

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Kombination von Kryo-Ultramikrotomie, Kryoelektronen-  
tomographie und digitaler Mustererkennung zur Detektion  
makromolekularer Komplexe im zellulären Kontext

Lars Christian Andrees

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Christian F. W. Becker

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister

2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Die Dissertation wurde am 30.03.2010 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.07.2010 angenommen.

**Inhaltsverzeichnis**

1	Zusammenfassung .....	4
2	Abstract .....	5
3	Einleitung .....	7
3.1	Tripeptidylpeptidase II (TPP II).....	7
3.1.1	Zelluläre Funktionen von TPP II .....	7
3.1.2	Visualisierung von TPP II im zellulären Kontext .....	7
3.1.3	Struktur von TPP II .....	8
3.1.4	Notwendigkeit zur Probedissektion geeigneter Systeme .....	9
3.2	Ribosomen.....	11
3.2.1	Strukturen pro- und eukaryotischer Ribosomen .....	11
3.3	Etablierung eines TPP-II-überexprimierenden eukaryotischen Systems .....	13
4	Grundlagen .....	14
4.1	Elektronenmikroskopie.....	14
4.1.1	Techniken zur Abbildung biologischer Objekte.....	14
4.1.2	Aufbau eines Elektronenmikroskops .....	14
4.1.3	Theorie der Streuung und Abbildung.....	16
4.1.4	Diffraktogramme und Kontrastübertragungsfunktion .....	18
4.1.5	Elektronentomographie .....	19
4.1.6	Strahlenempfindlichkeit von biologischem Material .....	20
4.1.7	Verfahren zur automatisierten Datenaufnahme von Kippserien .....	21
4.2	Digitale Bildverarbeitung .....	21
4.2.1	Alignierung der Projektionen .....	21
4.2.2	Rückprojektionsalgorithmen und Projektionstheorem.....	22
4.2.3	Gewichtete Rückprojektion .....	23
4.2.4	Iterative Rückprojektion .....	23
4.2.5	Bereich fehlender Information .....	24
4.2.6	Identifizierung von Mustern aufgrund ihrer strukturellen Signatur .....	24
4.3	Kryopräparation und Kryo-Ultramikrotomie .....	25
4.3.1	Vitrifizierung biologischer Proben <i>versus</i> Kryosubstitution .....	26
4.3.2	Kryoschnitte.....	26
5	Methoden.....	30
5.1	Zellbiologische Methoden .....	30
5.1.1	Kultivierung von <i>Cyanidioschyzon merolae</i> .....	30
5.1.2	Kultivierung von Hepatocyten.....	30
5.1.3	Kultivierung von <i>Drosophila</i> -Schneider-S2-Zellen .....	31
5.1.4	Kultivierung von <i>E.-coli</i> .....	33
5.2	Molekularbiologische Standardmethoden .....	34
5.2.1	Hitzeschocktransformation .....	34
5.2.2	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> .....	34
5.2.3	Amplifikation von <i>dtp II</i> aus pET30b_ <i>dtp-II</i> .....	34
5.2.4	Amplifikation von pMT/V5_ <i>dtp-II</i> in <i>E. coli</i> und DNS-Isolierung .....	35
5.2.5	Restriktionsendonukleolytische Spaltung des insertierten <i>dtp-II</i> -Gens .....	35
5.2.6	Trennung von DNS-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	36
5.2.7	Gelextraktion von DNS-Banden aus Agarosegelen.....	36
5.2.8	Quantifizierung der DNS.....	36
5.3	Proteinbiochemische Methoden und enzymologische Messungen.....	37
5.3.1	Aktivitätsmessung.....	37
5.3.2	Größenausschlusschromatographie.....	37
5.3.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
5.3.4	Westernblot .....	38
5.3.5	Immunmarkierung für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen .....	38
5.4	Kryopräparative Methoden.....	40
5.4.1	Vitrifizierung durch Einschuss in flüssiges Ethan .....	40
5.4.2	Hochdruckvitrifizierung .....	40
5.4.3	Hydratisierte Schnitte durch Vitrifizierung und Kryo-Ultramikrotomie .....	40
5.4.4	Kryofixierung von Hepatocyten.....	41

5.4.5	Kryosubstitution von <i>Drosophila</i> -Schneider-S2-Zellen .....	42
5.4.6	Kryofixierung von <i>Drosophila</i> -Schneider-S2-Zellen .....	42
5.5	Elektronenmikroskopische Methoden .....	42
5.5.1	Aufnahme der EM-Projektionsbilder .....	42
5.6	Methoden der digitalen Bildverarbeitung .....	43
5.6.1	Alignierung der Projektionen .....	43
5.6.2	Dreidimensionale Rekonstruktion .....	44
5.6.3	Visualisierung durch Segmentierung .....	44
5.6.4	Mustererkennung mittels lokal normierter Korrelationsfunktion .....	45
5.6.5	Iterationsverfahren zur Verfeinerung der gemittelten Struktur .....	46
6	Ergebnisse .....	46
6.1	Aufgabenstellung .....	46
6.2	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> .....	47
6.2.1	Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen .....	47
6.2.2	Vergleich ungeschnittener und kryogeschnittener Proben .....	48
6.3	HepG2-Zellen .....	50
6.3.1	Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen .....	51
6.3.2	Detektion von TPP II .....	52
6.3.3	Detektion von 80S-Ribosomen .....	53
6.4	<i>Escherichia coli</i> .....	55
6.4.1	Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen .....	55
6.4.2	Detektion von heterolog-überexprimierter dTPP II .....	55
6.4.3	Detektion von nativ-exprimierten 70S-Ribosomen .....	57
6.5	<i>Drosophila</i> -Schneider-S2-Zellen .....	61
6.5.1	Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen .....	61
6.5.2	Amplifikation des <i>dtp-II</i> -Gens .....	63
6.5.3	TOPO-Klonierung von <i>dtp-II</i> .....	64
6.5.4	Bestimmung der Überexpression von dTPP II .....	64
6.5.5	Immunfluoreszenz .....	68
7	Diskussion .....	69
7.1	Auswahl eines geeigneten Systems .....	69
7.1.1	Auswirkungen von Präparationsartefakten .....	69
7.1.2	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> .....	70
7.1.3	HepG2-Zellen .....	71
7.1.4	<i>Escherichia coli</i> .....	72
7.1.5	<i>Drosophila</i> -Schneider-S2-Zellen .....	72
8	Ausblick .....	76
9	Anhang .....	77
9.1	Material .....	77
9.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	77
9.1.2	Organismen und Zelllinien .....	81
9.1.3	Medien .....	81
9.1.4	Puffer und Lösungen .....	83
9.1.5	Antikörper .....	85
9.1.6	„Kits“ und „Standards“ .....	85
9.1.7	Enzyme .....	86
9.1.8	Nukleinsäuren .....	86
9.1.9	Geräte .....	86
10	Abkürzungen .....	89
10.1	Allgemeine Abkürzungen .....	89
10.2	Aminosäuren .....	91
10.3	Nukleobasen .....	91
11	Literaturverzeichnis .....	92
12	Danksagungen .....	98

# 1 Zusammenfassung

Ein aktuelles Anliegen in der Zellbiologie ist es, neben der molekularen „Inventarliste“ der Zelle auch die supramolekulare Organisation ihrer Bestandteile zu entschlüsseln.

Eine seit Jahrzehnten etablierte Untersuchungsmethode dafür ist die Elektronenmikroskopie und seit einiger Zeit auch ihre als „Elektronentomographie“ bezeichnete dreidimensional-abbildende Variante.

Finden diese Untersuchungen bei sehr tiefen Temperaturen statt (z.B. bei  $-268,93^{\circ}\text{C}$  (Temperatur flüssigen Heliums) oder bei  $-195,79^{\circ}\text{C}$  (Temperatur flüssigen Stickstoffs)), die die Beibehaltung annähernd physiologischer Bedingungen während der Präparation gewährleisten, so spricht man auch von „Kryoelektronenmikroskopie“ bzw. „Kryoelektronentomographie“.

Dadurch wird ein möglichst natürliches Abbild von „molekularen Landschaften“ einer Zelle, bzw. eines Zellausschnittes erzielt. In einer Art „visuellen, funktionellen Proteomforschung“ sollen so Aussagen über miteinander interagierende Proteinnetzwerke möglich werden.

Da typische eukaryotische Zellsysteme in der Regel zu dick sind, um als Ganzes elektronenmikroskopisch untersucht werden zu können, konnten Makromoleküle im zellulären Kontext bislang nur in kleinen bakteriellen Systemen oder den sehr dünnen Randbereichen eukaryotischer Zellen visualisiert werden. Es erscheint jedoch unbefriedigend, sich bei der Wahl der Proben auf dünne Zellen oder Zellareale, die als ganzes (*in toto*) untersucht werden können, beschränken zu müssen. Aus diesem Grunde müssen Methoden zur Probendisektion angewendet werden.

Im Fokus dieser Arbeit stehen daher Versuche, die Kryo-Ultramikrotomie (eine Methode zur Dissektion vitrifizierter Proben unter Flüssigstickstoffbedingungen), die Kryoelektronenmikroskopie und die automatisierte digitale Mustererkennung (eine computergestützte Methode zur Detektion und Lokalisierung makromolekularer Komplexe in Tomogrammen aufgrund ihrer digitalen Signatur) miteinander zu kombinieren.

Von besonderem Interesse ist die Visualisierung von Enzymen des proteolytischen Abbaus in eukaryotischen Systemen. Als Untersuchungsobjekt dient da-

bei die Tripeptidylpeptidase II (TPP II), eine dem 26S-Proteasom nachgeschaltete Peptidase, die bislang nur in eukaryotischen Zellen nachgewiesen wurde.

Zur visuellen Lokalisierung funktioneller Proteolyse-Netzwerke wurden vitrifizierte Schnitte von kultivierten eukaryotischen Hepatokarzinom- und Insektenzelllinien, sowie von einzelligen Rotalgen mit Hilfe der Kryo-Ultramikotomie angefertigt. Diese Schnitte wurden mittels Kryoelektronentomographie und mathematischer Algorithmen dreidimensional rekonstruiert und das resultierende Abbild des zellulären Volumens im Falle der Hepatokarzinomzelllinie nach der digitalen Signatur von TPP II abgerastert.

Eine Lokalisierung war auf diese Weise jedoch nicht möglich. Da TPP II in diesen Zellen lediglich in geringem Umfang exprimiert wird, wurden ebenfalls TPP-II-überexprimierende Bakterien untersucht, deren TPP-II-Expressionsrate deutlich höher war. Jedoch gelang auch hier der TPP-II-Nachweis mit den beschriebenen Methoden nicht. Dagegen war es sowohl in den Bakterien als auch in den Hepatokarzinomzelllinien möglich, die in deutlich größerer Anzahl exprimierten Ribosomen zu lokalisieren. Es konnte somit gezeigt werden, dass sich in ausreichendem Maße exprimierte makromolekulare Komplexe grundsätzlich in physiologischer Umgebung zellulär rekonstruieren und anschließend aufgrund ihrer Signatur lokalisieren lassen.

## **2 Abstract**

It is a current concern in cell biology to decipher not only the molecular "inventory" of the cell but also the supramolecular organisation of its constituents.

For a few decades electron microscopy and, more recently, its three-dimensional imaging variant "electron tomography" have become established methods.

Electron microscopes can be operated at very low temperatures (e.g., at temperatures of  $-268.93^{\circ}\text{C}$  (temperature of liquid helium) or at  $-195.79^{\circ}\text{C}$  (temperature of liquid nitrogen) to maintain nearly physiological conditions. The corresponding techniques are commonly referred to as "cryo-electron microscopy" or "cryo-electron tomography".

Thereby a most lifelike image of "molecular landscapes" of a cell or a cell cut-out is achieved. The aim of such a "visual and functional proteomics approach" is to gain information on interacting protein networks.

Since typical eukaryotic cell systems are generally too thick to be examined by electron microscopy *in toto*, macromolecules have so far only been detectable in small bacterial systems or in very thin edge regions of eukaryotic cells. However, a limitation to thin cells or cell cut-outs which can be studied *in toto* appears to be unsatisfactory. Therefore, methods for dissecting the samples are required.

Hence, the focus of this thesis was the attempt to combine cryo-ultramicrotomy (a method to dissect vitrified samples), cryo-electron tomography and automated digital pattern recognition (computer-based method for the localisation of macromolecular complexes in tomograms due to their structural signature). The visualisation of proteolytic degradation enzymes in eukaryotic systems is of particular interest. Therefore, tripeptidylpeptidase II (TPP II) a peptidase operating downstream of the 26S proteasome which has so far only been proven to exist in eukaryotic cells was chosen as the object of investigation.

Vitrified sections of cultured hepatocarcinoma cell lines, insect cell lines, and red algae were prepared by cryo-ultramicrotomy. These sections were three-dimensionally reconstructed by means of cryo-electron tomography and mathematical algorithms. After reconstruction, the resulting virtual cellular volume of the hepatocarcinoma cell line was scanned for the structural signature of TPP II.

Due to its low expression rate, TPP II was not localisable in liver cancer nor in insect cell lines. Therefore, also TPP II overexpressing bacteria were investigated, which had a significantly higher expression rate than the eukaryotic cell lines. However, even here the TPP II detection/localization was not possible with the methods described. In contrast, it was possible both in bacteria as well as in the hepatocarcinoma cell line to localise ribosomes, which are expressed in significantly greater numbers. Hence, it could be demonstrated by this thesis that macromolecular complexes which are sufficiently expressed can be reconstructed and subsequently be localised by their structural signature in a physiological environment.

## 3 Einleitung

### 3.1 Tripeptidylpeptidase II (TPP II)

#### 3.1.1 Zelluläre Funktionen von TPP II

TPP II ist eine Exopeptidase vom Subtilisin-Typ und gehört damit zur Gruppe der Serinproteasen (Tomkinson et al. 1987), (Tomkinson 1994). Sie entfernt pro katalytischem Schritt drei N-terminale Reste (Tripeptide) gleichzeitig (Bälöw et al. 1983). Neben ihrer Funktion als Exopeptidase konnte eine endoproteolytische Aktivität mit einer trypsinähnlichen Spezifität nachgewiesen werden (Geier et al. 1999), (Seifert et al. 2003).

Man vermutet, dass sie beim zellulären Proteinabbau in den meisten eukaryotischen Zellen neben dem Proteasom eine Schlüsselrolle einnimmt. *In vivo* müssen einige organisatorische Voraussetzungen für eine effiziente Proteindegradation erfüllt sein. So wird zum Beispiel angenommen, dass das Cytoplasma in lokal mehr oder weniger nicht durch Membranen begrenzte Mikrokompartimente untergliedert ist, in denen sich Proteine des gleichen Stoffwechselweges nahe beieinander befinden (Hoppert und Mayer 1999), (Srere 1987), (Malaisse 1996). Auf diese Weise ist gewährleistet, dass Proteine *in situ* vollständig degradiert werden können, ohne diffusionskontrolliert lange Wege zurücklegen zu müssen. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die notwendigen Umsatzgeschwindigkeiten des Proteinabbaus dar.

#### 3.1.2 Visualisierung von TPP II im zellulären Kontext

Eine intrazelluläre Lokalisierung von TPP II könnte daher zu Erkenntnissen über die cytoplasmatische Kompartimentierung der Zelle und im Idealfall zur Visualisierung des Komplexes im postulierten Wechselspiel mit anderen Komponenten des ubiquitinabhängigen Proteolyseapparates führen.

Dazu ist eine Technik nötig, mit der ein Ausschnitt aus einer Zelle in einer möglichst physiologischen Umgebung rekonstruiert und dreidimensional abgebildet werden kann. Außerdem muss die Methode einigen weiteren Ansprüchen genügen: Das Cytosol einer Zelle ist ein hochsensibles Gefüge aus Proteinen, Lipiden, Polysacchariden, Nukleinsäuren, kleinen organischen und anorgani-

schen Molekülen und Ionen. Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Bedingungen muss daher besonderes Augenmerk auf eine minimal-invasive Präparation der Probe gelegt werden. Bei jeder Art von Dehydratisierung, Trocknung oder chemischer Fixierung besteht die Gefahr, dass sich die Struktur des Cytoplasmas derart verändert, dass lösliche Komponenten untereinander oder mit Membranstrukturen aggregieren und somit das molekulare Arrangement der Zelle nicht erhalten bleibt. Die derzeit einzige praktikable Möglichkeit, Teile des Cytoplasmas eukaryotischer Zellen unter Bedingungen dreidimensional abzubilden, die der natürlichen Umgebung möglichst nahe kommen, ist die Kryoelektronentomographie.

Die Kryoelektronentomographie kann pleomorphe Strukturen, wie Zellen oder Organellen abbilden, ohne dass die Probe zuvor entwässert, getrocknet und/oder kontrastiert werden muss. Der Vorteil der tomographischen Rekonstruktion ganzer, ausreichend dünner Zellen gegenüber konventioneller zweidimensionaler Mikroskopietechniken, bei denen sich die Informationen in axialer Richtung (der Richtung des Elektronenstrahls) überlagern, liegt also in der Bereitstellung dreidimensionaler Momentaufnahmen der zellulären Architektur. Zelluläre Kryoelektronentomogramme bilden damit die räumliche Organisation des gesamten Zellproteoms ab (Nickell et al., 2006).

### 3.1.3 Struktur von TPP II

Die aus Eiern der schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*) isolierte und vollständig assemblierte TPP II bildet einen 6-MDa schweren Spindelkomplex mit Dimensionen von 60 x 28 nm (Rockel et al., 2005). Diese charakteristische Struktur leitet sich ab aus zwei segmentierten und spiralig umeinander gewundenen Strängen mit einer Breite von 12,5 nm, die aus insgesamt 40 Kopien einer einzigen Untereinheit bestehen. Diese Untereinheit hat bei Säugern, Pflanzen und Nematoden eine Masse von 138 kDa (Hilbi et al. 2002) und bei *D. melanogaster* eine Masse von 150 kDa (Renn et al. 1998), (Rockel et al. 2002). Die terminalen Dimere eines jeden Stranges

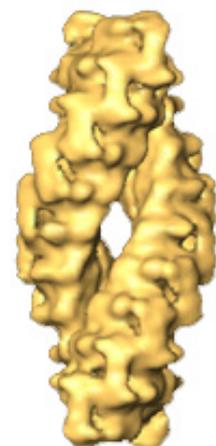


Abb. 3.1: Dreidimensionale Rekonstruktion einer TPP-II-Spindel mit einer Auflösung von 2,2 nm

interagieren mit den Dimeren des gegenüberliegenden Stranges und bilden so eine Art Doppelklemme (Rockel et al. 2005). Aufgrund ihrer charakteristischen Spindelform und Größe sollte sich TPP II deutlich von anderen makromolekularen Komplexen unterscheiden und mittels elektronentomographischer Untersuchungen in geeigneten Systemen detektieren lassen.

### 3.1.4 Notwendigkeit zur Probendissektion geeigneter Systeme

TPP II konnte ausschließlich in Eukaryonten nachgewiesen werden. Eukaryotische Zellen sind jedoch in der Regel zu dick, um als Ganzes elektronenmikroskopisch untersucht werden zu können. Aus diesem Grunde müssen diese Proben mit Hilfe der Kryo-Ultramikrotomie bei Temperaturen von etwa  $-160^{\circ}\text{C}$  geschnitten werden. Auf diese Weise können vitrifizierte Serienschnitte erzeugt werden, die einerseits noch dick genug sind, um zelluläre Bestandteile zu enthalten, jedoch auf der anderen Seite ausreichend dünn sind, um auch eukaryotische Zellen *in parte* unter möglichst physiologischen Bedingungen elektronenmikroskopisch untersuchen zu können.

Die Methode ist artefaktbehaftet. Dennoch ist derzeit keine geeignetere Methode verfügbar, die die elektronenmikroskopische Untersuchung einer eukaryotischen Probe unter nahezu physiologischen Bedingungen ermöglicht. Die Artefakte werden nachfolgend beschrieben (siehe 4.3.2).

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Dissertation (und bis ins Jahr 2005 hinein), galten solche biologische Proben für die Kryo-Ultramikrotomie als besonders geeignet, die eine gewisse Rigidität aufweisen und deswegen den Kräften, die während des Schneideprozesses auftreten, vermeintlich besser widerstehen. Anfänglich wurden Bakterien und Pflanzenzellen als potentiell bestgeeignete Proben für die Hochdruckvitrifikation in Kombination mit der Kryo-Ultramikrotomie eingestuft, da sie eine feste Zellwand besitzen. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass verhältnismäßig weiches Leberepithelgewebe nach Vitrifikation erfolgreich geschnitten werden konnte (Hsieh et al. 2002).

Als Testorganismus, der eine der einfachsten einzelligen eukaryotischen Lebensformen mit einer stabilen Zellwand sein sollte, wurde die einzellige Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* ausgewählt. Dieser Protist hat eine geringe Größe, die es ermöglicht, seine Architektur sowohl *in toto* – wenn auch mit Einschränkungen – als auch in Schnitten zu studieren.

*C. merolae* tritt in der Regel in einer Mischkultur zusammen mit einer weiteren Rotalge (*Cyanidium caldarium*) auf. *C. merolae* und *C. caldarium* sind einander in Größe und Struktur sehr ähnlich, jedoch lassen sie sich elektronenmikroskopisch anhand ihres Zellzyklusses unterscheiden: *C. merolae* hat eine elongierte Form und vermehrt sich ausschließlich vegetativ (De Luca et al. 1978). Es besitzt keine Vakuole und lediglich ein Mitochondrium und einen Plastid (De Luca et al. 1978).

*C. caldarium* ist dagegen sphärisch und teilt sich in vier Autosporen (De Luca et al. 1978). Eine typische Vakuole ist auch hier nicht vorhanden. Ebenso wie bei *C. merolae* finden sich in diesen Zellen genau ein Mitochondrium, ein Plastid und ein Zellkern (Kuroiwa 1998).

Das Genom von *C. merolae* wurde kürzlich vollständig sequenziert (Nozaki et al. 2007). Seitdem ist bekannt, dass *C. merolae* (aufgrund seiner Einfachheit) nicht mit allen Proteinen des für die vorliegende Arbeit interessanten ubiquitin-abhängigen Proteolyseapparates höherer Eukaryonten ausgestattet ist. So konnte zwar die Anlage für das 26S-Proteasom im Genom von *C. merolae* nachgewiesen werden, jedoch findet sich kein Hinweis auf TPP II oder homologe Strukturen. Damit eignet sich *C. merolae* für diese Arbeit lediglich als Testorganismus zur Etablierung der Kombination von Kryo-Ultramikrotomie und Kryoelektronentomographie, nicht jedoch für weiterführende Studien auf molekularer Ebene.

Leberepithelzellen waren dagegen die ersten Zellen, aus denen TPP II isoliert wurde (Bålów et al. 1983). Die humane Hepatokarzinomzelllinie HepG2 wurde daher im Rahmen dieser Arbeit mit dem Ziel kultiviert, eine TPP-II-enhaltene, einfach zu kultivierende Zelllinie zur Hochdruckvitrifikation und Kryosektion zur Verfügung zu haben, anhand derer die anschließenden Lokalisations- und Visualisierungsstudien makromolekularer Komplexe im zellulären Kontext mittels Elektronentomographie durchgeführt werden können.

Allerdings beträgt die Menge des exprimierten TPP-II-Proteins in Hepatocyten nur 0,05-0,1% der gesamten Proteinmasse, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Detektion gering ist. Wie bereits in 3.1.1 erwähnt wurde, wird jedoch vermutet, dass TPP II im Cytoplasma nicht homogen verteilt ist, sondern aufgrund ihrer Funktion in Form proteolytischer Netzwerke zusammen mit anderen Kom-

ponenten des Proteinabbaus akkumuliert ist und so möglicherweise in bestimmten Zellregionen bevorzugt gefunden werden kann.

In unserer Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass heterolog-exprimiertes dTPP II auch im bakteriellen System (*E.-coli*) zu einem spindelförmigen Komplex assembliert (Rockel et al. 2005). dTPP-II-überexprimierende *E.-coli*-Bakterien wurden daher im Rahmen dieser Arbeit als weiteres Testsystem kultiviert, da sie, verglichen mit autolog-TPP-II-exprimierenden Systemen, größere Mengen an TPP II enthalten. In dem hier verwendeten *E.-coli*-Stamm macht dTPP II einen Anteil von 5% an der gesamten löslichen Proteinmasse aus, wobei der Komplex in der charakteristischen Spindelform aus den Bakterien isoliert werden konnte (Seyit 2006). Geht man von einer Gesamtprotein-konzentration von 150-200 mg/mL aus, so entfallen darauf maximal 10 mg/mL dTPP II (ca. 1.000 Spindeln pro  $\mu\text{m}^3$ ). Umgerechnet auf das rekonstruierte Bakterienvolumen der Kryoschnitte von ca.  $0,06 \mu\text{m}^3$  (bei einer Schnittdicke von 100 nm) sollten also im Idealfall etwa 60 dTPP-II-Spindeln im Cytoplasma des Schnittvolumens vorhanden sein.

Zur Kontrolle, ob eine Detektion makromolekularer Komplexe in Tomogrammen von Kryoschnitten grundsätzlich möglich ist, wurde die signaturgestützte digitale Erkennung auch an Ribosomen durchgeführt. Ribosomen kommen in einer Zelle von *E.-coli* etwa zu 15.000 Stück vor. Bezogen auf das rekonstruierte Schnittvolumen entspricht das einer prinzipiell detektierbaren Menge von etwa 940 Ribosomen. Ribosomen sollten somit mit einer etwa 16-fach höheren Wahrscheinlichkeit detektierbar sein als TPP-II-Spindeln.

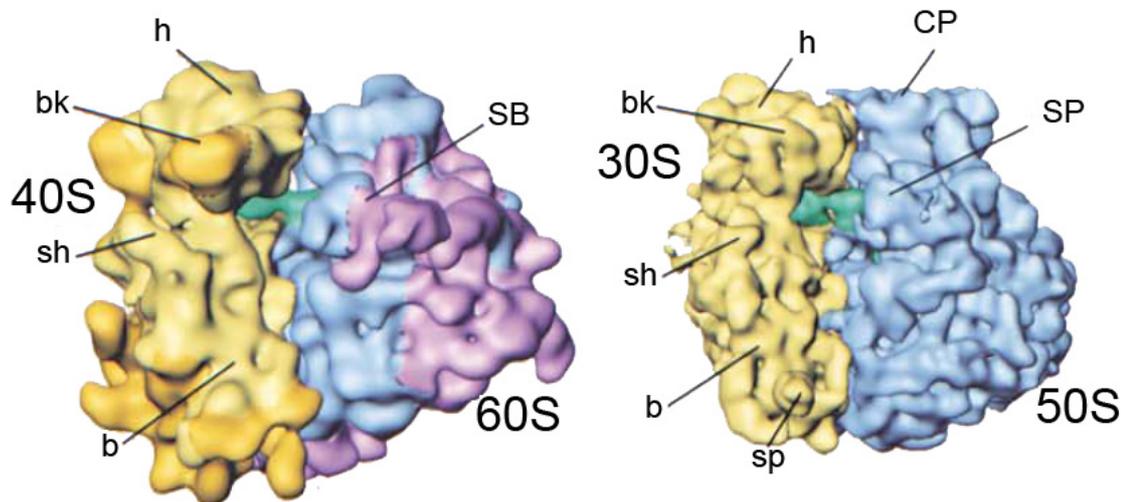
## 3.2 Ribosomen

### 3.2.1 Strukturen pro- und eukaryotischer Ribosomen

Ribosomen übersetzen genetische Informationen in Aminosäuresequenzen und bilden damit die Schlüsselmaschinerie für die Proteinbiosynthese.

Prokaryotische Ribosomen sind 21 nm große multifunktionale Partikel (Spahn et al. 2001), die aus einer kleinen Untereinheit (30S) und einer großen Untereinheit (50S) aufgebaut sind. Beide Untereinheiten zusammen formen den kataly-

tisch funktionellen 70S-Ribosomenkomplex (Ramakrishnan 2002). Im Gegensatz zu den meisten anderen zellulären Maschinen, besitzt das Ribosom einen funktionellen Kern aus ribosomaler RNS (rRNS), der durch 50-80 ribosomale Proteine (Green und Noller 1997) und akzessorische Faktoren verstärkt wird.



**Abb.: 3.2: Kryoelektronenmikroskopische Dichtekarten von Ribosomen aus Spahn et al. (Spahn et al. 2001)**

Links: 80S-Ribosom aus Hefe, rechts: 70S-Ribosom aus *E. coli*

Die Ribosomen sind aus der L7/L12-Ansicht gezeigt. Die kleinen ribosomalen Untereinheiten sind in gelb, die großen ribosomalen Untereinheiten in blau und die an die P-Stelle gebundenen tRNS in grün dargestellt. Zusätzliche Teile der eukaryotischen 80S-Ribosomen durch Expansionssegmente in den rRNS und nicht-homologe Proteine sind goldfarben (40S-Untereinheit) und lilafarben (60S-Untereinheit) dargestellt. b: Körper; bk: Rüssel h: Kopf; lf: linker Fuß; rf: rechter Fuß; pt: Plattform; sh: Schulter; sp: Sporn. CP, zentrale Ausstülpung; L1: L1-Ausstülpung; SB: Stielansatz; St: L7/L12-Stiel; H34: Helix 34; H38: Helix 38; SRL: Sarcin-Ricin-Loop.

Im Falle des prokaryotischen Ribosoms konnten die Strukturen beider Untereinheiten aus *E. coli* mittels Röntgenkristallanalyse bis zu einer Auflösung von 3,5 Å gelöst werden (Schuwirth et al. 2005).

Während die 16S-rRNS der kleinen Untereinheit fast ausschließlich für den Dekodierungsprozess verantwortlich ist (Carter et al. 2000), (Spahn et al. 2001), katalysiert die 23S rRNS der großen Untereinheit die Peptidyltransferaseaktivität (Nissen et al. 2000).

Der eukaryotische 80S-HoloKomplex wird durch die kleine 40S- und die große 60S-Untereinheit gebildet. Die 40S-Untereinheit von *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus der 18S rRNS und 32 ribosomalen Proteinen. Die 40S-Untereinheit enthält 11 Proteine mehr als ihr 30S-Homolog in *E. coli* (Spahn et al. 2001).

Aufgrund dessen, dass die rRNS und ribosomale Proteinen evolutionär in hohem Grade konserviert ist, kann angenommen werden, dass die ribosomalen Untereinheiten in Pro- und Eukaryonten eine ähnliche räumliche Anordnung

einnehmen. Insertionen in den rRNS-Molekülen und das Vorhandensein von 20 bis 30 zusätzlichen Proteinen (Planta und Mager 1998) sind dafür verantwortlich, dass eukaryotische Ribosomen größer als ihre prokaryotischen Homologe sind. Es gibt funktionelle Unterschiede bezüglich der Initiation, die in Eukaryoten komplexer ist (Sachs et al. 1997). Darüber hinaus gibt es Unterschiede in der Elongationsphase (so benötigt z.B. das Ribosom aus Hefe einen dritten Elongationsfaktor (EF3) (Triana-Alonso et al. 1995)).

### **3.3 Etablierung eines TPP-II-überexprimierenden eukaryotischen Systems**

Mittels eines *Drosophila*-Expressionssystems für dTPP II sollte eine Umgebung bereitgestellt werden, in der genetische Modifikationen in die TPP-II-Sequenz eingebracht werden können. Durch einen fluoreszierenden „Tag“ sollen in Zukunft mittels korrelativer Mikroskopie Aussagen über die Lokalisation des Proteins machbar sein, ohne dass die Zellen zuvor fixiert und immunmarkiert werden müssen. Das verwendete *Drosophila*-Expressionssystem (DES) der Firma Invitrogen bedient sich für die Expression von rekombinanten Proteinen in *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen einfacher Plasmide. Das System kommt ohne Zellyse aus (Invitrogen 2007). Eine schnelle, transiente Expression kann nach Herstellerangaben in diesen Gewebezellen innerhalb von zwei bis sieben Tagen nach der Transfektion erzielt werden.

