

# **Biochemische und elektronenkristallographische Untersuchungen an Membranproteinen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Jens Dietrich

aus Opladen

Frankfurt, 2001

(D F 1)

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Engels

Gutachter: Prof. Dr. Werner Kühlbrandt

Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation: 30. Oktober 2001



# Biochemische und elektronenkristallographische Untersuchungen an Membranproteinen

Reinigung und 2D-Kristallisation von hochaktivem  
Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex aus Spinat,

2D-Kristallisation an detergentstabilen Lipid-  
Einzelschichten und Erstellung eines Homologiemodells  
von P-Typ H<sup>+</sup>-ATPasen.

## Veröffentlichungen:

**Dietrich, J.** & Kühlbrandt, W. (1999) "Purification and two-dimensional crystallization of highly active cytochrome b(6)f complex from spinach." FEBS Letters **463**(1-2): 97-102.

Lebeau, L.; Lach, F.; Vénien-Bryan, C.; Renault, A.; **Dietrich, J.**; Jahn, T.; Palmgren, M. G.; Kühlbrandt, W. & Mioskowski, C. (2001) "Two-dimensional crystallization of a membrane protein on a detergent-resistant lipid monolayer." J. Mol. Biol. **308**(4): 639-47.

Jahn, T.; **Dietrich, J.**; Andersen, B.; Leidvik, B.; Otter, C.; Briving, C.; Kühlbrandt, W. & Palmgren, M. G. (2001) "Large Scale Expression, Purification and 2D Crystallization of Recombinant Plant Plasma Membrane H(+)-ATPase." J. Mol. Biol. **309**(2): 465-476.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 MEMBRANPROTEINE</b>	<b>1</b>
1.1.1 CYTOCHROM $B_6F$	3
1.1.2 $H^+$ -ATPASE	8
1.1.3 DIE $H^+$ -ATPASE AUS <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	11
1.1.4 VORLIEGENDE STRUKTUREN VON P-TYP-ATPASEN	12
<b>1.2 2D-KRISTALLISATION</b>	<b>14</b>
1.2.1 OBERFLÄCHENKRISTALLISATION	17
1.2.2 KRYO-ELEKTRONENMIKROSKOPIE	20
1.2.3 BILDVERARBEITUNG	23
1.2.4 MODELLING	24
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>2.1 CYTOCHROM <math>B_6F</math></b>	<b>26</b>
2.1.1 PROTEINREINIGUNG	26
2.1.2 AKTIVITÄTSTEST	28
2.1.3 REINIGUNG VON PLASTOCYANIN AUS SPINAT	29
2.1.4 REDUKTION VON DECYLPLASTOCHINON	30
2.1.5 2D-KRISTALLISATION	30
<b>2.2 <math>H^+</math>-ATPASE</b>	<b>31</b>
2.2.1 2D-KRISTALLISATION	31
2.2.1.1 Rekonstitution	31
2.2.1.2 Oberflächenkristallisation	32
<b>2.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE</b>	<b>32</b>
2.3.1 PROBENVORBEREITUNG	32
2.3.2 CYTOCHROM $B_6F$	33
2.3.3 REKONSTITUTION DER $H^+$ -ATPASE	33
2.3.4 OBERFLÄCHENKRISTALLISATION DER $H^+$ -ATPASE	33
<b>2.4 BILDVERARBEITUNG</b>	<b>34</b>
<b>2.5 MODELL</b>	<b>37</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>3.1 CYTOCHROM <math>B_6F</math></b>	<b>39</b>
3.1.1 PROTEINREINIGUNG	39
3.1.2 SPEKTROSKOPIE	41
3.1.3 AKTIVITÄTSTEST	42
3.1.4 2D-KRISTALLISATION	43
<b>3.2 <math>H^+</math>-ATPASE</b>	<b>47</b>
3.2.1 KRISTALLISATION DURCH REKONSTITUTION	47
3.2.2 OBERFLÄCHENKRISTALLISATION	52
3.2.3 PROJEKTIONSDICHTEKARTEN	58
<b>3.3 MODELLING</b>	<b>61</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>4.1 CYTOCHROM <math>B_6F</math></b>	<b>65</b>
4.1.1 PROTEINREINIGUNG	65
4.1.2 SPEKTROSKOPIE	65
4.1.3 AKTIVITÄTSTEST	66
4.1.4 2D-KRISTALLISATION	67

<b>4.2</b>	<b>H<sup>+</sup>-ATPASE</b>	<b>71</b>
4.2.1	KRISTALLISATION DURCH REKONSTITUTION	71
4.2.2	OBERFLÄCHENKRISTALLISATION	72
4.2.3	PROJEKTIONSDICHTEKARTEN	79
<b>4.3</b>	<b>MODELLING</b>	<b>82</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>84</b>
<hr/>		
<b>5.1</b>	<b>CYTOCHROM B<sub>6</sub>F KOMPLEX</b>	<b>84</b>
<b>5.2</b>	<b>H<sup>+</sup>-ATPASE</b>	<b>84</b>
<b>5.3</b>	<b>ABSTRACT IN ENGLISH</b>	<b>86</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>88</b>
<hr/>		
<b>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>		<b>104</b>
<hr/>		
<b>8. LEBENSLAUF</b>		<b>106</b>
<hr/>		

# 1. Einleitung

## 1.1 Membranproteine

Biologische Membranen bestehen einheitlich aus einer kontinuierlichen Lipiddoppelschicht, in die Membranproteine eingebettet sind. Die Funktion von Membranen ist allerdings vielfältig und wird vor allem durch die Proteinzusammensetzung bestimmt. Die Proteinmengen in verschiedenen Membrantypen sind sehr unterschiedlich. So schwankt der Proteinmassenanteil von 25% in Myelinmembranen (Isolation der Nervenzell-Axone) bis zu 75% in der Chloroplastenthylakoidmembran.

Membranen haben die Aufgabe, Zellen und Organellen voneinander abzugrenzen und zu isolieren. Carrierproteine, energieabhängige Transportsysteme und Poren ermöglichen einen kontrollierten Stofftransport, d. h. das Konstanthalten von Stoffkonzentrationen und physiologischen Parametern, die Homöostase. Auch bei der Aufnahme und Weiterleitung von Signalen kommt den Membranen und ihren Proteinen eine entscheidende Rolle zu. In Nervenzellen sorgt die durch Schwannsche Zellen gebildete Markscheide für eine hervorragende elektrische Isolation der Axone und garantiert so eine schnelle Signalweiterleitung. Synapsen hingegen sind hochspezialisierte Kontaktstellen zwischen Neuronen bzw. zwischen Neuronen und Muskelzellen. Vermittelt durch Neurotransmitter und Rezeptoren wird das Signal von Zelle zu Zelle weitergeleitet. Signale, die ins Zellinnere gelangen sollen, werden meist über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt, die bei höheren Organismen bis zu 1 % des Genoms ausmachen (Herz *et al.*, 1997).

Viele Membranen sind der Ort für wichtige enzymatische Reaktionen. Insbesondere sind hier auch Reaktionen mit unpolaren Substraten möglich, wie zum Beispiel die Biosynthese von Lipiden im glatten endoplasmatischen Retikulum. Die wichtigsten Reaktionen der Energieumwandlung, wie die oxidative Phosphorylierung und die Photosynthese sind in den stark aufgefalteten inneren Membranen von Mitochondrien bzw. den Thylakoidmembranen der Chloroplasten lokalisiert, die sehr dicht gepackt mit Membranproteinen sind, um diese Aufgabe zu erfüllen.

Membranen bieten mit ihren Proteinen Verankerungspunkte des Cytoskeletts und tragen zum Erhalt der Zell- bzw. Organellgestalt bei; sie ermöglichen zelluläre Bewegungsvorgänge. Auch der Kontakt und Austausch zwischen benachbarten Zellen wird über spezielle Proteinkontaktstellen vermittelt, den Gap-Junctions.

Ihre Lokalisation in einer Lipiddoppelschicht erfordert, dass Membranproteine sowohl hydrophobe als auch hydrophile Oberflächen besitzen. Darum sind sie nicht in wässrigen Puffern löslich, sondern benötigen die Anwesenheit von Detergenzien, welche die hydrophoben Bereiche maskieren.

Betrachtet man die Vielfalt und Bedeutung der von Membranproteinen erfüllten Aufgaben, so verwundert es nicht, dass sie der Angriffspunkt für die Mehrheit aller gebräuchlichen Medikamente sind. Strukturelle Informationen sind notwendig, um eine Vielzahl von grundlegenden biologischen Abläufen zu verstehen, aber auch um neue Ansatzpunkte für neuartige Wirkstoffe zu finden.

Ungefähr ein Viertel aller Gen-Produkte in höheren Eukaryonten sind Membranproteine (Frishman & Mewes, 1997). Im Gegensatz zur Bedeutung dieser Klasse von Proteinen hinkt das Wissen um ihre Struktur weit hinter den wasserlöslichen Proteinen her. Die PDB-Datenbank enthält inzwischen ungefähr 14.000 Strukturen von löslichen Proteinen, wohingegen weniger als 40 hochauflösende Strukturen von Membranproteinen bekannt sind, wobei nur 22 nicht verwandte Proteine vorhanden sind.

Die meisten Membranproteine, von denen auswertbare Kristalle existieren, sind in der Natur gut verfügbar. Davon gehört die Hälfte der Klasse der  $\beta$ -Faltblatt-Proteine an, obwohl die große Mehrheit der Membranproteine ein  $\alpha$ -Helix-Bündel als Transmembranbereich aufweisen dürfte. Von den  $\alpha$ -helikalen Transmembranproteinen, für die eine Struktur zur Verfügung steht, haben fast alle eine prosthetische Gruppe, was sicherlich nicht repräsentativ für diese Proteinklasse ist (Jones, 1998).

Das erste Membranprotein, dessen Sekundärstruktur aufgeklärt werden konnte, war das Bakteriorhodopsin aus dem Archaeobakterium *Halobacterium halobium* (heutiger Name: *Halobacterium salinarum*) (Henderson & Unwin, 1975). Die erste atomare Röntgenstruktur

konnte 1985 vom photosynthetischen Reaktionszentrum aus *Rhodospseudomonas viridis* gelöst werden (Deisenhofer *et al.*, 1985), gefolgt von einer Struktur des gleichen Proteins aus *Rhodobacter sphaeroides* (Allen *et al.*, 1987). Die nächste atomare Struktur wurde unter Verwendung der Elektronenkristallographie für natürlich vorkommende 2D-Kristalle von Bakteriorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* erstellt (Henderson *et al.*, 1990). Darauf folgten die Strukturen zweier Porine aus *Rhodobacter capsulatus* (Weiss *et al.*, 1991) und *E. coli* (Cowan *et al.*, 1992), bis schließlich die Struktur des ersten eukaryontischen Membranproteins, des Lichtsammelkomplex LHC II aus Erbse, gelöst wurde (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Ein weiterer Meilenstein war die Strukturaufklärung von großen Komplexen mit vielen Untereinheiten, wie die Cytochrom *c* Oxidase (Tsukihara *et al.*, 1996), der Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex (Xia *et al.*, 1997a) und die Fumarat-Reduktase (Iverson *et al.*, 1999; Lancaster *et al.*, 1999), . Kürzlich wurde mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vom sarkoplasmatischen Retikulum aus Kaninchen (Toyoshima *et al.*, 2000) auch die Struktur einer P-Typ-ATPase publiziert, die verwandt ist mit der in dieser Arbeit untersuchten Protonen-ATPase ( $\text{H}^+$ -ATPase).

Neben den Transmembranproteinen gibt es auch noch periphere Membranproteine, die in der Membran verankert sind, sie aber nicht komplett durchqueren. In dieser Klasse von Proteinen steht nur für die Prostaglandin H<sub>2</sub> Synthase-1 (Picot *et al.*, 1994), die Cyclooxygenase-2 (Kurumbail *et al.*, 1996) und die Squalen Zyklase (Wendt *et al.*, 1997) eine hochauflösende Struktur zur Verfügung.

Neben den atomaren Strukturen gibt es eine Vielzahl von Proteinen, für die eine 3D-Struktur bei geringerer Auflösung vorliegt. Auch diese Informationen sind für das Verständnis der Funktionsweise dieser Proteine ein wichtiger Beitrag.

### **1.1.1 Cytochrom *b<sub>6</sub>f***

Bei oxygenen Organismen von Cyanobakterien bis zu höheren Pflanzen stellt der photosynthetische Elektronentransport Energieäquivalente in Form von ATP und Redoxäquivalente in Form von NADPH für die verschiedenen Assimilationsvorgänge zur Verfügung. Die Thylakoidmembran der Chloroplasten enthält drei wichtige Komplexe, die dem Elektronentransport dienen. Der Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex (Plastochinol:Plastocyanin Oxidoreduktase) vermittelt dabei den Elektronentransport zwischen Photosystem II und

Photosystem I mittels beweglicher Komponenten, entweder über Plastochinol zu Plastocyanin oder im zyklischen Elektronentransport um das Photosystem I über Ferredoxin zu Plastocyanin. Der Komplex fungiert als Recycling-Maschine, der die Wechselwirkung eines 2-Elektronen Carriers (Plastohydrochinon,  $\text{PQH}_2$ ) mit einem 1-Elektronen Carrier (Eisen-Schwefel-Zentrum, Rieske-Protein) ermöglicht. Dies ist so zu verstehen, dass nur immer ein Elektron des Plastohydrochinons auf den Akzeptor Plastocyanin übertragen wird. Das andere Elektron wird über das Cytochrom  $b_6$  wieder auf ein anderes Chinon zurückübertragen und später erneut in den Komplex eingespeist.

### Q-Zyklus

Der „Q-Zyklus“ wurde zuerst von Mitchell (Mitchell, 1975) für den äquivalenten Cytochrom  $bc_1$  Komplex aus Mitochondrien vorgeschlagen und später von Crofts modifiziert (Crofts *et al.*, 1983). Der Q-Zyklus bewirkt, dass sich die Menge der pro Elektron transportierten Protonen verdoppelt (Abb. 1). Dazu wird die Hydrochinon-Oxidation in zwei Schritte aufgeteilt: Nach Bindung des Plastohydrochinons an der luminal gelegenen  $Q_0$ -Bindungsstelle des Cytochrom  $b_6$  Komplexes wird es vom Eisen-Schwefel-Zentrum der Rieske-Untereinheit zum Semichinon oxidiert. Das Rieske-Zentrum wird durch Cytochrom  $f$  oxidiert, und das Elektron fließt weiter zum peripher angedockten Plastocyanin und verlässt den Komplex. Das Proton wird in den Lumenraum abgegeben und das Semichinon von der luminal gelegenen Hämgruppe des Cytochrom  $b_6$  zum Plastochinon (PQ) oxidiert. Damit sind beide Elektronen des Plastohydrochinons in den Komplex eingespeist. Letzteres wird aber wieder auf der Matrixseite auf ein Plastochinon zurückübertragen. Dazu gibt die Hämgruppe ihr Elektron an die an der Matrixseite liegende zweite Hämgruppe ab. Dort wird das Elektron an der zweiten Chinonbindungsstelle ( $Q_i$ -site) auf ein Plastochinon übertragen, wobei ein Proton aus dem Matrixraum aufgenommen wird. In einer zweiten Runde wird dann ein Plastohydrochinon gebildet, welches wieder auf die andere Membranseite wandert und in gleicher Weise seine zwei Elektronen in den Komplex einspeist.

Durch die Rückbildung des Hydrochinons werden sequentiell zwei Protonen von der Matrixseite aufgenommen. Dadurch werden beim Transport von vier Elektronen insgesamt acht Protonen in das Lumen befördert. Der Q-Zyklus scheint im photosynthetischen System

nicht obligatorisch zu sein, wie es in der Bakterienphotosynthese oder der Atmung der Fall ist, sondern er wird vermutlich bei hohem Protonenpotential im Lumen abgeschaltet. Dann wäre an der Oxidation des Plastohydrochinons nur die luminal Hämgruppe des Cytochrom  $b_6$  beteiligt.

Der Elektronentransport ist also an die Translokation von Protonen über die Thylakoidmembran hinweg gekoppelt und trägt so zur Bildung eines elektrochemischen Protonengradienten bei, der von der ATP-Synthase der Chloroplasten zur Herstellung von ATP genutzt wird.

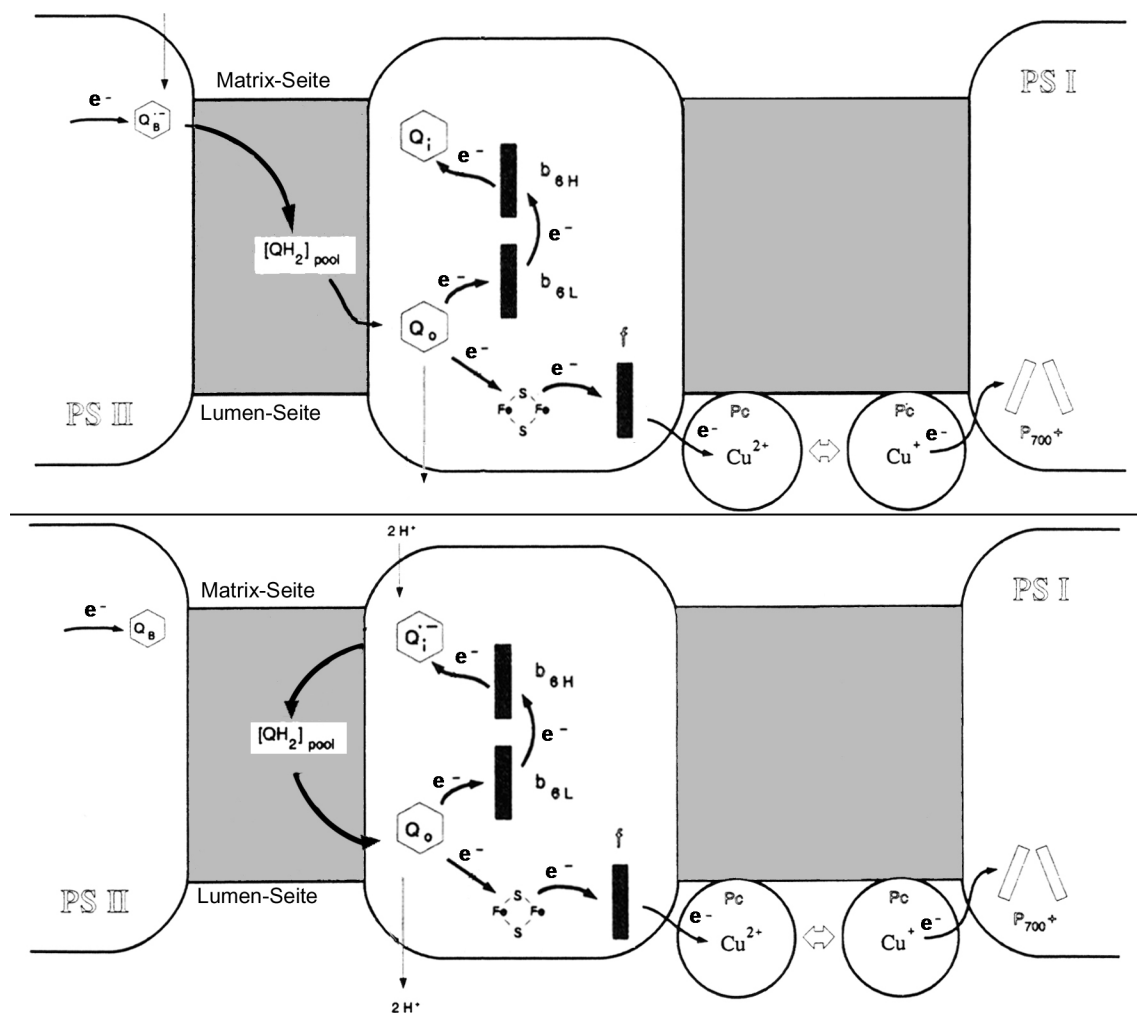


Abb. 1: Der Q-Zyklus in Chloroplasten. Das Schema zeigt den Cytochrom  $b_6/f$  Komplex umgeben von Photosystem II (links) bzw. Photosystem I (rechts). Plastochinon bzw. Plastocyanin stellen jeweils eine mobile Verbindung zwischen den Photosystemen und dem  $b_6/f$  Komplex her. Der obere und untere Teil des Schemas zeigen jeweils eine Hälfte eines



kompletten Umsatzes zweier Elektronen. Sechsecke markieren Bindungsstellen für Plastochinol. Die Tetraporphyrine der Häme und des Chlorophylldimers P700 im Photosystem II sind durch Rechtecke gekennzeichnet. Das Rieske-Protein ist durch sein Eisen-Schwefel-Zentrum ( $2Fe2S$ ) gekennzeichnet. Pc steht für Plastocyanin,  $f$  für Cytochrom  $f$  und  $b_{6L}$  bzw.  $b_{6H}$  stehen für die luminale bzw. zur Matrix gelegene Hämgruppe des Cytochrom  $b_6$ . Modifiziert aus (Hauska *et al.*, 1996).

## Untereinheiten

Der Komplex besteht aus mindestens sieben Untereinheiten, vier davon wird eine genaue Funktion zugeordnet. Die größte Untereinheit ist das Cytochrom  $f$  ( $M_w = 31,372$  kDa, 285 Aminosäuren, alle Angaben für das Protein aus Spinat (Cramer *et al.*, 1994)) mit einem kovalent gebundenen  $c$ -Typ Cytochrom. Es besitzt die Bindungsstelle für den Elektronenakzeptor Plastocyanin. Nur eine Aminosäurekette durchdringt die Membran und bildet so einen Anker. Das Häm  $c$  als funktionelle Gruppe befindet sich auf der Lumenseite, wie auch das Rieske-Protein. Von einem 252 Aminosäurereste langen, löslichen Fragment des Cytochrom  $f$ , bei dem die Transmembranhelix nicht vorhanden ist, steht eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von  $1,96 \text{ \AA}$  zur Verfügung (Martinez *et al.*, 1996). Besonders interessant ist dabei, dass die Struktur des Cytochrom  $f$  keine Homologie mit dem funktionellen Äquivalent Cytochrom  $c_1$  aus dem  $bc_1$  Komplex aufweist. Das Protein besteht aus zwei Domänen, deren Sekundärstruktur vorwiegend von  $\beta$ -Faltblatt bestimmt ist, wobei das Häm an der größeren Domäne kovalent gebunden ist. Ein Kluster von basischen Aminosäuren an der Grenze der beiden Domänen ist vermutlich für die Bindung von Plastocyanin wichtig (Martinez *et al.*, 1994).

Die Cytochrom  $b_6$  Untereinheit ( $M_w = 24,038$  kDa, 214 Aminosäuren) hat zwei nicht-kovalent gebundene  $b$ -Häme. Sie haben ein unterschiedliches Redoxpotential und spielen eine entscheidende Rolle im Q-Zyklus.

Die Untereinheit IV ( $M_w = 17,444$  kDa, 160 Aminosäuren) besitzt keine prosthetische Gruppe und ist an der Bindung des Elektronendonors Plastochinon beteiligt. Aufgrund von Sequenzhomologien kann man davon ausgehen, dass das Cytochrom  $b_6$  und die Untereinheit IV im Cytochrom  $bc_1$  Komplex als eine einzelne Untereinheit vorliegen (Cytochrom  $b$ ), wobei die korrespondierende, essentielle Transmembranhelix 8 des Cytochrom  $b$  in der Untereinheit IV fehlt (DiRago, 1996; Martinez *et al.*, 1994).

Das Rieske-Protein ( $M_w = 18,922$  kDa, 180 Aminosäuren) verfügt über einen luminal gelegenen Eisen-Schwefel-Komplex und ist nach J. S. Rieske benannt, der zuerst das Äquivalent im Cytochrom  $bc_1$ -Komplex von Mitochondrien entdeckt hat (Rieske *et al.*, 1964). Es fungiert als Elektronendonator für Cytochrom  $f$ . Es ist nicht abschließend geklärt, ob das Rieske-Protein eine Transmembranhelix besitzt, oder ob es ein extrinsisches Protein ist. Zwar widersteht es einer Extraktion aus der Membran durch alkalische Behandlung oder hohe Salzkonzentrationen, was untypisch für ein extrinsisches Protein ist, aber es wird von chaotropen Verbindungen leicht herausgelöst, was für Transmembranproteine normalerweise nicht der Fall ist (Breyton *et al.*, 1994). Ein atomares Modell der Extramembrandomäne ist bekannt und zeigt eine enge strukturelle Verwandtschaft zum Rieske-Protein aus dem Cytochrom  $bc_1$  Komplex (Carrell *et al.*, 1997).

Die drei letztgenannten Untereinheiten spielen eine Rolle in der Bindung des Elektronendonors Plastochinol (Cramer *et al.*, 1996; Wollman *et al.*, 1999). Es gibt im Spinat-Komplex noch mindestens drei weitere kleine Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 4 kDa. Diese haben jeweils eine Transmembranhelix (Cramer *et al.*, 1994; Schmidt & Malkin, 1993). Darüber hinaus gehört ein Chlorophyll  $a$  Molekül zum Komplex. Es ist wahrscheinlich am Cytochrom  $b_6$  gebunden, seine Funktion ist allerdings noch nicht geklärt (Cramer *et al.*, 1994; Pierre *et al.*, 1997; Poggese *et al.*, 1997). Außerdem ist noch ein  $\beta$ -Carotin am Komplex gebunden, welches wohl eine Schutzfunktion gegen auftretende Radikale in der Membran hat (Zhang *et al.*, 1999). Cytochrom  $f$  und  $b_6$  sind plastidär codiert, wohingegen das Rieske-Protein und die kleinen Pet-Untereinheiten aus dem Kern stammen.

### **Cytochrom $bc_1$**

Der Cytochrom  $b_6f$  und der  $bc_1$  Komplex erfüllen die gleiche Funktion von Elektronentransfer und Protonentransport in der Photosynthese bzw. in der Atmung. Es gibt eine starke Sequenzhomologie zwischen dem Cytochrom  $b_6$  bzw. der Untereinheit IV und dem N- bzw. C-terminalen Bereich des Cytochrom  $b$  sowie zwischen den Rieske-Untereinheiten. Beide Komplexe besitzen die gleichen vier wesentlichen prosthetischen Gruppen. Strukturelle Vergleiche für das Rieske-Protein ergeben eine gute Übereinstimmung. Cytochrom  $c_1$  und Cytochrom  $f$  sind zwar beide von  $c$ -Typ, unterscheiden sich aber in Sequenz und Struktur

wesentlich voneinander, obwohl sie die gleiche Funktion erfüllen. Das weist darauf hin, dass Cytochrom  $c_1$  und  $f$  in der Evolution unterschiedliche Vorläufer hatten.

Vergleiche zwischen den atomaren Strukturen des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes und den verfügbaren elektronenkristallographisch erstellten Projektionskarten für den Cytochrom  $b_6f$  Komplex zeigen, dass die Transmembranbereiche beider Enzyme strukturell sehr ähnlich sind, sich aber in der Organisation der  $c$ -Typ Cytochrome und der Rieske-Untereinheiten unterscheiden (Breyton, 2000b).

### **Strukturinformationen zum Cytochrom $b_6f$ Komplex**

Die bisherigen Informationen zur Struktur des Cytochrom  $b_6f$  Komplexes sind verschiedener Natur. Dünne dreidimensionale und tubuläre Kristalle wurden vom Spinat  $b_6f$  Komplex erzeugt (Mosser *et al.*, 1994), aber die strukturelle Information, die von diesen Kristallen gewonnen werden konnte, war begrenzt. Zwei Projektionskarten des Proteins von der einzelligen Alge *C. reinhardtii* bieten eine Einsicht in die zweidimensionale Struktur dieses Komplexes (Bron *et al.*, 1999; Mosser *et al.*, 1997). Hochauflösende Strukturen der wasserlöslichen Fragmente der Cytochrom  $f$ - und der Rieske-Untereinheit wurden per Röntgenkristallographie ermittelt (Carrell *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 1994), aber eine detaillierte Struktur des Holokomplex gibt es noch nicht.

#### **1.1.2 $H^+$ -ATPase**

In lebenden Zellen unterscheidet sich die Ionenzusammensetzung innerhalb der Zelle von der Umgebung: Im Inneren ist die  $K^+$ -Konzentration hoch, wogegen die  $Na^+$ -Konzentration niedrig ist. Schon 1957 entdeckte Jens Skou ein Enzym, welches ATP nur in der Anwesenheit von  $Na^+$  und  $K^+$  hydrolysiert (Skou, 1957). Der aktive Transport von  $Na^+$  und  $K^+$ , den diese  $Na^+/K^+$ -ATPase leistet, ist von so großer Bedeutung, dass eine tierische Zelle im Ruhezustand ungefähr ein Drittel des ATPs zum Betrieb dieser Pumpe aufwendet. Heute weiß man, dass es weitere Pumpen gleichen Typs mit unterschiedlicher Ionenspezifität in allen Organismen gibt. Gemeinsam ist ihnen, dass während des Reaktionszyklus eine kovalent phosphorylierte Zwischenstufe auftritt, weswegen man diese Enzyme auch P-Typ-ATPasen nennt. Die Pumpen werden durch ATP angetrieben und teilen einen gemeinsamen Reaktionsmechanismus, in dem das Enzym selber vorübergehend durch ATP an einem Aspartatrest phosphoryliert

wird. Eine Sequenz von fünf Aminosäuren (**D**KTGT), die diesen Aspartatrest enthält, ist in allen Enzymen dieser Klasse unveränderlich konserviert (Axelsen & Palmgren, 1998). P-Typ-ATPasen haben eine einzige katalytische Untereinheit und ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Eine Analyse der Evolution der P-Typ-ATPasen von Palmgren & Axelsen (Palmgren & Axelsen, 1998) hat ergeben, dass es ca. 160 verschiedene Sequenzen von P-Typ-ATPasen in den Datenbanken gibt. Diese können in fünf Familien eingeteilt werden, wobei die ATPasen mit einer hohen Sequenzhomologie das gleiche Ion transportieren (Abb. 2). Eine Familie beinhaltet Mitglieder, welche die Funktion einer Flippase erfüllen, d. h. die Translokation von Lipiden über die Membran (Tang *et al.*, 1996). Einer anderen Familie konnte bisher keine Funktion oder Ionenspezifität zugewiesen werden. Mitglieder dieser Familie sind weit verbreitet in Eukaryonten und unterscheiden sich durch eine 100-200 Aminosäuren lange extracytoplasmatische Domäne (Catty *et al.*, 1997). Die pflanzlichen Plasmamembran  $H^+$ -ATPasen gehören zur Untergruppe der  $P_3$ -Typ ATPasen, die auch in Pilzen vorkommt. In Säugern gibt es sie nicht, aber sie sind eng verwandt mit den  $P_2$ -Typ ATPasen, zu den in Säugern vorliegenden Kationenpumpen, wie die  $Na^+/K^+$ -ATPasen (errichtet das Membranpotential),  $H^+/K^+$ -ATPasen (säuert den Magen an) und die  $Ca^{2+}$ -ATPasen (im Muskel) gehören (Axelsen & Palmgren, 1998).

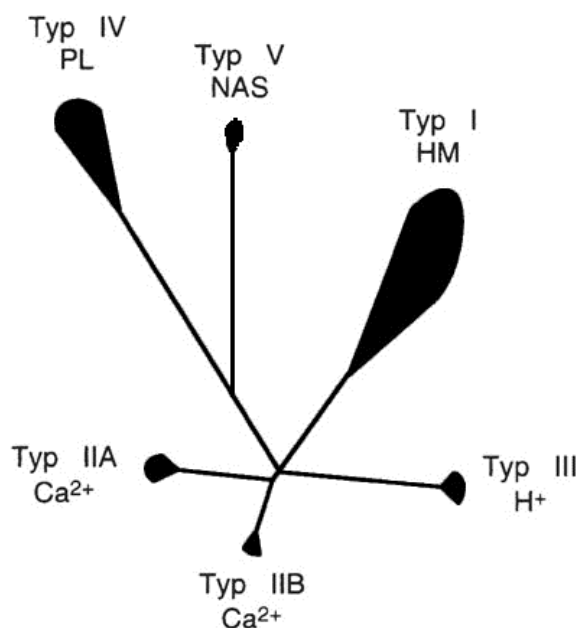


Abb. 2: Phylogenetischer Baum der P-Typ-ATPasen. Die fünf Hauptklassen sind dargestellt. Folgende Abkürzungen stehen für das transportierte Ion:  $H^+$ , Protonen;  $Ca^{2+}$ , Calcium-Ionen; HM, Schwermetalle; PL, Phospholipide; NAS, keine bekannte Funktion. Modifiziert nach (Palmgren & Harper, 1999).

Plasmamembran  $H^+$ -ATPasen benutzen ATP zum Herauspumpen von Protonen aus der Zelle. Daraus resultieren ein Protonengradient sowie ein Membranpotential über die Zellmembran

(Morsomme & Boutry, 2000; Sze *et al.*, 1999). Dies ist unterschiedlich zu den Tieren, die einen elektrochemischen Gradienten durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufbauen. Die resultierende protonenmotorische Kraft wird für die Aufnahme von Nährstoffen und Kationen durch Kanäle und protonengekoppelte Transportproteine genutzt. Der Vorteil des Transports von geladenen Kationen (hier  $\text{H}^+$ ) gegenüber ungeladenen Verbindungen besteht darin, dass nicht nur ein Konzentrationsgradient, sondern gleichzeitig auch ein elektrischer Gradient aufgebaut wird. Durch den Ausstoß von Protonen aus der Zelle können Pflanzen ein Membranpotential von ca.  $-175$  mV (innen negativ) und einen Gradienten von 2 pH-Einheiten erzeugen (Sze, 1985). Ein Kation/ $\text{H}^+$ -Symporter kann unter diesen Voraussetzungen theoretisch ein Kation gegen einen 10-millionenfachen Konzentrationsgradienten transportieren (Lester *et al.*, 1994). Die Protonen-Pumpe kommt im Vergleich mit anderen Transportern in großer Zahl in der Plasmamembran von. Darin spiegelt sich die verhältnismäßig langsame Transportrate von ungefähr 100 Ionen pro Sekunde wider. Im Vergleich dazu arbeiten Kotransporter mit einer Rate von 300 bis 1000 Ionen pro Sekunde, Ionenkanäle erreichen sogar Werte von  $10^6$ - $10^8$  Ionen pro Sekunde, allerdings nicht gegen einen Konzentrationsgradienten.

Schon Mitte der siebziger Jahre hat Jørgensen das klassische Experiment zum Nachweis der starken Konformationsänderungen, welche die P-Typ-ATPasen während ihres katalytischen Zyklus durchlaufen, gemacht. Eine milde Behandlung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit Trypsin zeigte zwei unterschiedliche Verdauungsmuster auf einem Gel, je nachdem, ob ATP,  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  dazugegeben wurde (Jørgensen, 1975). Das war der erste Hinweis, dass das Enzym in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vorliegen kann. Der katalytische Zyklus, den man heute für die Plasmamembran  $\text{H}^+$ -ATPase postuliert, lehnt sich an das Modell für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus Säugern an (Übersichtsartikel in (MacLennan *et al.*, 1997)) und wurde auf die  $\text{H}^+$ -ATPase übertragen (diskutiert in (Rao & Slayman, 1996)). Dieser beinhaltet zwei Konformationen ( $\text{E}_1$  und  $\text{E}_2$ ), die während des Reaktionszyklus durchlaufen werden. Diese beiden Zustände haben eine unterschiedliche Affinität für die transportierten Kationen und das Nukleotid. Proton und ATP binden in der  $\text{E}_1$ -Form (Schritt 1, Abb. 3), wohl auch in dieser Reihenfolge (Blanpain *et al.*, 1992), woraufhin ein für alle P-Typ-ATPasen charakteristischer Übergangszustand auftritt, in dem das Enzym selber phosphoryliert wird (Schritt 2). Mit einer Konformationsänderung geht das Enzym von dem  $\text{E}_1$  in den  $\text{E}_2$ -Zustand über (Schritt 3).

Daraufhin wird das Proton in den extrazellulären Raum entlassen (Schritt 4) und anorganisches Phosphat wird freigesetzt (Schritt 5). Es folgt eine weitere Konformationsänderung - wieder zu  $E_1$  hin. Dies ist auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Schritt 6) (Amory *et al.*, 1982).

