

Zweidimensionale Kristallisation und elektronenkristallographische Struktur- bestimmung von Membranproteinen der Energieumwandlung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Tassilo Krug v. Nidda
aus Köln

Frankfurt am Main, 2002
(D F 1)

Dekan: Prof. Dr. Walter Müller

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig
Prof. Dr. Werner Kühlbrandt

Datum der Disputation: 09.12.2002

Zweidimensionale Kristallisation und elektronenkristallographische Struktur- bestimmung von Membranproteinen der Energieumwandlung

2D-Kristallisation und Charakterisierung von PSII aus Spinat
Elektronenkristallographische Untersuchung am CP47-RC-Komplex

2D-Kristallisation und elektronenkristallographische Strukturbestimmung der oligomeren
c-Untereinheit der Na⁺-translozierenden F₁F₀-ATP-Synthase aus *Ilyobacter tartaricus*

Veröffentlichung:

Vonck, J., **Krug von Nidda, T.**, Meier, T., Matthey, U., Mills, D.J., Kühlbrandt, W. and Dimroth, P. Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na⁺-ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **321**, 307-16 (2002)

Nihil tam difficile est, quin quaerendo investigari possi
Nichts ist so schwierig, dass es nicht erforscht werden könnte.

Terenz, ~190-159 v.Chr.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGEN	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1. MEMBRANPROTEINE	2
1.2. PHOTOSYSTEM II	5
1.3. F ₁ F ₀ -ATP-SYNTASE	11
1.4. ELEKTRONENKRISTALLOGRAPHIE	17
1.4.1. 2D-Kristallisation	17
1.4.2. Elektronenmikroskopie	20
1.5. BILDVERARBEITUNG	23
2. MATERIAL	26
2.1. BIOLOGISCHES MATERIAL	26
2.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZEN	26
2.3. ELEKTRONENMIKROSKOPE UND ZUBEHÖR	26
3. METHODEN	27
3.1. PRÄPARATION VON PHOTOSYSTEM II	27
3.1.1. Anzucht von Spinat	27
3.1.2. Puffer und Lösungen	28
3.1.3. Präparation von PSII	29
3.2. PRÄPARATION DER OLIGOMEREN C-UNTEREINHEIT	31
3.3. UV/VIS-SPEKTROSKOPIE	32
3.3.1. Chlorophyllbestimmung	32
3.3.2. Absorptionsspektren bei Raumtemperatur	32
3.4. HARNSTOFF-SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE.....	33
3.5. SAUERSTOFFELEKTRODE	35
3.6. GELFILTRATION / SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHIE.....	36
3.7. LIPIDVORBEREITUNG	36
3.8. METHANOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION VON LIPIDEN.....	37
3.9. DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE ZUR LIPIDBESTIMMUNG	37
3.10. 2D-KRISTALLISATION	38
3.10.1. Puffer und Lösungen für Photosystem II	38
3.10.2. Puffer und Lösungen für die oligomere c-Untereinheit.....	39
3.10.3. 2D-Kristallisation durch Mikrodialyse	40
3.10.4. Entnahme und Lagerung der Kristallsuspension	41
3.10.5. Saccharose-Dichtegradient-Zentrifugation	42
3.10.6. Nachbehandlung der 2D-Kristallisationsansätze	43
3.10.7. DCCD-Markierung von 2D-Kristallen der oligomeren c-Untereinheit.....	43

3.11. ELEKTRONENMIKROSKOPIE	44
3.11.1. Träger für 2D-Kristalle zur Negativkontrastierung.....	44
3.11.2. Negativkontrastierung.....	44
3.11.3. Cryo-Proben.....	45
3.11.4. Bildaufnahme	46
3.12. BILDVERARBEITUNG	47
3.12.1. Vorauswahl durch optische Beugung.....	47
3.12.2. Digitalisierung der Bilder.....	48
3.12.3. MRC-Programmpaket.....	48
3.12.4. Elektronendiffraktion.....	54
4. ERGEBNISSE.....	56
4.1. AUFREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES PHOTOSYSTEM II	56
4.1.1. Aufreinigung.....	56
4.1.2. Gelfiltration.....	59
4.2. 2D-KRISTALLISATION DES CP47-RC-KOMPLEXES	61
4.2.1. Einfluß von Zinkacetat.....	62
4.3. STRUKTURUNTERSUCHUNGEN AM CP47-RC-KOMPLEX.....	64
4.3.1. Elektronendiffraktion.....	64
4.3.2. Nachbehandlung der 2D-Kristalle	65
4.3.3. Saccharose-Dichtegradient-Zentrifugation	66
4.3.4. Mikroskopie und Bildverarbeitung.....	67
4.4. 2D-KRISTALLISATION DER OLIGOMEREN C-UNTEREINHEIT	69
4.4.1. Kristallmorphologie und Kristallformen.....	74
4.4.2. DCCD-markierter c-Ring.....	76
4.5. STRUKTURLÖSUNG DER OLIGOMEREN C-UNTEREINHEIT	80
4.5.1. Elektronenmikroskopie	80
4.5.2. Bildverarbeitung einzelner 2D-Kristalle	81
4.5.3. Erstellung und Symmetrisierung der 3D-Dichtekarte	85
4.5.4. Beschreibung der 3D-Dichtekarte	89
5. DISKUSSION.....	91
5.1. PHOTOSYSTEM II AUS SPINAT	91
5.1.1. Ausgangsmaterial und Aufreinigung von PSII	91
5.1.2. 2D-Kristallisation des CP47-RC-Komplexes.....	92
5.1.3. Strukturuntersuchungen am CP47-RC-Komplex	95
5.1.4. Ausblick	96
5.2. C-RING AUS <i>ILYOBACTER TARTARICUS</i>	98
5.2.1. Ausgangsmaterial.....	98
5.2.2. 2D-Kristallisation	99
5.2.3. Interpretation der symmetrisierten 3D-Dichtekarte	102
5.2.4. Ionenbindungsstelle	106
5.2.5. Vergleich zu anderen Strukturen und Modellen.....	110
5.2.6. Symmetry-Mismatch.....	112
5.2.7. DCCD-markierte Kristalle	114
5.2.8. Ausblick	115
6. ZUSAMMENFASSUNG	116
7. ABSTRACT	118

8. LITERATURVERZEICHNIS.....	120
9. LEBENSLAUF.....	133
10. DANKSAGUNG.....	134

Abkürzungen

1. Chemikalien

Ac	Acetat
ADA	N-(2-Acetamido)-2-iminodiessigsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Asc	Ascorbat
BSA	Bovines Serumalbumin
BHT	Butyliertes Hydroxytoluen
CHES	2-(N-Cyclo-hexylamin)-ethansulfonsäure
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DMPC	1,2-Dimyristoylphosphatidylcholin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DM	Decylmaltosid
DMBQ	Dimethyl-p-benzoquinon
EDTA	Ethylendiamin-tetra-essigsäure
EtOH / MeOH	Ethanol / Methanol
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HTG	n-Heptyl-β-D-Thioglucopyranosid
LS	n-Lauroylsarcosin
Mes	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
OG	n-Octyl-β-D-glucosid
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Phosphatidylcholin
POPS	1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Phosphatidylserin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
TCA	Trichloressigsäure (trichloroacetic acid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-ammonium

2. Einheiten

Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
A	Absorption oder Ampere
C	Celsius
d	Tage

Da / kDa / MDa	Dalton (entspricht u) / Kilodalton / Megadaltan
g / mg / µg	Gramm / Milligramm / Mikrogramm
h	Stunden
K	Kelvin
l / ml / µl	Liter / Milliliter / Mikroliter
m / mm / µm / nm	Meter / Millimeter / Mikrometer / Nanometer
min	Minuten
M / mM / µM	molar / millimolar / mikromolar
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunden
V	Volt
v/v	Volumenanteile (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
w/w	Gewichtsanteile (weight per weight)

3. Sonstige Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AFM	Atomic Force Microscopy
BBY	Thylakoidmembranstapel (nach den Autoren des ersten Aufreinigungsprotokoll Berthold, Babcock und Yokum (Berthold et al. 1981) benannt)
CCD	Charge-coupled Device
Chl	Chlorophyll
CMC	kritische Mizellenkonzentration (critical micellar concentration)
CP	Chlorophyll-bindendes Protein
CTF	Phasenkontrastübertragungsfunktion (contrast transfer function)
Cyt	Cytochrom
D1 / D2	Diffuse Bande 1/2 (Untereinheiten von PSII)
EM	Elektronenmikroskop
FT	Fourier-Transform / Fourier-Transformation
LED	Licht-emittierende Diode (light emitting diode)
LHC-II	Light-Harvesting-Complex von PSII
LMW	Low molecular weight
LPR	Lipid-Protein-Verhältnis (lipid-protein-ratio)
MRC	Medical Research Council (Institut in Cambridge, UK)
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
MWCO	Ausschlußgröße (molecular weight cut off)
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi (Reinheitsgrad für Chemikalien)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PS	Photosystem
RC	Reaktionszentrum (reaction center)
RT	Raumtemperatur (21°C)
TLC	Dünnschicht-Chromatographie (thin layer chromatography)
tm	transmembran (α -Helix)

1. Einleitung

Membranen

Alle bekannten Zellen umschließt eine von der Außenwelt abtrennende Lipiddoppelschicht, die Zell- oder Plasmamembran genannt wird. Auch im Inneren der Zelle (besonders ausgeprägt bei den Eukaryonten) kommen Membransysteme in Form von Zellorganellen oder Vesikeln vor. Sie unterteilen die Zelle in Reaktionsräume mit sehr unterschiedlichem Milieu, Proteinausstattung und Lipidzusammensetzung (z.B. Mitochondrien, Chloroplasten, Golgi, Lysosomen, etc.).

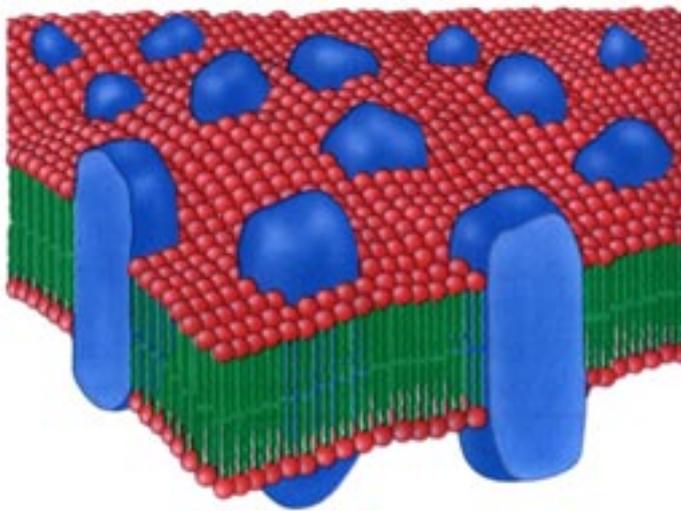


Abb. 1 Fluid mosaic model. Schematische Darstellung einer Lipiddoppelschicht mit integralen Membranproteinen (blau). Die Kopfgruppen der Lipidmoleküle sind rot, der hydrophobe Acylrest grün gefärbt (nach Singer & Nicolson 1972).

Biologische Membranen enthalten neben den Lipidmolekülen (Phospho-, Glykolipide und Cholesterin) charakteristische Proteine, die entweder nur assoziiert sind (zum Teil über einen Lipidanker) oder die Membran durchspannen. Letztere sind die eigentlichen integralen Membranproteine bzw. sollen als solche hier definiert werden. Das Verhältnis von Lipiden zu Proteinen kann stark variieren: Myelin, das die Nervenaxone isoliert, enthält fast nur Lipide und nur wenige Proteine (18 Massenprozent), während die Thylakoid- und inneren Mitochondrienmembranen dicht mit Membranproteinen gepackt sind (bis zu 76%) (Guidotti 1972). Die Plasmamembranen der meisten Zellen liegen mit einem typischen Proteingehalt von 50% dazwischen. Nach dem „fluid mosaic model“ kann die Membran auch als zweidimensionale Lösung aus orientierten Proteinen und Lipiden angesehen werden (Singer & Nicolson 1972) (Abb. 1).

1.1. Membranproteine

Da die Lipiddoppelschicht für gelöste Stoffe, besonders Ionen und polare Moleküle wie Na^+ , Aminosäuren und Zucker, impermeabel ist, die Zelle und die Organellen aber einen ständigen Stoffaustausch benötigen und mit der Umwelt kommunizieren müssen, übernehmen Membranproteine, wie Poren, Kanäle und Transporter, zahlreiche Aufgaben, um diese Barriere zu überbrücken. Zusätzlich dienen Membranproteine als Enzyme der Biosynthese (speziell hydrophober Moleküle) und als Rezeptoren für Hormone und Umweltreize.

Die große Verbreitung der Membranproteine wird auch durch die Analyse der bisher sequenzierten Genome des Menschen, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, Hefe und vieler Bakterien und Archaeen unterstrichen. Sie sagt einen Anteil von 20-30% an Membranprotein-kodierenden Genen mit mindestens zwei α -helikalen transmembranen (tm) Segmenten voraus (Wallin & von Heijne 1998, International Human Genome Sequencing Consortium 2001). G-Protein gekoppelte Rezeptoren machen zum Beispiel alleine fast 1% des humanen und 5% des Genoms von *C. elegans* aus (Herz et al. 1997, The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998).

Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass viele genetisch bedingte Krankheiten mit Defekten von Membranproteinen zusammenhängen und schätzungsweise 70% der Medikamente auf sie einwirken (Byrne & Iwata 2002).

In gravierendem Gegensatz zu ihrer herausragenden Bedeutung und weiten Verbreitung steht die absolute Anzahl an gelösten Strukturen. Weniger als 40 unterschiedliche Membranproteine sind in ihrem 3D-Aufbau momentan bekannt (Michel 2002). Ihnen stehen zur Zeit über 18.000 Einträge in der Proteindatenbank PDB (Berman et al. 2002), darunter etwa 1.000 unabhängige Strukturen von löslichen Proteinen, gegenüber (Rosenbusch 2001).

Es ist also leicht ersichtlich, dass ein großer (Aufhol-)Bedarf für die Strukturlösung der Membranproteine gegeben ist. 3D-Kristallisationsversuchen widersetzen sie sich zum Teil hartnäckig. Die Elektronenkristallographie an 2D-Kristallen bietet sich aber als Methode zur Strukturbestimmung an, da die Membranproteine schon *in vivo* in eine zweidimensionale Matrix aus Lipiden eingebettet sind.

Wohin gegen bei löslichen Domänen eine Vielzahl von Faltungsmotiven (über 600) gefunden werden konnten (Hadley & Jones 1999), dominieren bei den die Membran durchspannenden Segmenten die α -Helix und das „beta barrel“-Motiv (Porine). Die Packung und Lage der tm α -Helix in der Membran kann sich aber stark unterscheiden. Auch können Schleifen zwischen zwei Helices in die Membran zurückfalten und dann wichtige Teile des aktiven Zentrums oder der Kanalregion bilden (KcsA (Doyle et al. 1998), GlpF (Fu et al. 2000)). In vielen Fällen verbinden lange Helices den membranintegrierten und membranständigen Proteinanteil und sind wahrscheinlich für die Weiterleitung von Konformationsänderungen verantwortlich (Ca^{2+} -ATPase (Toyoshima et al. 2000)).

Auffällig ist das häufige Vorkommen von Membranproteinen als Dimere und Multimere.

Energieumwandlung

Eine zentrale Rolle nehmen Membranproteine bei der Energieumwandlung in der Zelle ein (Abb. 2). Zum einen spielt sich die Photosynthese, in der Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt wird, in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten ab. Zum anderen vollzieht sich in den inneren Membranen der Mitochondrien die oxidative Phosphorylierung. Homologe Komplexe und Reaktionen finden sich auch in der bakteriellen Plasmamembran. Die genannten Organellen haben sich auf die Energieumwandlung spezialisiert und beherbergen dicht gepackte und hoch komplexe Membranproteine. Diese dienen zum Teil nur als Gerüst für die prosthetischen Gruppen (Chlorophylle, Cytochrome, Metallcluster) und deren Ausrichtung und Verbindung, was durch die Einbettung in die Membran vereinfacht wird.

Erst der Aufbau eines Ionengradienten über die Membran ermöglicht die Energieumwandlung und Gewinnung von ATP, aber auch den Transport von Nährstoffen so wie die Reizgeneration und –weiterleitung in den Nervenzellen.

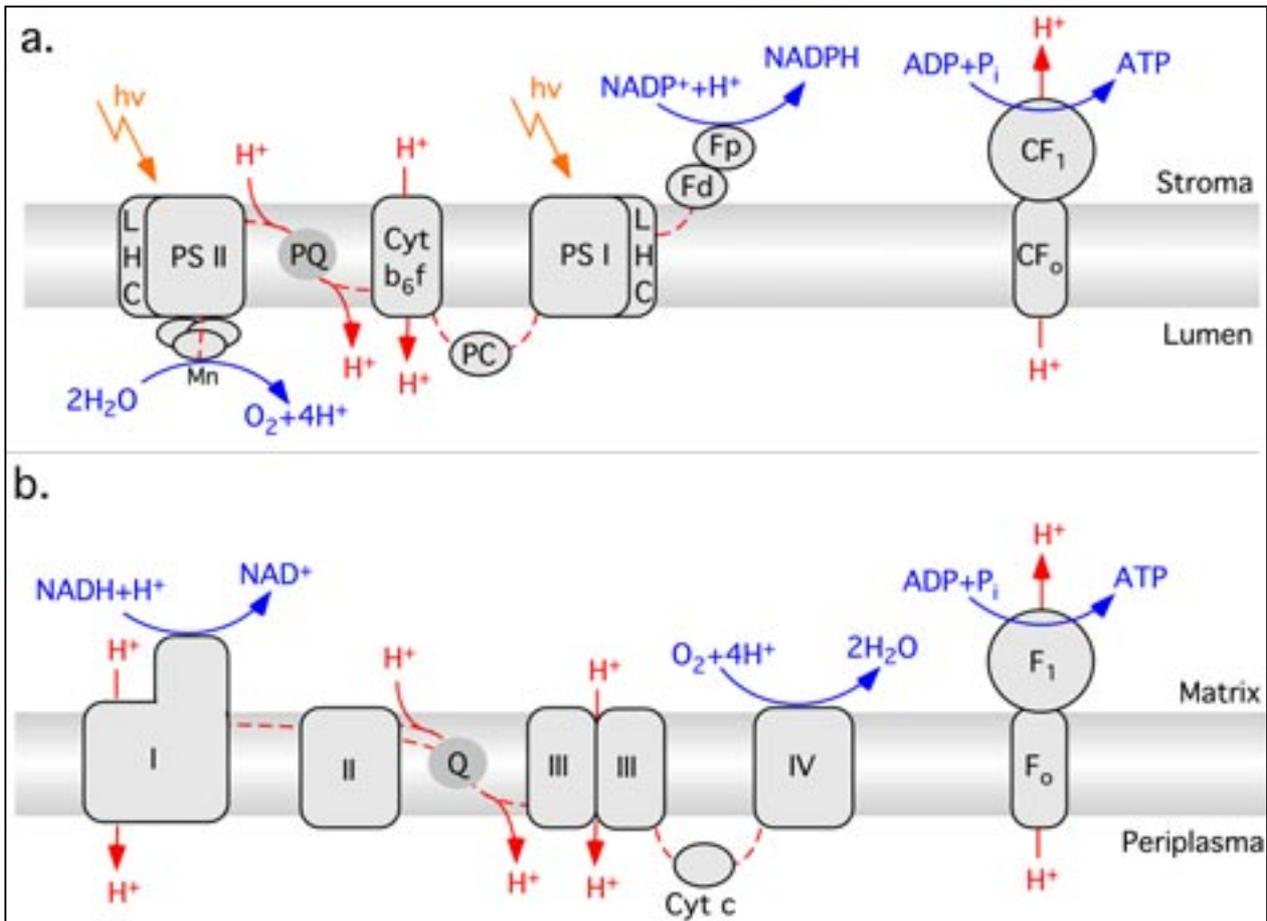


Abb. 2 Schematische Darstellung der **a.** Photosynthese und **b.** oxidativen Phosphorylierung. Biochemische Reaktionen sind in blau eingezeichnet. Elektronentransfer ist durch gestrichelte, rote Linien gekennzeichnet, Protonenbewegungen durch rote Pfeile. Abkürzungen: Mn – Mangancluster, PQ – Plastochinon, PC – Plastocyanin, Fd – Ferredoxin, Fp – Flavoprotein, Q – Ubichinon/Ubichinol-Pool

Durch ihre starke Anreicherung in den Organellen und das leichte Abtrennen der selbigen konnte eine relativ große Anzahl von Membranproteinen der Photosynthese und Atmungskette gereinigt, charakterisiert und kristallisiert werden.

Außer von Komplex I (NADH-Dehydrogenase), von dem zumindest eine elektronenmikroskopische Einzelpartikelstruktur (Grigorieff 1998, Guenebaut et al. 1998) erstellt werden konnte, der aber auch mit Abstand der größte Komplex ist, liegen hochauflösende Strukturen von zwei Analoga von Komplex II (Lancaster et al. 1999, Iverson et al. 1999), von Komplex III aus verschiedenen Organismen (Berry et al. 1999, Hunte et al. 2000, Iwata et al. 1998, Xia et al. 1997) sowie Komplex IV (Iwata et al. 1995) vor. Aus der Photosynthese ist die 3D-Struktur des Photosystems I (Jordan et al. 2001) und ein Strukturmodell bei mittlerer Auflösung von Photosystem II (Zouni et al. 2001) bekannt. Erste Antworten über den Aufbau von Membranproteinen und der Energie-

umwandlung gaben die Röntgenstrukturen der Reaktionszentren photosynthetischer Bakterien (Deisenhofer & Michel 1991).

1.2. Photosystem II

Photosynthese

Die oxygene Photosynthese liefert die Grundlage für alles höhere Leben der Erde. Sowohl der molekulare Sauerstoff der Erdatmosphäre, als auch die Energiegrundlage der Organismen gehen auf die Fixierung von Sonnenenergie zurück.

Die Lichtreaktion, die die Absorption der Lichtquanten (Primärreaktion) einschließt und die Dunkelreaktion, in der CO_2 unter Verbrauch von ATP und Reduktionsäquivalenten (NADPH) fixiert wird, spielen sich in den Chloroplasten der Algen und Pflanzen, sowie den Cyanobakterien ab.

Die Chloroplasten werden von zwei Membranen umschlossen und beherbergen eine wässrige Phase (Stroma) sowie ein Membransystem (Thylakoide). Letztere enthalten die Membranproteinkomplexe der Lichtsammelantennen, Reaktionszentren, Elektronentransferkette und CF_1F_0 -ATP-Synthase und unterscheiden sich von anderen Lipidmembranen durch einen hohen Anteil von Galaktolipiden.

In höheren Pflanzen durchziehen die Thylakoidmembranen das Stroma und bilden Stapel aus, die Grana genannt werden. In diesen Granamembranen ist das Photosystem II (PSII) mit seinem Lichtsammelkomplex (LHC-II) stark angereichert. Der Cytochrom b_6f -Komplex kommt sowohl in den Grana- als auch in den Stromathylakoiden vor. Das Photosystem I (PSI) und die CF_1F_0 -ATP-Synthase findet man vorwiegend in den Stromalamellen, aber auch in den vom Stroma zugänglichen Bereichen der Granastapel.

Die beiden Photosysteme und ihre Lichtsammelkomplexe absorbieren Lichtquanten des sichtbaren Spektrums, besonders im blauen und roten Bereich, und nutzen sie, um Elektronen anzuregen. Nach dem Z-Schema arbeiten sie in Serie (Blankenship & Prince 1985) (Abb. 2a). Das PSII überträgt Elektronen von Wasser auf einen Pool von Plastochinon (PQ). Über diesen sogenannten Q-Zyklus (Mitchell 1975) werden die

Elektronen auf den Cytochrom b_6f -Komplex übertragen, der die Photosysteme verbindet, indem er die Elektronen weiter auf Plastocyanin (PC) überträgt. PC transportiert die Elektronen wiederum zu PSI, wo sie ein weiteres Mal angeregt werden, um über FAD auf NADP übertragen zu werden. Von zyklischer Phosphorylierung spricht man, wenn das Elektron von PSI auf den Cytochrom b_6f -Komplex zurück übertragen wird.

Neben dem Transport der Elektronen werden Protonen von der stromalen auf die luminale Seite überführt. Das dadurch aufgebaute elektrochemische Potential über der Thylakoidmembran wird zur Bildung von ATP mittels der CF_1F_0 -ATP-Synthase genutzt (Mitchell 1961).

Photosystem II

PSII ist der größte integrale Thylakoidmembranproteinkomplex und kommt als Dimer mit jeweils bis zu 25 unterschiedlichen Untereinheiten in den Chloroplasten vor. Diese Proteine sind Produkte der *psb*-Gene, die im Chloroplasten oder Nukleus kodiert sind. Hinzu kommen noch die Genprodukte der *cab*-Gene, die in höheren Pflanzen und Algen das äußere Antennensystem (Lhcb1-6) aufbauen (Barber et al. 1997).

Aufbau

Der PSII-Komplex (Abb. 3) kann in mehrere funktionelle Untereinheiten eingeteilt werden: D1 (PsbA) und D2 (PsbD) bilden das Reaktionszentrum (RC) (Abb. 3c) mit dem speziellen Chlorophyll a-Paar P680, vier weiteren Chlorophyll a-Molekülen, zwei Phäophytinen, Q_A (D2) und Q_B (D1), zwei Eisenionen und dem Mangancluster. D1 zeichnet sich durch die höchste Umsatzrate (von der Proteinneusynthese bis zum Abbau) der PSII-Untereinheiten aus (Mattoo et al. 1984).

Cytochrom b_{559} ist eng mit dem D1/D2-Heterodimer assoziiert, so daß es oft zum RC hinzugerechnet wird. Es besteht aus einer α - und β -Untereinheit (PsbE und F), die jeweils eine transmembrane (tm) Helix besitzen und gemeinsam ein Häm binden. Es schützt wahrscheinlich das RC vor oxidativem Stress (Barber & Andersson 1992).

CP43 (PsbC) und CP47 (PsbB) werden häufig als innere Antennen bezeichnet. Ihre jeweils sechs tm Helices binden etwa 15 Chlorophyll a und 3 Carotinoide. Zwischen Helix V und VI befindet sich eine luminale Schleife von 150 bzw. 200 Aminosäuren, die

möglicherweise an der Bindung des Mangancluster beteiligt ist (Bricker 1990, Barber 1997).

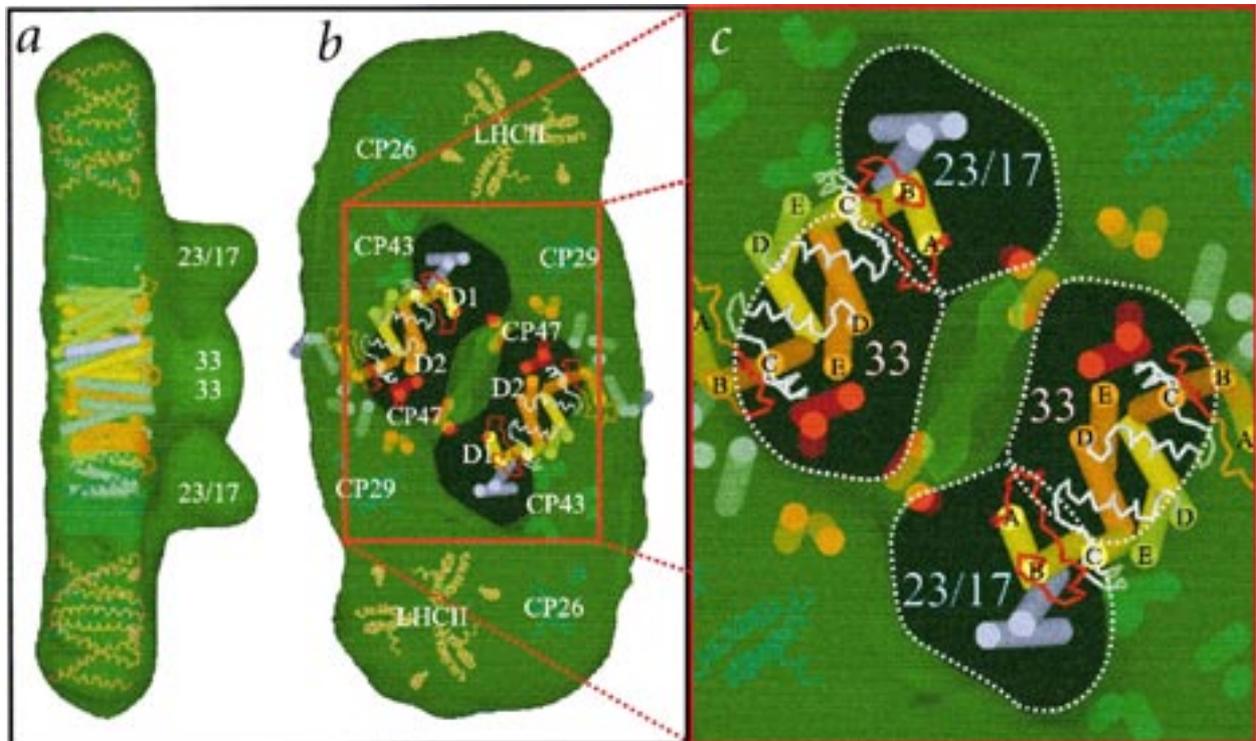


Abb. 3 Modell von PSII aus Spinat. Überlagerung der Einzelpartikelstruktur mit Strukturmodellen der Subkomplexe von LHC-II und CP47-RC. **a.** Seitenansicht, **b.** Aufsicht vom Lumen, **c.** Vergrößerung des dimeren Reaktionszentrums (aus Nield et al. 2000).

In höheren Pflanzen kommen drei extrinsische Proteine (PsbO, P, und Q mit einer Masse von 33, 23 und 17 kDa) vor, die sich leicht durch chaotrope Reagenzien von der luminalen Seite entfernen lassen. Früher wurde angenommen, dass sie den Mangancluster binden (oxygen *evolving* complex (OEC)), in der Zwischenzeit geht man davon aus, dass sie ihn nur schützen und den Ionenhaushalt (besonders Calcium- und Chloridionen) beeinflussen (oxygen *enhancing* complex). (Rutherford 1989, Bricker & Frankel 1998 und weitere Verweise darin). Cyanobakterien weisen ebenfalls ein PsbO-Protein auf. Hinzu kommen aber noch ein 12 kDa schweres PsbU und das extrinsische Cytochrom c_{550} (PsbV).

Von den vielen kleineren Untereinheiten, die oft nur eine α Helix besitzen, ist zum größten Teil die Funktion noch nicht bekannt. Sie könnten bei der Assemblierung und Dimerisierung des Komplexes helfen oder regulatorische Aufgaben übernehmen. Eine Ausnahme bildet PsbS, von dem gezeigt werden konnte, dass es für das „non-photochemical quenching“ verantwortlich ist (Li et al. 2000).

Funktion

Lichtquanten werden hauptsächlich von LHC-II aber auch den inneren Antennen eingefangen. Beide enthalten eine große Anzahl von Chlorophyll a und b (im Fall von LHC-II geht man von 12-14 Molekülen aus (Rogl et al. 2002)), welche ihnen ein breites Absorptionsspektrum verleihen. Des Weiteren binden sie Carotinoide, die maßgeblich eine Schutzfunktion übernehmen. Die Energie wird weiter über die inneren Antennen (CP24, 26, 29 und CP43, 47) auf das spezielle Chlorophyllpaar P680 des Reaktionszentrums von PSII übertragen. Dort kommt es zur Ladungstrennung. Das angeregte Elektron wird über eines von zwei Phäophytinen (Phe a) und ein gebundenes Plastochinon (Q_A) auf ein lösliches Plastochinon (Q_B) übertragen. Durch das Übertragen eines weiteren Elektrons entsteht Plastochinol. Das radikalische Kation $P680^+$ wird - mit einem Tyrosinradikal (Y_D bzw. Y_Z) als Elektronenüberträger - durch die Oxidation von Wasser zu Sauerstoff wieder reduziert. Die Spaltung von Wasser erfolgt an einem Cluster aus vier Manganionen in fünf diskreten Schritten (S_0 bis S_4), von denen vier Schritte jeweils ein Elektron liefern. PSII verbindet somit einen 4-Elektronenvorgang (Wasserspaltung) mit einem 1- (Elektronenanregung) bzw. 2-Elektronenvorgang (Plastochinol-Bildung) und überspannt gleichzeitig ein Reduktionspotential von +0,815 V (Oxidation von Wasser) bis -0,7 V (angeregtes Reaktionszentrum) (Blankenship & Prince 1985).

Strukturdaten

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur elektronenmikroskopische Einzelpartikelstrukturen von PSII-Komplexen aus Pflanzen und Cyanobakterien bei niedriger Auflösung (Boekema et al. 1995, Nield et al. 2000) und die Struktur des Subkomplexes CP47-RC bei einer Auflösung von 8 Å vor. Letzterer wurde durch elektronenkristallographische Untersuchungen an 2D-Kristallen gewonnen (Rhee et al. 1998). Diese Struktur (Abb. 4) zeigte zum ersten Mal die Lage und Ausrichtung der wichtigen Pigmente und wies große Parallelen zu den bekannten Strukturen von PS I (Jordan et al. 2001) und den bakteriellen Reaktionszentren (Michel & Deisenhofer 1988) auf. Offen blieb die Lage und Konformation des Manganclusters sowie die Struktur der extrinsischen Proteine, die während der Kristallisation verloren gingen. Auf Grund der begrenzten Auflösung blieb auch eine gewisse Unsicherheit über die genaue Lage und Ausrichtung der Chlorophylle, sowie die Zuordnung der kleinen Untereinheiten.