*Drosophila*-Schneider-S2-Zellen wurden erstmalig von Imogene Schneider im Jahre 1972 aus *Drosophila*-Embryos isoliert (Schneider 1972). Es handelt sich dabei um die Gewebezellen, die sich vermutlich aus embryonischen, makrophagenähnlichen Zellen (Hämocyten) entwickeln. Die Hämolymphe von *Drosophila* besteht aus Hämocyten, die entweder frei in den Hohlräumen des Organismus zirkulieren oder sessil mit verschiedenen Gewebearten oder Organen assoziiert sind. *In vivo* wirken Insektenhämocyten unter anderem an der Immunabwehr mit, indem sie Eindringlinge, wie Bakterien durch Phagozytose aktiv umschließen und intrazellulär abbauen. Darüber hinaus degradieren sie nekrotische und apoptotische Körperzellen und sind sowohl essentiell für die Bildung der verschiedenen Gewebeformen als auch für die Umgestaltung der Organe während der Metamorphose. Von einer hohen basalen proteolytischen Aktivität der

*Drosophila*-Schneider-S2-Zellen kann daher ausgegangen werden, was sie zu interessanten Objekten für die Untersuchung des ubiquitinabhängigen Proteinabbauweges macht.

## 4 Grundlagen

### 4.1 Elektronenmikroskopie

#### 4.1.1 Techniken zur Abbildung biologischer Objekte

Transmissionselektronenmikroskope (TEM) bieten die Möglichkeit Strukturen zu untersuchen, die deutlich unter der Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen liegen. Dabei führen die Elektronen, die das Objekt durchstrahlen, ähnlich wie das Licht im Lichtmikroskop, zur Abbildung. Es können auf diese Weise Strukturen von biologischen Objekten unter idealen Bedingungen mit einer Auflösung von 2 nm oder höher bestimmt werden.

#### 4.1.2 Aufbau eines Elektronenmikroskops

Der Aufbau eines Elektronenmikroskops lässt sich mit dem eines Lichtmikroskops vergleichen. Da jedoch Elektronen zur Abbildung von Objekten führen, sind hier die herkömmlichen optischen Linsensysteme des Lichtmikroskops durch magnetische Komponenten ersetzt. Die Sammelfunktion der Linsen wird daher durch eisenummantelte, stromdurchflossene Wicklungen bewerkstelligt. Das resultierende Magnetfeld wird durch den Eisenmantel auf das Linseninnere gerichtet.

Als Strahlungsquelle stehen funktionell verschiedene Kathoden zur Verfügung, die gemäß der für das Kathodenmaterial charakteristischen Austrittsenergie ( $E_a$ ) freie Elektronen emittieren, die auf ihrem Weg zum Objekt in einem Hochspannungsfeld in Richtung der Anode beschleunigt werden. Gebräuchliche Beschleunigungsspannungen liegen im Bereich von 100 bis 400 Kilovolt (kV). Als Glühkathoden eignen sich aufgrund des hohen Schmelzpunktes Wolfram ( $E_a = 4,5$  eV, Betriebstemperatur: 2800 K) und Lanthanhexaborid ( $\text{LaB}_6$ ,  $E_a = 2,7$  eV, Betriebstemperatur: 1400-2000 K).

Eine weitere Variante stellt die Feldemissionskathode (engl.: *FEG = field emission gun*) dar. Sie besteht aus einer Wolframspitze als Kathode, einem Extraktor, einer *Gun*-Linse, der Beschleunigerlinse und zwei nacheinander angeordneten Anoden. Durch den sehr kleinen Radius der Spitze (üblicherweise 100 nm) können die Elektronen aus dem energetischen Bereich des Fermi-Niveaus ins Vakuum tunneln. Dadurch werden eine bessere räumliche und zeitliche Kohärenz der Elektronen, eine schärfere Energieverteilung und eine wesentlich höhere Helligkeit bei geringerer Betriebstemperatur im Vergleich zur Glühkathode erzielt. So werden auch Objekte scharf abgebildet, die nicht exakt im Fokus liegen.

Damit die mittlere freie Weglänge der Elektronen ausreicht, um das Objekt zu durchdringen und sie nicht durch Stöße mit Gasmolekülen abgelenkt werden, muss der Strahlengang des Elektronenmikroskops bis zu einem Hochvakuum ( $10^{-5}$  bis  $10^{-7}$  mbar) evakuiert sein. Am Anfang des Strahlenganges steht ein Kondensorsystem aus (meist zwei) Kondensorlinsen und einer Apertur, das die Aufgabe hat, den Sammelwinkel der Objektivlinse, die hinter dem Objekt angeordnet ist, zu beschränken. Auf diese Weise werden durch die Probe stark gebeugte Elektronen ausgeblendet und die Objektivapertur gleichmäßig beleuchtet.

Mittels Zwischenlinsen wird die Abbildungsgröße durch zusätzliche Aufweitungen des Strahlengangs erhöht. Durch Ablenkspulen kann der Elektronenstrahl auf der Probe verschoben werden. Diese Funktion wird als Strahlversatz bezeichnet. Das entstandene Bild lässt sich durch weitere Ablenkspulen in der Bildebene verschieben. Diese Funktion bezeichnet man als Bildversatz.

Das Bild der Probe wird auf einem Zinksulfid-Leuchtschirm sichtbar gemacht, dessen Fluorophore durch die auftretenden Elektronen angeregt werden und Licht im sichtbaren Wellenbereich emittieren. Alternativ können die Elektronen auch einen photographischen Film belichten oder auf eine empfindliche, CCD-Kamera (engl.: *CCD = charge coupled device*) mit hoher Ausleserate fokussiert werden, die die Intensitätsverteilung  $I(x)$  eines Bildes in digitaler Form an einen Computer weiterleitet und somit eine sofortige Bildverarbeitung ermöglicht. Solche Kameras bestehen üblicherweise aus einem Szintillator, der die Elektronen in Photonen umwandelt, einer doppelten Glasfaseroptik und einem CCD-

Chip, der die auftreffenden Photonen wieder in ein Elektronensignal rückwandelt. Der Einfluss des Dunkelstroms sowie die Eigenstruktur des Systems (Wellenstruktur der Faseroptik und unterschiedliche Empfindlichkeit der CCD-Pixel) müssen nach der Aufnahme korrigiert werden. Dazu wird ein Leerbild mit gleichmäßiger Beleuchtung des Szintillators der CCD-Kamera aufgenommen, das später von den Projektionen während einer Kippserie subtrahiert wird.

### 4.1.3 Theorie der Streuung und Abbildung

Elektronen können als Quanten oder als elektromagnetische Wellen beschrieben werden. Die Vorstellung, dass beschleunigte Elektronen als Materiewellen aufgefasst werden können, und somit einen Impuls  $p$  besitzen, führt zu der *De-Broglie*-Beziehung, über die die Wellenlänge  $\lambda$  mit dem Impuls  $p$  im Zusammenhang steht.

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (2.1)$$

Zum Verständnis der auftretenden Streuvorgänge muss die Wellenlänge auf diese (relativistische) Weise interpretiert werden.

Im Transmissionselektronenmikroskop besitzen die Elektronen annähernd Lichtgeschwindigkeit, wodurch sich für deren Wellenlänge die folgende Beziehung ergibt:

$$\lambda = h \cdot c \frac{1}{\sqrt{2E_0E + E^2}}$$

$$E = U_b \cdot e_0 \quad (2.2)$$

$$\lambda \approx 3,7 \cdot U_b^{-0,6}$$

mit:

$$h = 6,6262 \times 10^{-34} \text{ Js} \quad (\text{Planck'sches Wirkungsquantum})$$

$$c = 2,9979 \times 10^8 \text{ ms}^{-1} \quad (\text{Lichtgeschwindigkeit})$$

$$E_0 = 8,14 \times 10^{-14} \text{ Nm} \quad (\text{Ruheenergie der Elektronen})$$

$$e_0 = 1,6022 \times 10^{-19} \text{ C} \quad (\text{Elementarladung eines Elektrons})$$

$$E \quad (\text{kinetische Energie der Elektronen})$$

Für Elektronen mit einer Beschleunigungsspannung ( $U_b$ ) von 100 kV ist die *De-Broglie*-Wellenlänge (gemäß Gleichung 2.2) 0,0037 nm, für 300 kV 0,0019 nm und damit etwa um den Faktor 100.000 kleiner als bei lichtmikroskopischen Techniken.

Dünne Präparate und Molekülkomplexe, die vornehmlich aus leichten Atomen bestehen, stellen in erster Näherung schwache Phasenobjekte dar. Der Phasenkontrast entsteht durch Interferenz der von der Probe gebeugten Strahlen mit dem Primärstrahl: Der Primärstrahl wird durch das Objektpotential verzögert und weist daher beim Austritt aus der Probe eine geringe Phasenverschiebung  $\Delta\varphi$ , und eine kleine Amplitude gegenüber dem nicht gebeugten Nullstrahl auf. Die phasenverschobenen Elektronen, die durch die Objektivblende gelangen, werden durch die Objektivlinse mit dem ungebeugten Primärstrahl zur Interferenz gebracht. Die aus der Wechselwirkung des Primärstrahls mit der Probe resultierende Elektronenwelle wird auch als Objektwellenfunktion bezeichnet. Infolge dieser Beugung entsteht als Bild eines Punktes ein „Beugungsscheibchen“ endlichen Durchmessers (Verteilung der Beleuchtungsstärke um einen Sollbildpunkt). Die Beugung fällt umso größer aus, je höher die Ladung des Kerns ist und je langsamer das Elektron den Kern passiert.

Die für die Bildentstehung wichtigsten Streueignisse sind elastische Streuungen. Bei der elastischen Streuung erfahren die eingestrahlten Elektronen bei nicht zu großen Streuwinkeln keinen nennenswerten Energieverlust, während bei der inelastischen Streuung ein Teil ihrer Energie absorbiert wird. Das heißt, die Atome der Probe werden in einen angeregten Zustand versetzt und die einfallenden Elektronen verlieren dadurch eben diesen Energiebetrag. Ihre Wellenlänge nimmt aufgrund der reziproken Beziehung zwischen  $E$  und  $\lambda$  zu, während sich ihre Frequenz verringert. Mit zunehmender Präparatdicke steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Elektronen mehrfach gestreut werden, bis zu dem Grenzfall, dass sie das Objekt nicht mehr durchstrahlen können. Präparate müssen deshalb dünn genug sein, um abgebildet werden zu können.

Durch den Einsatz von Mittel- und Hochspannungsmikroskopen mit einer Beschleunigungsspannung von mindestens 300 kV und einem Energiefilter kann die Abbildung dickerer Proben optimiert werden, indem die mittlere freie Weglänge der Elektronen vergrößert und inelastisch gestreute Elektronen aus den

Abbildungen herausgefiltert werden. Es tragen daher nur noch die Elektronen zur Bildentstehung bei, die im Energiebereich des Primärstrahls (300 keV  $\pm$  10 keV) liegen. Diese Mikroskopieform wird daher auch „zero-loss-Mikroskopie“ genannt. Mikroskope, die mit solchen Energiefiltern ausgestattet sind, werden auch als Energiefilter-Transmissionselektronenmikroskope (EFTEM) bezeichnet.

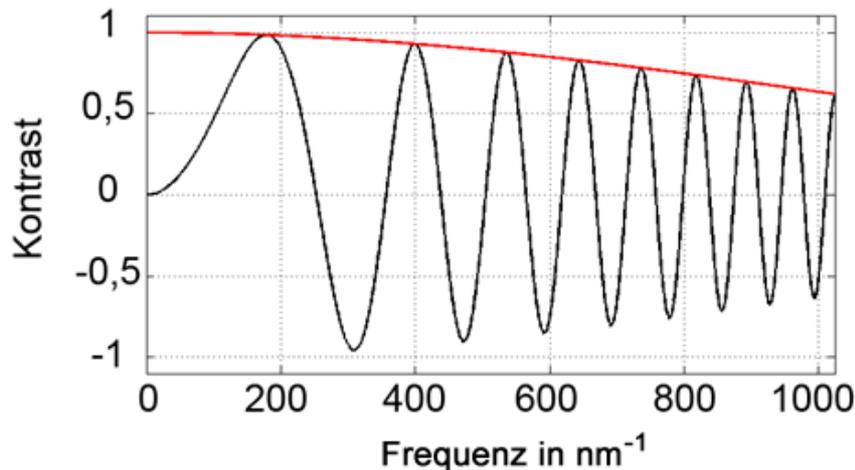
#### 4.1.4 Diffraktogramme und Kontrastübertragungsfunktion

Das elektronenmikroskopische Bild ist eine Funktion aus der abgebildeten Struktur des Objektes und der Kontrastübertragung des Mikroskops, die von den Mikroskop-Einstellungen abhängt. Sie beschreibt, wie Amplituden- (Dämpfungsfunktion) und Phaseninformation (Phasenverschiebung) der Objektwellenfunktion bei der elektronenmikroskopischen Abbildung auf das aufgezeichnete Bild übertragen werden. Beide Komponenten dieser Funktion werden getrennt von einander fouriertransformiert und miteinander multipliziert (math.: *gefaltet*).

Wenn elektromagnetische Strahlen durch die Objektivlinse treten, entstehen je nach Beugungswinkel Bereiche mit positivem und andere mit negativem Phasenkontrast, die von Ortsfrequenzen getrennt werden, die keine Kontrastinformationen besitzen (Übertragungslücken). Die Abbildung dieser sogenannten Thonschen Ringe wird auch als optisches Diffraktogramm bezeichnet. Der wichtigste Parameter, der sich aus einem solchen Diffraktogramm für die Kryoelektronentomographie ableiten lässt, ist die Fokusslage, denn die Lage der Übertragungslücken ist unmittelbar abhängig von der Fokussierung. Treffen Ortsfrequenzen der zu untersuchenden Struktur in diese Übertragungslücken, werden diese nicht übertragen und fehlen in der elektronenmikroskopischen Aufnahme.

Das Objekt wird im Hinblick auf bestimmte Strukturdetails (Ortsfrequenzen) also unvollständig oder mit dem falschen Kontrast abgebildet. Wird die Bildebene des Objektivs abgebildet ( $\Delta z=0$ ) spricht man vom Gaußschen Fokus. Für ein ideales Mikroskop ohne Öffnungsfehler ist dann kein Phasenkontrast zu erkennen

Befindet sich ein Objekt nicht in der zur Bildebene konjugierten Objektebene der Linse, so führt auch hier der Unterschied des optischen Weges für achsen- nahe und achsenferne Strahlen zu einer Phasenverschiebung, die vom Defokus ( $\Delta z$ ) abhängt. Von Unterfokus spricht man bei einer Fokusslage von  $\Delta z > 0$ , Überfokus eine solche mit  $\Delta z < 0$ .



**Abb. 4.1:**  
**Zusammenhang zwischen Ortsfrequenz und Kontrast.** Die Kontrasttransferfunktion (CTF) ist hier dargestellt für eine Beschleunigungsspannung von 300 kV, einen Defokus von  $-10 \mu\text{m}$  und eine sphärische Aberration von 2 mm. Die Kontrasttransferfunktion eines Mikroskops ist abhängig von dessen magnetischen und optischen Bauteilen und dem gewählten Defokus

### 4.1.5 Elektronentomographie

Die Elektronentomographie basiert auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Objektes aus verschiedenen Kippwinkeln um eine Kippachse, die orthogonal zu dem Elektronenstrahl verläuft. Aus den so aufgezeichneten Projektionen, deren Ursprung und Orientierung sich im Raum aus der Kippgeometrie ergibt, kann durch mathematische Verfahren (Rückprojektionsalgorithmen) das Objekt dreidimensional rekonstruiert werden (siehe 4.2.2).

Für die Elektronentomographie müssen die Proben besonders dünn sein, da sich der Weg, den die Elektronen durch die Probe zurücklegen müssen, in Abhängigkeit vom Kippwinkel verlängert. Dies ist mit Hilfe trigonometrischer Überlegungen leicht verständlich. So nimmt die apparente Dicke der Probe mit steigendem Kippwinkel ( $\alpha$ ) zu:

$$l_{\text{Probe}}^{\alpha} = \frac{l_{\text{Probe}}^{0^{\circ}}}{\cos \alpha} \quad (2.4)$$

mit	$I_{\text{Probe}}^{\alpha}$	(Weglänge der Elektronen durch die um $\alpha$ gekippte Probe)
	$I_{\text{Probe}}^{0^{\circ}}$	(Weglänge der Elektronen durch die ungekippte Probe)
	$\alpha$	(Kippwinkel)

Diese Gleichung ist essentiell für die Beurteilung, ob sich eine Probe für die elektronentomographische Untersuchung eignet, denn auch bei hohen Kippwinkeln (und damit einer größeren apparenten Dicke) müssen noch genug Elektronen die Probe durchstrahlen können, damit eine Abbildung des Objektes erreicht werden kann. Die mittlere freie Weglänge der Elektronen, das heißt die durchschnittliche Weglänge, die ein Elektron zwischen zwei Streuprozessen zurücklegt, nimmt mit zunehmender Elektronenenergie zu (gemäß Gleichung 2.2 beträgt die mittlere freie Weglänge ( $\Lambda_{el}$ ) bei  $U_b = 100$  kV etwa 100 nm, bei  $U_b = 300$  kV etwa 250 nm).

#### 4.1.6 Strahlenempfindlichkeit von biologischem Material

Die Aufnahme von Projektionsserien über einen möglichst großen Kippwinkelbereich bei gleichzeitig möglichst kleinem Winkelinkrement führt jedoch dazu, dass die Probe einer hohen kumulativen Elektronendosis ausgesetzt wird und so im biologischen Material durch irreversible Strahlungsschäden Radikale induziert werden können, was zum Verlust von Strukturinformation führen kann. Die Bestrahlungsdosis muss daher, besonders bei Untersuchungen in vitrifiziertem Eis (siehe 4.3), sehr gering gewählt werden.

Bei kryotomographischen Untersuchungen muss der zulässige Elektronenquerschnitt (etwa  $20 - 40 \text{ e}^- / \text{\AA}^2$ ) auf alle Einzelbilder einer Kippserie verteilt werden, wodurch jedes einzelne Bild nur mit einem Bruchteil der abbildenden Elektronen bestrahlt werden kann. Dies geschieht durch die Verwendung computerkontrollierter Transmissionselektronenmikroskope und digitaler CCD-Kameras mit einem breiten Aufnahmefeld. Durch die Automatisierung können die Elektronen so effizienter zur Aufnahme von Strukturinformationen genutzt werden, was die Untersuchung von strahlungsempfindlichen zellulären Strukturen in vitrifiziertem Eis unter Niedrigdosisbedingungen möglich macht (Dubochet et al. 1988).

### **4.1.7 Verfahren zur automatisierten Datenaufnahme von Kippserien**

Ein Faktor, der die Genauigkeit bei der Aufnahme einer Kippserie beschränkt, ist die mechanische Präzision des Probenhalters und der verwendeten Kippvorrichtung. Abweichungen von der idealen Kippgeometrie können aufgrund einer nicht perfekten Euzentrik und einer Instabilität und Driftbewegung des Probenhalters auftreten. Diese wiederum führt zu lateralen Verschiebungen des Bildausschnitts in  $x$ - und  $y$ -Richtung und zu Veränderungen der Fokusebene. Bezogen auf eine ganze Kippserie kann dieser Versatz auf einen Wert von bis zu einigen Mikrometern akkumulieren, was bis zur kompletten Auswanderung der Zielstruktur aus dem Beobachtungsfeld der CCD-Kamera führen kann. Es muss daher während der Aufnahme einer Kippserie korrigierend eingegriffen werden. Würde man diese Korrekturen manuell bewerkstelligen, so bestünde die Gefahr, dass die Probe einer zu starken Strahlenbelastung ausgesetzt wird. Daher muss die Aufnahme automatisiert durchgeführt werden und auf jede Veränderung des Kippwinkels eine erneute Zentrierung der Zielstruktur und eine Fokussierung erfolgen. Die Bildverschiebung wird dazu unmittelbar nach Einstellung eines neuen Kippwinkels durch einen angeschlossenen Computer mittels Kreuzkorrelation bestimmt und die Spannungen an den Ablenkungsspulen und der Objektivlinse zur Korrektur des Bildversatzes und der Fokusebene angepasst (Dierksen et al. 1992), (Dierksen et al. 1993).

## **4.2 Digitale Bildverarbeitung**

### **4.2.1 Alignierung der Projektionen**

Alle auf dem Projektionstheorem (siehe 4.2.2) basierenden Methoden zur dreidimensionalen Rekonstruktion der Probe erfordern zunächst eine Alignierung (den Abgleich) der Projektionen aufeinander. Dazu eignen sich prinzipiell zwei voneinander grundlegend verschiedene Methoden:

1. Alignierung mittels Kreuzkorrelation (Guckenberger 1982), (Liu et al. 1995), (Taylor et al. 1997) und
2. Alignierung mittels Bezugsmarkern (Lawrence 1992).

Bei der Kreuzkorrelation wird jeweils die vorangehende auf die zu alignierende Projektion extrapoliert. Je geringer die Ähnlichkeit dieser beiden Projektionen ist, desto ungenauer ist die Alignierung. Darüber hinaus ist diese Methode im Allgemeinen sehr vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis beeinflusst und erfordert Kenntnisse über die Lage der Kippachse.

Bei der Alignierung mit Markern werden die Positionen einer Anzahl von Bezugspunkten durch alle Projektionen hindurch bestimmt und mit einem Modell verglichen (Lawrence 1992). Dabei wird der Fehler von vorhergesagten und gemessenen Koordinaten als Funktion der Translation und dem Winkel der Kippachse minimiert.

#### 4.2.2 Rückprojektionsalgorithmen und Projektionstheorem

Die 2D-Fouriertransformierte der Projektion eines Objektes entspricht einem zentralen Schnitt durch seine 3D-Fouriertransformierte, wobei dieser senkrecht zur Projektionsrichtung liegt. Der Projektionswinkel im Realraum entspricht genau dem Schnittwinkel im Fourierraum. Dieser Zusammenhang zwischen der Fouriertransformierten einer Funktion und der Fouriertransformierten ihrer Parallelprojektion wird als Projektionstheorem bezeichnet (De Rosier und Klug 1968), (Hart 1968). Kippt man nun die Probe schrittweise um ein Kippwinkelinkrement ( $\Delta\alpha$ ), so resultieren daraus weitere zentrale Schnitte der Fouriertransformierten des Objektes, die zusammengenommen die dreidimensionale Information der Dichteverteilung beinhalten.

Zur Aufnahme eines tomographischen Datensatzes wird die Probe um eine zum Elektronenstrahl orthogonal liegende Achse mittels einer Kippvorrichtung rotiert. Dabei ist die Auflösung ( $r$ ) des Tomogramms direkt abhängig von der Dicke ( $D$ ) (angenommen ist ein sphärisches Objekt), dem äquidistanten Kippwinkelinkrement ( $\Delta\alpha$ ) und der Anzahl der Projektionen ( $N$ ), die über den gesamten Kippwinkelbereich verteilt sein müssen (Crowther et al. 1970).

$$r = \frac{\pi \cdot D}{N} = \Delta\alpha \cdot D \quad (2.6)$$

### 4.2.3 Gewichtete Rückprojektion

Die am häufigsten zur dreidimensionalen Rekonstruktion elektronentomographischer Datensätze verwendete Methode ist die gewichtete, gefilterte Rückprojektion (engl.: *weighted backprojection*) (Harauz und van Heel 1986). Bei der ungewichteten Variante findet eine ungleichmäßige Abtastung im Fourierraum statt, wodurch niedrige Frequenzen in den Zentralschnitten der Projektionen im Gebiet des Ursprungs (*Crowther*-Kriterium) überlappen und dadurch in der Rekonstruktion überbetont werden. Das Resultat ist ein verschmierter Rückprojektionskörper (Hoppe und Hegerl 1980).

Um die mehrfach vorhandene Information im Zentrum auszugleichen, müssen die Projektionen vor der Rückprojektion im Fourierraum senkrecht zur Kippachse mit der Betragsfunktion von ( $r^*$ ), gewichtet werden, wobei  $r^*$  der Abstand vom Zentrum im Frequenzraum ist. Diese Art der Gewichtung wird *analytische Gewichtung* genannt. Die *exakte Gewichtung* stützt sich dagegen auf festgelegte Formfaktoren. Dabei nimmt man an, dass das zu rekonstruierende Volumen eine zylindrische, bzw. sphärische Form besitzt und berechnet die exakte ‚Abtastungsdichte‘ im Fourierraum (Hoppe und Hegerl 1980) (Harauz und van Heel 1986). Diese Annahme ist für pleomorphe Systeme wie Zellen mit einer Vielzahl von Objekten mit unterschiedlichen Formen streng genommen nicht zulässig, wird aber üblicherweise als gute Näherung verstanden.

### 4.2.4 Iterative Rückprojektion

Andere gängige Verfahren zur dreidimensionalen Rekonstruktion im Realraum sind multiplikative und additive ART, (engl.: *algebraic reconstruction technique*) (Gordon et al. 1970) oder SIRT (engl.: *simultaneous iterative reconstruction technique*) (Gilbert 1972), (Penczek et al. 1992). Diese Verfahren zeichnen sich dadurch aus, dass in den Rekonstruktionen, verglichen mit der gefilterten gewichteten Rückprojektion, meist weniger Rauschen vorhanden ist (Sorzano et al. 2001). Ebenso wird eine Kontrastverstärkung erreicht. Das Rekonstruktionsproblem wird bei diesen Methoden als algebraisches Gleichungssystem verstanden, das iterativ gelöst wird. Dabei erfolgt eine Minimierung der Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung zwischen den aufgenommenen Projektionen und den sich aus der berechneten Rekonstruktion ergebenden Projektio-

nen. Die Rückprojektion erfolgt hier zunächst ungewichtet. Allerdings werden die Grauwerte der jeweiligen *Voxel* (Bild-Kubi) schrittweise durch die Bestimmung und Anwendung additiver Korrekturterme verändert, wodurch das stark verschmierte Abbild des rekonstruierten Objektes, wie es bei alleiniger ungewichteter Rückprojektion auftritt, vermieden wird.

#### 4.2.5 Bereich fehlender Information

Bei der Verwendung eines (Kryo-)Präparatehalters mit einem einachsigen Kippwinkelbereich von maximal  $\pm 70^\circ$  ist eine gleichmäßige Abtastung im 3D-Fourierraum nicht möglich<sup>a</sup>. Es entsteht ein doppelkeilförmiger Bereich (engl.: *missing wedge*) entlang der *z*-Achse, in dem keine Informationen verfügbar sind. Für den Realraum resultiert daraus eine nicht isotrope Dichteverteilung mit ungleichmäßiger Auflösung in lateraler und axialer Richtung. Dichten werden aus diesem Grunde axial elongiert-verzerrt abgebildet.

#### 4.2.6 Identifizierung von Mustern aufgrund ihrer strukturellen Signatur

Die dichte Ausstattung des Cytoplasmas mit Proteinen macht es nahezu unmöglich, Zielproteine allein interaktiv-visuell in zellulären Tomogrammen zu identifizieren. Dies gelingt in der Regel nur für einige einfach erkennbare Strukturen wie Membranen und das Cytoskelett (Grünwald et al. 2003). Für die Lokalisierung der meisten cytosolischen Makromoleküle können daher automatisierte Analysemethoden nötig werden.

Eine Methode dafür ist die Identifizierung von Zielstrukturen aufgrund ihrer strukturellen Signatur nach dem *Matched-Filter*-Prinzip (van der Lugt 1964). Dazu wird ein Volumen mit einem dreidimensionalen Referenzmodell der Zielstruktur korreliert, wobei das Referenzmodell um die Eulerschen Rotations- ( $\Phi$ ), Nutations- ( $\Psi$ ) und Präzessionswinkel ( $\Theta$ ) rotiert wird. Das Referenzmodell kann durch Einzelpartikelmikroskopie oder, soweit verfügbar, aus kernresonanzspektroskopischen bzw. röntgenkristallographischen Techniken abgeleitet wer-

---

<sup>a</sup> Eine gleichmäßige Abtastung im 3D-Fourierraum ergäbe sich, wenn die Probe um  $\pm 90^\circ$  rotiert werden könnte, was allerdings derzeit durch die Geometrie der verfügbaren Kryopräparatehalter und der Objektträgernetzchen nicht möglich ist.

den. Das Ergebnis der Korrelation des Tomogramms mit dem Referenzmodell liefert eine Korrelationsfunktion, die die Ähnlichkeit eines Tomogrammelements zum Modell angibt. Die einzelnen Werte der Korrelationsfunktion sind die Korrelationskoeffizienten (für Details siehe Förster (Förster 2005)).

Sind einmal die Koordinaten einer Zielstruktur in der Zelle bekannt, kann zur weiteren Analyse ein Subtomogramm extrahiert werden, das die Struktur selbst und einen Teil ihrer Umgebung enthält. Die so extrahierten Strukturen werden aufeinander aligniert und aufsummiert, und die erhaltenen Mittelungen können dann iterativ verfeinert werden. Die Auflösung der erzielten elektronentomographischen Rekonstruktion stellt bei dieser Methode den limitierenden Faktor dar. Mit der derzeitigen anisotropen Auflösung von 4 bis 5 nm können nur größere Komplexe über 400 kDa in einem zellulären Kontext identifiziert werden.

### 4.3 Kryopräparation und Kryo-Ultramikrotomie

Dünne prokaryotische Organismen können üblicherweise *in toto* durch Elektrentomographie dreidimensional rekonstruiert werden, während eukaryotische Zellen aufgrund ihrer Dicke oftmals in Schichten geschnitten werden müssen (engl.: *serial sectioning*). Dazu mussten bis vor einigen Jahren Zellen oder Gewebeteile für ihre Einbettung in Plastik (Epon-Harze, Lowicryl) dehydriert und organischen Lösungsmitteln ausgesetzt werden, um sie dann mit dem Ultramikrotom zu Präparaten einer Dicke von 100 bis 200 nm zu schneiden. Heute können sie dagegen direkt und ohne Zugabe von Kontrastmitteln im Kryoelektronenmikroskop untersucht werden. Dazu wird das biologische Material in vitrifiziertem (amorphem oder glasartigem) Eis präserviert (Braunfeld et al. 1994). Ziel der Kryopräparation ist es, biologische Strukturen in möglichst nativer Umgebung einzufrieren, ohne dass sich dabei Eiskristalle bilden. Da Eiskristalle durch Volumenzunahme und Verdrängung von Elektrolyten biologische Strukturen leicht zerstören können, muss ein direkter, kinetisch kontrollierter Phasenübergang zwischen flüssigem Wasser und amorphem Eis gewählt werden. Dieser Phasenübergang kann für Proben (bis zu einer Dicke von etwa 10 µm) bei Normaldruck und einer Temperatur von weniger als 150 K<sup>b</sup> dadurch erreicht

---

<sup>b</sup> Temperatur des Phasenübergangs reinen Wassers von der kubischen in die vitrifizierte Form

werden, dass die Probe in flüssigem Ethan in Bruchteilen von Sekunden herabgekühlt wird.

Die Vitrifizierung mittels dieses sogenannten Einschussverfahrens hat sich daher in den letzten Jahrzehnten für Proteinlösungen, Zelllysate und einzelne dünne Zellen als die Methode der Wahl für eine Untersuchung unter *quasi*-physiologischen Bedingungen herausgestellt.

