

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE STRUKTURBIOLOGIE

Konzeption und Entwicklung von Technologien zur
beschleunigten strukturellen Inventarisierung makromolekularer
Komplexe am Beispiel von *Thermoplasma acidophilum*

Roland W. Knispel

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

ABTEILUNG FÜR MOLEKULARE STRUKTURBIOLOGIE

Konzeption und Entwicklung von Technologien zur beschleunigten
strukturellen Inventarisierung makromolekularer Komplexe am Beispiel von
Thermoplasma acidophilum

Roland W. Knispel

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. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Die Dissertation wurde am 14. Juni 2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 30. November 2010 angenommen.

„Dans la vie, il n’y a pas des solutions. Il n’y a que des forces en marche: il faut les créer et les solutions suivent.“

„Es gibt keine Lösungen im Leben. Es gibt Kräfte in Bewegung: die muss man schaffen und die Lösungen folgen nach.“

Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944)

Für meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zusammenfassung	1
2.	Abstract	4
3.	Einleitung	6
3.1	Visual Proteomics.....	6
3.2	Generierung von Proteinstrukturbibliotheken	11
3.3	Der Modellorganismus <i>Thermoplasma acidophilum</i>	14
3.4	Zielsetzung und Fragestellung	15
4.	Materialien und Methoden	17
4.1	Bezugsquellen für Chemikalien	17
4.2	Thermoplasma acidophilum.....	17
4.2.1	Aerobe Kultivierung.....	18
4.2.2	Langzeitkonservierung bei -80 °C.....	18
4.2.3	Herstellung eines Zellextrakts.....	18
4.3	Chromatographie.....	19
4.3.1	Hydroxyapatitchromatographie	19
4.3.2	Anionenaustauschchromatographie	19
4.3.3	Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie)	20
4.4	Proteinanalytik.....	21
4.4.1	Denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli.....	21
4.4.2	Native Gelelektrophorese	22
4.4.3	Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G250	22
4.4.4	Gelfärbung mit Silbernitrat	23
4.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
4.4.6	Massenspektrometrische Analyse	25
4.5	Fluoreszenzmessungen	25
4.6	Transmissionselektronenmikroskopie	26
4.6.1	Negativkontrastierung von Proteinen.....	26
4.6.2	Vitrifizierung von Proteinen	26
4.6.3	Herstellung kohlebefilmter Trägernetzchen.....	26
4.6.4	Grid-Blotting	27

4.6.5	Datenakquisition	27
4.6.6	Digitale Bildverarbeitung	28
5.	Präparative Anreicherung von Protein-komplexen	29
5.1	Theoretische Einführung	29
5.2	Ergebnisse	31
5.2.1	Stabilität eines Zellextrakts aus <i>Thermoplasma acidophilum</i>	31
5.2.2	Chromatographische Methode zur Anreicherung von Proteinkomplexen	34
5.3	Diskussion.....	40
6.	Direkter Transfer von Proteinen aus Poly-acrylamidgelen auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie (Grid-Blotting)	43
6.1	Theoretische Einführung	43
6.2	Ergebnisse	45
6.2.1	Protokoll der Grid-Blotting-Methode	45
6.2.2	Einfluss der Beglimmzeit	48
6.2.3	Einfluss der Temperatur.....	49
6.2.4	Einfluss des pH-Wertes.....	51
6.2.5	Einfluss der Blotzeit	53
6.2.6	Herstellung von negativkontrastierten Präparaten unter optimierten Bedingungen	53
6.2.7	Fallstudie anhand des 26S Proteasoms aus <i>Drosophila melanogaster</i>	55
6.2.8	Herstellung von vitrifizierten Präparaten	58
6.3	Diskussion.....	61
6.3.1	Vorteile und Limitierungen der Grid-Blotting-Methode	63
6.3.2	Mögliche Steigerung der Transfereffizienz beim Grid-Blotting durch Anlegen eines externen elektrischen Felds.....	65
7.	Detektion von nativen Proteinen.....	71
7.1	Theoretische Einführung	71
7.1.1	Geplanter Gesamtaufbau	73
7.2	Ergebnisse	75
7.2.1	Fluoreszenzaktivitätsmessungen	75
7.2.2	Lichtquelle	79
7.2.3	Emissionsfilter.....	84

7.2.4	Excitationsfilter	85
7.2.5	Erreichte Nachweisgrenzen in denaturierenden Gelen	87
7.3	Diskussion	90
7.3.1	Alternative Proteindetektion über Verschiebung der Tryptophanfluoreszenz.....	92
8.	Ausblick	96
9.	Literaturverzeichnis	99
10.	Eigene Veröffentlichungen.....	111
11.	Abbildungsverzeichnis.....	112
12.	Abkürzungsverzeichnis.....	115
13.	Danksagung	117
14.	Erklärung	119

1. Zusammenfassung

In einer lebenden Zelle ablaufende physiologische Prozesse sind im Regelfall Abfolgen von zahlreichen isolierten chemischen Reaktionen, die maßgeblich durch die in der Zelle existierenden Proteine gesteuert werden. Die Steuerung des gesamten zellulären Metabolismus erfordert ein überaus komplexes Netzwerk von Interaktionen und Rückkopplungen der einzelnen beteiligten Komponenten und lässt sich bis heute noch nicht ansatzweise vollständig erfassen. Ein zentrales Thema der molekularen Strukturbiologie ist es, die räumliche Verteilung einzelner Proteine innerhalb der Zelle, deren lokale Konzentrationsunterschiede und Interaktionen zwischen diesen Proteinen zu visualisieren, um das biologische Gesamtsystem besser zu verstehen.

Die Anwendung der Kryo-Elektronentomographie erlaubt es, Zellen bis zu einer Dicke von etwa 500 nm *in toto* und weitestgehend intakt, dreidimensional digitalisiert abzubilden. Die erreichte Auflösung liegt im Nanometerbereich und ist damit die Grundlage für eine topologische Beschreibung des Zellinneren. Diese Methode ist jedoch derzeit im Wesentlichen auf größere Proteinkomplexe und molekulare Maschinen mit einem Molekulargewicht von mindestens 200 kDa beschränkt. Die große Herausforderung im Anschluss an die Datenaquisition besteht darin, Einzelobjekte in diesem virtuellen Volumen zu identifizieren. Ohne Kenntnis über die Struktur der abgebildeten Objekte ist dies nahezu unmöglich. Das Problem vereinfacht sich jedoch stark, wenn Strukturbibliotheken (engl.: *template libraries*) sämtlicher vorkommender Proteinkomplexe des untersuchten Organismus verfügbar sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten am Beispiel des Archaeons *Thermoplasma acidophilum* neue Methoden und Technologien entwickelt werden, die eine generische und umfassende Erstellung einer solchen Strukturbibliothek bei gleichzeitig minimalem Zeitaufwand erlauben.

Die wohl schnellste Methode zur Gewinnung von annähernd homogen gereinigten Proteinen ist die Isolierung aus dem Ursprungsorganismus selbst, denn der Arbeitsaufwand zur Erstellung entsprechender Expressionsvektoren für eine heterologe Proteinproduktion

entfällt. Zelluläre Extrakte aus *T. acidophilum* wurden mittels einer Hydroxyapatitsäule chromatographisch in drei Hauptfraktionen getrennt, um die initiale Komplexität des Extrakts zu verringern. Zwei dieser Fraktionen wurden in Folge auf einer Anionenaustauschermatrix weiter fraktioniert, um schließlich mittels einer Gelfiltration die Proteinkomplexe zu erhalten. Die Gesamtzeit dieser Proteinanreicherung durfte dabei 36 Stunden nicht überschreiten, da andernfalls signifikante Dissoziation und Aggregation der Proteinkomplexe eintrat. Die finalen Fraktionen nach der Gelfiltration waren, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, überwiegend homogen.

Für weitere strukturelle Untersuchungen problematisch ist die hohe Verdünnung der Proteinkomplexe nach einer Gelfiltration. Deswegen wurde dieser Schritt durch eine native Gradientengelelektrophorese ersetzt. Auch hier erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Im Gegensatz zu einer Gelfiltration werden die Proteine jedoch in Banden fokussiert, was einer lokalen Ankonzentrierung entspricht. Ein Arbeitsprotokoll wurde etabliert, welches es erlaubt, einen kleinen Anteil der angereicherten Proteinkomplexe aus dem Trenngel direkt auf elektronenmikroskopische Objektträger zu transferieren und in Negativkontrastierung oder als vitrifiziertes Präparat direkt einer elektronenmikroskopischen Einzelpartikelanalyse zu unterziehen. Diese bietet sich aus zweierlei Gründen für die folgende Strukturaufklärung an. Zum einen sind die hierfür benötigten Proteinmengen minimal, im Vergleich dazu erfordern Röntgenkristallographie und Nuklearmagnetresonanzverfahren wesentlich größere Mengen an Ausgangsmaterial für eine Strukturbestimmung. Zum anderen ist die Toleranz von möglicherweise vorhandenen Verunreinigungen in der Probe weitaus höher als bei den anderen genannten. Massenspektrometrische Analysen des im Gel verbliebenen Materials ermöglichen schließlich eine direkte Korrelation zwischen Identität und Zusammensetzung der Proteinkomplexe und deren Struktur.

Um den manuellen Aufwand der Gelprozessierung zu reduzieren, wurde die Entwicklung und Konstruktion einer robotergestützten Plattform geplant, welche die Probenextraktion für Elektronenmikroskopie und Massenspektrometrie automatisiert durchführen kann. Dafür notwendig erwies sich unter anderem die Implementation einer geeigneten Detektionsmethode für die Proteinkomplexe in den Gelen, welche eine Strukturveränderung der Proteinkomplexe in jedem Fall vermeidet. In Kollaboration mit der Firma Herolab wurde deshalb an einem Aufbau zur Detektion von nativen Proteinen, basierend

auf der intrinsischen Fluoreszenz aromatischer Aminosäurereste in der Peptidsequenz, gearbeitet. Es wurde eine Flächenbeleuchtung realisiert, die derzeit auf großformatigen Gelen innerhalb einer Detektionszeit von 10 Minuten eine Sensitivität von etwa 250 ng erreicht.

2. Abstract

Physiological processes of living cells can be mainly understood as a plethora of subsequent individual chemical reactions, which are prevalingly controlled by the existing proteins within a cell. The regulation of the entire cellular metabolism requires a complex network of interactions and feedbacks between the involved single components, which is not yet comprehensively understood. One of the major aims in molecular structural biology is to provide a visual approach, by which the spatial distribution of proteins, their local variations in concentration within the cell and interactions between proteins can be studied, in order to generate a better understanding of this biological system.

The application of cryo-electron tomography facilitates recording digitized three-dimensional representations of vitrified cells with a thickness less than 500 nm *in toto*. Resolutions on the nanometer scale can be reached easily, which is the basis for the topological description of the interior of a cell. However, this method is as yet limited to image larger protein complexes and molecular machines exceeding a critical size of approximately 200 kDa. The big challenge following the data acquisition and tomographic reconstruction is to identify single objects in this imaged volume. Without any *a priori* knowledge of the structure of the imaged objects this task is hardly compliable. The problem significantly reduces however, if structural template libraries, containing all existing protein complexes of the target organism, become available.

The scope of this work was to develop new methods and technologies for a generic and comprehensive approach to generate such a structural template library in a timely and effective manner, using the archaeon *Thermoplasma acidophilum* as a model organism.

The most rapid way to produce proteins, purified close to homogeneity, is the extraction from the original host cells. In that way, a considerable amount of work and time to generate corresponding expression vectors for heterologous protein production can be omitted. Cellular extracts of *T. acidophilum* were chromatographically fractionated on hydroxyapatite into three main fractions to reduce its initial complexity. Two of these were subjected to an anion exchange matrix for further fractionation before separating the com-

plexes from the smaller proteins via gel filtration. The total duration of this protein complex enrichment must not exceed 36 hours, as significant dissociation and aggregation of protein complexes would otherwise occur. Electron micrographs of most of these final fractions after the gel filtration step showed, that the protein purity was close to homogeneity.

The considerably low concentration of protein complexes after gel filtration is problematic for subsequent structural investigations. Therefore the gel filtration step was replaced by native gradient gel electrophoresis. Here, proteins are similarly separated on the basis of their molecular weight. But due to the focussing of the proteins into bands, they get locally enriched as well. A protocol was established to facilitate the direct transfer of a small portion of these focussed proteins from the gel onto electron microscopy grids, which were then subjected to single particle analysis. The latter is the method of choice for subsequent structural investigations for two reasons. Firstly, the sample requirements are quite minute when compared with x-ray crystallography or nuclear magnetic resonance spectroscopy, and secondly, single particle analysis can tolerate a higher level of potential contaminants. Finally, mass spectrometric analyses of the remaining protein portions in the gel provide means to directly correlate identification and stoichiometry of individual protein complexes with their structure.

For a further reduction of the manual processing time of protein gels, the development of an automated platform to perform the tasks of sample extraction for mass spectrometry and electron microscopy was initiated. Amongst other things, the implementation of a suitable protein detection method was required, which under all costs avoids structural alterations of the protein complexes in the gels during the detection process. For that, the development of a detection device, exploiting the intrinsic fluorescence activity of aromatic amino acid residues in the peptide sequence, was initiated and performed in collaboration with the Herolab company. An areal illumination device for the direct visualization of large-scale gels was constructed, which currently reaches a sensitivity of approximately 250 ng protein within 10 minutes of detection time.

3. Einleitung

3.1 Visual Proteomics

Begibt man sich auf die Suche nach den mechanistischen Grundlagen des Lebens, so wird offensichtlich, dass die von Generation zu Generation weiter gegebene genetische Erbinformation zwar die Baupläne für Proteine und weitere regulatorische Nukleinsäureelemente enthält, jedoch selbst keinerlei Anhaltspunkte darüber liefert, welches Zusammenspiel der Einzelkomponenten erforderlich ist, um einen vollständig funktionsfähigen Metabolismus zu etablieren und aufrecht zu erhalten. Ein hochgradig komplexes Netzwerk von molekularen Interaktionen gewährleistet, dass physiologische Prozesse innerhalb einer Zelle unter optimalen Bedingungen ablaufen [Alberts 1998]. Da die meisten intrazellulären Prozesse durch Proteine vermittelt werden, lässt sich dieses Netzwerk in großen Teilen durch Analysen des Gesamtproteinkomplements beschreiben. Solche Studien werden unter dem Begriff Proteomik (engl.: ‚*proteomics*‘) zusammengefasst [Wilkins *et al.* 1996].

Die klassische Proteomik basiert auf der Erstellung von Proteinkonzentrationsprofilen homogener Zellpopulationen unter definierten Umgebungsbedingungen zu einem bestimmten Zeitpunkt. Variiert man die äußeren Bedingungen für die Zellen, wie beispielsweise Temperatur, Druck, Nährstoffangebot oder andere Stressfaktoren, erhält man durch vergleichende Analysen Informationen darüber, welche Proteine unter diesen veränderten Bedingungen stärker und welche schwächer exprimiert werden [Andersen *et al.* 2005]. In der Medizin kann dies zum Beispiel für die diagnostische Unterscheidung von gesundem und pathologisch geschädigtem Gewebematerial verwendet werden [Appel *et al.* 1991; Wimmer *et al.* 1996; Appel *et al.* 1997a; Appel *et al.* 1997b; Binz *et al.* 2003]. Von ebenso unschätzbbarer Hilfe bei der Aufbereitung und Annotation von Genomsequenzinformationen ist die Möglichkeit der Einteilung von Proteinen in funktionelle Klassen, wie durch Verfolgung von Änderungen der absoluten Proteinkonzentration oder post-translationeller Modifikationen [Arthur and Wilkins 2004; Armengaud 2010].

Proteomanalysen dieser Art erfolgen *in situ* und erfordern die Isolation und vollständige Auftrennung sämtlicher zellulärer Proteine. In aller Regel werden die zellulären Proteingemische elektrophoretisch, zunächst in einer Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der Folge in der zweiten Dimension nach ihrem apparenten Molekulargewicht, getrennt (zweidimensionale Gelelektrophorese, 2DE) [Klose 1975; O'Farrell 1975; Bjellqvist *et al.* 1982]. In jüngster Zeit werden jedoch vermehrt auch rein chromatographische HPLC-basierende Verfahren angewendet. Im Anschluss an die Auftrennung werden die Proteine massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert [Wang and Hanash 2003; Ong *et al.* 2005; Saito *et al.* 2006]. Massenspektrometrie-gestützte Proteinidentifikation anhand der proteinspezifischen Peptidsignatur setzt natürlich voraus, dass die Genomsequenz für den betreffenden Organismus bereits bekannt ist [Cottrell 1994].

Es ist klar, dass bei dieser Art der Probenaufbereitung jegliche Informationen über die räumliche Anordnung der Proteine innerhalb der Zelle vollständig verloren gehen. Gelänge es jedoch, diese spatiale Komponente durch geeignete Abbildungsverfahren zugänglich zu machen, ließen sich womöglich regulatorische Wechselwirkungen zwischen Proteinen direkt beobachten. Die Realisierung eines solchen visuellen Ansatzes ist ein zentrales Thema der modernen Strukturbiologie und rückt durch jüngste Entwicklungen im Bereich der Kryoelektronentomographie und der elektronischen Bildverarbeitung in greifbare Nähe.

Die Anwendung der Kryoelektronentomographie erlaubt es, Zellen und Zellorganellen nicht-invasiv, hochauflösend und dreidimensional abzubilden, und somit Einblicke in deren molekulare Organisation zu erhalten [Medalia *et al.* 2002]. Die zu untersuchenden Objekte werden ohne weitere Vorbehandlung in wässriger Umgebung eingefroren. Sehr hohe Abkühlraten sorgen dafür, dass das Wasser beim Einfrieren keine kristalline Form annimmt, sondern die Probe in einem dünnen Film aus amorphem Eis einbettet und somit in einem weitgehend nativen Zustand konserviert [Taylor and Glaeser 1976; Dubochet *et al.* 1982]. Ein solcherart vitrifiziertes Präparat wird im Elektronenstrahl eines Transmissionselektronenmikroskopes in kleinen Schritten über einen möglichst großen Winkelbereich gekippt und eine Serie von Projektionen aufgezeichnet, aus der sich das abgebildete Objekt, je nach Größe vollständig oder teilweise, dreidimensional rekonstruieren lässt [Derosier and Klug 1968]. Die maximal erreichbare Auflösung der Rekonstruktion ist im Wesentlichen limitiert durch die hohe Empfindlichkeit biologischer Objekte gegenüber hochenergetischer Strahlung [Glaeser 1971]. Um diese durch den Elektronenstrahl nicht massiv zu schädigen

muss die Gesamtelektronendosis für die gesamte Datenaquisitionsprozedur unterhalb eines kritischen Schwellwerts von etwa $10\text{-}20 \text{ e}^-/\text{Å}^2$ gehalten werden [Frank 2002]. Die Aufnahme von Daten unter Niedrigdosisbedingungen führt letztlich dazu, dass der Signal-Rausch-Abstand der Einzelprojektionen sehr gering ist. Teilweise ist es mit bloßem Auge unmöglich, mehr als die Umrisse des abgebildeten Objekts auszumachen. Dennoch lassen sich in den rekonstruierten Tomogrammen Auflösungen von derzeit etwa 4 nm erreichen, was somit die Auflösung von größeren subzellulären Strukturen und Proteinkomplexen mit einem Molekulargewicht von mindestens 200 kDa erlaubt [Henderson 1995] [Sali *et al.* 2003; Koning and Koster 2009]. Fortschreitende instrumentelle Verbesserungen im Bereich der Elektronenoptik und -detektion, sowie verbesserte Algorithmen zur Kompensation von Abbildungsfehlern und Rekonstruktionsartefakten, lassen erwarten, dass in den nächsten Jahren diese Auflösungsgrenze deutlich reduziert wird.

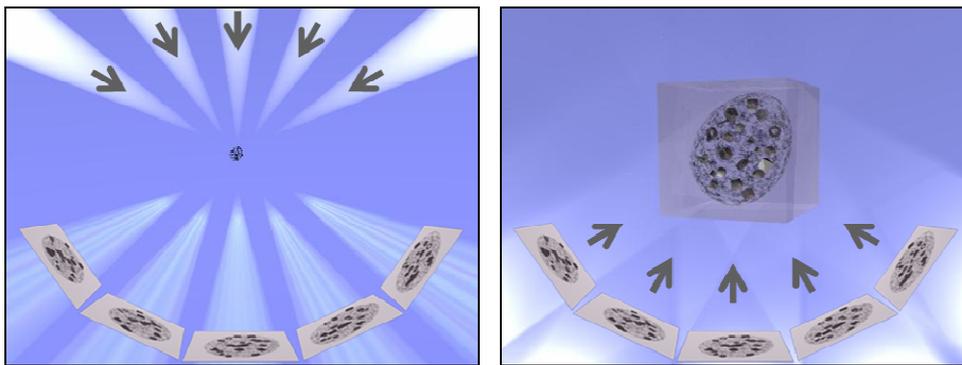


Abbildung 3-1: Prinzip der Elektronentomographie

Von einem Objekt wird eine Vielzahl von Projektionen aufgenommen, während selbiges schrittweise in kleinen Winkelinkrementen entlang einer Kippachse senkrecht zur Projektionsachse gekippt wird (links). Die Einzelprojektionen werden anschließend in ein virtuelles gemeinsames Volumen rückprojiziert, was zu einer dreidimensionalen, vergrößerten Abbildung des tomographierten Objekts führt (rechts).

Die Interpretation solcher zellulären Tomogramme ist jedoch schwierig und bis heute noch keine Routine. Naiv betrachtet sollte es möglich sein, verschiedene Objekte in der rekonstruierten Abbildung anhand ihrer strukturellen Signatur zu unterscheiden, um so Schritt für Schritt den gesamten Inhalt der Zelle zu segmentieren. Das ist eine anspruchsvolle Aufgabe, da das Zytosol eine dicht gepackte Ansammlung von zahlreichen verschiedenen Molekülen unterschiedlichster Größen ist, zwischen denen es kaum freien Raum gibt [Minton 1997]. Obwohl der Ansatz der visuellen Proteomanalyse (engl.: *visual proteomics*) in Kryoelektronentomogrammen auflösungsbedingt derzeit nur auf etwa 20-30 % des ge-

samten Zellvolumens abzielt, den Teil nämlich, der von makromolekularen Komplexen eingenommen wird, ist die zu bearbeitende Datenmenge enorm [Grunewald *et al.* 2003].

In der Realität wird die Interpretation der Daten zusätzlich damit konfrontiert, dass die Abbildung der Objekte nicht perfekt ist. Rekonstruierte Tomogramme enthalten ein hohes Maß an residualem Rauschen, welches die strukturellen Signaturen und damit die Unterscheidbarkeit gerade kleinerer Proteinkomplexe spürbar beeinflusst. Noch wesentlich schwerwiegender ist jedoch das völlige Fehlen bestimmter Strukturinformationen in den rekonstruierten Objekten. Da die Geometrie des Präparatehalters keine vollständige Rotation zulässt – im Allgemeinen werden Projektionen über einen Winkelbereich von -70 bis $+70^\circ$ aufgenommen – hinterlassen fehlende Projektionswinkel in der Rekonstruktion regelrechte Löcher in den Objekten. Je nach Art des tomographischen Aufnahmeschemas ist dieses Loch keil- oder pyramidenförmig (engl.: *missing wedge* bzw. *missing pyramid*) und obfuskiert weitere Strukturdetails (siehe Abbildung 3-2). Zusätzlich erscheinen abgebildete Objekte entlang eben dieser Achse fehlender Struktur leicht elongiert. Berücksichtigt man weiterhin, dass Proteine in der Zelle in der Regel nicht gleichförmig orientiert sind, können gleichartige Partikel nach ihrer Rekonstruktion sehr unterschiedlich aussehen.

Weil eine manuelle Analyse unter diesen Bedingungen kaum reproduzierbar, sehr zeitintensiv und stark von subjektiven Interpretationen gefärbt ist, werden dafür ausgefeilte, auf Mustererkennungsverfahren basierende Algorithmen eingesetzt. Im einfachsten Fall wird eine als Referenz dienende bekannte dreidimensionale Struktur des zu lokalisierenden Proteinkomplexes schrittweise mit Ausschnitten aus dem Tomogramm verglichen und durch ein Ähnlichkeitsmaß, beispielsweise durch Berechnung des Kreuzkorrelationskoeffizienten, beschrieben. Da die räumliche Orientierung der Partikel im Tomogramm *a priori* nicht bekannt ist, muss diese Ähnlichkeitssuche alle möglichen Orientierungen der Referenz umfassen. Eine solche erschöpfende Suche wird für alle zu lokalisierenden Proteinkomplexe wiederholt. Als Ergebnis erhält man eine Pseudokartierung, die in gewisser Hinsicht die Identifikationswahrscheinlichkeit eines Partikels mit einer bestimmten räumlichen Orientierung an jeder Position der untersuchten Zelle wiedergibt. Die Umsetzung der Pseudokartierung in eine absolute Lokalisierung wird dann oft durch Ansetzen eines Schwellenwertes für das Ähnlichkeitsmaß realisiert [Nickell *et al.* 2006]. So konnten in Tomogrammen von artifiziellen Phantomzellen – das sind künstlich erzeugte Liposomen, die mit definierten Mixturen von Proteinkomplexen gefüllt sind – Thermo-

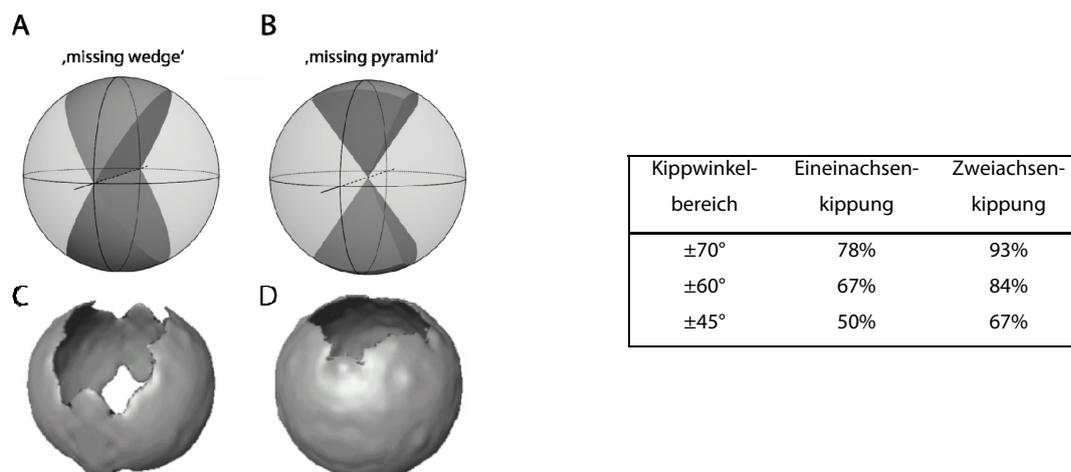


Abbildung 3-2: Rekonstruktionsartefakte durch Einschränkung des Kippwinkelbereichs in der Tomographie

Am Beispiel einer dünnen kugelförmigen Hohlmembran sei der Einfluss der Kippwinkellimitierung bei der Aufnahme elektronentomographischer Daten auf deren Rekonstruktion gezeigt. Einzelne Projektionen werden zum Auffüllen des fouriertransformierten Rekonstruktionsvolumens genutzt. Bei der Einachsentomographie führen die fehlenden Projektionswinkel zum Verlust von strukturellen Informationen in einem keilförmigen Sektor an den Polen ober- und unterhalb der 0° -Projektionsebene (A). Ein erweitertes Tomographieschema, bei dem die Objekte nach erfolgter Einachsentomographie in der 0° -Projektionsebene um 90° rotiert und nun in einer zweiten Achse senkrecht zur ersten Kippachse abermals tomographiert werden, kann die fehlenden Informationen auf einen pyramidalen Sektor reduzieren (B). Der prozentuale Anteil des während der Rekonstruktion mit Daten gefüllten Fourierraums in Abhängigkeit von der Art des angewendeten Tomographieschemas und des realisierten Kippwinkelbereichs ist in nebenstehender Tabelle aufgelistet. Die Auswirkungen der fehlenden Projektionen auf die Rekonstruktion der Hohlmembran im Realraum sind in C und D gezeigt (adaptiert nach [Lucic *et al.* 2005]).

somen und 20S Proteasomen detektiert und unterschieden werden [Bohm *et al.* 2000; Frangakis *et al.* 2002]. Verfeinerungen der kreuzkorrelationsbasierten Prozedur, die unter anderem die bereits beschriebenen Artefakte der Tomogramme besser berücksichtigen, erlaubten schließlich die Lokalisierung von 70S Ribosomen in vitrifizierten prokaryotischen Zellen der Art *Spiroplasma melliferum* [Förster 2005; Ortiz *et al.* 2006]. Das Hauptproblem solcher rein bildbasierten Interpretationen von Tomogrammen ist jedoch, dass es bislang kein verlässliches Kriterium zur Signifikanz der Lokalisation gibt. Insbesondere gilt die Kreuzkorrelation als eine wenig quantitative Methode der Ähnlichkeitssuche, was bedeutet, dass die Unterscheidung zwischen Proteinkomplexen etwa gleicher Größe und Topologie kaum möglich ist. Wie kürzlich von Beck *et al.* am Beispiel von *Leptospira interrogans* gezeigt, lässt sich allerdings die Konfidenz der Erkennung, unter Einbeziehung weiterer Daten aus klassischen Proteomstudien über die zu erwartenden Konzentrationen be-

stimmter Partikel, deutlich verbessern [Beck *et al.* 2009]. Dazu werden aus der Referenzstrukturbibliothek und den Quantifizierungsdaten Testdatensätze generiert, die eine Abschätzung über die Menge von falsch-positiv beziehungsweise falsch-negativ detektierten Proteinkomplexen *in silico* erlauben. Die aus diesen Simulationen abgeleitete Wichtung- oder Wertungsfunktion kann für eine Verfeinerung der Komplexlokalisierung in den Tomogrammen herangezogen werden. Die Visualisierung des makromolekularen Proteinkomplements einer Zelle ist damit in greifbare Nähe gerückt

3.2 Generierung von Proteinstrukturbibliotheken

Die Lokalisierung von Proteinkomplexen in zellulären Tomogrammen setzt zwingend voraus, dass geeignete Referenzstrukturen der Komplexe vorhanden sind, nach denen das tomographische Volumen abgesucht werden kann. Ansätze zur referenzfreien Identifikation von Objekten stellen derzeit noch eine sehr große Herausforderung dar und erfordern in der Regel deutlich höhere Rechenkapazitäten. Um das gesamte makromolekulare Proteinkomplement einer Zelle abzubilden, sollte also vorab eine vollständige Strukturbibliothek dieser Proteinkomplexe zur Verfügung stehen. Für eine optimale Detektion sollte die Auflösung der einzelnen Strukturen dabei möglichst der im Tomogramm erreichten Auflösung entsprechen. Diese Anforderung ist eher moderat und bedeutet im praktischen Fall, dass sich aus allen dreidimensionalen Strukturen von Proteinkomplexen mit einer Auflösung von etwa 2 nm durch weitere Prozessierung geeignete Referenzstrukturen zur Mustererkennung erstellen lassen. Prinzipiell wären damit alle gängigen dreidimensionalen Proteinstrukturbestimmungsmethoden, zu denen unter anderem Röntgenkristallographie, Nuklearmagnetresonanz, elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse und mit Einschränkungen auch Röntgenkleinwinkelstreuung zählen, für den Aufbau einer Referenzstrukturbibliothek geeignet.

Röntgenkristallographie, die wohl am häufigsten eingesetzte Methode der Strukturauflösung, bietet im besten Fall zwar atomare Auflösung der untersuchten Proteine, jedoch besteht zunächst eine nur mäßige Erfolgsquote, dass sich ein Protein überhaupt ohne weitere Modifikationen kristallisieren lässt. Bei prokaryotischen Proteinen liegt diese bei etwa 15 %, bei eukaryotischen bei gerade 3 % [Matthews 2007]. Ähnliche Auflösungen können mit Nuklearmagnetresonanz (NMR) erreicht werden. Doch können mittels NMR

derzeit nur Proteine bis zu einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa routinemäßig strukturell charakterisiert werden [Van Horn *et al.* 2009]. Gleichwohl gibt es Ansätze, NMR unter bestimmten Voraussetzungen auch auf makromolekulare Komplexe mit mehreren hundert Kilodalton anzuwenden. Hierfür sind allerdings umfangreiche proteinchemische Modifikationen am Komplex notwendig [Sprangers *et al.* 2007]. Mit der Analyse von Röntgenkleinwinkelstreudaten lassen sich Oberflächentopologien von Proteinen mit Auflösungen bis zu 1,5 nm rekonstruieren [Svergun 1999; Svergun *et al.* 2001; Hura *et al.* 2009]. Stärker noch als bei den zwei zuvor genannten Methoden werden für die Röntgenkleinwinkelstreuung monodisperse und homogene Proteinpräparationen benötigt. Allen drei Methoden ist außerdem gemein, dass die zur strukturellen Charakterisierung minimal benötigte Menge an Proteinmaterial im Bereich von einigen Mikrogramm liegt. Interessiert man sich allerdings im Speziellen für das makromolekulare Proteinkomplement, hebt sich die Einzelpartikelelektronenmikroskopie besonders hervor. Im Gegensatz zu den anderen genannten Methoden sind Proteinmengen kleiner als 100 ng oft schon ausreichend. Außerdem kann eine erheblich größere Menge an Verunreinigungen toleriert werden, was den Zeitaufwand für die Präparation der Proben deutlich reduziert. Somit ist die Einzelpartikelanalyse für die systematische Vervollständigung einer Referenzstrukturbibliothek der zellulären Proteinkomplexe in besonderer Weise geeignet.

Die Einzelpartikelanalyse basiert auf der Aufnahme einer großen Anzahl von zweidimensionalen Einzelprojektionen eines Zielproteins, die zunächst durch Alignierung bestmöglich in die gleiche Orientierung gedreht werden. Nachfolgend werden die Einzelprojektionen klassifiziert, um verschiedene Winkelansichten und Konformationszustände des Komplexes voneinander zu trennen und möglicherweise nicht mehr vollständig assemblierte Partikel und Verunreinigungen von der weiteren Prozessierung auszuschließen. Unter der Annahme, dass einzelne Klassen eine homogene Menge gleichartiger Partikel in gleicher Ansicht darstellen, können diese Klassen zur Verbesserung des Signal-zu-Rauschverhältnisses gemittelt werden. Aus Klassenmitteln verschiedener Winkelansichten lässt sich im Folgenden eine dreidimensionale Massendichteverteilung des Proteins rekonstruieren [Van Heel 1987]. Im typischen Fall werden für eine Einzelpartikelrekonstruktion einige zehntausend Einzelprojektionen benötigt. Die unter optimalen Bedingungen erreichbare Auflösung liegt im Subnanometerbereich und ist im Wesentlichen abhängig von den Abbildungseigenschaften des Elektronenmikroskops, den Aufnahmeeinstellungen, der Form des Partikels und der Verteilung der Einzelansichten auf die generierten Klassen [Henderson

1995]. Obwohl die benötigten Datenmengen erheblich sind, ist die erforderliche Menge an proteinischem Ausgangsmaterial mit nur wenigen Nanogramm etwa eintausendfach geringer als für die Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie, Röntgenkleinwinkelstreuung oder Nuklearmagnetresonanz.

War die Einzelpartikelanalyse anfänglich noch eine langwierige und manuelle Prozedur, wurden in den vergangenen Jahren deutliche Fortschritte bei der Automatisierung der Datenaufnahme und -auswertung gemacht, die inzwischen den Einsatz der Methode als Hochdurchsatzverfahren erlauben. So stehen mittlerweile vollständig automatisierbare Elektronenmikroskope, die ohne oder mit minimaler manueller Intervention rund um die Uhr Daten aufnehmen können, und integrierte Softwarelösungen, die eine weitgehend automatisierbare Prozessierung der gesammelten Daten erlauben, zur Verfügung [Sorzano *et al.* 2004; Nickell *et al.* 2005; Suloway *et al.* 2005; Nickell *et al.* 2007; Tang *et al.* 2007]. Sogar robotergestützte Mikroskopweiterungen, die einen automatisierten Wechsel zwischen mehreren Präparaten ermöglichen, wurden entwickelt [Potter *et al.* 2004; Lefman *et al.* 2007]. Sofern ausreichende Rechenkapazitäten vorhanden sind, kann von einer adäquaten Probe innerhalb weniger Tage eine dreidimensionale Struktur prozessiert werden, die den Anforderungen einer Aufnahme in eine Referenzstrukturbibliothek genügt.

Prinzipiell lassen sich auch gelöste Strukturmodelle anderer Organismen als Referenzen verwenden. Zu beachten ist dabei jedoch, dass im Regelfall eine einfache Bestimmung der Sequenzhomologie beteiligter Komplexuntereinheiten allein nicht ausreicht, um sicher zu stellen, dass Stöchiometrie und Konformation der vollständig assemblierten Proteinkomplexe tatsächlich eine hinreichende Ähnlichkeit aufweisen. Wichtiges Kriterium für die Auswahl solcher Ersatzreferenzen könnten beispielsweise stark konservierte strukturelle Domänen in phylogenetisch nahe verwandten Organismen sein. Gerade die Proteinkomplexe sind jedoch bis heute in Strukturdatenbanken deutlich unterrepräsentiert [Sali, Glaeser *et al.* 2003]. Die Wahrscheinlichkeit, dass für alle zellulären Proteinkomplexe eines Organismus geeignete dreidimensionale Referenzstrukturen verfügbar sind, ist deswegen sehr gering. Die Vorarbeiten zur Erstellung einer Referenzstrukturbibliothek umfassen deshalb auch Isolation oder Anreicherung der noch fehlenden Komplexe aus geeignetem Ausgangsmaterial und deren anschließende strukturelle Charakterisierung.

3.3 Der Modellorganismus *Thermoplasma acidophilum*

Thermoplasma acidophilum gehört zur Gruppe der *Thermoplasmatales* und ist damit ein Vertreter der *Euryarchaeota*, der Hauptgruppe archaealer Mikroorganismen. Es wurde erstmals aus Proben von wärmeproduzierenden Kohleabraumhalden isoliert, wiewohl diese nicht den ursprünglichen natürlichen Lebensraum darstellen [Darland *et al.* 1970]. Typischerweise kommt *T. acidophilum* in und um Thermalquellen und heißen Schwefeldfeldern vor [Segerer *et al.* 1988; Yasuda *et al.* 1995]. Optimales Wachstum wird bei Temperaturen um 59 °C und einem pH-Wert der Umgebung von etwa 1,5 erreicht [Belly *et al.* 1973; Stetter and Zillig 1985]. Toleriert wird ein Temperaturbereich von 30-65 °C und ein äußerer pH-Wert von 0,5-4,5, womit *T. acidophilum* als acidophil und moderat thermophil einzustufen ist [Madigan and Oren 1999; Huber and Stetter 2006]. Intrazellulär wird ein pH-Wert von 6,4-6,9 aufrecht erhalten [Hsung and Haug 1975; Searcy 1976]. *T. acidophilum* kann sowohl in mikroaeroben Umgebungen als auch anaerob, wofür es elementaren Schwefel als terminalen Elektronenakzeptor benötigt, gedeihen.

Die Zellmorphologie dieses Organismus ist heterogen pleomorph, in aller Regel jedoch rund mit Zelldurchmessern zwischen 0,2-2 µm. Vereinzelt bildet *T. acidophilum* Flagellen aus. Die Zellen sind umgeben von einer einzelnen etwa 5-10 nm dicken Plasmamembran, die im Wesentlichen aus Di- und Tetraetherphospholipiden mit variablen Polysaccharidgruppen besteht, deren Hauptzuckerbestandteile Mannose, Glukose und der eher ungewöhnliche Zucker Gulose sind. Dieser Aufbau stellt offenbar einen wirksamen Schutz gegen die aggressive Umgebung dar [Shimada *et al.* 2002]. Erhöht man jedoch den pH bis zum Neutralpunkt oder leicht darüber hinaus, verliert die Membran ihre Integrität und es setzt spontane Zelllyse ein, was präparative Zellaufschlüsse stark vereinfacht [Smith *et al.* 1973]. Das Genom von *T. acidophilum* wurde im Jahre 2000 vollständig sequenziert und ist mit 1,56 Mbp eines der kleinsten bekannten Genome nicht-parasitär lebender Organismen [Ruepp *et al.* 2000]. Derzeit sind 1483 offene Leserahmen annotiert. Ein großer Teil der Gene weist enge Verwandtschaft mit bakteriellen Genen auf, weitere 17 % sogar auffallende Homologie zu *Sulfolobus solfataricus*, einem phylogenetisch entfernt verwandten Archaeon, welches jedoch den gleichen Lebensraum wie *Thermoplasma* besiedelt [Brock *et al.* 1972]. Das zeigt einen ausgeprägten horizontalen Gentransfer in dieser ökologischen Nische an. Andererseits gibt es auch Gene, die denen von Eukaryoten sehr ähnlich sind. Makromolekulare Komplexe wie das 20S Proteasom oder das Thermosom, die an Prozessen

des Proteinabbaus, der Proteinfaltung, -stabilisierung und -erneuerung beteiligt sind, können als vereinfachte Versionen ihrer eukaryotischen Entsprechungen betrachtet werden [Dahlmann *et al.* 1989; Dahlmann *et al.* 1991; Waldmann *et al.* 1995].

Die geringe Zellgröße und die einfache Zellmembran ermöglicht zum Einen die dreidimensionale Abbildung vollständiger Zellen *in toto* mittels Kryoelektronentomographie, zum Anderen hat sich die geringe Komplexität des Genoms von *T. acidophilum* als brauchbar für umfassende Proteomstudien an diesem Organismus erwiesen [Sun *et al.* 2007; Sun *et al.* 2009]. In der Summe machen diese Eigenschaften *T. acidophilum* zu einem idealen Modellsystem, um die räumliche Verteilung von Proteinen innerhalb der Zellen zu studieren.

3.4 Zielsetzung und Fragestellung

Die Visualisierung des makromolekularen Proteinkomplements in zellulären Kryoelektronentomogrammen von *T. acidophilum* setzt umfangreiche, bereits abgeschlossene Proteomanalysen voraus, die einen Überblick über die in diesem Organismus existierenden Proteinkomplexe geben. Mittels Kryoelektronentomographie und nachfolgender Interpretation der gewonnenen Daten durch Mustererkennungsalgorithmen werden die Proteinkomplexe in ihrer zellulären Umgebung lokalisiert. Voraussetzung dafür ist die Verfügbarkeit einer umfassenden Referenzstrukturbibliothek aller zu kartierenden Komplexe.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, methodische und technologische Grundlagen zu entwickeln, um die, zum jetzigen Zeitpunkt nur teilweise gefüllte Bibliothek von Referenzstrukturen in effizienter Weise vervollständigen zu können.