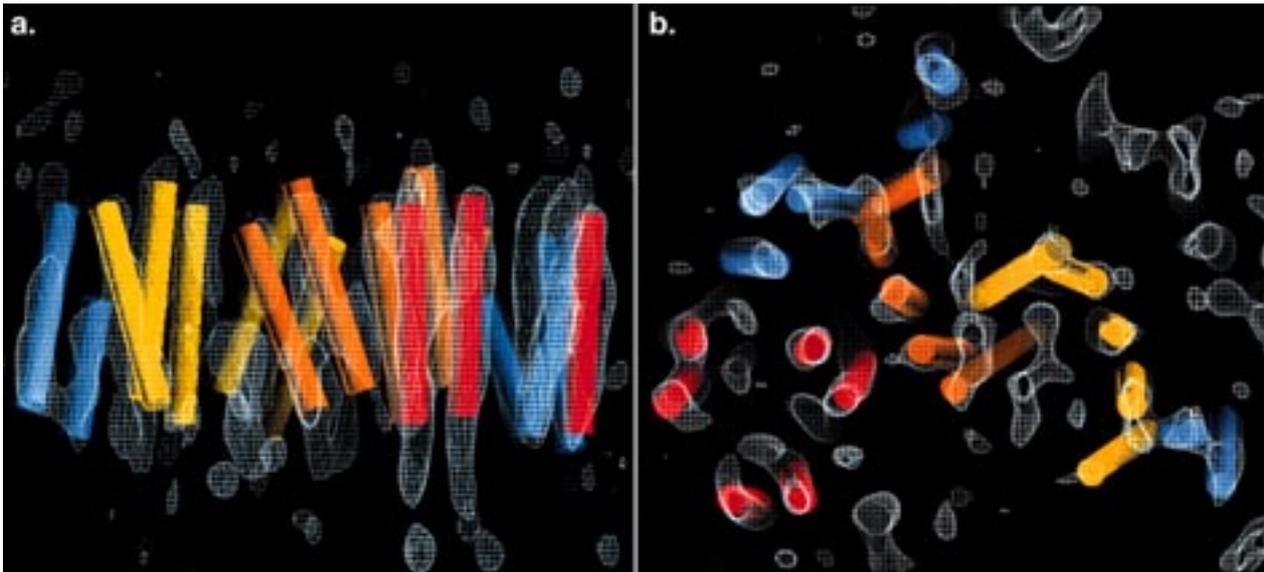


Abb. 4 3D-Dichtekarte des CP47-RC-Komplexes mittels Elektronenkristallographie ermittelt. 23 tm Helices sind eingezeichnet. **a.** Seitenansicht, Lumen unten. **b.** Aufsicht vom Lumen, D1 - gelb, D2 - orange, CP47 - rot, andere Untereinheiten - blau (aus Rhee et al. 1998).

In der Zwischenzeit wurde aber die Struktur des aktiven homodimeren PSII aus *Synechococcus elongatus*, einem thermophilen Cyanobakterium, bei einer Auflösung von 3,8 Å gelöst (Abb. 5) (Zouni et al. 2001). Die Röntgenstruktur bestätigt das bisherige Modell weitgehend (so auch die sehr spekulative Lage von Cyt b_{559} (Rhee 1998)), dies natürlich mit einer höheren Präzision und Vollständigkeit. Neu ist besonders die Lokalisation und die Form des Manganclusters, sowie die Identifizierung weiterer Untereinheiten (PsbK, L, H, I, X). Ferner konnten sieben tm Helices lokalisiert, aber nicht zugeordnet werden. Besonders die extrinsischen Domänen und Proteine sind bis auf PsbV und einen Teil von PsbO noch nicht gefittet.

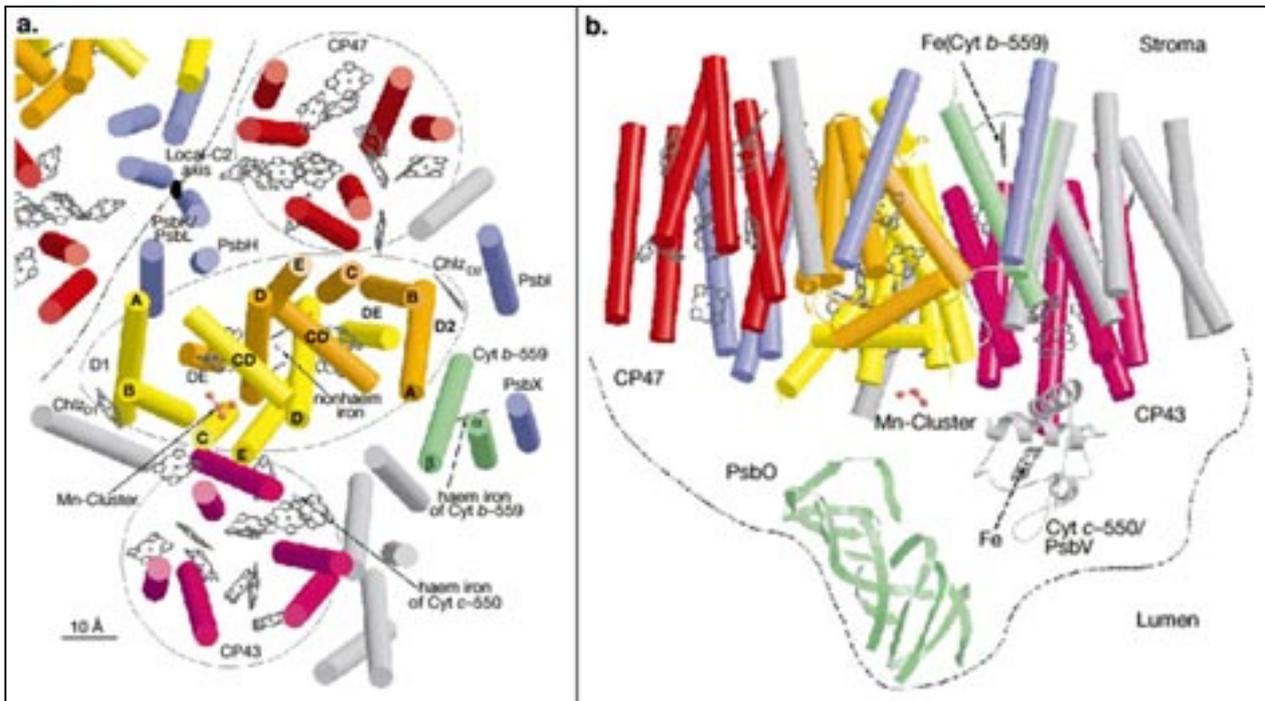


Abb. 5 Röntgenstrukturmodell von PSII. Tm Helices durch schlanke Zylinder und Häm und Chlorophylle durch Porphyrinstrukturen repräsentiert. **a.** Luminale Aufsicht ohne die extrinsischen Proteine. Reaktionszentrum mit D1 (gelb) und D2 (orange) durch elliptische Umrandung, innere Antennen CP43 (magenta) und CP47 (rot) durch runde Umrandung hervorgehoben. **b.** Seitenansicht des Monomers entlang der Längsachse der Untereinheiten D1/D2 (aus Zouni et al. 2001).

1.3. F₁F_o-ATP-Synthase

Adenosintriphosphat (ATP) ist die universelle Energiewährung der Zelle. Es wird zum größten Teil durch die ATP-Synthase unter Ausnutzung eines transmembranen elektrochemischen Gradienten aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat hergestellt. Man findet die ATP-Synthase in den inneren Mitochondrienmembranen und der Plasmamembran von Bakterien als F₁F_o-Komplex und in den Thylakoiden der Chloroplasten als CF₁CF_o-Komplex.

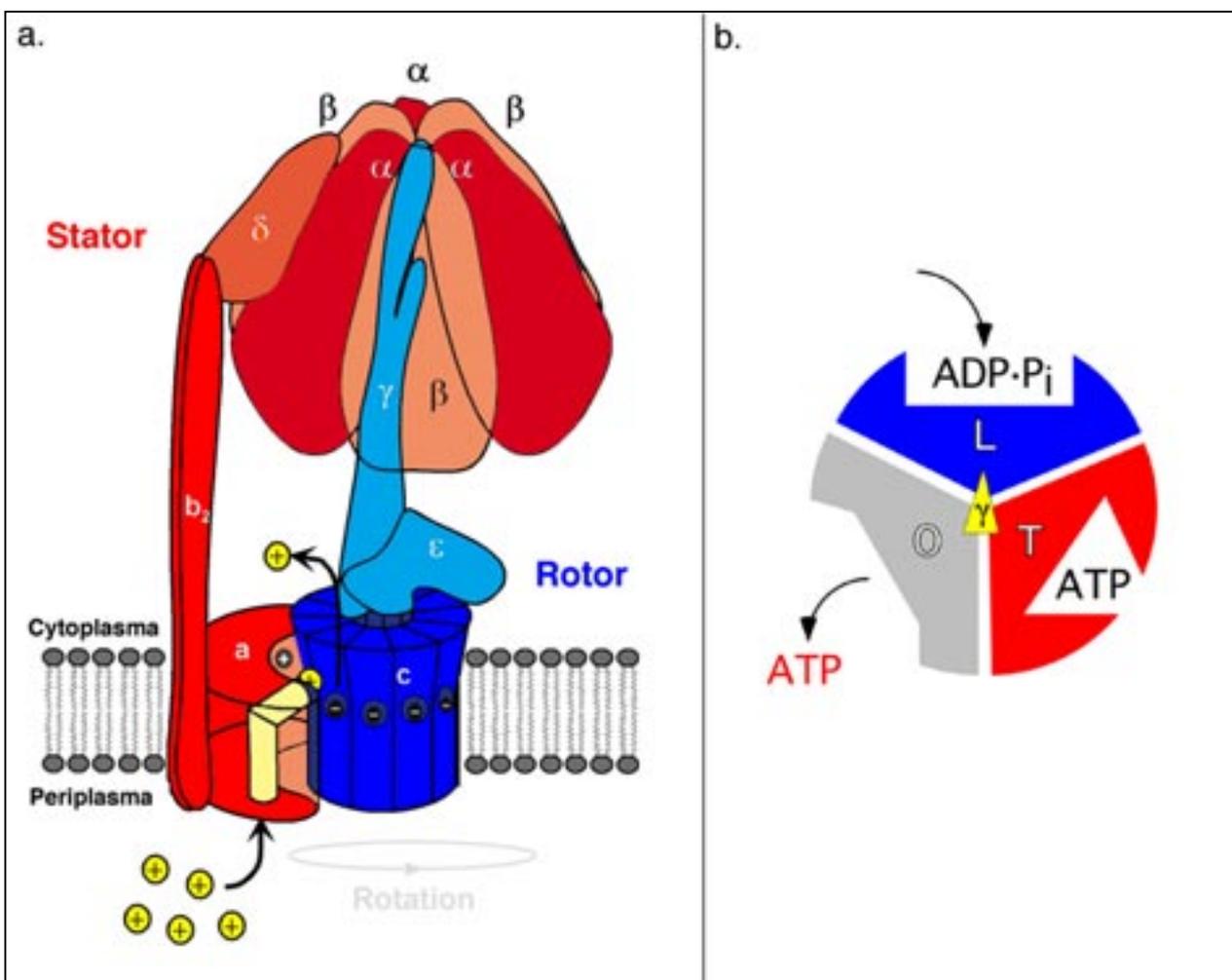


Abb. 6 a. Schematisches Modell der F₁F_o-ATPase. Der Rotor (blau) besteht aus den Untereinheiten c_xγε und der Stator (rot) aus ab₂δα₃β₃ (leicht verändert nach Dimroth et al.), **b.** „binding-change“ Mechanismus: die drei katalytischen Zentren rotieren durch die Konformationen: O – open, L – loose binding und T – tight binding.

Aufbau und Struktur

Die F₁F_o-ATP-Synthase aus *Escherichia coli* (Abb. 6a), die zu Beginn hier beispielhaft besprochen werden soll, besteht aus acht verschiedenen Genprodukten, die alle auf dem unc-Operon kodiert sind (Walker et al. 1984). Das Enzym besteht aus dem extramembranen, katalytischen F₁-Teil (380 kDa), der über den zentralen Stiel mit dem membranintegriertem F_o-Teil (ca. 160 kDa) verbunden ist (Stock et al. 2000 und weitere Verweise darin).

Der ins Cytoplasma schauende, globuläre F₁-Teil ist ein Komplex aus fünf verschiedenen Proteinen mit der Stöchiometrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. In den atomaren Röntgenkristallstrukturen des mitochondrialen F₁-Teils sind α und β alternierend um die antiparallelen α -Helices („coiled coil“) der γ -Untereinheit arrangiert. Die aktiven Zentren liegen in den β -Untereinheiten an den Grenzflächen zu α (Abrahams et al. 1994). Die α -Helices von γ ragen aus dem $\alpha_3\beta_3$ -Kopf heraus und binden mit der Hilfe von ε an den F_o-Teil (die Aufgabe von ε wird in Mitochondrien von der homologen Untereinheit δ und der kleinen Untereinheit ε übernommen) (Gibbson et al. 2000, Watts et al. 1996). Eine zweite Verbindung zum F_o-Teil wird über die Untereinheit δ (in Mitochondrien OSCP genannt) hergestellt, welche wiederum an den N-Terminus der α -Untereinheit bindet.

Über den F_o-Teil waren bisher nur wenige detaillierte Strukturdaten erhältlich. Allen Arten sind die Untereinheiten a, b und c (in Chloroplasten I, II und III genannt) gemeinsam. Die Untereinheit a hat fünf (oder sechs) tm Helices (Jäger et al. 1998, Valiyaveetil et al. 1998) und spielt durch ein konserviertes Arginin (Arg210 in *E. coli*) eine wichtige Rolle in der Ionentranslokation (Vik et al. 2000). Sie ist eng verbunden mit der dimeren b-Untereinheit, die durch eine N-terminale tm Helix in der Membran verankert ist (Dmitriev et al. 1999). Wahrscheinlich besteht der Rest der b-Untereinheit aus einer amphipathischen Helix, die den F₁-Kopf über die Untereinheit δ kontaktiert (Dunn et al. 2000). Die c-Untereinheit, ein kleines, hydrophobes Protein (etwa 8 kDa, 79 Aminosäuren in *E. coli*), kommt in mehreren Kopien in der Membran vor. Mittels NMR konnte gezeigt werden, dass die monomere c-Untereinheit aus zwei tm Helices und einem kurzen, cytoplasmatischen Loop besteht (Girvin et al. 1998, Matthey et al. 1999). Das Multimer bildet als so genannter c-Ring den zweiten Teil des ionentranslozierenden Mechanismus in F_o. Die N-terminale Helix liegt dabei im Inneren des Ringes, während

die C-terminale Helix, die ein konserviertes Aspartat oder Glutamat (Asp61 in *E. coli*) in ihrer Mitte aufweist, einen äußeren Ring bildet. Neben dem konservierten Carboxylrest konnten in *Ilyobacter tartaricus* noch weitere Aminosäuren, die an der Ionenbindung beteiligt sind, identifiziert werden (Kaim et al. 1997).

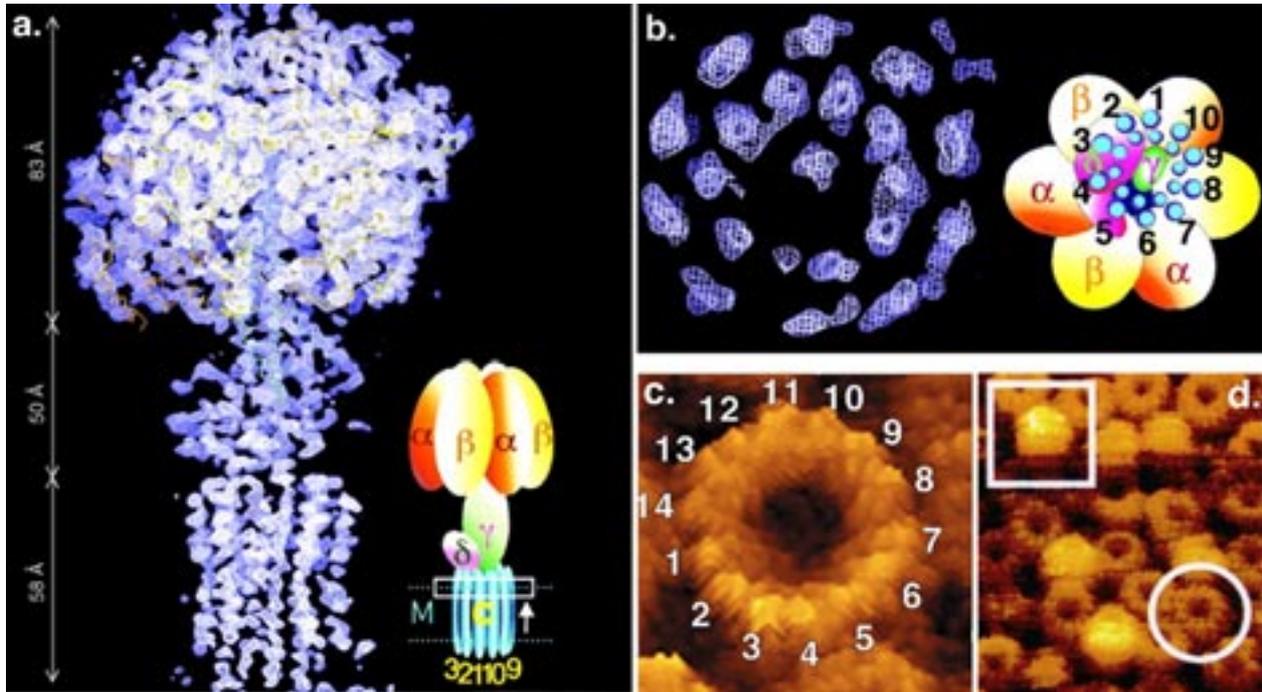


Abb. 7 a. Seitenansicht und b. Schnitt (gekennzeichneten Stelle in a.) durch die Elektronendichtekarte des F₁c₁₀-Komplexes aus Hefe (Stock et al. 1999). c. AFM-Topographie des Untereinheit-III-Multimers der Chloroplasten-ATPase (Seelert et al. 2000). d. AFM-Topographie des c₁₁-Rings aus *Ilyobacter tartaricus*, im Quadrat die periplasmatische Seite mit Lipidpfropfen, im Kreis die cytoplasmatische Seite (Stahlberg et al. 2001).

Jüngste Erkenntnisse zeigen, dass der c-Ring in Mitochondrien der Hefe aus 10 (Stock et al. 1999) (Abb. 7b), in Chloroplasten aus 14 (Seelert et al. 2000) (Abb. 7c) und in *I. tartaricus* aus 11 Untereinheiten (Stahlberg et al. 2001) (Abb. 7d) aufgebaut ist. Weiterhin legen neuere genetische Experimente nahe, dass auch *E. coli* einen zehngliedrigen Ring besitzt (Jiang et al. 2002), während frühere Vermutungen von 12 Untereinheiten ausgingen.

Basierend auf der NMR-Struktur der c-Untereinheit von *E. coli* wurden Modelle für den multimeren c-Ring postuliert (Dmitriev et al. 1999, Rastogi & Girvin 1999). Doch erst die Röntgenstrukturaufklärung des F₁c₁₀-Komplexes von Stock et al. (1999) kann als wirklicher Durchbruch in den dreidimensionalen Aufbau des c-Rings und das

Zusammenspiel von F_1 und F_0 -Teil angesehen werden (Abb. 7a). Deutlich sind 10 c-Untereinheiten zu erkennen, deren genaue Struktur bei einer Auflösung von 3,8 Å aber nicht aufgelöst werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnte nun auch für den elfgliedrigen c-Ring aus *I. tartaricus* ein 3D-Modell erstellt werden.

Funktion

Mit verschiedenen Methoden (besonders anschaulich durch das Anbringen eines fluoreszierenden Aktinfilaments an die γ -Untereinheit und die Dokumentierung der Drehung live auf Video) konnte gezeigt werden, dass es sich bei der ATP-Synthase um eine rotierende Maschine (Nanomotor) handelt (Noji et al. 1997, Sabbert et al. 1996, Pänke et al. 2000), bei der *in vitro* ATP-abhängig die γ -Untereinheit sich gegen den Uhrzeigersinn (vom Periplasma gesehen) im F_1 -Kopf dreht. Der Kontakt der intrinsisch asymmetrischen γ -Untereinheit zu den drei katalytischen β -Untereinheiten führt in β zu unterschiedlichen Konformationen mit verschiedenen Nukleotidaffinitäten (Abrahams et al. 1994). Durch die Rotation des zentralen Stiels durchlaufen die drei Untereinheiten sequenziell die Stationen (Abb. 6b): Bindung von Substrat (ADP und P_i), Bildung von ATP und Freisetzung des Produkts (Boyer 1993). Die Freisetzung des festen gebundenen ATP stellt den energetisch aufwendigsten Schritt dar. Die Rotation in 120° Schritten (Yasuda et al. 1998) konnte in der Zwischenzeit sogar in Teilschritte von 90° und 30° optisch aufgelöst werden (Yasuda et al. 2001). Durch die hochauflösende Struktur des $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Komplexes und Teilen von γ, ϵ und δ (Abrahams et al. 1994, Braig et al. 2000) ist sowohl der dreidimensionale Aufbau des F_1 -Teils, als auch die Funktionsweise im Detail bekannt.

Weiterführende Experimente legen den Schluß nahe, dass sich der c-Ring mit γ (und ϵ) als eine Einheit dreht (Sambongi et al. 1999, Pänke et al. 2000). Die ATP-Synthase kann somit auch funktionell in einen Rotor ($c_x\gamma\epsilon$) und Stator ($ab_2\delta\alpha_3\beta_3$) unterteilen werden (Abb. 6a), die wie ein Turbine mit Kurbelwelle arbeitet. *In vivo* geht die Rotation des c-Rings (im Uhrzeigersinn) auf die Ionentranslokation zwischen der Untereinheit a und dem c-Ring zurück. Dabei stammt die Energie aus dem elektrochemischen Gradienten über der Membran, auch „proton-motive force“ (PMF) genannt, der durch die Atmungskette oder Photosynthese aufgebaut wird. Er setzt sich zusammen aus dem Membranpotential und Ionengradienten über der Membran (Mitchell 1961).

Der Ablauf der Ionentranslokation ist nach wie vor nicht im Detail verstanden, besonders da genaue strukturelle Daten für die a, aber auch c-Untereinheit fehlen. Es liegen aber zwei Arbeitshypothesen (Abb. 8) vor:

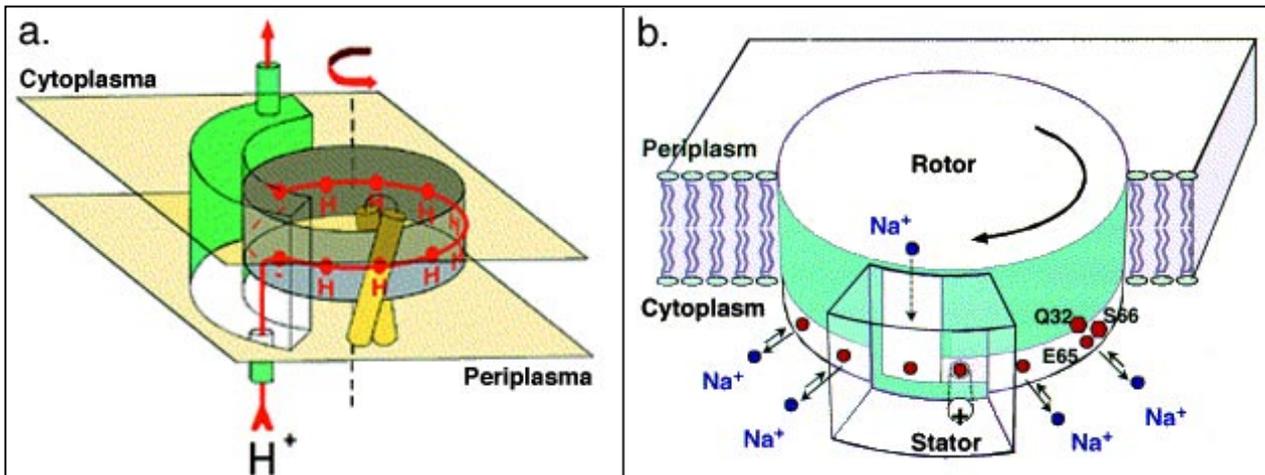


Abb. 8 Modelle zur Ionentranslokation. **a.** Zwei-Kanal-Modell (Junge et al. 1997). **b.** Ein-Kanal-Modell (Dimroth et al. 2000). Es ist die gegensätzliche Topologie zu beachten.

Junge et al. (1997) schlagen das Zwei-Kanal-Modell (Abb. 8a) vor, in dem Protonen durch einen Halbkanal in a von der periplasmatischen Seite kommend an eine c-Untereinheit in der Mitte der Membran binden. Dort drehen sie sich wie auf einem Karussell fast eine ganze Umdrehung durch die Lipidphase, bis sie wieder auf die a-Untereinheit treffen und durch einen zweiten Halbkanal das Cytoplasma erreichen. Dabei würde die freie Bindungsstelle an c ein Zurückdrehen verhindern und der konservierte Argininrest in a das Ablösen des Proton erleichtern.

Dimroth et al. (2000) setzen dem das Ein-Kanal-Modell (Abb. 8b) entgegen, das mit einem Kanal in a auskommt. In der Kontaktfläche zwischen a und c ist die Bindungsstelle unbesetzt und kann nur durch den Kanal von der periplasmatischen Seite von einem Ion erreicht werden. Durch thermische Bewegung rutscht die c-Untereinheit weiter und wird durch elektrostatische Kräfte, wie eine Ratsche, am Zurückrutschen gehindert. Nachdem sich die c-Untereinheit mit dem gebundenen Ion aus der Schnittstelle mit a herausgedreht hat, steht das Ion durch einen freien Zugang zum Cytoplasma im Equilibrium mit dem Cytoplasma. Der Argininrest fungiert in diesem Fall als Attraktor für freie Bindungsstellen.

Während es keine biochemischen Beweise für das Zwei-Kanal-Modell gibt, konnte der freie Zugang von Na⁺-Ionen an die Ionenbindungsstelle in c bewiesen werden (Kaim &

Dimroth 1998, Kaim et al. 1998). Die vermutete Nähe der Ionenbindungsstelle zur Membranoberfläche scheint aber der Lage des Carboxylrests in der Mitte der äußeren Helix von c zu widersprechen.

Eine große Anzahl an Entkopplern und Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung sind bekannt. Einige wirken direkt auf die ATPase ein. So geht der Name des F_o-Teils auf den Inhibitor Oligomycin zurück. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) inhibiert die ATPase, indem es irreversibel an das Carboxylat (Glutamat oder Aspartat) der Ionenbindungsstelle der c-Untereinheit bindet.

Na⁺-translozierende F₁F_o-ATP-Synthasen

Neben Protonen als Kopplungsign findet man bei einigen Bakterien, wie *Ilyobacter tartaricus* (Neumann et al. 1998), *Propionigenium modestum* (Laubinger & Dimroth 1989) oder *Acetobacterium woodii* (Reidlinger & Müller 1994), Na⁺-translozierende F₁F_o-ATP-Synthasen. Weniger effizient oder durch Punktmutationen können auch Protonen und Lithiumionen als Kopplungsign dienen (Kaim & Dimroth 1995, Kaim et al. 1997). Sequenzvergleiche und biochemische Untersuchungen, sowie chimäre Komplexe lassen vermuten, dass allen F₁F_o-ATP-Synthasen der gleiche Mechanismus zugrunde liegt (Kaim & Dimroth 1993).

Hervorzuheben ist die hohe Stabilität des oligomeren c-Rings aus z.B. *I. tartaricus*, der einige Minuten kochen in SDS widersteht (Neumann et al. 1998) und nur bei niedrigem pH (zum Beispiel durch Fällen mit TCA) in seine Monomere zerfällt (Thomas Meier, persönliche Kommunikation). Das Monomer ist mit 89 Aminosäuren zehn länger als die Untereinheit aus *E. coli* und besitzt wie die meisten c-Untereinheit ein Glutamat als konservierten Carboxylrest.

1.4. Elektronenkristallographie

In der Strukturaufklärung findet das Transmissionselektronenmikroskop (TEM, hier kurz EM) weite Verwendung. Als Methoden stehen die Tomographie, die Einzelpartikelanalyse (mit dem Spezialfall der (ikosaedrischen) Viruscapside), die helikale Rekonstruktion und Elektronenkristallographie an zweidimensionalen (2D) Kristallen zur Verfügung.

Die zu erreichende Auflösung ist sehr unterschiedlich und stark vom betrachteten Objekt (Größe, Symmetrie) und der gewählten Methode abhängig. Sie deckt aber mit einem Auflösungsbereich von 2 Å bis zu einigen nm einen breiten Bereich ab, der hilft, die Daten der hochauflösenden Röntgenstrukturanalyse mit Bildern der modernen Lichtmikroskopie zu integrieren. In einigen Beispielen ermöglichten EM-Daten die Lösung des Phasenproblems der Röntgenstrukturanalyse (Cate et al. 1999). Gängig ist in der Zwischenzeit das Einpassen von atomaren Strukturen in EM-Dichtekarten (Volkman & Hanein 1999, Wriggers et al. 1999), so zum Beispiel der Konnektor der Bakteriophagen (Simpson et al. 2000). Umgekehrt können auch hochauflösende Strukturen in ihrer Auflösung beschränkt werden, um sie dann mit EM-Daten zu vergleichen (Belnap et al. 1999).

1.4.1. 2D-Kristallisation

Zweidimensionale Kristalle sind einlagige Schichten aus periodisch angeordneten (Protein-) Molekülen. Durch ihre geringe Schichtdicke von 100-200 Å sind sie gut für die Abbildung im EM geeignet. Wie in der Röntgenstrukturanalyse ist die Bildung eines großen, hoch geordneten (2D-) Kristalls die größte Hürde für die Strukturbestimmung mittels Elektronenkristallographie.

Obwohl *in vivo* 2D-Kristalle selten sind, findet man in der Plasmamembran des Archaeum *Halobacterium halobium* kristalline Bereiche des Membranproteins Bakteriorhodopsin (purple membrane) vor. An ihnen konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass Daten zur Rekonstruktion eines hochauflösenden dreidimensionalen Modells erlangt werden können (Henderson & Unwin 1975). Dazu wurde von R.

Henderson und Mitarbeitern das heute weitverbreitete MRC-Programmpaket (Crowther et al. 1996) entwickelt. Weitere Beispiele für natürlich vorkommende 2D-Kristalle sind Porine (Kessel et al. 1988), die Fumarat-Reduktase aus *E. coli* (Cole et al. 1985) und Gap-Junctions (Unwin & Zampighi 1980).

Membranproteine, die schon in der Membran hoch angereichert und daher dicht gepackt vorliegen, lassen sich häufig *in situ* kristallisieren, zum Beispiel im Fall der Ca^{2+} -ATPase durch die Inkubation mit Inhibitoren oder Salzen (Dux & Martonosi 1983, Dux et al. 1985). Vielfach wurde auch die enzymatische Aktivität von Phospholipasen genutzt (z.B. Porine (Mannella 1984)), um das Protein weiter in der Membran aufzukonzentrieren.

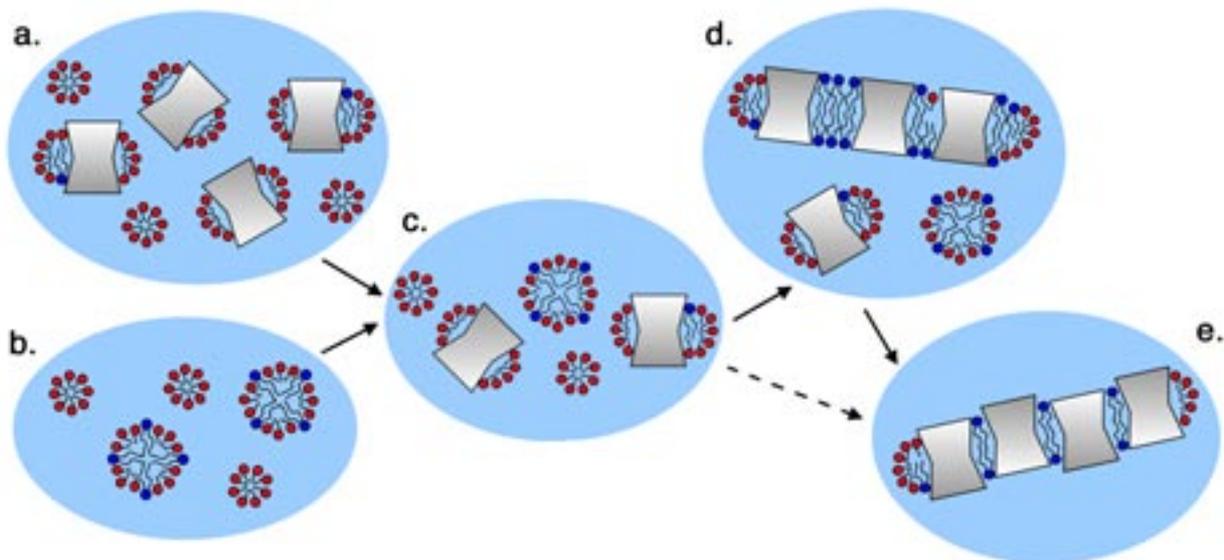


Abb. 9 Schematische Darstellung der Rekonstitution und 2D-Kristallisation eines Membranproteins. Gereinigtes und solubiliertes Protein (a.) wird mit solubiliertem Lipid (b.) gemischt. Dem Gemisch (c.) wird das Detergenz entzogen, wodurch das Protein in eine Lipiddoppelschicht rekonstituiert wird (d.). Das rekonstituierte Protein kann sich weiter zu 2D-Kristallen ordnen (e.). Möglicherweise bilden sich auch direkt 2D-Kristalle (gestrichelter Pfeil). Detergenz in rot, Lipidmoleküle in blau.