#### 4.3.1 Vitrifizierung biologischer Proben *versus* Kryosubstitution

Während die Kryosubstitution einen zeitaufwendigen Prozess darstellt, bei dem das Eis einer kryohochdruckfixierten Probe aufgelöst und langsam bei Temperaturen unter  $-70^{\circ}\text{C}$  durch ein organisches Lösungsmittel ersetzt wird, lässt sich die Vitrifizierung ausschließlich durch extrem schnelles Herabkühlen der Probe erzielen. Die Kühlgeschwindigkeit liegt beim Einschussverfahren im Bereich von  $10^6$  K/s. Dieser Zeitraum ist zu kurz, als dass sich hexagonale Eiskristalle bilden und die Probe irreversibel schädigen könnten. Die schnelle Abkühlung ist daher eine notwendige Bedingung für die Abbildung von hydratisierten biologischen Objekten. Nur sie erlaubt eine dynamische (zeitaufgelöste) Untersuchung im Submillisekundenbereich: Die niedrigen Temperaturen stoppen *stante pede* die thermische Beweglichkeit der molekularen Komponenten in der Probe, wodurch eine räumliche und zeitliche Fixierung gewährleistet wird. Bei der Kryosubstitution werden dagegen die Proben nach vollständig erfolgter Substitution wieder erwärmt. Durch die vollständige Entwässerung ist das Cytosol zu diesem Zeitpunkt schon kollabiert (Dubochet et al. 1988) und cytosolische Strukturen aggregiert. Allerdings bleiben Epitope weitestgehend erhalten. So können Proben für immunocytochemische Untersuchungen mit Harz infiltriert und bei niedrigen Temperaturen polymerisiert werden, um Strukturen wie Membranen, Organellen oder Bestandteile des Cytoskeletts zu markieren (z.B. mit der *Tokuyasu*-Methode (Tokuyasu 1973)).

#### 4.3.2 Kryoschnitte

Um sich die Vorteile der Vitrifizierung auch bei dickeren Proben zunutze machen zu können, wird seit einigen Jahren die Kryo-Ultramikrotomie von vitrifiziertem Material intensiv vorangetrieben. Dazu wird eine biologische Probe mit

einem Kryoschutzmittel (üblicherweise Dextran, seltener auch Saccharose) gemischt und bei hohem Druck (2000 bar) eingefroren. Durch die Applikation hoher Drücke wird die Vitrifikationstiefe biologischer Proben von etwa 10 µm auf etwa 100 µm gesteigert (Studer et al. 1989) (Sartori et al. 1993). Danach werden die auf diese Weise vitrifizierten Proben mit einem Diamantmesser bei Temperaturen zwischen -140°C und -160°C geschnitten<sup>c</sup>. Die Methode ist prinzipiell anwendbar auf Proben bis hin zu einer Größenordnung von kleinen Biopsien (Norlén 2003), (Norlén et al. 2003), (Al-Amoudi et al. 2004), (Norlén und Al-Amoudi 2004).

Die Idee der Kryo-Ultramikrotomie ist zwar schon seit den 1950-er Jahren bekannt, jedoch leisteten in den letzten zwanzig Jahren Dubochet und Mitarbeiter auf diesem Gebiet die eigentliche Pionierarbeit (Dubochet et al. 1983), so dass die Technik erst seit kurzem in wenigen Labors zu den etablierten Dissektionsmethoden zu zählen ist.

Heutzutage ist es möglich, Schnitte einer Dicke von 50 nm in einer reproduzierbar guten Qualität zu erzeugen (Al-Amoudi et al. 2004). Je dicker die Schnitte sind, desto deutlicher treten (methodenbedingte) Schneideartefakte auf, die bei der Rückprojektion der Daten mitrekonstruiert werden und so die Interpretierbarkeit der Strukturen erschweren:

Eines der Hauptprobleme bei der Interpretation der rekonstruierten Volumina ist die Kompression des Schnittbandes. Sie liegt im Bereich von 30-45% (Al-Amoudi et al. 2003) und verläuft mit der Schneiderichtung (Al-Amoudi et al. 2005).

Andere Artefakte betreffen ein Schnittband nicht in seiner gesamten Dicke, sondern sind auf die Schnittoberfläche beschränkt. Insbesondere in oberflächenfernen Bereichen der Probe haben sie wenig oder keinen sichtbaren Einfluss auf die subzelluläre Architektur einer Probe.

Solche Artefakte sind zum Beispiel Messerspuren. Sie werden entweder durch Eiskristalle, die sich während des Schneidens zwischen Messerkante und Probe befinden, oder durch die Verwendung eines Messers, das eine unregelmäßige Schneide aufweist, verursacht. Messerspuren liegen daher auf der dem Messer zugewandten Seite. Sie sind, so sie vorkommen, unabhängig von der

---

<sup>c</sup> Die Devitrifizierungstemperatur liegt bei etwa -135°C

Schnittdicke in Rekonstruktionen bis zu einer Tiefe von 10-40 nm erkennbar (Hsieh et al. 2002).

*Crevassen* sind vorwiegend an der Oberseite (der dem Messer abgewandten Seite) des Schnittbandes vorhanden und können je nach Schnittdicke bis zu einer Tiefe von 20-50 nm tief in dem Volumen nachgewiesen werden (Hsieh et al. 2002). Sie entstehen durch die Scherkräfte, die auf die Probe wirken, während sich das Schnittband über die Messerschneide biegt (Al-Amoudi et al. 2005). Dabei werden im amorphen Eis nanometergroße bananenförmige Fissuren oder „Knicke“ induziert. Aus ihrer Form lassen sich bei mikroskopischer Betrachtung Rückschlüsse auf die Schnittrichtung ziehen, da das Material im Bereich der *Crevassen* in Schnittrichtung zunehmend verdichtet wird.

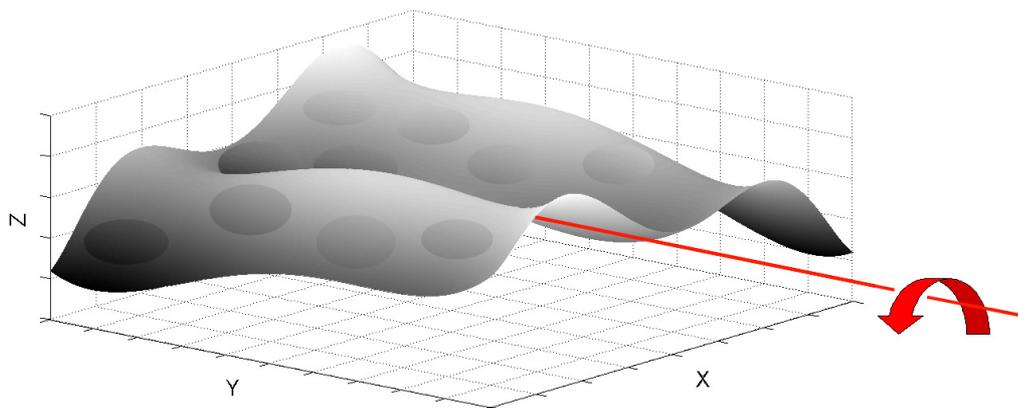
In elektronentomographischen Rekonstruktionen äußert sich diese Artefaktform gelegentlich in einem Versatz von Membranen von Organellen und Zellen, besonders dann, wenn diese sehr dicht an der Oberseite des Schnittbandes liegen. In der Regel ist der natürliche Verlauf der Membranen, die an der Schnittbandunterseite liegen, besser erhalten.

Reibungsartefakte, sogenannte „*Chatter*“ sind das Resultat einer Vibrationschwingung des Probenblocks, die während des Schneidevorgangs auftritt. Diese Vibrationen führen zu einem periodischen Wellenprofil von mehr oder weniger stark verdichtetem Material. So *Chatter* vorhanden sind, sind sie in jeder Schicht des rekonstruierten Volumens sichtbar. Allerdings können sie häufig aufgrund ihrer Periodizität mittels digitaler Bildverarbeitung mit einem Hochpassfilter aus den Projektionen entfernt werden, ohne dass dabei die Details der subzellulären Struktur verloren gehen.

Die periodischen Abstände mit der *Chatter* in einer Probe vorkommen, ist nicht für alle Proben gleich. Sie hängt vermutlich von verschiedenen instrumentellen Faktoren, wie dem Probenvorschub, der Schneidegeschwindigkeit, der Geometrie des Eisblocks und der Festigkeit der Kupferkapillare im Spannfutter des Mikrotoms ab. Auch gleitet das Diamantmesser offensichtlich leichter durch den vitrifizierten Probenblock, wenn der Messervortrieb geringer ist, so dass weniger Vibrationen und damit auch weniger *Chatter* auftreten.

Ein weiteres Problem, das sich häufig zeigt, ist, dass die Kryoschnitte oftmals nicht flach auf das Trägernetzchen überführt werden können. Sie erscheinen

daher im Elektronenmikroskop häufig wellig (schematisch in Abbildung 4.2). Bereiche, die für die Aufnahme von Tomogrammen von Interesse sind, können in solchen Schnittbändern dicht an der Trägerfolie des Objektträgernetzchens oder ebenso gut auf dem Rücken einer Falte, einige Mikrometer über dem Objektträger im Schnittband liegen.



**Abb. 4.2: Schematische Darstellung eines unebenen Schnittbandes im Raum.** Zellen sind als ovale Formen innerhalb des Schnittbandes symbolisiert. In rot dargestellt ist die Kippachse ( $y$ -Achse), um die der Schnitt während der Kippserie rotiert wird. Zellen, die sich bevorzugt in den Wellentälern befinden können, bei höheren Kippwinkeln von angrenzenden Auffaltungen überlagert werden.

Das Einstellen einer einheitlichen euzentrischen Höhe für Untersuchungen bei kleiner Vergrößerung ist aus diesem Grunde oft nicht möglich. Da für tomographische Untersuchungen jedoch eine ebene Probengeometrie vorhanden sein muss, stellt die Welligkeit ein schwerwiegendes Problem für die digitale Rückprojektion dar.

Kryoschnitte konnten zu Alignierungszwecken bis vor einiger Zeit nur mittels Kreuzkorrelation aligniert werden, die allerdings oftmals an dem niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis der aufgenommenen Bilder und den Veränderungen des Schnittes während der Exposition scheitert. Seitdem gezeigt werden konnte, dass sich auch *Quantumdots* nach der Vitrifizierung auf Kryoschnitten dispers verteilen lassen (Masich et al. 2006), ist auch bei Kippserien von Kryoschnitten eine Alignierung der Projektionen mit Bezugsmarkern möglich. Allerdings tragen die Rückstände des Isopentans, in dem die *Quantumdots* gelöst sind, zur elektrostatischen Aufladung des Schnittes im Elektronenstrahl bei, was sich wiederum negativ auf die Stabilität der Probe auswirkt.

## 5 Methoden

### 5.1 Zellbiologische Methoden

#### 5.1.1 Kultivierung von *Cyanidioschyzon merolae*

Die *C.-merolae*-Zellen wurden als Suspensionskultur in modifiziertem Allen's Medium, das mit konzentrierter Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 1,5 eingestellt wurde in einem Schüttelinkubator bei einer Temperatur von 40°C und einer kontinuierlichen Beleuchtung von 90  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$  kultiviert. Nachdem die Zellen die stationäre Phase erreicht hatten, wurden sie statt einer kontinuierlichen Beleuchtung einem periodischen 12-stündigen Zyklus von Hell- und Dunkelphasen ausgesetzt.

#### 5.1.2 Kultivierung von Hepatocyten

Das Kryogefäß mit den gefrorenen HepG2-Zellen wurde im 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in Williams' Medium (Williams 1971), (Williams und Gunn 1974) mit 10% FKS, ohne Antibiotika resuspendiert. Die Zellen wurden bei 400-500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um das Kryoschutzmittel (DMSO) zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 mL serum- und antibiotikahaltigem Medium in einer Konzentration von 300.000 Zellen/mL resuspendiert. Ein 10- $\mu\text{L}$ -Aliquot der Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau gemischt und die Vitalität der Zellen lichtmikroskopisch nach fünfminütiger Inkubation mittels einer Bürker-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in eine T75-Zellkulturflasche überführt und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Adhäsion, die Konfluenz und die Farbe des Indikatormediums überprüft. Das Medium wurde alle 48 Stunden erneuert.

Bei einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt, um exponentielles Wachstum zu gewährleisten. Dazu wurde das Medium abgesogen und die Zellen ein- bis zweimal mit je 10 mL PBS gewaschen, um das Serum zu entfernen. Dann wurden 3 mL einer Trypsin/EDTA-Lösung in PBS in die T75-Flasche gegeben und auf der Oberfläche gleichmäßig verteilt. Die Flaschen wurden 5 Minuten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100%

Luftfeuchtigkeit inkubiert und dann das Trypsin/EDTA entfernt. Die noch feuchten Flaschenböden wurden weitere 5 Minuten unter gleichen Bedingungen inkubiert und danach die Reaktion durch Zusatz von 10 mL serum- und antibiotikahaltigem Medium zum stoppen gebracht. Die Zellen wurden mit einem kräftigen Strahl aus der Pipette vom Flaschenboden abgelöst und durch mehrmaliges Aufziehen und Auslassen der Pipette vereinzelt. Danach wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 400 x g vom trypsinhaltigen Überstand befreit. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 3 mL frischem, serum- und antibiotikahaltigem Medium resuspendiert. Je 1 mL dieser Zellsuspension wurde anschließend in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegten 19 mL serumhaltigen Mediums gegeben. Die Flaschen wurden für 48 Stunden inkubiert, bevor der nächste Mediumwechsel nötig war.

Um Zellen zur Lagerung in flüssigem Stickstoff einfrieren zu können, wurden diese nach dem letzten Zentrifugationsschritt anstatt in serumhaltigem Medium in Medium mit 10% FKS, 10% DMSO, 0,5% einer sterilen 20%igen Glukoselösung in Milli-Q-Wasser und 1% einer Penicillin-G-Natrium/Dihydrostreptomycinsulfat-Lösung aufgenommen. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen im Tiefkühlschrank bei -80°C eingefroren. Das langsame Abkühlen wird durch eine individuelle Isolierung der Kryoröhrchen, durch eine Polystyrolbox mit geeigneter Wandstärke, erreicht. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C aufbewahrt.

### 5.1.3 Kultivierung von *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen

Das Kryogefäß mit den gefrorenen *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen wurde im 30°C-warmen Wasserbad schnell aufgetaut und die Zellen kurz vor dem vollständigen Auftauen in eine T25-Kulturflasche überführt, in der 5 mL Schneider's Medium supplementiert mit 10% FKS, 50 µg/mL Dihydrostreptomycinsulfat und 50 U/mL Penicillin-G-Natrium vorgelegt waren. Die Zellen wurden bei 28°C in geschlossenen Kulturflaschen kultiviert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen bei 400 x g zentrifugiert, um den DMSO-haltigen Überstand zu entfernen. Das Pellet wurde in frischem serum- und antibiotikahaltigem Medium aufgenommen und bei 28°C inkubiert, bis eine Zellkonzentration von etwa  $6 \times 10^6$  Zellen/mL erreicht war und die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt wurden. Dazu wur-

den die adhärennten Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und durch mehrfaches vorsichtiges Aufziehen und Auslassen einer serologischen Pipette vereinzelt. Die Zellen wurden so inokuliert, dass daraus eine Konzentration von etwa  $3\text{-}6 \times 10^5$  Zellen/mL resultierte. Bei geringer Zelldichte (etwa  $3\text{-}5 \times 10^5$  Zellen/mL) wuchsen die Zellen teils adhärennt, während sie bei höheren Zelldichten ( $>2 \times 10^6$  Zellen/mL) dazu neigten, sich von der Oberfläche abzulösen, um in Suspension zu wachsen. Bei Zelldichten über  $5 \times 10^6$  Zellen/mL formten sich Aggregate, was das Wachstum aber nicht zu beeinflussen schien. Die Zellen wurden bei  $28^\circ\text{C}$  kultiviert, bis sie erneut eine Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/mL aufwiesen. Größere Zellmengen wurden in 1000-mL-Rührflaschen kultiviert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen pro mL auf die beschriebene Weise vom Flaschenboden gelöst und bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Gefriermedium aus 45% frischem Schneider's Medium, 45% konditioniertem Schneider's Medium (Medium, in dem die Zellen bereits gewachsen waren und in das die Zellen Wachstumsfaktoren sekretiert hatten) und 10% DMSO als Kryoschutzmittel aufgenommen. Die Zellen wurden unter kontrollierten Bedingungen langsam eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 5.1.3.1 Transfektion mittels Cellfectin

Eine zu 90% konfluent mit *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen bewachsene T25-Flasche wurde einen Tag vor der Transfektion in Sf9/S2-Medium ohne Antibiotika und ohne Serum kultiviert.

Es wurden  $5 \mu\text{g}$  *dtp-II*-DNS in 2,5 mL antibiotika- und serumfreiem Sf9/S2-Medium verdünnt.  $50 \mu\text{L}$  des Cellfectin-Reagenz wurden ebenso in 2,5 mL antibiotika- und serumfreien Sf9/S2-Medium verdünnt. Beide Lösungen wurden vereinigt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde immer eine sogenannte *mock*-transfizierte Probe kultiviert. Hierbei wurde das entsprechende Volumen an DNS durch Medium ersetzt. Adhärennte Zellen wurden am Tag der Transfektion mit einem Zellschaber von der Flaschenoberfläche abgelöst und die Zellsuspension bei  $400 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in dem Transfektionsmix (DNS-Lipid-Komplex) resuspendiert und in dieselbe Flasche rücküberführt. Die Zellen wurden dann bei  $28^\circ\text{C}$

für 5 Stunden inkubiert und danach das Transfektionsgemisch gegen Schneider's Medium mit Antibiotika und Serum ausgetauscht. Für eine transiente Expression wurde die Genexpression durch Zugabe einer 700  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ -Lösung induziert. Beginnend 36 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen auf gesteigerte Genexpression im 24-Stunden-Takt mit Hilfe eines Aktivitätsassays auf TPP II (siehe 5.3.1) untersucht.

#### **5.1.3.2 Optimierte Transfektion**

Am Tag vor der Transfektion wurden  $3\text{-}4 \times 10^5$  vitale Zellen/mL in T25-Flaschen ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium verworfen und 1 mL des Lipid-Transfektionsmixes (Herstellung wie in 5.1.3.1 beschrieben) hinzugefügt. Nach 5-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken wurden 4 mL serum- und antibiotikahaltiges Schneider's Medium zugefügt. Gleichzeitig wurde die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 700  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  veranlasst. Die Probe wurde bei 28°C in ruhenden T25-Kulturflaschen kultiviert.

Die Zellen wurden in Eiswasser durch 2 x 5 Ultraschallpulse, bei 50% Pulsdauer und einer Pulsintensität von ,6' mit einem Ultraschalldisruptor lysiert. Die lysierte Zellsuspension wurde in einer Kühlzentrifuge für 10 Minuten bei 4°C und 18.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die cytosolischen Komponenten befanden, wurde für weitere Untersuchungen verwendet.

#### **5.1.4 Kultivierung von *E.-coli***

Es wurden Bakterien aus einer Glycerinstocklösung auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin enthielten. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurde eine einzelne Kolonie gepickt und damit 10 mL kanamycinhaltiges LB-Medium angeimpft. Auf dem Schüttelinkubator wurde diese Kultur bei 37°C über Nacht in 50-mL-Reaktionsgefäßen mit nur lose aufgesetzten Schraubverschlüssen inkubiert.

## 5.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 5.2.1 Hitzeschocktransformation

Die verwendeten *E.-coli*-Top10-Bakterien sind  $\text{CaCl}_2$ -kompetent und wurden mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurden die Zellen für ca. 20 Minuten auf Eis aufgetaut. Danach wurden 5  $\mu\text{L}$  der zu transformierenden DNS zugegeben und der Ansatz für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 45 Sekunden im Wasserbad bei  $42^\circ\text{C}$  erhitzt und dann 2 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in 500 mL LB-Medium suspendiert und für 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. Danach wurde der gesamte Ansatz zu je 200  $\mu\text{L}$  auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin enthielten, und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die so erhaltenen Kolonien wurden gepickt und in je 4 mL ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  schüttelnd inkubiert.

### 5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmiden wurde das QIAprep-Spin-Miniprep-Kit verwendet. Die Funktionsweise orientiert sich an der alkalischen Lyse von Bakterien, gefolgt von der selektiven Adsorption der DNS auf einer Siliziumdioxid-Gelmembran bei hohen Salzkonzentrationen und ihrer Elution bei geringen Salzkonzentrationen. Dazu wurden transformierte *E.-coli*-Kulturen bei  $37^\circ\text{C}$  unter stetigem Schütteln bis zu 16 Stunden wachsen gelassen und dann geerntet. Die Plasmidisolierung erfolgte nach den Richtlinien des Herstellers.

### 5.2.3 Amplifikation von *dtpp II* aus pET30b\_*dtpp-II*

Zur Amplifikation von *dtpp II* aus dem pET30b\_*dtpp-II*-Vektor (Seyit 2006) wurden Primer-Annealing-Temperatur, dNTP-Konzentration und Primer-Verlängerungszeit optimiert. Die besten Ergebnisse ergaben sich bei einer Annealing-Temperatur von  $58^\circ\text{C}$ , einer Primer-Verlängerungszeit von 240 s und einem PCR-Mix von jeweils 1  $\mu\text{L}$  Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 2  $\mu\text{L}$  dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  Template-DNS und 1  $\mu\text{L}$  Roche-Long-Template-Amplifikationskit (Polymerase). Außerdem wurden 5  $\mu\text{L}$  NEB-Puffer-1 zugesetzt und der Reaktionsmix mit

39  $\mu\text{L}$  Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Es wurden 25 PCR-Zyklen vor der finalen Primerverlängerung durchlaufen.

#### 5.2.4 Amplifikation von pMT/V5\_*dtp-II* in *E.coli* und DNS-Isolierung

Das Amplifikat wurde unmittelbar nach der PCR in den TOPO-Vektor pMT/V5 (Invitrogen) ligiert. Dazu wurden 4  $\mu\text{L}$  des PCR-Produktes, 1  $\mu\text{L}$  einer Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M  $\text{MgCl}_2$ ) und 1  $\mu\text{L}$  des linearisierten TOPO-Vektors (TOPO-pMT/V5) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Vektor wurde in eine chemisch kompetente *E.coli*-TOP10-Bakterienpopulation mittels Hitzeschock transformiert (siehe 5.2.1). Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert, bevor die Bakterien auf ampicillinhaltigem LB-Selektionsmedium (100 mg/mL) über Nacht ausplattiert wurden. Aus drei ampicillinresistenten Klonen wurden die entsprechenden Kolonien gepickt und Vorkulturen in LB-Amp-Medium angesetzt.

#### 5.2.5 Restriktionsendonukleolytische Spaltung des insertierten *dtp-II*-Gens

	KpnI-Spaltung 6193 bp / 1430 bp	SpeI-Spaltung 6630 bp / 993 bp	MfeI-Spaltung 4291 bp / 3332 bp
Plasmid-DNS	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
NEB-Puffer 1	1 $\mu\text{L}$	-	-
NEB-Puffer 2	-	1 $\mu\text{L}$	-
NEB-Puffer 4	-	-	1 $\mu\text{L}$
BSA (10x)	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	-
KpnI (20 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	-	-
SpeI (20 U/ $\mu\text{L}$ )	-	1 $\mu\text{L}$	-
MfeI (20 U/ $\mu\text{L}$ )	-	-	1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
Summe	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$

**Tabelle 1:** Schema der endonukleolytischen Spaltung des insertierten *dtp-II*-Gens. Es wurden drei Ansätze gemäß obiger Tabelle hergestellt. Die in der Kopfzeile eingetragenen Werte geben die Größen der Spaltprodukte in Basenpaaren unter Verwendung des jeweiligen Enzyms wieder.

Die Plasmid-DNS wurde mit Hilfe des QIAprep-Spin-Miniprep-Kit isoliert, zur Überprüfung der richtigen Orientierung des insertierten Gens im Vektor durch die Restriktionsendonukleasen SpeI, KpnI und MfeI gespalten (2 Stunden bei 37°C) und die Spaltfragmente mittels eines Agarosegel getrennt.

### 5.2.6 Trennung von DNS-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Fragmente des endonukleolytischen Abbaus wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Als Lauf- und Gelpuffer wurde TAE-Puffer verwendet, in dem 1% Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst wurde. Das Gel wurde in Form einer horizontalen Platte gegossen, in der sich am oberen Rand (zur Kathode gerichtet) Proben-Taschen befanden. Bevor das Gel erstarrte, wurde 1  $\mu\text{L}$  Ethidiumbromid zugesetzt und verteilt. Die Auftrennung der DNS Fragmente erfolgte bei konstanter Spannung von 80 V.

Als DNS-Molekulargewichtsmarker wurde die 1-kb-DNA-Ladder der Firma NEB in einer Menge von 2  $\mu\text{L}$  pro Tasche verwendet.

10  $\mu\text{L}$  DNS wurden mit 2  $\mu\text{L}$  6x-Probenpuffer versetzt und in die Proben-Taschen pipettiert. Die Banden wurden im UV-Transilluminator ( $\lambda = 320 \text{ nm}$ ) sichtbar gemacht.

### 5.2.7 Gelextraktion von DNS-Banden aus Agarosegelen

DNS-Banden aus Restriktionsspaltungen wurden mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraktionskit aus Agarosegelen extrahiert. Die Aufreinigung erfolgte nach den Richtlinien des Herstellers.

### 5.2.8 Quantifizierung der DNS

Die DNS-haltigen Proben wurden im 25-fachen Volumen Milli-Q-Wasser gelöst und das Absorptionsspektrum zwischen 250 nm und 350 nm in einer Quarzküvette mit einer Weglänge von 1 cm aufgenommen. Reine DNS zeigt ein Absorptionsmaximum bei 254 nm. Entsprechend dem *Lambert-Beerschen* Gesetz gilt für doppelsträngige DNS, dass jeder Absorptionseinheit bei 260 nm eine Konzentration von ca. 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNS entspricht.

## 5.3 Proteinbiochemische Methoden und enzymologische Messungen

### 5.3.1 Aktivitätsmessung

Im Zelllysat wurde die enzymatische Aktivität von TPP II ermittelt. Der Aktivitätstest basiert auf dem Fluoreszenzsignal, das bei Spaltung des artifiziellen Substrates AAF-AMC (Alanin-Alanin-Phenylalanin konjugiert mit AMC (7-Amido-4-Methylcoumarin)) detektierbar wird. Zu diesem Zwecke wurden 45  $\mu\text{L}$  AAF-AMC (0,2 mM) mit 0,04 mM des Aminopeptidaseinhibitors Bestatin in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) im Heizblock bei 30°C einige Minuten vorinkubiert. Zu diesem Assaymix wurden 50  $\mu\text{L}$  des Zelllysat-Überstandes gegeben. Der so präparierte Testansatz wurde für 25 Minuten bei 30°C im Heizblock inkubiert und die Spaltreaktion durch Zugabe von 450  $\mu\text{L}$  eines Stoppuffers (100 mM Tris, 1 % SDS, pH 9,5) beendet.

Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal des Proteolyseproduktes (AMC) im Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Detektionswellenlänge von 460 nm gemessen. Zur Bestimmung des Hintergrundfluoreszenzsignals durch den Testansatz wurde ein lysatfreier Ansatz verwendet.

### 5.3.2 Größenausschlusschromatographie

Eine Superose™-6-Gelfiltrationssäule (24 mL Superose™ 6 10/300 GL-Tri-corn™) wurde vor der Verwendung mit dem 0,2-fachen des Säulenvolumens an 6 M Guanidiniumhydrochlorid behandelt, um Proteinpräzipitate zu entfernen. Nachdem die Säule mit dem zweifachen Säulenvolumen an Gelfiltrationspuffer gewaschen wurde, wurde die Säule erneut mit demselben Puffer äquilibriert. Es wurden 2 mL des Lysates aufgetragen. Die Säule wurde an einer Beckman-HPLC-Anlage mit einer Durchflußrate von 0,5 mL/min betrieben und Fraktionen beginnend 17,5 Minuten nach dem Start in Volumina von 1 mL gesammelt.

### 5.3.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden 12%-ige (w/v) Schägger-SDS-Polyacrylamidgele mit den Dimensionen 70 mm x 80 mm x 0,8 mm verwendet. Den Trenngelen aufgesetzt waren Sammelgele mit 5% (w/v) Acrylamid. In die Probenaschen wurde jeweils ein

Volumen von 15  $\mu\text{L}$  aufgetragen. Dazu wurden 7,5  $\mu\text{L}$  Probe mit 7,5  $\mu\text{L}$  Auftragspuffer gemischt und aufgekocht. Als Standard wurde bei allen Gelen der *PAGE-Ruler* (Fermentas) verwendet, der in einem Volumen von 10  $\mu\text{L}$  auf das Gel aufgetragen wurde. Als Puffer wurden die Standard-Puffer von Schägger verwendet. Für etwa 70 Minuten wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt, bis die Lauffront das Gel verlassen hatte.

#### **5.3.4 Westernblot**

Zur Immunmarkierung der TPP-II-Banden wurden zunächst die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine unter Anwendung des sogenannten halbtrockenen Westernblottingverfahrens in einer Blotting-Apparatur auf eine Protran Nitrocellulosetransfermembran (Schleicher & Schüll, Dassel) überführt. Dazu wurde für 240 Minuten eine Stromstärke von 0,8 mA pro  $\text{cm}^2$  (124 mA) angelegt. Die transferrierten Proteinbanden wurden mit Hilfe einer Ponceau S-Lösung (0,2 % Ponceau in 3 % TCA, Chroma Gesellschaft Schmid & Co) genau 1 Minute angefärbt, mit Milli-Q-Wasser sichtbar gemacht, und die Nitrocellulose anschließend durch Wässern in TBS wieder entfärbt. Die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran wurden mit einer auf Raumtemperatur gebrachten 1:1 Mischung zweier vom Hersteller bereitgestellter Vorbehandlungslosungen (*Pretreat Solution A* und *Pretreat Solution B*) für 5 Minuten auf einem Wippinkubator blockiert. Danach wurde die Membran zweimal mit je 14 mL einer ebenfalls im Nachweiskit enthaltenen 1-x-Waschlösung gespült. Es wurden 200  $\mu\text{L}$  polyklonales Serum gegen dTPP II in 10 mL der Westernblot-Lösung (*WB Solution*) verdünnt und die Nitrocellulosemembran in dieser Lösung für 120 Minuten auf dem Wippinkubator bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch Spülen mit 14 mL der 1-x-Waschlösung entfernt. Die Proteinbanden wurden durch mehrminutige Inkubation mit dem ChromoSensor<sup>TM</sup>-One-Solution-TMB-Substrat des Herstellers sichtbar gemacht.

#### **5.3.5 Immunmarkierung für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen**

In eine Zellkulturschale mit zwölf Vertiefungen wurden sterile, in Ethanol aufbewahrte und abgeflammete runde Glasdeckglaschen eingebracht.

