Proteomics*) beschäftigt sich mit der Auftrennung komplexer Proteingemische sowie deren anschließender Analyse. Das erste Standardwerkzeug für die Proteomanalyse, die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE), wurde bereits 1975 von J. Klose und P.H. O'Farrell entwickelt [O'Farrell 1975, Klose 1975]. Bei der 2DE werden zwei elektro-

phoretische Methoden kombiniert, die isoelektrische Fokussierung (IEF) und die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate* Polyacrylamid Gelelektrophorese). In der ersten Dimension werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) in einem in einer Gelmatrix immobilisierten pH-Gradienten [Bjellqvist *et al.* 1982] fokussiert. In der zweiten Dimension werden die fokussierten Proteine einer denaturierenden SDS-PAGE unterzogen, was eine Trennung nach der Größe (d.h. apparentes Molekulargewicht) bewirkt. Zur nachfolgenden Visualisierung der aufgetrennten Proteine stehen unterschiedliche Färbemethoden wie die Coomassie- oder Silberfärbung sowie auf Fluoreszenz basierende Farbstoffe zur Verfügung.

Die vollständige Entschlüsselung des Genoms von *T. acidophilum* im Jahre 2000 liefert die Grundlage für die aktuelle Proteomanalyse. Drei Viertel aller Gene kodieren für cytosolische Proteine [Ruepp *et al.* 2000]. Mit Hilfe von 2DE und MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry*) wurde das cytosolische Proteinkomplement von *T. acidophilum* unter aeroben Bedingungen in Flüssigkultur (59°C, pH 1.5) analysiert [Sun 2005]. Insgesamt wurden 272 cytosolische Proteine identifiziert, die mit dem Klassifizierungsschema der COGs (*clusters of orthologous groups of proteins*) Datenbank in funktionelle Gruppen eingeteilt wurden (vgl. Abb. 1.4). Es werden überwiegend Proteine exprimiert, die für die Energiegewinnung, den Protein-, DNA-, und RNA-Abbau sowie für die Biosynthese und für den Koenzymstoffwechsel benötigt werden.

1.4 Cytoskelettähnliche Strukturen in *T. acidophilum*

Inzwischen ist die Existenz eines Cytoskeletts in Bakterien etabliert und anerkannt [Møller-Jensen und Löwe 2005]. Über das Cytoskelett in Archaeen liegen aber nur Spekulationen und indirekte Beweise vor [Trent *et al.* 1997].

Im Genom von *T. acidophilum* wurde eine Sequenz gefunden, die in Zusammenhang mit einem Cytoskelett gebracht werden kann [Ruepp *et al.* 2000]. Ta1488 kodiert für ein cytosolisches Protein, mit „*coiled-coil*“ Strukturregionen. Dieses Protein wurde in allen sequenzierten Archaeen-Genomen gefunden und ist analog zu Proteinen aus denen intermediäre Filamente aufgebaut sind. *T. acidophilum*-Zellen sind nur von einer Plasmamembran umgeben, in ihrer Gestalt aber variabel. Das Fehlen einer starren Zellwand in *T. acidophilum* deutet auf die Existenz von stabilisierenden Elementen in der Zelle hin, welche ihre Gestalt aufrechterhalten und stützen. Zudem sind manche *T. acidophilum*-Zellen flagelliert (vgl. Abb. 1.2 A).

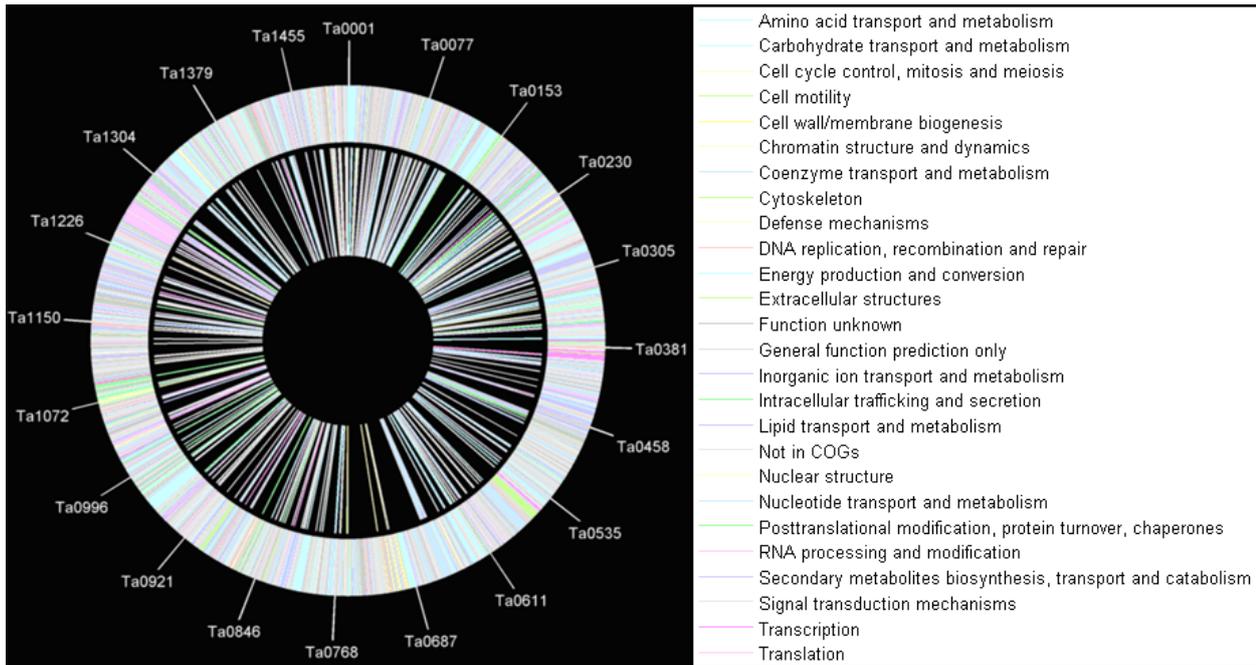


Abbildung 1.4: Gegenüberstellung der Verteilung der Protein-kodierenden Gene und der identifizierten Proteine von *T. acidophilum* in Kreisdarstellung. Von außen nach innen sind abgebildet: die fortlaufende Bezeichnung der vorhergesagten Gene, der äußere Ring stellt die Positionen der Gene auf dem Chromosom dar, die für Proteine kodieren und der innere Ring zeigt die Lage der identifizierten Proteine an. Die vorhergesagten Gene und die identifizierten Proteine sind nach dem Klassifizierungsschema der COGs (*clusters of orthologous groups of proteins*) Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) farblich markiert. Funktionelle Genkategorien sind in der Farblegende (rechts) aufgelistet [Sun 2005].

Der Mechanismus, der die Basalstruktur des Flagellums in der Membran verankert und in welche Struktur der Stator eingebettet ist, ist noch unklar. In der Literatur gibt es mehrere Hinweise dafür, dass in *T. acidophilum* Strukturen existieren, die einem Cytoskelett ähnlich sind. W.G. Hixon und D.G. Searcy [Hixon und Searcy 1993] entdeckten einen netzartigen Verbund aus Filamenten (10 nm im Durchmesser) in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, nachdem sie Zellextrakt von *T. acidophilum* zwei Stunden mit ATP inkubiert hatten. Yasuda *et al.* beschreiben intrazelluläre kristallartige Strukturen in Kunstharz eingebetteten Zellen von *T. acidophilum*-Isolaten aus heißen Quellen in Japan [Yasuda *et al.* 1995a], die möglicherweise in Verbindung mit der Zellteilung gebracht werden könnten (vgl. Abb. 1.2 B).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es, einzelne makromolekulare Proteinkomplexe in tomographischen Rekonstruktionen von intakten eiseingebetteten *T. acidophilum*-Zellen zu kartographieren. Voraussetzung dafür sind Tomogramme von hinreichend flachen Zellen, die

mit Hilfe eines Musterkennungsalgorithmus mit Referenzen von bekannten Proteinkomplexen wie z.B. dem Ribosom, dem Thermosom oder dem Proteasom korreliert werden können. Deshalb wurden der Einfluss von Temperatur, Sauerstoffgehalt, Druck, sowie adhärentem Wachstum auf die Zellmorphologie von *T. acidophilum* untersucht.

Die Proteinbibliothek der Referenzstrukturen von bereits vorhandenen Proteinkomplexen aus *T. acidophilum* sollte mit noch unbekanntem Proteinkomplexen erweitert werden. Dazu wurde Zellsat aus *T. acidophilum* mit der *Free-Flow* Elektrophorese separiert, die Fraktionen im Elektronenmikroskop strukturell charakterisiert und Proteine mit Massenspektrometrie identifiziert.

2. Elektronenmikroskopie und Tomographie

2.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) hat seinen Namen von seinem Abbildungsmodus. Es werden diejenigen Elektronen zur Abbildung genutzt, die das hinreichend dünne Präparat durchstrahlt haben. In der Materialwissenschaft können kristalline Proben mit einer Auflösung von etwa 0.1 nm abgebildet werden. Bei biologischen Materialien, wie Gewebe oder Zellen, die nicht periodisch aufgebaut sind, liegt die erreichbare Auflösung dagegen im Nanometerbereich.

2.1.1 Aufbau eines Transmissions-Elektronenmikroskopes

Seit der Entwicklung des Elektronenmikroskopes in den frühen 30er Jahren durch Ernst Ruska, Bodo von Borries, Max Knoll und Mitarbeitern hat sich am prinzipiellen Aufbau des Mikroskops, trotz zahlreichen Verbesserungen, nichts verändert. Im folgenden soll kurz auf die wesentlichen Elemente des Elektronenmikroskops (siehe Abb. 2.1), wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, eingegangen werden. Als Elektronenquelle dient eine Feldemissionskathode (*field emission gun*, FEG), die Elektronen hoher zeitlicher und örtlicher Kohärenz bei gleichzeitig großer Stromdichte und hoher Helligkeit emittiert. Die FEG besteht aus einem U-förmig gebogenen Wolframdraht, auf den ein orientierter Wolframkegel mit einer sehr feinen Spitze ($r < 100$ nm) aufgeschweißt ist. Versieht man die feine Spitze mit einem sehr hohen negativen Potential (Extraktionsspannung ~ 3.8 kV) gegenüber der Umgebung, entsteht an der Spitze ein extrem hohes elektrisches Feld (10^9 V/cm). Dadurch wird die Potentialbarriere für die Elektronen an der Oberfläche des Emitters herabgesetzt, und die Elektronen können die Spitze durchtunneln. Für die Bündelung der emittierten Elektronen werden zwei auf unterschiedlichem Potential liegende Anoden - Extraktions- und

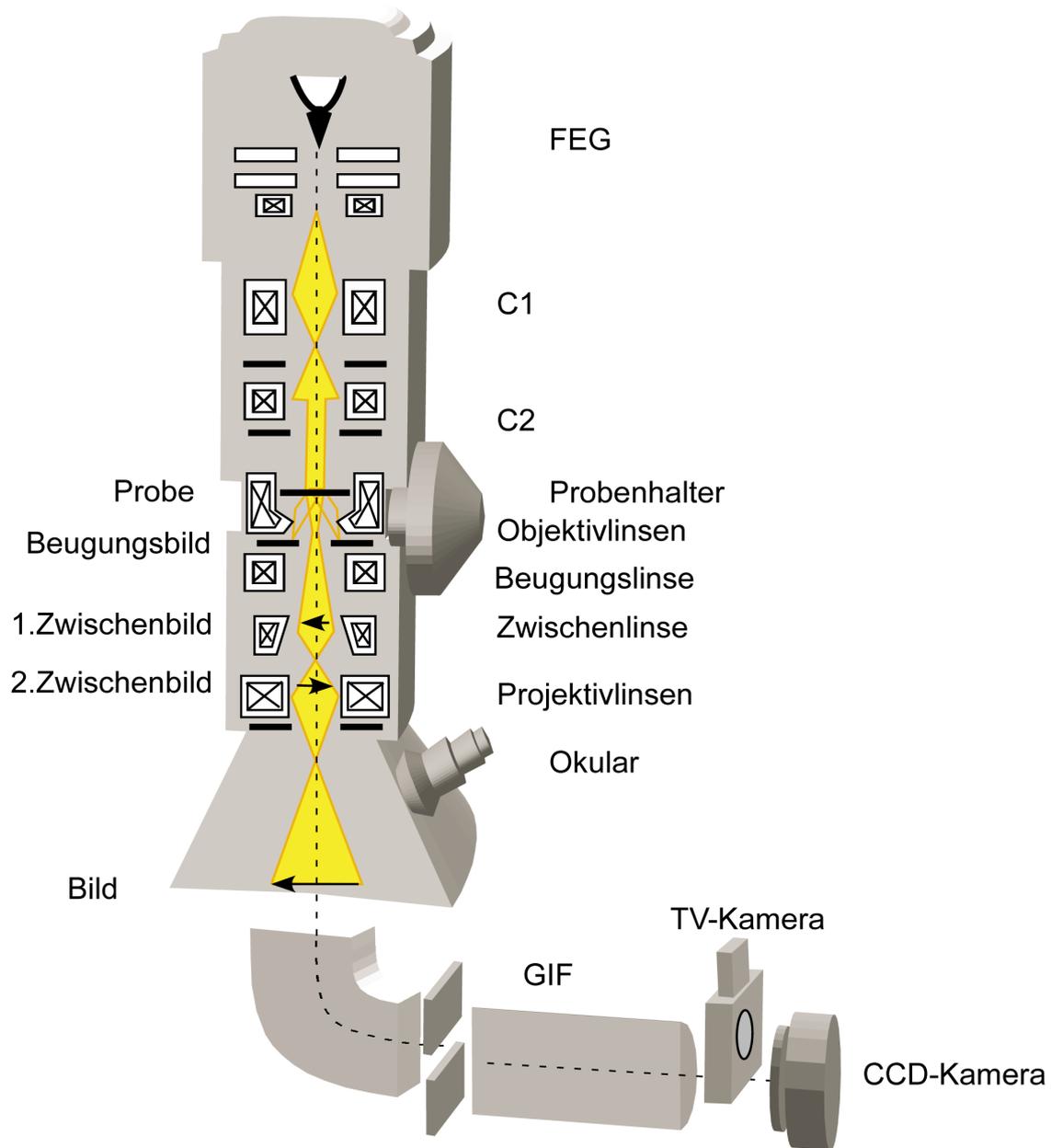


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau und Strahlengang des Phillips CM300 TEMs in Martinsried. Das Gerät ist mit einem *Post-Colum* Energiefilter und einer CCD Kamera ausgestattet [Schweikert 2004].

Beschleunigungselektroden - verwendet. Mit Hilfe der beiden Anoden wird der Elektronenstrahl auf einen Durchmesser von ca. 10 nm fokussiert. Der so erzeugte divergente Elektronenstrahl wird durch das Kondensorenliniensystem (C1 und C2) in die Objektebene auf die abzubildende Präparatstelle fokussiert, die annähernd parallel beleuchtet wird. Der Elektronenstrahl durchquert die Probe, wobei ein Teil der Elektronen mit den Atomen in der Probe wechselwirkt und dadurch gestreut wird. Stark gestreute Elektronen werden durch die Objektivblende, die sich hinter der Objektivlinse befindet, ausgeblendet und tragen somit zu einem erhöhten Bildkontrast bei. Die gestreuten und ungestreuten Elektronen interferieren und werden durch die Objektivlinse in der Bildebene in das erste Abbild der Probe umgesetzt. Die Abbildungsfehler der Objektivlinse (sphärische und chromatische Aberration) dominieren die Abbildungseigenschaften des ganzen Systems. Zusätzlich gibt es eine Beugungslinse, die nur im Beugungsmodus verwendet wird. Durch ein System von Zwischen- und Projektionslinsen wird dieses Bild zusätzlich vergrößert und auf einen Fluoreszenzschirm projiziert. Alternativ kann der Elektronenstrahl umgeleitet werden, damit die Elektronen auf einem Negativ oder auf einer CCD-Kamera (*charge coupled device*) abgebildet werden können.

Energiefilter

Der Elektronenstrahl besteht nach dem Durchqueren des Präparates aus Elektronen mit verschiedenen Energien. Aufgrund der chromatischen Aberration der Objektivlinse werden inelastisch und mehrfach gestreuten Elektronen in Abhängigkeit des durch die Streuung erfahrenen Energieverlustes in unterschiedlichen Ebenen fokussiert, was zu einer Verschmierung der Bildinformation führt. Durch die Verwendung eines Energiefilters (ein magnetisches Prisma) können die Elektronen gemäß ihrer Energie im Magnetfeld räumlich voneinander getrennt werden. Mittels einer beweglichen Schlitzblende können Elektronen aus bestimmten Energiebereichen für die Abbildung ausgewählt werden. Bei der Mikroskopie von eiseinbetteten biologischen Proben wird der Energiefilter hauptsächlich im *Zero-Loss*-Modus betrieben, um die Abbildungsqualität zu erhöhen [Grimm *et al.* 1996a, Grimm 1997]. Dabei werden die Elektronen mittels einer Blende innerhalb eines schmalen Energieintervalls (ca. 10 eV) um die Energie des Primärstrahls selektiert. Die *zero-loss*-gefilterte Abbildung beseitigt alle Elektronen, die mindestens einmal inelastisch gestreut wurden. Dadurch kommt es gegenüber dem ungefilterten Fall zu deutlich höherer Absorption, und es liegt somit ein größerer Anteil an Streuabsorptionskontrast im Bild vor. Gerade bei der Untersuchung von

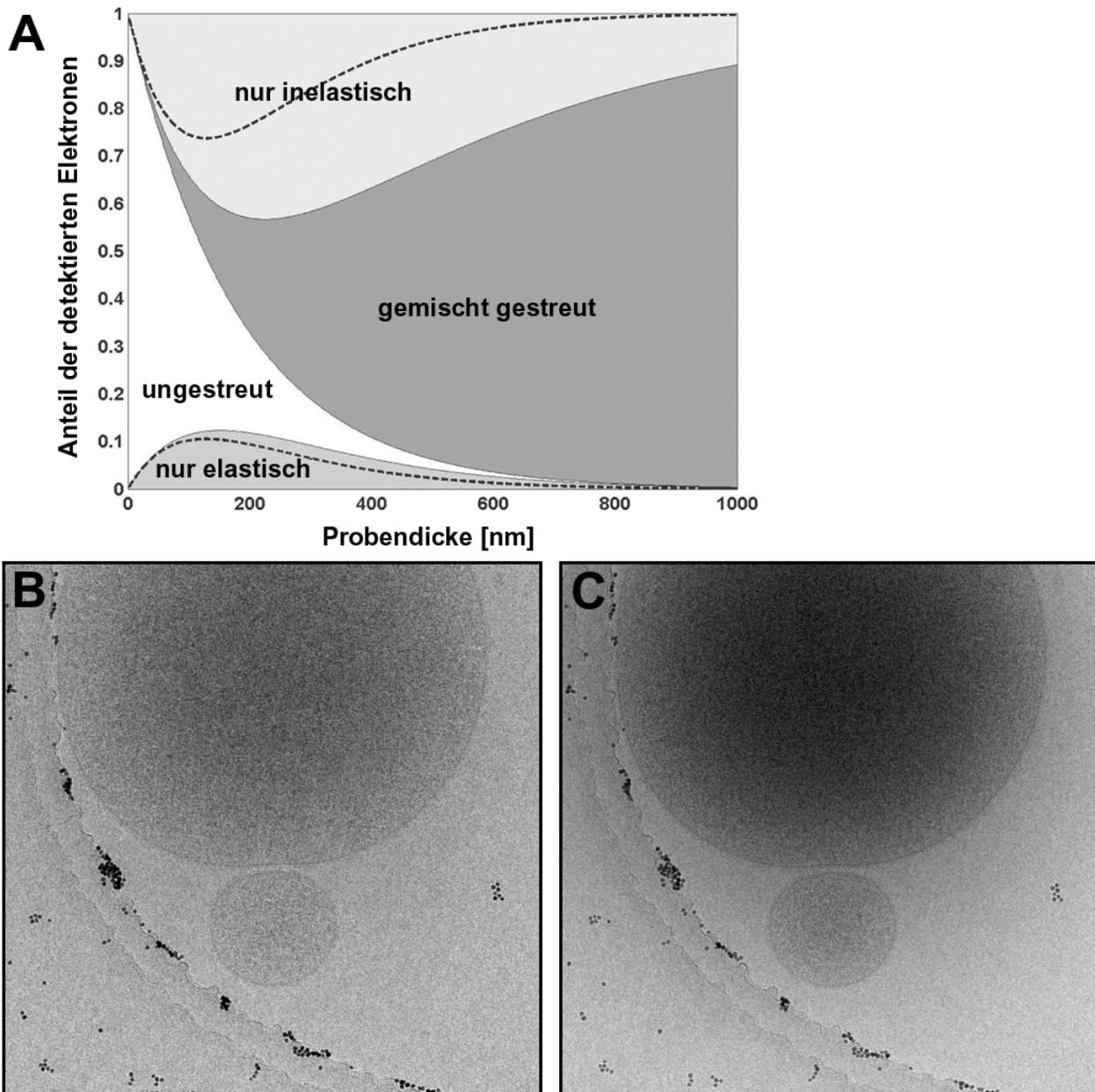


Abbildung 2.2: A Zu erwartende Anteile an ungestreuten, rein elastisch, rein inelastisch beziehungsweise gemischt gestreuten Elektronen im Strahl in Abhängigkeit von der Dicke einer Eisprobe bei 300 keV Beschleunigungsspannung (ohne Verwendung einer Objektivblende). Die theoretische Verteilung der Streuwahrscheinlichkeiten wurde mit den experimentell bestimmten freien Weglängen $\Lambda_i = 180$ nm (inelastisch) und $\Lambda_e = 450$ nm (elastisch) für amorphes Eis berechnet [Schweikert, 2004]. Der Bereich der nur elastisch gestreuten Elektronen unterhalb der gestrichelten Linie und der inelastisch gestreuten Elektronen oberhalb der gestrichelten Linie entspricht dem Anteil der Einfachstreuung. Eiseingebettete *T. acidophilum*-Zellen bei 8 μm Defokus ohne **B** und mit Energiefilterung **C**. Die inelastisch gestreuten Elektronen sind ausgeblendet, dadurch wird der Kontrast der Aufnahme erhöht.

ausgedehnten Präparaten und bei der Elektronentomographie, wo bedingt durch die Kippung der Probe die geometrische Dicke ansteigt, führt die Energiefilterung zu einer wesentlichen Kontrasterhöhung des Bildes.

Abb. 2.2 **A** zeigt, dass bei Probendicken von mehr als etwa einer inelastischen freien Weglänge (> 180 nm) inelastische und gemischte Streuprozesse bei der Bildentstehung dominieren. Hierbei wird angenommen, dass alle gestreuten Elektronen ins Bild gelangen. Während einfach inelastisch gestreute Elektronen zu einem Bild mit niedriger Auflösung beitragen, sind mehrfach gestreute Elektronen nicht ohne weiteres interpretierbar und tragen somit vorwiegend zum Rauschen im Bild bei. Mit Hilfe eines energiefilternden Mikroskops können inelastisch gestreute Elektronen aus dem Strahl entfernt werden, d.h. es tragen hauptsächlich die elastisch gestreuten Elektronen zur Bildintensität bei. Dies führt zu einer Verbesserung der Auflösung und des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (*signal to noise ratio*, SNR^1) in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Beim visuellen Vergleich der beiden Bilder (vgl. Abb. 2.2 **B** und **C**) fällt vor allem der höhere Kontrast des energiegefilterten Bildes auf, z.B. erscheinen die Zellen mit Energiefilterung deutlich „dunkler“ (vgl. Abb. 2.2 **C**).

Experimenteller Aufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten für die zelluläre Tomographie an einem CM300 TEM (Philips, Niederlande), das bei einer Hochspannung von 300 keV betrieben wird, aufgenommen. Das Instrument ist mit einem *Post-Column* Filter des Typs GIF (Gatan Imaging Filter [Krivanek *et al.* 1995]) 2002 der Firma Gatan (Pleasanton, KA, USA) ausgerüstet, der ausschließlich im *Zero-Loss*-Modus betrieben wurde. Das heißt es wurden nur die Elektronen, deren Energie innerhalb eines schmalen Energieintervalls des Primärstrahls ($300 \text{ keV} \pm 10 \text{ eV}$) liegt, für die elektronenmikroskopische Abbildung verwendet. Zur Aufnahme von Kippserien wurde das in der Skriptsprache `Digital Micrograph` geschriebene Programmpaket [Grimm 1997, Grimm *et al.* 1997] von R. Grimm verwendet. Die Daten von „dünnen Proben“ wurden an einem CM20 TEM (Philips, Niederlande) ohne Energiefilter aufgenommen, das bei 160 keV betrieben wurde. Die Datenakquisition erfolgte mit der `TCL`-Software. Beide Instrumente sind mit einer FEG ausgestattet. In Tab. 2.1.1 sind die elektronenoptischen Parameter für die beiden Mikroskope aufgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit fasergekoppelten CCD-Kameras aufgezeichnet. Am CM300 wurde

¹Es ist definiert als das Verhältnis der Varianzen des Signals σ_S^2 und des Rauschens σ_N^2 : $SNR = \frac{\sigma_S^2}{\sigma_N^2}$. Das SNR ist i.A. stark frequenzabhängig, da das Signal mit der Frequenz schnell abnimmt.

	U [kV]	λ [pm]	δE [eV]	f [mm]	C_S [mm]	C_C [mm]
CM20	160	2.85	0.8	2.7	2.0	2.0
CM300	300	1.97	0.8	2.7	2.0	2.0

Tabelle 2.1: Elektronenoptische Parameter des CM20 und CM300. Beschleunigungsspannung U, relativistische Wellenlänge der Elektronen λ , Energiebreite der FEG δE , Brennweite f sowie chromatische und sphärische Abberation, C_C und C_S , der Objektivlinse.

eine Gatan GIF 2002 CCD (Gatan, Pleasanton, Kalifornien) und am CM20 eine TVIPS F214 (TVIPS, Gauting, Deutschland) verwendet.

2.1.2 Wechselwirkungen zwischen hochenergetischen Elektronen und Materie

Der Abbildungsprozess im Elektronenmikroskop beruht auf der Wechselwirkung zwischen den Strahlelektronen und den Probenatomen. Treffen hochenergetische Elektronen auf eine nicht zu dicke, amorphe Probe, so können die Elektronen die Probe entweder ungestört durchqueren, oder die Elektronen wechselwirken mit den Atomen in der Probe und werden dadurch gestreut. Die Streuung kann ohne Energieverlust am positiven Kernpotential erfolgen - elastische Streuung - oder mit einer Energieabgabe an die Probe - inelastische Streuung - verbunden sein. Den hauptsächlichen Beitrag zur Entstehung des Bildkontrastes liefert die elastische Streuung, wie in Abschnitt 2.2 zu sehen ist. Inelastisch gestreute Elektronen tragen zur chromatischen Aberration bei und sind unerwünscht. Um die Wechselwirkung zwischen Strahlelektronen und Probe zu charakterisieren, verwendet man den Wirkungsquerschnitt Ω und die mittlere freie Weglänge Λ .

2.1.3 Das Streuproblem

Um den differentiellen elastischen Wirkungsquerschnitt für hochenergetische Elektronen zu bestimmen, kann der einzelne Streuvorgang quantenmechanisch durch Lösen der Schrödingergleichung für das Streuproblem² beschrieben werden.

Unter der Annahme, dass die Elektronen aus der Elektronenquelle monoenergetisch und kohärent (zeitlich und örtlich) emittiert werden, können diese Elektronen durch eine ebene Welle

2

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \vec{\nabla}^2 + V(\mathbf{r}) \right] \Psi(\mathbf{r}) = E\Psi(\mathbf{r}), \text{ mit } E = \frac{\hbar^2 k^2}{2m}$$

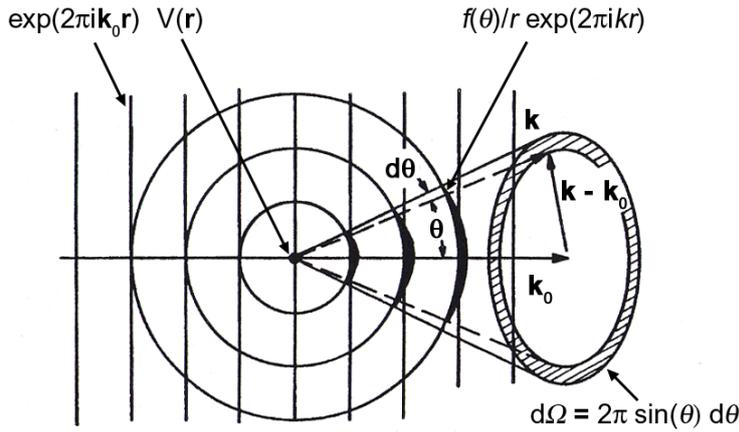


Abbildung 2.3: Schema zur elastischen Streuung am Zentralpotential $V(\mathbf{r})$ im Wellenmodell (adaptiert nach [Reimer 1997]). Die einfallende ebene Welle mit dem Wellenvektor \mathbf{k}_0 streut an einem Zentralpotential. Dadurch wird eine Kugelwelle mit der Streuamplitude $f(\theta)$ emittiert. Die Objektwellenfunktion ist die Superposition der ungesteuerten mit der gestreuten Welle.

mit der Amplitude $|\Psi_0|$ und der Phase $\mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r}$ beschrieben werden:

$$\Psi_{ein}(\mathbf{r}) = |\Psi_0| \exp(2\pi i \mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r}) \quad (2.1)$$

Dabei ist \mathbf{k} der Wellenzahlvektor. Seine Größe wird durch die Wellenlänge λ bestimmt $|\mathbf{k}| = 2\pi/\lambda$. Aufgrund der hohen kinetischen Energie der Elektronen E muss die Wellenlänge λ relativistisch berechnet werden:

$$\lambda(E) = \frac{h}{\sqrt{2m_0 E \left(1 + \frac{E}{2m_0 c^2}\right)}} \quad (2.2)$$

Hierbei ist h das Plancksche Wirkungsquantum (die verwendeten physikalischen Konstanten sind im Anhang zusammengefasst), e die Ladung des Elektrons, m_0 die Ruhemasse des Elektrons und c die Lichtgeschwindigkeit. Bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV beträgt die Wellenlänge der Elektronen 1.97 pm und sie erreichen 93% der Lichtgeschwindigkeit.

Trifft die ebene Welle eines einlaufenden Elektrons auf das Objekt, wird eine Streuwelle erzeugt. In großer Entfernung vom Streuzentrum wird die gestreute Welle zur Kugelwelle, deren Intensität durch die atomare Streuamplitude $f(\theta)$ bestimmt wird (vgl. Abb. 2.3).

$$\Psi_{streu}(\theta, r) = |\Psi_0| f(\theta) \frac{\exp(2\pi i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r})}{r} \quad (2.3)$$

Der atomare Streufaktor $f(\theta)$ ist komplex, $f(\theta) = |f(\theta)| \cdot \exp(i\eta(\theta))$. Er enthält sowohl die winkelabhängige Intensitätsverteilung als auch die Phasenverschiebung der gestreuten Welle und trägt damit alle Informationen über das streuende Probenatom. Für leichte Elemente wird der Term $\eta(\theta)$ vernachlässigt. Zwischen der atomaren Streuamplitude und dem differentiellen Wirkungsquerschnitt $d\sigma$ im Raumwinkelement $d\Omega$ besteht der fundamentale Zusammenhang:

$$d\sigma = |f(\theta)|^2 d\Omega = 2\pi |f(\theta)|^2 \sin(\theta) d\theta \quad (2.4)$$

Die gesamte, hinter der Probe beobachtete Wellenfunktion Ψ_{tot} ist in erster Näherung gleich der ungestreuten Wellenfunktion Ψ_{ein} , die überlagert ist mit der (sehr viel schwächeren) um 90° (Faktor i) verschobenen gestreuten Wellenfunktion Ψ_{streu} .

$$\Psi_{tot}(\mathbf{r}, \theta) = \Psi_{ein}(\mathbf{r}) + i\Psi_{streu}(\theta, r) = |\Psi_0| \left(\exp(2\pi i \mathbf{k}_0 \cdot \mathbf{r}) + if(\theta) \frac{\exp(2\pi i k \cdot r)}{r} \right) \quad (2.5)$$

2.1.4 Elastische Streuung

Der Energie- und Impulsübertrag vom Strahlelektron auf ein Probenatom ist bei der elastischen Streuung im allgemeinen vernachlässigbar, weil die Masse des Atomkerns viel größer als die Masse des Elektrons ist. Bei der Streuung wird die Lage des Kerns praktisch nicht verändert. Die kinetische Energie und damit die Wellenlänge des Elektrons bleiben annähernd konstant. Jedoch führt die Wechselwirkung mit dem elektrostatischen Coulomb-Potential des Kerns zu einer Änderung der Bewegungsrichtung des Elektrons. Der Großteil der elastisch gestreuten Elektronen erfährt nur eine kleine Ablenkung (< 0.2 rad), eine geringe Phasenschiebung bezüglich des einfallenden Elektronenstrahls und wird in Vorwärtsrichtung gestreut. Das effektive Potential $V_{eff}(r)$, welches das Elektron im teilweise abgeschirmten Coulomb-Potential eines Atoms mit der Ordnungszahl Z im Abstand r vom Kern erfährt, wird in erster Näherung durch das Wentzel-Modell

$$V_{eff}(r) = -\frac{e^2 Z}{4\pi \epsilon_0 r} \exp(-r/R) \quad (2.6)$$

beschrieben. Der abschirmende Radius R wird mit Hilfe der Beziehung $R = a_B Z^{-1/3}$ approximiert. In dieser Näherung nimmt man an, dass das Potential des Kerns durch die umgebenden, gebundenen Elektronen exponentiell geschwächt wird. Für kleine Z , d.h. insbesondere für biologische Materialien, wird angenommen, dass das effektive Potential linear von Z abhängt [Frank 1996]:

$$V_{eff} \sim -Z. \quad (2.7)$$

Unter Verwendung des Wentzel-Modells für das Potential und der Bornschen Näherung (schwaches Phasenobjekt) kann man für den differentiellen Wirkungsquerschnitt eine analytische Lösung angeben [Lenz 1954]

$$\frac{d\sigma_{el}(\theta)}{d\Omega} = |f(\theta)|^2 = \frac{4(1 + \frac{eU_B}{m_0 c^2})^2}{a_B^2 k_0^4} \frac{Z^2}{(\theta^2 + \theta_0^2)^2}. \quad (2.8)$$

Dabei bezeichnet θ_0 den charakteristische Streuwinkel. Bei $\theta_0 = \lambda/2\pi R$ fällt der Wirkungsquerschnitt auf die Hälfte seines Wertes in Vorwärtsrichtung ab. Für Kohlenstoff ($Z = 6$)

misst er etwa 18 mrad, für Uran 45 mrad ($Z = 92$) [Grimm 1997]. Kohlenstoff ist ein Hauptbestandteil biologischer Materialien und Uran wird für die präparative Kontrastierung von biologischen Objekten mit Schwermetallsalzen (*Negative Staining*) verwendet.

Den totalen elastischen Wirkungsquerschnitt σ_{el} von biologischen Materialien erhält man durch Integration über das Raumwinkelement $d\Omega = 2\pi \sin(\theta)d\theta$. Da durch den Einsatz der Objektivblende der Winkelbereich auf 10 bis 20 mrad beschränkt wird, genügt es nur die Kleinwinkelstreuung zu betrachten, bei der $\sin(\theta) \approx \theta$ gilt.

$$\sigma_{el} = 2\pi \int \frac{\sigma_{el}}{d\Omega} \theta d\theta = \frac{h^2 c^2 Z^{4/3}}{\pi E^2 \beta^2} \sim \frac{\lambda^2 Z^{4/3}}{\pi} \quad (2.9)$$

Dabei stellt $\beta = v/c$ die relativistische Korrektur für die Elektronengeschwindigkeit dar. Der elastische Wirkungsquerschnitt steigt überproportional mit der Kernladungszahl Z der getroffenen Atome an und nimmt quadratisch mit der Wellenlänge der Elektronen zu. Um die Wechselwirkung zwischen den Strahlelektronen und der Probe zu beschreiben, kann man anstelle einer Fläche auch eine Länge verwenden, nämlich die Strecke, die das Elektron im Mittel zwischen zwei Streuereignissen zurücklegt. Diese Entfernung wird als mittlere freie Weglänge Λ bezeichnet. Idealerweise verwendet man Probendicken im Bereich der Größenordnung von Λ , um den Einfluss der Mehrfachstreuung zu verringern. Hat die Probe die Dicke der freien Weglänge, wird jedes passierende Elektron im Durchschnitt einmal gestreut. Die mittlere freie Weglänge Λ ist mit dem Wirkungsquerschnitt über die Beziehung $\Lambda_{el} = A/(N_A \rho \sigma_{el})$ verknüpft, wobei A die Massenzahl, N_A die Avogadro Konstante und ρ Dichte darstellen.

2.1.5 Inelastische Streuung

Im Gegensatz zur elastischen Streuung findet bei inelastischer Streuung Energietransfer ΔE auf die Probe statt. Diese Wechselwirkung hat eine Veränderung der Probenstruktur zur Folge und kann sogar zur ihrer Zerstörung führen. Durch den Energietransfer verlieren die Strahlelektronen einen Teil ihrer kinetischen Energie und werden dadurch „langsamer“ (d.h. ihre Wellenlänge wird größer). In Abhängigkeit von der auf die Probe übertragenen Energie kann das zu unterschiedlichen Folgeprozessen führen. Es können quasi-freie Elektronen angeregt werden (Compton-Streuung), es kann zur Aussendung von Bremsstrahlung kommen (Röntgenstrahlung mit breiter Energieverteilung), oder es kann zur Anregung von Molekül-, Phononen- (Gitterschwingungen), Plasmonen- (kooperative Schwingungen der Valenzband- und Leitungsbandelektronen) oder Excitonenschwingungen (Elektronen-Loch-Paare). Ein

weiterer möglicher Prozess ist die Ionisation in den inneren Elektronenschalen. Hierdurch entstehende freie Plätze werden von Elektronen aus energetisch höher gelegenen Schalen wieder aufgefüllt. Die dabei freiwerdende Energiedifferenz wird in Form von charakteristischer Röntgenstrahlung emittiert oder für das Herauslösen weiterer Elektronen (Auger-Elektronen) verwendet, welche das Atom verlassen. Verlieren die inelastisch gestreuten Elektronen so viel Energie, dass die Elektronen auf die thermische Energie abgebremst werden, können sie die Probe nicht mehr verlassen und werden von der Probe absorbiert, wobei Wärme entsteht. Durch die Vielfalt der möglichen inelastischen Streumechanismen wird die Berechnung eines exakten inelastischen Wirkungsquerschnittes kompliziert. Verwendet man analog, wie bei der elastischen Streuung, das Wentzel-Modell und die erste Bornsche Näherung, erhält man für den differentiellen inelastischen Wirkungsquerschnitt [Lenz 1954]:

$$\frac{d\sigma_{in}}{d\Omega} = \frac{4 \cdot \left(1 + \frac{eU_B}{m_0c^2}\right)^2}{a_B^2 k_0^4} \frac{Z \left(1 - \frac{1}{(1+(\theta^2\theta_E^2)/\theta_0^2)^2}\right)}{(\theta + \theta_E^2)^2} \quad (2.10)$$

Hierbei ist $\theta_E \approx \Delta E/2eU_B$ der charakteristische Streuwinkel für inelastische Streuung bei einem mittleren Energieübertrags während der Streuung von ΔE . Dieser ist viel kleiner als der charakteristische Streuwinkel für elastische Streuung, d.h. $\theta_E \ll \theta_0$. θ_E beträgt z.B. bei $E = 300$ keV für eiseingebettete biologische Proben zirka 0.03-0.04 mrad. Die inelastisch gestreuten Elektronen werden noch stärker in Vorwärtsrichtung gestreut als die elastischen. Da es bei der inelastischen Streuung zu kollektiven Anregung der Probe kommt, sind die inelastischen Streuprozesse stärker delokalisiert als die elastische Wechselwirkungen. Inelastisch gestreute Elektronen liefern nur geringe Information über Strukturdetails und eignen sich folglich nicht für die hochauflösende Mikroskopie. Die Berechnung des exakten totalen inelastischen Streuquerschnitts ist aufgrund der Vielzahl der Streuprozesse und der element-spezifischen charakteristischen Verluste nur bedingt möglich. Unter der Annahme, dass der Plasmonenverlust bei der inelastischen Streuung dominiert, lässt sich näherungsweise ein mittlerer totaler inelastischer Wirkungsquerschnitt angeben [Wall *et al.* 1974]:

$$\sigma_{in} = \frac{1,5 \cdot 10^{-20}}{\beta^2} Z^{1/2} \ln(2/\overline{\theta_E}) \sim Z^{1/2} \quad (2.11)$$

$(\overline{\theta_E}) = J/mv^2 \approx J/2E$ und $J \cong 13,5 \cdot Z$ dem mittleren Ionisierungspotential. Ein Vergleich zwischen dem Wirkungsquerschnitt der elastischen und inelastischen Streuung [Reimer und Rossmessemer 1989] ergibt die Beziehung

$$\frac{\sigma_{in}}{\sigma_{el}} \approx \frac{20}{Z}. \quad (2.12)$$

Demzufolge werden an leichten Elementen ($Z < 20$) die Elektronen vor allem inelastisch gestreut, während an den schweren Elementen die elastische Streuung dominiert. Für biologische, eiseingebettete Materialien ist der inelastische Wirkungsquerschnitt zirka um den Faktor 3.5 größer als der elastische. Durch den Einsatz eines abbildenden Energiefilters, der mit einer energiselektiven Blende ausgestattet ist, werden die inelastisch gestreuten Elektronen abgetrennt. Dadurch wird einerseits das SNR erhöht, was zu einem besseren Bildkontrast führt und andererseits die Verschmierung scharfer Bildstrukturen verhindert.

2.2 Kontrastentstehung im Elektronenmikroskop

Bei der konventionellen Elektronenmikroskopie sind drei Arten des Kontrastes zu unterscheiden: Phasen-, Amplituden- und Streuabsorptionskontrast. Phasen- und Amplitudenkontrast basieren auf dem Wellencharakter der Elektronen und werden durch die Wellenoptik beschrieben. Der Streuabsorptionskontrast wird mit Hilfe eines teilchenoptischen Formalismus beschrieben. Zur Vereinfachung der Beschreibung des Abbildungsprozess wird die Kontrastübertragungsfunktion (*contrast transfer function*, CTF) eingeführt.

2.2.1 Der Abbildungsprozess

Mathematisch kann die Signalübertragung im Elektronenmikroskop näherungsweise durch eine Faltung der gestreuten Welle $\Psi_{streu}(\mathbf{r})$ mit einer Funktion c , welche die Abbildungseigenschaften des optischen Systems repräsentiert, dargestellt werden:

$$\begin{aligned} \psi(\mathbf{r}) &= \Psi_{streu}(\mathbf{r}) \otimes c(\mathbf{r}) = \int \Psi_{streu}(\mathbf{r}') \cdot c(\mathbf{r} - \mathbf{r}') d\mathbf{r}' \\ &= \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{\Psi_{streu}\}(\mathbf{q}) \cdot \mathcal{F}\{c\}(\mathbf{q})\} = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{\Psi_{streu}\}(\mathbf{q}) \cdot CTF(\mathbf{q})\} \end{aligned} \quad (2.13)$$

In der zweiten Zeile erfolgt der Übergang in den Fourier-Raum³. Im Fourier-Raum wird die Faltung zu einer einfachen Multiplikation. Die hier eingeführte Funktion $CTF(\mathbf{q})$ wird als Kontrastübertragungsfunktion des Mikroskops bezeichnet. Sie beschreibt die Abbildungseigenschaften der Objektivlinse im Fourier-Raum und ist unabhängig von der Probenstruktur.

³Für die Fourier-Transformierte wird der Operator \mathcal{F} und für die Rücktransformation in den Realraum wird der Operator \mathcal{F}^{-1} verwendet.

2.2.2 Kontrastübertragungsfunktion, Phasen- und Amplitudenkontrast

Die Kontrastverhältnisse und der Verlauf der Übertragungsfunktion werden durch ein Zeigerdiagramm verständlich. In Gl. 2.5 wurde gezeigt, dass die Phase der elastisch gestreuten relativ zur ungestreuten Welle um 90° ($\pi/2$) verschoben ist. Das bedeutet, dass ein reines Phasenobjekt, das mit einer idealen Linse abgebildet wird, unsichtbar ist. Elektromagnetische Linsen sind aber keine idealen Linsen, sondern sie verlängern den optischen Weg um Δs der durch sie hindurchlaufenden gestreuten Wellen, was eine Phasenschiebung zur Folge hat. Die Ursache für die zusätzliche Phasenschiebung sind die sphärische Aberration C_S und die Defokussierung der Objektivlinse. Aus dem allgemeinen Ausdruck für die Phasenschiebung $W(\theta) = 2\pi\Delta s/\lambda$ ergibt sich unter Annahme kleiner Streuwinkel θ und kleiner Defokusänderungen Δz für die Phasenschiebung [Reimer und Rossmessemer 1989]:

$$W(\theta) = \frac{\pi}{2\lambda}(C_S\theta^4 - 2\Delta z\theta^2) \text{ bzw. } W(q) = \frac{\pi}{2}(C_S\lambda^3q^4 - 2\Delta z\lambda q^2), \quad (2.14)$$

wobei $q = \theta/\lambda$ die Ortsfrequenz ist. Die CTF ist im allgemeinen komplex, d.h. sie lässt einen Absorptionsanteil zu.

$$CTF(q) = K(q) \exp(-iW(q)). \quad (2.15)$$

Die Funktion $K(q) \leq 1$ stellt eine Dämpfungsterm aufgrund der nichtidealen Eigenschaften der einlaufenden Welle dar. Der Realteil von Gleichung 2.15 beschreibt die Übertragung des Amplitudenkontrastes (ACTF) und der Imaginärteil die Übertragung des Phasenkontrastes (PCTF):

$$ACTF = \text{Re} \{CTF\} = K(q) \cos(W(q)) \quad (2.16)$$

$$PCTF = \text{Im} \{CTF\} = K(q) \sin(W(q)). \quad (2.17)$$

Maximaler positiver bzw. negativer Phasenkontrast tritt auf, wenn die zusätzliche Phasenschiebung der Streuwelle $\pm\frac{\pi}{2}$ beträgt:

$$W(q) + \frac{\pi}{2} = n\pi \text{ bzw. } \sin W(q) = \pm 1. \quad (2.18)$$

Der Kontrast verschwindet dagegen für

$$W(q) = n\pi \text{ bzw. } \sin W(q) = \pm 0. \quad (2.19)$$

Für in Eis eingebettete Proteine beträgt der Anteil des Amplitudenkontrasts am gesamten Bildkontrast etwa 7% [Toyoshima und Unwin 1988] für negativ kontrastierte Makromoleküle 27% [Typke und Radermacher 1982].

2.2.3 Streuabsorptionskontrast

Der Streuabsorptionskontrast ist insbesondere bei stark streuenden Proben, wie z.B. schwermetallkontrastierten biologischen Objekten, dominierend. Obwohl eiseingebettete biologische Proben schwach streuen, ist der Streuabsorptionskontrast in der zellulären Kryoelektronentomographie von Bedeutung, da die Proben z.T. entlang der Durchstrahlungsrichtung einige 100 nm dick sind, und die Massendicke (das Produkt aus der Dichte ρ und der Probendicke D) aus diesem Grund hoch ist. Während die zum Phasenkontrast beitragenden Elektronen kohärent gestreut werden, entsteht der Streuabsorptionskontrast durch inkohärent elastisch gestreute Elektronen. Der Bildkontrast resultiert aus der Absorption der in große Winkel gestreuten Elektronen an der Objektivblende und ist in der teilchenoptischen Betrachtungsweise besonders leicht nachzuvollziehen. In dichteren Probenbereichen (das heißt in Bereichen mit kleinerer freier Weglänge Λ) ist die Transmission der Elektronen niedriger. Selbiger Effekt gilt für dickere Probenstellen (Variation in D). Der Massenabsorptionskontrast ist eine Funktion der Größe der verwendeten Objektivblende. Im Gegensatz zum Amplituden- und Phasenkontrast ist er vom Defokus unabhängig [Reimer und Rossmessemer 1989].

2.3 Präparation von biologischen Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Untersuchung von biologischen Objekten im Elektronenmikroskop müssen diese vakuumtauglich und möglichst strahlungsresistent präpariert werden. Dabei soll ihre Struktur und ihr physiologischer Zustand erhalten bleiben. Im Hochvakuum im Inneren eines Elektronenmikroskopes würden wässrige Lösungen oder Suspensionen von biologischen Materialien sofort verdampfen. Deshalb müssen diese Proben grundsätzlich fixiert werden bevor sie im Elektronenmikroskop untersucht werden können. Seit den fünfziger Jahren werden Zellen und andere biologische Materialien durch die Einbettung in Epoxidharze und Proteine durch einen Film aus Schwermetallionen fixiert. Durch diese Methoden wird jedoch die Struktur der Präparate verändert. In den 70er Jahren begannen K.A. Taylor und R.M. Glaeser [Taylor und Glaeser 1974] biologische Proben in amorphem (vitrifiziertem) Eis einzubetten. Diese Technik der Kryo-Fixierung, die von J. Dubochet, M. Adrian und J. Lepault [Dubochet *et al.* 1982, Dubochet *et al.* 1988] weiterentwickelt wurde, ermöglicht es, biologische Proben im hydratisierten Zustand durch extrem rasches Abkühlen zu vitrifizieren, und

sie somit in ihrem funktionellen Zustand zu konservieren, so dass ihre Untersuchung in einem nahezu nativen Zustand durchgeführt werden kann.

2.3.1 Negativkontrastierung

Bei der Negativkontrastierung (*Negative Staining*), einer einfachen und daher auch weit verbreitete Methode, werden die zu untersuchenden Objekte in wässrigen Lösungen von Schwermetallsalzen, wie Ammoniummolybdat, Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure, eingebettet [Brenner und Horne 1959]. Im Idealfall lagern sich die Schwermetallanionen nur an den negativen Oberflächenladungen der Partikel bzw. Zellen an, so dass diese vom Kontrastmittel umgebenen Strukturen hell erscheinen. Der hohe Bildkontrast stammt von den stark streuenden Schwermetallatomen, die die Probe umgeben.

Durch den Konzentrationseffekt bei der Adsorption an den Kohlefilm können Proteinsuspensionen mit relativ geringer Konzentration (> 0.1 mg/ml) verwendet werden. Neben dem hohen Bildkontrast zeigen die so präparierten Proben eine relativ hohe Stabilität bei der Bestrahlung mit Elektronen. Es können Elektronendosen⁴ von bis zu $100 \text{ e}/\text{Å}^2$ verwendet werden, ohne dass sich die Probe merklich verändert. Die Auflösung der Abbildung ist durch die Korngröße des verwendeten Schwermetallsalzes limitiert. Für Uranylacetat liegt die Auflösungsgrenze bei ca. 1.5 nm. Diese Methode ist wegen der komplexen Wechselwirkung zwischen Probe und Kontrastierungsmittel nicht frei von Artefakten. Ein wesentlicher Nachteil liegt jedoch darin, dass die Probe nicht vollständig eingebettet wird. Der weiter vom Kohlefilm entfernte Teil der Moleküle wird nicht kontrastiert und ist so bei einer 3D Rekonstruktion nicht sichtbar. Auch die 2D Projektionen unterscheiden sich dadurch von Aufnahmen von vollständig eingebetteten Proteine. Außerdem wird die Probe während der Präparation dehydratisiert und es kommt zu einer Abflachung der Moleküle durch die bei der Adsorption am Kohlefilm auftretende Kräfte. Trotz aller Einschränkungen dieser Technik liefert die Negativkontrastierung eine Reihe von brauchbaren Ergebnissen über die Verteilung, Größe und molekulare Struktur von biologischen Objekten.

2.3.2 Kryo-Präparation

Die Kryofixierung stellt eine grundlegende präparative Maßnahme für die strukturelle Untersuchung von biologischen Substanzen in Gegenwart von Wasser dar, die keine Struktur-

⁴Als Maß für die Stärke der Bestrahlung wird in der Elektronenmikroskopie die Elektronendosis verwendet, womit die akkumulierte Flächenladungsdichte j (in eingestrahlte Elektronen/Å² bzw. C/cm²) gemeint ist.

Veränderungen der Probe aufgrund von Entwässerung, Trocknung oder Kontrastierung zur Folge hat. Durch die Kryofixierung wird die native Struktur von biologischen Präparaten und dynamische Zustände innerhalb der Probe in wässriger Lösung „schockgefroren“. Das Ziel ist dabei die Struktur innerhalb der Probe zu konservieren. Beim „langsamen“ Gefrieren von biologischen Strukturen erfolgt eine Zerstörung der Probe bei der Umwandlung von Wasser in hexagonales Eis. Neben der Volumenzunahme beim Kristallisieren werden gelöste Substanzen, wie z.B. Elektrolyte, aus den gebildeten Eiskristallen herausgedrängt, was eine Ortsveränderung der Bestandteile zur Folge haben kann. Durch schockartiges Gefrieren des flüssigen Wassers, d.h. durch direkten Phasenübergang zu vitrifiziertem (glasartigem) Eis, werden diese Kristallisationseffekte vermieden. Bei hinreichend dünnen Proben (Dicke $< 1 \mu\text{m}$) lässt sich dies bei Normaldruck durch extrem hohe Abkühlgeschwindigkeiten von 10^6 K/s bewerkstelligen. Durch das schnelle Abkühlen geht Wasser in einen glasähnlichen Zustand über, in dem sich das Präparat wie eine Flüssigkeit mit hoher Viskosität verhält. Bei etwa 150 K (bei Normaldruck) findet im reinen Wasser ein Phasenübergang vom amorphen (kubisch) zum glasartigen Zustand statt. Diesen Aggregatzustand des Wassers nennt man vitrifiziertes Eis [Dubochet *et al.* 1988]. In wässrigen Lösungen und Zellen liegt die Vitrifikationstemperatur etwas höher. Bei der Kryofixierung wird eine kleine Menge (typischerweise einige Mikroliter) der biologischen Suspension auf ein Objektträgernetzchen (Grid) aufgebracht, das mit einem dünnen löchrigen Kohlefilm überspannt ist. Danach wird durch Absaugen der überstehenden Lösung mit Filterpapier ein dünner Film (50 - 500 nm) der Suspension erzeugt. Dieser Vorgang wird als „Blotten“ (*to blot*, engl. für abtupfen) bezeichnet. Das Grid wird mittels einer Fallvorrichtung rasch in das Kryogen eingetaucht. Zur Vitrifizierung wird flüssiges Ethan (Siedetemperatur 87 K), das mit flüssigem Stickstoff (Siedetemperatur 77 K) gekühlt wird, verwendet. Ethan zeichnet sich durch seine gute Wärmeleitfähigkeit aus. Stickstoff alleine wäre kein gutes Abkühlmedium, da jede Wärmeaufnahme zu einem Verdampfen des Stickstoffs führt, der sich dann als isolierendes Gaspolster um die Probe legt (Leidenfrost-Phänomen). Um den Vitrifikationsvorgang besser zu kontrollieren und damit die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wird eine Einschussapparatur, die nach dem Prinzip einer Guillotine arbeitet, verwendet [Dubochet *et al.* 1988].