Bei der *in vitro* 2D-Kristallisation werden die Membranproteine erst aus der Membran gelöst, bevor sie kristallisiert werden. Dies geschieht mit Detergenzien, die zum Teil die gewünschten Proteine selektiv aus der Membran solubilisieren.

Die meisten häufig vorkommenden und leicht zu isolierenden Membranproteine (z.B. Bakteriorhodopsin, LHC-II, Porine und die oben angesprochenen Membranproteine der Energieumwandlung) sind in der Zwischenzeit zwei- oder dreidimensional kristallisiert

und ihre 3D-Struktur aufgeklärt worden. Da der bei weitem größte Teil aber in sehr niedrigen Kopien pro Zelle vorkommt, spielt die Klonierung und Überexpression von Membranproteinen eine immer größere Rolle (Tate 2001).

Die anschließende Rekonstitution des gereinigten Membranproteins unter Zugabe von Lipiden erfolgt durch die Entfernung (oder Verdünnung) des Detergenz (Abb. 9). Hierfür steht zum einen die klassische Methode der Dialyse zur Verfügung, zum anderen können Polystyrol-Kügelchen (BioBeads) zur Adsorption genutzt werden (Rigaud et al. 1997). Vorteil der *in vitro* Methode ist, dass verschiedene Lipide (synthetische, gereinigte, Gemische) und Mengen verwendet und die Bedingungen beliebig geändert werden können. (Eine ausführliche Besprechung der verschiedenen Methoden findet sich bei Kühlbrandt 1992.)

Morphologie

Zweidimensionale Kristalle können in Form von ein- bis mehrlagigen Schichten, kleinen bis großen, runden oder tubulären Vesikeln vorkommen. Einlagige Schichten sind dabei der Idealfall und lassen ab einem Durchmesser von 2 μm auch die direkte Elektronenbeugung im EM zu. Mehrschichtige Kristalle mit einer variablen Anzahl von Schichten können zur Zeit nicht für eine 3D-Rekonstruktion verwendet werden und lassen im günstigsten Fall eine 2D-Projektionsdichtekarte zu (Mosser et al. 1997, Stokes & Green 1990). Runde Vesikel haben meistens den Nachteil, dass sie bei der Adhäsion an den Kohlefilm Falten werfen oder Risse bekommen. Falls sie dabei nicht aufbrechen, liegen zwei kristalline Schichten übereinander. Relativ oft kommen Vesikel auch als breite tubuläre Kristalle vor, die relativ faltenfrei auf dem elektronenmikroskopischen Netzchen zu liegen kommen und leicht im Such-Modus des Niedrig-Dosis-Verfahrens und unter Cryo-Bedingungen zu erkennen sind (NhaA (Williams et al. 1999), Gluthationtransferase (Schmidt-Krey et al. 1998), Phospholipase A (Boekema et al. 1998), OmpF (Engel et al. 1992)). Wenn beide Schichten hoch geordnet sind, können sie getrennt zur Datenanalyse genutzt werden. Durch die limitierte Breite lässt sich aber häufig keine Elektronenbeugung an ihnen durchführen.

1.4.2. Elektronenmikroskopie

Aufbau

Ein Transmissionselektronenmikroskop (EM, Abb. 10) ähnelt in seinem Aufbau dem Lichtmikroskop. Anstelle der Lichtquelle besitzt es jedoch eine Elektronenquelle und erfordert deshalb ein hohes Vakuum in der Säule. Beim klassischen EM übernimmt eine Glühkathode aus Wolfram oder Lanthanhexaborid die Erzeugung von thermischen Elektronen. Neuere Modelle verfügen über eine Feldemissionskathode („field emission gun“, FEG). Sie besteht aus einem feinen nadelförmigen Wolframkristall, dem Elektronen durch Anlegen einer hohen Gegenspannung entzogen werden. Dies resultiert in einer hohen Kohärenz, Monochromazität und Brillanz. Durch die hohe Spannung (100 - 300 kV) werden die Elektronen zur Anode beschleunigt. Eine Beschleunigungsspannung von 300 kV entspricht einer Wellenlänge der beschleunigten Elektronen von $0,0198 \text{ \AA}$ und ist damit zwei Größenordnungen kürzer als Röntgenstrahlung. Dennoch kann die theoretisch zu erwartende Auflösung von $\lambda/2$ auf Grund der imperfekten elektromagnetischen Linsen nicht erreicht werden. Bei biologischen Proben kommt die Variabilität des Präparates noch hinzu. Daher liegt die höchste erreichte Auflösung zur Zeit bei etwa 1 \AA für anorganische und etwa 3 \AA für biologische Proben.

Vor dem Objekt befindet sich der Kondensor, bestehend aus zwei magnetischen Linsen und einer Blende. Damit läßt sich die Intensität und Kohärenz des Strahls sowie die bestrahlte Fläche regulieren. Der Objekthalter mit dem Objekt sitzt in einer Objektivpolschuhlinse, die maßgeblich die erreichbare Auflösung begrenzt. Um das Objekt herum befinden sich Antikontaminatoren (Kältefallen), die das Niederschlagen von flüchtigen Stoffen (z.B. Wasser, Öl) auf der Probe verhindern. Die nachgeschalteten Projektionslinsen vergrößern das erste Zwischenbild um mehr als das 100.000-fache. Für die Bildaufnahme werden in der Regel Endvergrößerungen zwischen 30.000 und 80.000 verwendet, um einerseits eine unnötig hohe Strahlendosis zu vermeiden und andererseits noch genügend feine Details auflösen zu können.

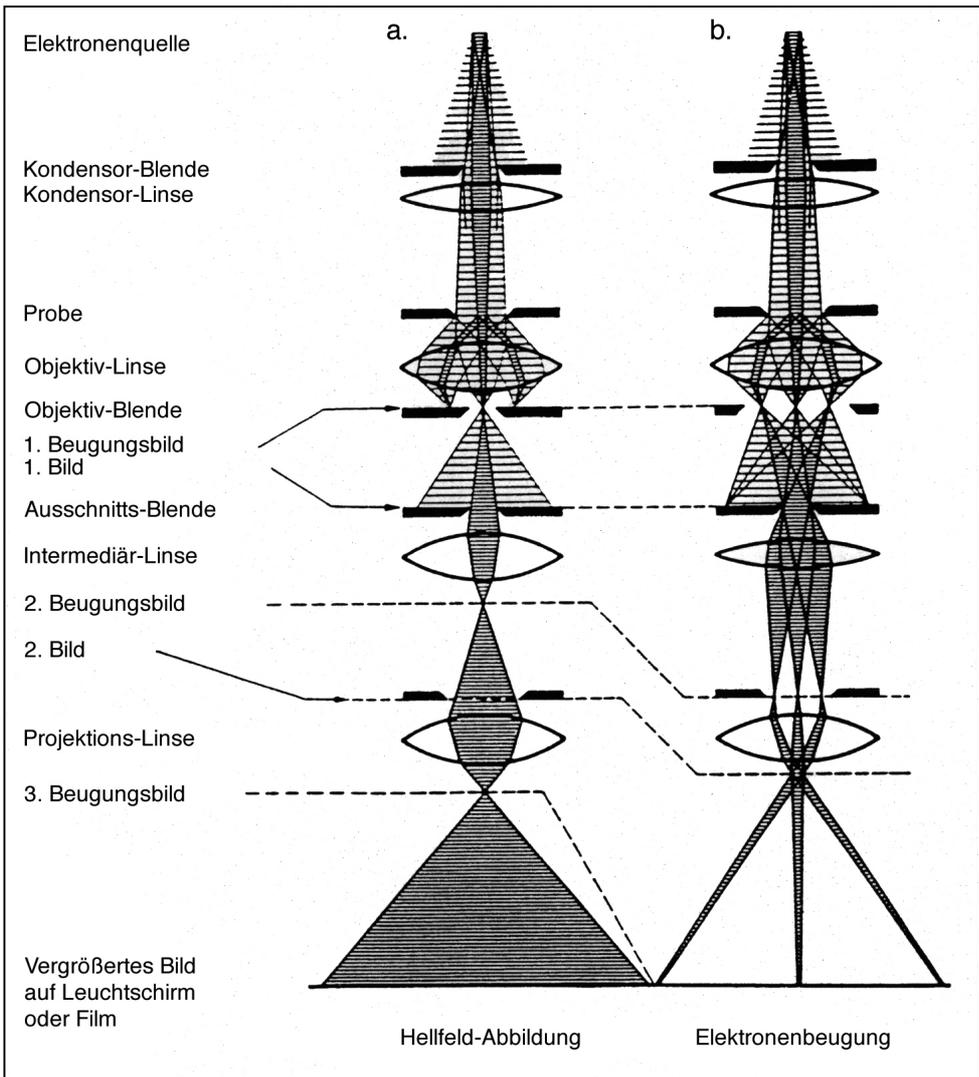


Abb. 10 Schematischer Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops. **a.** Hellfeld-Abbildung. **b.** Elektronenbeugung (geändert nach Reimer 1993).

Ein lumineszierender Schirm aus Zinkoxid dient in der Regel zur direkten Beobachtung des vergrößerten Bildes im EM. Eine andere Möglichkeit ist die Nutzung eines Szintillators, der über einen Bildverstärker an eine TV-Kamera angeschlossen ist und das Bild auf einen Monitor leitet. Zur dauerhaften Aufzeichnung wird normalerweise ein empfindlicher Film aus Silberhalide belichtet, der anschließend noch entwickelt werden muß. Alternativ können Bilder mittels einer CCD-Kamera aufgenommen werden. Da sie digital vorliegen, können sie sofort ausgewertet werden. Nachteilig ist aber die geringe Bildgröße in Pixeln und der hohe Querschnitt der Elektronen im Szintillator, daher können momentan keine hoch auflösenden Bilder von 2D-Kristallen mit der CCD-Kamera aufgenommen werden.

Bildentstehung und Elektronenbeugung

Während bei negativkontrastierten Proben der Beitrag des Amplitudenkontrasts nicht vernachlässigt werden darf, ist für die Bildentstehung von ungefärbten, biologischen Proben der Phasenkontrast entscheidend. Er entsteht durch die verstärkenden oder auslöschenden Überlagerungen von elastisch gestreuten und nicht-gestreuten Elektronenwellen, wenn sie durch die Objektivlinse zur Interferenz gebracht werden. Durch die Streuung an den Atomen erfahren die elastischen Elektronen eine Phasenverschiebung. Hinzu kommt noch der Beitrag der Phasenkontrastübertragungsfunktion (CTF), die die Amplitude und das Vorzeichen der Phase moduliert und vom Defokus und der sphärischen Aberration des Objektivs des EM abhängt.

Ändert man die Optik des EM so wie in Abb. 10 b. gezeigt ist (weitere Objektiv-Blende und Fokussierung der Intermediär-Linse), erhält man ein Beugungsbild. Es enthält zwar keine Phaseninformation über den Kristall, aber es läßt eine verlässlichere Bestimmung der Amplituden der Strukturfaktoren zu. Beugungsmuster sind außerdem unempfindlich gegenüber kleinen Probenbewegungen und lassen somit ohne großen Aufwand eine Aussage über die Ordnung des Kristalls zu. Da das Objektiv kein Bild liefert, ist die Auflösung nicht durch Linsenfehlern begrenzt. Das Beugungsmuster kann mit Hilfe einer CCD-Kamera aufgezeichnet und sofort inspiziert werden. Aufgrund der inelastischen Streuung, die sich in einem hohen Hintergrund bei niedriger Auflösung bemerkbar macht, ist das Aufnehmen von Beugungsbildern aber hauptsächlich bei hoher Auflösung (jenseits 8 Å) angebracht.

Probenvorbereitung

Organische Proben müssen vor dem Einbringen in das EM so präpariert werden, dass der Elektronenstrahl sie nicht sofort zerstört. Bei der Negativkontrastierung bettet man die Probe in einen glasartigen Film eines Schwermetallsalzes (z.B. Uranylacetat) ein. Die höhere Massendichte der Schwermetallatome im Vergleich zur Probe führt dazu, dass im Bild eine positive Dichte von den Atomen des Kontrastmittels verursacht wird. Die biologische Probe hinterläßt sozusagen einen negativen Abdruck. Nachteile dieser Methode sind Kontrastierungsartefakte und Deformationen der Probe durch die Schwermetallsalze, sowie eine limitierte Auflösung von etwa 15 Å, durch die Korngröße des Kontrastierungsmittels. Außerdem kann in der Regel keinerlei Strukturinformation über

den inneren Aufbau des Proteins gewonnen werden. Durch den hohen Kontrast, die lange Haltbarkeit der kontrastierten Probe und die einfache Herstellung eignet es sich hervorragend für das routinemäßige Durchmustern von Kristallisationsansätzen und macht ein vorhandenes Kristallgitter gut sichtbar (Brenner & Horne 1959).

Die Nachteile der Negativkontrastierung können durch das Einbetten in amorphe Substanzen bei niedrigen Temperaturen umgangen werden. Hierzu bieten sich vitrifizierter Puffer (Dubochet et al. 1988), Glukose (Unwin & Henderson 1975), Tannin (Wang & Kühlbrandt 1991) oder Trehalose an. Ungefärbt eingebettete Proben sind sehr empfindlich gegen Strahlenschäden. Durch die inelastische Streuung von Elektronen werden Radikale erzeugt, die zum Verlust von Atomen oder ganzen Molekülteilen führen können. Die Strahlenschäden verringern sich bei tiefen Temperaturen (4 K (flüssiges Helium) oder 100 K (flüssiger Stickstoff)), da die Diffusion der reaktiven Bruchstücke verlangsamt wird (Fujiyoshi 1989, Fujiyoshi et al. 1991). Die Verwendung des Niedrig-Dosis-Verfahrens stellt sicher, dass über 90% der Elektronen, die das Objekt treffen, für die Bildaufnahme verwendet werden (William & Fisher 1970). Dazu wird bei niedriger Vergrößerung und geringer Elektronendosis das Objekt gesucht und neben ihm fokussiert, bevor die Aufnahme gemacht wird.

1.5. Bildverarbeitung

Das Beugungsmuster an der optischen Bank (Klug & Berger 1964) gibt schon vor der Bildverarbeitung Auskunft über Ordnung und Größe des 2D-Kristalls, sowie die Qualität der Bildaufnahme. Es ermöglicht eine schnelle Auswahl der geeigneten Bilder und der Markierung ihrer besten Bereiche für die Digitalisierung. Des Weiteren erlaubt es eine erste Abschätzung von Abbildungsparametern wie den Defokus und Astigmatismus anhand der Thon-Ringe.

Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse bleibt im elektronenmikroskopischen Bild neben den Amplituden auch die Phaseninformation der Strukturfaktoren erhalten. Da ungefärbte, biologische Proben im EM sehr strahlungsempfindlich sind, kann für die

Bildaufnahme nur eine geringe Elektronendosis verwendet werden. Dies bedingt ein niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Als erste Ziel verfolgt die Bildverarbeitung eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses durch die kristallographische Mittelung über eine große Zahl von Molekülen. Außerdem können durch die Korrektur von Kristallverzerrungen und Abbildungsfehlern des EM schwache und durch Unordnung verbreiterte Maxima, die vorher im Rauschen untergingen, sichtbar gemacht werden. Dadurch erhöht sich normalerweise auch die erreichbare Auflösung.

Entzerrung

Der der Korrektur der Bilder zugrundeliegende Ansatz macht davon Gebrauch, dass die Phaseninformation in der numerischen Fourier-Transform des Bildes die Anwendung von Korrelationsverfahren ermöglicht. Zu diesem Zweck wird das Ausgangsbild unter Verwendung geeigneter Reflexe digital gefiltert. Das gefilterte Bild zeigt die periodische Struktur in der Originalaufnahme sehr viel deutlicher, da das Hintergrundrauschen durch Abweichungen der Einheitszelle und Einflüsse des Kohlefilms wegfallen, und gestattet die Auswahl einer Referenzfläche. Im Anschluß daran kann die Fourier-Transformation der Korrelationskarte durch eine Multiplikation der Fourier-Transformation des Originalbildes mit der komplex konjugierten Fourier-Transformation der Referenzfläche berechnet werden. Die Rücktransformation ergibt eine Korrelationskarte im realen Raum, deren Auswertung die Information über die exakte Position aller individuellen Einheitszellen im Bild und das Ausmaß ihrer Ähnlichkeit mit der Referenzfläche liefert. Die Positionen der Korrelationsmaxima erlaubt eine Reinterpolation des Bildes, in der Gitterverzerrungen entfernt und alle Einheitszellen in Übereinstimmung mit der Referenzfläche gebracht werden (Henderson et al. 1990). Die Höhe der Korrelationsmaxima erlaubt es darüber hinaus, die jeweils besten Bereiche innerhalb des korrigierten Bildes zu identifizieren und zu maskieren.

Die anschließende Fourier-Transformation eines derartig maskierten Bildes dient dazu, die Amplitude und Phase für jeden Reflex individuell zu ermitteln. Das Ergebnis besteht aus einer Auflistung der Amplitude, Phase, Güte und Hintergrund jedes ausgewiesenen Reflexes. In einem abschließenden Schritt werden die Phasenwerte der Reflexe um den Einfluß der CTF korrigiert. Dieser Schritt kompensiert die sonst zu beobachtenden,

periodischen Kontrastumkehrungen in den unbehandelten Daten und erlaubt die Vereinigung von Daten verschiedener Bilder sowie der Berechnung interpretierbarer 2D-Dichtekarten.

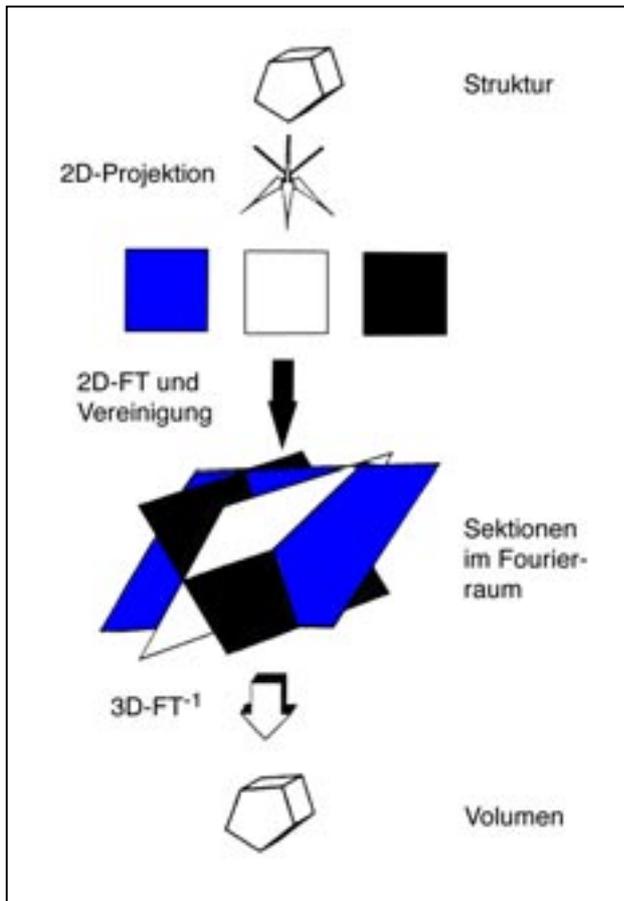


Abb. 11 3D-Rekonstruktion. Das Objekt wird unter verschiedenen Winkel im EM aufgenommen. Die Bilder werden getrennt verarbeitet und können im Fourier-Raum kombiniert werden. Durch Rücktransformation kann das 3D-Volumen des Objekts rekonstruiert werden (geändert nach Chiu et al. 1993).

3D-Rekonstruktion

Das EM liefert immer nur eine Projektion der Struktur auf eine Ebene, die senkrecht zum Strahl liegt. Um die dreidimensionale Information des Objekts zu erhalten, muß die Probe von unterschiedlichen Blickwinkeln betrachtet werden. Daher werden Aufnahmen von gekippten Kristallen gemacht, die zuerst getrennt, wie oben beschrieben ausgewertet werden (DeRosier & Klug 1968). Mit Kenntnis der Kippgeometrie läßt sich der dreidimensionale Fourier-Raum ausfüllen und aus den Struktur Faktoren eine 3D-Dichtekarte des Objekts erstellen (Abb. 11). Genau genommen handelt es sich dabei um eine Kernpotentialdichtekarte und nicht um eine Elektronendichtekarte, wie bei der Röntgenstrukturanalyse, da die Elektronen vom Kernpotential der Atome gestreut werden.

2. Material

2.1. Biologisches Material

Spinat (*Spinacia oleracea*) der Sorte Bolero F1 RS wurde in der Instituts-eigenen Gewächskammer angezogen (siehe Methoden).

Oligomere c-Untereinheit aus *Ilyobacter tartaricus* wurde freundlicherweise von Thomas Meier aus der Arbeitsgruppe Prof. Dimroth, ETH Zürich, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck, Darmstadt, Deutschland sowie Sigma, St. Louis (MO), USA und wurden in der Qualität p.a. verwendet. Lösungsmittel stammten von der Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland. Lipide und Detergenzien wurden von den Firmen Avanti Polar Lipids, Inc., USA, bzw. Sigma, St. Louis (MO), USA, bezogen.

2.3. Elektronenmikroskope und Zubehör

CM 12	Philips, Eindhoven, Niederlande
CM 120	Philips, Eindhoven, Niederlande
JEM 3000SFF	JEOL, Tokyo, Japan

Cryo-Apparaturen und weiteres Zubehör für die Philips-Mikroskope stammten von Gatan Inc., Pleasanton (CA), USA.

Netzchen, Pinzetten und Graphitstifte wurden von Plano, Wetzlar, Deutschland, bezogen.

3. Methoden

3.1. Präparation von Photosystem II

3.1.1. Anzucht von Spinat

Zur Anzucht wurden Samen der Sorte Bolero F1 RS (Royal Sluis, Holland) verwendet. Die gesamte Anzucht fand in einer Klimakammer bei einer Temperatur von 19°C, bei 50% Luftfeuchtigkeit und einer Lichtstärke von 10.000 bis 20.000 Lux sowie einer Lichtperiode von 9 h (9 - 18 Uhr) statt.

Die Samen wurden in Vermiculit (2-3 mm Körnung) gesät und mit Wasser befeuchtet. Die ersten zwei Tage wuchsen die Keimlinge im Dunkeln, danach eine Woche im Licht. Anschließend wurden sie in Hydrokulturen umgesetzt, wo sie noch einmal 4 Wochen wuchsen. Eine Hydrokulturschale faßte 10 Pflanzen und 12 l Nährlösung nach Robinson (1986), die belüftet wurde. Pro Schale wurden Blätter mit einem Frischgewicht von 200 g geerntet.

Nährlösung nach Robinson (1986):

(Einwaage für 2,5 l einer 100-fach konz. Stammlösung in Klammern)

Lösung A:	6 mM	KNO ₃	(152,5 g)
	4 mM	Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	(237,5 g)
	90 µM	Fe-EDTA ¹	(280 ml)
Lösung B:	1 mM	(NH ₄)H ₂ PO ₄	(30 g)
	2 mM	MgSO ₄	(122,5 g)
	50 µM	H ₂ BO ₃	(750 mg)
	10 µM	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	(500 mg)
	1 µM	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	(75 mg)

¹ Zur Herstellung einer Fe-EDTA-Lösung nach Siegenthaler & Depéry (1976) und Arnon et al. (1974) wurden 16 g EDTA und 10,4 g KOH in 186 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung aus 13,7 g FeSO₄·7 H₂O in 364 ml Wasser gemischt. Über Nacht wurde Eisen durch einen Luftstrom zu Fe(III) oxidiert.

0,5 μM	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	(31 mg)
0,1 μM	H_2MoO_4	(3,8 mg)
0,1 μM	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	(6,3 mg)

Die Nährlösung wurde mit KOH auf pH 5,8 eingestellt.

3.1.2. Puffer und Lösungen

		(Einwaagen für 1l)
Puffer A	50 mM HEPES/NaOH pH 7,5	(11,915 g)
	400 mM NaCl	(23,376 g)
	10 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(2,033 g)
	2,5 mM Na Asc (0,5 g/l)	(0,500 g)
	30 μM BSA (2 g/l)	(2,000 g)
Puffer B	50 mM MES/NaOH pH 6,0	(9,760 g)
	150 mM NaCl	(8,766 g)
	5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(1,0165 g)
	2,5 mM Na Asc (0,5 g/l)	(0,500 g)
	1 g/l delip. BSA	(1,000 g)
Puffer C	50 mM MES/NaOH pH 6,0	(9,760 g)
	15 mM NaCl	(0,877 g)
	5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(1,0165 g)
Puffer 1	40 mM MES/NaOH pH 6,5	(7,808 g)
	20 mM NaCl	(1,169 g)
	5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	(1,017 g)
	1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(0,147 g)

25% (w/v) Triton X-100 (in Puffer C)

10% (w/v) n-Heptyl- β -Thioglucopyranosid (HTG) (in Puffer 1)

3.1.3. Präparation von PSII

Der Spinat wurde zur Ernte noch vor Beginn der Lichtperiode aus der Klimakammer geholt. Bei gedämpftem Licht wurden die dunkelgrünen, gesunden Blätter ohne die dicken Mittelrippen geerntet. Das Frischgewicht wurde durch Wiegen ermittelt. Die Blätter wurden zweimal mit kaltem Leitungswasser und einmal mit entionisiertem, eisgekühltem Wasser gewaschen.

Die folgende Aufreinigung wurde in einem abgedunkelten Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Das Protokoll entspricht weitgehend den gebräuchlichen Aufreinigungen für Sauerstoff-entwickelnde PSII-Komplexe, zur 2D-Kristallisation oder weiterführende Isolation von Untereinheiten (Nakazato et al. 1996, Enami et al. 1989). Um die Präparation zu beschleunigen und die Ausbeute zu erhöhen, wurde ein verkürztes Protokoll entworfen, das die explizite Isolation von Granathylakoiden² überspringt und direkt zur zweiten Solubilisierung übergeht (Diplomarbeit 1999).

Isolierung von BBY

Die gewaschenen Blätter wurden in einem Mixer (Waring Blender, 2l Fassungsvermögen) mit Puffer A (150 ml auf 100 g) bei geringer Umdrehungszahl vorzerkleinert und abschließend 10 s bei maximaler Umdrehungszahl homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch acht Lagen Gaze und einer Lage Watte gefiltert und auf Beckman JA-14-Becher verteilt. Bei 7500 rpm (8600 g) wurde für 10 min bei 4°C in einem JA-14-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde im Puffer B - halbes Volumen des vorangegangenen Schrittes - mit einem Pinsel resuspendiert und wieder abzentrifugiert (JA-14 Rotor, 7500 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde vorsichtig in wenig Puffer C mit einem kleinen Pinsel resuspendiert, um eine hohe Chlorophyllkonzentration von 3 und 5 mg/ml zu erreichen, und durch dreimaliges Pottern homogenisiert.

Zur folgenden Solubilisierung wurde langsam, tropfenweise und unter Rühren 25% Triton X-100 (w/v) bis zur gewünschten Endkonzentration von 40 mg Triton/mg Chl.

² Die isolierten Granastapel werden auch nach den Autoren Berthold, Babcock und Yocum des ersten Aufreinigungsprotokolls (Berthold et al. 1981) BBY genannt.

hinzugegeben. Bei einer Chlorophyllendkonzentration von 2 mg Chl./ml entsprach dies 8% Triton X-100 (Boehringer-Mannheim).

Abschließend wurde die Suspension unter Rühren 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde auf Beckman JA-30.50-Röhrchen verteilt. Bei 19.000 rpm (40.000 g) wurde für 30 min bei 4°C in einem JA-30.50-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer 1 - halbes Volumen des vorangegangenen Schrittes - mit einem Pinsel resuspendiert und wieder abzentrifugiert (JA-30.50-Rotor, 19.000 rpm, 30 min, 4°C). Das Pellet (BBY) wurde in wenig Puffer 1 mit einem kleinen Pinsel aufgenommen und dreimal gepottet (Chlorophyllendkonzentration von 4-5 mg Chl./ml).

Um die Bestimmung der Chlorophyllmenge zu verbessern und gleichzeitig die Ausbeute nicht zu verschlechtern, wurde die sehr dickflüssige BBY-Suspension in einen skalierten Homogenisierer gefüllt, homogenisiert und gleichzeitig das Volumen gemessen. Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurde eine größere Probe (20 µl anstelle von 5 µl) entnommen. Dabei wurde die Pipettenspitze sorgfältig außen abgewischt. Die Probe mußte vor der Messung noch 1:10 verdünnt werden, um im optimalen OD-Bereich zu liegen.

Isolierung von PSII

Die BBY-Suspension wurde sofort weiter in ein kleines Becherglas mit Rührfisch gegeben und mit Puffer 1 auf 4,1 mg Chl./ml verdünnt. Durch die weitere Zugabe von 10% (w/v) n-Heptyl-β-Thioglucopyranosid (HTG) (Sigma, St. Louis, USA) bis zu einer Endkonzentration von 2,7% wurde die Suspension auf eine Chlorophyllendkonzentration von 3 mg/ml gebracht. Die Zugabe von HTG hatte langsam, tropfenweise und unter Rühren zu erfolgen. Die Suspension wurde in einen kleinen Potter überführt und siebenmal auf Eis homogenisiert. Wieder zurück im Becherglas wurde unter langsamen Rühren auf Eis im Dunkeln für 20 min inkubiert. Nach dem Verdünnen mit zwei Volumen Puffer 1 und weiteren 5 min inkubieren unter den selben Bedingungen, wurde die Suspension in Beckman JA-30.50-Röhrchen überführt und bei 17.000 g (35.000 g) für 20 min bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in Centriprep-10-Ultrafiltrationsgefäße (10 kDa Ausschlußgröße) (Amicon, USA) dekantiert und in einem SS-34-Rotor bei 5.000 rpm und 8°C bis zu einer Konzentration von 1 mg Chl./ml aufkonzentriert. Zu stark konzentrierte Proben wurden

mit Filtrat auf 1 mg Chl./ml verdünnt. Das aufkonzentrierte PSII wurde entweder direkt für Kristallisationsexperimente verwendet oder in flüssigem Stickstoff unter Argon eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2. Präparation der oligomeren c-Untereinheit

Die Aufreinigung der c-Untereinheit erfolgte von Thomas Meier in der Arbeitsgruppe von Prof. Dimroth an der ETH Zürich, Schweiz, nach dem Protokoll von Neumann et al. (1998) und soll im folgenden nur kurz zusammengefaßt werden:

I. tartaricus wurde anaerob bei 30°C für 18 h auf Tartarmedium angezogen. Von den lysierten Zellen wurden die Membranen isoliert und anschließend mit Triton solubilisiert. Die F₁F₀-ATP-Synthase konnte durch eine fraktionierte Fällung mit PEG-6000 isoliert werden. Durch eine zweite Solubilisierung mit 1% n-Lauroylsarcosin (LS) gefolgt von einer Ammoniumsulfatfällung konnte die oligomere c-Untereinheit im Überstand angereichert werden. Nach einer abschließenden Aufkonzentrierung (Ultrazentrifugation, Ultrafiltration oder Fällung) lag das gereinigte Proteine entweder in n-Octyl-β-D-glucosid (OG) oder LS und 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, sowie 0.02% NaN₃ vor und konnte gekühlt versendet werden.

Markierung der oligomeren c-Untereinheit

Um N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)-markiertes Protein zu erhalten, wurde das gereinigte Protein mit einer Konzentration von 2 mg/ml (20 μM c-Ring = 220 μM c-Untereinheit) in einen Natrium-freien Puffer überführt und anschließend mit 0,4 mM DCCD (1M und 50 mM Stammlösung in Ethanol) für mehrere Stunden inkubiert (Meier et al., in Vorbereitung).

3.3. UV/VIS-Spektroskopie

3.3.1. Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte nach Porra et al. (1989). Dazu wurde ein Aliquot von etwa 5 µg Chlorophyll (5 - 200 µl Probe) in einen 2-ml-Messkolben gegeben, mit 80% wässrigem gepuffertem Aceton (2,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,8) aufgefüllt und durch Schütteln gemischt. Partikel und denaturiertes Protein wurden in einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl abzentrifugiert.

In einem Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer (Lambda Bio 40) wurde die Probe bei drei Wellenlängen (646,6, 663,6 und 750,0 nm) vermessen. Bei einer OD über 1 wurde die Probe verdünnt. Die Absorption bei 750,0 nm (ein Indikator für Lichtstreuung an Partikeln) sollte nahe bei Null sein, ansonsten wurde noch einmal abzentrifugiert.

Mittels der folgenden Formeln erhielt man die Chlorophyll a/b-Konzentrationen (µg/ml) bzw. das Verhältnis von Chl. a zu b:

$$\text{Chl. a} = 12,25 \times [A(663,6) - A(750)] - 2,55 \times [A(646,6) - A(750)]$$

$$\text{Chl. b} = 20,31 \times [A(646,6) - A(750)] - 4,91 \times [A(663,6) - A(750)]$$

$$\text{Chl. gesamt} = \text{Chl. a} + \text{Chl. b}$$

$$\text{Chl. a/b-Verhältnis} = \text{Chl. a} / \text{Chl. b}$$

3.3.2. Absorptionsspektren bei Raumtemperatur

An demselben Gerät wurden auch Absorptionsspektren von 300 bis 750 nm in 80% wässrigem gepuffertem Aceton (extrahierte Pigmente) oder in Puffer 1 (nativer Pigment-Protein-Komplex) gemessen.

3.4. Harnstoff-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Harnstoff-SDS-PAGE wurde in Mini-Gelapparaturen der Firma Biorad, USA nach dem Prinzip von Laemmli (1974) durchgeführt. Die Abmessungen eines Mini-Gels betragen 1 x 70 x 85 mm. Angaben für ein Gel sind wie folgt:

Trenngel:	6 M	Harnstoff
(5 ml)	14%	Acrylamid (2.6% Crosslinker) (Bio-Rad, USA)
	375 mM	Tris/HCl pH 8,0
	0,1%	SDS

Die Reaktion wurde mit 20 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet. Das gegossene Trenngel wurde während der Polymerisation mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet.