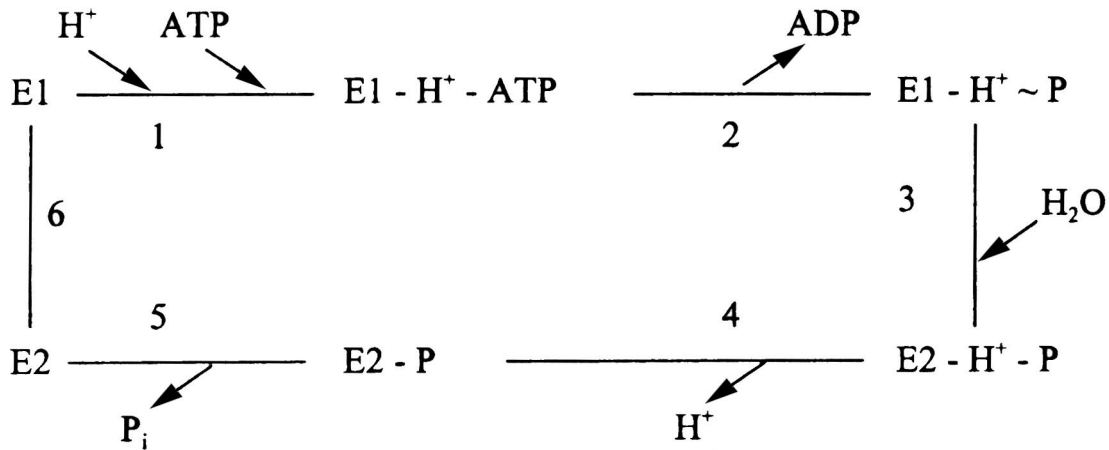


Abb. 3: Reaktionszyklus der Plasmamembran  $H^+$ -ATPase. Siehe Text für die Darstellung der einzelnen Schritte. Entnommen aus (Morsomme & Boutry, 2000).

### 1.1.3 Die $H^+$ -ATPase aus *Arabidopsis thaliana*

In *A. thaliana* ist die Plasmamembran  $H^+$ -ATPase durch eine Multigenfamilie von 10 Genen repräsentiert (AHA1-10) (Sussman, 1994). Die einzelnen Isoformen scheinen spezifisch in verschiedenen Geweben wie Antheren (AHA9) (Houlne & Boutry, 1994), Phloem (AHA3) (DeWitt *et al.*, 1991) oder in Keimlingen (AHA10) (Harper *et al.*, 1994) ausgeprägt zu werden. Die meisten Gene der Familie sind aber in verschiedenen Pflanzenorganen exprimiert und eine differenzielle Expression wird wohl durch hormonelle oder Umweltfaktoren reguliert. Auch in ihren kinetischen Eigenschaften unterscheiden sich die Isoformen voneinander. So ist die Affinität von AHA1 und AHA2 für ATP 10-mal höher als die von AHA3 (Palmgren & Christensen, 1994). Daher muss man bei diesen Isoformen von biochemisch unterschiedlichen Pumpen ausgehen, deren katalytischen Charakteristika eine funktionelle Bedeutung haben. Neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene durch verschiedene Isoformen sind die  $H^+$ -ATPasen auch enzymatisch reguliert. Aufgrund des enormen Verbrauchs an Energie (ATP) kann man davon ausgehen, dass eine strenge Kontrolle der Aktivität vorliegen muss. AHA2

hat eine C-terminale, 92 Aminosäuren lange autoinhibitorische Domäne, die durch Interaktion mit dem katalytischen Teil die Pumpe inhibiert (Palmgren & Christensen, 1993). Außerdem wird das Enzym durch 14-3-3 Proteine reguliert. 14-3-3 Proteine sind hochkonservierte Proteine, die überall in Eukaryonten exprimiert werden und viele Komponenten in diesen Organismen regulieren (Übersicht in (Aitken *et al.*, 1995)). Es konnte gezeigt werden, dass sie direkt mit der C-terminalen Domäne der H<sup>+</sup>-ATPase interagieren und eine Aktivierung des Enzyms bewirken (Jahn *et al.*, 1997). Dieser Komplex kann von Fusicoccin, einem Phytotoxin aus dem Pilz *Fusicoccum amygdali*, stabilisiert werden. Dadurch erhöht sich die Aktivität weiter.

Die Hauptfunktion der Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase liegt in der Bereitstellung der Energie für sekundäre Transportvorgänge, aber es wird auch eine Funktion für andere Prozesse, wie Salztoleranz, intrazelluläre pH-Regulation und Osmoregulation beim Öffnen und Schließen von Stomazellen, postuliert (Michelet & Boutry, 1995; Palmgren Michael, 1998; Serrano, 1989; Sussman, 1994).

#### 1.1.4 Vorliegende Strukturen von P-Typ-ATPasen

Zeitgleich wurden 1998 die Strukturen der Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase aus *N. crassa* und der Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von Kaninchen mit einer Auflösung von jeweils 8 Å veröffentlicht (Auer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998a). Die beiden Enzyme gehören zur Familie der P-Typ-ATPasen und transportieren ihre Ionen mit Hilfe des gleichen Mechanismus. Ein Vergleich ergab, dass die Anordnung der 10 Transmembranhelices in den beiden Molekülen sehr ähnlich war (Stokes *et al.*, 1999). Der cytoplasmatische Bereich hingegen, der den größten Teil des Enzyms ausmacht, erschien zunächst sehr unterschiedlich. Eine genauere Analyse der Strukturen konnte diese Unterschiede auf unterschiedliche Konformationen zurückführen, die verschiedene Zwischenstufen im Reaktionszyklus dieser Enzyme widerspiegeln. Je nachdem, ob das zu transportierende Kation gebunden war (H<sup>+</sup>-ATPase) oder nicht (Ca<sup>2+</sup>-ATPase), befanden sich die Proteine im E<sub>1</sub>- bzw. E<sub>2</sub>-Zustand und damit in unterschiedlichen Konformationen. So war es möglich die cytoplasmatischen Domänen durch Neuorientierung miteinander zur Deckung zu bringen und die Konformationsänderungen, die für den Reaktionszyklus von entscheidender Bedeutung sind, grob sichtbar zu machen.

Im Juni 2000 ist die erste hochauflösende Struktur einer P-Typ-ATPase von Toyoshima *et al.* (Toyoshima *et al.*, 2000) veröffentlicht worden (Schema in Abb. 4). Es handelte sich um die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von Kaninchenmuskel. Das Protein hatte zwei Calcium-Ionen gebunden und lag in der  $E_1$ -Konformation vor. Eine herausragende Erkenntnis konnte dabei über die Bindungsstelle für das Calcium gewonnen werden. Sie entsteht durch Unterbrechung der Windung der Transmembranhelices 4 und 6. Im zytoplasmatischen Bereich waren die Phosphorylierungsdomäne (P), die Nukleotidbindungsdomäne (N) sowie die Treiberdomäne (A) klar voneinander getrennt. Interessanter Weise war die Bindungsstelle für das ATP-Homolog TNP-AMP in der N-Domäne immer noch 25 Å von dem bedeutenden Asparaginsäurerest, der schließlich phosphoryliert wird, entfernt. Die Bindung von Calcium allein scheint also nicht ausreichend zu sein, um das Protein in eine Konformation zu bringen, in der eine Phosphorylierung dieser Aminosäure möglich ist. Eine andere Möglichkeit ist, dass TNP-AMP nicht an exakt der selben Stelle bindet wie ATP. Ein Vergleich mit einer 8 Å-Struktur des gleichen Enzyms, welches ohne Calcium, aber in Anwesenheit von Dekavanadat kristallisiert wurde (Zhang *et al.*, 1998a), zeigte, dass eine Drehung der N-Domäne um 20° den Spalt zwischen der N- und der P-Domäne weitgehend schließt. Eine vollständige Annäherung, wie sie für eine Reaktion zwischen dem Nukleotid mit der Phosphorylierungsstelle zu erwarten wäre, wurde aber durch die Anwesenheit des Dekavanadats verhindert. Um die Position der A-Domäne zwischen den beiden Strukturen zu überführen, ist eine 90° Drehung nötig. Damit wäre dann das konservierte TGES-Motiv der A-Domäne in der geschlossenen Konformation in unmittelbarer Nähe der Phosphorylierungsstelle. Wie die Phosphorylierung einen Effekt auf Calciumbindungsstellen im Membranbereich ausübt und wie die Kopplung zum Pumpvorgang erreicht wird, ist anhand der atomaren Struktur noch nicht schlüssig zu beantworten.



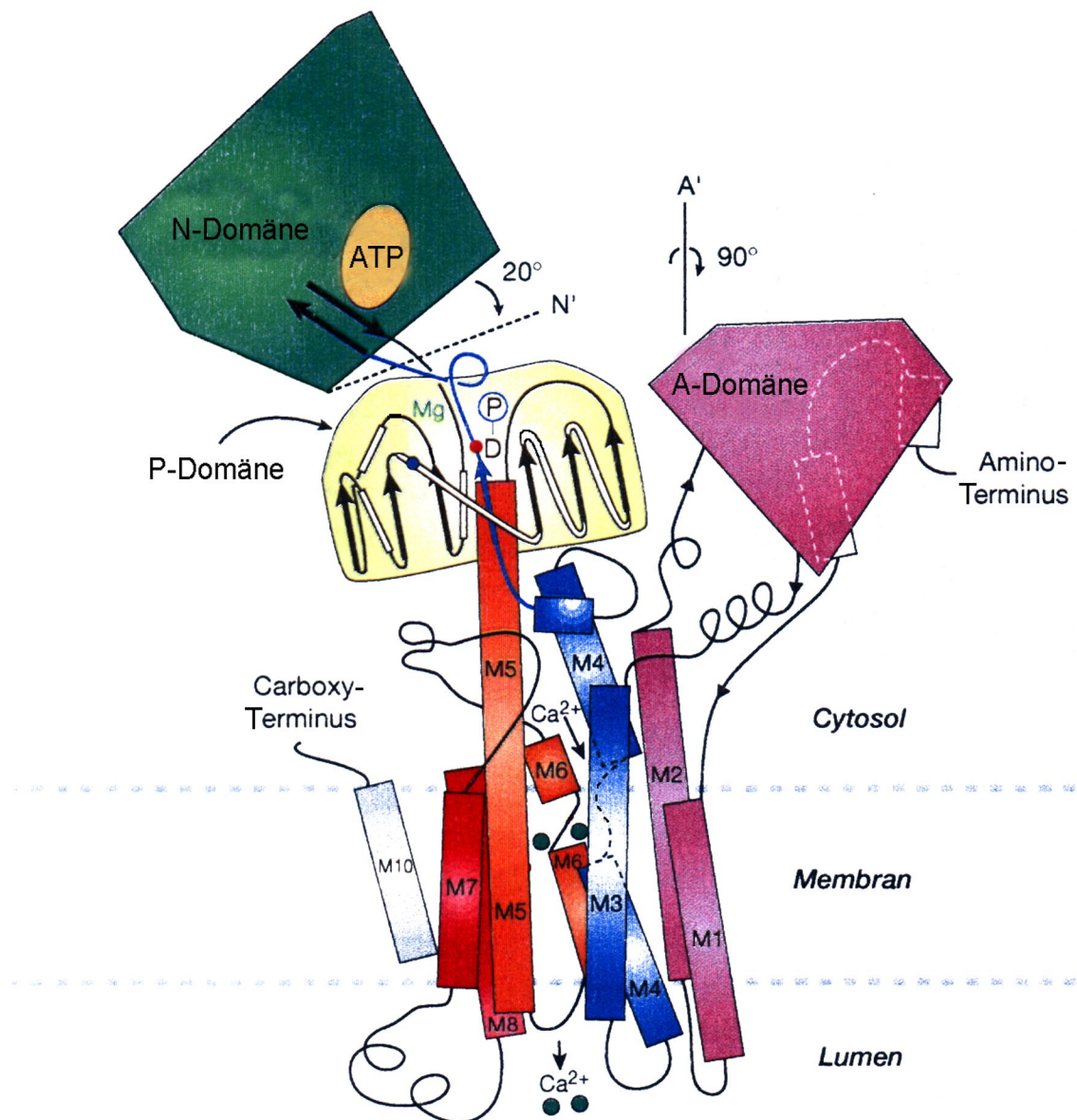


Abb. 4: Übersicht über die Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum des Kaninchens (Toyoshima et al., 2000). Es sind 10 Transmembranhelices zu sehen. Die Calciumbindungsstellen sind mit zwei grünen Punkten markiert. Die ATP-Bindungsstelle ist in der N-Domäne markiert (gelb). Die Phosphorylierungsstelle (Asp 351) in der P-Domäne ist mit einem umkreisten P gekennzeichnet. N' und A' markieren die Drehungen der N- bzw. A-Domäne, die nötig sind, um die Elektronendichte einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Struktur (Zhang et al., 1998a) auszufüllen. Modifiziert aus (MacLennan & Green, 2000).

## 1.2 2D-Kristallisation

Zweidimensionale Kristalle von Membranproteinen kommen natürlicherweise in den Zellmembranen einiger Bakterien vor. Dazu zählen Porine (Kessel et al., 1988) und die Fumarat-Reduktase aus *E. coli* (Cole et al., 1985). Am ausgeprägtesten findet man sie in der Plasmamembran des Archaeobakteriums *Halobacterium halobium*, in der Bakteriorhodopsin

große 2D-Kristalle ausbildet. Diese Kristalle waren auch der Ausgangspunkt für die Methodenentwicklung der Strukturbestimmung von 2D-Kristallen mit Hilfe von Elektronenmikroskopie, Elektronenbeugung und Bildverarbeitung durch Henderson und Unwin. Daraus resultierte das erste dreidimensionale Modell, welches mit der Elektronenkristallographie erstellt wurde (Henderson & Unwin, 1975; Unwin & Henderson, 1975). Oft ist es auch möglich, Membranproteine, die hoch exprimiert sind, durch die richtigen Bedingungen zu einer Kristallisation *in situ* anzuregen. Beispiele dafür sind der nikotinische Acetylcholinrezeptor (Brisson & Unwin, 1984) oder die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Dux & Martonosi, 1983). Die meisten Membranproteine kommen aber nur in einer geringen Konzentration in der Membran vor, so dass eine Reinigung und Konzentrierung unumgänglich ist. Die wasserunlöslichen Membranproteine werden dabei mit Hilfe von Detergenzien aus der Membran extrahiert und in Lösung gehalten.

Zur Erzeugung von 2D-Kristallen erfolgt die Rekonstitution in Membranen durch die Entfernung des Detergenz mittels Mikrodialyse oder Adsorption an Polystyrol-Kügelchen (BioBeads). Dies erweitert das Spektrum der Einflussnahme auf die Kristallisation enorm, da man die Art und Geschwindigkeit des Detergenzentszugs bestimmen kann und zusätzlich die Möglichkeit besteht, aus einer Reihe von natürlichen und synthetischen Lipiden, die man für die Rekonstitution verwendet, zu wählen. Teilweise werden aber auch in einer Batch-Methode, bei der schon zu Beginn der Kristallisation die Komponenten im richtigen Verhältnis vorliegen, große Kristalle gewonnen. Dies ist z. B. beim Lichtsammelkomplexes LHC II (Wang & Kühlbrandt, 1991) und Bakteriorhodopsin (Michel *et al.*, 1980) der Fall.

Die Morphologie der Kristalle ist vielfältig. Im einfachsten Fall liegt das Protein geordnet in einer flächigen Membran eingebettet vor. Oft findet man auch Kristalle, die aus mehreren dieser Schichten bestehen, wobei die einzelnen Lagen oft geordnet übereinander liegen. Dadurch verstärkt sich bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen das Signal, gleichzeitig ist es aber bisher nicht gelungen, solche mehrschichtigen Kristalle für eine 3D-Rekonstruktion zu verwenden. Dies liegt vor allem daran, dass die Anzahl der Schichten variiert. Allerdings können solche Kristalle der Ausgangspunkt für dreidimensionale Kristalle sein. Ein Beispiel dafür ist die kürzlich publizierte Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Hier gelang es, die Anzahl der Schichten so weit zu erhöhen, dass sie sich für die

Röntgenkristallographie eignen. Insbesondere die Tatsache, dass nun auch sehr kleine Kristalle durch die Verwendung von mikrofokussierter Synchrotronstrahlung für die Röntgenstrukturanalyse genutzt werden können, eröffnet hier weitere Perspektiven. So besaßen die Kristalle, mit der die Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase gelöst wurde, nur eine Dicke von 20  $\mu\text{m}$ . Das entsprach weniger als 1400 Schichten.

Mehrschichtige Kristalle wurden darüber hinaus elektronenkristallographisch genutzt, um eine 2D-Struktur des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes zu erstellen (Bron et al., 1999; Mosser et al., 1997).

Die klassischen Kristalle, die bei einer Rekonstitution entstehen, sind Vesikelkristalle. Normalerweise bilden sich aus dem gelösten Protein zusammen mit dem gelösten Lipid bei Detergenzentzug Proteoliposomen aus, in denen unter geeigneten Bedingungen das Protein kristallin angeordnet ist. Die Größe der Vesikel ist zumeist auf 3  $\mu\text{m}$  beschränkt, oder es handelt sich um große tubuläre Vesikel, die eine Länge bis zu 10  $\mu\text{m}$  aufweisen können, wobei die Breite 1,5  $\mu\text{m}$  meist nicht übersteigt. Aufgrund der limitierten Größe und des daraus resultierenden Fehlens von Elektronenbeugungsdaten ist es jedoch schwierig, atomare Strukturen mit Hilfe solcher Kristalle zu erzeugen.

Eine weitere Morphologie ist die der tubulären Kristalle. In den Röhren ist das Protein helikal angeordnet. Das hat den Vorteil, dass sich sofort alle möglichen Blickwinkel ergeben und Probleme, die mit der Aufnahme einer Kippserie verbunden sind und zu einer anisotropen Auflösung führen, nicht auftreten. Nachteilig wirkt sich allerdings aus, dass der Durchmesser der Röhren oft stark variiert, was die Analyse sehr erschwert. Die Struktur des nikotinischen Acetylcholinrezeptors wurde mit Hilfe solcher Kristalle bis zu einer Auflösung von 4,6 Å erstellt (Miyazawa *et al.*, 1999).

Grundvoraussetzung für die Anfertigung einer hochauflösenden Struktur sind große, gut geordnete Kristalle. Die Größe ist ein wichtiger Punkt, da für die Bestimmung einer 3D-Struktur die Probe im Elektronenmikroskop gekippt werden muss, um Abbildungen der Kristalle aus verschiedenen Perspektiven zu erhalten. Der notwendige Kippwinkel reicht von 0-60°, wobei sich mit steigendem Winkel der sichtbare Ausschnitt erheblich verkleinert. Darum ist es notwendig, dass die Kristalle groß und in ausreichender Anzahl vorhanden sind.

Zusätzlich kann man mit großen Kristallen Elektronenbeugung aufnehmen, wodurch bessere Daten für die Amplitudenwerte zur Verfügung stehen. Die Amplituden werden dann mit der Phaseninformation (die man von Beugungsbildern nicht erhalten kann) aus den elektronenmikroskopischen Bildern kombiniert. Elektronenbeugung ist außerdem unempfindlich gegenüber kleinen Probenverschiebungen und Linsenfehlern und eignet sich deshalb ideal für die schnelle Einschätzung der Ordnung der Kristalle.

Inzwischen ist es gelungen, hochgeordnete 2D-Kristalle von den verschiedensten Membranproteinen *in vitro* zu erzeugen, und Strukturmodelle mit atomarer Auflösung konnten mit Hilfe der Elektronenkristallographie für Bakteriorhodopsin (Grigorieff *et al.*, 1996; Mitsuoka *et al.*, 1999), den Lichtsammelkomplex II (LHC II) (Kühlbrandt *et al.*, 1994) und Aquaporin (Murata *et al.*, 2000) erstellt werden.

### **1.2.1 Oberflächenkristallisation**

Bei der Oberflächenkristallisation wird eine Lipideinzelschicht auf einen wässrigen Tropfen aufgebracht. In der darunterliegenden Phase befindet sich gelöstes Protein, welches aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung oder spezifischer Affinität an die Kopfgruppen des Lipids bindet. Durch die Affinität des Proteins zu der Lipidoberfläche kann eine sehr hohe Proteinkonzentration im Bereich von 500-1000 mg/ml an der Grenzfläche erzielt werden, ohne dass dabei die laterale Mobilität eingeschränkt wäre. Diese hohe Konzentration und die damit verbundene dichte Packung des Enzyms scheint die treibende Kraft für den Kristallisationsprozess zu sein. Zusätzlich ergibt sich möglicherweise eine einheitliche Ausrichtung der Proteine durch die Bindung an die Lipidschicht. Dies könnte den Kristallisationsprozess zusätzlich unterstützen.

Diese Technik wurde 1971 durch Fromherz vorgestellt (Fromherz, 1971) und später für die 2D-Kristallisation von wasserlöslichen Proteinen an geladenen oder funktionalisierten, natürlichen oder synthetischen Lipiden genutzt (Darst *et al.*, 1988; Kubalek *et al.*, 1994; Uzgiris & Kornberg, 1983). Ein universeller Weg, Proteine an solche Lipid-Einzelschichten zu binden, ergibt sich durch den Einsatz von His-tags. Verschiedene lösliche Proteine, die über diesen His-tag an Lipide mit einer Ni<sup>2+</sup>-komplexierenden Nitrilotriacetatgruppe (Ni<sup>2+</sup>-NTA) absorbiert wurden, konnten mit dieser Methode kristallisiert werden (Dietrich *et al.*, 1995;

Kubalek et al., 1994; Venien-Bryan *et al.*, 1997). Versucht man, diese Methode auf Membranproteine anzuwenden, so ergibt sich das Problem, dass das Detergenz, welches unverzichtbar ist, um das Protein in Lösung zu halten, rasch die Lipidschicht angreift und auflöst. Trotzdem ist es gelungen, 2D-Kristalle zweier Membranproteine, die einen His-tag trugen, an reinen Phospholipiden zu erzeugen, die mit einer  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Gruppe ausgestattet waren. Die rasche Absorption des Proteins an die Lipidschicht schien einen Schutz vor dem Angriff des Detergenz zu gewähren. Der Einsatz eines Detergenz mit niedriger CMC und eine sehr hohe Bindungsaffinität war offenbar Voraussetzung für den Erfolg. Wahrscheinlich stellen diese beiden Bedingungen eine Einschränkung für den Einsatz dieses Protokolls für eine Kristallisation von Proteinen, die in Detergenzien mit höherer CMC gelöst sind oder eine geringere Bindungsaffinität haben, dar.

Um zu vermeiden, dass die Lipidschicht von dem anwesenden Detergenz aufgelöst wird, haben L. Lebeau und C. Mioskowski, Strassburg, eine neue Klasse von partiell fluorierten Lipiden entwickelt. Diese haben die Eigenschaft, dass sie sowohl hydrophob als auch lipophob sind. Das heißt, dass bei einer Mischung von Fluorkohlenstoff- und Hydrokohlenstoffverbindungen mit Wasser ein Dreiphasensystem entsteht. Ein einschichtiger Film der fluorierten Lipide auf einer Tropfenoberfläche ist im Gegensatz zu konventionellen Lipiden also auch in Anwesenheit von Detergenzien in der Subphase stabil und erfüllt damit eine wichtige Anforderung für die Arbeit mit Membranproteinen. Außerdem besitzen die F-Lipide eine funktionalisierte  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA Kopfgruppe, die eine starke Affinität zu Histidinresten hat. Somit kann jedes Protein mit einem His-tag an die F-Lipide gebunden werden und steht dadurch für Experimente zur Oberflächenkristallisation zur Verfügung (Lebeau *et al.*, 2001).

Die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA fluorierten Lipide unterscheiden sich in der Länge der Verbindung zwischen dem hydrophoben Teil und der funktionellen  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Gruppe, wobei die längere Verbindung möglicherweise eine höhere Bewegungsfreiheit des gebundenen Proteins erlaubt und damit die geordnete Ausrichtung während der Kristallbildung erleichtert (Abb. 5). Weiterhin sind in Abb. 5 verschiedene geladene, fluorierte Lipide zu sehen. Die Mischung von funktionellen  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA fluorierten Lipiden und sogenannten verdünnenden Lipiden ermöglicht eine Variation der elektrostatischen Eigenschaften des Lipidfilms. Das kann die Interaktion des Proteins mit dem Lipidfilm beeinflussen und ist somit ein wichtiger Parameter

bei der Kristallisation. Die Fluidität der Lipidschicht wird durch Verzweigungen im aliphatischen Teil der Kette erhöht. Zusätzlich hat auch die Verwendung von Verbindungen mit ein oder zwei Kohlenstoffketten einen Einfluss auf die Beweglichkeit der Lipidmoleküle.

Messungen der Oberflächenspannung im Vergleich zur Packungsdichte zeigten, dass die fluorierten Lipide eine stabile Einzelschicht an der Grenzschicht zwischen Luft und Wasser bildeten (Lebeau et al., 2001). Die Einzelschicht aus fluorierten Lipiden zeigte sich beständig gegen die Auflösung durch Detergenzien. Mit Hilfe von Ellipsometrie, einem optischen nicht-invasiven Verfahren zur Analyse von Oberflächen, welches zur Messung von Schichtdicke und –dicke eingesetzt wurde, konnte nachgewiesen werden, dass die Einzelschichten der fluorierten Lipide – im Gegensatz zu konventionellen Lipiden – auch in der Gegenwart verschiedener Detergenzien stabil waren.

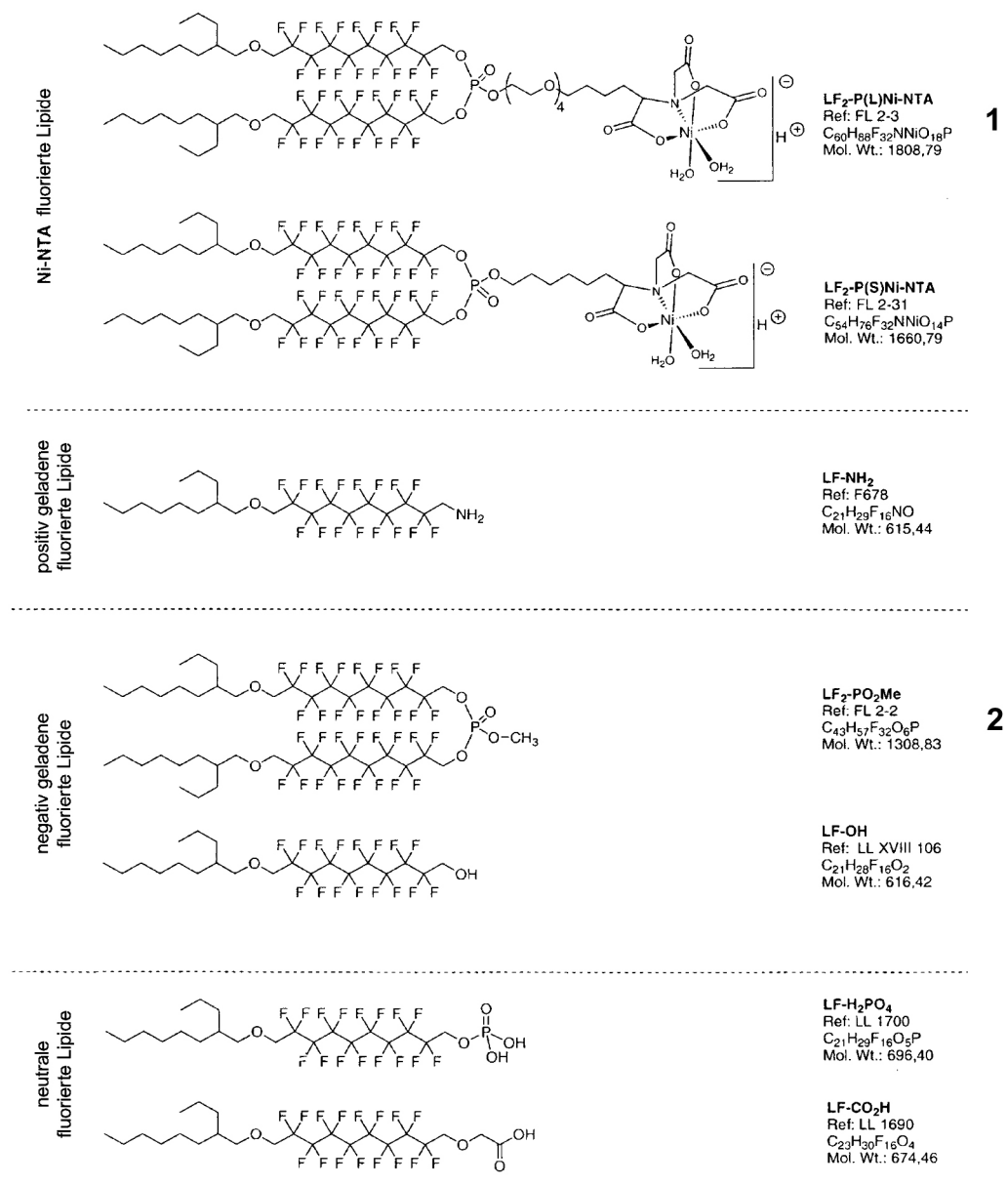


Abb. 5: Strukturformeln der fluorierten Lipide. Mit den Verbindungen 1 und 2 wurden die Kristalle erzeugt, die für die Berechnung einer Projektionsdichtekarte benutzt wurden. Die ersten beiden Lipide unterscheiden sich durch die Länge der Verbindung zwischen der Fettsäurekette und der Ni<sup>2+</sup>-NTA Kopfgruppe. Links sind die Eigenschaften der Kopfgruppen angegeben.

### 1.2.2 Kryo-Elektronenmikroskopie

Neben der NMR-Spektroskopie und der Röntgenstrukturanalyse ist die Elektronenmikroskopie die dritte Methode, mit der die dreidimensionale Struktur von Proteinen ermittelt werden kann. Elektronen wechselwirken mit Materie etwa 10.000 mal stärker als Röntgenstrahlen. Aus diesem Grund reicht eine einzelne Proteinschicht, um ein

genügend starkes Signal zu erhalten, welches man zur Analyse der Struktur nutzen kann. Es ist die einzige der drei Methoden, die es ermöglicht auch Einzelmoleküle abzubilden.

Das im Elektronenmikroskop erzeugte Bild ist ein Phasenkontrastbild. Dünne Präparate verhalten sich näherungsweise als schwache Phasenobjekte, da es zu keiner nennenswerten Absorption kommt. Der Hauptanteil der Elektronen wird durch das Kernpotential gestreut und erfährt eine Phasenverschiebung gegenüber dem nichtgebeugten Nullstrahl, wobei kein Energieverlust, d. h. keine Amplitudenänderung, auftritt. Die sphärische Abberation der Objektivlinse im Elektronenmikroskop und eine geeignete Unterfokussierung sorgen dafür, dass die Phase des nichtgebeugten Strahls um ca.  $\pi/2$  verschoben wird und es zu einer Interferenz mit dem gebeugten Strahl kommt, wodurch sich eine aufzeichenbare Amplitudenmodulation - der Phasenkontrast - ergibt. Durch Fokussierung lässt sich der Phasenkontrast beeinflussen; die optimale Einstellung wird Scherzer-Fokus genannt und liegt im schwachen Unterfokusbereich. Die Kontrastübertragung durch das Mikroskop ist allerdings nicht gleichmäßig. Sie kann mit der Kontrastübertragungsfunktion beschrieben werden und moduliert Amplituden und das Vorzeichen der Phasen unterschiedlicher Raumfrequenzen in Abhängigkeit von Unterfokus und sphärischer Aberration (Abb. 6).

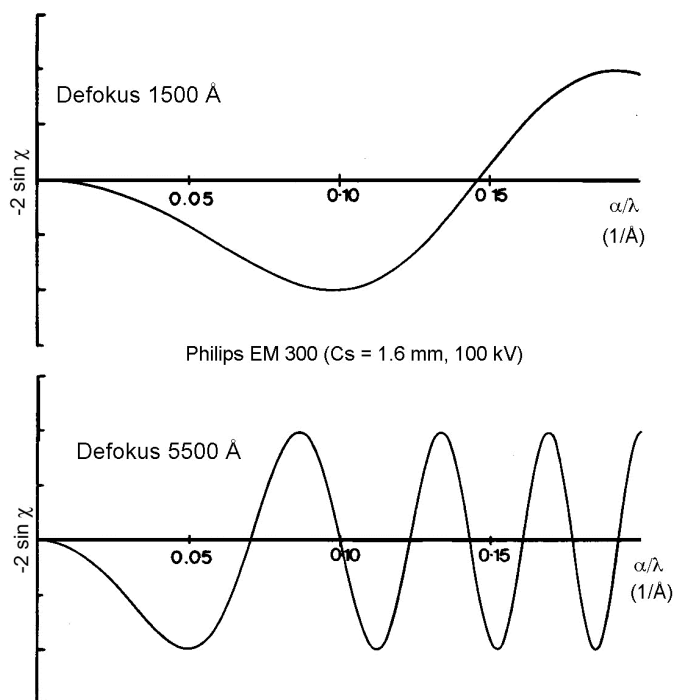


Abb. 6: Kontrastübertragungsfunktion (CTF) Die Übertragungsfunktion (Nulldurchgänge der Funktion  $-2 \sin \chi$ ) sind abhängig vom Defokus und der sphärischen Aberration des Elektronenmikroskops. Durch die CTF werden die Vorzeichen der Phasen und die Amplituden moduliert.



Bei der Einzelpartikelanalyse ist die minimale Größe der Proteine auf ca. 100 kDa begrenzt, da sonst ein korrektes Alignment der Partikel nicht mehr zu gewährleisten ist (Henderson, 1995). Mit Hilfe der Einzelpartikelanalyse konnte die Struktur des hochsymmetrischen, icosahedralen Hepatitis B Virus bis zu einer Auflösung von 7,4 Å ermittelt werden (Böttcher *et al.*, 1997). Da die Viruspartikel aus gleichen Untereinheiten mit definierter Position bestehen, sind in einer Aufnahme verschiedene Blickwinkel dieser Untereinheiten vorhanden und eine Kippung der Probe ist nicht notwendig. Damit stellen diese Viruspartikel ideale Objekte für die Untersuchungen durch Kryo-Elektronenmikroskopie dar. Für Partikel ohne Symmetrie müssen elektronenmikroskopische Aufnahmen von den im Präparat zufällig orientierten Partikeln unter Verwendung von Bildverarbeitungsprogrammen ausgerichtet und kombiniert werden. Die dabei gewonnenen unterschiedlichen Perspektiven des Partikels können dann mit Hilfe der „random conical tilt“-Methode zu einer 3D-Struktur vereint werden (Radermacher, 1988). Mit dieser Methode wurde kürzlich für die große ribosomale Untereinheit aus *E.coli* eine Auflösung von unter 10 Å erreicht (Matadeen *et al.*, 1999). Höhere Auflösungen sind unter Zuhilfenahme von 2D-Kristallen möglich. Dazu müssen die Kristalle ungefärbt präpariert werden. Bei Einschuss des Präparats in ein Kryogen (flüssiges Ethan oder Propan) erstarrt die wässrige Lösung zu amorphem Eis, das die Probe umgibt (Vitrifizierung) (Dubochet *et al.*, 1988). Die hohe Abkühlrate von ca. 10.000°C/sec verhindert das Entstehen von Eiskristallen. Alternativ können auch Zuckerverbindungen wie Glukose oder Tannin als Gefrierschutzmittel verwendet werden. Das Präparat wird dann im gekühlten Objekthalter mikroskopiert. Da biologische Proben äußerst strahlungsempfindlich sind, wird unter Niedrigdosisbedingungen ( $< 10 \text{ e}^-/\text{Å}^2$ ) gearbeitet.

Um Proben schnell zu untersuchen, bietet es sich an, das Präparat einer Negativfärbung zu unterziehen. Dabei wird die Probe in einer anorganischen Schweratomsalzlösung, wie zum Beispiel Uranylacetat, getrocknet, wobei sich ein glasartiger Film des Kontrastmittels um die Probe legt. Man kann davon ausgehen, dass das Protein dabei in einer Weise gefärbt wird, dass der hydrophobe Membranteil den Farbstoff ausschließt und die strukturelle Information vor allem von den Teilen des Proteins herrühren, die sich außerhalb der Membran befinden (Amos *et al.*, 1982). Da der Kontrastmittelfilm im Elektronenstrahl weitgehend stabil ist, kann man die Proben bei Raumtemperatur im Elektronenmikroskop anschauen. Die erreichbare

Auflösung ist allerdings auf ca. 15 Å limitiert, wobei es aber Berichte gibt, nach denen bis zu 8 Å Auflösung erreicht wurden (Mosser et al., 1997). Dies rührt vermutlich von internen Kontrasten im Protein zwischen  $\alpha$ -helikalen Bereichen her.