2.3.3 Strahlschädigung vitrifizierter Proben

Beugungsmessungen zu Beginn der 70er Jahre zeigten, welche verheerenden Auswirkungen die Bestrahlung mit Elektronen auf das Probenmaterial haben kann [Glaeser 1971].

Die Strahlenbelastung steigt zudem mit dem Quadrat der Pixelgröße. Obwohl biologische Strukturen im Vergleich zur Raumtemperatur unter Kryo-Bedingungen sehr viel weniger empfindlich gegenüber Elektronenstrahlung sind, stellt die hohe Strahlenempfindlichkeit von eiseingebetteten, biologischen Materialien dennoch eine wesentliche Limitierung bei der elektronentomographischen Datenaufzeichnung dar.

Die Schädigung biologischer Proben durch die Bestrahlung mit hochenergetischen Elektronen entsteht hauptsächlich durch inelastische Wechselwirkungen zwischen beleuchtenden Elektronen und den Probenatomen. Die bei der inelastischen Streuung übertragene Energie kann zu Bindungsbrüchen und zur Bildung von freien Radikalen führen. Durch thermische Diffusion dieser Radikale und anschließenden Sekundärreaktionen kommt es schließlich sogar zu makroskopisch sichtbaren Strahlschäden wie z.B. zur Blasenbildung auf dem Kohlefilm und im amorphen Eis [Heide und Zeitler 1985]. Die Sensitivität einer biologischen Probe für Sekundärreaktionen hängt wesentlich von ihrer chemischen Zusammensetzung, insbesondere der Fähigkeit radikalische Elektronen zu delokalisieren ab. Chemischen Sekundärreaktionen sind im Gegensatz zu den physikalischen Primärprozessen von der Temperatur abhängig. Durch Kühlung der Probe auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff (77 K) kann die thermisch aktivierte Diffusion eingeschränkt werden und der Strahlschaden reduziert werden⁵. Da das Ausmaß des Strahlschadens proportional zur applizierten Dosis anwächst, ist der hochauflösenden Kryo-Elektronenmikroskopie an biologischen Proben durch ihre Strahlungsempfindlichkeit eine intrinsische Grenze gesetzt. Letztendlich bestimmt die zu erzielende Auflösung die tolerierbare Elektronendosis der Probe. Deshalb wird in der Praxis bei Verfahren die auf höchste Auflösung abzielen, wie Elektronenkristallographie oder Einzelpartikel-Analyse, eine wesentlich geringere Elektronendosis verwendet als bei tomographischen Anwendungen. Für typische Proteinkomplexe sollte die Elektronendosis bei der Elektronenkristallographie weniger als $10 \text{ e}/\text{\AA}^{-2}$ betragen [Henderson 1995], während die Grenze bei der Einzelpartikel-Analyse bei $10\text{-}20 \text{ e}/\text{\AA}^{-2}$ bei 120 keV liegt [Frank 2002]. In der Kryo-Elektronentomographie sollte die Elektronendosis, abhängig von Probe und angestrebter Auflösung, den kritischen Bereich von ungefähr $50\text{-}100 \text{ e}/\text{\AA}^{-2}$ nicht übersteigen.

⁵Durch Kühlung mit flüssigem Helium (4 K) können diese Prozesse noch stärker eingeschränkt werden, allerdings kann es bei diesen Temperaturen möglicherweise zu einem Kontrastverlust kommen [Schweikert 2004].

2.4 Kryo-Elektronentomographie

Unter dem Begriff Tomographie werden verschiedene Verfahren zusammengefasst, mit denen die räumliche Verteilung eines Objektes ermittelt werden kann. Um Strukturen mit Hilfe des Elektronenmikroskopes dreidimensional (3D) darzustellen, ist es notwendig, das zu untersuchende Objekt, wie bei allen tomographischen Methoden, aus unterschiedlichen Richtungen abzubilden. Diese Vorgehensweise wurde zuerst von R. G. Hart im Jahre 1968 unter dem Begriff „polytrope Montage“ [Hart 1968] für die Elektronenmikroskopie formuliert. Die Betrachtungsrichtung wird variiert, indem das Objekt mit dem Probenhalter senkrecht zur optischen Achse gedreht wird, während die Richtung des Elektronenstrahls im Mikroskop unverändert bleibt. Bei den verschiedenen Kippwinkeln werden Projektionen erstellt, aus denen die 3D Struktur des Objekts mit Hilfe von Rückprojektionsalgorithmen im Computer berechnet werden kann (siehe Abb. 2.4). Das 3D Volumen, auch Tomogramm ($\tau\omicron\mu\eta$, griechisch für Schnitt) genannt, kann anschließend in jeder beliebigen Richtung virtuell zerschnitten werden. Die erste 3D Rekonstruktion eines biologischen Objektes erschien im Jahre 1968 von D.J. de Rosier und A. Klug [DeRosier und Klug 1968]. Unter Ausnutzung der helikalen Symmetrie von Phagenschwänzen, wurde lediglich aus 2D Aufnahmen, die schon eine Vielzahl von Projektionen mit unterschiedlichen Projektionsrichtungen enthalten, die 3D Struktur aufgeklärt, ohne die Probe physikalisch zu kippen. Die theoretische Grundlage für die Rekonstruktionsalgorithmen entwickelte bereits 1917 der Mathematiker J. Radon. Mit seiner recht generellen Theorie wies er nach, dass ein 3D Objekt eindeutig aus seinen Projektionen rekonstruiert werden kann, wenn alle seine Projektionen bekannt sind [Radon 1917]. In Abschnitt 2.1.4 wurde gezeigt, dass eine elektronenmikroskopische Abbildung in guter Näherung eine lineare Projektion des elektrostatischen Potentials der Probe darstellt, weshalb sich die Elektronenmikroskopie als Abbildungstechnik für die Tomographie eignet.

2.4.1 Projektionstheorem, Crowther-Kriterium

Die Möglichkeit, aus zweidimensionalen (2D) Parallelprojektionen eine 3D Objektfunktion zu rekonstruieren, basiert auf der Aussage des Projektionstheorems. Eine Parallelprojektion P_z einer 3D Dichteverteilung $\varrho(\mathbf{r})$ entlang der Projektionsrichtung z ist mathematisch definiert als:

$$P_z(\varrho(\mathbf{r})) = P_z(x, y, z = 0) = \int_{-\infty}^{\infty} dz \varrho(\mathbf{r}). \quad (2.20)$$

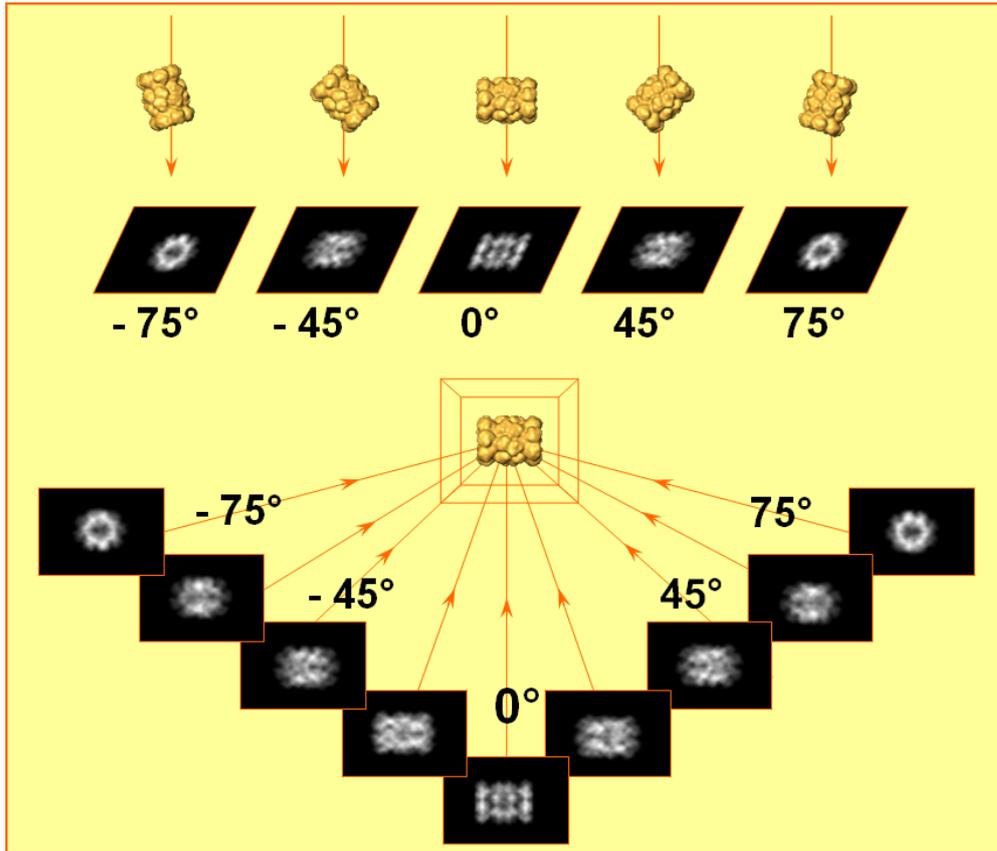


Abbildung 2.4: Prinzip der Tomographie. **Oben:** Von einem Objekt (hier das 20S Proteasom) werden senkrecht zum einfallenden Elektronenstrahl eine bestimmte Anzahl von Projektionen in einem begrenzten Kippwinkelbereich aus unterschiedlichen Richtungen aufgenommen. **Unten:** Die 3D Rekonstruktion erfolgt durch die Rückprojektion der einzelnen Projektionen in ein gemeinsames Volumen.

Mit Hilfe der Fourier-Transformierten der Dichteverteilung $\hat{\rho}$ lässt sich Gl. 2.20 zu

$$\begin{aligned}
 P_z(\rho(\mathbf{r})) &= \int dz \iiint dk_x dk_y dk_z \hat{\rho}(k_x, k_y, k_z) \exp[-2\pi i(k_x x + k_y y + k_z z)] \\
 &= \iiint dk_x dk_y dk_z \hat{\rho}(k_x, k_y, k_z) \delta(k_z) = \iint dk_x dk_y \hat{\rho}(k_x, k_y, 0) \quad (2.21)
 \end{aligned}$$

umformulieren, wobei $\delta(k_z) = \int_{-\infty}^{\infty} dz \exp[-2\pi i(k_x x + k_y y + k_z z)]$ die Deltafunktion ist. Dies bedeutet, dass sich die 2D Parallelprojektion der 3D Objektfunktion aus der inversen 2D Fourier-Transformierten, die einen Zentralschnitt durch die 3D Fourier-Transformierte der Objektfunktion $\hat{\rho}(k_x, k_y, k_z) = \mathcal{F}\{\rho(x, y, z)\}$ darstellt, berechnen lässt. Der Zentralschnitt verläuft in der Ebene, die senkrecht zur Projektionsrichtung liegt. Das Ergebnis ist für willkürliche Projektionsrichtungen gültig. Dieser fundamentale Zusammenhang zwischen der Fourier-Transformierten einer Funktion und der Fourier-Transformierten ihrer Parallelprojektion wird als Projektionstheorem bezeichnet. Variiert man, durch das Drehen der Probe, die Projektionsrichtung, so können weitere zentrale Schnitte der Fourier-Transformierten des Objektes erhalten werden, die zusammengenommen die 3D Information der Dichteverteilung

beinhalten. Würde man ein unbegrenztes Objekt im Fourier-Raum vollständig beschreiben wollen, müsste man eine unendliche Anzahl von Projektionen aufnehmen, da jeweils nur unendlich dünne Schnitte erhalten werden könnten. In der Praxis sind die abzubildenden Objekte jedoch endlich und die Projektionen haben eine endliche Dicke im Fourier-Raum, die indirekt proportional zur Objektdicke D im Realraum ist.

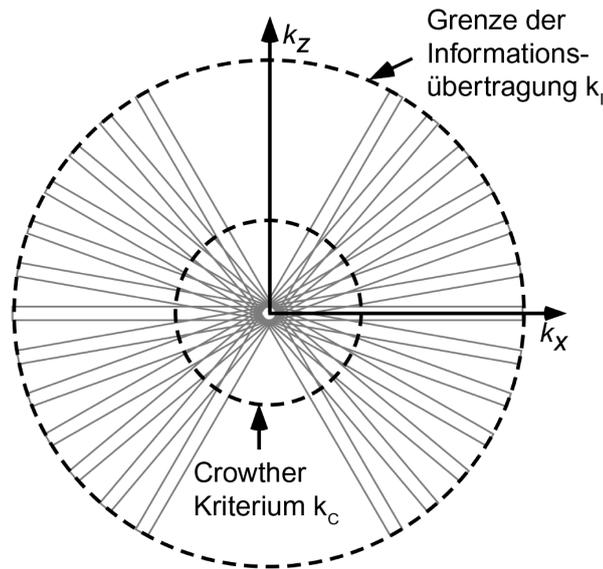


Abbildung 2.5: Abtasten der Probeninformation im Fourier-Raum (adaptiert nach [Lučić *et al.* 2005]). Einzelne Projektionen eines Objektes der Dicke D entsprechen zentralen Schnitten der Dicke $1/D$ im Fourier-Raum. Die Zentralschnitte verlaufen senkrecht zu ihrer Projektionsrichtung. Entlang k_z bleibt die Strukturinformation aufgrund des eingeschränkten Kippwinkelbereichs unzugänglich. Von diesem Bereich abgesehen werden die Strukturfaktoren des Objekts bis zur Frequenz k_C homogen aufgenommen, die darüber hinausgehende Information ist unvollständig. Dennoch kann Objektinformation bis zu einer Frequenz k_I aufgenommen werden, die über die Crowther-Frequenz k_C hinausgeht und z.B. durch die Abbildungseigenschaften des Elektronenmikroskopes begrenzt wird.

Crowther *et al.* [Crowther *et al.* 1970] haben aus der Dicke eines sphärischen Objektes D und der Anzahl der Projektionen N , die über den ganzen Winkelbereich verteilt sein müssen, ein Kriterium für die erreichbare 3D Auflösung r einer tomographischen Rekonstruktion abgeleitet. Für eine tomographische Einachsenkippsreihe mit äquidistantem Winkelinkrement $\Delta\alpha = \pi/N$ ergibt sich die Auflösung zu:

$$r = \frac{\pi \cdot D}{N} = \Delta\alpha \cdot D. \quad (2.22)$$

Diese Gleichung gilt streng genommen nur für eine vollständige Kippserie, so dass bei einem eingeschränkten Kippwinkelbereich nur eine Abschätzung für die obere Grenze geben kann. Zudem berücksichtigt die Auflösungsabschätzung des Crowther-Kriteriums nicht, dass der Informationsgehalt der einzelnen Projektionen durch Rauschen erheblich reduziert wird. Aufgrund der Strahlempfindlichkeit biologischer Präparate kann nur eine limitierte Elektro-

nendosis angewendet werden, die auf eine Vielzahl von Einzelprojektionen verteilt werden muss. Deshalb weisen die einzelnen Projektionen ein sehr geringes SNR auf.

2.4.2 Tomographische Rekonstruktion

Die tomographischen Rekonstruktionsverfahren lassen sich in drei Gruppen einteilen: gewichtete Rückprojektion, Fourier-Methoden und iterative algebraische Rekonstruktion (z.B. Algebraische Rekonstruktionstechnik (*algebraic reconstruction techniques*, ART) [Gordon *et al.* 1970] oder Simultane Iterative Rekonstruktionstechnik (*simultaneous iterative reconstruction techniques*, SIRT) [Gilbert 1972, Penczek *et al.* 1992]). Im folgenden wird nur kurz auf die gewichtete Rückprojektion und auf SIRT eingegangen, da ausschließlich diese beiden Rekonstruktionstechniken im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Bevor die einzelnen Projektionen mit einem geeigneten Verfahren 3D rekonstruiert werden, müssen sie auf ein gemeinsames Koordinatensystem aligniert werden, um für laterale Verschiebungen zu kompensieren, die während der Aufzeichnung der Kippserie entstehen. Die Verschiebungen der Bilder relativ zueinander rühren von der beschränkten mechanischen Genauigkeit des Goniometers und der thermischen Instabilität des Probenhalters her.

Alignierung der Projektionen

Die relativen Verschiebungen werden aus den Projektionen bei unterschiedlichen Kippwinkeln bestimmt. Hierfür existieren zwei verbreitete Methoden: Alignierung mittels Kreuzkorrelation [Guckenberger 1982, Liu *et al.* 1995, Taylor *et al.* 1997] oder Markerpunkten [Lawrence 1992]. Als Markerpunkte dienen ca. 10 nm große Goldpartikel, die mit der Probe auf den Objektträger aufgebracht werden. Kreuzkorrelationsbasierte Algorithmen sind relativ rauschempfindlich und erfordern *a priori* Kenntnis über die Lage der Kippachse und gegebenenfalls auch über die äußere Form des zu rekonstruierenden Objektes. Insbesondere ist es bei eiseingebetteten Proben deshalb üblich, die einzelnen Projektionen mit Hilfe von kontrastreichen Markerpunkten auf ein gemeinsames räumliches Koordinatensystem auszurichten. Dabei wird die Position der Markerpunkte in allen Projektionen bestimmt und mit den Koordinaten eines Modells verglichen. Auf der Basis dieser Information wird ein Alignierungsmodell berechnet und der Fehler zwischen gemessenen und vorhergesagten Koordinaten als Funktion der lateralen Translation und dem Winkel der Kippachse minimiert. Anschließend werden die alignierten Projektionen mit einem geeigneten Verfahren 3D rekonstruiert.

Gewichtete Rückprojektion

In der Elektronentomographie hat sich vor allem die gewichtete Rückprojektion [Radermacher *et al.* 1986, Harauz und van Heel 1986] als Methode zur 3D Rekonstruktion durchgesetzt, die für beliebige Kippgeometrien angewendet werden kann. Bei dieser Methode erfolgt die Rückprojektion der gewichteten Projektionen im Realraum, während die mathematische Vorbereitung der einzelnen Projektionen im Frequenzraum durchgeführt wird. Die Rückprojektion ist der inverse Prozess zur Projektion. Während die Projektion eine 2D Dichteverteilung von einem 3D Objekt erzeugt, „schmiert“ die Rückprojektion eine 2D Projektion durch Verschiebung senkrecht zur ursprünglichen Projektionsrichtung in ein 3D Volumen aus [Hoppe und Hegerl 1980]. Dieses Volumen wird Rückprojektionskörper genannt. Überlagert man die unterschiedlichen Rückprojektionskörper in ein gemeinsames Volumen zurück ohne sie vorher zu gewichten, erhält man ein stark verschmiertes Abbild des ursprünglichen Objekts, da niedere Raumfrequenzen in der 3D Rekonstruktion überbetont werden (vgl. Abb. 2.6 B). Der Grund dafür ist, dass sich die einzelnen Zentralschnitte der Projektionen im Frequenzraum im Gebiet um den Ursprung überlappen, wie in Abb. 2.5 illustriert ist. Die Dichte der abgetasteten Punkte nimmt mit zunehmenden Werten für die Raumfrequenz ab. Dieses Verhalten der Dichte im Fourier-Raum wird durch die Punktverbreiterungsfunktion $1/r^*$ beschrieben, wobei r^* der Abstand vom Zentrum im Frequenzraum ist. Um die mehrfache Information im Zentrum auszugleichen, ist es notwendig, die Projektionen vor der Rückprojektion in Richtung senkrecht zur Kippachse mit der Inversen der Punktverbreiterungsfunktion, also mit der Betragsfunktion von r^* , zu gewichten. Dadurch bekommen hohe Frequenzen entsprechend mehr Gewicht. Diese Art der Gewichtung wird als analytisch bezeichnet. Bei der exakten Gewichtung nimmt man eine zylindrische bzw. eine sphärische Form des zu rekonstruierenden Objekts an und berechnet gemäß (2.22) die exakte Abtastungsdichte im Fourier-Raum [Hoppe und Hegerl 1980, Harauz und van Heel 1986]. Allerdings erfordert dies die Angabe eines Objektdurchmessers, da die Formfunktion bzw. ihre Fouriertransformierte approximiert werden muss.

Simultane Iterative Rekonstruktionstechnik (SIRT)

Eine andere Möglichkeit zur 3D Rekonstruktion im Realraum ist SIRT, die von P. Gilbert 1972 vorgeschlagen wurde [Gilbert 1972]. SIRT formuliert das Rekonstruktionsproblem als ein lineares, algebraisches Gleichungssystem, das iterativ gelöst wird. Während der jeweiligen iterativen Schritte erfolgt eine Minimierung der Wurzel der mittleren quadratischen

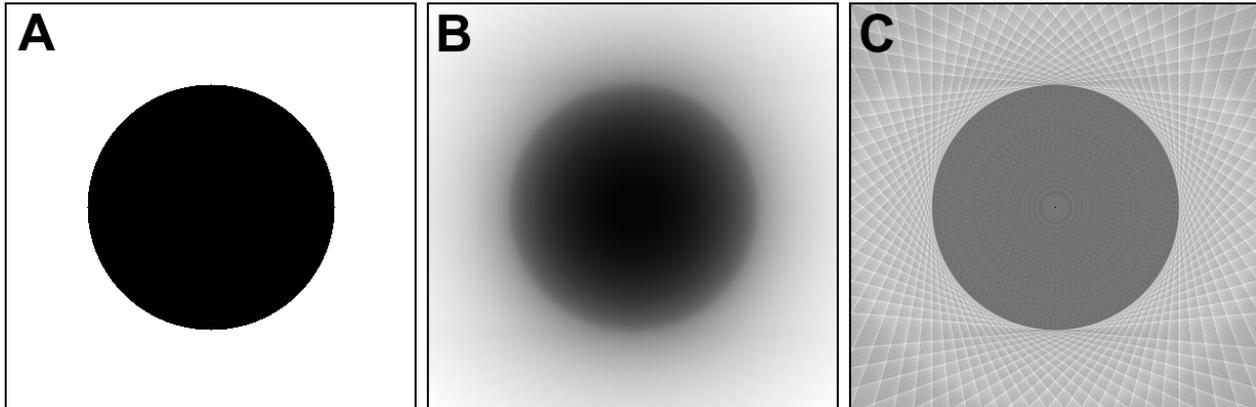


Abbildung 2.6: Effekt der Gewichtung auf die Rekonstruktion. **A** Schnitt durch das Volumen einer Kugel. **B** Schnitt durch die Rekonstruktion einer Kugel aus 72 Projektionen einer Kippserie von -90° bis $+90^\circ$ ohne Gewichtung. **C** Schnitt durch die gewichtete Rückprojektion der Kugel aus den selben Projektionen.

Abweichung zwischen den aufgenommenen Projektionen und den sich aus der berechneten Rekonstruktion ergebenden Projektionen. Die Grauwerte der jeweiligen Voxel werden schrittweise durch die Bestimmung und Anwendung additiver Korrekturterme verändert. Das Rauschen in den rekonstruierten Volumina ist meist geringer als bei der gewichteten Rückprojektion [Sorzano *et al.* 2001]. Ebenso wird eine erhebliche Kontrastverstärkung in der Rekonstruktion erreicht. Ein Nachteil ist jedoch der erhebliche Rechenaufwand.

2.4.3 Limitationen bei der Elektronentomographie

Der im Rahmen der Arbeit für die Aufzeichnung der Kippserien verwendete Kryomikroskophalter (Gatan, Inc. Pleasanton, CA, USA) kann bis maximal 75° um eine Achse gekippt werden, ohne dass das Präparat durch den Rand des Objekthalters abgeschattet wird. Die fehlenden Projektionen bei den hohen Kippwinkeln bilden im Fourier-Raum einen Doppelkeil, der nicht mit Objektinformation gefüllt ist, den sogenannten *Missing Wedge* (vgl. Abb. 2.7 A). In der tomographischen Rekonstruktion hat die fehlende Information eine Elongation der Strukturinformation parallel in Richtung der z -Achse zur Folge (vgl. Abb. 2.7 C). Der fehlende Doppelkeil von Strukturdaten im Fourier-Raum kann durch den Einsatz eines Drehkipphalters zu einer Doppelpyramide verkleinert werden (vgl. Abb. 2.7 B). Nach der Aufnahme einer ersten Einachskippserie wird das Präparat im Halter 90° um die Strahlachse gedreht, dann wird eine zweite Kippserie an der selben Stelle aufgenommen.

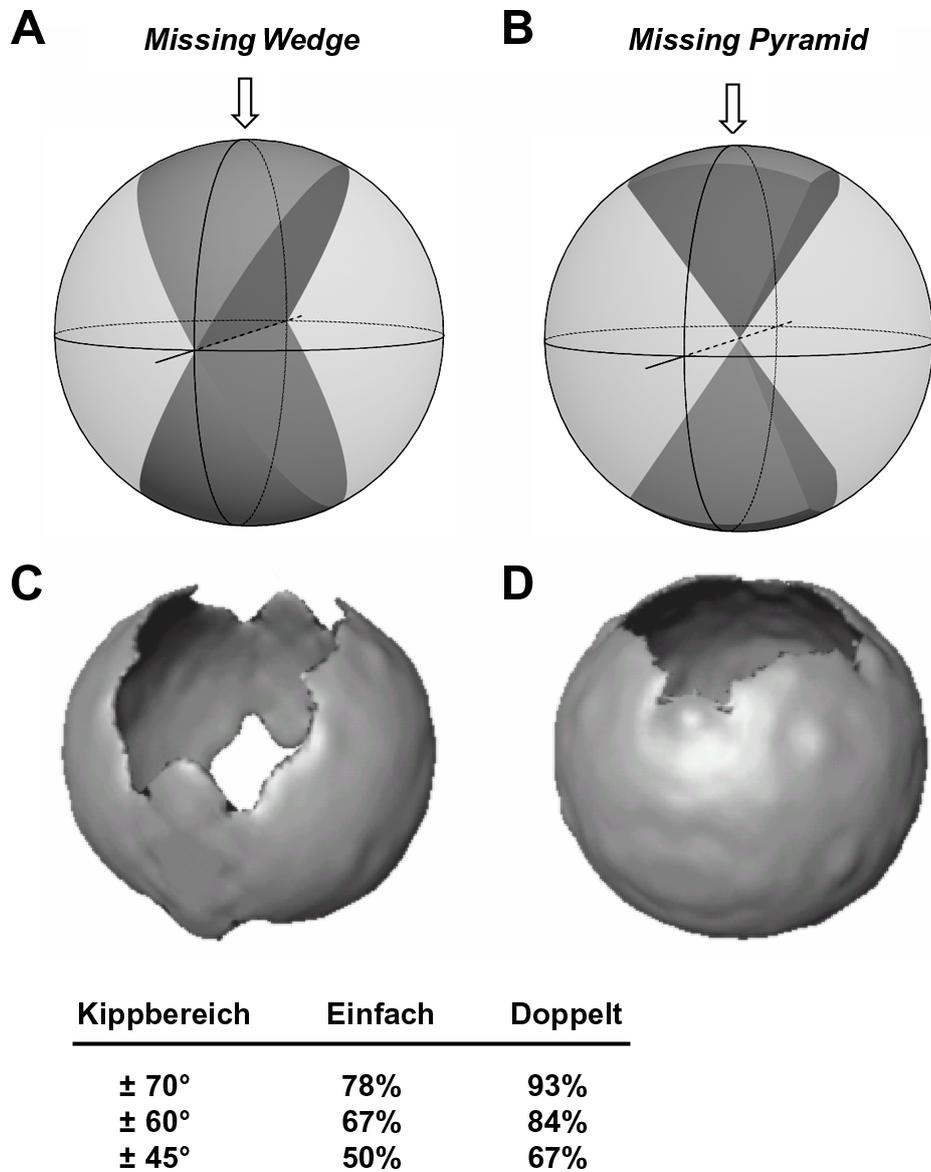


Abbildung 2.7: Einfluss der Kippgeometrie auf die 3D Rekonstruktion (adaptiert nach [Lučić *et al.* 2005]).

A Bei der Einachsenkippen ist ein keilförmiger Bereich im Fourier-Raum (*Missing Wedge*) aufgrund des beschränkten Kippwinkels ($\pm 60^\circ$) nicht zugänglich. **B** Die Zweiachsenkippen verkleinert den unzugänglichen Bereich im Fourier-Raum zu einem pyramidenförmigen Sektor (*Missing Pyramid*). Die resultierenden Artefakte in der Rekonstruktion infolge der fehlenden Information entlang der optischen Achse (z -Achse) sind für ein kugelförmiges, dünnwandiges Vesikel in den unteren Abbildungen dargestellt. Bei beiden Kippgeometrien wird das ursprünglich kugelförmige Vesikel in Richtung der z -Achse elongiert. **C** Im Fall der Einachsenkippen sind Regionen der Membran die senkrecht zur Kippachse liegen und die Vesikelpole unvollständig bzw. gar nicht sichtbar. **D** Im Fall der Zweiachsenkippen sind nur die Pole des Vesikels von der fehlenden Information beeinflusst, so dass die Rekonstruktion besser mit dem ursprünglichen Objekt übereinstimmt.

2.4.4 Automatisierte Datenaquisition

Durch die Automatisierung der Datensammlung wird die Dosis, und somit die Strahlschädigung, innerhalb einer Kippserie minimiert. Bei der Aufnahme der einzelnen Projektionen eines Tomogrammes, müssen aufgrund von mechanischen Ungenauigkeiten des Probenhalters, bestimmte Abweichungen nach dem Kippen der Probe korrigiert werden. Das betrifft insbesondere die Auswanderung der Probe und den Fokuswert. Gegebenenfalls muss auch die Position der Blende des Energiefilters justiert werden, um die Drift der Primärenergie auszugleichen. Die automatisierte Datensammlung erleichtert und beschleunigt die Aufnahme von Projektionen und macht das Arbeiten unter Niedrigdosisbedingungen (*low dose*) möglich [Dierksen *et al.* 1992, Dierksen *et al.* 1993, Koster *et al.* 1997, Grimm 1997]. Die Datenaufnahme erfolgt dabei in drei Schritten:

1. *Autofocus*. Auf der Basis zweier Bilder mit unterschiedlicher Strahlkipfung wird die Auswanderung der Probe zwischen zwei aufeinander folgenden Kippwinkeln bezüglich der z -Achse korrigiert und der vorgegebene Defokuswert neu eingestellt [Koster *et al.* 1989, Ziese *et al.* 2003].
2. *Tracking*. Nach der Aufnahme eines Bildes mit niedriger Elektronendosis wird mittels Kreuzkorrelation mit dem vorherigen Bild die laterale Auswanderung bestimmt und korrigiert.
3. *Exposure*. In diesem letzten Schritt wird die eigentliche Projektion aufgenommen.

Durch die Verschiebung der Position des *Autofocus* und *Tracking* Schrittes entlang der Kippachse weg vom Probenort, kann eine deutliche Dosiseinsparung vorgenommen werden. Ein wesentlicher Zeitfaktor ist die Auslesegeschwindigkeit der CCD-Kamera. Deshalb wird in der Praxis im *Autofocus*- und *Tracking*-Modus die CCD-Kamera nicht vollständig ausgelesen, also eine geringere Abtastung verwendet als im *Exposure*-Modus.

Idealerweise verteilt sich die Elektronendosis gleichmäßig über alle Projektionen. Der Weg der Elektronen durch die Probe wird jedoch mit zunehmenden Kippwinkel länger. Daher kann die Belichtungszeit im *Exposure*-Modus automatisch angepasst werden (z.B. $t \sim 1/\cos \alpha$).

3. Charakterisierung unterschiedlicher Morphologien von *T. acidophilum*

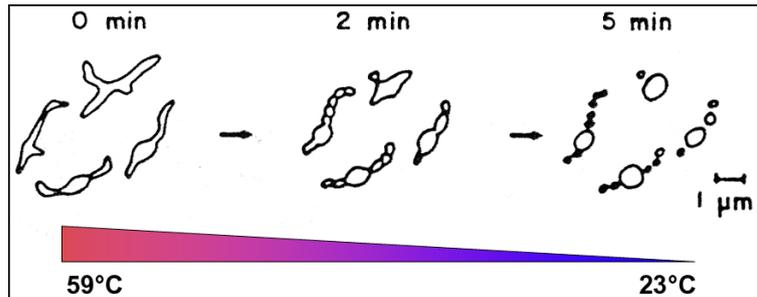
3.1 Einführung

Ursprünglich wurde die Gattung *Thermoplasma spp.*, zu der die beiden Arten *T. acidophilum* und *T. volcanium* zählen, wegen ihres Erscheinungsbildes und des geringen GC-Basenanteils der DNA zu den bakteriellen Mycoplasmen gezählt [Darland *et al.* 1970]. Nachdem die dritte Domäne des Lebens, die Archaea, entdeckt wurde, wurde *Thermoplasma spp.* dieser Domäne zugeordnet [Woese und Fox 1977, Woese *et al.* 1980, Woese *et al.* 1990].

T. acidophilum wurde erstmals aus Proben isoliert, die aus wärmeproduzierenden Kohleabraumhalden in den Vereinigten Staaten entnommen wurden [Darland *et al.* 1970]. Mittlerweile wurden weitere Stämme von *T. acidophilum* in heißen Quellen in Japan [Yasuda *et al.* 1995a], in Solfatare-Feldern in Italien und in marinen hydrothermalen Systemen im Atlantik [Seegerer *et al.* 1988] gefunden. Das thermoazidophile Archaeon *T. acidophilum* kann bei pH-Werten von pH 0.8 bis pH 4 und im Temperaturbereich von 37°C - 65°C wachsen [Belly *et al.* 1973]. Bei Temperaturen um 37°C verlangsamt sich das Wachstum erheblich [Smith *et al.* 1973]. Der intrazelluläre pH-Wert liegt bei pH 5.5 [Searcy 1976]. Der Durchmesser der Zellen ist sehr variabel und reicht von 0.3 bis 2 μm . Die Zellform wird als sphärisch, pleomorph oder filamentös beschrieben [Darland *et al.* 1970]. Der Organismus wird lediglich von einer einzigen 5 - 10 nm dicken, dreischichtigen Plasmamembran umgeben. Manche *T. acidophilum*-Zellen besitzen ein Flagellum, das bis zu 9 μm lang sein kann. In negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Flagellen eine gewellte Form [Black *et al.* 1979].

Searcy *et al.* beobachteten, dass *T. acidophilum*-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur ihre Zellgestalt verändern. Bei 59°C sind die Zellen filamentös, während sie bei Raumtempe-

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Zellform von *T. acidophilum* bei 59°C (links) und nach fünf minütiger Abkühlung auf Raumtemperatur (rechts) (adaptiert aus [Searcy *et al.* 1981]).



ratur eine sphärische Gestalt einnehmen (vgl. Abb. 3.1). Beim Abkühlungsprozess schnüren sich die Zellen ein und bilden mehrere kleinere kugelförmige Zellen. Searcy und seine Mitarbeiter brachten dieses Phänomen in Zusammenhang mit einem labilen internen Cytoskelett [Searcy *et al.* 1981].

T. acidophilum ist fakultativ anaerob, d.h. die Organismen können unter aeroben und anaeroben Bedingungen wachsen. Bei anaerobem Wachstum wird Schwefel reduziert, als Stoffwechselprodukt wird Schwefelwasserstoff (H_2S) freigesetzt. In anaeroben *T. acidophilum*-Kulturen wird die Bildung von 14 mM H_2S beobachtet [Searcy und Hixon 1991]. Da elementarer Schwefel in Wasser unlöslich ist, liegt er in wässrigen Lösungen in kolloidaler Form vor. Im Gegensatz zu anderen Organismen wie z.B. *Pyrococcus furiosus* [Blumentals *et al.* 1990], benötigt *T. acidophilum* direkten Kontakt mit der Schwefeloberfläche, um ihn für den Stoffwechsel zu verwenden [Searcy und Hixon 1991].

Der *T. acidophilum*-Stamm 122-1B2, welcher ursprünglich aus Indiana (USA) stammt, wurde bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen kultiviert, um die Auswirkungen von äußeren Faktoren wie Sauerstoffgehalt, Druck, sowie der Möglichkeit eines adhärenen Wachstums auf die Zellmorphologie im Elektronenmikroskop zu untersuchen. Der Einfluss der Temperatur auf die Zellgestalt wurde in einem Thermomikroskop beobachtet. Mit Hilfe dieser Vorstudien sollte eine geeignete Morphologie für die zelluläre Tomographie gefunden werden. Möglichst flache Zellen ($< 0.5 \mu\text{m}$) sind für diesen Zweck besonders vorteilhaft. Nachfolgend sollten mit Hilfe eines korrelationsbasierten Mustererkennungsalgorithmus makromolekulare Proteinkomplexe innerhalb derartiger Zellen lokalisiert und identifiziert werden. Die Identifikation der Makromoleküle wird erheblich erleichtert, wenn das Cytoplasma nicht zu dicht gepackt ist.

Lösung A		Lösung B	
1.930 g	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	13.20 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
0.180 g	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	3.72 g	KH ₂ PO ₄
0.450 g	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O	2.47 g	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
0.022 g	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.74 g	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
5.000 mg	CuCl ₂ · 2 H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O _{bidest}
3.000 mg	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O		
3.800 mg	VO ₂ SO ₄ · 5 H ₂ O		
2.000 mg	CoSO ₄ · 7 H ₂ O		
ad 1000 ml	H ₂ O _{bidest}		

Tabelle 3.1: Lösungen A und B für das *T. acidophilum*-Medium.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Kultur von *T. acidophilum* unter aeroben Bedingungen

Flüssigkultur

Die Kultivierung von *T. acidophilum* (Stamm 122-1B2) erfolgte bei 59°C in *T. acidophilum*-Medium, das sich wie folgt zusammensetzte: 5 ml Lösung B (vgl. Tab. 3.1), 5 ml 10% (w/v) Glukoselösung (Merck), 0.5 ml Lösung A (vgl. Tab. 3.1) und 1 ml 10% (w/v) Hefeextrakt (Difco). Diese Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit 0.1 ml 98% (v/v) H₂SO₄ auf ca. pH 1.5 eingestellt. Zur Sterilisation wurden die Lösung B, die Glukoselösung und der Hefeextrakt autoklaviert (20 min bei 121°C, Technomara) und Lösung A sterilfiltriert (Pall). 50 ml *T. acidophilum*-Medium wurden auf 59°C vorgewärmt und mit 1.5 ml tiefgefrorener Dauerkultur (122-1B2, DSM 1728) inokuliert. Die aerobe Kultur erfolgte 2 - 3 Tage bei 59°C und 150 rpm im Schüttelbad (innovaTM 3000, NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC). Im Anschluss davon wurde alle zwei Tage 1 ml der Zellkultur in frisches, vorgewärmtes Medium überführt um die Kultur aufrecht zu erhalten. Die optische Dichte der Zellsuspension wurde bei einer Wellenlänge von 540 nm (OD₅₄₀) im Spektrometer (Pharmacia Biotech, Novaspec II) bestimmt. Für die Wachstumskurve (vgl. Abb. 3.3) wurde eine Dreifachbestimmung der OD durchgeführt.

Oberflächenkultur auf festem Nährboden

Der Nährboden auf Natriumsilikatbasis wurde von Jozsef Kukolya entwickelt. Er setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen: 50 ml Lösung B, 50 ml 10% (w/v) Glukoselösung, 1 ml 98% (v/v) H₂SO₄, 10 ml 10% (w/v) Hefeextrakt (Difco) und 5 ml Lösung A.

Diese Mischung wurde mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 50 ml Natriumsilikatlösung (Riedel-de Haën) dazugegeben. Die resultierende Lösung hatte einen pH-Wert von ca. 11. Nachfolgend wurde der pH-Wert mit 98% (v/v) H₂SO₄ (ca. 6 ml) unter ständigem Rühren auf pH 1.75 erniedrigt. Durch Zugabe von 6 M KOH (5 - 11 ml) wurde der pH auf 4.5 angehoben, infolgedessen wird die langsame Gelbildung eingeleitet. Es wurden jeweils 25 ml der Lösung in Petrischalen gegossen. Damit der Nährboden den optimalen pH-Wert für die Zellkultur erreicht, wurde die Oberfläche mit 0.5 ml 6.4% (v/v) H₂SO₄ überschichtet. Einige Mikroliter Zellsuspension aus aerober Kultur wurden auf den vorgewärmten Nährboden ausplattiert. Um zu verhindern, dass die Platten austrocknen, wurden sie in einen verschließbaren Plastikbehälter gestellt, in dem eine gesättigte Wasserdampf-atmosphäre vorherrschte.

3.2.2 Flüssigkultur von *T. acidophilum* bei anaeroben Bedingungen und Überdruck

Die anaerobe Kultur von *T. acidophilum* erfolgte in *T. acidophilum*-Medium bei pH 2.5. Das Medium wurde im Verhältnis 3:2 mit genässtem Schwefel (ein Teil elementarer Schwefel (Merck) und vier Teile 10 mM H₂SO₄, bei 100°C für 30 Minuten sterilisiert) vermischt und bei 100°C für 30 Minuten sterilisiert. Dieses Gemisch wurde für eine halbe Stunde mit Stickstoff begast. Im Anaerobenzelt (Eigenbau der Abteilung) wurden ca. 20 ml des schwefelhaltigen Mediums pro Flasche abgefüllt und mit Gummistopfen und Metaldeckel luftdicht verschlossen. Das verbleibende Volumen wurde bis zu einem Druck von ca. 2 bar mit Stickstoff aufgefüllt. Um die Größe der Schwefelpartikel zu verringern, wurden die befüllten Kulturflaschen für mehrere Stunden ins Ultraschallbad (Bandelin, SONOREX, SUPER RK 156 BH) gestellt. Im Heizschrank (Heraeus INSTRUMENTS) auf 59°C vorgewärmte Flaschen wurden mit Hilfe einer Spritze mit 1 ml aerober Kultur (2 Tage alt) inokuliert. Die anaerobe Kultur erfolgte 4 - 5 Tage bei 59°C ohne Schütteln. Aufgrund seiner hohen Dichte setzte sich der Schwefel am Flaschenboden ab.

3.2.3 Untersuchungen im Thermomikroskop

Um den Einfluss der Temperatur auf die Zellgestalt von *T. acidophilum* zu untersuchen, wurden im Thermomikroskop der Universität Regensburg, ein Lichtmikroskop, das mit einem heizbaren Mikroskopiertisch ausgestattet ist, Aufnahmen von *T. acidophilum*-Zellen bei 60°C, 55°C, 50°C, 40°C, 30°C und 25°C erstellt. Die Zellen wurden in flüssigem Medium

bei aeroben Bedingungen kultiviert. Wegen der geringen Größe von *T. acidophilum* wurden die Zellen mit NanoOrange[®] (Molecular Probes) Fluoreszenz-markiert. NanoOrange ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die hydrophoben Regionen von Proteinen bindet und dadurch seine Fluoreszenz verstärkt. Frei in wässriger Lösung fluoresziert er nicht. Das proteingebundene NanoOrange-Reagenz zeigt ein breites Exzitationsmaximum bei 470 - 490 nm und ein Emissionsmaximum bei 570 - 590 nm. Für die Färbung wurden 10 μ l Zellsuspension mit 0.5 μ l NanoOrange-Reagenz für 10 min im Heizblock bei 60°C in Dunkelheit inkubiert [Grossart *et al.* 2000]. Als Objektträger für das Thermomikroskop dienten Glaskapillaren. Die fluoreszenzmarkierte Zellsuspension wurde am Heizblock (60°C) in vorgewärmte Kapillaren aufgenommen, sofort verschweißt und auf den vorgeheizten Mikroskopiertisch gebracht. Damit die Zellen genügend Zeit zur Anpassung an die optimale Wachstumstemperatur von 60°C haben bzw. eine Regeneration nach einem eventuell erlittenen Temperaturschock zu ermöglichen, wurden die Aufnahmen erst nach zwei Stunden erstellt. Anschließend wurde die Kapillare dann stufenweise auf die jeweils genannten Temperaturen abgekühlt und vor jeder Aufnahme abermals für zwei Stunden äquilibriert. Diese Vorgehensweise wurde solange, bis eine Temperatur von 25°C erreicht wurde, wiederholt. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm durchgeführt. Alle Experimente am Thermomikroskop wurden von Frau Daniela Näther (Archaeenzentrum, Regensburg, Arbeitsgruppe Wirth) durchgeführt.

3.2.4 Vorbehandlung der Zellen für die Kryo-Präparation

Bei allen Experimenten wurde stets versucht, die Zellen bis unmittelbar vor der Kryo-Präparation auf 60°C zu halten, um einen möglichen Einfluss der Temperatur zu minimieren bzw. zu vermeiden. Sämtliche Gegenstände, die mit den Zellen in direkten oder indirekten Kontakt kamen (Pipettenspitzen, Spritzen, Grids und Pinzetten) wurden ebenfalls auf 60°C vorgewärmt.

Dialyse

Aus der aeroben Flüssigkultur wurden bei einer OD₅₄₀ von ca. 0.5 Zellen entnommen. 70 μ l Zellkultur wurden im Heizschrank für 60 Minuten gegen 10 ml *T. acidophilum*-Medium (vgl. Abschnitt 3.2.1) ohne Glukose und ohne Hefeextrakt auf einem hydrophilen Nitrocellulose-Membranfilter (MILLIPORE, Porengröße 0.025 μ m) dialysiert.

Feste Oberfläche

Einige Mikroliter Zellsuspension wurden auf den Nährboden auf Silikatbasis ausplattiert. Hydrophilisierte Gold-Grids, die mit einem Kohlelochfilm beschichtet sind, wurden (mit der Kohlefilm beschichteten Seite nach oben) auf den Flüssigkeitsfilm aus Zellsuspension aufgelegt. Nach drei Tagen, vor der Entwicklung von makroskopisch sichtbaren Kolonien, wurden die Grids eingefroren.

Anaerobe Kultur

In der anaeroben Kultur wuchsen die Zellen adhärent auf den elementaren Schwefelkörnern. Durch heftiges Schütteln des Kulturgefäßes wurden die Zellen von den Schwefelkörnern getrennt. Kurz vor der Kryo-Präparation (< 2 Minuten) wurden mit einer Spritze einige Milliliter aus der anaeroben Kultur entnommen und in ein Eppendorf-Gefäß abgefüllt, verschlossen und bei 60°C bis zur Kryo-Fixierung gehalten.

3.2.5 Kryo-Präparation von ganzen *T. acidophilum* Zellen

Als Objektträgernetzchen dienten Quantifoil R 2/1¹ Kupfer-Grids bzw. Gold-Grids (Quantifoil Micro Tools GmbH) mit 100 × 400 mesh². Die Grids wurden für die Dauer von 30 Sekunden mit einem Plasmacleaner (Harrick Scientific Corporation, NY, USA) hydrophilisiert und mit Pinzetten aufgenommen. Als Alignierungshilfe für die spätere tomographische Rekonstruktion wurde 3 µl kolloidales Gold (Durchmesser ca. 10 nm) auf der Kohleseite des Grids aufgetragen. Nachdem die Goldsuspension eingetrocknet war, wurde auf die selbe Seite 6 µl Zellsuspension pipettiert. Im Fall von direkt auf dem Grid wachsenden Zellen, wurden 4 µl *T. acidophilum*-Medium auf das Grid pipettiert, um die Ausbildung eines Flüssigkeitsfilms vor dem anschließenden Blotten zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wurde die Pinzette aus dem Heizschrank entnommen und in der Einschussapparatur (Eigenbau Rudolf Gatz, MPI für Biochemie) eingespannt. Mit Hilfe eines Filterpapiers (Typ 1, Nr. 1001 090, Whatman) wurde die überstehende Zellsuspension von der unbeschichteten Seite des Objektträgers abgezogen. Im unmittelbaren Anschluss wurde das Grid in flüssiges Ethan eingeschossen. Die Proben wurden dann in flüssigen Stickstoff überführt und darin bis zur Datenaufnahme gelagert.

¹R 2/1: Lochdurchmesser 2 µm, Breite des Kohlestegs 1 µm

²Maschen/Inch

3.2.6 Datenaufzeichnung und Rekonstruktion von Kryo-Elektronentomogrammen

Die Kryo-Elektronentomogramme wurden am CM 300 FEG TEM (Philips, Eindhoven, Niederlande) mit *Zero-Loss* Filterung unter Niedrigdosisbedingungen aufgenommen. Unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff wurden die Grids in einen Kryo-Probenhalter (Gatan, Inc. Pleasanton, CA, USA) eingesetzt und in das Mikroskop eingebaut. Die Kippserien deckten typischerweise einen Winkelbereich von $\alpha_{min} = -70^\circ$ bis $\alpha_{max} = 70^\circ$ in Schritten von $\Delta\alpha = 2.5^\circ$ ab. Für den nominellen Wert des Defokus der einzelnen Projektionen wurde $8 \mu\text{m}$ gewählt, damit ergibt sich die erste Nullstelle der CTF bei ca. $1/4 \text{ nm}^{-1}$. Auf Objektebene betrug die Pixelgröße 0.82 nm bzw. 0.68 nm bei einer 36 500-fachen bzw. 44 000-fachen Vergrößerung. Die Belichtungszeit wurde mit dem reziproken Wert des Kosinus des Kippwinkels α variiert. Für die Belichtungszeit bei einem Kippwinkel von 0° wurden 0.3 Sekunden gewählt. Die aufgenommenen Projektionen wurden durch manuelles Markieren der Goldmarker auf einen gemeinsamen Ursprung ausgerichtet. Mittels des EM-Programmpaketes [Hegerl 1996] erfolgte die 3D Rekonstruktion unter Verwendung der exakt gewichteten Rückprojektion der Tomogramme [Hoppe und Hegerl 1980, Harauz und van Heel 1986].

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Einfluss der Temperatur auf die Zellgestalt

T. acidophilum ist ein thermophiles Archaeon, das ein Temperaturoptimum bei 59°C [Belly *et al.* 1973] aufweist. Searcy *et al.* hatten 1991 beobachtet, dass *T. acidophilum*-Zellen bei 59°C eine charakteristische filamentöse Gestalt aufweisen. Werden die Zellen innerhalb von 5 Minuten von 59°C auf Raumtemperatur abgekühlt, schnüren sich die Zellen ein und werden sphärisch [Searcy und Hixon 1991]. Ein ähnlicher Temperatureffekt auf die zelluläre Morphologie wurde bei einigen Säugerzellen beobachtet [Pollard 1976].

Mittels eines Thermomikroskop wurden bei unterschiedlichen Temperaturen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *T. acidophilum* aus flüssiger Kultur erstellt, um den Einfluss der Temperatur auf die Zellgestalt zu untersuchen. Die Zellen wurden direkt im Kulturmedium mit dem Fluoreszenzfarbstoff NanoOrange angefärbt (vgl. Abschnitt 3.2.3). Um einen möglichen Einfluss des Farbstoffes auf die Zellmorphologie auszuschließen wurde zur Kontrolle auch eine ungefärbte Probe von *T. acidophilum* erstellt und mikroskopiert.

Die von Searcy *et al.* beschriebene Veränderung der Zellform in Abhängigkeit von der Temperatur (vgl. Abb. 3.1) [Searcy und Hixon 1991] konnte nicht beobachtet werden. Die Experimente bei den unterschiedlichen Temperaturen, ergaben, dass die Zellen bei der langsamen, stufenweisen Abkühlung von 60°C auf 25°C ihre Gestalt nicht veränderten. Zudem konnte bei 60°C keine filamentöse Gestalt der Zellen beobachtet werden. Stattdessen wurden ausschließlich kugelförmige oder ovale Zellen vorgefunden (vgl. Abb. 3.2).

3.3.2 Einfluss der Kultivierung auf die Zellgestalt

T. acidophilum konnte in Flüssigkultur und auf festem Nährboden kultiviert werden. Zudem konnte der Einfluss von Sauerstoff auf die Morphologie des Organismus untersucht werden, da *T. acidophilum* unter aeroben und anaeroben Bedingungen wächst. Alle Kultivierungsversuche wurden beim Temperaturoptimum von 59°C und pH-Optimum von pH 2 durchgeführt. Die Grundzusammensetzung der Medien enthielt immer Hefeextrakt, Glukose und Spurenelemente.

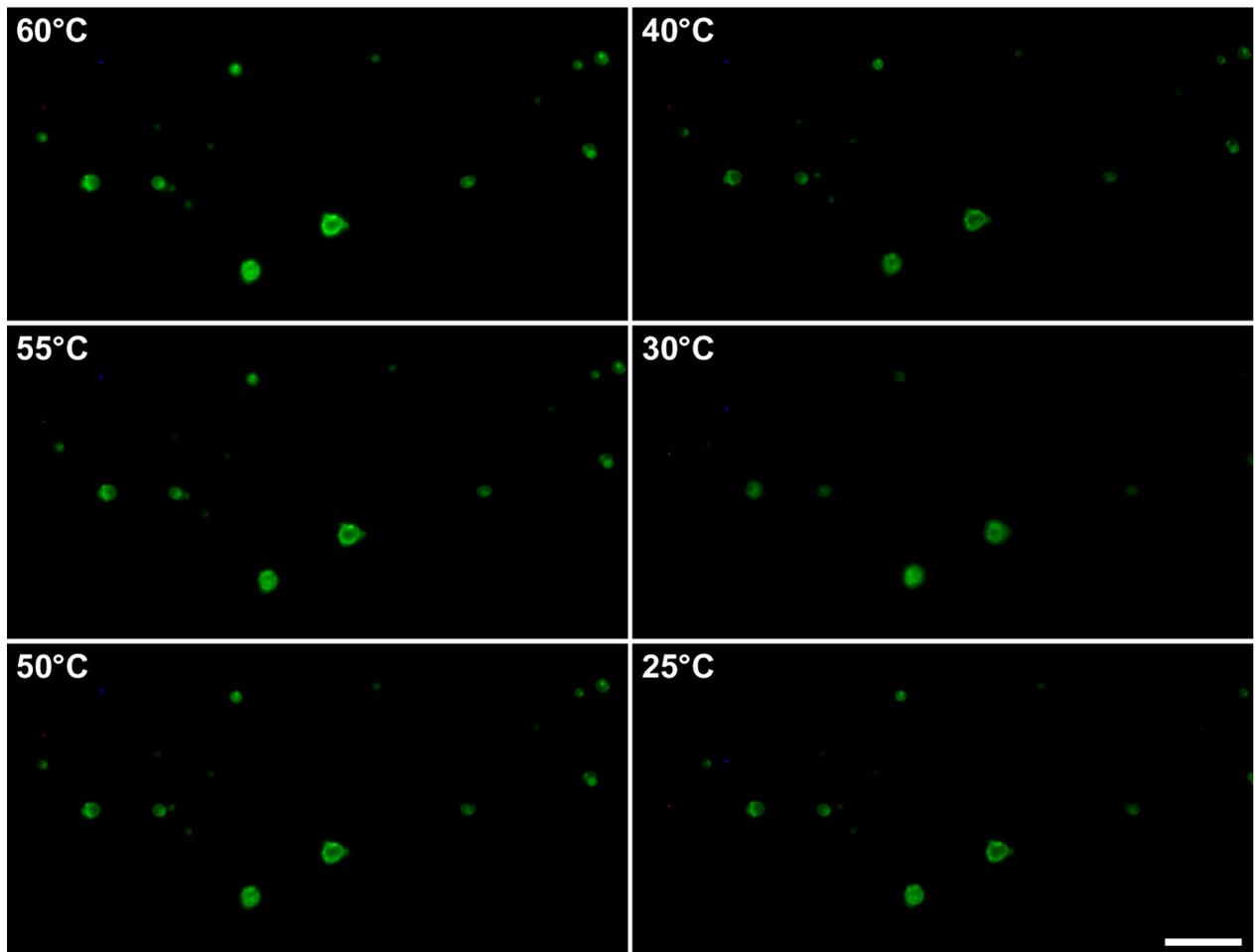


Abbildung 3.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unfixierten *T. acidophilum*-Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen. Durch Zugabe von NanoOrange in das Kulturmedium wurden die Zellen angefärbt. Die Aufnahmen wurden bei einer Wellenlänge von 570 nm erstellt. Der Balken entspricht 10 μm .