Sammelgel:	6 M	Harnstoff
(2,5 ml)	4%	Acrylamid (2.6% Crosslinker)
	125 mM	Tris/HCl pH 6,8
	0,1%	SDS

Die Reaktion wurde mit 10 µl 10% (w/v) APS und 5 µl TEMED gestartet. Ein 10-Taschen-Kamm wurde eingesetzt.

Laufpuffer (5 l):	15 g Tris, pH 8.3 (25 mM)
	72 g Glycin (192 mM)
	5 g SDS (0,1%)

2x Probenpuffer:	4x RotiLoad (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
	(enthält SDS, Mercaptoethanol und Bromphenol-Blau)
	6 M Harnstoff

LMW-Standard:	10 µl	Low molecular weight standard (Bio-Rad, USA)
	200 µl	2x Probenpuffer

190 µl dH₂O
bei -20°C lagern

Probenvorbereitung

Die Proben wurden 1:1 mit 2x Probenpuffer versetzt und 1 h im Dunkeln inkubiert. Es wurde jeweils etwa 1 µg Chlorophyll eingesetzt. 10 µl LMW-Standard wurden verwendet.

TCA-Fällung

Proben mit geringer Proteinkonzentration wurden mit 12% Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Das abzentrifugierte Pellet wurde mit Ethanol gewaschen und anschließend in Probenpuffer resuspendiert.

Laufbedingungen

Die Elektrophorese wurde bei konstanten 200 V durchgeführt und abgebrochen, wenn die blaue Farbstofffront oder die grüne Chlorophyllbande den Gelrand erreicht hatte (ca. 60 min). Um besonders scharfe Banden zu erhalten, wurde die Elektrophorese bei 4°C durchgeführt.

Coomassie-Färberlösung:

10% Essigsäure
50% Methanol
0,1% Coomassie-Brilliant-Blue G-250 (Bio-Rad, USA)

Entfärberlösung: 5% Methanol
7% Essigsäure

Das Gel wurde für 1 h oder über Nacht gefärbt und anschließend für einige Stunden entfärbt. Die Entfärbung wurde durch ein Stück Zellstoff, das den Farbstoff bindet, beschleunigt.

3.5. Sauerstoffelektrode

Die Messung der Aktivität von Photosystem II erfolgt nach dem von Terashima et al. (1994) vorgestellten Prinzip: Dimethyl-p-benzoquinon (DMBQ, Fluka, Schweiz) diene als künstlicher Elektronenakzeptor und Methylamin-HCl als Entkoppler. Gemessen wurde der molekulare Sauerstoff, der bei der Spaltung des sekundären Elektronendonors (Wasser) entsteht. Ein Molekül Sauerstoff entstand für vier transportierte Elektronen.

Die Messung fand in einer Clark-Elektrode mit Magnetrührer und eingebauter Wassertemperierung statt (Fork 1969). An die Elektrode wurden ein Verstärker und Schreiber angeschlossen.

Es wurden 100-fache Stammlösung von DMBQ in EtOH und Methylamin-HCl in dH₂O angesetzt.

Ansatz: 30 µg Chloroplasten-, Thylakoid- oder PSII-Suspension
 10 µl 100 mM DMBQ
 10 µl 2 M Methylamin-HCl
 0,5 ml 2x Puffer 1
 ad 1 ml mit dH₂O

Der Ansatz wurde ohne zu messende Probe in den Messraum gefüllt. Der Rührer wurde auf eine mittlere Stufe gestellt und die Apparatur bei konstanten 20°C gehalten. Nachdem sich die Elektrode equilibriert hatte, wurde die Probe (30 µg entsprechend einer Konzentration von 30 µM Chl.) im Dunkeln hinzugegeben. Nach einer kurzen Equilibrierungsphase wurde das Licht eingeschaltet und die Sauerstoffentstehung mittels eines Schreibers verfolgt, bis ein Plateau erreicht wurde.

Nach einer Meßserie wurde die Elektrode mit Natriumdithionit (Na₂S₂O₄) geeicht. Danach und zwischen einzelnen Messungen wurde die Elektrode mit Puffer 1 gespült.

Aktivitätsberechnung

Aus der Steigung der Messkurve (mm/min), der Eichung der Elektrode (100% Sauerstoffsättigung in mm auf dem Schreiberabzug) und der Sauerstoffkonzentration

bei 20°C im Puffer (0,276 $\mu\text{mol O}_2$ / ml) ließ sich die Sauerstoffkonzentrationsänderung ($\mu\text{mol O}_2/\text{h}$) bestimmen. Die Chlorophyllkonzentration und das Volumen des Messansatzes (2 ml) ergaben die Chlorophyllgesamtmenge (mg Chl.).

Danach berechnete sich die Aktivität in $\mu\text{mol O}_2$ pro mg Chl. und h wie folgt:

$$\text{Aktivität} = \text{O}_2\text{-Konz.änderung} \times \text{Chl.-Menge}$$

3.6. Gelfiltration / Size Exclusion Chromatographie

Das SMART-System (Pharmacia Biotech AB, Schweden) ist ein voll integriertes, analytisches Chromatographiesystem. Es wurde mit den Säulen Superose 6B (Ausschlußgröße: 40 MDa, optimaler Bereich: 5 kDa bis 5 MDa) und Superose 12 (Ausschlußgröße: 2 MDa, optimaler Bereich: 1 kDa bis 300 kDa) als Gelfiltration (Size exclusion chromatography) genutzt.

Die in Ethanol gelagerten Säulen wurden mit entgastem und gefiltertem Laufpuffer (Puffer 1 zuzüglich 1% HTG) equilibriert. PSII wurde mit Laufpuffer auf 0,5 bzw. 0,1 mg Chl./ml verdünnt (entspricht 2 bzw. 0,4 mg Protein/ml) und vor dem Auftragen durch eine 0,22 μm Membran filtriert. Der Lauf fand bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ statt. Ab 0,8 ml (Ausschlußvolumen) wurden 50 μl Fraktionen geschnitten und bei den Wellenlängen 280 (Protein) und 440 nm (Chlorophyll) detektiert.

Nach Beendigung des Lauf wurde mit entgastem dH_2O und abschließend mit Ethanol gespült.

3.7. Lipidvorbereitung

In Chloroform gelöstes Lipid wurde in ein Glasröhrchen mit Teflonverschluß überführt und das Chloroform unter Argon und Schütteln, damit sich das Lipid dünn am Glas niederschlägt, verdampft. Um restliches Chloroform zu entfernen, wurde das Glasröhrchen mindestens vier Stunden in einem Desikator unter Vakuum gesetzt. Anschließend wurde das Lipid in dem gewünschten Detergenz gelöst und auf eine

Endkonzentration von 5-10 mg/ml gebracht. Die fertige Lösung wurde steril filtriert und aliquotiert. Mit Argon überschichtet wurde das Lipid eingefroren und bei -20°C gelagert.

Folgende Lipide kamen hauptsächlich zum Einsatz:

1. 5 mg/ml 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Phosphatidylcholin (POPC) in 1 - 5% OG
2. 10 mg/ml 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-3-Phosphatidylserin (POPS) in 1,2% OG
3. 10 mg/ml 1,2-Dimyristoyl-3-Phosphatidylcholin (DMPC) in 2% DM
4. 10 mg/ml *E. coli* polar lipids (67% Phosphatidylethanolamin, 23% Phosphatidylglycerol, 10% Cardiolipin) in 1,5% DM

3.8. Methanol-Chloroform-Extraktion von Lipiden

Um das Lipid aufzukonzentrieren bzw. vergleichbare Mengen an Lipid mittels Dünnschichtchromatographie analysieren zu können, bei der Analyse störende Substanzen (besonders Wasser und Glycerin) zu entfernen oder BioBeads zu extrahieren, wurden Proben mit 250 µl Methanol und 125 µl Chloroform in ein Eppendorfgefäß gegeben. Nach 2 min schütteln und 10 min inkubieren bei RT im Dunkeln, wurden weitere 125 µl Chloroform hinzugegeben. Es wurde für 30 s geschüttelt und 125 µl dH₂O hinzugefügt, was die Phasentrennung begünstigte. Nach nochmaligem Schütteln für 30 s, zentrifugierte man 3 min in der Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl. Die untere, organische, (im Falle von PSII grüne) Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit Stickstoff auf wenige Mikroliter eingengt.

Die Proben wurden sofort auf Dünnschichtplatten aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

3.9. Dünnschicht-Chromatographie zur Lipidbestimmung

Zur Lipidanalyse wurden 10 x 10 cm Kieselgel 60 Dünnschichtplatten (Merck, Darmstadt) verwendet. (Handschuhe mußten zum Vermeiden der Übertragung von Hautfetten die ganze Zeit getragen werden.) Auf der Platte wurde in der rechten oberen Ecke das Datum mit einem weichen Bleistift notiert und im Abstand von 1 cm vom unteren Rand eine Linie gezogen. Auf der Linie wurden die Proben mit einer Kapillare

im Abstand von mindestens 1 cm aufgetragen. Es wurden entweder 5 µl Chloroform-Methanol-Extrakt oder 1-5 µl nicht-extrahierte Proben verwendet. Vor dem Lauf wurde die Platte gut getrocknet (Haartrockner oder Trockenschrank eigneten sich hierzu), besonders wenn die Proben nicht in Chloroform vorlagen.

Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser (65/25/4, v/v/v) verwendet (Bratt & Åkerlund 1994). Es wurde in eine mit Filterpapier ausgekleidete Kammer bis zu einer Höhe von 5 mm gefüllt und mit einem Deckel verschlossen. Nach etwa einer halben Stunde war die Atmosphäre gesättigt und ein oder zwei Platten konnten vorsichtig hineingestellt werden.

Wenn die Lauffront einen Abstand von 5 mm zum oberen Rand erreicht hatte (nach etwa 30 min), wurde die Platte herausgenommen und mit einem Haartrockner getrocknet.

Nachweis durch Verkohlung (Charring)

Die Dünnschichtplatte wurde gleichmäßig mit verdünnter Schwefelsäure (konz. Schwefelsäure/Ethanol/H₂O, 34/33/33, v/v/v) eingesprüht und für 10 min bei 150°C entwickelt. Die Banden wurden unspezifisch verascht, wobei starke Banden schwarz, schwächere Banden hingegen bräunlich oder farbig erschienen (Bratt & Åkerlund 1994).

3.10. 2D-Kristallisation

3.10.1. Puffer und Lösungen für Photosystem II

			(Einwaagen für 1l)
Puffer 2	40 mM	Mes/NaOH pH 6,5	(7,808 g)
	20 mM	NaCl	(1,169 g)
	1 mM	CaCl ₂ ·2H ₂ O	(0,147 g)
	1 mM	ZnAc·2H ₂ O	(0,219 g)
	1 mM	Na Ascorbat	(0,198 g)
	3 mM	NaN ₃	(0,065 g)
	1 µg/ml	BHT	(48,0 µl)

Nachträglich wurde Glycerin bis zu einer Konzentration von 30% (v/v) hinzugefügt.

BHT-Stammlösung: 19,5 mg in 1 ml Ethanol

Puffer 3	40 mM	Mes/NaOH pH 6,5	(7,808 g)
	20 mM	NaCl	(1,169 g)
	3 mM	NaN ₃	(0,065 g)

Einem Aliquot von 70 µl PSII mit einer Chl.-Konzentration von 1 mg/ml wurde 0 - 10 µl 10% HTG (entspricht einer HTG-Endkonzentration von 0,79 bis 2,04%) hinzugegeben und mit Puffer 1 auf 80 µl aufgefüllt. (Kein Lipid mußte hinzugefügt werden, da ausreichend endogenes Lipid in der Proteinprobe vorhanden war.) Der Kristallisationsansatz wurde 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Vor der Dialyse wurde jeder Ansatz 3 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, um aggregiertes Protein zu entfernen.

3.10.2. Puffer und Lösungen für die oligomere c-Untereinheit

Puffer X	10 mM	Tris/HCl pH 7,5 / 8	
	200 mM	NaCl	
	3 mM	NaN ₃	
			(Einwaagen für 1l)
Stammlösungen:	1 M	Tris/HCl	(121,14 g)
	5 M	NaCl	(292,25 g)
	300 mM	NaN ₃	(6,50 g)

Kristallisationsansätze wurden standardmäßig in folgender Reihenfolge in ein Reaktionsgefäß pipettiert: Puffer X ohne NaN₃, zusätzliches Detergenz, Lipid in einem Lipid-Protein-Verhältnis (w/w) von 0,1 - 1,5 und zuletzt das Protein (meistens 1 mg/ml).

Ohne zuviel Schaum zu produzieren wurde der Ansatz gevortext und in die Dialysevorrichtung gegeben.

3.10.3. 2D-Kristallisation durch Mikrodialyse

Mikrodialysezellen

Die zur 3D-Kristallisation entwickelten Mikrodialysezellen (Cambridge Repetition Engineers, Cambridge, UK) – wegen ihres Aussehens auch Button (Abb. 12a) genannt – wurden für Kristallisationsansätze mit geringen Volumina von 25 - 50 μl verwendet. Nachdem der Kristallisationsansatz in die Aussparung gefüllt wurde, wurde mit dem speziellen Applikator die Dialysemembran (Spectra/Por[®] 7 Membrane, MWCO: 10 kDa (Spectrum, USA)) mit einem O-Ring übergestülpt.

Zur Ernte wurde die Membran mit einer Pipette durchstoßen und der Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt.

Hockey-Sticks

Die Hockey-Sticks genannten gebogenen Glasröhrchen (etwa 8 cm lang mit einem Innendurchmesser von 3 mm) (Abb. 12b) wurden einen Tag vor Gebrauch vorbereitet, um die Dichtigkeit der Dialysemembran zu testen. Dazu wurde über das gekrümmte Ende mit Hilfe eines kurzen Stücks Plastikschlauch ein quadratisches Stück Dialysemembran gezogen und der Hockey Stick in ein Becherglas mit 1 cm hoch Wasser gestellt (Kühlbrandt 1992).

Am nächsten Tag wurden 50 - 100 μl Kristallisationsansatz langsam an der Glaswand der dichten Hockey-Sticks in den Knick gefüllt und durch vorsichtiges Herabschlagen in Kontakt mit der Membran gebracht.

Da das obere Ende offen war, konnten während der Dialyse Proben mittels einer feinen 5 μl -Kapillare entnommen werden, ohne den Kristallisationsprozess zu unterbrechen. Zur Ernte wurde die Membran mit einer Pipette durchstoßen und der Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt.

Zur Reinigung wurden Hockey-Sticks für einige Tage in konzentrierte Schwefelsäure gelegt und anschließend mit viel destilliertem Wasser und Ethanol gespült.

Weitere Mikrodialysevorrichtungen, wie Slide-A-Lyzer® (Pierce, USA) (Abb. 12c,d), Dispo-Biodialyzer™ (Amika Corp., USA) und selbst-konstruierte Behälter aus 0,6 ml Reaktionsbehältern, wurden zwar ausprobiert, aber nicht routinemäßig genutzt.

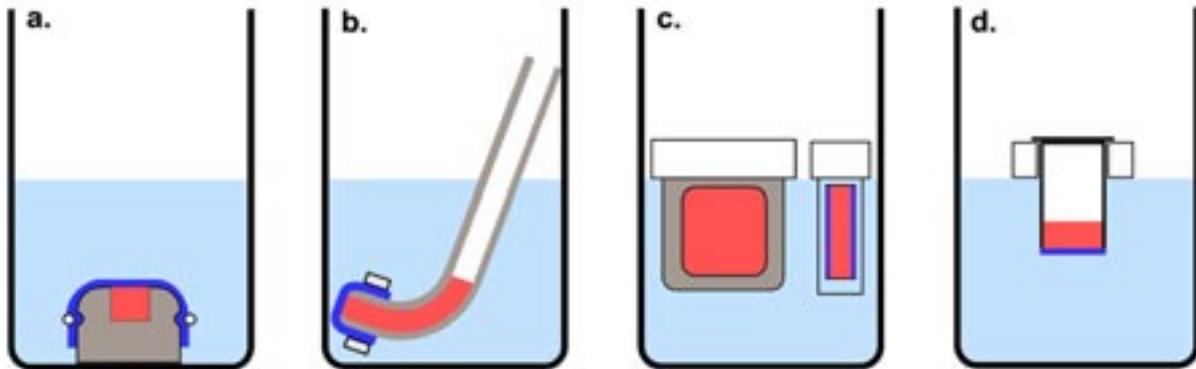


Abb. 12 Schematische Darstellung der Mikrodialysevorrichtungen im Querschnitt: Der 2D-Kristallisationsansatz (rot) wurde durch eine semipermeable Dialysemembran (blau) vom Dialysepuffer (hellblau) getrennt. **a.** Mikrodialysezelle (Button), **b.** Hockey-Stick, **c.** Slide-A-Lyzer® Cassette, **d.** Slide-A-Lyzer® MINI. (Abbildungen sind nicht maßstabsgetreu.)

Die Mikrodialysevorrichtungen wurden in ein 50 ml Plastikröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) mit einem Reservoir von 30 ml Dialysepuffer (2 oder X) gegeben und mit einem Schraubdeckel verschlossen. Routinemäßig wurde bei konstanten 20°C im Dunkeln dialysiert und nach der halben Dialysezeit der Ansatz auf eine höhere Temperaturen (30° oder 37°C) in regulierbare Inkubationskammern (Mettert, Deutschland) transferiert.

3.10.4. Entnahme und Lagerung der Kristallsuspension

Die Dialysevorrichtungen wurden nach 4 (PSII) oder 2 Tagen (c-Ring) aus dem Dialysepuffer genommen und die Kristallisationsansätze zurückgewonnen. Abschließend wurden die Kristallisationsansätze in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 5.000 rpm für 2 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in dem gleichen Volumen frischem Puffer (3 oder Puffer X ohne NaCl) wieder resuspendiert. Die Proben ließen sich mehrere Wochen bis Monate bei 4°C lagern.

Um den Zeitablauf der Kristallisation zu untersuchen, wurde in festgelegten Zeitintervallen (meist 6 oder 12 h) mit Hilfe einer Kapillare wenige µl Kristallisationsansatz

aus einem Hockey Stick entnommen und sofort zur Negativkontrastierung oder Dünnschichtchromatographie weiterverwendet.

3.10.5. Saccharose-Dichtegradient-Zentrifugation

Dichtegradienten mit 30-50% Saccharose (ansonsten wie Puffer 3) in 5% Stufen wurden in dünnwandigen Ultra Clear (2,2 ml Volumen, 0,4 ml je Stufe) oder dickwandigen Polycarbonat-Zentrifugationsröhrchen (1 ml Volumen, 0,2 ml je Stufe) mit der Pipette von unten nach oben gefüllt.

Kontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten wurden mit dem Gradient Master (Model 106 von Biocomp, Canada) hergestellt, indem in den Ultra Clear-Röhrchen 0,85 ml 50% mit 0,85 ml 30% Saccharose-Puffer 3 überschichtet und bei 85° mit „speed“ 18 für 1 min gedreht wurden.

Der Gradient wurde mit der Kristallsuspension überschichtet und die Röhrchen in den TLS 55-Schwenkrotor eingesetzt. Ein Lauf in der Beckman Optima TLX-120 Tisch-Ultrazentrifuge dauerte bei 40.000 rpm und 4°C 30 min.

Verschiedene Methoden wurden zur Isolierung der Banden verwendet:

1. Banden wurden von oben mit der Pipette abgenommen
2. Banden wurden von unten mit einer Hamiltonspritze entnommen
3. Banden wurden von unten mit Hilfe einer Peristaltikpumpe entnommen
4. Ultra Clear-Röhrchen wurden unten angestochen und die Tropfen fraktioniert
5. Banden wurden direkt aus dem Gradienten mit einer Pipette entnommen

Am Ende wurden die Banden in der Tischzentrifuge bei 5.000 rpm für 2 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in frischem Puffer 3 wieder resuspendiert.

3.10.6. Nachbehandlung der 2D-Kristallisationsansätze

Freeze and Thaw

Bei dieser Prozedur (Mosser et al. 1997) wurde die Kristallsuspension dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Das Einfrieren geschah mittels flüssigem Stickstoff (-196°C), bei -80°C oder -20°C . Die Probe wurde entweder auf Eis oder bei RT wieder aufgetaut. Um eine hohe lokale Kristallkonzentration zu gewährleisten, wurden die sedimentierten Kristalle meistens nicht resuspendiert.

Inkubation bei verschiedenen Temperaturen

Reaktionsgefäße mit geernteten Kristallansätzen wurden bei RT, 30° , 37° , 42° und 60°C unterschiedlich lange inkubiert.

Phospholipase

1 μl Phospholipase C (Typ V, bovin, Sigma) in 3,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5 gelöst wurde zu 24 μl Kristallsuspension hinzugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.10.7. DCCD-Markierung von 2D-Kristallen der oligomeren c-Untereinheit

50 mM DCCD in Ethanol (ausgehend von einer 1 M DCCD-Stammlösung in Ethanol) wurde zu 2D-Kristallen gegeben, so dass eine Endkonzentration von etwa 5 mM vorlag. Anschließend wurden die Ansätze bei Raumtemperatur inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben zur Inspektion im EM entnommen.

3.11. Elektronenmikroskopie

3.11.1. Träger für 2D-Kristalle zur Negativkontrastierung

Amorphe Kohlefilme mit einer Dicke von etwa 100 Å wurden auf frisch gespaltene Glimmerplättchen (Mica, 75 x 25 mm, Plano, Wetzlar) in einer Edwards Auto 306 Turbo Aufdampfungsanlage (Edwards High Vacuum, UK) bei $1,0 \times 10^{-7}$ Torr aufgedampft. Es wurden Kohlestifte von besonders hohem Reinheitsgrad (Hitachi, Japan) benutzt. Das Verfahren ist bei Butt et al. (1991) genau beschrieben.

Netzchen aus Kupfer bzw. Kupfer/Rhenium (3,05 mm Durchmesser und 400 mesh, Maxtaform HR26 Cu/Rh, Sigma/Plano) wurden erst mit Aceton und dann mit Ethanol in einem Ultraschallbad gewaschen und auf Filterpapier (Whatman No. 4, UK) getrocknet. Der Kohlefilm wurde von einem Glimmerplättchen auf eine saubere Wasseroberfläche übertragen und mit den vorbereiteten Netzchen herausgehoben. Damit sich der Kohlfilm leichter vom Glimmerplättchen löste, wurde er vorher in eine Befeuchtungskammer (Petrischale mit einem Wasser getränktem Filterpapier) gelegt. Auf einem Filterpapier wurden die beschichteten Netzchen getrocknet.

Kohlefilm, Glimmer und fertige Netzchen wurden im Trockenschrank aufgehoben.

Beglimmung (Glow Discharge)

Um den Kohlefilm der Netzchen hydrophil zu machen, wurden sie kurz vor Gebrauch auf einem Glasträger in ein Beglimmungsgerät (CTA 010 von Balzers Union, Liechtenstein) plaziert. Nachdem Aufbau eines Vakuums von 0,2 mbar, wurde für 30 s bei maximal 20 mA in Luft entladen.

3.11.2. Negativkontrastierung

Zur ersten Durchmusterung und Bewertung von Kristallisationsansätzen genügt die Kontrastierung mit Schwermetallsalzen, wie z.B. Uranylacetat (1 - 2%). Dazu wurde ein kleiner Tropfen Kristallsuspension (1-2 µl) für 30 s auf das vorbereitete Netzchen aufgetragen und dann mit Filterpapier (Whatman No. 4, UK) abgesaugt. Auf einem

Stück Parafilm wurden jeweils 5 µl Tropfen Uranylacetat plaziert, die mit dem beschichteten Netzchen durch Berühren aufgenommen wurden. Der erste Tropfen wurde sofort abgesaugt (Waschschritt), während der zweite durch 30 s Inkubation die endgültige Kontrastierung bewirkte. Überschüssige Flüssigkeit wurde wieder mit Filterpapier abgesaugt und das Netzchen an der Luft getrocknet, bevor es in einem Behälter aufgehoben wurde.

Negativkontrastierte Proben wurden im Philips CM12 oder CM120 angeschaut und durch die Aufnahme von Bildern dokumentiert (Abb. 13 a).

3.11.3. Cryo-Proben

Um zu höheren Auflösungen zu gelangen, muß die Probe in amorphes Eis, Tannin, Glucose oder Trehalose eingebettet werden. In diesem Fall wurde das Protokoll für LHC-II übernommen („back injection method“, Wang & Kühlbrandt, 1991).

Ein kleines Stück Kohlefilm (4 x 4 mm) wurde vom Glimmer auf eine saubere Wasseroberfläche übertragen, mit einem Molybdennetzchen herausgefischt und in Kontakt mit einem Tropfen Einbettungsmedium (0,5% Tannin- oder 4,5% Trehaloselösung) gebracht (Vonck 2000a). Dabei entfernte man überstehenden Kohlefilm und das Wasser wurde gegen das Einbettungsmedium ausgetauscht. Das Netzchen wurde umgedreht und 1 - 2 µl Kristallsuspension durch achtmaliges Auftragen und Wiederaufnehmen mit dem Einbettungsmedium durchmischt. Das Netzchen wurde ein weiteres Mal umgedreht und auf Filterpapier (Whatman No. 4, UK) geblottet. Unter Umständen wurde die Probe vorher noch in einer Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert, um eine bessere Adsorption der Kristalle an den Kohlefilm zu gewährleisten. Anschließend wurde das fertige Netzchen schnell in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und in einen Cryohalter (Gatan Inc., USA) für die Philips EM oder eine Probenpatrone des JEOL 3000 SFF überführt. Um Bilder von gekippten Kristallen aufzunehmen, wurde das Netzchen in eine Probenpatrone mit 20°, 30° oder 45°-Neigung gelegt.

3.11.4. Bildaufnahme

Vor der Bildaufnahme wurde der Fokus und Astigmatismus korrigiert und abgewartet bis sich die Probe nicht mehr im Strahl bewegte (Drift). Bilder wurden bei einem Unterfokus von -300 bis -1000 nm und einer 35.000-fachen Vergrößerung (Negativkontrastierung) bzw. -100 bis -200 nm und 60.000-70.000-fachen Vergrößerung (Cryo-Bedingungen) aufgenommen.

Bilder wurden auf Kodak SO-163 Film aufgenommen und in unverdünntem Kodak D-19 Entwickler für 12 min (Niedrig-Dosis-Bedingungen) bzw. 5 min entwickelt. Nach einem Waschschrift (1 min) wurden sie 8 min fixiert und nach einem weiteren Waschschrift (30 min) im Trockenschrank unter Zufuhr von warmer Luft getrocknet.

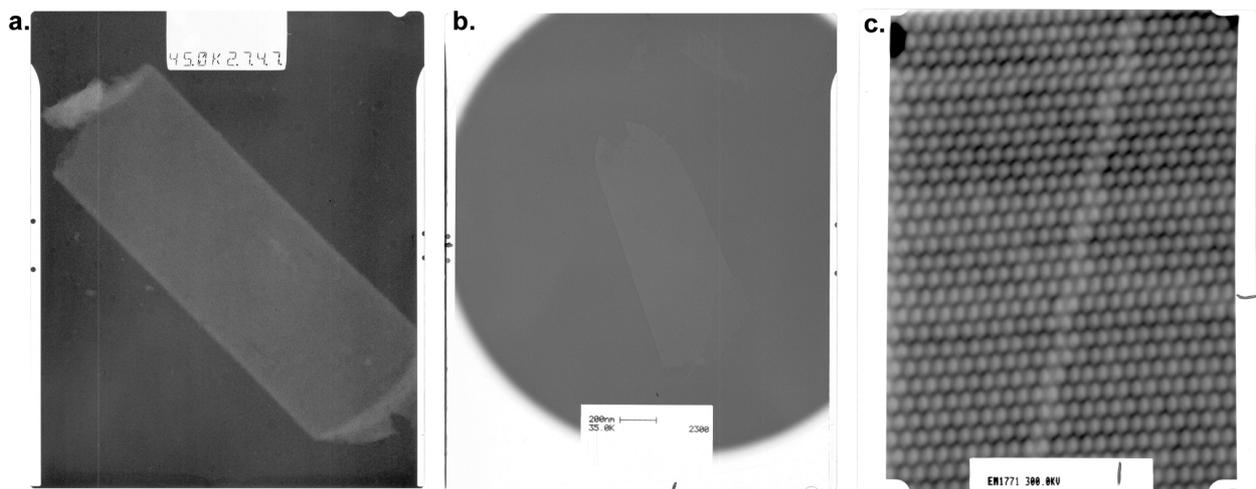


Abb. 13 EM-Bilder von 2D-Kristallen unter verschiedenen Aufnahmebedingungen. **a.** Negativkontrastierter Kristall (elektronendichteres Material, wie das Schwermetalsalz erscheint hell auf dem Bild), **b.** ungefärbter Kristall unter Cryo-Bedingungen und **c.** zusätzlich unter Verwendung von Spot-Scan. Durch die niedrige Strahlendosis ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis so niedrig, dass der Kristall in **b.** schwer und in **c.** gar nicht mit dem bloßen Auge zu erkennen ist.

Niedrig-Dosis-Verfahren

Um die ungefärbten Kristalle vor unnötigen Strahlenschäden zu schützen, wurde das Niedrig-Dosis-Verfahren („low dose mode“) verwendet (William & Fisher 1970). Dazu gab es drei abspeicherbare Einstellungen: der *Such-Modus* besaß eine niedrige Vergrößerung und schwache Strahlenintensität. In ihm wählte man die geeignet erscheinenden Kristalle aus. Der *Fokus-Modus* war auf ein oder zwei Stellen neben dem Objekt eingestellt und diente der Fokussierung der Objektivlinse bei hoher

Vergrößerung. Im *Abbildungsmodus* wurde die Aufnahme unter Verwendung des gewünschten Unterfokus bei einer mittleren Vergrößerung gemacht. Die Strahlendosis sollte dadurch 10 Elektronen per \AA^2 (20-30 bei 4 K im JEOL) nicht überschreiten (Abb. 13 b).

Spot-Scan-Verfahren

Das Spot-Scan-Verfahren verteilt die Gesamtelektronendosis auf viele, kleine, runde Bildausschnitte, um die Aufladung des Objekts und dadurch entstehende Probenbewegung zu minimieren (Bullough & Henderson 1987, Downing 1991). Für das JEOL 3000 SFF wurde das Verfahren von Ivo Tews (1991) implementiert. Das in C geschriebene Programm lief auf einem PC und steuerte die Auslenkung des Elektronenstrahls direkt über die Spannung der Kondensorlinse. Typischerweise wurde das Bild aus 26x32 runden Ausschnitten aufgebaut, die jeweils für 40 ms belichtet wurden (Abb. 13 c).

Nahe zu alle hoch auflösenden, elektronenmikroskopischen Bilder wurden am JEOL 3000 SFF unter Cryo- und Niedrig-Dosis-Bedingungen aufgenommen. Das JEOL 3000 SFF ist mit einem Helium-gekühlten Probenhalter und einer Feldemissionskathode (FEG) ausgestattet und wurde bei einer Proben temperatur von ca. 4 K und einer Beschleunigungsspannung von 300 kV betrieben (Fujiyoshi et al. 1991).

3.12. Bildverarbeitung

3.12.1. Vorauswahl durch optische Beugung

Die optische Bank bestand aus einem Laser, einem optischen System (Linsen, Blenden) und einem CCD-Detektor, der an einen PC angeschlossen war. Der Laserstrahl wurde aufgefächert und erreichte das Negativ als Strahl mit einem Durchmesser von mehreren Zentimetern. Durch Einbringen von Blenden mit unterschiedlichem Durchmesser konnte die Größe des durchleuchteten Bereichs variiert werden. Durch Verschieben des Negatives im Strahl und gleichzeitigem Betrachten des optischen Beugungsmusters am

Bildschirm ließen sich Kristalle an ihrem optischen Beugungsmuster erkennen (Klug & Berger 1964).

Das Zentrum des Bereichs, der die schärfsten Beugungsreflexe zur höchsten Auflösung und den geringsten Hintergrund zeigte, wurde am Rande des Negativs mit Strichen markiert.

3.12.2. Digitalisierung der Bilder

Um die Bilder mit dem Computer auswerten zu können, wurden sie mit einem Scanner (Zeiss SCAI CCD-Linien-Scanner, Oberkochen), der an einen Silicon Graphics Rechner angeschlossen war, mit dem Programm PHODIS (Zeiss) digitalisiert. Dafür wurde meistens ein Teilbereich von 4.000 x 4.000 oder 6.000 x 6.000 Pixel, dessen Zentrum die Markierung von der optischen Bank war, eingescannt. Die Schrittgröße betrug 7 μm , was bei einer Vergrößerung von 70.000 einem Abstand von 1,0 \AA auf der Probe entsprach (oder anderes ausgedrückt, entsprachen 6.000 Pixel bei einer Schrittgröße von 7 μm einer Länge von 42 mm auf dem Negativ und bei einer Vergrößerung von 70.000 600 nm auf der Probe im EM). Die zu erwartende, maximale Auflösung betrug nach der Nyquist-Regel mit 3 \AA etwa das Dreifache.

3.12.3. MRC-Programmpaket

Die Bildverarbeitung (Abb. 14a) erfolgte unter UNIX auf einem DEC Alpha 4100 bzw. ES40 Rechner. Das MRC-Programmpaket (Crowther et al. 1996) bestand aus einer Anzahl von FORTRAN-Routinen (im folgenden in eckigen Klammern, andere Programme in runden Klammern), die einzelne Teilaufgaben der Bildverarbeitung erledigten. Durch Skripten wurden sie aufgerufen, kombiniert und Variablen sowie Daten übergeben.

Das digitalisierte Bild wurde vom Silicon Graphics-Rechner des Scanners auf den DEC Alpha-Rechner transferiert und gleichzeitig vom tld- ins MRC-Datenformat umgewandelt (MTLD2MRC).