Danach wurde die Zellsuspension einer zu 80-90% konfluent-bewachsenen T75-Kulturflasche in zwei Hälften aufgeteilt. Eine Hälfte wurde in einer T75-Kulturflasche weiterkultiviert, während die andere Hälfte zu je 600- $\mu$ L-Volumina in Vertiefungen der zuvor präparierten Zellkulturplatte überführt wurde. Nach 60-stündiger Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit (im Falle der Hepatocyten), bzw. bei 28°C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung (im Falle der *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen) waren die Deckgläschen zu etwa 80% konfluent mit Zellen bewachsen. Das Medium wurde aus den Vertiefungen abgesogen und die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit einer 4%-igen *para*-Formaldehyd-Lösung in PBS 10 Minuten lang bei Raumtemperatur fixiert wurden. Das *para*-Formaldehyd wurde entfernt und die Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen, bevor TBS für 10 Minuten zugegeben wurde, um das verbleibende *para*-Formaldehyd zu lösen. Die Deckgläschen wurden wiederum einmal mit PBS gewaschen bevor die Zellen mittels einer 0,1%-igen Triton-X-100-Lösung 5 Minuten lang bei Raumtemperatur permeabilisiert wurden. Um das Detergens wieder zu entfernen, wurden die Deckgläschen erneut gründlich (drei- bis viermal) in PBS gewaschen. Die unspezifischen Antikörperbindungsstellen wurden mit einer 3%-igen BSA-Lösung in PBS blockiert. Die Deckgläschen wurden aus den Vertiefungen entnommen und in eine „feuchte Kammer“ (eine mit feuchten Papiertüchern ausgelegte Petrischale) überführt. Auf die Deckgläschen wurden 20  $\mu$ L einer 1:100-Verdünnung (in 0,3% BSA/PBS) des primären polyklonalen anti-dTPP-II-Serums aufgetragen. Die Petrischale wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und danach ungebundene Antikörper gründlich, jedoch sorgsam durch Eintauchen der Deckgläschen in ein PBS-befülltes Becherglas gewaschen. Schließlich wurden 20  $\mu$ L eines FITC-konjugierten sekundären Antikörpers gegen den primären Antikörper auf die Deckgläschen gegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die so präparierten Deckgläschen wurden kopfüber in einem 10- $\mu$ L-Tropfen eines hochviskosen Fixiergels auf einem Glasobjektträger fixiert. Nach der Aushärtung des Gels wurden die Proben fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

## 5.4 Kryopräparative Methoden

### 5.4.1 Vitrifizierung durch Einschuss in flüssiges Ethan

Auf die amorphe Kohleoberfläche der Objektträgernetzchen wurden zunächst 3  $\mu\text{L}$  einer Goldsuspension aufgetragen. Nach dem Eintrocknen wurden 5  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension hinzugefügt und für wenige Sekunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, so dass die Probe an der Graphitschicht adsorbieren konnte. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgezogen und die Objektträgernetzchen dann in flüssigem Ethan schockgefroren.

Dazu wurde eine Einschussapparatur mit einem schweren Kolben verwendet, an dessen unterem Ende sich eine Haltevorrichtung befand, in die das Objektträgernetzchen eingespannt wurde. Nach Auslösung des Mechanismus fiel der Kolben, durch das Schwerfeld der Erde beschleunigt, aus einer Höhe von etwa 20 cm herab und tauchte das Objektträgernetzchen in ein mit flüssigem Ethan gefülltes Reservoir ein. Unter einer Stickstoffatmosphäre wurde das Objektträgernetzchen unmittelbar nach dem Einschuss in flüssigen Stickstoff überführt und bis zum Einbau in einen gekühlten Kryopräparatehalter unter diesen Bedingungen gehalten.

### 5.4.2 Hochdruckvitrifizierung

Zur Hochdruckvitrifizierung wurde das Leica *EMPact*-Hochdruckgefriergerät verwendet (Studer et al. 2001). Die Maschine appliziert innerhalb von 5 ms einen Druck von 2000 bar mittels Methylcyclohexan als hydraulischer Flüssigkeit in das Innere des Probenhalters und kühlt etwa 25 ms später dessen Außenfläche durch einen Strom flüssigen Stickstoffs (10 bar) ab. Nachdem die Probe gefroren ist, klappt der Probenhalter automatisch in ein Reservoir, das mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist. Die Abkühlrate ( $dT/dt$ ) liegt in der Größenordnung von  $7000 \text{ K s}^{-1}$ .

### 5.4.3 Hydratisierte Schnitte durch Vitrifizierung und Kryo-Ultramikrotomie

Dicke (100-200 nm) und dünne ( $\leq 65 \text{ nm}$ ) hydratisierte Schnitte wurden durch Herrn Dr. Andrew Leis und Herrn Dr. Thomas Keil hergestellt. Dazu wurde ein

Leica-*Ultracut*-Ultramikrotom verwendet, das mit einem *EM-FCS*-Kryoauflauf versehen war. In den Präparatehalter passende Kupferkapillaren wurden mit einem Ende in das Einspannfutter des Mikrotoms fixiert und mit einem Trimmmesser ein kubischer Eisblock mit einer Breite von 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  aus dem umgebenden Kupfer freigeschnitten. Es wurden nur solche Proben benutzt, die als Zeichen für eine erfolgreiche Vitrifizierung stirnseitig eine homogen schwarze Eisoberfläche zeigten. Zum Erzeugen der Schnittbänder wurde in den frühen Stadien der Arbeit (100-200 nm dicke Schnitte der Algen) ein 35°-Diamantmesser und für spätere Versuche (*E. coli*, HepG2- und *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen) ein 25°-Diamantmesser verwendet. Die Messer waren in einem Winkel von 4° eingebaut. Zusätzlich betrug der sogenannte *Clearance*-Winkel beim Trimmen 6°, beim eigentlichen Schneiden 3-4°.

Die Messergeschwindigkeit lag zwischen 1,0 und 1,4 mm/s im Bereich des Schnittfensters (Schnittgeschwindigkeit). Messer und Schneidekammer wurden konstant auf einer Temperatur von -160°C gehalten. Ein justierbarer „Diatome-Static-Line“-Ionisator wurde während des Schneidevorgangs verwendet. Es wurden Schnittbänder mit nominalen Dicken zwischen 65 nm und 200 nm erzeugt. Die Schnittbänder wurden mit einer Wimper, die an ein kleines Holzstäbchen geklebt war, vom Schneidmesser auf die Objektträgernetzchen mit 100 x 400 Maschen und kontinuierlichem Kohlefilm überführt. Dazu wurde der Ionisator ausgeschaltet. Die so platzierten Schnittbänder wurden auf dem Netzchen mittels einer Keramik-Pressvorrichtung flachgedrückt und in eigens dafür vorgesehene Aufbewahrungsbehältnisse überführt.

#### **5.4.4 Kryofixierung von Hepatocyten**

Die Zellen wurden enzymatisch mittels Trypsin-EDTA in PBS vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, vereinzelt und bei 400 x g pellettiert, bevor der Überstand entfernt wurde und das Pellet 1:1 mit einer 40%-igen Dextranlösung gemischt und in die Kupferkapillaren gesogen wurde. Durch diese Behandlung wurden sowohl die Zell-Zell-Interaktionen als auch die Zell-Substrat-Interaktionen gelöst, und die HepG2-Zellen konnten in die Mikrokapillare überführt, hochdruckgefroren, geschnitten und elektronenmikroskopisch untersucht werden.

#### 5.4.5 Kryosubstitution von *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen

*Drosophila*-Schneider-S2-Zellen wurden von Herrn Dr. Thomas Keil 1:1 mit einer 40%-igen Dextranlösung (Molekulargewicht: 100.000-200.000) gemischt, in einem Leica *EMPACT-2*-Hochdruck-Gefriergerät vitrifiziert und anschließend in einem Leica AFS-2 durch Aceton mit 1% OsO<sub>4</sub> und 0,15% Uranylacetat bei Raumtemperatur substituiert (van Donselaar et al. 2007). Das Produkt wurde in Gelatine eingebettet und in Gegenwart von 2,3 molarer Saccharose in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -100°C geschnitten. Schnitte mit einer nominalen Dicke von 200-400 nm wurden auf Glasobjektträger überführt und mit einem Antikörper aus polyklonalem Serum gegen dTPP II immunmarkiert. Mittels eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (polyklonales FITC-konjugiertes Anti-Kaninchen IgG aus Ziege (Sigma)) konnten die TPP-II-Komplexe indirekt fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden (siehe 5.3.5).

#### 5.4.6 Kryofixierung von *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Im Gegensatz zu den Hepatocyten war hier der Zellverband lose genug, so dass eine enzymatische Behandlung nicht notwendig war. Die Zellen wurden pellettiert, der Überstand abgesogen und das Zellpellet 1:1 mit einer 40%-igen Dextranlösung vermischt. Die Zellsuspension wurde in Kupferkapillaren eingesogen, hochdruckgefroren, geschnitten und elektronenmikroskopisch untersucht.

### 5.5 Elektronenmikroskopische Methoden

#### 5.5.1 Aufnahme der EM-Projektionsbilder

Bilder wurden unter Niedrigdosisbedingungen bei einer Vergrößerung von 5.900-fach (2,6 nm Bildpunktgröße) und einem Defokus von -50 µm bis zu einer Vergrößerung von 27.500-fach (0,5 nm Bildpunktgröße) und einem Defokus von -10 µm an einem computerkontrollierten Philips-CM300-Transmissionselektronenmikroskop, das mit einer euzentrischen Kippvorrichtung ausgestattet war, aufgenommen und mit einer *slow-scan* CCD-Kamera (CCD-Chip-Größe von 2048 x 2048 Bildpunkten) mittels des *Digital-Micrographsystems (DM-System)*

unter Verwendung eines „*Gatan-post-column*“-*Energiefilter-System (GIF-2002-System)* digitalisiert.

Zur automatisierten Aufnahme einer Kippserie wurde dann im ersten Schritt ein Übersichtsbild bei geringer Vergrößerung und mit einer verhältnismäßig geringen Belichtungsintensität aufgenommen. Dieses Bild wurde zu einer groben Korrektur des Bildversatzes mit dem Übersichtsbild des vorherigen Zyklus verglichen.

Bei höherer Vergrößerung wurde die Probe fokussiert. Dazu wurde der Elektronenstrahl entweder auf die Aufnahmeposition oder an eine andere Stelle entlang der Kippachse gesetzt<sup>d</sup>. Eine von der Belichtungsstelle verschobene Fokusposition hat den Vorteil, dass die Elektronen, die die Probe zum Fokussieren durchstrahlen, nicht zur kumulativen Dosis an der Belichtungsstelle beitragen, birgt jedoch bei unebenen Kryoschnitten die Gefahr, dass der Fokus aufgrund der Welligkeit des Schnittbandes nicht zwingend identisch sein muss. Nach der Fokussierung wurde der Strahl bei derselben Vergrößerung, bei der das Bild aufgenommen werden soll auf die Aufnahmeposition versetzt und eine Feinkorrektur des Bildversatzes in Relation zu der vorherigen Aufnahme durchgeführt. Schließlich wurde an der Belichtungsstelle das Bild aufgenommen, woraufhin sich der Zyklus für den folgenden Kippwinkel wiederholte.

## 5.6 Methoden der digitalen Bildverarbeitung

### 5.6.1 Alignierung der Projektionen

Zur Alignierung der Projektionen wurden zwei verschiedene Programmpakete benutzt. 1. *EM-Programmpaket* (Hegerl und Altbauer 1982) und 2. das *Inspect3D Xpress Advance* Programm der FEI Company (Hillsboro, Oregon). Beide Programme ermöglichen sowohl das Alignieren mittels Bezugsmarkern als auch mittels Kreuzkorrelation. Im letzteren Falle kann die Lage der Kippachse mit der *Inspect-3D-Software* aus dem Mittelbild aller alignierten Projektionen bestimmt werden, während sie bei dem *EM-Programmpaket* *a priori* bekannt sein muss.

---

<sup>d</sup> nur entlang der Kippachse ist bei Proben, die flach auf dem Objektträgernetzchen liegen, der Fokus an jeder Stelle gleich.

Projektionen aus Datensätzen *in toto* untersuchter Proben wurden mit dem EM-Programmpaket mittels Bezugsmarkern aligniert. Dazu wurde die Prozedur *marker\_align\_new.emp* verwendet und die Position von fünf Goldpartikeln durch alle Projektionen verfolgt. Das Resultat dieses Alignierungsprozesses ist eine Datei, in der die Verschiebungen der einzelnen Projektionen zueinander eingetragen sind.

Die aufgenommenen Projektionen der Kryoschnitte wurden mittels Kreuzkorrelation aligniert. Dazu wurde entweder die Prozedur *CC\_align\_man\_new.emp* des EM-Programmpakets (auch hier werden die Verschiebungen in einer Datei gespeichert) oder die Kreuzkorrelationsfunktion von *Inspect3D Xpress Advance* verwendet. Im letzteren Fall werden die Projektionen ungewichtet in Form eines dreidimensionalen Projektionsstapels gespeichert, innerhalb dessen die Verschiebung der Projektionen zueinander bereits korrigiert ist, während im EM-Programmpaket die einzelnen Projektionsbilder gewichtet, in Bezug auf Translation und Rotation korrigiert und im nächsten Schritt rückprojiziert werden.

### **5.6.2 Dreidimensionale Rekonstruktion**

Die Rekonstruktion erfolgte im Falle der gewichteten Rückprojektion mittels der EM-Prozedur *CC\_align\_rec\_3d\_new.inp*. Dazu wurden zunächst gewichtete 2D-Projektionen erzeugt, die gemäß der in der Alignierungsdatei gespeicherten Verschiebungen korrigiert und rückprojiziert wurden.

Die SIRT-Rekonstruktion erfolgte mittels der Inspect-3D-Software. Dazu wurde beginnend mit dem Stapel der alignierten Projektionen das Rekonstruktionsproblem algebraisch-iterativ gelöst. Es wurden 17 Iterationszyklen durchlaufen.

### **5.6.3 Visualisierung durch Segmentierung**

Die dreidimensionale Oberflächendarstellung wurde mit Hilfe des *Amira*-Programms (Mercury Computer Systems) realisiert. Zu diesem Zwecke wurde für jede Struktur eine binäre Selektionsmaske erstellt und diese mit den Daten des Ausgangsvolumens multipliziert. Die Rohdaten der daraus resultierenden segmentierten Teilvolumina wurden durch Modellierung natürlicher Phänomene wie Textur, Refraktion, Reflexion, Schatten anschaulich gemacht, um dem Betrachter ein Eindruck der Materialität und Form der Strukturen zu vermitteln.

#### 5.6.4 Mustererkennung mittels lokal normierter Korrelationsfunktion

Alle für die Mustersignaturerkennung eingesetzten Referenzen wurden auf eine Auflösung von 4,4 nm tiefpassgefiltert, was der maximal erreichbaren Auflösung in den aufgenommenen Tomogrammen bei einer Pixelgröße von 0,547 nm und einem Defokus von -10  $\mu\text{m}$  (erste Nullstelle der Kontrastübertragungsfunktion) entsprach.

Die Auflösung der zu durchsuchenden Tomogramme wurde zunächst zweimal halbiert (gebinnt) und unter Verwendung des Programms „*Molmatch*“ (Förster 2005) mit diesen Referenzen korreliert. Zusätzlich wurde eine die Proteindichte vollständig umschließende sphärische Ausschlussmaske erzeugt. Diese Maske wurde mit der Referenz multipliziert und das Ergebnis mit einem Volumen gleicher Größe, das die Punktspreizfunktion<sup>e</sup> enthält, mathematisch gefaltet.

Die nachfolgende Bildverarbeitung und Analyse der Daten wurden im Programm „*Matlab*“ (The Math Works) mit dem TOM-Softwarepaket (Nickell et al. 2005) und dem „*av3-Prozedurenkatalog*“ (Förster 2005) durchgeführt.

Jedes Partikel wurde unter Berücksichtigung der ermittelten Rotation und Translation auf die Referenzstruktur aligniert, indem die Eulerwinkel mit einem Inkrement von 10° abgetastet wurden. Auf diese Weise wurden Informationen über die Lage der Kreuzkorrelationspeaks und der Orientierungen der gefundenen Partikel erhalten und die Positionen und Orientierungen der besten Kreuzkorrelationstreffer in einer Liste gespeichert. Außerdem wurde das zu untersuchende Volumen auf das Cytosol der Zellen reduziert. Dazu wurden die übrigen Bereiche durch eine Ausschlussmaske verdeckt.

Im nächsten Schritt wurden interaktiv falsch-positive Partikel mit Hilfe der TOM-Funktion „*tom\_chooser*“ aussortiert. Die verbleibenden Partikel wurden in Bezug auf Translation und Rotation auf die Referenz mittels Kreuzkorrelation ausgerichtet und in Form von Subtomogrammen in gleicher räumlicher Orientierung bei voller Auflösung rekonstruiert und gemittelt.

---

<sup>e</sup> Die Punktspreizfunktion (PSF) beschreibt die Wirkung von bandbegrenzenden Faktoren wie Beugungserscheinungen an Blenden, Abbildungsfehler und Einfluss der Sensorfläche bzw. Apertur. Sie gibt an, wie ein punktförmiges Objekt durch ein System abgebildet würde. Bei Mikroskopen begrenzt die Breite der PSF die erreichbare Auflösung.

### 5.6.5 Iterationsverfahren zur Verfeinerung der gemittelten Struktur

Zur iterativen Verfeinerung der gemittelten Struktur wurde die Referenz mittels der Prozedur „*av3\_trans\_rot.align.m*“ in die ermittelte Orientierung des jeweiligen Einzelpartikels rotiert und vor der Kreuzkorrelation mit dem *missing wedge*, der sich aus den Aufnahmemodalitäten der Kippserie ergab, gewichtet. Anhand der Intensität des Kreuzkorrelationspeaks kann die Orientierung des Einzelpartikels genauer bestimmt werden, während die Position des Peaks Auskunft über die Auswanderung gibt. Im ersten Schritt werden nacheinander alle erkannten Strukturen durch Kreuzkorrelation aligniert. Als Referenz dazu dient die gemittelte und gefilterte Struktur. Die alignierten erkannten Strukturen werden im nächsten Schritt gemittelt, wobei das so erzeugte Partikelmittel für den nächsten Schritt als Referenz dient. Die folgenden Iterationen wurden bei einer stetig feiner werdenden Winkelabtastung vorgenommen, bis sich die Mittelung nicht mehr veränderte, der Algorithmus also konvergierte. Die Konvergenz wurde mit der Prozedur „*av3\_motlanalyze.m*“ überprüft.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurden Systeme mit dem Ziel untersucht, makromolekulare Komplexe, insbesondere TPP II anhand ihrer Größe und signifikanten Form in ihrer physiologischen zellulären Umgebung mittels Kryoelektronentomographie zu lokalisieren und zu visualisieren.

Tripeptidylpeptidase II kommt nur in eukaryotischen Zellen vor. Diese Zellen sind jedoch in der Regel zu dick, um sie *in toto* elektronenmikroskopisch untersuchen zu können. Für eine dreidimensionale Abbildung der Zellen oder Zellareale müssen die Proben daher in kleinere Einheiten geschnitten werden. Dazu wurden Kryoschnitte von verschiedenen Systemen angefertigt, Tomogramme aufgenommen und Rekonstruktionen erstellt.

Anhand dieser Rekonstruktionen wurden die Auswirkungen der Präparationsartefakte bestimmt und in Bezug auf den Strukturerhalt der Probe diskutiert.

## 6.2 *Cyanidioschyzon merolae*

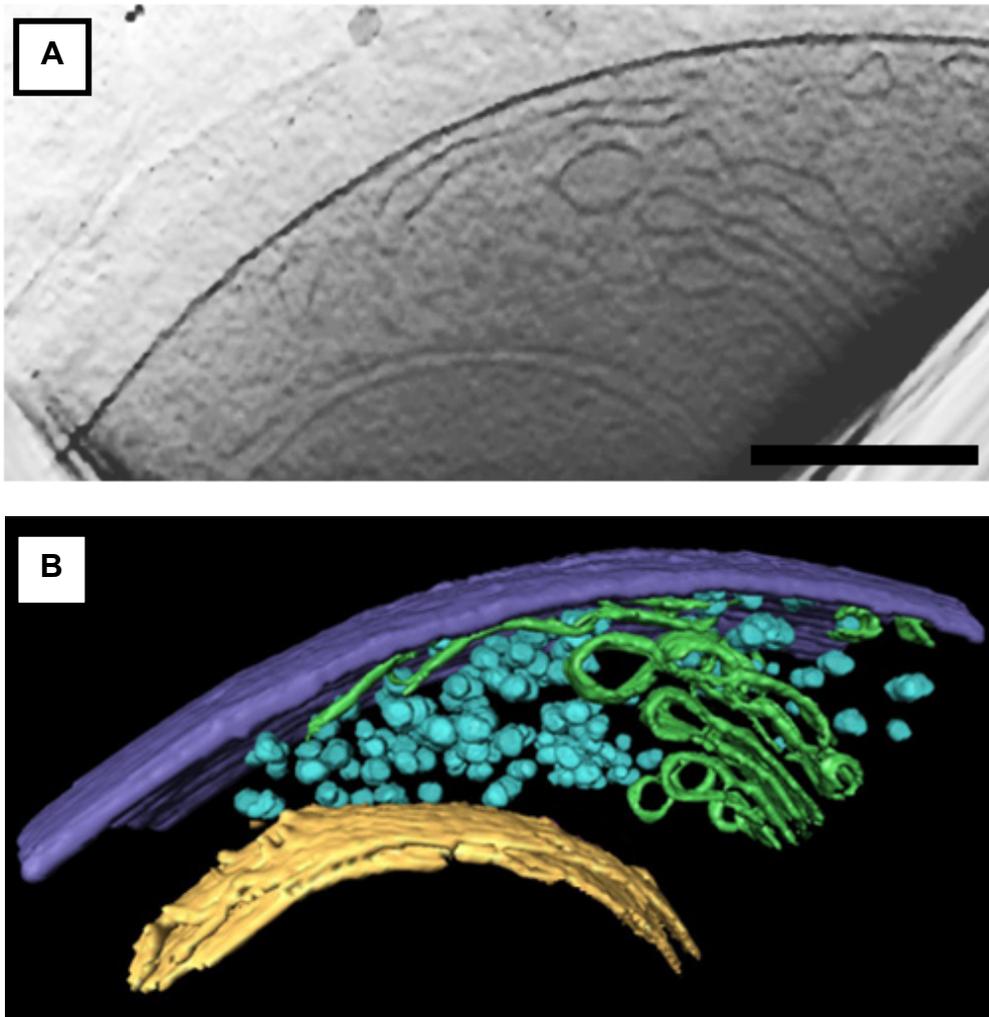
Eine der wenigen eukaryotischen Zellen, die aufgrund ihrer geringen Dicke – zumindest in ihren Randbereichen – *in toto* kryoelektronentomographisch untersucht werden können, ist die einfache einzellige Rotalge *C. merolae*, die einen der kleinsten eukaryotischen Organismen darstellt. Da bei dem Vitrifikationsprozess ganzer Proben weder hohe Drücke noch durch den Schneideprozess induzierte Scherkräfte auftreten, waren die Tomogramme ungeschnittener *C.-merolae*-Proben der Maßstab für eine Abbildung der subzellulären Architektur, die den physiologischen Bedingungen möglichst nahekommt. Tomogramme von Kryoschnitten des gleichen Systems sollten nun Aufschluss darüber geben, wie sich präparationsbedingte, durch die Hochdruckvitrifizierung und den Schneideprozess induzierte Artefakte auf den Strukturverlust auswirkten.

*C. merolae* besitzt einen Plastiden, ein Mitochondrium, einen Zellkern und einen Golgi-Apparat. Aufgrund dieser dichten Organellausstattung kann das Cytoplasma, das fast vollständig mit Stärkegranulae besetzt ist, nur einen geringen Teil des verbleibenden Zellvolumens einnehmen. Die Stärkeeinschlüsse sind besonders anfällig gegenüber der Elektronenbestrahlung. Diese Zellareale scheiden damit *per se* für die Aufnahme von Kippserien aus.

In Einzelfällen umgaben die Stärkeeinschlüsse im Wesentlichen den Bereich des Plastids, während andere Bereiche des Cytoplasmas weitgehend granulaaufrei waren. Lediglich in diesen Arealen konnten Tomogramme aufgenommen und Volumenausschnitte des Cytoplasmas dreidimensional rekonstruiert werden.

### 6.2.1 Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen

Eine solche Rekonstruktion ist in Abbildung 6.2 dargestellt. Im Bereich des Golgi-Apparates (grün) ließen sich die Zisternen mit ihren lateral abschnürenden Vesikeln erkennen. Die Vesikel besaßen eine gleichmäßig runde Morphologie, während die Zisternen die bekannte langgestreckte Form aufwiesen. Etwa einhundert globuläre makromolekulare Komplexe (türkis), die zwischen der Kernmembran (hellgelb) und der Zellwand (dunkelblau) lokalisiert waren, umgaben den Golgi-Apparat.



**Abb. 6.1:** Kryoelektronentomographische Rekonstruktion eines Ausschnitts einer ungeschnittenen, im Einschussverfahren vitrifizierten *C.-merolae*-Zelle mit Teilen des Zellkerns, des Golgi-Apparates und cytosolischer makromolekularer Komplexe.

A: Digitaler *x-y*-Schnitt durch das Tomogramm. Es wurde eine Kippserie mit 49 Projektionen bei einer Vergrößerung von 27.500 x im 2°-Inkrement im Kippwinkelbereich von -48° bis +48° bei einem Defokus von -10 µm aufgenommen und mittels gewichteter Rückprojektion rekonstruiert.

B: Dreidimensionale, segmentierte Oberflächenrepräsentation; Zellwand: dunkelblau; Zellkern-Doppelmembran: hellgelb; Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum: hellgrün; makromolekulare Komplexe: türkis.

Maßstab: 200 nm

### 6.2.2 Vergleich ungeschnittener und kryogesechnittener Proben

Kippserien im Bereich des Plastids konnten ohne erkennbare Strahlschädigungen und in reproduzierbar guter Qualität aufgenommen werden. Nach tomographischer Rekonstruktion ungeschnittener *C.-merolae*-Zellen konnten die Randbereiche des Plastids bis zu einer Tiefe von 400 nm (gemessen von der Zellwand) ins Plastidinnere untersucht werden. Sowohl in den ungeschnittenen als auch in den kryogesechnittenen Proben war die Struktur des Plastids mit seinen Thylakoiden durch die Kryofixierung gut erhalten.

Auffällig war der gelegentlich wellige Verlauf der Thylakoidenmembranen (Abbildung 6.2 B weiße Pfeilspitzen), der jedoch weder durch die Vitrifizierung bei hohen Drücken, das Schneiden oder eine Kombination dieser Faktoren induziert worden sein konnte, da er sowohl bei geschnittenen als auch bei ungeschnittenen Proben zu beobachten war.

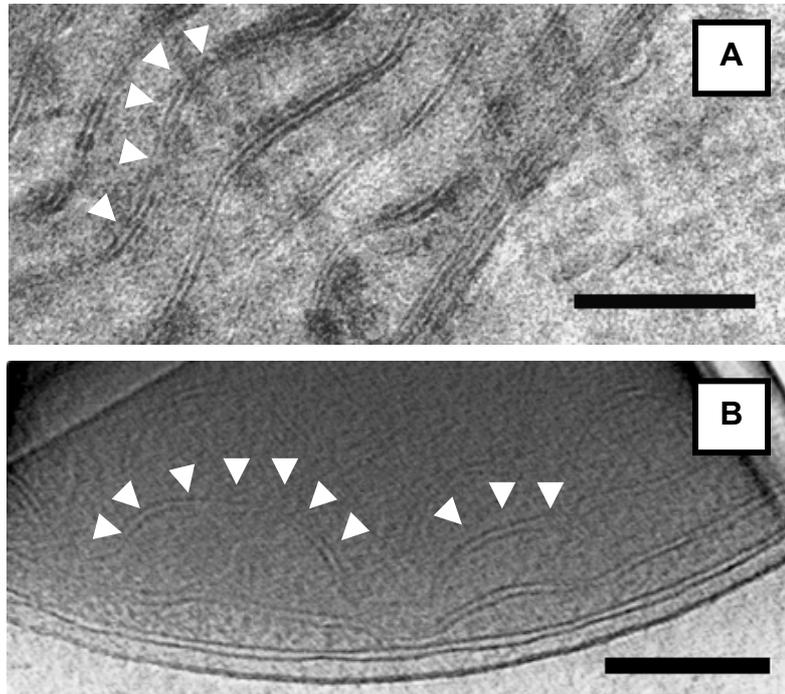
**Abb. 6.2: Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen im Bereich des Plastids von *C. merolae*.**

A: 0°-Projektion eines Kryoschnittes nach Hochdruckfixierung (Dicke: etwa 100 nm)

B: Digitaler  $x$ - $y$ -Schnitt durch das Tomogramm einer ungeschnittenen, im Einschussverfahren vitrifizierten Probe. Es wurde eine Kippserie mit 51 Projektionen im Bereich von  $-50^\circ$  bis  $+50^\circ$  aufgenommen und das Volumen mittels gewichteter Rückprojektion rekonstruiert.

Der wellige Verlauf der konzentrischen Thylakoiden-Doppelmembran ist in beiden Darstellungen durch weiße Pfeilspitzen markiert

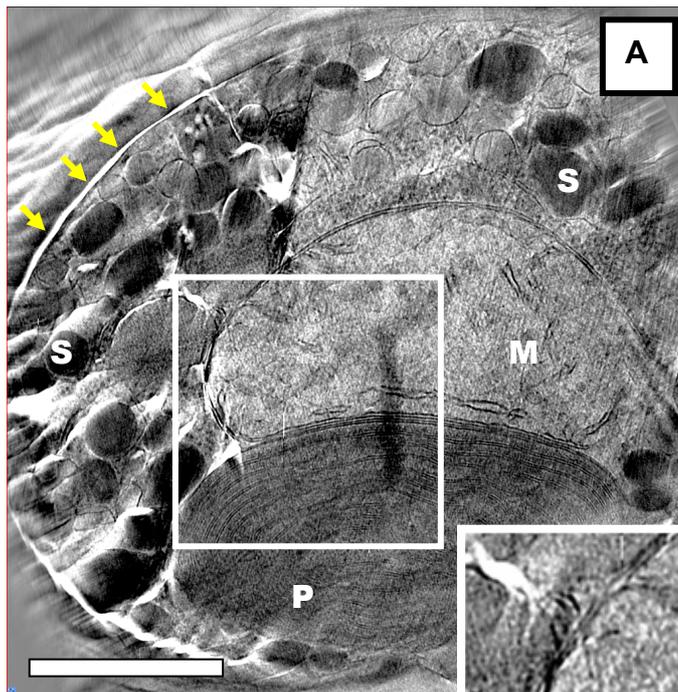
Maßstab 200 nm



Der Abstand der Thylakoidenmembranpaaren in 100-nm dicken Schnitten wurde an mehreren Stellen bestimmt und aufgrund fehlender Referenzwerte aus der Literatur mit dem der ungeschnittenen Proben verglichen. Dabei ergaben sich für die ungeschnittenen Proben Membranabstände von  $12 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$  und für die 100-nm-Schnitte Membranabstände von  $11 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$ . Die Ergebnisse belegen, dass zumindest im Hinblick auf den Abstand der Thylakoidenmembranen die Feinstruktur der Plastiden durch die Hochdruckvitrifizierung und Kryosektion nicht oder nicht nennenswert komprimiert wurde. Andernfalls wäre ein geringerer Membranabstand zu erwarten gewesen.

Bei dickeren Schnitten (100-200 nm) traten zusätzliche Präparationsartefakte auf. Sehr rigide Strukturen neigten dazu, aus dem Schnitt herauszuberechnen (Abbildung 6.3, gelbe Pfeile)<sup>f</sup>.