Die elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse ist ideal geeignet, um solche Referenzstrukturen mit hinreichenden Auflösungen zu liefern, und die Instrumentation für eine Hochdurchsatzdatenaquisition und -analyse ist existent. Der limitierende Faktor für deren effiziente Nutzung ist jedoch derzeit die sehr arbeitsintensive und langwierige Gewinnung geeigneter Präparate aus biologischem Zellmaterial. Aus diesem Grund wurde an einer chromatographischen Anreicherung von Proteinkomplexen aus zytosolischen Extrakten von *T. acidophilum* gearbeitet, mit dem Ziel, neue und bisher noch nicht charakterisierte Kom-

plexe zu isolieren. Vorversuche hatten Hinweise geliefert, dass Hydroxyapatit zur initialen Anreicherung von Proteinkomplexen geeignet sein könnte, welche nachfolgend durch weitere Chromatographieschritte voneinander getrennt werden sollten.

Mit Blick auf eine massiv-parallele Weiterverarbeitung der so vorgereinigten Proteinkomplexe wurde weiters das Konzept einer präparativen Nativgelelektrophorese als Ausgangspunkt für die Gewinnung von elektronenmikroskopischen Präparaten evaluiert und entwickelt. Selbst für bis dahin unbekannte Komplexe sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, Strukturaufklärung mit massenspektrometrischer Identifizierung zu verknüpfen. Gel-basierende Massenspektrometrie für Proteine ist eine etablierte Standardmethode. Die bis dato theoretische Möglichkeit der Extraktion von nativen Proteinen aus Polyacrylamidgelen, um daraus elektronenmikroskopische Präparate zu gewinnen, sollte praktisch untersucht und ein robustes Arbeitsprotokoll für diese Methode erstellt werden.

Die automatisierte Prozessierung der Nativgele im beschriebenen Kontext erfordert außerdem eine Methode, die im Gel fokussierten Proteine zu detektieren, ohne deren strukturelle Integrität zu beeinträchtigen. Eine Möglichkeit hierzu bietet die intrinsische Fluoreszenzaktivität der ubiquitären aromatischen Aminosäurereste in Proteinen. Durch UV-Bestrahlung der Proteine im fernen UV-Bereich kann eine detektierbare Fluoreszenz im nahen UV-Bereich angeregt werden. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine adäquate Umsetzung dieser Technologie existierte, sollte in Kooperation mit der Firma Herolab die Entwicklung einer entsprechenden Detektionsplattform realisiert werden. Diese Detektionseinheit soll zukünftig die Basis für eine robotergestützte Gelprozessierungseinheit bilden, welche die gleichzeitige Vorbereitung von Proben für elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse und Massenspektrometrie erlaubt.

4. Materialien und Methoden

4.1 Bezugsquellen für Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Standardchemikalien im Reinheitsgrad „p.a.“ oder „reinst“ von VWR International/Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen.

4.2 Thermoplasma acidophilum

Thermoplasma-Medium:

10 ml	Lösung A
100 ml	Lösung B
20 ml	Hefeextraktlösung
2 ml	cH ₂ SO ₄ (98 %)
ad 950 ml	H ₂ O
50 ml	Glukose (20 w%) sterilfiltriert (0,2 µm)

Lösung A für Thermoplasma-Medium:

1,93 g	FeCl ₃ *6H ₂ O
0,18 g	MnCl ₂ *4H ₂ O
0,45 g	Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O
2,2 ml	ZnSO ₄ *7H ₂ O (1 w%)
0,5 ml	CuCl ₂ *2H ₂ O (1 w%)
0,3 ml	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O (1 w%)
0,38 ml	VOSO ₄ *5H ₂ O (1 w%)
0,1 ml	CoSO ₄ *7H ₂ O (1 w%)
ad 1000 ml	H ₂ O

für 20 min bei 121 °C autoklavieren

Lösung B für Thermoplasma-Medium:

13,2 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
3,72 g	KH ₂ PO ₄
2,47 g	MgSO ₄ *7H ₂ O
0,74 g	CaCl ₂ *2H ₂ O
ad 1000 ml	H ₂ O

für 20 min bei 121 °C autoklavieren

Hefeextraktlösung für Thermoplasma-Medium:

100 g	Hefeextrakt
ad 1000 ml	H ₂ O

für 20 min bei 121 °C autoklavieren

4.2.1 Aerobe Kultivierung

Frisches Thermoplasma-Medium wurde mit 1 ml einer Thermoplasma-Vorkultur (OD₅₄₀: 1,1) oder 4 ml Saccharosevorratskultur (gelagert bei -80 °C) inokuliert und in einem Ölbad bei 60 °C bis zum Erreichen einer OD₅₄₀ von 1,0-1,2 geschüttelt (100 rpm) [Robb and Place 1995; Sun, Beck *et al.* 2007].

4.2.2 Langzeitkonservierung bei -80 °C

Zur Langzeitlagerung wurden 100 ml einer bis zu einer OD₅₄₀ von 0,8 angezogenen Kultur von *Thermoplasma acidophilum* auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 7 % NH₄OH auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Nach Lösen von 15 g Saccharose in der Kultur wurde diese in Aliquots von 1,5 ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.3 Herstellung eines Zellextrakts

Eine Kultur von *T. acidophilum* wurde unter optimalen Wachstumsbedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen (s. Abschnitt 5.2.1). Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 min (4000 xg) geerntet und in möglichst wenig Wasser oder

Ampholyt3 (FFE Weber, Martinsried, Deutschland) resuspendiert. In 2 ml dieser Zellsuspension wurden 2 mM EDTA, Proteaseinhibitor in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration (Complete EDTA-free Protease Inhibitor, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 0,5 mg DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gelöst. Durch Zugabe von 1 M Trislösung wurde der pH auf 8 angehoben, wodurch die Zellen spontan lysierten [Searcy 1976]. Nach vollständiger Lyse und DNA-Degradation durch 30 min Inkubation auf Eis wurde der Rohextrakt bei 4 °C nochmals für 1 h zentrifugiert (35000 xg), um Zelltrümmer und Mikrosomen zu sedimentieren. Der Überstand enthielt die Proteine und Metabolite des Zytosols von *Thermoplasma acidophilum* und wurde frisch für die weiteren Experimente eingesetzt.

4.3 Chromatographie

4.3.1 Hydroxyapatitchromatographie

Für eine grobe Vorfraktionierung der zytosolischen Proteine von *T. acidophilum*, wurde ein Volumen Zellextrakt, welches einer Gesamtproteinmenge von 200 mg entspricht, mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine mit 150 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) äquilibrierte 20 ml Hydroxyapatitsäule (Bio-Gel HTP, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) aufgetragen. Bei konstanter Flussrate von 0,5 ml/min wurde die Säule anschließend solange mit Äquilibrationpuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder Grundniveau erreicht. In gleicher Weise wurde die Elution der verbleibenden Proteine nacheinander in zwei Stufen mit erst 300 mM und später 500 mM Kaliumphosphatpuffer (beide mit pH 7,0) durchgeführt.

4.3.2 Anionenaustauschchromatographie

Startpuffer:

25 mM	Tris (pH 7,5)
1 mM	DTT
20 mM	NaCl

Elutionspuffer:

25 mM	Tris (pH 7,5)
1 mM	DTT
1 M	NaCl

Von Hydroxyapatitfraktionen wurden Volumina, deren Gesamtproteinmenge 10 mg nicht überschritt, auf eine mit Startpuffer äquilibrierte 1 ml MonoQ-Säule (5/50 GL, GE Healthcare, München, Deutschland) aufgetragen. Bei konstanter Flussrate von 0,5 ml/min wurde die Säule anschließend solange mit Äquilibrationpuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder Grundniveau erreichte. Im Anschluss wurde bei konstanter Flussrate von 0,5 ml/min ein linearer Gradient von 20 mM bis 1 M NaCl über 30 Säulenvolumina appliziert und Fraktionen à 0,5 ml automatisiert gesammelt (ÄKTA Purifier 10, GE Healthcare, München, Deutschland). Die Proteinelution wurde durch Messung der Absorptionslinien bei 280, 254 und 230 nm verfolgt.

4.3.3 Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie)

GF-Puffer 1:

20 mM	HEPES (pH 7,5)
150 mM	NaCl

GF-Puffer 2:

25 mM	Tris (pH 7,5)
150 mM	NaCl

Für die Anreicherung der Proteinkomplexe wurden gesammelte Fraktionen nach der Ionenaustauschchromatographie auf einer Superose-6-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) weiter aufgetrennt. Bei Proteinkonzentrationen von mehr als 100 µg/ml erfolgte die Gelfiltration auf einer Säule mit 23,5 ml Gesamtvolumen. 200 µl einer MonoQ-Fraktion wurden geladen und bei einer Flussrate von 0,5 ml/min in Fraktionen à 0,5 ml automatisiert gesammelt (ÄKTA Purifier 10, GE Healthcare, München, Deutschland). Die Proteinelution wurde durch Messung der Absorptionslinien bei 280, 254 und 230 nm verfolgt. Bei Proteinkonzentrationen des Ausgangsmaterials unterhalb von 100 µg/ml erfolgte die Gelfiltration auf einer Säule mit 3,2 ml Gesamtvolumen. Es wurden dann 30 µl

Probe bei einer Flussrate von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgetrennt und automatisiert in Fraktionen à 50 μl gesammelt (SMART, GE Healthcare, ehemals Amersham Biosciences, München, Deutschland).

4.4 Proteinanalytik

4.4.1 Denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli

10x SDS-PAGE-Laufpuffer:

30 g	Tris
144 g	Glycin
10 g	SDS
<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O

5x SDS-PAGE-Auftragspuffer:

6 ml	Glycerin (88 w%)
1 ml	5x SDS-Laufpuffer
0,2 g	DTT
0,1 g	SDS
0,12 w%	Bromphenolblau
<i>ad</i> 10 ml	H ₂ O

Die Zusammensetzung von Proteinfractionen wurde mittels denaturierender SDS-Gelelektrophorese visualisiert [Laemmli 1970]. Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit 5x SDS-Auftragspuffer versetzt, 10 min bei 95 °C gekocht und 5-20 μl auf ein SDS-Gel aufgetragen (meist mit 12 % Trenngel und 6 % Sammelgel). Die Elektrophorese erfolgte bei einer (konstanten) Stromstärke von 27 mA je Gel (8 cm x 10 cm x 0.5 mm). Als Molekulargewichtsstandard wurde der Molecular Weight Marker (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mit β -Galactosidase (116 kDa), Albumin (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactatdehydrogenase (35 kDa), Restriktionsendonuklease Bsp98I aus *E. coli* (25 kDa), β -Lactoglobulin (18,4 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa) verwendet.

4.4.2 Native Gelelektrophorese

10x Laufpuffer (pH 9,5):

30 g	Tris
144 g	Glycin
<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O

10x Laufpuffer (pH 7.4):

29,3 g	Imidazol
83,4 g	HEPES
<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O

5x Nativ-Auftragspuffer:

310 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
50 % w/v	Glycerin
0,05 % w/v	Bromphenolblau

Es wurden 4-12 % und 4-20 % Novex Tris-Glycin-Gradientengele (TG) bzw. 3-8 % Novex Tris-Acetat-Gradientengele (TA) von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) verwendet. Proben für die native Gelelektrophorese wurden 1:4 mit fünffach konzentriertem Nativ-Auftragspuffer versetzt und geladen. Die Elektrophorese erfolgte mit einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer bei konstanter Spannung von 120 V (TG-Gele) bzw. 140 V (TA-Gele) für 3-12 h. Für analytische Zwecke wurde im Allgemeinen Elektrophoresepuffer mit einem pH-Wert von 9,5 verwendet, für Gele, die im Anschluss für das Grid-Blotting vorgesehen waren, betrug der pH-Wert des Elektrophoresepuffers 7,4. Als Molekulargewichtsstandard diente ein High Molecular Weight Marker der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) mit Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Lactatdehydrogenase (140 kDa) und Albumin (66 kDa).

4.4.3 Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G250

Coomassie-Silber Färbelösung:

50 g	Aluminiumsulfat-(14-18)-hydrat
100 ml	abs. Ethanol

0,2 g	Coomassie Brilliant Blue G250
20 ml	ortho-Phosphorsäure
<i>ad</i> 1000 ml	H ₂ O

Zur Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde in der Regel eine modifizierte Coomassie-Silber-Prozedur verwendet [Neuhoff *et al.* 1985; Kang *et al.* 2002; Candiano *et al.* 2004]. Die Gele wurden zunächst für 2x5 min in Wasser gewaschen, falls notwendig für 5 min in 10 % TCA fixiert und abermals 2x5 min mit Wasser gewaschen, und schließlich in der Coomassie-Silber Färbelösung für mindestens 15 min inkubiert. Zum Entfärben wurde ddH₂O verwendet.

Um eine möglichst schnelle Anfärbung der Referenzproteinbanden für das Grid-Blotting (s. Abschnitt 6) zu erreichen, wurden diese mit Coomassie-Färbelösung für 2 min in einer Mikrowelle bei 270 W Leistung erhitzt. Eine anschließende Entfärbung war nicht notwendig.

4.4.4 Gelfärbung mit Silbernitrat

Fixierlösung I:

250 ml	Methanol
60 ml	Eisessig
<i>ad</i> 500 ml	H ₂ O

Fixierlösung II:

250 ml	Ethanol
<i>ad</i> 500 ml	H ₂ O

Sensitizer-Lösung:

20 mg	Natriumthiosulfat
<i>ad</i> 100 ml	H ₂ O

Imprägnierlösung:

200 mg Silbernitrat	
38 µl	Formalin
<i>ad</i> 100 ml	H ₂ O

Entwicklerlösung:

6 g	Natriumcarbonat
2,5 ml	Imprägnierlösung
25 µl	Formalin
ad 100 ml	H ₂ O

Stopplösung:

120 ml	Eisessig
ad 1000 ml	H ₂ O

Für den sensitiven Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde eine Massenspektrometrie-kompatible Silberfärbung durchgeführt [Mortz *et al.* 2001]. Zur Vorbereitung der Färbung wurden die Gele nacheinander für 2x30 min in Fixierlösung I, weitere 3x20 min in Fixierlösung II und 1 min in frisch zubereiteter Sensitizer-Lösung geschwenkt. Nach kurzem Waschen mit Wasser wurden die Gele für 20 min in Imprägnierlösung inkubiert, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit Wasser. Die Gelfärbung erfolgte bis zur gewünschten Stärke in Entwicklerlösung und wurde nach kurzem Waschen mit Wasser durch Zugabe von Stopplösung beendet.

4.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in der Regel mit der Methode nach Bradford [Bradford 1976]. Dazu wurden 0,5 ml Bradford-Reagenz mit 1-50 µl der Probe versetzt und mit ddH₂O auf 1 ml aufgefüllt. Nach 10 min Inkubation wurde die OD₅₉₅ gegen einen Blindwert, der die entsprechende Pufferkomposition besitzt aber kein Protein enthält, gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Vergleich mit einer Kalibrationskurve des Referenzproteins BSA (engl.: *bovine serum albumine*), welches in definierten Mengen ebenso vermessen wurde. Als weitere Methode wurde das 2D Quant Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Alternativ dazu wurden Proteinbestimmungen optometrisch durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm und 260 nm, bzw. 260 nm und 230 nm bei fehlender oder geringer Aromatenabsorption, gemäß nachstehender Formeln durchgeführt [Warburg and Christian 1942; Layne 1957].

$$c_{Prot} [mg / ml] = 1.55 \cdot E_{280} - 0.76 \cdot E_{260}$$

$$c_{Prot} [mg / ml] = 1.83 \cdot E_{230} - 0.76 \cdot E_{260}$$

4.4.6 Massenspektrometrische Analyse

Die Proteinbanden wurden nach ihrer Visualisierung aus den Gelen ausgeschnitten und dem hausinternen Service für massenspektrometrische Analysen übergeben. Zum Einsatz kam ein Reflex III Massenspektrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) im MALDI-TOF-Modus. Die gefundenen Peptide wurden anschließend mittels MASCOT-Suche (Matrix Science, Boston, MA, USA) gegen eine ORL-Datenbank von *T. acidophilum* abgeglichen.

4.5 Fluoreszenzmessungen

Zur Aufnahme von Fluoreszenzexcitations- und Fluoreszenzemissionsspektren wurde ein Lumineszenzspektrometer (LS 50 B, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) verwendet. Einzelne Aminosäuren wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml in Reinstwasser gelöst, Proteine wurden in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) in einer Konzentration von ebenfalls 10 µg/ml für nachfolgende Messungen eingesetzt.

Die Messung von Fluoreszenzexcitationsspektren erfolgte durch Detektion der emittierten Fluoreszenz bei konstanter Wellenlänge, während die Anregungswellenlänge mit 60 nm/min kontinuierlich von 200 bis maximal 360 nm verändert wurde.

Fluoreszenzemissionsspektren wurden bei konstanter Wellenlänge des Anregungslichts aufgenommen, indem die Fluoreszenzintensität bei kontinuierlicher linearer Veränderung der Detektionswellenlänge von minimal 260 bis 600 nm mit 60 nm/min verfolgt wurde.

4.6 Transmissionselektronenmikroskopie

4.6.1 Negativkontrastierung von Proteinen

Für die Negativkontrastierung [Brenner and Horne 1959; Harris and Horne 1994] wurden 3 µl Probe auf das Trägernetzchen aufgetragen. Nach etwa 1-2 min Adsorptionszeit wurde der Flüssigkeitstropfen vorsichtig mit einem Stück Filterpapier (z.B. Whatman Nr 1) abgezogen und gleich darauf 3 µl Kontrastierungsreagenz (2 %iges Uranylacetat) vorsichtig auf dem Netzchen verteilt. Nach einer Einwirkzeit von 30 s wurde abermals die Flüssigkeit mit Filterpapier abgezogen und die Probe an der Luft getrocknet.

4.6.2 Vitrifizierung von Proteinen

Die Vorbereitung der Kryoproben erfolgte nach der Standardmethode [Adrian *et al.* 1984] mit kleinen Modifikationen. Die Trägernetzchen wurden zunächst in einer Plasmaionisationskammer für 30 s beglimmt und anschließend in eine Einschussapparatur (engl.: *plunge-freezing apparatus*) eingespannt. Nach Auftrag von 5 µl Proteinlösung und einer Adsorptionszeit von 1 min wurde das Trägernetzchen für etwa 3 s mit Filterpapier (z.B. Whatman Nr 1) geblottet und durch Auslösen des Einschussmechanismus in flüssigem Ethan vitrifiziert.

4.6.3 Herstellung kohlebefilmter Trägernetzchen

Frisch gespaltener Quarz-Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurde in einer Bal-Tec MED 020 Bedampfungsapparatur (Leica Microsystems, vormals Bal-Tec, Witten, Deutschland) bei 10^{-5} mbar mit Kohle oder Graphit bedampft. Die Filamentspannung zur Verdampfung der Kohle betrug 180 V bei ~85 A, oder 200 V bei ~100 A für Graphit. Die Dicke des Films wurde während des Verdampfprozesses über einen Bal-Tec QSG 301 Quarzkristallmonitor (Leica Microsystems, vormals Bal-Tec, Witten, Deutschland) verfolgt und lag je nach Anwendung zwischen 0,5 und 10 nm.

Die Kohlefilme wurden von der Glimmoberfläche durch schräges Eintauchen in Reinstwasser gelöst und verblieben auf der Wasseroberfläche. Um das Abflotieren des

Kohlefilms zu erleichtern, wurde der befilmte Glimmer direkt vor Verwendung für 24 h bei 200 °C gesintert und getrocknet. Der freie Kohlefilm wurde dann auf Trägernetzchen (aus Kupfer bzw. Gold) für die Elektronenmikroskopie übertragen und die Netzchen, zum besseren Halt des Films, nicht vor Ablauf von zwei Tagen zur Präparateerstellung verwendet.

4.6.4 Grid-Blotting

Die Methode des Grid-Blotting wird in dieser Arbeit erstmalig beschrieben (siehe Abschnitt 6.2.1) und implementiert ein patentrechtlich geschütztes Verfahren zur ‚Detektion und Analyse von makromolekularen Komplexen‘ (EP 1 591 783 B1) [Baumeister *et al.* 2008].

Für den direkten Transfer von nativen Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie wurde nach der Elektrophorese (siehe Abschnitt 4.4.2) an den Stellen der Proteinbanden die Geloberfläche mit Hilfe einer spitzen Pinzette leicht angeraut. Mit kontinuierlichem Kohlefilm versehene Trägernetzchen wurden in einer Plasmaionisationskammer für 5 s schwach hydrophilisiert, auf die angerauten Gelstellen aufgelegt und anschließend mit 3-6 µl Elektrophoresepuffer benetzt, um die Diffusion von Proteinen zu ermöglichen. Nach 2 min wurden die Netzchen entfernt und zur Herstellung negativkontrastierter oder vitrifizierter Präparate verwendet.

4.6.5 Datenakquisition

Um initial die optimalen Bedingungen für das Grid-Blotting auszutesten, wurden mit Uranylacetat kontrastierte Präparate zunächst an einem Philips CM12 TEM, ausgestattet mit einer 1024x1024 Pixel CCD-Kamera, untersucht. Weiterführende Aufnahmen einzelner Proben der Proteinkomplexanreicherung (siehe Abschnitt 5), wie auch der Datensätze der durch Grid-Blotting gewonnenen Präparate (siehe Abschnitt 6), erfolgten an einem FEI Tecnai F20 TEM bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV mit einer 4096x4096 Pixel CCD-Kamera (Eagle 4k, FEI, Eindhoven, Niederlande) oder einem Philips CM20 FEG TEM betrieben bei 160 kV, ebenfalls ausgerüstet mit einer 4096x4096 Pixel CCD-Kamera (TVIPS, Gauting, Deutschland).

4.6.6 Digitale Bildverarbeitung

Die Bearbeitung und Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit der am Max-Planck-Institut für Biochemie entwickelten TOM-Toolbox für Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA).[Nickell, Forster *et al.* 2005] Einzelansichten der Partikel wurden manuell selektiert und ausgeschnitten (`tom_av2_particlepickergui`), aligniert (`tom_av2_alignment`) und mittels Eigenwertanalyse (`tom_pcgui`) klassifiziert. Charakteristische Klassen wurden zusammengefasst und gemittelt.

5. Präparative Anreicherung von Proteinkomplexen

5.1 Theoretische Einführung

Wie Proteomstudien an *T. acidophilum* gezeigt haben, liegen viele der zytosolischen Proteine nicht in monomerer Form, sondern in homo- und heterooligomeren Proteinkomplexen vor [Sun, Tamura *et al.* 2009]. Derzeit existieren noch keine etablierten Werkzeuge zur endogenen Überexpression in diesem Organismus und konventionelle heterologe Expressionssysteme weisen nur geringe Erfolgsraten bei der Produktion von Proteinkomplexen aus *T. acidophilum* auf. Der zielführende Weg war aus diesem Grund die direkte Anreicherung aus zytosolischen Extrakten für eine nachfolgende elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse. Das Hauptaugenmerk lag dabei insbesondere auf einer raschen Gewinnung bislang noch nicht strukturell charakterisierter, stabiler und mäßig stabiler Komplexe. In Kombination mittels der in Abschnitt 6 vorgestellten Grid-Blotting-Methode und massenspektrometrischen Analysen sollten so neue Kandidaten für die Aufnahme in die Referenzstrukturbibliothek der Proteinkomplexe aus *T. acidophilum* identifiziert werden.

Bei der Anreicherung von endogenem Material sind vor allem zwei Faktoren zu berücksichtigen. Zum einen spielt die Komplexstabilität eine große Rolle für den Anteil intakter Komplexe nach der Reinigungsprozedur. Während manche Komplexe extrem stabil sind, liegen andere Komplexe in labilen thermodynamischen Gleichgewichten vor, bei denen schon geringe Änderungen der Gesamtkonzentration oder Änderungen der Konzentration von strukturstabilisierend wirkenden Kofaktoren, eine teilweise oder gar vollständige Dissoziation bewirken können. Besonderes Augenmerk auf die Anreicherung dieser labilen oder transienten Komplexe wurde jedoch nicht gelegt.

Zum anderen bestimmt die natürliche intrazelluläre Konzentration, wie viel Zellmasse für die Gewinnung einer bestimmten Menge des Komplexes benötigt wird. Unter der Annahme, dass während der Reinigungsprozedur keine Verluste auftreten, zeigt eine einfache Beispielrechnung von Gygi *et al.*, dass für die Isolation von 100 ng Protein mit einem

Molekulargewicht von 50 kDa aus *Saccharomyces sp.*, welches in 1000 Kopien je Zelle vorkommt, etwa 20 mg Gesamtprotein eines zytosolischen Extrakts benötigt werden [Gygi *et al.* 2000]. Um die gleiche Menge eines Proteins mit nur 10 Kopien je Zelle zu isolieren, steigt die nötige Menge an Ausgangsprotein, unter Berücksichtigung der zu erwartenden Proteinverluste bei den einzelnen Reinigungsschritten, schnell auf mehrere Gramm. Die Konzentration eines Zellextrakts aus *T. acidophilum*, der nach der in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Methode hergestellt wird, liegt bei etwa 20 mg/ml, das entspricht einem Ausgangsvolumen von mindestens 50 ml Zellextrakt. Für die Etablierung einer Anreicherungsmethode von Proteinkomplexen wurden deswegen chromatographische Methoden angewendet, weil sich diese im Bedarfsfall gut auf größere Probenvolumina skalieren lassen.

Um die initial hohe Komplexität des frischen Zellextrakts zu verringern, wurde Hydroxyapatit verwendet. Hydroxyapatit ist ein vielfältig einsetzbares Material zur Fraktionierung von komplexen Mischungen aus Biomolekülen und Proteinen [Tiselius *et al.* 1956; Kadoya *et al.* 1988]. Seine einzigartigen Trenneigenschaften beruhen auf einem multi-modalen Bindungsverhalten, welches durch drei unterschiedliche Arten von Bindungsstellen vermittelt wird. Auf der Materialoberfläche existieren sogenannte p-Bindungsstellen, die negativ geladen sind, positiv geladene c-Bindungsstellen und Bereiche freier Hydroxylgruppen. Dadurch können Proteine gleichermaßen durch elektrostatische Wechselwirkungen, Komplexierung oder auch Wasserstoffbrückenbindungen gebunden werden. In allen drei Fällen erfolgt die Desorption der Proteine durch einen kompetitiven Eluenten, bei den durchgeführten Experimenten wurde dafür Phosphat verwendet.

Der zweite Fraktionierungsschritt erfolgte auf einer MonoQ-Matrix, einem starken Anionenaustauscher, der mit verschiedenen quartären Aminen funktionalisiert ist und für Anwendungen, die eine hohe Trennleistung verlangen, eingesetzt wird. Bei der Ionenaustauschchromatographie werden Biomoleküle und Proteine gemäß der Stärke ihrer elektrostatischen Wechselwirkungen mit einer stationären Ionenaustauschermatrix voneinander getrennt [Sober and Peterson 1954]. Die Bindung von Proteinen ist bei niedrigen Ionenstärken der mobilen Phase nahezu quantitativ. Die Elution erfolgt mittels Erhöhung der Ionenstärke in der mobilen Phase, wodurch die Proteine kompetitiv von den Matrixbindungsstellen verdrängt werden.

In einem letzten Reinigungsschritt werden vorhandene Proteinkomplexe in den MonoQ-Fractionen mittels einer Superose-6-Gelfiltrationssäule von dissoziiertem Material, kleineren

Proteinen und unspezifischen Aggregaten getrennt. Superose 6 ist ein Säulenmaterial mit einem optimalen Trennbereich zwischen 10 kDa und 5 MDa.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Stabilität eines Zellextrakts aus *Thermoplasma acidophilum*

Unter konstanten Umgebungsbedingungen wird im Zytosol einer Zelle für die meisten Metabolite ein homöostatisches Gleichgewicht aufrecht erhalten. Dies wird durch die Regulation der Proteinkonzentrationen und Modulation der enzymatischen Aktivität der Proteine erreicht. Durch die Zellyse und dem folgenden Abtrennen des membranösen und genomischen Materials nimmt man diesem System die Fähigkeit der Selbstregulation, da nicht mehr alle benötigten Komponenten zur Aufrechterhaltung der Homöostase verfügbar sind. In aller Regel wird zur Lyse ein vorher geerntetes Zellpellet in einem möglichst geringen Volumen Lysispuffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen führt somit automatisch zu einer leichten Verdünnung aller vorhandenen Metabolite. Dennoch kommen die physiologischen Prozesse im zytosolischen Extrakt nicht sofort zum Stillstand. Vielmehr werden enzymatische Reaktionen noch solange ablaufen, bis die entsprechenden Metabolite bestimmte Grenzkonzentrationen unterschritten haben. Dies kann beispielsweise dazu führen, dass Kofaktoren, die für die stabile Assoziation von makromolekularen Proteinkomplexen benötigt werden, nicht mehr in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen und diese Komplexe in Folge dessen dissoziieren. Es findet also unweigerlich ein Degenerationsprozess des zytosolischen Extrakts statt.

In Vorversuchen sollte deswegen zunächst untersucht werden, über welchen Zeitraum ein solcher Extrakt ohne weitere Additiva stabil bleibt. Dazu wurde Zellextrakt aus *T. acidophilum* frisch hergestellt und das Absorptionsprofil einer Gelfiltration über eine Superose-6-Säule bei 280 nm Wellenlänge aufgezeichnet. Eine Molekulargewichtskalibrierung der Säule ergab, dass Proteine mit einem Molekulargewicht von 200 kDa bei einem Retentionsvolumen von etwa 15 ml eluieren. Speziell der Elutionsbereich zwischen 7 und 15 ml enthält also den Anteil der für die Elektronenmikroskopie interessanten Proteinkomplexe. Die insgesamt aufgetragene Proteinmenge betrug 4 mg in 200 µl. Nach 16 bzw. 40 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur wurde die Gelfiltration wiederholt. Die Chromatogramme in

Abbildung 5-1 zeigen deutlich, dass schon innerhalb von 16 h ein merklicher Anteil der Proteine undefiniert aggregiert und viele höhermolekulare Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten dissoziieren. Dies wäre jedoch für eine weiter reichende chromatographische Anreicherung makromolekularer Komplexe ein sehr eng begrenzter Zeitrahmen.

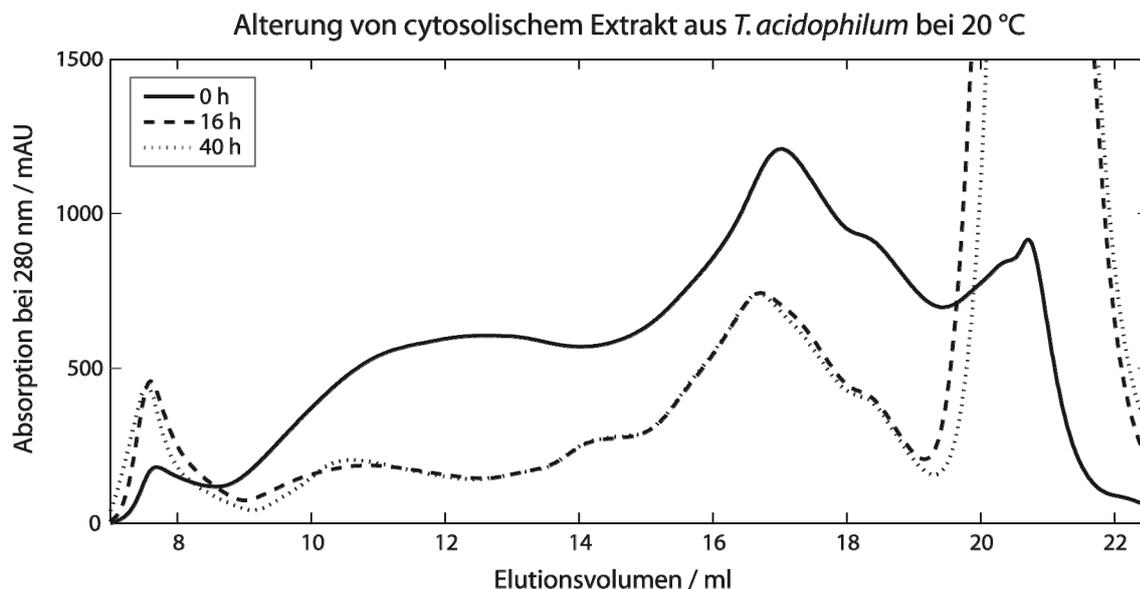


Abbildung 5-1: Degradation von zytosolischem Extrakt bei Raumtemperatur

Gezeigt sind Elutionsprofile bei Verfolgung der 280 nm Absorptionslinie einer Superose 6 Gelfiltration von zytosolischem Extrakt nach verschiedenen Lagerzeiten bei Raumtemperatur. Im Vergleich zu frischem Extrakt ändert sich das Profil schon nach 16 h deutlich. Eine Zunahme der Absorption des ersten Peaks bei etwa 8 ml, welcher auch dem Größenausschlussvolumen entspricht, indiziert die Bildung von Proteinaggregaten; die überaus hohe Zunahme des Peaks bei 20 ml deutet auf eine starke Dissoziation und Degradation von Proteinen hin. Beide Prozesse führen zu einer Verringerung der Proteinkonzentration im mittleren Molekulargewichtsbereich. Insbesondere nimmt die Konzentration der Proteinkomplexe mit Molekulargewichten über 200 kDa (bis 15 ml) überproportional ab. Nach 40 h sind gegenüber 16 h keine Veränderungen mehr festzustellen.

Da Kälte bekanntlich kinetische Prozesse verlangsamt, wurden in einer analogen Zeitreihe Chromatogramme von kühl gelagertem Zellextrakt aufgenommen (siehe Abbildung 5-2). Auch die Gelfiltration erfolgte bei derselben Temperatur. Aggregation und Komplexdissoziation konnten dadurch deutlich eingeschränkt werden. Auffällig ist, dass die Proteinkonzentration bei 8 °C im oberen Molekulargewichtsbereich bis hinab zu 200 kDa nur schwach abfällt, während bei Raumtemperatur in diesem Bereich mehr als 50 % aller Komplexe verloren gehen. Im Folgenden wurden daher alle Anreicherungsexperimente bei 8 °C durchgeführt, geringere Temperaturen konnten von technischer Seite her während der Chromatographie nicht realisiert werden.

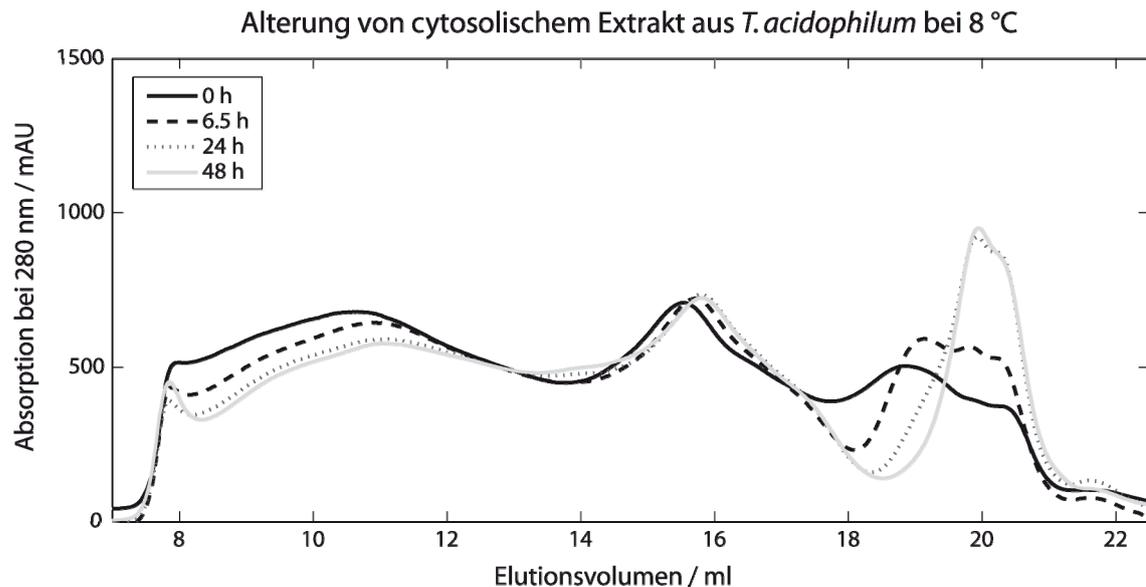


Abbildung 5-2: Degradation von zytosolischem Extrakt bei 8 °C

Gezeigt sind Elutionsprofile bei Verfolgung der 280 nm Absorptionslinie einer Superose 6 Gelfiltration von zytosolischem Extrakt nach verschiedenen Lagerzeiten bei 8°C. Der bei Raumtemperatur beobachtete Alterungsprozess lässt sich durch Abkühlen der Probe deutlich verlangsamen. Zwar sind im Vergleich zum frischen Extrakt schon nach 6,5 h leichte Veränderungen, besonders im niedermolekularen Bereich sichtbar (um 18-20 ml). Doch selbst nach 24 h sind die Veränderungen des Profils gegenüber den Veränderungen bei Raumtemperatur noch sehr moderat. Erst nach 48 h wird eine zunehmende Proteinaggregation (8 ml) sichtbar. Auffällig im Vergleich zu den bei Raumtemperatur durchgeführten Experimenten ist, dass hier im hochmolekularen Bereich um 8-9 ml eine deutlich höhere relative Proteinkonzentration vorliegt.

Es wurde weiterhin versucht, eine langfristige Stabilisierung des Zellextrakts durch Osmolyte zu erreichen. Es ist bekannt, dass insbesondere Organismen, die in hochosmolaren Umgebungen leben, ihren intrazellulären osmotischen Druck durch Akkumulation von niedermolekularen, meist amphoteren organischen Substanzen erhöhen, um so ihren Wasserhaushalt zu regulieren [Yancey *et al.* 1982]. Diese Moleküle haben jedoch zusätzlich zu ihren osmoaktiven Eigenschaften auch günstigen Einfluss auf die Stabilität der Proteine gegenüber Temperaturschwankungen und anderen Stressfaktoren [Bolen 2004]. Die Verringerung der Anfälligkeit gegenüber partieller Denaturierung bei osmotischem Stress erfolgt dabei vermutlich ohne direkte Bindung an die Proteinoberfläche, sondern wird über eine energetische Stabilisierung der Hydrathülle, die Proteine in Lösung hält, vermittelt [Arakawa and Timasheff 1983; Arakawa and Timasheff 1985]. Prolin wurde in Konzentrationen von mindestens 1 M als eine solche osmoaktive Substanz beschrieben, die beispielsweise außerordentlich schnell aggregierendes, humanes P39A, ein Retinsäurebindendes Protein, in Lösung stabilisiert. Außerdem wirkt Prolin auf kleinere Protein-

aggregate und partiell entfaltete Proteine destabilisierend und hat eine positive Wirkung in Renaturierungsversuchen [Kumar *et al.* 1998; Ignatova and Gierasch 2006]. Es sollte daher im Folgenden untersucht werden, ob der Zusatz von 2 M Prolin zu frischem Zellextrakt eine längere Stabilisierung der Proteinkomplexe bewirkt. Die gleiche Prolin-Konzentration war auch bereits im Lysispuffer für die Zellen enthalten. Wie oben beschrieben wurden auch hier Chromatogramme nach 0, 2,5, 24 und 48 Stunden aufgenommen (siehe Abbildung 5-3). Beim Vergleich mit den vorangegangenen Versuchen wird deutlich, dass die relative Konzentration der höhermolekularen Proteinkomplexe durch die Zugabe von Prolin abgesenkt wird. Es scheint hingegen deutlich mehr Dissoziation aufzutreten. Wirksam verhindert wurde Proteinaggregation, welche auch nach 48 h noch nicht nennenswert ist.

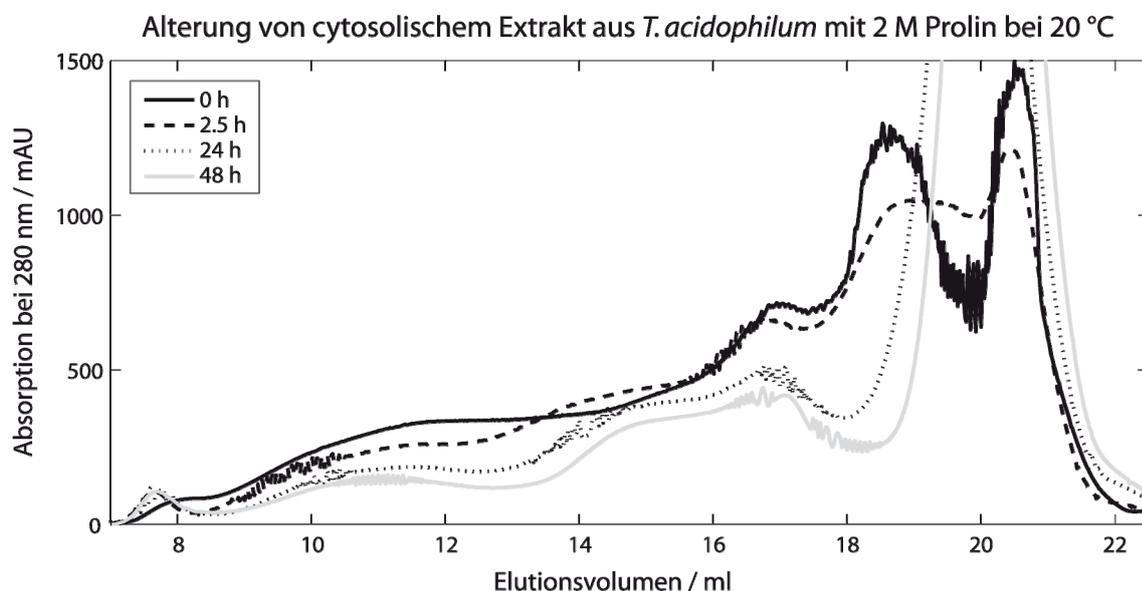


Abbildung 5-3: Degradation von zytosolischem Extrakt bei Raumtemperatur und Zugabe von Prolin
Gezeigt sind Elutionsprofile bei Verfolgung der 280 nm Absorptionslinie einer Superose 6 Gelfiltration von zytosolischem Extrakt nach verschiedenen Lagerzeiten bei Raumtemperatur. Zusätzlich enthielt der Extrakt seit dem Aufschluss der Zellen 2 M Prolin. Selbst nach 48 h bei Raumtemperatur ist keine übermäßige Proteinaggregation zu beobachten, Dissoziation der Proteinkomplexe findet aber weiterhin statt. Eine Konservierung der makromolekularen Komplexe durch Prolin konnte nicht nachgewiesen werden.

5.2.2 Chromatographische Methode zur Anreicherung von Proteinkomplexen

In zytosolischen Extrakten konnten etwa eintausend der 1483 im Genom von *T. acidophilum* annotierten Proteine mittels massenspektrometrischer Analysen identifiziert werden [Sun *et al.* in Vorbereitung]. Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, ist diese komplexe Mischung einem kontinuierlichen Alterungsprozess unterworfen, der zu Dissoziation

von Proteinkomplexen und unspezifischer Aggregation von Proteinen allgemein führt. Die Zeit für die Anreicherung einzelner Proteinkomplexe war damit ab dem Zeitpunkt des Zellaufschlusses auf 24-36 h beschränkt. Um innerhalb dieser kurzen Zeitspanne eine hohe Fraktionierungsrate zu erreichen, wurden mit Hydroxyapatit und MonoQ Säulenmaterialien verwendet, die eine hohe Trennleistung aufweisen. Als letzter Schritt wurde im Anschluss eine Gelfiltration auf Superose 6 durchgeführt, um die intakten Proteinkomplexe von dissoziiertem Material und Aggregaten zu befreien.

