

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

Kryo-EM Struktur des humanen 26S Proteasoms

Andreas Schweitzer

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

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

Die Dissertation wurde am 09.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 21.06.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	ii
Zusammenfassung.....	iv
Summary	v
Einleitung.....	1
Das Ubiquitin-Proteasom-System	1
Aufbau des 26S Proteasoms	2
Das 20S Proteasom (20S CP).....	4
Das 19S Regulatorische Partikel (19S RP).....	6
Die ATPasen Rpt1-Rpt6	6
Das Adaptorprotein Rpn1 & das Strukturprotein Rpn2.....	8
Die Ubiquitinrezeptoren Rpn10 & Rpn13	8
Die Strukturproteine Rpn3, Rpn5-7, Rpn9 & Rpn12.....	10
Die Deubiquitinase Rpn11 & Rpn8.....	11
Elektronenmikroskopie.....	11
Allgemeiner Aufbau und theoretische Grundlagen.....	11
Prinzipien der Einzelpartikelanalyse	15
Ziel der Doktorarbeit	17
Material und Methoden.....	19
Material	19
Puffer für die Gewinnung von Erythrozyten.....	19
Puffer für die 26S Proteasom-Präparation	19
Methoden	20
Gewinnung von Erythrozyten	20
Präparation des humanen 26S Proteasoms.....	20
Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildanalyse.....	21
Ergebnisse	22
Aufreinigung des humanen 26S Proteasoms	22
Funktionelle Charakterisierung.....	23
3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms.....	28

3D-Klassifikation des humanen 26S Proteasoms	34
Diskussion.....	37
3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms.....	37
3D-Klassifikation des humanen 26S Proteasoms	47
Ausblick.....	48
Anhang.....	51
Abkürzungsverzeichnis	51
Literaturverzeichnis	53
Danksagung	62

Zusammenfassung

Das 26S Proteasom dient innerhalb des Ubiquitin-Proteasom-Systems als 2,5 MDa große Protease, die für den kontrollierten Abbau von Proteinen in der Zelle verantwortlich ist. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist für grundlegende zelluläre Funktionen von wesentlicher Bedeutung und nimmt eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Krankheiten wie Krebs oder Alzheimer ein. Aus diesem Grund ist ein mechanistisches Verständnis dieser makromolekularen Maschine erforderlich. Strukturelle Informationen über das 26S Proteasom können einen Einblick in die zugrunde liegende Arbeitsweise des 26S Proteasoms gewähren. Über Jahrzehnte blieben aber Versuche erfolglos, das flexible 26S Proteasom für eine hochaufgelöste Röntgenstrukturanalyse zu kristallisieren. Um die dreidimensionale Struktur dieses Komplexes aufzuklären, wird in dieser Arbeit die Kryo-Elektronenmikroskopie zur Strukturanalyse herangezogen. Mit dieser Methode ist es möglich, isolierte und aufgereinigte Proteinkomplexe einer heterogenen Probe nativ in Eis eingebettet zu betrachten. Mit den digital aufgezeichneten zweidimensionalen Projektionen kann man dann mittels der Einzelpartikelanalyse eine dreidimensionale EM-Dichte bestimmen.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war, eine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur des menschlichen 26S Proteasom-Komplexes zu erhalten, um vor allem detaillierte Einblicke in den Aufbau des 19S Regulatorischen Partikels zu ermöglichen.

Als Grundlage für die Strukturbestimmung wurde zunächst ein Aufreinigungsprotokoll zur Gewinnung von aktiven 26S Proteasom-Molekülen aus humanen Erythrozyten etabliert. Die biochemische Charakterisierung mittels massenspektrometrischer Analyse zeigte, dass alle kanonischen Untereinheiten und keine bis wenige substöchiometrisch, transient bindende Proteine enthalten waren. Die Rekonstruktion der Einzelpartikel aus den elektronenmikroskopischen Daten ergab die Struktur des humanen 26S Proteasoms mit einer Auflösung von 6,8 Å. Das so bestimmte neue Strukturmodell des humanen 26S Proteasoms berichtigt ein bereits bestehendes Modell, dabei vor allem die Lage der Untereinheiten Rpn8, Rpn11 und Rpn12.

Durch Klassifikation und Varianzanalyse konnten zwei Bereiche mit hoher Flexibilität innerhalb des 19S Regulatorischen Partikels bestimmt werden. Die sehr hohe Beweglichkeit der Untereinheit Rpn1 steht vermutlich in Zusammenhang mit ihrer Funktion als Bindestelle für diverse transient bindende Proteine. Bekannt war dies bereits vom Hefe-Proteasom, doch beim humanen 26S Proteasom ist diese Flexibilität wesentlich größer. Völlig unbekannt war bisher die Flexibilität von Rpn6, die beim Homolog aus dem Hefe-Proteasom überhaupt nicht auftritt, aber schon in einer niedrigaufgelösten Struktur des 26S Proteasoms aus der Fruchtfliege zu vermuten war. Der Ursprung der beobachteten Rpn6-Flexibilität ist noch ungeklärt. Sie könnte zellspezifisch und damit natürlichen Ursprungs oder ein Artefakt der Aufreinigung sein. Zur endgültigen Aufklärung dieses Sachverhalts sind weitere Experimente und Untersuchungen erforderlich.

Summary

The 26S proteasome functions in the ubiquitin-proteasome system as a 2.5 MDa large protease which is responsible for the controlled degradation of cellular proteins. Given the importance of the ubiquitin-proteasome system for basic cellular functions, the proteasome can be associated with various diseases such as cancer and Alzheimer's disease. This is, why a mechanistic understanding of this macromolecular machine is necessary. Structural information on the 26S proteasome can provide valuable insights into its underlying mechanisms. Due to decades of unsuccessful attempts to crystallize the flexible 26S proteasome in order to calculate a high-resolution 3D structure using X-ray crystallography, structural analysis of the proteasome in this thesis is based on cryo-electron microscopy. With this method it is possible to view natively ice-embedded protein complexes in a heterogeneous sample. Using single particle analysis, an EM density can be determined from 2D projections.

The primary objective of this study was to calculate a high-resolution 3D structure of the human 26S proteasome in order to obtain structural details of the 19S regulatory particle.

For structure determination, first a purification protocol for obtaining active 26S proteasomes from human red blood cells was established. The biochemical characterization by mass spectrometric analysis showed that all canonical subunits and no or only a few sub-stoichiometrically, transiently binding proteins are included. Using cryo-electron microscopy and single particle analysis, the structure of the human 26S proteasome could be reconstructed at a resolution of 6.8 Å. This new structure corrected an already existing model of the human 26S proteasome in the positioning of subunits Rpn8, Rpn11, and Rpn12.

Through classification and variance analysis two areas with high flexibility have been identified within the 19S regulatory particle. The expected flexibility of subunit Rpn1 is probably associated with the function as a binding site for various transiently binding proteins. This flexibility of Rpn1 is already known from the yeast proteasome, but is more significant in humans. However, the completely unknown flexibility of Rpn6 in yeast proteasomes is in contrast to the findings in humans and in the fruit fly. Whether the flexibility of Rpn6 is of natural origin, cell-specific, or artificially induced by the purification of the proteasome, needs to be clarified by further experiments.

Einleitung

Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) beschreibt die Hauptroute des intrazellulären Proteinabbaus, bei dem ATP-abhängig die kontrollierte Zerstörung einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen im Nukleus und im Zytosol erfolgt (Glickman et al. 2002, Finley 2009). Von diesem Abbau betroffen sind Proteine mit kurzer Halbwertszeit wie regulatorische Proteine, Polypeptide, die während oder nach der Proteinsynthese falsch gefaltet vorliegen und geschädigte Proteine. Der kontrollierte Abbau erfolgt zum einem zur Wiederverwertung der Aminosäuren und zum anderen zur Vorbeugung der Bildung von krankheitsfördernden Proteinaggregaten. Das UPS spielt damit eine zentrale Rolle bei der Kontrolle grundlegender Zellprozesse während des Zellzyklus' sowie bei der Kontrolle der Proteinqualität, Transkription, Signaltransduktion und Apoptose (Finley 2009). Störungen des empfindlichen Proteinabbausystems können Auslöser für viele Erkrankungen sein, darunter einige neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Chorea Huntington (Glickman et al. 2002), aber auch Mukoviszidose (Kopito 1999, Bence et al. 2001).

Die Aufgabe, nicht benötigte oder fehlerhafte Proteine abzubauen, übernimmt dabei eine 2,5 MDa Protease, das Proteasom. Beim Proteasom handelt es sich um einen multimeren Proteinkomplex, der je nach Proteasom-Spezies aus bis zu 33 verschiedenen Untereinheiten bestehen kann (Voges et al. 1999, Finley 2009). Diese Protease zerlegt ihre Substrate durch Chymotrypsin-, Trypsin- und Kaspase-ähnliche Aktivität, d.h. der Abbau erfolgt nach hydrophoben, basischen oder sauren Aminosäuren (Kisselev et al. 1998, Nussbaum et al. 1998, Borissenko et al. 2007). Das Proteasom zeichnet sich dabei einerseits durch eine gewisse Promiskuität aus: den Abbau jegliche Art von Protein; andererseits durch hohe Selektivität: keine Degradation bei nicht geschädigten und noch benötigten Proteinen. Die hohe Selektivität erfolgt im UPS durch die Markierung des abzubauenen Proteins mit dem 8,5 kDa Protein Ubiquitin (Hershko et al. 1992, Coux et al. 1996, Pickart et al. 2004, Bhattacharyya et al. 2014).

Eine Enzymkaskade (Abb. 1), bestehend aus einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1, einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym E2 und einer Ubiquitin-Protein Ligase E3, modifiziert das Zielprotein ATP-abhängig mit einer Kette von Ubiquitinmolekülen. Die Verknüpfung erfolgt durch eine Isopeptidbindung zwischen einem Lysin des Proteins mit der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins. Die Isopeptidbindungen innerhalb der Kette entstehen über das Lysin des einen Ubiquitins mit der C-ständigen Carboxylgruppe des anderen Ubiquitins (Glickman et al. 2002, Finley 2009).

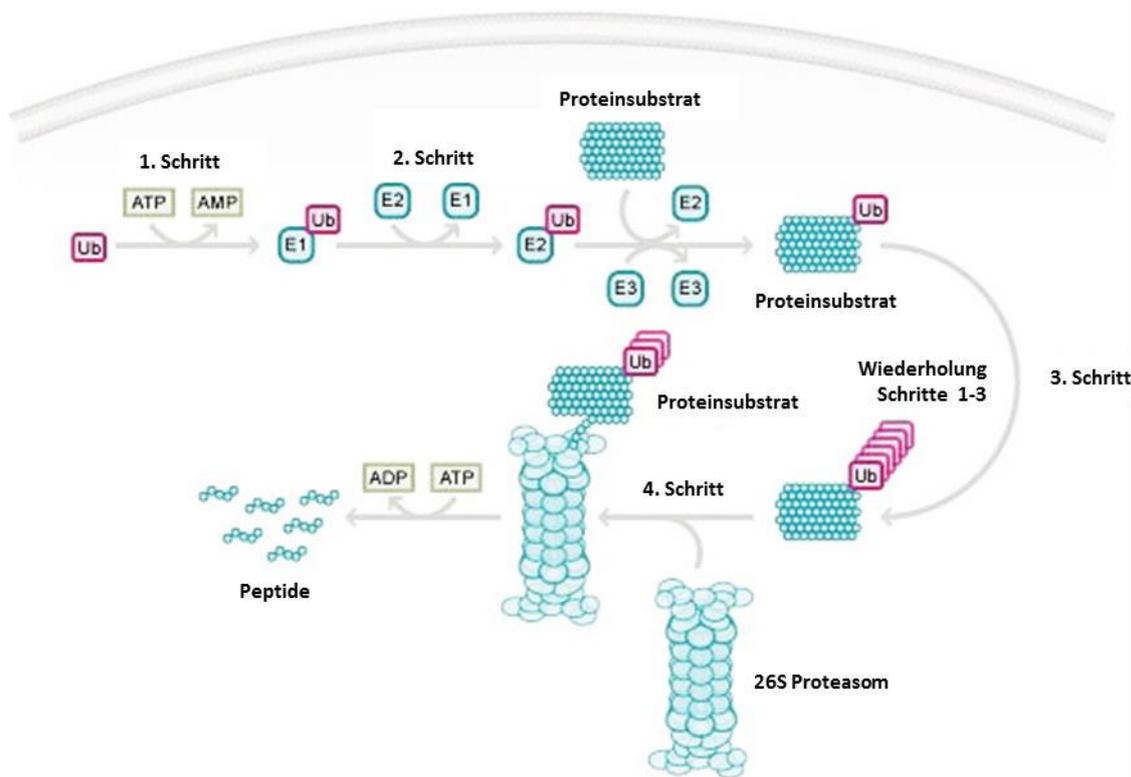


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Substratubiquitinierung durch die Enzyme E1-E3 und des Substratabbaus durch das 26S Proteasom. Abbildung adaptiert aus Corn (Corn 2007).

Aufbau des 26S Proteasoms

Die Aufklärung des allgemeinen Aufbaus des 26S Proteasoms (aus Embryos von *Drosophila melanogaster* oder aus Oozyten von *Xenopus laevis*) erfolgte bereits in den 90er Jahren durch Elektronenmikroskopie (EM) an mit Schwermetallsalzen kontrastierten Präparaten (Peters et al. 1993, Walz et al. 1998). Das 26S Proteasom (Abb. 2) setzt sich aus zwei großen Einheiten zusammen (Voges et al. 1999). Zum einen besteht es aus einer zentralen proteolytischen Einheit, mit jeweils zwei Kopien von 14 verschiedenen Untereinheiten, das 20S Proteasom (~700 kDa) oder Kernpartikel (core particle, CP). Zum anderen besitzt es ein oder zwei 19S Regulatorische Partikel (19S RP) oder PA700 (je 970 kDa), die sich an den beiden Enden des Kernkomplexes befinden und aus jeweils 19 verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind (Peters et al. 1993).

Die erste höher aufgelöste Struktur (Subnanometerbereich) des 26S Proteasoms aus *Schizosaccharomyces pombe* gelang erst im Jahre 2010 mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie. Diese ermöglichte es, einige Untereinheiten im 19S RPs (Rpt1-6, Rpn11) zu beschreiben und zu lokalisieren (Bohn et al. 2010). Allerdings blieben die Positionen weiterer Untereinheiten wie der Ubiquitinrezeptoren ungeklärt. In den darauffolgenden Jahren erschienen weitere detaillierte Strukturanalysen des 26S Proteasoms, vor allem bezüglich des 19S RPs (Beck et al. 2012, Lander et al. 2012, Lasker et al. 2012, Matyskiela et al. 2013, Sledz et al. 2013).

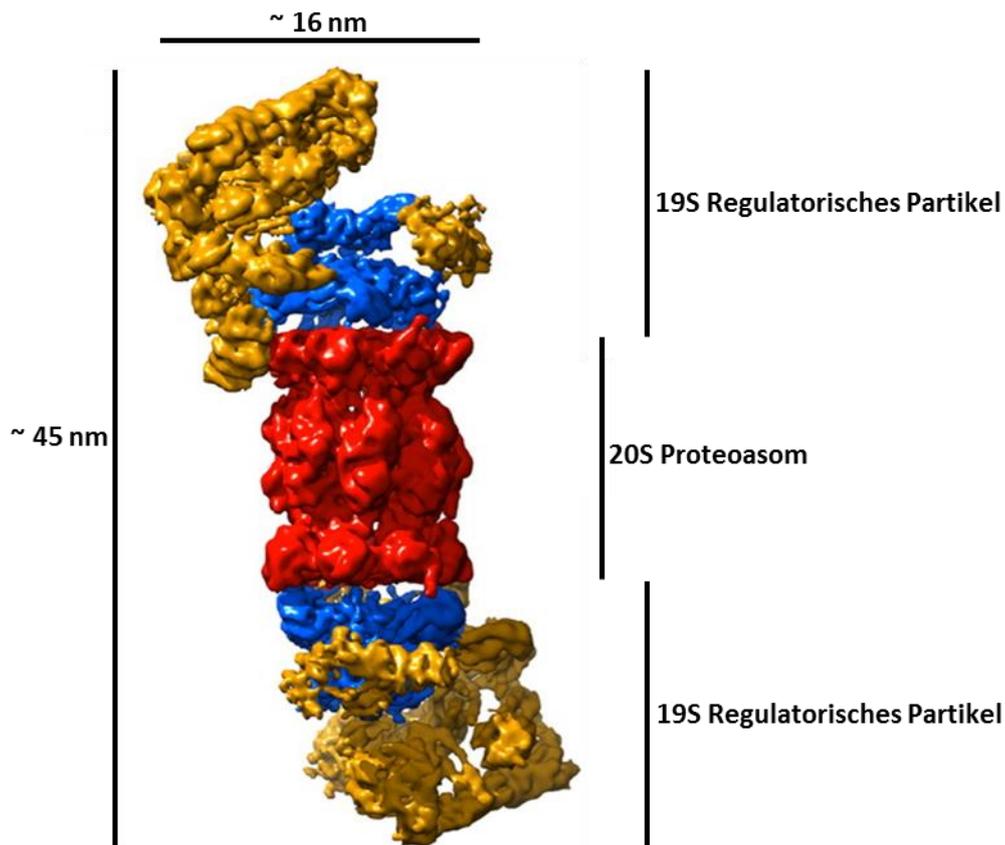


Abbildung 2 *Single Particle* kryo-elektronenmikroskopische Rekonstruktion des 26S Proteasom aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* bei einer Auflösung von 8,4 Å. Das 20S Proteasom ist in rot dargestellt. Die ATPasen (blau) und die Nicht-ATPasen (gold) bilden zusammen das 19S Regulatorische Partikel. Abbildung adaptiert aus Lasker *et al.* (Lasker *et al.* 2012).

Die daran beteiligten Wissenschaftler bestimmten unabhängig voneinander Strukturen des 26S Proteasoms aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit einer Auflösung von 7,7-9 Å. Diese bildeten die Grundlage, um in einem hybriden Ansatz den Aufbau des makromolekularen, flexiblen und dynamischen 26S Proteasoms zu vervollständigen. Die Informationen für diesen hybriden Ansatz gewann man aus Kristallstrukturen einzelner Untereinheiten, Homologiemodellen nicht kristallisierbarer Untereinheiten, Protein-Protein-*crosslinking* mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (Bohn *et al.* 2010, Lasker *et al.* 2012), oder aus *negative stain*-Daten von heterolog exprimierten 26S Proteasom-Subkomplexen (Lander *et al.* 2012).

Nachdem die Lokalisation der stöchiometrischen Untereinheiten des 26S Proteasoms abgeschlossen war, widmete man sich der Art und Weise, wie das 26S Proteasom in der Zelle arbeitet. Traditionell erfolgt die Aufreinigung des 26S Proteasoms bei hoher ATP-Konzentration, so dass es nahe lag, eine Strukturveränderung des 26S Proteasom durch Austausch von ATP gegen ATP-Analoga herbeizuführen (Sledz *et al.* 2013). Ein komplementärer Ansatz war die Komplexierung des 26S Proteasom mit ubiquitiniertem Substrat (Matyskiela *et al.* 2013). Beide Ansätze führten zu dem Ergebnis, dass mindestens zwei unterschiedliche Zustände vorliegen: ein Ruhezustand oder S1-Zustand (Aufreinigung in Gegenwart von ATP) und eine aktivierte Form des 26S Proteasoms, oder S3-Zustand

(Matyskiela et al. 2013, Sledz et al. 2013). Dabei lassen sich S1-, S3- und die Zwischenform S2-Zustand wie folgt charakterisieren (Tab. 1). Bei einer Aufreinigung in Gegenwart von ATP liegen der S1- und S2-Zustand des 26S Proteasoms gleichzeitig vor. Allerdings ist der S1-Zustand mit einer Häufigkeit von ca. 80 % die Hauptkonfiguration (Aufderheide et al. 2015).

Tabelle 1 Charakteristische Eigenschaften der drei 26S Proteasom-Konfigurationen.

S1-Zustand	<ul style="list-style-type: none"> - treppenstufige Anordnung der ATPasen mit Rpt3 an höchster Position - keine geordnete Ausrichtung der ATPasen und 20S Proteasom (Nickell et al. 2009, Bohn et al. 2010, Beck et al. 2012, Lander et al. 2012)
S2-Zustand	<ul style="list-style-type: none"> - gleiche „Treppe“ wie im S1-Zustand - abgestimmter Aufbau von ATPasen und 20S Proteasom (im Gegensatz zu S1) - Rotation der restlichen 19S RP Untereinheiten um 25° - Rpn11 ist substratzugänglich - Rpn10 ist näher an den ATPasen (Unverdorben et al. 2014)
S3-Zustand	<ul style="list-style-type: none"> - Treppenstufige Anordnung der ATPasen mit Rpt1 an höchster Position - gleiche Position von Rpn10 und Rpn11 wie in S2 bei gleichzeitiger Verschiebung der restlichen 19S RP Untereinheiten (Matyskiela et al. 2013, Sledz et al. 2013)

Das 20S Proteasom (20S CP)

Das eukaryotische 20S Proteasom besitzt eine zylinderförmige Struktur mit C_2 -Symmetrie (Abb. 3), die aus 4 aufeinander liegenden Ringen aufgebaut ist. Die äußeren Ringe werden aus jeweils 7 verwandten, aber unterschiedlichen α -Untereinheiten gebildet, während die zwei inneren Ringe aus jeweils 7 verwandten, ebenfalls unterschiedlichen β -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Entlang der Längsachse des hohlen 20S-Zylinders liegen zwei kleinere Kammern (Vorkammern), gebildet zwischen α - und β -Ring, und eine mittlere große Kammer (Zentralkammer), die nur von den β -Ring gebildet wird (Groll et al. 1997, Groll et al. 2000, Unno et al. 2002).

Den α - und β -Ring fallen dabei unterschiedliche Aufgaben zu. Die N-Termini der α -Untereinheiten (α_2 , α_3 , α_4) schließen die zentralen Kanäle und beschränken somit den Zugang zu den aktiven Zentren nur auf entfaltete Polypeptidketten (Groll et al. 1997, Groll et al. 2000). In der Zentralkammer besitzen drei der β -Untereinheiten eines Ringes durch einen N-terminalen Threoninrest Kaspase-ähnliche (β_1), Trypsin-ähnliche (β_2) und Chymotrypsin-ähnliche (β_5) Aktivität (Seemuller et al. 1995, Borissenko et al. 2007).

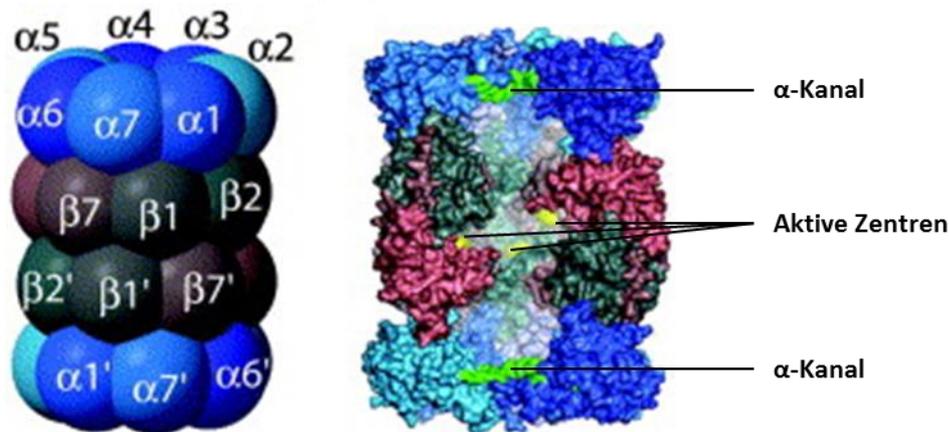


Abbildung 3 Schematische Darstellung des 20S Proteasoms (links). Das Schnittmodell des 20S Proteasoms (rechts) zeigt die Vorkammern mit den α -Kanälen sowie die Zentralkammer mit den aktiven Zentren. Abbildung adaptiert aus Rechsteiner *et al.* (Rechsteiner *et al.* 2005).

Im nicht-aktivierten Zustand des 20S Proteasoms können gefaltete und intakte Proteine, die zur Zellfunktion immer noch benötigt werden, von dem an sich unspezifischen 20S Proteasom nicht gespalten werden (Baumeister *et al.* 1998). Die Aktivierung des 20S Proteasoms und, damit einhergehend, die Öffnung der Kanäle in den α -Ringern erfolgt durch Bindung von verschiedenen Aktivator-Komplexen (Stadtmueller *et al.* 2011), wie beispielsweise durch Anbindung an das 19S RP. Dabei binden die C-Termini der ATPasen (*Regulatory Particle Triple-A ATPase* oder kurz Rpt) Rpt2, Rpt3 und Rpt5 in die α -Taschen, Zwischenräume zwischen den α -Untereinheiten, des jeweiligen 20S Proteasom-Ringes. Wichtig für diese Assoziierung sind die C-terminalen Aminosäuren, die ein sogenanntes HbXY-Motiv bilden, wobei Hb für jede hydrophobe, X für jede beliebige Aminosäure steht, und Y dem Tyrosin entspricht (Smith *et al.* 2007, Gillette *et al.* 2008, Rabl *et al.* 2008).

Neben dem 19S RP existieren noch weitere 20S Proteasom-Aktivatoren wie der 11S/REG/PA28 Aktivator-Komplex (REG: *Regulator*; PA: *Protein Activator*) oder der *Proteasome Activator* 200 PA200/Blm200 (Ortega *et al.* 2005, Stadtmueller *et al.* 2011). PA28 besteht aus einem heptameren Ring, der aus 28 kDa großen α - und β -Untereinheiten oder nur aus γ -Untereinheiten zusammengesetzt ist (Ma *et al.* 1992, Whitby *et al.* 2000, Stadtmueller *et al.* 2011). PA28 katalysiert die Zerlegung von Proteinsubstraten ATP- und Ubiquitin-unabhängig (Finley 2009). Ein ATP-abhängiger Aktivator-Komplex dagegen ist die aus 6 Untereinheiten bestehende AAA+-ATPase Cdc48/p97/VCP (*Transitional endoplasmic reticulum ATPase, TER-ATPase*). Die *TER-ATPase* findet man in allen Archaeen und Eukaryoten (Barthelme *et al.* 2012); sie ist an diversen proteolytischen Vorgängen beteiligt (Meyer *et al.* 2012). Ihre detaillierte Arbeitsweise ist aber noch größtenteils unverstanden (Barthelme *et al.* 2012).

Das 19S Regulatorische Partikel (19S RP)

Die einzige Aufgabe des 20S Proteasoms ist die Hydrolyse von Peptidbindungen im entfalteten Substrat. Dahingegen sind die Aufgaben des 19S RP vielfältiger, dazu gehören: Substraterkennung, Substratentfaltung und Substrattransport sowie Ubiquitinrecycling. Dementsprechend ist die Zusammensetzung des 19S komplexer und auch seine Funktionsweise differenzierter. Die strukturelle Verbindung des 19S RPs zum 20S Proteasom ist zudem flexibel und dynamisch (Beck et al. 2012, Lander et al. 2012, Lasker et al. 2012, Sledz et al. 2013, Unverdorben et al. 2014).

Das 19S RP wird gemäß traditioneller Nomenklatur in zwei größere Komplexe unterteilt: in Basis (*base*) und Kappe (*lid*) (Voges et al. 1999). Die Basis des 19S RPs besteht aus 10 Untereinheiten (6 ATPasen Rpt1-6, zwei Ubiquitinrezeptoren *Regulatory Particle Non-ATPase* (Rpn) Rpn10 und Rpn13, Rpn1 und Rpn2 (Abb. 4, links)). Die Kappe des 19S RPs setzt sich aus den restlichen 8 Untereinheiten Rpn3, Rpn5-9, Rpn11-12 (Abb. 4, rechts) zusammen.