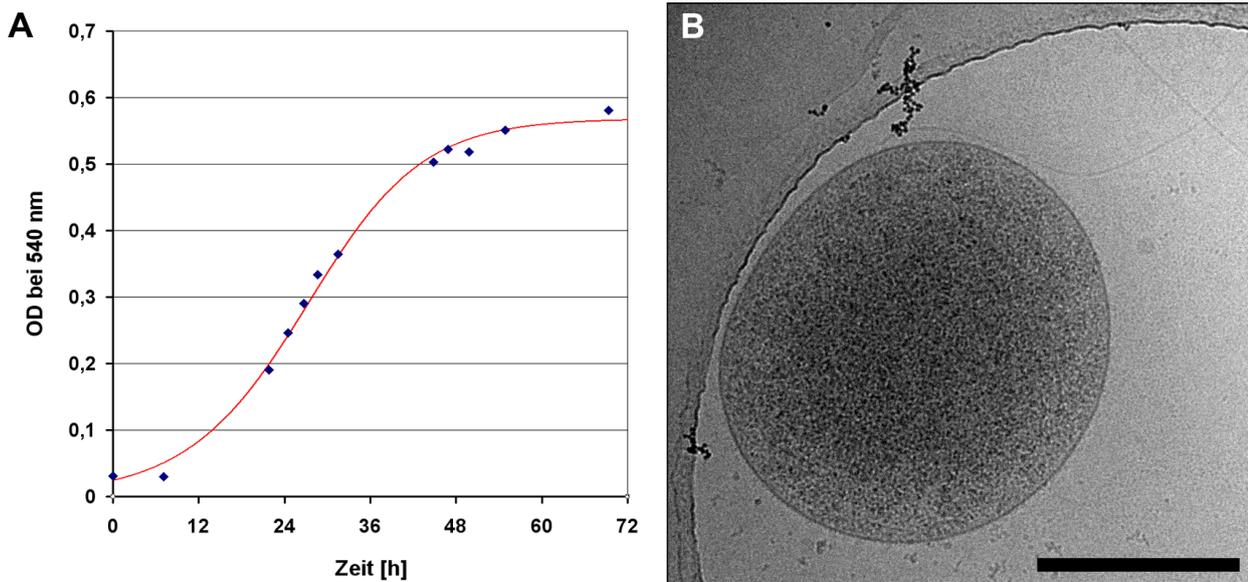


Abbildung 3.3: **A** Wachstumskurve von *T. acidophilum* über einen Zeitraum von 3 Tagen. Die Zellen wurden bei aeroben Bedingungen in Flüssigmedium bei 59°C kultiviert. Das Medium wurde mit 2% einer 2 Tage alten Vorgängerkultur inokuliert. Die gemessenen Werte der OD (blaue Quadrate) konnten durch eine logistische Wachstumskurve angenähert werden (rote durchgezogene Linie). Die Generationszeit beträgt ca. 8 Stunden.

B *T. acidophilum*-Zelle mit Flagellum aus Flüssigkultur bei aeroben Bedingungen kultiviert. Der Balken entspricht 500 nm.

Aerobe Kultur im flüssigen Medium und auf fester Oberfläche

Die Flüssigkultur von *T. acidophilum* erfolgte im *T. acidophilum*-Medium (vgl. Abschnitt 3.2.1) bei aeroben Bedingungen unter ständigem Schütteln. Die Generationszeit wurde aus der Steigung der Tangente im Wendepunkt der angepassten logistischen Wachstumskurve zu ungefähr 8 Stunden bestimmt (vgl. Abb. 3.3 A). Die Zellform war sphärisch bis oval. In einzelnen Fällen waren die Zellen flagelliert (vgl. Abb. 3.3 B). Da sich die im Medium enthaltene Glukose und der enthaltene Hefeextrakt negativ auf die Strahlungsempfindlichkeit der Probe im EM auswirkten, wurde die Zellsuspension vor der Kryo-Fixierung gegen *T. acidophilum*-Medium dialysiert, welches die beiden Bestandteile nicht enthielt (vgl. Abschnitt 3.2.4 Dialyse). Nach der einstündigen Dialyse konnte im EM gehäuft das Auftreten von netzwerkartigen Verbänden aus Zellen beobachtet werden, die sich über einige Mikrometer erstreckten (vgl. Abb. 3.4 A). Das Netzwerk setzt sich aus runden Zellen zusammen, die mit unterschiedlich langen ca. 80 - 320 nm breiten Kanälen verbunden waren. Ein Kreuzungspunkt von 3 Kanälen wurde tomographiert und rekonstruiert (vgl. Abb. 3.4 B und C). Die Ausdehnung in z-Richtung dieser Region betrug ungefähr 200 nm. Im Cytoplasma ließen sich globuläre Strukturen mit homogener Dichte erkennen, deren Durchmesser im Bereich von 50 - 80 nm lagen. Ähnliche Strukturen wurden bereits früher in Tomogrammen von *T.*

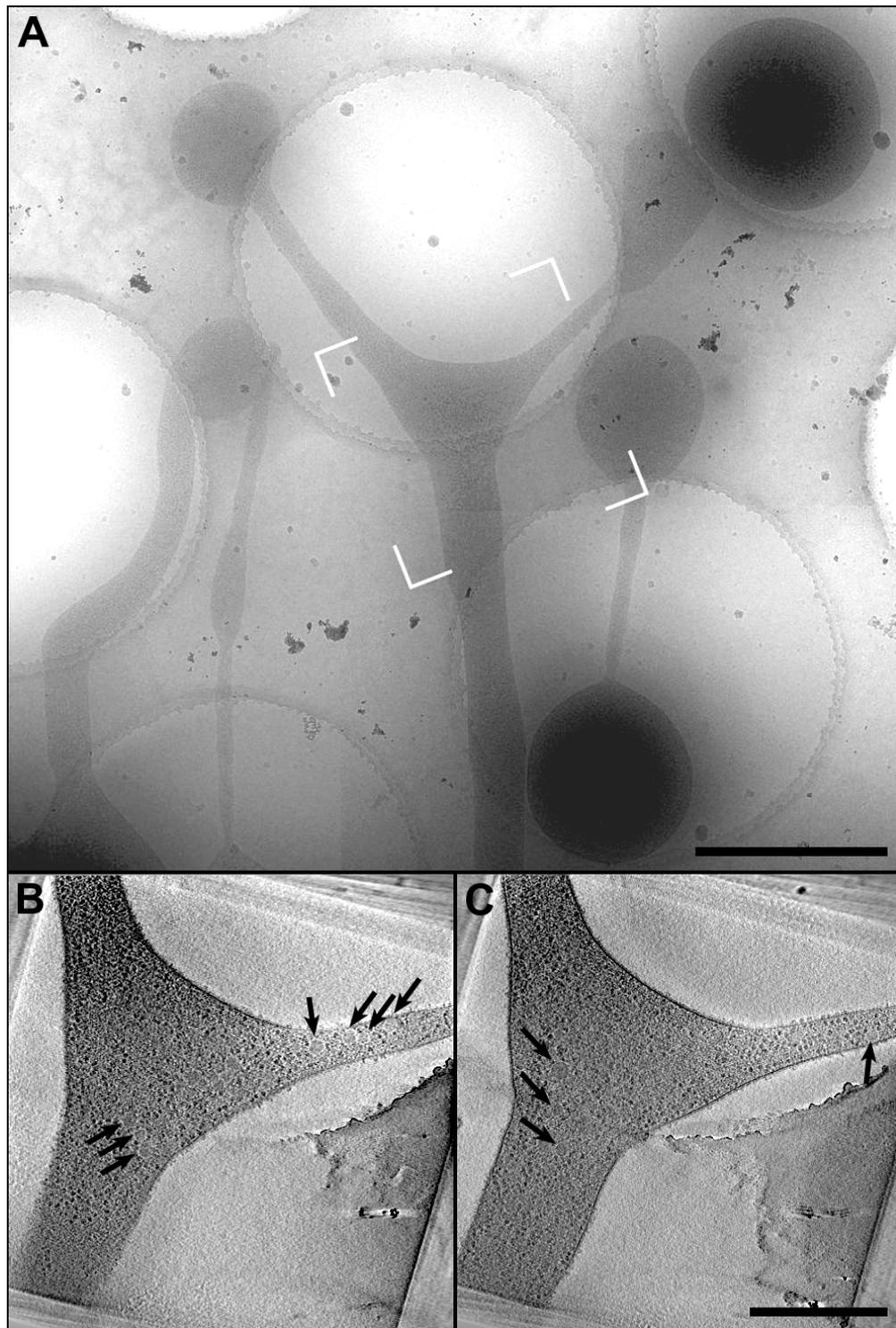


Abbildung 3.4: A Montage aus 2D Aufnahmen von vitrifizierten *T. acidophilum*-Zellen. Vor der Kryofixierung wurden die Zellen aus der aeroben Flüssigkultur für 60 Minuten bei 60°C dialysiert. Von dem weiß markierten Bereich wurde ein Tomogramm aufgenommen. Der Balken entspricht 1 μm . B und C x-y Schnitte (23 nm dick) durch die Rekonstruktion in unterschiedlichen z-Höhen. Schwarze Pfeile markieren globuläre Strukturen im Cytoplasma. Der Balken entspricht 500 nm.

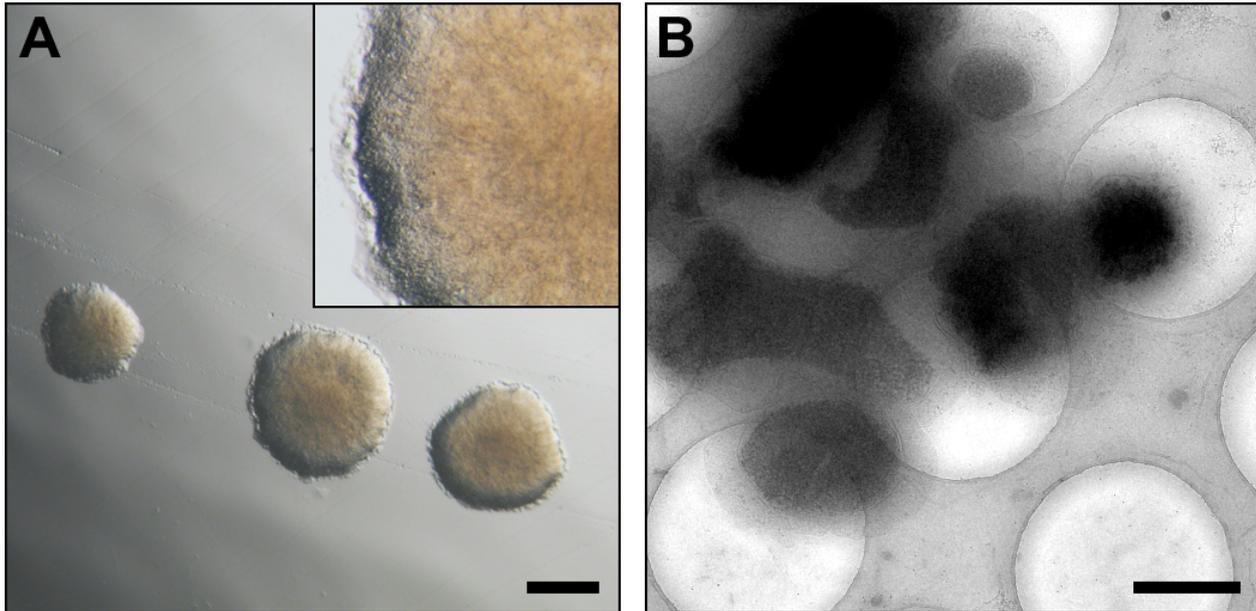


Abbildung 3.5: **A** Kolonien von *T. acidophilum* auf fester Oberfläche (Nährboden auf Silikatbasis). Inset: Vergrößerte Darstellung einer gut entwickelten einzelnen Kolonie. Der Balken entspricht 1 mm. **B** Elektronenmikroskopische Aufnahme von direkt auf dem Grid gewachsenen *T. acidophilum*-Kolonien (drei Tage alt). Der Balken entspricht 1 μm .

acidophilum-Zellen, die mittels Erhöhung des pH-Wertes am Grid partiell lysiert wurden, beobachtet. Walz *et al.* brachten die Partikel, deren Größe im Bereich von 30 - 60 nm variierten, in Zusammenhang mit dem Tricorn-Capsid [Walz *et al.* 1997].

Die Kultur von *T. acidophilum* auf Agarplatten war mit Problemen verbunden, weil die ursprünglich bei Raumtemperatur festen Agarplatten bei 60°C hydrolysierten. Deshalb wurden die Nährböden anstatt mit Agar auf Silikatbasis hergestellt (vgl. Abschnitt 3.2.1). Auf dem Nährboden konnte nach 5 - 7 tägiger Inkubation die Bildung von makroskopischen Kolonien beobachtet werden. Die Kolonien waren von bräunlicher Farbe und hatten einen Durchmesser von bis zu 3 mm (vgl. Abb. 3.5 A). Im Lichtmikroskop erschienen die äußersten Randbereiche der Kolonien opaleszent und unregelmäßig. Für die Untersuchungen im EM wurden die Zellen direkt auf den Gold-Grids, die mit einem Kohlelochfilm bespannt waren, kultiviert (vgl. Abschnitt 3.2.4 Feste Oberfläche). Im EM konnten kleine Kolonien aus Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zur aeroben Flüssigkultur lagen die Zellen dicht nebeneinander und bildeten einen „Rasen“ aus (vgl. Abb. 3.5 B). In morphologischer Hinsicht unterschieden sich die individuellen Zellen von denen aus aerober Flüssigkultur. Der Großteil der Zellen war nicht von sphärischer Gestalt sondern irregulär. Innerhalb der Zelle war die Dichte des Cytoplasmas nicht gleichmäßig verteilt, zum Rand hin wurden die Zellen dünner.

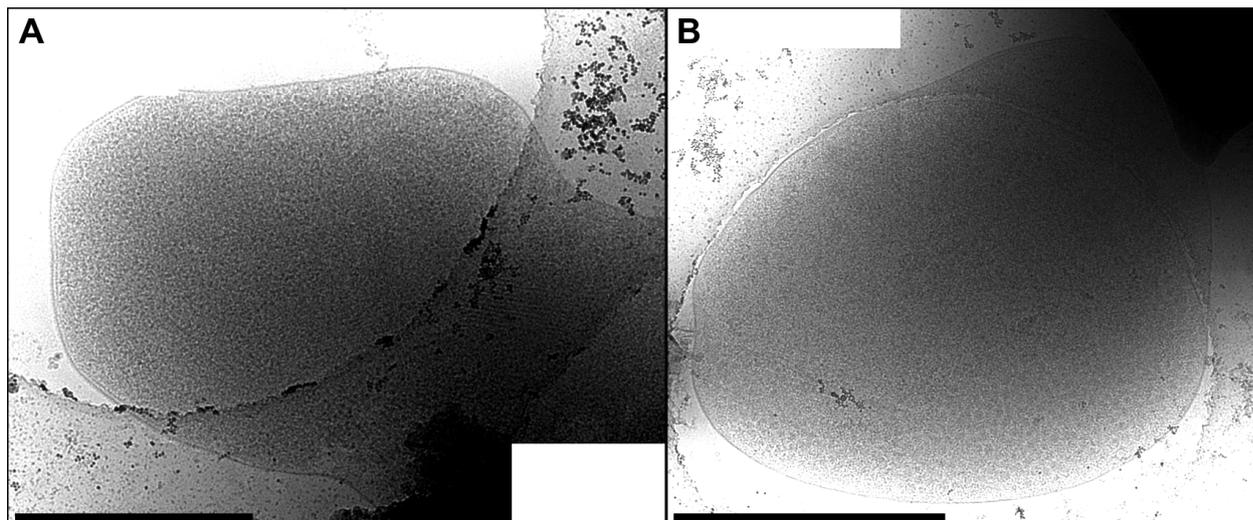


Abbildung 3.6: Montage aus 2D Aufnahmen von *T. acidophilum* aus anaerober Kultur. In der rechten oberen Ecke von Abb. **B** ist ein Schwefelkorn zu erkennen. Der Balken in **A** bzw. **B** entspricht 500 nm bzw. 1 μm .

Anaerobe Kultur bei Überdruck

Für die anaerobe Kultur wurde ein ähnliches Medium, wie für die aerobe Flüssigkultur verwendet, mit dem Unterschied, dass dem Medium elementarer Schwefel, auf dem die Zellen adhärent wuchsen, zugesetzt wurde. Zudem herrschte in den anaeroben Kulturgefäßen ein Überdruck von 2 bar vor (vgl. Abschnitt 3.2.2). Unter anaeroben Bedingungen verlangsamte sich das Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kultur im flüssigen Medium. Wegen des im Medium gelösten Schwefels war es aber nicht möglich, die OD zu bestimmen. Während des Wachstums konnte die Bildung von H_2S wahrgenommen werden. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen 5 Tage nach der Inokulation aus der anaeroben Flüssigkultur entnommen.

In morphologischer Hinsicht hatten die *T. acidophilum*-Zellen, die unter anaeroben Bedingungen kultiviert wurden, mehr Ähnlichkeit mit den Zellen aus der aeroben Flüssigkultur als mit den Zellen, die direkt auf dem Grid adhärent gewachsen waren. Die Form der Zellen war oval oder irregulär (vgl. Abb. 3.6 **A** und **B**). Aus den tomographischen Rekonstruktionen ging hervor, dass in den anaerob gewachsenen Zellen gehäuft globuläre Strukturen in unterschiedlichen Größen vorkamen (vgl. Abb. 3.7 **A** und 3.8).

Die maximale laterale Ausdehnung der Zelle in Abb. 3.7 **A** betrug $1340 \text{ nm} \times 950 \text{ nm}$, in z-Richtung hatte sie eine Dicke von ca. 200 nm. Nähert man die Zelle durch ein Ellipsoid an, umfasst sie ein Volumen von ungefähr $0.127 \mu\text{m}^3$. In diesem Tomogramm wurden ca. 400 annähernd sphärische Partikel manuell lokalisiert, welche ungefähr 21% des Gesamtvolumens

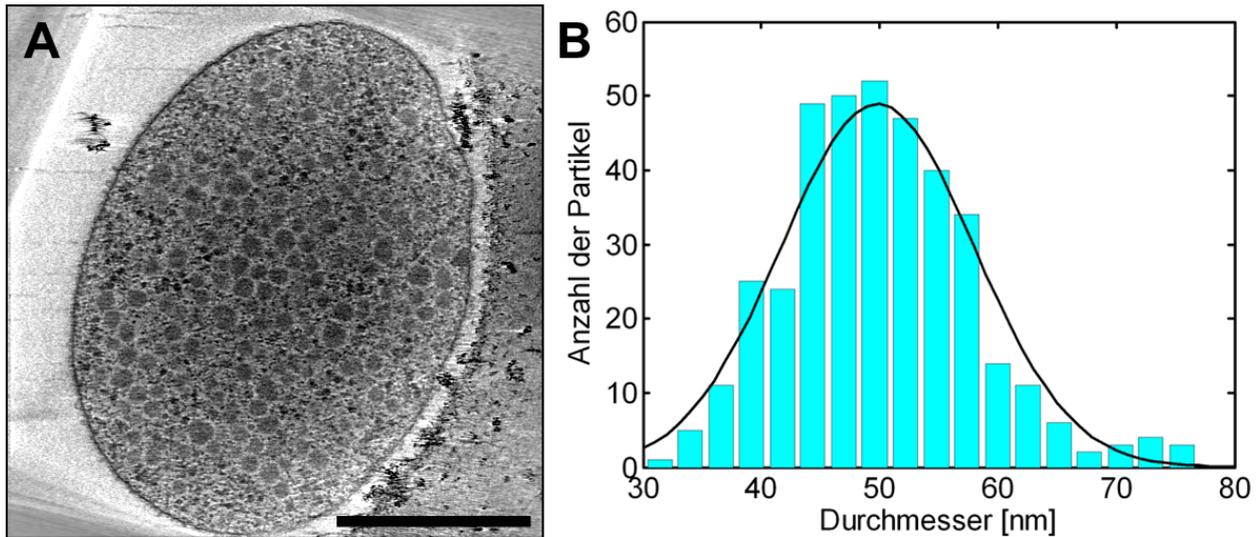


Abbildung 3.7: **A** x-y-Schnitt durch das Tomogramm einer Zelle, die unter anaeroben Bedingungen kultiviert wurde. Die Pixelgröße beträgt 2.72 nm und der Balken entspricht 500 nm. **B** Größenverteilung der sphärischen Partikel, die innerhalb der Zelle lokalisiert wurden. Die gemessene Verteilung der Partikeldurchmesser kann durch eine Gauß-Kurve angenähert werden (schwarze durchgezogene Linie).

der Zelle einnahmen. Die Partikel wurden durch Kugeln approximiert, vermessen und die Durchmesser als Histogramm dargestellt. Aus der Häufigkeitsverteilung war ersichtlich, dass die Durchmesser der Partikel normalverteilt waren (vgl. Abb. 3.7 B). Der Erwartungswert des Durchmessers lag bei 49.8 nm und die Partikeldurchmesser variierten im Bereich zwischen 30.1 nm bzw. 76.8 nm. Die globulären Strukturen, welche in den aerob gewachsenen Zellen beobachtet wurden, lagen im selben Größenbereich wie die Partikel, die in den Zellen aus der anaeroben Kultur gefunden wurden (vgl. Abb. 3.4 B und C). Mögliche Ursachen für die Zunahme der Anzahl dieser Strukturen könnte die Umstellung des Stoffwechsels von Sauerstoff- auf Schwefelatmung sein oder die Erhöhung des Drucks auf 2 bar. Die Natur dieser globulären Strukturen und deren Funktion wurde bis jetzt noch nicht geklärt. In Prokaryoten gibt es mehrere Arten von Zelleinschlüssen innerhalb des Cytoplasmas, die als Reservoir für Energieträger dienen. Die verbreitetsten prokaryotischen Einlagerungen sind Glykogen, Poly- β -Hydroxyfettsäuren, Phosphat- und Schwefelgranula. Glykogen, welches aus dem Skelettmuskel von Kaninchen isoliert wurde, zeigt eine ähnliche Größenverteilung wie die sphärischen Partikel in *T. acidophilum*. Der mittlere Durchmesser der Glykogenpartikel aus Kaninchen liegt bei 39.4 nm [Wanson und Drochmans 1968].

Im Proteom von *T. acidophilum* wurde ein Protein mit der Bezeichnung, Ta0341, gefunden, welches ein verwandtes Protein zur α -1,6-Glucosidase (*glycogen debranching enzyme*) ist [Sun 2005]. Dieses Protein wird für den Abbau für Glykogen benötigt.

In einer weiteren tomographischen Rekonstruktion einer anaerob gewachsenen Zelle (vgl.

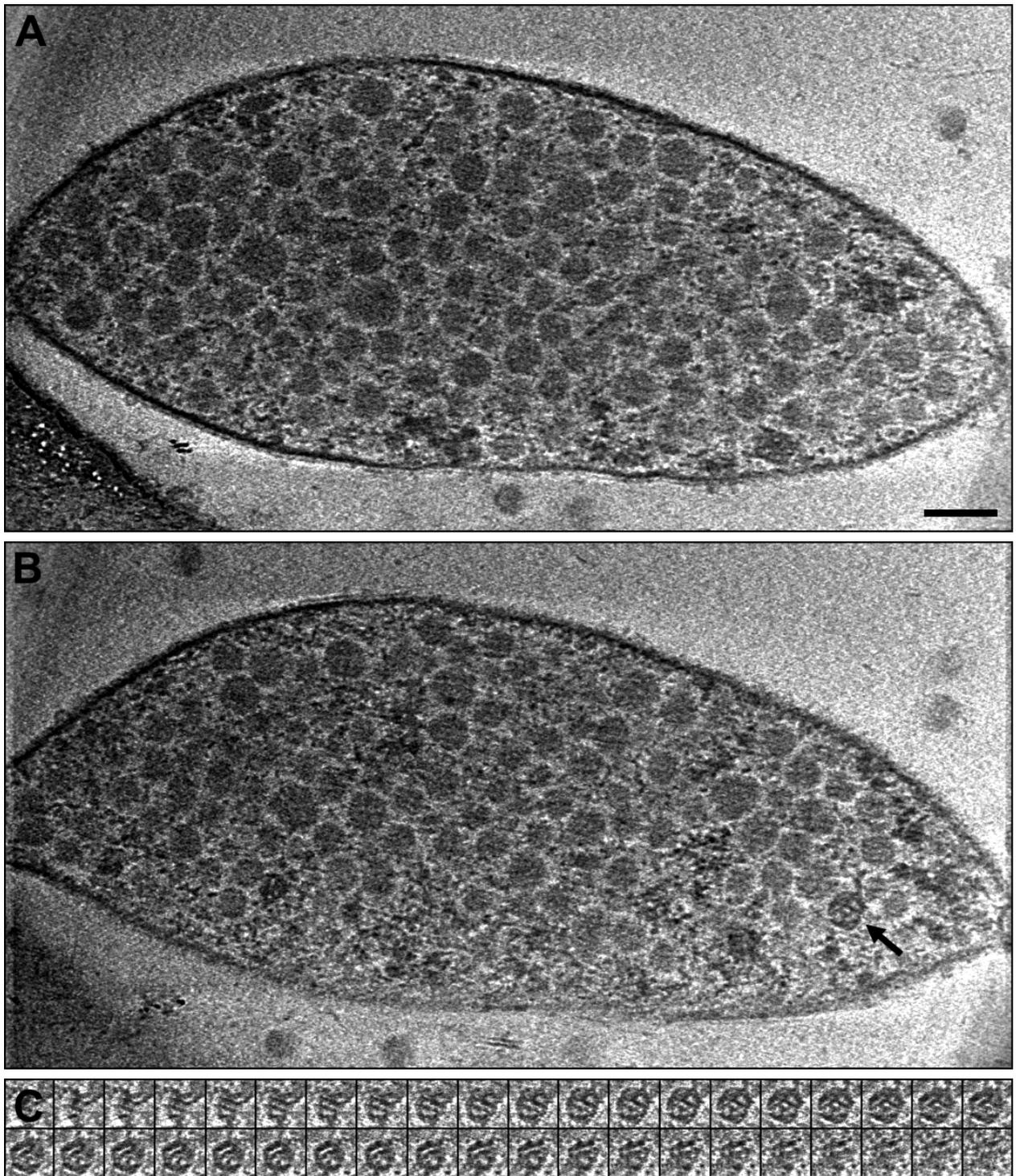


Abbildung 3.8: A und B zeigen x-y-Schnitte (1.364 nm dick) in zwei unterschiedlichen z-Höhen durch die 3D Rekonstruktion einer *T. acidophilum*-Zelle die unter anaeroben Bedingungen kultiviert worden ist. Die Rekonstruktion wurde mit SIRT erstellt. C Galerie von x-y-Schnitten (1.364 nm) durch das mit einem schwarzen Pfeil markierte Partikel aus Abb. B. Im Gegensatz zu den anderen sphärischen Partikel ist es strukturiert und nicht von homogener Dichte. Der maximale Durchmesser des Partikels beträgt 54.4 nm. Der Balken entspricht 100 nm.

Abb. 3.8) konnte neben den Partikel mit homogener Dichte ein strukturierter Partikel mit einem Durchmesser von 54.4 nm gefunden werden (vgl. Abb. 3.8 **B** schwarzer Pfeil). Die Größe und die Form dieses makromolekularen Proteinkomplexes hatte eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Tricorn-Capsid. Das Tricorn-Capsid, eine hochmolekulare Protease mit einem Gesamtmolekulargewicht von 14.6 MDa und mit einem Durchmesser von 55 nm, bildet *in vitro* eine ikosaedrische Capsidstruktur, die aus 20 hexameren Tricorn-Untereinheiten besteht, aus. Das Innere des Tricorn-Capsids bildet einen Hohlraum von ca. 37 nm [Walz *et al.* 1997]. Das in der *T. acidophilum*-Zelle gefundene Partikel war dagegen teilweise gefüllt, wie aus einer Serie von x-y-Schnitten ersichtlich ist (vgl. Abb. 3.8 **C**).

Die Kultivierung von *T. acidophilum* bei anaeroben Wachstumsbedingungen unter Überdruck erwies sich für die tomographische Datenaufzeichnung am geeignetsten. Eventuell versuchen die *T. acidophilum*-Zellen die Kontaktfläche zum Schwefel zu maximieren und schmiegen sich deshalb eng an die Oberfläche der Schwefelpartikel an, was die geringe Ausdehnung in z-Richtung erklären würde. Durch die Vielzahl der globulären Partikel war das Cytoplasma im Vergleich zu Zellen aus anderen Kulturbedingungen nicht so dicht gepackt. Bei dieser Art von zellulären Tomogrammen konnte die automatisierte Mustererkennung von makromolekularen Proteinkomplexen innerhalb des Cytoplasmas von intakten *T. acidophilum*-Zellen angewendet werden (vgl. Kap. 6).

4. Charakterisierung eines archaealen Aktin-Homologs aus *T. acidophilum*

4.1 Einführung

Lange Zeit galt das Fehlen eines Cytoskeletts in Prokaryoten als ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen pro- und eukaryotischen Zellen. Es wurde angenommen, dass sich ein Cytoskelett erst relativ spät in der Evolution entwickelt hat. Vereinzelt Berichte von cytosekelettähnlichen Strukturen in Archaeen [Searcy *et al.* 1978, Searcy *et al.* 1981] fochten dies zwar an, aber der direkte Beweis für die Existenz dieser Strukturen in Archaeen blieb aus. Bei Bakterien ging man davon aus, dass die externe Zellwand aus Peptidoglycan primär für die Zellform ausschlaggebend sei. Dies wurde jedoch spätestens mit der Entdeckung der *Mollicutes* [Tully 1992, Tully *et al.* 1993] in Frage gestellt - einer Klasse zellwandloser Bakterien, die diverse dynamische Morphologien und Zellbewegungen aufweisen, ohne jedoch über Zellanhänge (wie z.B. Flagellen oder Sekretionsorganellen [Bardy *et al.* 2003] zu verfügen, welche normalerweise mit Bewegung in Zusammenhang stehen. Kryo-Elektronentomogramme des Bakteriums *Spiroplasma melliferum*, das zu der Klasse der *Mollicutes* zählt, gaben erstmals einen Einblick in den räumlichen Verlauf und den Aufbau des bakteriellen Cytoskeletts *in vivo* [Kürner *et al.* 2004].

Das eukaryotische Cytoskelett besteht aus dynamisch auf- und abbaubaren Filamenten, die sich ständig im Umbau befinden. Es ist verantwortlich für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihrer äußeren Form, für aktive Bewegungen der Zelle als Ganzes, sowie für Bewegungen und Transporte innerhalb der Zelle. Bei eukaryotischen Zellen setzt sich das Cytoskelett aus drei Klassen faseriger Strukturen zusammen: den 24 nm dicken Mikrotubuli, den 7 - 9 nm dicken Mikrofilamenten und den 8 - 11 nm dicken Intermediärfilamenten. Mikrotubuli sind aus dem Protein Tubulin (55 kDa) aufgebaut, welches in Form von Dimeren Protofilamente bildet, die sich zu einem Hohlzylinder mit ausgeprägter Polarität zusammenlagern. Sie bilden den Spindelapparat bei der Chromosomensegregation und sind für den

intrazellulären Langstreckentransport von Organellen oder Vesikeln verantwortlich. Mikrofilamente (auch Aktinfilamente oder filamentöses Aktin genannt) sind aus Aktin (43 kDa) aufgebaut. Dabei polymerisieren Aktin-Monomere (auch als G-Aktin bezeichnet) zunächst zu helikal angeordneten Filamenten, von denen jeweils zwei ein polares, doppelhelikales Filament aufbauen. Vor allem in netzartigen Anordnungen unterhalb der Plasmamembran und in Membranausbuchtungen stabilisieren sie die äußere Form der Zelle. Aktinfilamente werden auch für den Kurzstreckentransport z.B. von Vesikeln zur Plasmamembran benötigt. Die Intermediärfilamente bilden sich aus IF-Proteinen (*intermediate filament proteins*) wie z.B. Kreatin oder Lamin, welche ein sehr zellspezifisches Expressionsmuster und eine zellspezifische Organisation aufweisen. Die länglich gestreckten Monomere bilden Multimere mit „*coiled-coil*“ Strukturen, die sich kettenförmig zu Protofilamenten zusammenlagern. Aus den Protofilamenten entstehen die hohlfaserartigen Intermediärfilamente, welche die Zelle stützen.

Erst mit der Entdeckung bakteriellen Zellteilungsproteins FtsZ (*filamentation temperature-sensitive protein Z*), das strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu dem eukaryotischen Tubulin der Mikrotubuli hat, bekam die These eines bakteriellen Cytoskeletts als Vorläufer des eukaryotischen Cytoskeletts eine stichhaltige Grundlage [Erickson 1998, Faguy und Doolittle 1998, Löwe und Amos 1998, Lutkenhaus und Addinall 1997]. Mit Hilfe von Immunofluoreszenz konnte erstmals die Lokalisierung des cytokinetischen FtsZ-Rings in *Escherichia coli* gezeigt werden (vgl. Abb. 4.1 B) [Bi und Lutkenhaus 1991, Ma *et al.* 1996]. *E. coli*-Mutanten, bei denen das FtsZ-Gen ausgeschaltet ist, wachsen weiter, ohne sich zu teilen, und es bilden sich lange, vielkernige Ketten von Zellen [De Pedro *et al.* 1997]. Analog zu Tubulin, benötigt FtsZ GTP zur Bildung von Protofilamenten (vgl. Abb. 4.1 A) [Hoppert und Mayer]. Diese haben einen Durchmesser von 4 - 5 nm und können sich zu 23 nm dicken, tubulären Strukturen zusammenlagern, welche in Form und Größe den Mikrotubuli ähneln.

Bakterielle Strukturverwandte zu Aktin sind die Proteine MreB (das MreB-Gen ist im *murein cluster e* lokalisiert), Mbl (*mreB-like protein*) und ParM (*partitioning locus motor protein*) [van den Ent *et al.* 2001a]. MreB (39 kDa) ist ein nur in stäbchenförmigen Bakterien vorkommendes Protein, das maßgeblich die langgestreckte Form der Zellen bestimmt. In *Caulobacter crescentus* bildet dieses Protein spiralförmige Strukturen aus, die sich während des Zellzyklus dynamisch verändern und für die Zellpolarität bedeutend sind [Gitai *et al.* 2004]. Das dynamische Lokalisierungsmuster von

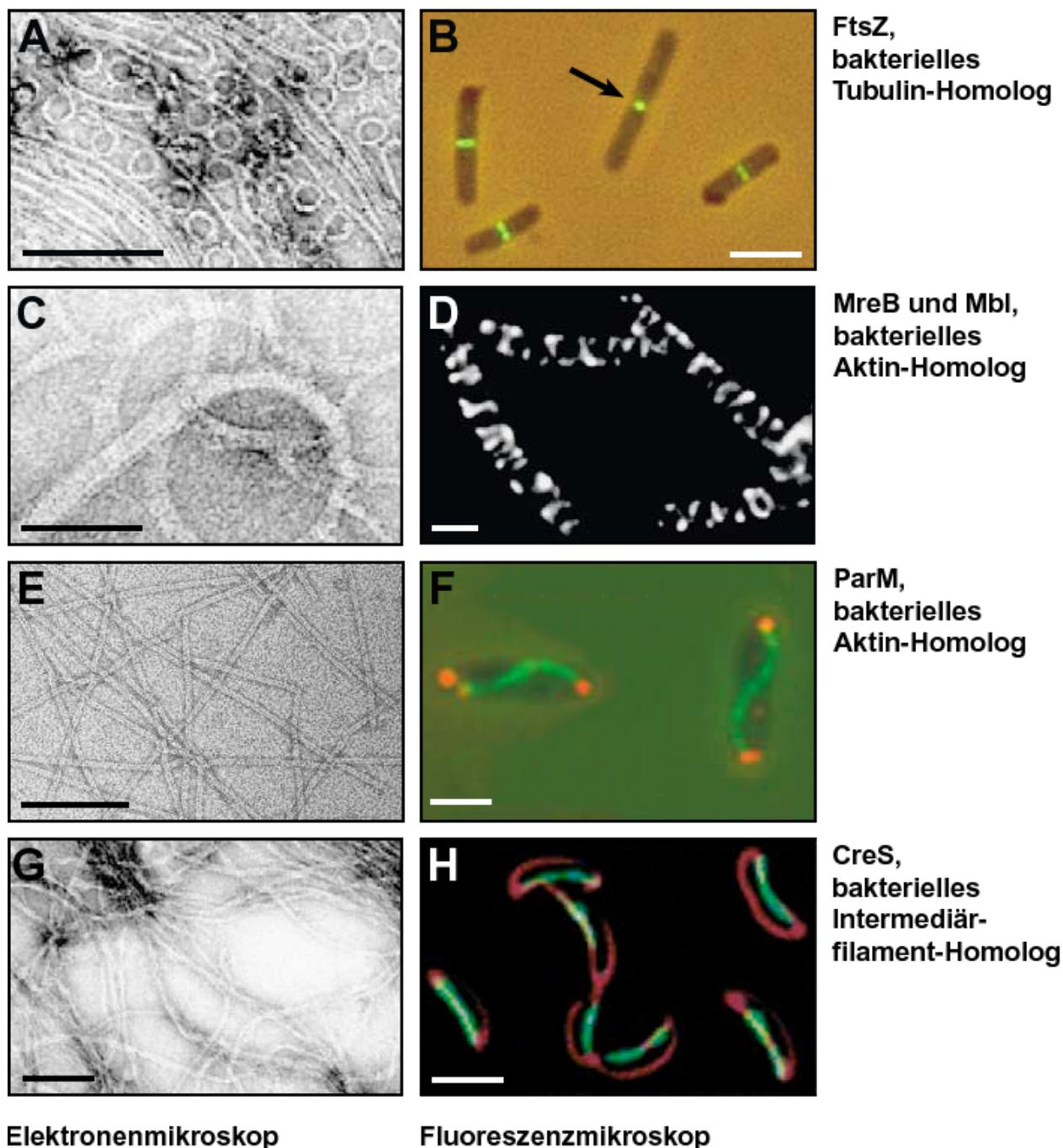


Abbildung 4.1: Elemente des bakteriellen Cytoskeletts (adaptiert aus [Møller-Jensen und Löwe 2005]). In den Abbildungen **A**, **C**, **E** und **G** sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von Proteinpolymeren dargestellt. Die intrazelluläre Lokalisierung der Filamente ist durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (**B**, **D**, **F** und **H**). **A** Gerade und ringförmige FtsZ Protofilamente assembliert in der Gegenwart von GDP. **B** Lokalisierung von FtsZ in *E. coli*-Zellen. Der Pfeil markiert die Position des Z-Ringes. **C** Filamente aus MreB mit ATP polymerisiert. **D** Helikale Filamente aus Mbl-GFP in *B. subtilis*. **E** ParM-Polymere in Gegenwart von ATP- γ -S und Mg^{2+} [Møller-Jensen *et al.* 2002]. **F** Intrazelluläre Lokalisation von Plasmid-DNA (orange) und ParM (grün) im *E. coli*-Stamm MC 1000 [Møller-Jensen *et al.* 2003]. **G** Intermediäre Filamente, die sich aus His-CreS zusammensetzen. **H** Fluoreszenzbild der CreS-GFP Hybridstrukturen (grün) in *C. crescentus*. Die Zellmembran ist rot angefärbt. Der Balken in **A**, **C**, **E** und **G** entspricht 100 nm und in **B**, **D**, **F** und **H** 2 μ m.

MreB und Mbl (vgl. Abb. 4.1 D) während des Zellzykluses deutet darauf hin, dass sie an der Organisation der Zellwand-Synthese während der Zellteilung beteiligt ist [Carballido-Lopez und Errington 2003, Daniel und Errington 2003, Figge *et al.* 2004]. Beide Proteine sind zudem in *Bacillus subtilis* und *E. coli* an der Chromosomen-Segregation beteiligt [Kruse *et al.* 2003, Soufo und Graumann 2003]. In *B. subtilis* bildet MreB helikale, filamentöse Strukturen aus, die spiralförmig unterhalb der cytoplasmatischen Membran durch die Zelle verlaufen [Jones *et al.* 2001]. Die Ausschaltung von MreB induziert die Bildung runder, aufgeblähter Zellen und führt letztendlich zum Absterben der Zelle [Doi *et al.* 1988, Wachi *et al.* 1987]. Dieses Phänomen wurde nicht nur für *B. subtilis* und *C. crescentus*, sondern auch in *E. coli* beobachtet [Kruse *et al.* 2005]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das heterolog in *E. coli* exprimierte MreB aus *Thermotoga maritima* *in vitro* zu F-Aktin-ähnlichen Filamenten und Sheets polymerisiert (vgl. Abb. 4.1 C). Trotz einer geringen Sequenzhomologie ($\sim 15\%$) stimmt die 3D Struktur von MreB bemerkenswert mit der von Aktin überein [van den Ent *et al.* 2001a, van den Ent *et al.* 2001b]. Neben MreB/Mbl ist auch das plasmidkodierte ParM-Protein von aktinartiger Struktur. Im Unterschied zu MreB, aber sehr ähnlich dem F-Aktin, bildet ParM eine doppelhelikale Struktur aus (vgl. Abb. 4.1 E). ParM ist an der Plasmid-DNA-Segregation beteiligt (vgl. Abb. 4.1 F) [Møller-Jensen *et al.* 2003]. In seiner Funktion, Plasmide in Richtung der Zellpole zu orientieren, weist es somit deutliche Ähnlichkeiten zur Funktion des eukaryotischen Spindelapparates auf.

Mit der jüngsten Entdeckung eines intermediärfilamentähnlichen Proteins namens Crescentin (CreS) aus *C. crescentus* wurde schließlich auch ein bakterielles Homolog zur dritten Klasse der eukaryotischen Cytoskelett-Eelemente entdeckt. CreS ist der bestimmende Faktor in der Morphologie von *C. crescentus* (vgl. Abb. 4.1 H) [Margolin 2004]. Je nach Wachstumsphase nehmen die Zellen eine gebogene oder helikale Form an. Zellen, die sich in der stationären Phase befinden, haben eine helikale Gestalt, da CreS eine Helix entlang der Cytoplasmamembran bildet [Ausmees *et al.* 2003]. Bei der Deletion des CreS-Gens, nehmen diese Zellen eine gerade stäbchenförmige Gestalt an. *In vitro* kann die Filamentbildung von rekombinant exprimierten CreS Protein spontan durch Dialyse induziert werden. Die assemblierten Filamente haben einen Durchmesser von 10 nm (vgl. Abb. 4.1 G) [Ausmees *et al.* 2003].

Schließlich sei noch ein letztes Protein erwähnt, welches in allen drei Domänen des Lebens vorkommt, nämlich der Elongationsfaktor EF-Tu, der im allgemeinen an der Proteinsynthese (Translation) beteiligt ist. EF-Tu weist eine morphologische Ähnlichkeit zu Aktin auf

[Rosenbusch *et al.* 1976] und polymerisiert *in vitro* zu Filamenten mit einem periodischen Abstand von 6 nm entlang der Filamentachse [Beck *et al.* 1978]. Es bleibt jedoch zu klären, ob dieses Merkmal in lebenden Zellen relevant ist, was bereits spekuliert wurde [Mayer 2003]. Man sollte jedoch nicht unbedingt erwarten, dass prokaryotische Cytoskelett-Elemente, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem eukaryontischen Cytoskelett aufweisen, notwendigerweise der gleichen Funktion in Bakterien dienen. Proteine, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz-Homologie mit Aktin verwandt sind, können sehr unterschiedliche Funktionen haben, die in keinem Bezug zum Cytoskelett stehen. Hierzu zählen beispielsweise die Hexokinasen und Hitzeschock-Proteine (Hsp70/DnaK) [Bork *et al.* 1992].

In Genomen von Archaeen wurden nur wenige homologe Sequenzen zu Aktin identifiziert. Diese treten verstreut über unterschiedliche Ordnungen im Reich der Euryarcheota in *Methanopyrus kandleri*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Archaeoglobus fulgidus* und im Reich der Thermoplasmatales in *T. acidophilum*, *T. volcanium* und *Ferroplasma acidarmanus* auf. Einige Proteine, die homolog zu Aktin sind, wurden in der dritten Domäne des Lebens, den Archaeen, nachgewiesen [Searcy *et al.* 1978, Sioud *et al.* 1987]. Strukturell wurde bis jetzt noch kein archaeales Aktin-Homolog charakterisiert, obwohl es in Dünnschnitten von *T. acidophilum* Anzeichen dafür gibt, dass in Archaeen Strukturen existieren, die einem Cytoskelett ähnlich sind [Yasuda *et al.* 1995a].

In Rahmen dieser Arbeit wurden in Kryo-Elektronentomogrammen von intakten *T. acidophilum*-Zellen filamentöse Strukturen beobachtet, die einen ersten Hinweis auf die Existenz eines archaealen Cytoskeletts geben können und Anlass dazu gaben, im Genom von *T. acidophilum* nach Genen zu suchen, welche für Proteine kodieren, die Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen des bakteriellen Cytoskeletts haben.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung

Kryo-Elektronentomographie von intakten Zellen

T. acidophilum wurde unter aeroben Bedingungen bei 59°C in flüssigem Medium kultiviert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Die Kryo-Präparation erfolgte wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Die Daten wurden am CM300 FEG TEM (Philips, Eindhoven, Niederlande) unter Niedrigdosisbedingungen aufgezeichnet und die Rekonstruktion der Kippserie wie in Abschnitt 3.2.6 durchgeführt.

Negativkontrastierung von aufgereinigtem Protein

Mit kontinuierlichem Kohlefilm beschichtete Kupfer-Grids (PLANO W. Plannet GmbH, 100 × 400 mesh) wurden für 30 Sekunden im Plasmacleaner (Harrick Scientific Corporation, NY, USA) beglimmt, um die Oberfläche hydrophil zu machen und die Adsorption der Probe zu erleichtern. 3 µl Proteidlösung (1 mg/ml) wurde für 1 Minute auf dem Grid adsorbiert. Mit Filterpapier (Typ 1, Nr. 1001 090, Whatman) wurde der Überstand seitlich abgezogen. Der verbleibende Flüssigkeitsfilm wurde für 30 Sekunden mit 2% (w/v) ungepufferter Uranylacetat-Lösung (~ pH 4) negativ kontrastiert. Die überstehende Uranylacetat-Lösung wurde mit Filterpapier vom Grid abgesaugt. Das Grid wurde an der Luft getrocknet.

Am CM20 FEG TEM (Philips, Niederlande) wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV die Elektronenmikrographen aufgenommen. Die negativ kontrastierten Proben wurden mit einem ungekühlten Präparathalter eingeschleust und bei Raumtemperatur mikroskopiert. Die einzelnen Bilder wurden bei 7 800- und 85 000-facher Vergrößerung mit einer 2048 × 2048 Pixel CCD-Kamera aufgezeichnet. Auf Objektebene korrespondierte die Pixelgröße zu 17.889 Å bzw. 1.647 Å. Die Bildverarbeitung wurde im EM Software-System [Hegerl 1996] auf Opteron Workstations durchgeführt. Für die Fourier-Filterung wurde das Powerspektrum von kristallinen Bereichen berechnet. Im Powerspektrum separiert sich das periodische Signal vom Rauschen. Mit einem Fensterfilter, der nur die auf einem Gitter liegenden Bereiche um die Beugungsreflexe für die Rücktransformation zulässt, ist es möglich, grobe Unregelmäßigkeiten zu entfernen und das Rauschen zu reduzieren. Die Fourier-Rücktransformation enthüllt fast ausschließlich die periodischen Bildinformationen ohne Rauschen.

4.2.2 Immungold-Markierung an Dünnschnitten

Für Immungold-Markierung an fixierten *T. acidophilum*-Zellen und Western-Blot-Analyse wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das rekombinante Protein Ta0583 im Kaninchen erzeugt. Dieser wurde von Annette Röben (MPI für Biochemie, Martinsried, Abt. Hartl) affinitätsgereinigt (1.5 mg/ml in 20% (v/v) Glycerin) und wird im folgenden mit anti-Ta0583-Antikörper bezeichnet. Die chemische Fixierung der Zellen in Formaldehyd, die Einbettung der Zellen in Kunstharz mittels *Progressive Lowering of Temperature* (PLT), die Herstellung der Ultradünnschnitte von etwa 70 nm, die Immungold-Markierung und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Schnitte wurden von Brigitte Kühlmorgen gemacht.

Für die Immungold-Markierung wurden Schnitte der eingebetteten *T. acidophilum*-Zellen auf Nickel-Grids aufgezogen und wie folgt bei Raumtemperatur markiert. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Schnitte für 10 Minuten in Präimmunserum inkubiert. Zur Herstellung von Präimmunserum wurde 10% (v/v) hitzeinaktiviertes Kaninchen-Serum (15 Minuten bei 45°C) in Puffer (10 mM PBS, pH 8, 0.1% (w/v) BSA, 0.13% (w/v) NaN₃) verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-Ta0583-Antikörper), 1:100 verdünnt in Puffer (10 mM PBS, pH 8, 0.1% (w/v) BSA, 0.13% (w/v) NaN₃), erfolgte für 2 Stunden. Nach fünfmaligem Waschen für je 2 Minuten in Puffer wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper, der in einer 1:10 Verdünnung verwendet wurde, für eine Stunde in Konjugationspuffer (0.5 M NaCl, pH 7.4, 0.1% (v/v) BSA, 0.05% (w/v) Tween 20, 5% (v/v) fötales Rinderserum) inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurden 5 nm bzw. 10 nm goldgekoppelte Anti-Kaninchen IgG Antikörper (SIGMA) eingesetzt. Die Schnitte wurden in bidestilliertem Wasser gewaschen und in 2% (w/v) Uranylacetat negativ kontrastiert. Nach der Kontrastierung wurden die Schnitte abermals in Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Eine Negativkontrolle wurde analog, jedoch in Abwesenheit des primären Antikörpers, hergestellt.

4.2.3 Heterologe Expression und Aufreinigung von Ta0583

Die Klonierung von His₆-Ta0583 in einen Expressionsvektor und die Aufreinigung von Ta0583 wurde von István Nagy durchgeführt. Mittels Polymerasekettenreaktion wurde das Ta0583-Gen aus genomischer DNA von *T. acidophilum* mit folgenden Primern amplifiziert: 5'-gcatatgatggttagttgtaggattggatg-3' (N-terminal) und 5'-ctcgagctacatcgatctttccgccatcc-3' (C-terminal). Das gereinigte PCR-Produkt wurde in den pCR[®]T7/NT-TOPO[®] Vektor

(Invitrogen) ligiert und unter Verwendung der eingeführten Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Expressions-Vektor pET28a (Novagen) subkloniert. Der resultierende Vektor kodiert für einen N-terminalen Hexahistidin-Tag, der durch Thrombinverdau entfernt werden kann.

His₆-Ta0583 wurde im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) exprimiert. Das Protein wurde über eine Ni-NTA Säule (Qiagen) affinitätsgereinigt. Mittels Massenspektrometrie wurde das aufgereinigte Protein als Ta0583 identifiziert. Das Protein wurde auf 50 mg/ml konzentriert. Ein Teil der Proteinlösung wurde mit 5% (v/v) Glycerin versetzt und der andere Teil ohne Zusatz eingefroren. Die Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

4.2.4 Polymerisationsassays

Es wurden drei unterschiedliche Polymerisationsassays für His₆-Ta0583 getestet. Alle Polymerisationsansätze wurden für 60 Minuten bei 59°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde von diesen Proben negativ kontrastierte Grids für die Untersuchung im EM angefertigt (vgl. Abschnitt 4.2.1).

Der Polymerisationsassay wurde ursprünglich für MreB aus *T. maritima* bei 65°C verwendet [van den Ent *et al.* 2001b]. Aufgereinigtes His₆-Ta0583 wurde mit dem Polymerisationspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 2 mM ATP) auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. In einem weiteren, leicht modifizierten Assay für MreB aus *T. maritima* [Esue *et al.* 2005] setzte sich der Polymerisationspuffer wie folgt zusammen: 100 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 2 mM ATP. Der dritte Assay wurde von Møller-Jensen *et al.* entwickelt, um ParM aus *E. coli* bei Raumtemperatur zu polymerisieren [Møller-Jensen *et al.* 2002]. His₆-Ta0583 (Endkonzentration 1 mg/ml) wurde in 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DDT, 1 mM ATP- γ -S inkubiert.

4.2.5 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Die Kristallisation, die Lösung der Kristallstruktur und die funktionelle Charakterisierung von Ta0583 wurden von Annette Röben und Andreas Bracher (MPI für Biochemie, Martinsried, Abt. Hartl) durchgeführt. Detaillierte Angaben finden sich bei [Röben *et al.* 2006].