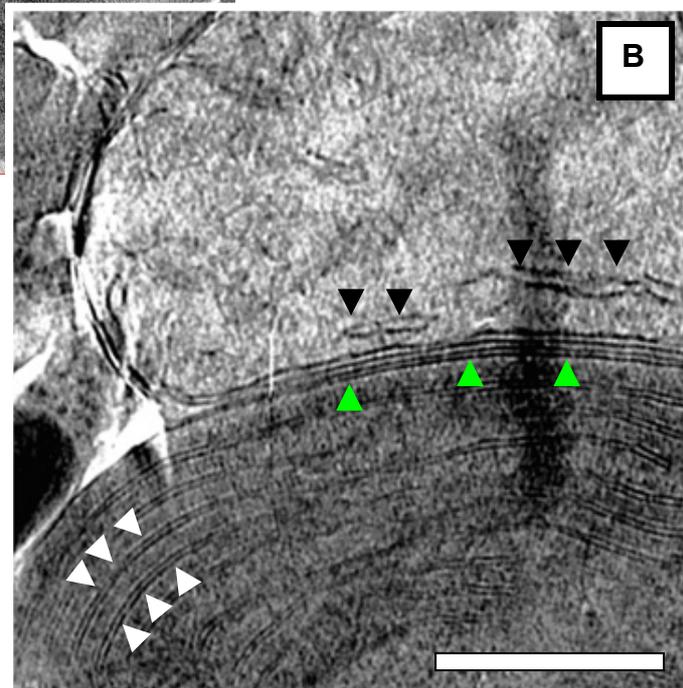
<sup>f</sup> Die Schnittrichtung verläuft hierbei diagonal von links oben nach rechts unten



**Abb. 6.3: Digitaler  $x$ - $y$ -Schnitt durch ein rekonstruiertes Volumen eines 100 nm dicken Kryoschnittes von *C. merolae*.** Das Volumen wurde mit dem SIRT-Algorithmus rekonstruiert. 51 Projektionen wurden über den Kippwinkelbereich von  $-50^\circ$  bis  $+50^\circ$  in  $2^\circ$ -Inkrementen bei einem Defokus von  $-10\ \mu\text{m}$  aufgenommen. Zehn digitale Schichten von je 1,47 nm Dicke wurden in die dargestellte  $x$ - $y$ -Ebene projiziert.

(Abbildung B ist eine Vergrößerung der in A markierten Grenzfläche von Plastid und Mitochondrium)

P: Plastid; M: Mitochondrium; S: Stärkegranulae



Zellkern und Golgi-Apparat sind in dieser Schnittregion nicht vorhanden.

Weißer Pfeilspitzen markieren die gut erhaltenen Plastid-Doppelmembranen.

Schwarze Pfeilspitzen markieren die angeschnittenen Cristae des Mitochondriums.

Gelbe Pfeile markieren Bruchstellen im Bereich der Zellwand und des Plastids.

Plastid und Mitochondrium stehen in engem Kontakt zueinander, dargestellt durch grüne Pfeilspitzen. Dies kann zum einen eine Folge des limitierten Raumes sein, oder auf eine funktionelle Wechselwirkung der beiden Organellen miteinander hinweisen.

Maßstab: A: 500 nm

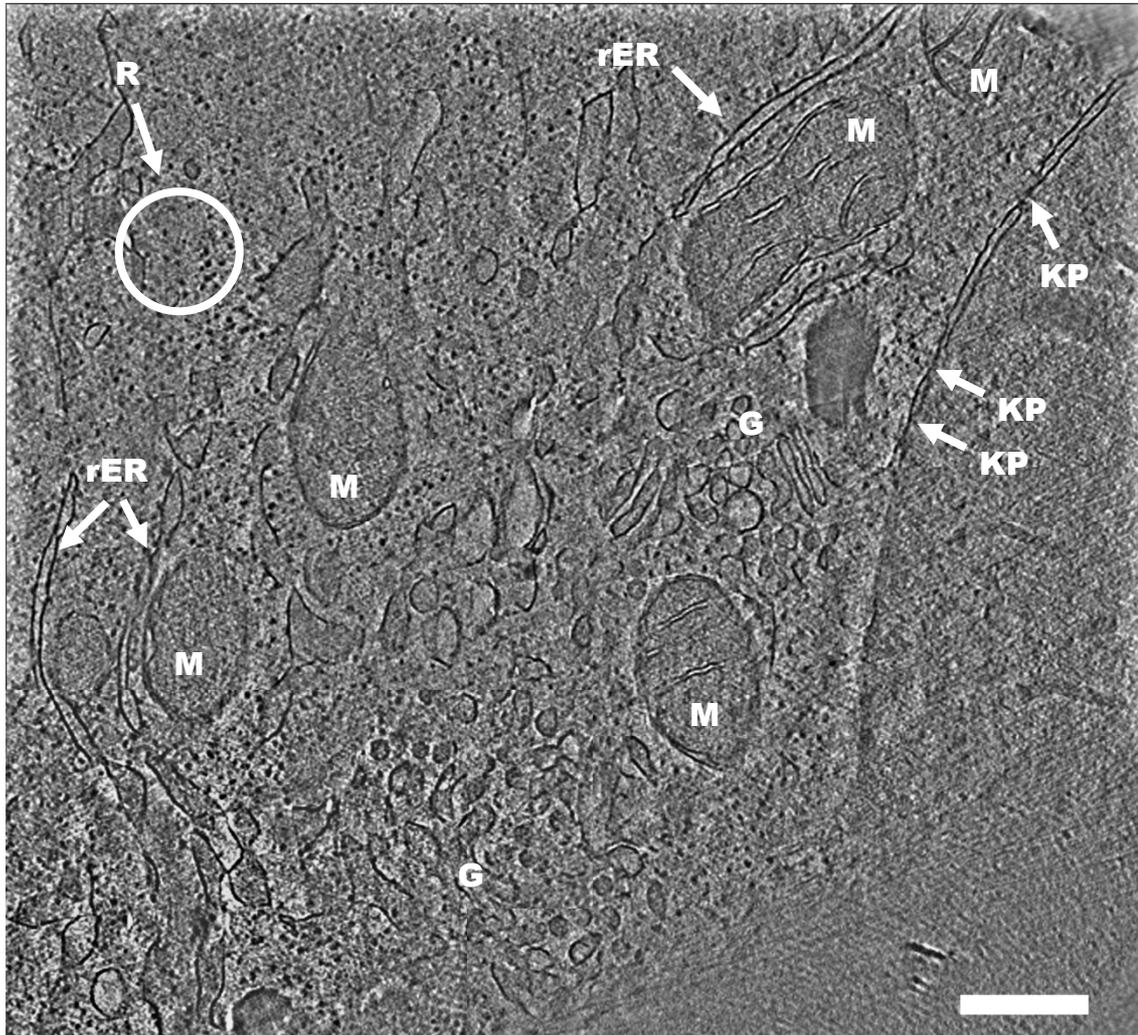
B: 200 nm

### 6.3 HepG2-Zellen

Für die Untersuchung der cytoplasmatischen Organisation und insbesondere für die Lokalisation von TPP II im zellulären Kontext wurde die Hepatokarzinomzelllinie HepG2 kultiviert, da einerseits das Verhältnis von Cytoplasmavolumen zu Gesamzellvolumen größer ist als das der Rotalgen und andererseits es sich hierbei um hochdifferenzierte epitheliale Zellen handelt, die im Gegensatz zu den Rotalgen über einen vollständig entwickelten eukaryotischen Proteolyseapparat, verfügen, in dem auch TPP II exprimiert wird (Bälöw et al. 1983).

### 6.3.1 Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen

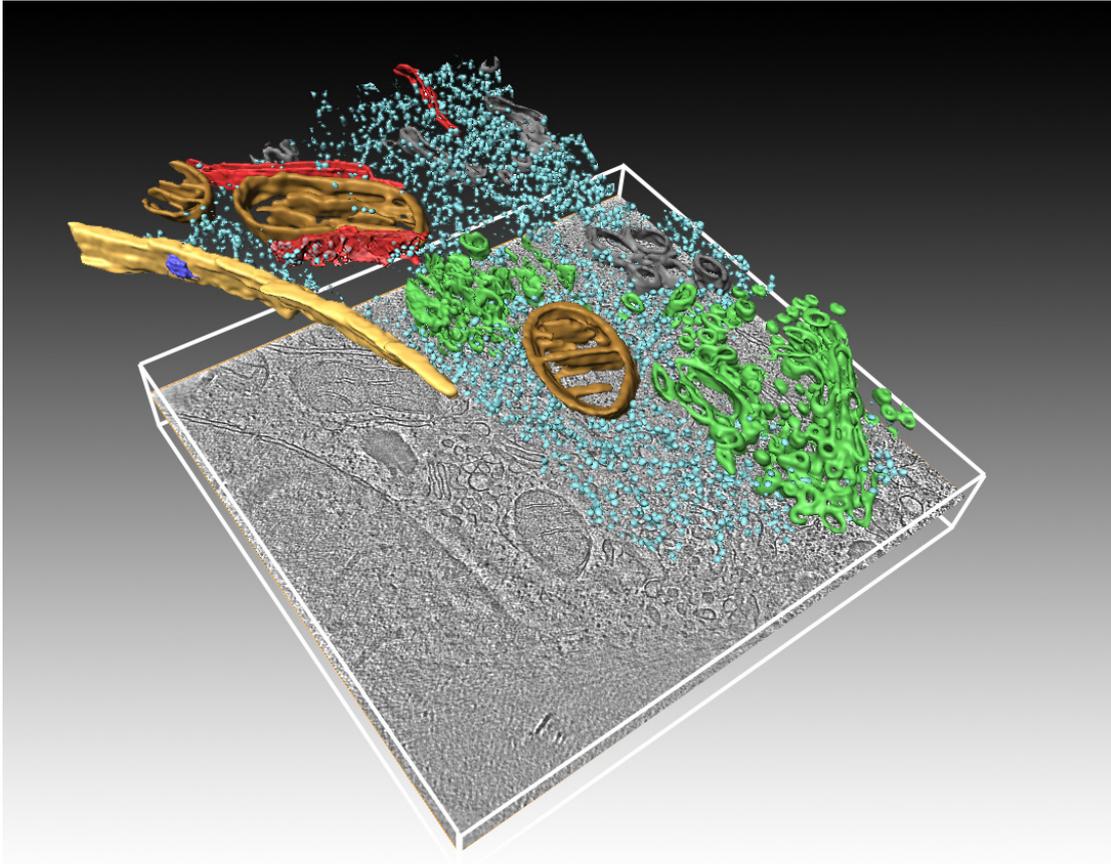
Zunächst wurden Kippserien bei geringer Vergrößerung (5.900 x) aufgenommen, um die strukturelle Integrität der zellulären Struktur zu beurteilen.



**Abb. 6.4: Zelluläre Architektur einer HepG2-Zelle.** (Digitaler  $x$ - $y$ -Schnitt durch ein Tomogramm nach Rekonstruktion eines 200 nm dicken Kryoschnittes mittels gewichteter Rückprojektion) Siebenundfünfzig Projektionen wurden über den Kippwinkelbereich von  $-50^\circ$  bis  $+64^\circ$  in  $2^\circ$ -Inkrementen bei einem Defokus von  $-50 \mu\text{m}$  aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion wurde mittels gewichteter Rückprojektion errechnet. Zehn digitale Schichten von je 2,56 nm Dicke wurden in die  $x$ - $y$ -Ebene projiziert. Die Abbildung ist eine Montage benachbarter Bereiche, die in  $z$ -Richtung manuell aneinander angepasst wurden, um die Unebenheit des Schnittes zu kompensieren. Eine Vielzahl zellulärer Bestandteile ist identifizierbar. Neben Mitochondrien ( $M$ ), dem rauhen endoplasmatischen Retikulum ( $rER$ ) und dem Golgi-Apparat ( $G$ ) sind Kernporen ( $KP$ ) und cytosolische Bereiche mit makromolekularen, globulären Strukturen ( $R$ ) zu erkennen. (Die Darstellung wurde nach der Rekonstruktion zusätzlich hochpassgefiltert) Maßstab: 200 nm,

In den aufgenommenen Tomogrammen waren zahlreiche lösliche Komponenten des Cytoplasmas sichtbar,.

Die rekonstruierten Volumina wurden segmentiert und dreidimensional in einer perspektivischen Ansicht dargestellt (Abbildung 6.5).



**Abb. 6.5: Oberflächendarstellung der subzellulären Organisation einer kryogeschnittenen HepG2-Zelle.** Die Darstellung zeigt die dreidimensional modellierten Oberflächen des in Abbildung 6.4 dargestellten Tomogramms. Kernmembran (gelb); Kernpore (blau), Mitochondrium (braun), Golgiapparat (grün), raues endoplasmatisches Retikulum (rot), makromolekulare Komplexe (türkis)

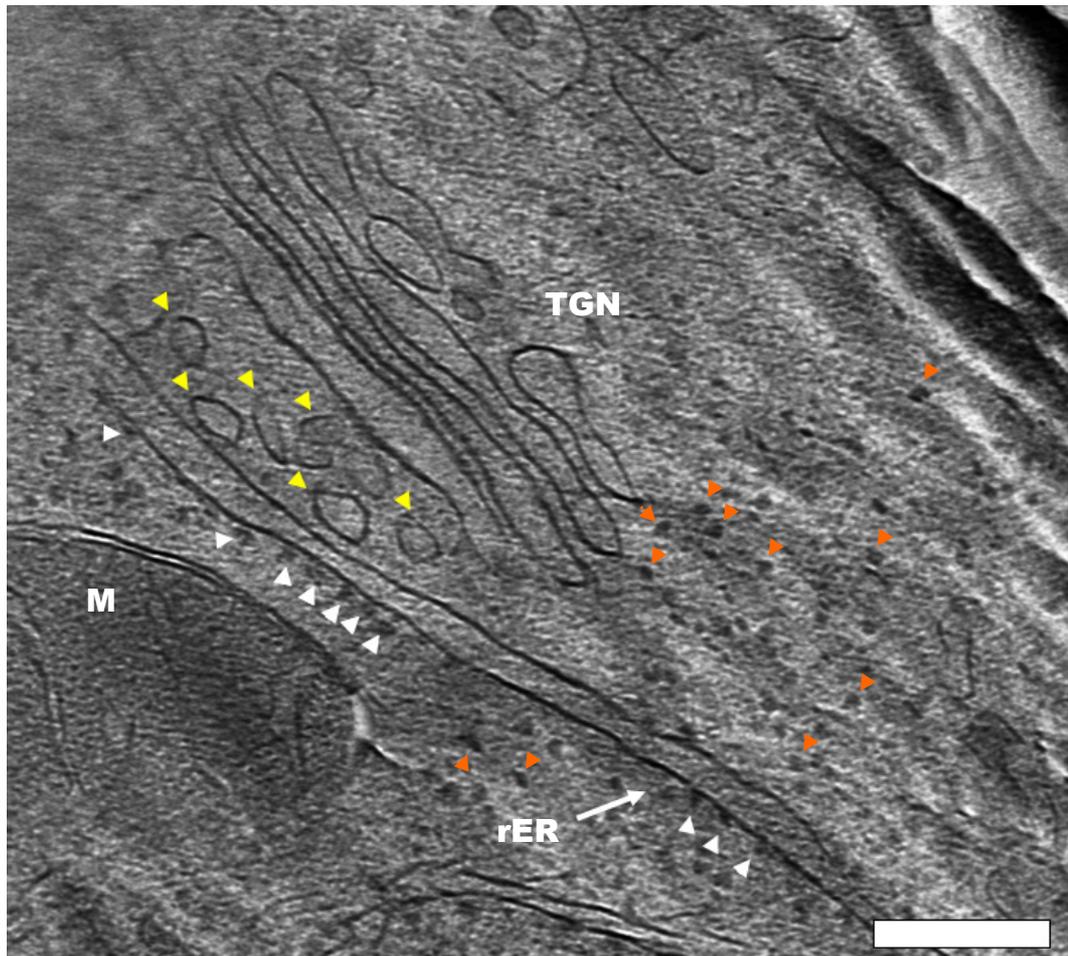
### 6.3.2 Detektion von TPP II

In der Literatur gibt es Hinweise, dass TPP II während der S/G2-Phasen des Zellzyklus am pericentriolaren Golgi-Apparat lokalisiert und den Start der Mitose regelt (Stavropoulou 2006). Aus diesem Grunde wurden bei höherer Vergrößerung (27.500 x) bevorzugt Tomogramme im Bereich des Golgi-Apparates zur systematischen Suche nach TPP-II-Spindeln (Abbildung 6.6) aufgenommen.

Bei der Durchsicht ergaben sich keine Hinweise auf das Vorhandensein von TPP-II-Spindeln. Denkbare Ursachen dafür sind vielfältig. Neben der geringen Expressionsrate von TPP II in Hepatocyten kann eine unvorteilhafte Orientierung die rein-visuelle Erkennbarkeit der charakteristischen Spindelform nahezu unmöglich machen.

Ein Beispiel für eine derart ungünstige Orientierung wäre beispielsweise die direkte Aufsicht entlang der Longitudinal-Achse (der Achse der längsten Ausdehnung des TPP-II-Komplexes). In diesem Falle wäre bei der gegebenen

Auflösung eine kreisrunde Erscheinung zu erwarten, die sich von der Aufsicht der globulären Strukturen nicht oder nur geringfügig unterscheiden würden.



**Abb. 6.6: Anordnung von endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und freien cytosolischen globulären Makromolekülen.**

*x-y*-Schnitt durch ein Tomogramm im Bereich des Golgi-Apparates. Die gelben Pfeilspitzen verweisen auf Vesikel, die wahrscheinlich aus dem rER-Lumen knospen und in Richtung der *cis*-Golgi-Zisternen transportiert werden, wo sie zum ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) fusionieren; Die weißen Pfeilspitzen markieren Ribosomen, die an das rER gebunden sind, orange Pfeilspitzen cytosolische, makromolekulare Komplexe (*rER*: raues endoplasmatisches Retikulum, *M*: Mitochondrium; *TGN*: *trans*-Golgi-Netzwerk); Maßstab: 250 nm

### 6.3.3 Detektion von 80S-Ribosomen

Mit dem bloßem Auge waren einige hundert makromolekulare globuläre Strukturen erkennbar, die den Golgi-Apparat umgaben (Abbildung 6.6, weiße Pfeilspitzen). Die Mehrzahl davon war in dichter Nachbarschaft zum endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Ihre Form und Größe entsprach der von 80S-Ribosomen. Aus diesem Grunde wurde das rekonstruierte Schnittvolumen mit einer 80S-Ribosom-Referenz (Spahn et al. 2001) durchsucht.

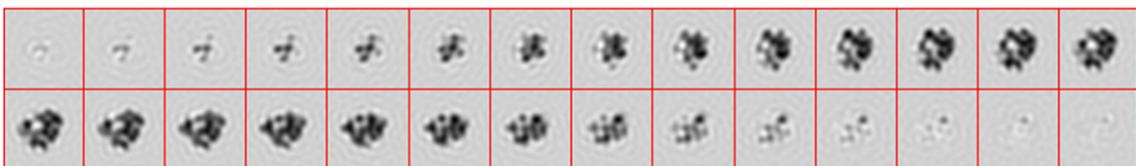
Die TPP-II- und 80S-Ribosom-Referenzen korrelierten nicht nur mit cytoplasmatischen Strukturen, sondern auch mit Membranen des Golgi-Apparates und des

endoplasmatischen Retikulums, sowie mit den kontrastreichen *Crevassen*. Zusätzlich korrelierte die 80S-Ribosom-Referenz im Gegensatz zur TPP-II-Referenz mit den globulären Partikeln.

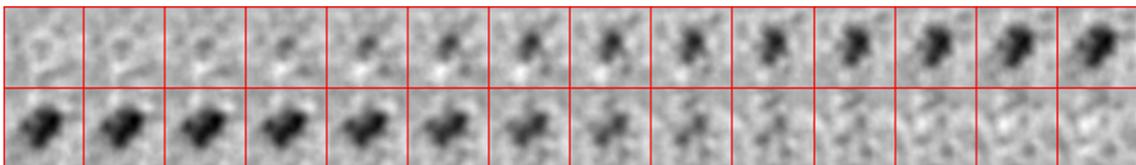
Die Positionen und Orientierungen der 280 Partikel mit den höchsten Kreuzkorrelationskoeffizienten wurden in einer Liste (*Motivliste*) gespeichert.

Nach manueller Aussortierung falsch-positiver Partikel (Korrelationen mit Membranen und Artefakten) blieben noch 52 potentielle Ribosomen zurück, die rekonstruiert, auf einander ausgerichtet, gemittelt und tiefpassgefiltert wurden.

**A: Initialreferenz 80S-Ribosom** (Spahn et al. 2001)



**B: Ergebnis: Aus 52 erkannten Einzelstrukturen gemittelt und gefiltertes Partikel** (als Referenz wurde die Struktur aus A eingesetzt)



**Abb. 6.7: Ergebnisse der automatisierten Strukturerkennung in HepG2-Zellen.**

Obwohl die Mittelung (Abbildung 6.7 B) weniger Strukturdetails aufweist, lässt sich doch eine deutliche Ähnlichkeit in Größe und Form mit der eingesetzten Referenz (Abbildung 6.7 A) feststellen.

Diese ersten Ergebnisse legten damit die Vermutung nahe, dass es möglich sein könnte, bekannte Strukturen auf die beschriebene Weise im komplexen zellulären Kontext zu lokalisieren.

Dennoch wurde aufgrund der fehlerhaften Korrelationen der Referenz mit Membranen und Artefakten und der damit verbundenen geringen Partikelzahl an dieser Stelle die gemittelte Struktur nicht iterativ verfeinert (siehe 5.6.5), da unter den gegebenen Bedingungen allenfalls mit einer schlechten Auflösung zu rechnen gewesen wäre, die keine aussagekräftigen Schlussfolgerungen zulässt.

## 6.4 *Escherichia coli*

*E. coli* ist ein etabliertes System zur Überexpression von Proteinen. Es ermöglicht außerdem im Vergleich zu den höheren Eukaryonten Untersuchungen in einer deutlich weniger komplexen intrazellulären Umgebung. Im Folgenden wurde daher ein genetisch modifizierter *E.-coli*-Stamm verwendet, der dTPP II überexprimierte.

Zusammen mit der Möglichkeit dTPP II in deutlich größeren Raten zu exprimieren, als sie natürlicherweise in eukaryotischen Systemen vorkommt, bietet die Vereinfachung somit den idealen Ansatz für ein optimiertes Detektionssystem, ohne auf den zellulären Kontext zu verzichten.

Die Vereinfachung des Systems lässt sich im Wesentlichen darauf zurückführen, dass *E. coli* keine intrazellulären membranumschlossene Kompartimente und Organellen besitzt, die, wie im Falle der zuvor erwähnten Hepatocyten, mit der eingesetzten Referenz korrelieren können. So kann die Zahl der falsch-positiven Korrelationen wenn auch nicht ganz ausgeschlossen, jedoch zumindest deutlich reduziert werden (siehe dazu auch 6.4.2 und 6.4.3).

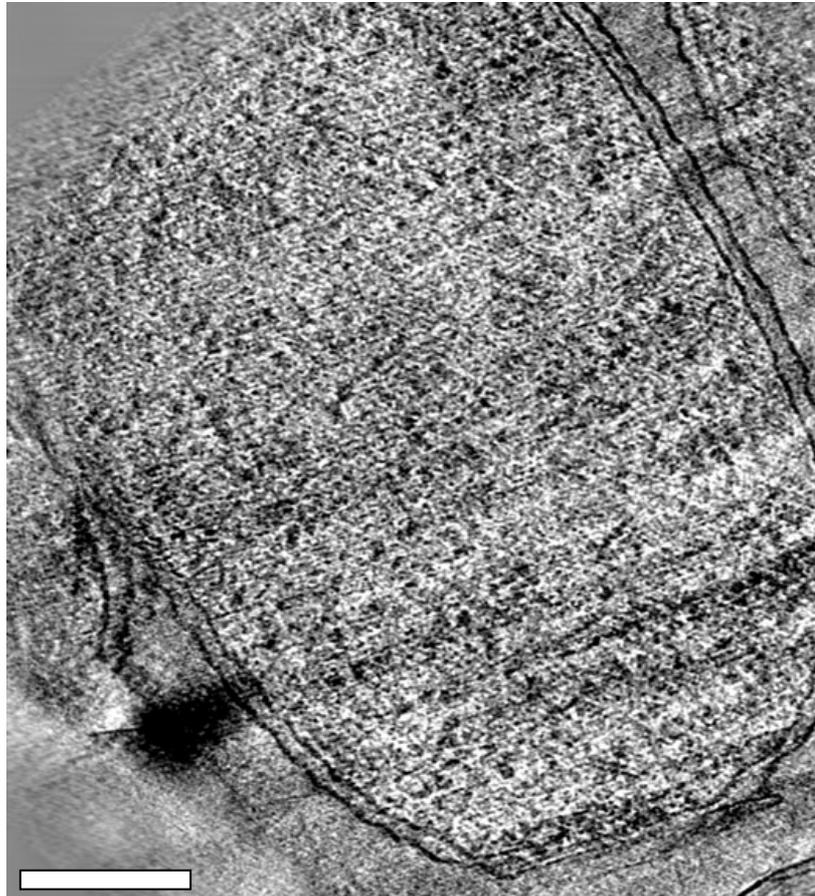
### 6.4.1 Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen

Es wurden Kippserien an Kryoschnitten von *E.-coli*-Bakterien bei hoher Vergrößerung von (27.500 x) aufgenommen, um das Cytoplasma der Zellen nach TPP II zu durchsuchen. Auch wenn Bakterien *per se* nicht mit dem Proteolyseapparat höherer Eukaryonten ausgestattet sind, und daher die Detektion zu Lokalisierungszwecken keinerlei Aussagekraft hat, so erscheint es jedoch sinnvoll, zunächst zu überprüfen, ob sich TPP II überhaupt in (irgend)einem zellulären Kontext detektieren lässt.

### 6.4.2 Detektion von heterolog-überexprimierter dTPP II

Im SIRT-rekonstruierten *E.-coli*-Tomogramm ließen sich einige hundert globuläre Strukturen ähnlicher Größe erkennen (Abbildung 6.8). Allerdings war es nicht möglich, dTPP-II-Einzelstränge oder ganze Spindeln mit bloßem Auge zu identifizieren. Um auszuschließen, dass die Komplexe bei der rein-visuellen Durchsicht übersehen werden, da sie unter Umständen axial verkippt, oder in

anderer Form ungünstig für das menschliche Auge im Volumen orientiert vorliegen, wurde eine automatisierte Detektion mit einer dTPP-II-Einzelstrang- und einer dTPP-II-Spindelreferenz durchgeführt.



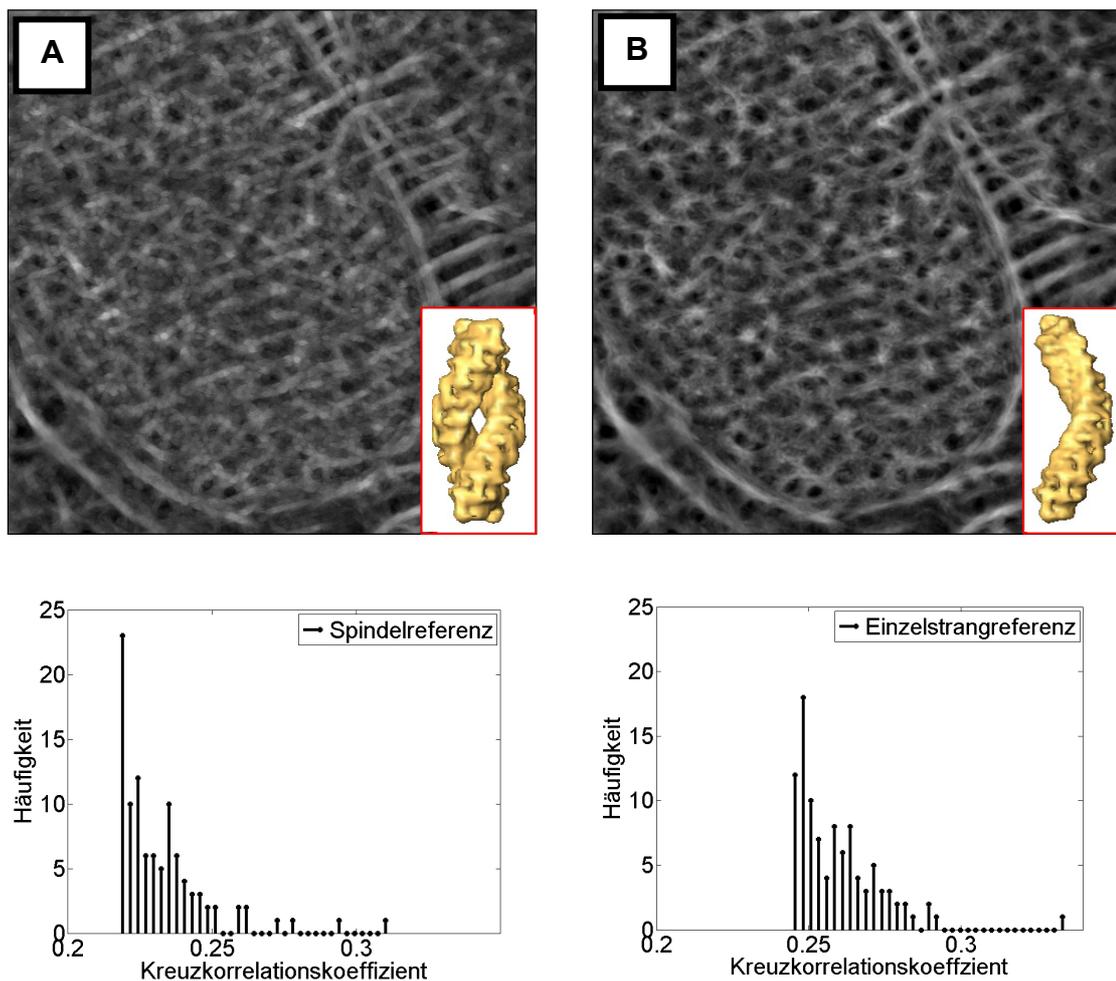
**Abb. 6.8: Kryoelektronentomographische Rekonstruktion eines Kryoschnittes von *Escherichia coli* (dTPP II überexprimierend)**

SIRT-Rekonstruktion eines *E.-coli*-Bakteriums. Zur Veranschaulichung wurden zehn digitale Schichten in die  $x$ - $y$ -Ebene projiziert, woraus eine virtuelle Schichtdicke von 5,5 nm resultierte. Es wurden 53 Projektionen im Bereich von  $-52^\circ$  bis  $+52^\circ$  mit einem Kippwinkelinkrement von  $2^\circ$  aufgenommen. Maßstab: 200 nm

Sowohl die dTPP-II-Einzelstrang-Referenz als auch die dTPPII-Spindelreferenz korrelierten aufgrund ihrer langgestreckten Form teilweise mit den verbleibenden, kontrastreichen Artefakten<sup>9</sup>, jedoch – wie erwartet – kaum mit den globulären Partikeln (Abbildung 6.9). Die Durchsicht der korrelierten Strukturen bestätigte, dass im rekonstruierten Volumen weder dTPP-II-Einzelstränge noch Spindeln gefunden wurden. Die Kreuzkorrelationskoeffizienten lagen in beiden Fällen im Bereich von  $<0,35$ , was – in anderen Worten – bedeutet, dass keinerlei dTPP-II-Einzelstränge oder -Spindeln mit annehmbarer Sicherheit detektiert werden konnten. Im Gegenteil, aufgrund der erhaltenen Daten ist davon auszu-

<sup>9</sup> Zur Detektion wurden die artefaktreichen Teile des Volumens computergestützt ausmaskiert, um eine falsch-positive Korrelation zu vermeiden. *Crevassen* lassen sich jedoch z.B. nicht ausmaskieren.

gehen, dass weder Einzelstränge noch Spindeln im untersuchten Volumen vorhanden waren.