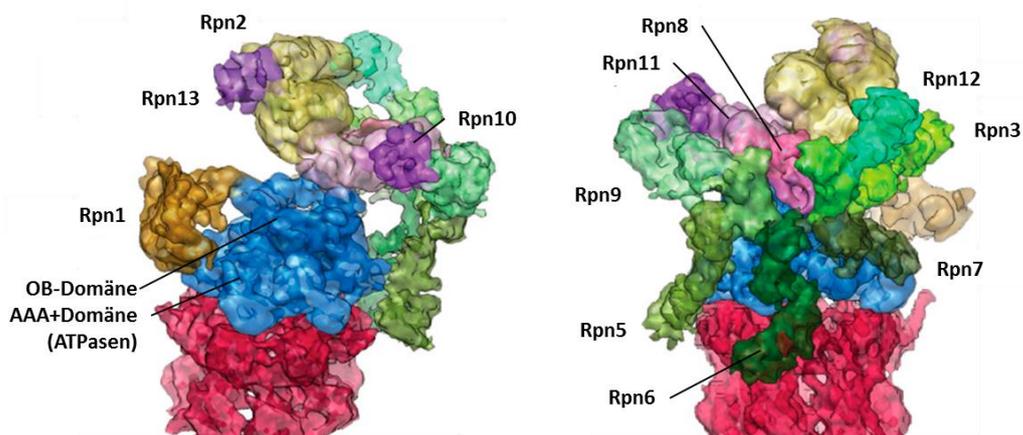


Abbildung 4 Molekulare Architektur des 19S RPs aus der Hefe *S. pombe*. Segmentierte Dichten der Basis-Untereinheiten (rechts) und der Kappen-Untereinheiten (links). Da Rpn13 substöchiometrisch in *S. pombe* vorliegt, wurde das Homolog aus *S. cerevisiae* verwendet. Abbildung adaptiert aus Lasker et al. (Lasker et al. 2012).

Die ATPasen Rpt1-Rpt6

Die 6 AAA+-ATPasen (Neuwald et al. 1999, Iyer et al. 2004, Hanson et al. 2005) der Basis bilden einen Ring, der flach auf einem α -Ring des 20S Proteasoms liegt (Abb. 5).

Die verwandten, aber unterschiedlichen ATPasen teilen sich ein gemeinsames Bauprinzip: Einem ausgedehnten α -helikalen *coiled-coil*-bildenden Bereich am N-Terminus folgt eine Domäne mit Oligonukleotid/Oligosaccharid-Bindedomänen-Faltung (OB-Domäne) und eine AAA+-Domäne, bestehend aus großer und kleiner Subdomäne am C-Terminus (Zhang et al. 2009, Bar-Nun et al. 2012). Während sich der große AAA+-Domänen-Ring auf dem α -Ring des 20S Proteasoms befindet, formt die OB-Domäne einen kleineren Ring, der flexibel auf dem AAA+-Domänen-Ring liegt (Beck et al. 2012, Lasker et al. 2012).

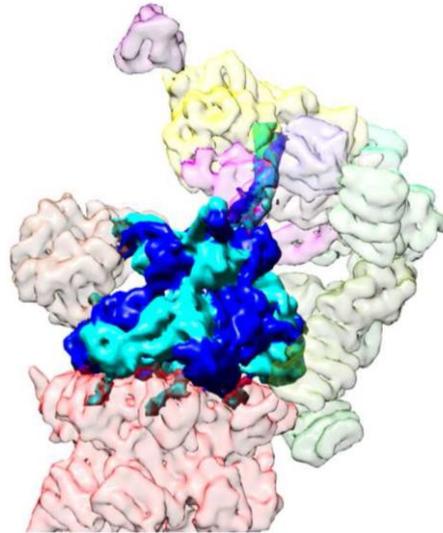


Abbildung 5 Position der AAA+-ATPasen (abwechselnd hell und dunkelblau) innerhalb der 26S Proteasoms aus *S. cerevisiae*. Abbildung aus Unverdorben (Unverdorben 2014).

Die Elemente der ATP-Bindung, Hydrolyse und $\text{ADP}+\text{P}_i$ -Freisetzung liegen an der Grenzfläche der großen Subdomänen innerhalb der AAA+-Domäne. Durch den ATP-Hydrolyse-Zyklus kommt es innerhalb der AAA+-Domäne zu Verschiebungen der Domänenabschnitte zueinander. Auf diese Weise induzieren die ATPasen eine mechanische Kraft, die für die Entfaltung und Translokation von Proteinen notwendig ist (Hanson et al. 2005).

Ob der ATP-Hydrolyse-Zyklus einer ATPase allosterische Auswirkungen auf den Zyklus benachbarter ATPasen hat und somit den ganzen ATP-Zyklus innerhalb eines Ringes koordiniert (Glynn et al. 2012, Kim et al. 2015), ist bislang unklar. Möglich, wenn auch unwahrscheinlicher, wäre auch eine nicht-koordinierte Arbeitsweise des Ringes (Martin et al. 2005). Hydrophobe Aminosäuren in den Peptidschleifen (*loops*) der großen AAA+-Domäne sind zum unteren ATPasen-Kanal hin ausgerichtet und übertragen die erzeugte Kraft direkt auf einen unstrukturierten Bereich des zu entfaltenden und translozierenden Proteins (Wang et al. 2001, Hinnerwisch et al. 2005, Hinnerwisch et al. 2005). Wie aber das Proteasom die unstrukturierte Proteinsequenz innerhalb des Substrates erkennt, ist noch ungeklärt, da es bislang noch keine hochaufgelöste Struktur der 26S Proteasom-Substrat-Komplexes gibt. Um den ATPase-Motor mit den Untereinheiten der Substratverarbeitung zu koordinieren, stehen die ATPasen über ihre drei N-terminalen *coiled-coil*-Strukturen, Rpt1/2, Rpt6/3 und Rpt4/5, mit Rpn1, Rpn2 und der Kappe in Kontakt (Beck et al. 2012).

Im S1-Zustand (Aufreinigung in Gegenwart von ATP) ist der Kanal im ATPase-Ring der Basis des 19S RPs gegenüber dem Kanal des α -Rings des 20S Proteasoms um etwa 1 nm verschoben (Nickell et al. 2009, Bohn et al. 2010, Lander et al. 2012). Erst durch Austausch von ATP gegen $\text{ATP}\gamma\text{S}$ im Puffer, oder durch Bindung eines Substrats verschieben sich die Ringe so zueinander, dass ein zentraler Kanal ausgehend vom ATPase-Ring durch den α -Ring hin zu den aktiven Zentren im β -Ring entsteht (Matyskiela et al. 2013, Sledz et al. 2013). Durch diesen Kanal kann die entfaltete Polypeptidkette des Substrates vom 19S RP in das

20S Proteasom transloziert werden. Aufgrund der Änderung der relativen Positionen vor allem der ATPasen-Paare Rpt1/2 und Rpt6/3 zueinander weitet sich zudem der so entstandene Kanal auf (Sledz et al. 2013).

Das Adaptorprotein Rpn1 & das Strukturprotein Rpn2

Die beiden größten Untereinheiten des gesamten 26S Proteasoms sind Rpn1 und Rpn2 (Abb. 6).

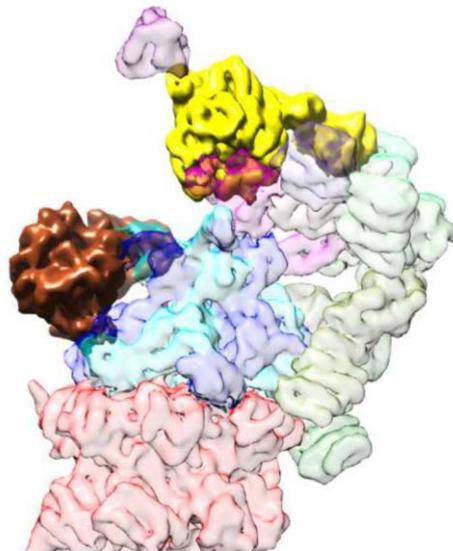


Abbildung 6 Position von Rpn1 (braun) und Rpn2 (gelb) innerhalb des 26S Proteasoms aus *S. cerevisiae*. Abbildung aus Unverdorben (Unverdorben 2014).

Rpn1 dient als Bindungsplattform für transient bindende Proteine, die eine Vielzahl von Funktionen am Proteasom erfüllen. Neben der Aufgabe als strukturgebende Untereinheit des 26S Proteasoms kann Rpn2 auch als Bindestelle innerhalb des Proteasom-Komplexes fungieren. Rpn1 bindet, isoliert von allen anderen Untereinheiten der Kappe, seitlich an den ATPase-Ring (Abb. 6). Rpn2 hingegen sitzt über dem ATPase-Ring und ist maßgeblich an der Struktur des 19S RP beteiligt. Beide Untereinheiten zeichnen sich strukturell durch die elffache Wiederholung des 35-40 Aminosäuren langen *proteasome/cyclosome* (PC)-Motives aus. Dabei bildet die PC-Domäne eine toroidale Struktur, bestehend aus zwei konzentrischen Ringen von axial ausgerichteten α -Helices, die wiederum zwei axiale α -Helices einschließen (He et al. 2012). Auf N-terminaler Seite ist sie von einer gestreckten Domäne, bestehend aus 17 nacheinander angeordneten α -Helices, umgeben. Dahingegen befindet sich am C-Terminus eine globuläre Domäne. Im Vergleich zu Rpn2 ist die N-terminale Domäne in Rpn1 anders orientiert (He et al. 2012).

Die Ubiquitinrezeptoren Rpn10 & Rpn13

Die beiden integralen Ubiquitin (Ub)-Rezeptoren liegen in der Peripherie des 26S Proteasoms (Abb. 7). So bindet Rpn13 nur an Rpn2 (Husnjak et al. 2008, Schreiner et al. 2008, He et al. 2012). Rpn10 bindet über Rpn8 an das 26S Proteasom (Beck et al. 2012). Während in Rpn13 die Pru-Domäne (Pleckstrin-ähnlicher Rezeptor für Ubiquitin) die Ub-Erkennung übernimmt

(Husnjak et al. 2008), erfüllt diese Aufgabe in Rpn10 (Riedinger et al. 2010) die UIM-Domäne (Ubiquitin-Interagierendes Motiv).

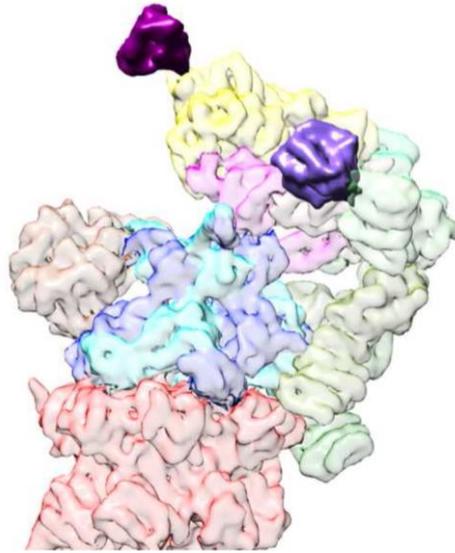


Abbildung 7 Position von Rpn10 (violett) und Rpn13 (malve) innerhalb des 26S Proteasoms aus *S. cerevisiae*. Abbildung aus Unverdorben (Unverdorben 2014).

Neben den konstitutiven Ub-Rezeptoren Rpn10 und Rpn13 arbeitet das 26S Proteasom mit einer Reihe von weiteren transient bindenden Ub-Rezeptoren zusammen (Elsasser et al. 2004, Husnjak et al. 2008). Fast immer dient dabei Rpn1 als Bindestelle für diese Art der Ub-Rezeptoren (Elsasser et al. 2002, Husnjak et al. 2008), der Rad23, Dsk2 und Ddi1, allesamt Mitglieder der UBL-UBA-Familie, angehören (Chen et al. 2002, Funakoshi et al. 2002, Kaplun et al. 2005, Husnjak et al. 2008). Diese Familie ist durch zwei Domänen gekennzeichnet, die über eine Aminosäurekette miteinander verknüpft sind (Fishbain et al. 2011). Die C-terminale UBA-Domäne (Ubiquitin-Assoziierte Domäne) erkennt Ub, während die N-terminale UBL-Domäne (Ubiquitin-Ähnliche Domäne) an das 26S Proteasom bindet (Funakoshi et al. 2002, Saeki et al. 2002). Auch Rpn10 ist in der Lage, Mitglieder der UBL-UBA-Familie zu binden (Hiyama et al. 1999, Walters et al. 2002, Elsasser et al. 2004, Husnjak et al. 2008).

Der Grund für die verschiedenen zellulären Ub-Rezeptoren, die in allen möglichen Kombinationen an das 26S Proteasom binden können, liegt wahrscheinlich in der Vielfalt der abzubauenen Substrate. Das 26S Proteasom muss nicht nur viele verschiedene Proteine abbauen, sondern auch sehr viele unterschiedliche Poly-Ub-Ketten erkennen. So können sich Poly-Ub-Ketten in der Anzahl der verknüpften Ub-Moleküle, der Art der Verknüpfung und in der Position der Ketten im Substrat unterscheiden. Durch diese Vielfalt der Poly-Ub-Ketten kann die Zelle die Stärke der Substratbindung ans Proteasom und somit die Verweildauer des Substrates am Proteasom steuern. Die Substratpositionierung als auch die tatsächliche Bindezeit des Substrats an das 26S Proteasom wird zusätzlich durch Bindung von externen Deubiquitinasen reguliert. Dazu gehören beispielsweise Uch37, welches an Rpn13 bindet (Husnjak et al. 2008), die Rpn1-bindende Deubiquitinase Ubp6 (Guterman et al. 2004, Hanna

et al. 2006, Aufderheide et al. 2015, Bashore et al. 2015) sowie E3 Ubiquitin-Ligasen, wie das Rpn2-bindende E3 Enzym Hul5 (Crosas et al. 2006). Ein fein reguliertes Gleichgewicht aus Ub-Rezeptoren, Deubiquitinasen und Ligasen entscheidet über den Substratabbau durch das 26S Proteasom.

Jede der oben erwähnten Ub-Bindedomänen kann *in vitro* ein oder mehrere Ub-Moleküle gleichzeitig binden (Wang et al. 2005, Husnjak et al. 2008, Schreiner et al. 2008). Eine lineare Ub-Kette in gestreckter Form, bestehend aus 4 Untereinheiten, könnte die Distanz von Rpn10 bis zu Rpn13 überspannen (Komander 2009, Lander et al. 2012). Ein tetraubiquitiniertes Substrat kann dann gleichzeitig von Rpn10 und Rpn13 gebunden werden (Lasker et al. 2012, Sakata et al. 2012). Dies muss aber nicht sein, da lineare Ub-Ketten auch kürzere, kompaktere Konfigurationen annehmen können (Cook et al. 1994, Eddins et al. 2007). Deletionsstudien an Rpn10 und Rpn13 in Hefe zeigten, dass deren Wachstum nur geringfügig beeinträchtigt worden ist, selbst in Doppelmутanten. Demzufolge ist die gleichzeitige Bindung der Ub-Ketten an Rpn10 und Rpn13 wohl keine absolute Bedingung für den Substratabbau (Husnjak et al. 2008).

Die Strukturproteine Rpn3, Rpn5-7, Rpn9 & Rpn12

Die Kappe des 19S RPs wird aus insgesamt 8 Untereinheiten gebildet. Sie liegt seitlich an den ATPasen an und befindet sich gegenüber von Rpn1 (Abb. 4). Die Untereinheiten Rpn3, 5, 6, 7, 9 und 12 (Abb. 8) bilden mit ihren C-terminalen PCI-Domänen ein nach oben offenes Hufeisen mit radial nach außen gerichteten N-terminalen α -Helices (Lasker et al. 2012, Pathare et al. 2012).

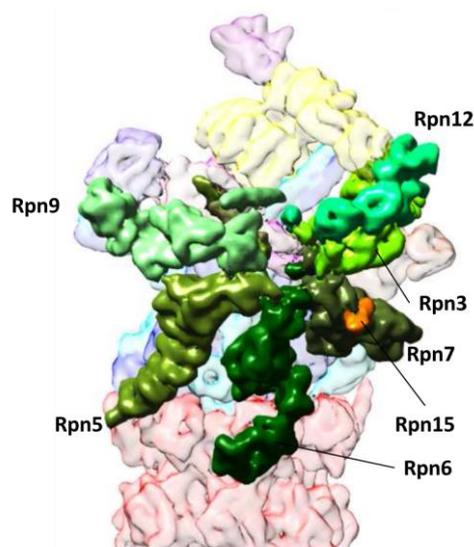


Abbildung 8 Position von Rpn3, 5, 6, 7, 9, 12 (grün-Töne) und Rpn15 (orange) innerhalb des 26S Proteasoms aus *S. cerevisiae*. Abbildung adaptiert aus Unverdorben (Unverdorben 2014).

Während alle PCI-Proteine über ihre C-Termini miteinander in Kontakt stehen, interagieren die Untereinheiten Rpn5 und Rpn6 über ihre N-Termini mit den α -Untereinheiten des 20S Proteasoms und bilden so eine Art Klammer (Pathare et al. 2012), die das 19S RP stabilisiert. Andere Funktionen dieser Untereinheiten sind derzeit nicht bekannt.

Die Deubiquitinase Rpn11 & Rpn8

Am oberen Ende des Hufeisens liegen die beiden letzten kanonischen, eng miteinander verwandten Untereinheiten Rpn8 und Rpn11 (Abb. 9). Zusammen formen sie ein Heterodimer, in dem aber nur die Metalloprotease Rpn11 Zn^{2+} -abhängig katalytisch aktiv ist (Pathare et al. 2014, Worden et al. 2014). Die Aktivität von Rpn11 ist zudem an den ATP-Zyklus der ATPasen und damit an die Substrattranslokation gekoppelt (Finley 2009). Im ATP-gebundenen Ruhezustand des 26S Proteasoms zeigt das aktive Zentrum von Rpn11 weg von der Abbauroute zwischen Rpn10 und dem OB-Ring der ATPasen (Beck et al. 2012, Lander et al. 2012). Bindet das 26S Proteasom aber Substrat, wird Rpn11 so verschoben, dass das aktive Zentrum nun in der Translokationsroute liegt und die Ub-Kette abgespalten werden kann (Unverdorben et al. 2014). Im Gegensatz zu den Ub-Ketten zerlegenden exo-Deubiquitinasen Ubp6 und Uch37 trennt Rpn11 ganze Ubiquitinketten vom Substrat und nimmt somit eine Schlüsselstellung beim kontrollierten Abbau von Substraten ein (Verma et al. 2002, Yao et al. 2002).

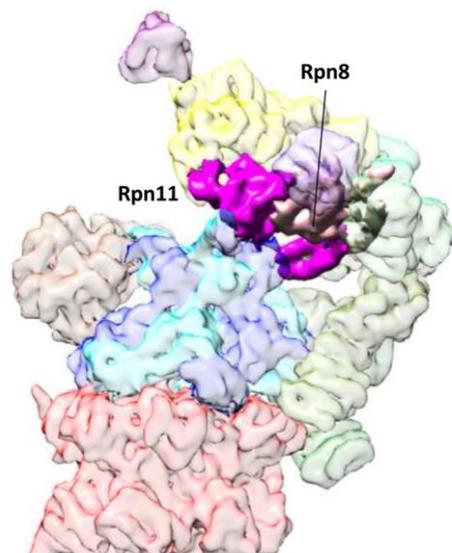


Abbildung 9 Position von Rpn11 (pink) und Rpn8 (rosa) innerhalb des 26S Proteasoms aus *S. cerevisiae*. Abbildung adaptiert aus Unverdorben (Unverdorben 2014).

Elektronenmikroskopie

Allgemeiner Aufbau und theoretische Grundlagen

Die in dieser Doktorarbeit vorliegenden Strukturuntersuchungen am 26S Proteasom erfolgten mit Hilfe der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie, Kryo-EM (*cryo-EM*) und der anschließenden Einzelpartikelanalyse (*single particle analysis*). Für die Datenakquise kam ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) der Bauart Titan Krios (FEI Company, NL) zum Einsatz. Der generelle optische Aufbau eines solch technisch aufwändigen Gerätes ist sehr ähnlich zum gewöhnlichen Durchlichtmikroskop (Abb. 10). Doch die Art der benutzten Strahlung und damit einhergehend die optischen Komponenten, deren Handhabung und deren Detektion unterscheiden sich wesentlich vom Durchlichtmikroskop.

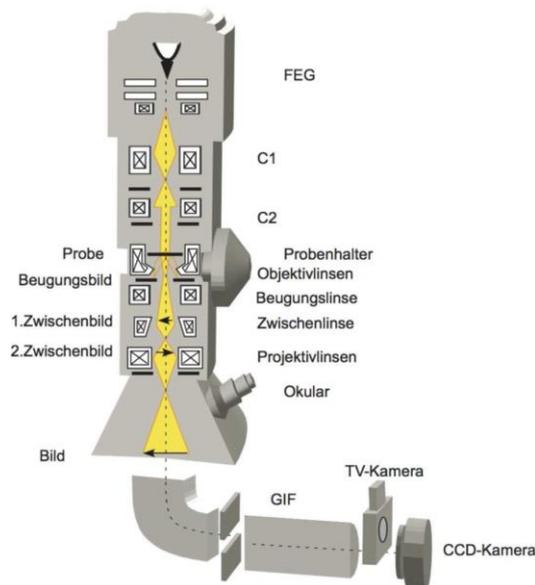


Abbildung 10 Schematischer Aufbau eines TEMs. Im Gegensatz zum hier dargestellten Aufbau eines TEMs verfügt das FEI Titan Krios über drei Kondensorlinsen (C1-C3). Abbildung aus Schweikert (Schweikert 2004).

Bei dem verwendeten TEM dient eine Feldemissionsquelle (*field-emission gun*, FEG) als Elektronenquelle. Die Extraktion der Elektronen erfolgt aus einer feinen Wolframspitze, die als Kathode fungiert. Während ein starkes elektrisches Feld die Elektronen zunächst aus der Kathode extrahiert, beschleunigt eine Anode bei einer angelegten Spannung von 300 kV die Elektronen. Damit gelingt es, einen sowohl zeitlich als auch räumlich hochkohärenten Elektronenstrahl zu generieren. Um diesen in der Objektebene zu fokussieren und ihn parallel auf die Probe treffen zu lassen, sind beim Titan Krios drei Kondensorlinsen, die oberhalb der Objektivlinse und der Probe angebracht sind, nötig. Generell verwendet man in einem Elektronenmikroskop elektromagnetische Linsen. Wie der Wortteil „Transmission“ in TEM andeutet, nutzt diese Technik nur die Elektronen zur Abbildung eines Objektes, welche die Probe durchstrahlen. Die Wechselwirkung der Strahlelektronen mit dem Probenmaterial erzeugt sowohl elastisch als auch inelastisch gestreute Elektronen. Während die elastisch gestreuten Elektronen nur ihre Flugbahn ändern (großer Streuwinkelbereich) erleiden die inelastisch gestreuten Elektronen zusätzlich noch einen Energieverlust (kleiner Streuwinkelbereich). Die elastisch gestreuten Elektronen sind wesentlich für die Bildentstehung und bilden hinter der Objektivlinse ein erstes Zwischenbild ab. Durch die Kombination mehrerer Projektivlinsen (im Anschluss an die Objektivlinse) erzielt man die gewünschte Nachvergrößerung. Alle elektronenoptischen Bauteile befinden sich im Ultrahochvakuum, um eine Interaktion der Elektronen und damit eine zusätzliche Streuung mit Gasmolekülen zu vermeiden. In der finalen Bildebene kann das Objekt dann klassisch auf dem Fluoreszenzschirm betrachtet werden. Ursprünglich verwendete man Filme (Negativplatten) zur Bildaufzeichnung. Seit den 1990ern sind aber digitale Bildaufnahmeverfahren üblich. Herkömmliche Digitalkameras (CCDs, *charge coupled devices*) detektierten das eintreffende Signal indirekt, indem die Elektronen in einer Szintillatorschicht zunächst abgebremst und dann zu Licht (Photonen) umgewandelt werden. Je nach Szintillatoreigenschaften wird die räumliche Auflösung erheblich herabgesetzt (*point*

spread function, PSF) und ein großer Teil des eintreffenden Signals geht verloren. Die Signalausbeute (*detection quantum efficiency*, DQE) von CCDs ist damit äußerst gering; nur ca. 1/10 des eintreffenden Signals wird detektiert. Heutzutage kommen Direktdetektoren (*direct detection device*, DDD) zum Einsatz. In diesem Fall werden die eintreffenden Elektronen direkt detektiert. Zusätzlich gestattet diese Detektortechnologie das schnelle Auslesen von 30-100 *frames* pro Sekunde. Letzteres erlaubt es, Bilderserien über die gewählte Belichtungszeit zu erstellen und so vor allem strahlinduzierten Probendrift zu korrigieren. Im Vergleich zur indirekten Detektion führt diese direkte und schnelle Registrierungsart zu einer dramatisch verbesserten Leistungsausbeute, sowohl in der erreichbaren Ortsauflösung als auch in der Sensitivität (Nogales et al. 2015).

Die erreichbare Auflösung eines TEMs ist weit besser als die Auflösung, welche typischerweise für biologische Untersuchungen in Frage kommt und letztendlich erreichbar ist. Nach Louis de Broglie hängt die Wellenlänge der Elektronen direkt von der Beschleunigungsspannung ab: je größer die Beschleunigungsspannung desto kleiner die Wellenlänge. So beträgt die Wellenlänge für 300 keV Elektronen 0,0019 nm. Nach dem Rayleigh-Kriterium ist die Auflösung eines Mikroskops direkt von der Wellenlänge der Elektronen und indirekt von der numerischen Apertur abhängig. Die numerische Apertur ändert sich wiederum mit dem Brechungsindex des Mediums (hier ~ 1) und dem Aperturwinkel der Objektivapertur. Bei TEMs kann für die numerische Apertur ein Wert von 0,01 angenommen werden (Lottspeich et al. 1998). Somit ergibt sich für ein 300 kV-TEM eine theoretische Auflösung von 0,1 nm = 1 Å = 100 pm. Zum Vergleich: Der van-der-Waals-Radius eines Wasserstoffatoms beträgt 120 pm.

Allerdings sind die Abbildungseigenschaften der elektromagnetischen Linsen eines TEMs deutlich schlechter als die optischen Linsen eines Lichtmikroskops. Diese Abbildungsfehler elektromagnetischer Linsen begrenzen die erreichbare Auflösung. Zu diesen Abbildungsfehlern gehören die sphärische und chromatische Aberration sowie der Astigmatismus der Objektivlinse.

- 1.) Die sphärische Aberration beschreibt in erster Näherung, dass parallel einfallende Strahlen sich nach Linsendurchgang nicht genau in einem Punkt treffen. Strahlen, die entfernt zur optischen Achse durch das Linsensystem gehen, werden stärker gebeugt als achsennahe Strahlen. Anstelle eines ‚scharfen‘ Fokuspunktes entsteht so ein kreisförmiger Bereich (Fehlerscheibchen), dessen Radius die sphärische Aberrationskonstante C_s des Mikroskops darstellt. Der Einfluss der sphärischen Aberration führt zu unscharfen Bildern und einer verringerten Auflösung.
- 2.) Im Gegensatz zum sphärischen Abbildungsfehler beschreibt die chromatische Aberration die Abhängigkeit der Beugung von der Wellenlänge. Unterschiedliche Wellenlängen werden verschieden stark von der Linse gebrochen. In der Praxis haben auch mittels einer FEG emittierte Elektronen immer einen gewissen Wellenlängenbereich. Da unterschiedliche Wellenlängen in der Lichtmikroskopie auch verschiedene Farben beschreiben, spricht man von der chromatischen

Aberration. Auch hier entsteht ein Fehlerscheibchen, dessen Radius die chromatische Aberrationskonstante C_c beschreibt. Auch dieser zweite Abbildungsfehler führt zu unscharfen Bildern und zu einer verringerten Auflösung.