Mit Hilfe des Index Screen (Hampton Research, Aliso Viejo, CA) wurde versucht, Kristallisationsbedingungen für His₆-Ta0583 zu finden. In 44 von 96 Kristallisationsansätzen

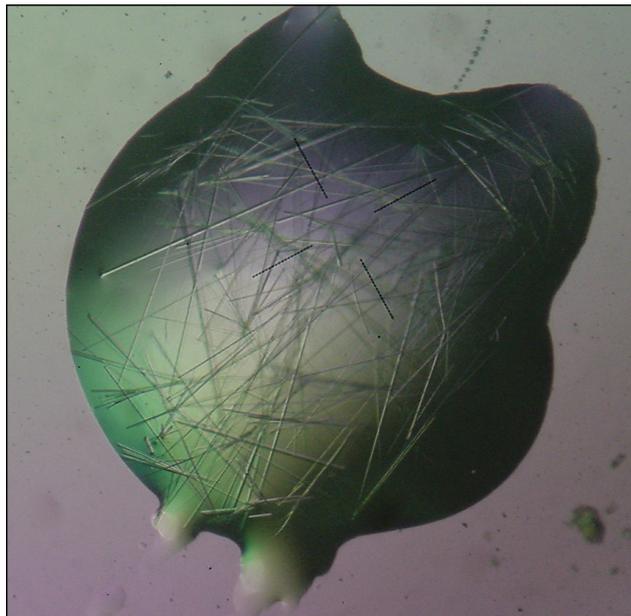


Abbildung 4.2: Lichtmikroskopische Aufnahme der nadelförmigen His₆-Ta0583-Kristalle aus *T. acidophilum*. Kristallisiert wurde das heterolog in *E. coli* exprimierte Protein nach dem *hanging-drop*-Verfahren (aufgenommen von Annette Röben).

bildeten sich kleine nadelförmige Kristalle aus. Lange Kristalle mit einem Durchmesser von 10 - 20 μm (vgl. Abb. 4.2), die für die röntgenkristallographischen Untersuchung geeignet waren, wurden durch Mischen von 1 μl Proteinlösung mit 1 μl Reservoirlösung (100 mM Bis-Tris, pH 6.5, 9-17% (w/v) PEG-2000-MME, 21-22% (v/v) Ethylenglycol) nach der Dampfdiffusionsmethode in hängenden Tropfen bei 20°C über Nacht erhalten (vgl. Abb. 4.2). Selenomethionin-markiertes Ta0583 wurde in einem separatem Experiment mit 10 mM ADP im Tropfen (100 mM Bis-Tris, pH 6.5, 15-17% (w/v) PEG-2000-MME, 14-16% (v/v) Ethylenglycol) co-kristallisiert. Die Kristalle wurden zum Gefrierschutz kurz in Pufferlösung, die zusätzlich 20% (v/v) Glycerin enthielt, getaucht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Kristallstruktur von Ta0583 wurde mit der SAD-Methode (*single-wavelength anomalous dispersion*) an Selenomethionin-markiertem Ta0583 bestimmt. Die Beugungsdaten wurden an der Messstationen X06SA-PX-I und X10SA-PX-II der *Swiss synchrotron light source* (SLS) in Villigen aufgezeichnet.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Filamente in Kryo-Elektronentomogrammen und Dünnschnitten von *T. acidophilum*

In mehreren 3D Rekonstruktionen von intakten, eiseingebetteten *T. acidophilum*-Zellen konnten Filamente und Bündel von Filamenten beobachtet werden. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 4.3 A dargestellt. Ein Bündel aus mehreren Fasern, die leicht gegeneinander verdreht sind, verläuft zentral durch einen 340 nm langen Kanal, der zwei Zellen miteinander verbindet. Das Faserbündel reicht in beide Zellen. Der Abstand zwischen den einzelnen Filamenten wurde mit Hilfe der Reflexe im Powerspektrum zu 8 nm bestimmt (vgl. Abb. 4.3 B Inset). Für eine bessere Visualisierung der Fasern in Abb. 4.3 A und B, wurden 15 z-Schichten (à 3.28 nm) aufeinander projiziert.

Ebenso wurden in den Dünnschnitten von fixierten, in Epoxidharz eingebetteten *T. acidophilum*-Zellen Bündel von Filamenten beobachtet, die im Inneren der Zelle verliefen (vgl. Abb. 4.4).

Die im EM beobachteten Filamente in *T. acidophilum* wurden als potentielles Cytoskelett interpretiert. Aufgrund von Sequenzhomologien zu bekannten Proteinen des bakteriellen Cytoskeletts wurden 5 Gene im Genom von *T. acidophilum* mit Hilfe der *T. acidophilum*-Datenbank (<http://pedant.gsf.de>) identifiziert, die für ähnliche Proteine kodieren: die beiden FtsZ-Homologe (Ta0072 und Ta0508), der Elongationsfaktor EF-Tu (Ta0444), das „coiled-coil“ Protein (Ta1488) und das Aktin Homolog (Ta0583). In 2D Gelen von *T. acidophilum* wurde die Expression der Proteine mittels MALDI-TOF MS (*matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry*) bestätigt (vgl. Abb. 4.5). Besonders stark exprimiert wurden der Elongationsfaktor, welcher in mehreren Isoformen auftrat, und das „coiled-coil“ Protein. Das Expressionsniveau von Ta0583 dagegen war sehr gering. In anderen (nicht gezeigten) Experimenten wurden auch die beiden FtsZ-Homologe Ta0072 und Ta0508 im Cytoplasma nachgewiesen [Nagy 2006].

Ein multiples Sequenzalignment mit dem Programm CLUSTAL_W [Thompson *et al.* 1994] zeigte, dass Ta0583, das Aktin-Homolog aus *T. acidophilum*, in charakteristischen Bereichen eine hohe Sequenzhomologie zu ParM aus *E. coli* und MreB aus *T. maritima* hatte (vgl. Abb. 4.6). Die Sequenzübereinstimmung im paarweisen Alignment von Ta0583 mit ParM aus *E. coli* bzw. MreB aus *T. maritima* betrug jeweils nur 11%. Diese Eigenschaft wies Ta0583

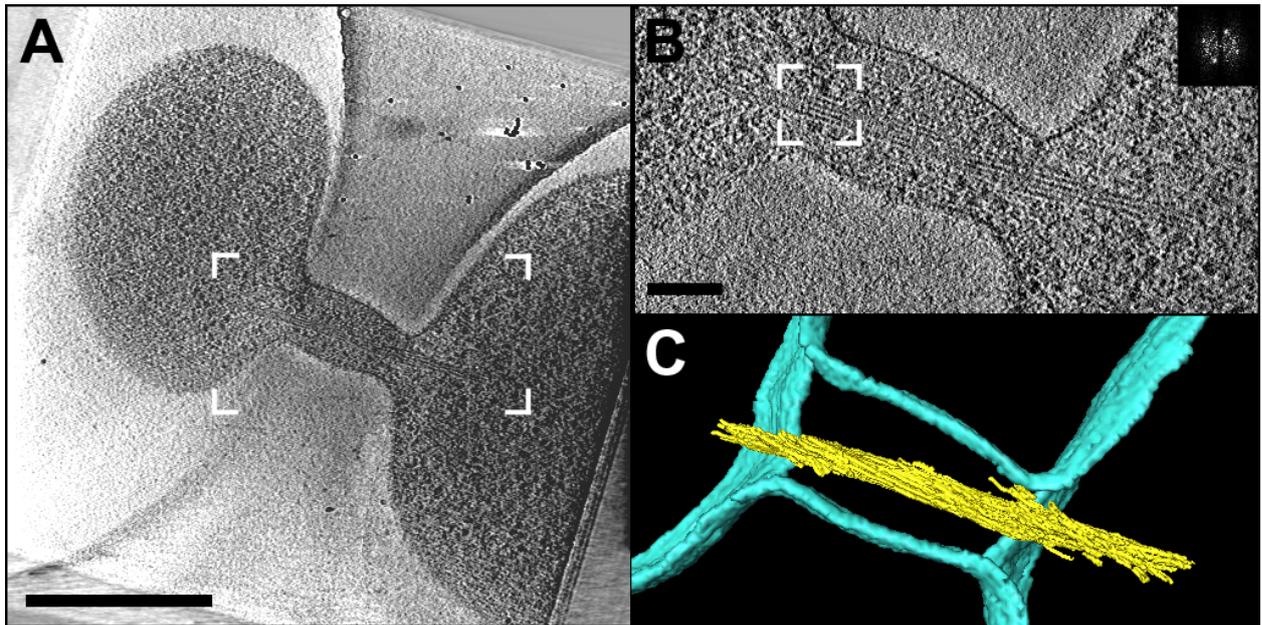


Abbildung 4.3: **A** Projektion (49.3 nm dick) durch ein Kryo-Elektronentomogramm von *T. acidophilum*. Zwei Zellen sind durch einen Kanal verbunden. Im Inneren des Kanals verläuft ein Bündel von Filamenten. Der Balken entspricht zu 500 nm. **B** Vergrößerte Darstellung des in **A** markierten Bereichs. Der Abstand der Filamente wurde mit Hilfe des Powerspektrums zu 8 nm berechnet (siehe Inset). Der Balken korrespondiert zu 100 nm. **C** Der selbe Ausschnitt wie in **B** als 3D-Oberflächendarstellung. Die manuell segmentierten Filamente sind in gelb und die Plasmamembran in türkis eingefärbt. In dieser Darstellung ist zu erkennen, dass die Filamente leicht gegeneinander verdreht sind.

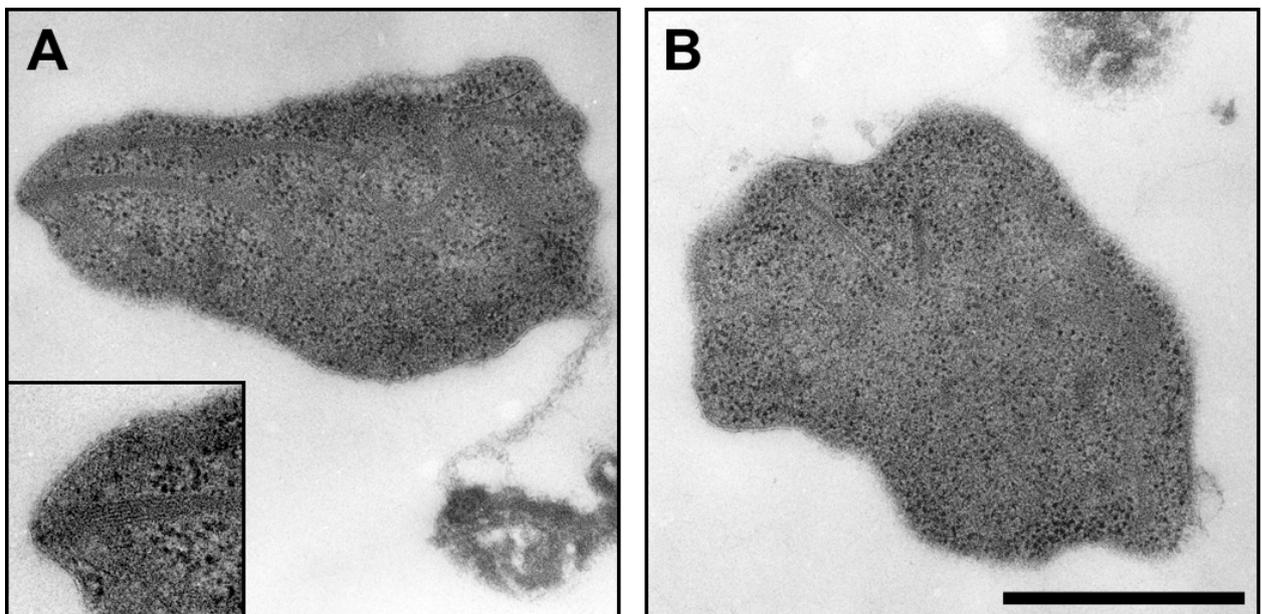


Abbildung 4.4: Dünnschnitte von in Epoxidharz eingebetteten *T. acidophilum*-Zellen (negativ kontrastiert mit Uranylacetat). Im Cytoplasma verlaufen mehrere Bündel von Filamenten. Inset: vergrößerte Darstellung eines Bündels, das aus mehreren Filamenten besteht. Der Balken entspricht 1 μm .

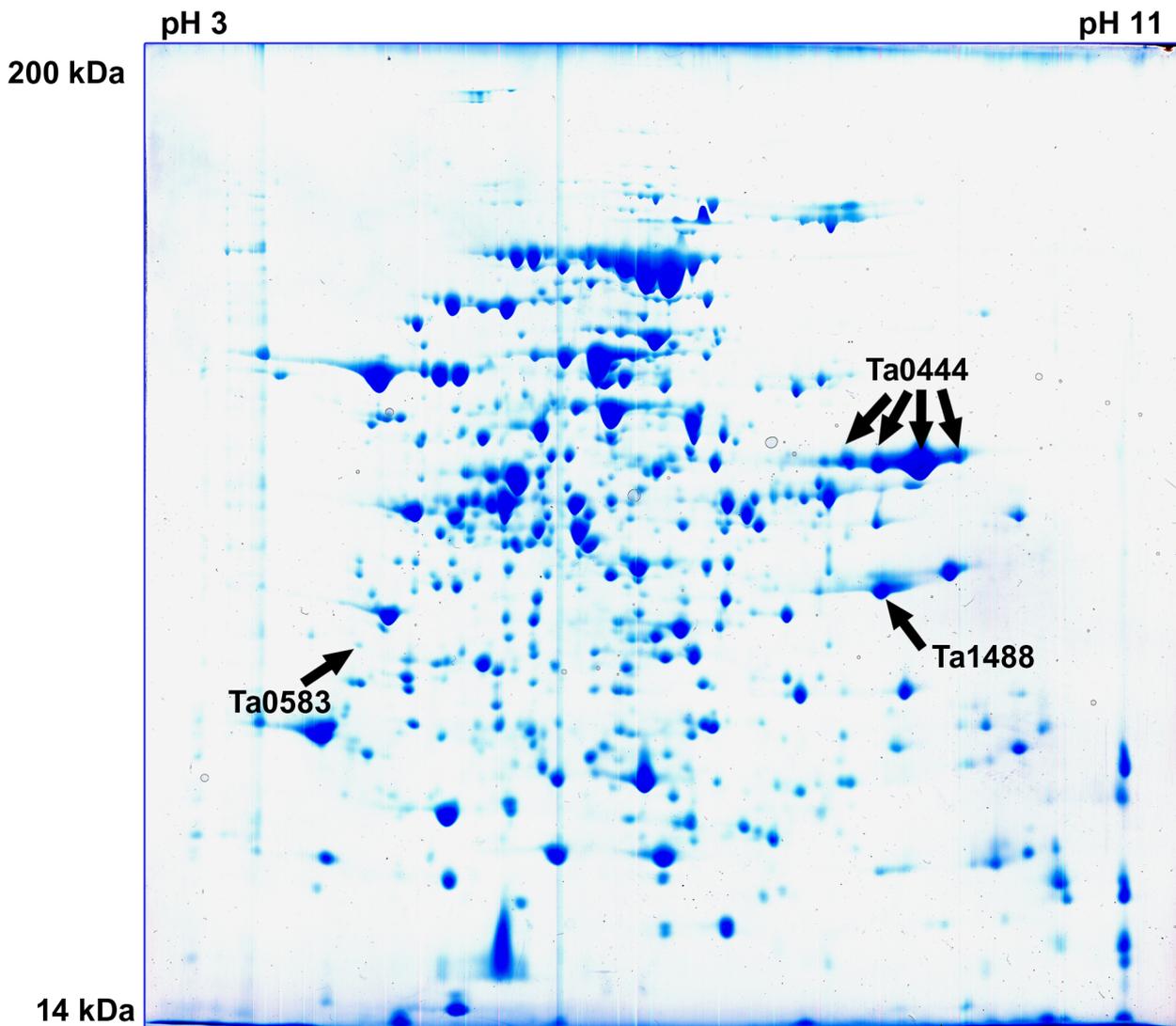


Abbildung 4.5: Übersicht der cytosolischen Proteine von *T. acidophilum*, aufgetrennt mittels 2D Gelelektrophorese (gefärbt mit Coomassie Brilliant Blue G250). In der ersten Dimension wurden die Proteine gemäß ihres isoelektrischen Punktes in einem linearen pH-Bereich zwischen pH 3 - pH 11 mit immobilisierten IEF-Streifen fokussiert und anschließend in der zweiten Dimension gemäß ihres Molekulargewichts in einem 11.3%igen SDS-Gel aufgetrennt. Proteine, die homolog zu bakteriellen filamentbildenden Proteinen sind, sind mit Pfeilen markiert und mittels MALDI-TOF MS identifiziert worden (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Na Sun).

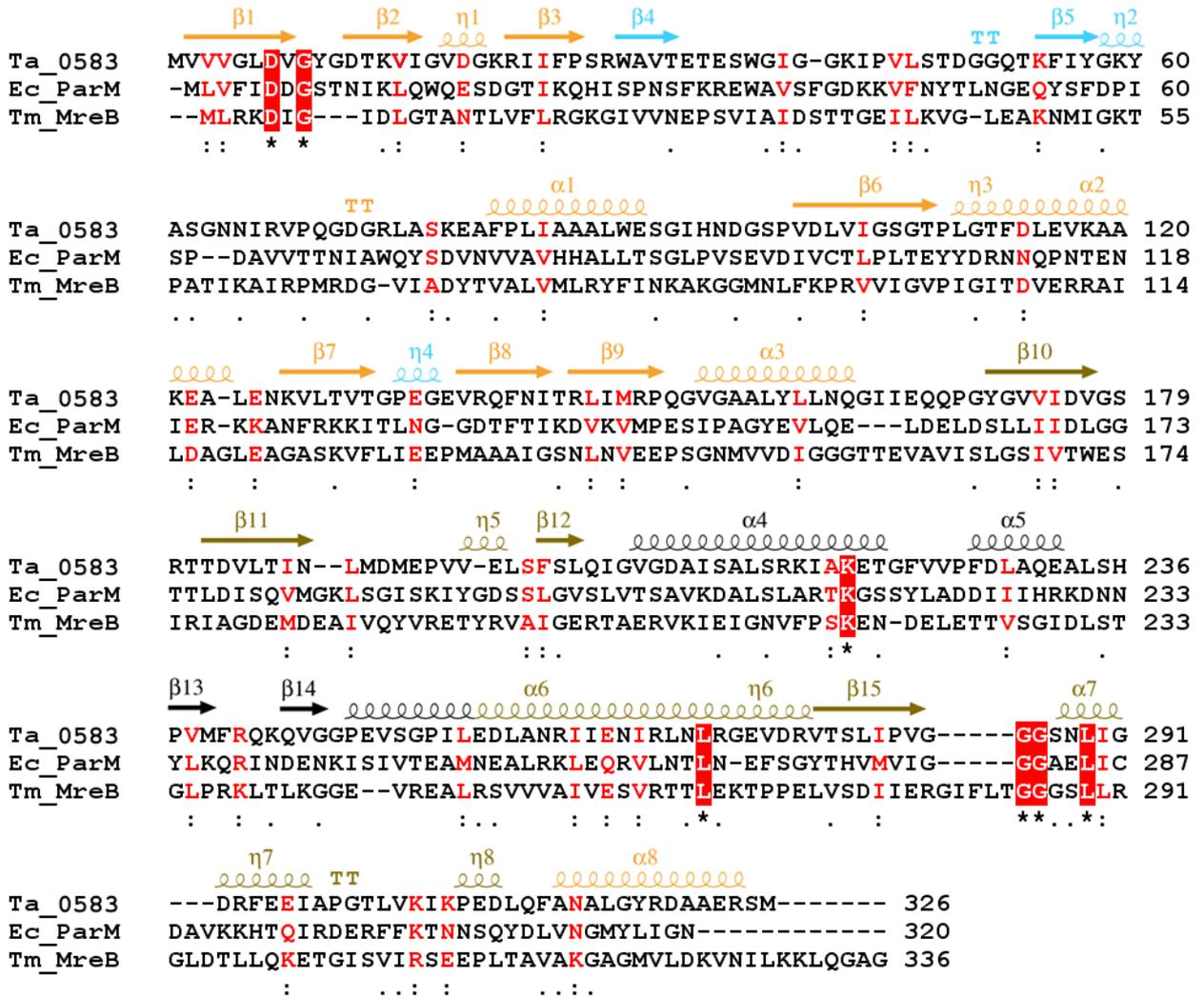


Abbildung 4.6: Multiples Sequenzalignment von Ta0583 (*Ta_0583*) mit ParM aus *E. coli* (*Ec_ParM*) und MreB aus *T. maritima* (*Tm_MreB*). Sekundärstrukturelemente für Ta0583 sind oberhalb der Sequenz angezeigt. Am Ende jeder Zeile ist die Aminosäureposition in der jeweiligen Sequenz angegeben. Identische Reste sind in weiß mit rotem Hintergrund dargestellt (mit einem Stern markiert). Konservierte Reste sind rot gedruckt (mit einem Doppelpunkt markiert). Mit einem Punkt gekennzeichnete Aminosäuren sind semi-konserviert. Die Proteinsequenzen wurden mit dem Programm CLUSTAL_W [Thompson *et al.* 1994] aligniert.

als einen potentiellen Kandidaten aus, der unter bestimmten Bedingungen Filamente bilden könnte.

4.3.2 Immungold-Markierung an Dünnschnitten von *T. acidophilum*-Zellen

Es wurden immunocytochemische Untersuchungen mit anti-Ta0583-Antikörpern an Dünnschnitten von fixierten *T. acidophilum*-Zellen durchgeführt, um die Lokalisierung von Ta0583 zu bestimmen (vgl. Abschnitt 4.2.2). Abb. 4.7 **A** und **B** zeigen die Verteilung des sekundären Antikörpers, der an 10 nm große Goldpartikel gekoppelt ist. Ob die Bindung des primären und sekundären Antikörpers spezifisch an das Antigen Ta0583 bzw. an den primären Antikörper gegen Ta0583 erfolgte, war nicht eindeutig festzustellen, da auch auf dem Kohlefilm vereinzelt Goldpartikel lokalisiert waren. Ebenso wurde in der Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt) im Cytoplasma und auf dem Kohlefilm Gold detektiert. Neben dem anti-Ta0583-Antikörper stand noch ein weiterer Antikörper, der anti-Ta0547-Antikörper, zur Verfügung (Ta0547 ist ein hypothetisches Protein aus *T. acidophilum*). Die Abbildungen 4.7 **C** bis **F** zeigen die Verteilung der Immungoldkomplexe gegen den anti-Ta0547-Antikörper an Dünnschnitten von *T. acidophilum*-Zellen, die Filamente und andere regelmäßige Strukturen enthalten. Das Gold war ebenfalls nicht bei den Filamenten und den regelmäßigen Strukturen lokalisiert.

4.3.3 Ta0583 in *T. acidophilum*

Der offene Leserahmen Ta0583 aus *T. acidophilum*, welcher für ein potentielles prokaryotisches Aktin-Homolog kodiert, wurde als ein lösliches Protein in *E. coli* überexprimiert (vgl. Abschnitt 4.2.3). Das vorhergesagte Molekulargewicht von Ta0583 beträgt 35 kDa. Um die Expression und die Lokalisation von endogenem Ta0583 in *T. acidophilum* nachzuweisen, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Ta0583 hergestellt. Anschließend wurden *T. acidophilum*-Zellen bei aeroben Bedingungen in Flüssigkultur angezogen (vgl. Abschnitt 3.2.1), bei einer OD₅₄₀ von 0.57 geerntet, aufgeschlossen und durch Zentrifugation in cytosolischen Überstand und in unlösliche Bestandteile (Membranen etc.) getrennt (vgl. Abschnitt 5.3.1). Die entsprechenden Fraktionen wurden auf Reaktion mit dem affinitätsgereinigten anti-Ta0583-Antikörper im SDS-Gel getestet. Der Antikörper reagierte mit einer Bande in der cytosolischen Fraktion, deren Höhe einem apparenten Molekulargewicht von 35 kDa entsprach. In der Membranfraktion (Pellet) konnte kein Ta0583-Signal detektiert

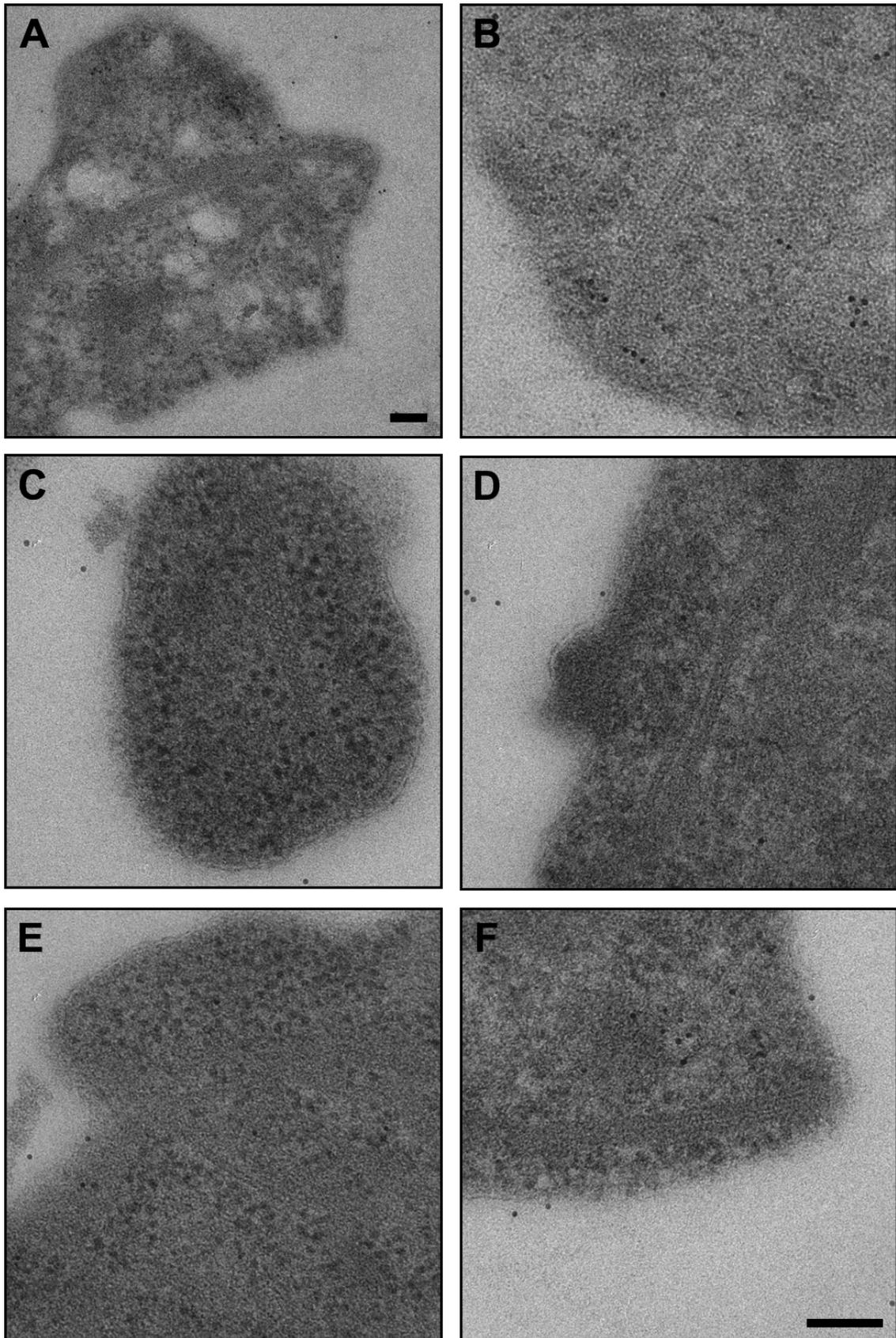
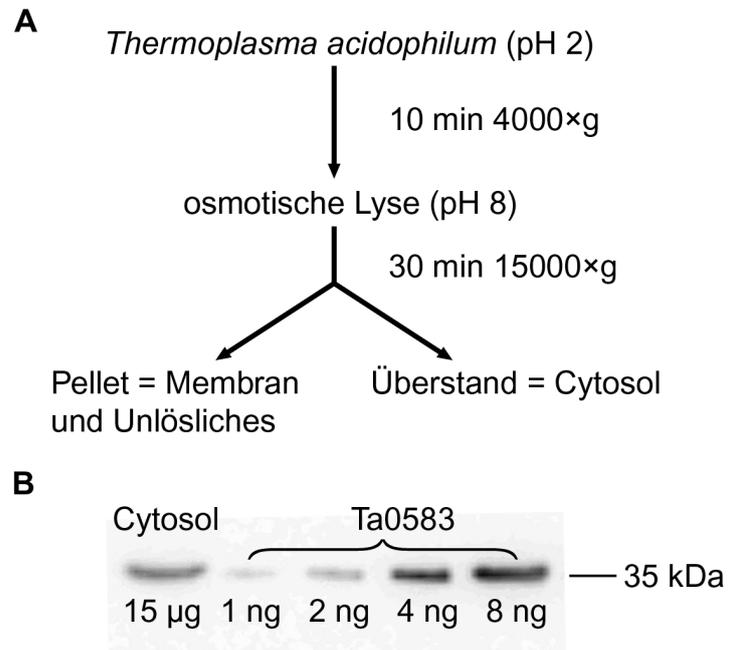


Abbildung 4.7: Verteilung der Immungoldkomplexe auf *T. acidophilum*-Schnitten. Die Schnitte wurden zuvor mit anti-Ta0583-Antikörper (A und B) bzw. anti-Ta0547-Antikörper inkubiert (C - F). In den Schnitten sind Filamente und regelmäßige Strukturen zu erkennen. Das zur Immunmarkierung verwendete Gold hat einen Durchmesser von 10 nm. Der Balken in A und F entspricht 100 nm. Abb. (B - F) wurden bei der selben Vergrößerung aufgenommen.

Abbildung 4.8: Expression und Lokalisation von Ta0583 in *T. acidophilum*. **A** *T. acidophilum*-Zellen wurden nach osmotischer Lyse mittels Zentrifugation in cytosolische Bestandteile und Membranen getrennt. **B** 15 μg cytosolischer Extrakt und bekannte Proteinkonzentrationen von aufgereinigtem Ta0583 (1, 2, 4 und 8 ng) wurden mittels SDS-PAGE Western-Blot mit anti-Ta0583-Antikörper analysiert. Aus dem Vergleich der Bandenintensitäten konnte die cytosolische Konzentration von Ta0583 auf 0.4 mg/ml abgeschätzt werden. Im Pellet konnte das Ta0583-Signal nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



werden. Die Proteinkonzentration von Ta0583 im Cytosol betrug nur 0.04% (vgl. Abb. 4.8). In Eukaryoten wie *Dictyostelium discoideum* entfallen $\sim 8\%$ des gesamten zellulären Proteins auf Aktin [Eichinger *et al.* 1999].

4.3.4 Polymerisationsassays mit Ta0583

Es wurden verschiedene Polymerisationsassays mit Ta0583 getestet, um zu überprüfen, ob dieses Protein *in vitro* Filamente bilden kann (vgl. Abschnitt 4.2.4). In allen verwendeten Assays trübte sich die ursprünglich klare Lösung aus Protein und Polymerisationspuffer nach einer Stunde Inkubation bei 59°C. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung stellte sich jedoch heraus, dass sich keine Filamente gebildet hatten, sondern „amorphe“ Bänder (vgl. Abb. 4.9). Auch die Verwendung von unterschiedlichen Nukleotiden und Nukleotidanaloga wie GTP, AMP-PNP, ATP- γ -S, ADP·AlF₃ oder ADP konnte die geordnete Polymerisation von Ta0583 nicht induzieren. Ursprünglich wurde vermutet, dass der N-terminale Hexahistidin-Tag am rekombinanten Protein die ATP-getriebene Filamentbildung behindert. Doch auch bei Protein mit C-terminalem Hexahistidin-Tag und bei unmodifiziertem rekombinanten Protein konnte keine Ausbildung von Filamenten induziert werden.

Ta0583-Proben, die vor dem Einfrieren mit 5% (v/v) Glycerin versetzt wurden, zeigten ein anderes Verhalten. Bereits nach dem Auftauen trübte sich die Proteinlösung. Dieses Präzipitat wurde mit deionisiertem Wasser auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt und nachfolgend im EM untersucht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass

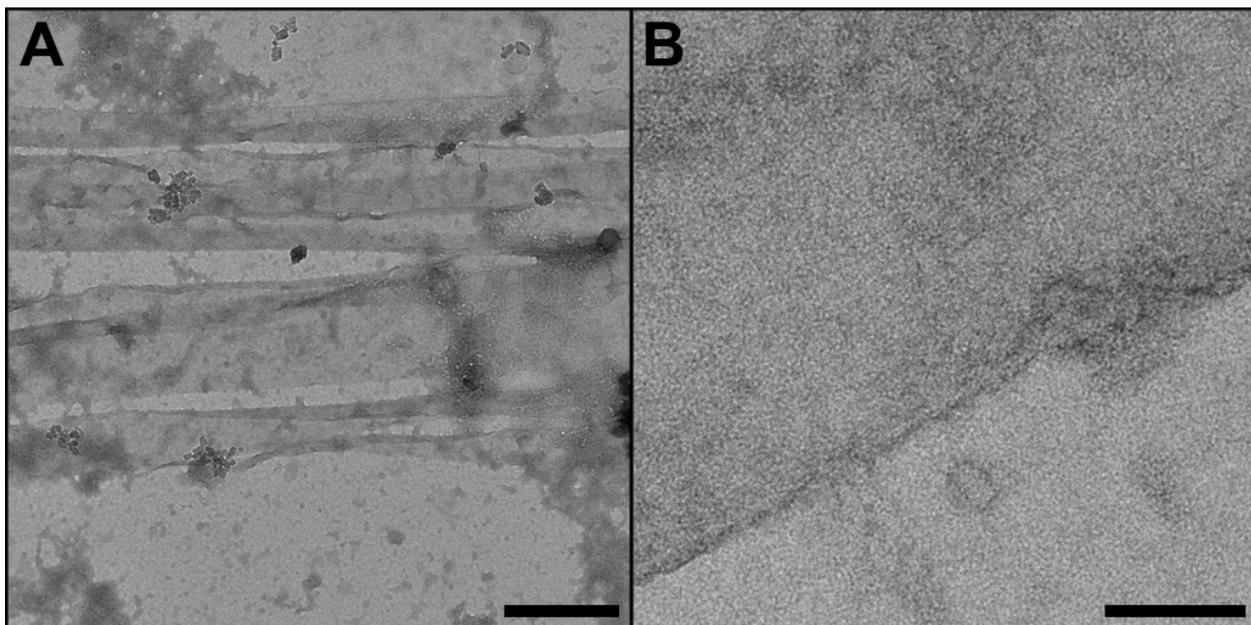


Abbildung 4.9: EM-Aufnahmen von „amorphen“ Bändern von Ta0583 (negativ-kontrastiert mit Uranylacetat). **A** Bei niedriger Vergrößerung (7 800-fach). **B** Ausschnitt eines Bandes bei 64 000-facher Vergrößerung. Der Balken in **A** entspricht 8000 Å und in **B** 1000 Å.

sich das Protein in mehrschichtigen Blättern angeordnet hatte (vgl. Abb. 4.10 **A**). Bei höherer Vergrößerung war zu erkennen, dass einige Bereiche eine periodische Anordnung aus antiparallelen Protofilamenten aufwiesen (vgl. Abb. 4.10 **B**). Im zugehörigen Powerspektrum waren die Reflexe bis zur 3. Ordnung zu erkennen, was einer Auflösung von 16.4 Å entsprach. Die Größe der rechteckigen Einheitszelle, 51 Å × 122 Å, wurde aus dem Powerspektrum bestimmt (vgl. Abb. 4.10 **C**).

4.3.5 Biochemische Charakterisierung von Ta0583

Die biochemischen Eigenschaften von Ta0583 wurden von Annette Röben untersucht. Sie konnte zeigen, dass rekombinantes Ta0583 bei physiologischen Temperaturen eine detektierbare ATPase-Aktivität aufwies. Die Bestimmung der NTPase-Aktivitäten mit den unterschiedlichen Nucleosidtriphosphaten ATP, CTP, GTP und UTP ergab, dass ATP wesentlich schneller von Ta0583 hydrolysiert wurde, als die anderen Nucleosidtriphosphate (vgl. Abb. 4.11 **A**). Bis 50°C stieg die enzymatische Aktivität von Ta0583 exponentiell mit der Temperatur. Jenseits dieser Temperatur, welche 9°C unter der optimalen Wachstumstemperatur von *T. acidophilum* [Darland *et al.* 1970] liegt, verlor das Enzym schnell an Aktivität. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_M und v_{max} bei 50°C wurde die spezifische ATPase-Aktivität von Ta0583 bei verschiedenen ATP-Konzentrationen gemessen und gegen

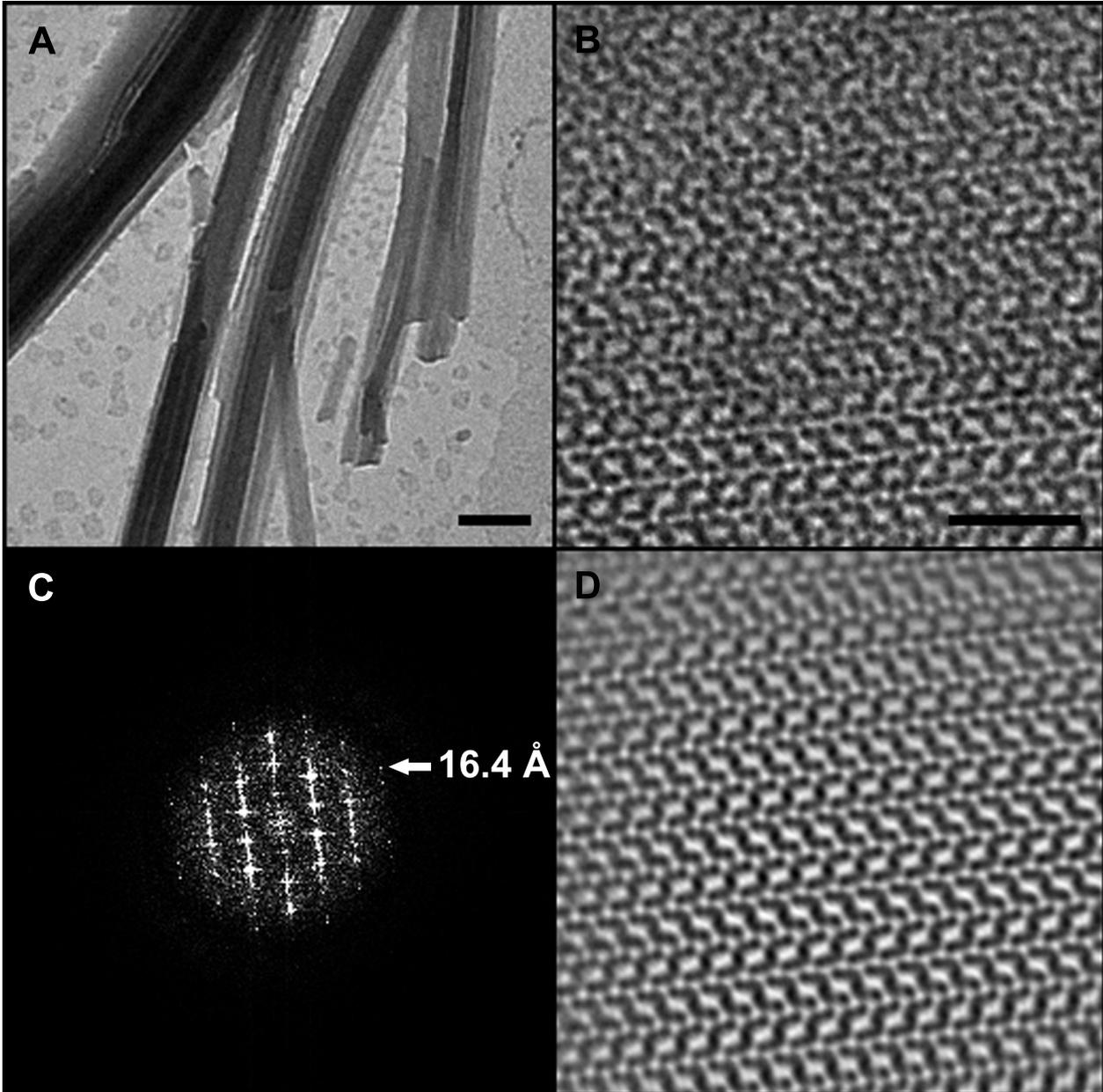


Abbildung 4.10: EM-Aufnahmen von mehrschichtigen Blättern von Ta0583 (negativ-kontrastiert mit Uranylacetat). **A** Bei niedriger Vergrößerung (7 800-fach). **B** Ausschnitt eines kristallinen Bereichs bei 85 000-facher Vergrößerung. **D** zeigt den zu **B** korrespondierenden Fouriergefilterten Bereich. **C** Die Reflexe des zu **A** zugehörigen Beugungsbildes liegen auf einem rechteckigen Gitter und streuen bis zur 3. Ordnung. Dies entspricht einer Auflösung von 16.4 Å. Der Balken in **A** korrespondiert zu 2000 Å und in **B** zu 200 Å.

die entsprechende ATP-Konzentration aufgetragen (vgl. Abb. 4.11 **B**). Die in mehreren unabhängigen Messungen erhaltenen Datenpunkte folgten einer Michaelis-Menten Kinetik. Aus der Auftragung derselben Daten nach Lineweaver-Burk wurde die Michaelis-Menten Konstante K_M für Ta0583 mit $289(\pm 48)\mu\text{M}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} mit $1.054(\pm 0.062)$ Mol Phosphat pro Mol Ta0583 pro Minute bestimmt.

Der v_{max} -Wert von MreB aus *T. maritima* wurde zu $0.1(\pm 0.01)$ Mol Phosphat pro Mol MreB bestimmt [Esue *et al.* 2005]. Eukaryotisches Aktin zeigt $v_{max} = 0.3$ Mol Phosphat pro Mol Aktin [Blanchoin und Pollard 2002]. Somit liegt der v_{max} -Wert für Ta0583 um eine Größenordnung höher als der für MreB aus *T. maritima* und für eukaryotisches Aktin.

Im Jahr 2002 wurde ein Inhibitor namens A22 (S-(3,4-Dichlorobenzyl)Isothioharnstoff) charakterisiert der zu einer anomalen Zellmorphologie und zu asymmetrischer Zellteilung in *E. coli* führt [Iwai *et al.* 2002]. Gitai *et al.* konnten zeigen, dass durch A22 die Funktion von MreB in *C. crescentus* gestört wird. Ebenso wie bei *E. coli* hatte die Gegenwart von A22 im Medium von *C. crescentus* ein verlangsamtes Wachstum und eine abnormale Zellform zur Folge [Gitai *et al.* 2005]. Ta0583 wurde durch A22 kompetitiv gehemmt. Die Inhibitions-konstante K_i hatte einen Wert von $204(\pm 35)\mu\text{M}$ und lag in derselben Größenordnung wie der K_M -Wert für ATP (vgl. Abb. 4.11 **C**).

Die strukturelle Charakterisierung der Ta0583-Proben, die mit A22 und ATP inkubiert wurden, erfolgte im EM, wobei unter anderem bündelartige Strukturen beobachtet werden konnten, die einen regelmäßigen Abstand von 7.95 nm aufwiesen (vgl. Abb 4.11 **D**). Der Abstand dieser Filamente liegt im selben Bereich, wie der Abstand jener Filamente, die im Kryoelektronentomogramm der intakten *T. acidophilum*-Zelle beobachtet wurden (vgl. Abb. 4.3). Jedoch hatte die direkte Zugabe von unterschiedlichen A22-Konzentrationen ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ und $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$) in flüssige *T. acidophilum*-Kulturen keinen Einfluss auf die Wachstumsrate der Zellen. Im flüssigen Kulturmedium von *T. acidophilum* war der Inhibitor sehr harschen Bedingungen, pH 2 und 59°C , ausgesetzt. Dies könnte zu einer Zerstörung von A22 geführt haben. Zudem ist nicht bekannt, ob der Inhibitor die Plasmamembran von *T. acidophilum* passieren konnte.

4.3.6 Kristallstruktur von Ta0583

Die Kristallstruktur von Ta0583 wurde von Annette Roeben gelöst. Zusätzlich zu nativem Ta0583 (pdb-Eintrag: 2fsj; Auflösung $1.9\ \text{Å}$), wurden Strukturen gelöst von Selenomethionin-

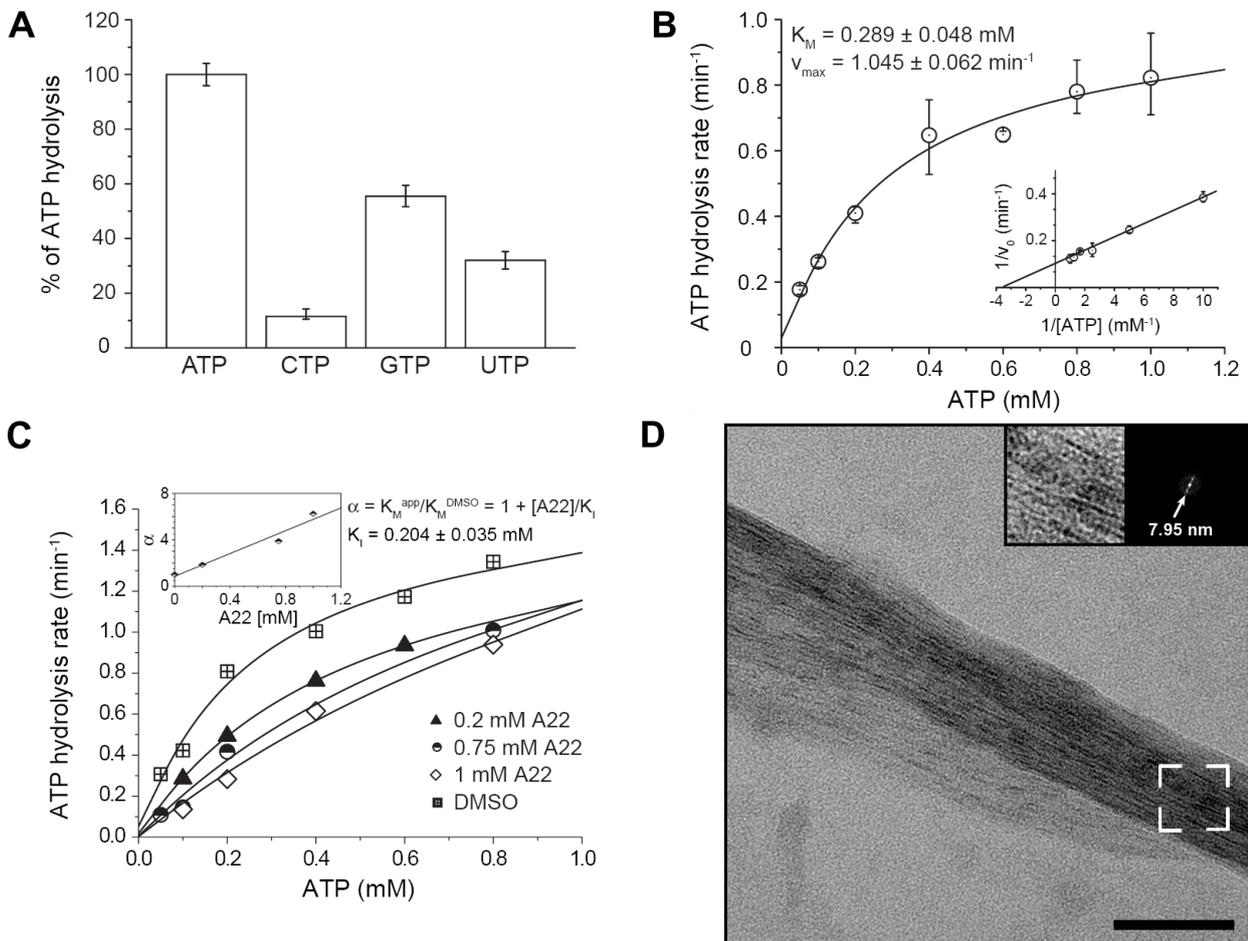


Abbildung 4.11: Biochemische Charakterisierung von Ta0583. **A** Substratspezifität von Ta0583. Die Aktivität von ATP wurde auf 100% gesetzt. **B** ATP-Hydrolyserate von Ta0583 in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration. Die durchgezogene Linie zeigt den Fit an eine Michaelis-Menten Kinetik. 10 μM Ta0583 wurden in Reaktionspuffer (20 mM Tris, pH 6.8, 10 mM MgCl_2 , 25 mM NaCl) in Gegenwart von 500 μM Nukleotid für 5 Minuten bei 50°C inkubiert. Die kinetischen Parameter K_M und v_{max} wurden aus dem Michaelis-Menten Diagramm und nach Lineweaver und Burk ermittelt (siehe Inset) [Röben *et al.* 2006].

Inhibierung von Ta0583 durch den Inhibitor A22. **C** ATP-Hydrolyserate in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration bei drei unterschiedlichen Konzentrationen von A22. In einem Kontrolleexperiment wurde anstelle von A22 die selbe Menge DMSO in den Reaktionspuffer dazugegeben [Röben *et al.* 2006]. **D** Negativ kontrastierte elektronenmikroskopische Aufnahme von Ta0583 (3 μM) nach fünfminütiger Inkubation mit 0.5 mM A22 und 0.6 mM ATP bei 50°C. Der Abstand der Filamente wurde mit Hilfe des Powerspektrums zu 7.95 nm berechnet (siehe Inset). Der Maßstab korrespondiert zu 100 nm.

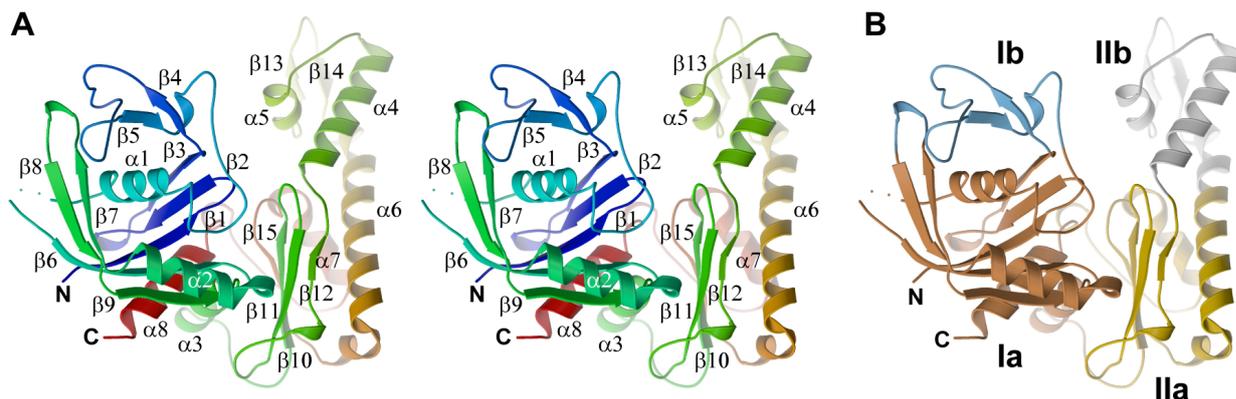


Abbildung 4.12: Kristallstruktur von Ta0583. **A** Stereobild der Faltung eines Monomers von Ta0583 in Bänderdarstellung. Der Farbverlauf von blau nach rot entspricht der Sequenz beginnend am N-Terminus. Die β -Stränge sind mit $\beta 1$ - $\beta 15$ gekennzeichnet und die α -Helices mit $\alpha 1$ - $\alpha 8$. Das Fehlen der Reste 95 und 96 im Modell ist durch zwei Punkte dargestellt. **B** Die vier Subdomänen Ia, Ib, IIa bzw. IIb sind in braun, blau, gelb bzw. grau dargestellt [Röben *et al.* 2006].

markiertem Ta0583 (pdb-Eintrag: 2fsk; Auflösung 2.1 Å) und von Ta0583, co-kristallisiert mit ADP (pdb-Eintrag: 2fsn; Auflösung 2.9 Å). Die Konformationen von unmodifiziertem und Selenomethionin-markiertem Ta0583 waren sehr ähnlich. Im Strukturmodell von Selenomethionin-markiertem Ta0583 fehlen lediglich zwei, vermutlich fehlgeordnete, Reste, die sich an der Oberfläche des Proteins befinden.

Monomeres Ta0583 hat einen annähernd herzförmigen Umriss mit den Maßen $66 \text{ \AA} \times 55 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$. Lobus I und II, die beiden Hälften von Ta0583, bestehen aus je einer aktinähnlichen Domäne Ia bzw. IIa (vgl. Abb. 4.12 **B**). Die Kernstruktur der aktinähnlichen Domänen zeichnet sich aus durch ein viersträngiges β -Faltblatt, das von vier α -Helices flankiert wird. Die Domänen Ia und IIa berühren sich und die beiden Domänen Ib und IIb sind durch einen Spalt getrennt. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen in der Subdomäne Ia. Der Aufbau der beiden Domänen ist strukturell homolog.

Die Bindung von ADP in Ta0583 führte zu einer Konformationsänderung gegenüber der apo-Form. Als eine Folge der ADP-Bindung drehte sich Lobus II um 8° . Von dieser Rotation waren die Sekundärstrukturelemente von Domäne IIb am stärksten betroffen (vgl. Abb. 4.13). ParM führt aufgrund von ADP-Bindung eine qualitativ ähnliche 25° -Rotation von Lobus II aus [van den Ent *et al.* 2002]. Dagegen zeigt MreB aus *T. maritima* keine größeren Strukturveränderungen bei der Bindung von nicht-hydrolysierbarem ATP-Analogen AMP-PNP [van den Ent *et al.* 2001b]. Die beobachtete Konformation von komplexiertem ADP in Ta0583 ist ähnlich der Konformation von ADP in ParM [van den Ent *et al.* 2002].

4.4 Diskussion

In *Thermoplasma volcanium* und *Ferroplasma acidarmanus*, die ebenfalls wie *T. acidophilum* zu der Ordnung Thermoplasmatales zählen, existieren homologe Sequenzen zu Ta0583. Eine Besonderheit dieser Organismen ist, trotz ihrer pleiomorphen Gestalt, das Fehlen einer festen Zellwand. Die Zellen sind lediglich von einer Plasmamembran umgeben [Segerer *et al.* 1988, Edwards *et al.* 2000, Darland *et al.* 1970].

In Kryo-Elektronentomogrammen und Dünnschnitten von *T. acidophilum*-Zellen konnte klar gezeigt werden, dass in *T. acidophilum* intrazelluläre filamentöse Strukturen existieren, die einem Cytosekelett ähneln. Momentan ist aber noch unklar aus welchen Proteinen die Filamente aufgebaut sind und unter welchen Bedingungen diese Strukturen gehäuft auftreten. Aus den immunocytochemischen Untersuchungen konnte keine eindeutige Aussage über die intrazelluläre Lokalisierung von Ta0583 getroffen werden (vgl. Abb. 4.7). Es ist denkbar, dass Ta0583 unter speziellen Wachstumsbedingungen oder in einem bestimmten Zellstadium hochreguliert wird. Dies ist jedoch schwierig nachzuweisen, da momentan noch keine Methode bekannt ist, um *T. acidophilum*-Kulturen zu synchronisieren. Aufgrund der geringen Konzentration von Ta0583 im Cytosol (vgl. Abb. 4.8) und der Abwesenheit von Ta0583 in der Membranfraktion, ist auszuschließen dass, Ta0583 für die innere Organisation der Zelle verantwortlich ist oder als stabilisierendes Element in der Plasmamembran dient.