Hydroxyapatit eignet sich insbesondere zum raschen Abtrennen von niedermolekularen Komponenten des Zellysats und kleineren Proteinen, was durch intensives Waschen mit niedrigen Phosphatkonzentrationen erreicht wird. Wie in Abbildung 5-4 zu sehen ist, binden makromolekulare Komplexe stärker an das Säulenmaterial und werden hauptsächlich erst bei Phosphatkonzentrationen oberhalb von 300 mM eluiert.

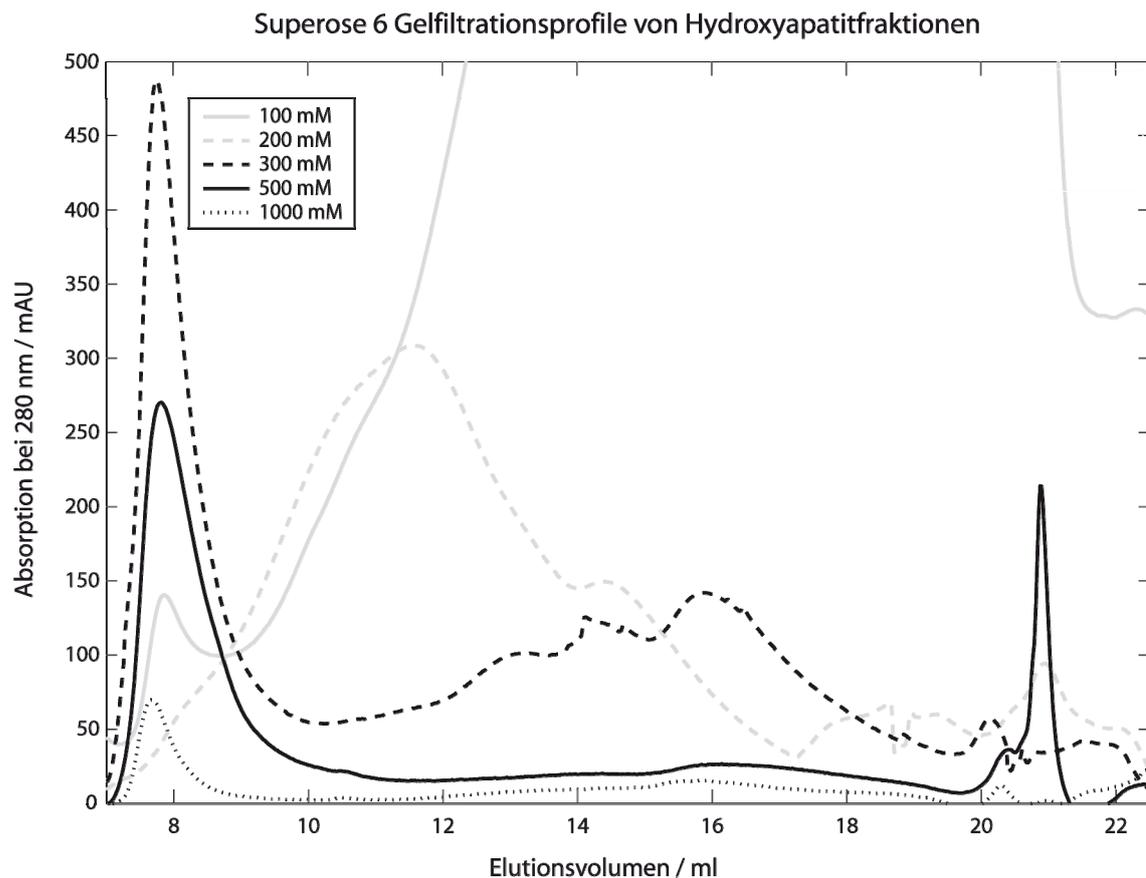


Abbildung 5-4: Fraktionierung von zytosolischem Extrakt aus *T. acidophilum* auf Hydroxyapatit
Frischer Zellextrakt wurde mittels eines stufenförmigen Phosphatgradienten von 100, 200, 300, 500 und 1000 mM Phosphat (pH 7,4) auf Hydroxyapatit fraktioniert. Gezeigt sind Elutionsprofile bei Verfolgung der 280 nm Absorptionslinie einer Superose 6 Gelfiltration dieser Fraktionen. Die überwiegende Mehrheit der kleineren Proteine wird bereits bei geringen Phosphatkonzentrationen von der Hydroxyapatitsäule eluiert. Höhermolekulare Komplexe werden bei 300 und 500 mM eluiert.

Da die einzelnen Stufenelutionen recht langwierig sind, wurden aus Gründen der Zeitersparnis für die folgenden Experimente nach einem erschöpfenden ersten Waschschrift mit 150 mM Phosphat nur noch zwei Elutionskonzentrationen, 300 mM und 500 mM, verwendet. Ein typisches Elutionsprofil dieser Hydroxyapatitfraktionierung ist in Abbildung 5-5 gezeigt. Da die beiden Fraktionen noch zu komplex für eine direkte Analyse mittels SDS-PAGE waren, wurden sie vor der SDS-PAGE einer weiteren Trennung auf einer Superose 6 Säule unterzogen. Ein Vergleich der angefertigten SDS-Gele zeigt, dass die Proteinzusammensetzung beider Fraktionen deutlich voneinander verschieden ist (siehe Abbildung 5-6).

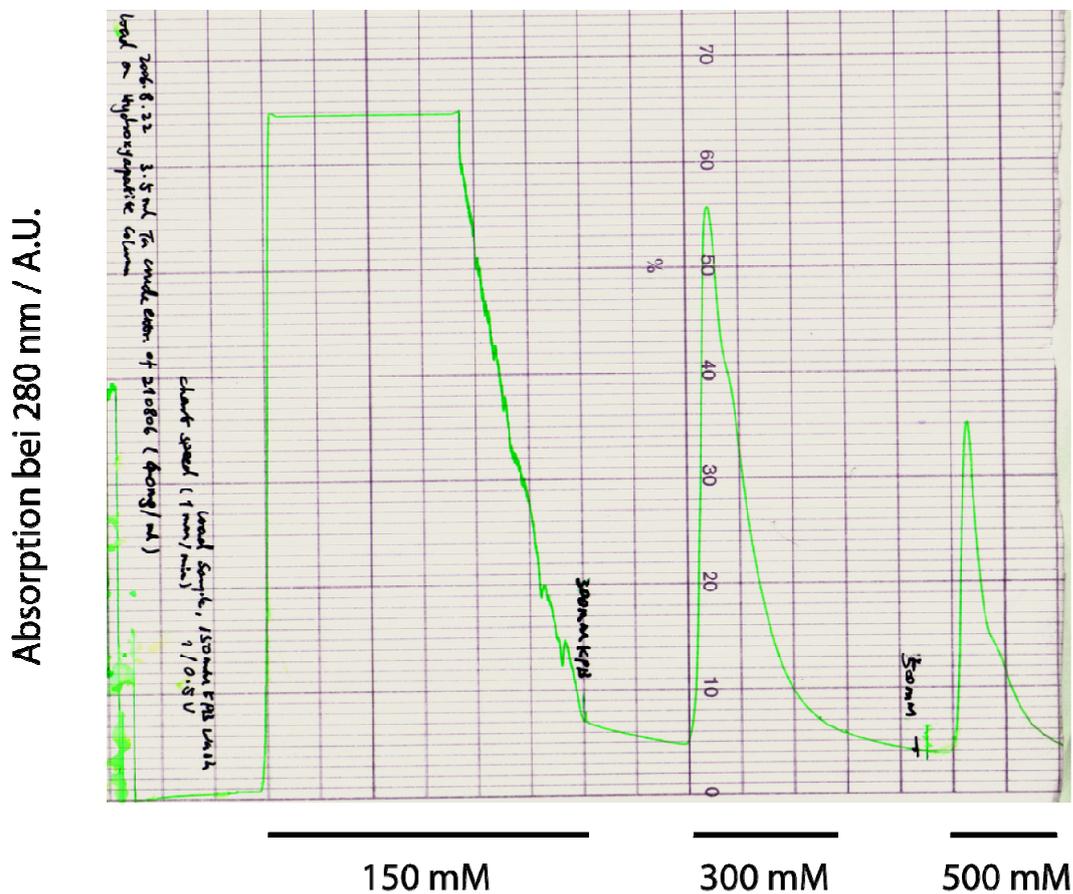


Abbildung 5-5: Chromatogramm einer Fraktionierung von Zellextrakt aus *T. acidophilum* auf Hydroxyapatit

Gezeigt ist ein typisches Chromatogramm einer Zellextraktfraktionierung, aufgezeichnet bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm. Ein Startvolumen von 3,5 ml Extrakt wird auf eine Hydroxyapatitsäule mit 15 ml Bettvolumen aufgetragen und mit 150 mM Phosphat solange gewaschen, bis die Absorptionslinie wieder auf Basisniveau abgesunken ist. Auf analoge Weise werden anschließend zwei Fraktionen durch Stufenelution mit 300 mM und 500 mM Phosphat gesammelt.

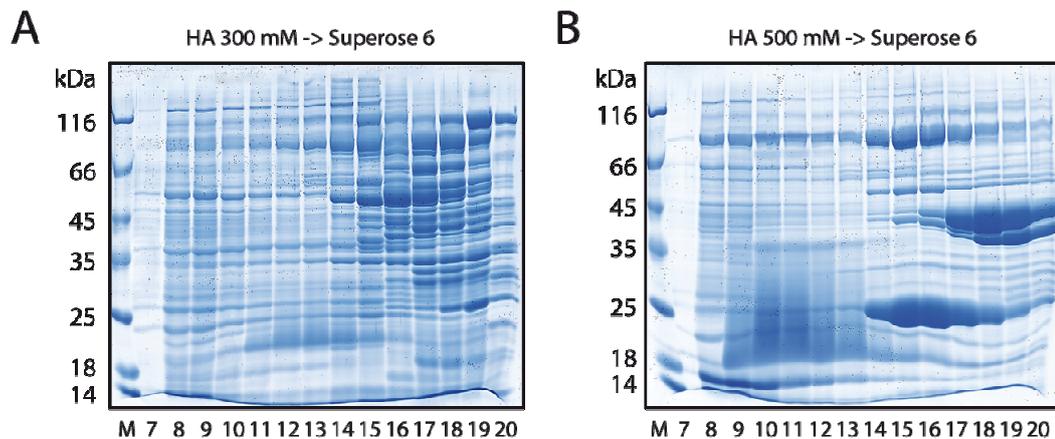


Abbildung 5-6: SDS-PAGE der 300 mM und 500 mM Hydroxyapatit-Fractionen nach weiterer Fraktionierung mittels Gelfiltration

Mit 300 und 500 mM Phosphatpuffer eluierte Hydroxyapatitfraktionen eines frisch hergestellten Zellextrakts wurden einer folgenden Gelfiltration auf einer Superose 6 Säule unterzogen und resultierende Fraktionen mittels SDS-PAGE untersucht. Obwohl die Gelfiltrationsprofile der bei 300 mM und 500 mM eluierten Hydroxyapatitfraktionen sehr ähnlich sind (siehe Abbildung 5-4), offenbaren die Gele deutliche Unterschiede in der Protein-Zusammensetzung beider Fraktionen (A: 300 mM, B: 500 mM). Gezeigt sind jeweils Fraktionen des makromolekularen Bereichs der Superose 6 Gelfiltration. Das entspricht etwa dem Elutionsvolumen zwischen 7 und 15 ml in Abbildung 5-5.

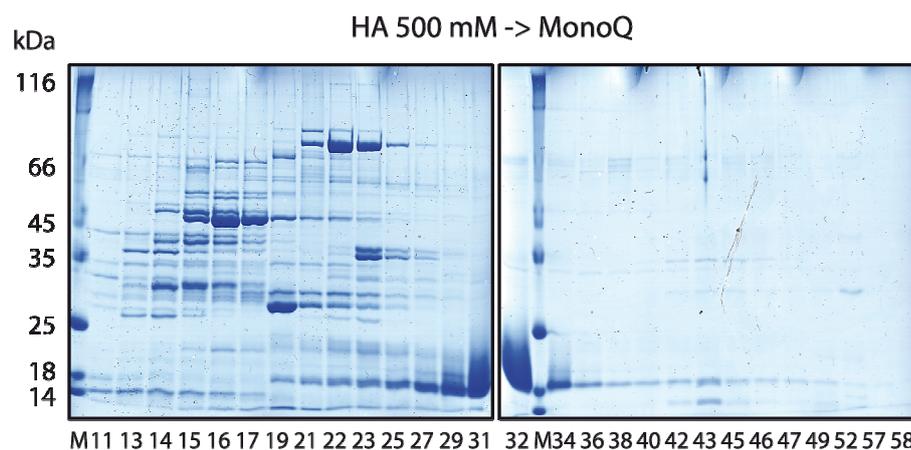


Abbildung 5-7: SDS-PAGE der MonoQ-Fraktionierung einer 500 mM Hydroxyapatitfraktion

Eine mit 500 mM Phosphatpuffer eluierte Hydroxyapatitfraktion eines frisch hergestellten Zellextrakts wurde auf einer MonoQ-Säule weiter fraktioniert und resultierende Fraktionen mittels SDS-PAGE untersucht. Die Komplexität der Einzelfractionen liegt im Durchschnitt zwischen 5 und 30 deutlich sichtbaren Proteinbanden.

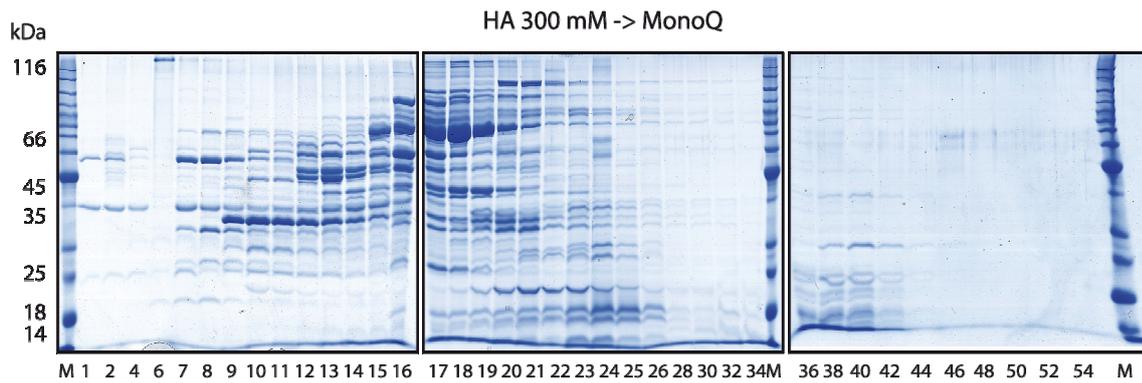


Abbildung 5-8: SDS-PAGE der MonoQ-Fraktionierung einer 300 mM Hydroxyapatitfraktion

Eine mit 300 mM Phosphatpuffer eluierte Hydroxyapatitfraktion eines frisch hergestellten Zellextrakts wurde auf einer MonoQ-Säule weiter fraktioniert und resultierende Fraktionen mittels SDS-PAGE untersucht. Die Komplexität der Einzelfractionen liegt im Durchschnitt zwischen 5 und 40 deutlich sichtbaren Proteinbanden.

In der Folge wurden die bei 300 mM und 500 mM Phosphat eluierten Hydroxyapatit-Fractionen auf einer MonoQ-Anionenaustauschermatrix weiter fraktioniert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE visualisiert und massenspektrometrisch identifiziert (siehe Abbildung 5-7 und Abbildung 5-8). Die Komplexität der Einzelfractionen bewegt sich im Durchschnitt zwischen 5 und 30 anfärbaren Proteinbanden. Die Fractionen mit nur wenigen Banden konnten teilweise direkt für die im folgenden Abschnitt 6 beschriebene Erstellung von elektronenmikroskopischen Präparaten mittels der Grid-Blotting-Methode verwendet werden.

Ausgewählte andere Fractionen wurden für einen weiteren Gelfiltrationsschritt auf eine Superose 6 Säule geladen, um die Proteinkomplexe von kleineren Proteinen und dissoziiertem Material zu trennen. Fractionen dieses dritten Trennschrittes wurden wiederum mittels SDS-PAGE und durch eine Nativgelelektrophorese analysiert. Banden, die in den hochmolekularen Fractionen sichtbar waren, wurden im Anschluss massenspektrometrisch identifiziert und Aliquots der entsprechenden Fractionen elektronenmikroskopisch begutachtet.

Für vier der so angereicherten Komplexe seien im Folgenden beispielhaft korrespondierende SDS-Gele gezeigt (siehe Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10). In MonoQ-Fraktion 19 wurde das gut charakterisierte 20S Proteasom (Ta1288 und Ta0612) und Ta0547, ein Protein bislang unbekannter Funktion gefunden, welches in Form von runden sphärischen Partikeln mit einem durchschnittlichen Radius von etwa 50 nm auftritt. Letzteres wurde in Folgestudien intensiv untersucht und charakterisiert [Nagy *et al.* in Vorbereitung]. In MonoQ-Fraktion 43

wurde eine exosomale Untereinheit (Ta1294) identifiziert, andere exosomale Untereinheiten wurden jedoch nicht gefunden. In MonoQ-Fraktion 14 wurde die Glucose-1-Dehydrogenase (Ta0191) entdeckt. Dieses Protein ist bislang in *T. acidophilum* noch nicht charakterisiert oder strukturell untersucht worden, und zum jetzigen Zeitpunkt sind auch keine gelösten Strukturen homologer Proteine bekannt. In weiteren Fraktionen wurden unter anderem auch ribosomale Partikel, das Thermosom (Ta0980 und Ta1276), VAT (Ta0840), Peroxi-redoxin-1 (Ta0152) und die Glutamat-Dehydrogenase (Ta0635) identifiziert. Ein weiterer Komplex wurde zwar elektronenmikroskopisch abgebildet, konnte jedoch bislang noch nicht eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 5-11E). Neben strukturell wohl charakterisierten Komplexen existiert für zwei der gefundenen Enzyme (Glucose-1-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase) noch keine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur (Abbildung 5-11A und H).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 5-11 zeigen, dass nahezu alle der genannten Komplexe in ausreichender Homogenität für eine elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse vorliegen. Angesichts der Tatsache, dass bislang nur exemplarisch Fraktionen des zweiten Anreicherungsschritts untersucht wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass durch eine umfassende Suche weitere, noch nicht strukturell charakterisierte Proteinkomplexe entdeckt und so weitere Lücken in der Referenzstrukturbibliothek der Proteinkomplexe aus *T. acidophilum* geschlossen werden können.

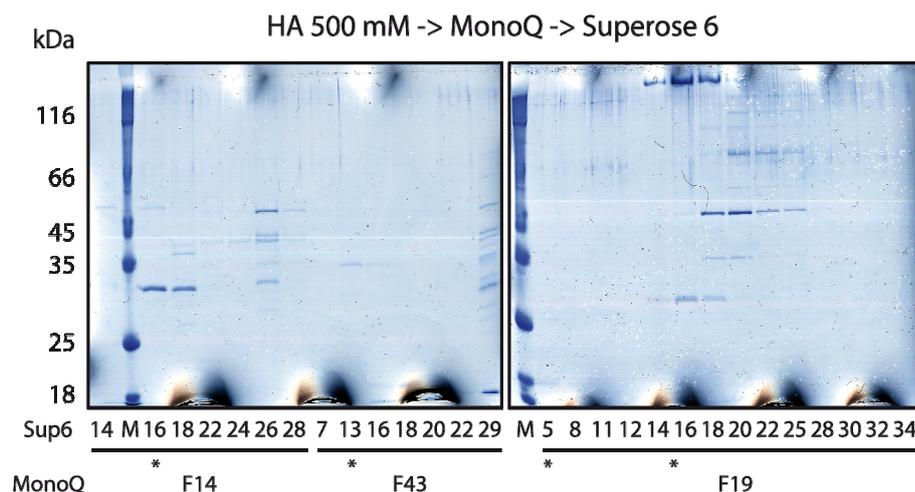


Abbildung 5-9: SDS-PAGE von ausgewählten MonoQ-Fractionen nach Gelfiltration über Superose 6

Eine ursprünglich mit 500 mM Phosphat eluierte Hydroxyapatitfraktion wurde auf einer MonoQ-Säule fraktioniert und ausgewählte Fraktionen davon in einem Folgeschritt für eine Gelfiltration verwendet. Für drei dieser so separierten MonoQ-Fractionen sind exemplarisch SDS-Gele gezeigt. Die mit (*) markierten Fraktionen wurden später elektronenmikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 5-11).

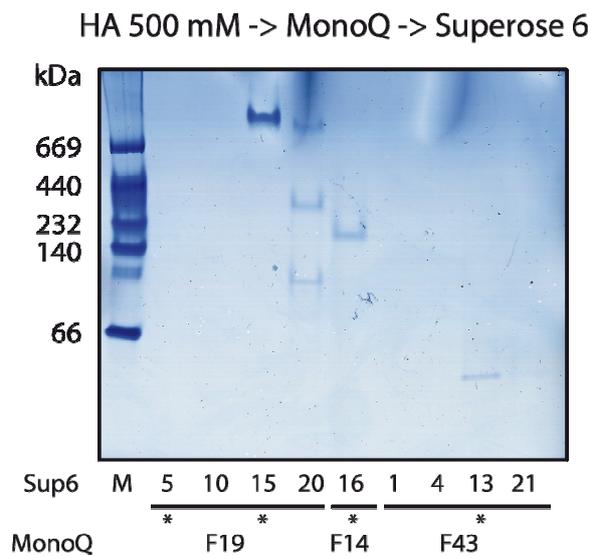


Abbildung 5-10: Native PAGE von ausgewählten MonoQ-Fractionen nach Gelfiltration über Superose 6

Exemplarisch sei hier ein natives Gradientengel (3-8 %) von ausgewählten Fractionen nach dem dritten Chromatographieschritt gezeigt. Höhermolekulare Fractionen, die eine signifikante Absorption bei 280 nm gezeigt haben, sind hier auf einem nativen Gradientengel gezeigt. Die mit (*) markierten Fractionen wurden später elektronenmikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 5-11).

5.3 Diskussion

Aus zytosolischem Zellextrakt ließen sich durch sequentielle Trennung über Hydroxyapatit, MonoQ und Superose 6 zahlreiche Proteinkomplexe anreichern. Deren finale Reinheit war im Regelfall für eine nachfolgende Einzelpartikelanalyse ausreichend. Neben bereits gut charakterisierten Komplexen wurden bei der exemplarischen Auswahl von insgesamt 7 von 2 x 50 Fractionen (~50 je Hydroxyapatitfraktion) auch Komplexe identifiziert, wie beispielsweise die Glucose-1-Dehydrogenase, von denen bislang noch keine hochaufgelöste Struktur bekannt ist und die deswegen als Ziel für eine zukünftige Strukturaufklärung ausgemacht wurden. Weitere Zielkomplexe dürften durch detaillierte Untersuchung aller Fractionen nach dem zweiten MonoQ-Trennschritt identifiziert werden. Weiterhin vorteilhaft ist bei dieser Methode, dass sie wegen ihrer hohen Repetitivität mit geringem Aufwand automatisiert werden kann.

Unbestritten ist die Tatsache, dass es einige Proteinkomplexe geben wird, die der hier beschriebenen Anreicherungsprozedur nicht standhalten und deswegen der Detektion entgehen. Solche Inkompatibilitäten können in unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial selbst oder den Pufferbedingungen während der Trennung begründet liegen. Bindet beispielsweise eine Proteinuntereinheit stärker an die Ionenaustauschermatrix als an ihren Komplexbindungspartner, führt das dazu, dass der Komplex nicht in

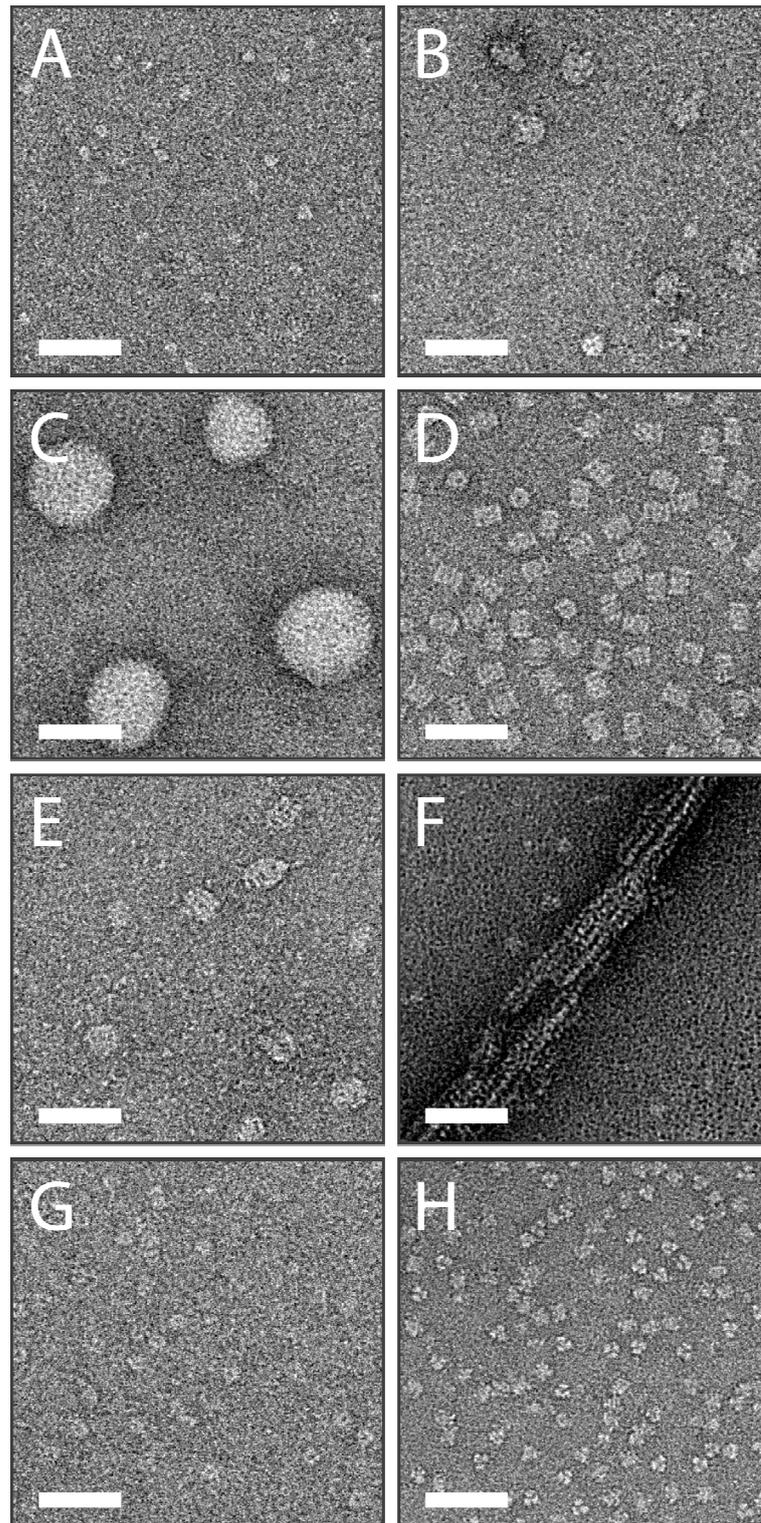


Abbildung 5-11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von angereicherten Proteinkomplexen

Nach dreistufiger Fraktionierung von zytosolischem Extrakt aus *T. acidophilum* über Hydroxyapatit, MonoQ und Superose 6 konnten in mehreren der ausgewählten Fraktionen nahezu homogen gereinigte Proteinkomplexe identifiziert und elektronenmikroskopisch abgebildet werden. Einige dieser Komplexe seien hier aufgelistet: Glucose-1-Dehydrogenase (A), Ribosomen (B), Ta0547 (C), 20S Proteasom (D), ein bislang noch nicht identifizierter Komplex (E), Peroxiredoxin-1 (F), vermutlich exosomale Partikel (G) und Glutamatdehydrogenase (H). Der weiße Balken entspricht 50 nm.

vollständig assoziiertem Zustand eluiert werden kann. Sind solche Inkompatibilitäten bekannt, können eventuell alternative Trennverfahren, wie hydrophobe Interaktionschromatographie, Affinitätschromatographie oder Phasenseparationen angewendet werden, um dennoch die Isolation eines bestimmten Zielkomplexes zu ermöglichen. Eine optimale Strategie für die Anreicherung aller Proteinkomplexe zu finden, wird nahezu unmöglich sein. Gleichwohl können auf Basis von Analysen der Proteinsequenz und Kenntnis über die exakte molekulare Funktionsweise einer Trennmatrix immer bessere Vorhersagen über die Trennleistung bestimmter Methoden getroffen werden [Asenjo and Andrews 2009].

Einen gänzlich anderen Ansatz zur Massenaufreinigung von Proteinkomplexen aus zytosolischen Extrakten bieten schließlich Verfahren, die auf immunspezifischer Bindung der Komplexe beruhen. Diese eignen sich außerdem besonders zur Aufreinigung von labilen Komplexen unter milden Bedingungen [Burgess and Thompson 2002; Subramanian 2002]. Die große, aber nicht unlösbare Herausforderung besteht jedoch darin, zuvor Antikörper, welche ausschließlich Epitope der intakten Proteinkomplexe binden, für möglichst alle der makromolekularen Komplexe zu produzieren. An eine Matrix immobilisiert, bieten diese Antikörper eine schonende Möglichkeit auch labile Komplexe schonend und mit hoher Spezifität direkt aus dem Zellysat anzureichern [Zickermann *et al.* 2010].

6. Direkter Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie (Grid-Blotting)

6.1 Theoretische Einführung

Die Auftrennung von Proteinen auf nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen mittels Gelelektrophorese und die anschließende massenspektrometrische Analyse der fokussierten Banden ist eine etablierte Standardmethode zur Identifizierung der Bestandteile von Proteinkomplexen [Mackun and Downard 2003]. Die dafür minimal nötige Menge an Protein ist sehr gering, im Regelfall liegt sie im Bereich von einigen hundert Nanogramm [Gaspari *et al.* 2007]. Die maximale Beladungsmenge eines Gels liegt bei einer typischen Dicke zwischen 0,75 und 1,5 mm und einer Taschenbreite von 3-4 mm um etwa einen Faktor 10 höher. Proteinmengen über 10 µg können nicht mehr scharf fokussiert werden.

Zwar ist die Gelelektrophorese in erster Linie eine analytische und keine präparative Methode, dennoch besitzt sie einige Vorteile, die sie als letzten Reinigungsschritt einer Proteinpräparation für die Elektronenmikroskopie interessant macht [Burgess 2009]. Der klassische Reinigungsschritt der Gelfiltration, um größere Proteine und Proteinkomplexe von dissoziiertem Material und niedermolekularen Verunreinigungen zu trennen, geht einher mit einer Verdünnung des Proteinmaterials. Oftmals müssen die Zielproteine anschließend wieder aufkonzentriert werden, was weiteren Materialverlust, beispielsweise auf einer Konzentrationsmembran, zur Folge hat. Zudem ist es sehr schwierig mit Proben volumina zu hantieren, die kleiner als 50 µl sind. Es muss also stets eine gewisse Mindestmenge an Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen. Im Vergleich dazu verrichtet ein Polyacrylamidgel effektiv eine ähnliche Trennung wie eine Gelfiltrationssäule, mit dem Unterschied, dass die Proteine dabei in Proteinbanden fokussiert und somit sogar aufkonzentriert werden. Die Trennung hängt bei der Gelelektrophorese durch die forcierte Bewegung im elektrischen Feld stärker von der Oberflächenladung als vom Formfaktor der Proteine ab. Das eingesetzte Volumen liegt bei wenigen Mikrolitern, so dass selbst kleinste Mengen von angereichertem Protein bearbeitet werden können.

Es stellt sich abschließend die Frage, welche Proteinmenge eigentlich tatsächlich für die Einzelpartikelanalyse benötigt wird und in welcher Relation dies zu der Beladungsmenge eines gewöhnlichen Trenngels steht. Dazu sei anhand des 20S Proteasoms aus *T. acidophilum* eine Beispielrechnung aufgestellt. Die Fläche eines Trägernetzchens für die Elektronenmikroskopie mit einem Standarddurchmesser von 3 mm beträgt 8 mm^2 . Optimale Probenpräparationen erreichen eine lokale Belegungsdichte durch Partikel von etwa 30 %. Höhere Belegungsdichten sind für die nachfolgende digitale Bildverarbeitung ungünstig, da die Partikel dann eine höhere Tendenz zur Überlappung haben und nicht mehr einer idealen Einzelansicht entsprechen. Unter der Annahme einer homogenen Partikelverteilung über das ganze Trägernetzchen reduziert sich somit die mit Protein zu belegende Gesamtfläche auf etwa $2,4 \text{ mm}^2$. Das 20S Proteasom kann in seiner Seitansicht als annähernd rechteckig betrachtet werden und hat eine Größe von $15 \times 11 \text{ nm}$. In Gitteranordnung sind rund 15 Milliarden Einzelproteine erforderlich um die genannte Fläche zu bedecken. Bei einem Molekulargewicht von 680 kDa entspricht dies einer Gesamtmenge von etwa 5 ng Protein. Diese Proteinmenge ist nahe dem unteren Limit, welche in einem Gel durch optimierte Färbeprotokolle mit Coomassie G250 gerade noch detektiert werden kann und entspricht etwa der unteren Grenze an Protein, mit der in der Nativgelelektrophorese gearbeitet wird [Candiano, Bruschi *et al.* 2004; Westermeier 2006].

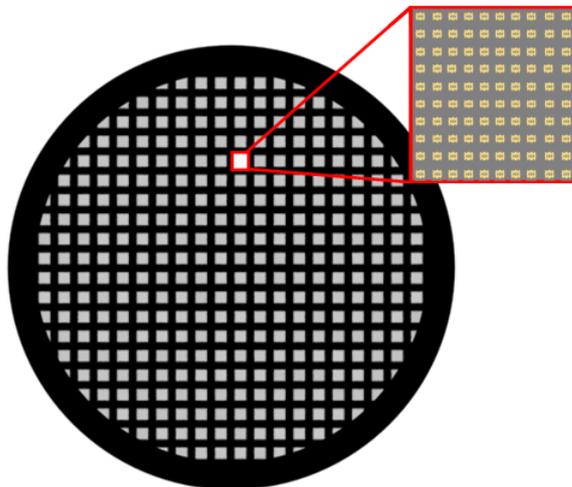


Abbildung 6-1: Verdeutlichung der Mengenverhältnisse einer Einzelpartikelanalyse

Ein Standardnetzchen für die Elektronenmikroskopie hat einen Durchmesser von etwa 3 mm. Wenn der Einfachheit halber angenommen wird, dass Proteine sich in einem regelmäßigen Gitter, mit einem Leerraum entsprechend eines Einzelproteins, auf der verfügbaren Oberfläche anordnen – die Belegungsdichte beträgt dann 25 % – befinden sich schon in einer einzelnen Masche von $95 \times 95 \mu\text{m}$ eines Netzchens (Meshgröße: 200/Zoll) mehr als 20 Millionen Einzelproteine. Gewöhnlich sind für eine hochauflösende Einzelpartikelanalyse nur wenige Hunderttausend vonnöten.

Für eine hochauflösende Strukturbestimmung werden allerdings nur einige hunderttausend Partikel benötigt. Schon eine Fläche von $14 \times 14 \mu\text{m}$, bei einer Maschendichte von 200 je Zoll ein Bruchteil einer einzelnen Masche eines Trägernetzchens, enthält bei 30 % Belegungs-dichte rund 500000 einzelne 20S Proteasomen. Bei einer Pixelgröße von 2.35 \AA (etwa 50000-fache effektive Vergrößerung) und Verwendung einer $2k \times 2k$ Pixel CCD-Kamera wären somit nur rund 1000 elektronenmikroskopische Aufnahmen für die Aufnahme eines kompletten Datensatzes vonnöten. Mit einem automatisierbaren Transmissionselektronenmikroskop und einer entsprechenden Akquisitionsroutine kann diese Menge an Aufnahmen bereits in weniger als zwei Tagen erstellt werden [Nickell, Beck *et al.* 2007].

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Protokoll der Grid-Blotting-Methode

Der erfolgreiche Transfer von nativen Proteinkomplexen aus Polyacrylamidgelen auf Trägernetzchen für die Einzelpartikelelektronenmikroskopie (Grid-Blotting) konnte an mehreren Beispielen demonstriert werden. Es konnte weiterhin ein robustes Standardprotokoll erstellt werden, welches bei Verwendung von standardisierten äußeren Bedingungen, allerdings unter Vernachlässigung proteinspezifischer Parameter, im Regelfall zu recht guten Ergebnissen führt [Knispel *et al.* in Vorbereitung]. Dieses Protokoll wurde in den Methodenteil dieser Arbeit aufgenommen. (siehe Abschnitt 4.6.4) Es sollen jedoch im Folgenden für den Transferprozess wesentliche Parameter näher beleuchtet werden. Etwaige Abweichungen vom Standardprotokoll werden dabei explizit aufgeführt.

In Kürze wiedergegeben, werden Proteine durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese auf einem Polyacrylamidgel entsprechend ihres apparenten Molekulargewichts aufgetrennt und in Proteinbanden fokussiert. An Stellen, wo die Proteine lokalisiert sind, wird die Oberfläche des Gels mit einer spitzen Pinzette angeraut, um die verfügbare Kontaktfläche für den Transfer zu vergrößern. Anschließend werden mit dünnem kontinuierlichem Kohlefilm belegte Trägernetzchen mit der Filmseite auf die angerauten Gelflächen gelegt. Schließlich werden $4 \mu\text{l}$ des Elektrophoresepuffers (oder eines anderen geeigneten Puffers) auf die Trägernetzchen pipettiert, so dass frei bewegliche Proteine aus der Gelmatrix zum Kohlefilm

diffundieren und dort adhären können. Nach einer Inkubationszeit von etwa zwei Minuten werden die Trägernetzchen entfernt und gemäß Standardprotokollen für die Herstellung von elektronenmikroskopischen Präparaten weiter behandelt (siehe Abbildung 6-2).

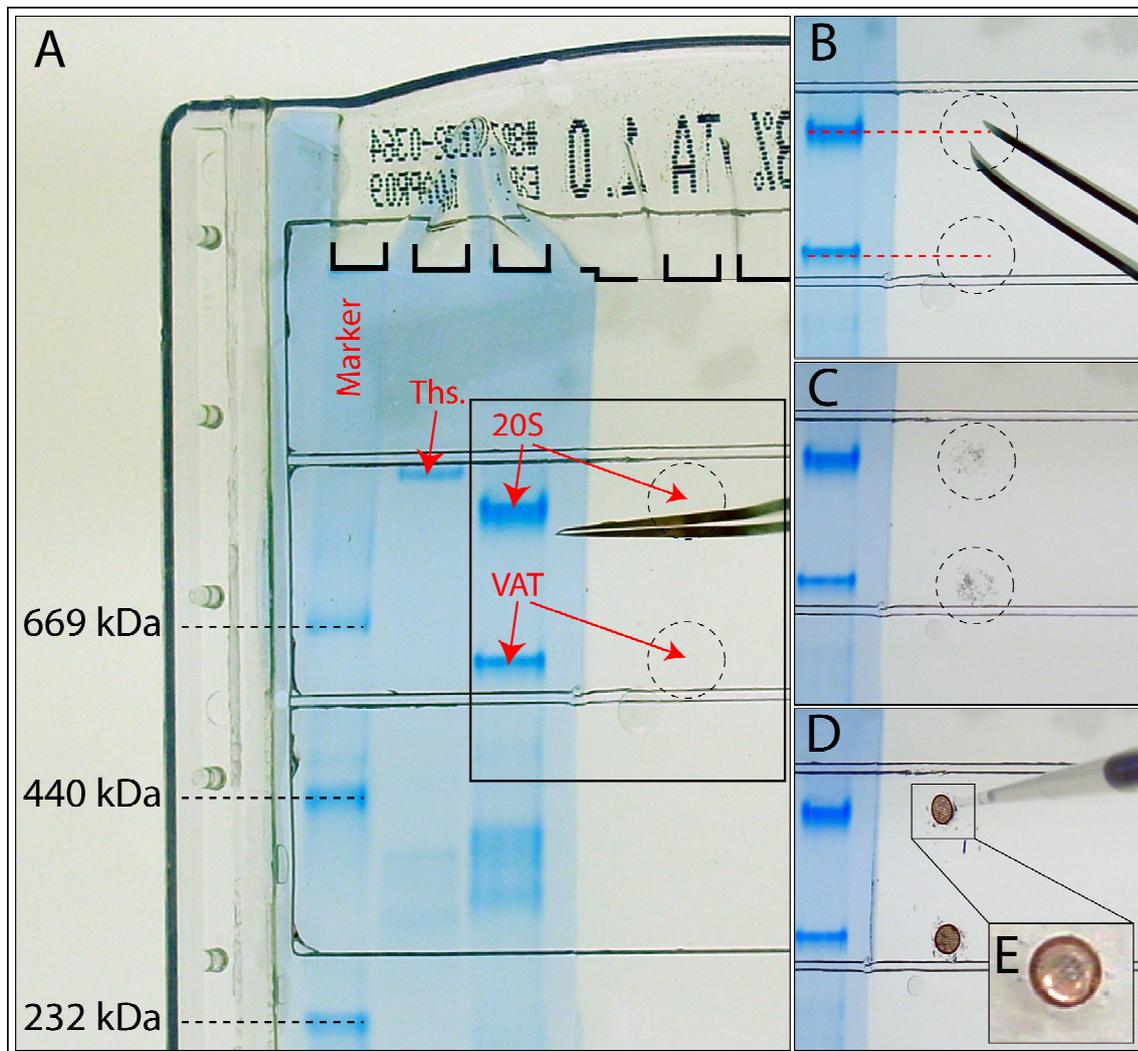


Abbildung 6-2: Arbeitsschritte für die Extraktion von Proteinen aus nativen Gelen auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie

Auf dem Polyacrylamidgel (A) wurden neben einem Molekulargewichtsmarker Proteinfractionen aus Experimenten der Proteinkomplexanreicherung (siehe Abschnitt 5) mehrfach geladen. Exemplarisch sei das weitere Vorgehen für eine Fraktion, die neben dem 20S Proteasom und VAT noch weitere niedermolekulare Proteine enthält, beschrieben. Das Gel wird zerteilt und die Referenzspuren mit Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt, während die nicht zu färbenden Probenspuren in feuchter Atmosphäre bei 4°C aufbewahrt werden. Legt man nach der Färbung beide Teile nebeneinander, kann die Position der unbehandelten Proteine im Gel extrapoliert werden. An diesen Stellen wird das Gel mit einer scharfen Pinzette leicht angeraut (B und C). Danach werden mit Kohle befilmte Trägernetzchen auf diese Stellen gelegt und mit wenigen Mikrolitern geeignetem Puffer benetzt (D). Nach einer Inkubationszeit von etwa 2 min werden die Netzchen entfernt und nach Standardprotokollen zur Negativkontrastierung oder Einbettung in vitrifiziertes Eis behandelt.