- 3.) Der dritte und tatsächlich in der Praxis leicht zu korrigierende Abbildungsfehler ist der Objektivastigmatismus. Dieser bezeichnet einfach den Fakt, dass der Fokus von gestreuten Strahlen abhängig vom Winkel zur optischen Achse variiert, d.h. die Linse ist in der Praxis „unrund“. Der Objektivastigmatismus wird mit Hilfe von magnetischen oder elektrostatischen Quadrupollinsen minimiert und kann auch in der Bildauswertung berücksichtigt werden.

Der bildgebende und damit wesentliche Kontrast unkontrastierter biologischer Proben ist der Phasenkontrast, der durch elastische Streuung entsteht. Elektronen werden durch Wechselwirkung vor allem mit den Atomkernen der Probe gestreut. Bei der elastischen Streuung erfahren die Elektronen eine Richtungsänderung, jedoch keinen Energieverlust. Im Wellenbild entsteht der Phasenkontrast aus Interferenz der gebeugten mit ungebeugten Elektronenwellen. Der Phasenkontrast wird in erster Linie nicht durch die vernachlässigbare kleine Phasenverschiebung der Probe hervorgerufen, sondern durch die Defokussierung der Objektivlinse. Einen weitaus geringeren Anteil am Kontrast im Kryo-TEM hat der Amplitudenkontrast, der primär durch Streuung der Elektronen an den Atomkernen der Probe und sekundär durch Abtrennung dieser stark gestreuten Elektronen durch die Objektivblende entsteht. Dabei gilt: Je größer die Massenzahl der Atome in der Probe, desto stärker die Streuung. Dieser Beitrag ist bei Kryo-Proben etwa 7 % des reinen Phasenanteils (Toyoshima et al. 1988, Mindell et al. 2003).

Zusammenfassend werden Phasen- und Amplitudenkontrast als sin- bzw. cos-Term in der Kontrastübertragungsfunktion (*contrast transfer function*, CTF) beschrieben:

$$CTF(q) = A(q) \times \left(\sqrt{1 - B^2} \sin(\pi \lambda q^2 (\Delta z - 0,5 \lambda^2 q^2 C_s)) + B \times \cos(\pi \lambda q^2 (\Delta z - 0,5 \lambda^2 q^2 C_s)) \right)$$

Hier beschreiben q die Raumfrequenz, Δz den Defokus, C_s die sphärische Aberration, λ die Wellenlänge der Elektronen und B den Anteil des Amplitudenkontrasts. Dabei werden graphisch die Schwankungen des Kontrastes in Abhängigkeit von der Raumfrequenz dargestellt (Abb. 11). Die Überlagerung der Kontrastübertragungsfunktion (CTF) mit der einhüllenden Funktion $A(q)$, bewirkt, dass die Amplitude der CTF bei großem Defokus (Abb. 11, links) schneller gedämpft wird als bei niedrigem Defokus (Abb. 11, rechts). Für diese Dämpfung sind C_s , C_c , der Defokus, die Probedrift und die Übertragungsfunktion der Kamera verantwortlich (Cheng 2015).

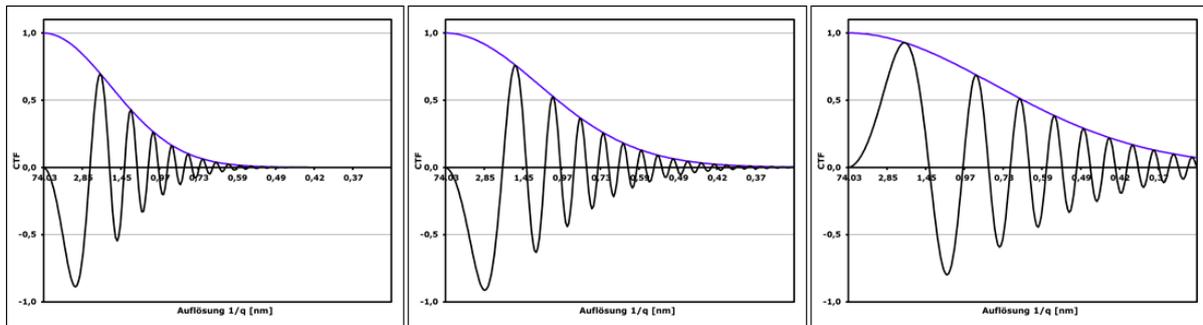


Abbildung 11 CTF-Simulationen eines 300 kV TEMs für unterschiedliche Δz -Werte $-3 \mu\text{m}$ (links), $-2 \mu\text{m}$ (Mitte) und $-1 \mu\text{m}$ (rechts). Allen Simulationen gemein sind folgende Parameter: $\lambda = 1,97 \text{ pm}$; $C_s = C_c = 2,3 \text{ mm}$; $\Delta E = 1 \text{ eV}$ (Energiedifferenz der Elektronenquelle). CTF: schwarz; $A(q)$: blau Die Simulationen wurden mit dem von Stahlberg entwickelten Programm durchgeführt (Stahlberg 2012). Der Anteil des Amplitudenkontrasts' wird hier mit 0 % angenommen.

Um ein möglichst hochaufgelöstes Signal zu erreichen, sollte der Defokus klein sein, was aber zu einem niedrigen Phasenkontrast führt (Cheng 2015). Zu geringer Kontrast macht aber eine Strukturbestimmung fast unmöglich, da Partikel im Bild nicht mehr lokalisiert und identifiziert werden können. Das bedeutet wiederum, dass ein Kompromiss zwischen erreichbarem Kontrast und minimalem Defokus gefunden werden muss, um optimale Daten zur Bestimmung einer hochaufgelösten Struktur eines Makromoleküls zu erhalten.

Prinzipien der Einzelpartikelanalyse

Die Einzelpartikelanalyse (*single particle analysis*, SPA) ist eine besonders gut geeignete Technik zur Strukturanalyse von makromolekularen Proteinkomplexen. Im Gegensatz zur Röntgenkristallographie, bei der Proteine in ein Kristallgitter „gezwängt“ werden, damit ein gut brechender Proteinkristall entsteht, können durch Kombination von TEM und SPA Proteine $\geq 200 \text{ kDa}$ (Nogales et al. 2015) direkt in vitrifizierter wässriger Lösung abgebildet und anschließend rekonstruiert werden. Somit bietet die SPA die Möglichkeit, Proteine und makromolekulare Komplexe, die sich nicht kristallisieren lassen, in ihrer natürlichen Umgebung und Konformation zu untersuchen.

Voraussetzung für die Einzelpartikelanalyse mit dem Elektronenmikroskop sind vitrifizierte Präparate, d.h. in amorphes Eis eingebettete Proben. Dies gelingt durch sehr schnelles schockartiges Einfrieren der wässrigen Proteinlösung direkt auf einem EM-Trägernetz (*EM grid*). Das Einfrieren erfolgt bei sehr hohen Kühlraten und Temperaturen um -190°C innerhalb von Millisekunden. So erhält man eine dünne amorphe Schicht, in der die Proteine in unterschiedlichen Orientierungen eingebettet sind. Um ein Auftauen dieses kryo-fixierten Präparates zu verhindern, müssen alle weiteren Transfer- und Untersuchungsschritte ebenfalls bei tiefen Temperaturen ausgeführt werden. Vitrifizierte Proben sind sehr strahlungsempfindlich. Um während der Bildaufzeichnung mögliche Strahlungsschäden zu verhindern, muss die zur Belichtung einer Aufnahme erforderliche Strahlendosis sehr klein sein. Dies hat aber den Nachteil, dass auch das Signal-Rausch-Verhältnis der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sehr niedrig ist. Um das Signal-Rausch-Verhältnis künstlich zu vergrößern, werden hunderte bis tausende Bilder der Probe gemittelt. Jedes

aufgenommene Bild eines Proteins entspricht dabei der 2D-Projektion dieses Proteins in Richtung des einfallenden Elektronenstrahls (Abb. 12).

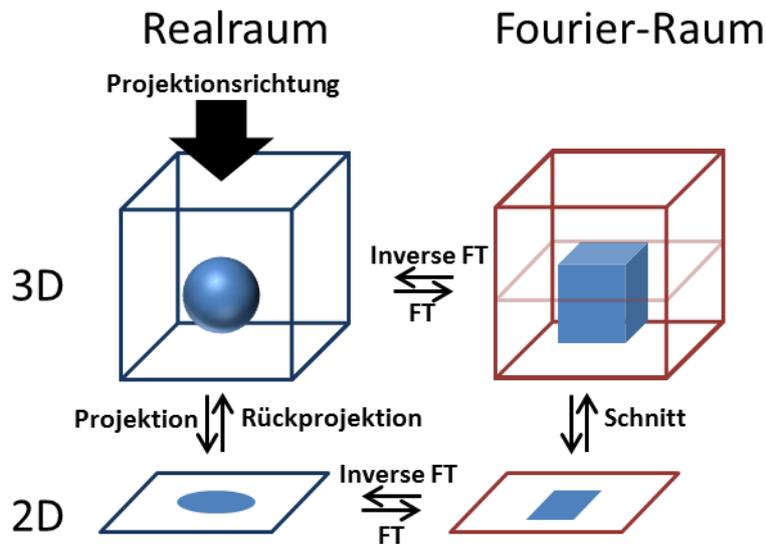


Abbildung 12 Veranschaulichung des Projektion-Schnitt-Theorems. Durch dieses Theorem lassen sich gewonnene 2D Daten in 3D Daten überführen. FT: Fourier-Transformation.

In der Einzelpartikelanalyse erhält man die 3D-Rekonstruktion eines Proteins durch die Kombination vieler einzelner 2D-Projektionen (Partikelbilder) des unterschiedlich orientierten Proteins (Nogales et al. 2015). Dabei gilt, dass die 2D-Projektion eines 3D-Objektes im Realraum einem zentralen Schnitt des Objektes im Fourierraum entspricht (Projektion-Schnitt-Theorem (Abb. 12), wobei die Projektionsrichtung im Realraum senkrecht zur Schnittebene ist. Sind die Projektionsrichtungen bekannt, kann man die entsprechenden 2D-Schnitte im Fourier-Raum exakt positionieren. So entsteht im Fourier-Raum sukzessive die 3D-Fourier-Transformierte des Objekts. Über eine Fourier-Rück-Transformation ergibt sich dann das 3D-Objekt im Realraum (Nogales et al. 2015).

Die Ermittlung der zunächst unbekanntenen relativen Orientierungen der 2D-Projektionen zueinander (Sigworth et al. 2010) gelingt mit Hilfe des *projection-matching*-Ansatzes (Penczek et al. 1994). Beim *projection-matching* vergleicht man jede experimentelle 2D-Projektion mit einer computererzeugten 2D-Projektion eines unterschiedlich orientierten Referenzobjektes. Da die Orientierung (drei Eulerwinkel und 2 Translationskoordinaten) der erzeugten 2D-Projektion des Referenzobjektes bekannt ist, kann man bei gegebener Übereinstimmung der experimentellen 2D-Projektion die gleiche Orientierung (Kreuzkorrelation, *cross correlation*) zuordnen. Neuerdings verwendet man für diese Zuordnung *maximum-likelihood* (ML) basierende Methoden (Sigworth et al. 2010). Dabei werden die wahrscheinlichsten Werte für Eulerwinkel und Translationskoordinaten einer 2D-Projektion zugeordnet. Im Idealfall konvergieren diese Werte und entsprechen dann denen, die über den klassischen *projection-matching* Ansatz bestimmt worden sind. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit, in ein lokales Minimum zu konvergieren niedriger als bei der Kreuzkorrelation.

Durch Kombination aller Orientierungen der verwendeten 2D-Projektionen kann man eine 3D-Rekonstruktion des Proteins errechnen und iterativ mit Hilfe des *projection-matching*-Ansatzes verfeinern (Penczek et al. 1994, Scheres 2012). Die erreichbare Auflösung hängt dabei von der Anzahl der verwendeten 2D-Projektionen, der konformereren Flexibilität des Proteins und der Heterogenität der Probe ab.

Ein EM-Datensatz ist immer eine Mischung aus 2D-Projektionen ein und desselben Proteinkomplexes in verschiedenen konformereren und kompositionellen Zuständen, sofern die Probe nicht mit anderen unerwünschten Proteinkomplexen verunreinigt ist. Es ist deshalb schwierig zu unterscheiden, ob 2D-Projektionen zu ein und demselben Proteinkomplex gehören, oder ob es sich um 2D-Projektionen unterschiedlicher Proteinkomplexe handelt (Nogales et al. 2015). Durch die Weiterentwicklung der Bildverarbeitungsmethoden in der Einzelpartikelanalyse kann heutzutage auch die Probenheterogenität bestimmt und genutzt werden. Beispielsweise erlaubt die auf ML basierende Klassifizierung eines Datensatzes die Auftrennung der 2D-Projektionen in strukturell homogene Klassen und gestattet so Einblicke in die Dynamik eines Proteinkomplexes (Scheres et al. 2007).

Ziel der Doktorarbeit

2012 gelang es zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander, alle kanonischen Untereinheiten des 26S Proteasoms aus den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* (Beck et al. 2012, Lander et al. 2012) und *Schizosaccharomyces pombe* (Lasker et al. 2012) zu lokalisieren. Die veröffentlichten Strukturen sind nahezu identisch, so dass die 26S Proteasom-Forschungsgemeinde beide Strukturen sehr schnell als richtig akzeptierte. Zeitgleich wurde jedoch eine Struktur des menschlichen 26S Proteasoms veröffentlicht (da Fonseca et al. 2012), die auf signifikante Weise von den Hefe-Strukturen abwich. Die Untereinheiten Rpn8 und Rpn11 waren in ihrer Position vertauscht, und auch die Position von Rpn12 am anderen Ende des hufeisenförmigen *lid*-Komplexes (in unmittelbarer Nähe von Rpn10) war völlig verschieden. Tabelle 2 zeigt das teilweise sehr unterschiedliche Ausmaß der Sequenzidentität der 26S Proteasom-Untereinheiten zwischen der Hefe *S.cerevisiae* und dem menschlichen Proteasom. Speziell bei den katalytischen Untereinheiten, β 1, β 2 und β 5 im evolutionär hochkonservierten 20S Proteasom beträgt die Sequenzidentität 55 %, 55 % bzw. 67 %. Mit Ausnahme der Hefe-ATPasen und Rpn11, die zu 69-77 % bzw. 68 % identisch mit denen des Menschen sind, beträgt die Sequenzidentität aller anderen Untereinheiten des RP lediglich 31-51 %. Im Fall von Rpn12 sind es 33 %. Die relativ hohe Sequenzidentität bei Rpn 8 und Rpn11 würde aber eine identische Positionierung dieser Untereinheiten innerhalb den 19S RPs nahelegen.

Tabelle 2 Sequenzvergleich der kanonischen Untereinheiten aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und dem Menschen *Homo sapiens*. Sechs im Menschen substöchiometrisch vorliegende Untereinheiten (*) wurden ebenfalls mit den Hefe-Homologen verglichen. Mit Ausnahme von Rpn13 liegen alle markierten Untereinheiten auch in der Hefe substöchiometrisch vor. Der NCBI *Align Sequences Protein* BLAST wurde zur Ermittlung der Daten herangezogen.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>Homo sapiens</i>			Sequenzidentität [%], Hefe-Sequenzdeckung [%]
Protein- name	Uniprot- ID	Masse [kDa]	Länge [aa]	Uniprot- ID	Masse [kDa]	Länge [aa]	
α1	P21243	28,0	252	P60900	27,4	246	54, 97
α2	P23639	27,1	250	P25787	25,9	234	58, 100
α3	P23638	28,7	258	P25789	29,5	261	53, 91
α4	P40303	28,4	254	O14818	27,9	248	59, 90
α5	P32379	28,6	260	P28066	26,4	241	61, 91
α6	P40302	25,6	234	P25786	29,6	263	53, 100
α7	P21242	31,5	288	P25788	28,4	255	51, 90
β1	P38624	23,5	215	P28072	25,4	239	55, 93
β2	P25043	28,3	261	Q99436	30,0	277	55, 98
β3	P25451	22,6	205	P49720	23,0	205	55, 97
β4	P22141	22,5	198	P49721	22,8	201	45, 97
β5	P30656	31,6	287	P28074	28,5	263	67, 71
β6	P23724	26,9	241	P20618	26,5	241	46, 93
β7	P30657	29,4	266	P28070	29,2	264	43, 87
Rpt1	P33299	52,0	467	P35998	48,6	433	72, 95
Rpt2	P40327	48,8	437	P62191	49,2	440	73, 94
Rpt3	P33298	47,9	428	P43686	47,4	418	66, 100
Rpt4	P53549	49,4	437	P62333	44,2	389	69, 87
Rpt5	P33297	48,3	434	P17980	49,2	439	69, 96
Rpt6	Q01939	45,3	405	P62195	45,6	406	77, 96
Rpn1	P38764	109,5	993	Q13200	100,2	908	42, 86
Rpn2	P32565	104,4	945	Q99460	105,8	953	41, 96
Rpn3	P40016	60,4	523	O43242	61,0	534	34, 85
Rpn5	Q12250	51,8	445	O00232	53,0	456	41, 98
Rpn6	Q12377	49,8	434	O00231	47,5	422	45, 89
Rpn7	Q06103	49,0	429	Q15008	45,5	389	37, 93
Rpn8	Q08723	38,3	338	P51665	37,0	324	51, 86
Rpn9	Q04062	45,8	393	Q9UNM6	42,9	376	31, 95
Rpn10	P38886	29,7	268	P55036	40,7	377	50, 88
Rpn11	P43588	34,4	306	O00487	34,6	310	68, 94
Rpn12	P32496	31,9	274	P48556	39,6	350	33, 91
Rpn13*	O13563	17,9	156	Q16186	42,2	407	-, -
Rpn15	O94742	10,4	89	P60896	8,3	70	54, 31
Ubp6*	P43593	57,1	499	P54578	56,1	494	32, 95
Dsk2*	P48510	39,3	373	Q9UHD9	65,7	624	33, 69
Rad23*	P32628	42,4	398	P54725	39,6	363	32, 99
Ddi1*	P40087	47,4	428	Q8WTU0	44,1	396	49, 39
Ecm29*	P38737	210,4	1868	Q5VYK3	204,3	1845	30, 69

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Positionen der Untereinheiten und die Gesamtarchitektur des humanen 26S Proteasoms im Detail aufzuklären.

Die bisher veröffentlichte Struktur des humanen 26S Proteasoms (EMBD-2047) hat eine mutmaßliche Auflösung von 7 Å (da Fonseca et al. 2012). Diese Auflösung wäre ausreichend, um Sekundärstrukturelemente einiger Untereinheiten zu erkennen. Das ist jedoch nicht der Fall. Höchstwahrscheinlich fällt die angegebene Auflösung wesentlich geringer aus, was in der sehr niedrigen Partikelzahl begründet liegt (Lander et al. 2013). Gerade im Bereich der Untereinheiten ist die Auflösung eher in einem Bereich von 12 Å (FCS_{0,5}) (Beck et al. 2012) und damit viel zu gering, um weitere Erkenntnisse bezüglich der „Feinmechanik“ des 26S Proteasoms oder potenzielle therapeutische Ansätze zu liefern. Selbst die beiden Hefe-Modelle EMBD-2165 und EMBD-1992 (Beck et al. 2012, Lander et al. 2012) mit einer Auflösung von 7,4-9 Å (FSC_{0,5}) konnten nicht alle intramolekularen Protein-Protein-Interaktionen in der Hefe ermitteln. Doch gerade diese fehlenden Interaktionen sind von besonderer Bedeutung bei der Erforschung des Abbaumechanismus.

So ist zum Beispiel weiterhin unklar, welche Rolle die *coiled-coil*-Strukturen der ATPasen bei der Substraterkennung spielen. Einige Untereinheiten sind außerdem für die hohe Flexibilität (Rpn1) und Dynamik (Rpn13, Ubp6, Rad23, Dsk2) des 26S Proteasoms verantwortlich. Dementsprechend ist es nicht überraschend, dass alle Versuche, den ganzen 26S Proteasom-Komplex zu kristallisieren, fehlgeschlagen sind. Durch die Kombination der Entwicklungen in der Detektorentechnologie für die Kryo-EM, zusammen mit verbesserten Bildverarbeitungsverfahren für die Einzelpartikelanalyse, sollte es möglich sein, eine hochaufgelöste Struktur des menschlichen 26S Proteasom-Komplexes zu erstellen, um das vorrangige Ziel dieser Arbeit zu verwirklichen: Detaillierte Einblicke in den Aufbau und die Funktion des 19S Regulatorischen Partikels zu gewähren.

Material und Methoden

Material

Puffer für die Gewinnung von Erythrozyten

Phosphate-buffered saline (PBS):

10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3 (4°C); 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 5 mM Glucose

Puffer für die 26S Proteasom-Präparation

Resuspensionspuffer:

20 mM Tris-HCl pH 7,5 (RT); 10 % Glycerin; 10 mM β-Mercaptoethanol; 5 mM Adenosintriphosphat (ATP, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) pH 7; 10 mM MgCl₂

Sucrose-Gradienten-Puffer:

20 mM Tris-HCl pH 7,5 (RT); 10 mM β -Mercaptoethanol; 5 mM ATP pH 7; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM Kreatinphosphat (CP, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland); 0,03 mg/ml Kreatinphosphat-Kinase (CPK, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland); 20 % w/v Sucrose oder 40 % w/v Sucrose

Aktivitätspuffer:

50 mM Tris-HCl pH 8 (RT); 5 mM ATP pH 7; 10 mM $MgCl_2$; 50 μ M Suc-LLVY-AMC Peptid (BACHEM, Bubendorf, Schweiz)

Methoden

Gewinnung von Erythrozyten

Frisch gewonnenes venöses Blut eines gesunden Spenders, welches zum Stopp der Blutgerinnung entweder in 10 ml BD Vacutainer[®] EDTA-Röhrchen oder in einer 50 ml Spritze, versetzt mit 1,8 mg EDTA pro Milliliter Blut (final \sim 5 mM), gesammelt wurde, wird zur Auftrennung der Blutbestandteile zentrifugiert (10 Minuten; 4°C; 4000xg; Hettich Rotanta 460R). Der Überstand, der größtenteils aus Blutplasma besteht, wird mit Hilfe einer Pipette abgesaugt und verworfen. Der Bodensatz, bestehend aus roten Blutzellen mit der darüber liegenden Schicht aus weißen Blutzellen und Blutplättchen wird insgesamt 3-5 mal mit dem Volumen des Zellpellets an eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird mit der Pipette auch die Schicht aus weißen Blutzellen und Blutplättchen entfernt, so dass man ein fast reines Pellet aus roten Blutzellen erhält, das sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren werden kann.

Präparation des humanen 26S Proteasoms

Die unter kaltem fließendem Wasser angetauten Pellets werden in einem Becherglas vereint und zur Zelllyse mittels osmotischem Schock mit 8 Volumen kaltem destilliertem Wasser verdünnt. Alle hier genannten Volumenangaben beziehen sich auf das Volumen des ursprünglich eingesetzten Zellpellets; die folgenden Konzentrationsangaben beziehen sich auf das Endvolumen. Es erfolgt die sofortige Zugabe von 5 mM ATP pH 7, 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM β -Mercaptoethanol. Für 30 Minuten wird diese Zellsuspension nun unter pH-Wert-Kontrolle in Eiswasser gerührt, bevor die Zugabe von 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (RT) und 10 % Glycerin erfolgt. Nun wird mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 10 Volumen aufgefüllt.

Zur Herstellung eines klaren Zellextraktes werden die Zellfragments durch Zentrifugation (10 Minuten; 4°C; 31.000xg; Sorvall RC5B; SS-34) entfernt. Um zusätzlich einen Großteil der vorhandenen Zellmembranen abzutrennen, wird der Extrakt anschließend für 30 Minuten bei 4°C 100.000xg im Type 50.2 Ti Rotor (Beckman Optima LE-80K Ultrazentrifuge) erneut zentrifugiert.

Eine erste Anreicherung des 26S Proteasoms aus dem klaren Zellextrakt erfolgt durch Zugabe von zu feinem Pulver zerriebenen Ammoniumsulfat, bis eine 40 %ige Sättigung der

Proteinlösung erreicht ist. Die Zugabe geschieht portionsweise innerhalb von 30 Minuten unter pH-Kontrolle in Eiswasser. Anschließend wird die Lösung eine Stunde gerührt. Das Präzipitat wird mittels Zentrifugation (15 Minuten; 4°C; 31.000xg; Sorvall RC5B; SS-34) vom Überstand getrennt und dann in Resuspensionspuffer für 20 Minuten gelöst. Eine weitere Zentrifugation (5 Minuten; 4°C; 31.000xg; Sorvall RC5B; SS-34) trennt gelöstes von unlöslichem Protein.

Die zweite Anreicherung erfolgt durch Sedimentation des 26S Proteasoms aus der oben beschriebenen Lösung durch Ultrazentrifugation (2:11 Stunden; 4°C; 160.000xg; Type 50.2 Ti; Beckman Optima LE-80K). Die entstehenden Bodensätze werden vom Überstand getrennt, in Resuspensionspuffer resuspendiert, vereint und wiederholt zentrifugiert. Erneut wird der Bodensatz vom Überstand getrennt und in wenig frischem Resuspensionspuffer gelöst. Eine letzte Zentrifugation in 1,5 ml Reaktionsgefäßen dient zur Abtrennung von gelöstem unlöslichen Proteins.

Der abschließende Schritt der Proteasom-Aufreinigung entfernt alle verbliebenen Proteinverunreinigungen durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation. Dabei wird die Probe einem 20-40 %igen Sucrose-Gradienten überlagert und zentrifugiert (15 Stunden; 4°C; 208.000xg; SW 41 Ti; Beckman Optima LE-80K). Im Anschluss wird der Gradient in Fraktionen geerntet.

Die Fraktionen werden mit Hilfe des Aktivitätspuffers auf spezifische 26S Proteasom-Aktivität getestet. Dabei wird das im Peptid enthaltene und gequenchte Fluorophor AMC vom Peptid abgespalten und bei $\lambda_{\text{ex}} 360 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 460 \text{ nm}$ im BMG FLUOstar Optima detektiert.

Basierend auf dem Aktivitätsprofil der Fraktionen des Gradienten werden ausgewählte Fraktionen hinsichtlich ihrer Proteinkonzentration (Bradford-Assay), der Reinheit (SDS-PAGE) und Partikeldichte (*negative stain*-EM) analysiert.

Kryo-Elektronenmikroskopie und Bildanalyse

Die Probe (4 μl) wird auf Quantifoil® R 2/1 Holey Carbon Grids (Cu 200 mesh) oder Quantifoil® Lacey Carbon Grids (Cu 200 mesh) gegeben und mittels eines im Haus entwickelten und gebauten Guillotine-artigen *plungers* vitrifiziert. Um einer einheitlichen Orientierung der Partikel im Eis vorzubeugen, kann 0,01 % Nonidet-P40 der Probe und/oder Waschlösung zugesetzt werden. Das zweimalige Waschen (2x4 μl) der Probe mit Wasser ist notwendig, um den Sucrose-Anteil in der Probe zu minimieren, da Sucrose die Eisqualität vermindert.

Um die Struktur des humanen Wildtyp-26S Proteasoms zu analysieren, wird ein Datensatz am FEI Titan Krios, ausgestattet mit einer Falcon II Kamera und der FEI EPU Software, gesammelt. Die Bilder werden mit einer Pixelgröße von 1,4 Å auf Probenniveau, einer totalen Elektronendosis von 45 Elektronen pro Å, verteilt auf sieben Frames und einem nominalen Defokus von -1,8 bis -3,0 μm aufgenommen. Die einzelnen Frames werden

translational aligniert und basierend auf einem Algorithmus nach Li *et al.* (Li *et al.* 2013) gemittelt. *Double capped* (dc) oder *single capped* (sc) 26S Proteasom-Partikel werden automatisch lokalisiert (Hrabe *et al.* 2012). Partikel geringer Qualität werden mit Hilfe von Prozeduren der TOM Toolbox entfernt (Nickell *et al.* 2005). Die verbliebenen Partikel werden rekonstruiert und mit einer *in-house* weiterentwickelten Version eines XMIPP-Programms (Scheres *et al.* 2008) klassifiziert, so dass der Focus der Klassifikation nur auf einem der RPs liegt (Unverdorben *et al.* 2014). Somit lassen sich die RPs eines dc 26S Proteasoms als voneinander getrennte RPs behandeln, was zu einer Verdoppelung der Anzahl der zu mittellenden RPs führt. Zusätzliche Klassifikationen mittels kleinerer Masken wurden wie in Bohn *et al.* beschrieben durchgeführt (Bohn *et al.* 2010).