Im ersten Verarbeitungsschritt wurde eine Fourier-Transformation (FT) des Bildes berechnet [FFTRANS], dazu wurde es vorher noch reduziert, indem 2x2 Pixel jeweils gemittelt wurden [LABEL] und die Ränder geglättet (besonders für Spot-Scan-Bilder wichtig), damit keine störenden Linien in der FT wegen der scharfen Kanten am Rande des Bildes entstehen konnten [TAPEREDGE].

Die berechnete FT konnte nun mit dem Graphikprogramm XIMDISP betrachtet werden und die Beugungsmaxima (auch Reflexe oder Spots genannt) per Hand ausgewählt und indiziert werden. Das Programm lieferte bei erfolgreicher Indizierung die Gitterparameter, mit deren Hilfe man ein Gitter über das Beugungsmuster legen konnte. Dies erleichterte die Auswahl und Indizierung von einer Liste von starken Reflexen für den nächsten Schritt. Die Ausgabe dieser Liste konnte aber auch automatisiert werden, indem sie nach der Signalstärke der indizierten Reflexe der rohen FT ausgewählt wurden [MMBOX].

Der Signalstärke der einzelnen Reflexe wurden sogenannte Qualitätsfaktoren (IQ-Wert) zugeordnet, die das Verhältnis des Signals des Reflexes zum umgebenden Hintergrund angaben:
$$IQ = 7 \times \text{Stärke des Hintergrund} / \text{Stärke des Reflexes}$$

Der IQ-Wert konnte ganzzahlige Werte zwischen 1 und 9 annehmen, wobei ein IQ=1 ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von besser als 7, ein IQ=2 bis 3,5 und so weiter, hatte. Ein IQ=7 entsprach einem Verhältnis von 1; ein solcher Reflex konnte noch Informationen enthalten. Unterhalb eines Signal-zu-Rausch-Verhältnisses von 1 (IQ=8,9) lagen in der Regel keine Informationen mehr vor, so dass diese Reflexe aussortiert wurden. Als besonders starke und signifikante wurden Reflexe mit IQ-Werten von 1 - 3 gewertet.

Mit Hilfe der Liste von Reflexen wurde eine Maske erstellt, durch die die FT gefiltert wurde [MASKTRAN]. Die Filterung entfernte einen Großteil des Hintergrundrauschens und ließ ein gefiltertes Bild entstehen, in dem zum ersten Mal der 2D-Kristall zu erkennen war.

Aus dem gefilterten Bild wurden zwei Referenzflächen geschnitten [BOXIMAGE]. Die kleinere diente zur Autokorrelation, welche später als Suchprofil benutzt wurde [AUTOCORRL]. Die größere ist im ersten Durchgang etwa 1/10 der reduzierten Bildgröße. Die FT des gefilterten Bildes und die FT der Referenz wurden multipliziert [TWOFILE], wodurch sich die FT einer Kreuzkorrelation ergab. Die Maxima, welche an den Positionen der besten Übereinstimmung zwischen Referenz und Gesamtbild auftreten, wurden mit Hilfe des Suchprofils erkannt [QUADSERCH]. Die daraus

resultierenden Verschiebungsvektoren sowie der Übereinstimmungsgrad waren wichtige Parameter für die anschließende Reinterpolation [CCUNBEND] des Rohbildes. Es entstand ein entzerrtes Bild, das von Kristallfehlern weitgehend befreit wurde, aber noch Rauschen enthielt. Aus der Kreuzkorrelation ließen sich außerdem Bereiche identifizieren, die nicht kristallin oder zu ungeordnet waren, um korrigiert werden zu können. Da sie nicht zur Information beitrugen, aber das Rauschen erhöhten, wurden sie auf einen durchschnittlichen Grauwert gesetzt [BOXIMAGE].

Aus der FT des entzerrten Bildes konnten Amplituden und Phasen entnommen [MMBOX] und die gefundenen Reflexe mit ihren IQ-Werten graphisch dargestellt werden [RESPLOT].

Das entzerrte Bild konnte nun als Referenz für einen zweiten oder weiteren Durchgang dienen, bis keine Verbesserung mehr eintrat, d.h. die Intensität bzw. die Anzahl und Qualität (IQ-Wert) der Reflexe sich nicht mehr änderte.

Vom ersten Nulldurchgang der CTF in der FT des Rohbildes konnte der ungefähre Wert des Defokus und der Winkel des Astigmatismus abgeschätzt werden. CTFAPPLY korrigierte unter Kenntnis der Beschleunigungsspannung und der sphärischen Aberration des EM den Defokus, wodurch das Vorzeichen der Phasen und der Kontrast der Amplituden entsprechend der CTF angepasst wurden. Der exakte Defokus konnte interaktiv verfeinert werden, indem die Lage der Nulldurchgänge in der graphischen Auftragung der IQ-Werte verglichen wurde.

Um die Kristallsymmetrie zu bestimmen [ALLSPACE] und ausnutzen zu können, wurden die Phasen symmetriebezogener Reflexe verglichen und im Falle einer Symmetrie gemittelt [AVRGAMPS].

Projektionskarte

Aus den Strukturfaktoren konnte mit Hilfe der CCP4 Suite (Collaborative Computational Project, 1994) eine Dichtekarte in Projektion (Projektionskarte) berechnet werden. Hierfür wurde die Liste der Reflexe mit ihren Miller'schen Indices $h,k,0$ und den zugehörigen Amplituden und Phasen in ein MTZ-Format umgewandelt [EXTEND_P1, F2MTZ]. Durch FT errechnete sich eine Dichtekarte [FFT, FFTBIG], die auf mehrere Einheitszellen erweitert werden konnte [EXTEND, MAPMASK]. Um den Abfall der Amplituden bei höherer Auflösung zu kompensieren und den Anteil an Phasen-

informationen bei höheren Auflösung stärker zu gewichten, konnte ein Temperaturfaktor (B-Faktor) eingeführt werden.

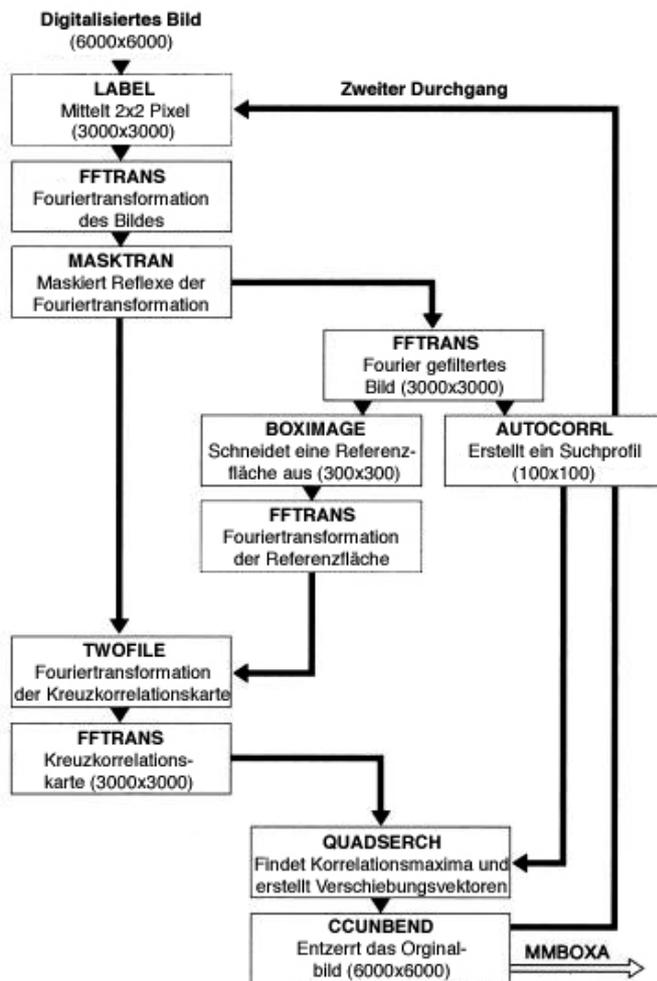


Abb. 14 Flußdiagramm der Bildverarbeitung eines 2D-Kristalls unter Verwendung der MRC-Routinen. (verändert nach Kunji et al. 1997).

3D-Rekonstruktion der oligomeren c-Untereinheit

Die 3D-FT eines 2D-Kristalls kann man sich als periodisches Gitter von geraden Gitterlinien, die senkrecht zur 2D-Kristallebene stehen, vorstellen. Dies erklärt sich durch die periodische Anordnung in zwei Dimensionen (a und b) und die fehlende Wiederholung der einlagigen Schicht in c . Wenn der Kristall im EM gekippt wird, dann schneidet die Projektionsebene (a^*b^*), die senkrecht zum einfallenden Elektronenstrahl liegt, die Gitterlinien in den entsprechenden Positionen (c^*) des reziproken Gitters des gekippten Kristalls (Abb. 15).

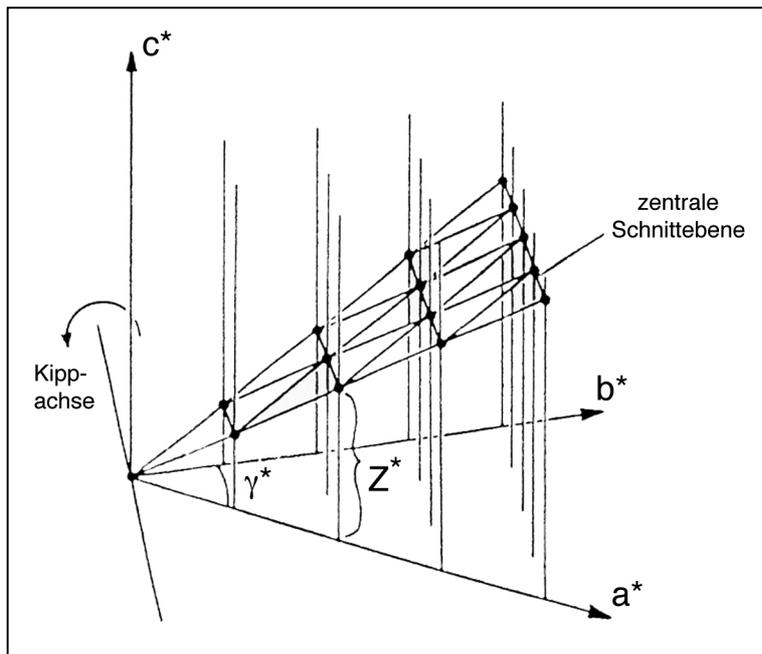


Abb. 15 Schematische Darstellung des dreidimensionalen reziproken Gitters. Die reziproken Vektoren a^* und b^* liegen in der Membranebene, während c^* senkrecht dazu steht. Eine zentrale Schnittebene liegt senkrecht zum einfallenden Elektronenstrahl und schneidet das reziproke Gitter in Abhängigkeit vom Kippwinkel und dem Winkel der Kippachse zu den Kristallachsen. Mit Kenntnis der Geometrie ist es möglich, den Gitterlinien einen z^* -Wert zuzuordnen (Henderson & Unwin 1975).

Bilder von gekippten Kristallen der oligomeren c-Untereinheit wurden wie ungekippte behandelt und dementsprechend wie oben beschrieben entzerrt und ausgewertet. Da es in der Flächengruppe $p1$ sechs Möglichkeiten der Indizierung gab (Abb. 16), alle drei Achsen eine ähnliche Länge (89,7, 91,7 und 97,6 Å) aufwiesen und diese bei gekippten Kristallen zusätzlich verzerrt waren, war eine eindeutige Zuordnung der Achsen $a = 89,7$ Å und $b = 91,7$ Å nicht möglich.

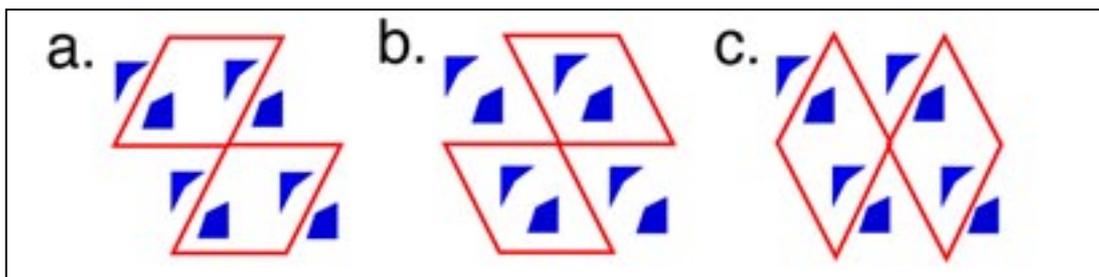


Abb. 16 Indizierung eines $p1$ -Kristallgitters. Dargestellt sind die drei Kombinationen der drei Achsen, durch die sich ein Kristall mit $p1$ -Symmetrie beschreiben lässt (a. ab, b. bc, c. ac). Insgesamt ergeben sich durch Umdrehen der Achsen (ab, ba) sechs Möglichkeiten der Indizierung.

Um die Daten aller gekippten und ungekippten Bilder zu vereinigen, mußte wie folgt vorgegangen werden:

Zuerst wurde der Kippwinkel und die Kippachse für alle sechs Kombinationen bestimmt [EMTILT]. Das richtige Vorzeichen des Kippwinkels konnte aus dem Fokusgradient des

Bildes abgeleitet werden. Die Kippgeometrie, deren Kippwinkel nahe an dem voreingestellten Wert lag (zum Teil mehrere), wurde genutzt, um die Daten mit dem bestehenden 3D-Datensatz zu vereinigen [ORIGTILTD]. Nur eine, die richtige Indizierung ergab einen niedrigen Phasenfehler. In weiteren Runden wurde die Kippgeometrie verfeinert und am Ende die Amplituden und Phasen aller Bilder in einer Datei zusammengefaßt [ORIGTILTD].

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Händigkeit der 3D-Struktur wurde die Vorgehensweise mit einem Bild eines Bakteriorhodopsin-2D-Kristalls verifiziert.

Die Liste aller Strukturfaktoren konnte nun gewichtet und vorbereitet werden [LATLINE], indem die I-Werte der Miller'schen Indices (h,k,l) durch Berechnung des Verlaufs der Gitterlinien aus den z^* -Werten bestimmt wurden. Anschließend wurden die Daten in das MTZ-Datenformat (reziproker Raum) umgewandelt [F2MTZ]. In einem abschließenden Schritt wurde mit Hilfe von weiteren CCP4-Routinen [FFTBIG, MAPMASK, NPO] eine Postscript-Datei mit Schnittbildern der 3D-Dichtekarte erstellt.

Symmetrisierung der 3D-Dichtekarte

Die elffache Symmetrie, die jeder c-Ring besaß, konnte während der Bildverarbeitung nicht ausgenutzt werden, da es sich um eine nicht-kristallographische Symmetrie („non-crystallographic symmetry“ (NCS)) handelte. Gleiches galt für die beiden c-Ringe einer Einheitszelle. Um die elffache Symmetrie doch noch ausnutzen zu können, wurde jeder Ring für sich mit Hilfe von CCP4-Routinen symmetrisiert. Dazu wurden in O an der gleichen Stelle einer jeden c-Untereinheit eine Markierung angebracht und die Symmetrieeoperatoren dafür ausgerechnet [FINDNCS]. Nachdem jeder c-Ring aus der 3D-Dichtekarte ausgeschnitten worden war [MAPMASK], konnten die Symmetrieeoperatoren für jeden einzeln angewandt werden. Im Endeffekt wurde jeder c-Ring zehnmal um $32,7^\circ$ rotiert und aufaddiert [MAPROT]. Die 3D-Dichtekarte der beiden wieder vereinigten c-Ringe [MAPMASK] konnte wieder unter O inspiziert werden.

Um das symmetrisierte Modell als synthetische Referenz nutzen zu können, musste es im MTZ-Format vorliegen. Zu diesem Zweck wurde die 3D-Dichtekarte (realer Raum) wieder zurückkonvertiert [SFALL] und die Strukturfaktoren (reziproker Raum) in die

richtige Reihenfolge gebracht (h-Werte nur positiv und von Null aufsteigend) [MTZDUMP, SORT, F2MTZ].

Visualisierung

Die Visualisierung und Inspektion der 3D-Dichtekarten, sowie der Modellbau erfolgte mittels des Graphikprogramms O (Jones et al. 1991) auf Silicon Graphics-Rechner (O2 oder Octane), dazu mußte die MTZ-Datei über das map-Format (realer Raum) noch weiter ins brk-Format konvertiert werden [MAPMAN].

Zur Darstellung des Modell wurde das Programm Bobscrip (Esnouf 1997, Esnouf 1999) mit den Modifikationen Molscrip (Kraulis 1991) und Raster3D (Merritt & Bacon 1997) eingesetzt.

Die elektrostatischen Berechnungen und Oberflächendarstellungen wurden mit GRASP (Nicholls et al. 1991) ebenfalls auf den Silicon Graphics-Rechner erstellt.

3.12.4. Elektronendiffraktion

Kristallisationsansätze, die schon in Negativkontrastierung große (multilamellare) Schichten mit guter Ordnung zeigten, wurden mittels „Back-Injection“-Methode (siehe S. 45) in Trehalose eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das Philips CM120 wurde durch die Entfernung der Objektappertur und der Wahl einer kleinen Kondensorappertur in die Lage versetzt Beugungsbilder aufzunehmen. Nach dem Justieren des EM wurde wiederum das Niedrig-Dosis-Verfahren gewählt und im Such-Modus wurde in den Diffraktions-Modus (Spot 9-11, 970 mm Kameralänge) umgeschaltet und die restlichen Einstellungen, wie Größe des Elektronenstrahls und Intensität, optimiert.

Die Beugungsmuster wurden direkt mit einer CCD-Kamera (Tietz Tvips, 1k x 1k) aufgenommen. Beugungsmuster, die ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, keine Überbelichtung und scharfe Reflexe zu hoher Auflösung zeigten, wurden auf dem angeschlossenen Computer abgespeichert, auf den DEC Alpha Rechner transferiert und ins MRC-Format konvertiert [MTIETZ2MRC].

Bildverarbeitung

Nach einer groben Bestimmung des Zentrums konnte der Hintergrundgradient entfernt werden [BACKAUTO], wodurch die Reflexe an Kontrast gewannen und in XIMDISP indiziert werden konnten.

Durch Eingabe der gefundenen Gitterparameter konnte eine Liste mit Reflexen und ihren Amplituden erstellt werden [PICKPROF]. Diese Liste konnte anschließend gewichtet und in einem Diagramm dargestellt werden [PLOTDIFF].

4. Ergebnisse

Im ersten Teil sollen die Versuche zur Verbesserung der 2D-Kristalle des PSII-Subkomplexes CP47-RC aus Spinat vorgestellt werden. Dieses Projekt baute auf der Arbeit von Rhee et al. (1998) auf, in der die 3D-Struktur mit einer Auflösung von 8 Å in der Membranebene gelöst wurde.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit der 2D-Kristallisation und 3D-Strukturbestimmung der oligomeren c-Unterheit der Na⁺-translozierenden ATP-Synthase aus *Ilyobacter tartaricus*.

4.1. Aufreinigung und Charakterisierung des Photosystem II

Um die Reproduzierbarkeit der Präparation des Photosystem II (PSII) aus Spinat zu erhöhen, wurde nur in Hydrokultur gezogener Spinat (Bolero F1 RS) aus der Klimakammer verwendet. Jahreszeitliche Schwankungen, sowie Qualitätsunterschiede oder verschiedene Sorten, die bei im Freiland gewachsenem Spinat zwangsläufig auftreten, sollten dadurch ausgeschlossen werden. So konnte die bei Freilandspinat gefundene jahreszeitliche Abhängigkeit der 2D-Kristallisation (Lyon 1998) nicht beobachtet werden. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen leicht unterschiedlich erscheinenden Ernten und 2D-Kristallisationen festgestellt werden.

4.1.1. Aufreinigung

PSII wurde durch zwei spezifische Solubilisierungen aus der Thylakoidmembran isoliert. Die Prozedur entsprach prinzipiell dem Protokoll von Nakazato et al. (1996) mit der in meiner Diplomarbeit (1999) besprochenen Verkürzung.

Im ersten Schritt wurden BBY (Granastapel) durch den Einsatz von 8% Triton X-100 isoliert. Diese Solubilisierung wurde nicht variiert, da schon in der Diplomarbeit die Detergenzkonzentration optimiert und von 5% auf 8% erhöht worden war.

Die BBY-Suspension wurde nicht eingefroren (verkürztes Protokoll), sondern PSII gleich durch eine zweite Solubilisierung mit 2,7% HTG aus der Granamembran isoliert. Dabei stellte sich bei genauem Nachmessen heraus, dass die Chlorophyllkonzentration vor der Solubilisierung nur ungenau bestimmt worden war, weswegen es zu einer beträchtlichen Fluktuation der Endkonzentration (3 mg/ml) kommen konnte. Zum Problem wurde es besonders dadurch, dass sich die Detergenzkonzentration nach der Chlorophyllmenge berechnete. Daher wurde eine genauere Bestimmung der Chlorophyllmenge und -konzentration eingeführt.

So wurden zum Beispiel vor der verbesserten Bestimmung folgende Werte gemessen:

Unverdünnte Probe	8 ml mit 6,53 mg Chl./ml	52,2 mg Chl.
Verdünnte Probe	12 ml mit 5,08 mg Chl./ml	60,9 mg Chl.
Zugabe von HTG		
Nachmessung	20,3 ml mit 4,07 mg Chl./ml	82,7 mg Chl.

Nach der Einführung der verbesserten Vorgehensweise war der Fehler deutlich geringer:

Verdünnte Probe	11 ml mit 5,57 mg Chl./ml	61,3 mg Chl.
Zugabe von HTG		
Nachmessung	20,4 ml mit 2,91 mg Chl./ml	59,4 mg Chl.

Der Einsatz eines Puffer 1 ohne Magnesium während der zweiten Solubilisierung, welcher die Entstapelung der Granamembranen fördern und dadurch die Entfernung von LHC-II verbessern sollte, führte zu keiner großen Erhöhung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses (7,15 im Vergleich zu 6,49) und zu keiner sichtbaren Reduzierung der LHCII-Bande auf dem Harnstoff-SDS-Gel (Abb. 17), deshalb wurde in weiteren Aufreinigungen wieder auf den magnesiumhaltigen Puffer zurückgegriffen.

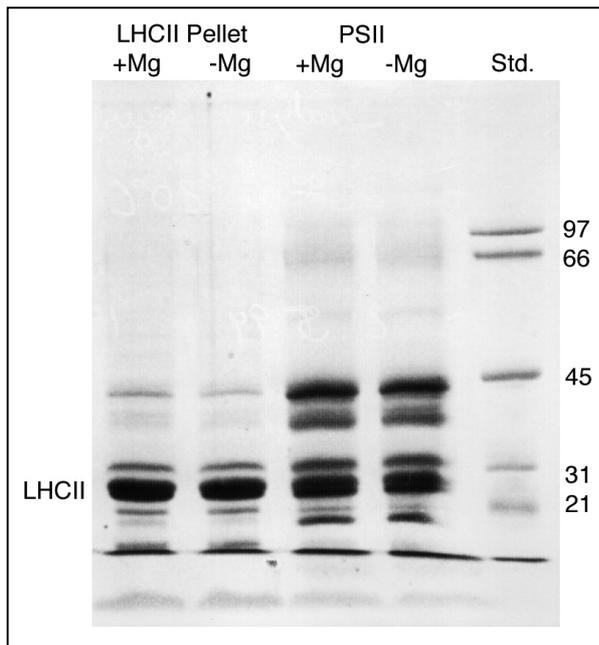


Abb. 17 Harnstoff-SDS-Gel. Aufgetragen wurden das wiederaufgenommene LHCII-Pellet und das aufkonzentrierte PSII aus dem Überstand. Kein Unterschied ist im Bandenmuster und der Gewichtung der Banden zwischen den Bahnen mit oder ohne Magnesium im Puffer während der zweiten Solubilisierung zu erkennen. Die Auflösung des Gels reicht nicht aus, um die einzelnen Untereinheiten von PSII zu unterscheiden. Außerdem überlappt die LHCII-Bande mit der 23 kDa OEC-Bande.

Die Ausbeute an PSII war sehr reproduzierbar. Aus 400 g Spinatblätter wurden mindestens 10 mg Chl. in Form von PSII gewonnen. Dies entsprach 7% der Ausgangschlorophyllmenge oder einer Proteinmenge von 48 mg (unter der Annahme, dass das PSII-Dimer 72 Chl. (70 kDa) und eine Masse von 340 kDa besitzt). Bei einem 1:1-Verhältnis von PSI zu PSII in den Thylakoidmembranen und 150 bzw. 250 Chlorophyllmoleküle je Reaktionszentrum (die jeweiligen Antennenkomplexe miteingeschlossen) berechnet sich die theoretisch maximale Ausbeute auf 18%. Der relativ hohe Verlust ist auf die erhöhte Konzentration an Triton X-100 im ersten Solubilisierungsschritt zurückzuführen. Ausgehend von BBYs blieben 20% der Chlorophyllmenge erhalten (verglichen mit einer maximalen Ausbeute von 29%). Die fehlenden 80% konnten im LHCII-Pellet nachgewiesen.

Sauerstoffaktivität

Zur Kontrolle der Aktivität der PSII-Präparation wurde die Sauerstoffaktivität mittels Clark-Elektrode gemessen. Dies wurde nur qualitativ und nicht für jede Aufreinigung durchgeführt. Auch Messeinrichtungen an der Universität Princeton, USA und am Imperial College, London, UK wurden zu diesem Zweck genutzt; diese bestätigten die gute Aktivität von über 1.000 $\mu\text{mol O}_2 / \text{mg Chl.} \cdot \text{h}$ der Proben.

4.1.2. Gelfiltration

Die Gelfiltration sollte zeigen, in welchem Zustand der gereinigte und solubilisierte PSII-Komplex vorlag. Zum einen kam frisch aufgetautes PSII zum Einsatz, zum anderen PSII, das mindestens eine Woche bei 4°C gelagert worden war, um den Alterungsprozess und die Stabilität des Komplexes zu untersuchen.

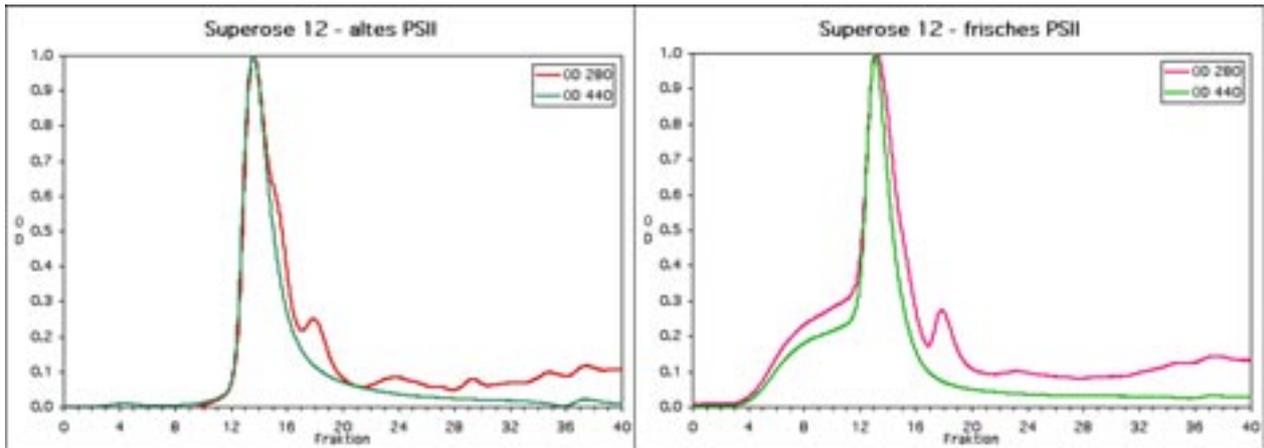


Abb. 18 Superose 12 Gelfiltration. Die optische Dichte (OD) wurde in beiden Diagrammen und für beide Wellenlängen auf 1 normiert.

Superose 12

Es wurde zuerst ein Lauf mit der Superose 12-Säule durchgeführt, da kleinere Subkomplexe erwartet wurden. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, eluierte bei frischem PSII erst eine breite Schulter (Fraktion 4-12) vor dem Hauptpeak (Fraktion 14). Anschließend kam noch ein kleinerer Peak (Fraktion 18/19). Älteres PSII zeigte einen Haupt- und Nebenpeak an den gleichen Stellen. Der Hauptpeak besaß aber keine breite Schulter auf der hochmolekularen Seite, sondern eine leichte Schulter auf der Seite kleinerer Komplexe. Die SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen ergab, dass die linke Schulter der frischen PSII-Probe PSII-Komplexe mit unterschiedlicher Anzahl an LHCII enthielt, während diese in der älteren Probe fehlten (Daten hier nicht gezeigt). Dieses Ergebnis paßte gut zu der Beobachtung, dass sich aggregiertes Protein (zum größten Teil LHCII) abzentrifugieren ließ, wenn man PSII über Nacht auf Eis stehen ließ. Der Hauptpeak konnte klar als PSII-Komplex identifiziert werden, da er alle Hauptuntereinheiten enthielt. Der Nebenpeak in Fraktion 18/19 enthielt nur die extrinsischen Proteine PsbO,P,Q, wodurch das Fehlen einer Absorption bei 440 nm (Chlorophylle) erklärt wird.

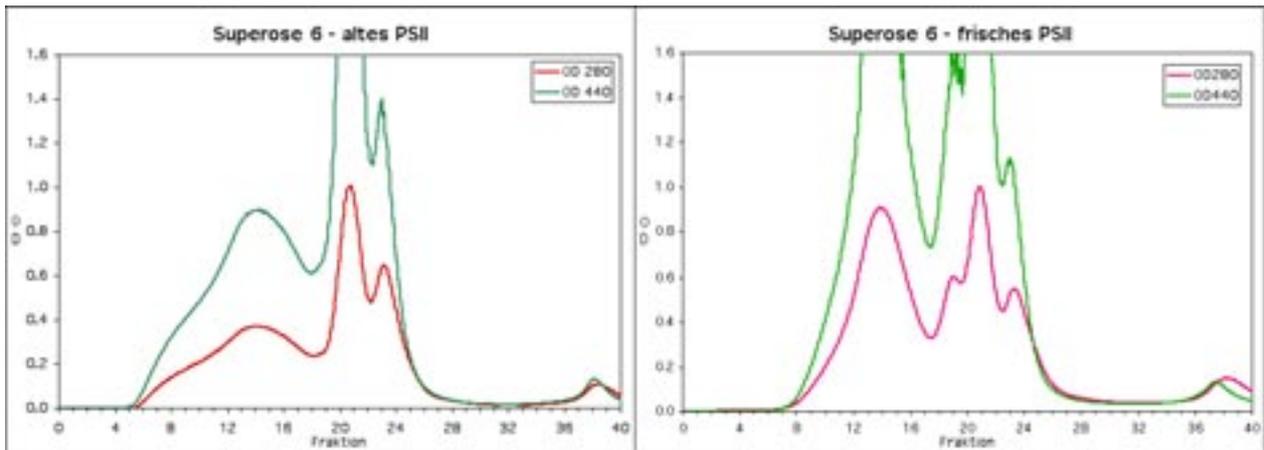


Abb. 19 Superose 6-Gelfiltration. Um eine Überlagerung der beiden Kurven zu vermeiden, wurde die Chlorophyllkonzentration (OD 440) auf 2 normiert, während die Proteinkonzentration (OD 280) auf 1 normiert wurde.

Superose 6

Beim Lauf mit der Superose 6, deren optimaler Bereich zwischen 5 MDa und 5 kDa liegt, zeigte sich ein anderes Bild (Abb. 19). Diesmal eluierte die alte PSII Probe früher, wodurch der erste Peak (Fraktion 14, etwa 400 kDa) sehr breit wurde. Diese Fraktion enthielt die Hauptuntereinheiten von PSII (D1, D2, CP43, CP47, Cyt. b559), aber kein LHCII und stimmte von der Masse gut mit dem PSII-Dimer (400 kDa) überein. Wobei in der alten Probe immer etwas mehr CP43 verloren gegangen ist (Vergleiche Fraktion 15, 17 und 19 in Abb. 20). Desweiteren unterschieden sich die beiden Proben in Fraktion 19 (etwa 90 kDa). Hier wies nur die frisch aufgetaute Probe einen Peak auf, der PSII mit den extrinsischen Untereinheiten enthielt (Abb. 20b). Interessant ist der nächste Peak (Fraktion 21, etwa 60 kDa), der die höchste Proteinkonzentration aufwies. Auf dem Gel konnte neben den extrinsischen Proteinen und LHCII auch CP43 gefunden werden. Zuletzt kam wieder eine Fraktion (24), die nur die extrinsischen Untereinheiten enthielt.

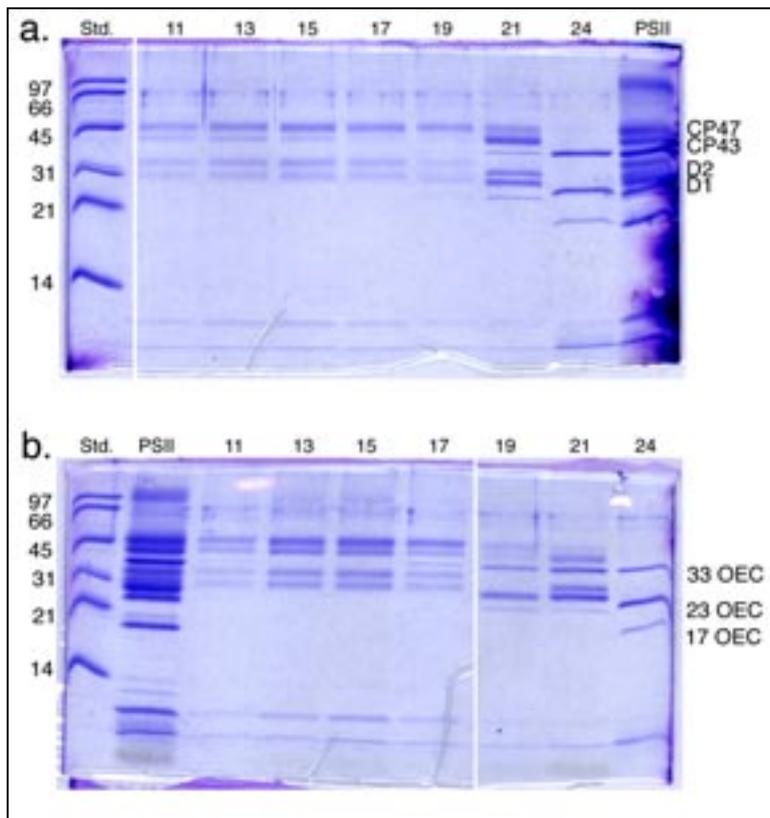


Abb. 20 Harnstoff-SDS-PAGE der Superose 6-Gelfiltrationsfraktionen. **a.** Altes PSII, **b.** Frisches PSII.