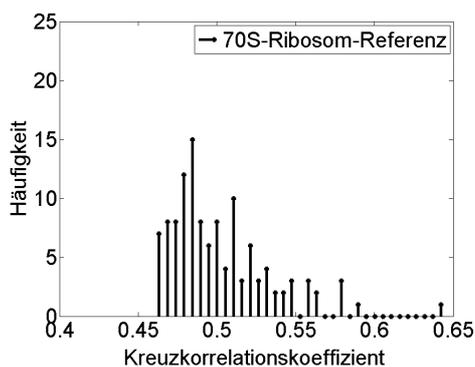
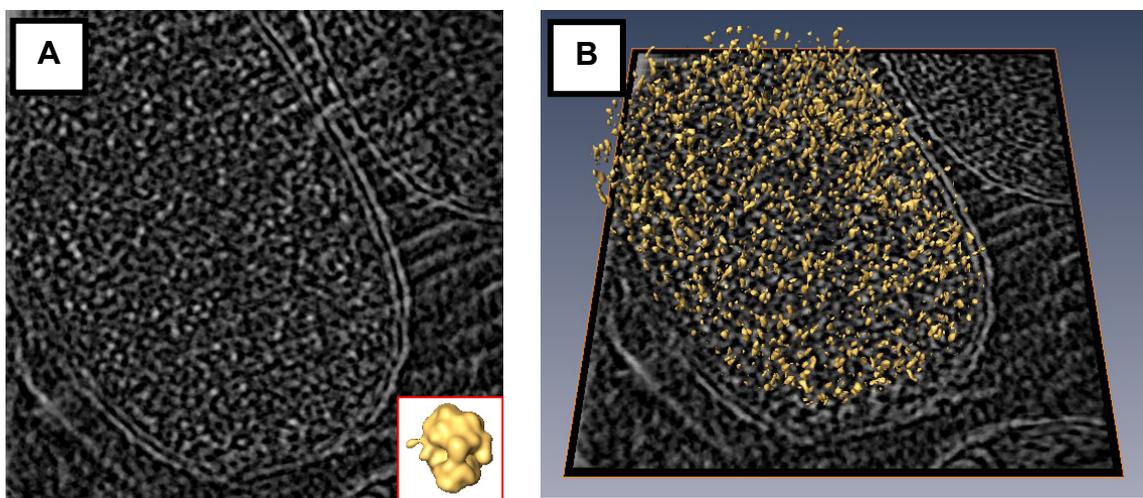
**Abb. 6.14:** Darstellung der Kreuzkorrelationsfunktionen (Ausschnitte der zentralen Schicht) nach automatisiertem Strukturvergleich mit einer dTPP-II-Spindel (A) und einem dTPP-II-Einzelstrang (B). Darunter ist jeweils das entsprechende Histogramm über die Häufigkeit der Kreuzkorrelationskoeffizienten mit den 100 höchsten Werten aufgetragen. Dabei fällt auf, dass die langgestreckten Referenzen bevorzugt mit der Zellwand und den Schneideartefakten (hier *Crevassen* und *Chatter*), jedoch nicht mit den globulären cytosolischen Strukturen korrelieren.

Die Ergebnisse aus dem Strukturvergleich zeigen, dass die Höhe der Kreuzkorrelationskoeffizienten im Falle der dTPP-II-Einzelstränge verglichen mit den dTPP-II-Doppelsträngen zu höheren Werten verschoben ist. Die schmalen Einzelstränge korrelierten also eher mit der Zellwand und den schmalen, langgestreckten Schneideartefakten als die breiteren Spindeln.

### 6.4.3 Detektion von nativ-exprimierten 70S-Ribosomen

Um zu überprüfen, inwieweit detektierbare makromolekulare Komplexe in Kryoschnitten ganzer Zellen nach Mittelung der Einzelpartikelvolumina der Struktur der vermeintlich passenden Referenzstruktur entsprechen, wurde zusätzlich das Volumen zusätzlich zu der TPP-II-Referenzstruktur auch noch mit einer 70S-Ribosom-Struktur (Schuwirth et al. 2005) durchsucht. Die Referenz korrelierte mit 298, vornehmlich globulären, cytosolischen Strukturen (Abbildung 6.10 A und B).

Eine Korrelation mit langgestreckten Artefakten, wie sie bei der dTPP-II-Referenz der Fall war, trat deutlich seltener auf. Dennoch mussten unter visueller Kontrolle von den anfänglich 298 detektierten Partikeln 179 aussortiert werden, bei denen es sich mutmaßlich nicht um 70S-Ribosomen, sondern um Korrelationen mit der Zellwand, Artefakten oder Kontaminationen handelte. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Partikel, die zu dicht an der Zellwand oder an benachbarten Partikeln lokalisiert waren. Alle diese Partikel wurden als „Falsch-Positive“ zusammengefasst und trugen nicht zur Mittelung bei. Alle übrigen Komplexe wurden auf die Referenzstruktur ausgerichtet und zu einem gemittelten Partikel aufaddiert.



**Abb. 6.10:** Darstellung der Kreuzkorrelationsfunktion (Ausschnitt der zentralen Schicht (A)), nach automatisiertem Strukturvergleich mit einer 70S-Ribosomreferenz und Visualisierung der Positionen aller gefundenen Partikel in einer Oberflächendarstellung vor manueller Aussortierung (B).

Darunter ist das entsprechende Histogramm über die Häufigkeit der Kreuzkorrelationskoeffizienten der 119 manuell ausgewählten Partikel aufgetragen.

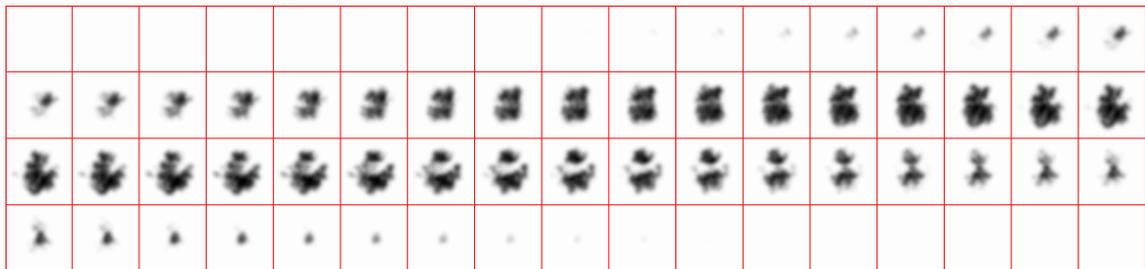
Die einhundert Kreuzkorrelationskoeffizienten mit den höchsten Werten lagen in diesem Fall im Bereich von 0,45 bis 0,6. Damit ist das Maß der Ähnlichkeit der detektierten Partikel mit der eingesetzten 70S-Ribosomreferenz signifikant größer als mit den langgestreckten TPP-II-Referenzen, was ein hinreichendes Kriterium zur Mittelung und Rekonstruktion der detektierten Partikel darstellt.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Wahl der Startreferenz das Ergebnis der Mittelung bei Daten, die durch starkes Rauschen überlagert sind, beeinflussen kann (Penczek et al. 1992). Im Extremfall kann das dazu führen, dass nach Korrelationsmittelung aus einem Volumen, das nur Rauschen enthält, eine Kopie der Referenz generiert wird (van Heel et al. 1992), (Grigorieff 2000). Um deren Strukturbeitrag möglichst gering zu halten, wurde das gemittelte Partikel iterativ verfeinert (Penczek et al. 1994) (siehe 5.6.5). Tabelle 2 gibt das Iterationsschema wieder.

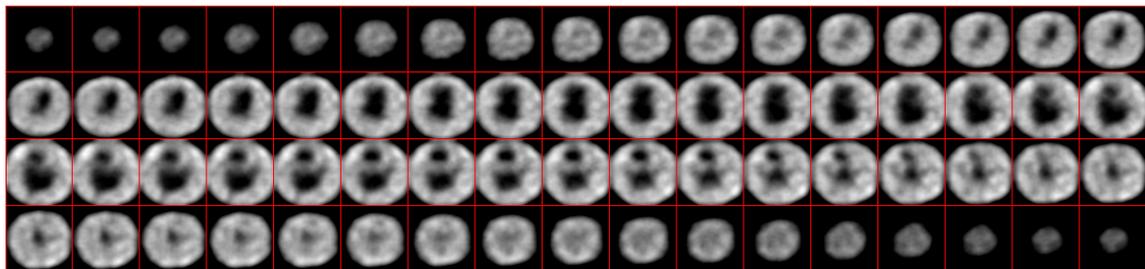
Index	Winkelinkrement	Iterationen für jeden Eulerwinkel
1	10°	3
2	5°	3
3	3°	2
4	3°	2
5	3°	2
6	2°	2
7	1,5°	2
8	1,5°	2
9	1,5°	2

Tabelle 2: Schema des iterativen Verfeinerungsprozesses.

A: Initialreferenz 70S-Ribosom (Schuwirth et al. 2005)



B: Ergebnis: Aus 119 erkannten Einzelstrukturen tiefpassgefilterte Mittelung. Als Referenz wurde die Struktur aus A eingesetzt



C: Ergebnis: Iterativ verfeinertes und tiefpassgefiltertes Partikel nach 9 Iterationen (Referenz: In B dargestelltes Partikel)

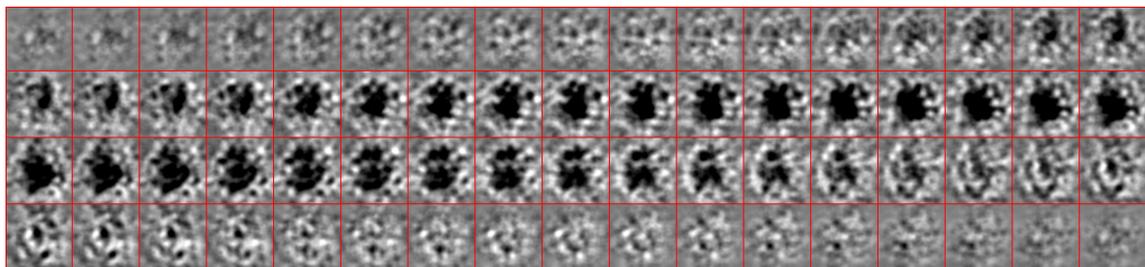
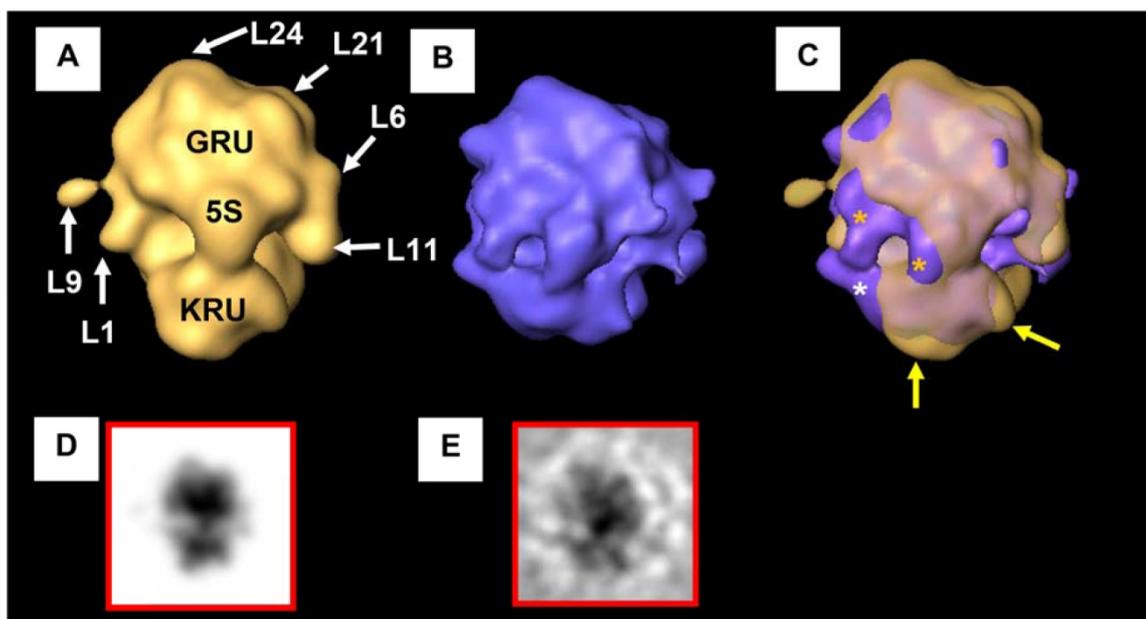


Abb. 6.11: Ergebnisse der automatisierten Strukturerkennung prokaryotischer Ribosomen in *E.-coli*-Bakterien.

Für alle in dieser Arbeit beschriebenen Fälle konvergierte diese Verfeinerungsmethode mit dem dritten Iterationsschritt. Dennoch wurde die Struktur zur Sicherheit in neun Iterationszyklen verfeinert. Durch diese Vorgehensweise wird der Strukturbeitrag der Referenz zum rekonstruierten Partikel stetig verringert (Abbildung 6.11 B und C).

Besonders im Bereich der ribosomalen Proteine L21 und L24 der großen ribosomalen Untereinheit (GRU, 50S) stimmte die Struktur des gemittelten Partikels bei der gegebenen Auflösung weitestgehend mit der Referenzstruktur überein, während das Protein L11 nur schlecht repräsentiert war, L9 fehlte in der Mittelung vollständig. Zusätzliche Dichten im Bereich der großen ribosomalen Untereinheit (Abbildung 6.12, Stern, orange) und daran angrenzend im Bereich der kleinen ribosomalen Untereinheit (Stern, weiß) konnten keine Strukturen in der Referenz zugeordnet werden. In anderen Arealen der KRU fehlte es in der gemittelten Struktur gegenüber der Referenz an Elektronendichte (gelbe Pfeile).



**Abb. 6.12:** Ergebnis des automatisierten Strukturvergleichs in *E.-coli*-Bakterien mit einer 70S-Ribosomenreferenz

Oberflächendarstellung des 70S-Ribosoms mit „kleiner ribosomaler Untereinheit“ (KRU, 30S) unten und großer ribosomaler Untereinheit“ (GRU, 50S) oben. (A): 70S-Referenz mit markierten Domänen der GRU; (B): Ergebnis nach Mittelung von 119 Partikeln und anschließender iterativer Verfeinerung der Struktur; (C): Überlagerung beider Strukturen, wobei die Oberfläche der Referenzstruktur transparent dargestellt ist. Sterne markieren Bereiche zusätzlicher Elektronendichte (orange: GRU; weiß: KRU), gelbe Pfeile markieren Bereiche der KRU in denen das Mittel gegenüber der Referenz unterrepräsentiert ist; (D): Projektion der 70S-Referenz; (E): Projektion des iterativ verfeinerten Mittels nach 9 Iterationen.

## 6.5 *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen

Neben dem bakteriellen Expressionssystem wurde ein eukaryotisches Expressionssystem für dTPP II etabliert, das es einerseits erlaubt, genetische Veränderungen im *dtp-II*-Gen zu induzieren, z.B. durch Insertion einer Fluoreszenzkomponente enthaltenden Gensequenz, um auf diese Weise das autolog überexprimierte dTPP-II in der Zelle mit Konfokallasermikroskopie lokalisierbar zu machen, und das andererseits durch eine moderate Überexpression einen möglichst geringen Eingriff in das normale Expressionsverhalten der Zellen darstellt, so dass die zelluläre Verteilung von dTPP II den physiologischen Bedingungen möglichst nahekommt.

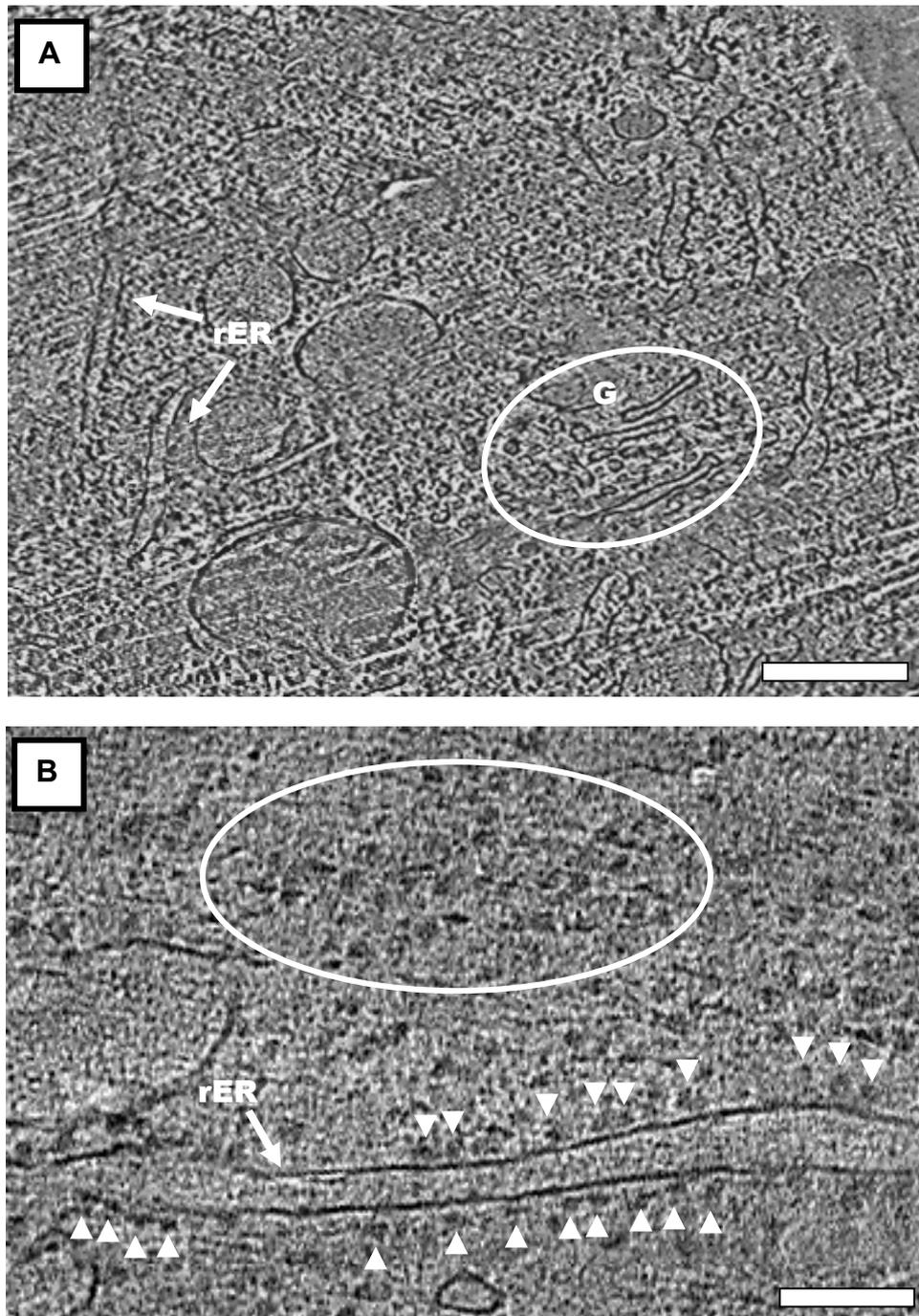
### 6.5.1 Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen

Übersichtstomogramme wurden bei geringer Vergrößerung (5.900 x) aufgenommen, um die strukturelle Erhaltung der zellulären Architektur nach Hochdruckvitrifizierung und Kryo-Ultramikrotomie zu bestimmen.

Die Tomogramme von artefaktarmen Schnittbändern legen nahe, dass die subzelluläre Struktur der Zellen gut erhalten ist (Abbildung 6.13 A). In den Übersichtstomogrammen lassen sich Organellen wie Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien neben vesikulären und elektronendichten cytosolischen makromolekularen Strukturen in ihrem physiologischen Gefüge erkennen. Hinweise auf Agglomeration der cytosolischen Komponenten, die auf einen Kollaps des Cytoplasmas deuten, wie er beispielsweise aus entwässernden/trocknenden und das Cytosol substituierenden Präparationsmethoden folgt, waren nicht zu erkennen.

Bei höheren Vergrößerungen (Abbildung 6.13 B) wurden Tomogramme im Bereich des rauhen endoplasmatischen Retikulums aufgenommen, die eine ähnlich dichte Verteilung von membrangebundenen und freien cytosolischen Makromolekülen zeigten, wie in vergleichbaren Bereichen der Leberzellen (Abbildung 6.6).

Auch hier deuten Form und Größe und Verteilung darauf hin, dass es sich um 80S-Ribosomen handelt.



**Abb. 6.13: Kryoelektronentomographische Rekonstruktionen von *Drosophila*-Schneider-S2-Kryoschnitten.**

A:  $x$ - $y$ -Schnitt einer Rekonstruktion der subzellulären Architektur (Vergrößerung: 5.900 x, Defokus:  $-50 \mu\text{m}$ ). Es wurden 5 Schichten in eine Ebene projiziert und das Bild hochpassgefiltert (*rER*: raues endoplasmatisches Retikulum, G: Golgiapparat). Maßstab: 200 nm

B:  $x$ - $y$ -Schnitt im Bereich des endoplasmatischen Retikulums mit freien cytosolischen globulären Makromolekülen. Weiße Pfeilspitzen: ER-ständige Ribosomen; weiß markierter Bereich: cytosolische, makromolekulare Komplexe (*rER*: raues endoplasmatisches Retikulum). Es wurden 14 Schichten in eine Ebene projiziert. Maßstab: 100 nm

Eine signaturgestützte Detektion der potenziellen Ribosomen wurde jedoch aufgrund der in 6.3.3 beschriebenen zu erwartenden fehlerhaften Korrelation und der damit verbundenen mangelnden Signifikanz für die *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen nicht durchgeführt.

### 6.5.2 Amplifikation des *dtp-II*-Gens

Zunächst wurden zwei verschiedene Bedingungen getestet, um das 4065-bp-große *dtp-II*-Gen aus dem pET30b\_*dtp-II*-Vektor zu amplifizieren. Dabei war es notwendig, eine Polymerase zu finden, die lange Nukleotidsequenzen schnell und zuverlässig abliest und amplifiziert. Es wurden die Taq-Polymerase (NEB) und das „Roche long template amplification kit“ verwendet und eine Polymerasekettenreaktion unter den in Tabelle 3 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Amplifikation waren im Falle der Taq-Polymerase ein unspezifisches Produkt, das zwar ein starkes UV-Signal bei 4 kb (dem erwarteten dTPP-II-Produkt) zeigte, darüber hinaus aber auch Banden bei 1 kb und etwa 2,5 kb und sehr viel unspezifischen Hintergrund aufwies (Abbildung 6.14). Im Falle der Roche-Polymerase zeigte sich dagegen eine scharfe Bande bei 4 kb und deutlich weniger Hintergrund.

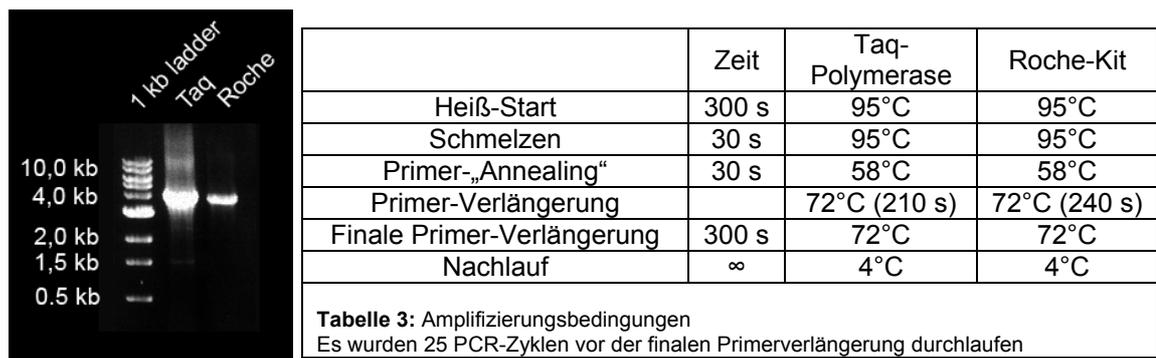
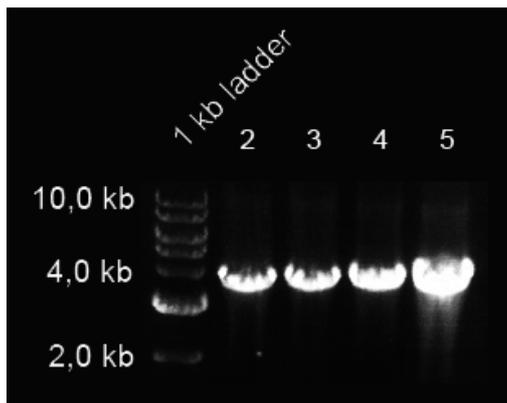


Abb. 6.14: Amplifizierung des *dtp-II*-Gens aus pET30b\_*dtp-II* mittels Taq-Polymerase und „Roche long template amplification kit“

Aus diesem Grunde wurde für alle weiteren Amplifikationsversuche das „Roche long template amplification kit“ eingesetzt. Des Weiteren wurden Primer-Annealing-Temperatur, dNTP-Konzentration und Verlängerungszeit optimiert. Die besten Bedingungen wurden mit den in Tabelle 4 dargestellten Temperatur- und Zeitparametern erreicht. Außerdem ließen sich die höchsten Ausbeuten an *dtp-II*-DNS bei einem Verhältnis von Polymerase zu dNTPs von 1:2 erzielen (Abbildung 6.15). Die Sequenzierung der DNS aus der Bande der Spur 5 bestätigte, dass es sich bei dem Amplifikat um *dtp II* handelte.



Spur 2: 0,5  $\mu$ L Polymerase, 1,0  $\mu$ L dNTPs  
 Spur 3: 1,0  $\mu$ L Polymerase, 1,0  $\mu$ L dNTPs  
 Spur 4: 0,5  $\mu$ L Polymerase, 1,0  $\mu$ L dNTPs  
 Spur 5: 1,0  $\mu$ L Polymerase, 2,0  $\mu$ L dNTPs

	Zeit	Temperatur
Heiß-Start	300 s	94°C
Schmelzen	30 s	94°C
Primer-„Annealing“	30 s	58°C
Primer-Verlängerung	240 s	68°C
Finale Primer-Verlängerung	300 s	68°C
Nachlauf	$\infty$	4°C

**Tabelle 4:** Amplifizierungsbedingungen  
 Es wurden 25 PCR-Zyklen vor der finalen Primerverlängerung durchlaufen

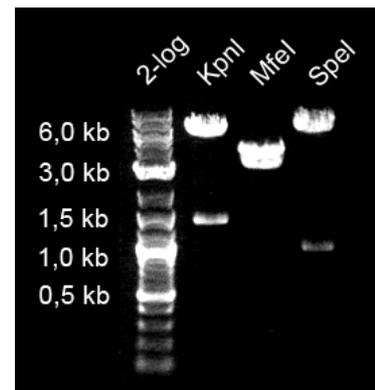
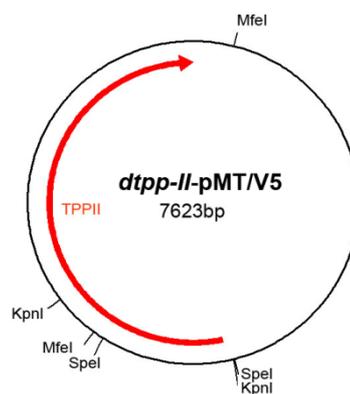
**Abb. 6.15: Optimierung des Verhältnisses von Polymerase zu dNTPs.**

Das beste Amplifikationsergebnis konnte bei einem Verhältnis von 1:2 (1,0  $\mu$ L Polymerase zu 2,0  $\mu$ L dNTPs) erzielt werden

### 6.5.3 TOPO-Klonierung von *dtp-II*

Die *dtp-II*-DNS wurde in den pMT/V5-Vektor ligiert und dann in *E. coli* transformiert.

Mittels endonukleolytischer Spaltung konnte nachgewiesen werden, dass der Klon das *dtp-II*-Gen in korrekter Leserichtung enthielt. Die Sequenzierung des Vektors mit integriertem *dtp II* ergab, dass mit Ausnahme einer stillen Punktmutation (C2874A) die 4065 bp lange *dtp-II*-Sequenz fehlerfrei in den TOPO-Vektor eingefügt war.



**Abb. 6.16: Endonukleolytische Spaltung zur Kontrolle der Orientierung des eingefügten *dtp-II*-Gens.**

Links: Schematische Darstellung des TOP-*dtp-II*-Konstruktes mit Position des *dtp-II*-Gens (rot) und eingezeichneten Restriktionsstellen.

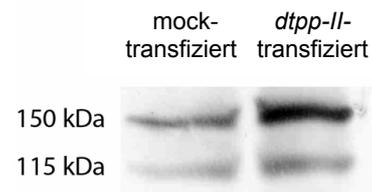
Rechts: Ergebnis der Kontrollrestriktion mit den Restriktionsendonukleasen KpnI, MfeI und SpeI. Das Bandenmuster zeigt, dass das *dtp-II*-Gen in der richtigen Orientierung in den Vektor eingefügt ist.

### 6.5.4 Bestimmung der Überexpression von dTPP II

Das so hergestellte TOPO-*dtp-II*-Konstrukt (*dtp-II*-pMT/V5) wurde in *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen transfiziert und transient überexprimiert. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für eine transiente Überexpression, wurden die in 5.1.3.1 und 5.1.3.2 beschriebenen Transfektionsansätze gewählt. Beide Methoden lieferten ähnliche Überexpressionsraten (gemessen an der Aktivität

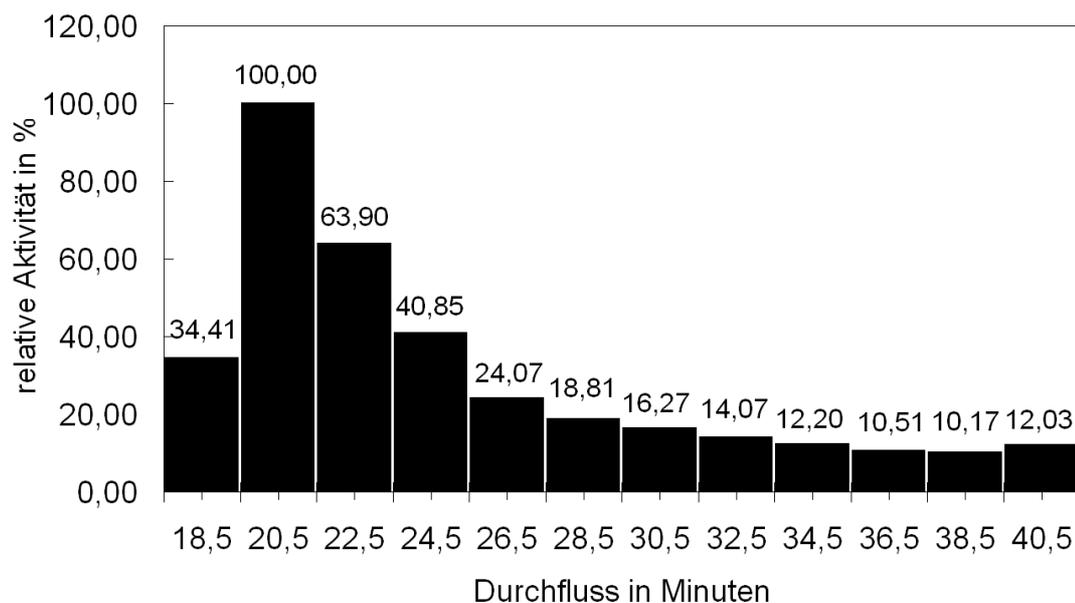
von dTPP II). Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse stammen aus Transfektionsexperimenten nach der modifizierten Methode nach Santos et al. (Santos et al. 2007). Dazu wurden am Tag vor der Transfektion  $3-4 \times 10^5$  Zellen/mL ausgesät, 72 Stunden nach Induktion ausgezählt und die Überexpression bezogen auf die Zellzahl mittels des in 5.3.1 beschriebenen Aktivitätsassays bestimmt. Die auf diese Weise transient transfizierten Zelllinien zeigten nach 72-stündiger Inkubation eine um das 2,3-fache gesteigerte Proteolyseaktivität von dTPP II.