Der gesamte Transferprozess besteht im Wesentlichen aus zwei aufeinanderfolgenden Ereignissen. Zunächst müssen die Proteine die Gelmatrix verlassen und in räumliche Nähe der mit Kohle befilmten Trägernetzchen gelangen. Dies geschieht durch Diffusion. In erster Näherung lässt sich die Gelmatrix als eine sehr viskose Proteinlösung beschreiben. Vernachlässigt man Quelleffekte des Gels durch den zusätzlichem Flüssigkeitseintrag, entsteht durch Benetzen der oberen Seite der Trägernetzchen mit einem kleinen Volumen Pufferlösung ein Proteinkonzentrationsgradient, entlang dessen frei motile Proteine in Richtung des aufliegenden Kohlefilms diffundieren werden. Dies ist ein passiver Vorgang, dessen Geschwindigkeit umso höher ausfällt, je höher auch die Ausgangskonzentration der freien Proteine ist. Die Menge frei beweglicher Proteine hängt hauptsächlich von der Wahl des zur Proteintrennung verwendeten Gels und der Dauer der Elektrophorese ab. Gele besitzen eine schwammähnliche Struktur, deren Porengröße mit zunehmender Quervernetzung und steigender Polyacrylamidkonzentration abnimmt [Kremer *et al.* 1994]. In den für diese Versuche verwendeten Gradientengelen nimmt die Polyacrylamidkonzentration von Beginn bis Ende des Gels kontinuierlich von 3 % auf 8 % zu. Nach einer gewissen Elektrophoresezeit werden sich alle Proteine, sofern sie das Gel nicht völlig durchqueren, in ihrer Gleichgewichtsposition befinden, weil sie durch ihre Größe an der weiteren Migration gehindert werden. Die Proteine sind dann in einem kleinen Volumen, bis zu zwanzigfach höher als im Auftragsvolumen, konzentriert und es besteht somit die Möglichkeit der partiell irreversiblen Proteinaggregation bedingt durch die hohe lokale Konzentrierung. Diese aggregierten Proteine sind strukturell nicht mehr intakt und für eine Einzelpartikelanalyse unbrauchbar. Es kann allerdings nicht ohne weiteres festgestellt werden, wie groß der Anteil der aggregierten Proteine tatsächlich ist. Um den Anteil gering zu halten, wurde eine Elektrophoresedauer von 2-4 Stunden nicht überschritten. Das Elektrophoresegleichgewicht stellt sich nach etwa 10-12 Stunden ein.

Der zweite, die Transfereffizienz bestimmende Teilprozess ist die Adhäsion der Proteine an den Kohlefilm. Die Wechselwirkungen zwischen Protein und Film hängen stark von deren Oberflächeneigenschaften ab, welche wiederum maßgeblich durch Parameter wie der Belichtungszeit des Films, der Kontaktzeit zwischen Netzchen und Gel oder dem pH-Wert des Elektrophoresepuffers bestimmt werden. Jedoch nicht nur Protein, auch durch das Aufrauen abgelöstes Gelmaterial adhärirt potentiell an den Film. Es hat sich gezeigt, dass für die Erstellung adäquater Präparate die Trägernetzchen direkt nach dem Blotvorgang mit frischem geeignetem Puffer gewaschen werden sollten, um den diffusen Hintergrund deutlich zu reduzieren (siehe Abbildung 6-3).

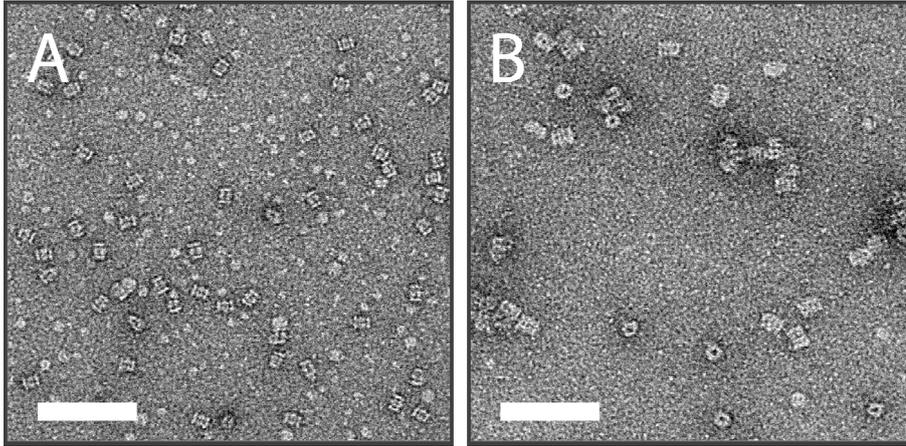


Abbildung 6-3: Reduktion des Hintergrunds durch einen zusätzlichen Waschschrift nach dem Grid-Blotting

Direkt vom Gel aufgenommene und mit 2% Uranylacetat behandelte Netzchen weisen oftmals einen undefinierten Hintergrund auf (links), der durch einmaliges Waschen mit frischem Puffer vor der Negativkontrastierung deutlich reduziert werden kann (rechts). Der weiße Balken entspricht 60nm.

6.2.2 Einfluss der Beglimmzeit

Kohlefilm ist von Natur aus hydrophob und lässt sich nur schlecht mit wässrigen Lösungen benetzen. Zur Präparation von elektronenmikroskopischen Proben wird der Film deshalb oft vor Auftragen der Probe in einem kalten Plasma ionisiert. Je nach Positionierung der Trägernetzchen zwischen Anode und Kathode in der Plasmaionisationskammer lässt sich die Kohlefilmoberfläche bevorzugt positiv oder negativ aufladen, was in beiden Fällen zu einer Hydrophilisierung des Films führt [Namork and Johansen 1982]. Mit zunehmender Verweildauer des Films in der Plasmaionisationskammer erhöht sich die Zahl der aufgebracht Ladungen und erleichtert so die vollständige Benetzung der Kohlefilmoberfläche.

Um die optimalen Bedingungen für das Grid-Blotting zu bestimmen, wurde die Ionisationszeit von 0 bis 120 s variiert. Die aufs Gel aufgetragene Menge an 20S Proteasom aus *T. acidophilum* betrug 5 µg. Charakteristisch war ein Wechsel der bevorzugten Orientierung der 20S Proteasomen zwischen nicht ionisierten und ionisierten Netzchen. Ohne Ionisation lagen nahezu alle Partikel auf der Seite, während sie sich bei zunehmender Ionisationsdauer bevorzugt senkrecht aufstellten. Die Änderung der Orientierung bei 60 s Ionisationszeit war nahezu quantitativ, bei kürzerer Dauer konnten Mischpopulationen erhalten werden (vgl. Abbildung 6-5 bei 5 s Ionisationszeit). In der Summe wurde jedoch kein signifikanter Einfluss der Beglimmzeit auf die Transfereffizienz beobachtet.

Dennoch ist die Ionisationsdauer durchaus von praktischer Relevanz. Sie spielt eine Rolle für das Verhalten des Puffertropfens, der für den Transfervorgang auf die Netzchen pipettiert wird. Da durch das beschriebene Protokoll nur kleine Mengen Protein aus dem Gel extrahiert werden können, werden nur 3-5 μl Flüssigkeit verwendet, um nicht eine unnötige Verdünnung zu verursachen. Diese Menge ist mindestens erforderlich, um zu verhindern, dass nach 2 min Inkubationszeit auf dem Gel sämtliche Flüssigkeit durch osmotische Effekte vom Gel aufgesogen wurde. Trägt man diese Menge Flüssigkeit auf ein stark hydrophilisiertes Netzchen auf, wird deren Oberflächenspannung soweit abgesenkt, dass sich der Tropfen spontan über das Gel verteilt. Bei wenig hydrophilisierten Netzchen kann sich der Tropfen auf der Rückseite des Grids halten, und der in der Regel immer einige Risse aufweisende Kohlefilm wirkt wie eine Membran, die die Dissipation der Flüssigkeit in das Gel bremst. Aus diesem Grund wurde in der Folge eine Ionisationszeit zwischen 5 und 8 s gewählt. Diese Ionisationszeit wurde schließlich auch für die Präparation von vitrifizierten Proben beibehalten, da der gebildete Eisfilm unter diesen Bedingungen glatter und homogener erschien, als bei nicht hydrophilisierten Netzchen.

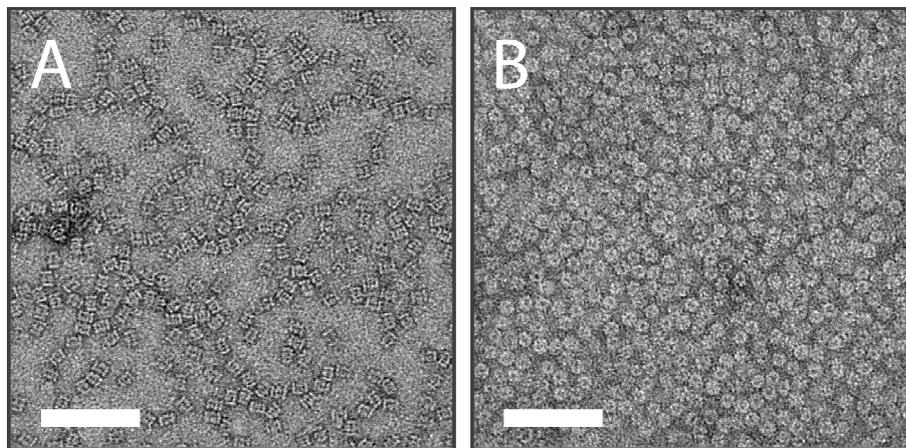


Abbildung 6-4: Einfluss der Beglimmzeit auf die Transfereffizienz

Bei Änderungen der Beglimmzeit zum Hydrophilisieren des Kohlefilms sind kaum Unterschiede in der Transfereffizienz auszumachen. Am Beispiel des 20S Proteasoms aus *T. acidophilum* lässt sich jedoch beobachten, dass die vorherrschende Orientierung auf dem Film von nahezu 100 % Seitansicht bei 0 s Beglimmzeit (links) auf fast 100 % Draufsicht bei 60 s Beglimmzeit wechselt (rechts). Der weiße Balken entspricht 60 nm.

6.2.3 Einfluss der Temperatur

Für viele physikalische und chemische Prozesse spielt die Temperatur eine wichtige Rolle. Für optimale Ergebnisse ist es beim Arbeiten mit einigen Proteinen nötig, die Temperatur

während der gesamten Versuchszeit bei 4 °C zu halten. Speziell bei weniger stabilen Proteinkomplexen, wie beispielsweise dem 26S Proteasom aus *Drosophila melanogaster*, ist nach einstündiger Lagerung bei Raumtemperatur eine deutliche Abnahme vollständig assemblierter, intakter Partikel zu beobachten. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwiefern die Temperatur die Anwendung der Grid-Blotting-Methode beeinflusst. Dazu wurden unter ansonsten gleichen Bedingungen wie in Abbildung 6-3 (rechts) Präparate bei 4 °C hergestellt. Die Anzahl der Partikel je Aufnahme war vergleichbar mit den unter Raumtemperatur angefertigten Präparaten. Subjektiv waren die Partikelzahlen zwar insgesamt etwas niedriger, doch beim Vergleich verschiedener Positionen auf den Trägernetzchen liegt die Abweichung innerhalb der natürlichen Streuung und ist damit nicht signifikant.

Tatsächlich ist die Temperatur eine physikalische Größe, die den Diffusionskoeffizienten von Molekülen direkt beeinflusst. Im einfachsten Fall, also für kleine Elektrolyte in großer Verdünnung, ist der Diffusionskoeffizient linear abhängig von der absoluten Temperatur [Castillo and Garza 1993]. Für die Diffusion von biologischen Makromolekülen hingegen spielt zunehmend auch die Viskosität der Diffusionsumgebung eine Rolle. Diese lässt sich im Temperaturbereich zwischen 0 und 100°C hinreichend durch die Andrade-Beziehung beschreiben, wonach der Kehrwert der Temperatur dem Logarithmus der Viskosität direkt proportional ist [Andrade 1934]. Nach dieser führt ein Absenken der Temperatur von 25°C auf 4°C zu einer Absenkung des Diffusionskoeffizienten von maximal 5%, was als sehr gering betrachtet werden kann.

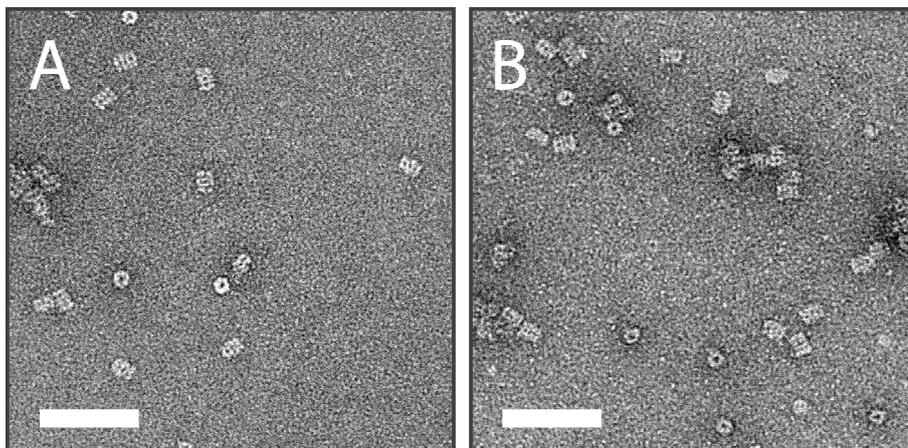


Abbildung 6-5: Grid-Blotting von 20S Proteasomen bei 4°C

Bei Verringerung der Umgebungstemperatur auf 4°C verringert sich die Partikeldichte gegenüber Raumtemperaturproben (vgl. Abbildung 6-3 rechts) zwar leicht, aber im Rahmen der Streuung der Partikeldichten in den durchgeführten Experimenten nicht signifikant. Der weiße Balken entspricht 60 nm.

6.2.4 Einfluss des pH-Wertes

Die klassische nicht-denaturierende Gelelektrophorese wird oft in einem Tris und Glycin enthaltenden Elektrophoresepuffer durchgeführt [Laemmli 1970]. Diese Lösung hat einen pH-Wert zwischen 9 und 9,5. Der recht hohe pH-Wert sorgt dafür, dass die meisten an der Proteinoberfläche befindlichen Aminosäurereste deprotoniert werden und damit eine negative Ladung tragen. Eine definierte und uniforme Oberflächenladung der Proteine ist allein schon deshalb gewünscht, weil die Proteinmigration durch ein elektrisches Feld induziert wird, und damit sichergestellt wird, dass sich nahezu alle Proteine in die selbe Richtung, von Anode zu Kathode, bewegen. Bei diesem pH basiert die elektrophoretische Trennung dann vorrangig auf Größe und Form der Proteine, nicht jedoch auf deren Aminosäurekomposition.

Führt man die Gelelektrophorese bei diesen Bedingungen aus und wendet anschließend die beschriebene Grid-Blotting-Methode zur Extraktion von Proteinen an, so sind im Anschluss auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur sehr wenige Partikel sichtbar. Dieses Phänomen konnte leider nicht im Detail aufgeklärt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die durch das Hydrophilisieren der Trägernetzchen entstandene negative Oberflächenladung die ebenfalls negativ geladenen Proteine aus dem Gel so stark abstößt, dass die Anheftung von Proteinen an den Kohlefilm stark behindert ist. Eine Ladungsumkehr durch Behandeln des frisch hydrophilisierten Kohlefilms mit einer Magnesiumacetatlösung (0,5 M) brachte jedoch keine besseren Resultate [Portmann and Koller 1976]. Auch die Verwendung eines neutralen Tris-Puffers (25 mM) als Transferpuffer blieb erfolglos. Weiterhin mussten, im Unterschied zu anderen Experimenten, für die Realisierung längerer Blotzeiten Goldnetzchen benutzt werden, da die basische Umgebung in der Lage ist, Kupfer aufzulösen.

In Folge dieser Ergebnisse wurde der pH-Wert des Elektrophoresepuffers gesenkt, um die stark negative Oberflächenladung der Proteine abzuschwächen. Eine Lösung mit 43 mM Imidazol und 35 mM HEPES hat einen pH-Wert von 7,4 und ist ein für die Elektrophorese geeignetes Puffersystem [McLellan 1982]. Dieser pH-Wert wird außerdem allgemein häufig für Proteinaufreinigungen verwendet, stellt also entsprechend milde Bedingungen dar, welche besser für die strukturelle Erhaltung von Proteinkomplexen geeignet sind. Bei diesem pH-Wert muss aber zwingend beachtet werden, dass sich das Trennverhalten der Proteine auf dem Gel drastisch verändert. Da der durchschnittliche isoelektrische Punkt aller in *T. acidophilum* vorkommenden Proteine bei 7,25 liegt, ist die Trennung nun wesent-

lich stärker durch den individuellen pI bestimmt, der annähernd die effektive Oberflächenladung von Proteinen beschreibt. Der isoelektrische Punkt gibt wieder, bei welchem pH-Wert der Umgebung die Nettoladung eines Proteins neutral ist. Da aber nicht alle Bereiche im Inneren des Proteins für die wässrige Umgebung zugänglich sind und somit dort befindliche Aminosäuren nicht deprotoniert werden, weichen zwar der isoelektrische Punkt, bestimmt über die Aminosäuresequenz, und der pH bei dem die Oberflächenladung tatsächlich elektrisch neutral ist, leicht voneinander ab. Dennoch ist der isoelektrische Punkt eines Proteins eine probate Schätzung bei welchem pH-Wert die Proteinoberfläche elektrisch neutral ist. Liegt der pH-Wert der Umgebung gar unter dem isoelektrischen Punkt, kommt es an der Proteinoberfläche zur Ladungsumkehr und das Protein wechselt seine Migrationsrichtung in der Elektrophorese.

Eine Illustration der Migrationsgeschwindigkeiten von verschiedenen Markerproteinen bei pH-Werten von 9,5 bzw. 7,4 liefert Abbildung 6-6. Es ist deutlich sichtbar, dass die geringere Nettoladung der Proteine bei einem fast neutralen pH-Wert dazu führt, dass die Bewegungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld erheblich abnimmt.

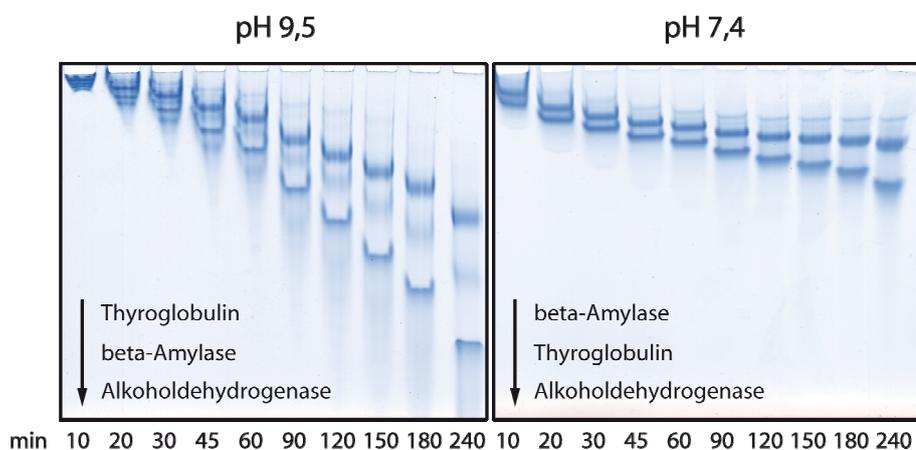


Abbildung 6-6: Migrationsverhalten von Markerproteinen während der Gelelektrophorese bei unterschiedlichen pH-Werten

Eine Mischung aus Thyroglobulin (669 kDa), β -Amylase (200 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa) wurde während ihrer Migration in Nativgelen verfolgt. Die Elektrophorese erfolgte für 4 h bei 4 °C und konstanter Spannung von 140 V, unterschiedlich war nur die Verwendung eines Tris-Glycin-Puffers mit einem pH-Wert von 9,5 (links) gegenüber einem Imidazol-HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 (rechts). Gleiche Aliquots des Proteingemisches wurden einzeln nach definierten Zeitintervallen auf beide Gele geladen, die Elektrophorese wurde dafür für wenige Sekunden unterbrochen. Die zuerst geladene Probe erfuhr also mit 4 h die längste Trennzeit. Zwei Eigenschaften werden deutlich sichtbar. Zum einen ist die absolute Migrationsgeschwindigkeit der drei Proteine durch die verringerte Nettooberflächenladung bei einem pH-Wert von 7,4 deutlich vermindert. Zum anderen ändert sich die Reihenfolge der Markerproteine, das schwerere Thyroglobulin migriert durch einen niedrigeren pI nun schneller als die β -Amylase.

Die Absenkung des pH-Werts bei der Elektrophorese führte zu einer etwa fünffach höheren Transfereffizienz. So konnten schließlich hinreichend dicht belegte Präparate aus Proteinbanden mit nur 400-500 ng Protein gewonnen werden, verglichen mit initial verwendeten Proteinmengen von mindestens 10 µg je Proteinbande (vgl. dazu Abbildung 6-4 erhalten von einer Proteinbande mit 15 µg gegenüber Abbildung 6-7 B von einer Proteinbande mit 2 µg).

6.2.5 Einfluss der Blotzeit

Es ist leicht einzusehen, dass die Transfereffizienz bei längeren Verweilzeiten der Trägernetzchen auf dem Polyacrylamidgel steigt. Standardprotokolle zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Präparate erfordern *per se* eine Verweilzeit der biologischen Probe auf den Netzchen von mindestens 30 s. Das soll gewährleisten, dass die Proteinkomplexe genügend Zeit erhalten sich aus der Probenflüssigkeit auf dem Kohlefilm abzusetzen und stabil zu adhären, damit nach dem anschließenden Abziehen überschüssiger Flüssigkeit mit Filterpapier dennoch genügend biologisches Material auf den Präparaten verbleibt.

Es konnte gezeigt werden, dass für Proteinbanden, die weniger als 1 µg Protein enthalten, Blotzeiten unter 20 s in der Regel zu kurz sind. Die erreichten Partikeldichten auf den Trägernetzchen waren in diesem Fall sehr gering und für eine Einzelpartikelanalyse nicht praktikabel. Zu lange Verweilzeiten hingegen, vor allem länger als 5 Minuten, lieferten zwar zufriedenstellende Partikeldichten, wiesen jedoch eine deutlich reduzierte Fläche an intaktem Kohlefilm auf. Schon durch den direkten Kontakt mit der Gelmatrix wird der Kohlefilm mechanisch recht stark beansprucht. Hinzu kommt, dass sich die Gelmatrix mit zunehmender Blotzeit zusammenzieht, weil Feuchtigkeit verdunstet. Der aufliegende Kohlefilm ist nicht elastisch, so dass er durch die Scherkräfte teilweise vom Netzchen abgelöst wird oder aufreißt. Ein guter Kompromiss zwischen möglichst intaktem Kohlefilm und einer guten Belegungsichte wurde mit Blotzeiten von etwa 2 min erreicht.

6.2.6 Herstellung von negativkontrastierten Präparaten unter optimierten Bedingungen

Unter Berücksichtigung der in den Abschnitten 6.2.1 bis 6.2.5 gewonnenen Erkenntnisse wurde die Grid-Blotting-Methode im Folgenden für einige endogene Proteinkomplexe aus *T. acidophilum* angewendet. Diese wurden vorab nicht homogen gereinigt, sondern wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben aus zytosolischem Extrakt angereichert. Das in Abbildung 6-2

gezeigte Nativgel wurde mit zwei Fraktionen nach der Anionenaustauscherchromatographie auf einer MonoQ-Matrix so beladen, dass die finale Proteinmenge in den interessierenden Banden zwischen 1 und 2 μg lag. Eine der Fraktionen enthält als Hauptbestandteile 20S Proteasomen und VAT, die andere Thermosomen. Wie deutlich zu sehen, enthalten beide Fraktionen neben den genannten Proteinkomplexen noch Verunreinigungen mit Proteinen kleinerer Molekulargewichte. Die Elektrophorese erfolgte für 3 h bei 4 °C und konstanter Spannung von 140 V. VAT (500 kDa) und 20S Proteasom (680 kDa) konnten klar voneinander getrennt werden, ebenso ist die Abtrennung der kleineren Proteine deutlich erkennbar.

Von diesen drei Proteinbanden wurden negativkontrastierte Präparate für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Die Trägernetzchen wurden dazu für 6 s in einer Plasmaionisationskammer hydrophilisiert, nach Aufrauen des Gels mit 3 μl Elektrophoresepuffer für 2 min auf dem Gel inkubiert und schließlich mit 2 % Uranylacetat kontrastiert.

Für jeden der Komplexe wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen mit einem Philips CM20 FEG TEM bei 160 keV Beschleunigungsspannung, ausgerüstet mit einer 4096x4096 Pixel CCD-Kamera, gemacht. Die Pixelgröße auf Objektebene betrug 0,216 nm, der Defokus lag bei etwa -2 μm . Zusammenfassend sind in Tabelle 6-1 die Anzahl der Aufnahmen, die resultierende Partikelzahl, sowie die mittlere Anzahl an Partikeln je Aufnahme und deren Standardabweichung für die drei Proteinkomplexe aufgelistet. Einzelansichten der Partikel wurden manuell gepickt (tom_av2_particlepickergui), iterativ aligniert (tom_av2_alignment) und klassifiziert (tom_pcagui). Von anfänglich mehr als 10000 Partikeln je Komplex verblieben nach der Klassifikation noch zwischen 7000 und 8000, die nach erneuter Alignierung gemittelt wurden.

Die Mittelungen von Thermosom und 20S Proteasom (siehe Abbildung 6-7A und B) zeigen, verglichen mit deren verfügbaren hochaufgelösten Strukturen, alle charakteristischen Strukturmerkmale [Lowe *et al.* 1995; Ditzel *et al.* 1998; Gutsche *et al.* 2000]. Lediglich der äußere spiralförmige Ring der N-Domäne konnte, verglichen mit der von Rockel *et al.* publizierten EM-Struktur in dem prozessierten VAT-Mittel nicht aufgelöst werden (siehe Abbildung 6-7C) [Rockel *et al.* 2002]. Bei der verhältnismäßig hohen Defokuseinstellung war dies aber auch nicht unbedingt zu erwarten.

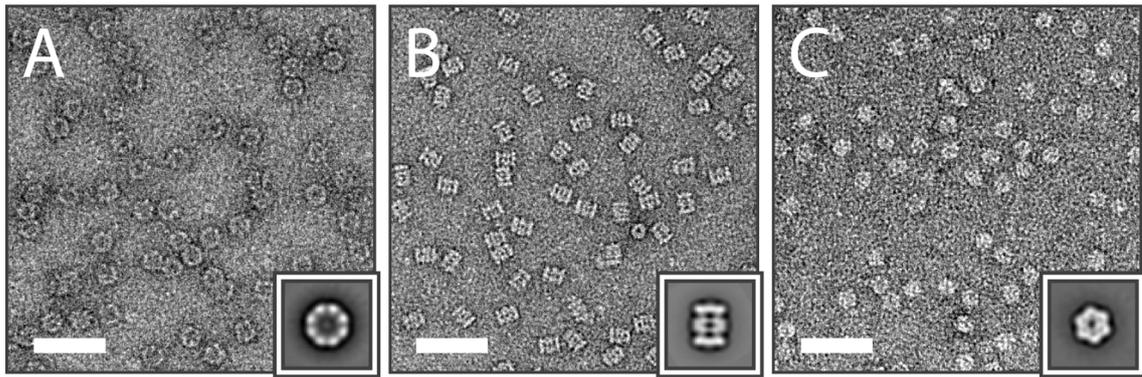


Abbildung 6-7: Elektronenmikroskopische Abbildungen von mit Hilfe der Grid-Blotting-Methode hergestellten negativkontrastierten Präparaten

Thermosom (A), 20S Proteasom (B) und VAT (C) aus *T. acidophilum* wurden aus nativen Polyacrylamidgelen direkt auf kohlebefilmte Trägernetzchen geblottet und mit 2 % Uranylacetat kontrastiert. Die gemittelten Strukturen wurden nach Alignment und Klassifikation aus je etwa 8000 Einzelpartikeln berechnet und zeigen die charakteristischen Strukturmerkmale der Komplexe. Der Defokus der Aufnahmen liegt zwischen -2 und -2,4 μm und der weiße Balken entspricht 40nm.

Im Mittel betrug die Belegungsdichte der Kohlefilmoberfläche zwischen 20 und 30 Prozent. Durch die hohe Streuung der Partikelzahlen von Aufnahme zu Aufnahme, die für elektronenmikroskopische Proben durchaus üblich ist, lässt sich die Transfereffizienz nur ungefähr abschätzen. Für die oben gezeigten Präparate liegt sie zwischen 0,05 und 0,5 Prozent bezogen auf die Gesamtproteinmenge in der fokussierten Bande.

	Ths	20S	VAT
Aufnahmen	23	14	21
Partikelgesamtzahl	11394	10931	12412
Ø Partikel / Aufnahme	495	781	591
Standardabweichung	92	214	258

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der erreichten Partikelzahlen auf mit Hilfe der Grid-Blotting-Methode gewonnenen elektronenmikroskopischen Präparaten

6.2.7 Fallstudie anhand des 26S Proteasoms aus *Drosophila melanogaster*

Das 26S Proteasom ist ein Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von etwa 2,5 MDa (siehe Abbildung 6-8). Seine Aufgabe ist die terminale proteolytische Spaltung von zytosolischen Proteinen, die durch Polyubiquitinierung für den Abbau markiert sind. Den Kern dieses Komplexes bildet das tonnenförmige 20S Proteasom, welches aus vier übereinander liegenden homoheptameren Ringen, zwei äußeren α -Ringen und zwei inneren

β -Ringen, besteht. Die Ringöffnungen an der Ober- und Unterseite des 20S Proteasoms sind jeweils mit einer hexameren ATPase bedeckt, an die regulatorische Kappen, jeweils bestehend aus mehr als 30 weiteren Proteinuntereinheiten, gebunden sind. Während der 20S-Kern äußerst stabil ist, verhalten sich die Kappen vergleichsweise labil und dissoziieren sehr leicht [Nickell, Beck *et al.* 2007]. Dies ist gut in elektronenmikroskopische Aufnahmen von 26S Proteasomen zu erkennen, die durch herkömmliche Methoden aufgereinigt wurden, in denen leider nur geringe Homogenität erreicht wird. Neben vollständig assemblierten, intakten Partikeln findet sich auch eine große Anzahl von teilweise dissoziierten Partikeln, beispielsweise Partikel mit nur einer Kappe, Halbproteasomen oder kleinere Proteinfragmente (siehe Abbildung 6-9D).

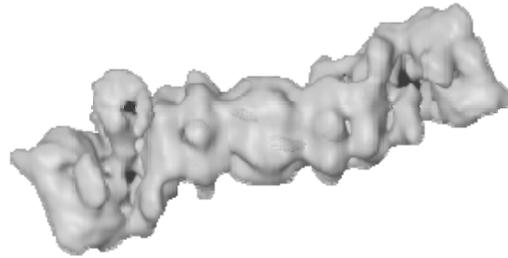


Abbildung 6-8: EM-Struktur vom 26S Proteasom bei einer Auflösung von etwa 2 nm

Es wurde untersucht, inwieweit die Abtrennung von bereits dissoziiertem Material auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel und der anschließende direkte Transfer der vollständig assemblierten 26S Proteasome auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie die Homogenität der Partikel positiv beeinflussen kann. Dazu wurde aufgereinigtes 26S Proteasom aus *D. melanogaster* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Oana Mihalache) auf ein Nativgel geladen und nach 4 h Elektrophorese bei 4 °C wie beschrieben auf Trägernetzchen geblottet. Der Elektrophoresepuffer hatte einen pH-Wert von 7,4 und enthielt zur Stabilisierung des Komplexes zusätzlich 2 mM ATP und 5 mM Magnesiumchlorid.

Es wurden negativkontrastierte Präparate der 26S-Banden bei einer Beladung der Einzelspuren mit 1, 5 und 10 μ g angefertigt (siehe Abbildung 6-9). Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich keine deutliche Zunahme der Homogenität beobachten. Bei gleicher Proteinmenge (1 μ g) in der geblotteten Bande ist jedoch die absolute Anzahl der Partikel, im Vergleich zu bereits gezeigten Aufnahmen anderer Proteine, deutlich niedriger (Abbildung 6-9A). Das war nicht anders zu erwarten, da bedingt durch

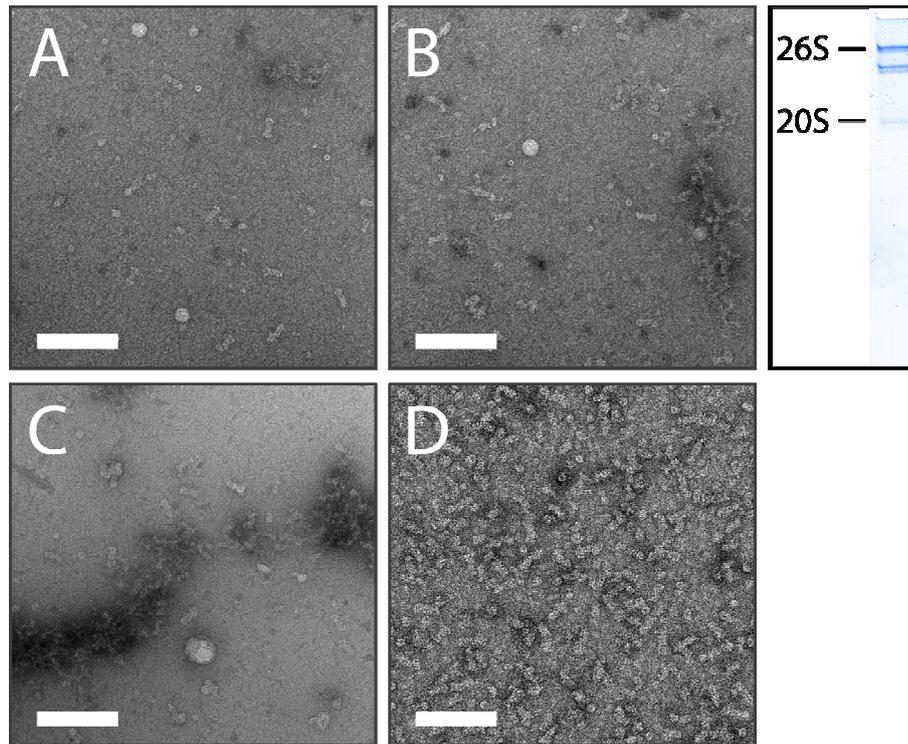


Abbildung 6-9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von aus Nativgelen extrahierten und mit Uranylacetat kontrastierten 26S Proteasomen (*D. melanogaster*)

Trägt man eine Präparation von 26S Proteasomen auf ein Nativgel auf, sind nach der Elektrophorese (4 h, 4 °C, pH 7,4, Elektrophoresepuffer mit zusätzlich 2 mM ATP und 5 mM MgCl₂) durch Coomassie-Färbung mehrere Banden sichtbar (rechts). In der obersten Bande sollten sich hauptsächlich vollständig assemblierte 26S Proteasomen befinden. Die untere Bande besteht aus reinen 20S Proteasomen. Massenspektrometrische Analyse der dazwischen liegenden Banden ergab das Vorhandensein von Kappenproteinen und 20S-Untereinheiten. Es könnte sich demnach um 20S Proteasomen mit nur einer intakten Kappe und halbe 26S Proteasomen handeln. Eine Gesamtmenge von 1 (A), 5 (B) und 10 µg (C) 26S Proteasom aus *D. melanogaster* wurde auf einem Tris-Acetat-Nativgel aufgetrennt. Die vollständig assembliertem Komplex entsprechenden Banden wurden anschließend auf Trägernetzchen geblottet und mit 2% Uranylacetat kontrastiert. Bei zunehmender Auftragsmenge ist verstärkt das Auftreten von Aggregaten zu beobachten, während die Zahl der vereinzelt Partikel ungefähr gleich bleibt. Zum Vergleich ist ein konventionell hergestelltes Präparat der gleichen Probe gezeigt (D). Der weiße Balken entspricht 100 nm.

das höhere Molekulargewicht, die absolute Anzahl an Einzelmolekülen bei gleicher Proteinmasse sinkt. Damit sinkt auch die Zahl der frei motilen Proteine, die für den Transfer zur Verfügung stehen. Um also höhere Partikelzahlen zu erreichen, wurde die auf das Gel geladene Proteinmenge erhöht. Etwas mehr Partikel lassen sich bei einer Beladung des Gels mit 5 µg finden (Abbildung 6-9B), erhöht man die Proteinmenge jedoch weiter auf 10 µg, führt dies schließlich dazu, dass die 26S Proteasomen gehäuft in Aggregaten auftreten und damit für eine Einzelpartikelanalyse nicht mehr brauchbar sind (Abbildung 6-9C). Vereinzelt sind

auch schon bei 5 μg kleinere Aggregate sichtbar. Ohne eine weitere Erhöhung der Transfer-effizienz oder Optimierung der Elektrophoresebedingungen lässt sich die Grid-Blotting-Methode derzeit nicht für eine Verbesserung der Homogenität von präparierten 26S Proteasomen einsetzen.

6.2.8 Herstellung von vitrifizierten Präparaten

Mit Uranylacetat oder anderen Schwermetallen kontrastierte Präparate von Proteinen sind in der Regel gut geeignet um initiale Strukturmodelle zu erstellen. Sie sind schnell und einfach herzustellen und haben durch die Anlagerung von Schwermetallen an die zugängliche Proteinoberfläche einen hohen Massenkontrast im Transmissionselektronenmikroskop. Für hochauflösende Strukturen sind sie jedoch nur bedingt geeignet, da durch die Probenpräparation oft artifizielle Änderungen der nativen Proteinkonformation erzeugt werden. So erscheinen die Proteine bedingt durch adhäsive Wechselwirkungen mit dem Kohlefilm, der als Auflagefläche dient, in z-Richtung leicht abgeflacht. Weiters wird die erreichbare Auflösung durch das Kontrastmittel selbst eingeschränkt. Dieses bildet nach vollständigem Verdunsten des Wassers eine glasartige Beschichtung um die Proteine, welche aus Nanokristallen besteht. Die Größe dieser Nanokristalle, welche letztlich den Kontrast erzeugen, bestimmt die erreichbare Auflösungsgrenze und liegt beispielsweise für Kontrastierungen mit Uranylacetat bei etwa 1,5 nm [Bremer *et al.* 1992]. Mit dem Eintrocknen einher geht auch eine Dehydrierung der Proteine, was weitere strukturelle Artefakte erzeugen kann. Nicht zuletzt beobachtet man außerdem häufig eine bevorzugte Orientierung der Partikel auf dem Kohlefilm, was in letzter Konsequenz eine dreidimensionale Rekonstruktion erschwert.

Aus diesem Grund werden zur Gewinnung hochaufgelöster Strukturen mittels EM bevorzugt vitrifizierte Präparate eingesetzt. Hierbei werden die Proteine direkt in einem dünnen Film ihrer wässrigen Lösung und damit einer Umgebung, die physiologischen Bedingungen wesentlich näher kommt, eingefroren. Abkühlraten von mehr als 10^6 K/s sorgen dafür, dass das Umgebungswasser beim Gefrieren keine Kristalle bildet, sondern einen festen, amorphen und glasartigen Zustand erreicht. Derart vitrifizierte Partikel können ohne weitere Kontrastierung durch deren Massendichteunterschied zu dem sie umgebenden Wasser, im Transmissionselektronenmikroskop abgebildet werden. Im Idealfall haben Proteine in vitrifizierten Proben keine Vorzugsorientierung, was eine dreidimensionale Rekonstruktion mit isotroper Auflösung in allen Raumrichtungen deutlich erleichtert.

Um den nur wenige Nanometer dünnen Eisfilm auf den Trägernetzchen zu stabilisieren, wird in der Regel ein Kohlelochfilm verwendet, der je nach Produktionsweise unterschiedlich beschaffen ist. Quantifoil- (Quantifoil Micro, Jena, Deutschland) oder C-Flat-Filme (Protochips Inc., Raleigh, NC, USA) sind Kohlefilme mit äquidistanten Löchern konstanten Durchmessers und besitzen eine relativ große Filmfläche. Netzfilme (Lacey-Filme) überspannen mit dünnen Kohlestegen das gesamte Trägernetzchen und bieten dementsprechend große trägerfilmfreie Flächen. Beide Typen erlauben in den filmfreien Regionen die Aufnahme vitrifizierter Proteine ohne störenden Hintergrund. Bedingt durch die Dicke des Kohlefilms und dem geringen Eigenkontrast der Proteine sind hochauflösende Strukturbestimmungen von Partikeln, die auf diesen Kohlefilmen aufliegen, nicht möglich. Als dafür praktikabel hat sich jedoch ein sehr dünner (<1 nm) durchgängiger Kohlefilm erwiesen, der wahlweise auf einer Lochfolie oder eigenständig frei auf den Netzchen aufliegt. Diese durchgängigen Kohlefilme bei Kryopräparaten stellen somit einige durch die Vitrifizierung vermeidbare Artefakte, die wie bereits beschrieben auch bei konventionell bei Raumtemperatur angefertigten Präparaten auftreten, wieder her. Die nachfolgende Bildverarbeitung jedoch kann durch solch dünne Kohlefilme erleichtert werden, weswegen sie in manchen Fällen als zweckmäßig gelten können.

Nach erfolgreicher Demonstration des Transfers von Proteinkomplexen aus nativen Polyacrylamidgelen auf elektronenmikroskopische Objektträger und deren anschließende Visualisierung als negativkontrastierte Präparate war der nächste logische Schritt die Herstellung von vitrifizierten Präparaten nach Anwendung der Grid-Blotting-Prozedur. Mit der Zielstellung eine akzeptable Partikeldichte in filmfreiem Eis zu erreichen, sollten 20S Proteasomen aus *T. acidophilum* auf Quantifoil- und Lacey-Kupfernetzchen transferiert werden.