### 1.2.3 Bildverarbeitung

Generell sind biologische Kristalle nie perfekte Kristalle. Kristallverzerrungen, aber auch Abbildungsfehler, die durch das Mikroskop hervorgerufen werden sowie Schwankungen in der Kontrast-Übertragungsfunktion beeinträchtigen die verwertbare Information der Aufnahmen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen enthalten neben dem Signal, welches von dem analysierten Protein herrührt, auch immer einen Rauschanteil, der sich aus der geringen Anzahl von Elektronen bei Niedrigdosisbedingungen und aus dem amorphen Signal des Kohlefilms, der das Präparat trägt, ergibt. Mit Hilfe von Bildverarbeitungsprogrammen lassen sich jedoch einige dieser Fehler korrigieren und so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessern.

2D-Kristalle eignen sich in besonderer Weise für die Strukturbestimmung, da die Moleküle von vornherein gleichartig orientiert und regelmäßig angeordnet sind. Die Bildverarbeitung erfolgt im reziproken (Fourier) Raum, da hier die Analyse und Korrektur von sich wiederholenden Strukturen wesentlich einfacher möglich ist. So liefert die Fourier-Transformation der digitalisierten Aufnahme eines 2D-Kristalls Reflexe, welche die gesamte Information der periodisch angeordneten Proteinmoleküle enthalten. Alle Ortsfrequenzen zwischen den Reflexen tragen nicht zur Struktur bei. Daher kann man den größten Teil des Rauschens eliminieren, indem man eine Fensterfilterung durchführt, bei der nur noch die Information in einem kleinen Bereich um die Reflexe genutzt wird. Das kommt einer Mittelung der Dichte aller Einheitszellen im Kristall gleich.

2D-Kristalle von Proteinen sind normalerweise nicht perfekt. Verzerrungen des Kristallgitters bewirken, dass Reflexe sich über mehrere Bildpunkte ausdehnen oder sich nicht exakt an der erwarteten Position befinden. Durch Bildverarbeitungsprogramme können laterale Positionsabweichungen korrigiert werden, indem ein kleiner Bildausschnitt, bestehend aus wenigen Einheitszellen, mit dem ganzen Kristall kreuzkorreliert wird. Dabei erhält man Verschiebungsvektoren, welche die Abweichung jeder Einheitszelle von ihrer theoretischen Position beschreiben. Diese Vektoren können benutzt werden, um jede Einheitszelle an ihre

ideale Position zu verschieben, was eine Entzerrung des Kristalls bewirkt und dadurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert. Aus den ermittelten Amplituden und Phasen lassen sich zweidimensionale Projektionen des Kristalls errechnen und analysieren.

#### 1.2.4 Modelling

Das Anfertigen von Strukturmodellen großer Proteine basiert darauf, dass Sequenzhomologien auch Strukturhomologien bedingen (Chothia & Lesk, 1986). Gibt es von dem Protein von Interesse einen Verwandten, für den die Struktur experimentell ermittelt wurde, so kann basierend darauf ein Strukturmodell berechnet werden. Je nachdem, wie hoch die Sequenzhomologie ist, unterscheidet sich die Genauigkeit des Modells. Allgemein kann man sagen, dass bei einer Sequenzhomologie von über 70 % die Struktur exakt genug ist, um z. B. die Spezifität und Details des aktiven Zentrums zu untersuchen. Bei 30 % bis 70 % Homologie kann man davon ausgehen, dass die Faltung des Modells wahrscheinlich korrekt ist und es möglich ist, etwas über die Funktion auszusagen sowie Vorhersagen über die Auswirkungen von ortsgerichteten Mutationsexperimenten zu treffen. Bei einer Sequenzhomologie von weniger als 30 % ist das Ergebnis oft minder eindeutig, obwohl Proteine nicht selten auch bei einer Homologie von nur 10-20 % eine ähnliche Faltung haben. Der Schlüssel für ein gutes Modell ist das richtige Alignment der Sequenzen (Lozano *et al.*, 1997). Für diesen Zweck können sogenannte "Multiple Sequence Alignment"-Programme wie BLAST (Altschul *et al.*, 1997) oder CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994) benutzt werden. Das Ergebnis dieses automatisch erstellten Vergleichs muss allerdings vom Benutzer gegebenenfalls korrigiert werden, um alle verfügbaren Erkenntnisse einfließen zu lassen. Dabei spielen auch Resultate biochemischer Natur, wie z. B. Cross-linking-Experimente, eine große Rolle, da sie strukturelle Informationen liefern. Besonders hilfreich ist es, wenn viele verwandte Sequenzen verglichen werden können, da hier hochkonservierte Regionen deutlicher sichtbar werden, als wenn man nur zwei Sequenzen miteinander vergleicht. Aufgrund der Strukturdaten der bekannten Struktur wird dann für die konservierten Regionen ein Rückgrad der Aminosäurekette gebaut. Gibt es Regionen, die keine Homologie aufweisen (meist sind dies Loops), kann eine Datenbank mit den Strukturen von bekannten Loopregionen auf Ähnlichkeiten durchsucht werden und es können passende Kandidaten für diese speziellen Bereiche als Vorlage herangezogen werden. Anschließend werden die Seitenketten der

Aminosäuren in einer wahrscheinlichen Orientierung angefügt. Dann wird die Struktur durch Energieminimierung oder molekulardynamische Methoden optimiert. Speziell im Falle der P-Typ-ATPasen ist ein solches Strukturmodell von großem Nutzen, wenn man davon ausgeht, dass es sich bei den großen Konformationsänderungen während des katalytischen Zyklus um die Bewegung von ganzen Untereinheiten um einen Angelpunkt handelt. Dabei bleibt die Struktur der Domänen selber erhalten, nur ihre Position zueinander ändert sich (Scarborough, 1992).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Cytochrom *b<sub>6</sub>f*

#### 2.1.1 Proteinreinigung

##### Präparation der Chloroplastenmembranen

Der verwendete Spinat wurde in Hydrokultur in Hoagland Medium (Robinson, 1986) selber gezogen. Für eine Membranpräparation wurde 1 kg Spinatblätter ohne Stiele benutzt. Die Chloroplasten wurden nach Black *et al.* (Black *et al.*, 1987) präpariert: Nach dem Waschen und Entstielen wurden die Blätter in einem "Waring Blender" zusammen mit 1,5 l Puffer A (400 mM Saccharose, 10 mM Tris (pH 8,0), 10 mM NaCl) homogenisiert und durch eine Schicht aus Gaze und Watte gefiltert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Sämtlichen Puffern wurde kurz vor dem Benutzen 0,2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) zugesetzt. Zentrifugiert wurde jeweils 30 Minuten bei 13.500 g und 4 °C.

Das Filtrat wurde zunächst zentrifugiert und das Pellet in 700 ml Puffer B (10 mM Tris (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)) resuspendiert. Die Lösung wurde 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Die Anwesenheit des Chelators EDTA bewirkte ein Entstapeln der Thylakoidmembranen durch Entzug der Magnesiumionen. Nach dem Zufüllen von 700 ml Puffer C (150 mM NaCl) wurde zentrifugiert. Das Pellet wurde in 700 ml Puffer D (2 M NaBr, 400 mM Saccharose, 10 mM Tris (pH 8,0)) aufgenommen und für 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Bromidionen sind chaotrop und bewirken eine Ablösung extrinsischer Proteine von den Membranen. Die gleiche Menge Wasser wurde hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift mit Puffer D und die anschließende Zentrifugation wurden wiederholt. Das Pellet wurde in Puffer B zu einem Volumen von 1l aufgefüllt, homogenisiert und die Chlorophyllkonzentration wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurden 20 µl der Lösung mit 80% Aceton zu 2 ml aufgefüllt und die Absorption bei den Wellenlängen 646,8 und 663,8 nm bestimmt. Mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten ( $90,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  für Chlorophyll *a* und 56,3 für Chlorophyll *b* (Porra *et al.*, 1989)) war es möglich, die Chlorophyllkonzentration zu ermitteln. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Chlorophyllkonzentration anhand der vorherigen Messung auf einen Wert von 3 mg/ml mit Puffer E (40 mM Tricin (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>,

10 mM KCl) eingestellt, die Lösung in Aliquots von 35 ml aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## **Solubilisierung**

Da die optimale Detergenzkonzentration zur selektiven Solubilisierung von Cytochrom *b<sub>6</sub>f* für verschiedene Membranpräparationen unterschiedlich war, wurde für jede Membranpräparation eine Testsolubilisierung mit verschiedenen Konzentrationen des Detergens Hecameg durchgeführt. Dazu wurden Membranen zu je 1 ml aliquotiert und 1:1 mit Puffer E verdünnt. Es wurden verschiedene Detergenzkonzentrationen im Bereich von 25-35 mM eingestellt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C auf der Rotunde und einer Zentrifugation von 20 Minuten bei 100.000 g und 4 °C wurde der Überstand in eine Küvette gegeben und über das Verhältnis von Cytochrom *f* zu Chlorophyll die Hecamegkonzentration mit der größten Selektivität für Cytochrom *b<sub>6</sub>f* ermittelt. Diese Konzentration wurde dann für die eigentliche Proteinreinigung gewählt. Dabei wurde mit einem Volumen von 35 ml Membranen gearbeitet. Die Solubilisierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Der Überstand dann jedoch auf einen 10-30 %igen kontinuierlichen Saccharosegradienten (Volumen pro Gradient: 50 ml, beladen mit 10 ml Überstand) gegeben, der außerdem noch 40 mM Tricin (pH 8,0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 20 mM Hecameg und 0,1 mg/ml Phosphatidylcholin aus Ei enthielt. Der Gradient und alle weiteren Puffer enthielten 0,1 mg/ml Phosphatidylcholin sowie als Proteaseinhibitoren 0,15 mM PMSF, 1,0 mM Benzamidin und 5,0 mM Aminocaprinsäure. Der Gradient wurde bei 180.000 g für 16 Stunden bei 10°C in einem Festwinkelrotor zentrifugiert. Die resultierende braune Bande, die den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex enthielt, wurde auf eine Hydroxyapatit-Säule (Biorad) geladen, die mit 50 mM Ammoniumphosphat und 20 mM Hecameg äquilibriert war. Dann wurde mit 2,5 Säulenvolumen (125 mM Ammoniumphosphat, 20 mM Hecameg) gewaschen. Das Protein wurde mit 400 mM Ammoniumphosphat / 20 mM Hecameg eluiert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.1.2 Aktivitätstest

Aktivitätstests wurden bei 23 °C auf einem Perkin-Elmer Lambda Bio 40 Spektrophotometer aufgenommen. Die Spektroskopie wurde in einem Puffer mit 0,3 mM Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) und 20 mM Tricin (pH 7,5) durchgeführt. Das hatte den Vorteil, dass bei diesem sehr milden Detergenz keine zusätzlichen Lipide benötigt wurden, um eine Monomerisierung des Komplexes zu verhindern. Es wurde ein Extinktionskoeffizient für den Cytochrom  $b_6f$  Komplex von  $\epsilon = 20 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  bei einer Wellenlänge von 564 nm angenommen (Cramer & Whitmarsh, 1977). Für den Aktivitätstest wurden 0,5 nM gereinigter Cytochrom  $b_6f$  Komplex zusammen mit 15  $\mu\text{M}$  Decylplastochinol (Sigma) als Elektronendonator und 5  $\mu\text{M}$  Plastocyanin aus Spinat als Elektronenakzeptor eingesetzt (Pierre *et al.*, 1995). Das Hinzugeben des Elektronendonors startete die Reaktion, die für zwei Minuten als Abnahme der Absorption von Plastocyanin bei 600 nm (Extinktionskoeffizient:  $\epsilon = 4500 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) aufgezeichnet wurde (Tan & Ho, 1989). Die Auftragung der Daten erfolgte als  $\ln(\Delta\text{OD})$  gegen die Zeit  $t$  (mit  $\Delta\text{OD} = A_t$  (Absorption bei Zeit  $t$ ) -  $A_f$  (Endabsorption)). Die Steigung der resultierenden Gerade ergibt die Konstante  $k$  in  $\text{s}^{-1}$ . Die Geschwindigkeit des Elektronentransfers ( $V$ ) ist gegeben durch:

$$V\left(\frac{\text{mol PC}_{\text{red}}}{\text{s}}\right) = \frac{k \times \Delta\text{OD}}{\epsilon(\text{PC})}$$

Die spezifische Aktivität ist gegeben durch:

$$SA = \frac{V(\text{Probe}) - V(\text{ohne } b_6f)}{\text{mol } b_6f}$$

Für die Redoxdifferenzspektren wurden die Cytochrome mit Natriumascorbat (Cytochrom  $f$ ) bzw. Natriumdithionit (Cytochrom  $f$  und Cytochrom  $b_6$ ) reduziert und mit Hexacyanoferrat (Cytochrom  $f$  und Cytochrom  $b_6$ ) oxidiert. Nach der Aufnahme des Referenzspektrums erfolgte die Zugabe eines Körnchens des Reduktions- bzw. Oxidationsmittels in die Küvette. Es war zu beachten, dass die Reduktion von Cytochrom  $b_6$  einige Minuten dauert.

### 2.1.3 Reinigung von Plastocyanin aus Spinat

Plastocyanin wurde aus Spinat vom lokalen Markt nach dem Protokoll von Anderson *et al.* (Anderson & McCarty, 1969) gereinigt:

1 kg Spinatblätter ohne Stiele vom lokalen Markt wurde homogenisiert, in 1 l Puffer (100 mM Tricine-NaOH (pH 7,5); 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 0,3 M Saccharose und 2,6 g/l BSA) aufgenommen und durch einen Gaze-Watte-Filter gegeben. Das Filtrat wurde 10 Minuten bei 13.500 g zentrifugiert. Die Chloroplasten im Pellet wurden in 60 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM NaCl aufgenommen. Die Suspension wurde tropfenweise zu 600 ml Aceton gegeben, welches auf -20 °C gekühlt war. Die präzipitierten Proteine wurden für 10 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 30 ml 50 mM Tris-HCl, (pH 8,0) aufgenommen. Die Lösung wurde 20 Minuten bei 22 °C stehen gelassen und dann für 15 Minuten bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet noch einmal mit 30 ml des gleichen Puffers wie oben extrahiert und zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde der Überstand auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 45 % gebracht und für 30 Minuten bei 4 °C gerührt. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand über Nacht bei 4 °C dreimal gegen 400 ml 10 mM KPO<sub>4</sub> (pH 7,0) dialysiert. Die folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt: Das Dialysat wurde mit einigen Körnchen von Kalium-Hexacyanoferrat oxidiert und auf eine Anionenaustauschersäule DEAE-Sephadex DE-23 (Ø=1cm, Höhe=10cm) gegeben, die vorher mit 10 mM KPO<sub>4</sub> (pH 7,0) equilibriert worden war. Es wurde mit 20 ml, 20 mM KPO<sub>4</sub> (pH 7,0) gewaschen. Eluiert wurde mit einem Gradienten von KPO<sub>4</sub> (pH 7,0), der von 10 bis 400 mM anstieg. Das Gesamtvolumen war 140 ml und die Fraktionen wurden zu 5 ml gesammelt. Nach Zugabe von Kalium-Hexacyanoferrat wurden die blauen Fraktionen (Plastocyanin) vereinigt und über Nacht gegen drei-mal 5 l 20 mM Tricine (pH 8,0) dialysiert. Die Lösung wurde unter einem Stickstoffdruck von 4 bar über eine Amicon Cellulosemembran mit einer Durchlassgröße von  $M_w = 10.000$  kDa konzentriert. Nach der Konzentration war eine erneute Oxidierung mit einigen Körnchen Kalium-Hexacyanoferrat nötig. Das Kalium-Hexacyanoferrat wurde auf einer Entsalzungssäule 10 DC (BioRad) wieder entfernt. Die Konzentration an Plastocyanin wurde unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{600} = 4,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  zu 5,2 mg/ml ermittelt. Bei -80 °C konnte



das Plastocyanin über Monate und sogar Jahre gelagert werden. Aus 1 kg Spinat konnten 3,5 mg Plastocyanin gereinigt werden.

#### 2.1.4 Reduktion von Decylplastochinon

10 mg Decylplastochinon (Sigma) wurden in 5 ml Diethylether in einem Glasgefäß gelöst und mit 1 ml einer wässrigen Lösung von Natriumdithionit und Natriumborohydrid zu Decylplastochinol reduziert. Dabei wurden die Komponenten unter Lichtabschluss stark geschüttelt, bis die Lösung ihre gelbliche Färbung verlor und farblos wurde (Barr & Crane, 1971). Dann wurden 100 µl einer 0,4%igen Salzsäurelösung dazugegeben, um den Überschuss an Borohydrid zu entfernen. Die wässrige Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und restliches Wasser mit Natriumsulfat entfernt. Nach Übertragung der organischen Phase in ein neues Glasgefäß wurde das Lösungsmittel unter Stickstoff verdampft. Das trockene Decylplastochinol wurde dann in DMSO aufgenommen und mit einem Tropfen 0,4%iger Salzsäurelösung angesäuert.

Der Oxidationszustand und die Konzentration des Decylplastochinons können spektroskopisch ermittelt werden: Decylplastochinon hat ein Absorptionsmaximum bei 254 nm und einen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{254}=16,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ , Decylplastochinol hingegen hat ein Absorptionsmaximum bei 290 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{290}=3,54 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.1.5 2D-Kristallisation

Der Kristallisationsansatz enthielt 400 mM Ammoniumphosphat, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM Hecameg, 1% Glycerin, 1 mg/ml gereinigten Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex sowie eine 1:1 Mischung von Phosphatidylcholin aus Ei und DOPG in unterschiedlicher Konzentration, ähnlich wie in Mosser *et al.* (Mosser et al., 1997) beschrieben. Das Lipid-zu-Protein-Verhältnis (LPR) wurde für jede Proteinreinigung neu bestimmt und lag zwischen 1:2 und 1:4 (w/w). Nach Mischung der Komponenten wurde der Versuchsansatz, der ein Volumen von 80 µl hatte, über Nacht bei 4 °C mit einem kleinen Magnetprüher bewegt. Das Detergenz wurde anschließend durch die Zugabe von 10 mg BioBeads (SM 2 BioBeads, Bio-Rad) bei weiterem Rühren über einen Zeitraum von sechs Stunden bei 4 °C entzogen. Der trübe Überstand wurde dann in ein Eppendorf-Hütchen überführt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Darauf folgten drei

Gefrier- und Auftauzyklen: Die Probe wurde schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann langsam bei 4 °C wieder aufgetaut. Dann wurde die Probe bei 4 °C belassen. Kristalle konnten nach drei Tagen beobachtet werden.

## **2.2 H<sup>+</sup>-ATPase**

### **2.2.1 2D-Kristallisation**

Zur Kristallisation wurde rekombinantes Enzym von Michael G. Palmgren (Department of Plant Biology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Zusammenfassend wurde das Protein folgendermaßen gereinigt: Die Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 aus *Arabidopsis thaliana* wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm INVSc1-HR *MATαhis3Δ1 leu 2 trp1-289 ura3-52*, exprimiert (Jahn *et al.*, 2001). Das Enzym wurde in einem ersten Schritt durch Ni<sup>2+</sup>-Chromatographie gereinigt. Daran schlossen sich eine Ionenaustausch-Chromatographie und eine Reinigung durch hydrophobe Wechselwirkung an. Die Reinheit des Eluats wurde durch die Analyse der Aminosäure-Zusammensetzung geprüft, wobei sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den erwarteten und den experimentellen Werten ergab.

Die Konzentration des Proteins betrug 10 mg/ml in einem Puffer mit 50 mM MES/KOH (pH 6,5), 20% Glycerin, 0,25 mM DTT, 1 mM EDTA und ca. 1% Dodecylmaltosid.

#### **2.2.1.1 Rekonstitution**

Der Kristallisationsansatz enthielt 1 mg/ml der gereinigten H<sup>+</sup>-ATPase AHA2, Phosphatidylcholin aus Ei (Ei-PC, Avanti Polar-Lipids Inc.), welches in 10 mM Dodecylmaltosid gelöst war, in einem Lipid zu Protein Verhältnis von 1:5 (w/w) sowie 20% Glycerin, 20 mM MES/KOH (pH 6,5), 150 mM KCl, 1 mM EDTA und 0,25 mM DTT mit einer Gesamtdetergenzkonzentration von ca. 0,1% Dodecylmaltosid. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 50 µl und wurde zunächst für zwei Stunden bei 22 °C mit einem kleinen Magnetrührer in einem Eppendorfgefäß gerührt. Danach wurde das Detergenz durch die Zugabe von 5 mg BioBeads (SM2 BioBeads, Bio-Rad) unter weiterem Rühren über einen Zeitraum von drei Stunden entzogen. Der leicht trübe Überstand wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Geordnete Vesikel konnten ab diesem Zeitpunkt gefunden werden und waren für einige Tage bei 4°C stabil.

### 2.2.1.2 Oberflächenkristallisation

Gereinigte rekombinante Plasmamembran  $H^+$ -ATPase wurde mit einer Konzentration von 150  $\mu\text{g/ml}$  mit in Dodecylmaltosid (10 mM) gelöstem Phosphatidylcholin aus Ei in einem Lipid zu Protein-Verhältnis von 1:3 (w/w) gemischt und in eine Vertiefung ( $\varnothing = 6 \text{ mm}$ , Tiefe = 1 mm) einer Teflon<sup>®</sup>-Platte (6×3×0,5 cm) gegeben. Der Puffer bestand aus 20 mM MES/KOH (pH 6,5), 20% Glycerin, 150 mM KCl und ca. 0,1% Dodecylmaltosid. Der Tropfen mit einem Volumen von 37  $\mu\text{l}$  wurde mit einer Einzelschicht der fluorierten Lipide bedeckt, indem 0,5-1  $\mu\text{l}$  der Arbeitslösung (Verbindung 1 und 2 in Abb. 5 in einem Verhältnis von 1:6 (w/w) in Chloroform/Hexan 1:1 (v/v) mit einer Molarität von insgesamt 500  $\mu\text{M}$ ) auf die Tropfenoberfläche gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 20 °C in einer Feuchtkammer wurden 8-10 BioBeads (SM2 BioBeads, Bio-Rad) durch einen Kanal - um die Tropfenoberfläche nicht zu stören (Abb. 7) - zugeführt. Über einen Zeitraum von weiteren 24 Stunden bildeten sich die zweidimensionalen Kristalle an der Tropfenoberfläche.

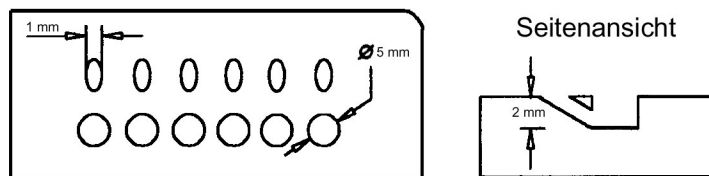


Abb. 7: Teflon-Platte mit Vertiefungen für die Oberflächenkristallisation. Die Teflon-Platten besaßen sechs Vertiefungen für ein Volumen von ca. 37  $\mu\text{l}$ . Von der Seite mündete zu jeder Vertiefung ein Kanal, der für das Einbringen von BioBeads vorgesehen war.

## 2.3 Elektronenmikroskopie

### 2.3.1 Probenvorbereitung

Um eine Probe auf ein elektronenmikroskopisches Netzchen auftragen zu können, muss das Netzchen mit einem Kohlefilm beschichtet werden. Dazu wurde eine dünne Kohleschicht (ca. 20-30 nm) in einem Edwards 306 Bedampfungsapparat bei einem Druck von  $1 \times 10^{-7}$  Torr durch Verdampfen eines Kohlestiftes (Agar Aids) auf frisch gespaltenem Glimmer aufgebracht. Der Kohlefilm wurde danach auf eine Wasseroberfläche überführt und durch Ablassen des Wassers auf darunterliegende Netzchen gebracht.

Elektronenmikroskopische Negative wurden an einem Philips CM 12 Transmissionselektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV, bei einer Vergrößerung von 45.000 $\times$  unter Niedrigdosisbedingungen bei einem Kippwinkel von 0 $^\circ$  aufgenommen. Dabei wurde das Netzchen bei niedriger Vergrößerung durchsucht und in einem an den 2D-Kristall angrenzenden Bereich fokussiert (Unwin & Henderson, 1975). Das Mikroskop war mit einer LaB<sub>6</sub>-Elektronenquelle ausgestattet und die Gesamtdosis betrug 10 e/ $\text{Å}^2$ . Der Film (Kodak SO-163) wurde in unverdünntem Entwickler (Kodak D19) für 12 Minuten entwickelt.

### **2.3.2 Cytochrom *b<sub>f</sub>***

Negativ gefärbte Proben wurden hergestellt durch Auftragen von 3 $\mu$ l der Kristalllösung auf ein mit Kohlefilm überzogenes elektronenmikroskopisches Netzchen. Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier Whatman No. 4 von der Seite abgesaugt und die Probe sofort mit zweimal 3  $\mu$ l 2% Uranylacetat für 30 Sekunden auf dem Netzchen gefärbt. Das Uranylacetat wurde jeweils wieder durch absaugen mit Filterpapier entfernt und das Präparat kurz an der Luft getrocknet. Die Aufnahmen im Elektronenmikroskop wurden dann bei Raumtemperatur gemacht.

### **2.3.3 Rekonstitution der H<sup>+</sup>-ATPase**

Für Aufnahmen der Kristalle aus den Rekonstitutionsversuchen unter Kryo-Bedingungen (Dubochet et al., 1988) wurden 2  $\mu$ l des Kristallisationsansatzes in ein kleines Volumen (ca. 2  $\mu$ l) 5%iger Glukoselösung auf einem Kupfer-Netzchen injiziert. Durch zweimaliges Wiederaufnehmen der Probe mit der Pipette wurde eine Mischung erreicht. Überschüssige Flüssigkeit wurde von der Seite mit Filterpapier Whatman No. 4 abgesaugt, so dass nur noch ein dünner Flüssigkeitsfilm übrig blieb. Das Netzchen wurde dann schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren und in eine Gatan-Kryo-Station überführt. Bilder wurden bei einer Temperatur von 100 K (flüssiger Stickstoff) aufgenommen. Negative wurde mittels optischer Beugung auf ihre Qualität geprüft und mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware der MRC Programmsuite prozessiert.

### **2.3.4 Oberflächenkristallisation der H<sup>+</sup>-ATPase**

Für den Transfer auf ein elektronenmikroskopisches Netzchen wurden Goldnetzchen benutzt, die mit einem Kohlefilm überzogen waren. Um den Kohlefilm möglichst hydrophob zu

machen, wurden die befilmten Netzen für eine Stunde bei 150 °C gebacken. Vor dem Auflegen der Netzen auf den Tropfen wurde das Tropfenvolumen mit dem Kristallisationspuffer (ohne Detergenz) so eingestellt, dass der Tropfen eine möglichst ebene Oberfläche hatte. Die Netzen wurden von oben auf die Tropfenoberfläche aufgelegt und nach 0,5-10 Minuten wieder nach oben hin abgenommen. Das Netzchen wurde in eine Feuchtkammer überführt und die überschüssige Flüssigkeit durch Absaugen mit Filterpapier Whatman No. 4 entfernt. Das Netzchen wurde dann mittels einer Guillotine in flüssigem Ethan eingefroren. Wahlweise wurden die Proben auch mit 0,5 % Tannin (pH 6,5) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## **2.4 Bildverarbeitung**

Die aufgenommenen Negative wurden an einer optischen Bank auf ihre Qualität geprüft. Durch Beugung von kohärentem Licht (Laserlicht) am Negativ der elektronenmikroskopischen Aufnahme konnte ein Powerspektrum sichtbar gemacht werden. An einer optischen Bank wird dabei ein Detektor über einem Linsensystem angebracht, der ein optisches Beugungsmuster aufnimmt. Die Größe des bestrahlten Bereichs konnte durch Blenden variiert werden. So konnte die Größe und Qualität der Kristalle in einfacher Weise bestimmt und der zu digitalisierende Bereich festgelegt werden. Zusätzlich ließen sich auch Aussagen über die Bildqualität machen. Im Diffraktogramm markieren dunkle Ringe, die durch Beugung am amorphen Kohleträgerfilm entstehen, Übertragungslücken, in denen die Information der entsprechenden Ortsfrequenzen fehlt. Sie werden als sog. Thon-Ringe bezeichnet. In den hellen Bereichen erscheinen die von der Mitte aus als Negativ- und Positivkontrast übertragenen Quadrate der Amplituden der Ortsfrequenzen. Das Objekt wird in diesen Bereichen im Hinblick auf bestimmte Strukturdetails (Ortsfrequenzen) unvollständig oder mit dem falschen Kontrast abgebildet. Mit Hilfe der Thon-Ringe, die durch Beugung des amorphen Kohleträgerfilms entstehen, können die Höhe des Unterfokus und Abbildungsfehler leicht am Diffraktogramm erkannt werden. Astigmatismus resultiert aus unterschiedlicher Fokussierung in senkrecht zueinanderstehenden Bildrichtungen. Sie entstehen durch Verzerrungen des elektromagnetischen Feldes der Mikroskoplinsen und sollten eigentlich vor der Aufnahme korrigiert werden. Die Powerspektren von astigmatischen Bildern zeigen elliptische Thon-Ringe. Drift hingegen führt zu unvollständig ausgebildeten und verwischten Thon-Ringen in

Richtung der Bewegung. Besonders bei der Kryo-Elektronenmikroskopie stellt die Bewegung des Probenhalters aufgrund von thermischer Instabilität ein Problem dar. Die Vollständigkeit der Reflexe und die Lage der äußersten Reflexe lassen eine Aussage über die zu erwartende Auflösung zu.

### **Digitalisierung der Negative**

Negative wurden mit Hilfe eines Zeiss SCAI CCD-Linien-Scanners digitalisiert. Ein Strukturelement wird theoretisch gelöst, wenn es durch mindestens zwei Pixel erfasst wird (DeRosier & Klug, 1968). Das bedeutet für die Pixelgröße auf der Objektebene  $P_o$ , dass die maximale Auflösung bei  $d = 2 P_o$  liegt. In der Praxis wird man eine etwas feinere Digitalisierung wählen, so dass für die Pixelgröße  $P_d$ , mit der das Negativ digitalisiert wird, gilt:  $P_d \leq 0,33 \times d \times V$ , wobei  $V$  die Vergrößerung des Mikroskops ist (Henderson, 1995). In der Regel wurde ein Teilbereich von  $4000 \times 4000$  Pixel bei einer Schrittgröße von  $7 \mu\text{m}$  aufgenommen. Alle Aufnahmen sind bei einer Vergrößerung von  $45.000\times$  gemacht worden, was bei einer Schrittgröße von  $7 \mu\text{m}$  einer Auflösung von  $1,6 \text{ \AA}$  entspricht. Wie oben beschrieben, geht man davon aus, dass die Schrittgröße ein Drittel der zu erwartenden Auflösung betragen sollte, was in diesem Fall einer maximal erreichbaren Auflösung von  $4,8 \text{ \AA}$  entsprechen würde.

### **Computer und Bildverarbeitungsprogramme**

Die zur Datenverarbeitung benutzten Programme entstammten der MRC Programmsuite (Crowther *et al.*, 1996). Die MRC Programmsuite enthält ungefähr 80 FORTRAN-Routinen, die in sogenannten Skripten zusammengefasst werden. Die Programme wurden auf einem Alpha-Server 4100, ausgestattet mit 4 Prozessoreinheiten, die je auf 400 MHz getaktet waren, ausgeführt.

Zu Beginn der Bildverarbeitung wird die Bildinformation des digitalisierten Bildes reduziert, indem das Programm LABEL jeweils  $2 \times 2$  Pixel mittelt (Abb. 8). Dies ist zulässig, da für die Ermittlung der Verschiebungsvektoren, die zum Entzerren des Gitters dienen, nicht die maximale Auflösung des Bildes gebraucht wird. Von dem reduzierten Bild wird dann eine Fourier-Transformation (FT) berechnet und auf dem Bildschirm wiedergegeben. Per Hand

werden die Reflexe indiziert und so die Gitterparameter für jedes einzelne Bild ermittelt. Reflexe mit ausreichender Signalintensität auf der Position des berechneten Gitters werden für die Fensterfilterung ausgewählt. Dazu wird eine Maske über die FT gelegt, die nur an den ausgewählten Reflexen durchlässig ist (MASKTRAN). Aus dem gefilterten Bild wird ein Referenzbereich ausgeschnitten (BOXIMAGE), dessen FT mit der FT des maskierten Bildes multipliziert wird (TWOFILE). Daraus ergibt sich eine Kreuzkorrelationskarte, die Maxima in Positionen aufweist, in der die Übereinstimmung der Referenzstruktur mit der Kristallstruktur am höchsten ist. Nach Rücktransformation wird die Kreuzkorrelationskarte mit Hilfe eines Suchprofils, welches auch aus dem gefilterten Bild durch das Programm AUTOCORRL erzeugt wurde, durchsucht (QUADSERCH). Dabei werden die Korrelationsmaxima ermittelt und die Verschiebungsvektoren erstellt. Mit Hilfe von CCUNBEND werden die Verschiebungsvektoren auf das Rohbild angewendet und so der Kristall entzerrt, d. h. die Einheitszellen werden ausgeschnitten und auf ihre ideale Position verschoben. Das entzerrte Bild hat nun weniger Kristallfehler und wird in einer zweiten Runde weiter verbessert. Bereiche ohne Korrelationsmaxima sind nicht kristallin und werden zuvor mit Hilfe von BOXIMAGE herausgeschnitten.

Durch Darstellung der FT des Rohbildes lässt sich der erste Nulldurchgang der Kontrasttransferfunktion feststellen und der Unterfokus exakt ermitteln. Das Programm MMBOX nutzt diesen Wert, um den Kontrast der Amplituden und das Vorzeichen der Phasen entsprechend der Kontrasttransferfunktion zu korrigieren und liest die Strukturfaktoren aus. Mit Hilfe des Programms AVRGAmps werden die Amplituden und Phasen verschiedener Bilder gemittelt. Das Programm FOMSTATS nutzt die Zweiersymmetrie, in der nur die Phasenwerte  $0^\circ$  oder  $180^\circ$  möglich sind und rundet den Phasenwert für jeden Reflex zum nächstliegenden Wert. Aus der Liste der Reflexe mit den zugehörigen Amplituden und Phasen wurden die Projektionsdichtekarten unter Verwendung der CCP4 Programmsuite erstellt (Collaborative Computational Project, 1994).

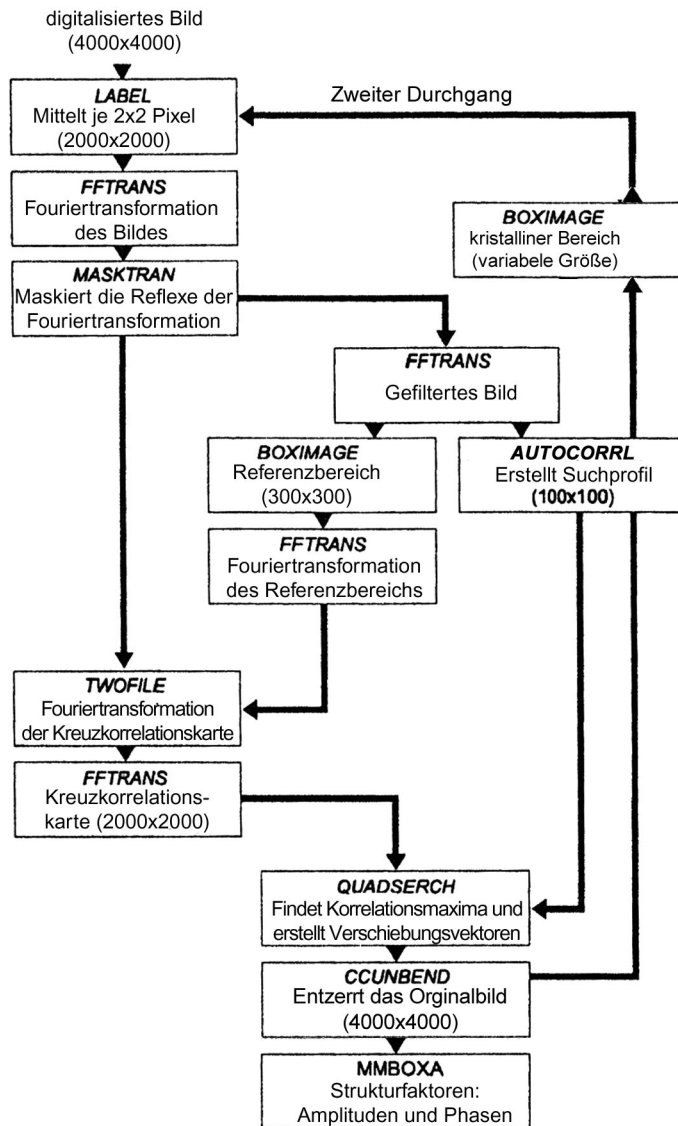


Abb. 8: Flussdiagramm zur Bildverarbeitung von 2D-Kristallen. Durch Kreuzkorrelationsmethoden und Reinterpolation des Bildes können Kristallfehler korrigiert werden. Dadurch kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Angefertigt nach (Kunji et al., 2000)..