Allein auf der Analyse von Sequenzdaten lässt sich aber keine Phylogenie für cytoskelett-ähnliche Proteine in Archaeen ableiten. Zudem treten in archaealen Genomen vorhergesagte Aktin-Homologe sehr sporadisch auf. Trotzdem könnte Ta0583 ein potentieller Kandidat für ein archaeales Cytoskelettprotein sein, da das rekombinant exprimierte Protein *in vitro* sich in kristalline Blattstrukturen anordnen kann (vgl. Abb. 4.10) und unter zahlreichen Bedingungen faserartige Kristalle ausbildet (vgl. Abb. 4.2). Die Kristallstruktur von Ta0583 belegt (vgl. Abb. 4.13), dass es sich bei Ta0583 tatsächlich um ein aktin-homologes Protein handelt. Ta0583 kombiniert sowohl strukturelle Elemente von MreB als auch von ParM, zwei Proteine aus dem bakteriellen Cytoskelett. Basierend auf der Aminosäuresequenz und auch auf der Strukturebene ist Ta0583 etwas näher zu ParM aus *E. coli* verwandt, als zu MreB aus *T. maritima* und Aktin (vgl. Abb. 4.6 und 4.13). Ta0583 zeigt eine ATPase-Aktivität (vgl. Abschnitt 4.3.5), deren maximale Reaktionsgeschwindigkeit um eine Größenordnung höher ist als von MreB aus *T. maritima* und von eukaryotischen Aktin [Esue *et al.* 2005, Blanchoin und Pollard 2002]. *In vitro* konnte keine Filamentbildung von

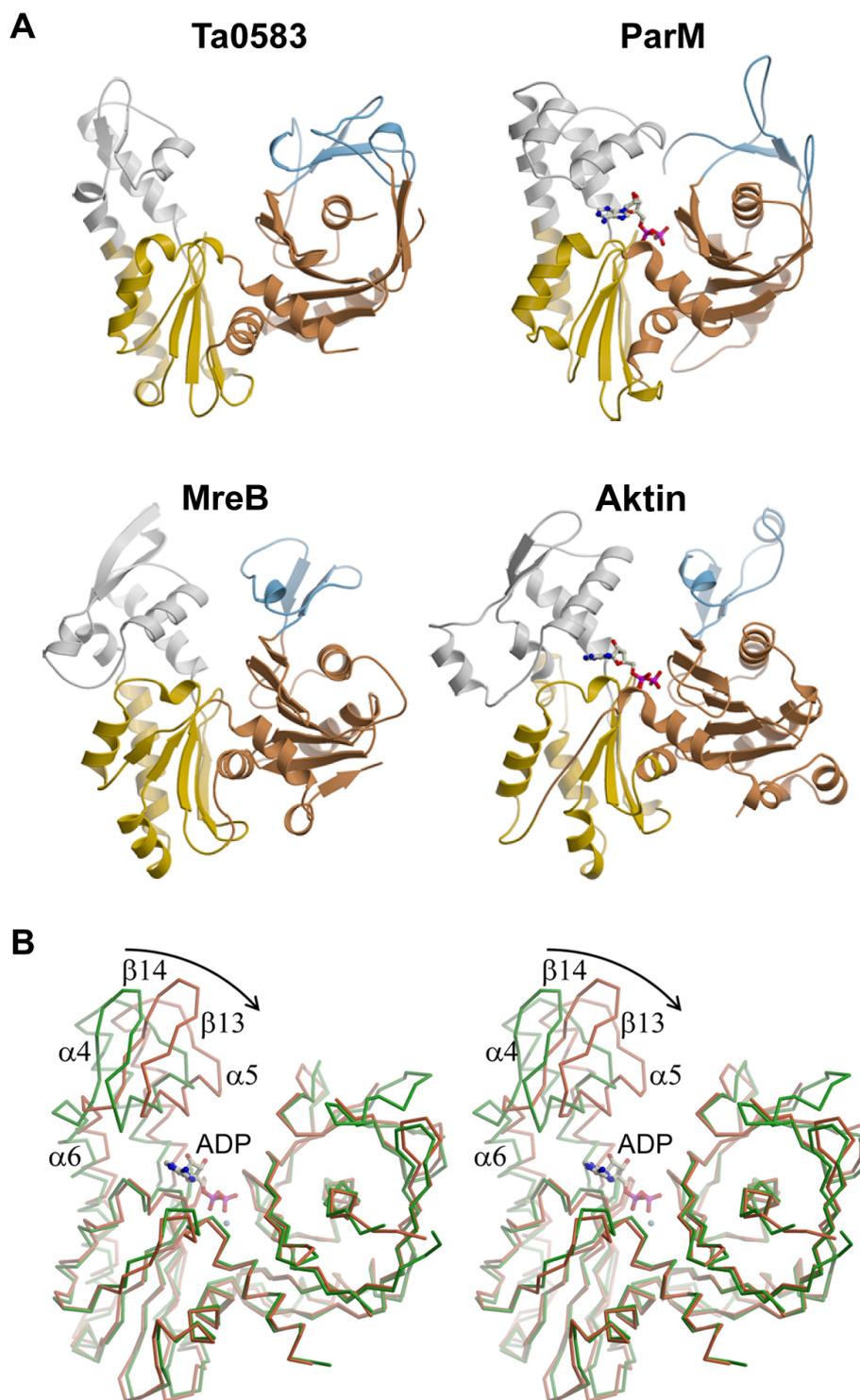


Abbildung 4.13: **A** Strukturvergleich von Aktin mit prokaryotischen Homologen. Die monomere Struktur von Ta0583, ParM aus *E. coli*, MreB aus *T. maritima* und eukaryotischem Aktin aus *Oryctolagus cuniculus* (pdb-Einträge 2fsj, 1mwm, 1jcf and 1j6z). Das Proteinrückgrat ist im Bändermodell gezeigt. Das ADP Molekül in der ParM- und Aktin-Struktur ist im Stabmodell dargestellt. Die Farbkodierung für die Subdomänen ist dieselbe wie in Abb. 4.12 **B** [Röben *et al.* 2006]. **B** Kristallstruktur des Ta0583-ADP Komplex. Stereobild, das die Überlagerung der beiden Strukturen, apo-Ta0583 (grün) und Ta0583 komplexiert mit ADP (rot), zeigt. Der Pfeil deutet die stärkste Bewegung der Sekundärstrukturelemente an. ADP und Mg²⁺ (hellblau) sind in im Stabmodell dargestellt [Röben *et al.* 2006].

Ta0583 induziert werden (vgl. Abb. 4.9). Von ParM ist bekannt, dass es dynamisch instabil ist und die ParM-Polymere durch eine Kappe aus ATP-Monomeren, die an die Enden der Filamente binden, stabilisiert werden [Garner *et al.* 2004]. Dies könnte ebenfalls für Ta0583 zutreffen. So könnten für die Polymerisation von Ta0583 zusätzliche, bis jetzt noch nicht identifizierte, Faktoren notwendig sein, die die Filamentbildung stabilisieren.

5. Auftrennung von cytosolischen Proteinen aus *T. acidophilum* mittels *Free-Flow* Elektrophorese

5.1 Einführung

Die kontinuierliche *Free-Flow* Elektrophorese (FFE) ist eine schonende und effiziente Methode für die analytische und präparative Auftrennung und Fraktionierung von gelösten geladenen Partikel. Das Anwendungsspektrum der FFE ist weit gefächert, mit ihr lassen sich Zellen [Baier *et al.* 1988][Heidrich und Hannig 1989], Zellorganellen wie Mitochondrien [Zischka *et al.* 2003] oder Endosomen [Ellinger *et al.* 2002], Proteine [Jaffé und Hannig 1965, Nolan *et al.* 1971] oder ganze Lysate [Burggraf *et al.* 1995, Hoffmann *et al.* 2001] auftrennen, sofern diese eine Ladung tragen oder durch Modifikationen geladen werden können. Die im Jahre 1950 von W. Grassmann und K. Hannig entwickelte FFE [Grassmann und Hannig 1950] arbeitet nach dem Prinzip der trägerfreien Elektrophorese, bei welcher der Trennprozess in Abwesenheit einer festen Matrix stattfindet. Stattdessen erfolgt die Auftrennung der Probe in einem laminaren kontinuierlichen Fluss von Pufferlösungen in einem elektrischen Feld. Entsprechend der Zusammensetzung der Trennmedien können drei völlig verschiedene Trennprinzipien angewendet werden: Zonelektrophorese, Isotachophorese und isoelektrische Fokussierung (IEF). Alle Trennungen sind sowohl unter nativen wie auch denaturierenden Bedingungen durchführbar. Im IEF-Modus wird die Probe in einem linearen pH-Gradient gemäß ihres isoelektrischen Punktes (pI) getrennt (vgl. Abb. 5.1 A).

Im Vergleich zu anderen Trennverfahren, bietet die FFE drei Vorteile: (i) Da die Auftrennung kontinuierlich ist, kann beliebig viel Probe aufgetragen werden. Dadurch können auch Substanzen, die nur in geringen Mengen vorkommen, angereichert werden. (ii) Die Trennmethode ist behutsam und schonend, da während der Separation nur relativ schwache Kräfte

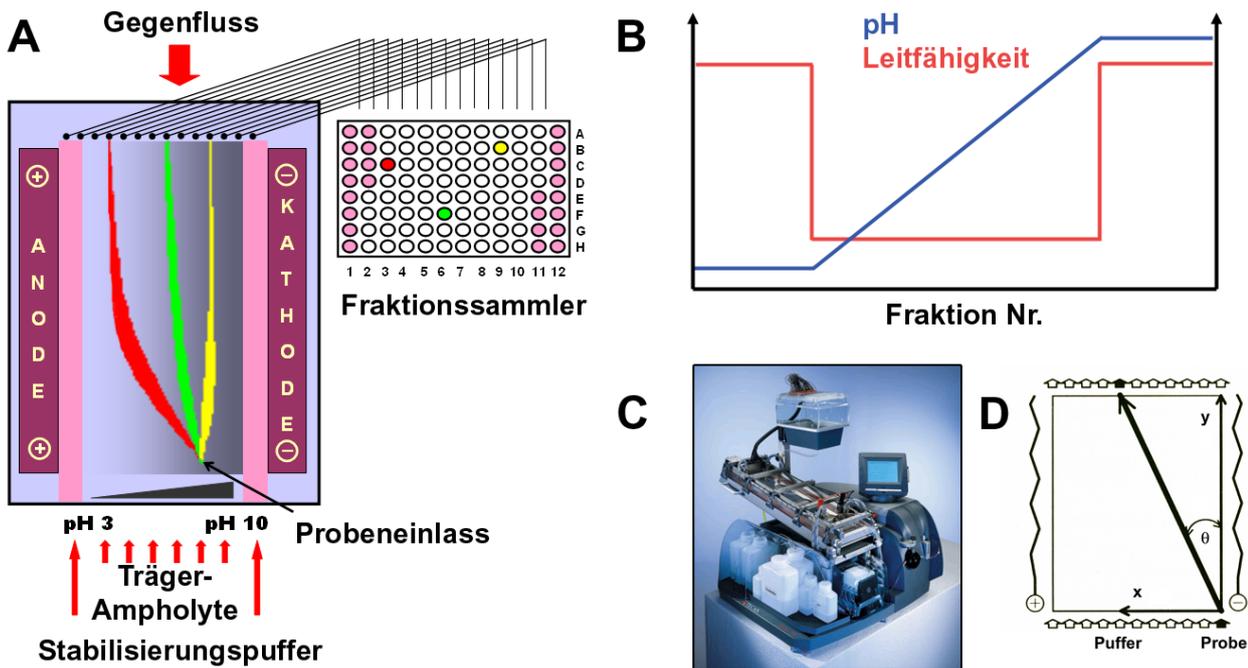


Abbildung 5.1: **A** Schematische Darstellung des Prinzips der FFE bei der IEF: In einer Trennkammer fließt ein kontinuierlicher Pufferstrom zwischen zwei gekühlten Glasplatten. Die Probe wird an einer definierten Stelle in die Trennkammer injiziert, und im laminaren Fluss an das Ende der Kammer transportiert. Das elektrische Feld senkrecht zur Fließrichtung lenkt die Probenkomponenten gemäß ihrer Ladung ab, so dass sie an unterschiedlichen aber konstanten Stellen am Ende der Trennkammer auftreffen. **B** Theoretischer Verlauf des pH-Gradientens (blaue Linie) und der Leitfähigkeit (rote Linie) bei der IEF. Das Plateau am Anfang und Ende wird durch das anodische und kathodische Stabilisierungsmedium verursacht. **C** ProTeamTM FFE der Firma TECAN. **D** Definition des Ablenkungswinkels θ bei der isoelektrischen Fokussierung.

auf die Probe einwirken. Deshalb ist es z.B. möglich Proteine auch in ihrem biologisch aktiven Kontext als transiente Komplexe zu isolieren. (iii) Es wird keine feste Trennmatrix (wie Polyacrylamid, Agarose oder Papier) benötigt, wodurch kein Verlust der Probe durch Adsorption am Trägermaterial auftritt. Im Gegensatz zu matrixbasierten Trennmethode wird die Größe der Partikel nicht durch die maximale Porengröße limitiert. Da die durch die FFE separierten Partikel in löslicher Form vorliegen, kann im Anschluss an die Trennung eine direkte Untersuchung der Probe im Elektronenmikroskop (EM) erfolgen.

Für die 3D Strukturaufklärung von Proteinen und Proteinkomplexen mittels Elektronenmikroskopie ist die herkömmliche Methode zur Probengewinnung die oft langwierige chromatographische Aufreinigung aus endogenem oder rekombinantem Material. Obwohl bei der rekombinanten Expression im gängigen *E. coli* Expressionssystem hohe Proteinausbeuten erzielt werden, können manche Proteine nicht im bakteriellen Cytosol exprimiert werden. Ein häufiges Problem ist, dass die überexprimierten Proteine im Bakterium nicht löslich sind, sich ansammeln und Aggregate bilden. Darüber hinaus falten und assemblieren viele prokaryo-

tische und eukaryotische Proteine nicht in ihre native Konformation im Expressionssystem [Baneyx und Mujacic 2004].

Aufgrund der oben aufgeführten Probleme wurde in den folgenden Versuchen die FFE im IEF-Modus genutzt, um die cytosolischen Proteine eines Zelllysates aus *T. acidophilum* unter nativen Bedingungen gemäß ihres pI zu separieren. Diese Reduktion der Komplexität der Probe diente als erster präparativer Schritt für die nachfolgende strukturelle Analyse der einzelnen Fraktionen im EM. Die Identität der Proteine wurde mittels Massenspektrometrie geklärt. Mit dieser schnellen und einfachen Methode sollten noch nicht bekannte Proteinkomplexe gefunden werden, die als mögliche Referenzen für die Mustererkennung in ganzen *T. acidophilum*-Zellen eingesetzt werden können (vgl. Abschnitt 6.2.2).

5.2 Theorie der Elektrophorese, der isoelektrischen Fokussierung und der FFE

Elektrophorese bezeichnet die Wanderung elektrisch geladener Teilchen durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff in einem elektrischen Feld E . Wird ein geladenes Teilchen (Ion) in Lösung einem elektrischen Feld ausgesetzt, bewegt sich dieses parallel zu den elektrischen Feldlinien mit einer Geschwindigkeit v zum elektrischen Gegenpol. Dabei wirken zwei unterschiedliche Kräfte auf das Teilchen. Einerseits wirkt die beschleunigende elektrophoretische Kraft F_{el} auf das Teilchen mit der Ladung q :

$$F_{el} = q \cdot E = q \cdot \frac{I}{A\gamma}. \quad (5.1)$$

Die Stärke des elektrischen Feldes ist direkt proportional zur Stromstärke I und indirekt proportional zum Produkt aus Querschnittsfläche A und spezifischen Leitfähigkeit des Puffers γ . Andererseits wirkt die geschwindigkeitsmindernde Reibungskraft F_{fr} , welche von den Molekülen des Lösungsmittels verursacht wird, die sich dem Teilchen entgegenstellen. Sie ist proportional zum Reibungskoeffizient f_c , der abhängig von der Viskosität des umgebenden Mediums ist:

$$F_{fr} = f_c \cdot v. \quad (5.2)$$

Das Gleichgewicht dieser beiden Kräfte bewirkt, dass sich das Teilchen mit einer konstanten Geschwindigkeit v_i bewegt.

$$F_{el} = F_{fr} \Rightarrow v_i = \frac{q \cdot E}{f_c} = \mu_i \cdot E = \mu_i \frac{I}{A\gamma} \quad (5.3)$$

Der Proportionalitätsfaktor zwischen Wanderungsgeschwindigkeit v_i und elektrischem Feld ist die Mobilität μ_i . Für kleine sphärische Teilchen lässt sich das Stokes'sche Gesetz anwenden um die Reibungskraft zu berechnen, und es ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität folgender Ausdruck:

$$\mu_i = \frac{Z \cdot e}{6\pi\eta r}, \quad (5.4)$$

wobei Z die Nettoladungszahl ist, η die dynamische Viskosität des Lösungsmittels und r der Stokes-Radius des geladenen Teilchens (d.h. der Radius des hydratisierten Ions).

Die IEF ist ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem Proteine im elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten aus Ampholyten¹ wandern, bis sie an den pH-Wert gelangen, an dem ihre Nettoladung² Null ist und damit auch ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Dieser pH-Wert wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet. Ab diesem Punkt können die Proteine nicht mehr weiterwandern, da sie keine Ladung mehr tragen. Das Auflösungsvermögen für Proteine ΔpI , die mit der IEF fokussiert werden, wurde von H. Svensson abgeleitet [Svensson 1961, Svensson 1962] und ist folgendermaßen definiert:

$$\Delta pI = 3.07 \sqrt{\frac{D \cdot [d(pH)/dx]}{E \cdot [-d\mu/d(pH)]}}. \quad (5.5)$$

Dabei ist D der Diffusionskoeffizient des Proteins, $d(pH)/dx$ der Anstieg des pH-Gradienten, E das elektrische Feld und $d\mu/d(pH)$ die Mobilitätssteigung des Proteins am pI .

Das Prinzip der FFE beruht auf der Tatsache, dass geladene Partikel im elektrischen Feld in der Trennkammer eine Bahn beschreiben, die durch zwei zueinander senkrechte Geschwindigkeiten hervorgerufen wird. Die elektrophoretische Mobilität des Teilchens führt zu einer Bewegung in Richtung des elektrischen Feldes (Abszissenachse) und die Pufferströmung treibt es in Richtung der Ordinatenachse. Infolgedessen legt die Probe nach einer gewissen Zeit t die Strecken $x = v_i \cdot t$ und $y = v_p \cdot t$ zurück, wobei v_i bzw. v_p die konstanten Geschwindigkeiten der Probe bzw. des Puffers sind. Das Verhältnis zwischen diesen beiden Strecken kann durch den Tangens des Ablenkungswinkels θ (vgl. Abb. 5.1 **D**) beschrieben werden:

$$\tan \theta = \frac{x}{y} = \frac{v_i}{v_p}. \quad (5.6)$$

Aus Gl. 5.6 und Gl. 5.3 ergibt sich

$$\tan \theta = \frac{\mu_i I}{A\gamma v_p}. \quad (5.7)$$

¹Chemische Verbindungen, die sich sowohl wie Säuren als auch wie Basen verhalten können.

²Summe aller negativen und positiven Ladungen an den Aminosäureseitenketten, wobei auch die 3D Konformation des Proteins eine Rolle spielt. Die Phosphorylierung, die Glykosylierung und der Oxidationszustand des Proteins beeinflussen den Ladungszustand ebenfalls.

Da die Stärke des elektrischen Stromes I , der Querschnitt der elektrophoretischen Kammer A , die spezifische Leitfähigkeit des Puffers γ und die Geschwindigkeit des Puffers während der Trennung bei der IEF konstant sind, hängt der Ablenkungswinkel θ nur von der Mobilität der Probe ab.

Bei der FFE, im IEF Modus betrieben, werden in Wasser gelöste Träger-Ampholyte verwendet, die mittels sieben Einlassschläuchen über den gesamten Trennspalt zwischen zwei Glasplatten einer flachen gekühlten Trennkammer zugegeben werden. Auf beiden Seiten der Kammer sind Elektroden angebracht, die quer zum laminaren Fluss ein elektrisches Feld erzeugen. Aufgrund des elektrischen Feldes verteilen sich die Träger-Ampholyte gemäß ihrer pI -Werte und es stellt sich ein linearer pH-Gradient in der Trennkammer ein [Vesterberg 1969]. An der Anode stellt sich ein niedriger pH ein und an der Kathode ein hoher. Zur Stabilisierung des pH-Gradienten in den Randbereichen wird an den Elektroden zusätzlich eine Säure und eine Base eingeleitet (vgl. Abb. 5.1 B). Die Probe wird kontinuierlich an einer definierten Stelle (Probeneinlass) in den laufenden laminaren Fluss injiziert. Sie wird vom Flüssigkeitsstrom aufgenommen, wandert seitwärts bis zu ihrem pI , an dem ihre Nettoladung Null ist, und wird dort fokussiert. Am Ende der Kammer befindet sich eine Fraktionierungseinheit, über die der gesamte Pufferstrom geleitet und in 96 Kapillaren gesammelt wird. Um Blasenbildung in der Trennkammer und Diffusion der Probe zu vermeiden, wird zusätzlich vom oberen Ende der Kammer ein Gegenfluss zugeführt.

5.3 Material und Methoden

5.3.1 Präparation des Zellysats für die FFE

T. acidophilum wurde in *T. acidophilum*-Medium bei 59°C kultiviert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Für die Herstellung von Zellysat wurden 4 Liter Kulturmedium mit 80 ml der Vorgängerkultur inokkuliert. Bei einer optischen Dichte ($\lambda = 540$ nm) im Bereich von 0.4 - 0.6 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10 Minuten, 4 000×g, 4°C; AvantiTM J-25 *Centrifuge*, BECKMAN; Rotor JA-10). Das Zellpellet wurde zwei Mal mit deionisiertem Wasser gewaschen und in 10 ml deionisiertem Wasser mit Proteaseinhibitoren (COMPLETETM EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche) resuspendiert. Durch Erhöhung des pH-Wertes auf pH 8 mit 1 M Tris (pH 9.5) wurden die Zellen lysiert. Die dadurch freigesetzte DNA wurde durch Zugabe von DNase I (Sigma) verdaut. Im letzten Schritt wurde das Homogenisat durch Zentrifugation bei 4°C für 30 Minuten bei 15 000×g (OptimaTM LE-80K *Ul-*

tracentrifuge, BECKMAN; Rotor Ti 70.1) in Cytosol- und Membranfraktion getrennt. Die Proteinkonzentration des Zellysates wurde mit dem Bradford-Test auf 10 mg/ml bestimmt.

5.3.2 FFE

In den folgenden Versuchen wurde das ProTeamTM-Gerät der Firma TECAN (Gröding, Österreich) verwendet, die im IEF-Modus von Herrn Marius Boicu betrieben wurde (vgl. Abb. 5.1 B). Die Trennkammer hatte eine Länge von 50 cm und der Abstand der Trennkammerober- und -unterseite wurde mit Hilfe von eingelegten Spacern auf 0.4 mm eingestellt. Die Anode und die Kathode waren 10 cm voneinander entfernt. Für die Auftrennung wurde die Trennkammer in der horizontalen Lage platziert. Das Trennmedium wurde über sieben Einlassschläuche am unteren Ende der Trennkammer kontinuierlich zugeführt und verließ diese 2 cm vor dem oberen Ende über 96 Kapillaren. Die Probe wurde über den kathodischen Probeneinlass zugegeben. Als optische Kontrolle für die Trennleistung des elektrischen Feldes wurde eine Mischung aus Farbmakern, die aus einem roten acidischen Farbstoff (SPADNS, Aldrich) und sechs gelben Farbstoffen mit unterschiedlichen *pI*-Werten (4.0, 5.3, 6.4, 7.5, 8.5, 10.1) besteht, verwendet.

Die native Auftrennung des Zellysats erfolgte in horizontaler Orientierung der Trennkammer bei 10°C, bei einer konstanten Hochspannung von 1500 V und einem Strom von 24 mA. Die Separationsmedien setzten sich wie in Tab. 5.1 beschrieben zusammen.

anodisches Stabilisierungsmedium (Einlass 1)	25% (w/w) Glyzerin, 0.2% (w/w) HPMC, 100 mM H ₂ SO ₄
Separationsmedium 1 (Einlass 2)	25% (w/w) Glyzerin, 0.2% (w/w) HPMC, 14.3% (w/w) ProLyte 1 (pH 4)
Separationsmedium 2 (Einlässe 3-5)	25% (w/w) Glyzerin, 0.2% (w/w) HPMC, 20% (w/w) ProLyte 2 (pH 7)
Separationsmedium 3 (Einlass 6)	25% (w/w) Glyzerin, 0.2% (w/w) HPMC, 14.3% (w/w) ProLyte 3 (pH 10)
kathodisches Stabilisierungsmedium (Einlass 7)	25% (w/w) Glyzerin, 0.2% (w/w) HPMC, 100 mM NaOH
Gegenflussmedium (Einlass 8)	25% (w/w) Glyzerin, 0.2% (w/w) HPMC

Tabelle 5.1: Zusammensetzungen der Medien für die native IEF.

Die Medien enthielten Hydroxypropyl-Methyl-Zellulose (HPMC, Aldrich), um die Viskosität des Mediums zu erhöhen und die Elektroosmose³ zu unterdrücken, sowie Glyzerin, um

³Bewegung von ionischen Lösungsmitteln in der Nähe einer fixierten Ladung an einer Oberfläche in

die Viskosität und die Dichte zu erhöhen. ProLytes sind von der Firma TECAN entwickelte Träger-Ampholyte, die den linearen pH-Gradienten im elektrischen Feld ausbilden. Für die Separationsmedien (Einlass 1 - 7) und das Gegenflussmedium wurde eine Flussrate von 57.2 ml/h verwendet. Das Zelllysate (Proteinkonzentration ~ 10 mg/ml) wurde 1:10 mit Separationsmedium 3 (vgl. Tab. 5.1) verdünnt und mit einer Flussrate von 1.97 ml/h am kathodischen Probeneinlass aufgetragen. Die Verweilzeit der Probe in der Trennkammer betrug mit der gewählten Medien-Flussrate 22 Minuten. Die separierten Proteine wurden in Polypropylen Mikrotiter-Platten (Greiner) spaltenweise in 96 Fraktionen gesammelt. Position A1 enthielt die äußerste anodische Fraktion und die letzte Position H12 enthielt die äußerste kathodische Fraktion (vgl. Abb. 5.3). Der Verlauf des pH-Gradienten wurde manuell vermessen.

5.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE und die Färbung der Gele wurde von Herrn Marius Boicu durchgeführt.

Die Fraktionen aus der Auftrennung der FFE (3 μ l bzw. 8 μ l) wurden für die native PAGE mit nicht-denaturierendem Auftragspuffer (62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 10% (v/v) Glycerin, 0.01% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und in einem kontinuierlichen Gradientengel (Sammelgel: 4% Acrylamid, Trenngel: 4 - 15% Acrylamid/Bis bzw. 3.3 - 15% Acrylamid/Diallyltartardiamid) bei Raumtemperatur aufgetrennt (Laufpuffer: 25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM Glycin; 125 V) (modifiziert nach [Lämmli 1970]).

Als Molekulargewichtsstandard diente ein Marker von Pharmacia Biotech mit den Proteinen: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Lactatdehydrogenase (140 kDa) und Rinderserumalbumin (67 kDa).

Die Banden aus den nativen Gelen wurden ausgeschnitten, in 10 μ l Auftragspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 20 mM DTT) aufgenommen, 10 Minuten bei 37°C geschüttelt, 1 Minute bei 70°C inkubiert und mittels SDS-PAGE (Sammelgel: 6% Acrylamid, Trenngel: 12% Acrylamid) bei RT aufgetrennt (Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8.5, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS; 100 V) (modifiziert nach [Lämmli 1970]).

Als Molekulargewichtsstandard diente die *BenchMark Protein Ladder* von Invitrogen. Sie enthält Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 10 bis 220 kDa.

Gegenwart eines elektrischen Feldes. Die Richtung des elektroosmotischen Flusses ist der Wanderungsrichtung der Probenionen entgegengerichtet. Die Elektrosmose ist mit einer Hydratisierung der Kathode und einer Dehydratisierung der Anode verbunden.

Antikörper	Verdünnung	Art
Anti-Thermosom, α	1 : 1000	affinitätsgereinigt, polyklonal, aus Kaninchen
Anti-Proteasom	1 : 1000	affinitätsgereinigt, polyklonal, aus Kaninchen
Anti-Tricorn	1 : 1000	affinitätsgereinigt, polyklonal, aus Kaninchen
Anti-VAT	1 : 1000	affinitätsgereinigt, polyklonal, aus Kaninchen

Tabelle 5.2: Verwendete Erstantikörper und deren Verdünnungen in PBS. Der Thermosom-Antikörper bindet nur an die α -Untereinheit.

Zur Coomassie-Färbung bzw. Silberfärbung von Proteingelen wurde die Methode nach K. Weber [Weber *et al.* 1972] bzw. J. Heukeshoven und R. Dernick [Heukeshoven und Dernick 1988] angewendet.

5.3.4 Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF Spektren wurden von Frau Sigrid Bauer (MPI für Biochemie, Martinsried, Abt. Oesterhelt) an einem MALDI-Massenspektrometer Reflex III (Bruker Daltonics) durchgeführt. Für die Auswertung der MALDI-TOF-Spektren wurden der *Mascot*-Server (Matrix Science) verwendet.

5.3.5 Dot-Blot

Alle Fraktionen der FFE (100 μ l) wurden mit Hilfe einer Filtrationsapparatur (Schleicher & Schüll) auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran-Membran BA-S85, Schleicher & Schüll) adsorbiert. Protein auf der Nitrozellulose-Membran wurde durch Ponceau-S-Lösung (3% (w/v) TCA, 3% (w/v) Sulfosalicylsäure, 0.2% (w/v) Ponceau-S) angefärbt. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation der Nitrozellulose-Membran für eine Stunde in PBS + 1.5% (w/v) Gelatine (SIGMA) geblockt. Die Membran wurde einmal in PBS (10 Minuten) gewaschen und dann für eine Stunde mit dem entsprechenden Antikörper (vgl. Tab. 5.2) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS (je 10 Minuten) wurde die Membran für eine Stunde mit anti-Kaninchen-IgG als Zweitantikörper inkubiert (Verdünnung in PBS 1:5000), der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert war. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen in PBS (dreimal 10 min) entfernt und gebundener Antikörper wurde mittels der AP-Reaktion nachgewiesen. Dazu wurde diese Membran in 10 ml AP-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) mit 66 μ l NTB-Lösung (5 % NTB in 70% (v/v) DMF) und 33 μ l BCIP-Lösung (5 % BCIP in 1 ml 100% (v/v) DMF) bis zum Sichtbarwerden der Spots behandelt.

5.3.6 Bestimmung der proteolytischen Aktivität des 20S Proteasoms

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität des 20S Proteasoms aus den FFE-Fractionen wurden 100 μl -Aliquots mit 100 μM N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4-methylcoumarinamid (Suc-LLVY-AMC, Bachem) in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 (Endvolumen 200 μl) 30 Minuten bei 60°C inkubiert. 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 zeitliche Zunahme der Fluoreszenzintensität ermöglichte. Das abgespaltene AMC wurde bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und die Emission bei 460 nm mit dem FLUOstar OPTIMA Platerader (BMG Labtech) gemessen. Die erhaltenen Werte wurden auf eine 100 μM AMC-Referenzlösung bezogen.

5.3.7 Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung

Mit kontinuierlichem Kohlefilm beschichtete Kupfer-Grids (PLANO W. Plannet GmbH, 400 \times 100 *mesh*) wurden für 30 Sekunden im Plasmacleaner (Harrick Scientific Corporation, NY, USA) behandelt, um die Oberfläche hydrophil zu machen und die Adsorption der Probe zu erleichtern. 3 μl Probe wurden für 1 Minute auf dem Grid adsorbiert. Der Überstand wurde mit Filterpapier (Typ 1, Nr. 1001 090, Whatman) seitlich abgezogen. Der verbleibende Flüssigkeitsfilm wurde für 30 Sekunden mit 2% (w/v) ungepufferter Uranylacetat-Lösung (\sim pH 4) negativ kontrastiert. Die überstehende Uranylacetat-Lösung wurde abermals mit Filterpapier vom Grid abgesaugt. Das so behandelte Grid wurde an Luft getrocknet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden am CM12 TEM (Philips, Eindhoven, Niederlande) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV aufgenommen.

Die negativ kontrastierten Proben wurden mit einem ungekühlten Präparathalter eingeschleust und bei Raumtemperatur mikroskopiert. Die einzelnen Bilder wurden bei 66 500-facher Vergrößerung mit einer 1024 \times 1024 Pixel CCD-Kamera aufgezeichnet. Die Pixelgröße korrespondierte zu 0.36 nm auf Objektebene. Die Bildverarbeitung wurde im EM Software-System [Hegerl 1996] und mit dem TOM-Software-Paket [Nickell *et al.* 2005] auf Opteron Workstations durchgeführt.

5.4 Ergebnisse und Diskussion

Die FFE, unter nativen Bedingungen im IEF-Modus betrieben, wurde dazu verwendet, um cytosolische Proteine bzw. Proteinkomplexe aus *T. acidophilum* gemäß ihres pI in einem pH-Bereich von pH 3 - pH 10 in insgesamt 70 Fraktionen aufzutrennen und anzureichern. Da die separierten Proteine in Lösung vorlagen, konnten sie direkt im Anschluss an die FFE auf Grids aufgebracht werden und im EM analysiert werden.

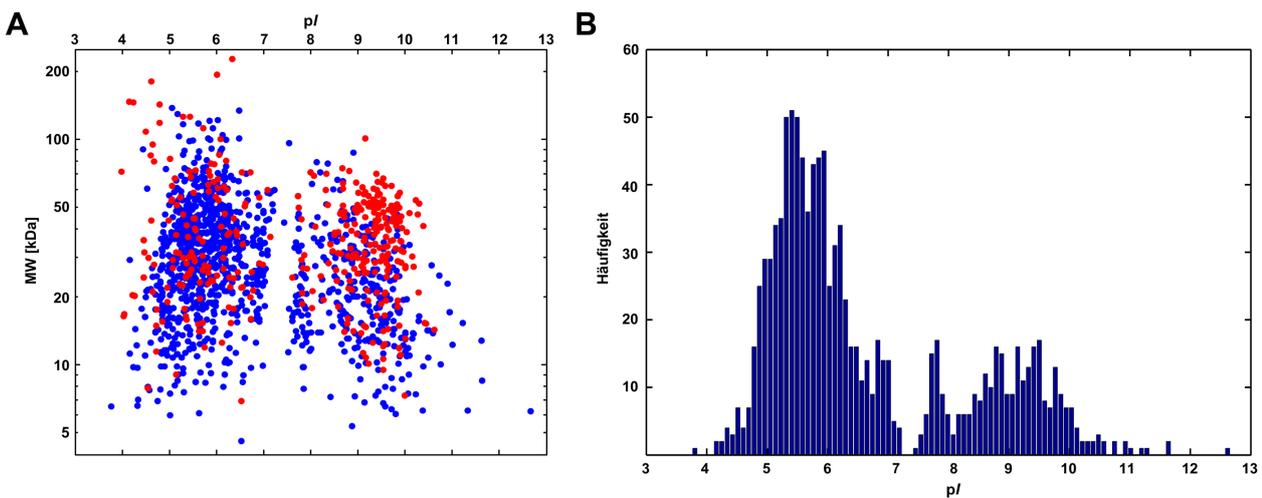


Abbildung 5.2: **A** Theoretisches 2D Gel von *T. acidophilum*. Der theoretische pI (waagrechte Achse) ist gegen das MW (senkrechte Achse, logarithmische Skalierung) aller Proteine, die im Genom von *T. acidophilum* für Proteine kodieren, aufgetragen. Proteine, die mindestens einen vorhergesagten Transmembranbereich aufweisen, sind rot dargestellt, cytosolische blau. **B** Theoretische Häufigkeitsverteilung aller vorhergesagten cytosolischen Proteine gemäß ihrer isoelektrischen Punkte. Eine ähnliche Verteilung der Proteine sollte nach der Auftrennung mittels FFE, die im IEF-Modus unter denaturierenden Bedingungen betrieben wurde, beobachtet werden.

Aus der Genom-Sequenzierung von *T. acidophilum* wurden 1507 offene Leserahmen ermittelt, die laut Vorhersage für 1482 Proteine kodieren [Ruepp *et al.* 2000]. 1095 Proteine besitzen keine vorhergesagten Transmembrandomänen und werden im folgenden als cytosolische Proteine betrachtet. Mit dieser Information ließ sich die theoretische Verteilung der Proteine bezüglich ihres isoelektrischen Punktes und ihres Molekulargewichts (*molecular weight*, MW) abschätzen. Dabei wurden die aus der Primärsequenz der Proteine ermittelten theoretischen pI -Werte gegen die jeweiligen Molekulargewichte aufgetragen. Für die 1482 Proteine aus *T. acidophilum* ergab sich dabei folgendes Proteinmuster (siehe Abb. 5.2 **A**).

Die Häufigkeitsverteilung der vorhergesagten cytosolischen Proteine gemäß ihres pI entspricht der theoretischen Verteilung der Proteine nach einer denaturierenden IEF in der FFE unter der Annahme, dass alle Proteine gleich stark vom Organismus exprimiert werden (siehe Abb. 5.2 **B**). Für die pI -Werte im Diagramm wurde eine Intervallbreite von 0.1

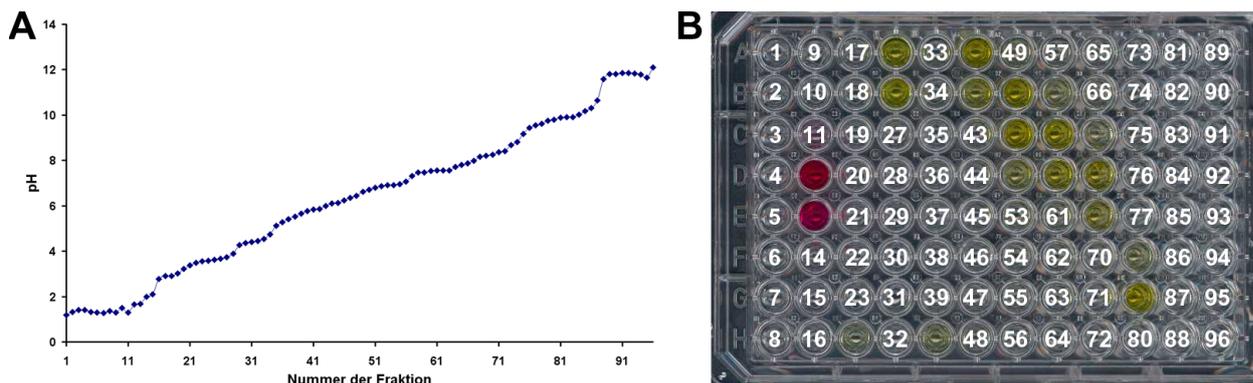


Abbildung 5.3: **A** Gemessener Verlauf des pH-Profiles bei der IEF (1500 V und 24 mA) der Träger-Ampholyte (ohne Probe). **B** Separierung der pI-Marker mittels FFE. Die pI-Marker fokussieren an ihren pI in 1 - 3 benachbarte Fraktionen. Die Fraktionen werden in den Mikrotiter-Platten Spaltenweise angeordnet. Position A1 enthält die äußerste anodische Fraktion und die letzte Position H12 enthält die äußerste kathodische Fraktion.

gewählt, was ungefähr dem pH-Unterschied von zwei benachbarten Fraktionen entspricht. Die meisten Proteine haben einen theoretischen pI im Bereich von 4.5 bis 10.5. Bei dieser Darstellungsweise wird nicht berücksichtigt, dass einige Proteine Komplexe bilden können, und somit einen anderen pI aufweisen.

5.4.1 IEF des Zelllysats

Das *T. acidophilum*-Zelllysats wurde wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben hergestellt. Es wurde jeweils frisch am selben Tag, an dem die FFE-Läufe stattfanden, präpariert. Für die Auftrennung des Zelllysats unter nativen Bedingungen wurde die FFE im IEF-Modus betrieben (vgl. Abschnitt 5.3.2). Durch das Anlegen einer konstanten Hochspannung von 1500 V quer zur Flussrichtung bildete sich ein linearer pH-Gradient aus Träger-Ampholyten im Trennmedium aus. Das gemessene Profil des Verlaufs ist in Abb. 5.3 **A** dargestellt. Am Rand bildet sich ein Plateau aus anodischen und kathodischen Stabilisierungsmedium aus. Zwischen den je 13 Fraktionen am Rand (Fraktionen 1 - 13 und 84 - 96) ist ein lineares pH-Profil zu erkennen, in dem sich die Proteine gemäß ihres pI in ungefähr 70 Fraktionen trennen. Als Kontrolle für die Trennschärfe des elektrischen Feldes wurde eine Mischung aus pI-Farbmärker zugegeben, die sich gemäß ihrer pI-Werte an sieben Positionen auftrennten. Die Farbstoffe fokussierten innerhalb von 2 - 3 benachbarten Fraktionen (Abb. 5.3 **B**). Der Verlauf des pH-Gradienten variierte in Läufen an unterschiedlichen Tagen um höchstens ein bis zwei Fraktionen.

Um eine Übersicht über die Verteilung der Proteine und Proteinkomplexe nach der IEF zu bekommen, wurden die Fraktionen 24 - 78 durch native PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt (siehe Abb. 5.4). Der Großteil der Proteine war über die Fraktionen 24 -

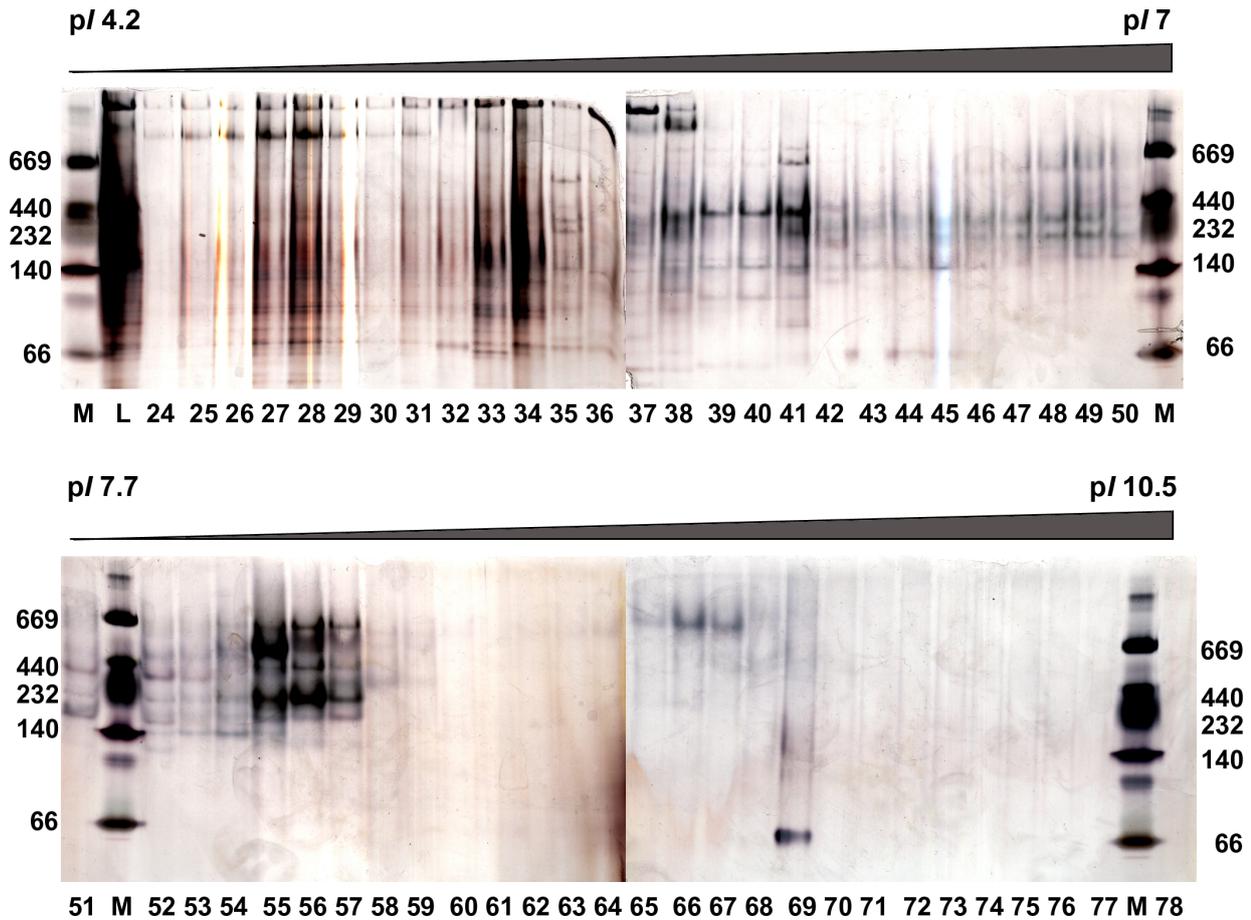


Abbildung 5.4: Analyse der FFE-Fractionen 24 - 77 mittels nativer PAGE. Der graue Keil oberhalb der Gele gibt den Verlauf des pH-Gradienten an. Es wurde jeweils 3 μ l Probe pro Spur aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht. M = Molekulargewichtsmarker und L = Lysat.

58 verteilt, was einem pI -Bereich von 3.8 bis 7.6 entspricht. Die meisten Fraktionen sind eine Mischung aus mehreren Proteinen. Von besonderem Interesse waren Fraktionen mit hochmolekularen Proteinkomplexen ($MW > 500$ kDa). Solche Fraktionen sollten im EM genauer untersucht werden, um gegebenenfalls die 3D Struktur von noch nicht bekannten Proteinkomplexen aufzuklären und als Referenz für die Mustererkennung in Tomogrammen von intakten *T. acidophilum*-Zellen zu verwenden (vgl. Abschnitt 6.2.2).

5.4.2 Detektion von bekannten Proteinkomplexen

Der immunologische Nachweis von bekannten cytosolischen Proteinkomplexen aus *T. acidophilum* bot eine einfache Möglichkeit, die Qualität der Auftrennung des Zelllysats und die Fokussierung der Proteine nach der IEF zu bestimmen (vgl. Abschnitt 5.3.5). Insgesamt standen vier Antikörper die gegen Proteinkomplexe aus *T. acidophilum* gerichtet sind zur Verfügung: Antikörper gegen Thermosom, 20S Proteasom, VAT und Tricorn. Diese wurden für Immuno-Dot-Blots mit dem fraktionierten Lysat verwendet (vgl. Abschnitt 5.2), um die Verteilung der Proteinkomplexe nach der IEF sichtbar zu machen. Die makromolekularen Komplexe fokussierten nicht ausschließlich an ihren theoretisch erwarteten pI , sondern waren über mehrere Fraktionen verteilt. Die breiteste Verteilung um ihren theoretischen pI zeigten das Thermosom (pI 5.37) und VAT (pI 5.59). Diese beiden Proteinkomplexe waren über 24 bzw. 23 Fraktionen verteilt. Dies entsprach einem Bereich von pH 3.6 - pH 6.4 bzw. pH 3.4 - pH 6.1. Das 20S Proteasom konnte in insgesamt 17 Fraktionen detektiert werden (pH 4 - pH 6.1). Die engste Verteilung wies das Tricorn auf, was über 15 Fraktionen (pH 3.4 - pH 5.5) verteilt war. An seinem theoretischen pI von 5.84 konnte kein Protein nachgewiesen werden. Das schwache Detektionssignal wies darauf hin, dass das Tricorn nur in sehr geringen Mengen im Lysat enthalten war.

Zusätzlich zum immunochemischen Nachweis des Proteasoms wurden die Fraktionen 3A bis 6H auf die enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms untersucht. Als Substrat diente das synthetische Tetrapeptid Suc-LLVY-AMC [Seemüller *et al.* 1995]. In den Fraktionen 4A bis 5F konnte eine proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms nachgewiesen werden (vgl. Abb. 5.5). Dies war in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem Dot-Blot. Das 20S Proteasom konnte demnach mittels FFE nativ separiert werden.

Eine mögliche Ursache für die breite Verteilung der getesteten Proteinkomplexe nach der IEF mittels FFE könnten im Zelllysat enthaltene Salze sein, die bereits in geringen Konzentrationen zu einer schlechten Fokussierung führen. Eine bessere Fokussierung könnte durch

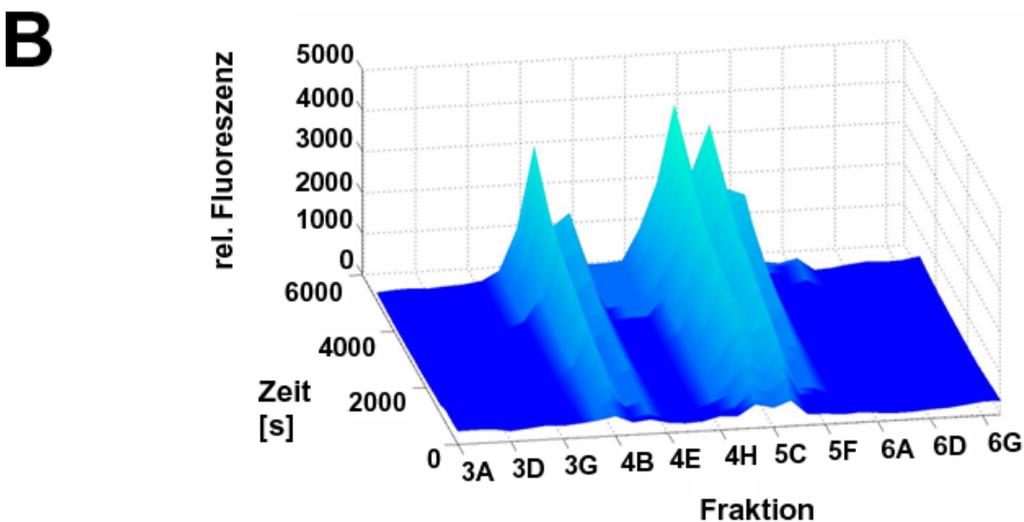
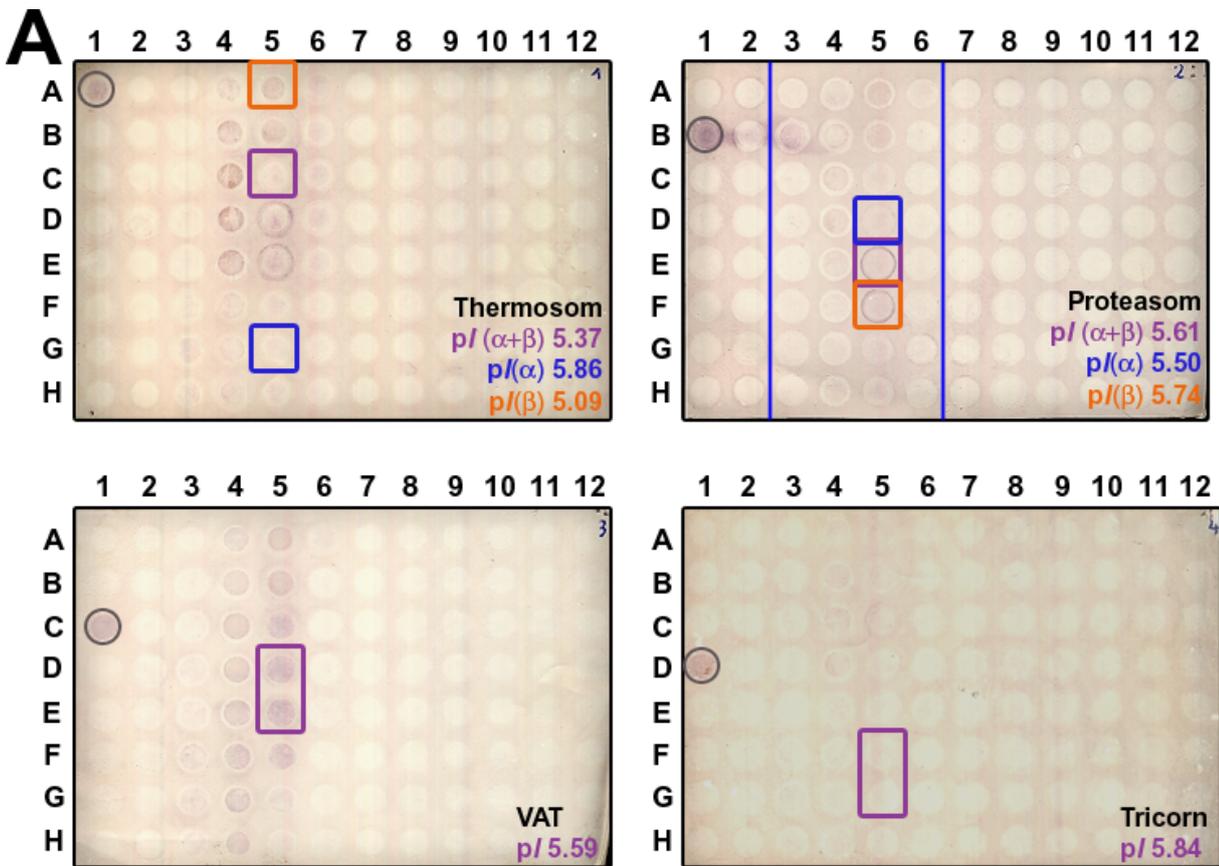


Abbildung 5.5: A Immuno-Dot-Blot zum Nachweis bekannter cytosolischer Proteinkomplexe aus *T. acidophilum*. Das Zellysate wurde in einem FFE-Lauf in 96 Fraktionen aufgetrennt. Die theoretischen isoelektrischen Punkte der jeweiligen Proteine bzw. ihrer Untereinheiten sind farblich markiert. In der ersten Spalte sind Positivkontrollen von aufgereinigtem Protein aufgetragen. A1: 10 μg Thermosom, B1: 300 μg Proteasom, C1: 60 μg VAT, D1: 170 μg Tricorn. B Aktivitätsmessung des 20S Proteasoms durch Aufzeichnung des zeitlichen Verlaufs der relativen Fluoreszenz während des Abbaus des fluorogenen Tetrapeptids Suc-LLVY-AMC. Es wurden, die im Dot-Blot des Proteasoms blau umrandeten Fraktionen, vermessen. Die gemessene proteolytische Aktivität ist in willkürlichen Einheiten angegeben.

eine Entsalzung der Probe erzielt werden. Viele Proteine benötigen jedoch eine gewisse Ionenstärke oder zweiwertige Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} für ihre native Konformation.

5.4.3 Elektronenmikroskopische Charakterisierung der Fraktionen

Das Zellysate aus *T. acidophilum* war eine inhomogene Mischung aus einer Vielzahl von Proteinen, wie aus nativen Gelen (vgl. Abb. 5.4, die mit L markierte Spur) und elektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 5.6 **A**) ersichtlich wurde. Es waren Proteine und makromolekulare Proteinkomplexe in unterschiedlichen Formen und Größen sichtbar. Für die strukturelle Charakterisierung im EM waren hochmolekulare Komplexe von besonderem Interesse, da sie in weiteren Experimenten in Tomogrammen von intakten *T. acidophilum*-Zellen detektiert werden sollten. Proteinkomplexe können mit Negativkontrastierung ab einem MW von 200 kDa im EM aufgelöst werden, wenn das Protein in aufgereinigter Form vorliegt. Die Heterogenität der Fraktionen erschwerte die Identifizierung einzelner Komplexe.

Nach der IEF in der FFE wurden jeweils einige Mikroliter der Fraktion 24 bis 76 auf ein Grid aufgetragen (vgl. Abschnitt 5.3.7), negativ kontrastiert und im EM bei Raumtemperatur mikroskopiert. Die Negativkontrastierung für die Probenpräparation wurde verwendet, da dies eine schnelle und effiziente Methode war, um einen generellen Überblick über eine Vielzahl von unterschiedlichen Proben zu bekommen (vgl. Abschnitt 2.3.1). Zudem konnte man aufgrund des hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der Bilder mit relativ wenigen Partikeln ein erstes Strukturmodell mit moderater Auflösung berechnen. Die Abbildungen 5.6 **B** bis **D** zeigen die negativ kontrastierten Fraktionen 38, 39 und 55. Die Fraktion 38 (pH 5.8) zeigte deutlich Thermosomen, andere Proteine ergaben einen inhomogenen Hintergrund. Die Thermosomen wurden aber nicht ausschließlich in dieser Fraktion beobachtet, sondern sie verteilten sich über mehrere Fraktionen (Daten nicht gezeigt). In der benachbarten Fraktion 39 (pH 5.8) konnte unter anderem das 20S Proteasom gefunden werden.