Ergebnisse

Aufreinigung des humanen 26S Proteasoms

Historisch gesehen ist die Aufreinigung des 26S Proteasoms gut erforscht. Bereits in den späten 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts gelang es, den Holokomplex aus diversen Organismen zu präparieren, und dementsprechend findet man in der Literatur eine große Zahl an verschiedenen Aufreinigungsprotokollen. Ein Charakteristikum haben alle frühen Protokolle gemeinsam: Sie basieren auf konventionellen chromatographischen Verfahren, wie Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration oder Hydroxyapatit-Chromatographie. Es ist also nicht verwunderlich, dass bei diesen Protokollen vergleichsweise große Mengen an Biomasse notwendig waren, um die Verluste an Proteasom von Schritt zu Schritt in Kauf nehmen zu können. Zudem waren die Protokolle mit 3-5 Tagen Arbeitsdauer sehr langwierig.

Beim 26S Proteasom handelt es sich um einen ziemlich instabilen Komplex, dessen Aktivität und Zusammensetzung vom pH-Wert, der Salzkonzentration, der Aufreinigungszeit sowie der Verfügbarkeit von stabilisierenden Komponenten wie ATP oder Glycerol abhängt (Glickman *et al.* 2001). Die Methoden der Aufreinigung änderten sich erst mit der Einführung der Affinitätschromatographie. Durch genetische Modifikation, vorwiegend in der Hefe (Knop *et al.* 1999), des häufig für Modifikationen genutzten C-Terminus der Rpn11-Untereinheit, konnte das 26S Proteasom innerhalb von 1-2 Tagen unter äußerst milden Bedingungen und ohne große Mühen mit hoher Reproduzierbarkeit aufgereinigt werden. Der Nachteil der Affinitätschromatographie besteht darin, dass nur einfach genetisch zu modifizierende Organismen wie Hefen zur Einführung eines *affinity tag* für die Aufreinigung genutzt werden können. Die Etablierung einer mit *affinity tag* genetisch modifizierten stabilen menschlichen Zelllinie wie Hela- oder HEK293-Zellen ist dagegen sehr zeitintensiv. Um diese Probleme zu umgehen, wird zur Aufreinigung des 26S Proteasoms aus höheren Organismen auf Rattenleber, Fruchtfliegenembryos oder Rinderblut zurückgegriffen. Das unter „Material und Methoden“ beschriebene Aufreinigungsprotokoll orientiert sich an Liu *et al.* (Liu *et al.* 2006) und wurde auf die Bedürfnisse der Kryo-EM zugeschnitten: Ausreichend hohe Proteinkonzentration ($\geq 400 \mu\text{g/ml}$), Reinheit von $\geq 80 \%$, hohe

proteasomale Aktivität wie auch ein hohes 26S/20S-Verhältnis waren das Ziel. Das hier entwickelte 26S Proteasom-Aufreinigungsprotokoll stellt dabei einen Mittelweg dar. Denn, obwohl es nicht auf Affinitätschromatographie beruht, dauert die Aufreinigung nur 1,5 Tage und es werden nur geringe Mengen an Biomasse benötigt, im Gegensatz zu den konventionellen Strategien.

Funktionelle Charakterisierung

Die Analyse der Aufreinigung beginnt mit dem Aktivitätstest (Abb. 13), der zunächst klären soll, welche Fraktionen des Sucrose-Gradienten proteasomale Aktivität zeigen. Dazu werden alle Fraktionen auf ihre Fähigkeit getestet, ein fluorogenes Peptidsubstrat zu spalten. Bei dem hier verwendeten Peptidsubstrat handelt es sich um *N*-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (*N*-Succinyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosyl-7-Amino-4-Methyl-coumarin). Dabei ist freies AMC das Fluorophor und Leu-Leu-Val-Tyr ein mit AMC kovalent verknüpftes Tetrapeptid. Die Phenol-Seitenkette der Aminosäure Tyrosin unterdrückt im intakten Peptidsubstrat die Fluoreszenz des AMC. Wird das Peptidsubstrat durch das 26S Proteasom zwischen Tyr und AMC gespalten (chymotrypsin-ähnliche Aktivität), liegt das Fluorophor AMC frei in Lösung vor und fluoresziert. Je mehr des freien AMCs entsteht, desto größer ist die Fluoreszenzintensität.

Bei dieser rein qualitativen Beurteilung ist nicht das erreichte Maximum, sondern die Steigung der Kurve im ersten Viertel der Messung (1-1500 sec) entscheidend (Abb. 13). Nur dieser Teil der Messung beschreibt den *steady-state* der Enzym-Substrat-Reaktion hinreichend genau. Dabei wird der *steady-state* durch eine zeitlich konstante Enzym-Substrat-Konzentration und durch sinkende Substratkonzentration bei gleichzeitig steigender Produktkonzentration charakterisiert. Ab $t \geq 1500$ sec befindet sich das System in der Endphase. Sie ist durch eine abnehmende Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes charakterisiert, die durch eine abnehmende Substratkonzentration hervorgerufen wird. Die Reaktion strebt ihrem Ende zu, d.h. das freie Enzym liegt wieder in der Anfangskonzentration vor. Im Fall des 26S Proteasoms ist die abnehmende Substratkonzentration nicht der entscheidende Faktor, der zum Ende der Reaktion führt. Vielmehr scheint die früh einsetzende Endprodukthemmung durch das Tetrapeptid die Reaktion zu terminieren. Nur im *steady-state* der Reaktion, bei konstanter Enzym-Substrat-Konzentration und Substratüberschuss, ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit annähernd proportional zur Enzymkonzentration. Unter den gewählten Umständen dürfte vorwiegend das 26S Proteasom in der Lage sein, dieses Substrat umzusetzen (Glickman et al. 2001). Das bedeutet: Je steiler die Kurve verläuft, desto mehr intaktes 26S Proteasom ist in der Probe zu erwarten. Abbildung 13 zeigt das Aktivitätsprofil der Fraktionen 18-26, wobei die Fraktion 22 die höchste Aktivität aufweist, gefolgt von den Fraktionen 21 und 23.

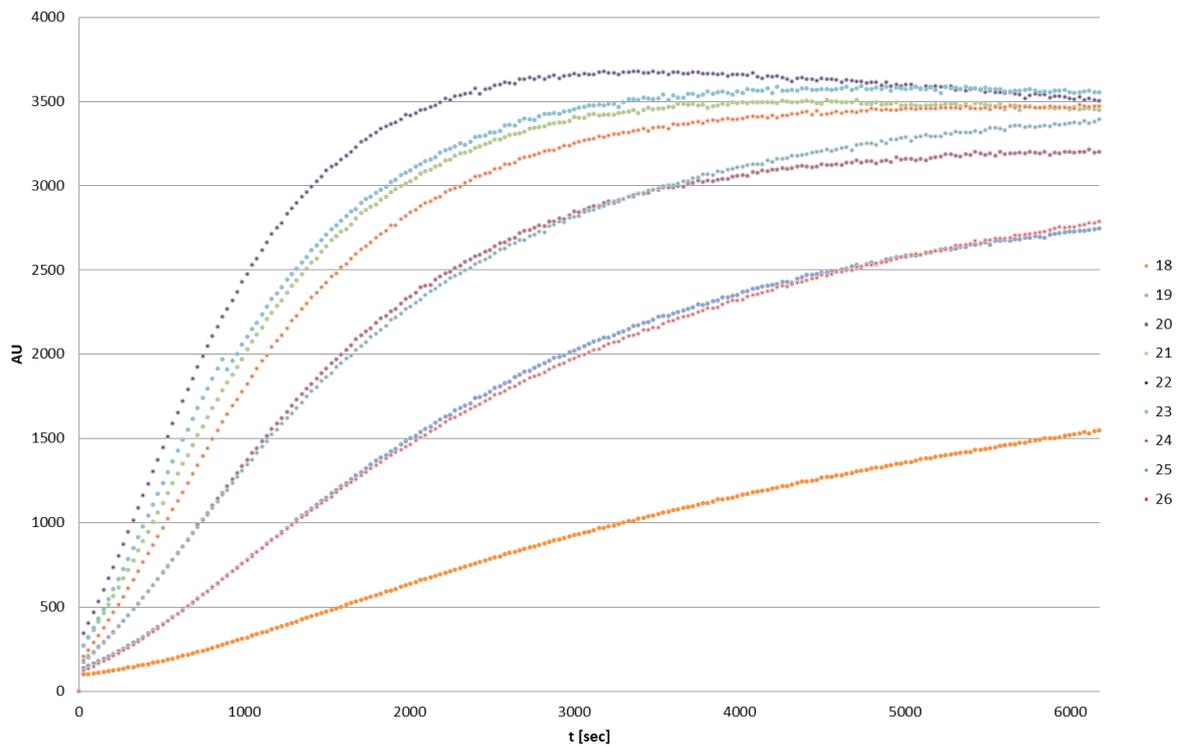


Abbildung 13 Typisches Aktivitätsprofil der verschiedenen Gradientenfractionen 18-26.

Basierend auf dem Aktivitätsprofil wurden die gleichen Fractionen auf ihre Komposition und Reinheit mit Hilfe der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) überprüft (Abb. 14).

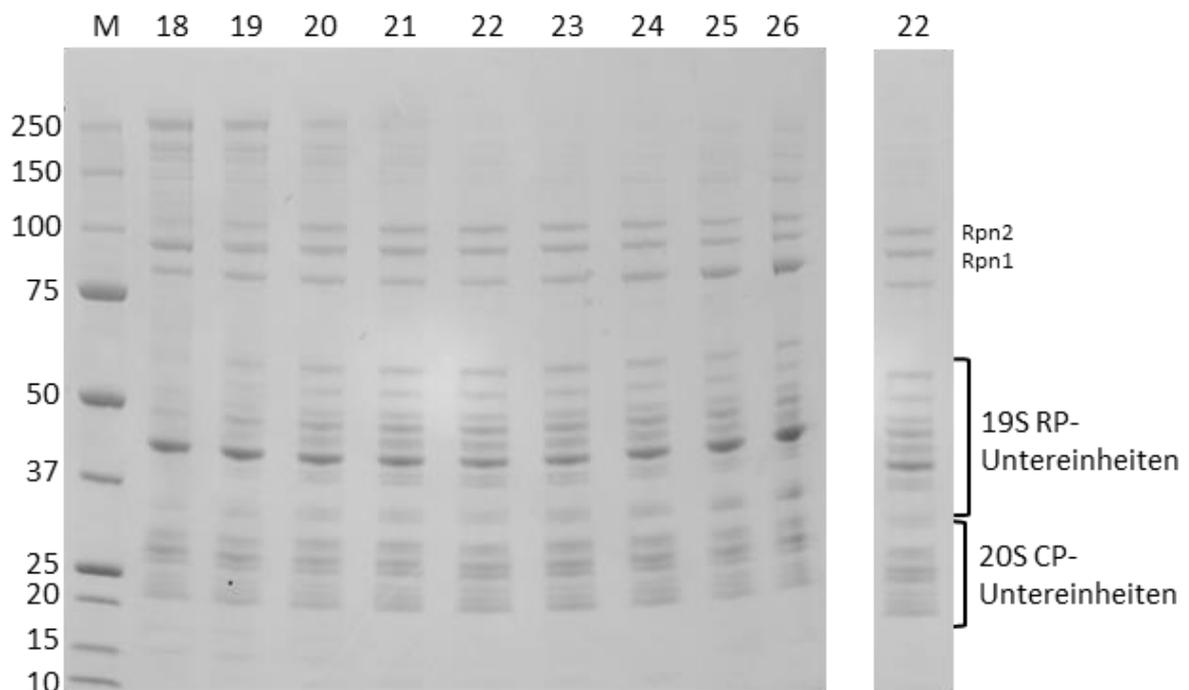


Abbildung 14 Links: Coomassie gefärbtes Polyakrylamid-Gel (NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris, 1,0 mm, 10-well). Jeweils 3µg der Gradientenfractionen 18-26 wurden aufgetragen. Rechts: Charakteristisches Bandenmuster einer 26S Proteasom-Aufreinigung (hier: Fraktion 22). M: Markerproteine, Angaben in kDa.

Generell zeigen alle Fraktionen mit Ausnahme von Fraktion 18 das Bandenmuster, welches charakteristisch für aufgereinigte 26S Proteasom-Proben ist. Im Bereich von 20-30 kDa liegen die Banden des 20S Proteasoms, während die meisten Banden des 19S RPs zwischen 37-60 kDa zu finden sind. Bei allen Proben liegt im Bereich zwischen 37-50 kDa die markante Bande der ~40 kDa großen Untereinheit der homodimeren Kreatinphosphat-Kinase, die elementarer Bestandteil des ATP-Regenerierungssystem ist. Die beiden größten Untereinheiten des 19S RP, Rpn1 und Rpn2, liegen bei ca. 100 kDa. Bei der qualitativen Beurteilung der Untereinheiten-Komposition ist auf die annähernd gleiche Intensität der Banden des 20S CPs und 19S RPs zu achten. Dies ist für die Fraktionen 18 und 19 nicht erfüllt, was auf ein niedriges 26S/20S-Verhältnis hindeutet, wohl aber für die restlichen Fraktionen 20-26. Die Fraktionen 22-24 können als rein genug für die Kyro-EM angesehen werden, da im Vergleich zu den anderen Fraktionen weder niedermolekulare (10-20 kDa) noch hochmolekulare (100-250 kDa) Verunreinigungen zu stark in Erscheinung treten. Allerdings findet sich bei allen untersuchten Proben im Bereich von 75-100 kDa eine Proteinbande, die durch MS-Analyse als humane Aldehyd-Dehydrogenase (~85 kDa) identifiziert worden ist. Sie steht bislang noch in keinem Zusammenhang mit dem 26S Proteasom. Da die gemessenen Proteinkonzentrationen für die Fraktionen 21 (ca. 400 µg/ml), 22 (ca. 525 µg/ml) und 23 (ca. 500 µg/ml) am höchsten sind, werden diese Fraktionen auf ihre Verwertbarkeit in der EM weiter analysiert.

Einen weiteren Hinweis auf das zu erwartende 26S/20S-Verhältnis erhält man, wenn man die Probe massenspektrometrisch untersucht (Tab. 3). Zur Auswertung wurde die iBAQ-Methode gewählt. iBAQ ist eine auf Intensität beruhende absolute Mengenbestimmung, die ohne die Verwendung von isotoopenmarkierten Referenzpeptiden in der Massenspektrometrie Anwendung findet (Schwanhauser et al. 2011). Dabei werden die Intensitäten aller durch Trypsin-Verdauung entstandenen Peptide eines Proteins addiert und durch die Anzahl der theoretisch zu erwartenden Peptide dieses Proteins geteilt (Schwanhauser et al. 2011). Die resultierenden iBAQ-Intensitätswerte dienen dann zur genauen Bestimmung der relativen Häufigkeit des identifizierten Proteins in der Probe (Schwanhauser et al. 2011, Smits et al. 2013). Bildet man den Gesamtmittelwert der iBAQ-Werte aller kanonischen Untereinheiten und dividiert die iBAQ-Mittelwerte der α - und β -Untereinheiten, der ATPasen und der Nicht-ATPasen-Untereinheiten sowie die iBAQ-Werte der einzelnen PIPs (*proteasome interacting proteins*), lässt sich das so approximierte Verhältnis der Untereinheiten ermitteln und graphisch darstellen (Abb. 15).

Tabelle 3 Massenspektrometrische Analyse aller kanonischen menschlichen 26S Proteasom-Untereinheiten sowie einiger transient bindender Proteine (PIPs, *).

Proteinname	Uniprot-ID	Anzahl der Peptide	Sequenzdeckung [%]	Masse [kDa]	iBAQ-Wert
α1	P25786-1	30	92,8	29,555	8,16E+09
α2	P25787	26	88	25,988	5,97E+09
α3	P25788-1	21	49	28,433	5,36E+09
α4	P25789-1	20	80,8	29,483	6,57E+09
α5	P28066-1	19	75,5	26,411	7,27E+09
α6	P60900	12	35,4	27,399	8,53E+09
α7	O14818-1	11	29,8	27,887	6,99E+09
β1	P20618	17	64,3	26,485	6,09E+09
β2	P49721	24	93	22,836	5,25E+09
β3	P49720	2	14,1	22,949	7,27E+09
β4	P28070	14	58,3	29,204	4,55E+09
β5	P28074	28	70	28,48	7,61E+09
β6	P28072	17	75,7	25,357	3,08E+09
β7	Q99436	13	60,3	29,965	5,21E+09
Rpt1	P35998	60	87,3	48,633	8,17E+09
Rpt2	P62191	10	12,3	49,184	8,16E+09
Rpt3	P43686	52	95,2	47,366	1,10E+10
Rpt4	P62333	40	71,5	44,172	8,24E+09
Rpt5	P17980	-	-	-	0,00E+00
Rpt6	P62195	49	83,5	45,626	8,11E+09
Rpn1 Iso. 1	Q13200-1	19	14,1	100,2	5,24E+09
Rpn1 Iso. 3	Q13200-3	2	1,4	85,605	3,27E+06
Rpn2	Q99460	87	80,2	105,84	5,28E+09
Rpn3 Iso. 1	O43242-1	20	27	60,977	5,34E+09
Rpn3 Iso. 2	O43242-2	2	3,4	41,183	1,54E+06
Rpn5	O00232	49	83,8	52,904	5,20E+09
Rpn6	O00231	46	89,8	47,563	8,44E+09
Rpn7	Q15008	41	80,2	45,531	5,10E+09
Rpn8	P51665	30	79,9	37,025	7,06E+09
Rpn9	Q9UNM6	34	83	42,945	5,01E+09
Rpn10 Iso. A	P55036-1	3	8,5	40,736	2,15E+08
Rpn10 Iso. E	P55036-2	3	7,6	28,612	3,94E+09
Rpn11	O00487	29	92,3	34,577	5,04E+09
Rpn12	P48556	31	66,6	39,611	3,27E+09
Rpn13*	Q16186	13	31,2	42,153	6,17E+08
Ubp6*	P54578	26	65	56,068	1,07E+08
Uch37*	Q5LJA5-1	17	71,3	40,423	5,76E+07
Ecm29*	Q5VYK3	56	41,1	204,29	2,82E+07

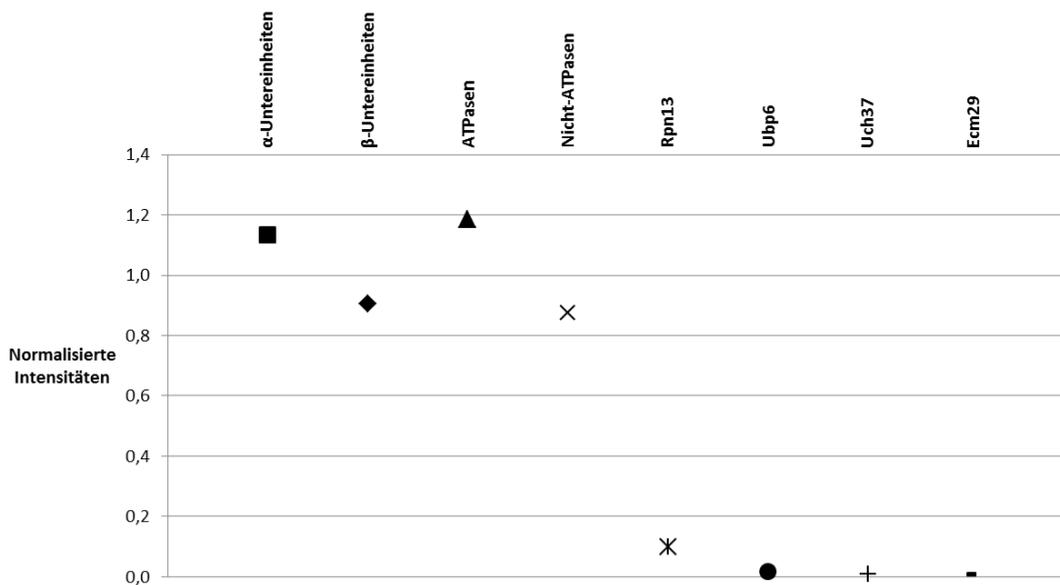


Abbildung 15 Graphische Darstellung der Stöchiometrie von Subkomplexes des humanen 26S Proteasoms und PIPs.

Deutlich ist zu erkennen, dass die normalisierten Intensitäten der kanonischen Untereinheiten (Subkomplexe) um den Wert 1 liegen (Abb. 15). Dies deutet darauf hin, dass alle kanonischen Untereinheiten etwa stöchiometrisch zueinander in der Probe vorliegen. Die vier transient bindenden Proteine erscheinen in sehr niedrigen Mengen, so dass man davon ausgehen kann, dass das 26S Proteasom nur aus den kanonischen Untereinheiten besteht und keine sonstigen Proteine gebunden hat. Dies ist für die Erreichung einer hochaufgelösten 3D-Rekonstruktion wünschenswert, da die Variabilität der Zusammensetzung niedrig ist. Die menschlichen Homologe zu den Hefeproteinen Rpn15, Dsk2, Rad23 und Ddi1 konnten nicht nachgewiesen werden.

Grundsätzlich gehört zu der Qualitätsanalyse einer EM-Probe, dass sie im TEM auf ihre Partikeldichte (Anzahl der Partikel pro Bild) und auf das 26S/20S-Verhältnis überprüft wird. Dabei können die Partikel mit Schwermetallsalzen negativ kontrastiert auf dünnem Kohlefilm (*negative stain*-EM) oder frei in Eis eingebettet, dargestellt werden (Kryo-EM). Aufgrund der Adsorption der meisten Proteine auf den Kohlefilm reichen in der *negative stain*-EM Proteinkonzentration von 10-100 µg/ml aus. Die Probenvorbereitung als auch die Datenaufzeichnung nehmen nicht sehr viel Zeit in Anspruch. Der gewaltige Nachteil ist aber das Auflösungslimit von ungefähr 20 Å, das auf die Korngröße der verschiedenen Schwermetallsalze zurückzuführen ist. Der zweite Grund ist, dass nur die Verteilung des Kontrastmittels und nicht die innere Struktur des Proteins abgebildet wird. Für die Kryo-EM werden hingegen in Abhängigkeit des Molekulargewichtes des zu untersuchenden Proteins Konzentrationen von ca. 400 µg/ml benötigt. Die Probenvorbereitung ist langwieriger und weniger reproduzierbar. Auch ist die Datenaufzeichnung viel zeitintensiver als mit Negativkontrastpräparaten. Jedoch ist das Auflösungslimit nicht von der Präparation beeinflusst. Abbildung 16 zeigt Gradientenfraktion 22, verdünnt auf 20 µg/ml mit Wasser, negativ kontrastiert bei einer Vergrößerung von 38.000X und einer Pixelgröße von 2,78 Å (Abb. 16, links).

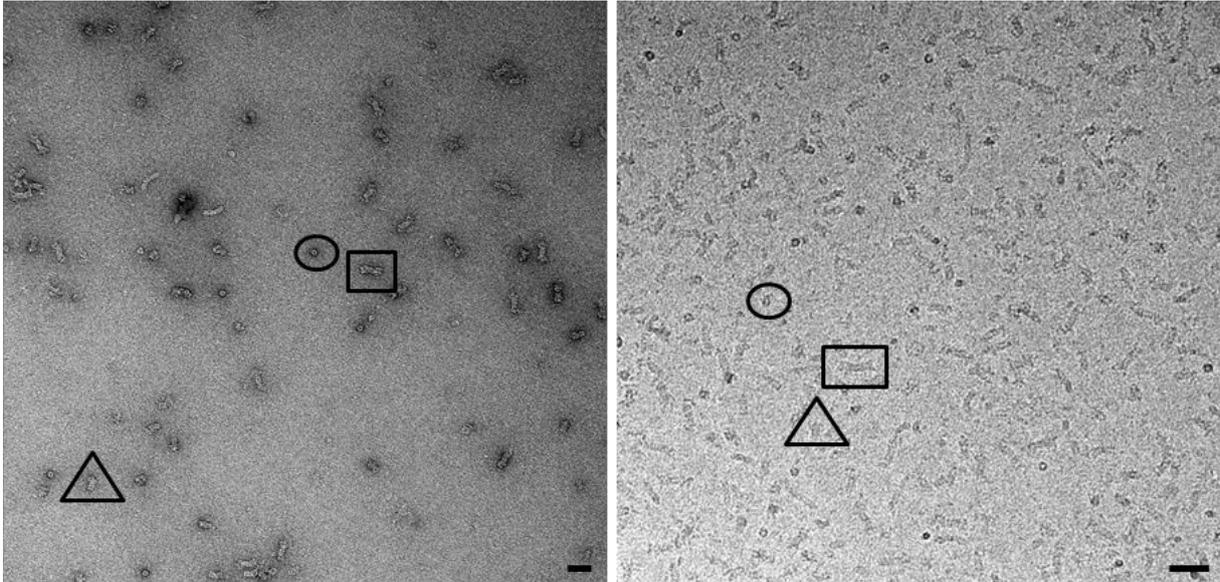


Abbildung 16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Gradientenfraktion 22 in *negative stain* (links) und vitrifiziert (rechts). Rechteck: dc 26S Proteasom (Seitenansicht); Dreieck: sc 26S Proteasom (Seitenansicht); Ellipse: 20S Proteasom (Aufsicht). Größenmarker: 45 nm.

26S Proteasom-Proben zeichnen sich typischerweise sowohl durch das Vorhandensein von 26S Proteasom-Partikeln mit ein (*single capped, sc*) oder zwei (*double capped, dc*) 19S RPs aus, sowie durch 20S Proteasom-Partikel ohne 19S RPs. In Fraktion 22 (Abb. 16, links) sind viele intakte dc26S- und sc26S Proteasom-Partikel zu sehen und nur wenige bis sehr wenige 20S Proteasom-Partikel. Letztendlich dient eine *negative stain*-Analyse lediglich als Hinweis, da intakte 26S Proteasom-Partikel in Abhängigkeit von der eingestellten Konzentration oder durch den sauren pH-Wert der Uranylacetat-Lösung in 20S- und 19S-Partikel dissoziieren können. Abbildung 16 zeigt rechts die gleiche Gradientenfraktion, unverdünnt vitrifiziert bei einer Vergrößerung von 62.000X und einer Pixelgröße von 1,78 Å. Auch hier ist eine Mischung von verschiedenen Proteasom-Partikeln zu sehen. Die Partikeldichte an gewünschten dc26S- und sc26S Proteasom-Partikeln ist sehr hoch. Aus diesem Grund ist die aufgereinigte Probe gut für die Datenaufzeichnung geeignet; denn eine hohe Partikeldichte bedeutet weniger aufzunehmende Bilder, die zur Erreichung einer bestimmten Auflösung benötigt werden.