## 2.5 Modell

Zur Erstellung eines Strukturmodells der Plasmamembran  $H^+$ -ATPase von *N. crassa* unter Verwendung der experimentell gelösten Struktur der  $Ca^{2+}$ -ATPase (Toyoshima et al., 2000) wurde das Programm MODELLER in der Version 4 eingesetzt (Sali & Blundell, 1993).



Als Grundlage für das Sequenzalignment diente ein mit dem Programm CLUSTALW (Thompson et al., 1994) erstelltes "Multi-Sequence-Alignment" von 30 P-Typ-ATPasen. Die große Zahl der verwandten Sequenzen machte es möglich, auch weniger konservierte Regionen auffindig zu machen und für das Alignment zwischen der Ca<sup>2+</sup>-ATPase und der H<sup>+</sup>-ATPase zu nutzen. Anschließend wurde das Alignment visuell begutachtet. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass Insertionen und Deletionen nicht in Transmembranhelices, anderen  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern auftraten. Vom Programm MODELLER wurde daraufhin automatisch ein 3D-Modell mit allen nicht-Wasserstoffatomen erstellt, welches die Vorgaben für Entfernungen, Atomwinkel und dihedrale Winkel von der Ca<sup>2+</sup>-ATPase Struktur und von der CHARMM-22-Datenbank möglichst gut erfüllte. Die CHARMM-22-Datenbank enthält Energie- und Kraftparameter, die dafür sorgen, dass die Atome des Modells in einer korrekten Stereochemie vorliegen. Danach führte das Programm eine Optimierung des Modells mittels Energieminimierung und Molekulardynamik durch.

Die Qualität des Modells wurde mit Hilfe des MODELLER -Befehls ENERGY beurteilt.

Das Modell wurde benutzt, um es in die Elektronendichtekarte der H<sup>+</sup>-ATPase aus *N. crassa*, welche von Auer *et al.* erstellt wurde, mit Hilfe des Programms „O“ (Jones *et al.*, 1991) einzupassen (persönliche Mitteilung W. Kühlbrandt). Dazu wurden die einzelnen Domänen als unabhängige Körper verschoben und so orientiert, dass eine größtmögliche Übereinstimmung zwischen der Elektronendichtekarte und dem Modell erzielt wurde.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Cytochrom *b<sub>6</sub>f*

#### 3.1.1 Proteinreinigung

Durch den eigenen Anbau des Spinats in Hydrokultur unter den kontrollierten Bedingungen einer Kulturkammer konnte die Reproduzierbarkeit der Präparation wesentlich erhöht werden. Damit konnten jahreszeitliche Schwankungen, dem die Qualität des Spinats vom lokalen Markt unterliegt, vermieden werden. Der Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex wurde in drei Schritten aus den Chloroplastenmembranen isoliert. Diese Schritte waren die selektive Solubilisierung des Proteins, die Reinigung über einen Saccharosegradienten sowie eine Hydroxyapatit-Säule.

Im ersten Schritt wurde durch eine selektive Solubilisierung mit dem nicht-ionischen Detergenz Hecameg vorzugsweise der Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex aus den Thylakoidmembranen herausgelöst. Es war wichtig, bei der Solubilisierung die optimale Konzentration an Hecameg für die verschiedenen Membranpräparationen zu ermitteln, um so eine höchstmögliche Selektivität zu erreichen. Die effektivste Detergenzkonzentration lag meist im Bereich von 32 mM. In Abb. 9 ist ein Vergleich von Pellet (Spur 1) und Überstand (Spur 2) des Solubilisierungsschrittes dargestellt, aus dem erkennbar ist, dass tatsächlich der Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex bevorzugt in Lösung ging. In einem zweiten Schritt wurde der Überstand auf einem 10-30 %igen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die braune Bande im Gradient (Abb. 10) enthielt nach der Zentrifugation hauptsächlich den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex (Spur 3). Im letzten Schritt der Reinigung wurde diese Bande auf eine Hydroxyapatit-Säule geladen, von welcher der gereinigte Komplex eluiert werden konnte (Spur 4). Außer den vier Hauptuntereinheiten enthielt der Komplex kleine Untereinheiten mit einer Größe von ca. 4 kDa, welche in einem 10-20 %igen SDS-PAGE Gradientengel sichtbar sind (Spur 5). Die Präparation war weitgehend frei von anderen Polypeptiden und konnte mit einer Konzentration von 5 bis >10 mg/ml eluiert werden. Der durchschnittliche Ertrag einer Präparation war ungefähr 20 mg Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex pro kg frischer Spinatblätter.

Der Komplex wird als Dimer gereinigt. Bei höheren Detergenzkonzentrationen (> 50 mM Hecameg) erscheint eine Bande des monomeren Komplexes im Saccharosegradienten. Da der monomere Komplex leicht das Rieske-Protein und somit seine Aktivität verliert, wurde die

Detergenzkonzentration so gering wie möglich gehalten, um das Protein im dimeren Zustand zu halten. Die Anwesenheit von Phosphatidylcholin während der Präparation bewirkte in dieser Hinsicht eine wesentliche Stabilisierung des Komplexes.

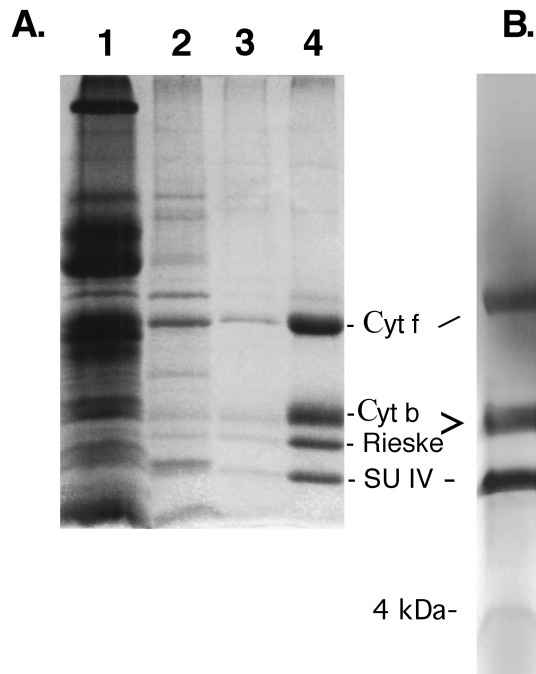


Abb. 9: **A:** Reinigung von Cytochrom  $b_6f$  Komplex aus Spinat. Pellet (Spur 1) und Überstand (Spur 2) nach der Solubilisierung von Thylakoidmembranen mit 32,5 mM Hecameg. Mit Cytochrom  $b_6f$  angereicherte Fraktion des Saccharosegradienten (Spur 3) und Eluat von der Hydroxyapatit-Säule (Spur 4) auf einem 12,5 % SDS-PAGE. Das Gel wurde mit Coomassie Blau gefärbt. **B:** Gereinigter Cytochrom  $b_6f$  Komplex mit sichtbaren 4 kDa Untereinheiten auf einem 10-20 %igen SDS-PAGE Gradientengel mit Silberfärbung. Unter diesen Bedingungen sind die kleinen Untereinheiten sichtbar, wohingegen Cytochrom  $b_6$  und das Rieske-Protein als eine Bande erscheinen.

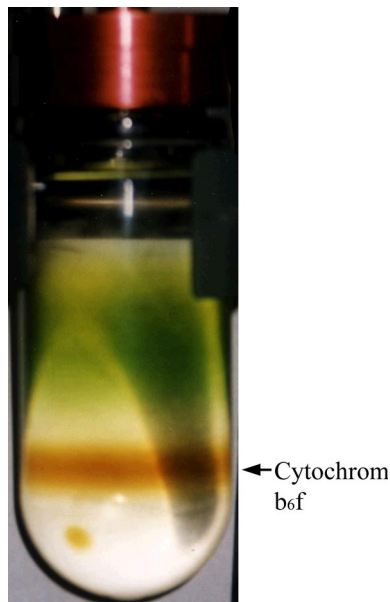


Abb. 10: 10-30 %iger Saccharosegradient mit sichtbarer Cytochrom  $b_6f$  Bande nach einer Zentrifugation bei 180.000 g und 10°C für 16 Stunden.

### 3.1.2 Spektroskopie

Das Absorptionsspektrum des gereinigten Cytochrom  $b_6f$  Komplexes ist in Abb. 11 zu sehen. Zu den kürzeren Wellenlängen des Spektrums hin ist die Soret-Bande der gebundenen Pigmente (Chlorophyll  $a$  und zwei Häme) bei 421 nm sichtbar. Die Bande bei 668 nm weist auf das Vorhandensein von Chlorophyll  $a$  hin. Unter Zuhilfenahme der Extinktionskoeffizienten ( $20 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  bei 554 nm für Cytochrom  $f$  (Cramer & Whitmarsh, 1977) und  $82 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  bei 669 nm für Chlorophyll  $a$  (Hoff & Ames, 1991)) lässt sich aus den Absorptionsspektren verschiedener Aufreinigungen ein Verhältnis von Chlorophyll  $a$  zu Cytochrom  $f$  von  $1 \pm 0,14$  ermitteln, wie es auch schon früher gezeigt wurde (Huang *et al.*, 1994). Neben dem Chlorophyll  $a$  gibt es ein weiteres Pigment, welches annähernd stöchiometrisch am  $b_6f$  Komplex gebunden ist - ein  $\beta$ -Carotin. Es ist im Absorptionsspektrum (Abb. 11) als Maximum bei 484 nm erkennbar.

Zur Unterscheidung von Cytochrom  $f$  und Cytochrom  $b_6$  können Redoxdifferenzspektren aufgenommen werden. Cytochrom  $f$  kann selektiv mit Ascorbat reduziert werden, wohingegen die Reduktion der Häme des Cytochrom  $b_6$  die größere Reduktionskraft von Dithionit benötigt. Die Redoxdifferenzspektren zeigen die Anwesenheit von Cytochrom  $f$  mit Absorptionsmaxima bei 523 und 554 nm und von Cytochrom  $b_6$  bei 534 und 563 nm (Abb. 11, Einsatz). Das daraus errechnete Verhältnis von Häm  $b$  zu Häm  $f$  von 2 ( $1,87 \pm 0,2$ ) stimmt mit publizierten Daten überein (Huang *et al.*, 1994). Es gibt also im Monomer ein Cytochrom  $b_6$  mit 2 Hämgruppen pro Cytochrom  $f$  mit einem  $c$ -Typ Häm, wie es auch für den Cytochrom  $bc_1$  bekannt ist (Xia *et al.*, 1997b).

Damit zeigt die Präparation alle charakteristischen Eigenschaften eines vollständigen Cytochrom  $b_6f$  Komplexes.

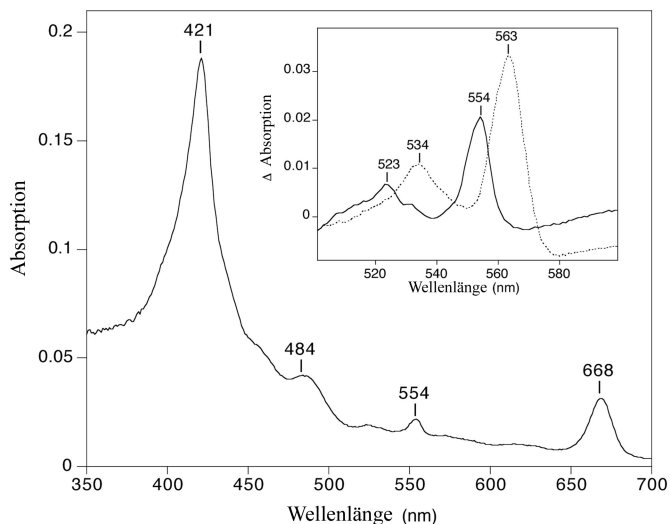


Abb. 11: Absorptionsspektrum des gereinigten, Ascorbat-reduzierten Cytochrom  $b_6f$  Komplexes. Einsatz: Differenzspektrum von Ascorbat-reduziertem minus Hexacyanoferrat-oxidiertem (durchgezogene Linie) sowie Natriumdithionit-reduziertem minus Ascorbat-reduziertem  $b_6f$  Komplex (gestrichelte Linie).

### 3.1.3 Aktivitätstest

Um die Aktivität des gereinigten Komplexes zu bestimmen, wurde die Elektronentransferrate von dem synthetischen Substrat Decylplastoquinol ( $C_{10}$ -PQH<sub>2</sub>) zu dem natürlichen Akzeptor Plastocyanin (aus Spinat) gemessen. Die Reaktion kann spektroskopisch verfolgt werden, da Plastocyanin im oxidierten Zustand ein Absorptionsmaximum bei 600 nm hat, welches im reduzierten Zustand verschwindet (Tan & Ho, 1989). Für das Experiment wurde zunächst in Ethanol gelöstes Plastoquinol verwendet (Hurt & Hauska, 1981). Es stellte sich im Laufe der Versuche heraus, dass Ethanol den Aktivitätstest beeinflusste: Es wurde eine unerwünschte Hintergrundreaktion ausgelöst, welche sich in einer kurzzeitigen Erhöhung der Absorption widerspiegelte, gefolgt von einem rasanten Abfall, der sogar in Abwesenheit des Elektronendonors (nur Ethanol) stattfand. Eine verlässliche Aufzeichnung der Absorptionsdaten wurde dadurch erschwert, und der Aktivitätstest war folglich schlecht reproduzierbar. Wird der Elektronendonor jedoch in Dimethylsulfoxid (DMSO) an Stelle von Ethanol gelöst, so verschwindet die oben beschriebene Hintergrundreaktion.

In sechs Experimenten mit Cytochrom  $b_6f$  Komplex aus zwei unterschiedlichen Reinigungen (je drei Experimente) wurde ein Elektronentransport von  $450 \pm 60$  Elektronen pro Sekunde

( $e^-/s$ ) gemessen (Abb. 12). Dieser Wert liegt weit über denen, die bisher für alle Präparationen des Komplexes aus Spinat oder anderen Organismen berichtet wurden (vgl. Diskussion).

Die Präparation wurde bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt und zeigte auch nach einer Lagerung von einigen Monaten keinen Verlust an Aktivität.

Insgesamt ist das Reinigungsprotokoll sehr effizient und durch die gute Verfügbarkeit von Spinat können auch größere Mengen an Protein gereinigt werden. Somit stellt das System einen idealen Startpunkt für Kristallisationsexperimente dar.

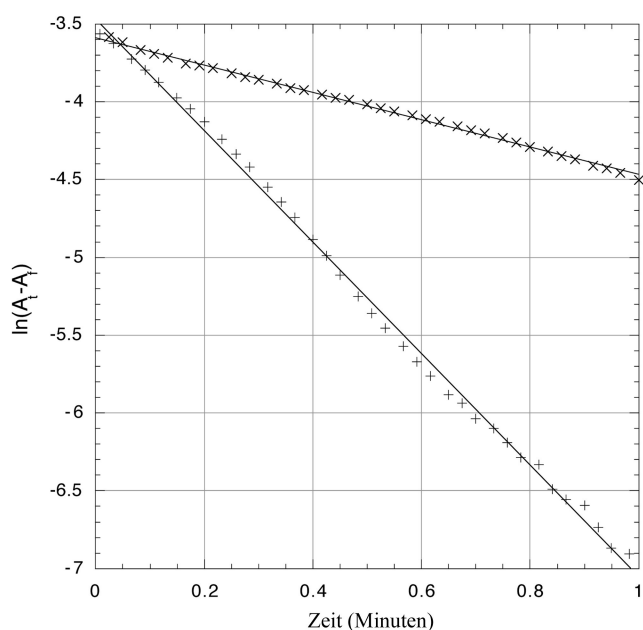


Abb. 12: Elektronentransferrate des gereinigten Cytochrom  $b_6$  Komplexes. Das Testmedium enthielt  $0,3\text{ mM DDM}$ ,  $20\text{ mM Tricin (pH 7,5)}$ ,  $5\text{ }\mu\text{M Plastocyanin}$  und  $0,5\text{ nM Cytochrom }b_6$ . Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Decylplastochinol ( $15\text{ }\mu\text{M}$ ), welches in DMSO gelöst war, gestartet. Sie wurde als Absorptionsabnahme von Plastocyanin bei  $600\text{ nm}$  (+) gemessen. Die zweite Kurve (x) zeigt die unkatalysierte Hintergrundreaktion ohne Enzym.

### 3.1.4 2D-Kristallisation

Das gereinigte Protein wurde in einer Mischung aus Phosphatidylcholin aus Ei und dem synthetisch hergestellten Lipid DOPG - beide in Hecameg gelöst - rekonstituiert. Nach drei Tagen konnten mit Hilfe des Elektronenmikroskops Kristalle in der Präparation beobachtet werden. Es wurden zweidimensionale Kristalle mit unterschiedlicher Morphologie gefunden: Es gab tubuläre Kristalle, welche ungeordneten Vesikeln entsprangen (Abb. 13 a). Die Größe

variierte stark. Sie waren 50-70 nm breit und hatten eine Länge von bis zu 1,5  $\mu\text{m}$ . Das Protein war helikal angeordnet und die Röhren zeigten in Negativfärbung eine für helikal geordnete Strukturen typische optische Beugung in Form von "Layer-Lines" bis ungefähr 35  $\text{\AA}$ .

Große Vesikel mit einem Durchmesser von bis zu 2  $\mu\text{m}$  wurden gebildet, wenn nach dem Detergenzentzug eine geringe Menge von Detergenz wieder zugegeben wurde, die allerdings nicht zu einer Auflösung der Vesikel führte, sondern ihre Fusion anregte. Bei diesen Vesikeln konnten mosaikartig verteilte kristalline Bereiche entdeckt werden (Abb. 13 b), die aber nur in einer Richtung geordnet waren, wie sich aus dem optischen Beugungsmuster schließen ließ, da nur *eine* Reihe von Reflexen in eine Richtung zu erkennen war.

Mehrschichtige Kristalle haben sich als die am besten geordnete Kristallform gezeigt, obwohl sie selten und schwierig zu reproduzieren waren. Abb. 13 c zeigt die mehrschichtige Morphologie eines solchen Kristalls. Deutlich sind hier die verschiedenen Graustufen zu erkennen, die der unterschiedlichen Anzahl von Schichten im Kristall entsprechen. Die optische Beugung dieses Kristalls reichte bis 20  $\text{\AA}$  bei negativer Färbung. Daraus lässt sich schließen, dass die einzelnen Schichten perfekt ausgerichtet übereinander liegen. Ohne diese Voraussetzung wäre es nicht möglich, eine Projektionsdichtekarte zu erstellen und sie zu interpretieren.

Das elektronenmikroskopische Bild eines negativ gefärbten, mehrschichtigen Kristalls (Abb. 13 c) wurde mit den Bildverarbeitungsprogrammen des MRC-Pakets analysiert. Abb. 13 d zeigt ein berechnetes Beugungsmuster dieses Kristalls. Die Einheitszelle ist definiert durch  $a = 176 \text{\AA}$ ,  $b = 66 \text{\AA}$  und  $\gamma = 90^\circ$ . Die Symmetrie wurde vom MRC-Programm ALLSPACE als  $p22_12_1$  erkannt. Der gemittelte Phasenfehler war  $24,7^\circ$  ( $45^\circ$  würden einer zufälligen Verteilung entsprechen) (Tabelle 1). Das bedeutet, dass bei Anwendung dieser Symmetrie sinnvolle Werte für die symmetrisch verbundenen Reflexe ermittelt wurden. Zwar sind die bei dieser Symmetrie zu erwartenden systematischen Abwesenheiten nicht sichtbar, aber das liegt wahrscheinlich in der unterschiedlichen Anfärbung der zwei Seiten des Kristalls beim negativen Färben (Amos et al., 1982).

Eine Projektionskarte des Moleküls bei einer Auflösung von 20  $\text{\AA}$  zeigt eine dimere Organisation des Komplexes (Abb. 13 e). Ein Vergleich mit der Projektionskarte des

Cytochrom *b<sub>6</sub>f* aus *C. reinhardtii* in negativer Färbung zeigte die gleiche Symmetrie und eine ähnliche Einheitszelle (*C. reinhardtii*:  $a = 175 \text{ \AA}$ ,  $b = 68 \text{ \AA}$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ) (Mosser et al., 1997). Allerdings ergaben sich Unterschiede in den Projektionen der beiden Dimere (Abb. 13 e, f). So ist der Abstand zwischen den Dichtezentren der Monomere in den Kristallen des Spinat-Komplexes kleiner und auch der Winkel der Monomere in einem Dimer zueinander ist unterschiedlich.

*Tabelle 1: Kristallographische Daten zur Projektionskarte der Kristalle des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes.*

Symmetrie	$p22_12_1$
Zellkonstanten	$a = 176 \text{ \AA}$ , $b = 66 \text{ \AA}$ und $\gamma = 90^\circ$
Anzahl der Bilder	1
Defokusbereich	$16700 \text{ \AA}$
Anzahl der gemittelten Amplituden und Phasen	59
Anzahl der unabhängigen Struktur faktoren	16
Mittlerer Phasenfehler bis $9 \text{ \AA}$	$12.6^{(a)}$

<sup>(a)</sup> Mittlerer Phasenfehler bei Vergleich aller symmetriebezogenen Reflexe, ohne ihre Abweichung von  $0$  oder  $180^\circ$ ;  $90^\circ$  würde einer zufälligen Verteilung entsprechen.



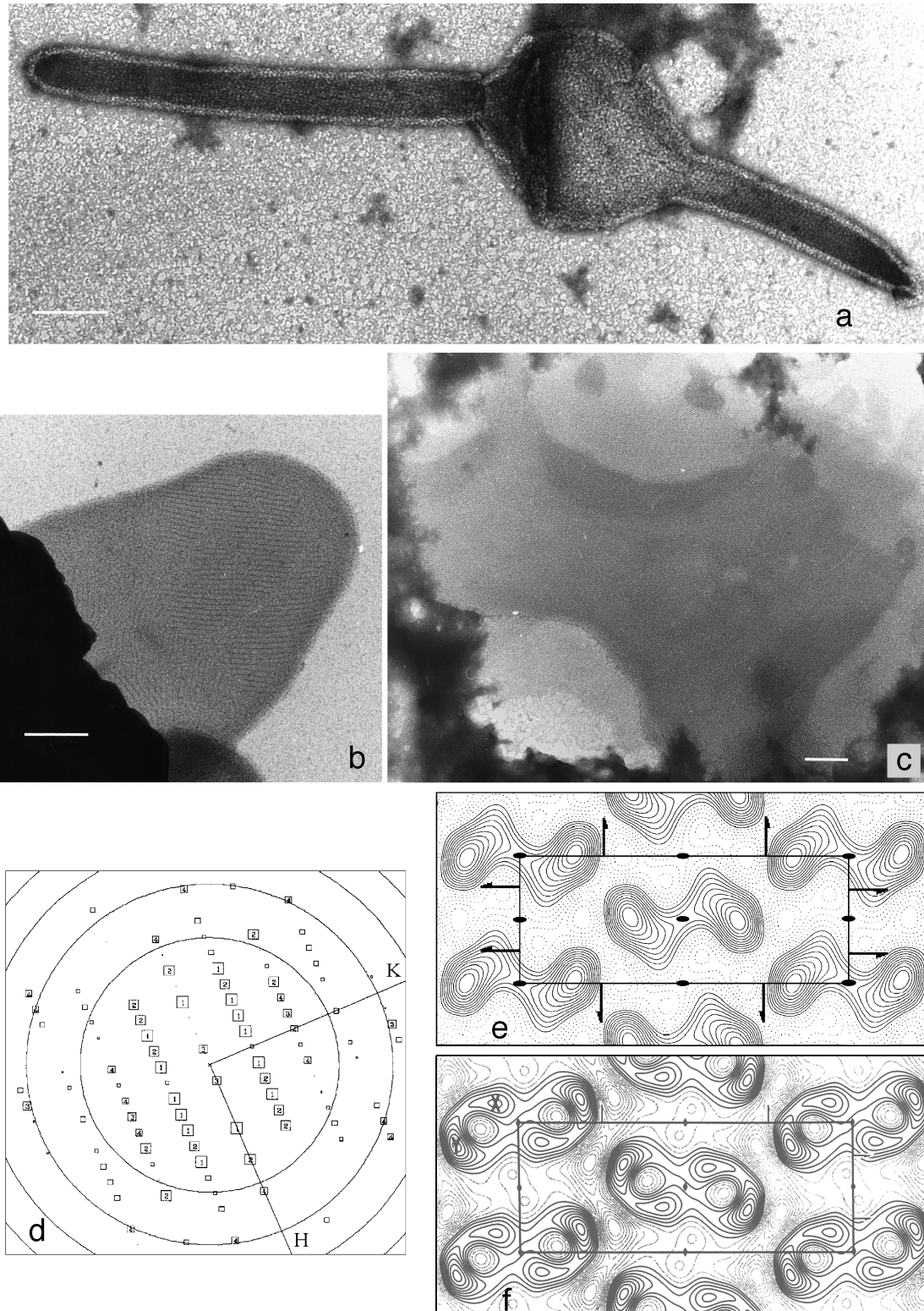


Abb. 13. **a-c**: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von negativ gefärbten Proben verschiedener Kristallformen des Cytochrom  $b_6/f$  Komplexes aus Spinat. Der Größenmaßstab entspricht  $0,1 \mu\text{m}$ . **d**: Berechnetes Beugungsmuster des in **c** gezeigten Kristalls nach dem Entzerren des Kristallgitters. Die Kästchen zeigen die Qualität der Reflexe an, wobei große Kästchen und kleine Nummern für ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis stehen (Henderson

et al., 1986). Die Kreise zeigen den Nulldurchgang der Kontrast-Übergangsfunktion an. Die Auflösung am Rand der Grafik ist 15 Å. **e**: Projektionskarte des Cytochrom  $b_6f$  Komplexes in negativer Färbung mit festgelegter  $p22_12_1$ -Symmetrie bei einer Auflösung von 20 Å. Die Einheitszelle ist  $a = 176$  Å,  $b = 66$  Å und  $\gamma = 90^\circ$ . Durchgezogene Linien zeigen die farbstoffausschließenden Proteindichten. **f**: Entnommen aus (Mosser et al., 1997). Projektionskarte des Cytochrom  $b_6f$  Komplexes aus *C. reinhardtii* bei einer Auflösung von 20 Å in negativer Färbung. Es wurde eine  $p22_12_1$ -Symmetrie angenommen. Die Einheitszelle ist  $a = 175$  Å,  $b = 68$  Å,  $\gamma = 90^\circ$ .

## 3.2 $H^+$ -ATPase

Jahn et al. ist es gelungen, in großem Maßstab rekombinante  $H^+$ -ATPase AHA2 aus *A. thaliana*, die mit einem His<sub>6</sub>-Tag ausgestattet war, in *S. cerevisiae* zu exprimieren und anschließend zu reinigen. Die spezifische Aktivität war die höchste, die für eine rekombinante P-Typ-ATPase bisher beschrieben worden ist. Dieses Protein wurde von M. Palmgren, Kopenhagen, für 2D-Kristallisationsexperimente zur Verfügung gestellt.

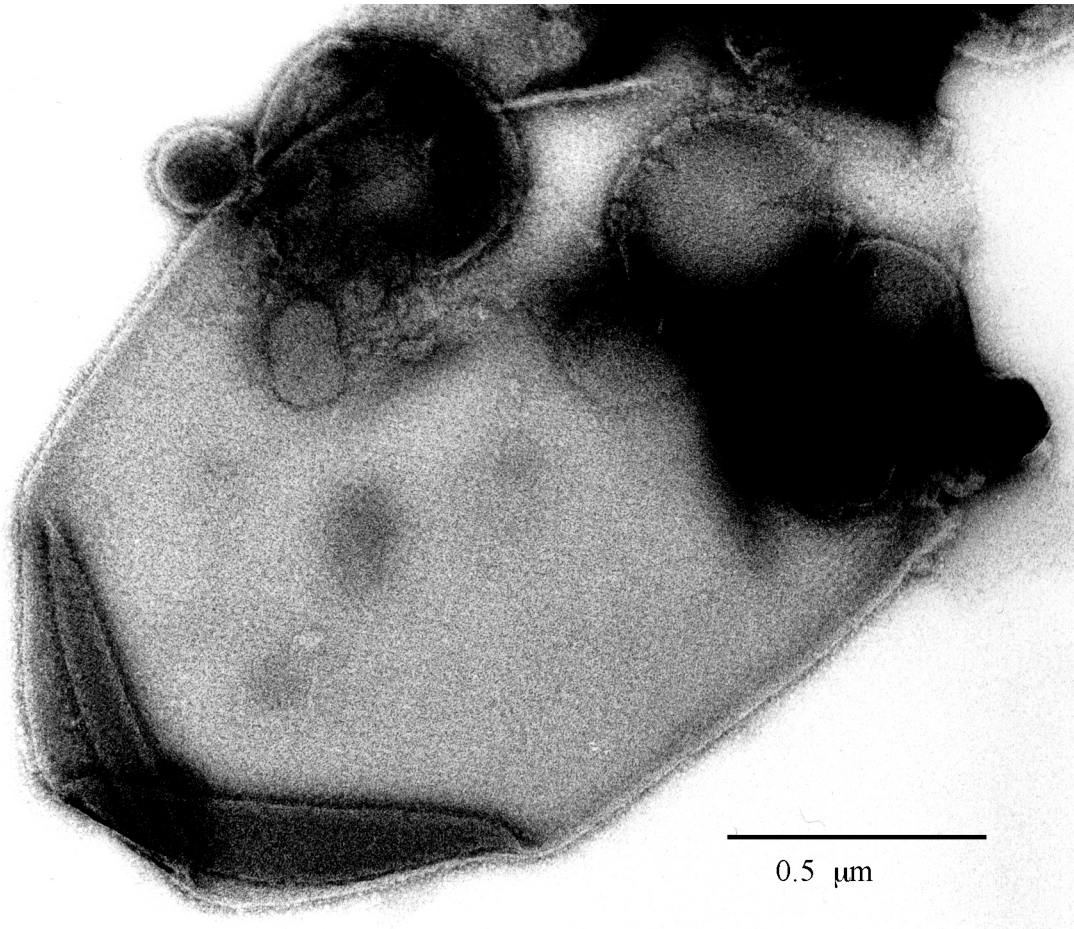
### 3.2.1 Kristallisation durch Rekonstitution

Für eine Rekonstitution der in dem Detergenz Dodecylmaltosid gelösten Plasmamembran  $H^+$ -ATPase in eine Membran, musste zunächst ein geeignetes Lipid und eine erfolgreiche Methode des Detergenzentzugs gefunden werden. Für die  $H^+$ -ATPase wurden Rekonstitutionsversuche unter Verwendung von BioBeads mit verschiedenen synthetischen und natürlichen Lipiden durchgeführt, die ebenfalls in Dodecylmaltosid gelöst waren. Versuche in denen das Lipid in anderen Detergenzien, vorzugsweise solchen mit einer höheren CMC, gelöst waren, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Der Einsatz von Phosphatidylcholin aus Ei und die einmalige Zugabe von 5 mg BioBeads brachte die besten Ergebnisse. Schon nach drei Stunden konnten Vesikelkristalle entdeckt werden. Nach diesem Zeitraum wurden die BioBeads entfernt und der Ansatz bei 23 °C belassen. Die besten Kristalle wurden nach ca. 24 Stunden gefunden und waren über mehrere Tage bei 4°C stabil. Eine schrittweise Zugabe von BioBeads über einen längeren Zeitraum von bis zu 12 Stunden brachte keine besseren Resultate.

Dialyseversuche unter Verwendung sogenannter Hockeysticks (Kühlbrandt, 1992) erbrachten höchstens sehr kleine Vesikel mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm, die kein kristallines Gitter aufwiesen. Hockeysticks sind gebogene Glasröhrchen, die an einem Ende

durch eine Dialysemembran abgeschlossen sind und sich für ein Probenvolumen von  $\geq 50 \mu\text{l}$  eignen.

Bei der oben beschriebenen Rekonstitution der  $\text{H}^+$ -ATPase AHA2 in Proteoliposomen konnten reproduzierbar gut geordnete 2D-Kristalle erzeugt werden. Abb. 14 zeigt in Negativfärbung das Kristallgitter der  $\text{H}^+$ -ATPase in Vesikeln, die einen Durchmesser bis zu  $1 \mu\text{m}$  erreichten.



*Abb. 14: Elektronenmikroskopisches Negativ eines kristallinen Vesikels der Plasmamembran  $\text{H}^+$ -ATPase, gefärbt mit 2% Uranylacetat.*

Um elektronenmikroskopische Negative für die Strukturbestimmung aufzunehmen, wurden Proben in 5%iger Glukoselösung als Gefrierschutzmittel eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Negative wurden nach kohärentem, gut geordnetem Kristallgitter mittels optischer Beugung ausgewählt, digitalisiert und einer Bildverarbeitung unterzogen. Die

Bilder zeigten nach der Korrektur von Gitterverzerrungen Strukturfaktoren bis zu einer Auflösung von  $8 \text{ \AA}$  (Abb. 15). Es stellte sich heraus, dass Vesikel, die aufgebrochen waren und als Einzelschicht auf dem Kohlfilm lagen, am geeignetsten für die Strukturbestimmung waren.

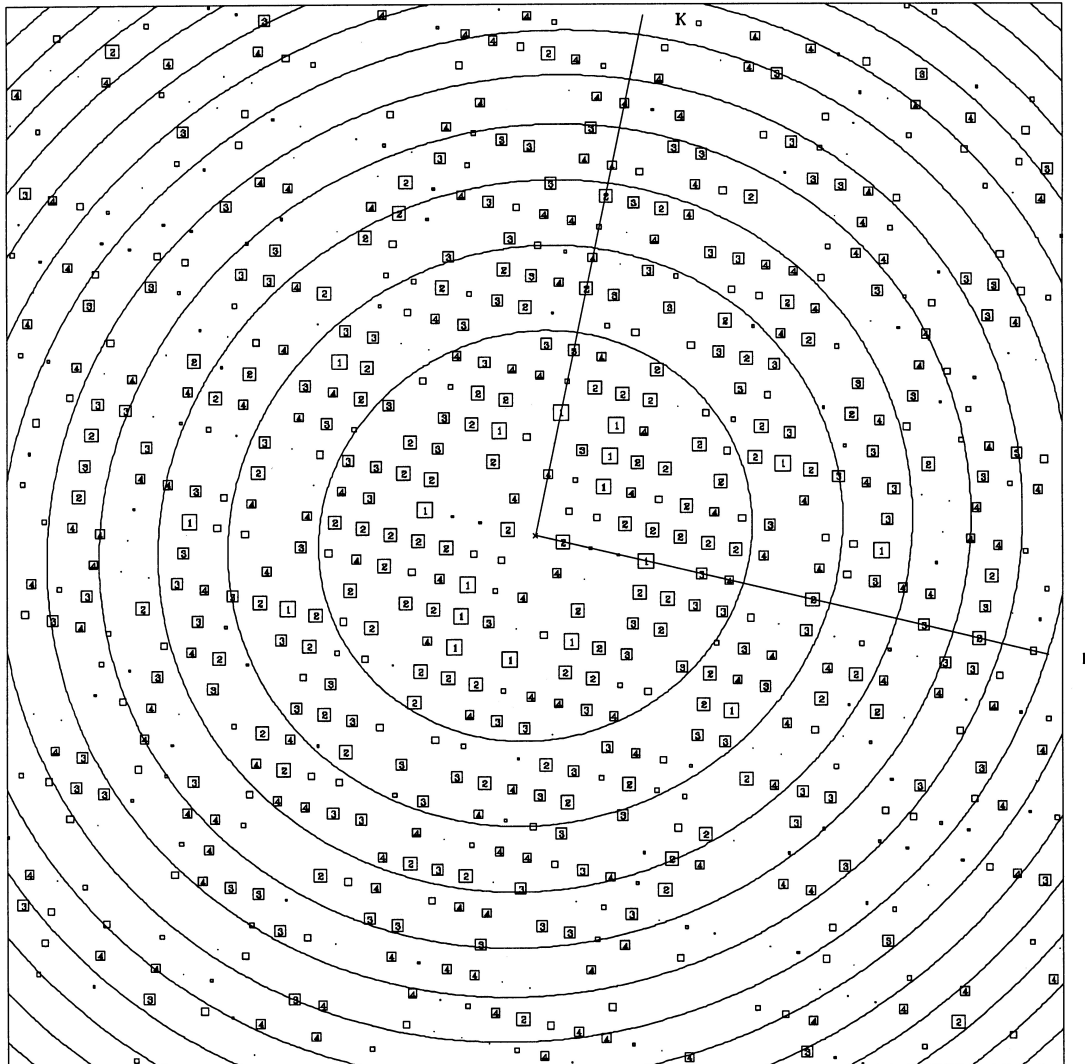


Abb. 15: Berechnete Strukturfaktoren des Einzelbildes Nr. 5275, aufgenommen von einem Vesikelkristall. Die Größe der Quadrate und die Nummern geben das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Fourierkomponenten wieder (Henderson et al., 1986). Die konzentrischen Ringe markieren den Nulldurchgang der Kontrastübertragungsfunktion. Die Auflösung am Rand der Abbildung beträgt  $8 \text{ \AA}$ .