Für erste Versuche wurde von Proteinbanden, die etwa 8 µg 20S Proteasom aus *T. acidophilum* enthielten, analog wie in Abschnitt 6.2.6 beschrieben, auf Kupfernetzchen mit Quantifoil 2/1 (Lochdurchmesser/Stegbreite in µm) Lochkohlefolie geblottet. Die Netzchen wurden nach 2 min Blotzeit vom Gel aufgenommen, ein Mal mit Elektrophoresepuffer gewaschen und ein zweites Mal mit 1,5 µl Puffer benetzt, um eine ausreichende Menge Flüssigkeit für die Einschussprozedur auf den Netzchen zu erhalten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Präparate weisen eine Akkumulation nahezu sämtlicher 20S Proteasomen auf dem Quantifoil-Film auf, zum Teil bis zur vollständigen Bedeckung des

Films (siehe Abbildung 6-10A). Im freien Eis in den Löchern des Films finden sich hingegen kaum nennenswerte Mengen an Partikeln, für praktikable Zwecke in jedem Fall zu wenige. Im Unterschied zur Präparation von Raumtemperaturproben, wo nach dem Blotprozess der kritische Schritt der Adhäsion einer ausreichenden Menge Protein an den Kohlefilm bewältigt ist, muss für zu vitrifizierende Präparate im Anschluss noch eine signifikante Menge der Partikel vom Film dehärieren, um diese später in freiem Eis auffinden zu können. Plausibel erscheint, dass während des Blotprozesses der Kohlefilm nicht vollständig abgesättigt wird, sodass auch nur wenige adsorbierte Partikel beim nachfolgenden Waschschrift wieder aufgeschwemmt werden können. Von entscheidender Bedeutung ist offensichtlich die absolut verfügbare Menge an frei motilen Proteinen. Bei der Präparation vitrifizierter Proben werden standardmäßig etwa 3 μl Proteinlösung mit einer Konzentration von 100 bis 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ auf die Netzchen aufgetragen. Das sind etwa 300-500 ng freies Protein. Rechnerisch entspricht dies etwa 5 Prozent der 8 μg Gelbeladungsmenge, welche vollständig aus dem Gel in den zum Transfer aufgebrauchten Puffertropfen mobilisiert werden müssten. Tatsächlich ließ sich nicht genau genug bestimmen, wie viel freies Protein während des Blottens verfügbar ist, aber die Vermutung liegt nahe, dass diese Menge nicht annähernd erreicht wird.

Um eventuell eine vollständige Absättigung des Trägerkohlefilms durch Verringerung seiner Fläche zu erreichen, wurde in einem Folgeversuch der Quantifoil-Film durch Lacey-Film ersetzt, doch das Resultat blieb das Gleiche. Die 20S Proteasomen akkumulieren auf und in direkter Umgebung der dünnen Kohlestetege, während im freien Eis fast keine Partikel sichtbar sind (siehe Abbildung 6-10B).

Eine gute Transfereffizienz hingegen wurde bei Verwendung eines kontinuierlichen Kohlefilms mit einer Dicke von etwa 2 nm erreicht. Die durchgeführten Arbeitsschritte entsprechen dabei im Wesentlichen dem Protokoll für die Erstellung von negativkontrastierten Präparaten. Auch die auf das Gel geladene Proteinmenge konnte wie zuvor auf 1-2 μg reduziert werden. Nach dem Blotvorgang werden die Netzchen wie beschrieben ein Mal mit Elektrophoresepuffer gewaschen und vitrifiziert. Als hilfreich hat es sich erwiesen, das Abziehen der Flüssigkeit vor dem Einschussvorgang in flüssiges Ethan zur Bildung eines dünnen Eisfilms mit einem leicht feuchten Filterpapier durchzuführen. Das gewährleistet eine bessere Kontrolle über die Homogenität des Eisfilms auf dem Trägerkohlefilm. Ähnlich wie bei den negativkontrastierten Proben konnten auch hier Partikelbelegungsichten auf dem Kohlefilm von etwa 20 Prozent erreicht werden (siehe Abbildung 6-10C und D).

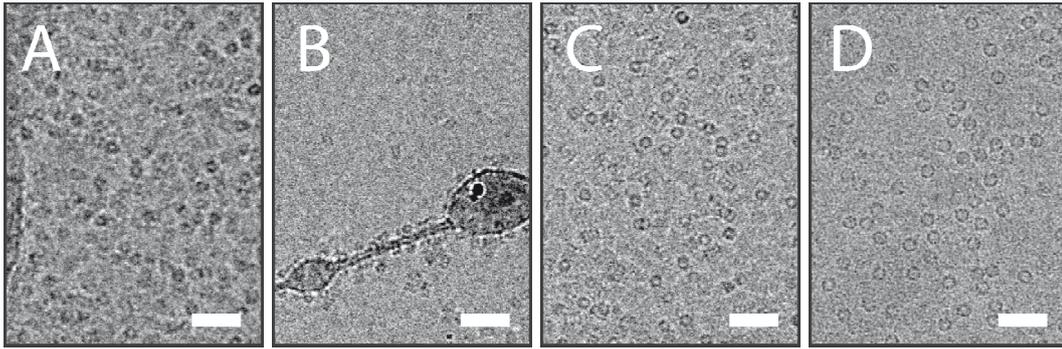


Abbildung 6-10: Elektronenmikroskopische Abbildungen von mit Hilfe der Grid-Blotting-Methode hergestellten vitrifizierten Präparaten

Die abgebildeten elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen vitrifizierte 20S Proteasomen (A-C) und Thermosomen (D) nach deren Extraktion aus Nativgelen mittels der Grid-Blotting-Methode. Um auf mit Lochkohlefolie befilmten Trägernetzchen eine hinreichende Menge von Partikeln im freien Eis zu erhalten sind sehr hohe Gelauftragsmengen $>10 \mu\text{g}$ je Proteinbande nötig. Das liegt bereits über der Gelsättigungskonzentration. Bei geringeren Proteinmengen wird der überwiegende Teil an den Kohlefilm adsorbiert, wie hier am Beispiel von Quantifoil 2/1 Kohlefilm (A) gezeigt. Auch bei Verwendung von Laceykohlefilm, der eine insgesamt kleinere Oberfläche hat, finden sich die meisten Partikel in unmittelbarer Umgebung der Kohlesteg, während die Partikelkonzentration im freien Eis vernachlässigbar gering ist (B). Unter Ausnutzung der starken Proteinadsorption an Kohlefilm wird eine gute Abbildungsqualität der Partikel durch Verwendung eines 2nm dicken kontinuierlichen Kohlefilms erreicht, wie am Beispiel vom 20S Proteasom (C) und Thermosom (D) gezeigt. Der Defokus der Aufnahmen liegt zwischen -2 und $-2.4 \mu\text{m}$ und der weiße Balken entspricht 40nm.

6.3 Diskussion

Es hat sich erwiesen, dass die Extraktion von strukturell intakten Proteinkomplexen aus nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen nach erfolgter Gelelektrophorese möglich ist, und mit der neu entwickelten Grid-Blotting-Methode ein geeignetes Verfahren zur Verfügung steht, um negativkontrastierte und vitrifizierte Präparate für die elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse dieser Komplexe zu gewinnen.

Maßgebliches Kriterium für die Bewertung der Präparate war dabei die erreichte durchschnittliche Partikelzahl auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Aus dieser lässt sich, unter der Annahme einer annähernd homogenen Verteilung der Partikel auf den Netzchen, die Transfereffizienz, also der prozentuale Proteinanteil der im Gel fokussierten Proteinbande, der letztlich auf dem Kohlefilm des Trägernetzchens adhäriert wurde, abschätzen. Unter optimierten Bedingungen wurden Transfereffizienzen von bis zu 0,5 Pro-

zent erreicht. In der erreichbaren Transfereffizienz spiegeln sich im Wesentlichen zwei Faktoren wider.

Zum einen muss für das Erreichen hoher Belegungsdichten eine genügende Menge an freimotilem Protein in der fokussierten Proteinbande verfügbar sein. Es hat sich gezeigt, dass dafür natürlich in erster Linie die Gesamtproteinmenge in der Bande eine Rolle spielt, aber wie am Beispiel vom 26S Proteasom demonstriert, sind der Erhöhung der lokalen Proteinkonzentration wegen möglicher Aggregatbildung natürliche Grenzen gesetzt, die abhängig von den physikochemischen Eigenschaften der jeweiligen Proteinspezies sind. Ein Umstand, der ebenso Einfluss auf die Transfereffizienz hat, ist die mittlere Wegstrecke, die die Proteine von ihrem Aufenthaltsort im Gel bis zum Kohlefilm zurücklegen müssen. Da das Gel eine poröse Matrix mit vergleichsweise kleinen Löchern ist, ist die freie Diffusion der Partikel nur eingeschränkt möglich [Lewus and Carta 2001]. Obwohl der Effekt nicht genau quantifiziert wurde, konnte beobachtet werden, dass durch das Aufrauen des Gels mit einer spitzen Pinzette eine deutlich höhere Transfereffizienz zu erreichen war, als wenn das Trägernetzchen direkt auf die glatte Geloberfläche gelegt wurde. Erklären lässt sich dies eventuell mit dem partiellen Zerstören der Gelmatrix, wodurch innere Bereiche der Proteinbande frei gelegt werden und nun direkt vom aufgetragenen Transferpuffertropfen aus zugänglich werden. In kürzerer Zeit können so mehr freie Proteine in das Flüssigkeitsvolumen des aufgetragenen Transfertropfens diffundieren.

Zum anderen werden hohe Belegungsdichten nur erreicht, wenn die Affinität zwischen dem Kohlefilm des Netzchens und den Proteinen hoch genug ist, um eine ausreichende Adsorption zu gewährleisten. Die Grundlage hierfür wird schon durch die Wahl der Elektrophoresebedingungen gelegt. Ein hoher pH-Wert des Elektrophoresepuffers scheint die Oberflächenladung der Proteine ungünstig zu beeinflussen, so dass kaum Proteine an den Film adsorbieren. Nähert man sich mit dem pH-Wert dem isoelektrischen Punkt der Proteine an, ist das Verhältnis zwischen negativen und positiven Ladungen an der Proteinoberfläche annähernd ausgeglichen, was eine Adsorption offenbar begünstigt. Die Transfereffizienz bei Gelen mit einem pH-Wert von 7,4 war um mindestens einen Faktor 10 höher als bei einem pH-Wert von 9,5. Der niedrigere pH-Wert entspricht außerdem in aller Regel auch eher intrazellulären und damit physiologischen Bedingungen, wie er für viele Proteine über die gesamte Zeit der Aufreinigung gehalten wird. Potentiell eignet sich die Grid-Blotting-Methode damit auch für weniger stabile Proteinkomplexe.

Die Blotzeit hat zwar Einfluss auf die Transfereffizienz, wurde jedoch im Hinblick auf praktische Aspekte bei der Durchführung der Grid-Blotting-Methode optimiert. Prinzipiell

sind längere Blotzeiten vorteilhaft für das Erreichen einer höheren Transfereffizienz, die mechanische Stabilität der Trägerfolie müsste dazu jedoch gegenüber dem für die hier durchgeführten Experimente verwendeten Kohlefilm deutlich erhöht werden. Andere untersuchte Parameter, wie Temperatur und Dauer der Ionisation für die Trägernetzchen spielen für den Transferprozess keine signifikante Rolle.

6.3.1 Vorteile und Limitierungen der Grid-Blotting-Methode

Die Produktion und Isolation von rekombinantem Proteinmaterial ist in aller Regel unproblematisch, da diese im heterologen Expressionssystem durch die Verwendung von starken Promotoren in sehr hohen Konzentrationen vorliegen. Wird die Isolation dagegen aus endogenem Material betrieben, ist die zur Verfügung stehende Menge des gewünschten Proteins abhängig von der natürlichen zellulären Konzentration. Die Unterschiede zwischen den Expressionsniveaus einzelner Proteine können bis zu 7 Zehnerpotenzen umfassen, und besonders die Aufreinigung der gering konzentrierten Proteine profitiert von Protokollen, die die Prozessierung von kleinsten Probenvolumina und -konzentrationen erlauben. Häufig wird als letzter Schritt eines Reinigungsprotokolls für Proteinkomplexe eine Molekularsiebmethode angewandt, um intakte, vollständig assemblierte Partikel von bereits dissoziiertem oder aggregiertem Material und weiteren eventuell noch vorhandenen niedermolekularen Verunreinigungen zu trennen.

Die klassischerweise eingesetzte Gelfiltration hat jedoch den Nachteil, dass sie die Konzentration des Komplexes um etwa das Zehnfache verringert. Vielfach wird die final gereinigte Fraktion im Anschluss erneut aufkonzentriert, was häufig zur Bildung von Aggregaten führt, die für die weitere Prozessierung wertlos sind und weiteren Materialverlust durch Adsorption an der Konzentratorenmembran bedeutet. Im Gegensatz dazu ist der Einsatz einer präparativen nicht-denaturierenden Gelelektrophorese zur Gewinnung nahezu homogen geeinigter Proteinkomplexe von besonderem Vorteil, wenn die zur Verfügung stehende Menge an Ausgangsmaterial nur sehr gering ist. Volumina im Bereich von 1-20 μl mit einer Konzentration zwischen 10 und 50 $\mu\text{g/ml}$ können auf Nativgelen noch gut analysiert werden. Die Gelelektrophorese leistet ebenso wie die Gelfiltration eine Trennung nach apparenten Molekulargewichten, hat aber den entscheidenden Vorteil, dass die Proteinkomplexe nach der Trennung lokal fokussiert vorliegen und damit in der Regel höher konzentriert sind als vor der Trennung.

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass es möglich ist aus Proteinbanden, die etwa 1 µg Protein enthalten, mittels der entwickelten Grid-Blotting-Methode, für die elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse geeignete Präparate zu gewinnen. Da bei dem diffusionskontrollierten Transfer ein maximaler Austrag im einstelligen Prozentbereich erfolgt, steht das verbleibende Proteinmaterial im Anschluss noch für weitere massenspektrometrische oder zymographische Analysen zur Verfügung. Damit können in einem einzigen Arbeitsgang Struktur, Identität, stöchiometrische Komposition und eventuelle enzymatische Aktivität eines Proteinkomplexes untersucht werden (siehe Abbildung 6-11). Insbesondere zur Charakterisierung der bis heute noch großen Gruppe (>40 %) der hypothetischen Proteine (engl.: ‚*hypothetical proteins*‘ und ‚*conserved hypothetical proteins*‘) von *T. acidophilum* kann die Grid-Blotting-Methode durch diesen integrierenden Ansatz möglicherweise einen wertvollen Beitrag liefern. Damit hat die Grid-Blotting-Methode das Potential, eine Brücke zwischen klassischer Proteomik auf der einen Seite und auf Strukturaufklärung basierenden Proteininventarisierungen von Organismen andererseits zu schlagen.

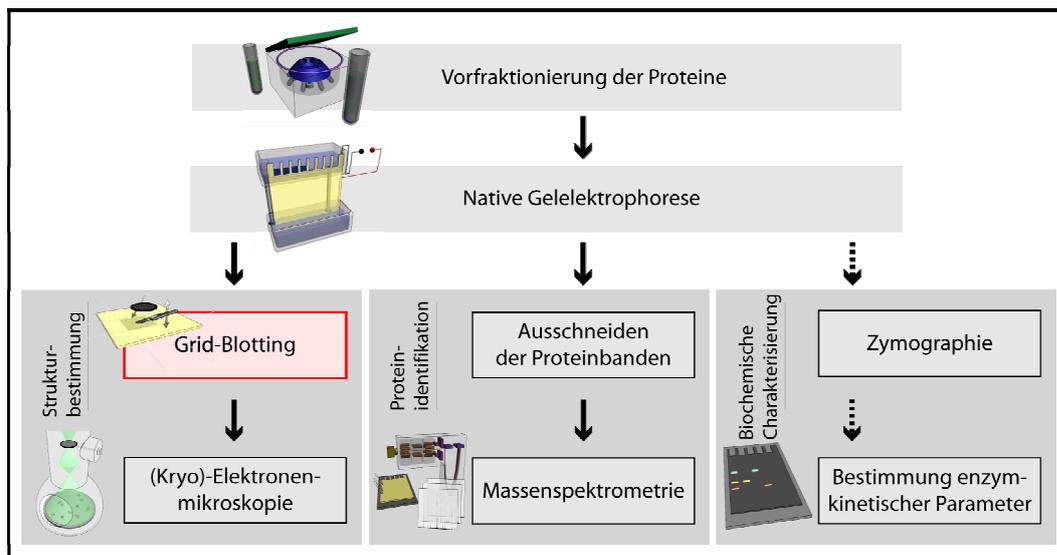


Abbildung 6-11: Anwendung der Grid-Blotting-Methode in disziplinübergreifenden Proteomstudien

Die zu untersuchenden Proteinkomplexe werden aus Zellextrakt durch eine Methode der Wahl vorfraktioniert bzw. angereichert, bevor sie einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese unterzogen werden. Nach der Elektrophorese wird ein geringer Anteil der im Gel fokussierten Proteinbanden durch die in diesem Abschnitt vorgestellte Grid-Blotting-Methode auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie transferiert und einer Einzelpartikelanalyse unterzogen. Im Gel verbleibendes Protein kann in Teilen für massenspektrometrische Analysen ausgestanzt und/oder für die zymographische Bestimmung enzymkinetischer Parameter herangezogen werden. Ein solches Arbeitsschema erlaubt für einzelne Proben die gleichzeitige Identifikation, Quantifizierung, Strukturaufklärung, sowie eventuell eine biochemische Charakterisierung, wenn geeignete Bestimmungsreaktionen bekannt sind.

Weiterhin ist die Prozedur der Grid-Blotting-Methode in idealer Weise für eine Automatisierung geeignet, da sie nur wenige repetitive Arbeitsschritte umfasst. Wie in Abschnitt 7 dieser Arbeit dargelegt, muss zwar zur Realisierung eines automatisierten Ablaufs insbesondere weitere Vorarbeit bei der Detektion von nativen Proteinen in Polyacrylamidgelen geleistet werden, aber prinzipiell wären bereits bestehende Spotpickerplattformen für die massenspektrometrische Proteomanalyse recht einfach zu modifizieren, um die gleichzeitige Gewinnung von strukturellen Proben zu ermöglichen.

Einschränkungen für die Anwendbarkeit der Grid-Blotting-Methode beruhen in erster Linie auf der Stabilität der zu untersuchenden Proteinkomplexe. Wie auch die Gelfiltration sind Molekularsiebmethoden im Allgemeinen nur bedingt für die Aufreinigung von labilen und gar nicht von transienten Proteinkomplexen geeignet. Als nachteilig erweist sich bei der nativen Gelelektrophorese, dass die Zugabe von strukturstabilisierenden Additiven und Kofaktoren nur begrenzt möglich ist, um die Trennung im elektrischen Feld nicht negativ zu beeinflussen. Hierbei spielen durch die Additiven induzierte endosmotische Effekte und lokale pH-Veränderungen eine wesentliche Rolle. Wie jedoch von Elsasser *et al.* gezeigt, bleiben selbst 26S Proteasomen, die sehr anfällig für die Dissoziation ihrer regulatorischen Kappen sind, während der Elektrophorese intakt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Grid-Blotting-Methode für eine Vielzahl von Proteinkomplexen anwendbar ist [Elsasser *et al.* 2005]. Die maximale Größe der untersuchbaren Komplexe ist eingeschränkt durch die verwendete Gelmatrix. Derzeit verfügbare Gele erlauben die Einwanderung von Makromolekülen mit Molekulargewichten bis zu 20 MDa. Die effektive Trennleistung in diesen sehr hohen Molekulargewichtsbereichen ist jedoch eher schwach. Die hier verwendeten Tris-Acetat-Gele erlauben recht gute Trennschärfen bis zu 4 MDa, was für alle Komplexe, die nicht wesentlich größer als Ribosomen (~2,5 MDa) sind, ausreicht. Für größere Komplexe ist die Methode derzeit wohl nicht geeignet.

6.3.2 Mögliche Steigerung der Transfereffizienz beim Grid-Blotting durch Anlegen eines externen elektrischen Felds

Zweifelsohne ist die erreichbare Transfereffizienz ein wesentlicher Faktor für die routinemäßige Anwendung der Grid-Blotting-Methode. Ziel sollte sein, die zur Verfügung stehende Menge an Protein-Material optimal zu nutzen. Für massenspektrometrische

Analysen sind in aller Regel 50 ng Protein vollkommen ausreichend, ebensoviel sollte für die Herstellung eines elektronenmikroskopischen Präparats völlig genügen [Mann *et al.* 2001]. Das kann allerdings nur mit deutlich erhöhten Mobilisierungsraten von bis zu 50 % erreicht werden. In Anlehnung an den klassischen Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine adsorbierende Trägermembran (,Western Blotting'), der durch Anlegen eines externen elektrischen Feldes eine nahezu quantitative Mobilisierung der Proteine aus dem Gel erlaubt, wurden Vorversuche zur Evaluierung eines ähnlichen Verfahrens mit Kupfernetzchen für die Elektronenmikroskopie durchgeführt. Der Transfer sollte in diesem Falle also nicht auf eine Kunststoffpolymere membran, sondern auf den dünnen Kohlefilm der Netzchen erfolgen.

Die heutzutage am häufigsten verwendete Variante des ,Western Blots' ist das sogenannte ,semi dry'-Verfahren [Burnette 1981; Kyhseandersen 1984]. Dazu werden Gel und Membran luftblasenfrei zwischen mehreren Lagen Filterpapier, welche mit einem geeigneten Transferpuffer getränkt sind, platziert. Dieser Stapel wird unter leichtem Anpressdruck zwischen zwei Elektroden einem elektrischen Feld ausgesetzt, welches die quantitative Migration der Proteine aus dem Gel auf die Membran forciert. In analoger Weise wurde die Membran durch Kupfernetzchen mit aufgebrachtem dünnem Kohlefilm ersetzt. Der Film war jedoch der mechanischen Beanspruchung während des Auf- und Abbaus der Transferkassette nicht gewachsen. Selbst auf Plastikfolien (z.B. Formvar) stabilisierter Kohlefilm war nach dem Blotvorgang komplett unbrauchbar. Dieser Aufbau erwies sich somit für den Zweck des elektrophoretisch unterstützten Proteintransfers als ungeeignet.

Um mechanische Belastungen des Kohlefilms weitestgehend zu minimieren, wurden in der Folge die auf dem Netzchen aufliegenden Filterpapiere entfernt und das Kupfernetzchen mit einem aufgetragenen Tropfen Transferpuffer direkt als Elektrode verwendet. Dies führte reproduzierbar dazu, dass der Kohlefilm sich vollständig von den Netzchen löste. Vermutlich spielen hier zwei Prozesse für das Ablösen des Films eine Rolle. Zum einen wird das Kupfer während des Anliegens einer elektrischen Spannung merklich aufgeladen, was die Wechselwirkungskräfte zwischen Kohlefilm und Netzchen beeinflusst. Zum anderen kommt es durch das Anlegen von Spannungen von 20 V und mehr, die typischerweise beim ,Western Blotting' verwendet werden, zu einer Hydrolyse und damit einer Entwicklung von Sauerstoff beziehungsweise Wasserstoff an den Elektroden. Da die Kontaktfläche zwischen

Film und Netzchen nicht hermetisch versiegelt ist, könnte diese Gasentwicklung das progressive Ablösen des Films bewirken. Dieser Ansatz war somit ebenfalls ungeeignet.

Die Hydrolysespannung von Wasser unter den standardmäßigen Bedingungen der Gelelektrophorese zwischen zwei Platinelektroden liegt in den verwendeten Puffersystemen bei etwa 2 V. Um die Gasbildung an den Elektroden zu vermeiden, darf die angelegte Spannung diesen Wert nicht überschreiten. Das liegt jedoch um das Zehnfache unter der für ‚Western Blotting‘ verwendeten Transferspannung, welche quantitative Elution der Proteine nach etwa 1-2 h erlaubt. Wie in Abbildung 6-12 gezeigt, ist aber schon bei einer Reduktion der Elektrophoresespannung auf 4 V kaum noch gerichtete Proteinmigration nachzuweisen. Die Mehrheit der fokussierten Proteine dürfte in einer Zeit von 4 h zwar die Gesamtdicke des Gels durchquert haben, dennoch ist dies nur die Prozessierungsdauer für eine Proteinbande. Für die Prozessierung mehrerer Banden pro Gel sind die Bedingungen nicht praktikabel.

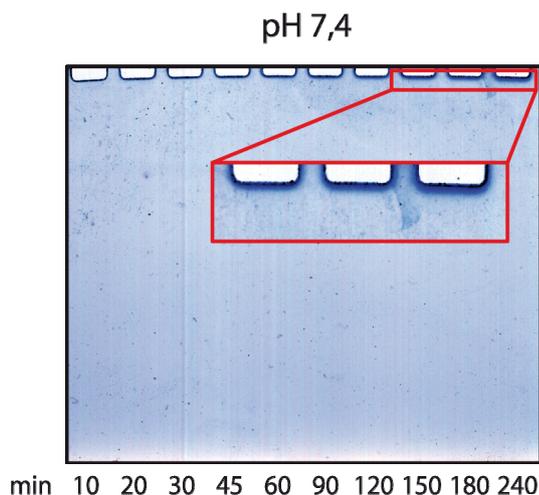


Abbildung 6-12: Migrationsverhalten von Referenzproteinen bei 4 V Elektrophoresespannung

Analog zu Abbildung 6-6 wurde ein Gemisch von Thyroglobulin (669 kDa), β -Amylase (200 kDa) und Alkoholdehydrogenase (150 kDa) bei einem Elektrophorese-pH von 7,4 mehrfach im Abstand von definierten Zeitintervallen auf ein Nativgel geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und 4 V. Die zuerst geladene Probe erfuhr die längste Trennzeit mit 4 h. Wie die Ausschnittsvergrößerung zeigt, ist die Migrationsstrecke selbst nach 4 h nur minimal. Die Blaufärbung an den Rändern der Auftragstaschen verdeutlicht, dass ein Großteil der Migration im Gel bei dieser Elektrophoresespannung ungerichtet durch Diffusion erfolgt.

Um Elektrode und Kupfernetzchen räumlich voneinander zu trennen, bietet sich das Verfahren einer Elektroelution an [Shoji *et al.* 1995]. Die Proteine werden hierbei nicht mehr an einer direkt dem Gel aufliegenden Kontaktfläche adsorbiert, sondern in ein Flüssigkeitsvolumen eluiert, welches im Anschluss für die Standardpräparation elektronen-

mikroskopischer Präparate verwendet werden kann. Auch dieser Ansatz bringt jedoch einige Schwierigkeiten mit sich, die bis jetzt noch nicht zufriedenstellend gelöst werden konnten. Um eine übermäßige Verdünnung der eluierten Proteine zu vermeiden und den konzentrierenden Effekt der Gelelektrophorese nicht völlig aufzuheben, sollte das Elutionsvolumen im Idealfall stets kleiner als das Gelbeladungsvolumen sein und damit nur wenige Mikroliter betragen. Solche Mikrovolumina zu handhaben ist jedoch nicht trivial. Bei Überschreiten der Hydrolysespannung an den Elektroden muss dafür Sorge getragen werden, dass das an der Anode gebildete Wasserstoffgas von der Elektrode abperlen kann und nicht akkumuliert und somit den Stromkreis der Elektrophorese unterbricht. Ein weiteres Problem sind Protonen, die bei der Wasserstoffbildung verbraucht werden. Bedingt durch das kleine Volumen ist die Pufferkapazität des Anodenreservoirs nur sehr begrenzt. Bei längeren Elutionszeiten wird das zu einer spürbaren Absenkung des pH-Wertes führen, was für die Probenpräparation ja gerade, wie in Abschnitt 6.2.4 ausgeführt, möglichst zu vermeiden ist. Nicht zuletzt neigen Gele zum Quellen, was dazu führt, dass nach dem Öffnen der Elektrophoresekassette auf das Gel aufgetragene kleine Flüssigkeitsmengen schnell resorbiert werden. Auch Verdunstung ist bei solch kleinen Volumina nicht zu unterschätzen. Eine potentielle Lösung für die genannten Probleme ist die Verwendung einer semi-permeablen Membran, die einen Wasser- und Pufferkomponentenaustausch zwischen dem Elutionsvolumen und einem größeren Elektrodenreservoir gestattet, aber Proteine am Verlassen des Elutionsvolumen effektiv hindert. Tendenziell adsorbiert eine Membran allerdings auch verstärkt Protein. Selbst Membranen mit niedrigster Bindungskapazität (z.B. mit Glycidylmethacrylat modifizierte Nylonmembranen) adsorbieren noch Proteinmengen zwischen 1 und 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [Hou 1990]. Das entspricht selbst bei einer kleinen Membran von etwa 4 mm Durchmesser noch einer Bindungskapazität von 130-250 ng. Gängige PVDF-Membranen mit niedriger Proteinbindungskapazität adsorbieren noch etwa 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Das entspricht in etwa der Proteinmenge einer dünnen, scharf fokussierten Proteinbande, welche sich durch Anfärbung noch optimal visualisieren lässt. Möglicherweise ist es vorteilhaft, ein Netzchen direkt in das Elutionsvolumen zu platzieren, so dass die Proteine schon während der Elution auf dem Kohlefilm adhären können und die Verlustrate so deutlich gesenkt wird. Die Umsetzung dieses Konzepts ist momentan in Bearbeitung und es wird sich zeigen müssen, inwieweit dieser Ansatz auch für geringkonzentrierte Proteinbanden geeignet ist. Eine entsprechende Prototypenanfertigung für die Elektroelution ist in Abbildung 6-13, Abbildung 6-14 und Abbildung 6-15 gezeigt.

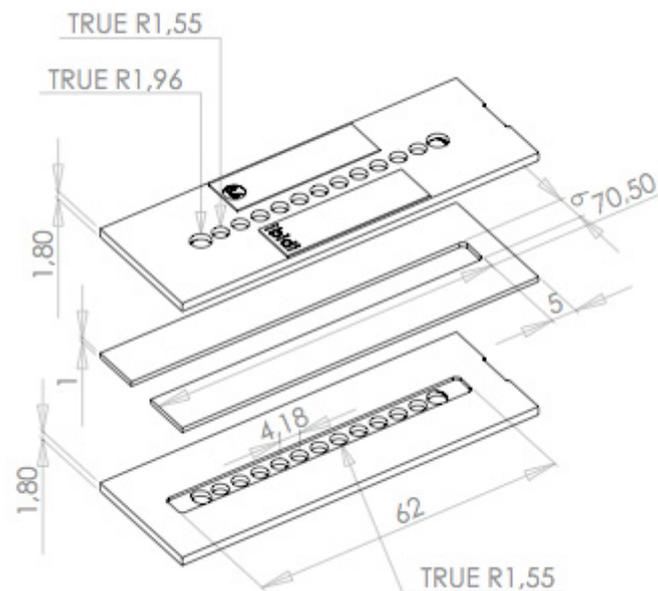


Abbildung 6-13: Technische Skizze einer Prototypenkassette zur Elektroelution von Proteinen aus Nativgelen

Zwischen zwei gleichartige mit Löchern versehene Plastikplättchen von der Größe eines handelsüblichen Objektträgers für die Lichtmikroskopie (25 x 75 x 1,8 mm) wird ein weiteres Plättchen mit einer vertikalen Aussparung von etwa 5 mm Breite gespannt. Diese Aussparung dient zur Aufnahme eines Trenngels, welches mit einem Adaptermodul (siehe Abbildung 6-15) direkt in dieser Kassette beladen werden kann. Alle Löcher der Deckplättchen, bis auf die zwei dem offenen Spaltende gegenüberliegenden endständigen, werden für die Dauer der Gelelektrophorese mit 10 % Agarose abgedichtet. Nach erfolgter Proteinseparation werden die Agarosepfropfen entfernt, und durch die jeweils gegenüber liegenden Lochpaare kann eine zonal begrenzte Elektroelution erfolgen.



Abbildung 6-14: Anschlussstücke an die Elektrodenreservoirs für die Elektroelutionskassette

Die zwei Adapterstücke werden in jeweils gegenüberliegende Löcher der Elektroelutionskassette gesteckt und erlauben die Befestigung eines Schlauchs, der zu größeren Elektrodenreservoirs führt. Die Anodenseite ist mit einer Stellschraube versehen, mit der man das Elutionsvolumen zwischen 10 und 25 µl variieren kann. In die Stellschraube lässt sich eine Molekulargewichtsausschlussmembran einfassen, die dafür sorgen soll, dass eluierte Proteine nicht in das größere Anodenreservoir gelangen können.

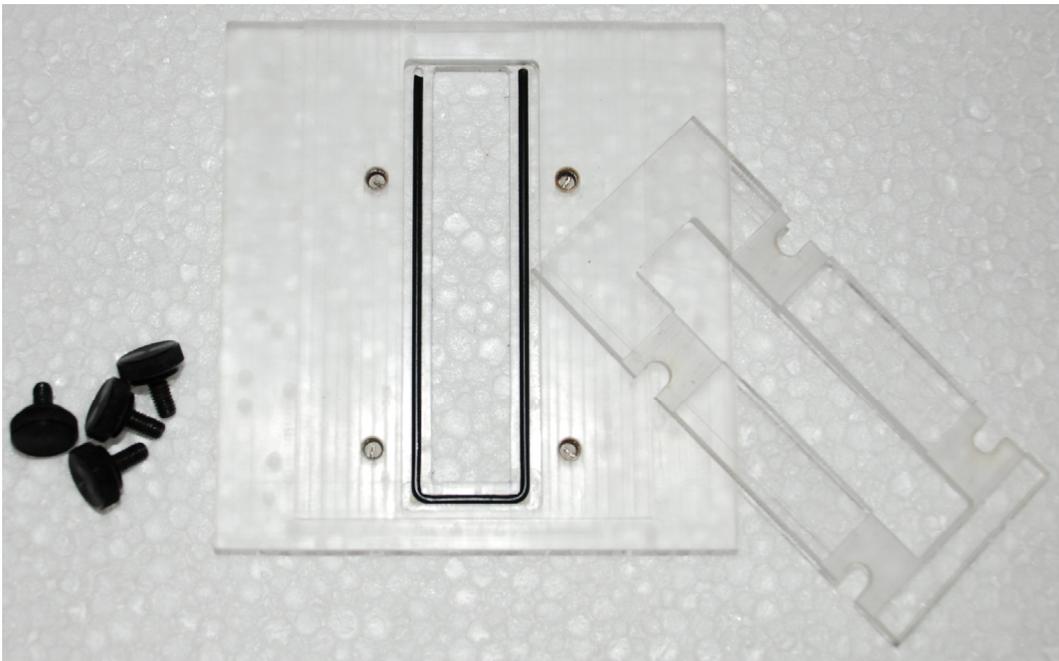


Abbildung 6-15: Adaptermodul für die Elektroelutionskassette zur Verwendung in einer Standard-elektrophoresekammer

Für die Elektrophorese der Proteine in der in Abbildung 6-13 gezeigten Elektroelutionskassette lässt sich mit dem hier gezeigten Adaptermodul eine X-Cell SureLock Elektrophoresekammer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwenden. Die Kassette wird mit der nach oben liegenden Aussparung in den Adapter gelegt und mittels einer Halteplatte befestigt.

7. Detektion von nativen Proteinen

7.1 Theoretische Einführung

Der qualitative und quantitative Nachweis von Proteinen ist für biochemisches Arbeiten unverzichtbar, und es existiert eine Vielzahl an verschiedenen Färbe- und Markierungstechniken. Diese müssen im Wesentlichen Kriterien wie eine möglichst hohe Sensitivität, hohe Linearität über einen weiten Konzentrationsbereich, hohe Robustheit gegenüber Störeinflüssen und geringen Zeit- und Kostenaufwand erfüllen, um sich im Laboralltag durchzusetzen. Die meisten dieser Nachweismethoden für Proteine basieren dabei auf einer chemischen oder physikochemischen Modifikation spezifischer funktioneller Gruppen innerhalb der Aminosäurekette mit einem entsprechenden Farbstoff. Für den klassischen Ergebnismachweis, beispielsweise einer erfolgreichen Proteinexpression oder einem akzeptablen Reinheitsgrad eines Proteins nach einem Aufreinigungsschritt, spielt es dabei keine Rolle, ob die Bedingungen der Färbereaktion verlangen, dass das Protein vollständig denaturiert wurde. Für Proteine jedoch, die in weiterführenden Arbeiten strukturell untersucht werden sollen, ist es essentiell, dass die Visualisierung möglichst keine Änderungen an der nativen Konformation hinterlässt. Das heißt, Reaktionen mit einem Farbstoff müssen im Idealfall vollständig reversibel sein und dürfen nicht in chemischen Umgebungen ablaufen, die die strukturelle Integrität des Zielproteins signifikant verletzen. Tatsächlich ist dies nur sehr schwer zu erreichen.

Als Alternative zu den direkten Färbemethoden werden Zymogramme genutzt. Besitzt ein Zielprotein enzymatische Aktivität, kann eine Detektion im Polyacrylamidgel indirekt über dessen Substratumsatz erfolgen. Voraussetzung hierfür ist, dass ein optischer Nachweis für die Konzentrationsänderung, beispielsweise über die Änderung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge, von Edukten oder Produkten existiert. Zugleich zeigt der Nachweis von enzymatischer Aktivität in jedem Falle an, dass das Zielprotein zu diesem Zeitpunkt seine biologische Funktion in seiner vorliegenden Konformation und unter den gegebenen Reaktionsbedingungen erfüllen kann. Zymogramme eignen sich damit gut zur spezifischen Detektion von einzelnen Proteinen, sind aber für die Visualisierung von komplexen Proteinmischungen denkbar ungeeignet.

Ein vielversprechender Ansatz zur direkten Detektion von nativen Proteinen in Polyacrylamidgelen, der keine chemischen Markierungen erfordert, wurde 2003 von Roegener *et al.* veröffentlicht [Roegener *et al.* 2003]. In Proteinen nahezu ubiquitär vorkommende aromatische Aminosäurereste besitzen eine intrinsische Fluoreszenzaktivität, die im fernen bis mittleren UV angeregt werden kann, um Fluoreszenzlicht im nahen UV zu erzeugen (siehe Kapitel 8.2.1). Erste Arbeiten zur Fluoreszenzdetektion reichen zwar bis in die Jahre 1989 und 1990 zurück. Mangels geeigneter Optik beschränkten sich Hogan *et al.* und Yamamoto *et al.* allerdings noch auf die Messung der reinen UV-Absorption. Die Detektionsgrenze lag bei einigen Mikrogramm [Hogan and Yeung 1989; Yamamoto *et al.* 1990]. Erst ein gutes Jahrzehnt später wurde von Roegener *et al.* die Sensitivität um mehr als drei Zehnerpotenzen durch Detektion des angeregten Fluoreszenzlichts verbessert.

Die Effizienz dieser Detektion hängt im Wesentlichen vom Fluoreszenzwirkungsgrad der drei natürlichen aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin ab. In nativen Proteinkonformationen übersteigt die Tryptophanfluoreszenz die von Tyrosin, da die Fluoreszenzemission von Tyrosin durch Wasserstoffbrückenbindungen zu seiner Hydroxylgruppe und Förster-Transfer zu benachbarten Tryptophanen stark abgeschwächt wird. Die relative Fluoreszenzintensität von Phenylalanin ist noch wesentlich schwächer, was diese Art der Proteindetektion in erster Linie abhängig vom Tryptophangehalt der Aminosäuresequenz macht. Proteine, die keine Tryptophane besitzen, sind zwar über ihre Tyrosine noch detektierbar, die Sensitivität ist aber um mindestens eine Größenordnung vermindert.

In der Natur liegt die durchschnittliche Häufigkeit von Tryptophanen in der Proteinsequenz bei etwa 1 %. Bei einer durchschnittlichen Masse von 120 Da je Aminosäurerest enthält also im Mittel jedes Protein mit einem Molekulargewicht von 12 kDa mindestens einen Tryptophanrest. Da die elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse für Proteine mit Molekulargewichten unter 150 kDa ohnehin kaum möglich ist, erscheint die native Fluoreszenzdetektion als eine geeignete Detektionsmethode für Proteine im Rahmen einer integrierten Umgebung für analytische und EM-gestützte strukturelle Proteomik.

Da zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit noch keine kommerziell erhältliche Plattform für die Anwendung der nativen Fluoreszenzdetektion zur Verfügung stand, wurde in Kollaboration mit der Herolab GmbH (Wiesloch, Deutschland) ein Projekt initiiert, welches vorsah eine Detektionsoptik für die Detektion von Proteinen mittels UV-Licht zu entwickeln und diese anschließend in einen Roboter (Spathunter) zu integrieren. Im Rahmen

dieser Doktorarbeit wurden alle dafür notwendigen biochemischen und biophysikalischen Experimente, sowie im Wesentlichen die wissenschaftliche Planung und Koordination des Projekts am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten werden in den folgenden Abschnitten dokumentiert.

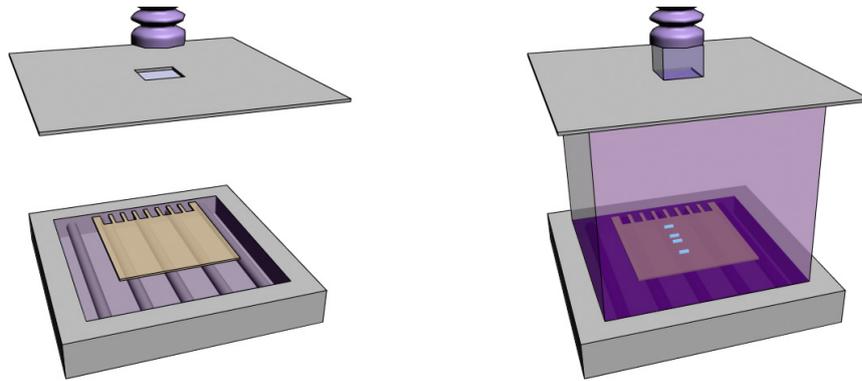


Abbildung 7-1: Schematische Darstellung für eine Apparatur zur nativen Fluoreszenzdetektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Das unbehandelte Gel liegt auf einer Quarzglasplatte oberhalb der Anregungslichtquelle. Je nach Spektralverhalten der Beleuchtung, muss zwischen Lampe und Quarzplatte ein weiterer Excitationsfilter installiert werden, um die Lichtwellenlängen des Detektionsfensters nicht in den von der Kamera abgebildeten Detektionsraum einstrahlen zu lassen. Das emittierte Fluoreszenzlicht der Proteine passiert einen Emissionsfilter, der das Anregungslicht blockt, und wird dann von einer für den UV-Bereich sensiblen CCD-Kamera aufgenommen und das Bild an einen angeschlossenen PC weitergeleitet.

7.1.1 Geplanter Gesamtaufbau

Das Gesamtkonzept der Detektionsapparatur und der Gelprozessierungseinheit sieht eine Integration in ein bestehendes „Spothunter“-Modell der Firma Herolab (Wiesloch, Deutschland) vor. Dieses Gerät ist mit einer Detektionsoptik für handelsübliche Fluoreszenzmarkierungen von Proteinen ausgerüstet, welche im Transmissionsmodus betrieben wird und eine Detektionsfläche von etwa 35x30cm besitzt. Um die Optik auf den Einsatz im UV-Bereich vorzubereiten, ist es nötig das Kameraobjektiv gegen ein UV-durchlässiges Objektiv und die Standardbeleuchtung gegen eine geeignete UV-Lichtquelle zu tauschen. Die verwendete CCD-Kamera (DX2-HC-FW, Kappa, Gleichen, Deutschland) ist sensitiv für Wellenlängen bis hinab zu 280 nm. Das Gel liegt einer mit Glycerin aktiv gekühlten, transparenten Quarzkammer auf, unterhalb derer sich ein Excitationsfilter anbringen lässt. Ebenso ist ein Einschub für einen Emissionsfilter vor dem Kameraobjektiv vorbereitet.