Die von der Säule eluierten Fraktionen waren besonders im zweiten Lauf, in dem mit 0,5 mg Chl./ml die fünffache Konzentration des ersten Laufes benutzt wurde, deutlich grün (siehe auch OD 440 in Abb. 19). Trotzdem waren sie zu verdünnt, um mit ihnen Kristallisationsversuche anzusetzen zu können. Durch Methanol-Chloroform-Extraktion angereicht konnten Lipide (MGDG, DGDG und SQDG) in den Fraktionen 15-24 mittels TLC nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt, da die Banden zu schwach waren, um eingescannt zu werden).

4.2. 2D-Kristallisation des CP47-RC-Komplexes

Der Standard-Screen, der für jede neue Aufreinigung von PSII zuerst durchgeführt wurde, bestand aus einer Variation der HTG-Konzentration von 0,8% bis 2,4%, dadurch wurden etwaige Detergenzschwankungen in der Probe ausgeglichen. Den Ansätzen mußte kein Lipid hinzugegeben werden, da ausreichend endogenes Lipid in der PSII-Probe vorhanden war.

Zur Optimierung wurden alle Bestandteile des Dialysepuffers variiert (Glycerol, Salz, Ascorbat) bzw. Additive (z.B. Reduktionsmittel in Form von DTT) hinzugegeben. Die Ergebnisse der Variation der ZnAc-Konzentration finden sich im nächsten Absatz. Grundsätzlich konnte durch den Dialysepuffer keine Verbesserung der 2D-Kristalle erzielt werden, wie schon in der Diplomarbeit dargestellt wurde.

Ähnliche Resultate zeigten sich bei unterschiedlichen Temperaturprofilen, die während der Kristallisation benutzt wurden. Wurde normalerweise bei Raumtemperatur (20°C) begonnen und nach zwei Tagen auf 37°C erhöht, so wurden auch höhere Starttemperaturen und unterschiedliche Zeitabläufe getestet, ohne dass eine Optimierung erreicht werden konnte.

Am Ende wurde immer wieder zu den ursprünglichen Kristallisationsbedingungen zurückgekehrt. Die Anzahl der Aufreinigungen, die größere, tubuläre 2D-Kristalle (Abb. 21) lieferten, war recht hoch. Es konnte aber wiederholt beobachtet werden, dass die Ergebnisse sich durch die Variation der Dialysebedingungen nicht verbessern ließen. So auch wenn bei den anfänglichen Screens keine gut geordneten Kristalle erhalten worden waren.

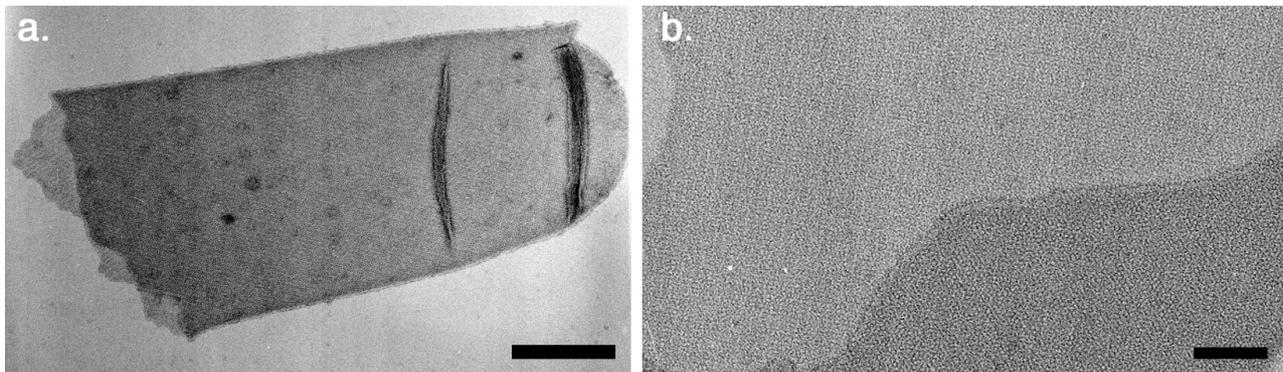


Abb. 21 Negativkontrastierte tubuläre 2D-Kristalle des CP47-RC-Subkomplexes. **a.** abgebrochener Kristall (Maßstab 300 nm), **b.** Vergrößerung eines aufgebrochenen 2D-Kristalls. Links oben besteht er nur aus einer Schicht, während er rechts unten eine Doppelschicht bildet (Maßstab 100 nm).

4.2.1. Einfluß von Zinkacetat

Der Dialysepuffer (Puffer 2) enthielt 1 mM Zinkacetat (ZnAc) und neben dem Puffer (40 mM Mes/NaOH) weitere Salze in Form von 20 mM NaCl, 3 mM NaN₃ und 1 mM CaCl₂.

Da der Puffer aber nachträglich noch auf 30% Glycerol gebracht wurde, lagen die effektiven Endkonzentrationen bei 70% der genannten Werte. Nakazato et al. (1996) berichteten, dass nur mit ZnAc eine Umwandlung der kleinen Kristalle in größere, tubuläre möglich war.

Wurde die ZnAc-Konzentration auf 2 oder 3 mM in Anwesenheit der anderen Salze erhöht, so fanden sich viele multilamellare Kristalle mit einem Durchmesser bis zu 3 μm (Abb. 22). Ein feinerer Screen (0,2 mM Schritte) ergab, dass schon eine Erhöhung auf 1,4 mM ZnAc ausreichte, um zu einer deutlichen Schichtenstapelung zu führen.

Entfernte man die Salze NaCl und CaCl_2 , so genügten schon 0,6 mM ZnAc, um eine Schichtenbildung hervorzurufen. Bei dieser ZnAc-Konzentration reichten schon 5 mM NaCl aus, um die Schichtenbildung wieder zu unterdrücken. Ging der NaCl-Screen von 0,8 mM ZnAc aus, so mußte die NaCl Konzentration auf 20 mM erhöht werden, um den gleichen Effekt zu bewirken. Diese Werte entsprachen fast wieder den Ausgangsbedingungen.

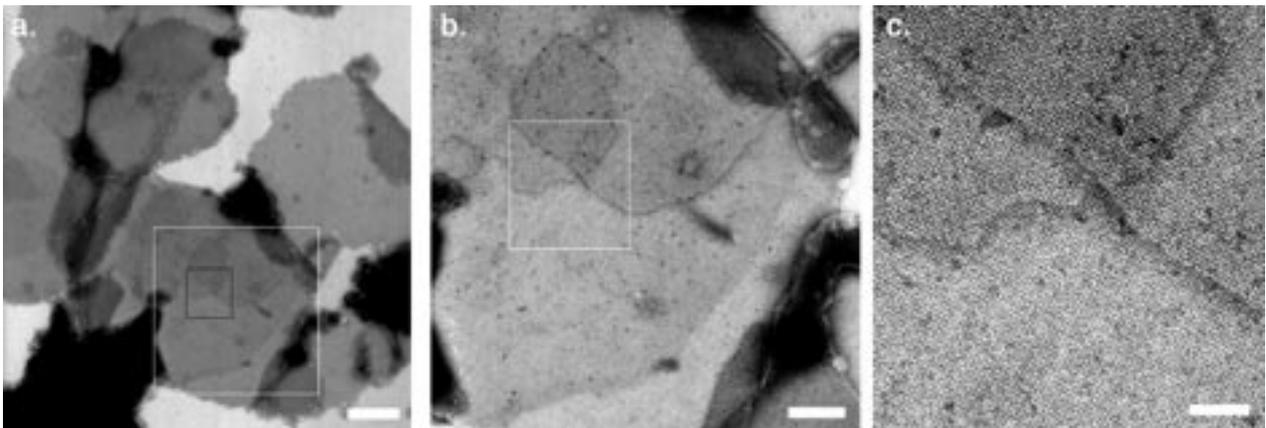


Abb. 22 Negativkontrastierte multilamellare 2D-Kristalle. **a.** Übersicht (Maßstab 1 μm), **b.** In der Vergrößerung erkennt man die unterschiedliche Anzahl an Schichten (Maßstab 300 nm), **c.** Durch weitere Vergrößerung läßt sich das Kristallgitter in den unterschiedlich dicken Schichten erkennen (Maßstab 100 nm).

ZnAc konnte nicht durch ähnliche Metallsalze (Mn, Cu, Fe, Ni) substituiert werden.

4.3. Strukturuntersuchungen am CP47-RC-Komplex

4.3.1. Elektronendiffraktion

Dünne geordnete Stapel aus 2D-Kristallen (dünne 3D-Kristalle) eingebettet in Trehalose waren unter Cryo-Bedingungen und Verwendung des Niedrig-Dosis-Verfahren leicht als große, runde Schichten mit bis zu 3 μm Durchmesser zu erkennen und nahezu immer hoch geordnet.

Nachdem das Beugungsmuster mittels der eingebauten CCD-Kamera aufgenommen (Abb. 23a) und auf dem DEC Alpha-Rechner ausgewertet wurde, zeigte sich beim Indizieren, dass die 2D-Kristallstapel die gleiche Einheitszelle ($a = 165 \text{ \AA}$, $b = 162 \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$) und Symmetrie ($P22_12_1$) wie die oben beschriebenen 2D-Kristalle aufwiesen.

Im Auswertungsplot (Abb. 23b), der die Intensität der gefundenen Reflexe auf dem indizierten Gitter angibt, konnte mit dem Reflex (36,6) (reziproker Raum) eine Auflösung von 4,5 \AA (realer Raum) erreicht werden

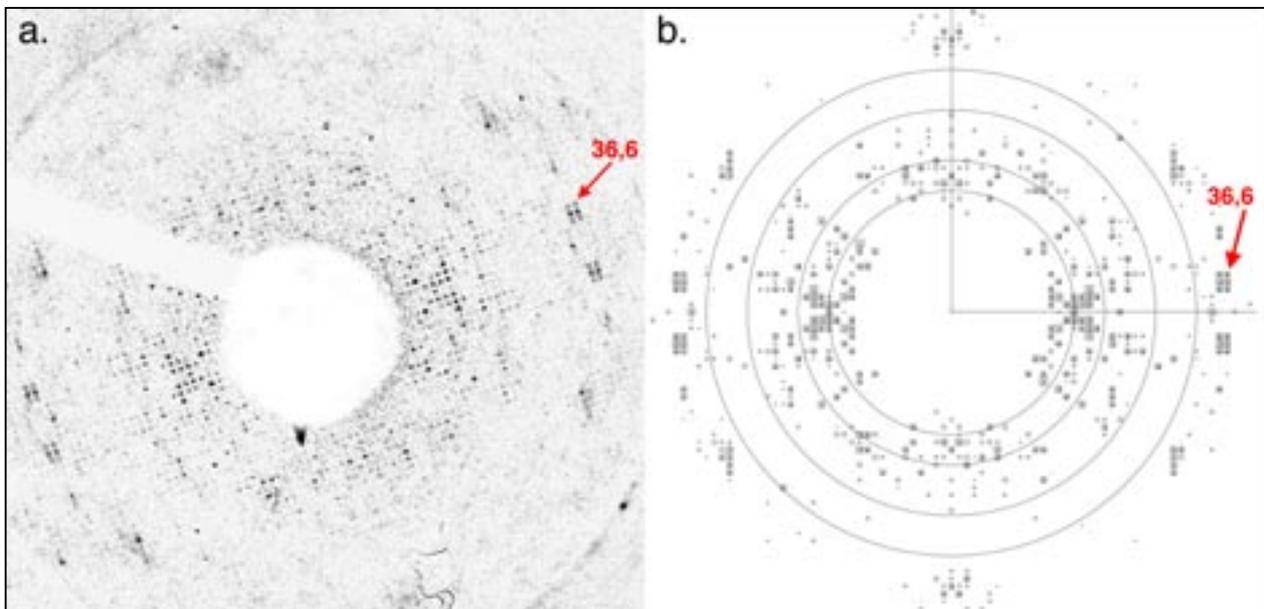


Abb. 23 Elektronenbeugung an CP47-RC-2D-Kristallstapeln. **a.** Beugungsmuster mit Strahlenfänger, wie es von der CCD-Kamera aufgezeichnet wurde. **b.** Auswertungsplot. Die eingezeichneten Auflösungsringe liegen von innen nach außen bei 10, 8, 6 und 5 \AA . Umso größer die repräsentierenden Kästchen, umso höher die Intensität des gefundenen Reflexes. Der Beugungsreflex (36,6) entspricht 4,5 \AA .

Obwohl die Aufnahme nicht ganz isotrop erscheint und vermehrt Reflexe um die h-Achse aufweist, widerlegt ein weiterer Cluster jenseits der 5 Å entlang der k-Achse diesen Eindruck.

Mittels Gefrierbruch sollte die Anzahl und der Aufbau der Schichten ermittelt werden (freundlicherweise durch Dr. Winfried Haase durchgeführt). Es konnten einige Doppel- und Mehrfachschichten gefunden werden, deren Kristallgitter deutlich in Register lagen (Abb. 24a). Zum Teil erschien es so, also ob Kristallmembranen von zwei aufeinanderliegenden Vesikeln stärker zusammenhielten, als die beiden Membranen desselben Vesikels (Abb. 24b).

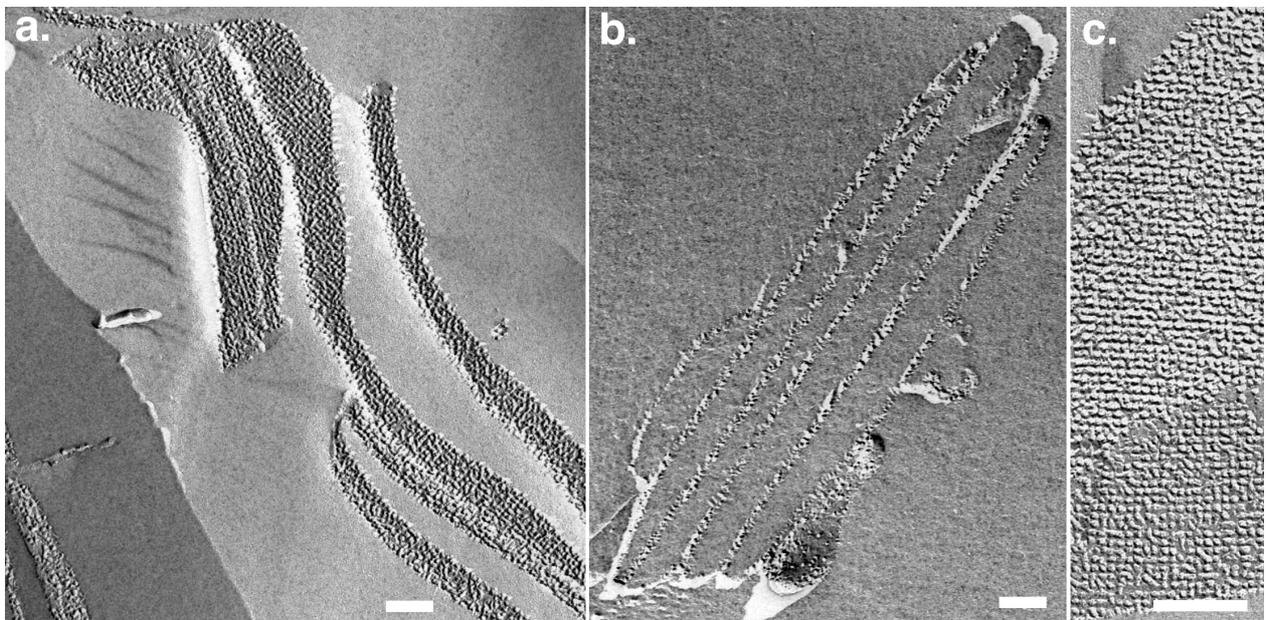


Abb. 24 Gefrierbruch von 2D-Kristallschichten. **a.** Bruch entlang mehrerer 2D-Kristallschichten, die in Register liegen. **b.** Querschnitt durch einen 2D-Kristallstapel. Es ist gut das Aufeinanderliegen der Schichten jeweils zweier Vesikel zu erkennen. **c.** Zwei leicht verschobene Kristallschichten mit rechtwinkeligem Gitter (Maßstab 150 nm) (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Winfried Haase).

4.3.2. Nachbehandlung der 2D-Kristalle

Wechselndes Einfrieren und Auftauen der sedimentierten Kristallvesikel („Freeze and Thaw“), Inkubation bei verschiedenen Temperaturen, sowie die Hinzugabe von Detergenz bis hin zum Auflösen der vorhandenen 2D-Kristalle und anschließender Rekristallisierung erbrachten keine Verbesserung der Kristallqualität oder -größe,

sondern führten in den meisten Fällen zu einer Verschlechterung derselben (z.B. Aggregation der Kristalle, löchrige Vesikel, etc.).

Die langfristige Lagerung (über Monate) der 2D-Kristallansätze bei 4°C schien nicht zu schaden, es konnte aber auch kein positiver Effekt beobachtet werden.

4.3.3. Saccharose-Dichtegradient-Zentrifugation

Wäre es möglich, die kristallinen von den nicht-kristallinen Vesikeln zu trennen, so wären sauberere und mit 2D-Kristallen angereicherte Proben für die Mikroskopie und eine genauere Bestimmung der Proteinzusammensetzung des CP47-RC-Subkomplexes möglich gewesen.

Am Ende einer Zentrifugation eines Saccharose-Dichtegradienten von 30-50% in 5% Schritten konnten bis zu drei Banden identifiziert werden. Die sehr grüne Hauptbande befand sich immer zwischen den 50% und 45% Stufen und konnte durch Nutzung eines feineren Stufengradienten auf 50/49% eingengt werden. Bei diesem traten aber keine weiteren Banden auf, wodurch der gröbere Gradient weiter genutzt wurde. Des weiteren trat meistens eine sehr schwache und daher hellgrüne Bande zwischen 45% und 40% auf. Ein wenig Material präzipitierte am Boden. Freie Pigmente drangen dagegen erst gar nicht in den Gradienten ein und bildeten eine hellgrüne Schicht am oberen Ende des Gradienten (Abb. 25).

Die Nutzung eines kontinuierlichen Gradienten, die mit dem Gradient Master hergestellt wurden, zeigte das gleiche Bandenmuster.

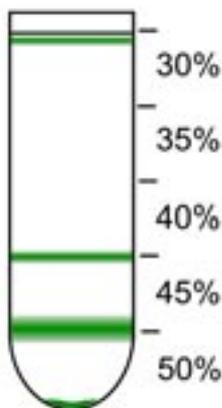


Abb. 25 Schematische Darstellung eines Saccharose-Dichtegradienten nach der Zentrifugation. Die Konzentration der Saccharoselösungsstufen ist in Prozent angegeben.

Durch die hohe Viskosität der Saccharoselösung und das geringe Volumen war die Entnahme der Banden schwierig. Nach Vergleich verschiedener Methoden wurde die Entnahme mit der Pipette von unten favorisiert.

Die Isolierung der 40/45%-Bande bereitete besondere Schwierigkeiten, da kein zufriedenstellender Weg zur Isolierung gefunden werden konnte. Eine Analyse war daher nicht möglich. Die folgenden Daten beziehen sich auf die 45/50%-Bande.

Auf dem Harnstoff-SDS-Gel zeigte sich, dass die extrinsischen Proteine abgetrennt wurden und ansonsten alle wichtigen Untereinheiten vorhanden waren. Der gleiche Effekt ließ sich aber auch durch einfaches Sedimentieren der Kristalle in der Tischzentrifuge bei niedriger Geschwindigkeit und anschließendem Austausch des Überstand gegen frischen Puffer erreichen.

Die Negativkontrastierung der entnommenen Banden war problematisch, da die anhaftende Saccharoselösung (etwa 45%) das Eindringen des Schwermetalsalzes behinderte. Eine Verdünnung der Saccharoselösung bzw. das Abzentrifugieren der Kristalle und Austausch gegen frischen Puffer, sowie das Waschen der Probe auf dem elektronenmikroskopischen Netzchen und Beglimmung desselbigen konnten die Färbung verbessern. Die Vesikel und 2D-Kristalle waren bei guter Kontrastierung etwas sauberer, dafür konnte aber eine verstärkte Aggregation beobachtet werden. Eine Anreicherung von 2D-Kristallen konnte nicht festgestellt werden.

Wie schon oben angesprochen, konnte ein ähnlicher Effekt durch leichtes Abzentrifugieren erreicht werden. Diese Vorgehensweise war sehr viel einfacher, schneller und reproduzierbarer und setzte sich gegen den Saccharose-Dichtegradienten durch.

4.3.4. Mikroskopie und Bildverarbeitung

Kristallisationsansätze, die in Negativkontrast einen hohen Anteil von gut geordneten, großen, tubulären 2D-Kristallen aufwiesen, wurden in Tannin oder Trehalose eingebettet bei 100 K eingefroren. Häufig war ein Zusammenklumpen der Vesikel zu beobachten, das auch durch leichtes Schütteln nicht behoben werden konnte. Um eine größere Anzahl an Vesikeln auf dem Kohlefilm zu erhalten, wurde vor dem Einfrieren die Probe auf dem Kohlefilm bis zu einer Minute in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer

inkubiert. Unter Cryo-Bedingungen bei 4 K und Verwendung des Spot-Scan-Verfahrens wurden einige hundert Bilder am JEOL SFF 3000 gemacht.

Oft zeigten die Bilder an der optischen Bank nur sehr schwache Reflexe. Dies vereinfachte die Indizierung nicht, da nur wenige starke Reflexe in der berechneten FT auftraten. Die Kenntnis der Gitterparameter ($a = 165 \text{ \AA}$, $b = 162 \text{ \AA}$), Symmetrie ($p22_12_1$) und einiger bekannten Reflexe erleichterte die Indizierung trotzdem. Die Auswertung der tubulären 2D-Kristalle zeigte bald, dass keine Verbesserung zur Diplomarbeit erreicht werden konnte. Die meisten Bilder enthielten Informationen bis zu einer Auflösung von 8 \AA . In seltenen Fällen lag die Auflösung nach der Entzerrung bei 6 \AA (Abb. 26a). Neben den Gitterparametern war auch die berechnete Projektionsdichtekarte (Abb. 26b) identisch zu den Ergebnissen von Rhee et al. (1997).

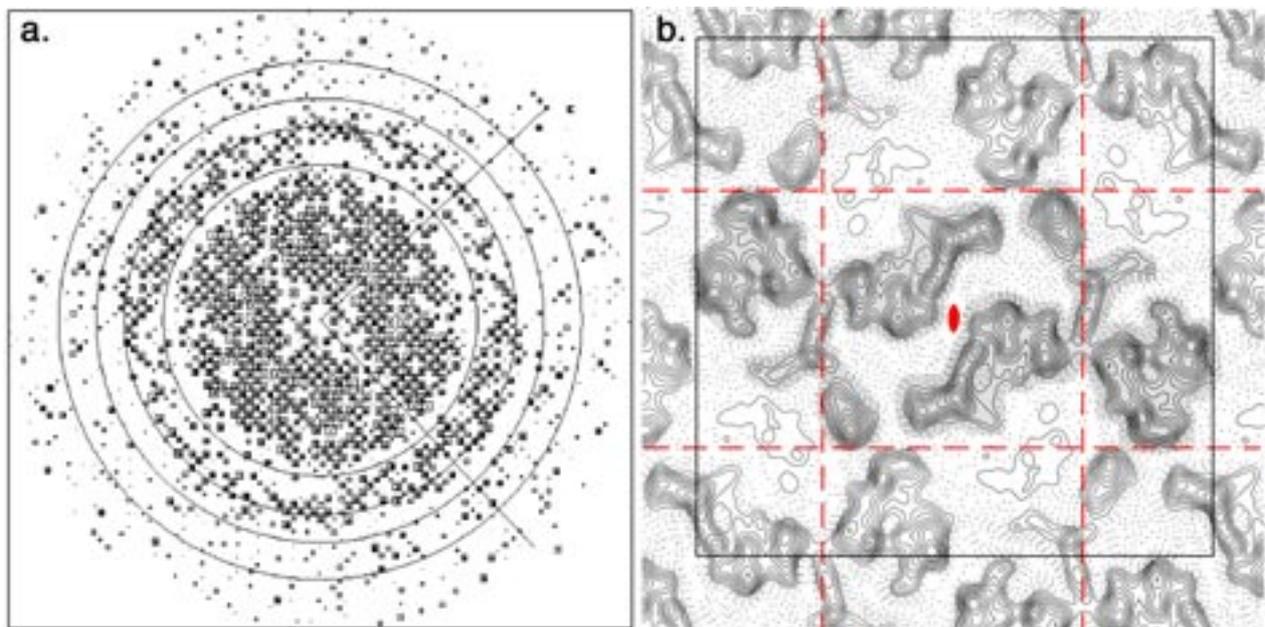


Abb. 26 a. IQ-Plot. Die konzentrischen Ringe markieren von innen nach außen eine Auflösung von 10, 8, 7 und 6 \AA . **b.** Projektionsdichtekarte. Es ist eine Einheitszelle ($165 \times 162 \text{ \AA}$) mit vier Monomeren abgebildet. Davon sind zwei grau hinterlegt. In rot sind die Symmetrien der Flächengruppe $p22_12_1$ eingezeichnet.

4.4. 2D-Kristallisation der oligomeren c-Untereinheit

Die Aufreinigung der c-Untereinheit erfolgte von Thomas Meier in der Arbeitsgruppe von Prof. Dimroth an der ETH Zürich (Meier et al. in Vorbereitung, Neumann et al. 1998). Die Anfangsbedingungen der 2D-Kristallisation wurden von den Laboren Prof. Dr. Dimroth und Prof. Dr. Engel (Universität Basel) gefunden. So lag zu Beginn dieser Arbeit schon eine Projektionskarte mit einer Auflösung von 6,9 Å vor (Stahlberg et al. 2001).

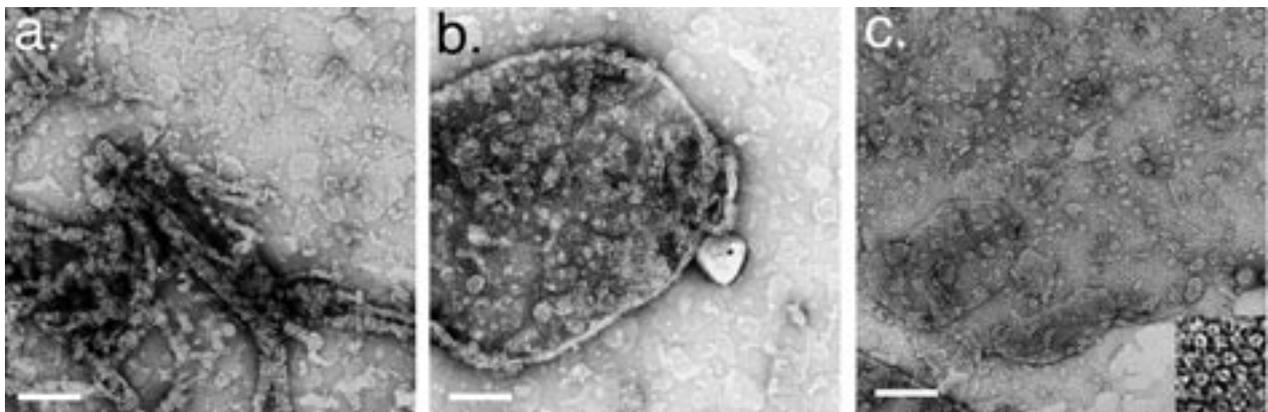


Abb. 27 Negativkontrastierte Proben des Zeitverlaufs. Nach 24 h Dialyse begann das noch teilweise solubilisierete Protein sich in Membranstapel (a.) und kleine, runden Vesikel (b.), die durch aufliegendes Protein verunreinigt waren und noch wenig Ordnung aufwiesen, anzuordnen. c. Nach 36 h konnten keine Membranstapel mehr gefunden werden. Dafür waren die Vesikel sauberer, größer und enthielt größere geordnete Bereiche (Maßstab 50 nm). Bei guter Färbung waren die ringförmigen Oligomere (50 Å Durchmesser) gut zu erkennen (Ausschnittsvergrößerung).

Zeitablauf der Dialyse

Um den Ablauf der Dialyse, sprich die Rekonstitution und 2D-Kristallisation, zu verfolgen, wurden Hockey-Sticks als Dialysevorrichtung benutzt und in Abständen von 12 h Proben mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (TLC) auf die Veränderung der Detergenzkonzentration untersucht und negativkontrastiert im EM inspiziert.

Schon nach den ersten 12 h fiel die Detergenzkonzentration drastisch ab (Vergleiche OG-Standard und 1a bzw. 2a in Abb. 28), gleichzeitig bildeten sich die ersten Vesikel, die auch schon Anzeichen von Ordnung aufwiesen. Oft machten aufliegende solubilisierete Proteinmoleküle das Gitter in diesem Stadium unkenntlich (Abb. 27a,b).

Gut war auf der TLC-Platte zu erkennen, dass sich die Lipidkonzentration während der Dialyse nicht änderte (Abb. 28).

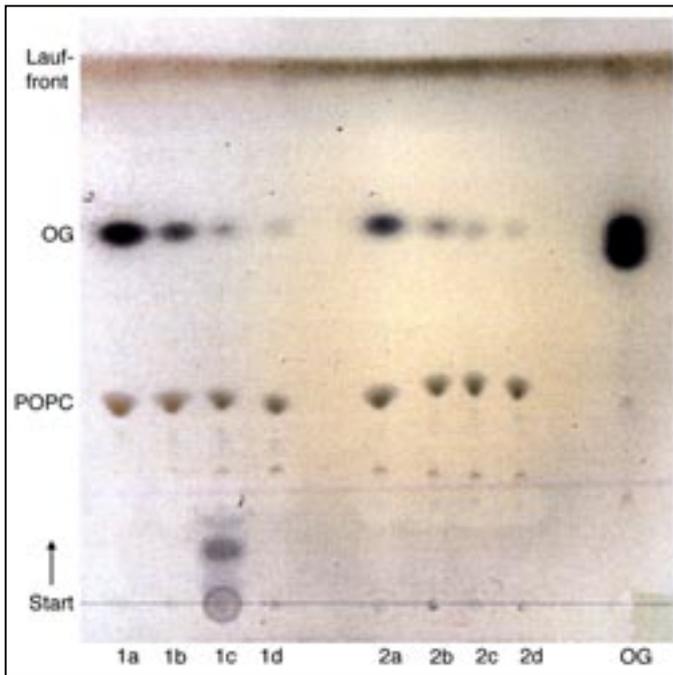


Abb. 28 TLC-Platte zum Zeitverlauf der Dialyse. Proben wurden nach 12 (a), 24 (b), 36 (c) und 48 h (d) entnommen. Versuch 1 enthielt 0,8% OG zu Beginn der Dialyse, Versuch 2 nur 0,5%. OG-Standard entspricht 1%. Jeweils 2 μ l Probe wurden direkt aufgetragen. Die Banden wurden durch Veraschung nach dem Lauf sichtbar gemacht.

Jeder neue Protein-Batch wurde zuerst einem Lipid-Protein-Verhältnis (LPR)-Screen unterworfen, indem die Proteinkonzentration mit 1 mg/ml konstant gehalten und die Lipidkonzentration variiert wurde. Anschließend wurde die Protein- und die Detergenzkonzentration optimiert bzw. andere Parameter variiert.

LPR

Die LPR hatte nicht den erwarteten großen Einfluß auf die 2D-Kristallisation. Über einen weiten Bereich war das Erscheinungsbild konstant. Deshalb wurde besonders mit den LPRs von 0,5, 0,8 und 1,0 gearbeitet. Unter einer LPR von 0,5 nahm der Anteil an großen Vesikeln mit guter Ordnung ab. Gleichzeitig kam es öfter zur Aggregation von Vesikeln und Partikeln.

Leere Lipidvesikel konnten in allen Kristallisationsansätzen gefunden werden, unabhängig wie stark die LPR abgesenkt wurde. Dies verstärkte den Eindruck, dass die Kristallisationsergebnisse wenig von der LPR beeinflussbar waren, solange genug Lipid im Ansatz vorhanden war.

Proteinkonzentration

Ein oberes Limit für die Proteinkonzentration war durch die Konzentration der Protein-Charge gegeben (meistens um 2 mg/ml Protein), zu der noch zumindest Lipid hinzugegeben werden mußte. Wie bei der LPR konnte keine schlüssige Abhängigkeit

gefunden werden, weshalb standardmäßig mit 1 mg/ml Protein im Kristallisationsansatz gearbeitet wurde.

Detergenzkonzentration

Das Protein lag sowohl in Laurylsarcosin (LS) als auch Octylglucosid (OG) vor (abhängig von der in Zürich gewählten Aufkonzentrierungsmethode), während das Lipid mit wenigen Ausnahmen in OG solubilisiert war. In den meisten Fällen wurde die Detergenzkonzentration durch weitere Zugabe von OG variiert. In einem der ersten Experimente bewirkte die stufenweise Verringerung der Detergenzkonzentration von 1,5% auf 0,4% eine Vergrößerung der kristallinen Vesikel und das vermehrte Auftreten einer tubulären Morphologie. Bei späteren Versuchen konnte dieser Effekt nicht mehr so ausgeprägt beobachtet werden. OG-Konzentrationen von 1,5 bis 1% führten in den meisten Fällen aber zu kleineren, runden Vesikeln.