Da die Strukturen von Proteasom und Thermosom bereits gelöst sind, wurden aus den korrespondierenden Fraktionen nur wenige Partikel manuell selektiert, aligniert und gemittelt. Die 2D Mittelung der Partikel ist jeweils als Inset in der rechten oberen Ecke der entsprechenden Fraktion gezeigt. Die Mittelungen zeigten die charakteristischen Merkmale und Abmessungen des Thermosoms und des Proteasoms. In der gemittelten Aufsicht des Thermosoms war die achtfache Radialsymmetrie des Komplexes zu erkennen (vgl. Abb. 5.6 **B**).

Die Mittelung der Seitenansicht des 20S Proteasoms zeigte die vier aufeinander gestapelten Ringe (vgl. Abb. 5.6 C).

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Fraktion 55 wurde eine Vielzahl von sternförmigen Partikel gefunden. Für die 2D Mittelung der Partikel aus Fraktion 55 wurden zwölf Partikel manuell selektiert, aligniert und gemittelt. Diese initiale Referenz wurde für eine automatische Partikeldetektion, die auf Kreuzkorrelation beruht, verwendet. Insgesamt wurden aus den Aufnahmen 6400 vermeintliche Partikel extrahiert. Durch Klassifizierung mittels PCA (principal component analysis) wurden 1186 Partikel für eine verfeinerte 2D Mittelung ausgewählt. Im Ergebnis zeigte die Mittelung der alignierten Partikel eine dreifache oder sechsfache Radialsymmetrie. Das Partikel war nicht perfekt symmetrisch, was möglicherweise durch eine ungleichmäßige Verteilung des Uranylacetats hervorgerufen wurde. Sein Durchmesser betrug ca. 16 nm. Weiterhin zeigte sich, dass das Partikel von einem 3 nm breiten Kanal durchzogen wurde.

Um detailliertere Aussagen über die 3D Struktur des Proteins machen zu können, wäre die Aufnahme von weiteren Daten notwendig. Weiterhin müssten verschiedene Ansichten aus anderen Richtungen untersucht werden bzw. das Protein in Eis eingebettet werden. Leider hatte, das in den Separationsmedien enthaltene HPMC, einen negativen Einfluss auf die fraktionierten Proben. Aufgrund seines relativ hohen MW (86 kDa) war eine Aufkonzentrierung der Probe nicht möglich und erzeugte gleichzeitig einen störenden Hintergrund bei der Elektronenmikroskopie. Für die Präparation eiseingebetter Proben, bei der eine höhere Proteinkonzentration benötigt wird als bei der Negativkontrastierung, wäre damit eine weitere Reinigung der Fraktionen notwendig.

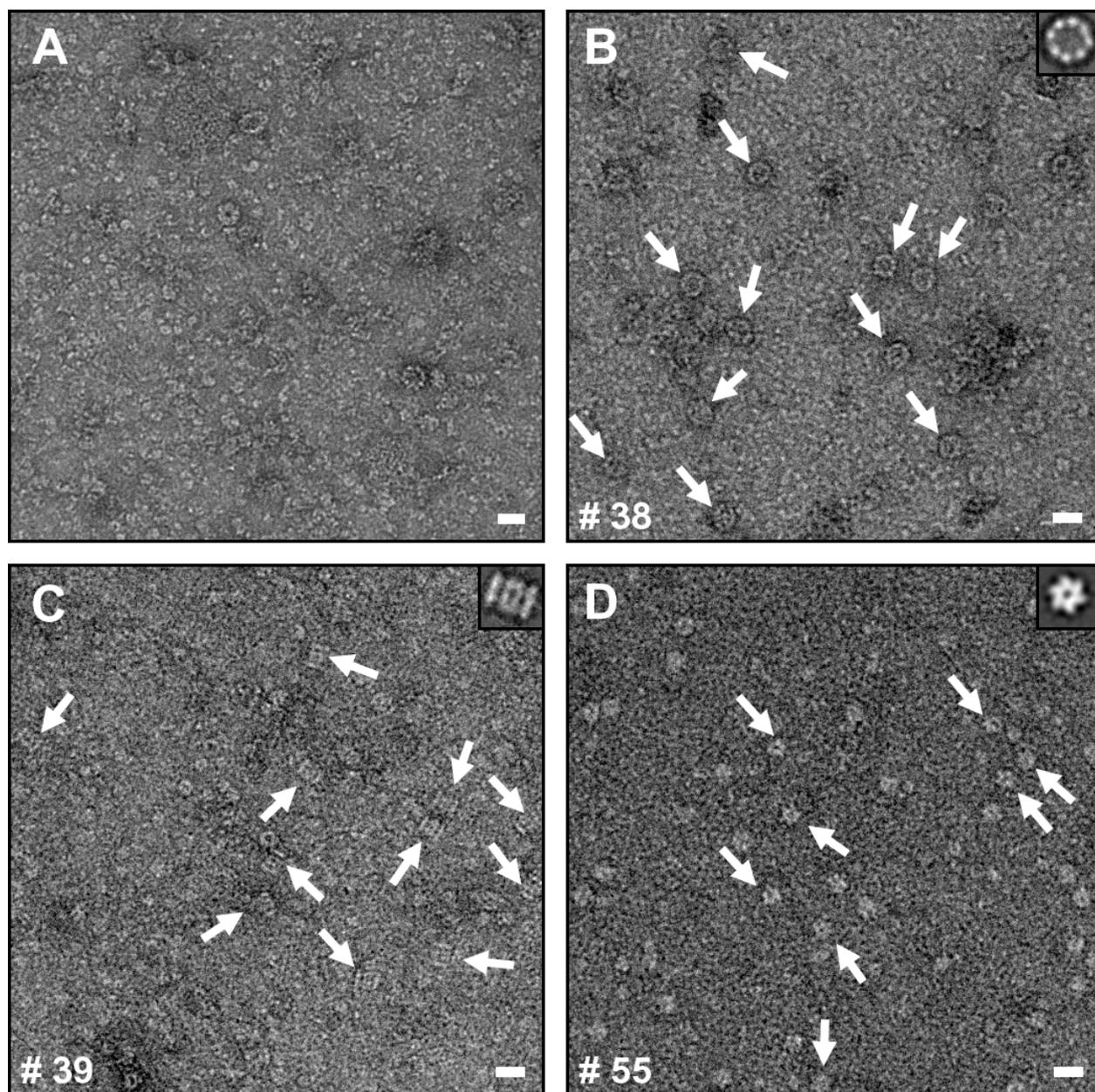


Abbildung 5.6: **A** Aufnahmen von negativ kontrastiertem (2% Uranylacetat) Zellysate bei 80 000-facher Vergrößerung. **B-D** Elektronenmikroskopische Aufnahmen ausgewählter Fraktionen bei 66 500- Vergrößerung. **B** In Fraktion 38 (pH 5.8) kommen gehäuft Thermosomen vor. Inset: 2D Mittelung von 30 Einzelmolekülen in Aufsicht. Die Ringe besitzen eine achtfache Radialsymmetrie und schließen in ihrer Mitte eine mit Kontrastmittel gefüllte Öffnung ein. **C** In Fraktion 39 (pH 5.9) kommen unter anderem 20S Proteasomen vor. Inset: 2D Mittelung von 29 Einzelmolekülen in seitlicher Ansicht. Das 20S Proteasom besteht aus vier aufeinander gestapelten Ringen. **D** In Fraktion 55 (pH 7.3) wurde eine Vielzahl von sternförmigen Partikel gefunden. Inset: 2D Mittelung von 1186 Einzelmolekülen. Die Balken entsprechen jeweils 20 nm.

5.4.4 Massenspektrometrische Analyse von Fraktion 55

Aus den nativen Gelen ging hervor, dass Fraktion 55 eine Mischung aus mindestens sechs unterschiedlichen Proteinen oder Proteinkomplexen war (vgl. Abb. 5.7 **A** und **D**). Die Muster der Proteinbanden auf den Nativgelen waren unterschiedlich, da in **A** 4 - 15% Acrylamid/Bis-Gele und in **D** 3.3 - 15% Acrylamid/Diallyltartardiamid-Gele verwendet wurden. Die erste und die fünfte Bande des nativen Gels wurde ausgeschnitten und auf ein SDS Gel übertragen (vgl. Abb. 5.7 **B** und **C**). Ihre Identität wurde mittels Massenspektrometrie geklärt (vgl. Tab. 5.3). Die erste Bande war eine Mischung aus zwei Proteinen: der Translations-Elongationsfaktor (Ta0444) und die katabole Ornithin Transcarbamoylase (OTCase, Ta1330). Die fünfte Bande enthielt nur ein Protein, die Eisen-Superoxid-Dismutase (SOD, Ta0013). Die Identität der restlichen Proteinbanden wurde aus Fraktionen von drei anderen FFE-Läufen bestimmt. Bei der zweiten Bande handelte es sich sehr wahrscheinlich um die α -Untereinheit der Succinyl-CoA-Synthetase (Ta0301). Für die dritte Bande ergab die Massenspektrometrie kein signifikantes Ergebnis, der MASCOT-Score lag unterhalb der Schwelle von 59. In der vierten Bande wurde, wie auch in der fünften die Eisen-Superoxid-Dismutase (SOD, Ta0013) identifiziert. In der sechsten Bande wurde die β -Untereinheit der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Ta0259) und der Translations-Elongationsfaktor (Ta0444) identifiziert. Insgesamt stehen somit sechs mögliche Kandidaten zur Auswahl, die den sternförmigen Komplex aus Fraktion 55 bilden konnten. Für diese Proteine standen auch 3D Strukturen aus der Röntgenstrukturanalyse von anderen Organismen zur Verfügung. Aufgrund der Dichteverteilung, die im EM beobachtet wurde (vgl. Abb. 5.8) und den Ergebnissen aus der Größenausschlußchromatographie an cytosolischen Proteinen aus *T. acidophilum* [Nagy 2006] konnte der Komplex in Fraktion 55 als die katabole OTCase identifiziert werden.

Mittels FFE in Kombination mit elektronenmikroskopischer und massenspektrometrischer Analyse konnte ein noch unbekannter Proteinkomplex aus dem *T. acidophilum*-Zelllysate separiert und identifiziert werden. Der Versuch die OTCase in *E. coli* rekombinant zu exprimieren scheiterte, da das Protein unlösliche Einschlusskörperchen bildete. Somit bietet die Separation von Zelllysate mit Hilfe der FFE einen alternativen Ansatz zur klassischen Methode der Probengewinnung für die Elektronenmikroskopie.

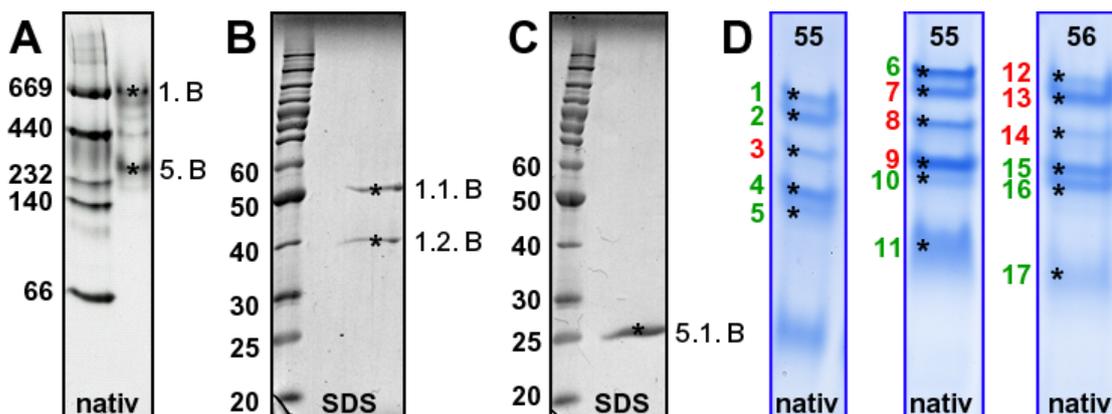


Abbildung 5.7: **A** Analyse der FFE-Fraktion 55 mittels nativer PAGE (4 - 15% Acrylamid/Bis-Gel). Es wurden 8 μ l Probe aufgetragen. Die zwei mit einem Stern markierten Banden wurden ausgeschnitten und auf ein SDS Gel übertragen. **B** Auftrennung der ersten Bande aus **A** mittels SDS PAGE. **C** SDS Gel der fünften Bande aus **A**. In der ersten Spur wurde der Molekulargewichtsmarker aufgetragen. **D** Analyse der FFE-Fractionen 55 bzw. 56 mittels nativer PAGE (3.3 - 15% Acrylamid/Diallyltartardiamid-Gele) aus drei anderen FFE-Läufen. Die Proteinbanden wurden durch kolloidale Coomassie-Brillantblau-Färbung sichtbar gemacht. Für die massenspektrometrische Analyse ausgewählte Proteinbanden sind durch Sterne markiert und nummeriert.

Natives Gel A , SDS Gele B und D				
Bez.	MW [Da]	pI	Score	Description
1.	34335	5.82	110	<i>Ornithine carbamoyltransferase, catabolic</i>
5.	23784	6.32	145	<i>Probable Fe-superoxide dismutase (sod)</i>
1.1.	47168	7.24	155	<i>Elongation factor 1-α (EF-1-α)</i>
1.2.	34335	5.82	143	<i>Ornithine carbamoyltransferase, catabolic</i>
5.1.	23784	6.32	117	<i>Probable Fe-superoxide dismutase (sod)</i>
Native Gele D				
Bez.	MW	pI	Score	Description
1	34335	5.82	69	<i>Ornithine carbamoyltransferase, catabolic</i>
6	64676	5.85	78	<i>Probable pyruvate ferredoxin oxidoreductase, α</i>
2	41360	5.59	60	<i>Probable succinyl-CoA synthetase, β</i>
4	23784	6.32	133	<i>Probable Fe-superoxide dismutase (sod)</i>
15	23784	6.32	90	<i>Probable Fe-superoxide dismutase (sod)</i>
5	23784	6.32	147	<i>Probable Fe-superoxide dismutase (sod)</i>
10	88855	5.62	149	<i>Tricorn protease interacting factor F2</i>
16	23784	6.32	158	<i>Probable Fe-superoxide dismutase (sod)</i>
11	64676	5.85	111	<i>Probable pyruvate ferredoxin oxidoreductase, α</i>
17	47168	7.24	92	<i>Elongation factor 1-α (EF-1-α)</i>

Tabelle 5.3: Massenspektrometrische Ergebnisse zu den Gelen. Die Bezeichnung der Spots ist mit den Nummern auf den Gelen identisch (vgl. Abb. 5.7). Die Identifizierung der Proteine erfolgte nach der Bestimmung der Peptidmassenmuster durch Vergleich mit der *T. acidophilum*-Datenbank (<http://pedant.gsf.de>) mit dem Programmpaket MASCOT. Zur Abschätzung der Qualität der Identifizierung ist deshalb der MASCOT-Score angegeben. Der Score ist als $-10 \cdot \log(P)$ definiert, wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass die beobachtete Übereinstimmung ein zufälliges Ereignis ist. Ein Score von größer als 59 ($P < 0.05$) wird als signifikant angesehen. Bei Banden mit roten Nummern lag der MASCOT-Score unterhalb der akzeptablen Schwelle von 59

5.4.5 Homologievergleich und Strukturvergleich der OTCase aus *T. acidophilum* mit archaealen OTCasen

Eine Homologiesuche mit dem Programm `blastp` (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) der OTCase-Aminosäuresequenz (Ta1330) aus *T. acidophilum* mit bisher sequenzierten Archaeen-Genomen ergab, dass Ta1330 eine hohe Identität zu Proteinen aus *T. volcanium* (87%), *Picrophilus torridus* (63%), *Ferroplasma acidarmanus* (60%), *Pyrococcus abyssi* (56%), *Methanocaldococcus jannaschii* (53%), *Pyrococcus horikoshii* (55%) und *Pyrococcus furiosus* (55%) besitzt. In Abb. 5.9 ist das multiple Sequenzalignment für Ta1330 und die oben genannten archaealen OTCasen dargestellt. Der *Score* und der *E*-Wert für das paarweise Alignment für Ta1330 und die OTCase aus *P. furiosus* lagen bei 310 *bits* und 10^{-84} (Blosum62). Die Sequenzübereinstimmung der beiden Proteine beträgt 55%.

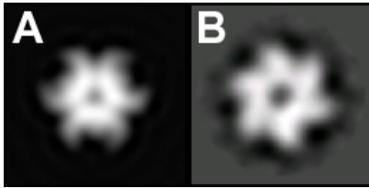


Abbildung 5.8: **A** Projektion der berechneten Elektronendichte aus der Röntgenkristallstruktur der OTCase aus *Pyrococcus furiosus* (pdb-Eintrag: 1pvv). Die Elektronendichte wurde auf eine Auflösung von 3.2 nm gefiltert, was einem Defokus von 3 μm entspricht. **B** Mittelung aus 1186 sternförmigen Partikeln von Fraktion 55 vgl. 5.6 D. Die Kantenlänge des Bildes entspricht 23 nm.

Für die anabole OTCase aus dem hyperthermophilen Archaeon *P. furiosus* ist auch eine 3D Röntgenkristallstruktur verfügbar [Massant *et al.* 2003]. Die OTCase ist ein Dodecamer mit einem Gesamtmolekulargewicht von 420 kDa [Villeret *et al.* 1998], das aus vier katalytischen Trimeren zusammengesetzt ist. Mit dem Programm `pdb2em` wurden die röntgenkristallographischen Strukturdaten der OTCase aus *P. furiosus* (pdb-Eintrag 1pvv) [Massant *et al.* 2003] in eine 3D Elektronendichte mit einer Pixelgröße von 0.36 nm umgerechnet. Das Volumen wurde anschließend entlang der dreifachen Symmetrieachse projiziert und auf eine Auflösung von 3.2 nm gefiltert (vgl. Abb. 5.8 A). Nicht nur auf der Aminosäureebene sondern auch auf der Strukturebene zeigt die OTCase aus *T. acidophilum* Ähnlichkeit zu der katabolen OTCase aus *P. furiosus* (vgl. Abb. 5.8 B).

Tac_OTCase	-----MLDMEKDLSEIIDLSIELKKNRYSYELSRNKVVLGLLIFEKLPSTR	45
Tvo_OTCase	-----MIMAKRDILSVLDMKNDLDEIINLSIELKKNRYSYELSRNKMLGLLIFEKLPSTR	55
Pto_OTCase	-----MKRDIISVYDMKDDLEDIEELSIKLKKD--RTIKFSEKKILAMIFEKLPSTR	50
Fac_OTCase	-----MKRDILSVADMENDFDQIIDTSLIKLKKD--KTIKFSDKLLGLMIFEKLPSTR	50
Pab_OTCase	MVVS LKGRDLLCLQDYTPPEIWTILETAKMLKIWQIKGPHRLLEGKTLAMIFOKPSTR	60
Mja_OTCase	-----MHLDDLVDLSREDVLKIEYGIYFKKNRK--HEKILEGKSVAILFEKLPSTR	51
Pho_OTCase	MVVS LKGRDLLCLQDYTPPEIWTILETAKMFKIWQIKGPHRLLEGKTLAMIFOKPSTR	60
Pfu_OTCase	MVVS LAGRDLCLCLQDYTAEEIWTILETAKMFKIWQIKGPHRLLEGKTLAMIFOKPSTR	60
Tac_OTCase	RTSLEVAIDQLGCHAVYLNPEMQLGRGETISDTHVLSRFLDATAYRAYDHRNVVELAR	105
Tvo_OTCase	RTSLEVAIDQLGCHAVYLNPEMQLGRGETISDTHVLSRFLDATAYRAFDHKNVVELAR	115
Pto_OTCase	RNSLEVAEMQLNGHAIYLNPNMQIGRGETIADTARVLSRFVDIISYRAFNHDDVVELAR	110
Fac_OTCase	RTSLEVAEMQLNGHAIYLSPEMHLDGGETIADTARVMSRFDDIISYRAYDYRNVRELAK	110
Pab_OTCase	RVSFEVAMAHLGGHALYLNAQDLQLRRGETIADTARVLSRYVDATMARVYDHKVEDLAK	120
Mja_OTCase	RMSFDIAVYELGCHPLIMNQNIEHLGKKEIKDITAKVMGRYVDITVARVYKRRHLEEMAK	111
Pho_OTCase	RVSFEVAMAHLGGHALYLNAQDLQLRRGETIADTARVLSRYVDATMARVYAHKVEDLAK	120
Pfu_OTCase	RVSFEVAMAHLGGHALYLNAQDLQLRRGETIADTARVLSRYVDATMARVYDHKVEDLAK	120
Tac_OTCase	STSI PVINALDDVEHPLQIVADFMITIKKGRFTNLKFSYIGDGNMANSMLGAAILGT	165
Tvo_OTCase	STSI PVINALDDVEHPLQIVADFMIVKEKKGKFSGLKFSYIGDGNMANSMLGAAILGV	175
Pto_OTCase	HATVPVLINALDNLEHPMQIVADFMIVYEKKHRLKGLKLAYIGDGNMANSLLLGSILGV	170
Fac_OTCase	YADVPVLINALDNMEHPLQIVADFMITIMEKKHRLKGLKLAYIGDGNMANSLLLGAALTM	170
Pab_OTCase	YASVPVINGLSDFSHPCQALADYMTIWEKKGKIKGVKVVYVGDGNNAHSLMIAGTKLGA	180
Mja_OTCase	YASVPVINALSDLAHPCQILADLMTIKEYKFKGLKIAYLGDGNMANSMLILGKALVGM	171
Pho_OTCase	YASVPVINGLSDFSHPCQALADYMTIWEKKGKIKGVKVVYVGDGNNVCHSLMIAGTKLGA	180
Pfu_OTCase	YATVPVINGLSDFSHPCQALADYMTIWEKKGKIKGVKVVYVGDGNNAHSLMIAGTKLGA	180
Tac_OTCase	DMYVASPKGFEPKQEFVEKARSIAKQHG--SSITITNDPVEAARDADVITYTDVWISMGEE	224
Tvo_OTCase	DIYVATPHGYEPKSEFVDKAKQVAKERG--SKVITINDAIEAKADADVITYTDVWISMGEE	234
Pto_OTCase	DISIACEPKGFEPNKEILRQAREISLKTG--NKIEITDDPRIAVEASDIITYTDVWVSMGEE	229
Fac_OTCase	DISVACEPHREPDRLILYRAKDLALKTG--SRIEILRDARTAVDSADIIITYTDVWVSMGEE	229
Pab_OTCase	DVVVATPEGYEPDEKVIKWAEQNAAESG--GSFELLHDPVKAVKADADVITYTDVWASMGQE	239
Mja_OTCase	DTYVGTPEGYEPNAKVVLLAKEIINNYGEGSLTLLTNDPIEAEDADVITYTDVWISMGDDK	231
Pho_OTCase	DVVVATPEGYEPDKKVIKWAEQNAAESG--GSFELLHDPVKAVKADADVITYTDVWASMGQE	239
Pfu_OTCase	DVVVATPEGYEPDEKVIKWAEQNAAESG--GSFELLHDPVKAVKADADVITYTDVWASMGQE	239
Tac_OTCase	KKGEKEKAFKDFQINEKLVSNAKRDYIFMHCLPAHRGLEVTIDGVADINSVIFDEAENRL	284
Tvo_OTCase	KRGEKEKAFTKYQINSDLVSNAKRDYIFMHCLPAHRGLEVTIDDVADINSVIFDEAENRL	294
Pto_OTCase	ERENKERIEFMPYQVNEDLTENANRDYIFMHCLPAHRGLEVTIAGVIDGIIHSVVFDEAENRI	289
Fac_OTCase	EKDQEKLEFKGYQVNEELADFADKNYIFMHCLPARRGLEVTIDEIEGIIHSVVFDEAENRL	289
Pab_OTCase	EAEERRKIERFPFQVKNKDLVKHAKPDYFMHCLPAHRGEVTIDDVIDSPNSVVWDEAENRL	299
Mja_OTCase	DKEEVLKIFPPFQINSKLLEYAKDDVIMHCLPANRGEVTIDDVIDGEHSVVYDEAENRL	291
Pho_OTCase	EAEERRKIERFPFQVKNKDLVKHAKSDYFMHCLPAHRGEVTIDDVIDSPNSVVWDEAENRL	299
Pfu_OTCase	EAEERRKIERFPFQVKNKDLVKHAKPDYFMHCLPAHRGEVTIDDVIDSPNSVVWDEAENRL	299
Tac_OTCase	HSEKGVLYKLLSY----- 297	
Tvo_OTCase	HSEKGVLYKLLSY----- 307	
Pto_OTCase	YSEKGLIYKLLS----- 301	
Fac_OTCase	YSEKGVITYVLS----- 301	
Pab_OTCase	HAQKAVLALLLGGVKTGF 317	
Mja_OTCase	HVQKGVFKFIFERK---- 305	
Pho_OTCase	HAQKAVLALLLGGVKTGF 317	
Pfu_OTCase	HAQKAVLALVMGGIKF-- 315	

Abbildung 5.9: Multiples Sequenzalignment von OTCasen aus den Archaeen *T. acidophilum* (Tac_OTCase), *T. volcanium* (Tvo_OTCase), *P. torridus* (Pto_OTCase), *F. acidarmanus* (Fac_OTCase), *P. abyssi* (Pab_OTCase), *M. jannaschii* (Mja_OTCase), *P. horikoshii* (Pho_OTCase) und *P. furiosus* (Pfu_OTCase). Am Ende jeder Zeile ist die Aminosäureposition in der jeweiligen Sequenz angegeben. Identische Reste sind in weiß mit rotem Hintergrund dargestellt. Konservierte bzw. semi-konservierte Reste sind rot bzw. blau gedruckt. Die Proteinsequenzen wurden mit dem Programm CLUSTAL_W [Thompson *et al.* 1994] aligniert.

6. Visualisierung von Makromolekülen im zellulären Kontext

6.1 Einführung

Das Ziel von *'visual proteomics'* ist die Bereitstellung eines Proteinatlas auf makromolekularer Ebene, mit dem es möglich wird, Information über die räumliche Orientierung, die Konzentration und die Interaktionen der makromolekularen Proteinkomplexe im ungestörten zellulären Kontext von individuellen Zellen zu erhalten [Nickell *et al.* 2006]. Kryo-Elektronentomogramme von intakten Zellen oder Organellen, bei einer gegebenen Auflösung von derzeit ca. 4 nm, enthalten eine gewaltige Informationsmenge. Sie sind ein 3D Abbild des gesamten Proteoms und stellen eine Momentaufnahme der lokalen, makromolekularen Interaktionen dar, welche die Grundlage von höheren zellulären Prozessen und Funktionen bilden [Alberts 1998]. Somit liefern sie wertvolle und ergänzende Informationen zur Massenspektrometrie.

Die Vorgehensweise zur Erzeugung eines 3D Proteinatlas auf makromolekularer Ebene ist in Abb. 6.1 skizziert. *T. acidophilum* stellt ein gut definiertes Modellsystem dar, da sowohl Daten aus der Genom- als auch aus der Proteomanalyse vorhanden sind. Zudem sind Strukturen von einigen makromolekularen Proteinkomplexen aus *T. acidophilum* gelöst. Diese Informationen ermöglichen es, eine strukturelle Proteinbibliothek bekannter Makromoleküle, die in der Zelle vorkommen, einzurichten. Als Referenzstrukturen kommen sowohl atomare Strukturen aus der Röntgenkristallographie als auch Kryo-Elektronenmikroskopie-Daten aus der Einzelpartikel-Analyse im mittleren Auflösungsbereich von 1 - 3 nm in Frage. Diese werden mit dem Tomogramm korreliert, wobei die Proteinstruktur mit der besten Übereinstimmung der unbekannt Struktur im Tomogramm zugewiesen wird. Dabei ist zu beachten, dass dieser auf Korrelation basierende Mustererkennungsalgorithmus eine statistische Aussage

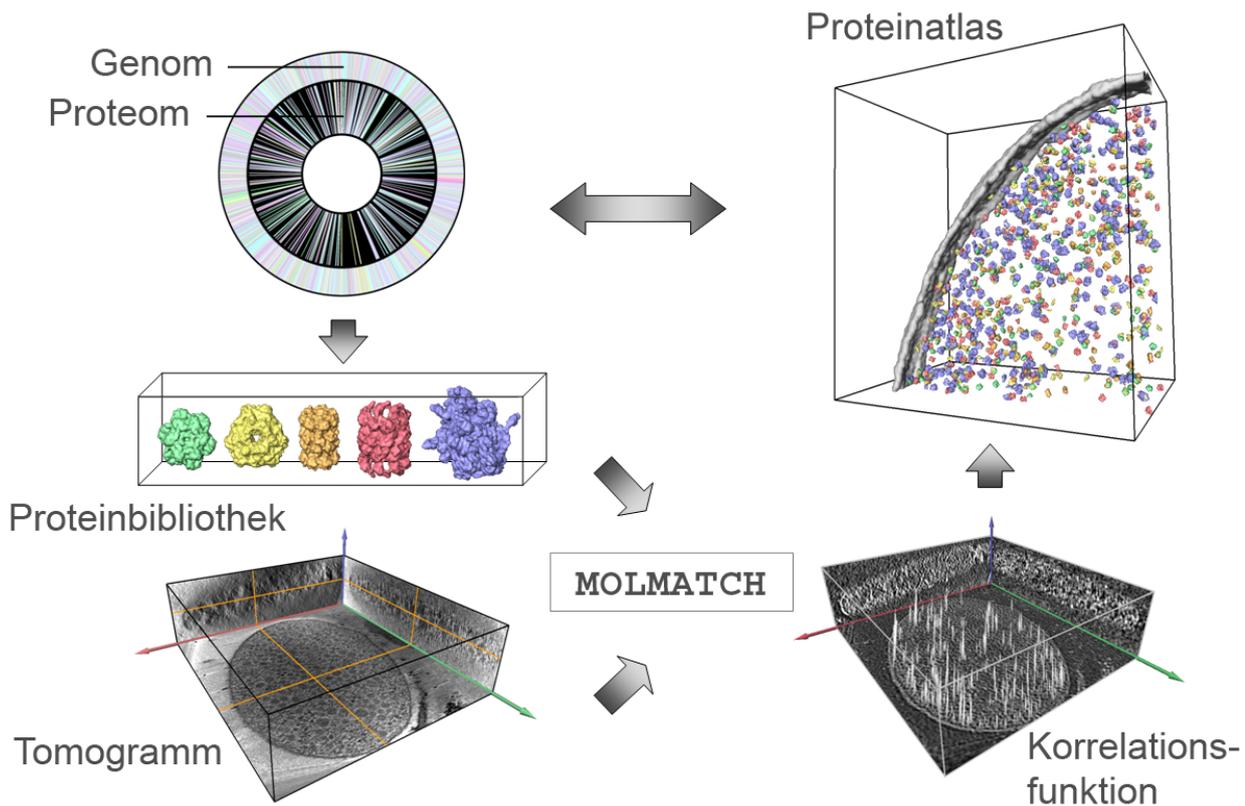


Abbildung 6.1: Von der Genomsequenz von *T. acidophilum* zum 3D Proteinatlas. Ausgangspunkt ist das sequenzierte Genom von *T. acidophilum* und die momentan bekannte Proteinausstattung. Die Proteombibliothek wird aus hochaufgelösten Strukturdaten generiert. Diese makromolekularen Proteinreferenzen sollen anhand ihrer strukturellen Signatur im Kryo-Elektronentomogramm einer eiseingebetteten Zelle wiedergefunden werden. Zur Detektion der Makromoleküle wird ein korrelationsbasierter Mustererkennungsalgorithmus, namens MOLMATCH, verwendet. Der Algorithmus liefert für jede Referenz ein Korrelationsvolumen, das die Ähnlichkeit und die Orientierung der verwendeten Referenz-Proteinstruktur zu der Dichteverteilung in der Zelle angibt. Aus der Höhe der Korrelationspeaks kann auf das Vorhandensein des Makromoleküls an der jeweiligen Position geschlossen werden. Als Ergebnis erhält man eine 3D makromolekulare Landkarte der ganzen Zelle, die dazu verwendet werden kann, die Interaktionen und die Konzentration der Proteinkomplexe untereinander zu analysieren - das zelluläre „Interaktom“ [Nickell *et al.* 2006].

darüber liefert, welche der verwendeten Referenzstrukturen am besten mit den unbekanntem Strukturen im Cytoplasma übereinstimmen.

Die Detektion von makromolekularen Proteinkomplexen in Kryo-Elektronentomogrammen von intakten Zellen birgt verschiedene Herausforderungen. Aufgrund der Strahlungsempfindlichkeit von vitrifizierten biologischen Proben werden die Kryo-Elektronentomogramme bei sehr niedriger Dosis aufgenommen. Dadurch besitzen Kryo-Elektronentomogramme ein sehr niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR). Zudem sind die Tomogramme durch den *Missing Wedge*-Effekt verzerrt, was zu einer anisotropen Auflösung führt. Zum Anderen ist das Cytoplasma von Prokaryoten sehr dicht gepackt, und in vielen Fällen berühren sich die Proteinkomplexe untereinander [Grünwald *et al.* 2003]. Diese hohe Protein-

konzentration, auch als *Macromolecular Crowding* bekannt, verringert den Kontrast. Abgesehen von leicht erkennbaren Strukturen wie Membranen oder filamentösen Strukturen ist es nur bedingt möglich, große Proteinkomplexe manuell zu detektieren und zu segmentieren [Medalia *et al.* 2002]. Die Schwierigkeit liegt darin, dass Partikel einer Spezies verschieden orientiert im Tomogramm vorliegen können und für den Betrachter nicht als gleich zu erkennen sind. Außerdem ist die manuelle Analyse subjektiv, kaum reproduzierbar und aufgrund der großen Datenmengen (ca. 1.6 Gigabyte für eine einfach gebinnte¹ Rekonstruktion) sehr zeitintensiv. Eine objektive Lokalisierung und Identifizierung von bekannten Makromolekülen in verrauschten Kryo-Elektronentomogrammen ist nur mit Hilfe von automatischen Mustererkennungsalgorithmen realisierbar. In Kryo-Elektronentomogrammen von „Phantomzellen“ (Liposomen, die mit bekannten Proteinkomplexen gefüllt sind) wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, mit einem korrelationsbasierten Algorithmus zwei Makromoleküle, das Thermosom und das 20S Proteasom, die strukturell ähnlich aufgebaut sind, im Tomogramm zu detektieren und zu unterscheiden [Böhm *et al.* 2000, Frangakis *et al.* 2002]. Phantomzellen stellen ein wohldefiniertes Modellsystem dar, das in Struktur und Größe kleinen prokaryotischen Zellen ähnelt, aber biochemisch genau definiert ist. Inzwischen wurde die korrelationsbasierte Mustererkennung erfolgreich auf intakte prokaryotische Zellen ausgeweitet. Mit dieser Methode ist erstmals gelungen 70S Ribosomen anhand ihrer strukturellen Signatur in Kryo-Elektronentomogrammen von *Spiroplasma melliferum*, zu detektieren und ihre 3D Verteilung in der Zelle zu visualisieren [Ortiz *et al.* 2006].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein korrelationsbasierter Algorithmus namens MOLMATCH² [Förster 2005] verwendet, um bekannte Makromoleküle im Cytoplasma von *T. acidophilum* anhand ihrer strukturellen Signatur zu kartographieren. Das Archaeon *T. acidophilum* konnte unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert werden (vgl. Kap. 3). Für die Tomographie und für die Mustererkennung einzelner Makromoleküle im zellulären Kontext waren *T. acidophilum*-Zellen, die bei anaeroben Bedingungen kultiviert wurden, besonders gut geeignet, da ihre Ausdehnung in Projektionsrichtung des Elektronenstrahls gering war (< 400 nm) und das Cytoplasma nicht so dicht gepackt war.

¹Binning: das Zusammenfassen von Pixeln

²MOLMATCH steht dabei für *molecule matcher*

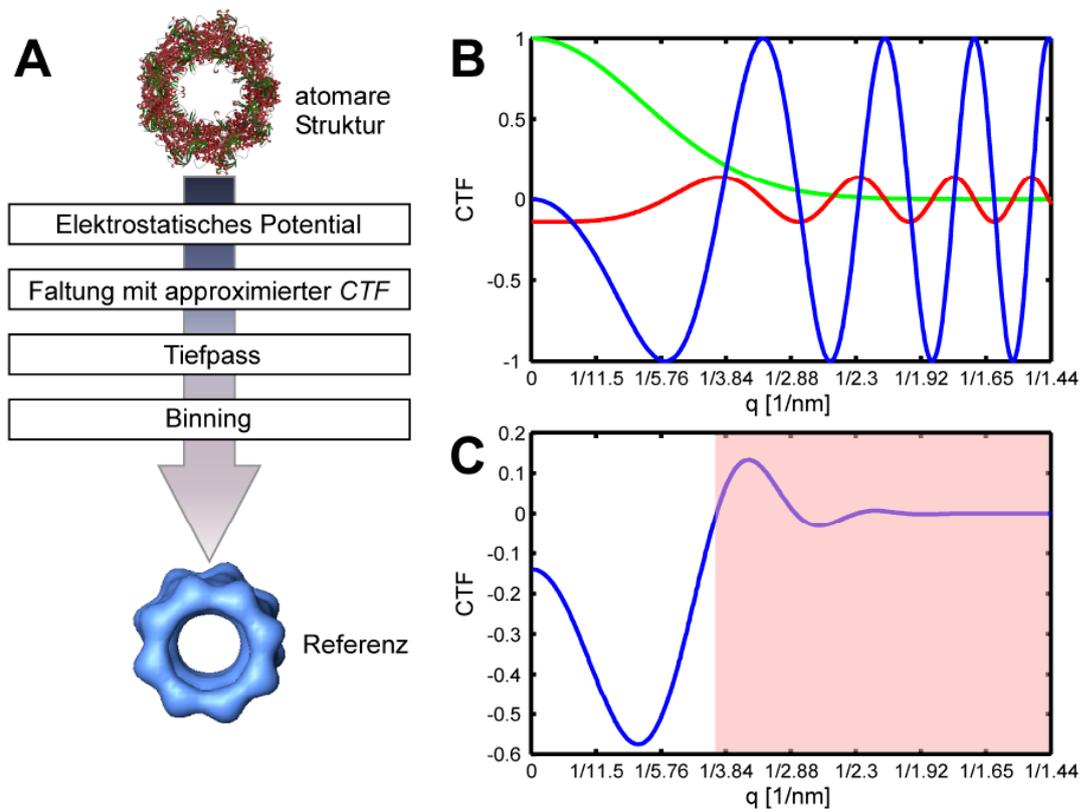


Abbildung 6.2: **A** Erzeugung einer Referenz für die Kryo-Elektronentomographie anhand atomarer Strukturdaten. **B** Funktionen, aus denen die effektive Kontrastübertragungsfunktion (CTF) zusammengesetzt ist: Phasenkontrasttransferfunktion (blau), Amplitudenkontrasttransferfunktion (rot) und die exponentiell abfallende Modulations-Transfer Funktion der CCD-Kamera (grün). Die Kurven wurden für einen Defokus von $8 \mu\text{m}$ berechnet. **C** Verlauf der effektiven CTF. Oberhalb der ersten Nullstelle, die bei einer Frequenz von $(4 \text{ nm})^{-1}$ liegt, wird die CTF abgeschnitten (rot schattiert) [Förster 2005].

6.2 Grundlagen der Mustererkennung

6.2.1 Erzeugung von Referenzen aus atomaren Strukturen

Der verwendete Mustererkennungsalgorithmus beruht auf einem korrelativen Vergleich einer bekannten Referenzstruktur mit unbekanntem Proteinstrukturen im zellulären Kontext von vitrifizierten Zellen. Mit einer momentanen Auflösung von 4 - 5 nm in der zellulären Kryo-Elektronentomographie können nur Proteinkomplexe, deren Molekulargewicht 400 kDa übersteigt, anhand ihrer strukturellen Signatur im Cytoplasma lokalisiert und identifiziert werden [Sali *et al.* 2003]. Für die Erzeugung von Referenzen, die mit den elektronentomographischen Daten korreliert werden, müssen die hoch aufgelösten Strukturdaten aus anderen Abbildungstechniken an den Abbildungsmechanismus und die Auflösung im EM approximiert werden. Die meisten 3D Strukturen biologischer Makromoleküle sind mit Hilfe der

Röntgenkristallographie aufgeklärt worden. Weitere Techniken zur Bestimmung atomarer Strukturen sind NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*) und Elektronenkristallographie. Alle genannten Techniken liefern atomar aufgelöste Strukturdaten der Proteine, die in der *Brookhaven protein data bank* (pdb, www.rcsb.org) archiviert sind. In den pdb-Dateien sind die Koordinaten und das Elementsymbol der Atome, aus denen der Proteinkomplex zusammensetzt ist, angegeben. Abb. 6.2 A veranschaulicht die Methode, mit der aus atomaren Strukturdaten die 3D elektronenmikroskopische Dichteverteilung bei einer Pixelgröße p approximiert wird. Die atomaren Koordinaten und Ordnungszahlen Z werden auf ein kartesisches Gitter mit einer Maschenweite p übertragen. Um Aliasing-Effekte zu vermeiden, wird ein zweites Gitter mit halb so großer Maschenweite über diese Daten gelegt, tiefpaßgefiltert und anschließend einfach gebinnt. Das approximierte elektrostatische Potential ist dann proportional zu der Summe der Ordnungszahlen, die in ein Voxel fallen, was der Näherung (2.7) aus Abschnitt 2.1.4 entspricht. Diese Näherung für das atomare Potential, welches die Elektronen erfahren würden, ist für die Kryo-Elektronentomographie gerechtfertigt, denn Proteine setzen sich vor allem aus leichten Elementen zusammen. Die so entstandene Dichteverteilung wurde mit einer effektiven Kontrastübertragungsfunktion (CTF) mit entsprechendem Defokus gefaltet, um der verwendeten abbildenden Elektronenoptik gerecht zu werden. Es wurde dabei angenommen, dass die MTF (Modulations-Transfer Funktion) der CCD-Kamera der dominierende Dämpfungsanteil der CTF ist (siehe Abb. 6.2 C).

6.2.2 Die *T. acidophilum*-Proteinbibliothek

T. acidophilum bietet sich als Modellsystem an, um mittels Kryo-Elektronentomographie und Mustererkennung die supramolekulare Architektur der Zelle zu untersuchen. Es sind bereits einige hochmolekulare Proteinstrukturen biochemisch und strukturebiologisch mit Hilfe von Einzelpartikel-Analyse oder Röntgenkristallographie charakterisiert und untersucht, darunter das 20S Proteasom [Dahlmann *et al.* 1992, Zwickl *et al.* 1992, Löwe *et al.* 1995], das archaeale p97/VCP-Homolog VAT [Pamnani *et al.* 1997][Rockel *et al.* 1999][Rockel *et al.* 2002], das Thermosom [Waldmann *et al.* 1995, Ditzel *et al.* 1998, Nitsch *et al.* 1998, Gutsche *et al.* 2000] und die Tricorn-Protease [Tamura *et al.* 1996, Walz *et al.* 1997, Brandstetter *et al.* 2001]. Mittels der *Free-Flow* Elektrophorese konnte ein weiterer hochmolekularer Komplex, die Ornithin Transcarbamoylase (OTCase), in *T. acidophilum* identifiziert werden (vgl. Abschnitt 5.4.3

und 5.4.4). Diese Strukturen können als Referenzen für die Mustererkennung verwendet werden.

Von besonderem Interesse für die Erstellung eines Proteinatlas sind diejenigen Proteine, die hochmolekulare Komplexe (MW > 400 kDa) bilden können. Mittels 2D Gelelektrophorese und Massenspektrometrie wurde das Proteom von *T. acidophilum* in flüssiger Kultur untersucht [Sun 2005]. Insgesamt wurden 272 cytosolische Proteine identifiziert, von denen 18 makromolekulare Komplexe bilden können. Mit dem zusätzlichen Wissen aus der Proteomanalyse kann die Proteinbibliothek mit homologen Strukturen aus anderen Organismen erweitert und ergänzt werden.

Die in Abb. 6.3 dargestellten Proteinkomplexe wurden als Referenzen für die Detektion dieser Strukturen innerhalb von Kryo-Elektronentomogrammen von intakten *T. acidophilum*-Zellen verwendet. Ihre Funktion und ihre Abmessungen werden nachfolgend kurz beschrieben.

Das 70S Ribosom, ein makromolekularer Riboprotein-Komplex, setzt sich aus zwei ribosomalen Untereinheiten, der kleinen (30S) und der großen Untereinheit (50S), zusammen. Seine Aufgabe besteht darin, aus der DNA über die Messenger-RNA (mRNA), Proteine zu synthetisieren. Die charakteristische Gestalt, ihre enorme Größe (das Molekulargewicht beträgt 2.5 MDa und der Durchmesser 23 nm) und die hohe interzelluläre Konzentration machen Ribosomen zu geeigneten Kandidaten, um sie *in vivo* zu kartographieren. Da es schwierig und aufwendig ist große Makromoleküle zu kristallisieren, wurde die erste 3D Struktur des Ribosoms aus *E. coli* zuerst mit der Einzelpartikel-Analyse aufgeklärt [Frank *et al.* 1995]. In den letzten Jahren konnten trotz aller technischen Schwierigkeiten die 50S Untereinheit aus dem Archaeobakterium *Haloarcula marismortui* [Ban *et al.* 2000] und die 30S Untereinheit aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus* [Wimberly *et al.* 2000, Schlutzen *et al.* 2000] kristallisiert werden. Die Kristallstruktur des 70S Ribosoms aus *T. thermophilus*, die gebundene mRNA und Transfer-RNA (tRNA) enthält, wurde im Jahr 2001 gelöst [Yusupov *et al.* 2001]. Da die Translationsmaschinerie evolutionär weitgehend konserviert ist, ist davon auszugehen, dass die Struktur der Ribosomen aus *T. acidophilum* im Auflösungsbereich von 4 nm hinreichend ähnlich zu der Struktur aus *T. thermophilus* ist.

Das Thermosom aus *T. acidophilum* ist ein molekulares Chaperon mit einem Molekulargewicht von ungefähr 930 kDa. Der Proteinkomplex setzt sich aus zwei identischen Ringen zusammen. Die beiden Ringe wiederum bestehen aus je vier α - und vier β -Untereinheiten (jeweils 60 kDa bzw. 58 kDa), die alternierend angeordnet sind. Die beiden 8-fach sym-

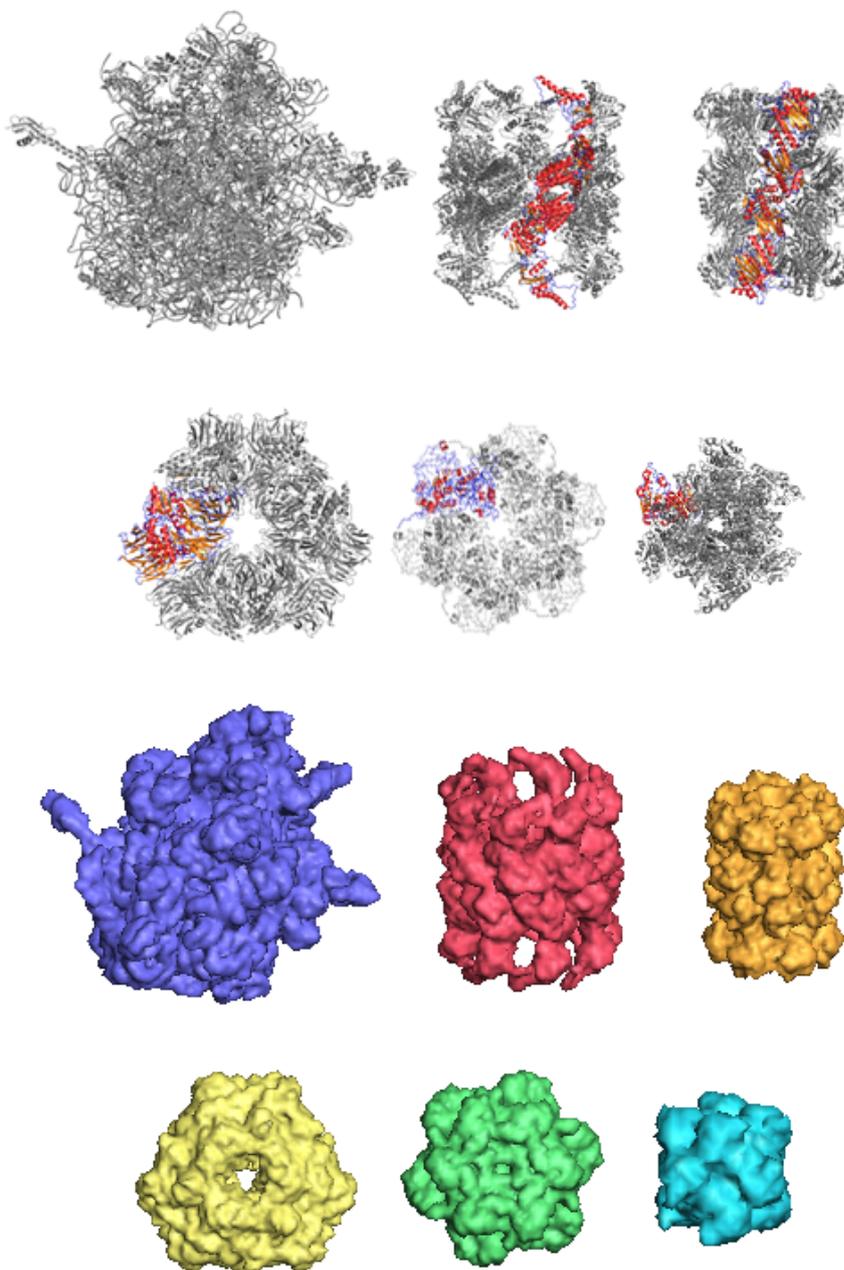


Abbildung 6.3: Strukturelle Proteinbibliothek von Makromolekülen aus kristallographischen Strukturdaten. In der oberen Hälfte sind die Proteinkomplexe in Bänderdarstellung abgebildet. Abgesehen von dem 70S Ribosom wurden einzelne oder mehrere (im Thermosom zwei und im Proteasom vier) Untereinheiten eingefärbt. Das Kohlenstoff-Rückgrat ist in blau, Helices sind in rot und Faltblätter sind in orange dargestellt. Die Bänderdarstellung der Proteine wurde mit dem Programm PyMOL (<http://www.pymol.org>) erstellt. Von links nach rechts 70S Ribosom, Thermosom, 20S Proteasom, Tricorn, p97 (homologe Struktur zu VAT) und OTCase. Die Dichteverteilung (untere Hälfte) wurde aus pdb-Dateien (vgl. Tab. 6.1) generiert und sind als Iso-Oberflächendarstellung mit etwa 3.41 Å Auflösung abgebildet.

metrischen Ringe umschließen je einen zentralen hydrophoben Bereich, in dem denaturierte oder ungefaltete Proteine entfaltet oder gefaltet werden können. Das Thermosom kann in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. In der „offenen“ Form hat das Thermosom die Gestalt eines Hohlzylinders mit einer Höhe von 16 nm und einem Durchmesser von 15 nm. Die apikalen Domänen weisen einen Anhang auf, der dazu dient, den Hohlraum zu verschließen [Ditzel *et al.* 1998]. Durch eine Drehung dieser Domänen kann der Hohlraum abgeschottet werden, und es bildet sich eine geschlossene, kugelförmige Konformation des Thermosoms aus [Schoehn *et al.* 2000]. Für die offene Konformation liegt bis jetzt noch keine hochaufgelöste Röntgenstruktur vor, da im Proteinkristall nur die völlig geschlossene Konformation beobachtet werden konnte [Ditzel *et al.* 1998]. Es sind jedoch Strukturdaten eines pseudoatomaren Modells zugänglich, die durch das Einpassen der Röntgenstruktur der geschlossenen Konformation in die elektronentomographische Dichteverteilung der offenen Konformation [Nitsch *et al.* 1998] entstanden sind.

Das 20S Proteasom aus *T. acidophilum* ist eine multikatalytische Protease von 720 kDa. Es kommt ubiquitär in allen drei Domänen des Lebens vor. In Eukaryoten bildet es in Kombination mit zwei regulatorischen 19S-Kappenkomplexen das 2.5 MDa große 26S Proteasom [Peters *et al.* 1993], welches das zentrale proteolytische Element des ATP-abhängigen Proteasom-Ubiquitin-Systems darstellt [Hochstrasser 1996]. Bei den Prokaryoten stellen im Cytosol lösliche Proteasen den einzig möglichen Weg des Proteinabbaus dar, da sie keine Lysosomen besitzen. In Eukaryoten ist Ubiquitin das Erkennungssignal für den selektiven proteasomalen Abbau von Substraten. Die durch wiederholte kovalente Anlagerung mit Ubiquitin markierten Substrate werden in Peptidfragmente mit einer Länge von 5 - 15 Aminosäuren gespalten. 20S Proteasomen haben eine zylinderförmige Gestalt mit einem Durchmesser von 11 nm und einer Höhe von 15 nm [Pühler *et al.* 1992]. Das Molekül wird aus vier aufeinander gestapelten Ringen gebildet und besitzt eine heptamere Rotationssymmetrie. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an 20S Proteasomen aus *T. acidophilum* haben gezeigt, dass die beiden polaren Ringe von jeweils sieben α -Untereinheiten (je 25.8 kDa) gebildet werden, während die äquatorialen Ringe aus je sieben β -Untereinheiten (je 22.3 kDa) bestehen [Grziwa *et al.* 1991]. Weitere wichtige Informationen zur Funktion und Struktur des Enzymkomplexes lieferte die Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *T. acidophilum* [Löwe *et al.* 1995]. Das 20S Proteasom wird von einem zentralen Kanal durchzogen, der sich an den Kontaktstellen der vier Ringe zu drei Kammern aufweitet. In der zentralen Kammer befinden sich die katalytischen Reste, welche die Proteine in Peptide abbauen. Aufgrund des 1.3 nm schmalen Eingangskanals können nur kurze Peptide

und entfaltete Proteine degradiert werden. Deshalb benötigt das 20S Proteasom die Zusammenarbeit mit weiteren Enzymen, die Substrate erkennen, binden und vielleicht sogar aktiv in das 20S Proteasom translozieren können. Wahrscheinlich ist jedoch die Assoziation vergleichsweise labil und hat dadurch bisher die Isolierung und biochemische Charakterisierung solcher Komplexe verhindert.