Von den verarbeiteten Bildern wurden vier Bilder von verschiedenen Kristallen für die Erstellung einer Projektionsdichtekarte ausgewählt, die eine Auflösung von  $8$  bzw.  $12 \text{ \AA}$  hatten. Die Bildnummern waren 2221 ( $12 \text{ \AA}$ ), 2229 ( $8 \text{ \AA}$ ), 5275 ( $8 \text{ \AA}$ ) und 5305 ( $8 \text{ \AA}$ ). Mit Hilfe der Bildverarbeitungsprogramme konnten Gitterverzerrungen in den Kristallen korrigiert und die Amplituden und Phasen von vier Bildern kombiniert werden. Es wurde der gemeinsame

Phasenursprung ermittelt, die Bilder entsprechend verschoben und kombiniert. Die Einheitszelle der Kristalle wurde bestimmt zu  $a = 143 \pm 2,0 \text{ \AA}$ ,  $b = 130 \pm 1,8 \text{ \AA}$  und  $\gamma = 90^\circ \pm 0,5$ . Durch Phasenvergleich mit Hilfe des Programms ALLSPACE (Valpuesta *et al.*, 1994) wurde die Kristallsymmetrie zu  $p22_12_1$  bestimmt. Der Vergleich aller symmetriebezogenen Reflexe lässt eine Aussage darüber zu, wie gut sich die vier Bilder kombinieren ließen. Dazu wird die Phasenabweichung von den theoretischen, durch die Symmetrie gegebenen Werten  $0^\circ$  oder  $180^\circ$  außer Acht gelassen. Stattdessen werden die Phasenwerte der symmetriebezogenen Reflexe der Bilder direkt miteinander verglichen. Ein Phasenfehler von  $90^\circ$  würde einer zufälligen Verteilung entsprechen. Ermittelt wurde mittlere Phasenfehler aller Reflexe bis  $8 \text{ \AA}$  von  $24,7^\circ$ . Die Qualität der kombinierten Daten spiegelt sich in der Phasenabweichung zu den durch die Symmetrie vorgegebenen Werten von  $0^\circ$  oder  $180^\circ$  wieder. In Tabelle 2 wurde die mittlere Abweichung der Phasen vom theoretischen Wert für Auflösungszonen mit vergleichbarer Anzahl von Reflexen zusammengestellt.

Tabelle 2: Kristallographische Daten zur Projektionskarte der Vesikelkristalle.

Symmetrie	p22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	
Zellkonstanten	a = 143 ± 2,0 Å, b = 130 ± 1,8 Å, γ = 90° ± 0,5	
Anzahl der Bilder	4	
Defokusbereich	10.000 – 13.000 Å	
Anzahl der gemittelten Amplituden und Phasen	397	
Anzahl der unabhängigen Struktur Faktoren	212	
Mittlerer Phasenfehler bis 9 Å	38,0 <sup>(a)</sup>	
Auflösungsbereich (Å)	Anzahl der unabhängigen Struktur Faktoren	mittlerer Phasenfehler <sup>(b)</sup>
> 18,0	46	14,8
18,0-12,7	43	19,6
12,7-10,4	44	27,1
10,4-8,9	41	29,3
8,9-8,0	38	34,9
insgesamt	212	24,7

<sup>(a)</sup> Mittlerer Phasenfehler bei Vergleich aller symmetriebezogenen Reflexe, ohne ihre Abweichung von 0 oder 180 °; 90° würde einer zufälligen Verteilung entsprechen. <sup>(b)</sup> Mittlerer Phasenfehler der Struktur Faktoren in Auflösungsbereichen, abweichend von ihrem theoretischen Wert 0° oder 180°; 45° würde einer zufälligen Verteilung entsprechen.

Aus diesen Daten wurde eine Projektionsdichtekarte bei einer Auflösung von 8 Å errechnet, die in Abb. 16 gezeigt ist und im Kapitel 3.2.3 Projektionsdichtekarten im Zusammenhang mit den Oberflächenkristallen erläutert wird.

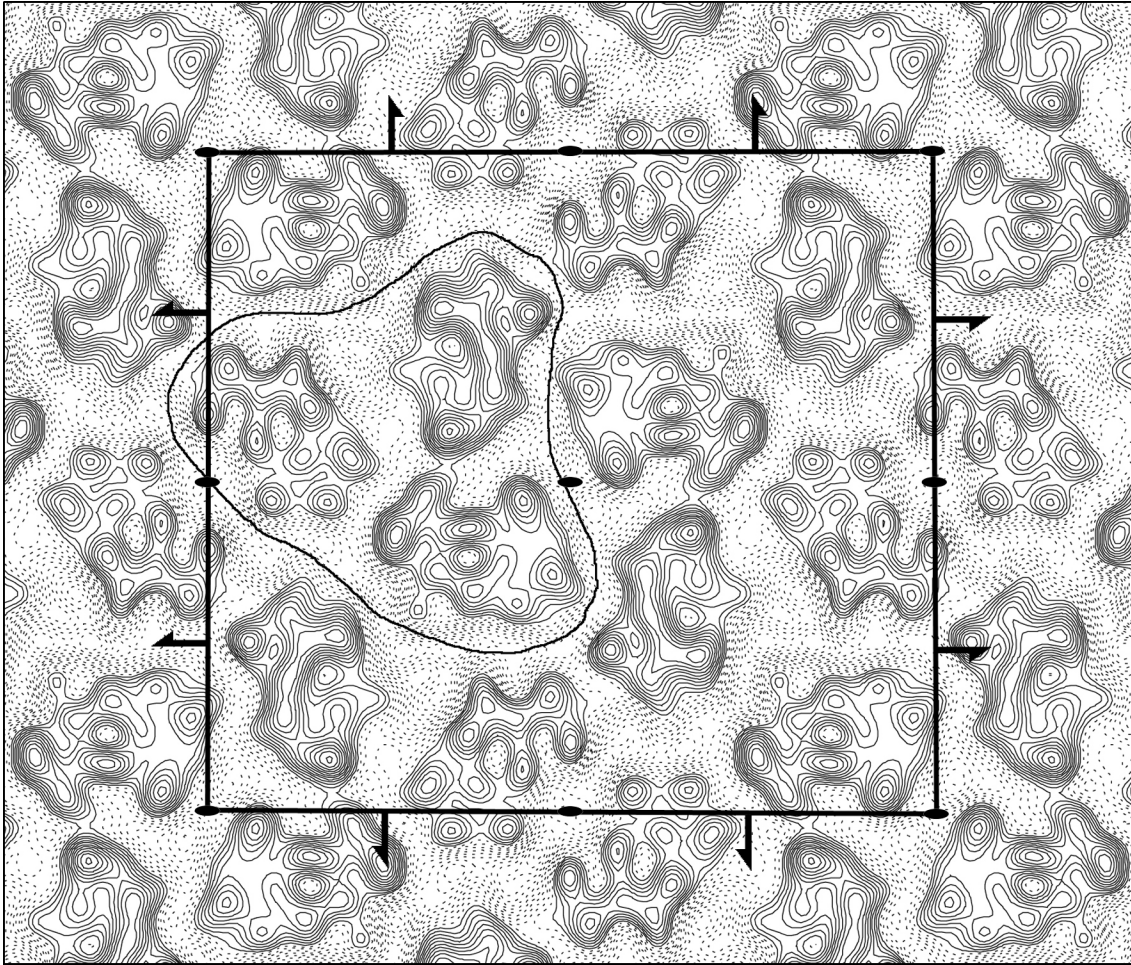


Abb. 16: Projektionskarte von Vesikelkristallen der Plasmamembran  $H^+$ -ATPase bei einer Auflösung von 8 Å. Die Projektion wurde aus den kombinierten Amplituden und Phasen von vier verschiedenen Kristallen in einer  $p22_12_1$  Symmetrie errechnet. Durchgezogene Linien zeigen Elektronendichte über und gepunktete Linien Dichten unter dem Mittelwert. Es wurde kein Temperaturfaktor (B-Faktor) angewendet. Die Einheitszelle (markiert) hat die Parameter  $a = 143$  Å,  $b = 130$  Å und  $\gamma = 90^\circ$ . Die Umrisse des Monomers können nicht mit Bestimmtheit festgelegt werden, aber die wahrscheinliche Kontur aufgrund von Vergleichen mit dem Enzym aus *N. crassa* und der  $Ca^{2+}$ -ATPase ist in der Karte markiert.

### 3.2.2 Oberflächenkristallisation

Durch eine Kooperation mit Catherine Vénien-Bryan (Grenoble/Oxford), Luc Lebeau und Charles Mioskowski (beide Strassburg) konnte mit der  $H^+$ -ATPase erstmalig eine neue Methode zur Oberflächenkristallisation erprobt werden. Im Vergleich zu den Vesikelkristallen konnten mit dieser Methode weitaus größere Kristalle hergestellt werden. Es wurden neu entwickelte, partiell fluoridierte Lipide (F-Lipide) benutzt, die eine  $Ni^{2+}$ -NTA Kopfgruppe besaßen. Der C-terminale His-tag, der schon für die Proteinreinigung genutzt wurde, ist für die 2D-Kristallisation nochmals zum Einsatz gekommen. Durch die Interaktion des His-tags mit

der funktionellen Ni<sup>2+</sup>-NTA Kopfgruppe der fluorierten Lipide war es möglich, mit einer sehr geringen Proteinkonzentration zu arbeiten. Durch die spezifische Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten wurde an der Grenzschicht eine lokal sehr hohe Proteinkonzentration erreicht.

Zur Kristallisation wurden die Verbindungen **1** und **2** verwendet (Abb. 5). Für die H<sup>+</sup>-ATPase wurde als Optimum ein Mischungsverhältnis von 1:6 (Ni<sup>2+</sup>-NTA-F-Lipid zu F-Lipid) unter Verwendung von ungeladenem verdünnendem F-Lipid ermittelt. Beide Lipide hatten zwei Alkylketten, was verglichen mit den einkettigen Lipiden eine höhere Fluidität des Films bedingt. Bei Verwendung von positiv oder negativ geladenen, verdünnenden Lipiden wurden weniger Kristalle gebildet.

Der Kristallisationstropfen wurde für 24 Stunden in einer Feuchtkammer bei 20 °C belassen. In dieser Zeit konnte das Protein an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Kopfgruppe der fluorierten Lipide binden. Wurde zu diesem Zeitpunkt durch das Auflegen eines elektronenmikroskopischen Netzchens auf den Tropfen eine Probe genommen und anschließend mit Uranylacetat gefärbt, so konnte eine großflächige Schicht von Protein gesehen werden, die jedoch nicht geordnet war. Es ist davon auszugehen, dass es sich um eine Proteinschicht gehandelt hat, da Netzchen, die man von Tropfen abnimmt, die nur die F-Lipide auf der Oberfläche, aber kein Protein in der Subphase haben, keine flächigen Strukturen erkennen lassen. Auch die Kontrollexperimente (siehe unten) weisen darauf hin, dass es sich um Proteinschichten handelte. Es ist zu erwarten, dass das Protein in diesem Stadium mehr oder weniger dicht gepackt und von Detergenz umgeben in einer orientierten Weise an der Grenzschicht zwischen den fluorierten Lipiden und dem Puffer vorlag. Mit Hilfe eines Kanals in der Teflon-Platte konnten für den Detergenzzug BioBeads zugegeben werden, ohne die Tropfenoberfläche zu stören. Nach 3 Stunden waren im Elektronenmikroskop erste runde kristalline Flächen sichtbar (Abb. 17). Diese waren stets umgeben von kleinen Vesikeln, die einen Durchmesser von ca. 100 nm hatten. Auch diese kleinen Vesikel zeigten oft kristalline Bereiche, die aber für eine Auswertung der Gitterkonstanten zu klein waren. Offene Vesikel zeigten bei Negativfärbung den gleichen Grauwert und das gleiche Gitter wie die großen Oberflächenkristalle. Das lässt darauf schließen, dass sich eine Lipiddoppelmembran (im Unterschied zu der darüberliegenden Einzelschicht der fluorierten Lipide) gebildet hatte, in die das Protein



eingebettet war. Mit der Zeit schienen diese kreisförmigen Areale zu fusionieren und bildeten schließlich sehr große Flächen, die sich oft über mehr als 10  $\mu\text{m}$  erstreckten, ohne dass dabei das Kristallgitter unterbrochen war (Abb. 17).

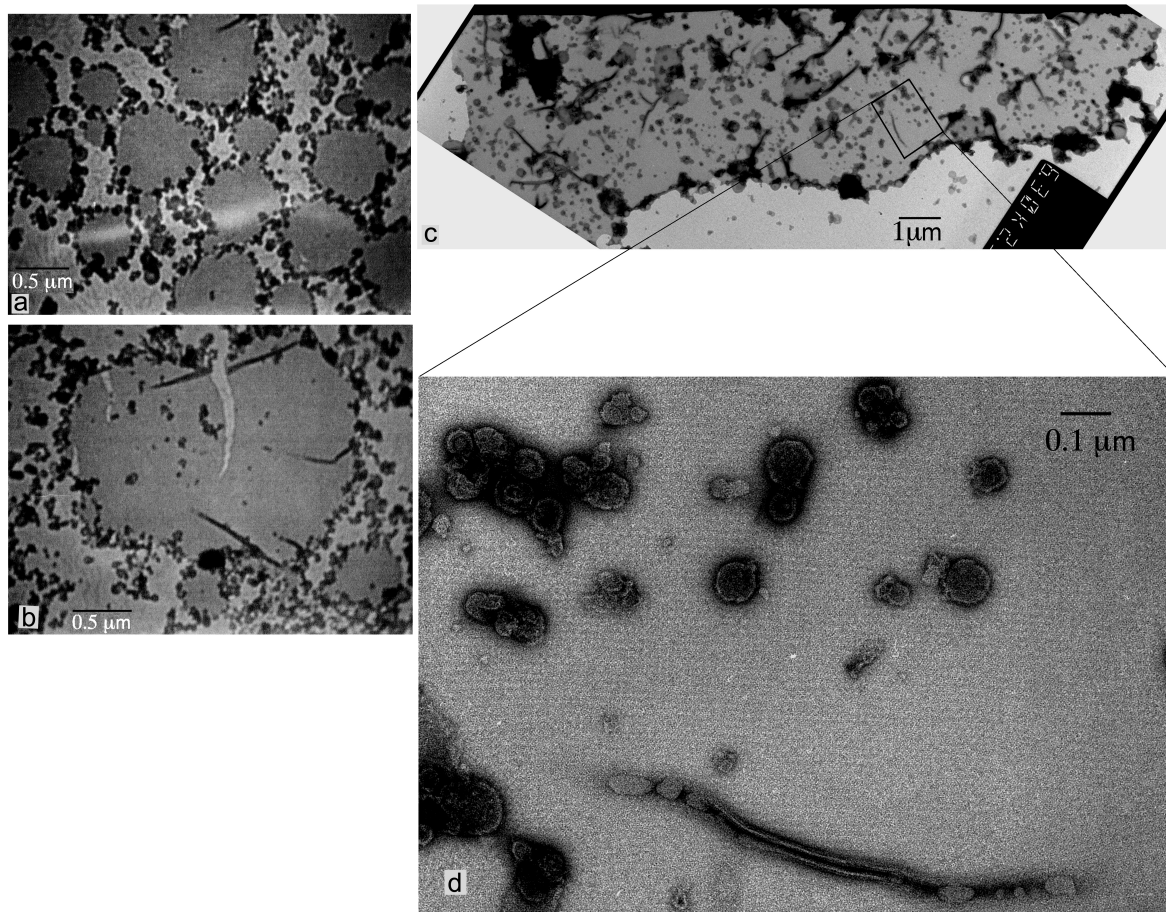


Abb. 17: Verschiedene Stadien der Kristallbildung nach 3 h (a) und 24 h (b, c) Detergenzentzug. (d) Eine Vergrößerung von (c).

In Kontrollexperimenten, unter Zugabe von 250 mM Imidazol oder 150  $\mu\text{M}$   $\text{NiSO}_4$ , konnten unter sonst gleichen Bedingungen keine Kristalle oder auch nur Lagen von ungeordnetem Protein gefunden werden. Beide Substanzen behindern die Interaktion zwischen dem His-tag und dem  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA. Imidazol wird üblicherweise bei der Chromatographie mit Nickel-Säulen zur Elution von gebundenem Protein von der Säule benutzt und bildet einen Komplex mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen, der die gebundenen Histidine verdrängt, bzw. eine Bindung verhindert. Geringe Konzentrationen von  $\text{NiSO}_4$  waren ausreichend, um den Nickel-komplexierenden His-tag des

Proteins abzusättigen und so ebenfalls die Bindung an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Kopfgruppen der fluorierten Lipide zu verhindern.

Für die elektronenmikroskopische Analyse der 2D-Kristalle wurde ein mit einem Kohlenstofffilm beschichtetes, hydrophobes Goldnetzchen von oben auf den Tropfen gelegt. Goldnetzchen wurden gegenüber Kupfernetzchen bevorzugt, da diese nicht wie Kupfer bei längerer Inkubationszeit oxidierten. Nach einer Inkubation von 0,5 - 10 Minuten wurde das Netzchen wieder nach oben hin abgenommen und entweder negativ gefärbt oder für Kryoelektronenmikroskopie mit oder ohne Gefrierschutzmittel eingefroren. Wenn von Versuchsbeginn an ein Netzchen auf dem Tropfen lag, akkumulierten viele Aggregate auf dem Kohlefilm und eine Untersuchung der Probe war nicht möglich. Hydrophobe Netzchen ergaben eine höhere Ausbeute an Kristallen auf dem Kohlefilm gegenüber hydrophilen Netzchen, weil der hydrophobe Teil der fluorierten Lipide mit dem Kohlefilm in Kontakt kam. Die Inkubationszeit wurde je nach Transferrate der Kristalle variiert und pendelte sich zu einem Wert von einer Minute ein.

Für das zum Sammeln von Strukturdaten notwendige Einfrieren der Netzchen wurde die Probe zunächst mit Hilfe einer Guillotine in flüssigem Ethan vitrifiziert (Dubochet et al., 1988). In späteren Versuchen wurden die Proben nach Zugabe des Gefrierschutzmittels Tannin in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Qualität der Aufnahmen blieb unverändert, aber die Eisdicke ließ sich in Anwesenheit von Tannin besser kontrollieren. Die Qualität der Negative wurde mittels optischer Beugung beurteilt.

Fünf Bilder mit in Ethan eingefrorenen Kristallen guter Ordnung und Kohärenz wurden ausgewählt, digitalisiert und einer Bildbearbeitung unterzogen. Die Bildnummern waren: 2479 ( $8\text{Å}$ ), 2483 ( $8\text{Å}$ ), 2494 ( $8\text{Å}$ ), 6898 ( $8\text{Å}$ ), 6882 ( $10\text{Å}$ ). Nach der Ermittlung des gemeinsamen Phasenursprungs wurden die Amplituden und Phasen der Bilder kombiniert. Die Parameter der Einheitszelle waren  $a = 150,9 \pm 1 \text{ Å}$ ,  $b = 139 \pm 1,5 \text{ Å}$  und  $\gamma = 90^\circ$ . Phasenvergleiche ergaben eine  $p22_12_1$  Kristallsymmetrie. Der mittlere Phasenfehler aller symmetriebezogenen Reflexe der kombinierten Bilder bis  $9 \text{ Å}$  betrug  $25,5^\circ$ . Nach der Korrektur von Gitterverzerrungen konnten Amplituden und Phasen bis zu einer Auflösung von  $9 \text{ Å}$  für eine Projektionskarte

ermittelt werden (Abb. 18, Abb. 19). Tabelle 3 gibt die kristallographischen Daten zur Projektionsdichtekarte wieder.

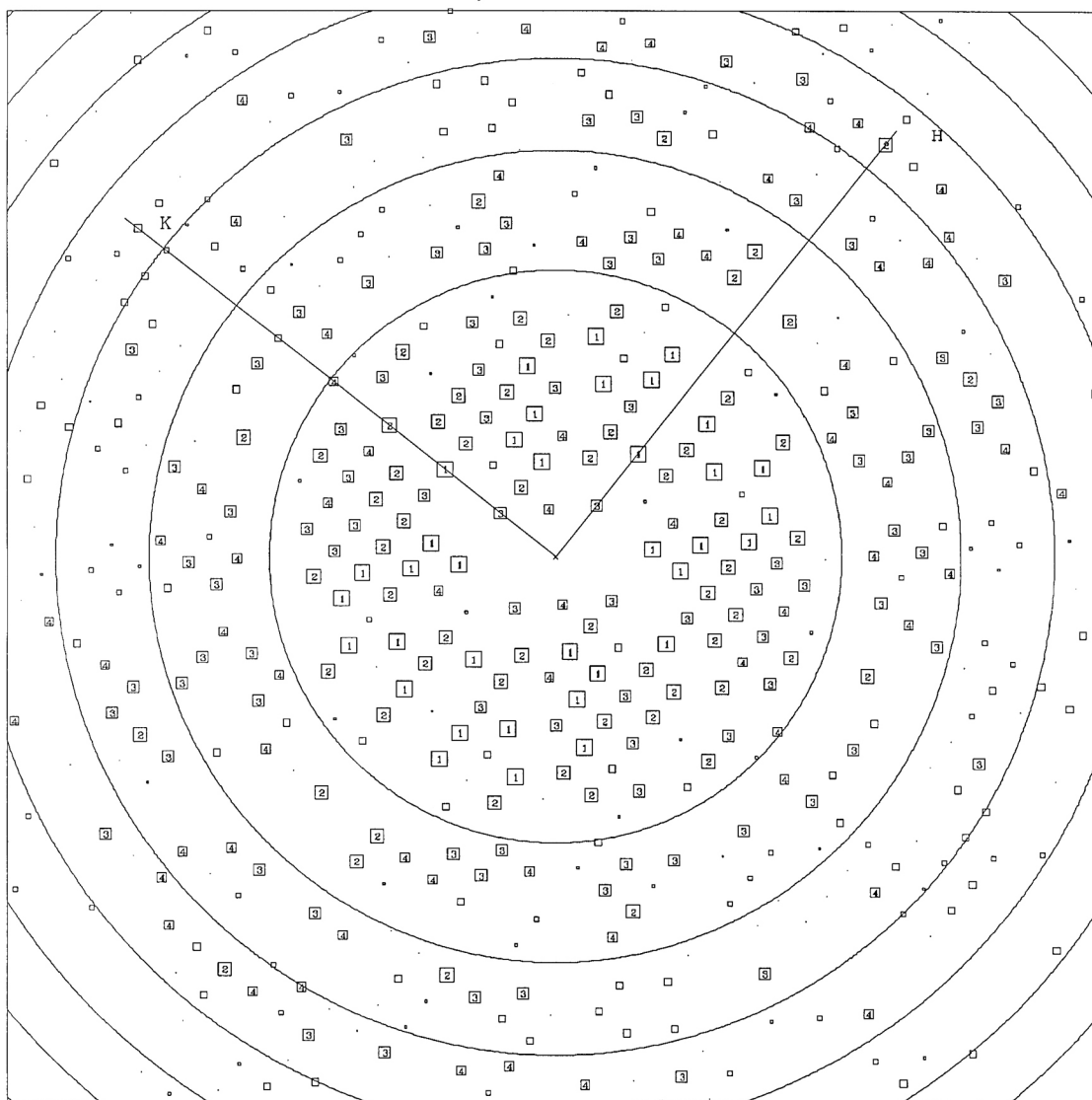


Abb. 18: Strukturfaktoren des Einzelbildes Nr. 6898 aufgenommen von einem Oberflächenkristall. Die Größe der Quadrate und die Nummern geben das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Fourierkomponenten wieder. Die konzentrischen Ringe markieren den Nulldurchgang der Kontrastübertragungsfunktion. Die Auflösung am Rand der Abbildung beträgt  $9 \text{ \AA}$ .

Tabelle 3: Kristallographische Daten zur Projektionskarte der Oberflächenkristalle

Symmetrie	p22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellkonstanten	a = 150,9 ± 1 Å; b = 138,9 ± 1,5 Å; γ = 90° ± 0,5
Anzahl der Bilder	5
Defokusbereich	7400-9500 Å
Anzahl der gemittelten Amplituden und Phasen	948
Mittlerer Phasenfehler bis 9 Å	36,0 <sup>(a)</sup>

Auflösungsbereich (Å)	Anzahl der unabhängigen Strukturfaktoren	mittlerer Phasenfehler <sup>(b)</sup>
> 18,0	51	15,3
18,0-12,7	49	24,7
12,7-10,4	48	31,8
10,4-9,0	43	31,0
insgesamt	191	25,5

<sup>(a)</sup> Mittlerer Phasenfehler bei Vergleich aller symmetriebezogenen Reflexe, ohne ihre Abweichung von 0 oder 180 °; 90° würde einer zufälligen Verteilung entsprechen. <sup>(b)</sup> Mittlerer Phasenfehler der Strukturfaktoren in Auflösungsbereichen, abweichend von ihrem theoretischen Wert 0° oder 180°; 45° würde einer zufälligen Verteilung entsprechen.

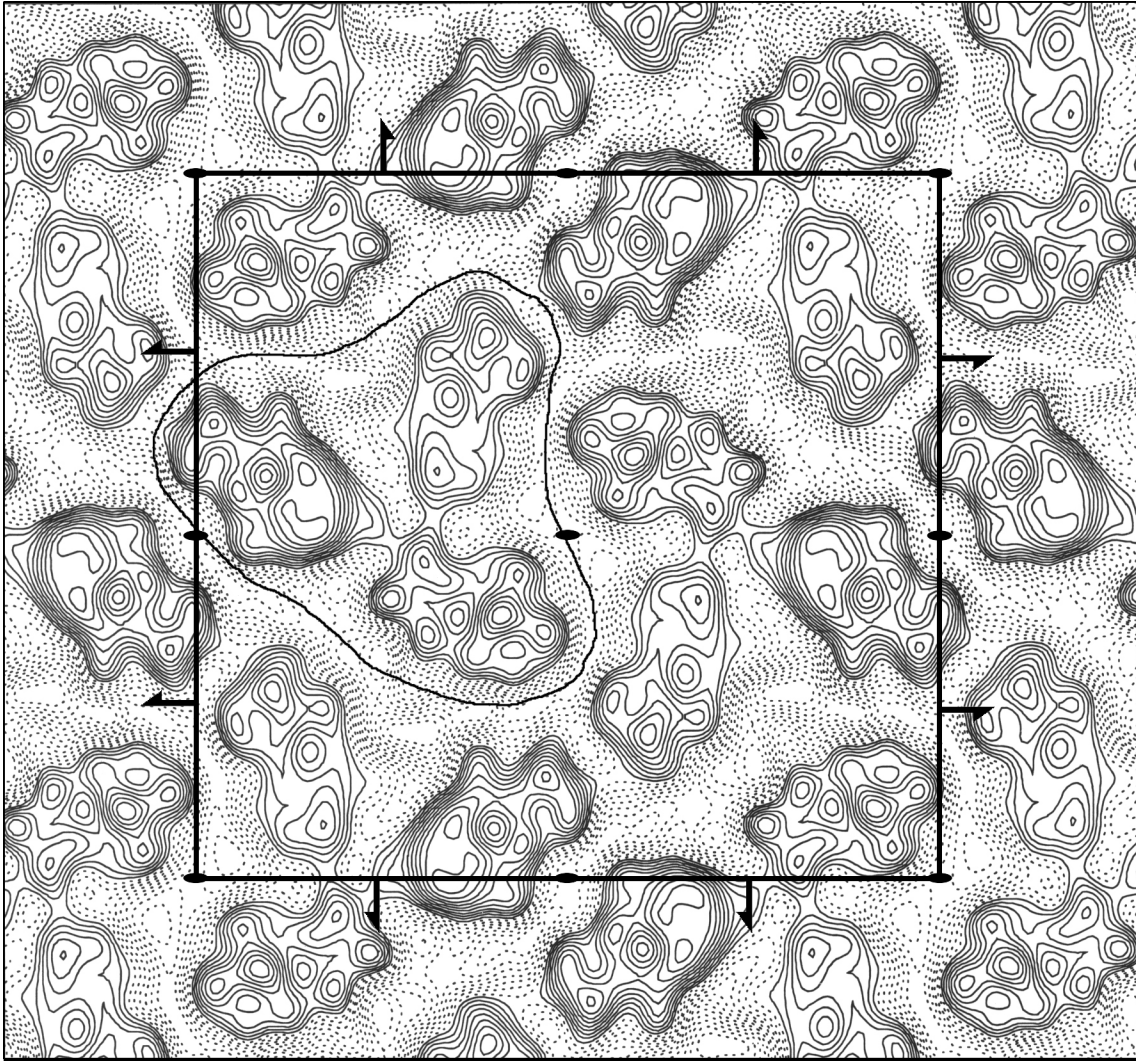


Abb. 19: Projektionskarte von Oberflächenkristallen der Plasmamembran  $H^+$ -ATPase bei einer Auflösung von 9 Å, errechnet aus den kombinierten Amplituden und Phasen von 5 verschiedenen Kristallen mit einer  $p22_12_1$ -Symmetrie. Durchgezogene Linien zeigen Elektronendichte über und gepunktete Linien Dichten unter dem Mittelwert. Es wurde kein Temperaturfaktor (B-Faktor) angewendet. Die Einheitszelle wurde bestimmt zu  $a = 150,9$  Å,  $b = 138,9$  Å und  $\gamma = 90^\circ$ . Die Umrisse des Monomers können nicht mit Bestimmtheit festgelegt werden, aber die wahrscheinliche Kontur aufgrund von Vergleichen mit dem Enzym aus *N. crassa* und der  $Ca^{2+}$ -ATPase ist in der Karte markiert.

### 3.2.3 Projektionsdichtekarten

Eine 2D-Dichtekarte stellt einen Blick von senkrecht oben auf den Kristall dar, bei dem alle Teile der Struktur in die Ebene senkrecht zum Elektronenstrahl projiziert sind.

Es besteht eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Molekülen beider Projektionskarten. In den beiden Projektionskarten der pflanzlichen Plasmamembran  $H^+$ -ATPase (Abb. 20 a, b) sind pro Molekül drei separate Regionen sichtbar, die wahrscheinlich den verschiedenen

Proteindomänen im Monomer entsprechen. Das Enzym füllt etwa den Raum eines Dreiecks mit den Dimensionen  $75 \times 75 \times 90 \text{ \AA}$  aus. Obwohl die Grenzen des Monomers nicht mit Sicherheit gezogen werden können, so ist der angegebene Ausschnitt doch wahrscheinlich, da hier die drei Bereiche nah beieinander liegen und miteinander verbunden sind.

Beide Kristalle, die Vesikelkristalle und die Oberflächenkristalle, haben die Symmetrie  $p22_12_1$ . Es sind vier Moleküle in einer Einheitszelle, die als zwei Dimere auftreten und durch eine kristallographische zweizählige Achse, die senkrecht zur Membran steht sowie durch eine 2-fache Schraubenachse, die senkrecht zu  $a$  und  $b$  steht, verbunden sind. Daraus ergibt sich, dass die Dimere abwechselnd auf- und abwärts ausgerichtet sind. Die Packung der Moleküle in den beiden Kristallformen ist sehr ähnlich. Die Größen der Einheitszellen variieren jedoch um mehr als 5 %. Dabei ist die Größe des Proteins identisch, allerdings ist die Packung der Oberflächenkristalle weniger dicht (siehe auch Abb. 25).

Die Transmembranhelices können in den Projektionskarten nicht erkannt werden. Das hängt damit zusammen, dass sich 80 % der Proteinmasse außerhalb der Membran befindet und so die typischen Elektronendichten, die eine Transmembranhelix markieren, überlagert werden. Auch in der 2D-Struktur der  $H^+$ -ATPase aus *N. crassa* erscheinen die Transmembranhelices nicht (Cyrklaff *et al.*, 1995) und wurden erst mit der Erstellung der 3D-Struktur sichtbar. Ein Vergleich beider Projektionen zeigt, dass die Größe des Monomers gut überein stimmt, die Details sich aber stark unterscheiden (Abb. 20).

Die Elektronendichte wird durch die Anzahl der Höhenlinien in der Elektronendichtekarte wiedergegeben. In Abb. 20 ist die Dichte in der Projektionskarte der Vesikelkristalle in allen drei Domänen ungefähr gleich stark. Betrachtet man jedoch die Projektionskarte der Kristalle, die durch die Oberflächenkristallisation erzeugt wurden (Abb. 20b), so sieht man, dass zwei dieser Domänen sehr ähnlich in Größe und Elektronendichte sind. Man kann hier 8 bzw. 9 Höhenlinien zählen. Nur kleine Bereiche erheben sich über die 5. Höhenlinie. In der dritten Domäne hingegen liegt der Hauptteil der Masse über der 7. Höhenlinie und das Maximum wird mit der 11. Höhenlinie erreicht. Das bedeutet, dass diese dritte Domäne eine erheblich höhere Masse hat als die beiden anderen. Vergleicht man diese Anordnung nun mit der Aufsicht auf das Strukturmodell der  $Ca^{2+}$ -ATPase in Abb. 20 d, so wird deutlich, dass hier eine ähnliche

Verteilung vorliegt. Auch hier gibt es zwei Domänen mit einer niedrigeren Masse. Sie entsprechen der N- und der A-Domäne. Eine größere Masse besitzt die dritte Domäne. Sie entspricht der Transmembrandomäne mit der P-Domäne darüber. Obwohl man diese Unterscheidung für die Vesikelkristalle nicht treffen kann, ist es nachvollziehbar, dass die massenstarke Domäne in der Projektionskarte diesen beiden übereinanderliegenden Domänen entspricht.