Nach Visualisierung der nativen Proteine im Gel sollen von den fokussierten Banden oder Spots durch Anwendung der in Kapitel 6 beschriebenen Methode zum direkten Transfer von Proteinen auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie entsprechende Proben hergestellt werden. Die Konzeption und der Bau einer entsprechenden robotergestützten Manipulationseinheit zur Durchführung der dafür erforderlichen Arbeitsschritte war nicht mehr Teil der vorliegenden Arbeit, ist jedoch als zweite Entwicklungsstufe geplant.

Das noch im Gel verbliebene Proteinmaterial wird nach der Grid-Blotting-Prozedur von der bestehenden Pickereinheit ausgestanzt und einzeln in Mikrotiterplatten transferiert, um Ausgangsmaterial für massenspektrometrische Analysen zu dessen Proteinkomposition zu gewinnen. Somit stünde eine integrierte Plattform zur gleichzeitigen Gewinnung von Daten über die Identität, stöchiometrische Komposition (bei gleichzeitiger Anwendung quantitativer Massenspektrometrie) und Konformation (bzw. Assoziation bei Proteinkomplexen) von proteinischen Proben zur Verfügung.

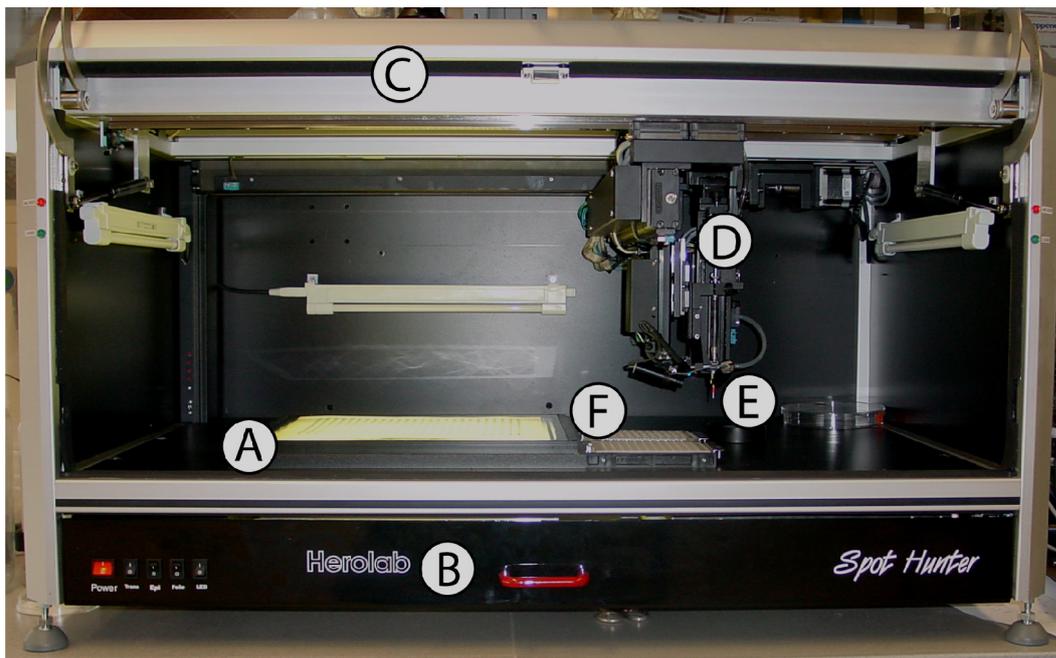


Abbildung 7-2: Innenansicht des „Spothunters“ von Herolab

Bei geöffneter Frontklappe sind die Detektionsplattform und die Gelstanzeinheit sichtbar. Auf der mit Glycerin gekühlten Quarzkammer (A) werden Proteingele platziert und durch eine unterhalb liegende Lichtquelle (B) beleuchtet. Senkrecht über dem Gel befindet sich eine CCD-Kamera mit vorgesetztem Filter (C) zur Visualisierung der Proteine. Das Bild wird direkt zu einem angeschlossenen PC übertragen und dient als Steuerreferenz für die Pickereinheit. Diese ist an einem zweidimensional beweglichen Arm (D) befestigt, der über zwei Schrittmotoren mit einer Genauigkeit $<0,5$ mm positioniert werden kann (siehe hierzu auch Abbildung 7-3). Gelstückchen werden mit einer Edelstahlnadel (E) auf der Detektionsplattform ausgestanzt und in Mikrotiterplatten (F) transferiert.

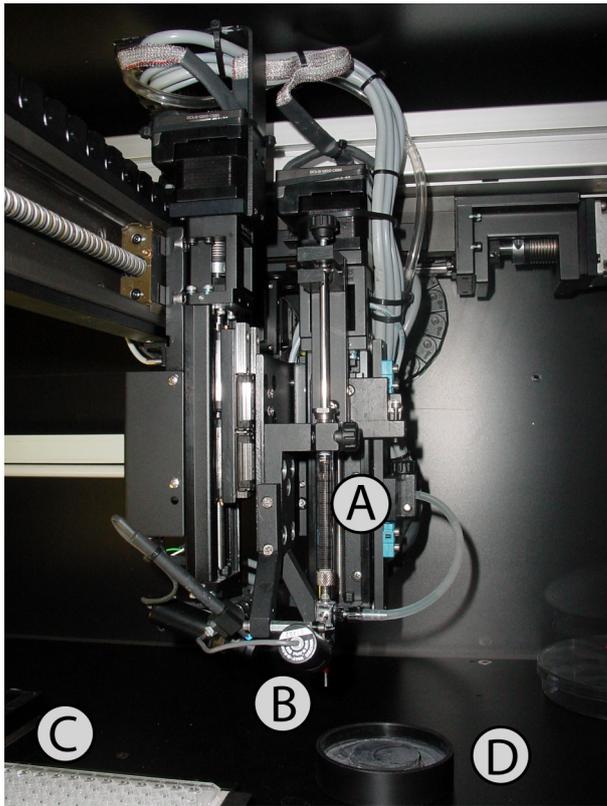


Abbildung 7-3: Detailansicht des xy-steuerbaren Pipettierarmes im „Spot-hunter“
 Der Arm wird in x- und y-Richtung über Schrittmotoren bewegt, die eine Feinpositionierung mit einer Genauigkeit unter 0,5 mm erlaubt. Zur Feinpositionierung sind zwei zueinander rechtwinklig befestigte Minikameras angebracht, die den Bereich der Positionierung der Nadel abbilden. Senkrecht ist eine 10ml Hamiltonspritze angebracht (A), deren Kolbenhub ebenfalls über einen Schrittmotor gesteuert wird. Eine plan abgeschliffene austauschbare Luer-Lock-Nadel (B) ermöglicht sowohl Pipettiervorgänge wie auch das Ausstanzen von kleinen Gelstückchen, die in neben dem Gel positionierte Mikrotiterplatten (C) transferiert werden können. Die Nadel kann nach jedem Arbeitsschritt in einem Becken (D) mit Wasser gespült werden.

7.2 Ergebnisse

7.2.1 Fluoreszenzaktivitätsmessungen

Die Kenntnis über das Absorptions- und Emissionsverhalten der aromatischen Aminosäuren liefert die späteren Kenngrößen für die zu konstruierende Detektionsoptik. Um die entsprechenden Wellenlängenbereiche für Fluoreszenzanregung und Fluoreszenzemission zu bestimmen, wurden die drei aromatischen Aminosäuren einzeln in einer Konzentration von 10 µg/ml in Wasser gelöst. Außerdem wurden zwei Referenzproteine, Tripeptidylpeptidase II aus *D. melanogaster* mit einer durchschnittlichen Anzahl von Tryptophanresten (1%) und 20S Proteasom aus *T. acidophilum*, welches keine Tryptophane besitzt, in einer Konzentration von ebenfalls 10 µg/ml in Wasser gelöst. Die Anregungsspektren wurden durch Messung der Fluoreszenzemission bei konstanter Detektionswellenlänge von 340 nm aufgezeichnet, während die Excitationswellenlänge mit linearer Geschwindigkeit von

120 nm/min von 200 nm bis 320 nm verändert wurde. Für die Emissionsspektren wurde die Anregungswellenlänge konstant bei 230 nm gehalten, während die Detektionswellenlänge mit linearer Geschwindigkeit von 120 nm/min von 280 nm bis 600 nm verändert wurde. Die zur besseren Darstellung auf maximale Intensität normierten Spektren finden sich in Abbildung 7-4 und Abbildung 7-5. Tryptophan zeigt ein sehr breites Anregungsmaximum um 270 nm und ein deutlich schwächeres bei 233 nm. Tyrosin wird hauptsächlich durch Licht mit Wellenlängen um 255 nm angeregt und hat außerdem ein weiteres scharfes Absorptionsmaximum bei 290 nm. Phenylalanin absorbiert stark um 230 nm und 275 nm. Im Gegensatz dazu finden sich bei den Proteinen zwei nahezu gleich starke Absorptionsbereiche um 282 nm und um 235 nm. Obwohl in der Aminosäuresequenz beider Proteine mehrere Tyrosine vorhanden sind, ist die charakteristische Tyrosinabsorption nicht sichtbar.

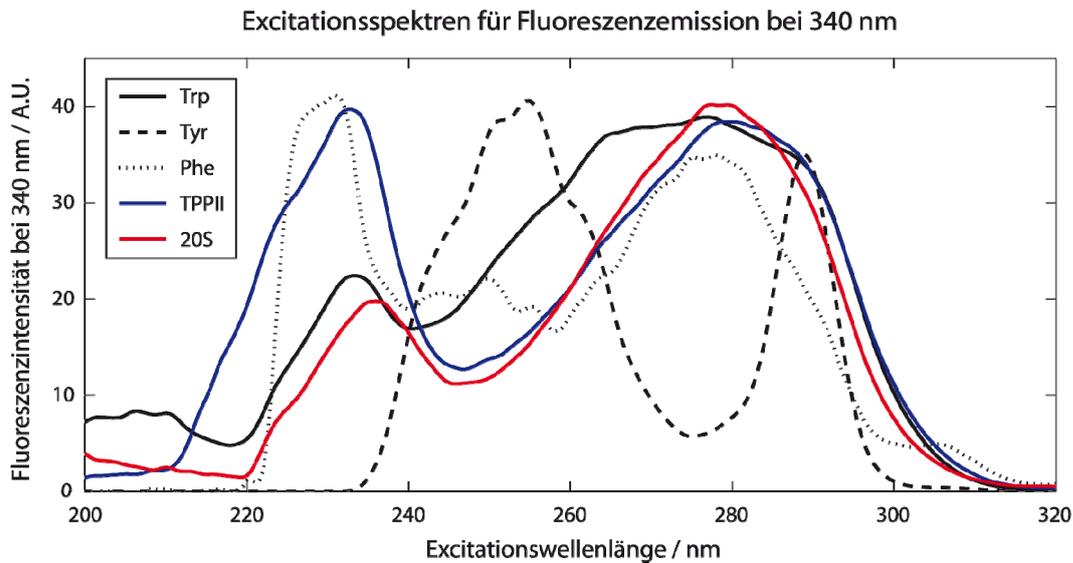


Abbildung 7-4: Excitationsspektren von aromatischen Aminosäuren und Proteinen

Es wurde die Intensität der Fluoreszenzemission bei 340 nm der drei natürlich vorkommenden Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe), sowie der Referenzproteine Tripeptidylpeptidase II (TPPII aus *D. melanogaster* (blau) und 20S Proteasom aus *T. acidophilum* (rot), bei linearer Veränderung der Excitationswellenlänge zwischen 200 und 320 nm gemessen. Die Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin zeigen charakteristische Absorptionen bei 280 und 230 nm, welche in der Peptidsequenz von Proteinen durch die gegenüber reinem Wasser veränderte chemische Umgebung leicht rotverschoben werden. Die charakteristische Absorption von Tyrosin bei 255 nm findet sich im proteinischen Spektrum nicht wieder, lediglich das schmale Absorptionsmaximum bei 290 nm ist als angegedeutete Schulter bei TPPII und dem 20S Proteasom noch zu erkennen.

Die Emissionsspektren der drei Aminosäuren sind deutlich breiter. Tryptophan fluoresziert bei einer Wellenlänge von 355 nm maximal, die Emissionsmaxima von Tyrosin und

Phenylalanin liegen bei entsprechend 305 und 295 nm. Die Emission von TPPII erscheint gegenüber der reinen Tryptophanemission leicht blauverschoben, mit einem Maximum bei 340nm, während das Emissionsspektrum vom 20S Proteasom, welches keine Tryptophane besitzt, stark dem von reinem Tyrosin ähnelt.

Um weiterhin sicherzustellen, dass die für die Experimente verwendeten verschiedenen wässrigen Puffersysteme keinen weitergehenden Einfluss auf die Fluoreszenzemission haben, wurden außerdem von bovinem Serumalbumin (BSA) Emissionsspektren in unterschiedlichen Puffersystemen aufgenommen. Diese Emissionsspektren sind jedoch nahezu identisch, so dass eine Fluoreszenzverschiebung durch diese Puffer ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Spektren, dass sich die zu detektierenden Analyte in einem Wellenlängenbereich von etwa 230 bis 295 nm anregen lassen. Speziell für Protein-gebundene aromatische Aminosäuren lassen sich zwei Anregungsfenster um 280 nm und 230 nm definieren. Das daraufhin emittierte Fluoreszenzlicht ist in einem Wellenlängenbereich von etwa 290 bis 400 nm detektierbar.

Die Proteine liegen zum Zeitpunkt der Detektion nicht isoliert in wässriger Lösung vor, sondern sind in einer offenporigen Gelmatrix, bestehend aus Polyacrylamid, eingebettet. Wie weitere Messungen gezeigt haben, absorbiert die Matrix selbst in ähnlichen Wellenlängenbereichen wie die Analyte (siehe Abbildung 7-6). Es existiert ein Anregungsmaximum bei 295 nm, welches stark mit dem von Proteinen überlappt, einhergehend mit einem dazu gehörigen Fluoreszenzmissionsmaximum bei 410 nm. Diese Fluoreszenz ist selbst bei 360 nm noch sehr stark. Im kürzerwelligen Bereich hingegen, bei Wellenlängen kleiner als 230 nm, wird ein sehr breites Fluoreszenzspektrum angeregt, welches eine eventuell vorhandene Proteinfluoreszenz völlig überdecken würde. Dabei spielt in erster Linie die deutlich höhere lokale Konzentration des Polyacrylamids, die in einem typischen Trenngel für denaturierte Proteine zwischen 4 und 12 Gewichtsprozent liegt, verglichen zu etwa 150 µg/ml für die fokussierten Proteinbanden, eine große Rolle. Die absolute Fluoreszenzintensität der Matrix ist um mindestens eine Zehnerpotenz stärker. Da die Fluoreszenzanregung der Proteine nicht sauber von der der Gelmatrix getrennt werden kann, ist damit auch der für die Detektion der Proteine nutzbare Wellenlängenbereich beschränkt. Das optimale Fenster für die Fluoreszenzanregung liegt somit zwischen 240 und maximal 300 nm, dasjenige für die Detektion zwischen etwa 310 und 370 nm. Das ist etwas schmalbandiger als der Filter, den Roegerer *et al.* für ihre Experimente verwendet haben, welcher transmissiv zwischen 300 und 375 nm ist.

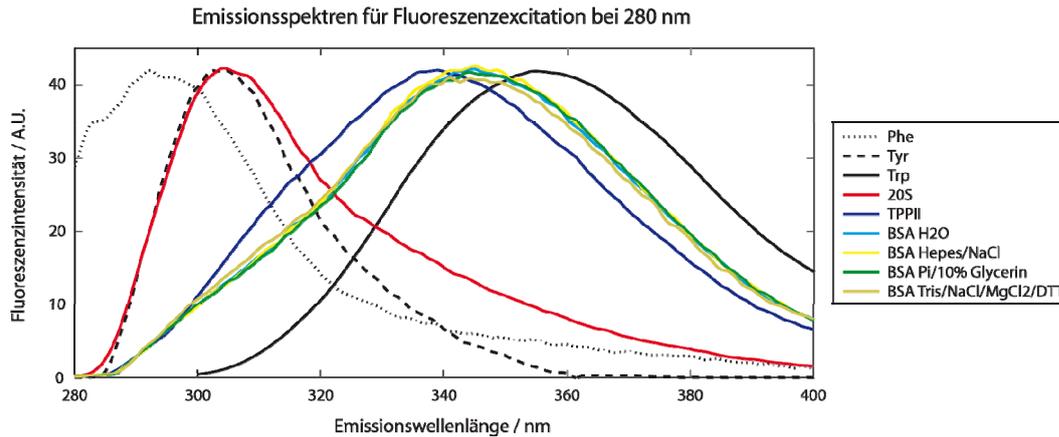


Abbildung 7-5: Emissionsspektren von aromatischen Aminosäuren und Proteinen

Es wurde die Intensität der Fluoreszenzemission der drei natürlich vorkommenden Aminosäuren Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr) und Phenylalanin (Phe), sowie der Referenzproteine TPPII aus *D. melanogaster* (blau), 20S Proteasom aus *T. acidophilum* (rot) und BSA (gelb bis grün) bei konstant gehaltener Anregungswellenlänge von 230 nm über einen Detektionswellenlängenbereich von 260 bis 400 nm gemessen. Die Fluoreszenz von in der Peptidkette gebundenem Tryptophan, welche den Hauptanteil der proteinischen intrinsischen Fluoreszenzaktivität ausmacht, ist gegenüber freiem Tryptophan leicht blauverschoben und fluoresziert bei etwa 340 nm maximal. Wie hier am Beispiel von BSA gezeigt, haben die in dieser Arbeit verwendeten unterschiedlichen Puffersysteme keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinfluoreszenz. Das Spektrum des 20S Proteasoms, welches keine Tryptophanreste enthält, ähnelt stark dem von Tyrosin, wiewohl der Abfall der Fluoreszenzintensität mit höheren Wellenlängen nicht ganz so steil erfolgt. Dies ermöglicht im Bereich um 340 nm selbst die Detektion von Proteinen, die nur Tyrosine und/oder Phenylalanine enthalten, wenn auch mit verminderter Sensitivität.

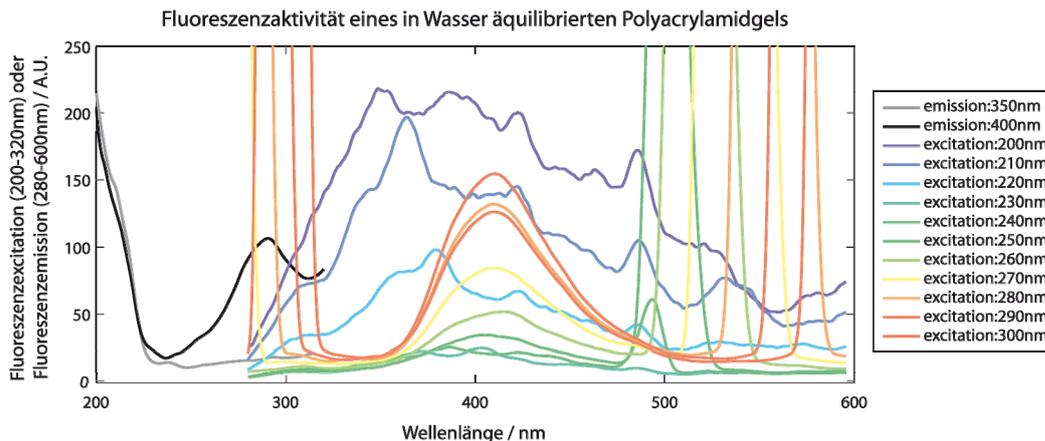


Abbildung 7-6: Intrinsische Fluoreszenz von Polyacrylamidgelen

Bei der für Proteintrenngele verwendete Polyacrylamidmatrix lässt sich durch Anregungswellenlängen von 260 bis 310 nm eine starke Fluoreszenz im Bereich von 370 nm bis 470 nm anregen. Anregungslicht mit Wellenlängen kleiner als 230 nm erzeugt eine intensive, fast das gesamte Spektrum bis 550 nm abdeckende Fluoreszenz, weswegen dieser Teil des theoretisch möglichen Anregungsspektrums für die Detektion von Proteinen nicht genutzt werden kann.

7.2.2 Lichtquelle

Die Wahl einer geeigneten Lichtquelle für ein integriertes Detektions- und Picksystem musste sorgfältig abgewogen werden und gestaltete sich schwieriger als zunächst vermutet. Zu berücksichtigen ist dabei insbesondere, dass sich die Trenngele nach Beendigung der Gelelektrophorese mit der Zeit stetig verändern. Zum einen können die vormals fokussierten Proteine innerhalb der Gelmatrix diffundieren, wodurch einerseits die maximale lokale Proteinkonzentration abnimmt und andererseits die Trennschärfe zwischen benachbarten Proteinen sinkt. Zum anderen verdunstet kontinuierlich Wasser aus der Gelmatrix, die daraufhin progressiv schrumpft, was zu Problemen bei der Prozessierung des Gels nach der Detektion führen kann. Das Einbringen von Wasser zur Befeuchtung befördert wiederum die Diffusionseffekte. Es ist also essentiell, die Zeit zur Abbildung der Proteinbanden so kurz wie möglich zu halten.

Roegener *et al.* verwendeten in ihrem Versuchsaufbau einen UV-Laser mit einer Hauptemission von 280 nm Wellenlänge mit 35 mW/cm² Beleuchtungsstärke direkt auf dem Gel. Ein solcher Laser ist allerdings zum Einen verhältnismäßig teuer in der Anschaffung und benötigt regelmäßige Wartung in relativ kurzen Zeitintervallen. Zum Zweiten lässt sich mit einem Laser keine flächige Beleuchtung realisieren, sondern es ist zusätzlich eine Mechanik zum Abrastern des Gels mit einem maximalen Flächenmaß von etwa 1 cm² erforderlich. Ein in allen Spuren beladenes Blotgel (siehe Abschnitt 6) hat eine Dimension von etwa 10 x 10 cm, erfordert also schon 100 Einzelbilder pro Gel, die anschließend koordinatengetreu zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden müssen. Die von Roegener *et al.* genutzte Dosisleistung muss möglicherweise zudem gesenkt werden, um die Proteine nicht irreversibel durch die harte UV-Strahlung zu schädigen. Das würde die Aquisitionsdauer je Einzelbild zusätzlich erhöhen. Da in der Zukunft durch das System allerdings auch Trenngele mit bis zu 25 x 25 cm prozessiert werden sollen, ist der so zu erwartende Zeitaufwand für die Detektion unverhältnismäßig hoch.

Idealerweise lässt sich eine Lichtquelle finden, die die gesamte Gelfläche homogen ausleuchtet und mit einer Einzelbelichtung das gesamte Gel erfasst. Da für die Fluoreszenzanregung nur der Wellenlängenbereich von 230 nm bis etwa 300 nm genutzt werden kann, sind jedoch der Verwendung herkömmlicher Lampen Grenzen gesetzt. Abbildung 7-7 zeigt die spektrale Leuchtkraftverteilung von Standardhalogenlampen, Xenonlampen, dotierten

Quecksilberdampfstrahlern und Deuteriumlampen. Letztere emittieren zwar nahezu ausschließlich im gewünschten UV-Bereich, erreichen dabei aber nur schwache Intensitäten. Die Halogenlampen emittieren zwar speziell im Bereich um 280 nm Wellenlänge etwas mehr Licht als Deuteriumlampen, jedoch liegt der Hauptanteil des emittierten Spektrums im sichtbaren Licht und Infrarotbereich. Der relevante Spektralbereich zwischen 230 und 300 nm macht insgesamt weniger als 1 % der Gesamtlichtleistung aus. Verschieden dotierte Quecksilberdampflampen, die in der Industrie standardmäßig als UV-Lichtquellen, beispielsweise zum Härten von Lacken, verwendet werden, erreichen einen UV-Anteil von bis zu 20 % [Stowe 1998]. Zudem ist die Strahlungsleistung um eine Zehnerpotenz größer als bei Halogenlampen.

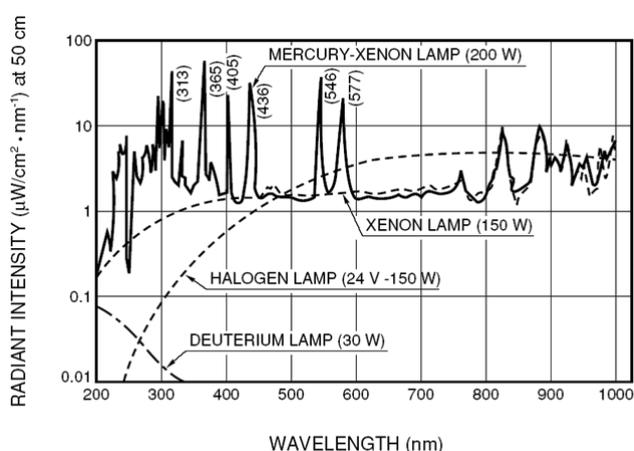


Abbildung 7-7: Spektralverteilung verschiedener Lichtquellen

Für verschiedene Lampentypen sind deren charakteristische Spektralverteilungen gezeigt. Einzig Quecksilberdampflampen (z.B. Quecksilber-Xenon-Strahler) emittieren einen signifikanten Anteil ihres Spektrums im UV-Bereich, der für die Anregung von proteinischer Fluoreszenz notwendig ist. Deuteriumlampen emittieren zwar nahezu ausschließlich im UV, erreichen aber nicht annähernd Intensitäten um kurze Belichtungszeiten zu ermöglichen. Konventionelle Halogen- und Xenonlampen emittieren in ihrem gesamten Spektrum nur wenig UV-Licht. (Abbildung von Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan)

Für einige der in Abschnitt 7.2.5 gezeigten Detektionsbeispiele kam eine Mitteldruck-Quecksilberdampflampe mit 200 W zum Einsatz (siehe Abbildung 7-8). Die Beleuchtungsstärke bei einem Abstand von 50 cm zwischen Lampe und Gel variierte je nach eingesetzten Excitations- und Emissionsfiltern zwischen etwa 0,1 und 15 mW/cm² und ist damit schon deutlich schwächer als ein UV-Laser. Mit einer entsprechenden Gainkorrektur ließ sich eine homogene Ausleuchtung der Detektionsfläche realisieren. Die hohe anfallende Abwärmeleistung konnte durch eine möglichst weit vom Gel entfernte Positionierung in einem erträglichen Rahmen gehalten werden.

Wie in Abbildung 7-9 gezeigt, konnte der unerwünschte Spektralanteil dieser Lampe nochmals deutlich durch eine dichroitische Beschichtung auf Basis von Aluminiumoxiden reduziert werden. In dieser Konfiguration wurde schließlich eine maximale Sensitivität von etwa 250 ng BSA in einer Proteinbande erreicht (siehe auch Abbildung 7-17D).

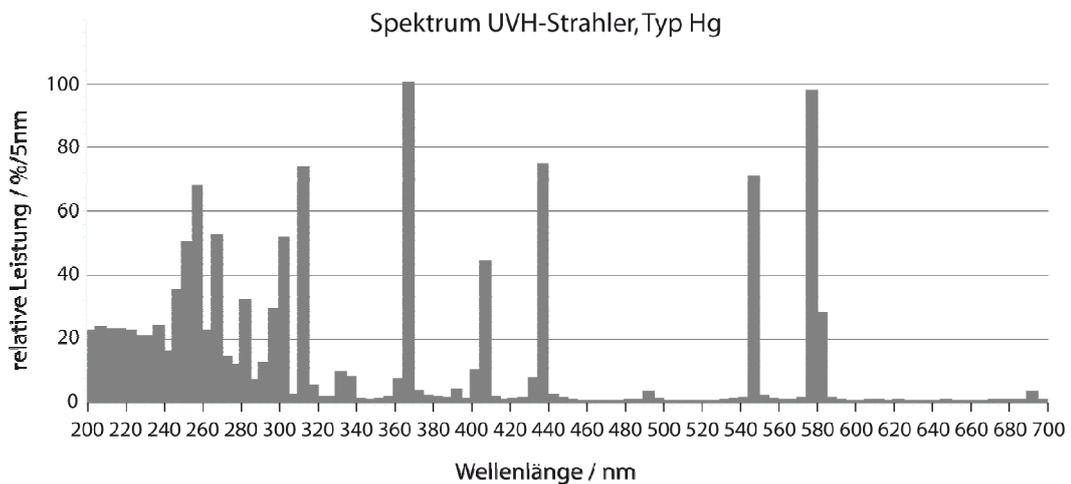


Abbildung 7-8: Spektralverteilung des verwendeten Quecksilber-Mitteldruckstrahlers

Quecksilberdampf lampen emittieren fast ihre gesamte Energie im fernen und mittleren UV-Bereich. Bei Wellenlängen größer als 320 nm gibt es allerdings noch weitere starke Spektrallinien, die durch geeignete Filter aus dem Anregungslicht herausgefiltert werden müssen (adaptiert von UV-Technik Meyer GmbH, Ortenberg/Bleichenbach, Deutschland).

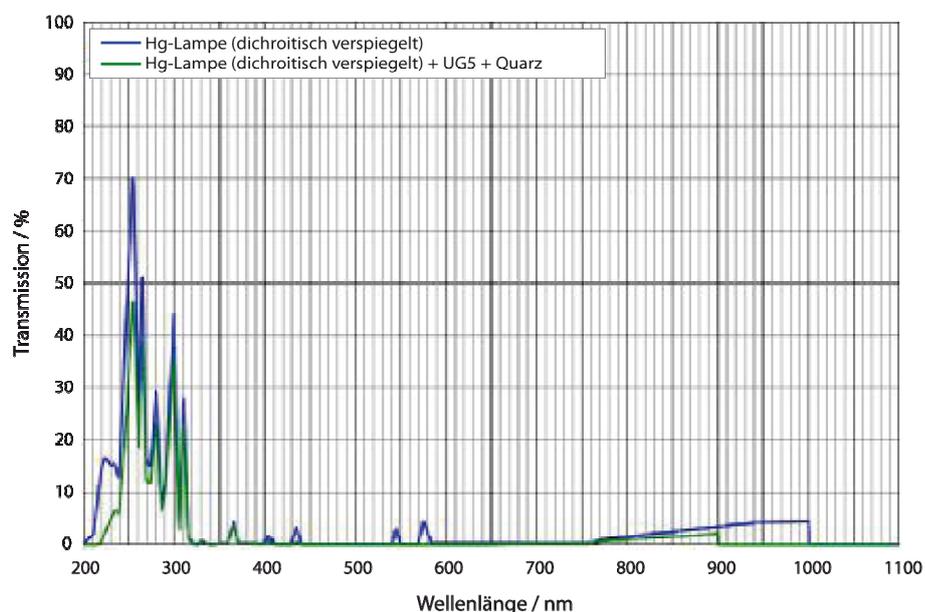


Abbildung 7-9: Spektralverteilung des dichroitisch beschichteten Quecksilber-Mitteldruckstrahlers

Die dichroitische Beschichtung drückt die höherwelligen Spektralemissionen der Quecksilberdampf lampen deutlich unter 10 Prozent (blaue Kurve). Zum direkten Vergleich ist dazu das Spektrum der unbeschichteten Lampe gezeigt (grüne Kurve). In Verbindung mit einem UG5-Anregungsfilter und der Quarzplatte, auf der das Gel aufliegt (siehe Abbildung 7-16), sinkt die Intensität dieses höherwelligen Lichts schließlich auf einen minimalen Wert.

Seit 2004 gibt es auch die Möglichkeit mittels LEDs spektral sehr reines UV-Licht, bis hinab zu einer Wellenlänge von 250 nm, zu erzeugen [Zhang *et al.* 2003; Sun *et al.* 2004]. In der Hoffnung die Detektionssensitivität durch eine Erhöhung der für die Fluoreszenzanregung optimalen 280 nm-Emission signifikant steigern zu können, wurden Versuche mit UV-TOP280-LEDs (Seoul Optodevice Co. Ltd., Seoul, Südkorea) unternommen. Diese LEDs haben einen klar definierten Emissionspeak bei 280 nm bei einer Intensitätshalbwertsbreite von 5 nm (siehe Abbildung 7-10A). Vier dieser LEDs wurden in einem 2x2 Raster mit einem Abstand von 1,5 cm zwischen den Mittelpunkten der LEDs angeordnet und dieses LED-Gitter zur Anregung von Proteingelen verwendet. Die erreichte Beleuchtungsstärke auf dem Gel bei einem Abstand von 50 cm lag zwischen 0,2 und 2 mW/cm² und damit etwa im gleichen Bereich wie die Quecksilberdampfampe. Im Gegensatz zu dieser haben die LEDs allerdings den Vorteil, dass die gesamte emittierte UV-Intensität im für die Aromatenabsorption günstigen Wellenlängenbereich um 280 nm liegt, die Beleuchtungseffizienz also höher ist.

Bei der Verwendung von LEDs gibt es jedoch auch bedeutende Nachteile. Eine LED hat einen Durchmesser von nur 3 mm und ist damit kaum geeignet, eine große Fläche zu beleuchten. Dafür lässt sich allenfalls ein LED-Gitter verwenden. Flache UV-LEDs haben einen weiten Abstrahlwinkel von +/- 40° und weisen über diesen Winkelbereich einen annähernd homogenen Lichtfluss auf. Mit einer Gainkorrektur sollte es somit möglich sein, ohne zusätzliche Dissipationslinse ein LED-Gitter mit einem Gitterabstand von 1,5 cm für eine Flächenbeleuchtung einzusetzen. Bei einer Detektionsfläche von 25 x 25 cm wären dafür 256 LEDs vonnöten; bei einem derzeitigen Stückpreis von etwa 300 Euro bedeutet dies bereits Gesamtkosten von 75.000 Euro.

Gravierend ist außerdem die Degradation des Diodenmaterials und der damit einhergehende Abfall der Leuchtkraft [Gong *et al.* 2006]. Messungen des Herstellers ergeben eine Reduktion der Lichtintensität um bereits 10 Prozent innerhalb der ersten 10 Betriebsstunden. Nach etwa 300 Betriebsstunden sind 50 Prozent der initialen Intensität eingebüßt (siehe Abbildung 7-11). Damit entbehrt der Einsatz von UV-LEDs für die native Fluoreszenzdetektion derzeit jeder wirtschaftlichen Rechtfertigung. Sollten sich in der Zukunft widerstandsfähigere LEDs erzeugen lassen, wären diese natürlich allein schon wegen ihrer spektralen Reinheit weiterhin für den Zweck der nativen Fluoreszenzdetektion interessant.

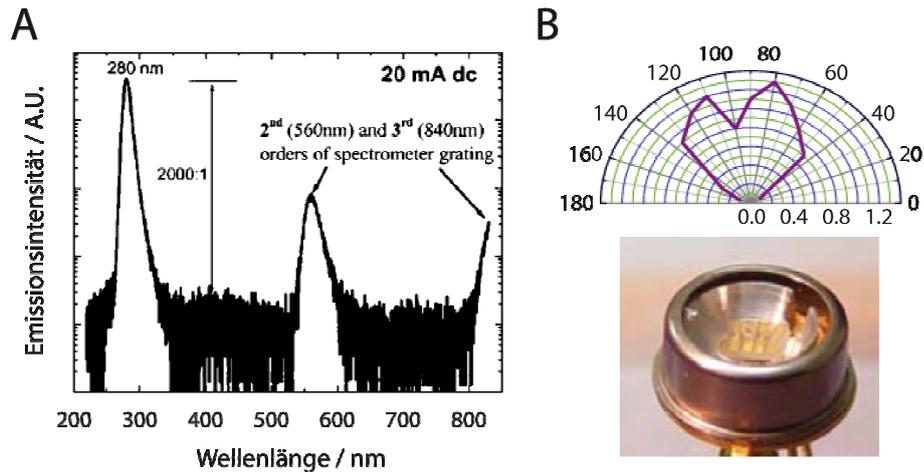


Abbildung 7-10: Foto einer UV-LED mit flachem Sichtfenster und deren räumliche Abstrahlcharakteristik

UV-LEDs besitzen ein sehr schmales Emissionsband, hier gezeigt für eine in Versuchen dieser Arbeit verwendete UV-LED mit einem Emissionsmaximum von 280nm, dessen Intensität bis zu vier Zehnerpotenzen über der spektralen Hintergrundstrahlung liegt. (A, adaptiert aus [Sun, Zhang *et al.* 2004]) Bei einer Ausrichtung von $90\pm 40^\circ$ liegt die abgestrahlte UV-Lichtintensität bei mindestens 50 Prozent der maximalen UV-Leistung. Bei bestimmten Winkeln, im gezeigten Beispiel bei 100° , kann es durch die baubedingte Geometrie der Diode zu Abschattungen kommen. (B, adaptiert von Sensor Electronic Inc., Columbia, USA)

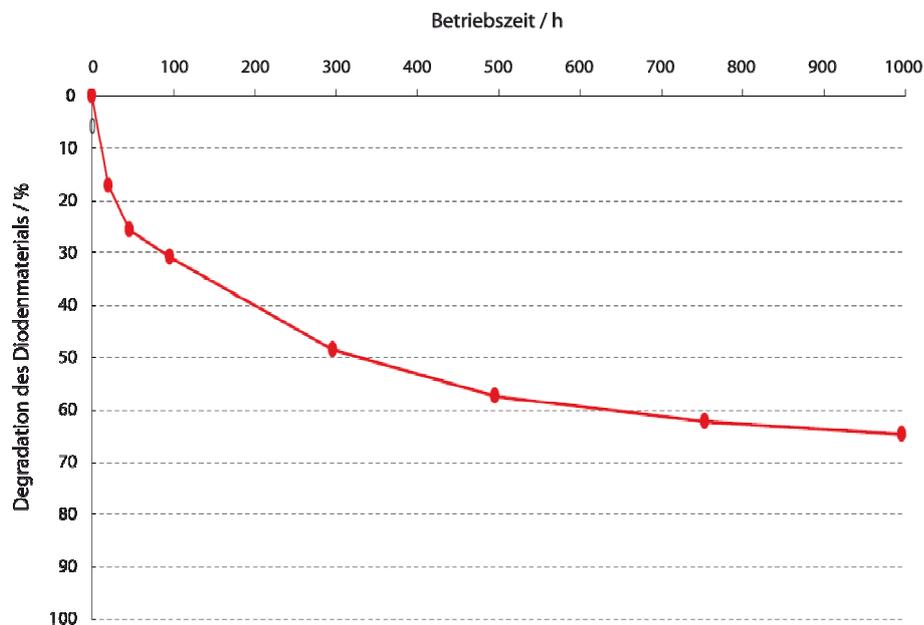


Abbildung 7-11: Degradation und Verlust der Lichtleistung von UV-LEDs nach Betriebsstunden

Dargestellt ist der Verlust an Lichtleistung in Abhängigkeit von der Betriebsdauer von UV-TOP280-LEDs. Bereits nach etwa 10 Betriebstunden sind 10 %, nach etwa 300 h schon 50 %, der Lichtleistung eingebüßt. Die harte UV-Strahlung setzt degradative Prozesse im Diodenmaterial Gang, die bereits nach kurzer Zeit zu einer deutlichen, irreversiblen Abnahme der emittierten UV-Lichtleistung führen (adaptiert von Seoul Optodevice Co. Ltd, Seoul, Südkorea).

7.2.3 Emissionsfilter

Um das emittierte Fluoreszenzlicht möglichst frei von Signalanteilen des Anregungslichts aufzunehmen, wird ein Emissionsfilter vor dem Kameraobjektiv montiert. In den durchgeführten Versuchen wurden zwei verschiedene Filter verwendet. In ersten Experimenten kam eine Filterkombination aus einem UG11- und einem BG40-Filter zum Einsatz, die gemeinsam Licht mit Wellenlängen zwischen 310 und 390 nm passieren lassen (siehe Abbildung 7-12).

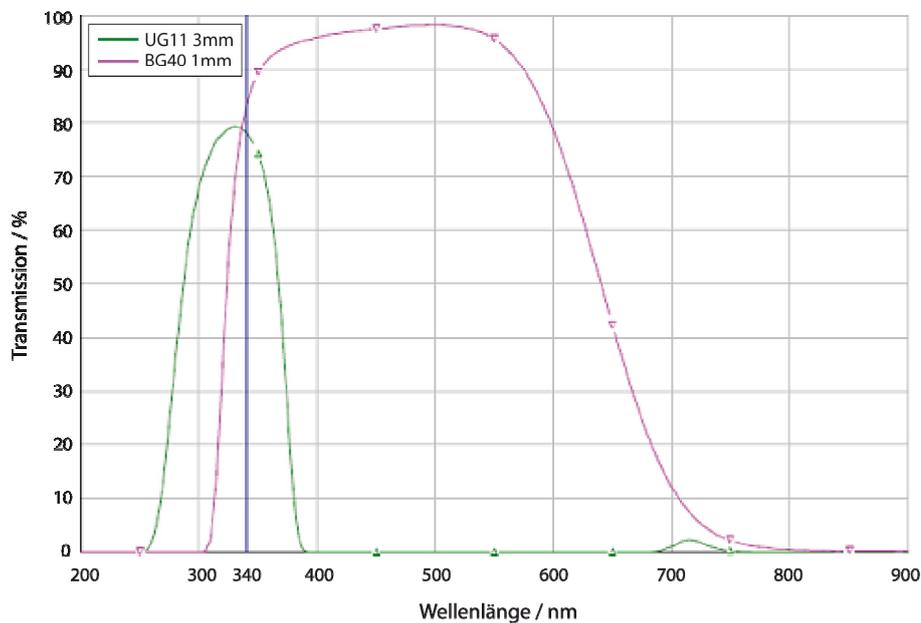


Abbildung 7-12: Transmissionsprofile der UG11/BG40 Emissionsfilterkombination

Dargestellt sind Transmissionsprofile von einem UG11- und einem BG40-Bandpassfilter. Die parallele Verwendung eines 3 mm UG11- und eines 1 mm BG40-Filters schränkt die Transmission auf ein Wellenlängenfenster zwischen etwa 310 und 390 nm ein.

Da allerdings durch diese Filterkombination das Gelbfluoreszenzsignal ebenfalls in beträchtlichem Maße zur CCD-Kamera durchgelassen wird, wurde für spätere Experimente ein etwas schmalbandigerer DAPI-Filter verwendet, der für Licht mit Wellenlängen zwischen etwa 320 und 375 nm maximal durchlässig ist und im Anregungswellenlängenbereich zwischen 230 und 300 nm sowie im sichtbaren Wellenlängenbereich oberhalb des Detektionsfensters eine Transmissivität $<0,1\%$ besitzt (siehe Abbildung 7-13). Dieser Filter unterdrückt weitestgehend die Fluoreszenz der Polyacrylamidmatrix.