Die Tricorn-Protease aus *T. acidophilum*, ein weiteres Element der proteolytischen Abbaukette [Tamura *et al.* 1996], ist in der Lage Spaltprodukte, die vom 20S Proteasom stammen, in Di- bis Tetrapeptide zu hydrolysieren und sie dadurch Aminopeptidasen zugänglich zu machen [Tamura *et al.* 1998]. Freigesetzte Aminosäuren können vom Organismus wieder für anabole Prozesse verwendet werden. Die Struktur der Tricorn-Protease setzt sich aus sechs identischen Untereinheiten zusammen, welche jeweils ein Molekulargewicht von 121 kDa haben. Somit beträgt das Gesamtmolekulargewicht 730 kDa. Im Jahr 2001 wurde seine Kristallstruktur gelöst [Brandstetter *et al.* 2001]. Der Name Tricorn (*tricorne*, französisch für Dreispitz) leitet sich von der Form der Aufsicht des Komplexes in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ab. Der Durchmesser des Makromoleküls beträgt ungefähr 18 nm. *In vitro* wurde eine ikosaedrische Capsidstruktur, bestehend aus 20 hexameren Tricorn-Untereinheiten und einem Gesamtmolekulargewicht von 14.6 MDa, mit 55 nm Durchmesser beobachtet [Walz *et al.* 1997].

VAT (*valosine containing protein-like ATPase of Thermoplasma*) ist eine homoexamere AAA-ATPase³ vom Typ II. Die Monomere (87 kDa) sind aus drei Domänen aufgebaut: die substratbindende N-terminale Domäne sowie zwei ATPase-Domänen D1 und D2. Bei hoher Mg²⁺-Konzentration (120 mM) wird die ATPase-Aktivität gesteigert und VAT wird zu einer effizienten Entfaltungsmaschine [Golbik *et al.* 1999]. Bei niedrigen Mg²⁺-Konzentrationen (20 mM) entwickelt VAT eine Chaperonaktivität und begünstigt die Substratrückfaltung [Gerega *et al.* 2005]. VAT ist ein sternförmiges Molekül, das von einem schmalen Kanal durchzogen wird. Der Durchmesser, einschließlich der N-Domänen, bzw. der des Kernkomplexes beträgt 19 nm bzw. 13 nm und die Höhe des Moleküls misst 8 nm. Die Kristallstruktur von VAT ist noch nicht gelöst, aber es liegen Kryo-Elektronenmikroskopie-Daten mit einer Auflösung von 2.3 nm vor [Rockel *et al.* 2002]. Für das eukaryotische VAT-Homolog aus *Mus musculus*, p97/VCP (*valosine containing protein*), sind atomare Koordinaten aus der Röntgenkristallographie verfügbar [De La Barre und Brunger 2003]. In Eukaryoten übernehmen bestimmte Untereinheiten in den 19S Kappenkomplexen des 26S Proteasoms, die

³*ATPases associated with a variety of cellular activities*

aus mindestens 18 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind, die Aufgabe der Erkennung und der Bindung von polyubiquitinierten Proteinen. Darunter sind sechs Untereinheiten (Rpt1-Rpt6⁴), die homologe AAA-ATPasen sind, und wahrscheinlich einen hexameren Ring ausbilden [Glickman *et al.* 1998], der das Substrat entfaltet und es zur Öffnung des Kanals in 20S Proteasomen transloziert. In prokaryotischen Zellen existiert keine Erkennungs- und Entfaltungseinheit wie der 19S-Kappenkomplex. In vielen Archaeen-Genomen konnte jedoch ein Gen (S4), welches für ein Protein kodiert, das homolog zu den proteasomalen AAA-ATPasen ist, gefunden werden [Bult *et al.* 1996]. Das S4-Gen aus *Methanococcus jannaschii* kodiert für ein 50 kDa Protein, das zu einem 650 kDa ATPase-Komplex assembliert. Der als PAN (*proteasome activating nucleotidase*) bezeichnete Komplex kann Substrate entfalten und das 20S Proteasom aktivieren [Zwickl *et al.* 1999]. Hingegen konnte im Genom von *T. acidophilum* keine homologe Sequenz zu PAN gefunden werden, aber dafür zwei cytosolische AAA-ATPasen: VAT und VAT2/TAA43 [Ruepp *et al.* 2000]. Für das letztgenannte Protein konnte keine Proteasom-aktivierende Aktivität nachgewiesen werden [Santos *et al.* 2004]. Eventuell übernimmt VAT, das *in vitro* eine Entfaltungsaktivität aufweist [Gerega *et al.* 2005], die Rolle des Proteasomenaktivators in *T. acidophilum*.

Anabole Ornithin Transcarbamoylasen (OTCase) katalysieren die Carbamoylierung von Ornithin zu Citrullin. Die Übertragung der Carbamoylgruppe von Carbamoylphosphat auf Ornithin ist der sechste Schritt in der Arginin-Biosynthese bzw. die erste Reaktion im Harnstoffzyklus. Ornithin ist eine basische, nicht-proteinogene Aminosäure und Citrullin ist eine nicht-proteinogene α -Aminosäure. Katabole OTCasen katalysieren die Phosphorolyse von Citrullin, dabei wird Ornithin und Carbamoylphosphat gebildet. Die meisten anabolen OTCasen bilden Trimere von ungefähr 105 kDa. Ihre Aktivität gehorcht einer Michaelis-Menten Kinetik. Die katabole OTCase aus *Pseudomonas aeruginosa* bildet einen Tetraeder-förmigen Proteinkomplex, der aus vier identischen Trimeren aufgebaut ist, mit einem Gesamtmolekulargewicht von 456 kDa [Villeret *et al.* 1995]. Im Gegensatz zu anderen anabolen OTCasen bildet die OTCase aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* ein Dodecamer, das aus vier katalytischen Trimeren zusammengesetzt ist. Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde ihre 3D Struktur aufgeklärt [Villeret *et al.* 1998, Massant *et al.* 2003]. Im *T. acidophilum*-Genom kodiert das Gen *Ta1330* für ein Protein, das eine hohe Identität (87%) zu der OTCase aus *T. volcanium*, deren Struktur noch nicht aufgeklärt ist, besitzt. Mittels der FFE konnte die OTCase aus *T. acidophilum*-Zelllysat isoliert (vgl. Abschnitt 5.4.4) und im EM strukturell analysiert werden (vgl. Abb. 5.6 D). In die Proteinbibliothek wurde die Struktur

⁴*regulatory particle triple-A protein*

aus *P. furiosus* aufgenommen, da die Sequenzidentität zu der *T. acidophilum*-OTCase 55% beträgt (vgl. Abb. 5.9).

6.2.3 Mustererkennung mittels der lokal normierten Korrelationsfunktion

Die lokal normierte Korrelationsfunktion (*local correlation function, LCF*) bietet sich an, um kleine Referenzen in räumlich stärker ausgedehnten Umgebungen zu lokalisieren [Roseman 2000, Frangakis *et al.* 2002]. Ein analoges Problem liegt bei der 3D Lokalisierung von Makromolekülen mit einem Durchmesser von etwa 10 - 23 nm, in Kryo-Elektronentomogrammen von ganzen Zellen vor, deren Durchmesser typischer Weise 1 μm beträgt. Die *LCF* kann als modifizierte Form der Korrelationsfunktion verstanden werden. Der Korrelationskoeffizient (*correlation coefficient, CC*) ist ein quantitatives Maß für die Ähnlichkeit zweier Funktionen (2D oder 3D) bezüglich einer oder mehrerer unabhängiger Variablen. Bei der Mustererkennung in elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen werden die Grauwerte des Tomogramms T , die der gemessenen Intensität entsprechen, mit den generierten Grauwerten einer Referenz R miteinander verglichen. Für den normierten CC zweier diskreten Funktionen T und R , die sich beide über N Punkte erstrecken, gilt:

$$CC = \frac{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}} - \bar{T})(R_{\mathbf{r}} - \bar{R})}{\sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}} - \bar{T})^2} \sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (R_{\mathbf{r}} - \bar{R})^2}}. \quad (6.1)$$

Hierbei bezeichnen \bar{T} bzw. \bar{R} die Mittelwerte⁵ der beiden Funktionen. Die Werte des normierten CC liegen zwischen -1 und +1. Korrelieren die beiden Funktionen, ist der CC positiv. Erreicht der CC den Wert von 1, sind die beiden Funktionen an dieser Position identisch. Bei einem CC von Null sind die beiden Funktionen unabhängig. Die normierte Korrelationsfunktion $CC(\mathbf{x})$ berücksichtigt eine relative Verschiebung \mathbf{x} der beiden Funktionen zueinander:

$$CC(\mathbf{x}) = \frac{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}+\mathbf{x}} - \bar{T})(R_{\mathbf{r}} - \bar{R})}{\sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}} - \bar{T})^2} \sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (R_{\mathbf{r}} - \bar{R})^2}}. \quad (6.2)$$

Im Fourier-Raum lässt sich die Korrelationsfunktion besonders effektiv berechnen:

$$CC(\mathbf{x}) = \mathcal{F}^{-1}\{\mathcal{F}\{R_{\mathbf{r}}\}\mathcal{F}^*\{T_{\mathbf{r}}\}\}. \quad (6.3)$$

⁵Der Mittelwert einer diskreten Funktion ist durch $\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$ definiert.

Besonders effizient erweist sich die LCF für die Berechnung der Korrelation von Objekten, deren Ausdehnung sich stark unterscheidet ($N \gg M$). Die Korrelation wird in einem definierten Gebiet der Größe M durchgeführt. Bei der LCF wird die Funktion T lokal in dem durch eine binäre Maskenfunktion Θ definierten Gebiet der Größe M nichtlinear gefiltert:

$$LCF(\mathbf{x}) = \frac{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}+\mathbf{x}} - \bar{T}) \Theta_{\mathbf{r}+\mathbf{x}} (R_{\mathbf{r}} - \bar{R})}{\sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}} - \bar{T})^2 \Theta_{\mathbf{r}+\mathbf{x}}} \sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^M (R_{\mathbf{r}} - \bar{R})^2}}. \quad (6.4)$$

$$\Theta_{\mathbf{r}+\mathbf{x}} = \begin{cases} 1 & \text{für } (1, 1, 1) \leq \mathbf{r} + \mathbf{x} \leq \mathbf{M} \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}.$$

Die Größe der Maske sollte dabei der äußeren Form der Referenz angepasst sein. Durch die lokale Normierung der Korrelationsfunktion wird die Skalierung zwischen Referenz und der maskierten Region des Tomogramms optimiert. So werden die variierenden Kontrastverhältnisse im Tomogramm besser ausgeglichen, was zu einer verbesserten Detektionsqualität führt.

In der Bild- und Signalverarbeitung sind der Mittelwert und die Stärke des Signals meist willkürlich gewählt. Deshalb können die Grauwerte des Volumens der Referenz so normiert werden, dass der Mittelwert \bar{R} gleich Null ist und die Standardabweichung gleich eins ist. Dann vereinfacht sich Gl. 6.4 zu:

$$LCF(\mathbf{x}) = \frac{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N T_{\mathbf{r}+\mathbf{x}} \Theta_{\mathbf{r}+\mathbf{x}} R_{\mathbf{r}}}{\sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}} - \bar{T}_{\mathbf{r}})^2 \Theta_{\mathbf{r}+\mathbf{x}}}}. \quad (6.5)$$

Gl. 6.5 beschreibt die Berechnung der lokalen Korrelationsfunktion in Abhängigkeit von \mathbf{x} für eine bestimmte Orientierung der Referenz. Die Korrelationsfunktion eines 3D Objekts hängt aber nicht nur von der Ortsvariablen \mathbf{x} sondern auch von der räumlichen Orientierung der Referenz R ab. Diese kann durch die Eulerwinkel⁶ φ , ψ und ϑ beschrieben werden. Die LCF (6.5) lässt sich für orientierungsabhängige Referenzen schreiben als:

$$LCF(\mathbf{x}, \varphi, \psi, \vartheta) = \frac{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N T_{\mathbf{r}+\mathbf{x}} \Theta_{\mathbf{r}+\mathbf{x}, \varphi \psi \vartheta} R_{\mathbf{r}, \varphi \psi \vartheta}}{\sqrt{\sum_{\mathbf{r}=(1,1,1)}^N (T_{\mathbf{r}} - \bar{T}_{\mathbf{r}, \varphi \psi \vartheta})^2 \Theta_{\mathbf{r}+\mathbf{x}, \varphi \psi \vartheta}}}. \quad (6.6)$$

Durch die Wahl einer rotationssymmetrischen Maske Θ wird der Nenner in (6.6) rotationsinvariant, was die Rechenzeit erheblich verkürzt.

⁶In der vorliegenden Arbeit sind die drei Eulerwinkel ϑ , φ und ψ , für Nutation, Präzession und Eigenrotation nach der Nomenklatur des EM Programms definiert. Das Objekt wird um ψ um die eigene z-Achse gedreht, um ϑ um die eigene x-Achse und um φ um die eigene z-Achse.

Alle bisher diskutierten Korrelationsfunktionen haben den Einfluss des *Missing Wedges* nicht berücksichtigt. Eine von Friedrich Förster weiter entwickelte, lokal normierte Korrelationsfunktion beschränkt die Korrelation auf den experimentell zugänglichen Winkelbereich $\alpha_{min} - \alpha_{max}$. Dies wird durch Faltung der Referenz R mit der *Pointspread*-Funktion (*PSF*) des *Wedges* im Realraum erreicht [Förster 2005].

6.3 Material und Methoden

6.3.1 Elektronenmikroskopie und Bildverarbeitung

Kryo-Elektronentomographie von intakten Zellen

Die *T. acidophilum*-Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen bei 59°C kultiviert (vgl. Kap. 3.2.2). Die Kryo-Präparation erfolgte wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben. Die Daten wurden am CM 300 FEG TEM (Philips, Eindhoven, Niederlande) unter Niedrigdosisbedingungen aufgezeichnet und die Rekonstruktion der Kippserie wurde wie in Abschnitt 3.2.6 durchgeführt. Die Kippserie deckte einen Winkelbereich von $\alpha_{min} = -69^\circ$ bis $\alpha_{max} = +65^\circ$ in Schritten von $\Delta\alpha = 2.5^\circ$ ab. Für den nominellen Wert des Defokus der einzelnen Projektionen wurde 8 μm gewählt, damit ergibt sich die erste Nullstelle der CTF bei ca. $1/4 \text{ nm}^{-1}$. Die Pixelgröße auf Objektebene betrug 0.68 nm bei einer 44 000-fachen Vergrößerung. Die Kippserie setzte sich aus 68 Projektionen zusammen. Das Volumen wurde einfach gebinnt, bevor die Mustererkennung angewandt wurde, so dass ein Voxel etwa $(1.36 \text{ nm})^3$ entsprach. Dadurch wurde die Rechenzeit erheblich verkürzt. Alle 3D *Isosurface*-Darstellungen wurden mit dem Amira Software Paket (TGS) erstellt.

Automatische Partikellokalisierung im Tomogramm

Die Referenzen der unterschiedlichen makromolekularen Proteinkomplexe, die für die Korrelationsuche verwendet wurden, wurden aus pdb-Dateien (vgl. Tab. 6.1) generiert. Die Proteinstrukturen wurden auf eine Pixelgröße von 1.36 nm angepasst und auf eine Auflösung von 4 nm (erste Nullstelle der *CTF*) tiefpaßgefiltert. Das Tomogramm ($1024 \times 1024 \times 384$ Voxel) wurde unter Verwendung von MOLMATCH mit diesen Referenzen ($28 \times 28 \times 28$ Voxel) korreliert. Zusätzlich zur Referenz benötigte MOLMATCH jeweils ein Volumen mit einer kugelförmigen Maske und ein Volumen, das die *PSF* enthielt. Die beiden Volumina hatten die selben Abmessungen wie die Referenz. Der Durchmesser der Maske wurde so

Proteinkomplex	pdb	Funktion	Struktur	Organismus	Domäne	MW
70S Ribosom: 50S 30S	1yl3 1yl4	Protein-Biosynthese	asymmetrisch	<i>T. thermophilus</i>	Bacteria	2.5 MDA
Thermosom	1a6d	Chaperon	Hexadecamer	<i>T. acidophilum</i>	Archaea	930 kDa
Tricorn	1k32	Hydrolase	Homohexamer	<i>T. acidophilum</i>	Archaea	720 kDa
Proteasom	1pma	Protease	Tetradecamer	<i>T. acidophilum</i>	Archaea	720 kDa
VCP/p97: VAT- Homolog	1yqi	Transportprotein	Homohexamer	<i>M. musculus</i>	Eukaryota	500 kDa
OTCase	1pvv	Transferase	Dodecamer	<i>P. furiosus</i>	Archaea	420 kDa

Tabelle 6.1: Übersicht der verwendeten Referenzstrukturen. Die Strukturen der Proteinkomplexe wurden mittels Röntgenkristallographie gelöst. Die Bezeichnung des pdb-Eintrags ist in der zweiten Spalte angegeben.

gewählt, dass die Proteindichte vollständig umschlossen wird. Durch die sphärische Maske wurde die Rotation des Referenzpartikels erleichtert, jedoch vor allem die Partikelsuche deutlich beschleunigt. Die Referenz wird mit der sphärischen Maske multipliziert und mit dem Volumen, das die *PSF* beinhaltet, gefaltet. Falls die Partikel eine Rotations-symmetrie entlang einer Achse aufwies, wurde diese ausgenutzt, um die Rechenzeit zu verringern. Die Eulerwinkel wurden innerhalb des ganzen Winkelraums mit einem Winkelinkrement von 10° bzw. 30° abgetastet. Das Ergebnis der Mustererkennung waren zwei Volumina, von denen das erste die maximalen Korrelationswerte und das andere die dazugehörigen Orientierungen enthielt.

Die nachfolgende Bildverarbeitung und Analyse der Daten wurden in **MATLAB** (*The Math Works*, Natick, MA) mit dem TOM-Software-Paket [Nickell *et al.* 2005] durchgeführt. Die verwendeten Prozeduren des **av3 for TOM**-Paketes wurden von Friedrich Förster entwickelt [Förster 2005, Förster *et al.* 2005]. Um etwaige Treffer mit kontrastreichen Strukturen (wie z.B. Goldmarker) außerhalb der Zelle zu vermeiden, wurde das normalisierte Korrelationsvolumen mit einer binären Maske multipliziert, welche die Zelle innerhalb des Tomogramms grob begrenzte. Aus diesem begrenzten Volumen wurden die Maxima der *LCF* in absteigender Folge extrahiert. Nach jedem extrahierten *CC* wurde eine Maske über den Peak gelegt, um eine mehrfache Detektion des selben Partikels zu vermeiden. Die *CC*-Werte, die Koordinaten und die korrespondierenden Winkel wurden in einer Motivliste abgespeichert. Aus den 1000 höchsten Korrelationskoeffizienten wurden Histogramme erstellt, wobei die Korrelationswerte in insgesamt 25 äquidistante Bereiche zusammengefasst wurden (vgl. Abb. 6.6). Diese 1000 Treffer wurden in der 3D Rekonstruktion der ganzen Zelle dargestellt und jeder Peak visuell mit dem GUI (*graphic user interface*) `tom_chooser.m` inspiziert. Es wurde subjektiv entschieden, ob die gefundene Struktur im Tomogramm mit dem jeweiligen Template übereinstimmt.

3D Alignierung und Mittelung von Subtomogrammen

Subtomogramme der subjektiv selektierten Partikel ($56 \times 56 \times 56$ Voxel) wurden mit voller Auflösung rekonstruiert (0.68 nm Pixelgröße). Für die 3D Alignierung der Subtomogramme wurde die iterative Prozedur `av3_trans_rot_alig.m` verwendet, welche den *Missing Wedge*-Effekt der Partikel berücksichtigt. Als erste Referenz für die nachfolgende Alignierung der einzelnen Partikel wurde die Summe aus allen selektierten Partikel berechnet. Das gemittelte Partikel wurde mit einer sphärischen Maske versehen, die nicht mit der Struktur

korrelierten Teile umschließt. Die Alignierungsparameter (3 Eulerwinkel und 3 Translationsvektoren) der Partikel stammten aus MOLMATCH. Die Prozedur `av3_trans_rot_alig.m` rotierte die Referenz in die angenommene Orientierung des Einzelpartikels und gewichtete vor der Kreuzkorrelation mit einem künstlichen *Missing Wedge* bekannter Größe (Parameter aus der Datensammlung). Aufgrund der Intensität des Kreuzkorrelationspeaks konnte die Orientierung des Einzelpartikels optimiert werden, während die Position des Peaks Auskunft über die Auswanderung gab. Die Konvergenz dieses Algorithmus wurde mit der Prozedur `av3_motlanalyze.m` überprüft. Die Auflösung der Partikel wurde mit Fourier-Ring Korrelation (FRK) [Saxton und Baumeister 1982, van Heel *et al.* 1992] bestimmt. Dazu wurden die selektierten Partikel willkürlich in zwei Gruppen eingeteilt und aus den beiden Partikelsets wurden zwei getrennte Mittelungen der Partikel berechnet. Dann wurde die radiale Korrelationsfunktion für 14 Schalen im Fourier-Raum berechnet (vgl. Abb. 6.7). Als Auflösungskriterium wurde der Wert bei einem Fourier-Ring Korrelationskoeffizienten (FRKK) von 0.5 angenommen. Die Daten wurden nicht CTF-korrigiert, da aufgrund des geringen SNR in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen die CTF nicht genau bestimmt werden kann.

6.4 Ergebnisse und Diskussion

6.4.1 Mustererkennung in *T. acidophilum*

In zahlreichen Kryo-Elektronentomogrammen, die von *T. acidophilum* aufgenommen wurden, war die Ausdehnung der Zellen in Strahlrichtung größer als 1 Mikrometer und das Cytoplasma erschien sehr dicht gepackt. Demzufolge war das SNR der 3D Rekonstruktion sehr niedrig und es war nicht möglich die korrelationsbasierte Mustererkennung in solchen Tomogrammen anzuwenden. Deshalb wurde versucht *T. acidophilum* bei Bedingungen zu kultivieren, bei denen die Zellen etwas flacher wuchsen und das Cytoplasma weniger dicht gepackt war. Die Kultivierung bei anaeroben Wachstumsbedingungen unter Überdruck (vgl. Abschnitt 3.2.2) erwies sich für die tomographische Datenaufzeichnung und die nachfolgende automatisierte Mustererkennung am geeignetsten. In Abb. 6.4 ist eine Serie von x-y-Schnitten durch die 3D Rekonstruktion einer derart kultivierten *T. acidophilum*-Zelle dargestellt. Die maximale räumliche Ausdehnung der Zelle in der x-y-Ebene beträgt ca. $1340 \text{ nm} \times 950 \text{ nm}$, in z-Richtung hat sie eine Dicke von nur ca. 200 nm . Nähert man die Zelle durch ein Ellipsoid an, umfasst sie ein Volumen von ungefähr $0.127 \mu\text{m}^3$. In der tomographischen Rekonstruktion von *T. acidophilum* stellen die Plasmamembran und globuläre Strukturen ($30 \text{ nm} - 75 \text{ nm}$), die gehäuft bei anaeroben Bedingungen unter Überdruck auftreten, die markantesten Strukturen dar (Abb. 6.4). Neben den globulären Partikel lassen sich aber noch andere Strukturen mit hohem Kontrast und kleinerer Abmessung ($\sim 20 \text{ nm}$) erkennen (Abb. 6.5 A). Bei diesen Strukturen handelt es sich sehr wahrscheinlich um Ribosomen, die aufgrund des hohen RNA-Anteils eine höhere Dichte ($\sim 1.6 \text{ g/cm}^3$) als Proteine ($\sim 1.3 \text{ g/cm}^3$) haben.

Mit Hilfe des Mustererkennungsalgorithmus MOLMATCH wurde die 3D Rekonstruktion dieser Zelle nach insgesamt sechs verschiedenen Proteinkomplexen abgesucht. Als Referenzen für die strukturbasierte Korrelationssuche wurden das 70S Ribosom, das Thermosom, das Tricorn, das 20S Proteasom, das VAT-Homolog (VCP/p97) und die OTCase verwendet. Die röntgenkristallographischen Strukturdaten für das Thermosom, das Tricorn und das 20S Proteasom stammen aus *T. acidophilum*. Für die anderen Proteinkomplexe wurden Strukturen sequenzhomologer Proteine aus anderen Organismen verwendet (vgl. Tab. 6.1). Es ist davon auszugehen, dass die generierten Referenzen im Auflösungsbereich von $\sim 4 \text{ nm}$ den Proteinkomplexen in *T. acidophilum* hinreichend ähnlich sind. Die Referenzen, die aus der *Brookhaven protein data bank* stammen, wurden auf die entsprechende Vergrößerung skaliert

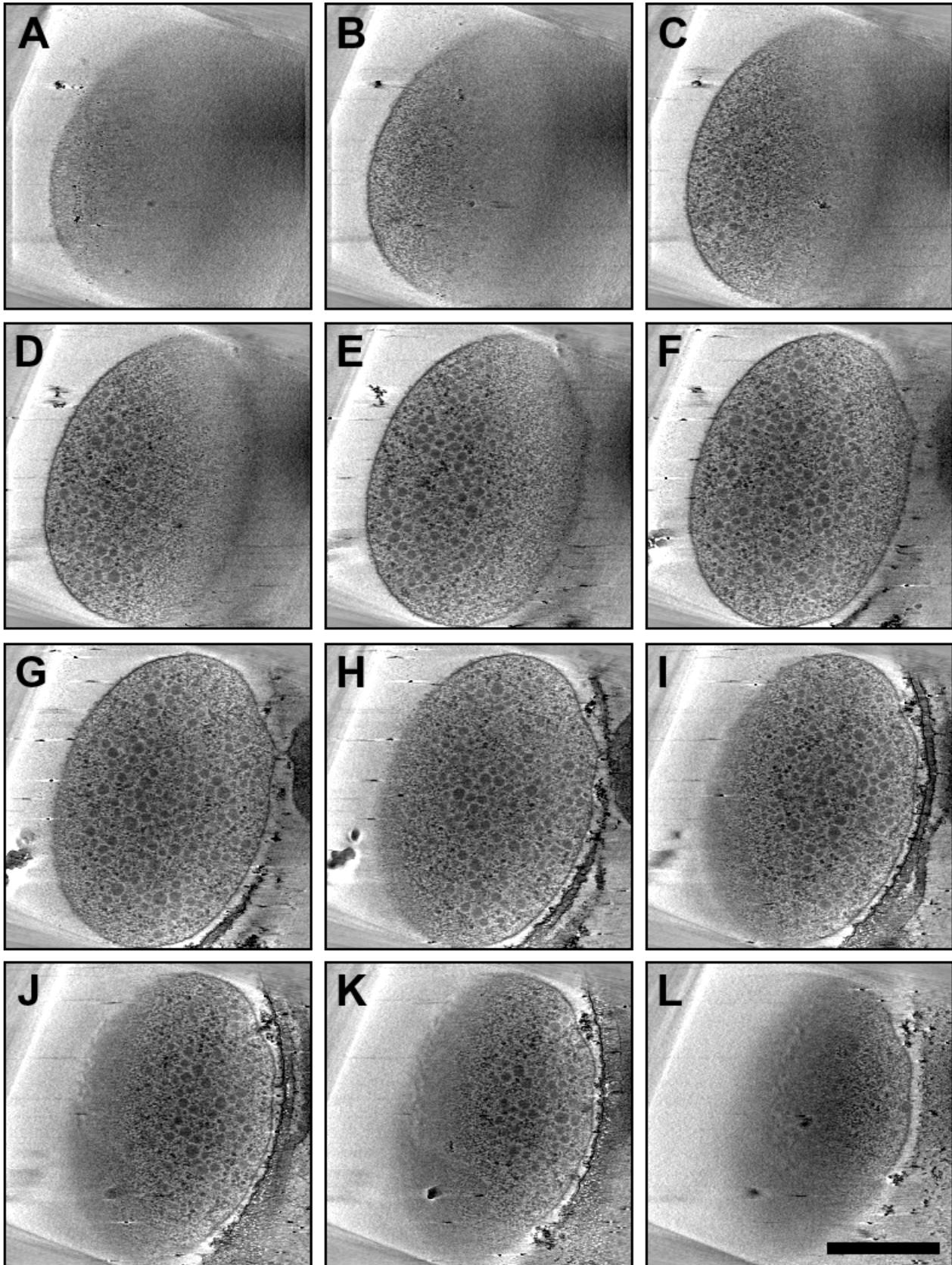


Abbildung 6.4: X-y-Schnitte aus dem rekonstruierten Volumen einer *T. acidophilum* Zelle, die unter anaeroben Bedingungen und Überdruck kultiviert wurde. Die einzelnen Schnitte sind 5.4 nm dick und haben einen relativen Abstand von 21 nm zueinander. Deutlich zu erkennen sind die Plasmamembran und globuläre Strukturen im Cytoplasma. Der Balken korrespondiert zu 500 nm.

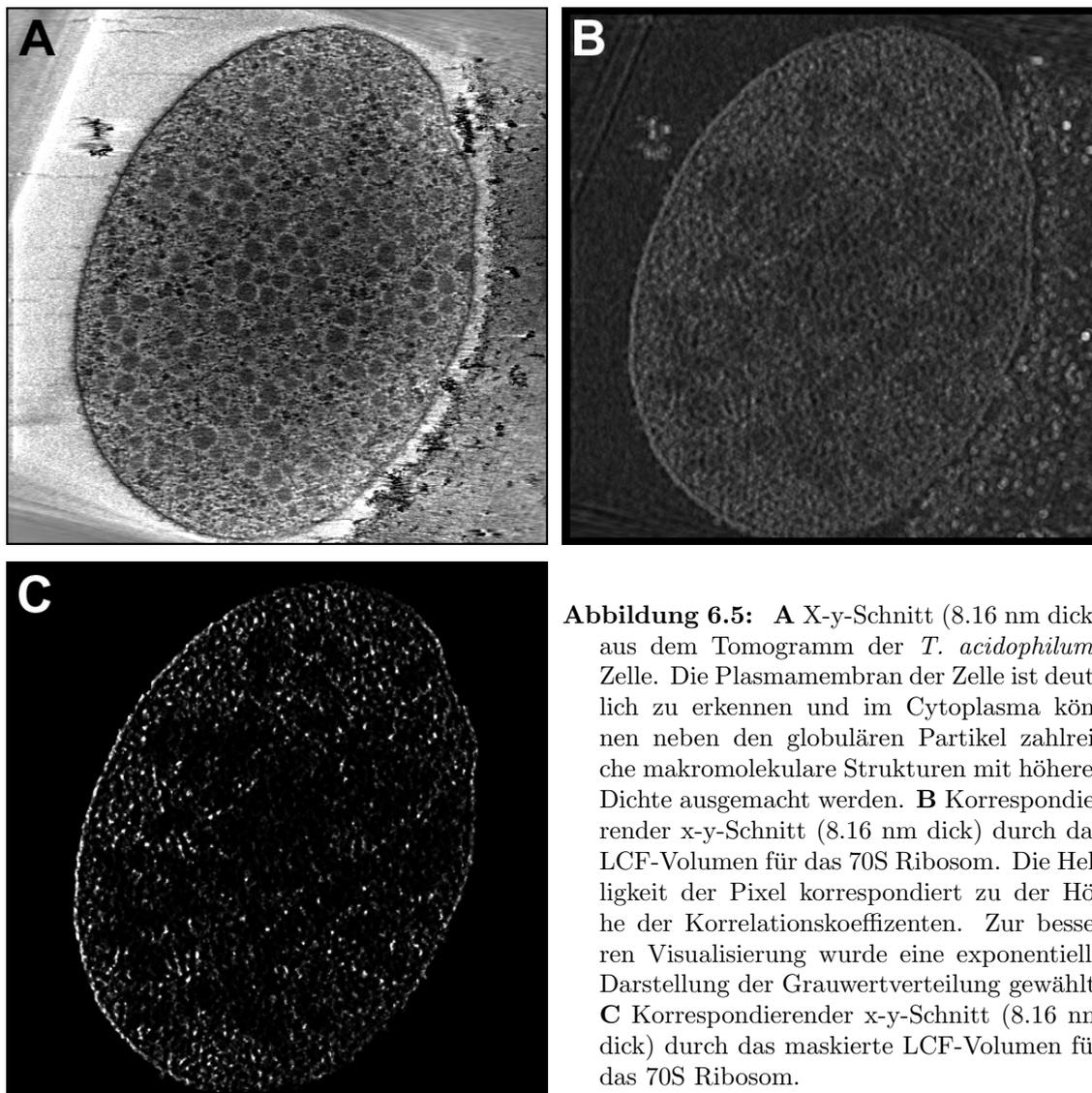


Abbildung 6.5: **A** X-y-Schnitt (8.16 nm dick) aus dem Tomogramm der *T. acidophilum*-Zelle. Die Plasmamembran der Zelle ist deutlich zu erkennen und im Cytoplasma können neben den globulären Partikel zahlreiche makromolekulare Strukturen mit höherer Dichte ausgemacht werden. **B** Korrespondierender x-y-Schnitt (8.16 nm dick) durch das LCF-Volumen für das 70S Ribosom. Die Helligkeit der Pixel korrespondiert zu der Höhe der Korrelationskoeffizienten. Zur besseren Visualisierung wurde eine exponentielle Darstellung der Grauwertverteilung gewählt. **C** Korrespondierender x-y-Schnitt (8.16 nm dick) durch das maskierte LCF-Volumen für das 70S Ribosom.

und auf die Auflösung im Tomogramm gefiltert (vgl. Abschnitt 6.3.1).

6.4.2 Identifikation makromolekularer Proteinkomplexe im zellulären Kontext

Zur Identifikation der oben genannten Proteinkomplexe wurde die *LCF* mit dem Tomogramm und der jeweiligen Referenz berechnet (vgl. Abschnitt 6.3.1). Unabhängig von der verwendeten Referenzstruktur wiesen die Goldmarker, aufgrund ihrer hohen Dichte und ihrer ähnlichen Größe (~ 10 nm), die höchsten Korrelationskoeffizienten auf (vgl. Abb. 6.5 **B**). Aus diesem Grund wurde die Zelle manuell maskiert (vgl. Abb. 6.5 **C**). Aus dem begrenzten Volumen wurden die ersten 1000 (empirisch festgelegt) höchsten Werte der *LCF* extrahiert. Die verwendete Maske schloss aber nicht alle Goldmarker aus, da diese zum Teil in unmittel-

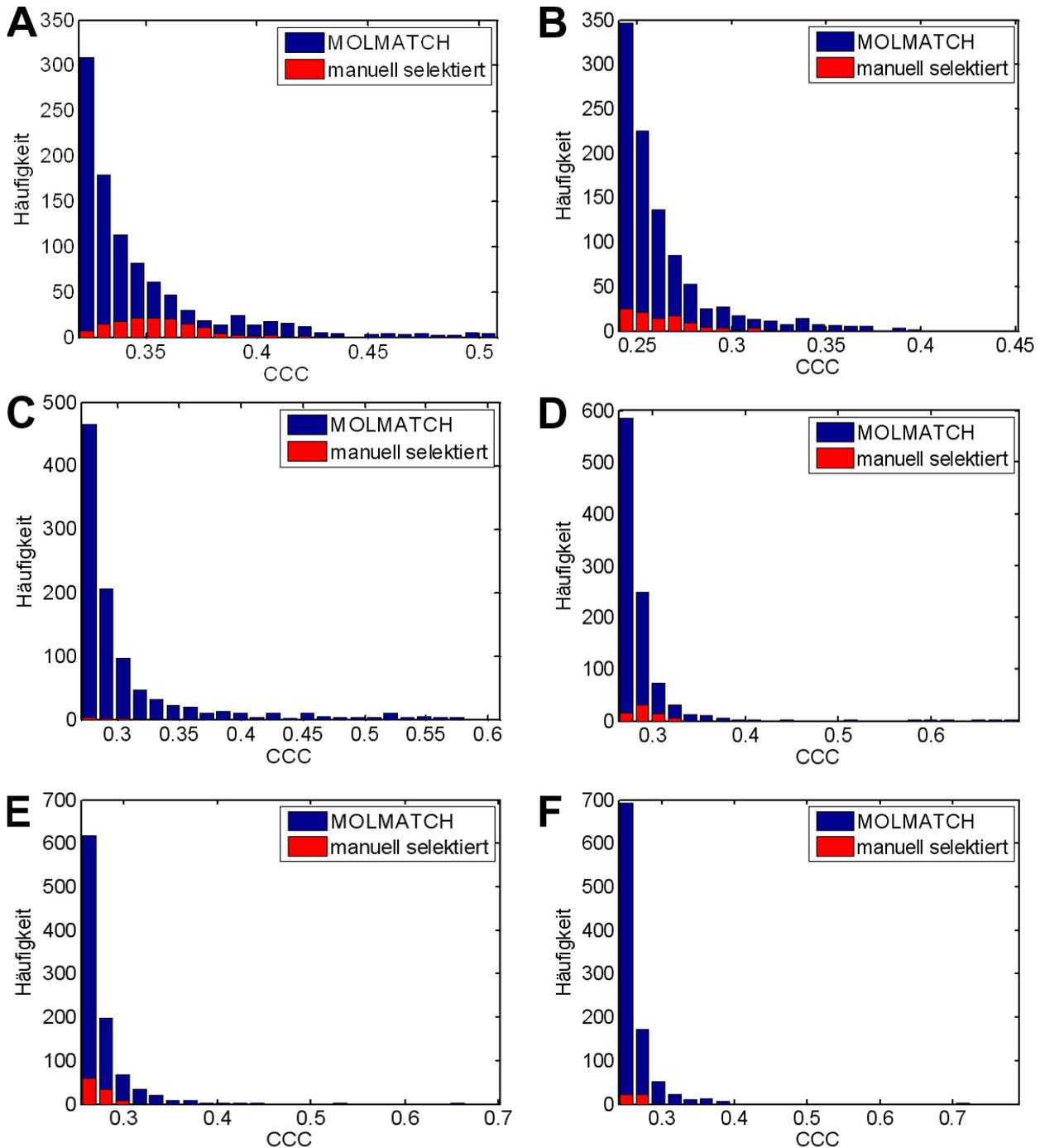


Abbildung 6.6: Histogramme der höchsten 1000 Korrelationskoeffizienten (CCC) aus MOLMATCH (blaue Balken) für das 70S Ribosom (A), das Thermosom (B), das Tricorn (C), das 20S Proteasom (D), das VAT-Homolog (VCP/p97) (E) und die OTCase (F). Es sind die Häufigkeiten gegen die korrespondierenden CCC aufgetragen. In rot sind die CCC der manuell selektierten Partikel dargestellt.

telbarer Nähe der Membran lokalisiert waren. Deshalb war es nötig die 1000 extrahierten Korrelationsmaxima subjektiv zu inspizieren und manuell zu selektieren. Abgesehen von den Goldmarkern wurden noch weitere Partikel als Falsch-Positive aussortiert. In Abb. 6.6 sind die Korrelationskoeffizienten für die unterschiedlichen Proteinkomplexe als Histogramm aufgetragen. In blau ist die Verteilung der größten 1000 Korrelationskoeffizienten mit den höchsten Intensitäten und in rot ist die Distribution der Korrelationskoeffizienten von den manuell selektierten Partikel dargestellt. Insgesamt wurden von den 1000 größten Korrelationskoeffizienten, die bei der Korrelation mit der Ribosom-Referenz erzielt wurden, lediglich 141 als mutmaßliche Ribosomen selektiert. Unter der Annahme, dass jedes einzelne 70S Ribosom ein Volumen von 3400 nm^3 einnimmt [Zhu *et al.* 1997], besetzen die 141 detektierten Ribosomen nur 0.4% des zellulären Volumens. Die anderen Proteinkomplexe kommen weniger häufig vor. Das Tricorn liegt in besonders geringer Kopienzahl vor (vgl. Abb. 6.8). Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Analyse von 2D Gelen, in denen das Tricorn als ein *Low Abundant*-Protein eingeordnet wurde [Sun 2005]. Die Korrelation des Tomogramms mit dem 70S Ribosom ergibt besonders hohe Werte an distinkten Positionen im Cytoplasma, die zu den dichten globulären Strukturen im Tomogramm korrespondieren (vgl. Abb. 6.5 A und C). Es treten jedoch auch hohe Korrelationswerte innerhalb der Plasmamembran auf (vgl. Abb. 6.5 B).

6.4.3 Einzelpartikel-Analyse der detektierten Partikel

Um die Qualität der vorangegangenen Detektion zu beurteilen, war es nötig eine Einzelpartikel-Analyse durchzuführen. Die im Tomogramm detektierten Proteinkomplexe wurden jeweils in voller Auflösung rekonstruiert, 3D aligniert und gemittelt (vgl. Abschnitt 6.3.1).

Die so durchgeführte Alignierung und Mittelung der Partikel aus dem Tomogramm ergab für die gemittelte Struktur der Ribosomen als ein Beispiel eine Auflösung von 4.8 nm. Als Auflösungskriterium wurde der Wert bei einem Fourier-Ring Korrelationskoeffizienten (FRKK) von 0.5 angenommen (vgl. Abb. 6.7 A). Die Struktur des Ribosoms ist isotrop abgetastet, da sich die Orientierungen der detektierten Partikel über den ganzen Winkelbereich verteilen (vgl. Abb. 6.7 B).

Abbildung 6.8 zeigt die Oberflächendarstellung der verwendeten Referenzen, die Mittelung der Strukturen und deren Überlagerung. Eine gute Übereinstimmung mit der verwendeten Referenz zeigen die gemittelten Strukturen des Ribosoms, des Proteasoms und von VAT.

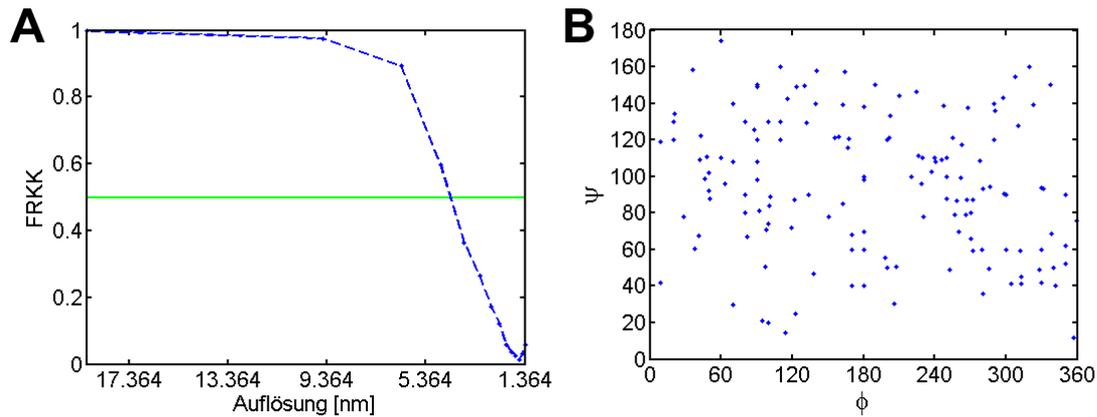


Abbildung 6.7: Bestimmung der Auflösung und Orientierung der Ribosomen im Tomogramm. **A** Auflösungstest durch Fourier-Ring Korrelation (FRK) für das in Abb. 6.8 gezeigte Ribosom. Die Fourier-Ring Korrelationskoeffizienten (FRKK) von zwei unabhängigen Mittelungen der Ribosomen aus je 50% der Partikel als Funktion der Auflösung. Als Kriterium für die Auflösung wurde der erstmalige Abfall des FRKK unter den Wert von 0.5 (grüne Linie) verwendet. Es ergibt sich eine Auflösung von 4.8 nm. **B** Auftragung des Eulerwinkels ψ gegen den Eulerwinkel θ . Die Orientierungen der Ribosomen verteilen sich über den ganzen Winkelbereich. Die gesamte Struktur ist deshalb isotrop abgetastet und unabhängig vom *Missing Wedge*-Effekt.

Die gemittelte Struktur des Thermosoms gibt nur den zentralen Bereich der Referenz wieder, die apikalen Domänen des Chaperons sind nicht vorhanden oder aufgelöst. Das Thermosom kann unterschiedliche Konformationen einnehmen, eine offene und eine geschlossene [Schoehn *et al.* 2000]. Es könnte durchaus der Fall sein, dass in der Zelle Thermosomen gehäuft in der geschlossenen Konformation vorkommen. Diese würde die Abweichung zwischen der Referenzstruktur und der Mittelung erklären. Die aus lediglich 10 Partikel gemittelte Struktur des Tricornis zeigt die größte Abweichung von der verwendeten Referenzstruktur.

6.4.4 Proteinatlas von *T. acidophilum*

Für die Visualisierung der Proteinkomplexe innerhalb der Zelle wurden an den Positionen der detektierten Partikel die jeweilige Referenzstruktur, die für die Korrelation verwendet wurde, mit der entsprechenden Orientierung aus der Mustererkennung gesetzt. Durch die Überlagerung von Proteinatlanten unterschiedlicher Proteinspezies konnte die räumliche Beziehung von ausgewählten Proteinkomplexen dargestellt und analysiert werden. Es ist wegen ihrer engen Beziehung im zellulären Stoffwechsel, möglich dass einige dieser makromolekularen Proteinkomplexe zusammenarbeiten und daher räumlich nah lokalisiert sind. In Abb. 6.9 **A** ist die spatiale Verteilung der 70S Ribosomen (lila) und der Thermosomen (rot) überlagert. Die einzelnen Ribosomen sind nicht homogen über das Cytoplasma verteilt, sondern hauptsächlich in der Nähe der Membran lokalisiert. Die räumliche Anordnung des 20S Pro-

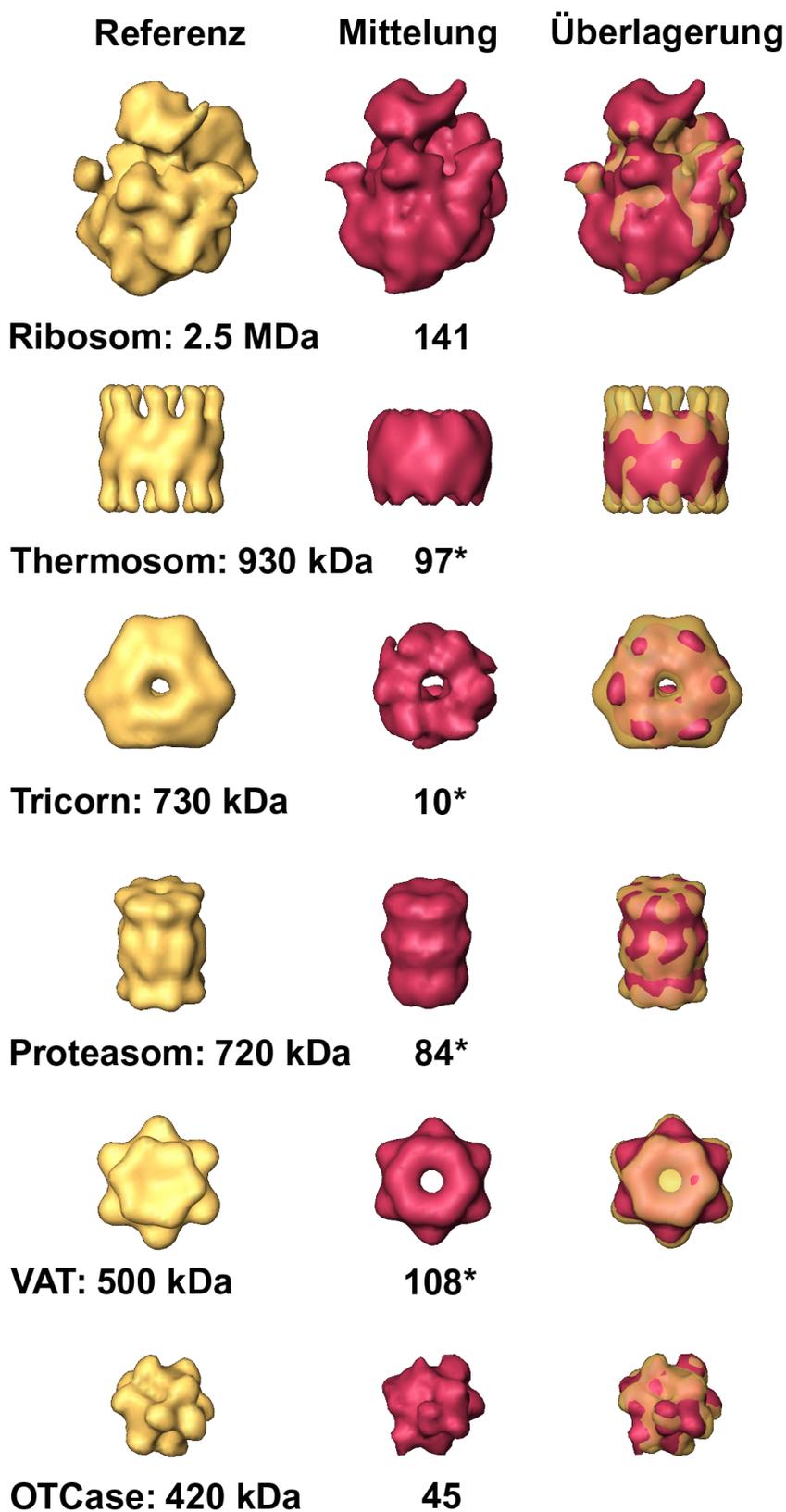


Abbildung 6.8: Übersicht der verwendeten Referenzen (erste Reihe) und die gemittelten Strukturen (mittlere Reihe). In der rechten Spalte ist die Überlagerung der beiden Strukturen dargestellt. Die Nummern geben die Anzahl der detektierten Partikel im Tomogramm an. Mit einem Stern gekennzeichnete Partikel wurden symmetrisiert.

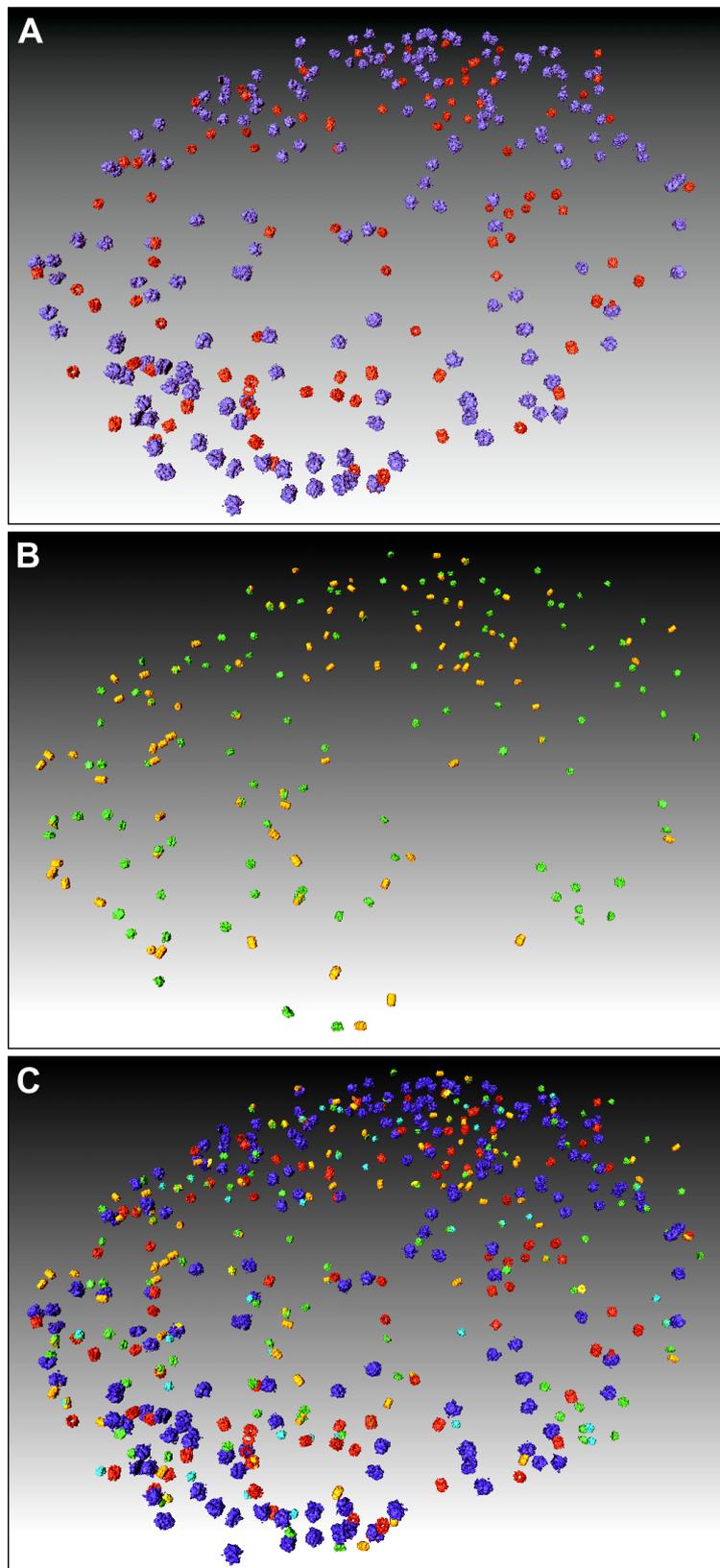


Abbildung 6.9: **A** Räumliche Verteilung der detektierten 70S Ribosomen (lila) und der Thermosomen (rot) innerhalb der Zelle. **B** Räumliche Anordnung der 20S Proteasomen (orange) und von VAT (grün) innerhalb der Zelle. **C** Makromolekularer Atlas, der sich aus sechs Proteinkomplexen zusammensetzt.

teasoms (orange) und von VAT (grün) ist in Abb. 6.9 **B** dargestellt. In Abb. 6.9 **C** ist ein makromolekularer Atlas von *T. acidophilum*, der sich aus insgesamt sechs Proteinkomplexen zusammensetzt, dargestellt. Sobald neue hochmolekulare Proteinkomplexe aus *T. acidophilum* entdeckt werden, können diese mit dem Tomogramm korreliert werden, und der Atlas kann um diese neuen Struktur erweitert werden.

Ob es sich bei den detektierten Objekten tatsächlich um die verwendeten Referenzstrukturen handelt ist nicht ganz sicher. Für eine eindeutige Aussage wäre zusätzlich eine spezifische Markierung der Proteine, z.B. mit goldkonjugierten Antikörpern, notwendig. Ein solches Vorgehen birgt jedoch mehrere Schwierigkeiten. Falls die Zellen nicht fähig sind das Goldlabel zu endozytieren, muss die Zellmembran permeabel gemacht werden, was im schlimmsten Fall mit einer Zerstörung der Zellarchitektur verbunden wäre. Außerdem können höchstens zwei bis drei unterschiedliche Makromoleküle durch Goldpartikel mit verschiedenem Durchmesser markiert werden, was nur einen verschwindend kleinen Bruchteil des gesamten Proteoms ausmacht.

Die Effizienz des Immunlabelings beträgt weniger als 100 Prozent. In Anbetracht dessen, und weil die Abstände zwischen den einzelnen Proteinen sehr gering sind, ist eine eindeutige Identifikation im zellulären Kontext mit der Immunomarkierung nicht realisierbar.

7. Ausblick

Zur Erzeugung eines 3D Proteinatlas auf makromolekularer Ebene ist es notwendig, Proteinkomplexe in ihrer nativen Umgebung - nicht-invasiv - zu studieren. Bei einer momentan erreichbaren Auflösung von 4 - 5 nm in Kryo-Elektronentomogrammen ist es möglich, große supramolekulare Strukturen ab etwa 400 kDa zu identifizieren und kartographieren [Sali *et al.* 2003]. Um in Zukunft zunehmend kleinere Proteinkomplexe in Zellen oder anderen biologischen Systemen zuverlässig detektieren zu können, ist vor allem eine Verbesserung der Auflösung in zellulären Tomogrammen unabdingbar.