3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms

Insgesamt wurden sechs Datensätze in jeweils einwöchigen Sitzungen semiautomatisch am FEI Titan Krios aufgenommen. Die Akquisition wurde mit der FEI EPU Software durchgeführt, bei der der Benutzer die Stellen auf dem *grid* (Kupfernetzscheibe, belegt mit dünnem Eis der wässrigen Probe) aussucht, die seiner gewünschten Eisdicke und Eisqualität entsprechen. Je nach Art der *grids* als auch je nach Vitrifizierungsbedingungen (Luftfeuchtigkeit, Puffer, *blotting time*, etc.) kann die Eisdicke variieren, was zu leicht unterschiedlichen Orientierungen des 26S Proteasoms in Eis führen kann. Bei den hier zum Teil verwendeten Quantifoil® R 2/1 Holey Carbon Grids haben die Löcher einen Durchmesser von 2 µm und sind im Abstand von 1 µm zueinander angeordnet. Dabei ist das Eis am Rand der Löcher

dicker als das in der Mitte des Loches (Cho et al. 2013). Werden Bilder nun innerhalb des Loches immer an den gleichen Stellen aufgenommen, ist die Partikelorientierung des 26S Proteasoms sehr ähnlich, da die Eisdicke von Loch zu Loch nur sehr gering variiert. Hingegen kann die Eisdicke in den ebenfalls verwendeten unregelmäßig geformten und unterschiedliche großen Löchern eines Quantifoil® Lacey Carbon Grids sehr variieren, was zu anderen Partikelorientierung des 26S Proteasoms führen kann. An den gewünschten Stellen werden die Daten vollautomatisch aufgenommen; das Fokussieren, die Aufzeichnung von Bildern und die Speicherung ist durch die Software gesteuert. Für die gespeicherten Bilder wurden die Powerspektren berechnet und vom gewünschten Fokus abweichende Bilder manuell entfernt. Jedes verbliebene Bild wurde dann vollautomatisch auf drei Kriterien überprüft: Der gemessene Astigmatismus des Bildes durfte maximal 0,2 betragen, der Defokus musste zwischen -0,8 und -3,5 μm liegen, und die Kreuzkorrelation (*cross correlation*) zwischen theoretischem und gemessenem Powerspektrum musste mindestens 0,1 betragen. Sobald nur eines der drei Kriterien für ein Bild nicht erfüllt war, wurde es verworfen. Die Partikel auf den nun selektierten Bildern sind anschließend automatisch durch eine im Haus entwickelte *particle picking software*, die Bestandteil der TOM *toolbox* ist (Nickell et al. 2005, Hrabe et al. 2012), markiert und extrahiert worden. Eine Vorsortierung der so ausgewählten Partikel erfolgte zunächst in 2D, um alle ungewünschten Partikel (26S Proteasom-Intermediate, Partikel fremder Proteinkomplexe, Ethan- oder Wasserverunreinigungen, speziell bei *lacey carbon grids* Kohlefilmkanten) von dc26S- und sc26S Proteasom-Partikeln zu trennen. So entstanden am Ende der 2D-Prozessierung zwei Datensätze mit sc26S- oder dc26S Proteasom-Partikeln. Abbildung 17 gibt einen Überblick, wie mit diesen zwei Datensätzen in der 3D-Klassifikation weiter verfahren worden ist.

Um eine möglichst hoch aufgelöste 3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms zu erhalten, ist es unabdingbar, einen hochgradig homogenen finalen Datensatz zu generieren, bei dem sich alle makromolekularen Partikel so wenig wie möglich in Komposition und Konformation unterscheiden. Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der Größe beider Datensätze wurde der sc26S Proteasom-Datensatz (ca. 108.000 Kappen) anders verarbeitet als der ca. vierfach größere dc26S Proteasom-Datensatz (431.100 Kappen). Um immer noch enthaltene Fremdpartikel aus dem Datensatz zu entfernen, wurden alle sc26S Proteasom-Partikel aus den sechs ursprünglichen Datensätzen vereint und in 3D rekonstruiert. Daraufhin waren zwei Runden *focused classification* nötig, um einen reinen, ca. 34.000 Kappen umfassenden finalen sc26S Proteasom-Datensatz zu erhalten. Dazu wurde die in Abb. 18 dargestellte Maske verwendet.

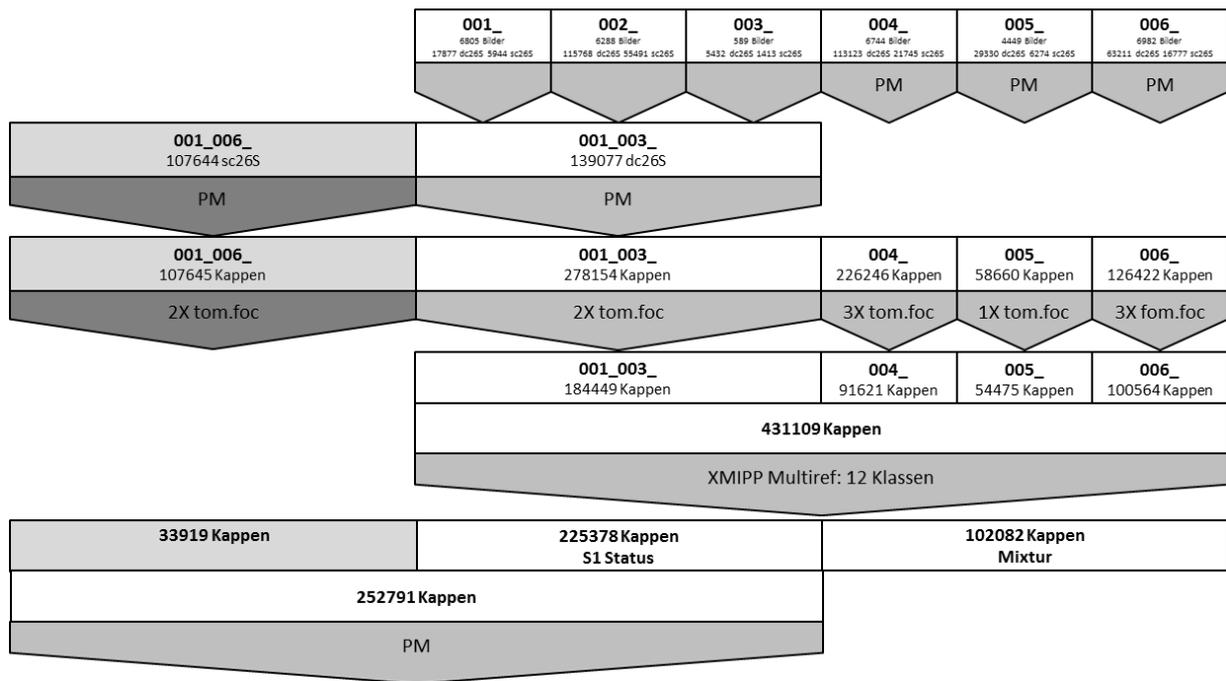


Abbildung 17 Arbeitsablauf der 3D-Datenprozessierung. Dunkler abgesetzt auf der linken Seite der Graphik der Arbeitsablauf für das sc26S Proteasom, rechts heller gehalten der Arbeitsablauf für das dc26S Proteasom. 001_-006_ markieren die 6 ursprünglichen Datensätze. tom.foc: *Focussed Classification* mit der TOM Toolbox; PM: *Projection Matching* in XMIPP.

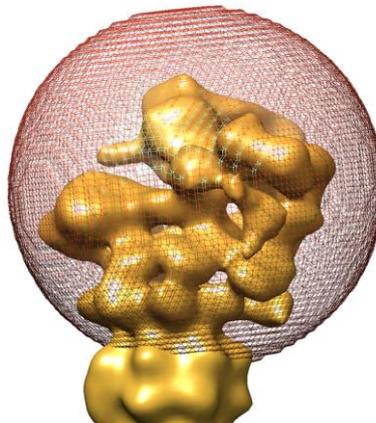


Abbildung 18 Darstellung der Maske (rot), die das 19S RP (gold) samt nächstliegendem α -Ring umschließt. Sie wurde für alle Runden der *focussed classification* der sc26S- und dc26S Proteasom-Datensätze eingesetzt.

Aufgrund der Größe des dc26S Proteasom-Datensatzes als auch wegen der erst nach und nach zur Verfügung stehenden einzelnen Datensätze war die Prozessierungsstrategie komplizierter und langwieriger als diejenige für den sc26S Proteasom-Datensatz. Die dc26S Proteasom-Partikel der ersten drei Datensätze wurden vereint rekonstruiert und 3D klassifiziert. Diese Strategie wurde auch innerhalb der Datensätze 004_, 005_ und 006_ verfolgt. Auch hier wurde die Maske aus Abb. 18 verwendet, was bei dc26S Proteasom-Partikeln und deren intrinsischer näherungsweise C_2 -Symmetrie zu einer Verdopplung des Datensatzes führte. Die beiden 19S RPs eines dc26S Proteasoms werden dabei als zwei eigenständige 19S RPs angesehen. Erst nachdem die Datensätze 001_-003_, 004_, 005_ und 006_ „vorgereinigt“ waren, wurden die Kappen vereint und anschließend durch eine auf *maximum likelihood* basierende ML3D-Klassifikation (Scheres et al. 2008) in zwölf Klassen

unterteilt. Auf diese Weise konnte noch ein erheblicher Anteil an Fremdpartikeln und 26S Proteasom-Partikeln, die nicht eindeutig dem S1-Zustand gemäß Unverdorben *et al.* (Unverdorben et al. 2014) entsprachen, eliminiert werden. Am Ende blieben ca. 252.000 einheitlich zusammengesetzte Kappen aus dem dc26S Proteasom-Datensatz übrig. Nach der Vereinigung aller verbliebenen Kappen aus den sc26S- und den dc26S Proteasom-Datensätzen konnte eine 3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms mit einer nominellen Auflösung von 6,8 Å (Scheres 2012) berechnet werden (Abb. 19). Dabei ließen sich alle kanonischen Untereinheiten exakt lokalisieren.

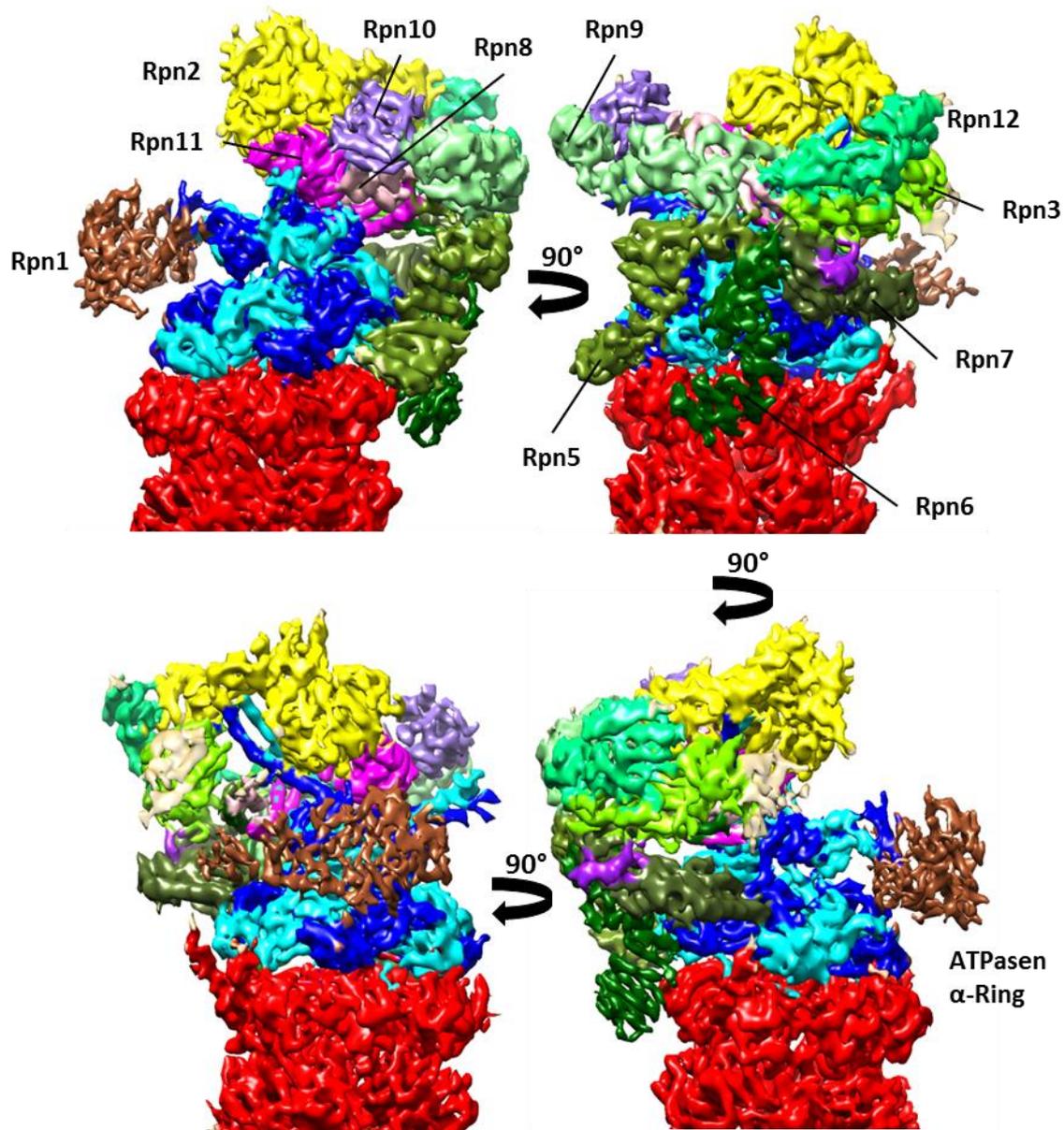


Abbildung 19 Molekulare Architektur des menschlichen 26S Proteasoms (gefiltert auf 7,4 Å zur besseren Darstellung von Rpn1). Die segmentierten Dichten der einzelnen Untereinheiten sind verschieden farbig dargestellt.

Wie bei einer Auflösung von 6,8 Å zu erwarten, sind α -Helices in allen Untereinheiten klar zu erkennen, wie z.B. bei den Untereinheiten Rpn5 oder Rpn7 (Abb. 19). Dennoch gibt es zwei Untereinheiten, Rpn1 und Rpn6, die eine erhebliche Variabilität zeigen und aufgrund dessen

niedriger aufgelöst sind als das restliche 26S Proteasom. Die weitgehend gleichmäßige Winkelverteilung des vitrifizierten humanen 26S Proteasoms (Abb. 20) schließt aus, dass es sich bei der niedrigen Auflösung von Rpn1 und Rpn6 um ein Problem fehlender Winkelklassen handelt. Deutlich zu erkennen sind drei Hauptwinkelklassen, die im Abstand von ca. 90° um die Längsachse des Partikels angeordnet sind (Abb. 20). Es gibt jedoch keine fehlenden Ansichten des 26S Proteasoms, die die niedrige Auflösung von Rpn1 oder Rpn6 erklären könnten.

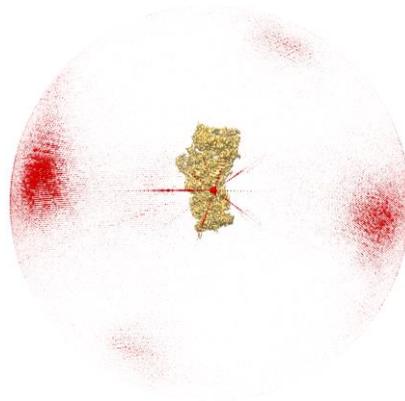


Abbildung 20 Winkelverteilung des vitrifizierten humanen 26S Proteasoms. Das 26S Proteasom ist als sc26S Proteasom (gold) dargestellt. Die roten Punkte zeigen die bevorzugten Winkelklassen des in Eis eingebetteten 26S Proteasoms an.

Die Varianz, berechnet über *bootstrapping* (Penczek et al. 2006, Penczek et al. 2006), und die lokale Auflösung bei Rpn1 und Rpn6 sind in Abbildung 21 dargestellt. Die Varianz bei Rpn1 fällt deutlich größer und weniger stark lokalisiert aus als bei Rpn6 und erstreckt sich von Rpn1 bis in den Bereich von Rpn3/12 (Abb. 21, Mitte oben und unten). Die Varianz bei Rpn6 (Abb. 21, Mitte unten) ist viel kleiner als bei dem Ubiquitinrezeptor Rpn10, dessen Varianz aufgrund seiner Funktion natürlichen Ursprungs ist. Dennoch überrascht die Rpn6-Varianz, da alle Rpn6-Konformere, die nicht eindeutig dem S1-Zustand entsprechen (Abb. 22), während der Datenprozessierung aussortiert worden sind. In Abbildung 22 sind die drei 26S Proteasom-Konformere abgebildet. Aufgrund der signifikanten strukturellen Unterschiede lässt sich der S1-Zustand leicht von den beiden anderen Konformeren (S2- und S3-Zustand) trennen. Unterschieden werden können die drei Konformeren nicht nur durch die Konformationsänderung von Rpn6, sondern ebenfalls durch die Rotation von Rpn2. Dies kann als zweites Unterscheidungskriterium herangezogen werden. Generell stimmt das menschliche 26S Proteasom-Homologiemodell sehr gut für alle Untereinheiten mit der humanen 6,8 Å Struktur überein, mit Ausnahme eben von Rpn1 und Rpn6 (Abb. 23). Dementsprechend liegt auch die lokale Auflösung dieser Untereinheiten bei nur 8-8,5 Å und nicht wie beim restlichen Proteasom bei 6,5-7,5 Å.

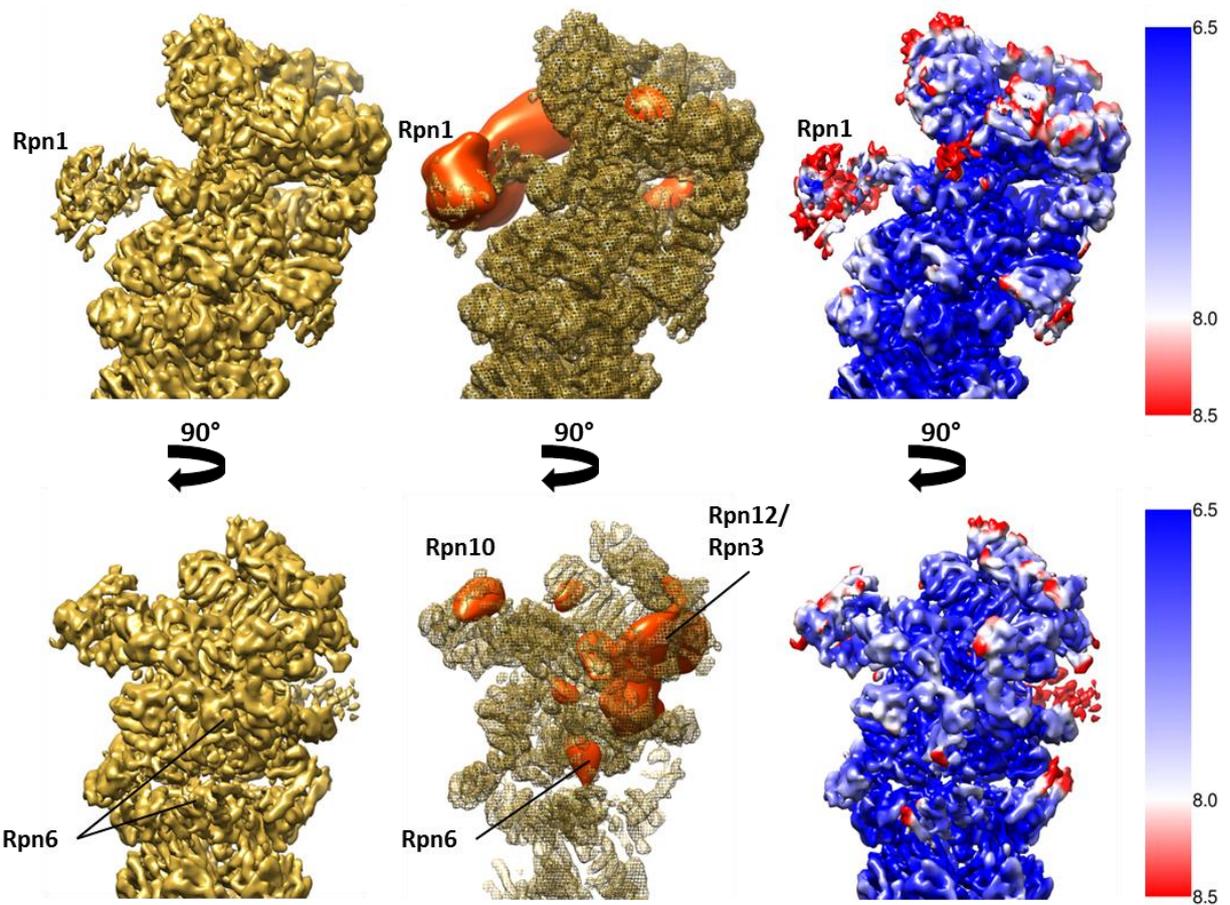


Abbildung 21 Lokal gefilterte 3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms (links). Gitterrepräsentation der Varianz des humanen 26S Proteasoms (Mitte). *Isosurface* Repräsentation der lokalen Auflösung (rechts).

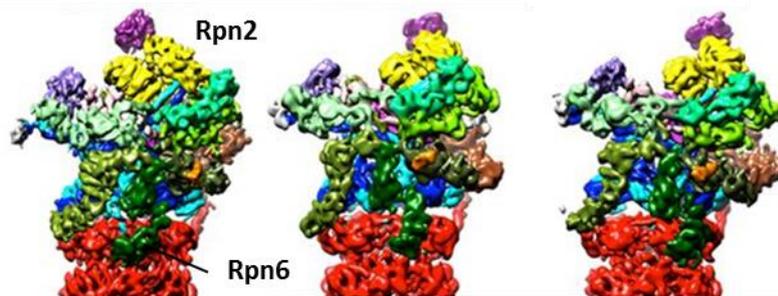


Abbildung 22 Molekulare Architektur des hufeisenförmigen *lid*-Subkomplexes (in Grüntönen) in den verschiedenen 26S Proteasom-Konformationen S1 (links), S2 (Mitte) und S3 (rechts). Die segmentierten Dichten der einzelnen Untereinheiten sind verschieden farbig dargestellt. Abbildung adaptiert aus Unverdorben *et al.* (Unverdorben et al. 2014).

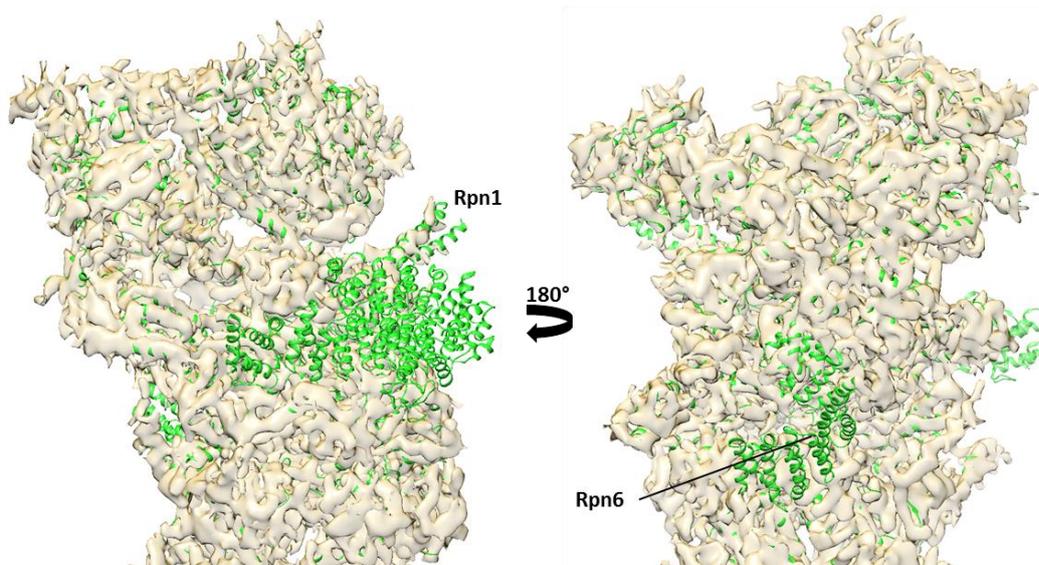


Abbildung 23 Isosurface Repräsentation des humanen 6,8 Å 26S Proteasoms (transparent gold). Zugeschnitten auf diese Dichte das Homologiemodell des menschlichen 26S Proteasoms (grün).

3D-Klassifikation des humanen 26S Proteasoms

Um der Flexibilität der beiden Untereinheiten Rpn1 und Rpn6 zu verstehen, wurde der ca. 252.000 Kappen umfassende Datensatz mittels zweier verschieden positionierter Masken getrennt voneinander in vier Klassen unterteilt (Abb. 24).

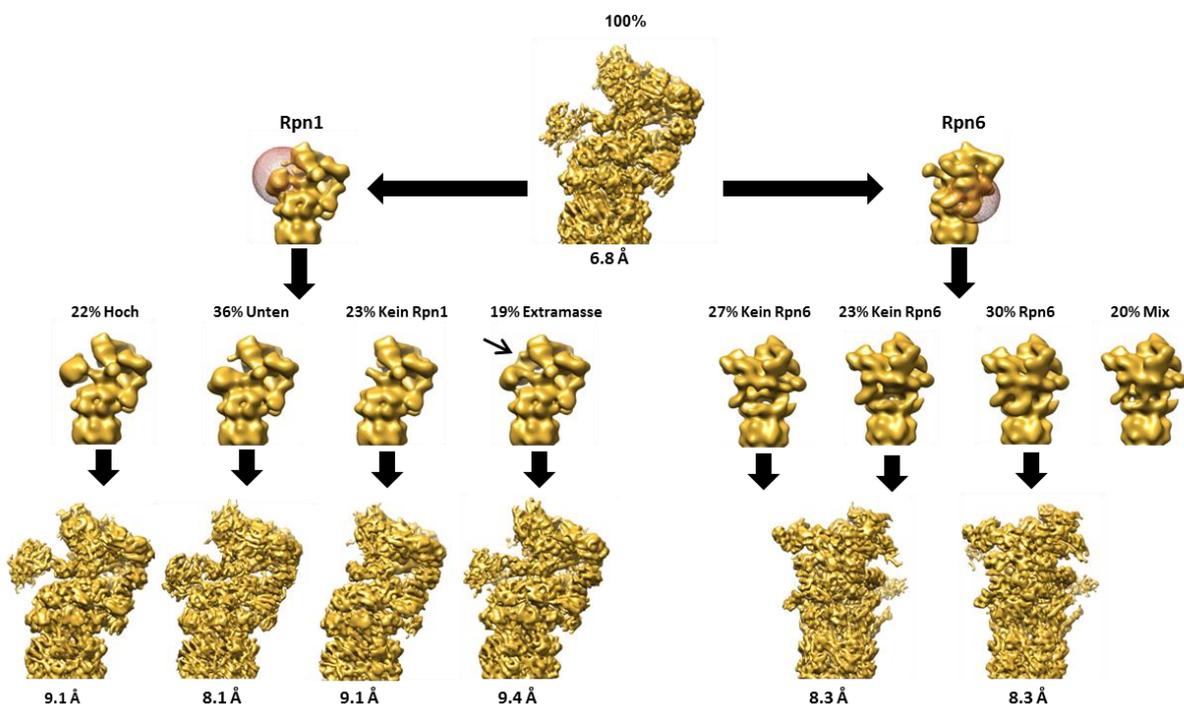


Abbildung 24 Focused Classification des gesamten Datensatzes mit einer Maske über Rpn1 (links) und einer über Rpn6 (rechts). Oberste Reihe: Ausgangsdatensatz. Mittlere Reihe: Klassen von Rpn1 bzw. Rpn6. Unterste Reihe: Refinement der Klassen von Rpn1 bzw. Rpn6.

Die Klassifikation des gesamten Datensatzes mit einer Maske, die Rpn1 umschließt (Abb. 24, links oben), ergab vier grundsätzlich verschiedene Klassen. Die ersten beiden Klassen zeigen

Rpn1 in zwei unterschiedlichen Positionen, die mit „Hoch“ und „Unten“ markiert sind (Abb. 24, links mittlere Reihe). In der Klasse „Hoch“ hat Rpn1 keinen Kontakt zu dem ATPase-Ring, während diese Untereinheit in der Konfiguration „Unten“ in Kontakt mit dem ATPase-Ring steht. Die Klassen „Kein Rpn1“ und „Extramasse“ zeichnen sich, wie der Name bereits suggeriert, durch das völlige Fehlen von Rpn1 aus oder durch das Vorhandensein einer Dichte zwischen Rpn1 und Rpn3. Die prozentualen Anteile der einzelnen Klassen sind relativ ausgeglichen, mit Ausnahme der Klasse „Unten“, die fast doppelt so stark repräsentiert ist wie die anderen drei Klassen.