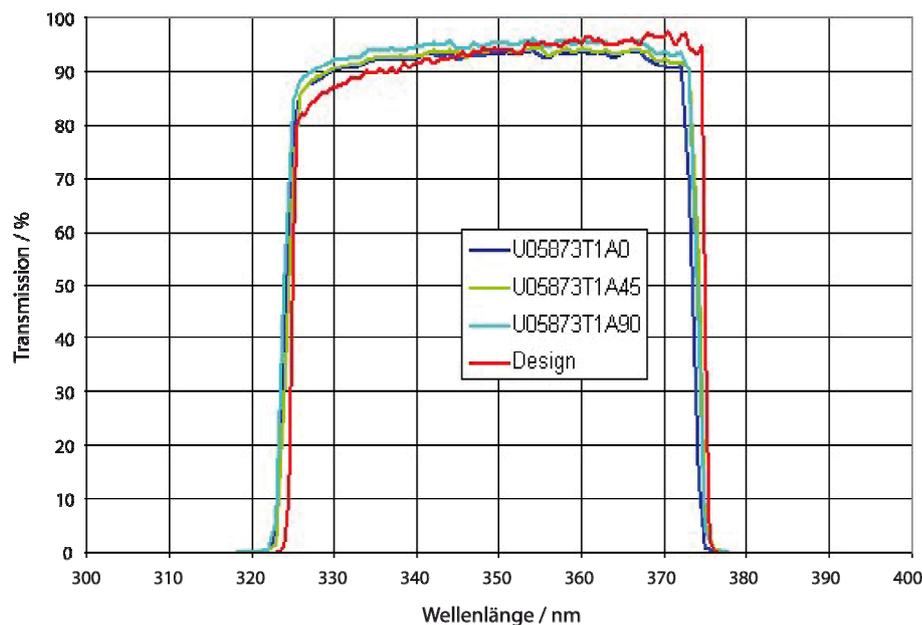


Abbildung 7-13: Transmissionsprofil des DAPI-Anregungswellenlängenfilters

Dargestellt ist das Transmissionsprofil eines DAPI-Anregungsfilters. Dieser Filter, der in der Regel bei der Fluoreszenzmikroskopie als Excitationsfilter für den fluoreszierenden Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) eingesetzt wird, wurde als Emissionsfilter vor der CCD-Kamera montiert, um das Anregungslicht der UV-Lichtquelle aus dem Signal zu entfernen. Er ist durchlässig für Licht der Wellenlängen von 322 bis 376 nm und hat im fernen UV-Bereich eine Transmissivität <0,1 %. Im Vergleich mit der UG11/BG40-Filterkombination sollte dieser Filter die störende Polyacrylamidfluoreszenz besser unterdrücken.

7.2.4 Excitationsfilter

Excitationsfilter waren nötig, um Lichtemissionen bei 335 und 370 nm der unverspiegelten Quecksilberdampfampe auszublenden. Hierfür wurde zunächst ein großflächiger Filter mit einer Grundfläche von 13 x 13 cm produziert, der ein Transmissionsmaximum bei 282 nm, das Optimum der Tryptophananregung in Proteinen, bei einer Peakhalbwertsbreite von 8 nm besitzt. Jedoch war die Detektionssensitivität bei der Verwendung dieses Filters erstaunlich gering. Eine leichte Abschwächung der Fluoreszenzintensität durch die verminderte Anregungslichtleistung war zwar zu erwarten, aber dieser Filter weist, wie weitere Messungen gezeigt haben, außerdem noch eine erhebliche Winkelabhängigkeit der Transmission auf (siehe Abbildung 7-15). Bedingt durch die Geometrie des Prototypenaufbaus traf das Anregungslicht nicht völlig senkrecht auf den Filter, wodurch das Transmissionsmaximum zu kürzeren Lichtwellenlängen verschoben wurde. Damit einher geht eine zusätzliche Abnahme der detektierbaren Proteinfluoreszenz, weil diese nicht mehr so effektiv angeregt werden kann (siehe auch Abbildung 7-17C).

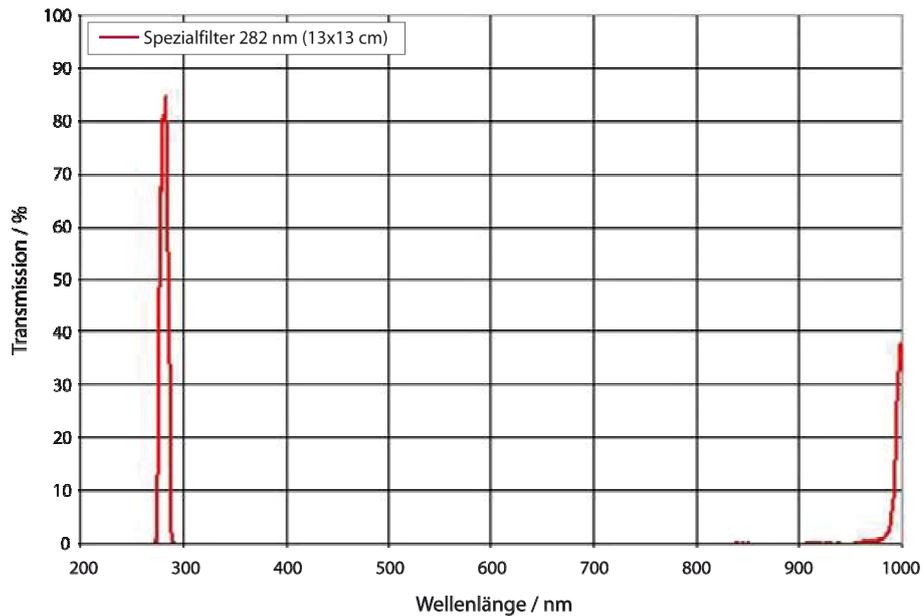


Abbildung 7-14: Transmissionsprofil des auftragsgefertigten 13 x 13 cm Excitationsfilters

Der Filter erreicht bis zu 90 % Transmissivität bei 282 nm und begrenzt damit das Fluoreszenzanregungslicht sehr scharf auf das Absorptionsmaximum der proteingebundenen Tryptophane.

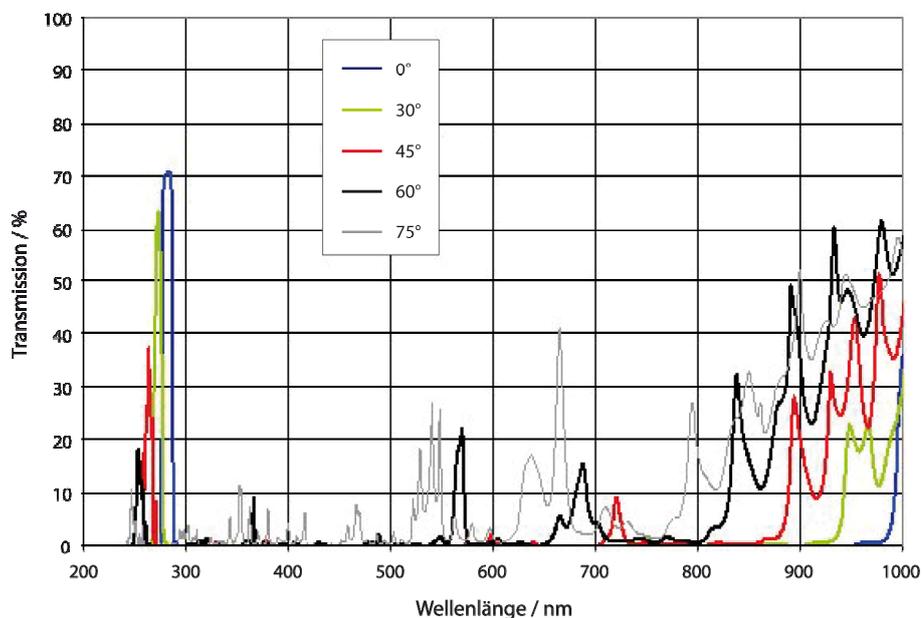


Abbildung 7-15: Winkelabhängigkeit der Filtertransmission des 13 x 13 cm Excitationsfilters

Das in Abbildung 7-14 gezeigte Transmissionsprofil verändert sich bei Abweichungen des Lichteintritts von der geometrischen Senkrechten. Das Transmissionsmaximum wird von 282 nm hin zu kleineren Wellenlängen verschoben. Zudem sinkt die maximale Transmissivität von etwa 70 % bei höheren Winkeln deutlich ab.

Aus diesem Grund wurde schließlich ein UG5-Filter als Excitationsfilter verwendet. Dessen Transmissivität ist zwar selbst im Detektionswellenlängenbereich noch maximal, bei Verwendung der dichroitisch beschichteten Lampe (siehe Abschnitt 7.2.2) wird jedoch kaum Licht höherer Wellenlänge als 310 nm emittiert. Der Filter dient in diesem Falle in erster Linie der Unterdrückung des fernen Ende des UV-Spektrums bis 230 nm. Dieser Effekt wird noch leicht durch die Quarzplatte verstärkt. Die entsprechenden Transmissionsspektren sind in Abbildung 7-16 zu finden.

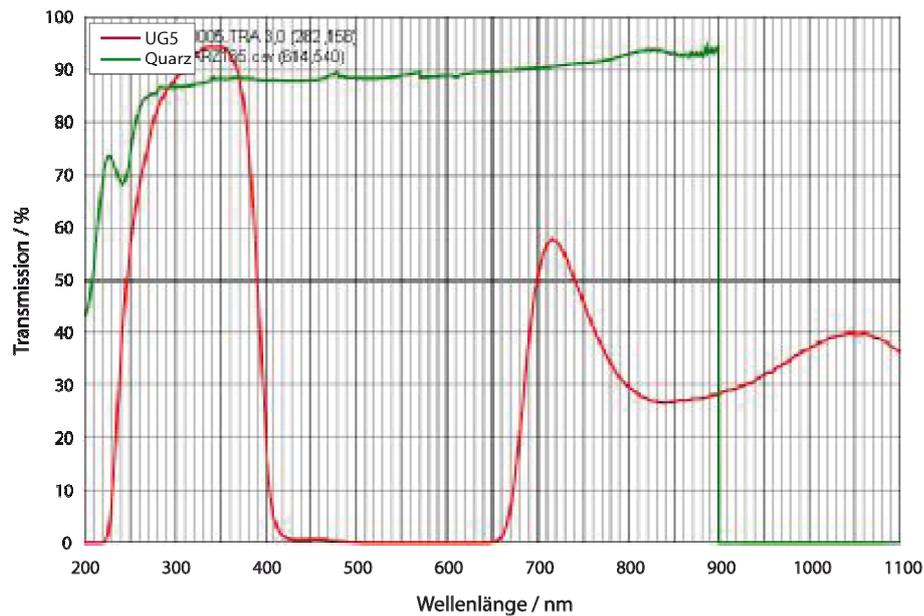


Abbildung 7-16: Transmissionsspektren für reines Quarzglas und einen UG5-Anregungsfilter

Dargestellt sind Transmissionsprofile von einem UG5-Filter und einer 0,3 cm dicken Quarzglasplatte. Der UG5-Filter ist in Verbindung mit der dichroitisch beschichteten Quecksilberdampfampe ausreichend, um eine effektive Beleuchtung zwischen 230 und 310 nm zu gewährleisten und sorgt dafür, dass die breitbandige Fluoreszenz der Gele durch Anregung bei Wellenlängen <230 nm vermieden wird. Die Quarzplatte als Gelträger verstärkt diesen Effekt sogar noch leicht, da sie selbst bis zu einer Wellenlänge von 250 nm für maximal 80 % des Lichts durchgängig ist.

7.2.5 Erreichte Nachweisgrenzen in denaturierenden Gelen

Die Fortschritte bei der Geräteentwicklung für native Fluoreszenzdetektion wurden in den einzelnen Phasen des Projekts durch die Visualisierung von Referenzproteinen auf denaturierenden SDS-PAGE-Gelen dokumentiert (siehe Abbildung 7-17). Für die ersten Versuche wurden Geltaschen mit jeweils 1 und 10 µg BSA beladen, um möglichst komplikationsfrei verschiedene Aufbauten testen zu können. In späteren Stadien wurden die

Gele mit seriellen Verdünnungen von BSA beladen, um Aussagen über die Sensitivität der Detektion treffen zu können.

Die ersten vielversprechenden Gelaufnahmen wurden mit UV-LEDs (s. auch Abschnitt 7.2.2) gemacht. Insgesamt vier LEDs wurden in den Ecken eines Quadrats mit 1,5 cm Kantenlänge montiert und mit einer Stromquelle verbunden. Da sich mit vier LEDs keine flächige Beleuchtung im Transmissionsmodus realisieren lässt, entstanden diese Aufnahmen unter Epillumination. Die LEDs werden dafür in einem Winkel von etwa 30° aus der Lotrechten befestigt und strahlen somit leicht seitlich aus einer Höhe von etwa 30 cm auf das auf einer Quarzplatte liegende Gel. Die Kamera befindet sich senkrecht in einem Abstand von etwa 50 cm über dem Gel und ist wechselweise ohne und mit Emissionsfilter bestückt (siehe Abbildung 7-17A und B). Deutlich sichtbar sind in beiden Fällen die 10 µg BSA-Banden, die 1 µg Banden jedoch nur relativ schwach. In Abbildung 7-17A wurde ohne Emissionsfilter aufgenommen, die LEDs wurden so ausgerichtet, dass keine direkten Reflektionen des Anregungslichts in die Kamera gelangen konnten. Deutlich sichtbar und als Hintergrund störend sind die hellen Bereiche am unteren Ende des Gels, welche der intrinsischen Gelfluoreszenz entsprechen. Die absolute Stärke der Gelfluoreszenz wird offensichtlich, wenn man das LED-Gitter direkt auf das Gel richtet und lediglich das reflektierte Licht durch einen UG5-Emissionsfilter vor der Kamera blockt (siehe Abbildung 7-17B). Die Intensität der Gelfluoreszenz liegt um mindestens einen Faktor 20 höher, als die Proteinfluoreszenz in der 10 µg BSA-Bande.

Da sich wie in Abschnitt 7.2.2 beschrieben die UV-LEDs als zu kurzlebig und unpraktisch erwiesen wurden, die LEDs in folgenden Versuchen durch eine Quecksilberdampfampe mit 200 W Leistung ersetzt. In Abbildung 7-17C ist eine serielle BSA-Verdünnungsreihe, beginnend mit 8 µg Protein in der ersten Gelspur, visualisiert. Für dieses Experiment wurde als Excitationsfilter der in Abbildung 7-14/Abbildung 7-15 beschriebene schmalbandige Filter bei 282 nm eingesetzt. Als Emission wurde eine Kombination aus einem UG11- und einem BG40-Filter verwendet. Es wurde deutlich, dass die Anregungslichtleistung, die das Gel erreicht, für praktische Zwecke zu gering ist. Die minimal detektierbare Menge von BSA lag bei 1 µg und damit um ein bis zwei Größenordnungen schlechter als eine klassische Färbung mit Coomassie G250. Zudem stellte sich heraus, dass die Anisotropie des Excitationsfilters dazu führt, dass höhere Lichtwellenlängen der Lampe den Filter passieren können und sich so die Röhrenform der Lampe als horizontaler heller Streifen auf der CCD-Kamera abbildet.

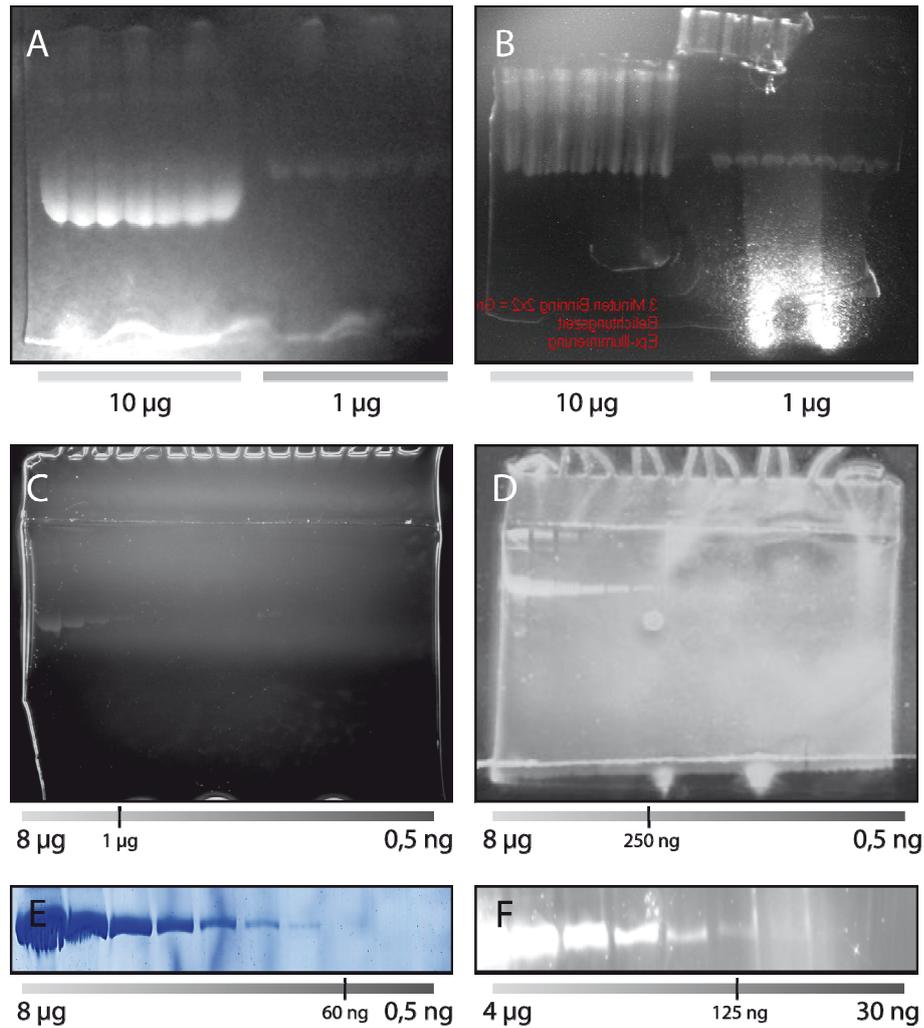


Abbildung 7-17: Erreichte Nachweisgrenzen für BSA in Polyacrylamidgelen mittels Fluoreszenzdetektion

Exemplarisch seien hier Visualisierungen von BSA in Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Aufbauten für die native Fluoreszenzdetektion gezeigt (A bis D) und die erreichte Sensitivität mit konventioneller Coomassie-Färbung (E) sowie einer inzwischen kommerziell verfügbaren Plattform für die Fluoreszenzdetektion (F) verglichen. In ersten Versuchen wurden vier UV-TOP280-LEDs in den Kanten eines Quadrates mit 1,5 cm Kantenlänge befestigt und als Epi-Illuminationsquelle zur Visualisierung von BSA, welches in Mengen von 1 bzw. 10 µg mehrfach auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen wurde, verwendet (A und B). Für Aufnahme A wurde kein Emissionsfilter eingesetzt. Das spektral sehr reine Anregungslicht der LEDs wurde so platziert, dass keine direkten Reflektionen in die Kamera gelangen können. Der Hintergrund leuchtet ausgeprägt durch die Eigenfluoreszenz der Gelmatrix. In Aufnahme B wurde das Gel direkt durch die LEDs angestrahlt und das emittierte Fluoreszenzlicht durch einen BG40 Bandpassfilter aufgenommen, der ab etwa 305 nm Wellenlänge öffnet und somit effektiv das direkt reflektierte Licht der LEDs blockt. Das so generierte Fluoreszenzlicht der Matrix ist in der Regel mindestens zwanzig Mal stärker als das der fokussierten Proteinbanden, weswegen der Einsatz von Filtern zur Reduktion der Gelfluoreszenz unbedingt angezeigt ist. Aufnahme C wurde mit einer gewöhnlichen Quecksilberdampfampe als Lichtquelle aufgenommen. Als Filter kamen der Schmalbandpassfilter bei 282 nm als Excitationsfilter, sowie eine Kombination aus einem UG11 und einem BG40 zum Einsatz. Der Hintergrund ist nur schwach ausgeprägt, aber der schmalbandige Excita-

tionsfilter lässt zu wenig Anregungslicht passieren, um eine effektive Detektion zu erreichen. Außerdem zeigt sich in der Abbildung der Röhrenform der Lampe deutlich die anisotrope Filterwirkung des Excitationsfilters. Die bislang höchste Sensitivität wurde durch Einsatz eines dichroitisch verspiegelten Quecksilberdampfstrahlers erreicht. Die Unterdrückung der höherwelligen Lichtanteile der Lampe durch die Verspiegelung erlaubt den Einsatz eines UG5-Excitationsfilters. Als Emissionsfilter wird ein DAPI-Anregungsfilter verwendet, der optimal den Wellenlängenbereich zwischen 325 und 375 nm öffnet und somit die Gel fluoreszenz größtenteils unterdrückt. Die erreichte Nachweisgrenze für BSA liegt mit diesem Aufbau bei 250 ng. Im Vergleich dazu sind in E und F die Sensitivitäten einer konventionellen Coomassiefärbung, sowie einer inzwischen kommerziell erhältlichen Detektorplattform abgebildet, die auf den Arbeiten von Roegner *et al.* basiert.

Die Sensitivität wurde nochmals deutlich durch die Verwendung einer dichroitisch verspiegelten Quecksilberdampfampe verbessert. Die dichroitische Beschichtung erlaubt es, den Spektralanteil des UV-Lichts gegenüber den höherwelligen Spektrallinien deutlich zu erhöhen, so dass ein UG5-Filter, der bis 400 nm öffnet, eingesetzt werden kann, ohne dass ein übermäßiger Hintergrund auftritt. Direkt vor der Kamera wurde ein DAPI-Emissionsfilter verwendet, um die Fluoreszenz der Polyacrylamidmatrix weitestgehend zu unterdrücken. Wie in Abbildung 7-17D zu erkennen ist, liegt die so erreichte Detektionsgrenze bei etwa 250 ng BSA. Zum Vergleich sei in Abbildung 7-17F ein mit Coomassie G250 angefärbtes Gel gezeigt, auf welchem noch Proteinbanden bis zu 50 ng erkennbar sind. Die mit dem verwendeten Aufbau erreichte Sensitivität der nativen Fluoreszenzdetektion liegt damit derzeit um etwa einen Faktor 5 hinter der Coomassie-Standardfärbung zurück, wobei zu berücksichtigen bleibt, dass dieser Wert natürlich stark abhängig von der Anzahl der Tryptophanreste im detektierten Protein ist. Die erreichte Sensitivität ist außerdem nur minimal schlechter als die optimale Detektionsleistung einer inzwischen kommerziell erhältlichen Plattform, die den von Roegner *et al.* beschriebenen Aufbau einer Epi-Illumination implementiert (BioAnalyzer Gel, LaVision Biotec, Bielefeld, Deutschland).

7.3 Diskussion

Die Detektionsleistung des derzeitigen Aufbaus liegt mit einer Sensitivität von 250 ng noch um etwa zwei Größenordnungen hinter einer sensitiven Coomassiefärbung oder Silberfärbung zurück. Dennoch ist der erreichte Entwicklungsstand als durchaus positiv zu bewerten. Eine der Hauptschwierigkeiten lag in der Realisierung eines großflächigen

Beleuchtungskonzepts, welches Aufnahmen von Gelen mit einer Größe von bis zu 25 x 25 cm in einem einzigen Belichtungsschritt ermöglichen sollte. Zudem musste das entworfene Konzept mit der bereits bestehenden Spothunter-Plattform kompatibel sein und unterlag damit gewissen geometrischen Einschränkungen. Eine motorisierte Epilluminationseinheit für eine Rasterabtastung der Gele stand schon allein aus Platzmangel im Innenraum des Spothunters nicht zur Disposition. Eine statisch montierte Detektionseinheit in Kombination mit einem beweglichen Gelschlitten ist auszuschließen, weil sonst die bestehende Pickereinheit nicht mehr einsetzbar wäre.

Ein wesentliches optisches Element dieser großflächigen Beleuchtung ist zunächst die UV-Lichtquelle, die eine hinreichende Intensität über die gesamte Detektionsfläche gewährleisten muss. Nach mehreren Tests mit UV-LEDs, die leider nur über eine begrenzte Lebensdauer verfügen, erwies sich der Einsatz einer xenondotierten Quecksilberdampflampe mit zusätzlicher dichroitischer Beschichtung als beste Lösung.

Ebenfalls von großer Wichtigkeit ist ein großflächiger optischer Filter, der verhindert, dass aus der Lampe Lichtstrahlung des Detektionswellenlängenfensters direkt auf den Kamerachip gelangen kann (Excitationsfilter). Während kleinere UV-Filter (bis 3 cm Durchmesser) dieser Art in der Licht- und Fluoreszenzmikroskopie standardmäßig eingesetzt werden, treten bei größeren Filterdimensionen Probleme mit anisotroper Filterung des einfallenden Lichts auf. Je nach Einstrahlwinkel verändert sich das Transmissivitätsspektrum des Filters deutlich und sorgt so dafür, dass Licht im Anregungswellenlängenbereich den Filter teilweise nicht mehr passieren kann, was zu einer Absenkung der Lichtintensität führt. Weiterhin können Spektralanteile der Lichtquelle im Detektionswellenlängenbereich den Filter teilweise passieren und resultieren in unerwünschter Hintergrundstrahlung. In Kombination mit der eingesetzten Lampe erwies sich ein UG5 Filter als geeignet.

Auf Detektionsseite sollte die Kamera mit einem voll UV-transparenten Objektiv bestückt sein, wobei der CCD-Chip der Kamera für eine optimale Abbildung des ultravioletten Fluoreszenzlichts eine möglichst hohe UV-Quantenausbeute benötigt. Die eingesetzte Kamera hatte eine Quantenausbeute für UV-Licht von etwa 25-30 %. Es existieren auch Kameras mit UV-Quantenausbeuten bis zu 60 % und durch den Einsatz einer solchen sollte sich die Detektionssensitivität noch deutlich steigern lassen. Ein der CCD-Kamera vorsitzender Emissionsfilter sorgt dafür, dass das Licht des Anregungswellenlängenfensters nicht als Hintergrund auf der CCD-Kamera abgebildet wird. Als zweckmäßig hat sich hier

ein DAPI-Excitationsfilter, wie er üblicherweise in der Fluoreszenzlichtmikroskopie verwendet wird, erwiesen.

Ein weiterer Grund für die niedrigere Sensitivität liegt in der Geometrie des Aufbaus selbst begründet. Die Lichtquelle befindet sich 10 cm unterhalb des Gels und ist damit in sehr naher Distanz. Die Entfernung zwischen Gel und CCD-Kamera beträgt allerdings 60 cm. Berücksichtigt man, dass die Lichtstärke proportional zum Quadrat der Entfernung abnimmt, ließe sich durch eine Verringerung des Abstands zwischen Gel und Kamera eine höhere Signalstärke erreichen, wodurch die Sensitivität positiv beeinflusst würde.

Sluszný *et al.* nutzten in einem revidierten Aufbau ebenfalls einen xenongefüllten Quecksilberdampfstrahler [Sluszný and Yeung 2004]. Das Licht wurde dabei auf eine Fläche von etwa 15 x 15 mm fokussiert und zur Visualisierung von 11 x 11 mm Mini-SDS-Gelen verwendet. Die maximal erreichte Sensitivität lag bei 0,04 ng Protein. Die Linearität der Detektion war dabei auf einen Bereich von etwa zwei Größenordnungen beschränkt. Damit steht fest, dass mittels der Fluoreszenzdetektion selbst kleinste Proteinmengen detektierbar sind, als problematisch muss jedoch die dafür benötigte UV-Dosisleistung erachtet werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung mit UV-C-Licht, entsprechend Wellenlängen zwischen 200 und 280 nm, zu photoinduzierten Schäden vorrangig an Tryptophan-, Tyrosin-, Histidin-, und Cysteinresten und zur Entstehung von radikalisch reagierenden Peroxiden führt. Dies führt in der Folge zu enzymatischer Inaktivierung, photolytischer Proteindegradation und unspezifischer Proteinaggregation [Grossweiner 1976; Schaich 1980; Davies 2004; Chan *et al.* 2006]. Das Ausmaß der Proteinschädigung ist dabei eindeutig von der Dosisleistung der UV-Exposition abhängig [Matthiessen *et al.* 2003].

7.3.1 Alternative Proteindetektion über Verschiebung der Tryptophanfluoreszenz

Die Arbeit mit optischen Bauteilen im UV-Bereich des elektromagnetischen Spektrums ist wesentlich anspruchsvoller als im Bereich des sichtbaren Lichts. Einer der Gründe ist die höhere Energiedichte der UV-Strahlung, die auf bestimmte Materialien chemisch aktivierend wirkt und radikalische oder ionisierende (bei UV-Bestrahlung mit Wellenlängen kleiner als 200 nm) Reaktionen auslösen kann. Die rasche Degradation des Photodiodenmaterials durch die emittierte UV-Strahlung ist beispielsweise einer der Hauptgründe für die relative geringe Lebensdauer der UV-LEDs. Auch optische Filter werden bei kontinuierlicher Exposition mit Licht der zu filternden Wellenlänge langsam zerstört. Das

absorbierte Licht entspricht aufgenommener Energie, die wenn sie nicht in ausreichendem Maße in die Umgebung dissipieren kann, zu einem Aufheizen des Filters führt. Werden Temperaturen jenseits von 400 °C erreicht, beginnt die amorphe Filterschicht, meist bestehend aus multiplen dünnen Schichten von Nb₂O₅, Ta₂O₅ und SiO₂, zu kristallisieren, was die Transmissionseigenschaften und damit auch die Filterwirkung drastisch verändert und im Extremfall völlig aufhebt.

Durch chemische Modifikationen lassen sich Molekülfluoreszenzen oftmals stark beeinflussen. Im Jahr 1992 wurde erstmals beobachtet, dass bei der Reaktion von Chloroform mit dem Indolchromophor des Tryptophans Produkte gebildet werden, deren Fluoreszenz gegenüber reinem Tryptophan deutlich rotverschoben ist [Vorobey *et al.* 1992; Pinchuk and Vorobey 1993]. Auch andere Trihalogenidverbindungen gehen vergleichbare Reaktionen mit Tryptophan ein. Erst die detaillierte Aufklärung des Reaktionsmechanismus zehn Jahre später durch Edwards *et al.* führte allerdings zur praktischen Anwendbarkeit dieser chemischen Reaktion zur direkten Visualisierung von ungefärbten Proteinen mit Chloroform oder Trichloressigsäure. Die initial erreichbare Sensitivität lag jedoch nur im Mikrogrammbereich [Edwards *et al.* 2002; Kazmin *et al.* 2002]. Nutzt man hingegen 2,2,2-Trichlorethanol (TCE) zur Fluoreszenzmodifikation, lassen sich ähnlich wie bei der Standard-Coomassiefärbung Sensitivitäten bis hinab zu 50 ng erreichen (siehe Abbildung 7-18) [Ladner *et al.* 2004]. Die Reaktion wird durch Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 280 nm initiiert und verschiebt die Tryptophanfluoreszenzemission in Proteinen von 340 zu 450 nm. Das Excitationsmaximum der Fluoreszenz verschiebt sich von 280 zu 350 nm (siehe Abbildung 7-19). Diese chemische Modifikation hat sich außerdem als kompatibel zur massenspektrometrischen Identifikation der modifizierten Proteine erwiesen [Ladner *et al.* 2006].

Die resultierenden längerwelligen Fenster für Anregung und Detektion der Proteinfluoreszenz würden zwar die Implementation einer Detektionsoptik erleichtern, leider hat sich jedoch gezeigt, dass die Behandlung von Proteinen mit TCE deutliche negative Auswirkungen auf deren Strukturintegrität hat. Wie in Abbildung 7-20 dargestellt, sind in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bereits nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C mit einer Konzentration von 20 mM TCE keine intakten Partikel mehr sichtbar. Diese Art der Fluoreszenzdetektion ist somit für native Proteine nicht geeignet.

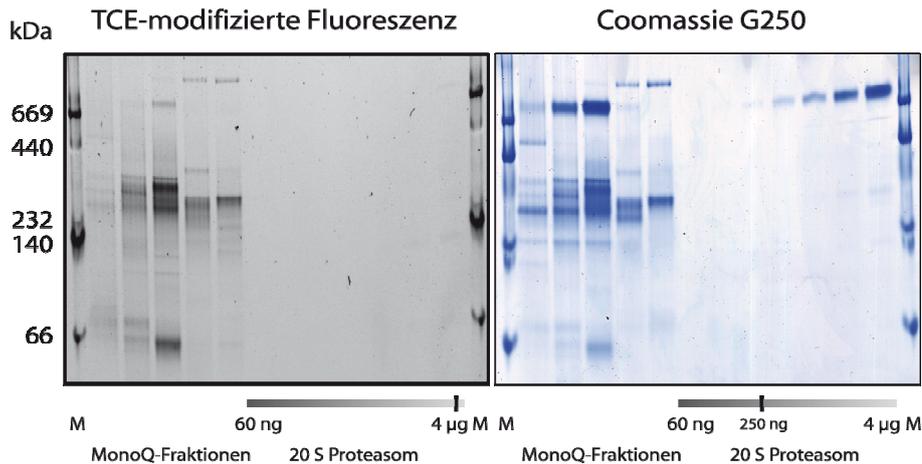


Abbildung 7-18: Vergleich der Detektionssensitivität zwischen TCE-Visualisierung und gewöhnlicher Coomassiefärbung

Auf beide gezeigten Nativgele sind links fünf willkürlich ausgewählte Fraktionen einer Proteinkomplexanreicherung aus einem Zellextrakt von *T. acidophilum* nach dem zweiten Anreicherungs-schritt auf einer MonoQ-Säule (siehe Abschnitt 5) aufgetragen. Im rechten Teil der Gele wurde eine serielle Verdünnung von rekombinant gewonnenem 20S Proteasom (*T. acidophilum*) geladen, beginnend mit einer Höchstmenge von 4 µg. Im Vergleich werden in beiden Gelen ähnlich viele Banden visualisiert, deren relative Intensität ist jedoch bei der Fluoreszenzdetektion mit TCE deutlich abhängig vom Tryptophangehalt der Proteine. Insbesondere das 20S Proteasom, welches keine Tryptophane enthält, lässt sich mit TCE nur in sehr hohen Konzentrationen detektieren.

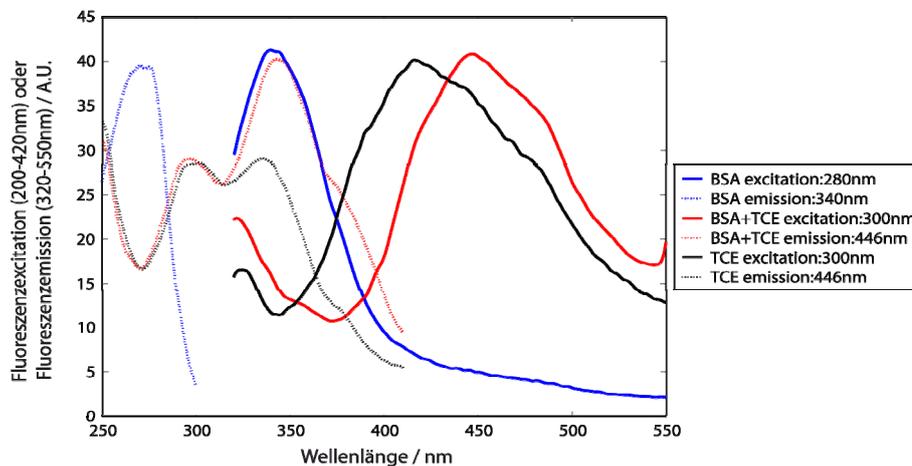


Abbildung 7-19: Fluoreszenzverschiebung der Proteinfluoreszenz durch 2,2,2-Trichloroethanol (TCE)

Am Beispiel von bovinem Serumalbumin (BSA) wurde der Einfluss von TCE auf die intrinsische Proteinfluoreszenz untersucht. Das ursprüngliche Excitationsmaximum um 280 nm (türkis) und das Maximum der Fluoreszenzemission (blau) von BSA bei 340 nm werden nach Zugabe von TCE zu deutlich höheren Wellenlängen (Excitation: braun, Emission: rot) verschoben. Die chemische Reaktion lässt sich durch den Vergleich der BSA-Spektren mit Anregungs- (grau) und Emissionsspektrum (schwarz) von reinem TCE nachweisen, welche sich nochmals deutlich unterscheiden. Mit TCE modifizierte Proteine können demnach schon im nahen UV-Bereich angeregt werden und emittieren mit bloßem Auge sichtbares blaues Licht. In diesen Wellenlängenbereichen wäre eine Detektionsoptik bedeutend leichter zu realisieren.

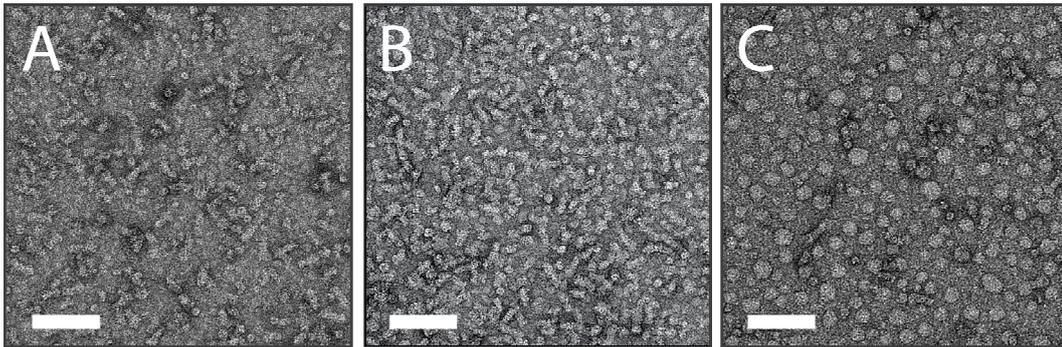


Abbildung 7-20: 26S Proteasomen vor und nach Inkubation mit TCE

Aliquots von frisch aufgetautem 26S Proteasomen wurden direkt mit 2 % Uranylacetat (A), nach 10-minütiger (B) bzw. 30-minütiger (C) Inkubation mit 20 mM TCE bei 4 °C negativkontrastiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Präparate zeigen, dass bereits nach 10 min Exposition mit TCE Aggregatbildung auftritt, welche progressiv voranschreitet, bis nach 30 min nahezu keine intakten Partikel mehr vorhanden sind. Der weiße Balken entspricht 60 nm.

8. Ausblick

Die instrumentellen Entwicklungen der letzten Jahre im Bereich der automatisierten Elektronenmikroskopie und Fortschritte bei der computergestützten Analyse der aufgezeichneten Daten ermöglichen heutzutage die dreidimensionale Strukturaufklärung von Proteinkomplexen mit einem Molekulargewicht von 200 kDa und mehr innerhalb weniger Tage. Die in dieser Zeit erreichbare Auflösung hängt zwar maßgeblich von den Symmetrieeigenschaften der untersuchten Partikel ab, aber moderate Auflösungen von 15-30 Angström erscheinen in jedem Falle realistisch. Um eine solche Hochdurchsatzplattform sinnvoll zu betreiben, ist es jedoch wünschenswert, einen stetigen Nachschub an biologischen Proben zur Verfügung zu stellen. Trotz fortschreitender Miniaturisierung verschiedener Verfahren der Proteinisolation, welche aus immer geringeren Ausgangsmengen biologischen Materials die Gewinnung von annähernd homogenem gereinigtem Protein stetig beschleunigt, ist das grundlegende Konzept stets die individuelle Isolation eines einzelnen Proteins oder Proteinkomplexes. Dem gehen jedoch für rekombinant gewonnene Proteine Vorarbeiten im Umfang von mehreren Tagen bis zuweilen Wochen voraus. In gleichem Maße aufwändig ist die Etablierung einer auf ein spezielles Protein zugeschnittenen Reinigungsprozedur bei Arbeiten mit endogenem Material.

In diesem Zusammenhang erstrebenswert wäre die Entwicklung von Methoden, die in Anlehnung an die klassische Proteomik in einem einzigen sequentiellen Arbeitsgang eine Vielzahl an Proteinen für deren weitere strukturelle Charakterisierung aufbereiten können.

Konzeptionell an der Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese mit anschließender massenspektrometrischer Identifikation orientiert, wurde ein ähnlich simples Verfahren zur Aufbereitung des zytosolischen Proteoms von *T. acidophilum* zur weiteren strukturellen Charakterisierung möglichst vieler Proteinkomplexe angestrebt. Es hat sich gezeigt, dass für die stabilen und mäßig stabilen Proteinkomplexe eine zweistufige Vorfraktionierung auf den Trennmaterialien Hydroxyapatit und MonoQ bereits hinreichend ist, um in einer folgenden eindimensionalen Nativgelelektrophorese die in einer Fraktion verbliebenen Proteinkomplexe voneinander zu trennen. Profitieren kann dieser chromatographische Ansatz durch eine weitere Erhöhung der effektiven Trennleistung der einzelnen Anreicherungsschritte. Dies lässt sich entweder durch eine andere Kombination

von Trennmaterialien erreichen – denkbar sind hier vor allem auf Affinität oder Hydrophobizität basierende Säulen – oder durch Optimierung der Proteinfractionierung, wie sie durch nichtlineare Gradienten erzielt werden kann. In letzterem Fall kann so dafür gesorgt werden, dass eine gleichmäßigere Fraktionierung erreicht wird und bestimmte Proteine mit sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften besser voneinander separiert werden [Tarafder *et al.* 2007].

Von noch größerer praktischer Bedeutung könnte allerdings eine zweidimensionale Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen in beiden Trenndimensionen sein. Die isoelektrische Fokussierung nativer Proteinkomplexe ist unter Verwendung von Agarosegelen mit Sorbitolzusatz und gewöhnlichen IEF-Ampholyten möglich, und Proteine könnten von diesen Gelen analog zu immobilisierten pH-Gradienten auf native Polyacrylamidgelen übertragen werden [Yokoyama *et al.* 2009].

Speziell für labile Komplexe mit sehr niedrigen thermodynamischen Bindungskonstanten bleiben jedoch weiterhin individuelle Aufreinigungen das Mittel der Wahl.

Sind die Proteinkomplexe auf einem Nativgel fokussiert, können diese, wie in dieser Arbeit beschrieben, mittels der neu entwickelten Grid-Blotting-Prozedur direkt auf Trägernetzchen für eine folgende elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse transferiert werden. Für eine hinreichende Belegungsdichte der Netzchen sind dazu etwa 500 ng Protein je Bande ausreichend. Diese Menge lässt sich möglicherweise bis auf 50 ng reduzieren, wenn der bislang ausschließlich diffusionskontrollierte Transfer durch ein Verfahren zur Elektroelution der Proteine unterstützt wird. Ein quantitativer Transfer wird in aller Regel jedoch gar nicht angestrebt werden, da im Gel verbliebene Proteine in klassischer Weise für eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse verwendet werden können. Auf diese Weise ermöglicht die Grid-Blotting-Methode eine elegante Verknüpfung von elektronenmikroskopischen Strukturdaten und Informationen über die Proteinidentitäten und stöchiometrische Zusammensetzung einer biologischen Probe.

Der gesamte Arbeitsgang nach Abschluss der Gelelektrophorese zur Bereitung von EM- und MS-Proben ist hochrepetitiv und daher in idealer Weise für eine Automatisierung geeignet. Während ‚Spotpicker‘ zum Ausstechen von fokussierten Proteinspots mittlerweile zum Standardrepertoire eines Hochdurchsatz-MS-Labors gehören, muss eine geeignete Roboter-einheit, die die Grid-Blotting-Methode implementiert, noch entwickelt werden. Die ursprünglich als problematisch erachtete geringe mechanische Stabilität der konven-

tionellen Trägernetzchen wurde mit der Einführung der sogenannten AutoGrids (FEI, Aindhoven, Niederlande), welche einen verstärkten umlaufenden Rand aufweisen, deutlich verbessert. Das wird insbesondere die Implementation des automatischen Aufnehmens und Ablegens der Trägernetzchen deutlich vereinfachen.