Dies kann auf der technischen Seite durch die Verwendung von verbesserten CCD-Kameras (wie z.B. Linsen-gekoppelte Kameras) zur Aufzeichnung von Kippserien erreicht werden [Gubbens *et al.* 1995, Fan und Ellisman 2000]. Alternativ zu den herkömmlichen CCD-Kameras können auch Detektoren basierend auf CMOS-Systemen (*complementary metal oxide semiconductor*) für die direkte Signalübertragung eingesetzt werden [Faruqi und Cattermole 2005, Milazzo *et al.* 2005]. Die direkte Detektion der Elektronen führt dabei zur einer verbesserten Rauschstatistik und einer besseren Ortsauflösung. Dadurch kann das Signal zu Rausch-Verhältnis in elektronenmikroskopischen Aufnahmen unter Kryo-Bedingungen erhöht werden, was den Einsatz einer CTF-Korrektur ermöglichen würde [Winkler und Taylor 2003, Fernandez *et al.* 2006]. Die Verwendung einer CTF-Korrektur, sowie die Aufnahme von Tomogrammen bei geringeren Defokuswerten und die Berücksichtigung des kippwinkelabhängigen Fokusgradienten könnte die Auflösung von Kryo-Elektronentomogrammen in der Zukunft ebenfalls noch weiter steigern.

Ein signifikanter Teil der Information in der Rekonstruktion geht verloren, weil die Datenaufnahme nur in einem begrenzten Winkelbereich vorgenommen werden kann (*Missing Wedge*-Effekt). Grund dafür ist die bauartbedingte Limitierung des Kippwinkelbereichs, sowohl bei Einachsenkipphaltern als auch bei Drehkipphaltern. Durch den Einsatz eines Drehkipphalters, kann das Präparat an der selben Stelle um eine zweite Achse, senkrecht zur ersten Kippachse, gekippt werden, was zu einer Erhöhung des erreichba-

ren Informationsgehalts führt [Penczek *et al.* 1995]. Die fehlende Information im Fourier-Raum verringert sich von einem Keil (bei der Einachsenkipfung) zu einer Pyramide (*Missing Pyramid*). Dadurch können Strukturdetails in Ebenen, die senkrecht zur Kippachse liegen, besser visualisiert werden. Folglich führt dies zu einer Verbesserung der kreuzkorrelationsbasierten Mustererkennung der Makromoleküle. Zur zuverlässigen Identifikation von detektierten Partikel wäre der Einsatz einer 3D Klassifikation, die auf *Principal Component Analysis* [van Heel und Frank 1981, Frank 1990] oder *Maximum Likelihood* [Sigworth 1998, Scheres *et al.* 2005] basiert, notwendig.

Eine Verbesserung der Auflösung in zellulären Tomogrammen von *T. acidophilum* als auch der Einzelpartikelstrukturen in den Tomogrammen hängt auch von biologischen Parametern ab. Dabei ist die Optimierung der Bedingungen für die Zellkultur essentiell. Die Kulturbedingungen sollten so gewählt werden, dass die Zellen einerseits vital und andererseits geeignet für die Tomographie sind. Im weiteren wäre das Studium von verschiedenen Entwicklungsstadien der Zelle und der zugehörigen Proteinzusammensetzung und Proteinverteilung von Interesse. Hierzu wäre die Synchronisation der Zellkultur notwendig, damit alle Zellen im gleichen biologischen genau definierten Zustand vorliegen.

Zusammengenommen könnten diese technischen und präparativen Verbesserungen zu einer nominellen Auflösung von 2 - 3 nm führen. Diese Auflösung würde ausreichen, um Proteinkomplexe eindeutig anhand ihrer strukturellen Signatur zu identifizieren und ihre Rolle im zellulären Kontext einzuordnen. In Kombination mit anderen molekularbiologischen Studien könnte die Elektronentomographie an *T. acidophilum*-Zellen ein wertvolles Instrument zur Entschlüsselung von Proteinnetzwerken liefern, was durch *in vitro*-Studien nicht realisierbar ist.

Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
2DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
A22	S-(3,4-Dichlorobenzyl)Isothioharnstoff
AAA-ATPase	<i>ATPases associated with a variety of cellular activities</i>
ACTF	Amplitudenkontrast
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AlF ₃	Aluminiumfluorid
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β,γ -Imido)-Triphosphat
AP	alkalische Phosphatase
ART	Algebraische Rekonstruktionstechnik, <i>algebraic reconstruction techniques</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase (ATP-hydrolysierendes Enzym)
ATP- γ -S	Adenosin-5'-(γ -Thio)-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CC	<i>correlation coefficient</i>
CCD	<i>charge coupled device</i>
<i>C. crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
CTF	Kontrasttransferfunktion, <i>contrast transfer function</i>
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
COGs	<i>clusters of orthologous groups of proteins</i>
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäuren, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	Elektronenmikroskop
EF	Elongationsfaktor
FEG	Feldemissionsquelle, <i>field emission gun</i>

FFE	<i>Free-Flow</i> Elektrophorese
FRK	Fourier-Ring Korrelation, <i>Fourier-ring correlation</i>
FRKK	Fourier-Ring Korrelationskoeffizienten
FtsZ	<i>filamentation temperature-sensitive protein Z</i>
GC	Guanin Cytosin
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein, <i>green fluorescent protein</i>
GMP-PNP	5'-Guanylylimidodiphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HPMC	Hydroxypropyl-Methyl-Zellulose
Hsp	Hitzeschockprotein, <i>heat shock protein</i>
IEF	isoelektrische Fokussierung
IF	<i>intermediate filament</i>
IgG	Immunglobulin G
LCF	<i>local correlation function</i>
MALDI-TOF MS	<i>matrix assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry</i>
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure, <i>messenger ribonucleic acid</i>
mesh	Maschen/Inch
Mbl	<i>mreB-like protein</i>
MME	Monomethylether
MTF	Modulationstransferfunktion, <i>modulation transfer function</i>
MW	Molekulargewicht
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Triessigsäure-Granulat, <i>nickel-trinitrilotriacetic acid-resin</i>
NTB	4-Nitrotetrazolium-Chloridblau
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen, <i>open reading frame</i>
OTCase	Ornithin Transcarbamoylase
PAN	<i>proteasome activating nucleotidase</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCTF	Phasenkontrast
pdb	<i>protein data bank</i>
PEG	Poly-Ethylen-Glykol
pI	isoelektrischen Punkt
PLT	<i>Progressive Lowering of Temperature</i>
PSF	<i>Pointspread-Funktion</i>
<i>P. torridus</i>	<i>Picrophilus torridus</i>
RNA	Ribonucleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
Rpt	<i>regulatory particle triple-A protein</i>
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure, <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
S	Svedberg
SAD	<i>single-wavelength anomalous dispersion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulphate</i>

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SIRT	Simultane Iterative Rekonstruktionstechnik, <i>simultaneous iterative reconstruction techniques</i>
SLS	<i>synchrotron light source</i>
SNR	Signal zu Rausch-Verhältnis, <i>signal to noise ratio</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4- methylcoumarin
<i>T. acidophilum</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>T. volcanium</i>	<i>Thermoplasma volcanium</i>
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
VAT	<i>valosine containing protein-like ATPase of Thermoplasma</i>
(v/v)	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
(w/v)	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Physikalische Konstanten

Lichtgeschwindigkeit	$c = 2.9979 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$
Elementarladung	$e = 1.602 \cdot 10^{-19} \text{ C}$
Ruhemasse des Elektrons	$m_0 = 9.1091 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$
Ruheenergie des Elektrons	$E_0 = m_0 c^2 = 511 \text{ keV}$
Plancksches Wirkungsquantum	$h = 6.6256 \cdot 10^{-34} \text{ Nms}$ $h = 4.136 \cdot 10^{-15} \text{ eVs}$
Dielektrizitätskonstante	$\epsilon_0 = 8.8419 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2\text{N}^{-1}\text{m}^{-2}$ $\epsilon_0 = 1.4165 \cdot 10^{-30} \text{ C}^2\text{eV}^{-1}\text{m}^{-1}$
Bohrscher Radius	$a_B = \frac{h^2 \epsilon_0}{\pi m_0 e^2} = 0.0529 \text{ nm}$
Avogadro Konstante	$N_A = 6.602 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Wellenlänge des Elektrons	$\lambda = hc(E E_0 + E^2)^{-1/2}$ $\lambda = 1.97 \cdot 10^{-12} \text{ nm}$ bei 300 keV
Atomgewicht	$\text{Da} = 1.6605387313 \cdot 10^{-24} \text{ g}$

Literaturverzeichnis

- [Alberts 1998] B. Alberts (1998). *The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists*. Cell, 92(3):291–4.
- [Ausmees *et al.* 2003] N. Ausmees, J. R. Kuhn und C. Jacobs-Wagner (2003). *The bacterial cytoskeleton: An intermediate filament-like function*. Cell, 115(6):705–713.
- [Baier *et al.* 1988] T. G. Baier, G. Weber, K. Hartmann, U. Heinrich und D. Schönberg (1988). *Preparative Separation Of Human-B And Lymphocytes-T By Free-Flow Electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 171(1):91–95.
- [Ban *et al.* 2000] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore und T. A. Steitz (2000). *The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution*. Science, 289(5481):905–20.
- [Baneyx und Mujacic 2004] F. Baneyx und M. Mujacic (2004). *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nat Biotechnol, 22(11):1399–408.
- [Bardy *et al.* 2003] S. L. Bardy, S. Y. M. Ng und K. F. Jarrell (2003). *Prokaryotic motility structures*. Microbiology-Sgm, 149:295–304.
- [Baumeister und Lupas 1997] W. Baumeister und A. Lupas (1997). *The proteasome*. Curr Opin Struct Biol, 7(2):273–8.
- [Beck *et al.* 1978] B. D. Beck, P. G. Arscott und A. Jacobson (1978). *Novel properties of bacterial elongation factor Tu*. Proc Natl Acad Sci U S A, 75(3):1250–4.
- [Belly *et al.* 1973] R. T. Belly, B. B. Bohlool und T. D. Brock (1973). *Genus Thermoplasma*. Annals Of The New York Academy Of Sciences, 225(DEC14):94–107.

- [Böhm *et al.* 2000] J. Böhm, A. S. Frangakis, R. Hegerl, S. Nickell, D. Typke und W. Baumeister (2000). *Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: template matching applied to electron tomograms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(26):14245–50.
- [Bi und Lutkenhaus 1991] E. F. Bi und J. Lutkenhaus (1991). *FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli*. Nature, 354(6349):161–4.
- [Bjellqvist *et al.* 1982] B. Bjellqvist, K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westmeier und W. Postel (1982). *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. J Biochem Biophys Methods, 6(4):317–39.
- [Black *et al.* 1979] F. T. Black, E. A. Freundt, O. Vinther und Christiansen (1979). *Flagellation and swimming motility of Thermoplasma acidophilum*. J Bacteriol, 137(1):456–60.
- [Blanchoin und Pollard 2002] L. Blanchoin und T. D. Pollard (2002). *Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin*. Biochemistry, 41(2):597–602.
- [Blumentals *et al.* 1990] I. Blumentals, M. Itoh, G. J. Olson und R. M. Kelly (1990). *Role of Polysulfides in Reduction of Elemental Sulfur by the Hyperthermophilic Archaeobacterium Pyrococcus furiosus*. Appl Environ Microbiol, 56(5):1255–1262.
- [Bork *et al.* 1992] P. Bork, C. Sander und A. Valencia (1992). *An Atpase Domain Common To Prokaryotic Cell-Cycle Proteins, Sugar Kinases, Actin, And Hsp70 Heat-Shock Proteins*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 89(16):7290–7294.
- [Brandstetter *et al.* 2001] H. Brandstetter, J. S. Kim, M. Groll und R. Huber (2001). *Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line*. Nature, 414(6862):466–70.
- [Brenner und Horne 1959] S. Brenner und R. W. Horne (1959). *A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses*. Biochim Biophys Acta, 34:103–10.
- [Bult *et al.* 1996] C. J. Bult, O. White, G. J. Olsen, L. X. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, J. M. Kelley, J. D. Peterson, P. W. Sadow,

- M. C. Hanna, M. D. Cotton, K. M. Roberts, M. A. Hurst, B. P. Kaine, M. Borodovsky, H. P. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese und J. C. Venter (1996). *Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, Methanococcus jannaschii*. *Science*, 273(5278):1058–1073.
- [Burggraf *et al.* 1995] D. Burggraf, G. Weber und F. Lottspeich (1995). *Free flow-isoelectric focusing of human cellular lysates as sample preparation for protein analysis*. *Electrophoresis*, 16(6):1010–5.
- [Carballido-Lopez und Errington 2003] R. Carballido-Lopez und J. Errington (2003). *A dynamic bacterial cytoskeleton*. *Trends In Cell Biology*, 13(11):577–583.
- [Crowther *et al.* 1970] R. A. Crowther, D. J. DeRosier und A. Klug (1970). *Reconstruction Of 3 Dimensional Structure From Projections And Its Application To Electron Microscopy*. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series A-Mathematical And Physical Sciences*, 317(1530):319–340.
- [Dahlmann *et al.* 1992] B. Dahlmann, L. Kuehn, A. Grziwa, P. Zwickl und W. Baumeister (1992). *Biochemical properties of the proteasome from Thermoplasma acidophilum*. *Eur J Biochem*, 208(3):789–97.
- [Daniel und Errington 2003] R. A. Daniel und J. Errington (2003). *Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell*. *Cell*, 113(6):767–776.
- [Darland *et al.* 1970] G. Darland, T. D. Brock, W. Samsonoff und S. F. Conti (1970). *A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile*. *Science*, 170(965):1416–8.
- [De La Barre und Brunger 2003] B. De La Barre und A. T. Brunger (2003). *Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains*. *Nat Struct Biol*, 10(10):856–63.
- [De Pedro *et al.* 1997] M. A. De Pedro, J. C. Quintela, J. V. Holtje und H. Schwarz (1997). *Murein segregation in Escherichia coli*. *Journal Of Bacteriology*, 179(9):2823–2834.
- [DeRosier und Klug 1968] D. J. DeRosier und A. Klug (1968). *Reconstruction Of 3 Dimensional Structures From Electron Micrographs*. *Nature*, 217(5124):130–134.
- [Dierksen *et al.* 1993] K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl und W. Baumeister (1993). *Towards Automatic Electron Tomography.2. Implementation Of Autofocus And Low-Dose*

- Procedures*. Ultramicroscopy, 49(1-4):109–120.
- [Dierksen *et al.* 1992] K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl, A. J. Koster und W. Baumeister (1992). *Towards Automatic Electron Tomography*. Ultramicroscopy, 40(1):71–87.
- [Ditzel *et al.* 1998] L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, K. O. Stetter, H. Huber, R. Huber und S. Steinbacher (1998). *Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT*. Cell, 93(1):125–38.
- [Doi *et al.* 1988] M. Doi, M. Wachi, F. Ishino, S. Tomioka, M. Ito, Y. Sakagami, A. Suzuki und M. Matsushashi (1988). *Determinations Of The Dna-Sequence Of The MreB-Gene And Of The Gene-Products Of The Mre-Region That Function In Formation Of The Rod Shape Of Escherichia-Coli-Cells*. Journal Of Bacteriology, 170(10):4619–4624.
- [Dubochet *et al.* 1988] J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell und P. Schultz (1988). *Cryo-electron microscopy of vitrified specimens*. Q Rev Biophys, 21(2):129–228.
- [Dubochet *et al.* 1982] J. Dubochet, J. Lepault, R. Freeman, J. A. Berriman und J. C. Homo (1982). *Electron-Microscopy Of Frozen Water And Aqueous-Solutions*. Journal Of Microscopy-Oxford, 128(DEC):219–237.
- [Edwards *et al.* 2000] K. J. Edwards, P. L. Bond, T. M. Gihring und J. F. Banfield (2000). *An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage*. Science, 287(5459):1796–1799.
- [Eichinger *et al.* 1999] L. Eichinger, S. S. Lee und M. Schleicher (1999). *Dictyostelium as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics*. Microsc Res Tech, 47(2):124–34.
- [Ellinger *et al.* 2002] I. Ellinger, H. Klapper, P. J. Courtoy, J. P. Vaerman und R. Fuchs (2002). *Different temperature sensitivity of endosomes involved in transport to lysosomes and transcytosis in rat hepatocytes: analysis by free-flow electrophoresis*. Electrophoresis, 23(13):2117–29.
- [van den Ent *et al.* 2001a] F. van den Ent, L. Amos und J. Löwe (2001a). *Bacterial ancestry of actin and tubulin*. Current Opinion In Microbiology, 4(6):634–638.
- [van den Ent *et al.* 2001b] F. van den Ent, L. A. Amos und J. Löwe (2001b). *Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton*. Nature, 413(6851):39–44.

- [van den Ent *et al.* 2002] F. van den Ent, J. Møller-Jensen, L. A. Amos, K. Gerdes und J. Löwe (2002). *F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM*. *Embo Journal*, 21(24):6935–6943.
- [Erickson 1998] H. P. Erickson (1998). *Atomic structures of tubulin and FtsZ (vol 8, pg 133, 1998)*. *Trends In Cell Biology*, 8(5):210–210.
- [Esue *et al.* 2005] O. Esue, M. Cordero, D. Wirtz und Y. Tseng (2005). *The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin*. *J Biol Chem*, 280(4):2628–35.
- [Faguy und Doolittle 1998] D. M. Faguy und W. F. Doolittle (1998). *Cytoskeletal proteins: the evolution of cell division*. *Curr Biol*, 8(10):R338–41.
- [Fan und Ellisman 2000] G. Y. Fan und M. H. Ellisman (2000). *Digital imaging in transmission electron microscopy*. *J Microsc*, 200(Pt 1):1–13.
- [Faruqi und Cattermole 2005] A. R. Faruqi und D. M. Cattermole (2005). *Pixel detectors for high-resolution cryo-electron microscopy*. *Nuclear Instruments Methods In Physics Research Section A-Accelerators Spectrometers Detectors And Associated Equipment*, 549(1-3):192–198.
- [Fernandez *et al.* 2006] J. J. Fernandez, S. Li und R. A. Crowther (2006). *CTF determination and correction in electron cryotomography*. *Ultramicroscopy*, 106(7):587–596.
- [Figge *et al.* 2004] R. M. Figge, A. V. Divakaruni und J. W. Gober (2004). *MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus**. *Molecular Microbiology*, 51(5):1321–1332.
- [Frangakis *et al.* 2002] A. S. Frangakis, J. Böhm, F. Förster, S. Nickell, D. Nicastro, D. Typke, R. Hegerl und W. Baumeister (2002). *Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22):14153–8.
- [Frank 1990] J. Frank (1990). *Classification of macromolecular assemblies studied as 'single particles'*. *Q Rev Biophys*, 23(3):281–329.
- [Frank 1996] J. Frank (1996). *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. Academic Press, San Diego.
- [Frank 2002] J. Frank (2002). *Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31:303–19.

- [Frank *et al.* 1995] J. Frank, J. Zhu, P. Penczek, Y. Li, S. Srivastava, A. Verschoor, M. Radermacher, R. Grassucci, R. K. Lata und R. K. Agrawal (1995). *A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the E. coli ribosome*. Nature, 376(6539):441–4.
- [Förster 2005] F. Förster (2005). *Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden*. Doktorarbeit, Technische Universität München.
- [Förster *et al.* 2005] F. Förster, O. Medalia, N. Zauberman, W. Baumeister und D. Fass (2005). *Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(13):4729–34.
- [Fütterer *et al.* 2004] O. Fütterer, A. Angelov, H. Liesegang, G. Gottschalk, C. Schleper, B. Schepers, C. Dock, G. Antranikian und W. Liebl (2004). *Genome sequence of Picrophilus torridus and its implications for life around pH 0*. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(24):9091–6.
- [Garner *et al.* 2004] E. C. Garner, C. S. Campbell und R. D. Mullins (2004). *Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog*. Science, 306(5698):1021–5.
- [Gerega *et al.* 2005] A. Gerega, B. Rockel, J. Peters, T. Tamura, W. Baumeister und P. Zwickl (2005). *VAT, the thermoplasma homolog of mammalian p97/VCP, is an N domain-regulated protein unfoldase*. J Biol Chem, 280(52):42856–62.
- [Gilbert 1972] P. Gilbert (1972). *Iterative Methods For 3-Dimensional Reconstruction Of An Object From Projections*. Journal Of Theoretical Biology, 36(1):105–17.
- [Gitai *et al.* 2004] Z. Gitai, N. Dye und L. Shapiro (2004). *An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria*. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America, 101(23):8643–8648.
- [Gitai *et al.* 2005] Z. Gitai, N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi und L. Shapiro (2005). *MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome*. Cell, 120(3):329–41.
- [Glaeser 1971] R. M. Glaeser (1971). *Limitations to significant information in biological electron microscopy as a result of radiation damage*. J Ultrastruct Res, 36(3):466–82.
- [Glickman *et al.* 1998] M. H. Glickman, D. M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V. A. Fried und D. Finley (1998). *A subcomplex of the proteasome*

- regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3*. Cell, 94(5):615–23.
- [Golbik *et al.* 1999] R. Golbik, A. N. Lupas, K. K. Koretke, W. Baumeister und J. Peters (1999). *The Janus face of the archaeal Cdc48/p97 homologue VAT: protein folding versus unfolding*. Biol Chem, 380(9):1049–62.
- [Golyshina und Timmis 2005] O. V. Golyshina und K. N. Timmis (2005). *Ferroplasma and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments*. Environ Microbiol, 7(9):1277–88.
- [Gordon *et al.* 1970] R. Gordon, R. Bender und G. T. Herman (1970). *Algebraic reconstruction techniques (ART) for three-dimensional electron microscopy and x-ray photography*. J Theor Biol, 29(3):471–81.
- [Grassmann und Hannig 1950] W. Grassmann und K. Hannig (1950). *Ein Einfaches Verfahren Zur Kontinuierlichen Trennung Von Stoffgemischen Auf Filterpapier Durch Elektrophorese*. Naturwissenschaften, 37(17):397–397.
- [Grimm 1997] R. Grimm (1997). *Anwendung von Energiefilterung bei der automatisierten Elektronentomographie von eiseingebetteten biologischen Objekten*. Dissertation, Technische Universität München.
- [Grimm *et al.* 1997] R. Grimm, M. Bärmann, W. Häckl, D. Typke, E. Sackmann und W. Baumeister (1997). *Energy filtered electron tomography of ice-embedded actin and vesicles*. Biophys J, 72(1):482–9.
- [Grimm *et al.* 1996a] R. Grimm, A. J. Koster, U. Ziese, D. Typke und W. Baumeister (1996a). *Zero-loss energy filtering under low-dose conditions using a post-column energy filter*. Journal of Microscopy, 183(Part 1):60–68.
- [Grünewald *et al.* 2003] K. Grünewald, O. Medalia, A. Gross, A. C. Steven und W. Baumeister (2003). *Prospects of electron cryotomography to visualize macromolecular complexes inside cellular compartments: implications of crowding*. Biophys Chem, 100(1-3):577–91.
- [Grossart *et al.* 2000] H. P. Grossart, G. F. Steward, J. Martinez und F. Azam (2000). *A simple, rapid method for demonstrating bacterial flagella*. Appl Environ Microbiol, 66(8):3632–6.

- [Grziwa *et al.* 1991] A. Grziwa, W. Baumeister, B. Dahlmann und F. Kopp (1991). *Localization of subunits in proteasomes from Thermoplasma acidophilum by immunoelectron microscopy*. FEBS Lett, 290(1-2):186–90.
- [Gubbens *et al.* 1995] A. J. Gubbens, B. Kraus, O. L. Krivanek und P. E. Mooney (1995). *An imaging filter for high voltage electron microscopy*. Ultramicroscopy, 59(1-4):255–265.
- [Guckenberger 1982] R. Guckenberger (1982). *Determination Of A Common Origin In The Micrographs Of Tilt Series In 3-Dimensional Electron-Microscopy*. Ultramicroscopy, 9(1-2):167–173.
- [Gutsche *et al.* 2000] I. Gutsche, O. Mihalache, R. Hegerl, D. Typke und W. Baumeister (2000). *ATPase cycle controls the conformation of an archaeal chaperonin as visualized by cryo-electron microscopy*. FEBS Lett, 477(3):278–82.
- [Harauz und van Heel 1986] G. Harauz und M. van Heel (1986). *Exact Filters For General Geometry 3-Dimensional Reconstruction*. Optik, 73(4):146–156.
- [Hart 1968] R. G. Hart (1968). *Electron microscopy of unstained biological material: the polytropic montage*. Science, 159(822):1464–7.
- [van Heel und Frank 1981] M. van Heel und J. Frank (1981). *Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules*. Ultramicroscopy, 6(2):187–94.
- [van Heel *et al.* 1992] M. van Heel, M. Schatz und E. Orlova (1992). *Correlation-Functions Revisited*. Ultramicroscopy, 46(1-4):307–316.
- [Hegerl 1996] R. Hegerl (1996). *The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy*. J Struct Biol, 116(1):30–4.
- [Heide und Zeitler 1985] H. G. Heide und E. Zeitler (1985). *The Physical Behavior Of Solid Water At Low-Temperatures And The Embedding Of Electron Microscopical Specimens*. Ultramicroscopy, 16(2):151–160.
- [Heidrich und Hannig 1989] H. G. Heidrich und K. Hannig (1989). *Separation Of Cell-Populations By Free-Flow Electrophoresis*. Methods In Enzymology, 171:513–531.
- [Henderson 1995] R. Henderson (1995). *The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules*. Q Rev Biophys, 28(2):171–93.

- [Heukeshoven und Dernick 1988] J. Heukeshoven und R. Dernick (1988). *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. *Electrophoresis*, 9(1):28–32.
- [Hixon und Searcy 1993] W. G. Hixon und D. G. Searcy (1993). *Cytoskeleton in the archaeobacterium Thermoplasma acidophilum? Viscosity increase in soluble extracts*. *Biosystems*, 29(2-3):151–60.
- [Hochstrasser 1996] M. Hochstrasser (1996). *Ubiquitin-dependent protein degradation*. *Annu Rev Genet*, 30:405–39.
- [Hoffmann *et al.* 2001] P. Hoffmann, H. Ji, R. L. Moritz, L. M. Connolly, D. F. Frecklington, M. J. Layton, J. S. Eddes und R. J. Simpson (2001). *Continuous free-flow electrophoresis separation of cytosolic proteins from the human colon carcinoma cell line LIM 1215: a non two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis strategy*. *Proteomics*, 1(7):807–18.
- [Hoppe und Hegerl 1980] W. Hoppe und R. Hegerl (1980). *Three-dimensional structure determination by electron microscopy (nonperiodic specimens)*, Bd. Bd. 13 d. Reihe *Topics in Current Physics Computer Processing of Electron Microscope Images*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- [Hoppert und Mayer] M. Hoppert und F. Mayer. *Principles of macromolecular organization and cell function in bacteria and archaea*. *Cell Biochemistry And Biophysics*, 31(3):247–284.
- [Howland 2000] J. L. Howland (2000). *The Surprising Archaea, Discovering Another Domain of Life*. Oxford University Press, New York.
- [Huber *et al.* 2002] H. Huber, M. J. Hohn, R. Rachel, T. Fuchs, V. C. Wimmer und K. O. Stetter (2002). *A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont*. *Nature*, 417(6884):63–7.
- [Huber *et al.* 2003] H. Huber, M. J. Hohn, K. O. Stetter und R. Rachel (2003). *The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life*. *Res Microbiol*, 154(3):165–71.
- [Iwai *et al.* 2002] N. Iwai, K. Nagai und M. Wachi (2002). *Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in Escherichia coli probably by acting on a rod-shape-*

- determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2*. Biosci Biotechnol Biochem, 66(12):2658–62.
- [Jaffé und Hannig 1965] W. G. Jaffé und K. Hannig (1965). *Fractionation Of Proteins From Kidney Beans (Phaseolus Vulgaris)*. Arch Biochem Biophys, 109:80–91.
- [Jones *et al.* 2001] L. J. F. Jones, R. Carballido-Lopez und J. Errington (2001). *Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in Bacillus subtilis*. Cell, 104(6):913–922.
- [Kates 1993] M. Kates (1993). *Biology of halophilic bacteria, Part II. Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significance*. Experientia, 49(12):1027–36.
- [Keeling *et al.* 1994] P. J. Keeling, R. L. Charlebois und W. F. Doolittle (1994). *Archaeobacterial genomes: eubacterial form and eukaryotic content*. Curr Opin Genet Dev, 4(6):816–22.
- [Klose 1975] J. Klose (1975). *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals*. Humangenetik, 26(3):231–43.
- [König und Stetter 1989] H. König und K. O. Stetter (1989). *Archaeobacteria*, Bd. 3 d. Reihe *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, Hongkong, London, Sydney.
- [Koster *et al.* 1997] A. J. Koster, R. Grimm, D. Typke, R. Hegerl, A. Stoschek, J. Walz und W. Baumeister (1997). *Perspectives of molecular and cellular electron tomography*. J Struct Biol, 120(3):276–308.
- [Koster *et al.* 1989] A. J. Koster, W. J. d. Ruijter, A. v. d. Bos und K. D. v. d. Mast (1989). *Autotuning of a TEM using minimum electron dose*. Ultramicroscopy, 27:251–72.
- [Krivanek *et al.* 1995] O. L. Krivanek, S. L. Friedman, A. J. Gubbens und B. Kraus (1995). *An imaging filter for biological applications*. Ultramicroscopy, 59(1-4):267–82.
- [Kürner *et al.* 2004] J. Kürner, O. Medalia, A. A. Linaroudis und W. Baumeister (2004). *New insights into the structural organization of eukaryotic and prokaryotic cytoskeletons using cryo-electron tomography*. Exp Cell Res, 301(1):38–42.

- [Kruse *et al.* 2005] T. Kruse, J. Bork-Jensen und K. Gerdes (2005). *The morphogenetic MreBCD proteins of Escherichia coli form an essential membrane-bound complex*. Molecular Microbiology, 55(1):78–89.
- [Kruse *et al.* 2003] T. Kruse, J. Møller-Jensen, A. Lobner-Olesen und K. Gerdes (2003). *Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in Escherichia coli*. Embo Journal, 22(19):5283–5292.
- [Langer *et al.* 1995] D. Langer, J. Hain, P. Thuriaux und W. Zillig (1995). *Transcription in archaea: similarity to that in eucarya*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(13):5768–72.
- [Larsen und Grant 1989] H. Larsen und W. Grant (1989). *Genus I. Halobacterium Elazari-Volcani 1957, 207AL*, Bd. 3 d. Reihe *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- [Lawrence 1992] M. Lawrence (1992). *Least-squares method of alignment using markers*. Electron tomography: Three-Dimensional Imaging with the Transmission Electron Microscope. Plenum Press, New York.
- [Lenz 1954] F. Lenz (1954). *Zur Streuung mittelschneller Elektronen in kleinste Winkel*. Zeitschrift für Naturforschung, 9(3):185–204.
- [Liu *et al.* 1995] Y. Liu, P. A. Penczek, B. F. McEwen und J. Frank (1995). *A marker-free alignment method for electron tomography*. Ultramicroscopy, 58(3-4):393–402.
- [Lämmli 1970] U. K. Lämmli (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227(5259):680–5.
- [Lutkenhaus und Addinall 1997] J. Lutkenhaus und S. G. Addinall (1997). *Bacterial cell division and the Z ring*. Annu Rev Biochem, 66:93–116.
- [Lučić *et al.* 2005] V. Lučić, F. Förster und W. Baumeister (2005). *Structural studies by electron tomography: from cells to molecules*. Annu Rev Biochem, 74:833–65.
- [Löwe und Amos 1998] J. Löwe und L. A. Amos (1998). *Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ*. Nature, 391(6663):203–6.
- [Löwe *et al.* 1995] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister und R. Huber (1995). *Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 Å resolution*. Science, 268(5210):533–9.

- [Ma *et al.* 1996] X. Ma, D. W. Ehrhardt und W. Margolin (1996). *Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living Escherichia coli cells by using green fluorescent protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(23):12998–3003.
- [Madigan *et al.* 2001] M. T. Madigan, J. M. Martinko und J. Parker (2001). *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 9 Aufl.
- [Margolin 2004] W. Margolin (2004). *Bacterial shape: Concave coiled coils curve Caulobacter*. Current Biology, 14(6):R242–R244.
- [Massant *et al.* 2003] J. Massant, J. Wouters und N. Glansdorff (2003). *Refined structure of Pyrococcus furiosus ornithine carbamoyltransferase at 1.87 Å*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 59(Pt 12):2140–9.
- [Mayer 2003] F. Mayer (2003). *Cytoskeletons in prokaryotes*. Cell Biol Int, 27(5):429–38.
- [Medalia *et al.* 2002] O. Medalia, I. Weber, A. S. Frangakis, D. Nicastro, G. Gerisch und W. Baumeister (2002). *Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryo-electron tomography*. Science, 298(5596):1209–13.
- [Milazzo *et al.* 2005] A. C. Milazzo, P. Leblanc, F. Duttweiler, L. Jin, J. C. Bouwer, S. Peltier, M. Ellisman, F. Bieser, H. S. Matis, H. Wieman, P. Denes, S. Kleinfelder und N. H. Xuong (2005). *Active pixel sensor array as a detector for electron microscopy*. Ultramicroscopy, 104(2):152–9.
- [Møller-Jensen *et al.* 2003] J. Møller-Jensen, J. Borch, M. Dam, R. B. Jensen, P. Roepstorff und K. Gerdes (2003). *Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism*. Molecular Cell, 12(6):1477–1487.
- [Møller-Jensen *et al.* 2002] J. Møller-Jensen, R. B. Jensen, J. Löwe und K. Gerdes (2002). *Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament*. Embo Journal, 21(12):3119–3127.
- [Møller-Jensen und Löwe 2005] J. Møller-Jensen und J. Löwe (2005). *Increasing complexity of the bacterial cytoskeleton*. Curr Opin Cell Biol, 17(1):75–81.
- [Nagy 2006] I. Nagy (2006). *Persönliche Mitteilung*.
- [Nelson *et al.* 1999] K. E. Nelson, R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton,

- M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter und C. M. Fraser (1999). *Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of Thermotoga maritima*. Nature, 399(6734):323–9.
- [Nickell *et al.* 2005] S. Nickell, F. Förster, A. Linaroudis, W. D. Net, F. Beck, R. Hegerl, W. Baumeister und J. M. Plitzko (2005). *TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography*. J Struct Biol, 149(3):227–34.
- [Nickell *et al.* 2006] S. Nickell, C. Kofler, A. P. Leis und W. Baumeister (2006). *A visual approach to proteomics*. Nat Rev Mol Cell Biol, 7(3):225–30.
- [Nitsch *et al.* 1998] M. Nitsch, J. Walz, D. Typke, M. Klumpp, L. O. Essen und W. Baumeister (1998). *Group II chaperonin in an open conformation examined by electron tomography*. Nat Struct Biol, 5(10):855–7.
- [Nolan *et al.* 1971] C. Nolan, E. Margoliash, J. D. Peterson und D. F. Steiner (1971). *The structure of bovine proinsulin*. J Biol Chem, 246(9):2780–95.
- [O’Farrell 1975] P. H. O’Farrell (1975). *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 250(10):4007–21.
- [Olsen und Woese 1997] G. J. Olsen und C. R. Woese (1997). *Archaeal genomics: an overview*. Cell, 89(7):991–4.
- [Ortiz *et al.* 2006] J. O. Ortiz, F. Förster, J. Kürner, A. A. Linaroudis und W. Baumeister (2006). *Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition*. J Struct Biol, S. im Druck.
- [Pace 1997] N. R. Pace (1997). *A molecular view of microbial diversity and the biosphere*. Science, 276(5313):734–40.
- [Pamnani *et al.* 1997] V. Pamnani, T. Tamura, A. Lupas, J. Peters, Z. Cejka, W. Ashraf und W. Baumeister (1997). *Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon Thermoplasma acidophilum*. FEBS Lett, 404(2-3):263–8.
- [Penczek *et al.* 1995] P. Penczek, M. Marko, K. Buttle und J. Frank (1995). *Double-tilt electron tomography*. Ultramicroscopy, 60(3):393–410.
- [Penczek *et al.* 1992] P. Penczek, M. Radermacher und J. Frank (1992). *Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice*. Ultramicroscopy, 40(1):33–53.

- [Peters *et al.* 1993] J. M. Peters, Z. Cejka, J. R. Harris, J. A. Kleinschmidt und W. Baumeister (1993). *Structural features of the 26 S proteasome complex*. J Mol Biol, 234(4):932–7.
- [Pühler *et al.* 1992] G. Pühler, S. Weinkauff, L. Bachmann, S. Müller, A. Engel, R. Hegerl und W. Baumeister (1992). *Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from Thermoplasma acidophilum*. Embo J, 11(4):1607–16.
- [Pollard 1976] T. D. Pollard (1976). *Cytoskeletal functions of cytoplasmic contractile proteins*. J Supramol Struct, 5(3):317–34.
- [Radermacher *et al.* 1986] M. Radermacher, T. Wagenknecht, A. Verschoor und J. Frank (1986). *A new 3-D reconstruction scheme applied to the 50S ribosomal subunit of E. coli*. J Microsc, 141(Pt 1):RP1–2.
- [Radon 1917] J. Radon (1917). *Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten*. Math. Phys. Klasse, 69:262–277.
- [Röben *et al.* 2006] A. Röben, C. Kofler, I. Nagy, S. Nickell, F. U. Hartl und A. Bracher (2006). *Crystal structure of an archaeal actin homolog*. J Mol Biol, 358(1):145–56.
- [Reimer 1997] L. Reimer (1997). *Transmission electron microscopy*, Bd. 36 d. Reihe *Springer Series in Optical Sciences*. Springer Verlag, Heidelberg, 4. Aufl.
- [Reimer und Rossmessemer 1989] L. Reimer und M. Rossmessemer (1989). *Contrast In The Electron Spectroscopic Imaging Mode Of A Tem.1. Influence Of Zero-Loss Filtering On Scattering Contrast*. Journal Of Microscopy-Oxford, 155:169–182.
- [Rockel *et al.* 2002] B. Rockel, J. Jakana, W. Chiu und W. Baumeister (2002). *Electron cryo-microscopy of VAT, the archaeal p97/CDC48 homologue from Thermoplasma acidophilum*. J Mol Biol, 317(5):673–81.
- [Rockel *et al.* 1999] B. Rockel, J. Walz, R. Hegerl, J. Peters, D. Typke und W. Baumeister (1999). *Structure of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon Thermoplasma acidophilum as studied by electron tomography*. FEBS Lett, 451(1):27–32.
- [Roseman 2000] A. M. Roseman (2000). *Docking structures of domains into maps from cryo-electron microscopy using local correlation*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 56(Pt 10):1332–40.

- [Rosenbusch *et al.* 1976] J. P. Rosenbusch, G. R. Jacobson und J. C. Jatton (1976). *Does A Bacterial Elongation-Factor Share A Common Evolutionary Ancestor With Actin*. Journal Of Supramolecular Structure, 5(3):391–396.
- [Ruepp *et al.* 2000] A. Ruepp, W. Graml, M. L. Santos-Martinez, K. K. Koretke, C. Volker, H. W. Mewes, D. Frishman, S. Stocker, A. N. Lupas und W. Baumeister (2000). *The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger Thermoplasma acidophilum*. Nature, 407(6803):508–13.
- [Saito und Tomita 1999] R. Saito und M. Tomita (1999). *Computer analyses of complete genomes suggest that some archaeobacteria employ both eukaryotic and eubacterial mechanisms in translation initiation*. Gene, 238(1):79–83.
- [Sali *et al.* 2003] A. Sali, R. Glaeser, T. Earnest und W. Baumeister (2003). *From words to literature in structural proteomics*. Nature, 422(6928):216–25.
- [Santos *et al.* 2004] L. Santos, T. Frickey, J. Peters, W. Baumeister, A. Lupas und P. Zwickl (2004). *Thermoplasma acidophilum TAA43 is an archaeal member of the eukaryotic meiotic branch of AAA ATPases*. Biol Chem, 385(11):1105–11.
- [Saxton und Baumeister 1982] W. O. Saxton und W. Baumeister (1982). *The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein*. J Microsc, 127(Pt 2):127–38.
- [Scheres *et al.* 2005] S. H. Scheres, M. Valle, R. Nuñez, C. O. Sorzano, R. Marabini, G. T. Herman und J. M. Carazo (2005). *Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images*. J Mol Biol, 348(1):139–49.
- [Schlunzen *et al.* 2000] F. Schlunzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi und A. Yonath (2000). *Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution*. Cell, 102(5):615–23.
- [Schoehn *et al.* 2000] G. Schoehn, M. Hayes, M. Cliff, A. R. Clarke und H. R. Saibil (2000). *Domain rotations between open, closed and bullet-shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin*. J Mol Biol, 301(2):323–32.
- [Schweikert 2004] G. Schweikert (2004). *Quantitativer Vergleich der Strahlschädigung biologischer Proben im Transmissions-Elektronenmikroskop bei Stickstoff- und Helium-Temperatur*. Diplomarbeit, Technische Universität München.

- [Searcy 1976] D. G. Searcy (1976). *Thermoplasma acidophilum: intracellular pH and potassium concentration*. Biochim Biophys Acta, 451(1):278–86.
- [Searcy und Hixon 1991] D. G. Searcy und W. G. Hixon (1991). *Cytoskeletal Origins In Sulfur-Metabolizing Archaeobacteria*. Biosystems, 25(1-2):1–11.
- [Searcy et al. 1978] D. G. Searcy, D. B. Stein und G. R. Green (1978). *Phylogenetic affinities between eukaryotic cells and a thermophilic mycoplasma*. Biosystems, 10(1-2):19–28.
- [Searcy et al. 1981] D. G. Searcy, D. B. Stein und K. B. Searcy (1981). *A mycoplasma-like archaeobacterium possibly related to the nucleus and cytoplasm of eukaryotic cells*. Ann N Y Acad Sci, 361:312–24.
- [Seemüller et al. 1995] E. Seemüller, A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber und W. Baummeister (1995). *Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease*. Science, 268(5210):579–82.
- [Seegerer et al. 1988] A. Seegerer, T. A. Langworthy und K. O. Stetter (1988). *Thermoplasma-Acidophilum And Thermoplasma-Volcanium New-Species From Solfatarata Fields*. Systematic Applied Microbiology, 10(2):161–171.
- [Sigworth 1998] F. J. Sigworth (1998). *A maximum-likelihood approach to single-particle image refinement*. J Struct Biol, 122(3):328–39.
- [Sioud et al. 1987] M. Sioud, G. Baldacci, P. Forterre und A. M. Derecondo (1987). *Antitumor Drugs Inhibit The Growth Of Halophilic Archaeobacteria*. European Journal Of Biochemistry, 169(2):231–236.
- [Smith et al. 1973] P. F. Smith, T. A. Langworth, W. R. Mayberry und A. E. Houghland (1973). *Characterization of the membranes of Thermoplasma acidophilum*. J Bacteriol, 116(2):1019–28.
- [Sorzano et al. 2001] C. O. Sorzano, R. Marabini, N. Boisset, E. Rietzel, R. Schröder, G. T. Herman und J. M. Carazo (2001). *The effect of overabundant projection directions on 3D reconstruction algorithms*. J Struct Biol, 133(2-3):108–18.
- [Soufo und Graumann 2003] H. J. D. Soufo und P. L. Graumann (2003). *Actin-like proteins MreB and Mbl from Bacillus subtilis are required for bipolar positioning of replication origins*. Current Biology, 13(21):1916–1920.

- [Sun 2005] N. Sun (2005). *Protein reference map of Thermoplasma acidophilum and implications for macromolecular complexes*. Diplomarbeit, Technische Universität Dresden.
- [Svensson 1961] H. Svensson (1961). *Isoelectric Fractionations, Analysis, and Characterisation of Ampholytes in natural pH gradients. I. The Differential Equation of Solute Concentrations at a Steady State and its Solution for Simple Cases*. Acta Chem. Scand., 15:325–341.
- [Svensson 1962] H. Svensson (1962). *Isoelectric Fractionations, Analysis, and Characterisation of Ampholytes in natural pH gradients. II. Buffering Capacity and Conductance of Isoionic Ampholytes*. Acta Chem. Scand., 16:456–466.
- [Tamura *et al.* 1998] N. Tamura, F. Lottspeich, W. Baumeister und T. Tamura (1998). *The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation*. Cell, 95(5):637–48.
- [Tamura *et al.* 1996] T. Tamura, N. Tamura, Z. Cejka, R. Hegerl, F. Lottspeich und W. Baumeister (1996). *Tricorn protease—the core of a modular proteolytic system*. Science, 274(5291):1385–9.
- [Taylor und Glaeser 1974] K. A. Taylor und R. M. Glaeser (1974). *Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals*. Science, 186(4168):1036–7.
- [Taylor *et al.* 1997] K. A. Taylor, J. Tang, Y. Cheng und H. Winkler (1997). *The use of electron tomography for structural analysis of disordered protein arrays*. J Struct Biol, 120(3):372–86.
- [Thompson *et al.* 1994] J. D. Thompson, D. G. Higgins und T. J. Gibson (1994). *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, 22(22):4673–80.
- [Toyoshima und Unwin 1988] C. Toyoshima und N. Unwin (1988). *Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: determination from pairs of defocused images*. Ultramicroscopy, 25(4):279–91.
- [Trent *et al.* 1997] J. D. Trent, H. K. Kagawa, T. Yaoi, E. Olle und N. J. Zaluzec (1997). *Chaperonin filaments: the archaeal cytoskeleton?*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(10):5383–8.

- [Tully 1992] J. G. Tully (1992). *Mollicutes (mycoplasmas)*, Bd. 3 d. Reihe *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, San Diego.
- [Tully *et al.* 1993] J. G. Tully, J. M. Bove, F. Laigret und R. F. Whitcomb (1993). *Revised Taxonomy Of The Class Mollicutes - Proposed Elevation Of A Monophyletic Cluster Of Arthropod-Associated Mollicutes To Ordinal Rank (Entomoplasmatales Ord-Nov), With Provision For Familial Rank To Separate Species With Nonhelical Morphology (Entomoplasmataceae Fam-Nov) From Helical Species (Spiroplasmataceae), And Emended Descriptions Of The Order Mycoplasmatales, Family Mycoplasmataceae (Vol 43, Pg 383, 1993)*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 43(3):630–630.
- [Typke und Radermacher 1982] D. Typke und M. Radermacher (1982). *Determination Of The Phase Of Complex Atomic Scattering-Amplitudes From Light-Optical Diffractograms Of Electron-Microscope Images*. *Ultramicroscopy*, 9(1-2):131–138.
- [Vesterberg 1969] O. Vesterberg (1969). *Synthesis and Isoelectric Fractionation od Carrier Ampholytes..* *Acta Chem. Scand.*, 23:2653–2666.
- [Villeret *et al.* 1998] V. Villeret, B. Clantin, C. Tricot, C. Legrain, M. Roovers, V. Stalon, N. Glansdorff und J. van Beeumen (1998). *The crystal structure of Pyrococcus furiosus ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6):2801–6.
- [Villeret *et al.* 1995] V. Villeret, C. Tricot, V. Stalon und O. Dideberg (1995). *Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa catabolic ornithine transcarbamoylase at 3.0-Å resolution: a different oligomeric organization in the transcarbamoylase family*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(23):10762–6.
- [Wachi *et al.* 1987] M. Wachi, M. Doi, S. Tamaki, W. Park, S. Nakajimaiijima und M. Matushashi (1987). *Mutant Isolation And Molecular-Cloning Of Mre-Genes, Which Determine Cell-Shape, Sensitivity To Mecillinam, And Amount Of Penicillin-Binding Proteins In Escherichia-Coli*. *Journal Of Bacteriology*, 169(11):4935–4940.
- [Waldmann *et al.* 1995] T. Waldmann, E. Nimmesgern, M. Nitsch, J. Peters, G. Pfeifer, S. Müller, J. Kellermann, A. Engel, F. U. Hartl und W. Baumeister (1995). *The thermosome of Thermoplasma acidophilum and its relationship to the eukaryotic chaperonin TRiC*. *Eur J Biochem*, 227(3):848–56.

- [Wall *et al.* 1974] J. Wall, M. Isaacson und J. P. Langmore (1974). *Collection Of Scattered Electrons In Dark Field Electron-Microscopy.2. Inelastic-Scattering*. Optik, 39(4):359–374.
- [Walz *et al.* 1997] J. Walz, T. Tamura, N. Tamura, R. Grimm, W. Baumeister und A. J. Koster (1997). *Tricorn protease exists as an icosahedral supermolecule in vivo*. Mol Cell, 1(1):59–65.
- [Wanson und Drochmans 1968] J. C. Wanson und P. Drochmans (1968). *Rabbit skeletal muscle glycogen. A morphological and biochemical study of glycogen beta-particles isolated by the precipitation-centrifugation method*. J Cell Biol, 38(1):130–50.
- [Weber *et al.* 1972] K. Weber, J. R. Pringle und M. Osborn (1972). *Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel*. Methods Enzymol, 26 PtC:3–27.
- [Wilkins *et al.* 1996] M. R. Wilkins, J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. Humphery-Smith, D. F. Hochstrasser und K. L. Williams (1996). *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev, 13:19–50.
- [Wimberly *et al.* 2000] B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, J. Clemons, W. M., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch und V. Ramakrishnan (2000). *Structure of the 30S ribosomal subunit*. Nature, 407(6802):327–39.
- [Winkler und Taylor 2003] H. Winkler und K. A. Taylor (2003). *Focus gradient correction applied to tilt series image data used in electron tomography*. J Struct Biol, 143(1):24–32.
- [Woese und Fox 1977] C. R. Woese und G. E. Fox (1977). *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 74(11):5088–90.
- [Woese *et al.* 1990] C. R. Woese, O. Kandler und M. L. Wheelis (1990). *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(12):4576–9.
- [Woese *et al.* 1980] C. R. Woese, J. Maniloff und L. B. Zablen (1980). *Phylogenetic analysis of the mycoplasmas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 77(1):494–8.
- [Yasuda *et al.* 1995a] M. Yasuda, H. Oyaizu, A. Yamagishi und T. Oshima (1995a). *Morphological variation of new Thermoplasma acidophilum isolates from Japanese hot springs*. Appl Environ Microbiol, 61(9):3482–5.

- [Yasuda *et al.* 1995b] M. Yasuda, A. Yamagishi und T. Oshima (1995b). *The Plasmids Found In Isolates Of The Acidothermophilic Archaeobacterium Thermoplasma Acidophilum*. Fems Microbiology Letters, 128(2):157–161.
- [Yusupov *et al.* 2001] M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate und H. F. Noller (2001). *Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution*. Science, 292(5518):883–96.
- [Zhu *et al.* 1997] J. Zhu, P. A. Penczek, R. Schröder und J. Frank (1997). *Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs: procedure and application to the 70S Escherichia coli ribosome*. J Struct Biol, 118(3):197–219.
- [Ziese *et al.* 2003] U. Ziese, W. J. Geerts, T. P. van der Krift, A. J. Verkleij und A. J. Koster (2003). *Correction of autofocusing errors due to specimen tilt for automated electron tomography*. J Microsc, 211(Pt 2):179–85.
- [Zillig *et al.* 1980] W. Zillig, K. O. Stetter, S. Wunderl, W. Schulz, H. Priess und I. Scholz (1980). *The Sulfolobus-Caldariella Group - Taxonomy On The Basis Of The Structure Of Dna-Dependent Rna-Polymerases*. Archives Of Microbiology, 125(3):259–269.
- [Zischka *et al.* 2003] H. Zischka, G. Weber, P. J. Weber, A. Posch, R. J. Braun, D. Buhringer, U. Schneider, M. Nissum, T. Meitinger, M. Ueffing und C. Eckerskorn (2003). *Improved proteome analysis of Saccharomyces cerevisiae mitochondria by free-flow electrophoresis*. Proteomics, 3(6):906–16.
- [Zwickl *et al.* 1992] P. Zwickl, F. Lottspeich und W. Baumeister (1992). *Expression of functional Thermoplasma acidophilum proteasomes in Escherichia coli*. FEBS Lett, 312(2-3):157–60.
- [Zwickl *et al.* 1999] P. Zwickl, D. Ng, K. M. Woo, H. P. Klenk und A. L. Goldberg (1999). *An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes*. J Biol Chem, 274(37):26008–14.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2002 bis August 2006 in der Abteilung Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Wolfgang Baumeister für seine stete Unterstützung und sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Großer Dank gilt Stephan Nickell für die gute Betreuung während dieser 4 Jahre. In gleicher Weise möchte ich mich bei István Nagy für seine hervorragenden Vorschläge für die Probenpräparation und für viele interessante Diskussionen bedanken.

Na Sun, Roland Knispel und Marius Boicu danke ich für das angenehme Arbeitsklima während dieser Zeit. Marius Boicu danke ich für die Trennung des Zelllysates mittels der FFE.

Für die Durchsicht der Arbeit und konstruktive Korrekturvorschläge möchte ich mich bei Karoline Bopp, Hubert Kettenberger, Peter Zwickl, Martin Beck, Roland Knispel, Andreas Bracher und bei Andrew Leis bedanken.

Martin Beck, Friedrich Förster und Florian Beck danke ich für die Hilfe bei MATLAB-Problemen und bei der Programmierung. William del Net danke ich für die Lösung von Computer-Problemen.

Reiner Hegerl für das Beantworten meiner zahlreichen Fragen zur Bildbearbeitung und Tomographie sowie seiner Hilfe in allen Fragen bezüglich des EM-Programms.

Jürgen Plitzko und Günter Pfeifer danke ich für die Hilfe bei der Lösung von zahlreichen Problemen an den Elektronenmikroskopen, Brigitte Kühlmorgen und Thomas Keil für das Schneiden der eingebetteten *Thermoplasma*-Zellen und für die elektronenmikrosko-

pischen Aufnahmen der Immungold-markierten Zellen, Manuela Gruska für ihre Hilfe beim Anaerobenzelt, Iosune Ibiricu und Ulrike Maurer für die Bereitstellung von selbst gemachtem Gold.

Für die Hilfe im Labor möchte ich mich bei Karoline Bopp, Peter Zwickl, Oana Mihalache, Erik Roth und Alexandra Gerega bedanken.

Weiterhin danke ich meinen langjährigen Mitdotorandinnen aus der Tomographiegruppe, Gabi Schweikert, Julia Kürner und Ariane Briegel für das immer angenehme und kollegiale Verhältnis.

Uli Zachariae und Thomas Klühspies danke ich für die interessanten Diskussionen und aufmunternden Gespräche.

Annette Röben und Andreas Bracher (MPI für Biochemie, Martinsried, Abt. Hartl) danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Besonderen Dank schulde ich meinem Freund Helmut für seine Nachsicht, Motivation und vieles mehr.

Spezieller Dank gilt meinem Bruder, der mir bei zahlreichen \LaTeX -Problemen und beim Layout dieser Arbeit geholfen hat.

Am meisten danke ich meinen Eltern, die mir meine gesamte Ausbildung ermöglicht haben und mich im Verlauf der Arbeit unentwegt gefördert haben.