Auf Grund der zur Verfügung stehenden Proteinmengen konnten die folgenden Screens nicht alle an einer Protein-Charge durchgeführt werden. Dadurch bedingte Schwankungen mußten hingenommen werden.

Temperatur

Zu Beginn wurde untersucht, ob die Starttemperatur einen Einfluß auf die Kristallisation hatte. Bei 4°C verlief die Rekonstitution sehr langsam und die endgültige Ausbeute an 2D-Kristallen war sehr niedrig. Auch wenn nach 24 h die Temperatur auf 37°C erhöht wurde, änderte dies das Erscheinungsbild nicht.

Begann die 2D-Kristallisation bei 20°C, so kam es auf die Protein-Charge an, ob durch eine Erhöhung auf 37°C die Qualität und Quantität der 2D-Kristalle verbessert werden konnte. Ähnlich sah es aus, wenn die Ansätze gleich bei 37°C zur Dialyse aufgestellt wurden.

Generell war der Wechsel von 20 auf 37°C nach 24 h am förderlichsten für die Entstehung von 2D-Kristallen.

Lipid

Neben Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC) wurden die Lipide Dimyrestoyl-PC (DMPC), PO-Phosphatidylserin (POPS) und polare Lipide aus *E. coli* verwendet. In

einem anfänglichen Experiment wurden auch noch Dielaidyl-, Linoleoyl-Palmitoyl- und Linoleoyl-Stearoyl-PC getestet. Mit den polaren Lipiden aus *E. coli* konnten keine Kristalle erlangt werden. Ansonsten setzte sich POPC immer in Hinsicht der Größe und Ordnung der Vesikel durch.

pH

Verschiedene pH-Werte wurden mit Hilfe der Puffersubstanzen Citrat (pH 5,5), NaADA (6, 6,5), TEA (7, 7,5), Tris (8, 8,5) und CHES (9,5) getestet. Die Dialyse bei pH-Werten unter 7,5 führten zu kleinen Vesikeln, die leicht zusammenhängen und aggregierten. Über pH 8 waren die Vesikel noch kleiner und es konnten fast keine geordneten Bereiche gefunden werden. pH 7,5 und 8, die schon standardmäßig genutzt wurden, zeigten die besten Ergebnisse, da die Vesikel weniger verklumpten und der größte Anteil an 2D-Kristallen enthalten war. Es wurde also weiter mit dem Puffer Tris/HCl bei pH 7,5 bis 8 gearbeitet.

NaCl

Standardmäßig wurden 200 mM NaCl im Dialysepuffer verwendet. In einem ersten Screen wurden 0, 10 und 100 mM NaCl ausprobiert, während die Zusammensetzung des Kristallisationsansatzes konstant blieb. Der Ansatz ohne Salz zeigte keine normale Rekonstitution des c-Rings in Liposomen, sondern höchstens sehr kleine und wenige Vesikel, sowie fadenförmige Erscheinungen. 10 mM lieferte etwas mehr Material auf dem Netzchen, aber erst 100 mM reichten aus, damit viele runde Vesikel erschienen. In einem zweiten Screen kamen die NaCl-Konzentrationen 100, 200, 300 und 400 mM zum Einsatz. Umso höher die Salzkonzentration war, umso stärker aggregierten die Vesikel, bzw. bildeten multilamellare Schichten, was besonders ausgeprägt in den zwei höchsten Konzentrationen war. Aus diesem Grund wurde die NaCl-Konzentration von 200 mM beibehalten.

Glycerol

Um die Dialysegeschwindigkeit zu verlangsamen, wurde der Dialysepuffer mit 5 - 30% Glycerol in 5% Schritten versetzt. Weder die Größe und Form noch die Quantität und Qualität der Kristalle konnte beeinflusst werden. Glycerol kam daher nicht weiter zum Einsatz.

Dialysevorrichtung

In den Ergebnissen unterschieden sich Hockey-Sticks und Mikrodialysezellen (Button) grundsätzlich nicht bzw. konnten etwaige Variationen nicht von dem allgemeinen Hintergrund unterschieden werden. Button mit 25 oder 50 μl Volumen wurden oft für anfängliche Screens verwendet, um den Proteinverbrauch gering zu halten. Der Nachteil davon war aber, dass bei einer erfolgreichen 2D-Kristallisation nur wenig Material zur Mikroskopie zur Verfügung stand. (Größere Button (100 μl) besaßen ein sehr großes Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, wodurch die Dialyse nicht mehr mit den Hockey-Sticks vergleichbar gewesen wäre.)

Insgesamt war zu beobachten, dass der Erfolg einer 2D-Kristallisation sehr stark von der Protein-Charge abhing. Über einen weiten Bereich an Bedingungen war das Erscheinungsbild der resultierenden 2D-Kristallisation sehr ähnlich und zeigte vorwiegend kleine, runde Vesikel mit geordneten Bereichen (Abb. 29a).

Es war also besonders schwierig die Größe der 2D-Kristalle zu beeinflussen. In den meisten Fällen, in denen größere Vesikel ($< 2 \mu\text{m}$) gezüchtet werden konnten, hatten diese viele Falten, da sie wie ein platter Ballon auf dem Netzchen zu liegen kamen, wodurch sie nicht über große Flächen geordnet waren (Abb. 29b). Oft neigten sie auch zu einer stärkeren Mosaizität, die leicht an der optischen Bank zu erkennen war.

Beste Kristallisationsansatz

Der Ansatz, der die am geordnetsten und größten 2D-Kristalle in Form von großen, tubulären Vesikeln (Abb. 29c/d) enthielt, wurde unter folgenden Bedingungen erhalten:

Kristallisationsansatz: 1 mg/ml c-Ring in LS solubilisiert
 0,5 mg/ml POPC in 1,5% OG gelöst (LPR = 0,5)
 0,6% OG Endkonzentration
 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 200 mM NaCl

Dialysevorrichtung: 70 μl Ansatz in Hockey-Stick

Dialysepuffer: 30 ml Dialysepuffer X
 10 mM Tris/HCl pH 7,5
 200 mM NaCl, 3 mM NaN₃

Dialysezeit: 1 Tag bei 20°C, anschließend 1 Tag bei 37°C

Die Bilder von Kristallen unter Cryo-Bedingungen, die direkt nach der Ernte gemacht wurden, waren nicht so gut wie von den negativkontrastierten Bilder erwartet worden war. Zwar waren die Kristalle groß und gut für Cryo geeignet, doch war die Ausbeute an guten Bildern gering, da die meisten eine hohe „Mosaizität“ aufwiesen.

Der selbe Ansatz wurde 3 Monate später noch einmal in Negativkontrastierung überprüft und wieder für gut befunden. Diesmal konnten sie auch unter Cryo-Bedingungen überzeugen, so dass am Ende etwa 80% der Daten des 3D-Modells (darunter alle Bilder von gekippten Kristallen) auf diesen Ansatz zurückgingen.

4.4.1. Kristallmorphologie und Kristallformen

Am häufigsten fanden sich runde Vesikel mit einem quasi-hexagonalen Kristallgitter in den Kristallisationsansätzen. Meistens waren beide Schichten geordnet und konnten an der optischen Bank an Hand ihrer Beugungsmuster identifiziert werden. Die Größe reichte von weniger als 100 nm bis etwa 1,5 µm Durchmesser. Die kleineren waren nicht zur Strukturanalyse tauglich, während die größeren zumindest ungekippt zu guten Ergebnissen führten (Abb. 29a).

Bevorzugt wurden längliche bzw. tubuläre Vesikel, die flach auf dem Kohlefilm zu liegen kamen und deren beiden 2D-Kristalllagen bei guter Ordnung ein deutliches Moiree-Muster erzeugten (Abb. 29c, d).

Große Schichten wurden sehr selten gefunden und waren dann meistens faltig und weniger geordnet (Abb. 29b). Auch diese waren im Grunde nur sehr große Vesikel und dadurch doppellagig, was wiederum am Moiree-Muster zu erkennen war.

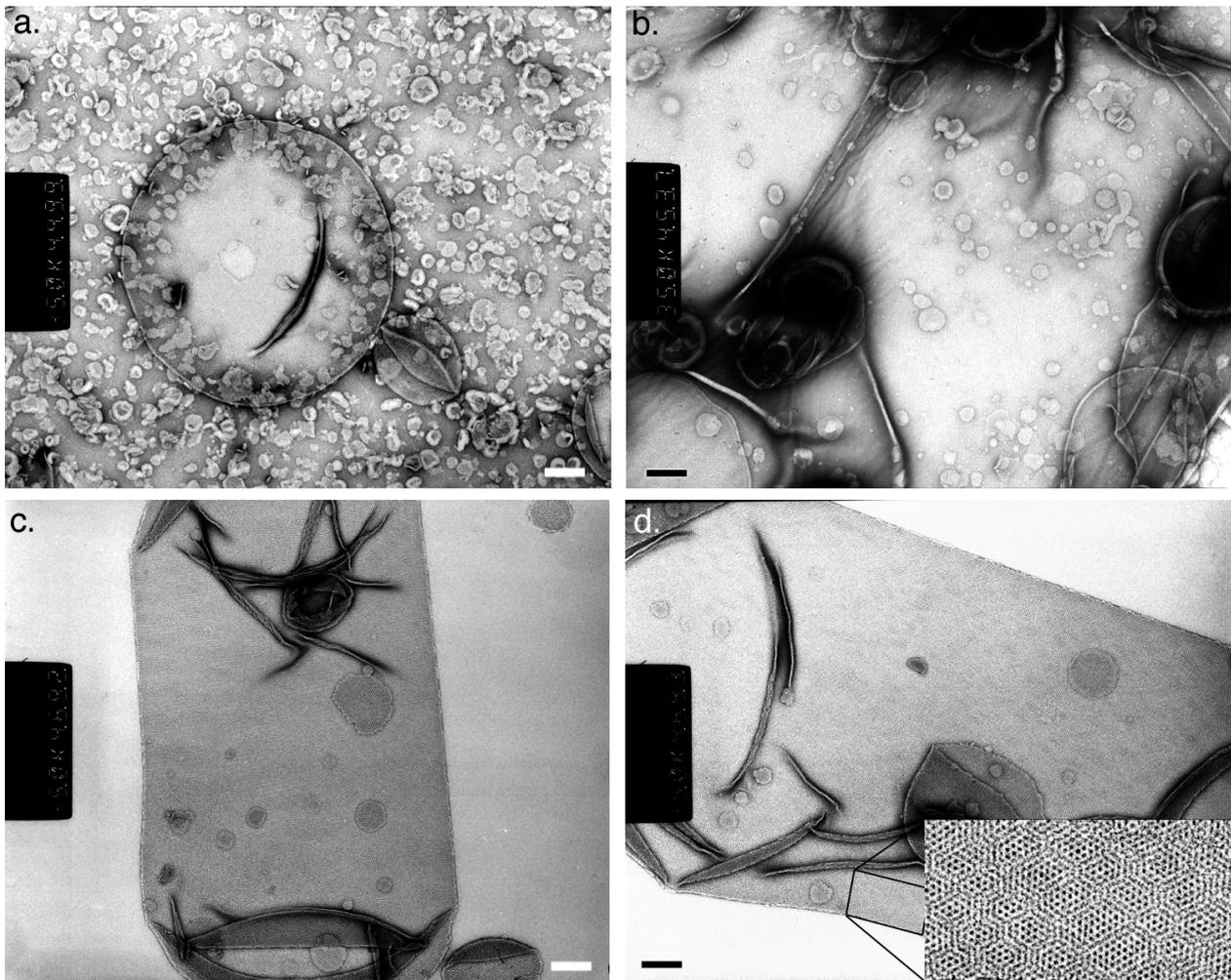


Abb. 29 2D-Kristallmorphologie: **a.** runde Vesikel, **b.** grosse doppelagige Schicht, **c./d.** tubuläre Vesikel mit Moiré-Muster (Ausschnittsvergrößerung) (Maßstab 200 nm).

Hauptsächlich wiesen die 2D-Kristalle eine $p1$ -Symmetrie auf (Abb. 30a), die auf den ersten Blick ein quasi-hexagonales Muster ergab. Auf die Gitterparameter wird in Kapitel 4.5 genauer eingegangen. Da dieser Kristalltyp die höchste Auflösung zeigte und am reproduzierbarsten war, wurde er zur Erstellung des 3D-Modells verwendet.

Eher selten fanden sich 2D-Kristalle mit einer höheren Symmetrie bzw. einem rechtwinkligen Gitter, wie zum Beispiel $p12_1$ in Abb. 30b. Eine niedrige LPR begünstigte ihr Erscheinen. Sie erreichten aber nie die Größe, Ordnung und Reproduzierbarkeit der oben angesprochenen Kristalle.

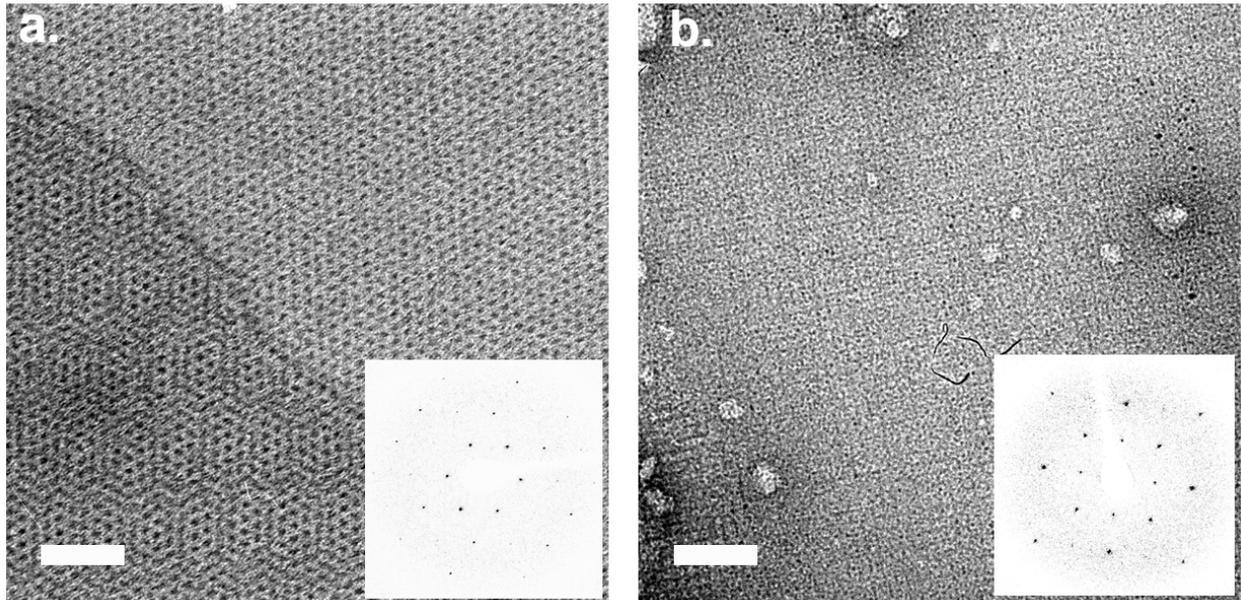


Abb. 30 2D-Kristallgitter in Negativkontrast. **a.** $p1$ -Symmetrie. Sowohl eine Lage (oben rechts), als auch eine Doppelschicht mit Moirée-Muster (unten links) ist abgebildet. **b.** $p12_1$ -Symmetrie. Eingefügt ist jeweils das Beugungsmuster an der optischen Bank (Maßstab 50 nm).

4.4.2. DCCD-markierter c-Ring

Zwei Strategien wurden zum Erlangen von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD)-markierten 2D-Kristallen verfolgt. Zum einen wurde versucht gelabeltes Protein zu kristallisieren, zum anderen 2D-Kristalle nachträglich zu markieren.

2D-Kristallisation von DCCD-markiertem c-Ring

Das in Zürich gelabelte Protein wurde in den Kristallisationsansätzen genau wie das unmarkierte Protein eingesetzt. Im Endeffekt wurden auch die gleichen Bedingungen durchgetestet. Dazu wurde die LPR, NaCl-, Protein- und Detergenzkonzentration, sowie das Lipid und die Temperatur optimiert.

Unter den verschiedenen Bedingungen entstanden meistens nur sehr kleine Vesikel, die eine große Tendenz zum Stapeln hatten. Die Vesikel waren dicht gepackt mit Protein, wiesen aber nur kleine kristalline Bereiche auf. Diese ließen zum Teil die gewohnte $p1$ -Symmetrie, meistens aber eine rechtwinkeliges Gitter erkennen. Wie schon bei dem

nicht-markierten c-Ring führte die Variation der einzelnen Kristallisationsparametern zu ähnlichen Resultaten.

Eine Ausnahme bildete die Verwendung des Lipids POPS. Kam es zum Einsatz (da DCCD eine negative Ladung am c-Ring neutralisiert, hätte eine negative Ladung am Lipid kompensatorische Wirkung haben können), konnten auch sehr große Vesikel gefunden werden. Diese waren zwar auch dicht mit Protein gepackt, wiesen aber keine Ordnung auf.

Es konnten schließlich keine Bedingungen gefunden werden, die 2D-Kristalle von einer Güte hervorbrachten, die unter Cryo-Bedingungen zur Datensammlung verwendet werden konnten.

DCCD-Markierung von 2D-Kristallen

Wurden Kristallisationsansätze mit schon vorhandene 2D-Kristallen vom Typ p1 (Abb. 30a) mit DCCD versetzt und mehrere Stunden oder sogar Tage inkubiert, so konnte bei negativkontrastierten Proben das alte quasi-hexagonale Kristallgitter im EM noch gut erkannt werden. Mit bloßem Auge unterschied sich das Aussehen der Proben nicht von dem vor der DCCD-Behandlung. An der optischen Bank war aber zu beobachten, dass nur die Beugungsreflexe der ersten Ordnung (etwa 100 Å Auflösung) erschienen und selbst diese meistens sehr verschmiert und über keinen weiten Bereich konstant waren (Abb. 31).

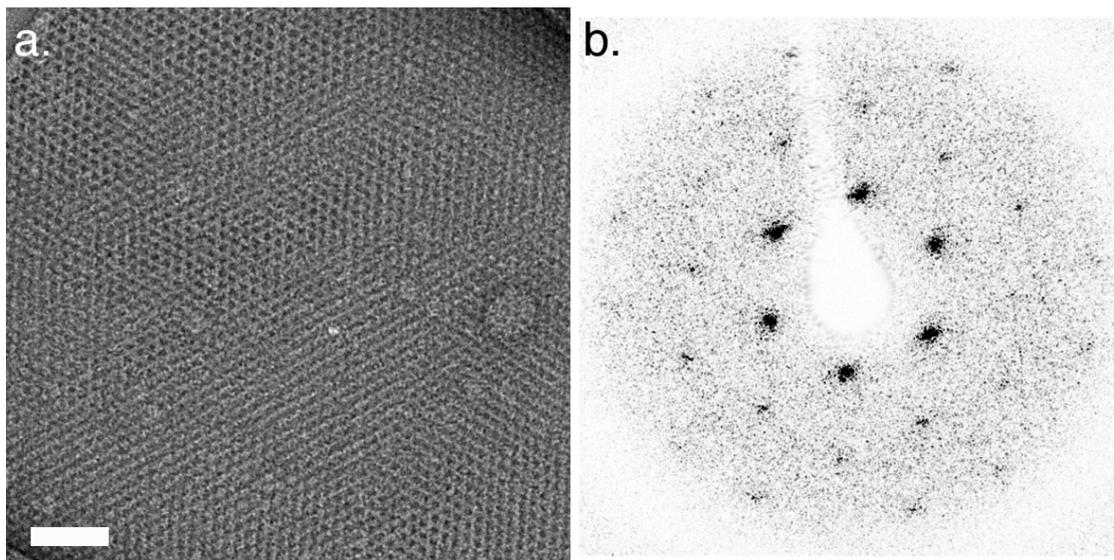


Abb. 31 a. Markierter 2D-Kristall in Negativkontrast (Maßstab 50 nm). **b.** Beugungsmuster an der optischen Bank. Die erste Ordnung von Reflexen ist sehr verschmiert und die nächsten beiden Ordnungen sehr schwach ausgeprägt (Vergleiche mit Abb. 30a).

Unter Cryo-Bedingungen gelang es nicht Bilder von Kristallen mit der gewünschten $p1$ -Symmetrie aufzunehmen. Dafür stellte sich an der optischen Bank heraus, dass sich einige Vesikel in 2D-Kristalle mit rechtwinkeligem Gitter umgewandelt hatten, die auch schon bei den Versuchen mit markiertem und nicht-markiertem Protein aufgetreten waren (siehe Abb. 30b). Diesmal war die Ordnung und die Größe der kristallinen Bereiche aber höher bzw. größer, so dass Daten bis $5,5 \text{ \AA}$ gewonnen werden konnten. Leider unterschieden sich die Einheitszellen zu sehr, um die Daten von mehreren Kristallen zu vereinigen.

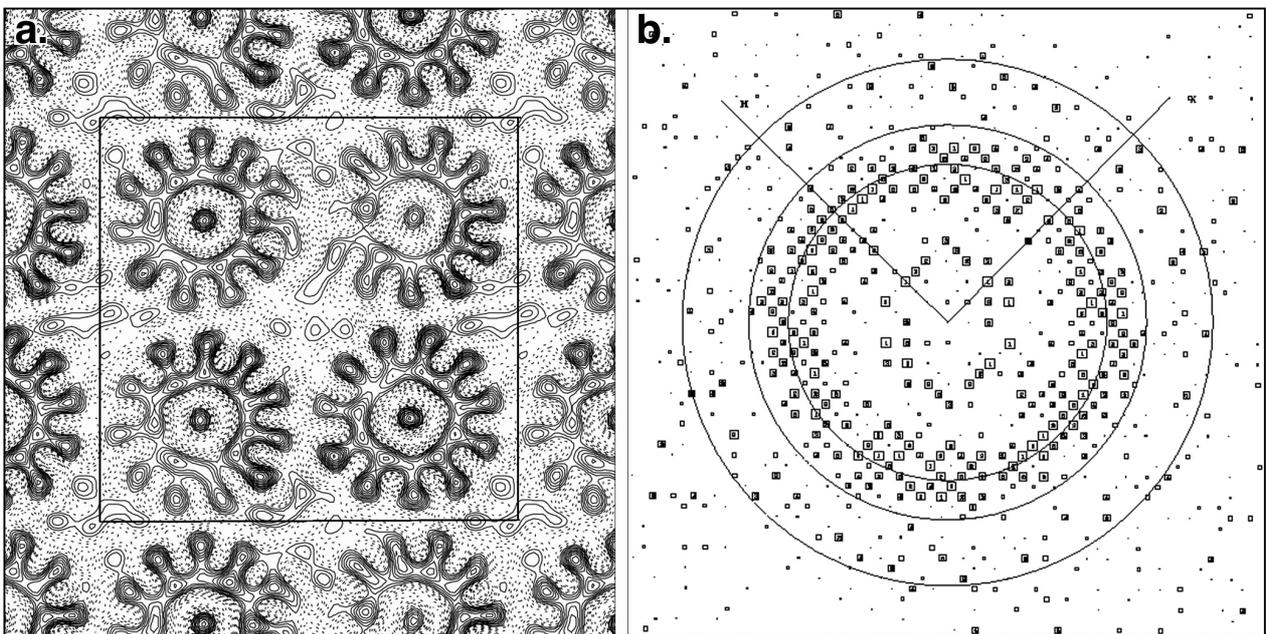


Abb. 32 a. Projektionsdichtekarte des DCCD-markierten c-Rings berechnet von einem Bild bis 8 \AA ohne Symmetrie. Die eingezeichnete Einheitszelle ($107,6 \times 110,5 \text{ \AA}$) enthält vier Moleküle, von denen je zwei in entgegengesetzte Richtungen schauen. **b.** IQ-Plot des selben Kristalls. Die konzentrischen Ringe markieren von innen nach außen eine Auflösung von $10, 8, \text{ und } 6 \text{ \AA}$.

Wie die 2D-Projektionsdichtekarte eines 2D-Kristalls (Abb. 32a) zeigt, weist der Kristall eine Einheitszelle mit den Maßen $107,6 \times 110,5 \text{ \AA}$ und einem Winkel von 90° mit wahrscheinlich $p12_1$ -Symmetrie auf. Sie enthält vier Moleküle, von denen die Hälfte nach oben bzw. unten gerichtet ist. Jeder c-Ring kontaktiert vier benachbarte c-Ringe (im Gegensatz zu nur drei Nachbarn im $p1$ -Kristall), wodurch es zu einer dichteren Packung im Kristallgitter kommt. Eine Hälfte der c-Ringe zeichnet sich durch eine sehr gleichmäßige Form aus, während die andere Hälfte Bereiche mit schwächerer Dichte aufweist. Insgesamt ähnelt das Aussehen den nicht-markierten c-Ringen (Abb. 35).

Die Hoffnung, dass nach noch längerer Inkubation (freies DCCD wurde nicht entfernt) und Lagerung die Kristalle sich weiter umordnen und die Ordnung sich verbessern würden, wurden nicht bestätigt.

Da sich die Einheitszelle komplett geändert hatte, war es nicht möglich eine Differenzdichtekarte zu berechnen.

4.5. Strukturlösung der oligomeren c-Untereinheit

4.5.1. Elektronenmikroskopie

Vorbereitung der 2D-Kristalle

Die 2D-Kristallisationsansätze wurden nach dem Ernten vorsichtig abzentrifugiert und in einem frischen Puffer (ohne NaCl) resuspendiert. Hierdurch konnten wirkungsvoll und einfach kleine Lipidvesikel abgetrennt werden und die Probe aufkonzentriert werden. Dies verbesserte besonders die Negativkontrastierung (Vergleiche Abb. 29a mit b/c). Negative Einflüsse durch Scherkräfte oder eine Aggregation der 2D-Kristalle konnten nicht beobachtet werden. Gleichzeitig wurde frisches NaN_3 hinzugefügt, so dass die Kristalle länger vor Bakterienbefall geschützt werden konnten.

Mikroskopie

Cryo-Netzchen wurden routinemäßig nach der „back injection“-Methode mit 5% (w/v) Trehalose als Einbettungsmedium hergestellt und lieferten reproduzierbar gute Ergebnisse. Die meisten ungekippten und alle gekippten Bilder, die verarbeitet wurden und in die 3D-Struktur einfließen, wurden am JEOL 3000 SFF mit Hilfe des Spot-Scan-Verfahrens aufgenommen. Einige wenige ungekippte entstanden am Philips CM120 bzw. Tecnai F20.

Die besten Spot-Scan-Ergebnisse konnten mit einer Aufteilung in 26x32 Kreissegmenten, die einen Durchmesser von 50 nm auf der Probe hatten, und einer Dosis von etwa 30 Elektronen / Å^2 erzielt werden. Das Spot-Scan-Verfahren war ganz besonders bei gekippten Kristallen notwendig, um eine gute Ausbeute zu erreichen.

Begünstigt durch den hohen Anteil an Kristallen und die einfache Identifikation der Kristalle an Hand der Morphologie war grundsätzlich im ungekippten Zustand die Erfolgsquote nahe 100%, sprich alle Negative zeigten ein Beugungsmuster an der optischen Bank. Trotzdem wurden immer nur die besten Bilder (scharfe Reflexe und eine hohe Auflösung) digitalisiert und weiterverarbeitet.

20°-Bilder konnten ebenfalls innerhalb von wenigen Tagen aufgenommen werden und zeigten eine ähnliche Erfolgsquote wie die ungekippten.

Die Ausbeute und Qualität der 30°-Bilder war schon sehr viel variabler. An sehr guten Tagen zeigten über 50% der Negative Beugungsmuster an der optischen Bank. Aus einer Kameraladung von 50 Bildern konnten oft zehn digitalisiert und erfolgreich prozessiert werden.

Die Bilder mit dem höchsten Kippwinkel von 45° zeigten erwartungsgemäß die niedrigste Erfolgsquote. Durch den hohen Kippwinkel der Probe im EM benötigte auch die Mikroskopie sehr viel mehr Zeit, da sich zum Beispiel der Fokus über eine kurze Strecke stärker veränderte.

Insgesamt wurden 164 Bilder digitalisiert und ausgewertet, davon 63 0°-, 22 20°-, 55 30°- und 24 45°-gekippte Bilder. Es kann davon ausgegangen werden, dass mindestens die zehnfache Menge an Bildern mit der Hilfe von Janet Vonck und Deryck Mills aufgenommen wurde.

4.5.2. Bildverarbeitung einzelner 2D-Kristalle

Ungekippte wie gekippte Kristalle wurden gleich verarbeitet. Nachdem an der optischen Bank der beste Bereich des Negatives markiert wurden, wurde dieser abhängig von seiner Größe als 6000 x 6000 oder 4000 x 4000 Pixel großes Bild eingescannt.

Indizierung

Auf den ersten Blick hatte es den Anschein, als ob die Kristalle eine hexagonale Packung besäßen. Der Winkel zwischen den Achsen wich mit 114,8° aber deutlich von den 120° eines hexagonalen Gitters ab, so dass nur noch $p1$ - und $p2$ -Symmetrie möglich waren (ein rechtwinkeliges Gitter kam überhaupt nicht in Frage). Die $p2$ -Symmetrie schied auch aus, obwohl sie bis zu einer Auflösung von 15 Å möglich gewesen wäre. Bis zu dieser Auflösung erschienen die c-Ringe als Ringe ohne die Untereinheiten erkennen zu lassen. (Tab. 1, Abb. 33). Da es sich aber um 11 Untereinheiten handelte und die Kristallkontakte durch Ineinandergreifen zu Stande kamen, war zwischen den beiden Ringe keine zweizählige Achse möglich. So weit bekannt, stellt dies die erste 3D-Struktur von 2D-Kristallen mit $p1$ -Symmetrie dar.

Sym.	5 Å		10 Å		15 Å		20 Å	
	PF (°)	Refl.						
<i>p1</i>	16.8	402	14.7	146	16.3	48	14.5	40
<i>p2</i>	69.5	201	60.8	73	24.2	24	23.3	20
<i>p4</i>	71.8	385	64.7	125	34.6	48	19.8	36
<i>p3</i>	74.2	258	56.4	96	9.4	30	8.3	28
<i>p6</i>	75.1	717	58.5	265	15.3	84	14.1	76

Tab. 1 Symmetriearauswertung. Um so dunkler die Schattierung, um so niedriger der mittlere Phasenfehler (PF) und damit um so besser die Übereinstimmung mit der theoretischen Vorhersage. Ein Phasenfehler von 90° würde einer zufälligen Verteilung entsprechen. Mit steigender Auflösung nimmt die Anzahl der zum Vergleich herangezogenen Reflexe (Refl.) zu. Symmetriegruppen mit einem 90° oder 120°-Winkel (*p4*, *p3*, *p6*) sind nur beispielhaft aufgenommen worden.

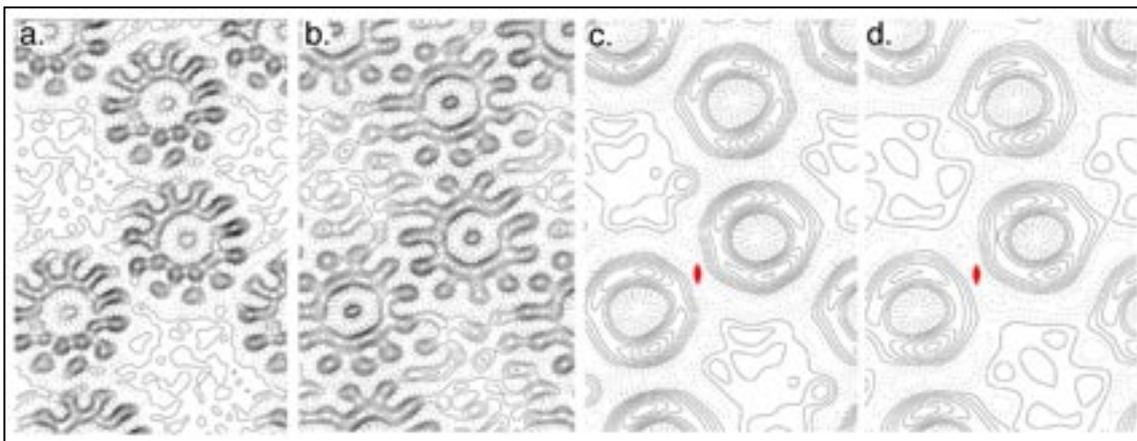


Abb. 33 2D-Projektionsdichtekarten von einem 2D-Kristall mit fallender Auflösung: 5 (a.), 10 (b.), 15 (c.), 20 Å (d.). Eine mögliche zweizählige Achsen ist in c. und d. rot eingezeichnet

Wie unter Methoden (siehe Abb. 16) schon ausführlich besprochen, gab es drei Achsen und damit sechs Möglichkeiten das Kristallgitter in *p1* zu indizieren. Während der Indizierung der ungekippten 2D-Kristallgitters wurde darauf geachtet, dass immer die beiden kürzeren Achsen (89,7 und 91,7 Å) und in dieser Reihenfolge als a und b verwendet wurden. Bei gekippten Kristallen war eine einheitliche Zuordnung der Achsen nicht möglich, da die Dimensionen der Achsen durch das Kippen verzerrt waren, daher wurde zum Teile eine Re-Indizierung zu einem späteren Zeitpunkt notwendig.