Die Klassifikation des Datensatzes in vier Klassen nach Rpn6 ergab drei deutlich voneinander unterscheidbare Zustände, da die ersten zwei Klassen, bezeichnet mit „Kein Rpn6“, zusammengefasst werden können. Beide Klassen, die insgesamt zu 50% im gesamten Datensatz vorzuliegen scheinen, zeichnen sich durch das Fehlen der Dichte für die N-terminalen Domäne von Rpn6 aus. Höchstwahrscheinlich wird diese Dichte durch die Flexibilität der Untereinheit Rpn6 „verschmiert“, d.h. sie kann nicht kohärent gemittelt werden. Mit 30 % liegt die Klasse „Rpn6“ vor, bei der die Rpn6-Dichte vollständig zu sehen ist. Die Klasse „Mix“ (20 %) stellt nach wie vor eine Mischung aus Partikeln dar, deren Rpn6-Dichte teilweise vorhanden ist und teilweise fehlt. Sie scheint ein Gemisch aus den Klassen „Kein Rpn6“ und „Rpn6“ zu sein, mit einem Schwerpunkt auf Kappen ohne Rpn6-Dichte, da die Rpn6-Dichte nicht so groß wie in „Rpn6“ erscheint. Die untere Reihe in Abb. 24 zeigt die vier Klassen für Rpn1 im Auflösungsbereich von 8,1-9,4 Å und die zwei Klassen für Rpn6 bei einer Auflösung von 8,3 Å.

Weitere Klassifikationsrunden waren nötig, um der Rpn6-Dichte teilweise eine Position zuordnen zu können (Abb. 25). Ausgangspunkt für die anschließenden drei Klassifikationsrunden war die erste Klassifikation in die vier Hauptklassen (Abb. 24). Bereits die zwölf Klassen der zweiten Klassifikationsrunde zeigen die hohe strukturelle Variabilität im Bereich von Rpn6. Auffallend sind die Klassen, die eine vom restlichen 26S Proteasom abstehende Dichte zeigen (Abb. 25, Klassen der 2. KR, rote Kästchen). Der C-terminale Bereich von Rpn6 scheint zwischen Rpn5 und Rpn7 fixiert zu sein, während der N-terminale Bereich von Rpn6 frei von jeglicher Bindung zu anderen 26S Proteasom-Untereinheiten jede Position einnehmen kann. Genau diese Klassen wurden vereint und erneut klassifiziert. Für die dritte Klassifikationsrunde ist eine etwas größere Maske gewählt worden, um eventuell auftretenden Masken-Artefakten vorzubeugen. Ein einziges Modell der dritten Klassifikationsrunde scheint eine Dichte zu zeigen, deren Position als auch Volumen mit Rpn6 übereinstimmt. Dies konnte durch die vierte Klassifikationsrunde bestätigt werden. Dieses eindeutig interpretierbare Modell zeigt Rpn6 in einem Winkel von 90° abstehend vom übrigen 19S RP. Dass es sich dabei nicht nur um eine unabhängige freie Masse handelt, die ohne Bindung in der Nähe von Rpn6 liegt, zeigen ebenfalls die Ergebnisse der vierten Klassifikationsrunde. Nur 1,6 % aller in die Klassifikation eingeflossenen Partikel nehmen eine solche Konformation an.

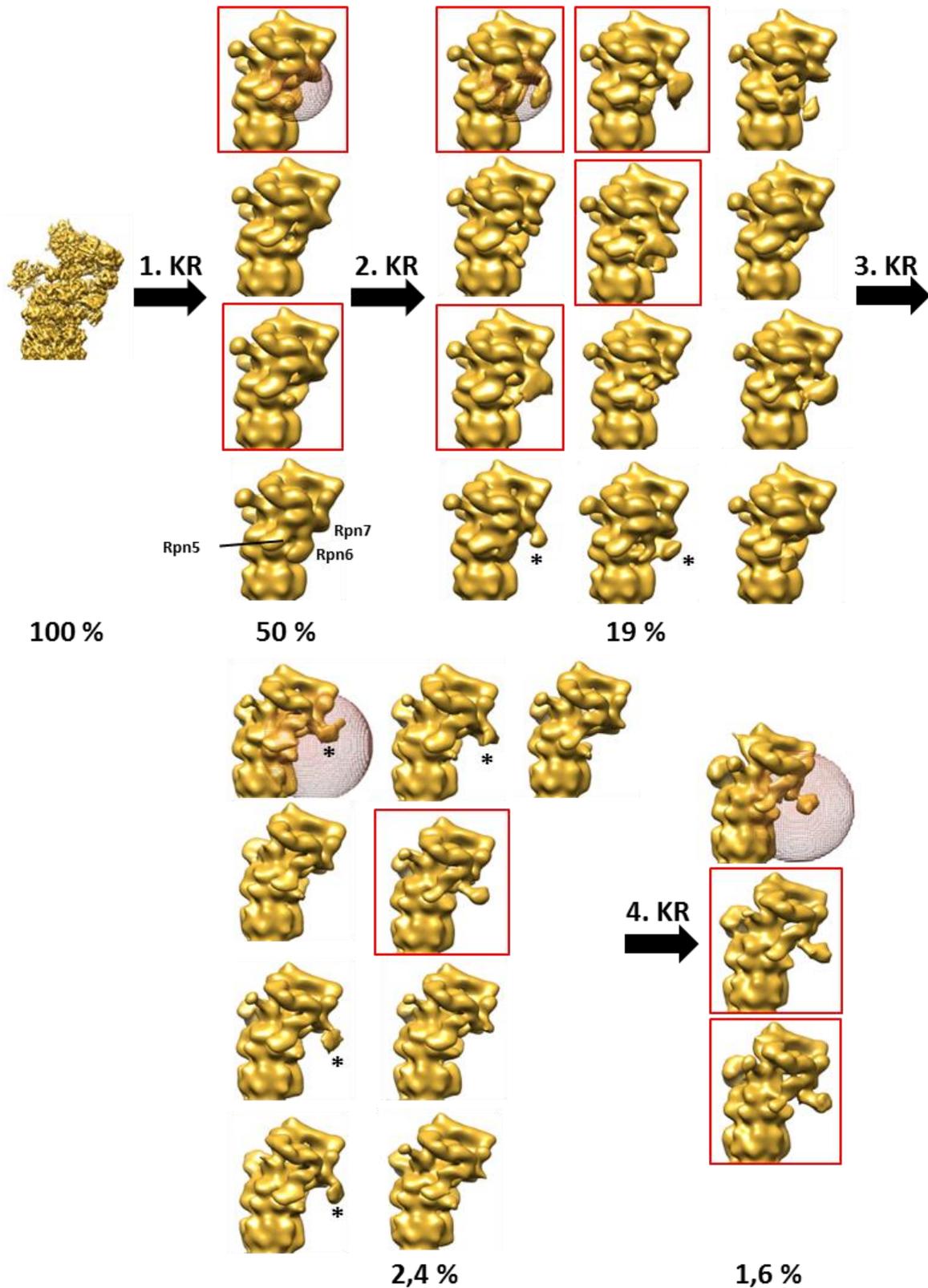


Abbildung 25 Darstellung der Klassen aus den vier Klassifikationsrunden (KR). Das erste Modell jeder KR stellt zusätzlich die in dieser KR verwendete Maske dar. Die prozentualen Angaben unter den Ergebnissen einer KR geben den Prozentteil der ausgewählten Klassen für die nächste KR an, gemessen an den 100 % des gesamten Datensatzes zu Beginn der ersten KR. Rote Kästchen: Ausgewählte Klassen für die nächste KR.

Diskussion

3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms

Bis zum jetzigen Zeitpunkt des bearbeiteten Projekts ist die hier vorgestellte Rekonstruktion des menschlichen 26S Proteasoms diejenige mit der höchsten Auflösung, unabhängig vom Ursprungsorganismus oder der angewendeten Symmetrie. Aus Abbildung 26 wird ersichtlich, dass sich das Hefe-Proteasom und das Menschen-Proteasom in Bezug auf die kanonischen Untereinheiten kaum unterscheiden.

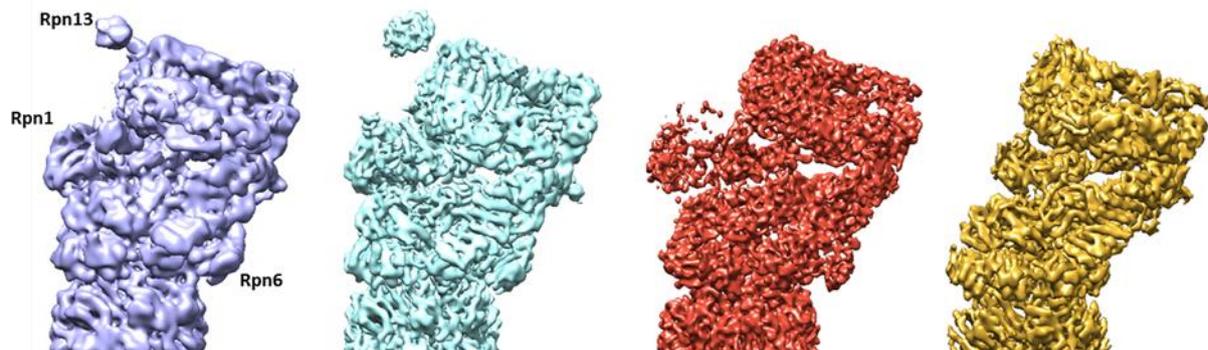


Abbildung 26 26S Proteasom-Komplexe aus unterschiedlichen Organismen und mit abweichender Auflösung. Für jede Rekonstruktion werden Probenorganismus, angewendete Symmetrie, Auflösung und Chimera-Konturlevel wie folgt angegeben: Violett (EMDB-1992): *S.cerevisiae*; C₂; 9 Å (FSC0,5); 3 (Lander et al. 2012). Zyan (EMDB-2594): *S.cerevisiae*; C₁; 7,7 Å (FSC0,143); 0,74 (Unverdorben et al. 2014). Rot (EMDB-2047): *H.sapiens*; C₂; 7 Å (FSC0,5); 2 (da Fonseca et al. 2012). Gold: *H.sapiens*; C₁; 6,8 Å (FSC0,143); 0,06 (diese Arbeit).

Dies ist generell auch nicht verwunderlich, da die Sequenzähnlichkeiten der einzelnen Untereinheiten zueinander ziemlich groß sind (Tab. 2, Tab. 4, Tab. 5, Tab. 6). Insbesondere die Positionen der einzelnen kanonischen Untereinheiten sind identisch. Lediglich für Rpn1 ergeben sich leichte Unterschiede in der Position. Nur Rpn13 ist zu unterscheiden, da diese Untereinheit höchstwahrscheinlich stöchiometrisch in der Hefe vorliegt und durch die angewandte Affinitätschromatographie, die mittlerweile ausschließlich zur Aufreinigung des Hefe-Proteasoms herangezogen wird, stöchiometrisch ans Proteasom bindend mit aufgereinigt wird (Lander et al. 2012, Sakata et al. 2012, Unverdorben et al. 2014). *In vivo*-Studien in Neuronen konnten belegen, dass ca. 58 % aller 26S Proteasom-Komplexe in der Zelle Rpn13 gebunden hatten (Asano et al. 2015). Dementsprechend würde man bei einer Aufreinigung von humanen 26S Proteasom-Komplexen unter ähnlich milden Präparationsbedingungen wie der Affinitätschromatographie Rpn13 in der 3D-Rekonstruktion erwarten. Selbst wenn die Rpn13-Besetzung des Proteasoms durch die Aufreinigungsbedingungen erniedrigt sein sollte, könnte man vielleicht eine Rpn13-Dichte erkennen. Chen *et al.* konnten bereits 2010 zeigen, dass sich konventionell aufgereinigte 26S Proteasom-Proben in ihrer Zusammensetzung von Proben unterscheiden, die man mit Hilfe der Affinitätschromatographie gewann. So fehlt in konventionell aus Erythrozyten aufgereinigten 26S Proteasom-Proben Rpn13 (Chen et al. 2010, da Fonseca et al. 2012) und in Folge dessen Uch37, ebenso Ubp6 (Chen et al. 2010). Präparierten Chen *et al.* das 26S Proteasom unter milden Bedingungen aus HEK293-Zellen (Wang et al. 2007), enthielt das

26S Proteasom Rpn13, Uch37 und Ubp6. Dazu nutzten sie einen Affinitäts-*tag* am C-Terminus von Rpn11 (Wang et al. 2007). Leider wurde eine solche Probe nie kryoelektronenmikroskopisch untersucht. Somit überrascht es nicht, dass die hier vorgestellte humane 26S Proteasom-Struktur keine Dichten für die PIPs Rpn13, Uch37 oder Ubp6 enthält. Höchstwahrscheinlich spielen Faktoren wie die hohe Ammoniumsulfat-Konzentration zu Beginn der Aufreinigung, der hohe Verdünnungsfaktor des 26S Proteasoms während der Ultrazentrifugation als auch die finale Zentrifugation im Sucrose-Gradienten eine Rolle bei der Dissoziation der PIPs vom 26S Proteasom. Es könnte aber auch schlichtweg an der Art der Zellen liegen, die zur 26S Proteasom-Präparation benutzt wurden.

Erst bei genauer Betrachtung fallen die Unterschiede bezüglich zweier kanonischer Untereinheiten, Rpn1 und Rpn6, auf. In beiden Rekonstruktionen des Hefe-Proteasoms können beide Untereinheiten exakt lokalisiert werden und unterscheiden sich anhand der Sekundärstrukturelemente kaum von den restlichen Untereinheiten. Vergleicht man nun sowohl die Position als auch die Auflösung beider Untereinheiten aus der Hefe mit den Proteasom-Modellen aus dem Menschen, fällt sofort auf, dass im rot dargestellten Modell der Abb. 26 beide Untereinheiten lokalisiert werden können. Dabei ist die Auflösung für Rpn1 schlechter als für Rpn6. Im goldenen, am höchsten aufgelösten Modell sind die Untereinheiten Rpn1 und Rpn6 nicht zu erkennen, was auf eine bisher unbekannte Flexibilität bzw. Dynamik beider Untereinheiten hindeutet (Abb. 26). Obwohl Rpn1 aus dem Menschen und der Hefe strukturell ähnlich sind (Tab. 4), spiegelt sich die intrinsische Flexibilität von Rpn1 in der unterschiedlichen Position im Menschen- und Hefe-Modell wieder (Tab. 4). Alle anderen Untereinheiten, inklusive Rpn6 (Tab. 4, 5 und 6), sind sowohl strukturell als auch positionell sehr ähnlich.

Tabelle 4 Strukturelle Ähnlichkeit der einzelnen 26S Proteasom-Untereinheiten (2. Spalte) des Menschen (gold) mit denen der Hefe *S.cerevisiae* (blau). Positionsähnlichkeit der 26S Proteasom-Untereinheiten im Menschen (gold)-und Hefe (blau)-Modell, wenn beide Modelle auf den β -Ring aligniert worden sind (3. und 4. Spalte).

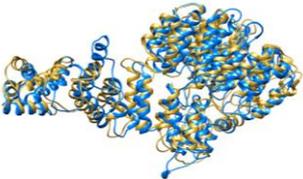
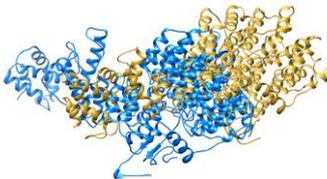
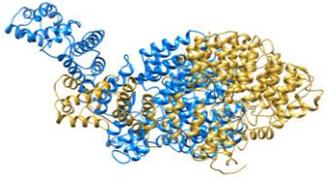
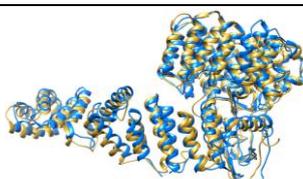
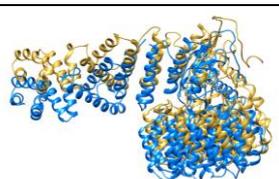
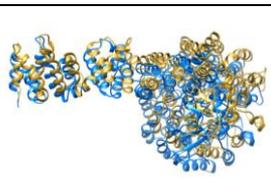
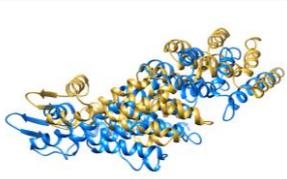
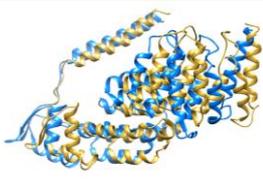
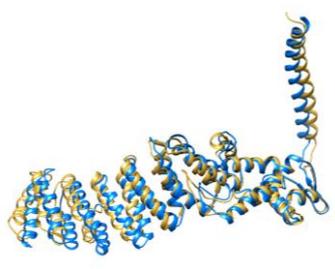
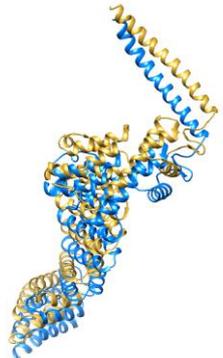
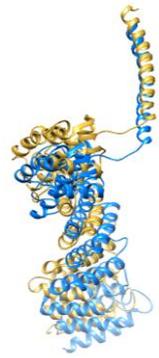
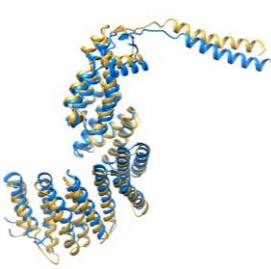
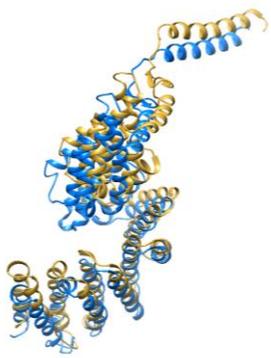
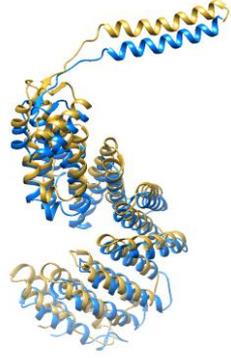
Unter- ein- heit	Überlagerung der Untereinheit aus dem Menschen und der Hefe	Überlagerung der Untereinheit aus dem Menschen und der Hefe basierend auf der β -Ring-Alignierung	
		Seitenansicht	Aufsicht
Rpn1	RSMD: 1,381 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpn2	RSMD: 1,280 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpn3	RSMD: 1,206 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpn5	RSMD: 1,253 Å	Seitenansicht	Seitenansicht
			
Rpn6	RSMD: 1,243 Å	Seitenansicht	Seitenansicht
			

Tabelle 5 Strukturelle Ähnlichkeit der einzelnen 26S Proteasom-Untereinheiten (2. Spalte) des Menschen (gold) mit denen der Hefe *S.cerevisiae* (blau). Positionsähnlichkeit der 26S Proteasom-Untereinheiten im Menschen (gold)-und Hefe (blau)-Modell, wenn beide Modelle auf den β -Ring aligniert worden sind (3. und 4. Spalte).

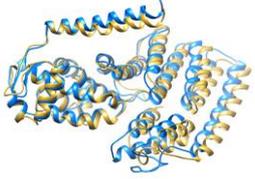
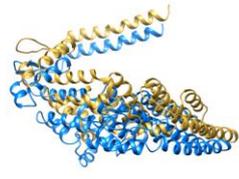
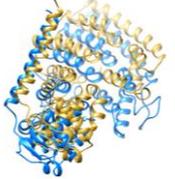
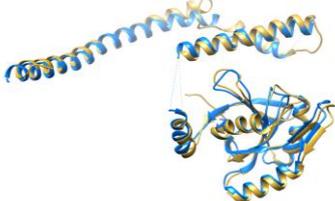
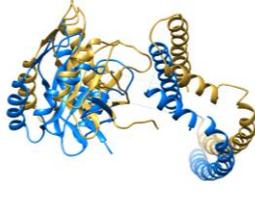
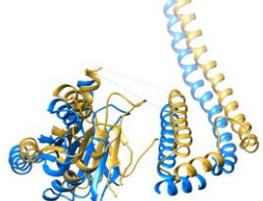
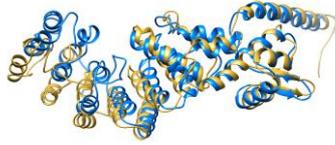
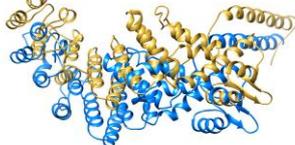
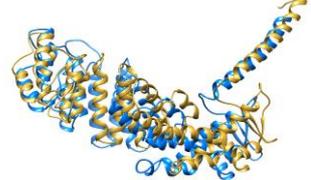
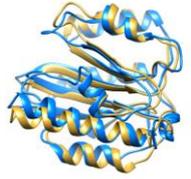
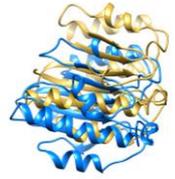
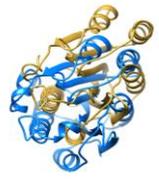
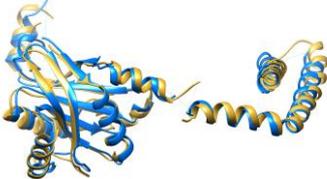
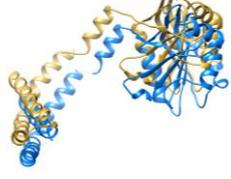
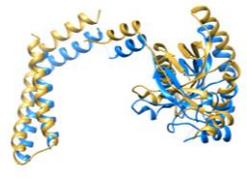
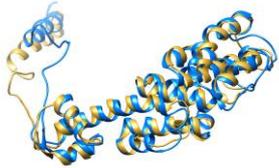
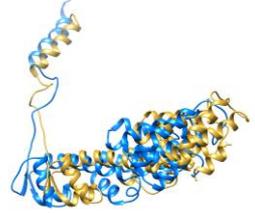
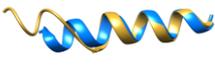
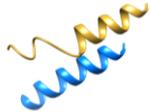
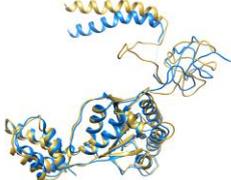
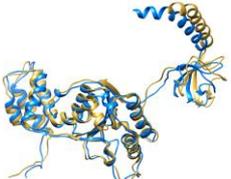
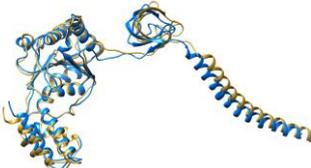
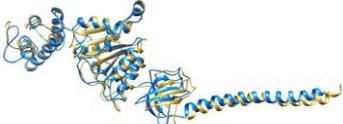
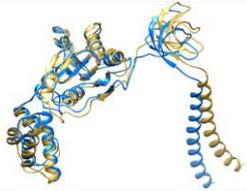
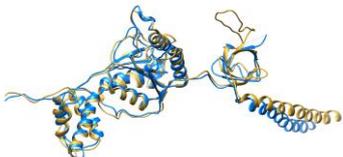
Unter-ein-heit	Überlagerung der Untereinheit aus dem Menschen und der Hefe	Überlagerung der Untereinheit aus dem Menschen und der Hefe basierend auf der β -Ring-Alignierung	
Rpn7	RSMD: 1,068 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpn8	RSMD: 1,129 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpn9	RSMD: 1,357 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpn10	RSMD: 1,038 Å	Seitenansicht	Seitenansicht
			
Rpn11	RSMD: 1,180 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpn12	RSMD: 1,378 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			

Tabelle 6 Strukturelle Ähnlichkeit der einzelnen 26S Proteasom-Untereinheiten (2. Spalte) des Menschen (gold) mit denen der Hefe *S.cerevisiae* (blau). Positionsähnlichkeit der 26S Proteasom-Untereinheiten im Menschen (gold)-und Hefe (blau)-Modell, wenn beide Modelle auf den β -Ring aligniert worden sind (3. und 4. Spalte).

Unter-ein-heit	Überlagerung der Untereinheit aus dem Menschen und der Hefe	Überlagerung der Untereinheit aus dem Menschen und der Hefe basierend auf der β -Ring-Alignierung	
Rpn15	RSMD: 0,520 Å	Seitenansicht	Aufsicht
			
Rpt1	RSMD: 1,214 Å	Seitenansicht des ATPase-Ringes	
			
Rpt2	RSMD: 1,205 Å	Seitenansicht des ATPase-Ringes	
			
Rpt6	RSMD: 1,098 Å	Seitenansicht des ATPase-Ringes	
			
Rpt3	RSMD: 1,193 Å	Seitenansicht des ATPase-Ringes	
			
Rpt4	RSMD: 1,219 Å	Aufsicht auf den ATPase-Ring	
			
Rpt5	RSMD: 1,288 Å	Aufsicht auf den ATPase-Ring	
			

Aus Abbildung 27 ist ersichtlich, dass der C-terminal Teil von Rpn1 hochkonserviert ist. Die N-terminale gestreckte Domäne an der vermutlich die *coiled-coil*-Struktur von Rpt1/2 bindet (Abb. 28) ist es aber nicht. Diese ist wiederum weniger stark konserviert als der Rest von Rpt1 und Rpt2 (Tab. 7). Zusammengenommen weist dies darauf hin, dass die Bindung von Rpn1 an die *coiled-coil*-Struktur von Rpt1/2 in Mensch und Hefe verschieden ist.

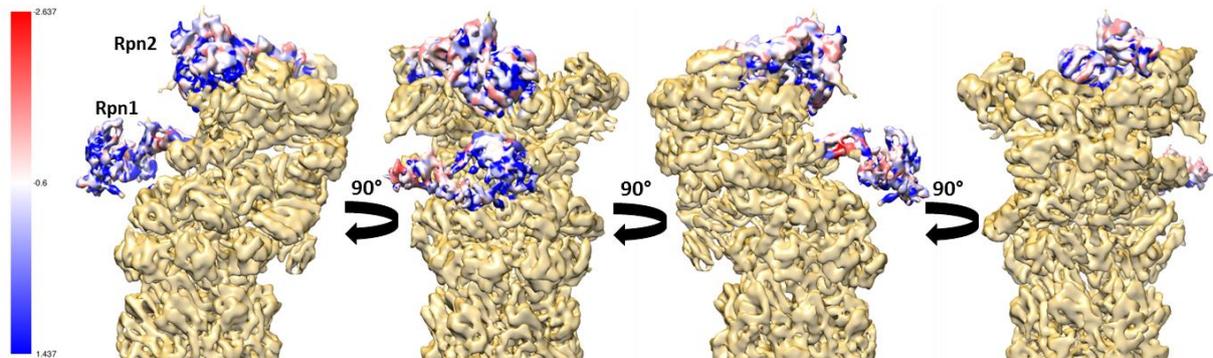


Abbildung 27 Isosurface-Darstellung der Konservierung von Rpn1, des strukturell verwandten Rpn2 sowie der *coiled-coil*-Strukturen von Rpt1 und Rpt2 aus dem Menschen (Hsa, *Homo sapiens*), der Fruchtfliege (Dme, *Drosophila melanogaster*), der Maus (Mmu, *Mus musculus*), der Spaltheife (Spo, *Schizosaccharomyces pombe*) und der Bäckerhefe (Sce, *Saccharomyces cerevisiae*).