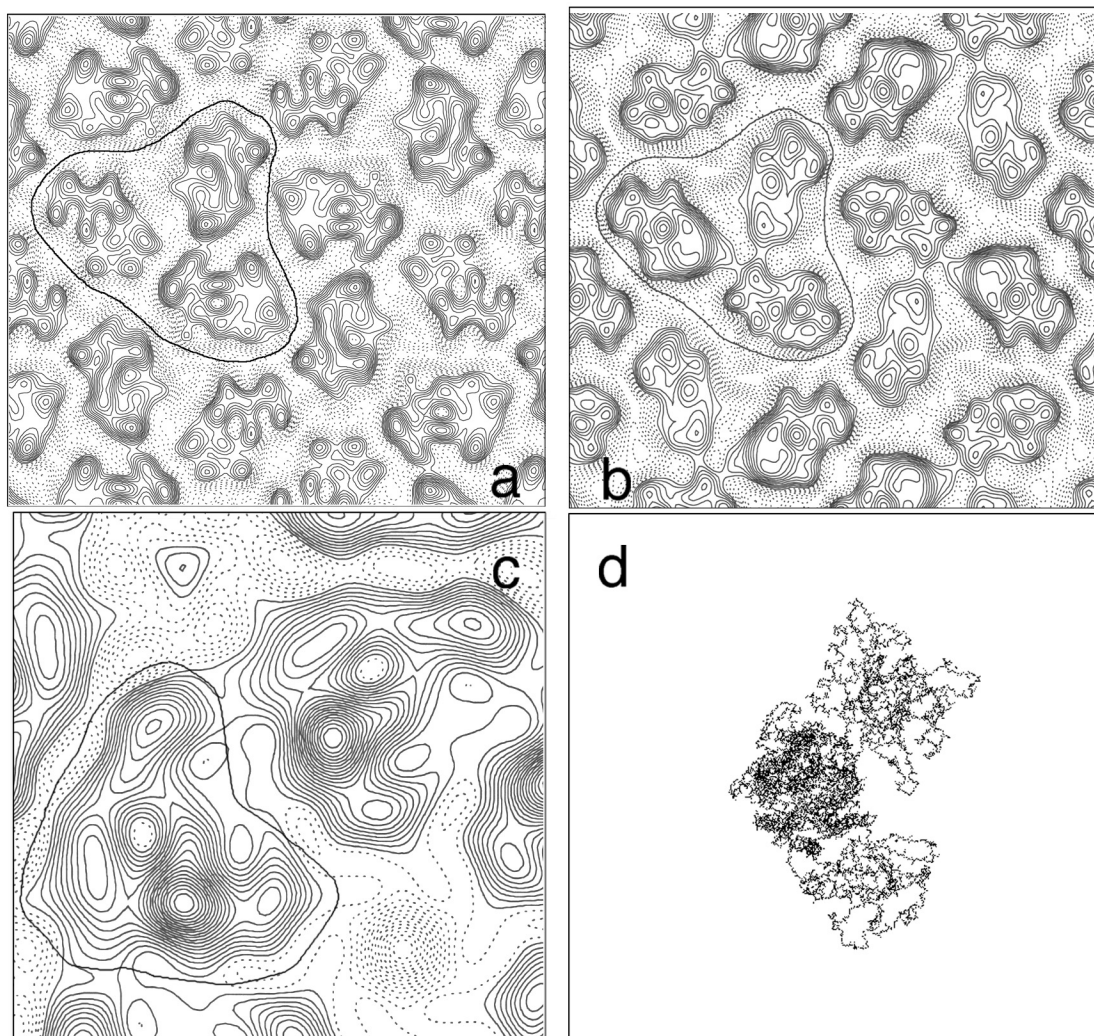


Abb. 20: Projektionskarte von Vesikelkristallen (a) und Oberflächenkristallen (b) der Plasmamembran  $H^+$ -ATPase bei einer Auflösung von 8 Å (a) bzw. 9 Å (b). Die Projektion wurde aus den kombinierten Amplituden und Phasen von vier (a) bzw. fünf (b) verschiedenen Kristallen in einer  $p22121$  Symmetrie errechnet. Durchgezogene Linien zeigen Elektronendichte über und gepunktete Linien Dichten unter dem Mittelwert. Die Einheitszelle hat die Parameter für (a):  $a = 143$  Å,  $b = 130$  Å und  $\gamma = 90^\circ$  und für (b):  $a = 151$  Å,  $b = 139$  Å und  $\gamma = 90^\circ$ . Die Umrisse des Monomers können nicht mit Bestimmtheit festgelegt werden, aber die wahrscheinliche Kontur ist in der Karte markiert. c: Projektion der  $H^+$ -ATPase aus

*N. crassa* (Cyrklaff et al., 1995) **d**: Aufsicht auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Toyoshima et al., 2000) senkrecht zur Membran von der cytoplasmatischen Seite aus.

### 3.3 Modelling

Es wurde ein Homologiemodell der  $\text{H}^+$ -ATPase von *N. crassa* mit Hilfe des Programms MODELLER (Sali & Blundell, 1993) berechnet. Eine 3D-Struktur dieses Enzyms wurde in dieser Abteilung von Manfred Auer ermittelt (Auer et al., 1998) und stellte die Grundlage der zum Thema Modelling gemachten Arbeiten dar.

Die Koordinaten der hochauflösenden Struktur der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Toyoshima et al., 2000) wurden benutzt, um damit ein Strukturmodell der  $\text{H}^+$ -ATPase aus *N. crassa* zu erzeugen. Die beiden Sequenzen sind zu 27 % identisch. N-terminal hat die  $\text{H}^+$ -ATPase 72 zusätzliche Aminosäuren, wovon viele negativ geladen sind. In der zytoplasmatischen Domäne hat die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase einige Insertionen, wichtige Bereiche, wie die Phosphorylierungsstelle oder die Nukleotidbindungsstelle, sind aber hoch konserviert. Im C-terminalen Teil, der die letzten drei Transmembranhelices einschließt, gibt es nur eine schwache Sequenzhomologie.

Das Programm MODELLER wendete ein vom Benutzer bereitgestelltes Sequenzalignment zwischen der bekannten Struktur ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) und der bearbeiteten Struktur ( $\text{H}^+$ -ATPase) an (siehe Abb. 21). Es berechnete dann in Anlehnung an die vorgegebene Struktur ein Modell unter Berücksichtigung von räumlichen Einschränkungen der Orientierung der Aminosäuren und ihrer Atome. Diese Einschränkungen ergaben sich aus den theoretischen und aufgrund von bekannten Strukturen statistisch ermittelten physikalischen Rahmenbedingungen, wie z. B. Bindungslängen und -winkel. Das Modell wurde durch die Anwendung einer molekularen Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion optimiert. In Regionen, in denen es ein Alignment mit der vorgegebenen Struktur gab, basierte die Konformation des Modells überwiegend auf der Vorgabe. In Insertionsregionen ohne Äquivalent zur  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase waren die Beschränkungsparameter und somit die Orientierung weitgehend durch die Präferenz der verschiedenen Aminosäurereste für die verschiedenen Gebiete des Ramachandran-Plots gegeben. Ein Vergleich der beiden Strukturen und einer Darstellung der Abweichung voneinander ist in Abb. 22 zu sehen. Nur in der N-Domäne gab es wesentliche Unterschiede in der Struktur. Diese beruhen auf Insertionen in der Sequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die in der  $\text{H}^+$ -ATPase keine Entsprechung finden.



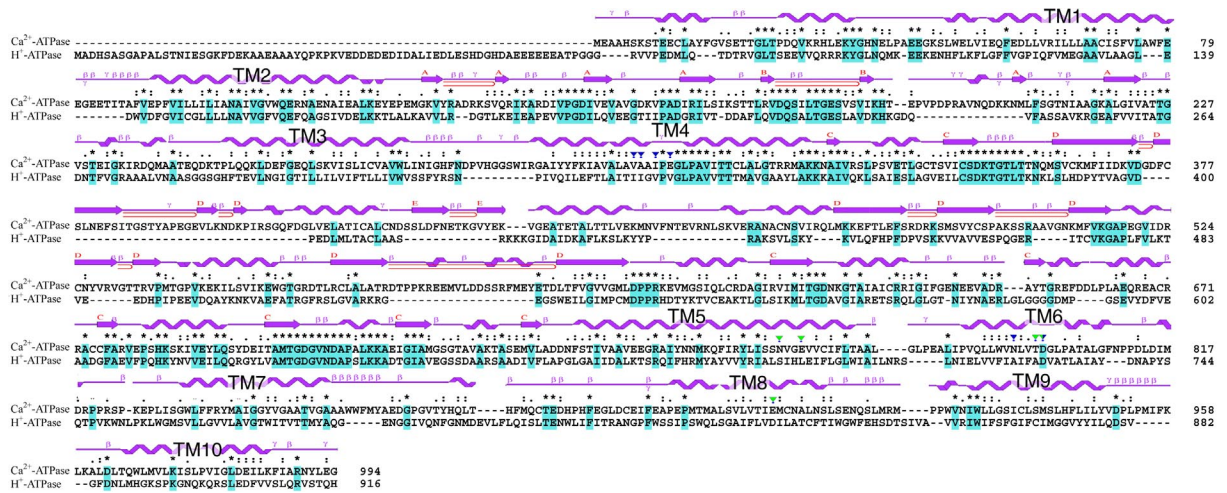


Abb. 21: Sequenzalignment der Proteinsequenz der  $Ca^{2+}$ -ATPase aus dem Kaninchenmuskel mit der  $H^{+}$ -ATPase aus *N. crassa*. TM bedeutet Transmembranhelix.

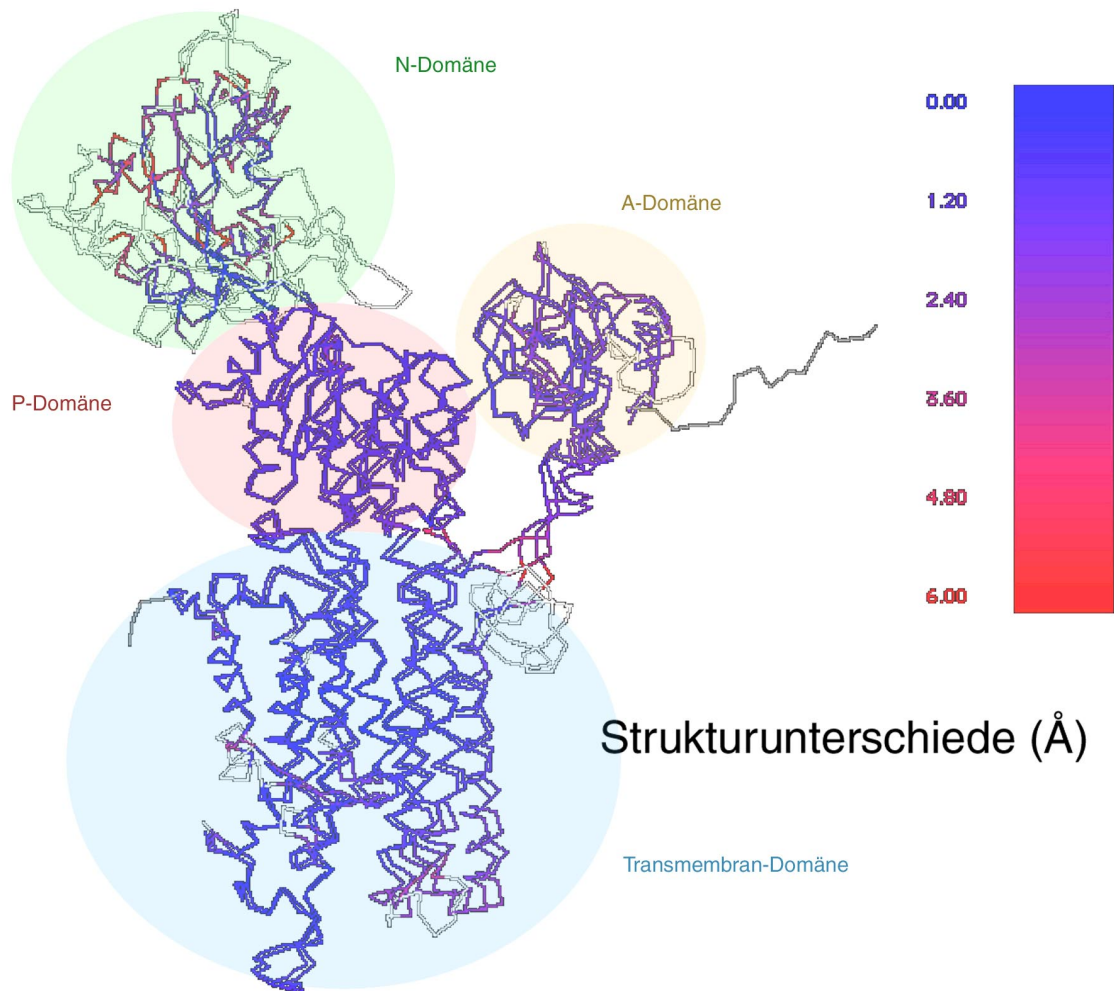


Abb. 22: Strukturelle Abweichungen zwischen der experimentellen Struktur der  $Ca^{2+}$ -ATPase und dem mit dem Programm MODELLER errechneten Modell der  $H^{+}$ -ATPase aus *N. crassa*. Insertionen, die keine Entsprechung in der jeweils anderen Sequenz haben sind weiß dargestellt.

Die Bewertung des Modells durch das Programm ENERGY zeigte, dass die Stereochemie teilweise nicht richtig war. Von einer weiteren Optimierung wurde allerdings abgesehen, da die Qualität des Modells für den hier verwendeten Zweck ausreichend war.

Das erstellte Modell hat die Sequenz der H<sup>+</sup>-ATPase aus *N. crassa*, liegt jedoch in der Konformation der Ca<sup>2+</sup>-ATPase vor. Nun wurde das Modell mit der experimentell ermittelten Elektronendichtekarte der *N. crassa* H<sup>+</sup>-ATPase zur Deckung gebracht (persönliche Mitteilung W. Kühlbrandt). Die Transmembran- und die P-Domäne zeigten hierbei eine sehr gute Übereinstimmung (Abb. 23). Die N- und die A-Domäne sind im Modell weit außerhalb der Elektronendichtekarte. Offensichtlich fehlen aber diese Massen nicht, sondern die entsprechende Elektronendichte ist nur an einer anderen Stelle. Bewegt man die einzelnen Domänen als unabhängige Körper, dann kann man sie gut in die Elektronendichtekarte einpassen. So ist die N-Domäne an einer Achse, die mit der Verbindung zwischen der P- und der N-Domäne übereinstimmt, um 30° gekippt (Abb. 23). Ein Pfeil markiert eine Distanz von 50 Å, zwischen den gleichen Punkten an der äußeren Seite der N-Domäne. Auch die A-Domäne erfährt eine Verschiebung und der Pfeil markiert einen Punkt in der A-Domäne, der sich um 19 Å verschiebt. Es wird deutlich, dass es sich die Unterschiede in der Konformation gut durch eine Bewegung von ganzen Domänen beschreiben lässt, wobei sich die Struktur der Domänen selber wahrscheinlich nicht wesentlich ändert.

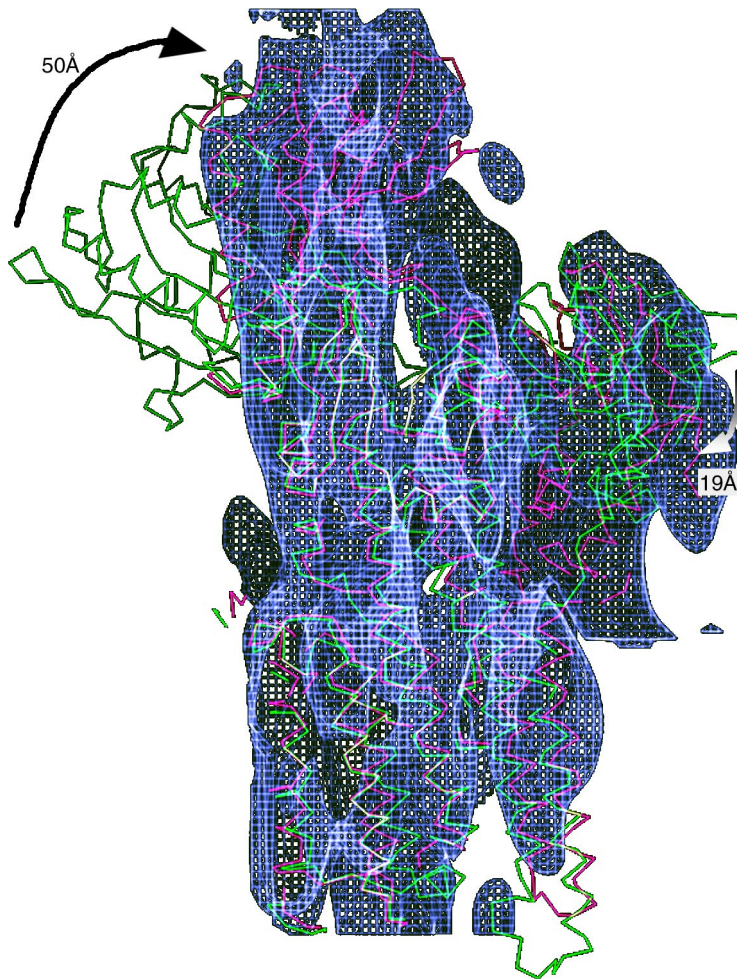


Abb. 23: Modell der  $H^+$ -ATPase aus *N. crassa* in der Konformation der  $Ca^{2+}$ -ATPase (grün) sowie nach Einpassen in die experimentelle Elektronendichtekarte (rot).

## 4. Diskussion

### 4.1 Cytochrom $b_6f$

#### 4.1.1 Proteinreinigung

Die Methode zur Reinigung von Cytochrom  $b_6f$  Komplex aus Spinat lehnt sich an die Präparation des Komplexes aus der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* an (Pierre et al., 1995). Nach der Entfernung der peripheren Proteine von den Thylakoidmembranen, nutzt das Protokoll die selektive Solubilisierung durch das neutrale Detergenz Hecameg. Dieses Detergenz ist eine interessante Alternative zu dem verwandten und weithin gebräuchlichen, aber teureren Octyl- $\beta$ -D-Glukosid (OG). Hecameg wurde von Plusquellec *et al.* (Plusquellec *et al.*, 1989) entwickelt, und seine chemische Struktur, Molekulargewicht, Aggregationszahl und CMC sind ähnlich zu OG. Ein Vergleich der beiden Detergenzien zeigte, dass bei der Reinigung von Cytochrom  $b_6f$  aus *C. reinhardtii* Hecameg den Komplex sogar spezifischer aus der Membran löste, als OG (Pierre et al., 1997).

Insgesamt sind nur drei Schritte von der Solubilisierung bis zum gereinigten Protein notwendig. Das Protein kann in einer Konzentration von über 10 mg/ml eluiert werden, so dass ein weiterer Konzentrationsschritt nicht notwendig ist, um Kristallisationsexperimente durchzuführen.

#### 4.1.2 Spektroskopie

Der gereinigte Cytochrom  $b_6f$  Komplex zeigte alle zu erwartenden spektroskopischen Merkmale. Cytochrom  $b_6$  und Cytochrom  $f$  konnten mit Hilfe von Redoxdifferenzspektren detektiert werden und waren im erwarteten Verhältnis von 2:1 vertreten. Über die Funktion des stöchiometrisch vorhandenen Chlorophylls kann bis jetzt nur spekuliert werden. Es scheint aber klar zu sein, dass es sich nicht um eine Verunreinigung bei der Isolation des Komplexes handelt. Pierre *et al.* (Pierre et al., 1997) konnten zeigen, dass der  $b_6f$  Komplex aus *C. reinhardtii* freies, radioaktiv markiertes ( $^3\text{H}$ )Chl $a$  nur sehr langsam mit dem gebundenen Chlorophyll  $a$  austauscht und dass das Chlorophyll eine spezifische Bindungsstelle hat. Allgemein kommt Chlorophyllen eine Funktion als lichtsammelndes System zu. Dies scheint für den Cytochrom  $b_6f$  Komplex jedoch unwahrscheinlich, da der Komplex nicht von

Lichtenergie angetrieben wird. Ein Beitrag zum lichtsammelnden Antennensystem in der photosynthetischen Membran ist ebenfalls nicht anzunehmen, da der Anteil am Gesamtantennenpigment verschwindend gering ist. Für den *in vitro* Elektronentransfer im Komplex, also für die Aktivität, ist das Chlorophyll nicht notwendig, da ein Ausbleichen des Chlorophylls im Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex von *C. reinhardtii* keine Änderung der Aktivität zeigte (Pierre et al., 1997). Der verwandte Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex besitzt kein Chlorophyll. Man geht davon aus, dass die hydrophobe Phytylkette eine strukturelle Rolle bei der Stabilisierung des Komplexes spielt.

Ein weiteres Pigment, welches zum Komplex gehört ist ein  $\beta$ -Carotin. Es wurde auch in *b<sub>6</sub>f* Komplexen anderer Organismen gefunden. Das Vorhandensein eines  $\beta$ -Carotins im Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex ist nicht überraschend, da es ein idealer Kandidat ist, unerwünschte photochemische Reaktionen, die unvermeidlich vom Chlorophyll hervorgerufen werden, zu verhindern. Der Triplett-Zustand des Chlorophylls, der bei Belichtung auftritt, führt zur Bildung von hochreaktivem Singletsauerstoff, der oxidative Schäden an konjugierten Doppelbindungen, wie etwa in aromatischen Aminosäuren und Lipiden verursacht und so den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex schädigen kann. Deswegen muss das Auftreten eines Triplett-Zustandes verhindert werden. Eine Funktion als Quencher des Chlorophylls im Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex liegt daher für das  $\beta$ -Carotin im Komplex nahe (Zhang et al., 1999). Eine solche Funktion ist für das  $\beta$ -Carotin im Photosystem II bekannt. Hier wirkt es als sehr effektiver Quencher des Triplett-Zustandes des Reaktionszentrums P680\* (Telfer et al., 1994). Die Funktion dieser beiden Pigmente im Komplex (Chlorophyll *a* und  $\beta$ -Carotin) kann ohne eine hochaufgelöste 3D-Struktur nicht geklärt werden.

#### 4.1.3 Aktivitätstest

Die hohe Elektronentransferrate von 450 Elektronen pro Sekunde zeigte, dass der Komplex durch die Reinigung nichts von seiner Aktivität eingebüßt hat. Die hohe Aktivität war außerdem ein Indiz dafür, dass das Protein in seinem nativen Zustand vorlag. Eine Monomerisierung würde zu einem Verlust an Aktivität führen.

Die höchste Elektronentransferrate für einen anderen gereinigten Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex wurde für die Organismen *M. laminosus* mit 350 e<sup>-</sup>/s (W.A. Cramer, persönliche Mitteilung),

*C. reinhardtii* mit  $270 \pm 60$  e<sup>-</sup>/s (Pierre et al., 1995) und für Spinat mit 77 e<sup>-</sup>/s (Huang et al., 1994) gemessen. Die *in vitro*-Aktivität des hier gereinigten Komplexes ist sogar höher, als *in situ* Messungen am Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex in intakten Chloroplastenthylakoiden ergeben haben (300 e<sup>-</sup>/s) (Hope, 1993). Dies könnte auf eine bessere Zugänglichkeit der Substrate zu ihrer Proteinbindungsstelle im detergenten gelösten Enzym beruhen, im Unterschied zu einem Enzym, welches in der Membran eingebettet ist.

Die im Vergleich zu anderen Präparationen höhere Aktivität war wahrscheinlich in Unterschieden im Reinigungsprotokoll begründet. Im Gegensatz zu den klassischen Protokollen für die Reinigung des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes aus Spinat (Black et al., 1987; Hurt & Hauska, 1981; Schmidt & Malkin, 1993) wurde der Einsatz einer Detergenzmischung vermieden. Die gesamte Reinigung wurde unter Verwendung eines einzigen Detergenz (Hecameg) durchgeführt. Der für die Aktivität bedeutendste Unterschied zu den oben genannten Spinat-Protokollen war vermutlich die Zugabe von Lipiden während der gesamten Präparation. Die Bedeutung von Lipiden für die Stabilität des Komplexes haben Breyton *et. al.* für den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex aus *C. reinhardtii* gezeigt (Breyton *et al.*, 1997). Ein Verlust von Lipiden, der einher geht mit der Ablösung der Rieske-Untereinheit, spielt eine entscheidende Rolle bei der Monomerisierung und Inaktivierung des detergenten gelösten Proteins.

#### 4.1.4 2D-Kristallisation

Die Erstellung eines Protokolls zur effektiven Reinigung des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes aus Spinat war Voraussetzung für eine kontinuierliche Bereitstellung von Enzym zur Durchführung von Kristallisationsexperimenten. Durch den Aktivitätstest konnte sichergestellt werden, dass das Protein funktionsfähig, also im nativen Zustand war. Die Konzentration des eluierten Proteins war auch ohne einen weiteren Konzentrationsschritt ausreichend hoch für Kristallisationsexperimente. Das hat - im Vergleich zu anderen Präparationen von Membranproteinen - den Vorteil, dass eine genaue Kontrolle der Detergenzkonzentration gegeben ist. Bei einem Aufkonzentrieren von Proteinen wird oft auch das Detergenz mit ankonzentriert. Ab einer feststehenden, für jedes Detergenz charakteristischen Konzentration (CMC = kritische Mizellenkonzentration), lagern sich die Detergenzmonomere zu Mizellen zusammen. Diese Mizellen haben meist eine solche Größe,

dass sie die beim Konzentrationsprozess verwendete Dialysemembran nicht passieren können, und so das Detergenz mit ankonzentriert wird. Eine exakte Angabe der Detergenzkonzentration ist dann nicht mehr ohne weiteres möglich. Die exakte Messung von Detergenzkonzentrationen ist zur Zeit noch zu aufwändig, um sie routinemäßig durchzuführen. Die Kontrolle über die Detergenzkonzentration ist aber besonders bei Kristallisationsexperimenten von großer Bedeutung, da wegen der Reproduzierbarkeit das Wissen um die genauen Startbedingungen entscheidend ist.

Ein wesentlicher Schritt im Kristallisationsprotokoll für den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex ist die Durchführung dreier Gefrier- und Auftauzyklen. Solche Gefrierzyklen sind aus der Präparation von Proteoliposomen bekannt und dienen dort zur Vergrößerung der Vesikel. Durch die beim Einfrieren entstehenden Eiskristalle werden die kleinen Vesikel aufgebrochen und können beim langsamen Auftauen miteinander fusionieren. Die Prozedur lehnt sich an der Methode an, die für die Kristallisierung von Cytochrom *b<sub>6</sub>f* aus *C. reinhardtii* beschrieben wurde (Mosser et al., 1997).

Die Kristallisation des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes erbrachte eine Reihe von morphologisch unterschiedlichen Kristallformen.

Tubuläre Kristalle entsprangen aus Proteoliposomen, die selber nicht geordnet waren. Prinzipiell sind tubuläre Kristalle gut für eine 3D-Rekonstitution geeignet, da die helikale Symmetrie alle Ansichten des untersuchten Proteins in einem Bild bereitstellt. Es kann daher auf eine Kippserie im Elektronenmikroskop verzichtet werden. Die Strukturdaten sind isotrop, da keine Daten fehlen, was bei Kippserien durch den begrenzten maximalen Kippwinkel (60-70°) der Fall ist und dort im sogenannten „missing cone“ resultiert. Allerdings sind die Daten bei einer Kippserie bis 60° zu 87 % vollständig. Andererseits ist die Anzahl der Moleküle in einem tubulären Kristall weitaus geringer, als es für 2D-Kristalle der Fall ist. Vergleicht man die 3D-Struktur des Bakteriorhodopsin bei einer Auflösung von 3,5 Å (Grigorieff et al., 1996), die mit Hilfe von 2D-Kristallen erstellt wurde, mit der Struktur des Acetylcholin-Rezeptors bei einer Auflösung von 4,6 Å (Miyazawa et al., 1999), die unter Benutzung von tubulären Kristallen angefertigt wurde, so ist die Zahl der gemittelten Moleküle sehr unterschiedlich. Für die erstere Struktur wurden ca. 6 Millionen Moleküle verwendet,

wohingegen für die letztere Struktur nur ca. eine halbe Million Moleküle gemittelt wurden. Das daraus resultierende schlechtere Signal-zu-Rausch-Verhältnis erschwert das Erzielen hoher Auflösungen. Erfolgreich angewendet wurde die Technik für Strukturen des Cytoskeletts wie Aktin und Mikrotubuli (Dias & Milligan, 1999; Hanein *et al.*, 1998). Auch für Membranproteine konnten strukturelle Erkenntnisse gewonnen werden. Eine Auflösung von 8 Å konnte für die Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA1 erreicht werden. Für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor liegt die Auflösung bei 4,6 Å (Miyazawa *et al.*, 1999), und eine atomare Struktur scheint in greifbarer Nähe.

Das Hauptproblem bei den tubulären Kristallen des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes war der unterschiedliche Durchmesser und die mangelnde Länge der Röhren. Die Variabilität des Durchmessers erschwert das kombinieren der Bilddaten erheblich, da die verschiedenen helikalen Familien unterschiedliche Symmetrien darstellen.

Vesikel mit einem Durchmesser bis zu 2 µm zeigten Ansätze einer Kristallbildung. Das Protein war nur in eine Richtung regelmäßig ausgerichtet. Diese Bereiche waren zudem mosaikartig verteilt. Eine großflächige Ordnung des Proteins in beiden Richtungen wurde nicht erzielt.

Die mehrschichtigen Kristalle eigneten sich zur Berechnung einer Projektionsdichtekarte. Es sind dünne dreidimensionale Kristalle, in denen jede Schicht einen 2D-Kristall repräsentiert. Da mehrere Schichten zum Beugungssignal beitragen, ist die Intensität der Reflexe höher als bei einschichtigen Kristallen. Wegen der wenigen Schichten kann man diese Kristalle jedoch nicht für röntgenkristallographische Untersuchungen verwenden. Auch die Nutzung für die Elektronenkristallographie ist bisher nicht gelungen. Dazu wäre es nötig, die Kristallsymmetrie sowie die Anzahl der Schichten exakt zu bestimmen. Dies ist überaus schwierig, da die Anzahl der Schichten variiert und die Methoden zur Analyse solcher Kristalle noch nicht ausgereift sind (Shi *et al.*, 1998).

Die Projektionsdichtekarte zeigt eine dimere Organisation des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes. Es besteht eine Ähnlichkeit zu dem gleichen Komplex aus *C. reinhardtii*, wenn man Projektionskarten mit gleicher Auflösung vergleicht (Abb. 13). Unterschiedlich ist allerdings die Orientierung der Monomere zueinander. Außerdem zeigt der Spinat-Komplex nur ein Dichtemaximum, wohingegen zwei im *C. reinhardtii* Komplex zu sehen sind. Möglicherweise



ergeben sich strukturelle Unterschiede durch eine unterschiedliche Position des flexiblen Rieske-Proteins. Vom Cytochrom  $bc_1$  Komplex ist bekannt, dass auch hier eine Konformationsänderung eine Rolle beim katalytischen Zyklus spielt. Verschiedene Kristallstrukturen des  $bc_1$  Komplexes mit unterschiedlichen, gebundenen Inhibitoren zeigen das Rieske-Protein an abweichenden Positionen. Das Rieske-Protein hat einen N-terminalen Membrananker, der über eine Verbindungsregion mit dem Kopfbereich gekoppelt ist. Der Kopf des Proteins mit dem FeS-Zentrum dreht sich um ca.  $60^\circ$  während das Chinol an der  $Q_0$ -Position oxidiert wird. Die Verbindungsregion streckt sich dabei und das FeS-Zentrum bewegt sich um ca.  $20 \text{ \AA}$  zwischen dem Cytochrom  $b$  und  $c_1$ . Dieser aufwendige Mechanismus scheint notwendig zu sein, um sicherzustellen, dass nur das erste Elektron vom Chinol aufgenommen wird, wohingegen das zweite Elektron über die beide Hämgruppen des Cytochrom  $b$  zur  $Q_i$ -Stelle wandert (Zhang *et al.*, 1998b).

Mehrschichtige Kristalle wurden auch für Cytochrom  $b_{6f}$  aus *C. reinhardtii* gefunden (Mosser *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu sind die tubulären- und Vesikelkristalle neue Kristallformen, die nicht bei den Kristallisationsexperimenten mit Cytochrom  $b_{6f}$  Komplex aus *C. reinhardtii* beobachtet wurden.

Trotz großer Anstrengungen gelang es im Rahmen der Arbeit nicht, die Bedingungen zur Erzeugung der Vesikelkristalle so zu verbessern, dass sich aus den kleinen, mosaikartig verteilten, geordneten Bereichen größere kristalline Bereiche bilden, die für eine Strukturanalyse geeignet wären. Da diese Kristallformen jedoch nicht mehrschichtig sind, eignen sie sich prinzipiell besser für die elektronenkristallographische Strukturbestimmung.

Um die Funktionsweise des Cytochrom  $b_{6f}$  Komplexes zu verstehen, ist ein detailliertes Strukturmodell notwendig. Trotz der Verwandtheit von  $bc_1$  und  $b_{6f}$  -Komplex gibt es bedeutende Unterschiede in Sequenz, der Bindung von Inhibitoren, Pigmentbindung, Zusammensetzung der Untereinheiten und Dimer-Organisation, die einen direkten Vergleich des  $bc_1$  Komplexes mit dem  $b_{6f}$  Komplex nicht zulassen. Darauf weist eine  $9 \text{ \AA}$  Projektionskarte des  $b_{6f}$  Komplexes aus *Chlamydomonas reinhardtii* hin, die einige Unterschiede zu einer berechneten Projektion des  $bc_1$  Komplexes bei gleicher Auflösung aufweist (Breyton, 2000a; Bron *et al.*, 1999). Zwar sind ähnliche Bewegungen des Rieske-

Proteins erkennbar, aber die Organisation der Extramembrandomänen ist unterschiedlich. Zusätzlich ist die Sequenz und Struktur der *c*-Typ Cytochrome verschieden und auch die Organisation ihrer Hämgruppen ist unterschiedlich (Schoepp *et al.*, 2000).

## 4.2 $H^+$ -ATPase

Die Analyse der Struktur von P-Typ-ATPasen wurde bisher dadurch erschwert, dass es nicht möglich, war rekombinantes Enzym in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Alle bisherigen Kristallisationsversuche mit P-Typ-ATPasen stützen sich auf Enzym aus natürlichen Quellen. Insbesondere Gewebe mit einem hohen Vorkommen nur einer Isoform einer P-Typ-ATPase, wie die  $Na^+/K^+$ -ATPase  $\alpha 1$  aus der Niere, die  $Ca^{2+}$ -ATPase SERCA1 aus der sarkoplasmatischen Membran des Skelettmuskels oder die  $H^+$ -ATPase aus der Plasmamembran des Pilzes *N. crassa*, werden bevorzugt. In den meisten Geweben kommt jedoch eine Mischung verschiedener Isoformen vor, die sich kaum biochemisch trennen lässt. Für das Verständnis von Enzymmechanismen ist es außerdem wichtig, mit Mutanten arbeiten zu können, die oft nicht in dem Organismus exprimiert werden können, dem das Wildtypenzym entstammt. Auch dafür ist die heterologe Expression notwendig.

### 4.2.1 Kristallisation durch Rekonstitution

Die gereinigte  $H^+$ -ATPase und auch die Lipide, die zur Rekonstitution eingesetzt wurden, waren in dem Detergenz Dodecylmaltosid gelöst, welches eine sehr niedrige CMC besitzt.

Das bedeutet, dass sich schon ab einer geringen Konzentration (hier 0,19 mM) Monomere zu Detergenzmizellen zusammenlagern. Diese Konzentration ist ausreichend, um ein Membranprotein in Lösung zu halten. Für eine Rekonstitution in Proteoliposomen muss das Detergenz entfernt werden. Dies geschieht oft durch Dialyse. Bei Detergenzien mit niedriger CMC ist das schwierig, da nur ein geringer Teil des Detergenz als dialysierbares Monomer vorliegt, der Rest aber in Form von Mizellen. Als Alternative bieten sich hier BioBeads an. Das sind poröse Kügelchen aus Polystyrol mit einem Durchmesser von weniger als einem Millimeter, die Detergenz sehr rasch und effektiv absorbieren und aus der Lösung entfernen. Lipide werden nur in einem begrenzten Umfang aufgenommen (Rigaud *et al.*, 1997). Ob BioBeads eine Alternative zur Dialyse sind, muss im Einzelfall geprüft werden, denn bei

manchen Proteinen mag der Zeitraum, in dem das Detergenz entfernt wird, zu kurz für die Ausbildung von Proteoliposomen und Kristallisation sein.