Parallel dazu wurde das Maß der Überexpression bei gleicher Zellzahl mittels eines Westernblots überprüft (Abbildung 6.17). Zu erkennen sind je zwei Banden pro Spur. Eine entspricht der Molekularmasse des dTPP-II-Monomers (150 kDa), die zweite (115 kDa) ist auf das Abspaltung einer C-terminalen Schleife zurückzuführen, die jedoch keine Auswirkungen auf die Quartärstruktur des Proteins hat. Eine ähnliche partielle Spaltung wurde auch bei der humanen (Bålów et al. 1986) und der pflanzlichen (Book et al. 2005) TPP-II-Variante beschrieben.



**Abb. 6.17: Bestimmung der Überexpression von dTPP II in *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen mittels eines Westernblots**

Dazu wurden die Zellen aus je zwei T75-Flaschen vereinigt, die Zellzahl in beiden Ansätzen bestimmt, zentrifugiert und gleich viele Zellen in je 5 mL Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte wie in 5.1.3.2 beschrieben.

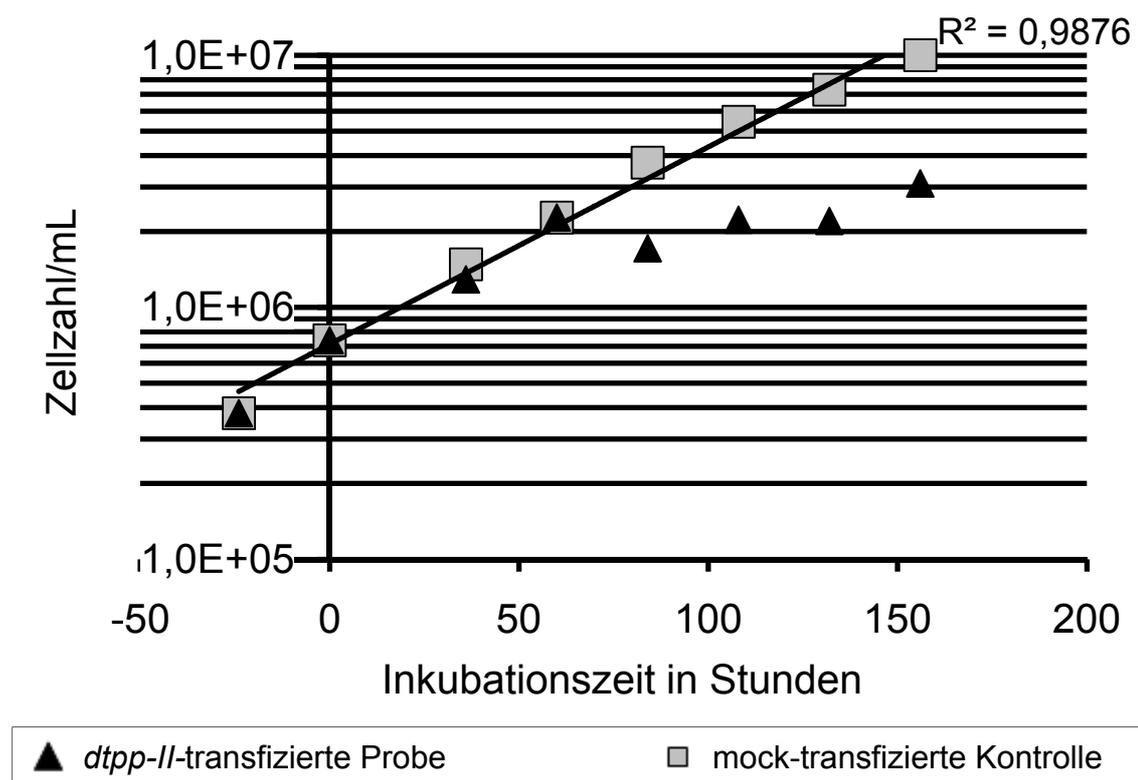


**Abb. 6.18: Bestimmung der Peptidaseaktivität von dTPP II nach Fraktionierung des Cytosols mittels Größenausschlusschromatographie, 72 Stunden nach Induktion der Genexpression.** Die höchste Aktivität wurde in der Fraktion gemessen, die zwischen 17'30" Minuten und 19'30" Minuten von der Säule eluierte. Die Aktivität dieser Fraktion entsprach der von dTPP-II-Spindeln und wurde auf 100% gesetzt. Alle übrigen Fraktionen zeigten eine geringere Proteolyseaktivität.

Um zu überprüfen, ob die überexprimierte dTPP II zu funktionell-aktiven Spindeln assembliert, wurde das Cytosol 72 Stunden nach Induktion per Größenausschlusschromatographie fraktioniert und die dTPP-II-spezifische Peptidolyseaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt (Abbildung 6.18).

Die Fraktion mit der höchsten Aktivität eluierte zwischen 17'30" Minuten und 19'30" Minuten von der Säule. Diese Elutionszeit entsprach der von dTPP-II-Spindeln. Alle folgenden Fraktionen wiesen deutlich geringere Aktivitäten auf.

Das Wachstum der Zellen wurde über siebeneinhalb Tage hinweg verfolgt und die Zellkonzentration (in Zellen pro Milliliter) täglich bestimmt. Einen Tag vor der Induktion der Genexpression wurden die Zellen in einer Zellkonzentration von  $3,8 \times 10^5$  Zellen pro mL ausgesät. Zum Zeitpunkt der Induktion waren sie zu einer Konzentration von  $7,4 \times 10^5$  Zellen pro Milliliter herangewachsen.



**Abb. 6.19: Wachstumskurven von dTPP-II- und mock-transfizierter Probe.** Die Zahl der vitalen Zellen wurde in einer Bürker-Zählkammer mittels Trypsinblaufärbung 24 Stunden vor Genexpression, am Tage der Induktion und im 24-Stunden-Intervall nach Induktion bestimmt. Im Falle der Kontrolle (*mock-transfizierte Probe*) zeigten die Zellen ein exponentielles Wachstum über den gesamten untersuchten Zeitraum (24 Stunden vor bis 156 Stunden nach Induktion). Die Zeit zur Verdoppelung der Zellzahl betrug 37 Stunden. Im Falle der *dtp-II*-transfizierten Probe gilt diese Proportionalität nur bis zum Zeitpunkt von 60 Stunden nach Induktion.

Während die *mock*-transfizierte Kontrolle über den sechsten Tag hinaus ein stetig exponentielles Wachstum mit einer Verdoppelungsrate von 37 Stunden der zu über 95% vitalen Zellen zeigte, waren im *dtp-II*-transfizierten Ansatz 84 Stunden nach erfolgter Induktion nur noch 60% aller Zellen vital (gemessen mittels Trypanblau-Nachweis) und die Zellkonzentration nahm nicht mehr wesentlich zu.

Parallel zur Zellkonzentration wurde das Maß der Überexpression *dtp-II*-transfizierten Zellen anhand der proteolytischen Aktivität in einem Zeitraum von 36-132 Stunden nach Induktion bestimmt und auf die gemessene Zellzahl bezogen. Die Aktivität der *mock*-transfizierten Kontrolle blieb – bezogen auf die Zellzahl – bei allen Messzeiten konstant. Ihr Mittelwert wurde auf 100% gesetzt.

Die Überexpressionsrate stieg bis zu 108 Stunden nach Induktion bis zum 2,7-fachen gemessen an der *mock*-transfizierten Probe an.

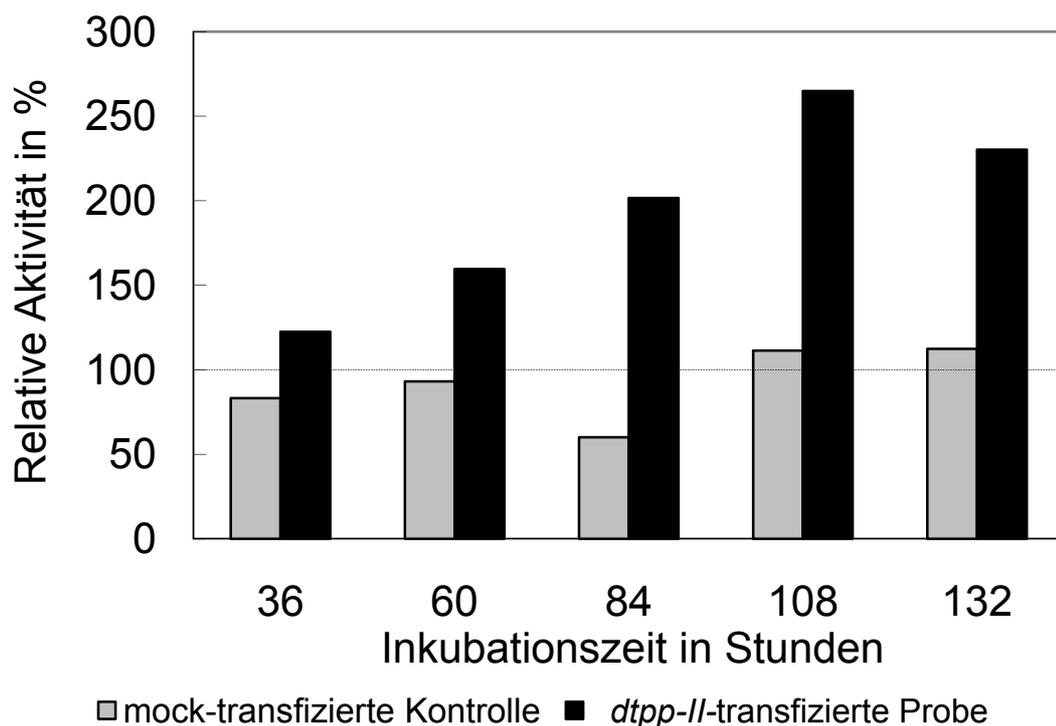
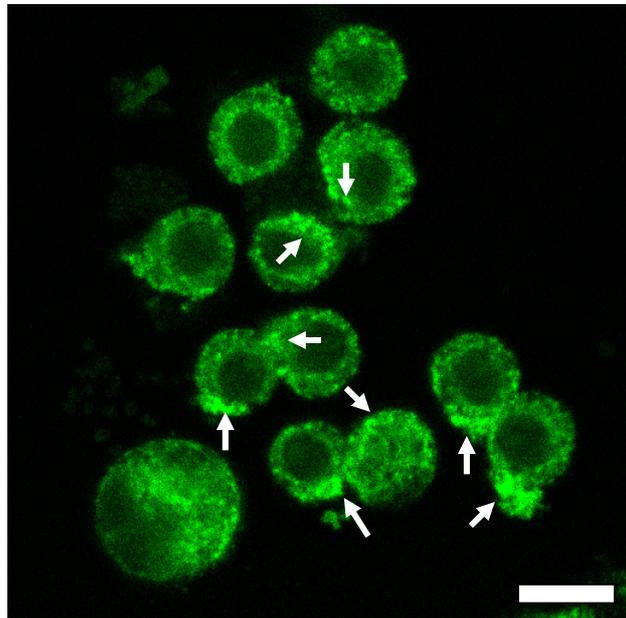


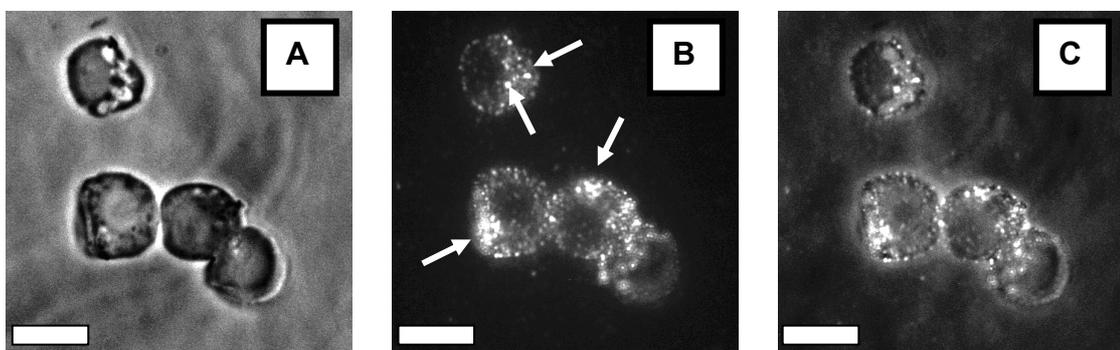
Abb. 6.20: Messung der proteolytischen Aktivität von dTPP II in transfizierten Schneider-S2-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

### 6.5.5 Immunfluoreszenz

Bis geeignete Positionen gefunden sind, an denen fluoreszierende Reportersequenzen in das *dtp-II*-Gen eingefügt werden können, bleiben zunächst nur immunologische Methoden, um die Verteilung von dTPP II in der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Dazu wurden ganze *para*-Formaldehyd-fixierte und markierte *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen im Konfokalmikroskop untersucht. Die *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen wiesen eine weitgehend gleichmäßige räumliche Verteilung von dTPP II im Cytoplasma auf. Darüber hinaus konnten jedoch auch lokale cytoplasmatische Anhäufungen des Proteins (weiße Pfeile) an der Zellperipherie festgestellt werden. Im Zellkern konnte kein signifikantes Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Parallel dazu wurden Schnitte von kryosubstituierten Proben hergestellt, an denen ebenfalls eine dTPP-II-Markierung durchgeführt wurde. In den Schnitten erschien die Markierung im Bereich der Zellperipherie noch etwas deutlicher (Abbildung 6.22, weiße Pfeile).



**Abb. 6.21: Immunfluoreszenzaufnahmen von *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen nach *para*-Formaldehydfixierung.** Markiert ist dTPP II. Die Detektion erfolgte mittels eines FITC-konjugierten sekundären Antikörpers. Das Protein scheint weitgehend homogen im Cytoplasma verteilt zu sein, lokale Akkumulationen waren jedoch erkennbar (weiße Pfeile). Maßstab: 10 µm



**Abb. 6.22: Schnitt durch kryosubstituierte *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen.** (A): Phasenkontrastaufnahme des Schnittes; (B): Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Schnittes. Markiert ist dTPP II. Die Detektion erfolgte mittels eines FITC-konjugierten sekundären Antikörpers. Regionen mit verstärktem Fluoreszenzsignal in der Zellperipherie sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet; (C): Überlagerung von (A) und (B). Maßstab: 10 µm.

## 7 Diskussion

Die automatisierte Detektion makromolekularer Komplexe anhand ihrer strukturellen Signatur in Tomogrammen konnte bislang erfolgreich auf isolierte Proteine (Ortiz et al. 2007), archaische Systeme (Kofler 2006), (Nickell et al. 2006), (Ortiz et al. 2006) oder pro- und eukaryotische Lysate (Bopp (2008), (Brandt et al. 2009) angewandt werden.

Eukaryotische Zellen sind dagegen in der Regel zu dick, um als Ganzes elektronentomographisch untersucht werden zu können. Erst mit der Etablierung der Kryo-Ultramikrotomie in Kombination mit der Kryoelektronentomographie und der automatisierten Strukturerkennung stehen Methoden zur Verfügung, die es grundsätzlich ermöglichen, makromolekulare Strukturen in willkürlich ausgewählten Bereichen von gefrorenen-hydratisierten Schnitten eukaryotischer Zellen zu lokalisieren und zu visualisieren.

### 7.1 Auswahl eines geeigneten Systems

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, anders als noch vor wenigen Jahren erwartet, nicht nur Zellen mit rigider Zellwand wie Bakterien oder Pflanzenzellen mittels Hochdruckvitrifizierung und Kryo-Ultramikrotomie präpariert werden können, sondern auch epitheliale Zellen, die eine sehr flexible Struktur haben. Damit eröffnet sich das Feld für strukturelle Untersuchungen der subzellulären Architektur höherer Eukaryonten in einer Umgebung, die ihrer physiologischen möglichst nahe kommt. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass mit Präparationsartefakten zu rechnen ist.

#### 7.1.1 Auswirkungen von Präparationsartefakten

Anders als bei herkömmlich vitrifizierten Proben (Dubochet et al. 1988) treten bei Kryoschnitten massive Probleme auf, die die Alignierung der aufgenommenen Projektionsbilder und die nachfolgende dreidimensionale Rekonstruktion erheblich erschweren. Es ist bekannt, dass die Morphologie der Kryoschnitte erheblich durch die auf die Probe treffende kumulative Dosis beeinflusst wird. So verändern sich die Schnittbänder schon nach kürzesten Belichtungszeiten, selbst unter Niedrigdosisbedingungen. Diese Veränderungen äußern sich in Form von Glättungseffekten (elektroneninduzierter Materialfluss), die mitunter in

der Literatur auch als Kontraststeigerung bezeichnet werden (Castano-Diez et al. 2007), (Hsieh et al. 2002), (Dubochet et al. 1988), (Sartori Blanc et al. 1998) und die auf die viskosen Fließeigenschaften des Schnittes zurückgeführt werden. Durch den Materialfluss werden hauptsächlich Messerspuren und *Crevasse* eingeebnet (Al-Amoudi et al. 2005), (Hsieh et al. 2002).

Außerdem adhärten die Kryoschnitte in der Regel nicht vollständig an der Oberfläche des Objektträgernetzchens. Die fehlenden Kontaktpunkte zwischen Schnittband und Trägerfolie tragen erheblich zur Instabilität des Schnittbandes bei. Dabei tritt folgendes Phänomen auf: Die Bereiche des Schnittbandes, die fester mit der Oberfläche verbunden sind, scheinen gegenüber dem elektroneninduzierten Materialfluss stabiler zu sein (Sartori Blanc et al. 1998). Die Welligkeit des Schnittbandes und der strahlinduzierte Materialfluss stellen während der Aufnahme einer Kippserie erhebliche Probleme für die elektronentomographische Rekonstruktion dar. Dies ist einer der Gründe, warum nur geringe Durchsatzraten an Tomogrammen erzielt werden können, die eine ausreichend gute und reproduzierbare Qualität liefern.

### **7.1.2 *Cyanidioschyzon merolae***

Die einzellige Rotalge *C. merolae* eignet sich aufgrund ihrer Simplizität und ihrer geringen Größe, sowie ihrer rigiden Zellstruktur dazu, die Kombination von kryodissektierenden und kryoelektronentomographischen Techniken zunächst an eukaryotischen Zellen zu etablieren. Da sich *C. merolae* zumindest partiell auch *in toto* studieren lässt, können zudem direkte Vergleiche zwischen geschnittenen und ungeschnittenen Proben angestellt werden. Im Hinblick auf die mögliche Lokalisierung und Visualisierung von makromolekularen Komplexen in eukaryotischen Systemen wird *C. merolae* jedoch aufgrund der gedrungenen Zellorganisation und der Minimalausstattung mit eukaryotischen Proteinkomplexen nicht allen Anforderungen gerecht.

Innerhalb der Organellen ist die Feinstruktur bemerkenswert gut erhalten. Exemplarisch wird das am Verlauf und am Abstand der Thylakoidenmembranen verdeutlicht.

Die gemessenen Unterschiede im Abstand der Membranen zwischen geschnittener und ungeschnittener Probe liegen in der Größenordnung eines Bildpunk-

tes und damit im Bereich der Messungenauigkeit (siehe 6.2.2). Die Thylakoidendoppelmembran wird also offenbar weder durch die Hochdruckfixierung noch durch die darauf folgende Dissektion komprimiert und ist daher strukturell vergleichbar mit Thylakoidendoppelmembran der Zelle, die als Ganzes auf die herkömmliche Weise in flüssiges Ethan eingeschossen wurde.

### 7.1.3 HepG2-Zellen

TPP II wurde erstmalig im Homogenisat von Lebergewebe entdeckt. Daher war es naheliegend nach dem Protein in Kryoschnitten von Hepatocyten zu suchen. Die geringe Expressionsrate (von nur 0,05-0,1% der gesamten Proteinmasse) schränkt jedoch die die Wahrscheinlichkeit einer Detektion deutlich ein: Unter der Annahme, dass TPP II im Cytoplasma annähernd homogen verteilt ist, gleicht die Suche danach der einer „Nadel im Heuhaufen“. Es ist allerdings anzunehmen, dass TPP II aufgrund ihrer Funktion in Form proteolytischen Netzwerken zusammen mit anderen Komponenten des Proteinabbaus akkumuliert und so möglicherweise Regionen gefunden werden können, in denen TPP II sich mit höherer Wahrscheinlichkeit in Schnitten detektieren lässt. Bislang ist jedoch vollkommen ungeklärt, ob und wo diese Bereiche in der Zelle vorhanden sind. In der Literatur wird beiläufig angemerkt, dass TPP II in einer ringförmigen Struktur zu Beginn der S/G2-Phase des Zellzyklus bis zur Prometaphase um das Centrosom akkumuliert (Stavropoulou 2006). Die Ringstruktur soll demnach mit dem pericentriolaren Golgi-Apparat kolokalisieren und sich parallel zur Golgi-Fragmentierung zu Beginn der Mitose wieder auflösen (Stavropoulou 2006). Vertiefende Publikationen über diese Kolokalisierung sind bislang allerdings nicht verfügbar, so dass die genauen Umstände dieser Beobachtungen völlig unklar bleiben. Jedoch wurden aufgrund der beschriebenen Beobachtungen in dieser Arbeit bevorzugt Kippserien im Bereich des Golgi-Apparates aufgenommen. TPP-II-Spindeln konnten dort allerdings nicht detektiert werden.

In der Einzelpartikelmikroskopie erscheinen die Projektionen von TPP II vorwiegend spindel- oder hantelförmig. In diesen Orientierungen, sowie in einer aufrecht stehenden Position hätte TPP II aufgrund ihrer charakteristischen Form einfach mit bloßem Auge in Kryoschnitten erkennbar sein müssen. Wenn das Protein allerdings axial verkippt im Schnitt lokalisiert ist, kann die automatisierte Strukturerkennung hilfreich sein. Aus diesem Grunde wurde das Volumen mit

einer TPP-II-Spindelreferenz abgerastert. Auch auf diese Weise wurden keine Komplexe detektiert.

#### **7.1.4 *Escherichia coli***

Lokalisierungsversuche von TPP II in *E. coli* zur Aufklärung intrazellulärer Proteinnetzwerke sind naturgemäß wenig sinnvoll, da *E. coli* nicht mit dem Proteolyseapparat höherer Eukaryonten ausgestattet ist und daher die Verteilung des Proteins im Cytoplasma der Zelle als zufällig anzunehmen ist.

Im Vordergrund dieses Versuchsabschnitts stand daher die Frage nach der generellen Detektierbarkeit makromolekularer Komplexe in (irgend)einem zellulären Kontext. *E. coli* bietet sich aufgrund der einfachen Möglichkeit, Proteine überzuexprimieren für diese Aufgabe besonders an.

Entgegen den Erwartungen konnte allerdings auch unter diesen optimierten Bedingungen kein TPP II detektiert werden. Jedoch gelang es, die in deutlich größerer Zahl nativ-exprimierten bakteriellen 70S-Ribosomen mit einer hohen Signifikanz zu detektieren, zu mitteln und schließlich zu rekonstruieren. Ein Vergleich mit der eingesetzten Referenzstruktur zeigt wesentliche Übereinstimmungen des gemittelten, rekonstruierten Partikels. Es erscheint also möglich, unter vorteilhaften Bedingungen, insbesondere bezüglich der Einfachheit des Systems und der Vermeidung von Schneideartefakten, makromolekulare Komplexe mittels Kryoelektronentomographie und auf die Signatur gestützten Korrelationsalgorithmen zu detektieren.

#### **7.1.5 *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen**

Um eine konkrete Vorstellung über die Verteilung von TPP II in eukaryotischen Zellen zu erhalten, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen angestellt. In diesem Zusammenhang erschien es langfristig sinnvoll, dTPP II autolog-rekombinant in einem eukaryotischen Expressionssystem zu exprimieren.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass TPP II in *E. coli* bis zu einem Anteil von 5% bezogen auf das gesamte lösliche Protein rekombinant exprimiert und in Spindeln isoliert werden kann (Seyit 2006) (zum Vergleich: im Zelllysate von *Drosophila*-Eiern beträgt der Anteil lediglich 0,05% des gesamten löslichen

Proteins) (Seyit 2006). Außerdem wurde die erfolgreiche Etablierung eines Expressionssystems auf der Basis der Hefe *Pichia pastoris* beschrieben, die *per se* kein TPP II exprimiert (Lindås 2006). Auf diese Weise konnte eine Überexpression um das 15-fache (gemessen anhand der Aktivität und in Westernblots) gegenüber Lysaten aus HEK-293-Zellen erzielt werden, wohingegen die Ausbeute bei der Aufreinigung von TPP II aus diesem System hinter den Erwartungen zurückblieb (Lindås 2006).

Darüber hinaus gelang die stabile rekombinante Überexpression von muriner Wildtyp-TPP-II in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293 um das 3-7-fache gegenüber der endogen-exprimierten humanen TPP II (gemessen an der Aktivität der Klone), ohne dass sich eine auffällige Veränderung des Phänotyps in Hinsicht auf Zellmorphologie und Wachstumsrate zeigte (Tomkinson et al. 1997). Tomkinson und Mitarbeiter stellten explizit fest, dass die Überexpression nicht letal ist und schlossen daraus, dass die enzymatische Aktivität in Zellen reguliert werden kann, oder dass die Substratspezifität trotz ihrer Breite dennoch restriktiv genug sei, um TPP II vom unkontrollierten Abbau von Peptiden in der Zelle abzuhalten (Tomkinson et al. 1997). Das in 6.5.4 beobachtete verlangsamte Wachstum der *dtp-II*-transfizierten Probe scheint unter Berücksichtigung der durch Tomkinson et al. festgestellten Ergebnisse also nicht zwangsläufig mit der Überexpression einherzugehen. Was allerdings genau die geringere Vitalität der transfizierten Zellen verursacht, bleibt unter diesen Umständen unklar. Festzuhalten ist jedoch, dass in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *dtp-II*-transfizierten Proben nach spätestens 84 Stunden reproduzierbar signifikant weniger vitale *Drosophila*-Schneider-S2-Zellen vorhanden waren als im *mock*-transfizierten Kontrollansatz. 138 Stunden nach Induktion der Genexpression waren 70% weniger vitale Zellen vorhanden als im Kontrollansatz.

Alle bisher gesammelten Erfahrungen deuten darauf hin, dass eine direkte, systematische elektronenmikroskopische Lokalisierung und Visualisierung von TPP II unter hydratisierten Bedingungen und damit ohne die Möglichkeit, immunchemischer Markierungsmethoden bzw. ohne *a-priori*-Wissen über ihre Lokalisation im Cytoplasma im zellulären Kontext eine schwer lösbare, wenn nicht unmögliche Aufgabe darstellt. Daher würden klonierbare, fluoreszierende Reportersequenzen im *tpp-II*-Gen eine wertvolle Hilfe zur Lokalisierung der

Protease innerhalb der Zelle mittels korrelativer Mikroskopie darstellen. Solange keine konkreten Informationen über mögliche Bereiche zur Insertion solcher Reportersequenzen zur Verfügung stehen, bleibt nur die Möglichkeit, TPP II intrazellulär mittels klassischer Immunfluoreszenzmarkierung an fixierten Proben nachzuweisen.

Obwohl TPP II eine cytosolische Protease ist, zeigte sich, dass das Enzym während des Zellaufschlusses von *E. coli* (Seyit 2006) und *Drosophila*-Eiern (Dr. Jürgen Peters, unpublizierte Daten) nicht ausschließlich in der Cytosolfraktion, sondern zusätzlich in der Membranfraktion nachweisbar ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass TPP II membranassoziiert ist. Übereinstimmende Ergebnisse zeigen die Immunfluoreszenzuntersuchungen (siehe 6.5.5).

Mehrere Szenarien bezüglich der Verteilung von TPP II in der Zelle sind denkbar:

**(1)** TPP II ist homogen im Cytoplasma lokalisiert: Die fluoreszenzmikroskopische Detektion wäre daher mit konventioneller konfokaler Mikroskopie aufgrund der geringen Auflösung nicht zu bewerkstelligen.

**(2)** TPP II ist ausschließlich membranständig oder wird auf ein bestimmtes Ereignis an die Plasmamembran rekrutiert: In diesem Falle sollte ein einheitlicher Fluoreszenzsaum entlang der Plasmamembran zu detektieren sein.

**(3)** TPP II ist immer, oder während bestimmter Phasen des Zellzyklus in der Nähe gewisser Organellen (z.B. Centrosom oder Golgi-Apparat) oder Vesikeln des endocytotischen und proteolytischen Pathways, (Endosomen, Lysosomen) lokalisiert: In diesem Falle sollte ein verstärktes Fluoreszenzsignal im Bereich dieser Kompartimente messbar sein. Darüber hinaus müsste es möglich sein, mittels einer Mehrfachfärbung eine Kolo-kalisation von TPP II mit den erwähnten Strukturen nachzuweisen.

**(4)** Das Cytoplasma ist auch ohne interne Membranen kompartimentiert: In diesem Falle sollten lokale Ansammlungen vorhanden sein, die sich in Form eines stärkeren Fluoreszenzsignals gegenüber dem Rest des Cytosols abheben. Möglicherweise ließe sich eine Kolo-kalisation mit dem 26S-Proteasom nachweisen.

Obwohl sich keine Anzeichen für eine Transmembrandomäne zeigen, deutet die Lokalisierung durch die Immunfluoreszenz an ganzen, fixierten und nach der Kryosubstitutionsmethode präparierten Zellen auf eine partielle Ansammlung von dTPP II an der Plasmamembran hin. Darüber hinaus zeigen sich lokale Ansammlungen im Bereich des Cytoplasmas. Die Ergebnisse korrelierten vollständig mit Fluoreszenzuntersuchungen an kryohochdruckfixierten, gefrier-substituierten und fluoreszenzimmunmarkierten Schnitten (Abbildung 6.22). Präparationsbedingt sind bei diesen Schnitten nur oberflächliche Epitope für die Immunmarkierung zugänglich, da die Probe, anders als bei der *para*-formaldehydfixierten Nachweismethoden nach der Fixierung für den Antikörper nicht mehr permeabel gemacht werden kann. Das Fluoreszenzsignal stammt damit ausschließlich von diesen oberflächlichen, für die Immunmarkierung zugänglichen Epitopen und ist daher sehr spezifisch und wenig durch das emittierte Licht aus Schichten außerhalb der Fokusebene gestört.

Unter der Voraussetzung, dass der Antikörper in der Immunfluoreszenz selektive Bindungseigenschaften aufweist, erscheint es daher unwahrscheinlich, dass TPP II vollständig homogen in der Zelle verteilt ist. Vielmehr ist zu erwarten, dass Szenario 3 und/oder 4 der Realität am nächsten kommen. Natürlich können die Immunfluoreszenzuntersuchungen, so wie sie bis hierher durchgeführt wurden keine erschöpfenden Aussagen über die Verteilung von TPP II in der Zelle liefern.

## 8 Ausblick

In anstehenden Versuchen muss mittels Kolokalisationsexperimenten nachgewiesen werden, ob TPP II mit bestimmten zellbiologisch etablierten Markern zusammen vorkommt (z.B. für das frühe Endosom, für lysosomale Zielstrukturen, für Centrosom und Golgi-Apparat). Parallel dazu müssten Kolokalisierungsexperimente mit anderen proteolytischen Systemen durchgeführt werden.