Ein weiterhin wichtiger Aspekt für eine erfolgreiche Automatisierung ist die Möglichkeit, Proteine in Polyacrylamidgelen zu visualisieren, ohne deren strukturelle Integrität nennenswert zu beeinflussen. Klassische Färbetechniken, bei denen der Farbstoff über eine chemische Reaktion an die Proteine bindet, oder Methoden, die auf Fluoreszenzmarkierungen basieren, sind dafür ungeeignet. Die theoretische Möglichkeit des doppelten Ladens gleicher Proben auf das selbe Gel, von denen später nur eine angefärbt wird, um die Position der Proteinbanden im ungefärbten Gelteil zu extrapolieren, ist bei eindimensionalen Trenngelen noch möglich, wird aber bei größeren nativen zweidimensionalen Gelen mangels exakter Reproduzierbarkeit kaum mehr durchführbar sein. Dafür sind die entstehenden Inhomogenitäten der Gelmatrix während des Auspolymerisierens in der Regel zu groß. Eine bessere Lösung scheint die Detektion von Proteinen durch Ausnutzen der intrinsischen Fluoreszenzaktivität ihrer aromatischen Aminosäurereste zu sein. Es wurde eine Detektionsplattform entwickelt, die derzeit in der Lage ist Banden mit minimal 250 ng Protein zu visualisieren. Erste Versuche haben gezeigt, dass bei minimaler UV-Exposition keine offensichtliche Schädigung der Proteinstruktur eintritt, es wird jedoch abschließend die Frage zu klären sein, welche maximale UV-Dosis von Proteinkomplexen toleriert werden kann, um die in der Einzelpartikelanalyse maximal erreichbare Auflösung nicht von vornherein durch die angewendete Detektionsmethode zu beschränken.

Zusammen genommen sind die in dieser Arbeit bearbeiteten Fragestellungen die Grundbausteine für eine effiziente und umfassende strukturelle Analyse des makromolekularen Proteinkomplements von *T. acidophilum* und damit für die Generierung einer Referenzstrukturbibliothek der Proteinkomplexe dieses Organismus. Diese Bibliothek wird es erlauben, durch Studien der räumlichen Verteilung von Proteinkomplexen in zellulären Kryoelektronentomogrammen einen dreidimensionalen molekularen Atlas von *T. acidophilum* zu erstellen. Anhand eines solchen zellulären Schnappschusses lassen sich potentielle molekulare Interaktionen zwischen Proteinen aufdecken, und es steht zu erwarten, dass daraus neue Erkenntnisse über intrazelluläre Organisations- und Regulationsmechanismen gewonnen werden können.

9. Literaturverzeichnis

- Adrian, M., J. Dubochet, J. Lepault and A. W. McDowell (1984). "Cryo-Electron Microscopy Of Viruses." Nature **308**(5954): 32-36.
- Alberts, B. (1998). "The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists." Cell **92**(3): 291-294.
- Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. L. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond and M. Mann (2005). "Nucleolar proteome dynamics." Nature **433**(7021): 77-83.
- Andrade, E. N. D. (1934). "A theory of the viscosity of liquids - Part I." Philosophical Magazine **17**(112): 497-511.
- Appel, R. D., D. F. Hochstrasser, M. Funk, J. R. Vargas, C. Pellegrini, A. F. Muller and J. R. Scherrer (1991). "The MELANIE Project - From A Biopsy To Automatic Protein Map Interpretation By Computer." Electrophoresis **12**(10): 722-735.
- Appel, R. D., P. M. Palagi, D. Walther, J. R. Vargas, J. C. Sanchez, F. Ravier, C. Pasquali and D. F. Hochstrasser (1997a). "Melanie II - a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface." Electrophoresis **18**(15): 2724-2734.
- Appel, R. D., J. R. Vargas, P. M. Palagi, D. Walther and D. F. Hochstrasser (1997b). "Melanie II - a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: II. Algorithms." Electrophoresis **18**(15): 2735-2748.
- Arakawa, T. and S. N. Timasheff (1983). "Preferential Interactions Of Proteins With Solvent Components In Aqueous Amino-Acid Solutions." Archives of Biochemistry and Biophysics **224**(1): 169-177.
- Arakawa, T. and S. N. Timasheff (1985). "The Stabilization Of Proteins By Osmolytes." Biophysical Journal **47**(3): 411-414.
- Armengaud, J. (2010). "Proteogenomics and systems biology: quest for the ultimate missing parts." Expert Review of Proteomics **7**(1): 65-77.
- Arthur, J. W. and M. R. Wilkins (2004). "Using proteomics to mine genome sequences." Journal of Proteome Research **3**(3): 393-402.
- Asenjo, J. A. and B. A. Andrews (2009). "Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions." Journal of Molecular Recognition **22**(2): 65-76.

- Baumeister, W., S. Nickell, C. Kofler, M. Boicu and T. Keil (2008). "Method For Detection And Analysis Of Macromolecular Complexes." Patent by Max-Planck-Gesellschaft, Verein Zur Förderung Der Wissenschaften E.V.,
- Beck, M., J. A. Malmstrom, V. Lange, A. Schmidt, E. W. Deutsch and R. Aebersold (2009). "Visual proteomics of the human pathogen *Leptospira interrogans*." Nature Methods 6(11): 817-U855.
- Belly, R. T., B. B. Bohlool and T. D. Brock (1973). "Genus *Thermoplasma*." Annals of the New York Academy of Sciences 225(DEC14): 94-107.
- Binz, P. A., D. F. Hochstrasser and R. D. Appel (2003). "Mass spectrometry-based proteomics: Current status and potential use in clinical chemistry." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 41(12): 1540-1551.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier and W. Postel (1982). "Isoelectric-Focusing In Immobilized pH Gradients - Principle, Methodology And Some Applications." Journal of Biochemical and Biophysical Methods 6(4): 317-339.
- Bohm, J., A. S. Frangakis, R. Hegerl, S. Nickell, D. Typke and W. Baumeister (2000). "Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: Template matching applied to electron tomograms." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(26): 14245-14250.
- Bolen, D. W. (2004). "Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization." Methods 34(3): 312-322.
- Bradford, M. M. (1976). "Rapid And Sensitive Method For Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing Principle Of Protein-Dye Binding." Analytical Biochemistry 72(1-2): 248-254.
- Bremer, A., C. Henn, A. Engel, W. Baumeister and U. Aebi (1992). "Has Negative Staining Still A Place In Biomacromolecular Electron-Microscopy." Ultramicroscopy 46(1-4): 85-111.
- Brenner, S. and R. W. Horne (1959). "A Negative Staining Method For High Resolution Electron Microscopy Of Viruses." Biochimica Et Biophysica Acta 34(1): 103-110.
- Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly and R. L. Weiss (1972). "Sulfolobus - New Genus Of Sulfur-Oxidizing Bacteria Living At Low Ph And High-Temperature." Archiv Fur Mikrobiologie 84(1): 54-&.
- Burgess, R. R. (2009). Elution Of Proteins From Gels. Guide to Protein Purification, Second Edition. San Diego, Elsevier Academic Press Inc. 466: 565-572.

- Burgess, R. R. and N. E. Thompson (2002). "Advances in gentle immunoaffinity chromatography." Current Opinion in Biotechnology 13(4): 304-308.
- Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting - Electrophoretic Transfer Of Proteins From Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels To Unmodified Nitrocellulose And Radiographic Detection With Antibody And Radioiodinated Protein-A." Analytical Biochemistry 112(2): 195-203.
- Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi and P. G. Righetti (2004). "Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." Electrophoresis 25(9): 1327-1333.
- Castillo, R. and C. Garza (1993). "Temperature-Dependence Of The Mutual Diffusion-Coefficients In Aqueous Solutions Of Alkali-Metal Chlorides." International Journal of Thermophysics 14(6): 1145-1152.
- Chan, H. L., P. R. Gaffney, M. D. Waterfield, H. Anderle, H. P. Matthiessen, H. P. Schwarz, P. L. Turecek and J. F. Timms (2006). "Proteomic analysis of UVC irradiation-induced damage of plasma proteins: Serum amyloid P component as a major target of photolysis." Febs Letters 580(13): 3229-3236.
- Cottrell, J. S. (1994). "Protein Identification By Peptide Mass Fingerprinting." Peptide Research 7(3): 115-&.
- Dahlmann, B., F. Kopp, L. Kuehn, R. Hegerl, G. Pfeifer and W. Baumeister (1991). "The Multicatalytic Proteinase (Prosome, Proteasome) - Comparison Of The Eukaryotic And Archaeobacterial Enzyme." Biomedica Biochimica Acta 50(4-6): 465-469.
- Dahlmann, B., F. Kopp, L. Kuehn, B. Niedel, G. Pfeifer, R. Hegerl and W. Baumeister (1989). "The Multicatalytic Proteinase (Prosome) Is Ubiquitous From Eukaryotes To Archaeobacteria." Febs Letters 251(1-2): 125-131.
- Darland, G., T. D. Brock, Samsonof, W and S. F. Conti (1970). "Thermophilic, Acidophilic Mycoplasma Isolated From A Coal Refuse Pile." Science 170(3965): 1416-&.
- Davies, M. J. (2004). "Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen." Photochemical & Photobiological Sciences 3(1): 17-25.
- Derosier, D. J. and A. Klug (1968). "Reconstruction Of 3 Dimensional Structures From Electron Micrographs." Nature 217(5124): 130-&.
- Ditzel, L., J. Lowe, D. Stock, K. O. Stetter, H. Huber, R. Huber and S. Steinbacher (1998). "Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT." Cell 93(1): 125-138.

- Dubochet, J., A. W. McDowell and J. Lepault (1982). "Frozen-Hydrated Specimens For High-Resolution Electron-Microscopy." Biology of the Cell 45: 456-456.
- Edwards, R. A., G. Jickling and R. J. Turner (2002). "The light-induced reactions of tryptophan with halocompounds." Photochemistry and Photobiology 75(4): 362-368.
- Elsasser, S., M. Schmidt and D. Finley (2005). "Characterization of the proteasome using native gel electrophoresis." Ubiquitin and Protein Degradation, Part A 398: 353-363.
- Förster, F. (2005). "Quantitative Analyse von Makromolekülen in Kryoelektronentomogrammen mittels Korrelationsmethoden." Dissertation, Technische Universität München, Fakultät für Physik, München
- Frangakis, A. S., J. Bohm, F. Forster, S. Nickell, D. Nicastro, D. Typke, R. Hegerl and W. Baumeister (2002). "Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(22): 14153-14158.
- Frank, J. (2002). "Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy." Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 31: 303-319.
- Gaspari, M., V. Abbonante and G. Cuda (2007). "Gel-free sample preparation for the nanoscale LC-MS/MS analysis and identification of low-nanogram protein samples." Journal of Separation Science 30(14): 2210-2216.
- Glaeser, R. M. (1971). "Limitations To Significant Information In Biological Electron Microscopy As A Result Of Radiation Damage." Journal of Ultrastructure Research 36(3-4): 466-&.
- Gong, Z., S. Chhajed, M. E. Gaevski, W. H. Sun, V. Adivarahan, M. Shatalov and M. A. Khan (2006). Reliability and degradation modes of 280 nm deep UV LEDs on sapphire. GaN, AlN, InN and Related Materials. M. Kuball, T. H. Myers, J. M. Redwing and T. Mukai. Warrendale, Materials Research Society. 892: 169-174.
- Grossweiner, L. I. (1976). "Photochemical Inactivation Of Enzymes." Current Topics in Radiation Research Quarterly 11(2): 141-199.
- Grunewald, K., O. Medalia, A. Gross, A. C. Steven and W. Baumeister (2003). "Prospects of electron cryotomography to visualize macromolecular complexes inside cellular compartments: implications of crowding." Biophysical Chemistry 100(1-3): 577-591.
- Gutsche, I., O. Mihalache, R. Hegerl, D. Typke and W. Baumeister (2000). "ATPase cycle controls the conformation of an archaeal chaperonin as visualized by cryo-electron microscopy." Febs Letters 477(3): 278-282.

- Gygi, S. P., G. L. Corthals, Y. Zhang, Y. Rochon and R. Aebersold (2000). "Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(17): 9390-9395.
- Harris, J. R. and R. W. Horne (1994). "Negative Staining - A Brief Assessment Of Current Technical Benefits, Limitations And Future Possibilities." Micron **25**(1): 5-13.
- Henderson, R. (1995). "The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic-resolution microscopy of unstained biological molecules." Quarterly Reviews of Biophysics **28**(2): 171-193.
- Hogan, B. L. and E. S. Yeung (1989). "Indirect Fluorometric Detection In Gel-Electrophoresis." Applied Spectroscopy **43**(2): 349-350.
- Hou, C., Disbrow, J., Hou, K. C. (1990). "Low protein binding membrane." Patent by Cuno, Incorporated (Meriden, CT), United States,
- Hsung, J. C. and A. Haug (1975). "Intracellular pH Of Thermoplasma-Acidophila." Biochimica Et Biophysica Acta **389**(3): 477-482.
- Huber, H. and K. O. Stetter (2006). "Thermoplasmatales." Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol 3, Third Edition:ARCHAEA. BACTERIA: FIRMICUTES, ACTINOMYCETES: 101-112.
- Hura, G. L., A. L. Menon, M. Hammel, R. P. Rambo, F. L. Poole, S. E. Tsutakawa, F. E. Jenney, S. Classen, K. A. Frankel, R. C. Hopkins, S. J. Yang, J. W. Scott, B. D. Dillard, M. W. W. Adams and J. A. Tainer (2009). "Robust, high-throughput solution structural analyses by small angle X-ray scattering (SAXS)." Nature Methods **6**(8): 606-U683.
- Ignatova, Z. and L. M. Gierasch (2006). "Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(36): 13357-13361.
- Kadoya, T., T. Ogawa, H. Kuwahara and T. Okuyama (1988). "High-Performance Liquid-Chromatography Of Proteins On A Hydroxyapatite Column." Journal of Liquid Chromatography **11**(14): 2951-2967.
- Kang, D. H., Y. S. Gho, M. K. Suh and C. H. Kang (2002). "Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." Bulletin of the Korean Chemical Society **23**(11): 1511-1512.

- Kazmin, D., R. A. Edwards, R. J. Turner, E. Larson and J. Starkey (2002). "Visualization of proteins in acrylamide gels using ultraviolet illumination." Analytical Biochemistry **301**(1): 91-96.
- Klose, J. (1975). "Protein Mapping By Combined Isoelectric Focusing And Electrophoresis Of Mouse Tissues - Novel Approach To Testing For Induced Point Mutations In Mammals." Humangenetik **26**(3): 231-243.
- Knispel, R. W., C. Kofler, M. Boicu, S. Nickell and W. Baumeister (in Vorbereitung). "Grid Blotting: A tool for high-throughput single particle electron microscopy."
- Koning, R. I. and A. J. Koster (2009). "Cryo-electron tomography in biology and medicine." Annals of Anatomy **191**(5): 427-445.
- Kremer, M., E. Pothmann, T. Rossler, J. Baker, A. Yee, H. Blanch and J. M. Prausnitz (1994). "Pore-Size Distributions Of Cationic Polyacrylamide Hydrogels Varying In Initial Monomer Concentration And Cross-Linker - Monomer Ratio." Macromolecules **27**(11): 2965-2973.
- Kumar, T. K. S., D. Samuel, G. Jayaraman, T. Srimathi and C. Yu (1998). "The role of proline in the prevention of aggregation during protein folding in vitro." Biochemistry and Molecular Biology International **46**(3): 509-517.
- Kyhseandersen, J. (1984). "Electroblotting Of Multiple Gels - A Simple Apparatus Without Buffer Tank For Rapid Transfer Of Proteins From Polyacrylamide To Nitrocellulose." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **10**(3-4): 203-209.
- Ladner, C. L., R. A. Edwards, D. C. Schriemer and R. J. Turner (2006). "Identification of trichloroethanol visualized proteins from two-dimensional polyacrylamide gels by mass spectrometry." Analytical Chemistry **78**(7): 2388-2396.
- Ladner, C. L., J. Yang, R. J. Turner and R. A. Edwards (2004). "Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining." Analytical Biochemistry **326**(1): 13-20.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage Of Structural Proteins During Assembly Of Head Of Bacteriophage-T4." Nature **227**(5259): 680-&.
- Layne, E. (1957). "Spectrophotometric And Turbidimetric Methods For Measuring Proteins." Methods in Enzymology **3**: 447-454.
- Lefman, J., R. Morrison and S. Subramaniam (2007). "Automated 100-position specimen loader and image acquisition system for transmission electron microscopy." Journal of Structural Biology **158**(3): 318-326.

- Lewus, R. K. and G. Carta (2001). "Protein transport in constrained anionic hydrogels: Diffusion and boundary-layer mass transfer." Industrial & Engineering Chemistry Research **40**(6): 1548-1558.
- Lowe, J., D. Stock, R. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister and R. Huber (1995). "Crystal-Structure Of The 20S Proteasome From The Archaeon T-Acidophilum At 3.4-Angstrom Resolution." Science **268**(5210): 533-539.
- Lucic, V., F. Forster and W. Baumeister (2005). "Structural studies by electron tomography: From cells to molecules." Annual Review of Biochemistry **74**: 833-865.
- Mackun, K. and K. M. Downard (2003). "Strategy for identifying protein-protein interactions of gel-separated proteins and complexes by mass spectrometry." Analytical Biochemistry **318**(1): 60-70.
- Madigan, M. T. and A. Oren (1999). "Thermophilic and halophilic extremophiles." Current Opinion in Microbiology **2**(3): 265-269.
- Mann, M., R. C. Hendrickson and A. Pandey (2001). "Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry." Annual Review of Biochemistry **70**: 437-473.
- Matthews, B. W. (2007). "Protein Structure Initiative: getting into gear." Nature Structural & Molecular Biology **14**(6): 459-460.
- Matthiessen, H. P., H. Anderle, P. L. Turecek, T. Kreil and H. P. Schwarz (2003). Proceedings of the Second International Congress on Ultraviolet Technologies (CD-ROM). Second International Congress on Ultraviolet Technologies, Wien, The International Ultraviolet Association.
- McLellan, T. (1982). "Electrophoresis Buffers for Polyacrylamide Gels at Various Ph." Analytical Biochemistry **126**(1): 94-99.
- Medalia, O., I. Weber, A. S. Frangakis, D. Nicastro, G. Gerisch and W. Baumeister (2002). "Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography." Science **298**(5596): 1209-1213.
- Minton, A. P. (1997). "Influence of excluded volume upon macromolecular structure and associations in 'crowded' media." Current Opinion in Biotechnology **8**(1): 65-69.
- Mortz, E., T. N. Krogh, H. Vorum and A. Gorg (2001). "Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis." Proteomics **1**(11): 1359-1363.
- Nagy, I., R. W. Knispel, C. Kofler, M. Boicu, E. Weyher-Stingl, J. Kukolya, S. Nickell and W. Baumeister (in Vorbereitung). "Quinone balls of *Thermoplasma acidophilum*."

- Namork, E. and B. V. Johansen (1982). "SURFACE ACTIVATION OF CARBON-FILM SUPPORTS FOR BIOLOGICAL ELECTRON-MICROSCOPY." Ultramicroscopy 7(4): 321-329.
- Neuhoff, V., R. Stamm and H. Eibl (1985). "Clear Background And Highly Sensitive Protein Staining With Coomassie Blue Dyes In Polyacrylamide Gels - A Systematic Analysis." Electrophoresis 6(9): 427-448.
- Nickell, S., F. Beck, A. Korinek, O. Mihalache, W. Baumeister and J. M. Plitzko (2007). "Automated cryoelectron microscopy of "single particles" applied to the 26S proteasome." Febs Letters 581(15): 2751-2756.
- Nickell, S., F. Forster, A. Linaroudis, W. Del Net, F. Beek, R. Hegerl, W. Baumeister and J. M. Plitzko (2005). "TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography." Journal of Structural Biology 149(3): 227-234.
- Nickell, S., C. Kofler, A. P. Leis and W. Baumeister (2006). "A visual approach to proteomics." Nature Reviews Molecular Cell Biology 7(3): 225-230.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High-Resolution 2-Dimensional Electrophoresis Of Proteins." Journal Of Biological Chemistry 250(10): 4007-4021.
- Ong, E. S., S. M. Len and A. C. H. Lee (2005). "Differential protein expression of the inhibitory effects of a standardized extract from *Scutellariae radix* in liver cancer cell lines using liquid chromatography and tandem mass spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(1): 8-16.
- Ortiz, J. O., F. Forster, J. Kurner, A. A. Linaroudis and W. Baumeister (2006). "Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition." Journal of Structural Biology 156(2): 334-341.
- Pinchuk, S. V. and A. V. Vorobey (1993). "Spectral Characteristics And Mechanisms Of Forming "Chloroform-Dependent" Tryptophan Photoproducts." Journal of Applied Spectroscopy 59(3-4): 711-715.
- Portmann, R. and T. Koller (1976). The Divalent Cation Method For Protein-free Spreading Of Nucleic Acid Molecules. Electron microscopy. Y. Ben Shaul. Jerusalem, Tal International Publishing Company. II: 546-548.
- Potter, C. S., J. Pulokas, P. Smith, C. Suloway and B. Carragher (2004). "Robotic grid loading system for a transmission electron microscope." Journal of Structural Biology 146(3): 431-440.
- Robb, F. T. and A. R. Place (1995). Media for thermophiles, Cold Spring Harbor Laboratory Press {a}.

- Rockel, B., J. Jakana, W. Chiu and W. Baumeister (2002). "Electron cryo-microscopy of VAT, the archaeal p97/CDC48 homologue from *Thermoplasma acidophilum*." Journal of Molecular Biology **317**(5): 673-681.
- Roegerer, J., P. Lutter, R. Reinhardt, M. Bluggel, H. E. Meyer and D. Anselmetti (2003). "Ultrasensitive detection of unstained proteins in acrylamide gels by native UV fluorescence." Analytical Chemistry **75**(1): 157-159.
- Ruepp, A., W. Graml, M. L. Santos-Martinez, K. K. Koretke, C. Volker, H. W. Mewes, D. Frishman, S. Stocker, A. N. Lupas and W. Baumeister (2000). "The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*." Nature **407**(6803): 508-513.
- Saito, H., Y. Oda, T. Sato, J. Kuromitsu and Y. Ishihama (2006). "Multiplexed two-dimensional liquid chromatography for MALDI and nanoelectrospray ionization mass spectrometry in proteomics." Journal of Proteome Research **5**(7): 1803-1807.
- Sali, A., R. Glaeser, T. Earnest and W. Baumeister (2003). "From words to literature in structural proteomics." Nature **422**(6928): 216-225.
- Schaich, K. M. (1980). "Free-Radical Initiation In Proteins And Amino-Acids By Ionizing And Ultraviolet Radiations And Lipid Oxidation. 2. Ultraviolet-Radiation And Photolysis." Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition **13**(2): 131-159.
- Searcy, D. G. (1976). "Thermoplasma-Acidophilum - Intracellular Ph And Potassium Concentration." Biochimica Et Biophysica Acta **451**(1): 278-286.
- Seegerer, A., T. A. Langworthy and K. O. Stetter (1988). "Thermoplasma-Acidophilum And Thermoplasma-Volcanium Sp-Nov From Solfatara Fields." Systematic and Applied Microbiology **10**(2): 161-171.
- Shimada, H., N. Nemoto, Y. Shida, T. Oshima and A. Yamagishi (2002). "Complete polar lipid composition of *Thermoplasma acidophilum* HO-62 determined by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection." Journal Of Bacteriology **184**(2): 556-563.
- Shoji, M., M. Kato and S. Hashizume (1995). "Electrophoretic Recovery Of Proteins From Polyacrylamide-Gel." Journal of Chromatography A **698**(1-2): 145-162.
- Slusznycy, C. and E. S. Yeung (2004). "One- and two-dimensional miniaturized electrophoresis of proteins with native fluorescence detection." Analytical Chemistry **76**(5): 1359-1365.

- Smith, P. F., Langwort, Ta, W. R. Mayberry and A. E. Hougland (1973). "Characterization Of Membranes Of Thermoplasma-Acidophilum." Journal Of Bacteriology 116(2): 1019-1028.
- Sober, H. A. and E. A. Peterson (1954). "Chromatography Of Proteins On Cellulose Ion-Exchangers." Journal of the American Chemical Society 76(6): 1711-1712.
- Sorzano, C. O. S., R. Marabini, J. Velazquez-Muriel, J. R. Bilbao-Castro, S. H. W. Scheres, J. M. Carazo and A. Pascual-Montano (2004). "XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy." Journal of Structural Biology 148(2): 194-204.
- Sprangers, R., A. Velyvis and L. E. Kay (2007). "Solution NMR of supramolecular complexes: providing new insights into function." Nature Methods 4(9): 697-703.
- Stetter, K. O. and W. Zillig (1985). "Thermoplasma And The Thermophilic Sulfur-Dependent Archaeobacteria." Woese, C. R. And R. S. Wolfe (Ed.). The Bacteria: A Treatise on Structure and Function, Volume VIII. Archaeobacteria. Xxiii+582p. Academic Press Inc., Publishers: Orlando, Fla., USA; Academic Press Inc. (London) Ltd.: London, England. Illus: 85-170.
- Stowe, R. W. (1998). UV lamps for coating, decorating, and bonding in electronics manufacturing. Proceedings of NEPCON West 98, Anaheim, CA., Reed Exhibition.
- Subramanian, A. (2002). "Immunoaffinity chromatography." Molecular Biotechnology 20(1): 41-47.
- Suloway, C., J. Pulokas, D. Fellmann, A. Cheng, F. Guerra, J. Quispe, S. Stagg, C. S. Potter and B. Carragher (2005). "Automated molecular microscopy: The new Leginon system." Journal of Structural Biology 151(1): 41-60.
- Sun, N., F. Beck, R. W. Knispel, F. Siedler, B. Scheffer, S. Nickell, W. Baumeister and I. Nagy (2007). "Proteomics analysis of Thermoplasma acidophilum with a focus on complexes." Molecular & Cellular Proteomics 6(3): 492-502.
- Sun, N., C. Pan, S. Nickell, M. Mann, W. Baumeister and I. Nagy (in Vorbereitung). "Quantitative proteome and transcriptome analysis of Thermoplasma acidophilum cultured under aerobic and anaerobic conditions."
- Sun, N., N. Tamura, T. Tamura, R. W. Knispel, T. Hrabe, C. Kofler, S. Nickell and I. Nagy (2009). "Size distribution of native cytosolic proteins of Thermoplasma acidophilum." Proteomics 9(14): 3783-3786.
- Sun, W. H., J. P. Zhang, V. Adivarahan, A. Chitnis, M. Shatalov, S. Wu, V. Mandavilli, J. W. Yang and M. A. Khan (2004). "AlGaIn-based 280 nm light-emitting diodes with

- continuous wave powers in excess of 1.5 mW." Applied Physics Letters **85**(4): 531-533.
- Svergun, D. I. (1999). "Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing." Biophysical Journal **76**(6): 2879-2886.
- Svergun, D. I., M. V. Petoukhov and M. H. J. Koch (2001). "Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering." Biophysical Journal **80**(6): 2946-2953.
- Tang, G., L. Peng, P. R. Baldwin, D. S. Mann, W. Jiang, I. Rees and S. J. Ludtke (2007). "EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy." Journal of Structural Biology **157**(1): 38-46.
- Tarafder, A., L. Aumann and T. Muller-Spath (2007). "Improvement of an overloaded, multi-component, solvent gradient bioseparation through multiobjective optimization." Journal of Chromatography A **1167**(1): 42-53.
- Taylor, K. A. and R. M. Glaeser (1976). "Electron-Microscopy Of Frozen Hydrated Biological Specimens." Journal of Ultrastructure Research **55**(3): 448-456.
- Tiselius, A., S. Hjerten and O. Levin (1956). "Protein Chromatography On Calcium Phosphate Columns." Archives of Biochemistry and Biophysics **65**(1): 132-155.
- Van Heel, M. (1987). "Angular reconstitution - A posteriori assignment of projection directions for 3-D reconstruction." Ultramicroscopy **21**(2): 111-124.
- Van Horn, W. D., H. J. Kim, C. D. Ellis, A. Hadziselimovic, E. S. Sulistijo, M. D. Karra, C. L. Tian, F. D. Sonnichsen and C. R. Sanders (2009). "Solution Nuclear Magnetic Resonance Structure of Membrane-Integral Diacylglycerol Kinase." Science **324**(5935): 1726-1729.
- Vorobey, A. V., E. A. Chernitsky, S. V. Konev, A. P. Krivitsky, S. V. Pinchuk and N. A. Shukanova (1992). "Chloroform-Dependent Photoproducts Of Tryptophan." Biofizika **37**(5): 848-850.
- Waldmann, T., E. Nimmesgern, M. Nitsch, J. Peters, G. Pfeifer, S. Muller, J. Kellermann, A. Engel, F. U. Hartl and W. Baumeister (1995). "The Thermosome Of Thermoplasma-Acidophilum And Its Relationship To The Eukaryotic Chaperonin Tric." European Journal Of Biochemistry **227**(3): 848-856.
- Wang, H. and S. Hanash (2003). "Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics." Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **787**(1): 11-18.

- Warburg, O. and W. Christian (1942). "Insulation and crystallisation of the fermenting process of Enolase." Biochemische Zeitschrift **310**(6): 384-421.
- Westermeier, R. (2006). "Sensitive, quantitative, and fast modifications for Coomassie Blue Staining of polyacrylamide gels." Proteomics: 61-64.
- Wilkins, M. R., J. C. Sanchez, A. A. Gooley, R. D. Appel, I. HumpherySmith, D. F. Hochstrasser and K. L. Williams (1996). "Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol 13 **13**: 19-50.
- Wimmer, K., R. Kuick, D. Thoraval and S. M. Hanash (1996). "Two-dimensional separations of the genome and proteome of neuroblastoma cells." Electrophoresis **17**(11): 1741-1751.
- Yamamoto, H., M. Nakatani, K. Shinya, B. H. Kim and T. Kakuno (1990). "Ultraviolet Imaging Densitometry Of Unstained Gels For 2-Dimensional Electrophoresis." Analytical Biochemistry **191**(1): 58-64.
- Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus and G. N. Somero (1982). "Living With Water-Stress - Evolution Of Osmolyte Systems." Science **217**(4566): 1214-1222.
- Yasuda, M., H. Oyaizu, A. Yamagishi and T. Oshima (1995). "Morphological Variation Of New Thermoplasma-Acidophilum Isolates From Japanese Hot-Springs." Applied And Environmental Microbiology **61**(9): 3482-3485.
- Yokoyama, R., Y. Iwafune, H. Kawasaki and H. Hirano (2009). "Isoelectric focusing of high-molecular-weight protein complex under native conditions using agarose gel." Analytical Biochemistry **387**(1): 60-63.
- Zhang, J. P., H. M. Wang, W. H. Sun, V. Adivarahan, S. Wu, A. Chitnis, C. Q. Chen, M. Shatalov, E. Kuokstis, J. W. Yang and M. A. Khan (2003). "High-quality AlGaIn layers over pulsed atomic-layer epitaxially grown AlN templates for deep ultraviolet light-emitting diodes." Journal of Electronic Materials **32**(5): 364-370.
- Zickermann, V., Z. Wumaier, B. Wrzesniewska, C. Hunte and H. Schagger (2010). "Native immunoblotting of blue native gels to identify conformation-specific antibodies." Proteomics **10**(1): 159-163.

10. Eigene Veröffentlichungen

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

Knispel, R. W., C. Kofler, M. Boicu, S. Nickell and W. Baumeister (in Vorbereitung). "Grid Blotting: A tool for high-throughput single particle electron microscopy."

Publikationen, deren Ergebnisse teilweise auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten basieren:

Nagy, I., R. W. Knispel, C. Kofler, M. Boicu, E. Weyher-Stingl, J. Kukolya, S. Nickell and W. Baumeister (in Vorbereitung). "Quinone balls of *Thermoplasma acidophilum*."

Sun, N., F. Beck, R. W. Knispel, F. Siedler, B. Scheffer, S. Nickell, W. Baumeister and I. Nagy (2007). "Proteomics analysis of *Thermoplasma acidophilum* with a focus on complexes." Molecular & Cellular Proteomics 6(3): 492-502.

Sun, N., N. Tamura, T. Tamura, R. W. Knispel, T. Hrabe, C. Kofler, S. Nickell and I. Nagy (2009). "Size distribution of native cytosolic proteins of *Thermoplasma acidophilum*." Proteomics 9(14): 3783-3786.

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1:	Prinzip der Elektronentomographie	8
Abbildung 3-2:	Rekonstruktionsartefakte durch Einschränkung des Kippwinkelbereichs in der Tomographie	10
Abbildung 5-1:	Degradation von zytosolischem Extrakt bei Raumtemperatur	32
Abbildung 5-2:	Degradation von zytosolischem Extrakt bei 8 °C	33
Abbildung 5-3:	Degradation von zytosolischem Extrakt bei Raumtemperatur und Zugabe von Prolin	34
Abbildung 5-4:	Fraktionierung von zytosolischem Extrakt aus <i>T. acidophilum</i> auf Hydroxyapatit	35
Abbildung 5-5:	Chromatogramm einer Fraktionierung von Zellextrakt aus <i>T.</i> <i>acidophilum</i> auf Hydroxyapatit	36
Abbildung 5-6:	SDS-PAGE der 300 mM und 500 mM Hydroxyapatit-Fractionen nach weiterer Fraktionierung mittels Gelfiltration.....	37
Abbildung 5-7:	SDS-PAGE der MonoQ-Fraktionierung einer 500 mM Hydroxyapatitfraktion.....	37
Abbildung 5-8:	SDS-PAGE der MonoQ-Fraktionierung einer 300 mM Hydroxyapatitfraktion.....	38
Abbildung 5-9:	SDS-PAGE von ausgewählten MonoQ-Fractionen nach Gelfiltration über Superose 6	39
Abbildung 5-10:	Native PAGE von ausgewähl-ten MonoQ-Fractionen nach Gelfiltration über Superose 6.....	40
Abbildung 5-11:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von angereicherten Proteinkomplexen.....	41
Abbildung 6-1:	Verdeutlichung der Mengenverhältnisse einer Einzelpartikelanalyse	44
Abbildung 6-2:	Arbeitsschritte für die Extraktion von Proteinen aus nativen Gelen auf Trägernetzchen für die Elektronenmikroskopie	46
Abbildung 6-3:	Reduktion des Hintergrunds durch einen zusätzlichen Waschschrift nach dem Grid-Blotting.....	48
Abbildung 6-4:	Einfluss der Beglimmzeit auf die Transfereffizienz	49

Abbildung 6-5:	Grid-Blotting von 20S Proteasomen bei 4°C	50
Abbildung 6-6:	Migrationsverhalten von Markerproteinen während der Gelelektrophorese bei unterschiedlichen pH-Werten	52
Abbildung 6-7:	Elektronenmikroskopische Abbildungen von mit Hilfe der Grid- Blotting-Methode hergestellten negativkontrastierten Präparaten	55
Abbildung 6-8:	EM-Struktur vom 26S Proteasom bei einer Auflösung von etwa 2 nm..	56
Abbildung 6-9:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von aus Nativgelen extra- hierten und mit Uranylacetat kontrastierten 26S Proteasomen (<i>D.</i> <i>melanogaster</i>)	57
Abbildung 6-10:	Elektronenmikroskopische Abbildungen von mit Hilfe der Grid- Blotting-Methode hergestellten vitrifizierten Präparaten	61
Abbildung 6-11:	Anwendung der Grid-Blotting-Methode in disziplinübergreifenden Proteomstudien	64
Abbildung 6-12:	Migrationsverhalten von Referenzproteinen bei 4 V Elektrophoresespannung	67
Abbildung 6-13:	Technische Skizze einer Prototypenkassette zur Elektroelution von Proteinen aus Nativgelen	69
Abbildung 6-14:	Anschlussstücke an die Elektrodenreservoirs für die Elektroelutionskassette	69
Abbildung 6-15:	Adaptermodul für die Elektroelutionskassette zur Verwendung in einer Standard-elektrophoresekammer.....	70
Abbildung 7-1:	Schematische Darstellung für eine Apparatur zur nativen Fluoreszenzdetektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	73
Abbildung 7-2:	Innenansicht des „Spathunter“ von Herolab.....	74
Abbildung 7-3:	Detailansicht des xy-steuerbaren Pipettierarmes im „Spot-hunter“ ...	75
Abbildung 7-4:	Excitationsspektren von aromatischen Aminosäuren und Proteinen.	76
Abbildung 7-5:	Emissionsspektren von aromatischen Aminosäuren und Proteinen...	78
Abbildung 7-6:	Intrinsische Fluoreszenz von Polyacrylamidgelen.....	78
Abbildung 7-7:	Spektralverteilung verschiedener Lichtquellen	80
Abbildung 7-8:	Spektralverteilung des verwendeten Quecksilber-Mitteldruckstrahlers	81
Abbildung 7-9:	Spektralverteilung des dichroitisch beschichteten Quecksilber- Mitteldruckstrahlers	81

Abbildung 7-10:	Foto einer UV-LED mit flachem Sichtfenster und deren räumliche Abstrahlcharakteristik.....	83
Abbildung 7-11:	Degradation und Verlust der Lichtleistung von UV-LEDs nach Betriebsstunden	83
Abbildung 7-12:	Transmissionsprofile der UG11/BG40 Emissionsfilterkombination .	84
Abbildung 7-13:	Transmissionsprofil des DAPI-Anregungswellenlängenfilters.....	85
Abbildung 7-14:	Transmissionsprofil des auftragsgefertigten 13 x 13 cm Excitationsfilters.....	86
Abbildung 7-15:	Winkelabhängigkeit der Filtertransmission des 13 x 13 cm Excitationsfilters.....	86
Abbildung 7-16:	Transmissionsspektren für reines Quarzglas und einen UG5-Anregungsfilter.....	87
Abbildung 7-17:	Erreichte Nachweisgrenzen für BSA in Polyacrylamidgelen mittels Fluoreszenzdetektion	89
Abbildung 7-18:	Vergleich der Detektionssensitivität zwischen TCE-Visualisierung und gewöhnlicher Coomassiefärbung.....	94
Abbildung 7-19:	Fluoreszenzverschiebung der Proteinfluoreszenz durch 2,2,2-Trichloroethanol (TCE).....	94
Abbildung 7-20:	26S Proteasomen vor und nach Inkubation mit TCE	95

12. Abkürzungsverzeichnis

20S	20 Svedberg (Einheit der Sedimentationsgeschwindigkeit) / 20S Proteasom
2DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
Å	Angström
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	engl.: ‚charge coupled device‘
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser / Reinstwasser
DNA	engl.: ‚desoxyribonucleic acid‘
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie / Elektronenmikroskop
FEG	engl.: ‚field emission gun‘
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	engl.: ‚high performance liquid chromatography‘
kDa	Kilodalton
LED	Licht-emittierende Diode
MALDI-TOF	engl. ‚matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight‘
Mbp	Megabasenpaare
MDa	Megadalton
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuklearmagnetresonanz
OD	optische Dichte
ORL	offener Leserahmen
p.a.	zur Analyse (lateinisch: ‚pro analysi‘)

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Phe	Phenylalanin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (engl.: <i>small angle x-ray scattering</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>T. acidophilum</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
TA-Gel	Tris-Acetat-Gel
TCE	2,2,2-Trichlorethanol
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie/ Transmissionselektronenmikroskop
TG-Gel	Tris-Glycin-Gel
Ths	Thermosom
TPPII	Tripeptidylpeptidase II
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
VAT	engl.: <i>VCP-like ATPase from Thermoplasma acidophilum</i>
VCP	engl.: <i>valosin-containing protein</i>
w%	Gewichtsprozent (% w/w)

13. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2006 bis April 2010 in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried angefertigt. Ich möchte an dieser Stelle den zahlreichen Menschen danken, die die Entstehung dieser Arbeit durch ihre Mitwirkung und wertvolle Unterstützung auf professioneller und sozialer Ebene ermöglicht und begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt dabei:

Herrn Prof. Wolfgang Baumeister für seine wohlwollende Unterstützung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für die Möglichkeit in einer einzigartigen interdisziplinären Umgebung promovieren zu dürfen.

Stephan Nickell für seine gute Betreuung während der vergangenen Jahre seine stete Motivation und Unterstützung und seine besondere Fähigkeit, zur rechten Zeit die wirklich wichtigen Dinge in den Fokus zu rücken.

István Nagy for his continuous patient support way beyond work-related topics, his friendship and numerous inspiring and valuable discussions on scientific and non-scientific matters.

Christine Kofler, Marius Boicu, Yasuo Mitani, Na Sun und Ágnes Hubert für das hervorragende Arbeitsklima und den freundschaftlichen Zusammenhalt in der ‚Visual Proteomics‘-Gruppe

Radosav Pantelic for his technical support upon realization of the electro elution cassette.

Amy Schönege, Anne Frohn, Torben Kanbach, Liam Wolten und im Besonderen Harald Engelhardt und Stephan Nickell für die detaillierte Durchsicht dieser Arbeit und zahlreiche konstruktive Verbesserungsvorschläge.

Jürgen Plitzko, Günter Pfeifer und Oana Mihalache für Rat und Tat rund um die Elektronenmikroskopie und viele andere nützliche Tipps.

Florian Beck, Thomas Hrabe, Thomas Haller und Andreas Korinek für ihre wertvolle Hilfe bei vertrackten Programmier- und Datenbankproblemen.

Peter Zwickl, Jürgen Peters, Beate Rockel, Harald Engelhardt für zahlreiche interessante Diskussionen.

Susanne Witt, Sarah Breuer und Christian Hoffmann für die angenehme Zeit im Westlabor.

Inga Wolf für die fürsorgliche Betreuung von Odin und Radiolarie und ihrer Hilfe bei vielen anderen Sachen.

Julio Ortiz für seine Unterstützung, seine Freundschaft und den interessanten Nebenprojekten rund um die dritte Dimension.

Lars Andrees für das Aufstellen eines entscheidenden Wegweisers.

der Fußball- und der Volleyballtruppe am MPI für den physischen Ausgleich an zahlreichen kalten Winternachmittagen wie lauen Sommerabenden.

Erzsébet Baka for her daily caretaking during the writing phase of this thesis, inspiring shared lab activities and for her spirit and friendship.

den Freunden fürs Leben, die mich zu jeder Zeit uneingeschränkt unterstützt haben, ganz besonders jedoch Andreas Karg, Semrah Kati und My Linh Ly.

meinem Vater für alles, was er in mich investiert hat.

14. Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Konzeption und Entwicklung von Technologien zur beschleunigten strukturellen Inventarisierung makromolekularer Komplexe am Beispiel von *Thermoplasma acidophilum*“

in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Wolfgang Baumeister ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die vorliegende, vollständige Dissertation wurde nicht vorab veröffentlicht.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Ich habe bisher an keiner anderen Hochschule die Zulassung zur Promotion beantragt.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den

.....

(Roland W. Knispel)