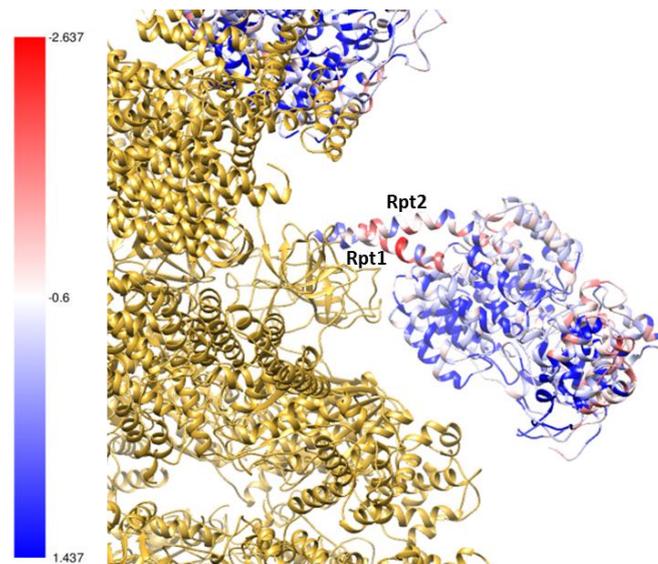


Abbildung 28 Darstellung der Konservierung der *coiled-coil*-Struktur von Rpt1/2. Die der *coiled-coil*-Struktur gegenüber liegende Innenfläche von Rpn1 ist hochkonserviert. Während die *coiled-coil*-Struktur von Rpt1/2 weniger konserviert ist, liegt die Homologie der Hefe-Untereinheiten für humanes Rpt1 und Rpt2 bei 79,1 % bzw. 74 %.

Tabelle 7 Sequenzidentität der einzelnen Untereinheiten aus verschiedenen Organismen zueinander. Hsa: *Homo sapiens*, Dme: *Drosophila melanogaster*, Mmu: *Mus musculus*, Spo: *Schizosaccharomyces pombe*, Sce: *Saccharomyces cerevisiae*. Werte wurden mit dem Chimera Multi Align Viewer berechnet.

Rpn1 Sequenzidentität [%]					
	Hsa	Dme	Mmu	Spo	Sce
Hsa		62,5	97,5	48,0	44,2
Dme			61,7	46,9	42,3
Mmu				48,7	43,5
Spo					47,1
Sce					
Rpt1 Sequenzidentität [%]					
	Hsa	Dme	Mmu	Spo	Sce
Hsa		92,6	98,9	77,8	79,1
Dme			91,5	72,8	73,0
Mmu				73,4	74,4
Spo					77,9
Sce					
Rpt2 Sequenzidentität [%]					
	Hsa	Dme	Mmu	Spo	Sce
Hsa		92,2	98,1	74,3	74,0
Dme			90,4	74,0	70,3
Mmu				72,7	71,2
Spo					71,9
Sce					

Für Rpn6 liegt kein struktureller oder positioneller Unterschied vor (Tab. 4). Dennoch ist aus Abbildung 29 ersichtlich, dass der N-terminale Teil von Rpn6 weniger konserviert ist als der C-terminale Teil, der Bestandteil der hufeisenförmigen *lid*-Struktur ist.

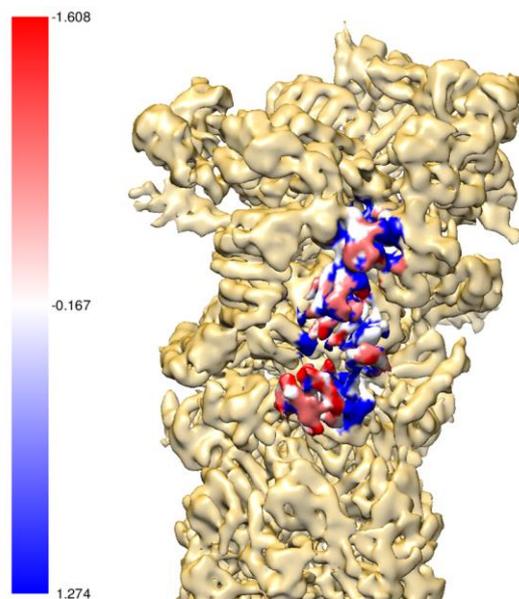


Abbildung 29 Isosurface-Darstellung der Konservierung von Rpn6 aus dem Menschen (Hsa, *Homo sapiens*), der Fruchtfliege (Dme, *Drosophila melanogaster*), der Maus (Mmu, *Mus musculus*), der Spaltheife (Spo, *Schizosaccharomyces pombe*) und der Bäckerhefe (Sce, *Saccharomyces cerevisiae*).

Tabelle 8 macht deutlich, dass speziell die Sequenzidentität zwischen Mensch und der Hefe *S.cerevisiae* am niedrigsten ist. Dies könnte die Abweichung der Konformation von Rpn6 teilweise erklären.

Tabelle 8 Sequenzidentität der einzelnen Untereinheiten aus verschiedenen Organismen zueinander. Hsa: *Homo sapiens*, Dme: *Drosophila melanogaster*, Mmu: *Mus musculus*, Spo: *Schizosaccharomyces pombe*, Sce: *Saccharomyces cerevisiae*. Werte wurden mit dem Chimera Multi Align Viewer berechnet.

	Rpn6 Sequenzidentität [%]				
	Hsa	Dme	Mmu	Spo	Sce
Hsa		65,6	98,1	53,9	41,7
Dme			66,6	53,4	44,1
Mmu				54,6	42,7
Spo					48,5
Sce					

Dass Rpn1 und Rpn6 in der Probe vorliegen, hatte bereits die massenspektrometrische Analyse und für Rpn1 auch die SDS-PAGE gezeigt. Es konnten keine Abbauprodukte beider Untereinheiten in der Probe nachgewiesen werden. Interessant ist dabei die Tatsache, dass für beide 26S Proteasom-Aufreinigungen Erythrozyten verwendet worden sind. Bei der aus Erythrozyten stammenden 26S Proteasom-Probe, die zur roten Struktur in Abb. 26/30 führten, handelt es sich um eine käuflich zu erwerbende Probe von Biomol International (da Fonseca et al. 2012). Leider gibt es keine Informationen über die Probengewinnung, doch wird hier davon ausgegangen, dass diese sehr ähnlich zu der von Enzo Life Sciences ist. Auch hier sind die Informationen zu den Aufreinigungsbedingungen spärlich. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurde eine konventionelle Aufreinigungsstrategie verfolgt, da die verwendeten Zellen nicht genetisch modifiziert worden sind.

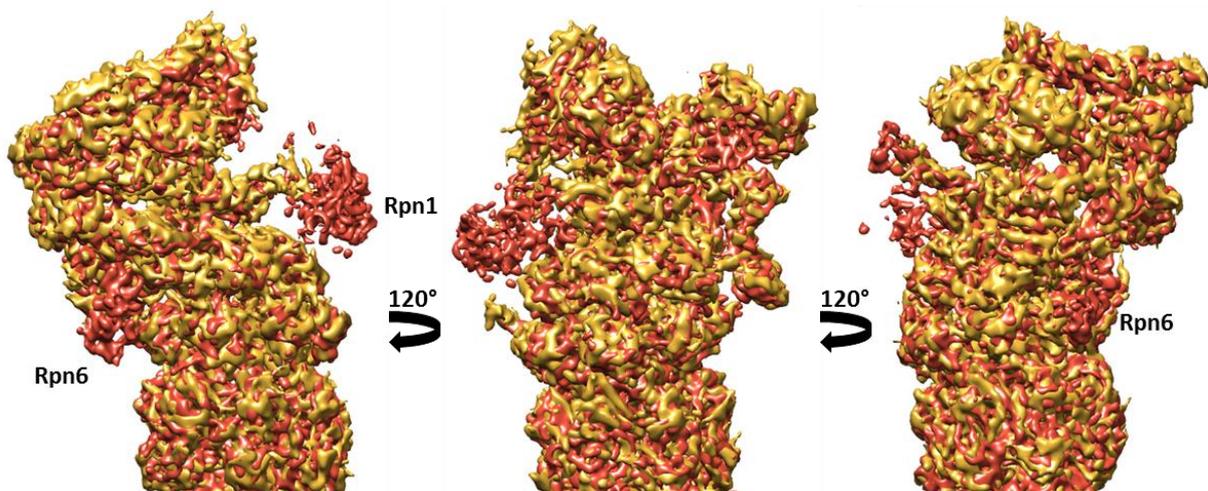


Abbildung 30 Überlagerung der humanen 26S Proteasom-Modelle. Es wurden die gleichen Werte wie in der vorherigen Abbildung 26 verwendet.

Obwohl die Auflösung des roten Modelles in Abb. 30 bei publizierten 7 Å liegt, ist es das einzige Modell in Abbildung 26, bei dem keine Sekundärstrukturelemente zu erkennen sind. Dies dürfte mit drei Gründen zusammenhängen:

- 1.) Die für eine solch hohe Auflösung von 7 Å extrem niedrige Partikelanzahl von ca. 13.000 Partikeln (EMDB-2047) im Vergleich zu den beiden 26S Proteasom-Strukturen aus der Hefe *S.cerevisiae* (Lander et al. 2013):
 - a.) EMDB-1992: 9 Å und 94.000 Partikeln (Lander et al. 2012)
 - b.) EMDB-2594: 7,7 Å und 1.300.000 Partikeln (Unverdorben et al. 2014)
- 2.) Die Überschätzung der Auflösung (Lander et al. 2013). Laut Beck *et al.* soll diese eher im Bereich von 12 Å liegen (Beck et al. 2012).
- 3.) Eine eventuelle nicht-isotropische Verteilung der Partikelorientierungen (Lander et al. 2013). Da Fonseca *et al.* verwendeten in der Probenvorbereitung einen zweiten dünnen Kohlefilm, der zusätzlich zu dem Kohlefilm der Quantifoil® Holey Carbon Grids aufgetragen worden ist (da Fonseca et al. 2012). Dieser bietet zwar den Vorteil, dass man bei einer Proteinkonzentration von nur 150 µg/ml eine brauchbare kryoelektronenmikroskopische 26S Proteasom-Probe hat, doch wirkt sich der Kohlefilm nachweislich limitierend auf die Partikelorientierungen des 26S Proteasoms in Eis aus (Lander et al. 2012).

Der zweite kritisch zu sehende Punkt bei der humanen 26S Proteasom-Struktur von da Fonseca *et al.* ist die Positionierung von Rpn12 innerhalb des *lid*-Komplexes. Obwohl durch Lasker *et al.* (Lasker et al. 2012) und Lander *et al.* (Lander et al. 2012) die Position von Rpn12 eindeutig definiert worden ist, bemängelten da Fonseca *et al.* an beiden Strukturen „Ungenauigkeiten“ (da Fonseca et al. 2012), die ihrer Meinung nach zu einer Fehlpositionierung von Rpn12 führten. Damit versuchten sie die bestehenden und bisher anerkannten Modelle zu korrigieren. Die hier vorgestellte 3D-Rekonstruktion des humanen 26S Proteasoms widerspricht dem Modell von da Fonseca *et al.* und stützt die allgemein akzeptierte 26S Proteasom-Struktur von Lander *et al.* (Lander et al. 2012) und Lasker *et al.* (Lasker et al. 2012). Ein Vergleich der segmentierten Untereinheiten des 26S Proteasoms im S1-Zustand aus der Hefe und des Menschen verdeutlicht dies auf eindrucksvolle Weise (Abb. 31). Die 26S Proteasom-Struktur von da Fonseca *et al.* (da Fonseca et al. 2012) kann deshalb nur bedingt als Vergleichsmodell herangezogen werden.

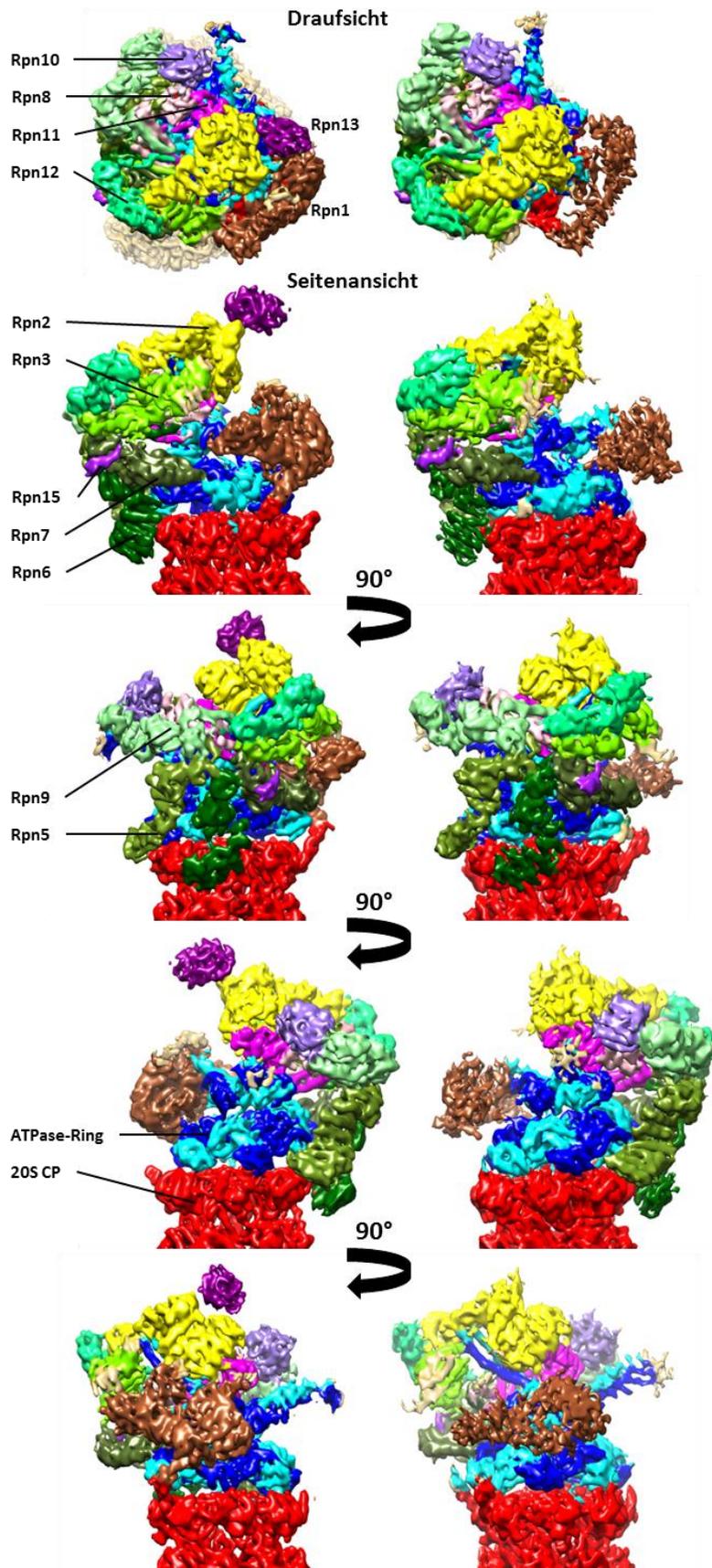


Abbildung 31 Molekulare Architektur des 26S Proteasoms (EMBD-2594, linke Spalte) aus der Hefe im Vergleich zum humanen 26S Proteasom (rechte Spalte). Struktur in der Aufsicht und 4 jeweils um 90° gedrehten Seitenansichten. In beiden Rekonstruktionen sind die Dichten der einzelnen Untereinheiten identisch segmentiert bzw. koloriert.

3D-Klassifikation des humanen 26S Proteasoms

Die Rpn1-Klassifikation zeigt, dass mehr Dynamik in dieser Region herrscht, als das einfache Fehlen von Rpn1 (ca. 23 %, Abb. 24) erklären könnte. In den restlichen Klassen ist Rpn1 präsent, aber nicht wie in der Hefe in einer einzigen Position. So ist deutlich ersichtlich, dass Rpn1 in zwei Konfigurationen vorliegt, einmal in einer „Hoch“- und einmal in einer „Unten“-Konfiguration. Zusammengenommen mit der Klasse „Extramasse“ scheint aber die „Unten“-Position bevorzugt zu sein. Da man davon ausgeht, dass Rpn1 als allgemeine Bindeplattform für diverse PIPs dient, einige davon beladen mit großen polyubiquitinierten Substraten, könnte die „Hoch“- „Unten“-Positionen von Rpn1 mit der Größe der Substrate zusammenhängen. Denkbar wäre auch, dass Rpn1 als eine Art Verteiler für Substrate dient, die, abhängig vom Ubiquitinierungsmuster, entweder Rpn13 („Hoch“-Position von Rpn1) oder Rpn10 („Unten“-Position von Rpn1) geliefert werden. Auch die Klasse „Extramasse“ könnte in diesem Zusammenhang mit dem bindenden Ub-Rezeptoren Rpn13 erklärt werden. In den durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen finden sich jedoch dafür keinerlei Hinweise. Nicht auszuschließen ist, dass es sich bei dieser „Extramasse“ einfach um eine Rpn1- oder Rpn3-Domäne handelt. Über die *coiled-coil*-Strukturen der ATPasen ist Rpn1 höchstwahrscheinlich auch mit dem ATP-Zyklus koordiniert, jedoch in einer bisher noch ungeklärten Weise.

Sehr viel überraschender ist die hohe Flexibilität von Rpn6, die dazu führt, dass die N-terminale Hälfte von Rpn6 in der Rekonstruktion nicht immer vorhanden zu sein scheint. Die Dichte, die dem N-terminalen Bereich von Rpn6 entspricht, kann offenbar aufgrund der hohen Flexibilität (im Vergleich zur Hefe) nicht exakt gemittelt werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde zuvor nur in der Struktur des 26S Proteasoms aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gemacht (Nickell et al. 2009). Auch hier „schmiert“ die Dichte für Rpn6 aus. Die Aufreinigungsstrategie, die sowohl bei der Fruchtfliege als auch für das humane 26S Proteasome zum Einsatz kam, könnte eine mögliche Ursache dafür sein.

Rpn6 wird in der Hefe als Klammer angesehen, welche das 20S Proteasom, den ATPase-Ring und die restlichen Untereinheiten des RPs zusammenhält und so positioniert, dass der Abbau von Substraten stattfinden kann (Pathare et al. 2012). Eventuell kann die Rpn6-Klammer in höheren eukaryotischen Organismen generell und zellspezifisch zur Regulation der Aktivität und zur Anpassung an äußere Umstände durch eventuelle posttranslationale Modifikationen (PTMs) wie Phosphorylierung gelockert werden. Bis heute ist allerdings nur eine Kinase bekannt, die eine solche Phosphorylierung von Rpn6 durchführt (Myeku et al. 2016). Ob die durch Phosphorylierung von Rpn6 gesteigerte 26S Proteasom-Aktivität mit einer Rpn6-Konformationsänderung einhergeht, ist jedoch unklar. Auch ein verändertes PTM-Muster des 20S Proteasoms käme als Ursache für die besondere Rpn6-Konformation in Frage. Eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades der α 7-Untereinheiten des 20S Proteasoms kann die kontrollierte Trennung von 19S RP und 20S CP verursachen (Bose et al. 2004, Day et al. 2013). Durch Oxidation geschädigte Proteine können sehr effizient vom 20S Proteasom in einer ATP- und Ubiquitin-unabhängigen Weise abgebaut werden (Ben-Nissan et al. 2014). Da

rote Blutzellen Sauerstoff transportieren und dadurch *reactive oxygen species* (ROS) ausgesetzt sind, ist es vorstellbar, dass Proteine in Erythrozyten besonders häufig oxidativ geschädigt werden, sofern die Abwehrmaßnahmen wie die enzymatische Umwandlung der O_2^- - und OH-Radikale zu Wasser nicht mehr ausreichend wirken. Durch das Lösen der „Klammer“ wären vermehrt 20S Proteasom-Partikel vorhanden, die oxidativ geschädigte Proteine schneller und effektiver abbauen als das 26S Proteasom. Speziell wenn die Zellen unter oxidativen Stress gelangen, kann sich die Aktivität des 20S Proteasoms durch S-Gluthationylierung innerhalb der α -Ringe erhöhen (Demasi et al. 2014). Ob es dabei aber zu einer kontrollierten Trennung von 19S RP und 20S CP kommt, ist aber noch unklar.

Ausblick

Durch die Fortschritte der Kryo-Elektronenmikroskopie und der Einzelpartikelanalyse ist es heutzutage möglich, Strukturen größer Proteinkomplexe mit fast atomarer Auflösung zu bestimmen. Vor allem durch die Verfügbarkeit und Verwendung hochsensitiver und hochauflösender direkter Elektronendetektoren (DDDs) hat sich die Kryo-EM der Auflösung der Röntgenstrukturanalyse sehr stark angenähert. Gerade instabile, flexible und heterogene Proteinkomplexe wie das 26S Proteasom, die aus vielen verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind, lassen sich nicht kristallisieren und sind für die Röntgenkristallographie unzugänglich. So bleibt zur Strukturbestimmung solcher Proteinkomplexe nur die Kryo-EM. Oft werden die Vorteile beider Methoden in einem integrativen Ansatz kombiniert: Einzelne Untereinheiten der Proteinkomplexe werden kristallisiert und die sich ergebenden hochaufgelösten Strukturen werden anschließend in die Kryo-EM Dichten des Holokomplexes eingepasst. So ist es gelungen, nicht nur den Aufbau des 26S Proteasom zu ermitteln (Bohn et al. 2010, Lasker et al. 2012), sondern auch über Protein-Protein-Interaktionen einzelner benachbarter Untereinheiten den Mechanismus dieses Proteinkomplexes teilweise aufzuklären. Eine weitere Stärke des integrativen Ansatzes ist es zudem, Informationen über nicht-kristallisierbare Proteinuntereinheiten, gewonnen aus der Bioinformatik/*Modelling*, zur Struktur- und Positionsbestimmung zu nutzen. Diese neuen Methoden ergänzen die klassischen biochemischen Methoden (*Pulldowns*, Massenspektrometrie), die üblicherweise zu Protein-Protein-Interaktionsstudien herangezogen werden.

Die neueste Generation von DDDs in Kombination mit immer leistungsfähigeren Software-Paketen für die Datenverarbeitung haben definitiv zu einem Technologiesprung innerhalb der Strukturbiologie mit Hilfe der Kryo-EM geführt (Kuhlbrandt 2014). Man kann gespannt sein, wie weit die Entwicklung von Hochleistungskameras für die EM noch vorangetrieben wird. Vor allem eine deutlichere Geschwindigkeitssteigerung in der Datenaufzeichnung und Prozessierung könnte den Datendurchsatz und die damit verbundene Strukturaufklärung nochmals beschleunigen. Doch der Erfolg elektronenmikroskopischer und strukturbiologischer Untersuchungen hängt unmittelbar mit der Probenpräparation zusammen. Denn nur mit reproduzierbaren, qualitativ hochwertigen und vor allem Artefakt-freien Proben ist ein schnellerer Zugang zu Struktur-Funktionsanalysen überhaupt erst

möglich. Durch optimierte Präparationen könnte das Potential der Datenakquisition und der Datenverarbeitung erst vollständig ausgeschöpft und mögliche Fehlinterpretation verhindert werden.

Es ist nur eine Frage der Zeit, wann die erste hochaufgelöste Struktur des 26S Proteasoms im Bereich von 3-4 Å publiziert wird. Höchstwahrscheinlich wird es sich dabei um das Hefe-Proteasom handeln, da dessen Aufreinigung etabliert und der Komplex bisher am besten biochemisch charakterisiert ist. Dennoch liegt die Schwierigkeit bei der 26S Proteasom-Probenpräparation darin, eine möglichst homogene Probe zu gewinnen. Speziell über Affinitätschromatographie aufgereinigte 26S Proteasom-Proben aus der Hefe zeichnen sich durch Flexibilität in Komposition und Konformation aus. Durch die milde Aufreinigung des 26S Proteasoms aus der Hefe werden transient bindende Proteine wie das PIP Ubp6 mit aufgereinigt. So können 30 % aller 26S Proteasom-Partikel Ubp6 gebunden haben (Aufderheide et al. 2015). Diese Partikel müssten während der Datenprozessierung so klassifiziert werden, dass sie aus dem Gesamtdatensatz herausfallen, um den finalen Datensatz homogener zu machen. Bei den ursprünglicheren Aufreinigungsprotokollen des 26S Proteasoms, die auf konventionellen chromatographischen Methoden beruhen, werden diese nicht-kanonischen Proteine nicht mit aufgereinigt (Chen et al. 2010) oder kommen nur zu 5-10 % in der Probe vor (Abb. 15). Dies schränkt die Variabilität konventionell aufgereinigter Proben erheblich ein. Um die Partikelhomogenität im EM-Datensatz weiter zu erhöhen, muss die konformationelle Flexibilität des 26S Proteasoms reduziert werden. Strukturell liegt diese Art der Flexibilität in dem ATPase-Ring. Hier könnte die Verwendung von ATP- oder ADP-Analoga helfen, bestimmte Konformationszustände der ATPasen zu stabilisieren. So lässt sich beispielsweise der S3-Zustand des 26S Proteasoms durch Austausch von ATP gegen ATPγS erzeugen (Sledz et al. 2013). Die erniedrigte Variabilität der ATPasen könnte sich dann positiv auf die Konformation des gesamten 26S Proteasoms auswirken. Voraussichtlich wird man aber so nicht zu einem reinen ATPase-Zustand gelangen, sondern durch die Verwendung von Nukleotidanaloga nur das Gleichgewicht der Zustände in eine Richtung verschieben. Die Erzeugung eines Hauptkonformers wäre aber dennoch ein großer Fortschritt in Richtung eines homogenen Datensatzes zur Ermittlung einer hochaufgelösten Struktur des 26S Proteasoms, dessen Auflösung am besten unterhalb von 3 Å liegen sollte, damit eine solche Struktur auch zur Untersuchung potenzieller therapeutischer Ansätze genutzt werden kann.

So sehr sich das Vorhandensein der PIPs in der Probe negativ auf die Bestimmung einer hochaufgelösten Struktur des 26S Proteasoms auswirkt, so interessant sind sie aber in Bezug auf den Mechanismus des Substratabbaus. Aus diesem Grund sollte man versuchen, Kryo-EM-Strukturen zu gewinnen, die einzelne PIPs gebunden an das 26S Proteasom zeigen, um so die Bindestellen zu identifizieren, die gleichzeitig über Mutationsstudien bestätigt werden könnten. Zur Identifizierung der Bindestellen wären lediglich Strukturen mit Auflösungen im Bereich von 8 Å nötig. Doch stellt die niedrige Besetzung aller Bindestellen eines bestimmten PIPs in der Probe ein immer wiederkehrendes Problem dar. Durch einen hohen Anteil an

besetzten Bindestellen im 26S Proteasom würde nicht nur die Datenprozessierung erleichtert werden, sondern es wäre auch möglich hochaufgelöste Strukturen dieser Komplexe zu erhalten, die Einblick in die Protein-Protein-Interaktion liefern könnten. Der erfolgreichste biochemische Ansatz zur Gewährleistung einer hohen Besetzungszahl ist vermutlich der *reconstitution assay*, in dem das 26S Proteasom und das betreffende PIP getrennt voneinander aufgereinigt werden und zur Komplexierung in einem kleinen Proteasom/PIP-Verhältnis kombiniert werden (Aufderheide et al. 2015).