Dazu scheint es unerlässlich zu sein, weiterführende Studien in Bezug auf die Strukturaufklärung von TPP II zu unternehmen, um Regionen im Komplex auffindig zu machen, die ausreichend exponiert sind, um dort eine klonierbare fluoreszierende Reportersequenz einzufügen, ohne dass diese dabei die Struktur des Gesamtkomplexes beeinträchtigt. Ein solches intrinsisches Fluoreszenzsignal ist aus dem Grunde besonders vorteilhaft, da es dem angestrebten minimal-invasiven Charakter der beschriebenen Untersuchungsmethoden entspricht. Nur durch die Kombination von Techniken, die das cytoplasmatische Gefüge erhalten, ohne dass trocknende, quervernetzende oder substituierende Methoden angewendet werden müssen, kann eine Lokalisierung von cytoplasmatischen Proteinen zuverlässig erreicht werden.

Letzten Endes bleibt jedoch festzustellen, dass, trotz aller Rückschläge bei der Lokalisierung und Visualisierung makromolekularer Strukturen im zellulären Kontext komplexer eukaryotischer Systeme, die Kombination aus Kryo-Ultramikrotomie, Kryoelektronentomographie und digitaler Mustererkennung auf dem besten Wege ist, einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der supramolekularen Organisation der Zelle zu liefern. Vieles, was bis vor einigen Jahren noch in weiter Ferne schien, ist bereits heute schon machbar. Dazu gehört die Identifizierung und Visualisierung von Proteinkomplexen in der Zelle unter vorteilhaften Bedingungen. Die uneingeschränkte Anwendung der Kombination der beschriebenen Techniken wird allerdings maßgeblich davon abhängen, inwieweit es gelingen wird, Vitrifizierungs- und Schneideartefakte in den Griff zu bekommen und die Auflösung der Rekonstruktionen zu steigern.

## 9 Anhang

### 9.1 Material

#### 9.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalie	Abkürzung/Formel	Firma
Ala-Ala-Phe, konjugiert mit AMC (7-Amido-4-Methylcoumarin)	AAF-AMC	Bachem
Acrylamid 30% Bisacrylamid 8,8%	Protogel Ultra Pure	National Diagnostics
Agarose		Sigma
Ammoniumperoxydisulfat	APS	Merck
Ampicillin	Amp	Sigma
Bacto Agar		BD
Bacto Tryptone		BD
Bacto Hefeextrakt		BD
Bestatin		Sigma
Borsäure	$H_3BO_3$	Sigma
Rinderserumalbumin	BSA	Sigma
Bromphenolblau		Serva
Calciumchlorid-Dihydrat	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck
Cellfectin		Invitrogen
Cobaltsulfat-Heptahydrat	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	Merck
Coomassie Brilliant Blue	R250	Serva
Dexamethason		Sigma
Dextran	$M_w$ 100.000-200.000	Sigma
Dihydrostreptomycinsulfat	Strept	Sigma
Di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	Merck
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	$Na_2HPO_4$	Merck
1,4-Dithiothreitol	DTT	Merck
Eisenchlorid-Hexahydrat	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Merck
Essigsäure, konzentriert	HAc	Merck

<b>Chemikalie</b>	<b>Abkürzung/Formel</b>	<b>Firma</b>
Ethanol, absolut	EtOH	Merck
Ethidiumbromid	EtBr	Merck
Ethylendiamin-N,N,N',N'- Tetraessigsäure	Titriplex, EDTA	Sigma
Fibronectin		Sigma
Fötale Kälberserum	FKS	PAA
<i>para</i> -Formaldehyd	<i>p</i> -FA	Riedel-de- Haen
Gelatine		Sigma
Glukose		Merck
Glycerin 86-88%		Riedel-de- Haen
Guanidin		Merck
Imidazol		Merck
Insulin		Sigma
Kaliumchlorid	KCl	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kaliumhydroxid	KOH	Merck
Kanamycin	Kan	Amersham
Kupferchlorid	CuCl <sub>2</sub>	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sigma
Manganchlorid-Tetrahydrat	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Serva
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure	HEPES	Biomol
Natriumazid	NaN <sub>3</sub>	Merck
Natriumchlorid	NaCl	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Natriumdodecylsulfat	SDS	Biorad
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Natriummolybdat-Dihydrat	Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Sigma
Natriumsilikat-Nonahydrat	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	Merck

<b>Chemikalie</b>	<b>Abkürzung/Formel</b>	<b>Firma</b>
Penicillin-G-Na/Dihydrostrptomycin-sulfat-Glutamin	Pen/Strept/Glutamin	Sigma
Ponceau S		Sigma
<i>iso</i> -Propanol	<i>i</i> -PrOH	Merck
Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid	PMSF	Sigma
Prolong Antifade Gold Fixiergel		Molecular Probes
Rinderserumalbumin	BSA	Sigma
Salzsäure, konzentriert	HCl	Merck
Triafol		Balzers Union AG
Tricine		Calbiochem
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	Tris-Base	Sigma
TritonX-100		Roth
Trypanblau		Sigma
Trypsin/EDTA		Sigma
Zinksulfat	ZnSO <sub>4</sub>	Merck
Zitronensäure-Monohydrat		Sigma
<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung/Spezifikation</b>	<b>Firma</b>
Butan-Kartuschen	CV 360	Campinggaz
Filterpapier	Modell 695	Schleicher & Schüll
Impfeschlingen PS	200 mm; 10 µL	Greiner
Kupfer-Objektträgernetze	Ø: 3,05 mm, 100 x 400 Maschen	Plano
Kryoröhrchen	CryoTube™ Vials; 1,8 mL	Nunc
Mikrofiltereinheiten	Nanosep® MF 0,2 µm	Millipore
Mikrozentrifugenröhrchen	0,5 mL, 1,5 mL und 2,0 mL	Eppendorf
Nitocellulose-Membran	Protran	Schleicher & Schüll
Objektträger	76 x 26 mm	Menzel-Gläser
PCR-Reaktionsgefäße	MicroAmp®	Applied Biosystems

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezeichnung/Spezifikation</b>	<b>Firma</b>
Pipetten (serologisch)	1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Falcon, Greiner bio- one, Costar
Pipettenspitzen	PP blau; 100-1000 µL	Peske
	PP weiß; 1-200 µL	Peske
	Kristall; 0,1-10 µL	Peske
	Filterspitzen FT20	Greiner
	Filterspitzen FT200	Greiner
	Filterspitzen FT1000	Greiner
Reaktionsgefäße	15 mL und 50 mL $\gamma$ -sterilisiert	Falcon
Rührflasche	1000 mL	Wheaton
Sterilfiltersystem	Corning 500 mL	Costar
Spritzen	5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL	Becton Dickinson
Spritzenaufsatzfilter	Millex®-GS (0,22 µm)	Millipore
Zellkulturflaschen	T25, T75, Polystyrene mit 0,2 µm Filtereinsatz	Becton Dickinson
	T25, T75, T175	Greiner
Zentrifugenflaschen		Beckmann

### 9.1.2 Organismen und Zelllinien

<b><i>C.-merolae</i>-Stamm:</b>	199 NAPS <sup>h</sup> (in Mischkultur mit <i>Cyanidium caldarium</i> ))
<b>Hepatokarzinomzelllinie :</b>	HepG2 (ACC 180), Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<b><i>Drosophila</i>-Zellen :</b>	<i>Drosophila</i> -Schneider-S2-Zellen (Invitrogen)
<b><i>E.-coli</i>-Stamm:</b>	<i>E.-coli</i> -TOP-10 (Invitrogen)

### 9.1.3 Medien

***C.-merolae*-Medium:** Modifiziertes Allen's Medium:

2,24 g/L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
5 mL	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Stocklösung 6 g/L)
5 mL	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	(Stocklösung 7,5 g/L)
5 mL	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	(Stocklösung 4 g/L)
10 mL	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	(Stocklösung 2,5 g/L)
10 mL	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	(Stocklösung 5,8 g/L)
1 mL	Zitronensäure-Monohydrat	(Stocklösung 6 g/L)
4 mL	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	(Stocklösung 6,7 g/L)
4 mL	Na <sub>2</sub> EDTA	(Stocklösung 7 g/L)
1 mL	PIV-Metalllösung	(1)
0,2 mL	A6-Spurenelementlösung	(2)

Ad 963 mL H<sub>2</sub>O

---

<sup>h</sup> freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Gabriele Pinto, (Università Degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Biologia Vegetale)

(1) PIV-Metalllösung (pH 7,8):

750 mg	Na <sub>2</sub> EDTA
97 mg	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O
41mg	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
5 mg	ZnSO <sub>4</sub>
2 mg	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
4 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Ad 100 mL H <sub>2</sub> O	

(2) A6-Spurenelementlösung (pH 1,5)

0,4 g	Glycerin
2,85 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,043 g	CuCl <sub>2</sub>
1,8 g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
0,105 g	ZnSO <sub>4</sub>
0,04 g	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,39 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
Ad 1 L H <sub>2</sub> O	

**Hepatocyten-Medium :**

1. Quantum-288 (PAA)
2. William's Medium (Invitrogen, Gibco)

Zusätze:

50 U/mL	Penicillin
50 µg/mL	Streptomycin
10%	Fötales Kälberserumalbumin (FKS)
10 <sup>-7</sup> M	Insulin
10 <sup>-7</sup> M	Dexamethason

**Schneider-S2-Medien :**

1. Schneider's Medium (Invitrogen, Gibco)
2. Sf9-S2-Insect-Express Medium (PAA)

Zusätze (optional):

50 U/mL	Penicillin
50 µg/mL	Streptomycin
10%	Fötales Kälberserumalbumin (FKS)

***E.-coli*-Medium:**

LB (Luria-Bertani)-Medium:

10 g	NaCl
10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Hefeextrakt

Ad 1 L H<sub>2</sub>O, autoklaviert bei 121°C für 20 min

LB-Agar:

1 L	LB-Medium
15 g	Bacto-Agar

**9.1.4 Puffer und Lösungen****10 x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS pH 7,0):**

10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1370 mM	NaCl
27 mM	KCl

**TAE-Puffer:**

2 mM	EDTA pH 8,0
20 mM	Natriumacetat
40 mM	Tris pH 8,0

**6x DNS-Auftragspuffer:**

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

**Ampicillin Stocklösung:**

100 mg/mL	Ampicillin in H <sub>2</sub> O
-----------	--------------------------------

**Kanamycin Stocklösung:**

50 mg/mL	Kanamycin in H <sub>2</sub> O
----------	-------------------------------

**Tris-gepufferte Salzlösung****(TBS, pH 7,5):**

150 mM NaCl  
 20 mM Tris/HCl, pH 7,5

**Block-Lösung:**

3% (w/v) BSA in PBS

**Gelfiltrationspuffer:**

80 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,5  
 1 mM DTT  
 5% Glycerin zugeben, filtrieren und entgasen

**12% Trenngel für SDS-Gele** (Menge angegeben für 6 Gele der Größe 8 x 7 cm):

18 mL 30% Acrylamid ProtoGel  
 7,5 mL 6x Gelpuffer  
 21 mL  $H_2O$   
 0,134 mL 20% (w/v) APS  
 0,0134 mL TEMED

**5% Sammelgel für SDS-Gele** (Menge angegeben für 6 Gele der Größe 8 x 7 cm):

3 mL 30% Acrylamid ProtoGel  
 3 mL 6x Gelpuffer  
 12 mL  $H_2O$   
 0,134 mL 20% (w/v) APS  
 0,0134 mL TEMED

**6x Gelpuffer für SDS-Gele:**

3 M Tris/HCl pH 8,4  
 0,3% (w/v) SDS

**2x SDS-Probenauftragspuffer:**

0,2% (w/v) Bromphenolblau  
 20% (v/v) Glycerin  
 100 mM Tris/HCl, pH 6,8  
 200 mM DTT  
 4% (w/v) SDS

<b>10x Kathodenpuffer</b> für SDS-PAGE:	<b>10x Anodenpuffer</b> für SDS-PAGE:
1 M Tris	2 M Tris/HCl, pH 8,9
1 M Tricine	
1% (w/v) SDS	

### 9.1.5 Antikörper

Anti-dTPP-II; aus Kaninchen, polyklonal (MPI Tierhaus)

Anti-Kaninchen IgG; aus Ziege, polyklonal, FITC-konjugiert (Sigma)

### 9.1.6 „Kits“ und „Standards“

#### Kits:

QIAprep Spin Miniprep Kit	(Qiagen)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen)
One-Step™ Western Kit	(GenScript)
DES® Transfektionskit	(Invitrogen)
BSD Support Kit	(Invitrogen)

#### Standards:

1 kb DNA Ladder (NEB), 0,5 µg Marker pro Spur

10,0 kb / 42 ng; 8,0 kb / 42 ng; 6,0 kb / 50 ng; 5,0 kb / 42 ng; 4,0 kb / 33 ng; 3,0 kb / 125 ng; 2,0 kb / 48 ng; 1,5,0 kb / 36 ng; 1,0 kb / 42 ng; 0,5 kb / 42 ng; bei

PAGE-Ruler (Fermentas)

9 rekombinante, aufgereinigte Proteine im Bereich von 10 kDa-250 kDa in aufgetragen 5 µL/Spur 0,1-0,2 mg/mL jedes Proteins in in 62,5 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5 at 25°C), 1 mM EDTA, 2% SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub> und 33% Glycerin

Banden bei 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 27 kDa, 15 kDa und 10 kDa.

### 9.1.7 Enzyme

KpnI (20 U/ $\mu$ L)	(NEB)
SpeI (20 U/ $\mu$ L)	(NEB)
MfeI (20 U/ $\mu$ L)	(NEB)
EcoRI (10 U/ $\mu$ L)	(NEB)
DrallI (20 U/ $\mu$ L)	(NEB)
Roche-Long-Template-Polymerase	(Roche)
Taq-Polymerase	(NEB)

### 9.1.8 Nukleinsäuren

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH synthetisiert, mittels HPLC gereinigt und auf 100 pM/mL eingestellt.

Amplifikations-Primer:

TPPII for: 5'-ATGGCCACCAGCGGTATTGTCGAGT-3'

TPPII rev: 5'-TCAGAACAAACGGAAGCTGCTGGG-3'

Vorlage: pET30b\_*dtp*\_II (Seyit 2006)

### 9.1.9 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur		MPI Werkstatt
Autoklav		Tecnomara
Bunsenbrenner	Fireboy Plus	Integra
Blockthermostat	BT200	Kleinfeld
Blot-Apparatur	TransBlot SemiDry Electrophoretic Transfer Cell-System	BioRad
Brutschrank	Funcioline	Haraeus Thermo
Einschußapparatur		Abteilungswerkstatt
Eismaschine		Ziegra

Elektronenmikroskop	CM300-FEG	Philips
mit CCD-Kamera		Gatan
mit Energiefilter	Post-column GIF-2002	Gatan
Fluorimeter	SFM 25	Kontron
Gefrierschrank	-86C ULT	Forma
Graphit-Bedampfungsanlage	MCS010	Baltec
HPLC-Anlage	System Gold	Beckmann
Konfokalmikroskop	TCS SP2 AOBS	Leica
mit Laserwellenlängen	405, 458, 476, 488, 496, 514, 543, 594, 633 [nm]	
verwendetes Objektiv	HCX PL APO 63x/1,4-0,6 (Öl)	
Kühl-/Gefrierkombination		Liebherr
Kryopräparatehalter		Gatan
Kulturschüttler	Cellstar Innova 3000	Nunc
Lichtmikroskop	Axiovert 10	Zeiss
mit CCD-Kamera	F-View II	SIS, Olympus
verwendete Objektive	LD Achroplan 32x/0,40 PlanNeofluar 100x/1,3 (Öl)	
Magnetrührer	Ika-Combimag RCT	Ika Labortechnik
Mikrowelle	Micromat	AEG
Milli-Q-Reinstwasser-Anlage	PLUS Ultra Pure Water	Millipore
PAGE Zubehör Mighty Small II-System (8x7 cm)		GE Healthcare
	Glasplatten 10x8 cm	GE Healthcare
	Aluplatten 10x8 cm	GE Healthcare
	Abstandshalter; 0,75 mm	GE Healthcare
	Kämme; 0,75 mm; 10 well	GE Healthcare
	Gießkammern (5 Gele)	GE Healthcare
Plasma-Cleaner	PDC-3XG	Harrick Scientific Corporation
PCR-Thermocycler	PCR System 2400	Perkin Elmer
pH-Meter	744	Metrohm
Pipetten	20 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL	Gilson
Pipetten	1 µL, 2 µL, 10 µL, 200 µL	Eppendorf
Superose™ 6 10/300 GL-Tricorn™	(24 mL)	Amersham

Schüttelinkubator	Thermomixer 1,5 mL	Eppendorf
Schwenker	Unimax 2010	Heidolph
Sicherheitswerkbank	BSB 4A	Gelaire
Spannungsquelle	PowerPac 300	BioRad
	E443	Consort
Thermomixer	5436	Eppendorf
Thermostat	Polystat cc-1	Huber
Ultraschall-Gerät	Sonifier 250	Branson
UV/VIS-Spektrometer	Lambda2	Perkin-Elmer
UV-Tisch Transilluminator	Image Reader	Herolab
Vakuum-Konzentrator	BA-VC-300 H	Bachhofer
Vortexer	Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Waage		Santorius
Wasserbad		GFL
Wippinkubator	Rockomat	Tecnomara
Zellkulturschalen	24-Well, 3524	Costar
Zentrifugen	5417R (Rotor: F 45-30-11)	Eppendorf
	Rotanta 46 RS	Hettich
	Sorvall RC-SB (Rotor: SS-34)	DuPont Instruments
	ZK 380	Eppendorf-Hermele

## 10 Abkürzungen

### 10.1 Allgemeine Abkürzungen

2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
°C	Grad Celsius
Å	Angström, $10^{-10}$ m
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>dtpp II</i>	<i>Drosophila</i> -Tripeptidylpeptidase-II-Gen
dTPP II	<i>Drosophila</i> -Tripeptidylpeptidase-II-Protein
e <sup>-</sup>	Elektron
EM	Elektronenmikroskop(ie)
engl.	englisch
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
x g	Erdbeschleunigung g ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
K	Kelvin
keV	Kiloelektronenvolt
kDa	Kilodalton

kV	Kilovolt
L	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
M	molar (mol/l)
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht
m	Meter
mA	Milliampère
mbar	Millibar
MDa	Megadalton
Milli-Q	deionisiertes Wasser
min	Minute
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
MPI	Max-Planck-Institut
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pET30b	pET30b-Vektorplasmid
pET30b_ <i>dtp</i> <sub>II</sub>	pET30b-Vektorplasmid mit <i>dtp</i> <sub>II</sub> -Gen-Insert
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Hydroxid-Ionen in wässriger Lösung
pMT/V5	pMT/V5-Vektorplasmid
pMT/V5_ <i>dtp</i> <sub>II</sub>	pMT/V5-Vektorplasmid mit <i>dtp</i> <sub>II</sub> -Gen-Insert
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
<i>tpp II</i>	Tripeptidylpeptidase-II-Gen
TPP II	Tripeptidylpeptidase-II-Protein
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (internationale Einheit für Enzymaktivität)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	engl.: <i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
w/v	engl.: <i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

## 10.2 Aminosäuren

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

## 10.3 Nukleobasen

A Adenin  
 C Cytosin  
 G Guanin  
 T Thymin

## 11 Literaturverzeichnis

- Al-Amoudi, A., Chang, J. J., Leforestier, A., McDowall, A., Salamin, L. M., Norlén, L. P. O., Richter, K., Blanc, N. S., Studer, D. und Dubochet, J. (2004) *EMBO Journal* **23**, 3583-3588.
- Al-Amoudi, A., Dubochet, J., Gnaegi, H., Luthi, W. und Studer, D. (2003) *Journal of Microscopy-Oxford* **212**, 26-33.
- Al-Amoudi, A., Norlén, L. P. O. und Dubochet, J. (2004) *Journal of Structural Biology* **148**, 131-135.
- Al-Amoudi, A., Studer, D. und Dubochet, J. (2005) *Journal of Structural Biology* **150**, 109-121.
- Bålöw, R.-M., Ragnarsson, U. und Zetterqvist, Ö. (1983) *J Biol. Chem.* **258**, 11622-11628.
- Bålöw, R. M., Tomkinson, B., Ragnarsson, U. und Zetterqvist, Ö. (1986) *Journal of Biological Chemistry* **261**, 2409-2417.
- Böhm, J., Frangakis, A. S., Hegerl, R., Nickell, S., Typke, D. und Baumeister, W. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 14245-14250.
- Book, A. J., Yang, P. Z., Scalf, M., Smith, L. M. und Vierstra, R. D. (2005) *Plant Physiology* **138**, 1046-1057.
- Bopp K (2008) Kryo-Elektronentomographie an *in vitro* Translationssystemen *Fakultät für Chemie*, Technische Universität München, München
- Brandt F, Etchells SA, Ortiz JO, Elcock AH, Hartl FU, Baumeister W. (2009) *Cell* **136(2)**, 261-271
- Carter, A. P., Clemons, W. M., Brodersen, D. E., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T. und Ramakrishnan, V. (2000) *Nature* **407**, 340-348.
- Crowther, R. A., De Rosier, D. J. und Klug, A. (1970) *Proc R Soc. London A* **317**, 319-340.
- De Luca, P., Taddei, R. und Varano, L. (1978) *Webbia* **33**, 37-44.
- De Rosier, D. J. und Klug, A. (1968) *Nature* **217**, 130-134.

- Dierksen, K., Typke, D., Hegerl, R., Koster, A. J. und Baumeister, W. (1992) *Ultramicroscopy* **70**, 71-87.
- Dierksen, K., Typke, D., Hegerl, R., Koster, A. J. und Baumeister, W. (1993) *Ultramicroscopy* **49**, 109-120.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowall, A. W. und Schultz, P. (1988) *Quart. Rev. Biophys.* **21**, 129-228.
- Dubochet, J., McDowall, A. W., Menge, B., Schmid, E. N. und Lickfeld, K. G. (1983) *Journal of Bacteriology* **155**, 381-390.
- Förster, F. (2005) Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden *Fakultät für Physik, Technische Universität München, München*
- Frangakis, A. S., Böhm, J., Förster, F., Nickell, S., Nicastro, D., Typke, D., Hegerl, R. und Baumeister, W. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14153-14158.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K. und Niedermann, G. (1999) *Science* **283**, 978-981.
- Gilbert, P. (1972) *Journal of Theoretical Biology* **36**, 105-117.
- Gordon, R., Bender, R. und Herman, G. T. (1970) *Journal of Theoretical Biology* **29**, 471-481.
- Green, R. und Noller, H. F. (1997) *Annual Review of Biochemistry* **66**, 679-716.
- Grigorieff, N. (2000) *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **56**, 1270-1277.
- Grünewald, K., Medalia, O., Gross, A., Steven, A. C. und Baumeister, W. (2003) *Biophys Chem* **100**, 577-579.
- Guckenberger, R. (1982) *Ultramicroscopy* **9**, 167-173.
- Harauz, G. und van Heel, M. (1986) *Optik* **73**, 146-156.
- Hart, R. G. (1968) *Science* **159**, 1464-1467.

- Hegerl R. und Altbauer A. (1982) *Ultramicroscopy* **9**, 109-116.
- Hilbi, H., Josza, E. und Tomkinson, B. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta* **1601**, 149-154.
- Hoppe, W. und Hegerl, R. (eds). (1980) *Three-dimensional structure determination by electron microscopy (nonperiodic specimens)*, Vol. 13 d, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hoppert, M. und Mayer, F. (1999) *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**, 247-284.
- Hsieh, C. E., Leith, A., Mannella, C. A., Frank, J. und Marko, M. (2006) *Journal of Structural Biology* **153**, 1-13.
- Hsieh, C. E., Marko, M., Frank, J. und Mannella, C. A. (2002) *Journal of Structural Biology* **138**, 63-73.
- Invitrogen. (2007) DES : The Drosophila Expression System.
- Kofler, C. (2006) Strukturelle Charakterisierung von *Thermoplasma acidophilum* mittels Kryo-Elektronentomographie. Technische Universität, München.
- Kuroiwa, T. (1998) *Bioessays* **20**, 344-354.
- Lawrence, M. (1992) Least-squares method of alignment using markers. in *Electron tomography* (Frank, J. ed.), Plenum Press, New York.
- Lindås, A.-C. (2006) Tripeptidyl-Peptidase II Structure, Function and Gene Regulation. in *Faculty of Science and Technology*, Uppsala Universitet, Uppsala.
- Liu, Y., Penczek, P. A., McEwen, B. F. und Frank, J. (1995) *Ultramicroscopy* **58**, 393-402.
- Malaisse, W. J. (1996) *Acta Diabetologica* **33**, 173-179.
- Marko, M., Hsieh, C., Moberlychan, W., Mannella, C. A. und Frank, J. (2006) *Journal of Microscopy-Oxford* **222**, 42-47.
- Marko, M., Hsieh, C., Schalek, R., Frank, J. und Mannella, C. (2007) *Nature Methods* **4**, 215-217.

- Masich, S., Östberg, T., Norlén, L., Shupliakov, O. und Daneholt, B. (2006) *Journal of Structural Biology* **156**, 461-468.
- Nickell, S., Förster, F., Linaroudis, A., Del Net, W., Beek, F., Hegerl, R., Baumeister, W. und Plitzko, J. M. (2005) *Journal of Structural Biology* **149**, 227-234.
- Nickell, S., Kofler, C., Leis, A. P. und Baumeister, W. (2006) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 225-230.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B. und Steitz, T. A. (2000) *Science* **289**, 920-930.
- Norlén, L. (2003) *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* **16**, 203-211.
- Norlén, L. und Al-Amoudi, A. (2004) *Journal of Investigative Dermatology* **123**, 715-732.
- Norlén, L., Al-Amoudi, A. und Dubochet, J. (2003) *Journal of Investigative Dermatology* **120**, 555-560.
- Nozaki, H., Takano, H., Misumi, O., Terasawa, K., Matsuzaki, M., Maruyama, S., Nishida, K., Yagisawa, F., Yoshida, Y., Fujiwara, T., Takio, S., Tamura, K., Chung, S., Nakamura, S., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Sato, N. und Kuroiwa, T. (2007) *BMC Biology* **5**, 28-35.
- Ortiz, J. O., Etchells, S., Leis, A., Hartl, F. U. und Baumeister, W. (2007) *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **24**, 633-633.
- Ortiz, J. O., Förster, F., Kürner, J., Linaroudis, A. und Baumeister, W. (2006) *Journal of Structural Biology* **156**, 334-341.
- Penczek, P., Radermacher, M. und Frank, J. (1992) *Ultramicroscopy* **40**, 33-53.
- Penczek, P. A., Grassucci, R. A. und Frank, J. (1994) *Ultramicroscopy* **53**, 251-270.
- Planta, R. J. und Mager, W. H. (1998) *Yeast* **14**, 471-477.
- Ramakrishnan, V. (2002) *Cell* **108**, 557-572.

- Renn, S. C., Tomkinson, B. und Taghert, P. H. (1998) *Journal of Biological Chemistry* **273**, 19173-19182.
- Rockel, B., Peters, J., Müller, S. A., Seyit, G., Ringler, P., Hegerl, R., Glaeser, R. M. und Baumeister, W. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 10135-10140.
- Rockel, B., Peters, J., Kühlmorgen, B., Glaeser, R. M. und Baumeister, W. (2002) *The EMBO Journal* **21**, 5979-5984.
- Sachs, A. B., Sarnow, P. und Hentze, M. W. (1997) *Cell* **89**, 831-838.
- Santos, M. G., Jorge, S. A. C., Brillet, K. und Pereira, C. A. (2007) *Cytotechnology* **54**, 15-24.
- Sartori Blanc, N., Studer, D., Ruhl, K. und Dubochet, J. (1998) *Journal of Microscopy-Oxford* **192**, 194-201.
- Sartori, N., Richter, K. und Dubochet, J. (1993) *Journal of Microscopy-Oxford* **172**, 55-61.
- Schneider, I. (1972) *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **27**, 353-365.
- Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M. und Cate, J. H. D. (2005) *Science* **310**, 827-834.
- Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J. F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P. M., Reiss, Y. und Hosmalin, A. (2003) *Nature Immunology* **4**, 375-379.
- Seyit, G. (2006) Structural Studies of Tripeptidylpeptidase II in *Fakultät für Chemie*, Technische Universität München, München.
- Sorzano, C. O. S., Marabini, R., Boisset, N., Rietzel, E., Schröder, R., Herman, G. T. und Carazo, J. M. (2001) *Journal of Structural Biology* **133**, 108-118.
- Spahn, C. M. T., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. A., Sali, A., Blobel, G. und Frank, J. (2001) *Cell* **107**, 373-386.
- Srere, P. A. (1987) *Annual Review of Biochemistry* **56**, 89-124.

Stavropoulou, V. (2006) Role of Tripeptidyl peptidase II in cell cycle regulation and tumor progression in *Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology*, Karolinska Institutet, Stockholm.

Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A. und Eggli, P. (2001) *Journal of Microscopy-Oxford* **203**, 285-294.

Studer, D., Michel, M. und Müller, M. (1989) *Scanning Microscopy*, 253-269.

Taylor, K. A., Tang, J. H., Cheng, Y. F. und Winkler, H. (1997) *Journal of Structural Biology* **120**, 372-386.

Tokuyasu, K. T. (1973) *Journal of Cell Biology* **57**, 551-565.

Tomkinson, B. (1994) *Biochemical Journal* **304**, 517-523.

Tomkinson, B., Hansen, M. und Cheung, W. F. (1997) *FEBS Letters* **405**, 277-280.

Tomkinson, B., Wernstedt, C., Hellman, U. und Zetterqvist, Ö. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7508-7512.

Triana-Alonso, F. J., Chakraburttty, K. und Nierhaus, K. H. (1995) *Journal of Biological Chemistry* **270**, 20473-20478.

van der Lugt, A. (1964) *Ieee Transactions on Information Theory* **10**, 139-145.

van Donselaar, E., Posthuma, G., Zeuschner, D., Humbel, B. M. und Slot, J. W. (2007) *Traffic* **8**, 471-485.

van Heel, M., Schatz, M. und Orlova, E. (1992) *Ultramicroscopy* **46**, 307-316.

Williams, G. M. (1971) *Exp Cell Research* **69**, 106-112.

Williams, G. M. und Gunn, J. M. (1974) *Exp Cell Research* **89**, 139-142.

## 12 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Kommilitonen und Kollegen, sowie vor allem bei meiner Familie für Ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfestellungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister für die Vergabe des interessanten Themas dieser Dissertation, für sein stetiges Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie dafür, dass er mir die Teilnahme am internationalen Graduiertenprogramm „Protein Dynamics in Health and Disease“ im Rahmen des Elitenetzwerk Bayerns ermöglicht hat,

Frau Dr. Beate Rockel für die ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit, für ihr stets offenes Ohr, für ihre konstruktiven Vorschläge und ihre Geduld,

Herrn Dr. Andrew Leis und Herrn Dr. Thomas Keil für die exzellente Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Kryoschneidens und für ihre Zeit und Mühe, die sie in dieses Projekt investiert haben.

Herrn Dr. Jürgen Peters für seine Unterstützung bei allen biochemischen Fragen, für die interessanten präparativen und analytischen Erkenntnisse,

Herrn Dr. Jürgen Pitzko für seine Hilfestellung bei der Elektronenmikroskopie,

Herrn Dr. Reiner Hegerl, Herrn Dr. Christoph Best, Herrn Dr. Stephan Nickell und Herrn Roland Knispel für die Hilfe bei Problemen mit der digitalen Bildverarbeitung,

Frau Manuela Gruska für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die lustige gemeinsame Zeit im Labor,

Frau Inga Wolf und Herrn William Del Net für ihre Hilfe bei allerlei kleineren Problemen rund um die Themen Computer und Netzwerk,

und Frau Carolin Fleischer.

Nicht zuletzt und in ganz besonderem Maße möchte ich meinen Eltern danken, die mich in jeder denkbaren Weise unterstützt, gefördert und mir immer den Rücken gestärkt haben.