Nach der erfolgreichen Entwicklung eines Kristallisationsprotokolls für die Plasmamembran  $H^+$ -ATPase durch Rekonstitution in Proteoliposomen unter Verwendung von BioBeads, stellte sich die Frage, mit welchen Mitteln es gelingen könnte, die Vesikelkristalle zu vergrößern. Die Kristalle waren auf eine Größe von maximal 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser beschränkt. Dies hing möglicherweise mit dem schnellen Detergenzentzug zusammen, der nicht genug Zeit für das Entstehen größerer Vesikel ließ. Allerdings erbrachte das Hinzufügen von einzelnen BioBeads über einen Zeitraum von 12 Stunden keine größeren Vesikel. Da BioBeads sehr effektiv in der Entfernung von Detergenz sind, ist es selbst bei Zugabe einzelner BioBeads nicht möglich, den Detergenzentzug über einen langen Zeitraum, wie z. B. einer Woche, gleichmäßig durchzuführen, wie es bei einer Dialyse der Fall ist. Es besteht aber die Möglichkeit, dass genau dies notwendig sein kann, um große Vesikelkristalle zu erzielen, wie es beispielsweise für 2D-Kristalle des sekundären Transporters NhaA aus *E. coli* der Fall war (Williams *et al.*, 1999).

Für eine 3D-Dichtekarte und für eine höhere Auflösung wären Kristalle von 5  $\mu\text{m}$  und mehr im Durchmesser günstiger, da man mit solchen Kristallen auch Elektronenbeugung durchführen kann. Strukturen von Proteinen mit atomarer Auflösung, beinhalten allesamt Daten von Elektronenbeugung, da die Amplituden der Strukturfaktoren weitaus präziser ermittelt werden können (Henderson *et al.*, 1990; Kühlbrandt *et al.*, 1994; Murata *et al.*, 2000; Nogales *et al.*, 1998).

#### **4.2.2 Oberflächenkristallisation**

Das Prinzip der Oberflächenkristallisation ist in Abb. 24 dargestellt. Nach Ansatz des Kristallisationsexperimentes mit gelöstem Protein und gelöstem rekonstituierendem Lipid in der wässrigen Phase und einer Einzelschicht von fluorierten Lipiden auf der Tropfenoberfläche, adsorbierte das Protein über den His-tag an die funktionale  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Kopfgruppen der F-Lipide. Nach dem Hinzufügen von BioBeads, die eine Entfernung des Detergenz aus der Lösung bewirkten, rekonstituierte sich eine Proteolipidmembran unterhalb

der Oberfläche. Die so gebildeten Kristalle konnten mit einem elektronenmikroskopischen Netzchen aufgenommen und analysiert werden.

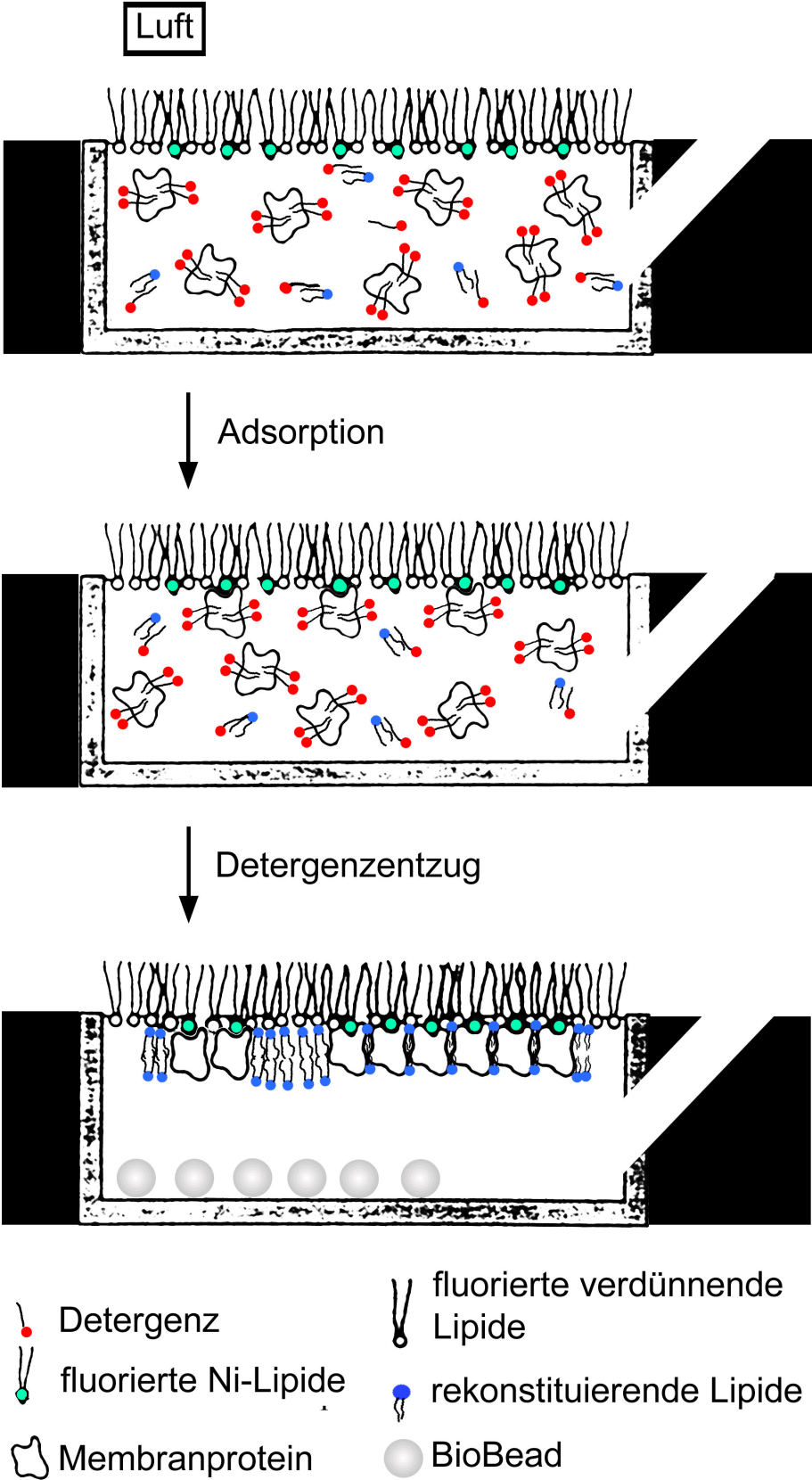


Abb. 24: Prinzip der Oberflächenkristallisation. Nach Ansatz des Kristallisationsexperimentes mit gelöstem Protein und gelöstem rekonstituierenden Lipid in der wässrigen Phase und einer Lipideinzelschicht von fluorierten Lipiden auf der Tropfenoberfläche, adsorbierte das Protein über den His-ta an die funktionale Ni<sup>2+</sup>-NTA-Kopfgruppen der F-Lipide. Nach hinzufügen von BioBeads, die eine Entfernung des Detergenz aus der Lösung bewirkten, rekonstituierte sich eine Proteolipidmembran unterhalb der Tropfenoberfläche. Die so gebildeten Kristalle konnten mit einem elektronenmikroskopischen Netzchen aufgenommen und analysiert werden.

Ein Problem, welches sich im Laufe der Experimente ergab, war eine gewisse Instabilität der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA F-Lipide. Anscheinend war das Nickel-Ion bei diesen Verbindungen nicht sehr stabil gebunden, so dass die Adsorption des Proteins an den Lipidfilm mit zunehmender Aufbewahrungsdauer der Lipide schwächer wurde. Dies hat den Ablauf der Kristallisationsexperimente teilweise stark behindert. Ursache war die Verwendung verschiedener Protokolle für das Beladen der Lipide mit Nickel-Ionen. Die Verwendung möglichst frisch synthetisierter  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA F-Lipide verbesserte die Situation, völlig gelöst war das Problem bis zum Abschluss der hier durchgeführten Arbeiten jedoch noch nicht.

### **Mechanismus der Kristallentstehung**

Neben den Oberflächenkristallen wurden auch immer kleine Vesikel (Durchmesser  $< 0,1 \mu\text{m}$ ) gefunden, die oft auch ein Kristallgitter zeigten. Offensichtlich war es notwendig für eine erfolgreiche Kristallisation, in einem Überschuss an Protein und rekonstituierendem Lipid zu arbeiten. Dies wirft die Frage nach dem Mechanismus der Kristallentstehung auf. Zwei verschiedene Mechanismen sind denkbar. Auf der einen Seite wiesen die Proteinflächen, die schon vor dem Detergenzentzug zu beobachten sind, darauf hin, dass sich das Protein mit Hilfe des His-tags spezifisch an die fluorierten Lipide anlagerte. Ob die Anlagerung unidirektional passierte, oder ob von vorne herein eine Anlagerung als dimerer Komplex stattfand, ist nicht zu entscheiden. Bei einem dimeren Komplex würde immer nur eines der beiden Proteine einen Kontakt über den His-tag mit den fluorierten Lipiden aufbauen, das andere jedoch in die andere Richtung weisen. In den Kristallen war das Protein jedoch immer alternierend orientiert. Eine unidirektionale Anlagerung erscheint zunächst einleuchtender, da jedes Proteinmolekül die Chance hat mit dem His-tag an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Gruppe der F-Lipide zu binden. Andererseits ist durch eine abwechselnde Orientierung eine viel dichtere Packung des hochgradig asymmetrischen Proteins möglich.

Eine andere Möglichkeit ist, dass sich, während das Detergenz entzogen wurde und sich Vesikel und Membranfragmente ausbildeten, erst diese vorgeformten Strukturen an die fluorierten Lipide anlagerten und dort zu großen Strukturen fusionierten. Da diese Vesikel aus gelöstem Protein und Lipid rekonstituiert wurden, wäre ein zufälliger Einbau, d. h. ein Protein

weist in die eine Richtung, das nächste in die andere Richtung, anzunehmen. Interessanterweise hatten die Kristalle aus den Rekonstitutionsversuchen die gleiche Symmetrie und eine ganz ähnliche Einheitszelle. Eine Bindung von vorgeformten Vesikeln an den F-Lipidfilm, die sich dann zu großflächigen Kristallen zusammenlagerten, ist durchaus im Bereich des Möglichen, aber nicht zwingend, da die Einheitszellen sich in ihrer Größe um ca. 5% unterschieden. Eine Bindung an den F-Lipidfilm hätte dann in einer lockereren Packung des Proteins resultiert. Da der F-Lipidfilm sehr fluide war, bestände jedoch von dieser Seite keine Notwendigkeit für eine solche Auflockerung.

Zusätzlich ist es zweifelhaft, warum das Protein in Lösung nicht schon alle Bindungsstellen am F-Lipidfilm abgesättigt haben sollte. Darüber hinaus wurde aus den Kontrollexperimenten klar, dass schon vor dem Detergenzentzug eine Adsorption von Protein an den Lipidfilm stattfand. Wie eine Verdrängung dieses Proteins durch vorgeformte Vesikelfragmente, die bei Beginn des Detergenzentzugs entstanden, verlaufen sollte, ist schwer vorstellbar.

Eine definitive Entscheidung über den Weg der Kristallbildung kann zur Zeit noch nicht getroffen werden. Geplant sind Versuche, bei denen mit ellipsometrischen Methoden die Kristallbildung verfolgt werden kann. Bei dieser Methode wird ein Laserstrahl nahe dem Brewsterwinkel auf die Oberfläche der Probe gerichtet. Die Änderung des Polarisationswinkels durch die Interaktion mit der Oberfläche ist dabei proportional zu der Menge an Protein, die an der Grenzfläche absorbiert wird (Vénien-Bryan *et al.*, 1998). Diese Technik ermöglicht es, die Anlagerung des Proteins an den F-Lipidfilm zu verfolgen, ohne den Film zu zerstören. Ein größeres Wissen um den Ablauf der Kristallisation wird sicherlich dazu beitragen, die Kristallisationsbedingungen weiter zu optimieren.

Die Kombination der fluorierten  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Lipide mit den fluorierten Lipiden ohne funktionelle Kopfgruppe ist von besonderer Bedeutung. Durch unterschiedliche Mischung verschiedener Lipide können die Fluidität, wie auch die elektrostatischen Eigenschaften des Films beeinflusst werden. Generell ist denkbar, dass nicht nur die Interaktion mit dem His-tag, sondern auch eine unspezifische Bindung durch elektrostatische Wechselwirkungen ausreichend für eine Kristallisation sein können, wenn eine genügende Affinität vorliegt. Dass eine Bindung an die geladenen Kopfgruppen und eine Oberflächenkristallisation nur aufgrund

einer elektrostatischen Wechselwirkung möglich ist, konnte an der RNA-Polymerase aus *E. coli* gezeigt werden (Darst et al., 1988). Die Interaktion zwischen der negativen Oberflächenladung der RNA-Polymerase und dem positiv geladenen Lipid war ausreichend für eine 2D-Kristallisation.

Die Kontrollexperimente mit NiSO<sub>4</sub> und Imidazol zeigten, dass die Interaktion zwischen den Ni<sup>2+</sup>-NTA-Kopfgruppen und dem His-tag des Proteins notwendig für eine Anlagerung des Proteins an die fluorierten Lipide und für die Kristallisation an der Oberfläche war. Da die Interaktion spezifisch ist, kann man erwarten, dass es möglich sein wird, auch Kristallisationen mit weniger reinem Protein durchzuführen. Nur der His-tag erlaubt dem Protein eine Anlagerung an den Oberflächenfilm. So wird es vielleicht möglich werden, auch mit anderen Membranproteinen zu experimentieren, bei denen es noch nicht gelungen ist, alle anderen Proteine aus der Präparation zu entfernen. Für das wasserlösliche Cholera-toxin konnte gezeigt werden, dass es 2D-Kristalle an Lipidfilmen bildete, die seinen Rezeptor enthielten, auch wenn andere Proteine anwesend waren, solange diese nicht mit dem Rezeptor konkurrierten (Mosser & Brisson, 1991). Das lässt darauf schließen, dass eine spezifische Bindung, wie sie durch einen His-tag gegeben ist, ausreichend sein kann, um Proteine aus einer weniger reinen Lösung zu kristallisieren.

Dies ist besonders für den Bereich der Kristallisation von Membranproteinen ein wesentlicher Vorteil. Bisherige Strukturinformationen von Membranproteinen liegen vor allem für Proteine vor, die bereits in der natürlichen Membran häufig vorkommen. Fortschritte in der Expression von Membranproteinen (Grisshammer & Tate, 1995) eröffnen nun ein erweitertes Spektrum an Proteinen, die normalerweise nur wenig exprimiert sind. Trotzdem ist die Ausbeute bisher selten ausreichend für die Durchführung von 3D-Kristallisationsexperimenten. Die neue Methode der Oberflächenkristallisation eröffnet erstmals die Möglichkeit, auch mit sehr geringen Proteinkonzentrationen Kristallisationsexperimente mit Membranproteinen durchzuführen.

Für die Anwendung der Technik der Oberflächenkristallisation zur Erzeugung von 2D-Kristallen von anderen Proteinen sollte man das Problem der dichten Packung („close packing“) von Proteinen im Auge behalten. 2D-Kristalle treten in verschiedenen Raumgruppen

auf, so auch mit einer echten hexagonalen (p6) Symmetrie, wie das Cholera-toxin (Kornberg & Ribí, 1987). In anderen Experimenten wurden jedoch auch geordnete Bereiche von Cholera-toxin gefunden, deren Beugung mit einem hexagonalen Gitter übereinstimmte (Ludwig *et al.*, 1986). Es stellte sich heraus, dass es sich dabei jedoch um hexagonal dicht gepackte Proteinbereiche handelte, die aber keinem echten Kristall entsprachen. Da die Methode der Oberflächenkristallisation ideale Voraussetzungen für eine dichte Packung liefert, muss man davon ausgehen, dass solche Effekte gehäuft auftreten können.

### **Kristalltransfer**

Der Transfer der Kristalle von der Oberfläche des Tropfens auf die elektronenmikroskopischen Netzen war ein entscheidender Punkt, denn er beeinflusste sowohl die Menge als auch die Ordnung der Kristalle, die man dann im Elektronenmikroskop untersuchen kann. Leider war es nicht möglich die Kristalle direkt auf dem Kohlefilm wachsen zu lassen, wie es bei den 2D-Kristallen der H<sup>+</sup>-ATPase von *N. crassa* der Fall war (Auer *et al.*, 1999). Mit dieser Methode konnten große 2D-Kristalle direkt auf dem Kohlefilm eines elektronenmikroskopischen Netzens wachsen. Der Kohlefilm bot ein mechanisch stabiles Substrat, wodurch ein Zerbrechen der Kristalle vermieden wurde. Im Unterschied zu den meisten anderen 2D-Kristallen wurden diese Kristalle aber nicht durch Rekonstitution erzeugt und enthielten kein Lipid, sondern es handelte sich um Kristalle aus Protein-Detergenz-Mizellen. Der Grund dafür ist, dass diese Kristallisationsmethode aus Kristallisationsexperimenten für 3D-Kristalle entwickelt wurde, als man herausfand, dass sich auf der Oberfläche des Kristallisationstropfens - an der Grenzfläche zwischen Puffer und Luft - 2D-Kristalle bildeten (Cyrklaff *et al.*, 1995). Somit ist das System nicht ohne weiteres übertragbar. Lag von Versuchsbeginn an ein Netzchen auf dem Tropfen, bedeckten Aggregate, die über die Zeit an den Kohlefilm absorbierten, das Sichtfeld und eine Untersuchung der Probe war nicht möglich. Auch ist fraglich, ob die für die Ausbildung von Kristallen erforderliche Beweglichkeit der Lipid-Moleküle durch einen direkt aufliegenden Kohlefilm nicht behindert würde.



## Ausblick

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung des Transfers soll hier noch aufgezeigt werden. Prinzipiell kann eine einheitlich hydrophobe Oberfläche für das Netzchen durch das Aufbringen einer dünnen Schicht (ca. 25 Å) von Siliziumdioxid auf den Kohlefilm, gefolgt von einer chemischen Alkylierung mit Dimethyloctadecylchlorosilan, geschaffen werden. Diese Oberfläche ist ideal geeignet für eine Interaktion mit den ebenfalls hydrophoben Alkylketten der einschichtigen Lipidoberflächenmembran. Im Testfall von Streptavidin 2D-Kristallen hat diese Transfermethode bei Kubalek *et al.* zu einer starken Erhöhung der Transferrate für die 2D-Kristalle sowie zu einer besseren Bewahrung der Ordnung der Kristalle während des Transfers geführt (Kubalek *et al.*, 1991). Ob die Nutzung einer definiert hydrophoben Netzchenoberfläche für den Kontakt mit den hydrophoben Enden der einschichtigen fluorierten Lipide in einer entscheidenden Verbesserung des schwierigen Transfers resultiert, muss noch getestet werden.

Die Oberflächenkristalle eignen sich auch für die Anwendung einer neuen Methode, die unter niedrigem Winkel eingestrahle Synchrotron-Röntgenstrahlen einsetzt (Haas *et al.*, 1995). Bei Nutzung der Röntgenstrahlen im Streiflicht (grazing incidence) wird der Strahl an der Grenzfläche total reflektiert und die Wellen dringen nur in einem Bereich von ca. 100 Å in die Oberfläche ein. Hier können sie von Oberflächenkristallen gebeugt werden. Durch die begrenzte Interaktion nur mit der Oberfläche lassen sich auch schwache Beugungssignale detektieren, da es zu keiner Hintergrundstreuung aus der darunterliegenden Flüssigphase kommt. Allerdings ist die Lebensdauer der Kristalle durch die intensive Bestrahlung so limitiert, dass die Probe unter dem Strahl verschoben werden muss, damit genügend auswertbare Daten gesammelt werden können (Lenne *et al.*, 2000). Um so wichtiger ist die Bereitstellung möglichst großflächiger Oberflächenkristalle, wie sie mit Hilfe der F-Lipide gewonnen werden können. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Auflösung begrenzt ist durch dynamische Unordnung auf molekularer Ebene, wobei es sich vermutlich um die Bewegung von Seitenketten handelt und nicht um Verzerrungen im Kristallgitter (Lenne *et al.*, 2000). Der Einsatz eines Cross-Linkers (Glutaraldehyd), welcher die lokale Bewegung von Molekülgruppen durch Vernetzung mindert, führte nämlich zu einer Verbesserung der Auflösung. Vorteilhaft bei der Niedrigwinkel-Röntgenbeugung ist, dass sie ohne vorherige

Präparation der Probe angewendet werden kann. Es ist keine Färbung, Kryo-Fixierung oder das Arbeiten im Vakuum - wie in der Elektronenkristallographie - nötig. Auch ein Transfer auf einen anderen Träger wie z. B. ein elektronenmikroskopisches Netzchen entfällt, weil die Messungen direkt auf der Tropfenoberfläche vorgenommen werden.

Lenne *et. al.* führten erste Experimente mit 2D-Kristallen des wasserlöslichen Proteins Streptavidin durch und konnten eine Auflösung von 10 Å in der Ebene und 14 Å senkrecht dazu erzielen (Lenne et al., 2000). In anderen Experimenten wurde ein zweidimensionales Kristall-Pulver von Bakteriorhodopsin analysiert (Verclas *et al.*, 1999). Dabei befand sich auf der Wasseroberfläche ein Film aus kleinen 2D-Kristallen mit einem Durchmesser von jeweils ca. 1 µm, in dem die Kristalle zufällig zueinander orientiert waren. Das führte zu einer Überlagerung der Reflexe. Es konnten dadurch nur Daten in einer Richtung bis zu einer Auflösung von 9 Å aufgenommen werden. Mit dem Einsatz großer 2D-Kristalle wäre es jedoch möglich, einen vollständigen Datensatz aufzunehmen.

Obwohl mit der Kleinwinkelbeugung noch keine neue Proteinstruktur aufgeklärt wurde, bieten die großflächigen Kristalle, die durch die Oberflächenkristallisation erzeugt werden können, eine ideale Voraussetzung für die Weiterentwicklung dieser Methode.

### 4.2.3 Projektionsdichtekarten

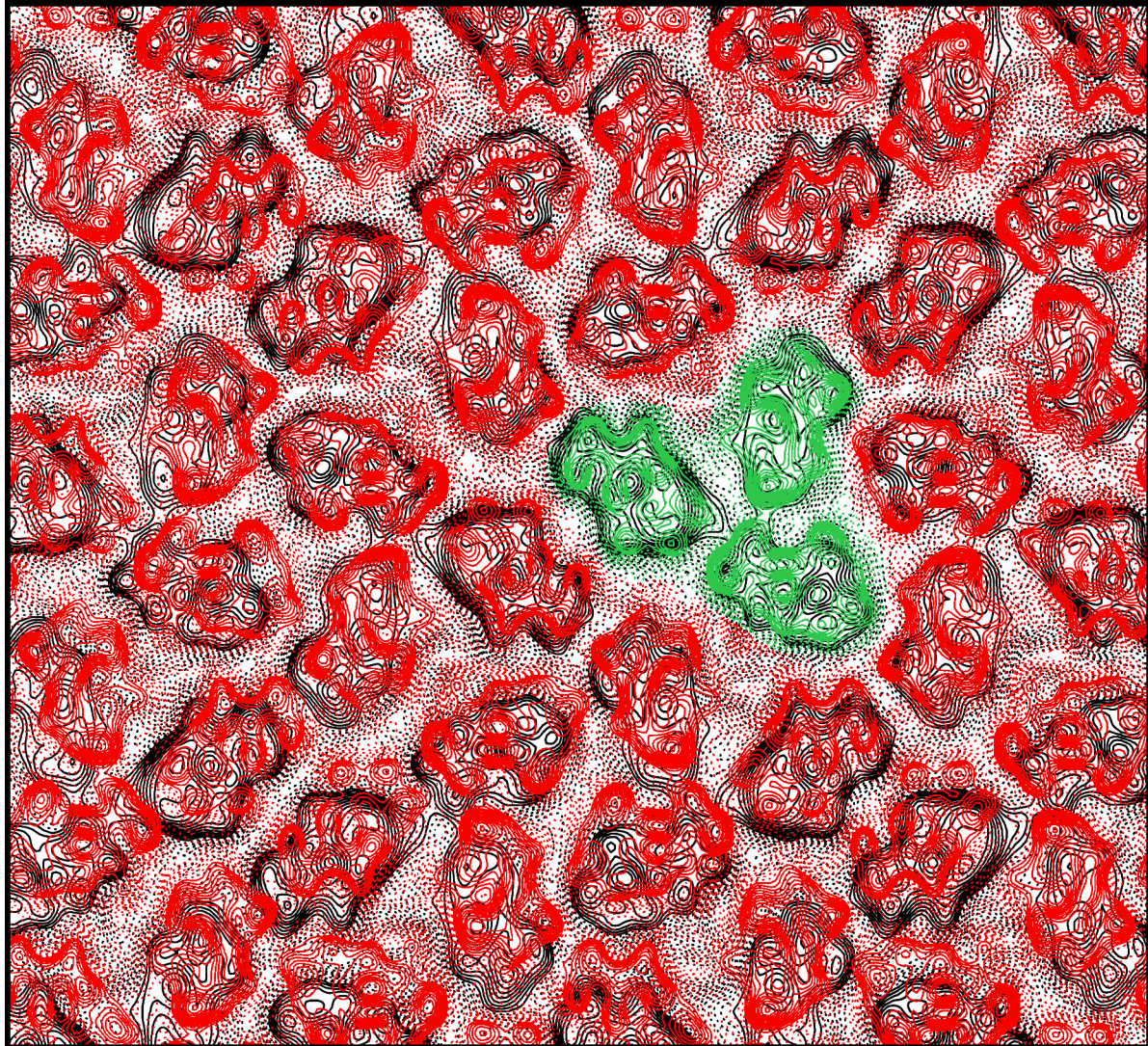
Aus der Symmetrie der Kristalle der H<sup>+</sup>-ATPase ergibt sich, dass das Protein als Dimer im Kristall vorliegt. Es stellt sich die Frage, ob ein Dimer auch die funktionell aktive Form des Enzyms ist. Ein Vergleich mit Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPasen aus anderen Pflanzen zeigt, dass für das Enzym aus der Roten Beete durch Strahlungsinaktivierungs-Tests mit Gamma-Strahlung eine Größe von ca. 225 kDa für den aktiven Komplex ermittelt wurden (Briskin, 1989). Da das Monomer ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa hat, weisen diese Experimente darauf hin, dass die funktionelle Einheit in der nativen Membran (*in situ*) tatsächlich ein Dimer ist. Allerdings wurde auch gezeigt, dass das *N. crassa* Enzym in rekonstituierten Proteoliposomen (*in vitro*) auch als Monomer arbeitet (Goormaghtigh *et al.*, 1986).

Membranproteine arbeiten oft als Dimere. Das Reaktionszentrum des Photosystems II (Boekema *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1995), der Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex (Xia *et al.*, 1997b) und die Cytochrom *c* Oxidase (Tsukihara *et al.*, 1996) existieren als funktionelle Dimere in der Membran und kristallisieren auch als Dimer. Unter den P-Typ ATPasen findet man allerdings eine größere Variation, so dass das Protein in Kristallen dieser Enzymklasse als Monomer, Dimer oder höheres Oligomer auftritt. So existieren für die Ca<sup>2+</sup>-ATPase aus dem sarkoplasmatischen Retikulum 2D-Kristalle mit jeweils einem Monomer (Dux *et al.*, 1985) oder einem Dimer (Castellani *et al.*, 1985) in der Einheitszelle. Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bildet in Anwesenheit von Vanadat kristalline Flächen aus dem dimeren ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> oder dem monomeren ( $\alpha\beta$ ) Enzym (Skriver *et al.*, 1981). Bei Zugabe von Co<sup>2+</sup>-ATP hingegen bildet das gleiche Enzym hexamere Kristalle (Skriver *et al.*, 1992), und mit Phospholipase (Mohraz *et al.*, 1987) oder bei niedrigem pH-Wert (Tahara *et al.*, 1993) ergeben sich Kristalle mit einem Dimer in der Einheitszelle. Die nah verwandte H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bildet 2D-Kristalle mit einem Tetramer in der Einheitszelle (Hebert *et al.*, 1992). Andere Resultate weisen darauf hin, dass die Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPasen in einer inaktiven Form zur Bildung von Hexameren tendieren. In *Saccharomyces cerevisiae* formt die Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase unter Hungerbedingungen - unter denen das Enzym nicht aktiv ist - Hexamere in der nativen Membran, wie durch Gefrierbruch sichtbar gemacht werden konnte (Moor & Mühlethaler, 1963). Von diesem Enzym konnten auch 2D-Kristalle erzeugt werden, die sich zur Erstellung eines Strukturmodells eigneten und auch eine hexamere Einheitszelle hatten (Auer *et al.*, 1998). Zweidimensionale Kristalle von Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase, die aus dem Speichergewebe der Roten Beete isoliert wurden, waren nach Rekonstitution in Liposomen ebenfalls hexamer organisiert (Huang & Berry, 1990). Dieses Spektrum weist auf ein dynamisches Gleichgewicht zwischen dem Monomer und verschiedenen oligomeren Komplexen hin, die möglicherweise funktionelle Bedeutung haben.

Die Kristallsymmetrie weist für die Vesikelkristalle und die Oberflächenkristalle auf ein Dimer in der Einheitszelle hin. In Abb. 25 zeigt eine Überlagerung der Projektionen der Vesikelkristalle und der Oberflächenkristalle, dass nur das Monomer exakt übereinstimmt, die Packung zweier Monomere zu einem Dimer aber unterschiedlich ist. Daraus lässt sich schließen, dass sich nicht schon in Lösung festgefügte Dimere bilden. Dies ist nicht



verwunderlich, da das Protein nicht wie in der Membran einheitlich, sondern alternierend ausgerichtet ist. Es lässt sich also kein Vergleich mit den Verhältnissen in der nativen Membran anstellen, wo möglicherweise zwei Dimere (in die selbe Richtung weisend) zusammenarbeiten.



*Abb. 25: Überlagerung der Projektionen der Vesikelkristalle (rot /grün) und der Oberflächenkristalle (schwarz). In grün ist ein Monomer der H<sup>+</sup>-ATPase von einem Vesikelkristall auf ein Monomer eines Oberflächenkristalls überlagert und ausgerichtet. Der Rest der Projektionskarte der Vesikelkristalle ist in rot dargestellt und es wird sichtbar, dass kein zweites Monomer exakt mit dem der Oberflächenkristalle überlagert.*

Die Orientierung der drei sichtbaren Regionen war in der Projektionskarte der H<sup>+</sup>-ATPase und in der Aufsicht auf die Ca<sup>2+</sup>-ATPase unterschiedlich. Daraus lässt sich schließen, dass sich die beiden Enzyme im Kristall in unterschiedlichen Konformationen befinden. Das gleiche gilt für

einen Vergleich mit der H<sup>+</sup>-ATPase aus *N. crassa*. In der Projektion sind die drei Domänen nicht klar trennbar. Wie bei den Modelling-Experimenten gezeigt, sind auch die Ca<sup>2+</sup>-ATPase und die *N. crassa* H<sup>+</sup>-ATPase in der Orientierung der Domänen unterschiedlich. Es ist zwar anzunehmen, dass alle drei Strukturen die offene Konformation darstellt, aber dies geht nicht einher mit einer starren Arretierung des Enzyms in einer Stellung. Vielmehr ist zu erwarten, dass die gegebene Flexibilität dazu führt, dass eine Position eingenommen wird, welche die Packung im Kristall begünstigt. Eine solche Variation war schon bei verschiedenen Strukturen des nativen Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplexes zu sehen (Hunte *et al.*, 2000; Iwata *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1997b; Zhang *et al.*, 1998b). Eine genauere Aussage über diese Unterschiede wird sich nach Erstellung einer 3D-Struktur der H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 mit Hilfe der Oberflächenkristalle treffen lassen.

### **4.3 Modelling**

Das Erstellen von Homologiemodellen bietet die Möglichkeit, vorhandene Strukturdaten - wie hier die atomare Röntgenstruktur der Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Toyoshima *et al.*, 2000) - zu nutzen, um ein Strukturmodell eines verwandten Enzyms anzufertigen. Dieses kann in Kombination mit elektronenkristallographischen Daten dazu verwendet werden, Aussagen über die Natur der Konformationsänderungen des Enzyms während des katalytischen Zyklus zu treffen.

Der Ablauf und das Ausmaß dieser Konformationsänderungen ist ausschlaggebend für die Funktion. Weil es sich um globale Änderungen handelt, reicht zur Untersuchung dieser Abläufe eine mittlere Strukturauflösung. Diese ist mit der Elektronenkristallographie und den hier vorgestellten Methoden erreichbar. Von Vorteil ist dabei auch, dass für die H<sup>+</sup>-ATPase AHA2 aus *A. thaliana* eine Vielzahl von Mutanten zur Verfügung steht. Einige davon haben eine eingeschränkte katalytische Funktion und sind an verschiedenen Stellen des Reaktionszyklus blockiert, so dass man davon ausgehen kann, dass sich diese Mutanten in einer Konformation befinden, die typisch für diesen Punkt im Zyklus ist (Buch-Pedersen Morten *et al.*, 2000). Wenn es möglich ist, von verschiedenen dieser Mutanten eine Struktur - auch bei mittlerer Auflösung - zu ermitteln, so wird man in der Lage sein, den "Bewegungsablauf", den das Enzym während der Katalyse durchläuft, wie in einem Film darzustellen. Das sollte wiederum Aufschluss über die Bedeutung und Funktion der Konformationsänderungen für die Aktivität

des Proteins geben. Der erste Schritt in diese Richtung wurde hier mit der 2D-Struktur der H<sup>+</sup>-ATPase aus *A. thaliana* vorgestellt. Die Ermittlung einer 3D-Struktur mit den vorliegenden Kristallen ist im Gange und die Kristallisation von Mutanten des gleichen Enzyms ist in Vorbereitung.

Der Ansatz des Homologie-Modellings ist auch für den Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex denkbar. Bewegungen von der Größenordnung, wie sie das Rieske-Protein im Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex zeigt (Zhang et al., 1998b), können auch schon bei mittlerer Auflösung durch elektronenkristallographisch sichtbar gemacht werden (Breyton, 2000a). Als verwandte hochauflösende Strukturen stehen hier verschiedene 3D-Strukturen des Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplexes zur Verfügung (Hunte et al., 2000; Iwata et al., 1998; Zhang et al., 1998b). Zusätzlich liegen für Fragmente des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes atomare Strukturen vor, die mit in das Modell einfließen können. So konnten die wasserlöslichen Teile des Cytochrom *f* aus Rübenblättern (Martinez et al., 1996; Martinez et al., 1994) und *Phormidium laminosum* (Carrell et al., 1999) sowie des Rieske-Proteins von Spinat (Carrell et al., 1997) kristallisiert und eine hochauflösende Struktur erstellt werden.

Eine Kombination von elektronenkristallographischen Strukturen des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes in verschiedenen Konformationen und einem Homologiemodell, beruhend auf den atomaren Strukturen des Cytochrom *bc<sub>1</sub>*-Komplexes, würden es ermöglichen zu ermitteln, in wie weit im Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes die gleichen Vorgängen ablaufen und wo Unterschiede im Mechanismus beider Komplexe vorliegen.



## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex

Der Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex vermittelt den Elektronentransport zwischen Photosystem II und Photosystem I und nimmt damit eine zentrale Rolle in der Photosynthese ein. Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte Protokoll für die Präparation des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes aus Spinat ermöglichte eine reproduzierbare Reinigung von hochaktivem Enzym. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den publizierten Daten für den Komplex überein. SDS-PAGE zeigte alle vier großen Untereinheiten sowie eine Bande der kleinen 4 kDa Untereinheiten. Die Präparation ist mit  $450 \pm 60$  Elektronen pro Sekunde 10 - 15 mal aktiver als in bisherigen Veröffentlichungen für Präparationen aus Pflanzenblättern beschrieben und fast doppelt so aktiv wie die besten Präparationen aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Zuverlässigkeit des Aktivitätstests konnte durch den Wechsel des Lösungsmittels für den Elektronendonator von Ethanol zu Dimethylsulfoxid erheblich verbessert werden. Die hohe Effizienz der Proteinreinigung und die hohe Aktivität des Komplexes stellen ideale Voraussetzungen für biophysikalische und strukturelle Studien dar. Versuche zur zweidimensionalen Kristallisation des Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplexes erbrachten Kristalle mit verschiedenen Morphologien, die unterschiedlich gut geordnet waren. Eine Projektionsdichtekarte bis zu einer Auflösung von  $20 \text{ \AA}$  von mehrschichtigen Kristallen zeigte strukturelle Übereinstimmungen, aber auch Unterschiede zu dem verwandten Komplex aus der einzelligen Alge *C.reinhardtii*.