Doch nicht nur PIPs alleine sind von großem Interesse, sondern ebenfalls all jene 26S Proteasom-Strukturen, die diesen Komplex bei der Arbeit zeigen. Insbesondere Substrat-Proteasom-Komplexe, die mit ubiquitiniertem Substrat erzeugt worden sind, wären sehr hilfreich, um die Erkennung und den Abbau der Substrate zu studieren. Ein solcher Komplex wurde zwar bereits hergestellt (Matyskiela et al. 2013) und zeigt ein sich im S3-Zustand befindliches 26S Proteasom mit einer kleinen „Substrat-Dichte“ am kleinen Ring der ATPasen, doch ließ sich die Bindung der linearen Ub-Kette an den Ub-Rezeptor nicht detektieren. Ein größerer Datensatz, der eine ausgiebigere Klassifikation erlaubt, als auch die Verwendung verbesserter Elektronendetektoren könnten hier Abhilfe schaffen. Denkbar, wenn aber auch unweigerlich schwieriger, wäre die Komplexierung des ubiquitinierten Substrates mit einem nicht-kanonischen Ubiquitinrezeptor (Rad23, Dsk2, Ddi1) im ersten Schritt. Im anschließenden zweiten Schritt würde dieser Substratkomplex mit dem 26S Proteasom gemischt, um einen Substrat-PIP-26S Proteasom-Komplex zu erhalten. Dieser Ansatz birgt zwei Vorteile: Aufgrund der flexiblen Verknüpfung der N-terminalen UBL-Domäne (Bindung an das 26S Proteasom) mit der C-terminalen UBA-Domäne (Substratbindung) innerhalb der nicht-kanonischen Ub-Rezeptoren würde die Dichte für die UBA-Domäne in der finalen hochaufgelösten Struktur des gesamten Komplexes wahrscheinlich in der Mittellage fehlen, wie im Fall der nicht fixierten *Ubiquitin-Specific Protease* (USP)-Domäne von Ubp6 (Aufderheide et al. 2015). Jedoch könnte die Ub-Kette des Substrates die Bindung der UBA-Domäne des PIPs fixieren und somit zu einer Dichte in der Struktur führen. Zudem könnte man Erkenntnisse gewinnen, welche Kombination von Substrat und Ub-Kette von welchen PIPs ans 26S Proteasom geliefert wird und vor allem, welcher intrinsische Ub-Rezeptor des 26S Proteasoms das entsprechende Substrat übernimmt bzw. bindet.

Ein Feld, das bisher nur selten bearbeitet worden ist, ist das der 26S Proteasom-Regulation. Es gibt zwar genug MS-Daten (Hirano et al. 2015), die zeigen, unter welchen Umständen Untereinheiten co- oder posttranslational modifiziert werden und was die Auswirkungen dieser Modifikationen auf die proteasomale Aktivität sind (Hirano et al. 2015), doch fehlen bisher die entsprechenden hochaufgelösten EM-Strukturen, die die Wirkungsweise dieser PTMs auf molekularer Ebene erklären könnten. Auch aus diesem Grund ist es zwingend erforderlich eine hochaufgelöste Struktur zu bestimmen, bei der die Aminosäuren-Seitenketten ebenso wie potenzielle PTMs zu erkennen sind. Dies wäre der erste Schritt in Richtung einer Referenzstruktur des 26S Proteasoms.

Doch nicht nur PTMs regulieren die proteasomale Aktivität in der Zelle, sondern ebenfalls PIPs wie Ecm29 (Proteasome-associated protein ECM29), das bei oxidativem Stress von Hefe-Zellen zur kontrollierten Dissoziation von 26S Proteasom-Partikeln in 19S RPs und 20S CPs führt (Wang et al. 2010). Hingegen bewirkt posttranslational modifiziertes PI31 (Proteasome Inhibitor PI31) die Bildung von intakten 26S Proteasom-Molekülen aus 19S RPs und 20 CPs in Fruchtfliegen-Embryos oder in Menschenzelllinien (Cho-Park et al. 2013). Hier wären nicht nur die dabei entstehenden Proteinkomplexe Ecm29/19S und PI31/20S interessant für die Strukturanalyse mittels SPA, sondern auch die Lokalisation dieser Komplexe durch die Kryo-Elektronentomographie in ganzen Zellen.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid, Aminosäure
Å	Angstrom
AAA-ATPase	ATPases Associated with diverse cellular Activities
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosine-5'-Triphosphat
CCD	Charge-Coupled Device
CP	Core Particle, Kernkomplex
CP	Kreatinphosphat
CPK	Kreatinphosphat-Kinase
CTF	Contrast Transfer Function, Kontrasübertragungsfunktion
DDD	Direct Detection Device, Direktelektronendetektor
Dme	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DUB	Deubiquitinating enzyme, Deubiquitinierendes Enzym
E1	Ubiquitin activating enzyme, Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin conjugating enzyme, Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin ligase, Ubiquitin-Ligase
eIF3	Eukaryotic translation initiation factor 3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMDB	Electron Microscopy Data Bank
FEG	Field Emission Gun, Feldemissionsquelle
FSC	Fourier Shell Correlation
FT	Fourier Transformation
HbYX	hydrophobic-tyrosine-any amino acid tripeptide, hydrophobisch-Tyrosin-X-Tripeptid

HEK293	Human Embryonic Kidney
Hsa	<i>Homo sapiens</i>
kDa	kilo Dalton
keV	kilo Elektronenvolt
Kryo-EM	Kryo-Elektronenmikroskopie
MDa	Mega Dalton
ML	Maximum-Likelihood
ML3D	Maximum Likelihood 3-Dimensional classification
Mmu	<i>Mus musculus</i>
MS	Massenspektrometrie
MTF	Modulation Transfer Function, Modulationstransferfunktion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAN	Proteasome-Activating Nucleosidase
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Proteasome/Cyclosome
PCI	Proteasome, COP9 Signalosome, eIF3 Translation Initiation Complex
PIP	Proteasome-Interacting Protein
PRU	Pleckstrin-like Receptor for Ubiquitin, Pleckstrin-ähnlicher Rezeptor für Ubiquitin
RP	Regulatory Particle, Regulatorisches Partikel
Rpn	Regulatory Particle Non-ATPase
Rpt	Regulatory Particle Triple A-ATPase
RSMD	Root Mean Square Deviation, mittlere quadratische Abweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
Scv	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Bäckerhefe
SPA	Single particle analysis, Einzelpartikelanalyse
Spo	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S.pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , Spaltheife
Suc-LLVT-AMC	<i>N</i> -Succinyl-Leucyl-Leucyl-Valyl-Tyrosyl-7-Amino-4-Methylcoumarin
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ub	Ubiquitin
UBA	Ubiquitin-Associated Domain, Ubiquitin-assoziierte Domäne
UBL	Ubiquitin-like Domain, Ubiquitin-ähnliche Domäne
Uch	Ubiquitin C-terminal Hydrolase
UIM	Ubiquitin-Interacting Motif, Ubiquitin interagierendes Motiv

UPS
z.B.

Ubiquitin-Proteasom-System, (eng. UPP)
zum Beispiel

Literaturverzeichnis

Asano, S., Y. Fukuda, F. Beck, A. Aufderheide, F. Forster, R. Danev and W. Baumeister (2015). "Proteasomes. A molecular census of 26S proteasomes in intact neurons." Science **347**(6220): 439-442.

Aufderheide, A., F. Beck, F. Stengel, M. Hartwig, A. Schweitzer, G. Pfeifer, A. L. Goldberg, E. Sakata, W. Baumeister and F. Forster (2015). "Structural characterization of the interaction of Ubp6 with the 26S proteasome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**(28): 8626-8631.

Bar-Nun, S. and M. H. Glickman (2012). "Proteasomal AAA-ATPases: structure and function." Biochim Biophys Acta **1823**(1): 67-82.

Barthelme, D. and R. T. Sauer (2012). "Identification of the Cdc48*20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine." Science **337**(6096): 843-846.

Bashore, C., C. M. Dambacher, E. A. Goodall, M. E. Matyskiela, G. C. Lander and A. Martin (2015). "Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome." Nat Struct Mol Biol **22**(9): 712-719.

Baumeister, W., J. Walz, F. Zuhl and E. Seemuller (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." Cell **92**(3): 367-380.

Beck, F., P. Unverdorben, S. Bohn, A. Schweitzer, G. Pfeifer, E. Sakata, S. Nickell, J. M. Plitzko, E. Villa, W. Baumeister and F. Forster (2012). "Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(37): 14870-14875.

Ben-Nissan, G. and M. Sharon (2014). "Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway." Biomolecules **4**(3): 862-884.

Bence, N. F., R. M. Sampat and R. R. Kopito (2001). "Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation." Science **292**(5521): 1552-1555.

Bhattacharyya, S., H. Yu, C. Mim and A. Matouschek (2014). "Regulated protein turnover: snapshots of the proteasome in action." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 122-133.

Bohn, S., F. Beck, E. Sakata, T. Walzthoeni, M. Beck, R. Aebersold, F. Forster, W. Baumeister and S. Nickell (2010). "Structure of the 26S proteasome from *Schizosaccharomyces pombe* at subnanometer resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(49): 20992-20997.

Borissenko, L. and M. Groll (2007). "20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development." Chem Rev **107**(3): 687-717.

Bose, S., F. L. Stratford, K. I. Broadfoot, G. G. Mason and A. J. Rivett (2004). "Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon." Biochem J **378**(Pt 1): 177-184.

Chen, L. and K. Madura (2002). "Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome." Mol Cell Biol **22**(13): 4902-4913.

Chen, X., B. H. Lee, D. Finley and K. J. Walters (2010). "Structure of proteasome ubiquitin receptor hRpn13 and its activation by the scaffolding protein hRpn2." Mol Cell **38**(3): 404-415.

Cheng, Y. (2015). "Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution." Cell **161**(3): 450-457.

Cho-Park, P. F. and H. Steller (2013). "Proteasome regulation by ADP-ribosylation." Cell **153**(3): 614-627.

Cho, H.-J., J.-K. Hyun, J.-G. Kim, H. S. Jeong, H. N. Park, D.-J. You and H. S. Jung (2013). "Measurement of ice thickness on vitreous ice embedded cryo-EM grids: investigation of optimizing condition for visualizing macromolecules." Journal of Analytical Science and Technology **4**(1): 7.

Cook, W. J., L. C. Jeffrey, E. Kaspersek and C. M. Pickart (1994). "Structure of tetraubiquitin shows how multiubiquitin chains can be formed." J Mol Biol **236**(2): 601-609.

Corn, P. G. (2007). "Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma." BMC Biochem **8 Suppl 1**: S4.

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

Crosas, B., J. Hanna, D. S. Kirkpatrick, D. P. Zhang, Y. Tone, N. A. Hathaway, C. Buecker, D. S. Leggett, M. Schmidt, R. W. King, S. P. Gygi and D. Finley (2006). "Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities." Cell **127**(7): 1401-1413.

da Fonseca, P. C., J. He and E. P. Morris (2012). "Molecular model of the human 26S proteasome." Mol Cell **46**(1): 54-66.

Day, S. M., A. Divald, P. Wang, F. Davis, S. Bartolone, R. Jones and S. R. Powell (2013). "Impaired assembly and post-translational regulation of 26S proteasome in human end-stage heart failure." Circ Heart Fail **6**(3): 544-549.

Demasi, M., L. E. Netto, G. M. Silva, A. Hand, C. L. de Oliveira, R. N. Bicev, F. Gozzo, M. H. Barros, J. M. Leme and E. Ohara (2014). "Redox regulation of the proteasome via S-glutathionylation." Redox Biol **2**: 44-51.

Eddins, M. J., R. Varadan, D. Fushman, C. M. Pickart and C. Wolberger (2007). "Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH." J Mol Biol **367**(1): 204-211.

Elsasser, S., D. Chandler-Militello, B. Muller, J. Hanna and D. Finley (2004). "Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome." J Biol Chem **279**(26): 26817-26822.

Elsasser, S., R. R. Gali, M. Schwickart, C. N. Larsen, D. S. Leggett, B. Muller, M. T. Feng, F. Tubing, G. A. Dittmar and D. Finley (2002). "Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains." Nat Cell Biol **4**(9): 725-730.

Finley, D. (2009). "Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome." Annu Rev Biochem **78**: 477-513.

Fishbain, S., S. Prakash, A. Herrig, S. Elsasser and A. Matouschek (2011). "Rad23 escapes degradation because it lacks a proteasome initiation region." Nat Commun **2**: 192.

Funakoshi, M., T. Sasaki, T. Nishimoto and H. Kobayashi (2002). "Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 745-750.

Gillette, T. G., B. Kumar, D. Thompson, C. A. Slaughter and G. N. DeMartino (2008). "Differential roles of the COOH termini of AAA subunits of PA700 (19 S regulator) in asymmetric assembly and activation of the 26 S proteasome." J Biol Chem **283**(46): 31813-31822.

Glickman, M. and O. Coux (2001). "Purification and characterization of proteasomes from *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 21**: Unit 21 25.

Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.

Glynn, S. E., A. R. Nager, T. A. Baker and R. T. Sauer (2012). "Dynamic and static components power unfolding in topologically closed rings of a AAA+ proteolytic machine." Nat Struct Mol Biol **19**(6): 616-622.

Groll, M., M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman and D. Finley (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." Nat Struct Biol **7**(11): 1062-1067.

Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik and R. Huber (1997). "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." Nature **386**(6624): 463-471.

Guterman, A. and M. H. Glickman (2004). "Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome." J Biol Chem **279**(3): 1729-1738.

Hanna, J., N. A. Hathaway, Y. Tone, B. Crosas, S. Elsasser, D. S. Kirkpatrick, D. S. Leggett, S. P. Gygi, R. W. King and D. Finley (2006). "Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation." Cell **127**(1): 99-111.

Hanson, P. I. and S. W. Whiteheart (2005). "AAA+ proteins: have engine, will work." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 519-529.

He, J., K. Kulkarni, P. C. da Fonseca, D. Krutauz, M. H. Glickman, D. Barford and E. P. Morris (2012). "The structure of the 26S proteasome subunit Rpn2 reveals its PC repeat domain as a closed toroid of two concentric alpha-helical rings." Structure **20**(3): 513-521.

- Hershko, A. and A. Ciechanover (1992). "The ubiquitin system for protein degradation." Annu Rev Biochem **61**: 761-807.
- Hinnerwisch, J., W. A. Fenton, K. J. Furtak, G. W. Farr and A. L. Horwich (2005). "Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation." Cell **121**(7): 1029-1041.
- Hinnerwisch, J., B. G. Reid, W. A. Fenton and A. L. Horwich (2005). "Roles of the N-domains of the ClpA unfoldase in binding substrate proteins and in stable complex formation with the ClpP protease." J Biol Chem **280**(49): 40838-40844.
- Hirano, H., Y. Kimura and A. Kimura (2015). "Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome." J Proteomics.
- Hiyama, H., M. Yokoi, C. Masutani, K. Sugawara, T. Maekawa, K. Tanaka, J. H. Hoeijmakers and F. Hanaoka (1999). "Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome." J Biol Chem **274**(39): 28019-28025.
- Hrabe, T., F. Beck and S. Nickell (2012). "Automated particle picking based on correlation peak shape analysis and iterative classification." Int J Med Biol Sci **6**: 1-7.
- Husnjak, K., S. Elsasser, N. Zhang, X. Chen, L. Randles, Y. Shi, K. Hofmann, K. J. Walters, D. Finley and I. Dikic (2008). "Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor." Nature **453**(7194): 481-488.
- Iyer, L. M., D. D. Leipe, E. V. Koonin and L. Aravind (2004). "Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases." J Struct Biol **146**(1-2): 11-31.
- Kaplun, L., R. Tzirkin, A. Bakhrat, N. Shabek, Y. Ivantsiv and D. Raveh (2005). "The DNA damage-inducible UbL-UbA protein Ddi1 participates in Mec1-mediated degradation of Ho endonuclease." Mol Cell Biol **25**(13): 5355-5362.
- Kim, Y. C., A. Snoberger, J. Schupp and D. M. Smith (2015). "ATP binding to neighbouring subunits and intersubunit allosteric coupling underlie proteasomal ATPase function." Nat Commun **6**: 8520.
- Kisselev, A. F., T. N. Akopian and A. L. Goldberg (1998). "Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes." J Biol Chem **273**(4): 1982-1989.
- Knop, M., K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth and E. Schiebel (1999). "Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines." Yeast **15**(10B): 963-972.
- Komander, D. (2009). "The emerging complexity of protein ubiquitination." Biochem Soc Trans **37**(Pt 5): 937-953.
- Kopito, R. R. (1999). "Biosynthesis and degradation of CFTR." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S167-173.

Kuhlbrandt, W. (2014). "Biochemistry. The resolution revolution." Science **343**(6178): 1443-1444.

Lander, G. C., E. Estrin, M. E. Matyskiela, C. Bashore, E. Nogales and A. Martin (2012). "Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle." Nature **482**(7384): 186-191.

Lander, G. C., E. Estrin, M. E. Matyskiela, C. Bashore, E. Nogales and A. Martin (2012). "Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle." Nature **482**(7384): 186-191.

Lander, G. C., A. Martin and E. Nogales (2013). "The proteasome under the microscope: the regulatory particle in focus." Curr Opin Struct Biol **23**(2): 243-251.

Lasker, K., F. Forster, S. Bohn, T. Walzthoeni, E. Villa, P. Unverdorben, F. Beck, R. Aebersold, A. Sali and W. Baumeister (2012). "Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(5): 1380-1387.

Li, X., P. Mooney, S. Zheng, C. R. Booth, M. B. Braunfeld, S. Gubbens, D. A. Agard and Y. Cheng (2013). "Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM." Nat Methods **10**(6): 584-590.

Liu, C. W., X. Li, D. Thompson, K. Wooding, T. L. Chang, Z. Tang, H. Yu, P. J. Thomas and G. N. DeMartino (2006). "ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome." Mol Cell **24**(1): 39-50.

Lottspeich, F. and H. Zorbas (1998). "Bioanalytik, Kapitel 16: Elektronenmikroskopie." Spektrum Akademischer Verlag: 413-449.

Ma, C. P., C. A. Slaughter and G. N. DeMartino (1992). "Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain)." J Biol Chem **267**(15): 10515-10523.

Martin, A., T. A. Baker and R. T. Sauer (2005). "Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines." Nature **437**(7062): 1115-1120.

Matyskiela, M. E., G. C. Lander and A. Martin (2013). "Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation." Nat Struct Mol Biol **20**(7): 781-788.

Meyer, H., M. Bug and S. Bremer (2012). "Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system." Nat Cell Biol **14**(2): 117-123.

Mindell, J. A. and N. Grigorieff (2003). "Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy." J Struct Biol **142**(3): 334-347.

Myeku, N., C. L. Clelland, S. Emrani, N. V. Kukushkin, W. H. Yu, A. L. Goldberg and K. E. Duff (2016). "Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling." Nat Med **22**(1): 46-53.

Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge and E. V. Koonin (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." Genome Res **9**(1): 27-43.

Nickell, S., F. Beck, S. H. Scheres, A. Korinek, F. Forster, K. Lasker, O. Mihalache, N. Sun, I. Nagy, A. Sali, J. M. Plitzko, J. M. Carazo, M. Mann and W. Baumeister (2009). "Insights into the molecular architecture of the 26S proteasome." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(29): 11943-11947.

Nickell, S., F. Forster, A. Linaroudis, W. D. Net, F. Beck, R. Hegerl, W. Baumeister and J. M. Plitzko (2005). "TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography." J Struct Biol **149**(3): 227-234.

Nogales, E. and S. H. Scheres (2015). "Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity." Mol Cell **58**(4): 677-689.

Nussbaum, A. K., T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanovic, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee and H. Schild (1998). "Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12504-12509.

Ortega, J., J. B. Heymann, A. V. Kajava, V. Ustrell, M. Rechsteiner and A. C. Steven (2005). "The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator." J Mol Biol **346**(5): 1221-1227.

Pathare, G. R., I. Nagy, S. Bohn, P. Unverdorben, A. Hubert, R. Korner, S. Nickell, K. Lasker, A. Sali, T. Tamura, T. Nishioka, F. Forster, W. Baumeister and A. Bracher (2012). "The proteasomal subunit Rpn6 is a molecular clamp holding the core and regulatory subcomplexes together." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(1): 149-154.

Pathare, G. R., I. Nagy, P. Sledz, D. J. Anderson, H. J. Zhou, E. Pardon, J. Steyaert, F. Forster, A. Bracher and W. Baumeister (2014). "Crystal structure of the proteasomal deubiquitylation module Rpn8-Rpn11." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(8): 2984-2989.

Penczek, P. A., J. Frank and C. M. Spahn (2006). "A method of focused classification, based on the bootstrap 3D variance analysis, and its application to EF-G-dependent translocation." J Struct Biol **154**(2): 184-194.

Penczek, P. A., R. A. Grassucci and J. Frank (1994). "The ribosome at improved resolution: new techniques for merging and orientation refinement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles." Ultramicroscopy **53**(3): 251-270.

Penczek, P. A., C. Yang, J. Frank and C. M. Spahn (2006). "Estimation of variance in single-particle reconstruction using the bootstrap technique." J Struct Biol **154**(2): 168-183.

Peters, J. M., Z. Cejka, J. R. Harris, J. A. Kleinschmidt and W. Baumeister (1993). "Structural features of the 26 S proteasome complex." J Mol Biol **234**(4): 932-937.

Pickart, C. M. and R. E. Cohen (2004). "Proteasomes and their kin: proteases in the machine age." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(3): 177-187.

- Rabl, J., D. M. Smith, Y. Yu, S. C. Chang, A. L. Goldberg and Y. Cheng (2008). "Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases." Mol Cell **30**(3): 360-368.
- Rechsteiner, M. and C. P. Hill (2005). "Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors." Trends Cell Biol **15**(1): 27-33.
- Riedinger, C., J. Boehringer, J. F. Trempe, E. D. Lowe, N. R. Brown, K. Gehring, M. E. Noble, C. Gordon and J. A. Endicott (2010). "Structure of Rpn10 and its interactions with polyubiquitin chains and the proteasome subunit Rpn12." J Biol Chem **285**(44): 33992-34003.
- Saeki, Y., T. Sone, A. Toh-e and H. Yokosawa (2002). "Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome." Biochem Biophys Res Commun **296**(4): 813-819.
- Sakata, E., S. Bohn, O. Mihalache, P. Kiss, F. Beck, I. Nagy, S. Nickell, K. Tanaka, Y. Saeki, F. Forster and W. Baumeister (2012). "Localization of the proteasomal ubiquitin receptors Rpn10 and Rpn13 by electron cryomicroscopy." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**(5): 1479-1484.
- Scheres, S. H. (2012). "A Bayesian view on cryo-EM structure determination." J Mol Biol **415**(2): 406-418.
- Scheres, S. H. (2012). "RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination." J Struct Biol **180**(3): 519-530.
- Scheres, S. H., H. Gao, M. Valle, G. T. Herman, P. P. Eggermont, J. Frank and J. M. Carazo (2007). "Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization." Nat Methods **4**(1): 27-29.
- Scheres, S. H. W., R. Nunez-Ramirez, C. O. S. Sorzano, J. M. Carazo and R. Marabini (2008). "Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP." Nature Protocols **3**(6): 977-990.
- Schreiner, P., X. Chen, K. Husnjak, L. Randles, N. Zhang, S. Elsassner, D. Finley, I. Dikic, K. J. Walters and M. Groll (2008). "Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction." Nature **453**(7194): 548-552.
- Schwanhausser, B., D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen and M. Selbach (2011). "Global quantification of mammalian gene expression control." Nature **473**(7347): 337-342.
- Schweikert, G. (2004). "Quantitativer Vergleich der Strahlschädigung biologischer Proben im Transmissions-Elektronenmikroskop bei Stickstoff- und Helium-Temperatur." Diplomarbeit, MPI für Biochemie.
- Seemuller, E., A. Lupas, D. Stock, J. Lowe, R. Huber and W. Baumeister (1995). "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease." Science **268**(5210): 579-582.
- Sigworth, F. J., P. C. Doerschuk, J. M. Carazo and S. H. Scheres (2010). "An introduction to maximum-likelihood methods in cryo-EM." Methods Enzymol **482**: 263-294.

- Sledz, P., P. Unverdorben, F. Beck, G. Pfeifer, A. Schweitzer, F. Forster and W. Baumeister (2013). "Structure of the 26S proteasome with ATP-gammaS bound provides insights into the mechanism of nucleotide-dependent substrate translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(18): 7264-7269.
- Smith, D. M., S. C. Chang, S. Park, D. Finley, Y. Cheng and A. L. Goldberg (2007). "Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry." Mol Cell **27**(5): 731-744.
- Smits, A. H., P. W. Jansen, I. Poser, A. A. Hyman and M. Vermeulen (2013). "Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics." Nucleic Acids Res **41**(1): e28.
- Stadtmueller, B. M. and C. P. Hill (2011). "Proteasome activators." Mol Cell **41**(1): 8-19.
- Stahlberg, H. (2012). "CTF-simul-simple.xls " Center for Cellular Imaging and NanoAnalytics <http://www.c-cina.unibas.ch/download/ctf-simulation>.
- Toyoshima, C. and N. Unwin (1988). "Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: determination from pairs of defocused images." Ultramicroscopy **25**(4): 279-291.
- Unno, M., T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka and T. Tsukihara (2002). "The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution." Structure **10**(5): 609-618.
- Unverdorben, P. (2014). "Pseudo-atomare Interpretation von Konformationsänderungen des 26S Proteasoms nach Klassifizierung von Kryo-Elektronenmikroskopie-Daten." Dissertation, MPI für Biochemie.
- Unverdorben, P., F. Beck, P. Sledz, A. Schweitzer, G. Pfeifer, J. M. Plitzko, W. Baumeister and F. Forster (2014). "Deep classification of a large cryo-EM dataset defines the conformational landscape of the 26S proteasome." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(15): 5544-5549.
- Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, 3rd, E. V. Koonin and R. J. Deshaies (2002). "Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome." Science **298**(5593): 611-615.
- Voges, D., P. Zwickl and W. Baumeister (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." Annu Rev Biochem **68**: 1015-1068.
- Walters, K. J., M. F. Kleijnen, A. M. Goh, G. Wagner and P. M. Howley (2002). "Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a." Biochemistry **41**(6): 1767-1777.
- Walz, J., A. Erdmann, M. Kania, D. Typke, A. J. Koster and W. Baumeister (1998). "26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy." J Struct Biol **121**(1): 19-29.

- Wang, J., J. J. Song, M. C. Franklin, S. Kamtekar, Y. J. Im, S. H. Rho, I. S. Seong, C. S. Lee, C. H. Chung and S. H. Eom (2001). "Crystal structures of the HslVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism." Structure **9**(2): 177-184.
- Wang, Q., P. Young and K. J. Walters (2005). "Structure of S5a bound to monoubiquitin provides a model for polyubiquitin recognition." J Mol Biol **348**(3): 727-739.
- Wang, X., C. F. Chen, P. R. Baker, P. L. Chen, P. Kaiser and L. Huang (2007). "Mass spectrometric characterization of the affinity-purified human 26S proteasome complex." Biochemistry **46**(11): 3553-3565.
- Wang, X., J. Yen, P. Kaiser and L. Huang (2010). "Regulation of the 26S proteasome complex during oxidative stress." Sci Signal **3**(151): ra88.
- Whitby, F. G., E. I. Masters, L. Kramer, J. R. Knowlton, Y. Yao, C. C. Wang and C. P. Hill (2000). "Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators." Nature **408**(6808): 115-120.
- Worden, E. J., C. Padovani and A. Martin (2014). "Structure of the Rpn11-Rpn8 dimer reveals mechanisms of substrate deubiquitination during proteasomal degradation." Nat Struct Mol Biol **21**(3): 220-227.
- Yao, T. and R. E. Cohen (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." Nature **419**(6905): 403-407.
- Zhang, F., M. Hu, G. Tian, P. Zhang, D. Finley, P. D. Jeffrey and Y. Shi (2009). "Structural insights into the regulatory particle of the proteasome from *Methanocaldococcus jannaschii*." Mol Cell **34**(4): 473-484.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Molekulare Strukturbiologie des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried bei München angefertigt. Generell mochte ich mich bei allen Mitarbeiter des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich aber bei folgenden Personen:

Prof. Dr. Baumeister für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Dr. Friedrich Förster für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit, sowie für die Hilfestellung in Bezug auf Datenprozessoren- und -interpretation.

Florian Beck und Antje Aufderheide für die Datenprozessoren und Einweisung in Chimera.

Günter Pfeifer und Oana Michalache für die Unterstützung in der Probenpräparation.

Dr. Eri Sakata, Dr. Istvan Nagy, Dr. Stephan Nickell und Dr. Jürgen Plitzko für praktische Ratschläge innerhalb der Biochemie sowie der Elektronenmikroskopie.

Dr. Jürgen Plitzko, Dr. Jürgen Peters, Dr. Harald Engelhardt für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Inga Wolf, Birgit Book und Nathalie Leclercq für die Hilfe bei Computerproblemen und organisatorischen Angelegenheiten.