### 5.2 *H<sup>+</sup>-ATPase*

Plasmamembran  $H^+$ -ATPasen wandeln chemische Energie (in Form von ATP) in einen elektrochemischen Gradienten um, der als Energielieferant von sekundären Transportproteinen dient. Es ist gelungen, zweidimensionale Kristalle der heterolog exprimierten und mit einem His-tag ausgestatteten Plasmamembran  $H^+$ -ATPase AHA2 aus *Arabidopsis thaliana* zu erzeugen. Zwei verschiedene Methoden wurden dabei angewandt. Zum einen wurde das Protein in Proteoliposomen rekonstituiert, und die so gewonnenen Vesikelkristalle resultierten in einer Projektionsdichtekarte mit einer Auflösung von  $8 \text{ \AA}$ . In einer zweiten

Methode wurde eine Technik, basierend auf dem Einsatz neu entwickelter, partiell fluorierter und funktionalisierter Lipide, angewandt. Einzelschichten dieser fluorierten Lipide auf der Oberfläche eines Tropfens erwiesen sich auch in Anwesenheit von Detergenz als stabil. Die funktionalisierte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Kopfgruppe der fluorierten Lipide ermöglichte eine Bindung des Proteins über den His-tag. Nach Detergenzentzug bildeten sich in einer Lipiddoppelmembran eingebettete 2D-Kristalle mit einem Durchmesser von bis zu 10 µm, die für die Erstellung einer Projektionsdichtekarte bis 9 Å genutzt wurden. Die beiden elektronenkristallographisch erstellten Projektionskarten waren sehr ähnlich. Sie zeigten drei voneinander abgegrenzte Domänen, die in Zusammenhang mit einer vorliegenden Struktur der verwandten Ca<sup>2+</sup>-ATPase interpretiert werden konnten. Die Technik der Oberflächenkristallisation eröffnet neue Möglichkeiten für die Kristallisation von Membranproteinen. Kristallisationsexperimente können bei Proteinkonzentrationen von nur 50-150 µg/ml durchgeführt werden und sind für alle Membranproteine, die mit einem His-tag exprimiert werden können, anwendbar.

Es wurde ein Homologiemodell der Plasmamembran H<sup>+</sup>-ATPase aus *Neurospora crassa* in Anlehnung an die atomare Struktur der verwandten Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA1 erstellt. Beide Enzyme liegen in unterschiedlichen Konformationen vor, die sie während des Reaktionszyklus durchlaufen. Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei offenbar um die Bewegung ganzer Domänen handelt. Dabei wurde klar, dass in einem solchen Fall schon 3D-Strukturen bei einer mittleren Auflösung von ca. 8 Å, wie sie mit Hilfe der Elektronenkristallographie verhältnismäßig einfach erreicht werden können, viel zum Verstehen von Reaktionszyklen beitragen können, die große Konformationsänderungen beinhalten.



### 5.3 Abstract in English

The cytochrome  $b_6f$  complex plays a central role in photosynthesis, mediating electron transport between photosystem II and photosystem I.

The purification and two-dimensional crystallization of highly active cytochrome  $b_6f$  complex from spinach is described. The preparation shows all spectroscopic characteristics of the pure complex. The electron transfer activity of  $450 \pm 60$  electrons per second is the highest *in vitro* activity reported to date for this complex. Using dimethyl sulfoxide (DMSO) as a solvent for the electron donor enhanced the performance and reproducibility of the assay. The high yield and the high activity of the protein makes it an ideal candidate for biophysical and structural studies. Two-dimensional crystallization experiments yielded several different forms of two-dimensional and thin three-dimensional crystals, exhibiting varying degrees of order. A projection map to a resolution of  $20 \text{ \AA}$  showed that the spinach complex is structurally similar, but not identical to the *C. reinhardtii* complex.

Plasma membrane  $H^+$ ATPases convert chemical energy into electrochemical that are used to energize secondary active transport. Two-dimensional crystals were obtained from *Arabidopsis thaliana* plasma membrane  $H^+$ -ATPase isoform AHA2. The protein was heterologously produced in yeast cells and equipped with a His<sub>6</sub>-tag. Two different methods were applied. The purified  $H^+$ -ATPase readily formed two-dimensional crystals following reconstitution into lipid vesicles. Electron cryo-microscopy of the crystals yielded a projection map at  $8 \text{ \AA}$  resolution. In a second approach, two-dimensional crystals have been obtained by a new strategy based on the use of functionalized, fluorinated lipids spread at the air-water interface. Monolayers of the fluorinated lipids are stable even in the presence of detergent. A nickel functionalized fluorinated lipid was spread into a monolayer at the air-water interface. The overexpressed His-tagged ATPase, which was solubilized in detergent, was added to the sub-phase. Removal of the detergent by adsorption led to the formation of 2D crystals of the membrane protein, embedded in a lipid bilayer. Electron microscopy indicated that the 2D crystals were single layers with dimensions of  $10 \text{ }\mu\text{m}$  or more. Image processing yielded a projection map at  $9 \text{ \AA}$  resolution, which was very similar to that obtained by the former method. Three distinct regions of density of approximately equal size were

apparent and may reflect different domains in individual molecules of AHA2, as indicated by a comparison with the related  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. The surface crystallization approach is quick and reproducible, and requires only minimal protein concentrations of 50-150  $\mu\text{g/ml}$ . The technique may be applied to any membrane protein that can be expressed with a His-tag, and thus offers the prospect of a much needed rational, conceptually simple and potentially general method for the 2D crystallization of membrane proteins.

A homology model of the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase from *Neurospora crassa* was built using the atomic structure of the related  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase as a template. The enzymes are in different conformations, which they acquire during their catalytic cycle. It could be shown that these differences corresponded to the movement of entire domains. It was concluded that 3D structures even at an intermediate resolution of about 8 Å - relatively easily obtainable by cryo-electron microscopy - should be sufficient to give a deeper insight into the processes which require large conformational changes during catalytic reaction cycles.

## 6. Literaturverzeichnis

Aitken, A., Jones, D., Soneji, Y. & Howell, S. (1995). 14-3-3 proteins: biological function and domain structure. *Biochem. Soc. Trans.* **23**(3), 605-11.

Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H. & Rees, D. C. (1987). Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(17), 6162-6.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17), 3389-402.

Amory, A., Goffeau, A., McIntosh, D. B. & Boyer, P. D. (1982). Exchange of oxygen between phosphate and water catalyzed by the plasma membrane ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **257**(21), 12509-16.

Amos, L. A., Henderson, R. & Unwin, P. N. T. (1982). Three-Dimensional Structure Determination by Electron Microscopy of Two-Dimensional Crystals. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **39**, 183-231.

Anderson, M. M. & McCarty, R. E. (1969). The effects of plastocyanin on photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **189**(2), 193-206.

Auer, M., Scarborough, G. A. & Kühlbrandt, W. (1998). Three-dimensional map of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the open conformation. *Nature* **392**(6678), 840-3.

Auer, M., Scarborough, G. A. & Kühlbrandt, W. (1999). Surface crystallisation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase on a carbon support film for electron crystallography. *J. Mol. Biol.* **287**(5), 961-8.

Axelsen, K. B. & Palmgren, M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* **46**(1), 84-101.

Barr, R. & Crane, F. L. (1971). *Methods Enzymol.* **23**, 372-408.

- Black, M. T., Widger, W. R. & Cramer, W. A. (1987). Large-scale purification of active cytochrome b6/f complex from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**(2), 655-61.
- Blanpain, J. P., Ronjat, M., Supply, P., Dufour, J. P., Goffeau, A. & Dupont, Y. (1992). The yeast plasma membrane H(+)-ATPase. An essential change of conformation triggered by H+. *J. Biol. Chem.* **267**(6), 3735-40.
- Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruip, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J. & Rogner, M. (1995). Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(1), 175-9.
- Böttcher, B., Wynne, S. A. & Crowther, R. A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* **386**(6620), 88-91.
- Breyton, C. (2000a). Conformational changes in the cytochrome b6f complex induced by inhibitor binding. *J. Biol. Chem.* **275**(18), 13195-201.
- Breyton, C. (2000b). The cytochrome b(6)f complex: structural studies and comparison with the bc(1) complex. *Biochim. Biophys. Acta - Bioen.* **1459**(2-3), 467-474.
- Breyton, C., De Vitry, C. & Popot, J.-L. (1994). Membrane association of cytochrome b-6f subunits: The Rieske iron-sulfur protein from *Chlamydomonas reinhardtii* is an extrinsic protein. *J. Biol. Chem.* **269**(10), 7597-7602.
- Breyton, C., Tribet, C., Olive, J., Dubacq, J.-P. & Popot, J.-L. (1997). Dimer to monomer conversion of the cytochrome b-6f complex. Causes and consequences. *J. Biol. Chem.* **272**(35), 21892-21900.
- Briskin, D. P. (1989). Change in Target Molecular Size of the Red Beet Plasma Membrane Atpase During Solubilization and Reconstitution. *Plant Physiol.* **90**(2), 394-397.
- Brisson, A. & Unwin, P. N. (1984). Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J. Cell Biol.* **99**(4 Pt 1), 1202-11.
- Bron, P., Lacapere, J. J., Breyton, C. & Mosser, G. (1999). The 9 angstrom projection structure of cytochrome b(6)f complex determined by electron crystallography. *J. Mol. Biol.* **287**(1), 117-126.

- Buch-Pedersen Morten, J., Venema, K., Serrano, R. & Palmgren Michael, G. (2000). Abolishment of proton pumping and accumulation in the E1P conformational state of a plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by substitution of a conserved aspartyl residue in transmembrane segment 6. *J. Biol. Chem.* **275**(50), 39167-39173.
- Carrell, C. J., Schlarb, B. G., Bendall, D. S., Howe, C. J., Cramer, W. A. & Smith, J. L. (1999). Structure of the soluble domain of cytochrome f from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochemistry* **38**(30), 9590-9.
- Carrell, C. J., Zhang, H., Cramer, W. A. & Smith, J. L. (1997). Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure* **5**(12), 1613-25.
- Castellani, L., Hardwicke, P. M. & Vibert, P. (1985). Dimer ribbons in the three-dimensional structure of sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Biol.* **185**(3), 579-94.
- Catty, P., de Kerchove d'Exaerde, A. & Goffeau, A. (1997). The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett.* **409**(3), 325-32.
- Chothia, C. & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* **5**(4), 823-6.
- Cole, S. T., Condon, C., Lemire, B. D. & Weiner, J. H. (1985). Molecular biology, biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase, a complex membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **811**(4), 381-403.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N. & Rosenbusch, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**(6389), 727-33.
- Cramer, W. A., Martinez, S. E., Huang, D., Tae, G. S., Everly, R. M., Heymann, J. B., Cheng, R. H., Baker, T. S. & Smith, J. L. (1994). Structural aspects of the cytochrome b-6f complex; Structure of the lumen-side domain of cytochrome f. *J. Bioen. Biomem.* **26**(1), 31-47.

- Cramer, W. A., Soriano, G. M., Ponomarev, M., Huang, D., Zhang, H., Martinez, S. E. & Smith, J. L. (1996). Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 477-508.
- Cramer, W. A. & Whitmarsh, J. (1977). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**, 133-177.
- Crofts, A. R., Meinhardt, S. W., Jones, K. R. & Snozzi, M. (1983). The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides* - A modified Q-cycle mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **723**, 202-218.
- Crowther, R. A., Henderson, R. & Smith, J. M. (1996). MRC image processing programs. *J Struct Biol* **116**(1), 9-16.
- Cyrklaff, M., Auer, M., Kühlbrandt, W. & Scarborough, G. A. (1995). 2-D structure of the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase as determined by electron cryomicroscopy. *EMBO J* **14**(9), 1854-7.
- Darst, S. A., Ribi, H. O., Pierce, D. W. & Kornberg, R. D. (1988). Two-dimensional crystals of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme on positively charged lipid layers. *J. Mol. Biol.* **203**(1), 269-73.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985). Structure of the Protein Subunits in the Photosynthetic Reaction Center of *Rhodospseudomonas-Viridis* At 3 Angstrom Resolution. *Nature* **318**(6047), 618-624.
- DeRosier, D. & Klug, A. (1968). Reconstruction of Three-Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature* **217**, 130-134.
- DeWitt, N. D., Harper, J. F. & Sussman, M. R. (1991). Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *Plant J* **1**(1), 121-8.
- Dias, D. P. & Milligan, R. A. (1999). Motor protein decoration of microtubules grown in high salt conditions reveals the presence of mixed lattices. *J. Mol. Biol.* **287**(2), 287-92.

- Dietrich, C., Schmitt, L. & Tampe, R. (1995). Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self-assembled lipid interfaces using a novel class of chelator lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20), 9014-8.
- DiRago. (1996). The Cytochrome b<sub>6</sub>f Complex- Composition, Structure and Function. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Yocum, D. O. a. C., ed.), pp. 377-398.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. & Schultz, P. (1988). Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Q Rev Biophys* **21**(2), 129-228.
- Dux, L. & Martonosi, A. (1983). Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca<sup>2+</sup>-ATPase vesicles treated with vanadate. *J. Biol. Chem.* **258**(4), 2599-603.
- Dux, L., Taylor, K. A., Ting-Beall, H. P. & Martonosi, A. (1985). Crystallization of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum by calcium and lanthanide ions. *J. Biol. Chem.* **260**(21), 11730-43.
- Frishman, D. & Mewes, H. W. (1997). Protein structural classes in five complete genomes. *Nature Struc. Biol.* **4**, 626-628.
- Fromherz, P. (1971). Electron microscopic studies of lipid protein film. *Nature* **221**, 267-268.
- Goormaghtigh, E., Chadwick, C. & Scarborough, G. A. (1986). Monomers of the Neurospora plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase catalyze efficient proton translocation. *J. Biol. Chem.* **261**(16), 7466-71.
- Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M. & Henderson, R. (1996). Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **259**(3), 393-421.
- Grisshammer, R. & Tate, C. G. (1995). Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev Biophys* **28**(3), 315-422.
- Haas, H., Brezesinski, G. & Mohwald, H. (1995). X-ray diffraction of a protein crystal anchored at the air/water interface. *Biophys. J.* **68**(1), 312-4.

- Hanein, D., Volkmann, N., Goldsmith, S., Michon, A. M., Lehman, W., Craig, R., DeRosier, D., Almo, S. & Matsudaira, P. (1998). An atomic model of fimbrin binding to F-actin and its implications for filament crosslinking and regulation. *Nature Struct. Biol.* **5**(9), 787-92.
- Harper, J. F., Manney, L. & Sussman, M. R. (1994). The plasma membrane H(+)-ATPase gene family in Arabidopsis: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. *Mol Gen Genet* **244**(6), 572-87.
- Hauska, G., Schütz, M. & Büttner, M. (1996). The Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Complex - Composition, Structure and Function. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R. & Yocum, C. F., eds.), pp. 377-398. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Hebert, H., Xian, Y., Hacksell, I. & Mardh, S. (1992). Two-dimensional crystals of membrane-bound gastric H,K-ATPase. *FEBS Lett.* **299**(2), 159-62.
- Henderson, R. (1995). The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q Rev Biophys* **28**(2), 171-93.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E. & Downing, K. H. (1990). Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**(4), 899-929.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Downing, K., Lepault, J. & Zemlin, F. (1986). Structure of purple membrane from *Halobacterium halobium*: recording, measurement and evaluation of electron micrographs at 3.5 Å resolution. *Ultramicroscopy* **19**, 147-178.
- Henderson, R. & Unwin, P. N. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **257**(5521), 28-32.
- Herz, J. M., Thomsen, W. J. & Yarbrough, G. G. (1997). MOLECULAR APPROACHES TO RECEPTORS AS TARGETS FOR DRUG DISCOVERY. *J. Rec. Sig. Transd. Res.* **17**(5), 671-776.
- Hoff, A. J. & Amesz, J. (1991). In *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.), pp. 723-738. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.



- Hope, A. B. (1993). The chloroplast cytochrome *bf* complex: a critical focus on function. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 1-22.
- Houlne, G. & Boutry, M. (1994). Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a plasma membrane H(+)-ATPase whose expression is restricted to anther tissue. *Plant J* **5**(3), 311-7.
- Hu, X., Xu, D., Hamer, K., Schulten, K., Koepke, J. & Michel, H. (1995). Predicting the structure of the light-harvesting complex II of *Rhodospirillum rubrum*. *Protein Sci* **4**(9), 1670-82.
- Huang, D., Everly, R. M., Cheng, R. H., Heymann, J. B., Schagger, H., Sled, V., Ohnishi, T., Baker, T. S. & Cramer, W. A. (1994). Characterization of the chloroplast cytochrome b-6/f complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry* **33**(14), 4401-4409.
- Huang, L. S. & Berry, E. A. (1990). Purification and characterization of the proton translocating plasma membrane ATPase of red beet storage tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **1039**(2), 241-52.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T. & Michel, H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* **8**(6), 669-684.
- Hurt, E. & Hauska, G. (1981). A Cytochrome f/b<sub>6</sub> Complex of Five Polypeptides with Plastoquinol-Plastocyanin-Oxidoreductase Activity from Spinach Chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **117**, 591-599.
- Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. & Rees, D. C. (1999). Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* **284**(5422), 1961-6.
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S. & Jap, B. K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Science* **281**(5373), 64-71.

- Jahn, T., Dietrich, J., Andersen, B., Leidvik, B., Otter, C., Briving, C., Kühlbrandt, W. & Palmgren, M. G. (2001). Large Scale Expression, Purification and 2D Crystallization of Recombinant Plant Plasma Membrane H(+)-ATPase. *J. Mol. Biol.* **309**(2), 465-476.
- Jahn, T., Fuglsang, A. T., Olsson, A., Bruntrup, I. M., Collinge, D. B., Volkmann, D., Sommarin, M., Palmgren, M. G. & Larsson, C. (1997). The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *Plant Cell* **9**(10), 1805-14.
- Jones, D. T. (1998). Do transmembrane protein superfolds exist? *FEBS Lett.* **423**, 281-285.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard. (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A* **47**(Pt 2), 110-9.
- Jorgensen, P. L. (1975). Purification and characterization of (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. *Biochim. Biophys. Acta* **401**(3), 399-415.
- Kessel, M., Brennan, M. J., Trus, B. L., Bisher, M. E. & Steven, A. C. (1988). Naturally crystalline porin in the outer membrane of Bordetella pertussis. *J. Mol. Biol.* **203**(1), 275-8.
- Kornberg, R. D. & Ribi, H. O. (1987). Formation of Two-Dimensional Crystals of Proteins On Lipid Layers. In *Protein structure, folding, and design 2* (Oxender, D. L., ed.), Vol. 69, pp. 175-186. INC.: NEW YORK, NEW YORK, USA.
- Kubalek, E. W., Kornberg, R. D. & Darst, S. A. (1991). Improved transfer of two-dimensional crystals from the air/water interface to specimen support grids for high-resolution analysis by electron microscopy. *Ultramicroscopy* **35**(3-4), 295-304.
- Kubalek, E. W., Le Grice, S. F. & Brown, P. O. (1994). Two-dimensional crystallization of histidine-tagged, HIV-1 reverse transcriptase promoted by a novel nickel-chelating lipid. *J Struct Biol* **113**(2), 117-23.
- Kühlbrandt, W. (1992). Two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Q Rev Biophys* **25**(1), 1-49.

- Kühlbrandt, W., Wang, D. N. & Fujiyoshi, Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**(6464), 614-21.
- Kunji, E. R., von Gronau, S., Oesterhelt, D. & Henderson, R. (2000). The three-dimensional structure of halorhodopsin to 5 Å by electron crystallography: A new unbending procedure for two-dimensional crystals by using a global reference structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9), 4637-42.
- Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C. & Stallings, W. C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**(6610), 644-8.
- Lancaster, C. R., Kroger, A., Auer, M. & Michel, H. (1999). Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* **402**(6760), 377-85.
- Lebeau, L., Lach, F., Venien-Bryan, C., Renault, A., Dietrich, J., Jahn, T., Palmgren, M. G., Kühlbrandt, W. & Mioskowski, C. (2001). Two-dimensional crystallization of a membrane protein on a detergent-resistant lipid monolayer. *J. Mol. Biol.* **308**(4), 639-47.
- Lenne, P.-F., Berge, B., Renault, A., Zakri, C., Venien-Bryan, C., Courty, S., Balavoine, F., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., Grubel, G., Boudet, N., Kononov, O. & Legrand, J.-F. (2000). Synchrotron radiation diffraction from two-dimensional protein crystals at the air/water interface. *Biophys. J.* **79**(1), 496-500.
- Lester, H. A., Mager, S., Quick, M. W. & Corey, J. L. (1994). Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **34**, 219-49.
- Lozano, J. J., Lopez-de-Brinas, E., Centeno, N. B., Guigo, R. & Sanz, F. (1997). Three-dimensional modelling of human cytochrome P450 1A2 and its interaction with caffeine and MeIQ. *J Comput Aided Mol Des* **11**(4), 395-408.
- Ludwig, D. S., Ribic, H. O., Schoolnik, G. K. & Kornberg, R. D. (1986). Two-dimensional crystals of cholera toxin B-subunit-receptor complexes: projected structure at 17-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(22), 8585-8.

- MacLennan, D. H. & Green, N. M. (2000). Pumping ions. *Nature* **408**, 633-634.
- MacLennan, D. H., Rice, W. J. & Green, N. M. (1997). The mechanism of Ca<sup>2+</sup> transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *J. Biol. Chem.* **272**(46), 28815-8.
- Martinez, S. E., Huang, D., Ponomarev, M., Cramer, W. A. & Smith, J. L. (1996). The heme redox center of chloroplast cytochrome f is linked to a buried five-water chain. *Protein Sci* **5**(6), 1081-92.
- Martinez, S. E., Huang, D., Szczepaniak, A., Cramer, W. A. & Smith, J. L. (1994). Crystal structure of chloroplast cytochrome f reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure* **2**(2), 95-105.
- Matadeen, R., Patwardhan, A., Gowen, B., Orlova, E. V., Pape, T., Cuff, M., Mueller, F., Brimacombe, R. & van Heel, M. (1999). The Escherichia coli large ribosomal subunit at 7.5 Å resolution. *Structure Fold Des* **7**(12), 1575-83.
- Michel, H., Oesterhelt, D. & Henderson, R. (1980). Orthorhombic two-dimensional crystal form of purple membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(1), 338-42.
- Michelet, B. & Boutry, M. (1995). The Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol.* **108**(1), 1-6.
- Mitchell, P. (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett.* **59**(2), 137-9.
- Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Miyazawa, A., Kidera, A., Kimura, Y. & Fujiyoshi, Y. (1999). The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J. Mol. Biol.* **286**(3), 861-82.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M. & Unwin, N. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J. Mol. Biol.* **288**(4), 765-86.
- Mohraz, M., Simpson, M. V. & Smith, P. R. (1987). The three-dimensional structure of the Na,K-ATPase from electron microscopy. *J. Cell Biol.* **105**(1), 1-8.

- Moor, H. & Mühlethaler, K. (1963). Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.* **17**, 609-628.
- Morsomme, P. & Boutry, M. (2000). The plant plasma membrane H(+)-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**(1-2), 1-16.
- Mosser, G., Breyton, C., Olofsson, A., Popot, J.-L. & Rigaud, J.-L. (1997). Projection map of cytochrome b<sub>6</sub>-f complex at 8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **272**(32), 20263-20268.
- Mosser, G. & Brisson, A. (1991). Conditions of Two-Dimensional Crystallization of Cholera Toxin B-Subunit On Lipid Films Containing Ganglioside Gm1. *J Struct Biol* **106**(3), 191-198.
- Mosser, G., Dörr, K., Hauska, G. & Kühlbrandt, W. (1994). International Congress on Electron Microscopy, Electron Microscopy 1994, Les Editions de Physique **3**, 609-610.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A. & Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**(6804), 599-605.
- Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**(6663), 199-203.
- Palmgren, M. G. & Axelsen, K. B. (1998). Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**(1-2), 37-45.
- Palmgren, M. G. & Christensen, G. (1993). Complementation in situ of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase gene *pma1* by an H(+)-ATPase gene from a heterologous species. *FEBS Lett.* **317**(3), 216-22.
- Palmgren, M. G. & Christensen, G. (1994). Functional comparisons between plant plasma membrane H(+)-ATPase isoforms expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* **269**(4), 3027-33.
- Palmgren, M. G. & Harper, J. F. (1999). Pumping with plant P-type ATPases. *J. Exp. Bot.* **50**(Special Issue SI), 883-893.
- Palmgren Michael, G. (1998). Proton gradients and plant growth: Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. In *Advances in Botanical Research*. (Callow, J. A., ed.), pp. 1-70.

- Picot, D., Loll, P. J. & Garavito, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367**(6460), 243-9.
- Pierre, Y., Breyton, C., Kramer, D. & Popot, J.-L. (1995). Purification and characterization of the cytochrome b-6 f complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **270**(49), 29342-29349.
- Pierre, Y., Breyton, C., Lemoine, Y., Robert, B., Vernotte, C. & Popot, J.-L. (1997). On the presence and role of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome b-6f complex. *J. Biol. Chem.* **272**(35), 21901-21908.
- Plusquellec, D., Chevalier, G., Talibert, R. & Wroblewski, H. (1989). Synthesis and Characterization of 6-O-N Heptylcarbamoylmethyl-Alpha-D-Glucopyranoside a New Surfactant For Membrane Studies. *Anal. Biochem.* **179**(1), 145-153.
- Poggese, C., Polverino De Laureto, P., Giacometti, G. M., Rigoni, F. & Barbato, R. (1997). Cytochrome b-6/f complex from the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: Evidence of dimeric organization and identification of chlorophyll-binding subunit. *FEBS Lett.* **414**(3), 585-589.
- Porra, R. J., Thompson, W. A. & Kriedemann, P. E. (1989). Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations For Assaying Chlorophylls a and B Extracted With Four Different Solvents Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards By Atomic Absorption Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**(3), 384-394.
- Radermacher, M. (1988). Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. *J. Electron Microsc. Tech.* **9**, 359-394.
- Rao, R. & Slayman, C. W. (1996). In *The Mycota* (Brambl, R. & Marzluf, G. A., eds.), Vol. 3, pp. 29-56. Springer-Verlag, Berlin.
- Rieske, J. S., MacLennan, D. H. & Coleman, R. (1964). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 338-344.
- Rigaud, J.-L., Mosser, G., Lacapere, J.-J., Olofsson, A., Levy, D. & Ranck, J.-L. (1997). Bio-Beads: An efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J Struct Biol* **118**(3), 226-235.

- Robinson, S. P. (1986). Improved Rates of Carbon Dioxide-Fixation By Intact Chloroplasts Isolated in Media With Potassium Chloride As the Osmoticum. *Photosynth. Res.* **10**(1-2), 93-100.
- Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**(3), 779-815.
- Scarborough, G. A. (1992). The *Neurospora crassa* plasma membrane proton-ATPase. In *Molecular Aspects of Transport Proteins* (De Pont, J. J. H. H. M., ed.), pp. 117-134. New Comprehensive Biochemistry.
- Schmidt, C. L. & Malkin, R. (1993). Low molecular weight subunits associated with the cytochrome b-6f complexes from spinach and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* **38**(1), 73-81.
- Schoepp, B., Chabaud, E., Breyton, C., Vermeglio, A. & Popot, J. L. (2000). On the spatial organization of hemes and chlorophyll in cytochrome b(6)f. A linear and circular dichroism study. *J. Biol. Chem.* **275**(8), 5275-83.
- Serrano, R. (1989). Structure and Function of Plasma Membrane Atpase. (Briggs, W. R., Ed.), 40, 0-8243.
- Shi, D., Lewis, M. R., Young, H. S. & Stokes, D. L. (1998). Three-dimensional crystals of Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum: merging electron diffraction tilt series and imaging the (h, k, 0) projection. *J. Mol. Biol.* **284**(5), 1547-64.
- Skou, J. C. (1957). The influence of some cations on an adenosine triphosphatase form peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 394-401.
- Skriver, E., Kaveus, U., Hebert, H. & Maunsbach, A. B. (1992). Three-dimensional structure of Na,K-ATPase determined from membrane crystals induced by cobalt-tetrammine-ATP. *J Struct Biol* **108**(2), 176-85.
- Skriver, E., Maunsbach, A. B. & Jorgensen, P. L. (1981). Formation of two-dimensional crystals in pure membrane-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *FEBS Lett.* **131**(2), 219-22.

- Stokes, D. L., Auer, M., Zhang, P. & Kühlbrandt, W. (1999). Comparison of H<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase suggests that a large conformational change initiates P-type ion pump reaction cycles. *Curr Biol* **9**(13), 672-9.
- Sussman, M. R. (1994). Molecular analysis of proteins in the plasmamembrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 211-234.
- Sze, H. (1985). Proton-Translocating Atpase Advances Using Membrane Vesicles. (Briggs, W. R., Ed.), 36, 0-8243.
- Sze, H., Li, X. & Palmgren Michael, G. (1999). Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell* **11**(4), 677-689.
- Tahara, Y., Ohnishi, S., Fujiyoshi, Y., Kimura, Y. & Hayashi, Y. (1993). A pH induced two-dimensional crystal of membrane-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase of dog kidney. *FEBS Lett.* **320**(1), 17-22.
- Tan, S. & Ho, K. K. (1989). Purification of an acidic plastocyanin from *Microcystis aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **973**(2), 111-7.
- Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A. & Williamson, P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity *Science* **272**(5267), 1495-7.
- Telfer, A., Dhami, S., Bishop Steven, M., Phillips, D. & Barber, J. (1994). Beta-Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry* **33**(48), 14469-14474.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**(22), 4673-80.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* **405**(6787), 647-55.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**(5265), 1136-44.



- Unwin, P. N. & Henderson, R. (1975). Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.* **94**(3), 425-40.
- Uzgiris, E. E. & Kornberg, R. D. (1983). Two-dimensional crystallization technique for imaging macromolecules, with application to antigen-antibody-complement complexes. *Nature* **301**(5896), 125-9.
- Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Henderson, R. (1994). Analysis of electron microscope images and electron diffraction patterns of thin crystals of phi 29 connectors in ice. *J. Mol. Biol.* **240**(4), 281-7.
- Venien-Bryan, C., Balavoine, F., Toussaint, B., Mioskowski, C., Hewat, E. A., Helme, B. & Vignais, P. M. (1997). Structural study of the response regulator HupR from *Rhodobacter capsulatus*. Electron microscopy of two-dimensional crystals on a nickel-chelating lipid. *J. Mol. Biol.* **274**(5), 687-92.
- Vénien-Bryan, C., Lenne Pierre, F., Zakri, C., Renault, A., Brisson, A., Legrand, J.-F. & Berge, B. (1998). Characterization of the growth of 2D protein crystals on a lipid monolayer by ellipsometry and rigidity measurements coupled to electron microscopy. *Biophys. J.* **74**(5), 2649-2657.
- Verclas, S. A., Howes, P. B., Kjaer, K., Wurlitzer, A., Weygand, M., Buldt, G., Dencher, N. A. & Losche, M. (1999). X-ray diffraction from a single layer of purple membrane at the air/water interface. *J. Mol. Biol.* **287**(5), 837-43.
- Wang, D. N. & Kühlbrandt, W. (1991). High-resolution electron crystallography of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in three different media. *J. Mol. Biol.* **217**(4), 691-9.
- Weiss, M. S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E. & Schulz, G. E. (1991). Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* **254**(5038), 1627-30.
- Wendt, K. U., Poralla, K. & Schulz, G. E. (1997). Structure and function of a squalene cyclase. *Science* **277**(5333), 1811-5.

- Williams, K. A., Geldmacher-Kaufer, U., Padan, E., Schuldiner, S. & Kühlbrandt, W. (1999). Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution. *EMBO J* **18**(13), 3558-63.
- Wollman, F. A., Minai, L. & Nechushtai, R. (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Bioen.* **1411**(1), 21-85.
- Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L. & Deisenhofer, J. (1997a). Crystal structure of the cytochrome bc-1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**(5322), 60-66.
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L. & Deisenhofer, J. (1997b). Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**(5322), 60-6.
- Zhang, H. M., Huang, D. R. & Cramer, W. A. (1999). Stoichiometrically bound beta-carotene in the cytochrome b(6)f complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. *J. Biol. Chem.* **274**(3), 1581-1587.
- Zhang, P., Toyoshima, C., Yonekura, K., Green, N. M. & Stokes, D. L. (1998a). Structure of the calcium pump from sarcoplasmic reticulum at 8-Å resolution. *Nature* **392**(6678), 835-9.
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R., Berry, E. A. & Kim, S. H. (1998b). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* **392**(6677), 677-84.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional	H <sup>+</sup>	Proton
3D	dreidimensional	Hecameg	6-O-(N-Heptylcarbamoyl)- methyl- $\alpha$ -D-glycopyranosid
Å	Ångström (0,1 nm)	kDa	Kilodalton
ADP	Adenosindiphosphat	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
Asp	Aspartat	MES	Morpholinoethansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	mg	Milligramm
Ca	Calcium	MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid	ml	Milliliter
CMC	kritische Mizellenkonzentration	mm	Millimeter
CTF	Kontrast-Übertragungsfunktion	mM	millimolar
DDM	Dodecylmaltosid	mV	Millivolt
DEAE	Diethylaminoethyl	M <sub>w</sub>	Molekulargewicht
DMSO	Dimethylsulfoxid	Na	Natrium
DOPG	L- $\alpha$ -Dioleoylphosphatidylglycerol	NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
DTT	Dithiothreitol	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid- phosphat
e <sup>-</sup>	Elektron	(Nh <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat	Ni <sup>2+</sup>	Nickel
F-Lipide	fluorierte Lipide	nm	Nanometer
FT	Fourier-Transformation	NTA	Nitrilotriacetat
h	Stunden		

OG	Octylglucosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQ	Plastochinon
PQH <sub>2</sub>	Plastohydrochinon
SDS	Natriumdodecylsulfat
TNP- AMP	2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-8- azido-adenosinmonophosphat
Tricin	N-tris-(hydroxymethyl)- methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## 8. Lebenslauf

### PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

Jens Dietrich  
geboren am 29. Juni 1971  
in Opladen, jetzt Leverkusen  
Eltern: Lore Dietrich, Geb. Bach  
Dirk Dietrich  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULAUSBILDUNG

---

Aug. 1977-Juni 1981	Gemeinschaftsgrundschule Herzogstraße in Leverkusen
Aug. 1981-Mai 1990	Landrat-Lucas-Gymnasium in Leverkusen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, 9.5.90

### ERSATZDIENST

---

Juni 1990-Sept. 1991	Zivildienst beim Diakonischen Werk des Kirchenkreises Leverkusen
----------------------	--

### HOCHSCHULAUSBILDUNG

---

Okt. 1991-Sept. 1993	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Okt. 1993-Juni 1994	Studium der Biologie an der University of Sussex at Brighton, Großbritannien Research Project: „Characterisation of horseradish peroxidase isozyme C mutant Phenylalanine 143 → alanine.“ Betreuer: Dr. A. T. Smith
Juli 1994-April 1996	Studium der Biologie an der Universität zu Köln Pharmakologie-Projekt: „Untersuchungen über die Veränderungen der lokomotorischen und analgetischen Aktivität von Mäusen unter Morphineinfluß und Kombination mit anderen Pharmaka.“ Betreuer: Prof. W. Klaus
Mai 1996-Aug. 1997	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, Abt. Biochemie Thema: „Charakterisierung von systemisch induzierten Kartoffel- Genen.“ Betreuer: Dr. E. Kombrink, Prof. Dr. K. Hahlbrock
Aug. 1997	Diplom
Sept. 1997-Aug. 2001	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M., Abt. Strukturbiologie Thema: „Biochemische und elektronenkristallographische Untersuchungen an Membranproteinen.“ Betreuer: Prof. Dr. W. Kühlbrandt

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Werner Kühlbrandt bedanke ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und das Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Thomas Schröter bedanke ich mich für seine guten Tips.

Dr. Vinzenz Unger und Dr. Patrick Bron danke ich dafür, dass sie mir die Bildverarbeitung beigebracht haben.

Bei all den netten Leuten im ganzen Institut bedanke ich mich dafür, dass ich diese Zeit in guter Erinnerung behalten werde.

Bei Dr. Christine Ziegler, Ulrike Geldmacher-Kaufer und Dr. Cécile Breyton bedanke ich mich für die kameradschaftliche und herzliche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Matteo Lamborghini für die guten und schlechten Zeiten, die wir während unserer Doktorarbeit durchlebten.