Bildverarbeitung

Die Bildverarbeitung wurde schon detailliert in Material und Methoden beschrieben (siehe S. 47). Von ungekippten Kristallen konnten Daten bis nahe an die 4 Å Auflösung gewonnen werden (Abb. 34a). Die Qualität der 20°-Bilder war ähnlich gut und lieferte isotrope Daten bis etwa 6 Å (Abb. 34b). Die Auswertung der um 30° bzw. 45°-gekippten

Kristalle ließ deutlich den Effekt der Kippachse erkennen. Während entlang der Kippachsen Daten über 8 Å vorhanden waren, verloren sie sich senkrecht zu ihr schon bei 10 Å (Abb. 34c, d).

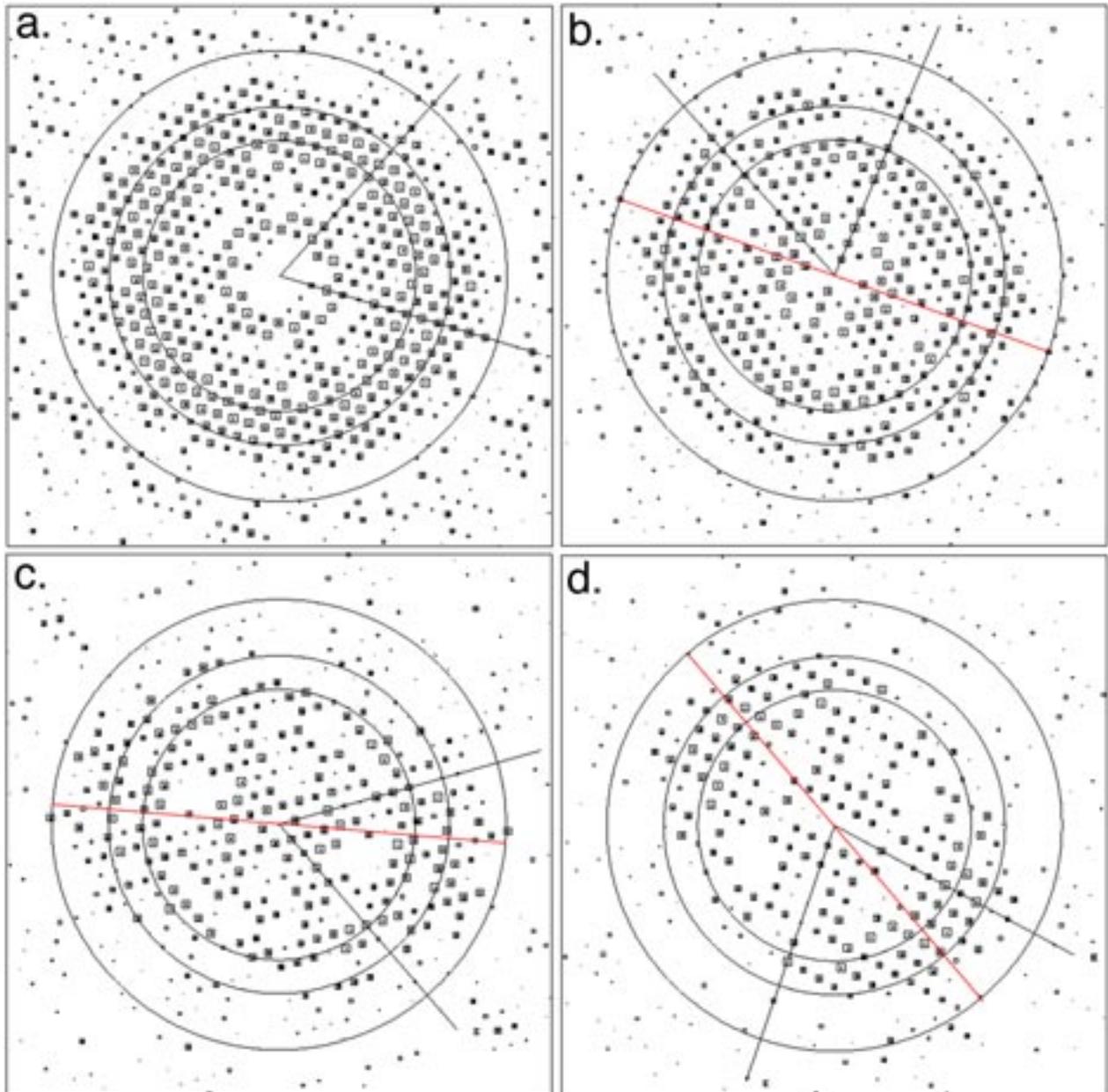


Abb. 34 Darstellung der Reflexe (IQ-Plot) für Bilder mit unterschiedlichen Kippwinkeln: **a.** 0°, **b.** 20°, **c.** 30° und **d.** 45°. Die konzentrischen Ringe markieren von innen nach außen eine Auflösung von 10, 8 und 6 Å. In den Bildern von gekippten Kristallen ist die Lage der Kippachse rot eingezeichnet.

Am Ende konnte aus den Strukturfaktoren in Form von Amplituden und Phasen eine 2D-Projektionsdichtekarte berechnet werden.

Beschreibung der 2D-Projektionsdichtekarte

Die Beschreibung der 2D-Projektionsdichtekarte soll im folgenden nur wenig Raum einnehmen, da viel Eigenschaft bei der Vorstellung der 3D-Dichtekarte (S. 89) im Detail besprochen werden.

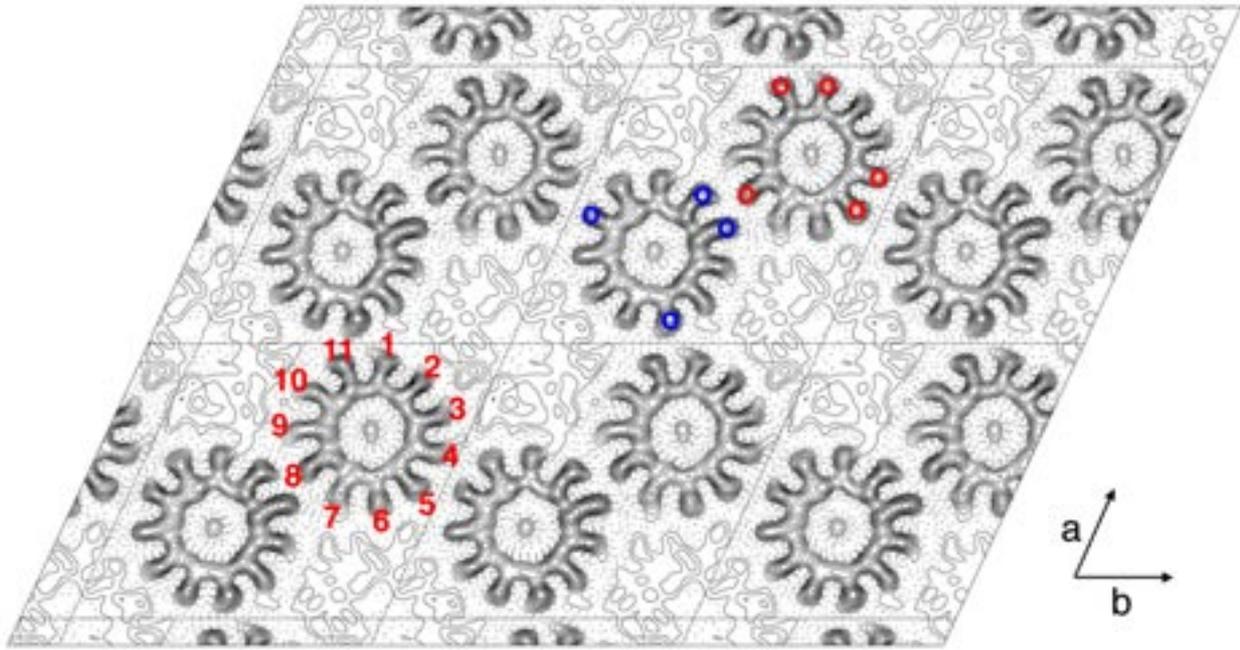


Abb. 35 2D-Projektionsdichtekarte berechnet von einem 2D-Kristall. Dargestellt sind mehrere Einheitszellen ($a = 89,7 \text{ \AA}$, $b = 91,7 \text{ \AA}$) bei einer Auflösung von 5 \AA . **Links unten:** Die 11 Untereinheiten sind im Uhrzeigersinn durchnummeriert. **Rechts oben:** Jeweils ein c-Ring in der Einheitszelle besitzt fünf Helices (rot markiert), die in Kontakt mit seinen Nachbarn stehen, während der andere nur vier (blau markiert) besitzt. Die Kristallkontakte sind immer die selben.

Die 2D-Projektionsdichtekarte (Abb. 35), berechnet von einem 2D-Kristall bis 5 \AA , zeigt zwei c-Ringe in jeder asymmetrischen Einheitszelle. Durch das Fehlen großer extrinsischer Schleifen sieht man direkt auf die tm Helices, die sich daher leicht und klar identifizieren lassen. Jeder Ring besteht aus 11 Untereinheiten mit zwei tm Helices, die einen inneren und äußeren Ring bilden. Der äußere Ring ist gegen den inneren verdreht, so dass eine äußere Helix in Kontakt mit zwei inneren und umgekehrt steht. Der Außendurchmesser beträgt rund 50 \AA und die zentrale Öffnung etwa 17 \AA .

Der Zusammenhalt der 2D-Kristalle kommt durch den immer gleichen Kontakt von drei äußeren tm Helices zu Stande, wobei zwei Helices des einen Ringes eine Helix des anderen Ringes in die Mitte nehmen. Jeweils einer der beiden c-Ringe in der Einheitszelle besitzt fünf Helices, die in Kontakt mit seinen Nachbarn stehen, während der

andere nur vier besitzt (blaue und rote Markierungen in Abb. 35). Zusammen mit der ungeraden Anzahl an c-Untereinheiten pro Oligomer wird so jede mögliche Symmetrie gebrochen.

4.5.3. Erstellung und Symmetrisierung der 3D-Dichtekarte

Die 13 besten Bilder von ungekippten Kristallen wurden vereinigt. Mit Hilfe von sechs 20°-Bildern konnten die Daten von 26 30°-Bildern hinzugefügt werden. Weitere 13 45°-Bilder komplettierten den 3D-Datensatz, der insgesamt 58 Bilder enthielt (Tab. 2). Abschließend wurde die Kippgeometrie der einzelnen Bilder noch verfeinert, so dass sich ein mittlerer Phasenfehler von 19.5° berechnete. Der Datensatz enthielt 15.242 gemittelte Amplituden und Phasen bzw. 5.243 unabhängige Strukturaktoren mit einer Auflösung von 4 Å in der Membranebene und etwa 15 Å senkrecht dazu.

Bild	Kippwinkel	Phasen- fehler	Datum	EM	Strahl	Ansatz
0079	0.000	13.55	23.10.2000	Tecnai	FB	C3-9
4170	0.000	15.18	14.02.2001	Jeol	SS 26x32	C21-5
0268	-0.258	11.35	27.07.2000	Jeol	FB	gamma
4168	0.283	12.22	14.02.2001	Jeol	SS 26x32	C21-5
0578	0.346	11.00	13.11.2000	CM120	FB	C14-5
0648	-0.479	12.18	04.10.2000	CM120	FB	C3-9
4949	0.835	9.55	27.03.2001	Jeol	SS 26x32	C32-4
0074	1.328	16.04	23.10.2000	Tecnai	FB	C3-9
0571	1.355	10.31	13.11.2000	CM120	FB	C14-5
1297	1.373	17.03	06.10.2000	Jeol	SS 7x9	C3-9
0267	-1.438	12.85	27.07.2000	Jeol	FB	gamma
1295	1.447	14.65	06.10.2000	Jeol	SS 7x9	C3-9
2246	1.482	9.85	28.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
3118	15.571	13.96	04.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3110	-17.170	18.71	04.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3070	18.838	15.28	04.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3131	-19.306	15.28	04.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3058	19.635	11.19	04.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3081	21.954	18.38	04.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
1716	24.390	18.57	27.10.2000	Jeol	SS 13x16	C3-9
1768	-24.909	16.68	02.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2737	-26.896	15.27	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2731	27.120	15.06	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2738	-27.432	11.45	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
1782	29.008	11.29	02.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2746	29.684	14.16	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2740	-30.000	13.75	28.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9

2739	30.100	13.10	28.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2260	30.341	11.55	28.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2000	-30.561	16.29	17.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
1915	-31.014	15.81	09.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2720	31.154	12.49	28.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2002	31.381	15.05	17.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2722	31.553	24.92	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2005	31.662	11.54	17.11.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2630	31.736	22.15	06.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2718	31.740	14.88	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2735	31.882	16.80	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2723	-31.980	14.43	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
12739	32.292	12.15	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2717	-32.670	14.12	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2752	32.726	12.85	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2639	33.846	15.11	06.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2627	33.851	11.78	06.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
2727	34.782	18.38	12.12.2000	Jeol	SS 26x32	C3-9
3491	40.640	14.56	18.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3504	-41.259	15.48	18.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3942	41.840	19.10	06.02.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3941	41.990	15.70	06.02.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3498	-42.200	19.02	18.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3492	42.660	14.53	18.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
4127	43.480	17.28	13.02.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3507	-43.630	15.72	18.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3515	44.070	11.15	18.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
13491	45.270	18.49	18.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
4435	45.430	15.65	06.03.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3550	45.880	18.28	23.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9
3575	-48.800	22.19	23.01.2001	Jeol	SS 26x32	C3-9

Tab. 2 Übersicht über die 58 Bilder, die zur Erstellung der 3D-Dichtekarte verwendet wurden. Sie sind nach aufsteigendem Kippwinkel sortiert und unterteilt in 0°, 20°, 30°- und 45°-gekippte Bilder. Neben der Nummer (Name) des Bildes ist der Kippwinkel mit Vorzeichen, der Phasenfehler, das Datum der Bildaufnahme, das EM, sowie das Aufnahmeverfahren (FB = ohne Spot-Scan (Flood beam), SS = Spot-Scan mit Angabe der Aufteilung) und die Bezeichnung des 2D-Kristallisationsansatzes aufgelistet.

Symmetrisierung

Die intrinsische Symmetrie des c-Rings, der aus 11 gleichen Untereinheiten bestand, machte es von Anfang an erstrebenswert diese für eine Mittelung auszunutzen. Wie in Abb. 36 deutlich zu sehen ist, führt die Symmetrisierung der 3D-Dichtekarte zu einem geringeren Hintergrund und besseren Definition der Konturen. Besonders die Durchgängigkeit der äußeren Helices konnte optimiert werden.

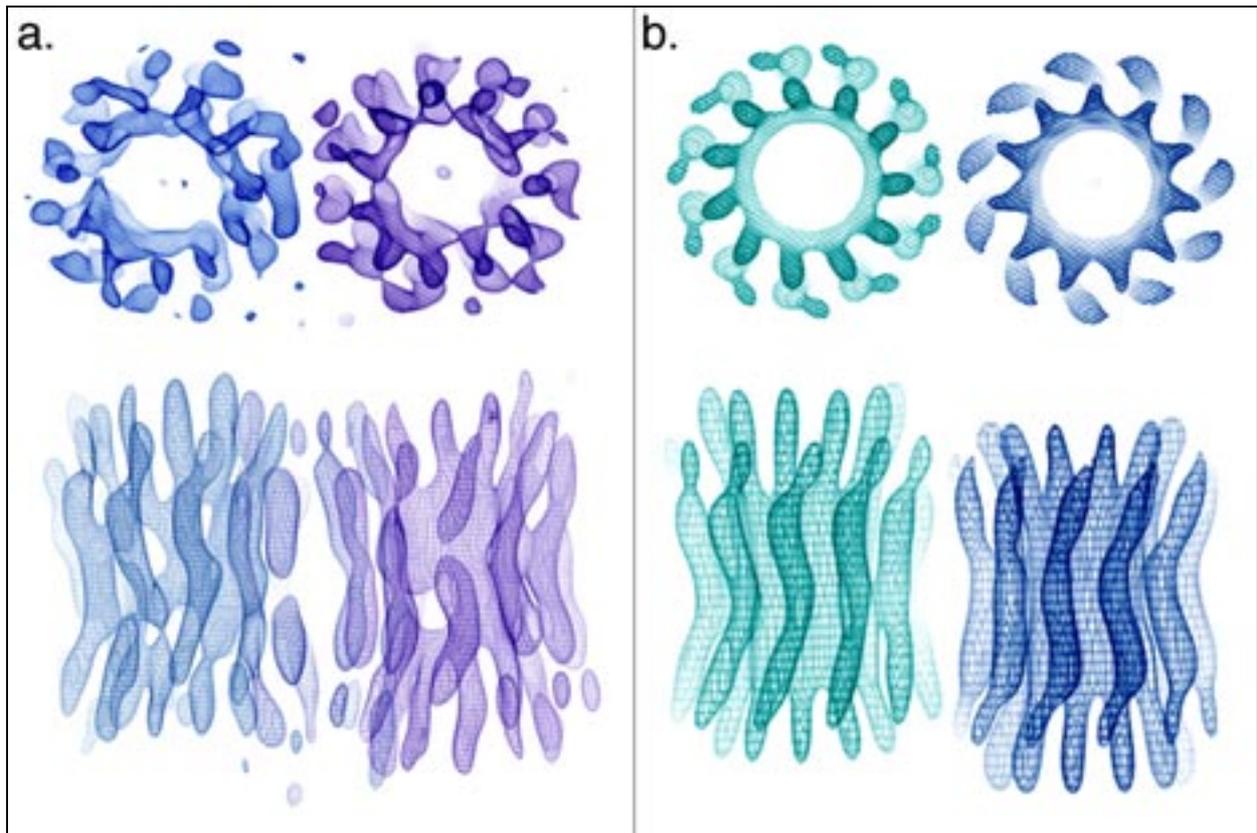


Abb. 36 Symmetrisierung der 3D-Dichtekarte. **a.** Aufsicht und Seitenansicht der nicht-symmetrisierten Karte. Die äußeren Helices weisen Brüche auf, während die inneren Helices zwar durchgängig sind, aber dafür in der Mitte miteinander verschmelzen. **b.** Aufsicht und Seitenansicht der symmetrisierten Karte. Die äußere Helix verläuft kontinuierlich, wobei sie den in a. erkennbaren Verlauf beibehält.

Auch die Dichten der beiden c-Ringe hätten gemittelt werden können. Nach der Inspektion der beiden symmetrisierten Dichten ließen sich aber keine nennenswerte Unterschiede feststellen, so dass kein großer Gewinn einer weiteren Mittelung zu erwarten war. Die große Ähnlichkeit diente als Beweis, dass die elffache Symmetrisierung nicht zur Bildung von Artefakten führte. Somit diente der Vergleich als unabhängiger Qualitätsstandard.

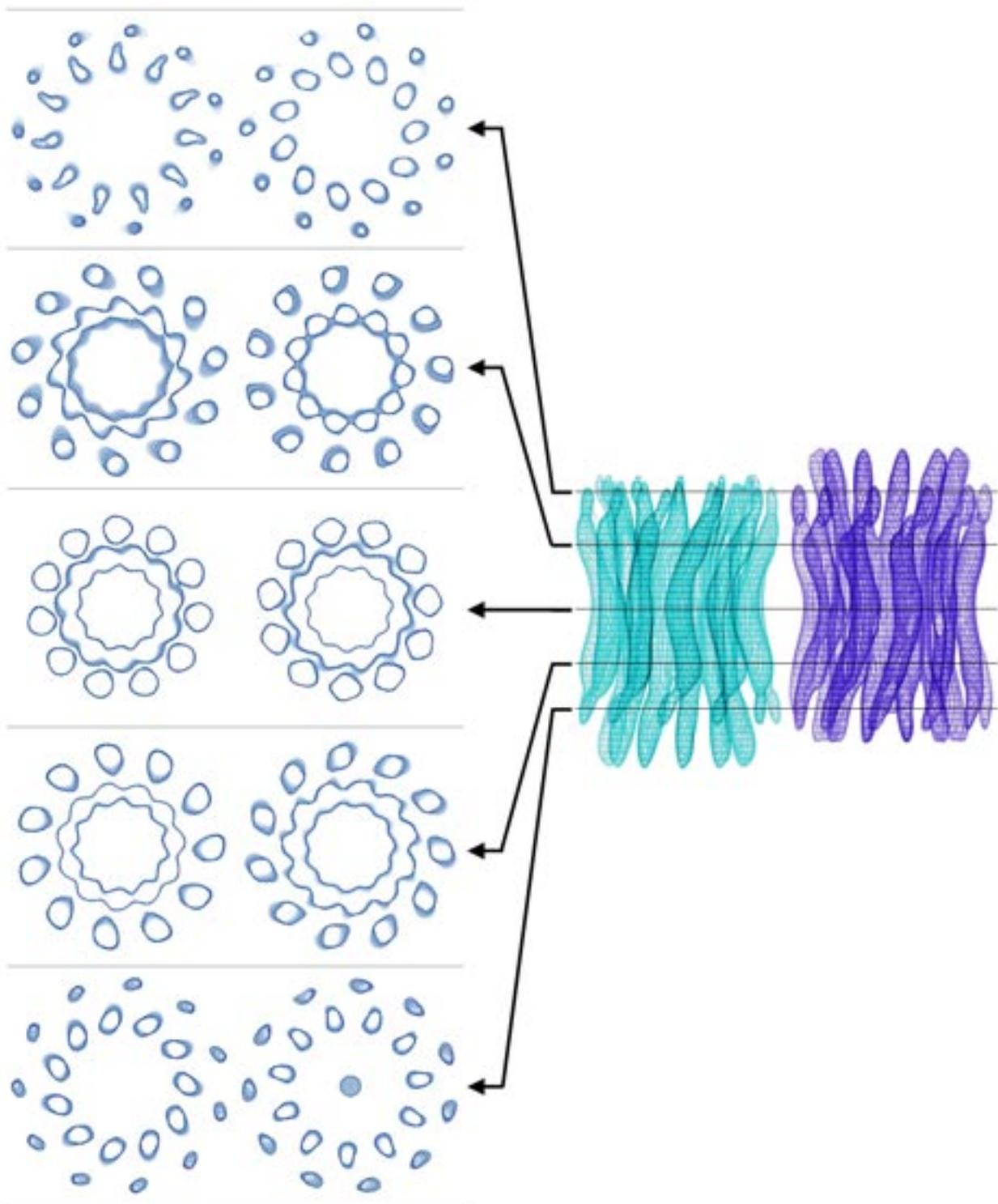


Abb. 37 Symmetrisierte 3D-Dichtekarte. Links: Schnitte an den angegebenen Positionen der Seitenansicht. Rechts: Seitenansicht.

4.5.4. Beschreibung der 3D-Dichtekarte

Die symmetrisierte Dichtekarte (Abb. 37) mit einer Auflösung von 4 Å in x,y- und etwa 15 Å in z-Richtung zeigt zwei c-Ringe aus jeweils 11 inneren und äußeren tm α -Helices, die in entgegengesetzte Richtungen in der Lipidmembran angeordnet sind. Ihre grobe Zylinderform hat einen äußeren Durchmesser von 45 Å in der Mitte der Membran und 50 Å an den beiden Enden. Jeder c-Ring hat eine Höhe von 70 Å, wobei die eine Seite des c-Rings 10 Å über die der anderen hinausragt, wie es auch schon in AFM-Topographien beobachtet werden konnte (Stahlberg et al. 2001). Im Inneren des Zylinders befindet sich ein durchgehender Hohlraum von 17 Å Durchmesser, der sich zu beiden Enden hin etwas erweitert.

Äußere Helices

Die äußeren tm Helices (C-Terminus) haben einen komplexen Verlauf in Form eines S. Nach der Schleife verläuft die Helix auf der cytoplasmatischen Seite in einem Winkel von 25° zur Membrannormalen in die Membran hinein. Etwa in der Mitte der Membran (in der Nähe von Glu65) macht sie einen 30°-Knick, wobei sie dem inneren Ring am nächsten kommt und anschließend in der Grube zwischen zwei inneren tm Helices entlang läuft, sich aber wieder vom inneren Ring entfernt. Beim Erreichen der periplasmatischen Membranoberfläche führt sie eine letzte Richtungsänderung in der Nähe von Pro83 durch. Nach diesem 45°-Knick endet sie in einem dünneren Appendix, der möglicherweise nicht mehr helikal ist.

Loops

Bei der gegebenen Auflösung sind extramembrane Proteinbereiche, wie zum Beispiel Schleifen zwischen tm Helices, nur selten aufzulösen. Senkt man bei der symmetrisierten 3D-Dichtekarte aber den Konturlevel ab, so werden Dichten sichtbar, die die äußere und innere Helix verbinden (Abb. 38a). Dies wird durch die Kürze der verbindenden Loops begünstigt und läßt auf eine gute Ordnung derselben schließen. Damit ist nun auch eine Zuordnung der periplasmatischen Seite, wo auch C- und N-Terminus der einzelnen c-Untereinheiten liegen, als weiter aus der Membranebene herausstehendes Ende möglich.

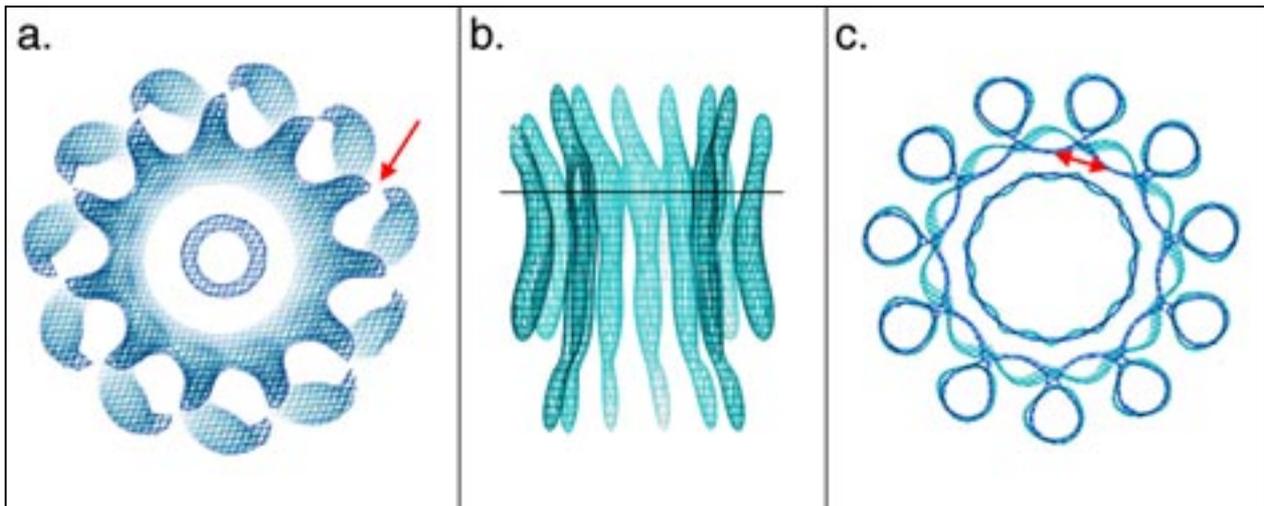


Abb. 38 Details der symmetrisierten 3D-Dichtkarte. **a.** Bei einem niedrigeren Konturlevel beginnen sich die inneren und äußeren Helices über einen kurzen Loop zu berühren (Pfeil). **b.** Blick auf die Packung der inneren Helices durch Wegschneiden der vorderen Hälfte. **c.** Schnitt, an der in **b.** gekennzeichneten Stelle durch die 3D-Dichtkarte bei einer Auflösung von 8 Å (hellblau) und 6 bzw. 4 Å (cyan). Der durch den Doppelpfeil markierte Abstand zwischen den Zentren der inneren Helices beträgt nur 6,5 Å.

Innere Helices

Auf der anderen Seite erwartet man ab einer Auflösung von 8-9 Å in der Membranebene, dass alle t_m Helices - besonders wenn sie relativ senkrecht verlaufen - klar voneinander getrennt sind. Statt dessen bildet der innere Ring aus elf t_m Helices bei einer Auflösung von 8 Å in der Mitte der Membran einen kontinuierlichen Zylinder, der erst bei der Hinzufügung von Daten bis 6 Å (ungekippt bis 4 Å) sich in einzelne Helices aufgliedert (Abb. 38b, c). Die Ursache liegt in der sehr dichten Helixpackung mit einem Zentrum-zu-Zentrum-Abstand von nur 6,5 Å (normalerweise beobachtet man einen Abstand von mindestens 8 Å).

Auf beiden Seiten biegen sich die inneren t_m Helices etwas nach Außen und überragen auf periplasmatischer Seite (N-Terminus) den äußeren Ring deutlich. Vertikal verlaufen sie ansonsten relativ gerade mit einer leichten Neigung nach links vom Zentrum aus gesehen (Abb. 38b).

5. Diskussion

5.1. Photosystem II aus Spinat

Die Lösung der Röntgenkristallstruktur des aktiven PSII-Dimers aus *Synechococcus elongatus* (Zouni et al. 2001) im Sommer 2000 führte zum unverhofften Abbruch des Projekts. Daher sind besonders eine Reihe von biochemischen Charakterisierungen unvollständig geblieben. Trotzdem konnten einige interessante Beobachtungen gemacht werden, die diskutiert werden sollen.

5.1.1. Ausgangsmaterial und Aufreinigung von PSII

Von der Aufreinigung über die 2D-Kristallisation bis zur Aufnahme und Verarbeitung der Bilder lagen alle Schritte in einer Hand. Zusätzlich wurde eine konstante und kontinuierliche Quelle an Spinat benutzt, so dass eine größt mögliche Kontrolle bzw. Konstanz der Bedingungen gegeben war.

Die Ausbeuten an PSII und der zeitliche Ablauf waren bei jeder standardmäßigen Aufreinigung nahezu identisch. Dabei sei hier erwähnt, dass das Aufkonzentrieren unter Verwendung der Centriprep-Ultrafiltrationseinheiten mit fünf Stunden etwa genauso lange wie die vorausgegangene Aufreinigung dauerte und damit der zeitlich längste Einzelschritt war.

Trotz einiger Versuche zur Optimierung des Aufreinigungsprotokolls wurde im Hinblick auf die 2D-Kristallisationsergebnisse dieses unverändert gelassen. Die genauere Bestimmung der Chlorophyllkonzentration während der zweiten Solubilisierung mit HTG stellte zwar ein weitere Verbesserung des Aufreinigungsprotokolls dar, konnte sich aber nicht in einer höheren Reproduzierbarkeit oder besseren Qualität der 2D-Kristalle manifestieren.

5.1.2. 2D-Kristallisation des CP47-RC-Komplexes

Reproduzierbarkeit und Optimierung

Die meisten Aufreinigungen von PSII lieferten 2D-Kristalle des Subkomplexes CP47-RC; wenn auch zum Teil nur nach langwierigen Optimierungsbemühungen und von schlechter Qualität.

Erstaunlich war die Konstanz des Erscheinungsbildes der 2D-Kristallisationsansätze einer Charge, obwohl die einzelnen Kristallisationsparameter über einen weiten Bereich variiert wurden. Dies bedeutete, dass wenn im ersten Screen mit verschiedenen Detergenzkonzentrationen die Vesikel einen bestimmten Durchmesser oder die Kristalle ein gewisse Morphologie aufwiesen, diese nur noch schwer zu ändern war.

Drei weitere Beobachtungen komplizierten die Optimierung der 2D-Kristalle:

1. Einmal gefundene Effekte von Kristallisationsparametern ließen sich oft nicht von Charge zu Charge übertragen. Dies erwies sich als besonders störend, da im Vergleich zur 3D-Kristallisation weniger Kristallisationsbedingungen ausprobiert werden können, so dass man prinzipiell mehr darauf angewiesen ist, auf den Ergebnissen der vorhergehenden Experimente aufzubauen.
2. Es war nur selten möglich, den Ausgang eines Kristallisationsexperimentes vorherzusagen bzw. den Einfluß eines Parameters auf die 2D-Kristallisation richtig einzuschätzen. Die einzige Ausnahme hiervon bildete die Induktion von dünnen 3D-Kristallen (gestapelte 2D-Kristalle) durch Zinkacetat.
3. Hinzu kamen beträchtliche Schwierigkeiten bei der Reproduktion eines sehr guten Ansatzes. Obwohl die gleiche Charge, der selbe Dialysepuffer und die identischen Bedingungen gewählt wurden, konnte sich der Anteil an großen, tubulären, gut geordneten 2D-Kristallen ändern.

Es spricht vieles dafür, dass das Ausgangsmaterial an PSII für den Erfolg der 2D-Kristallisation entscheidend war. Es konnte nicht herausgefunden werden, welche Eigenschaften des Ausgangsmaterials für eine erfolgreiche Kristallisation ausschlaggebend waren. Trotzdem können noch zwei weitere Gründe für die fehlende Reproduzierbarkeit angeführt werden: Zum einen lag ein sehr komplexes Gemisch während der 2D-Kristallisation vor, zum anderen kam erschwerend hinzu, dass ausgehend vom gesamten PSII-Komplex nur ein Subkomplex kristallisiert wurde.

Komplexität des Gemisches

Die Komplexität des Gemisches war bedingt durch die Variabilität der Konzentration, Verteilung und Zusammensetzung des Proteins, Lipids und Detergenz. Alle drei interagierten miteinander und waren in verschiedenen Mischformen vorhanden.

So lagen in der Dialysekammer kleinere Verunreinigungen an LHC-II und solubilisiertes PSII in verschiedenen Formen vor, zum größten Teil aber ein kompletter und aktiver PSII-Komplex mit den extrinsischen Untereinheiten. Dies belegten die gute Werte der Sauerstoffentwicklung. Außerdem befand sich solubilisiertes Lipid und Detergenzmizellen im Ansatz, sowie am Protein gebundene Lipidmoleküle.

Alle Faktoren waren kritisch für den Erfolg der 2D-Kristallisation, aber schwer genau zu bestimmen. Dies traf im Besonderen für das Lipid (Konzentration und Zusammensetzung) und teilweise für die Detergenzkonzentration zu. Bei der Rekonstitution kam nur das intrinsische Lipid zum Einsatz, das mit dem PSII-Komplex aufgereinigt wurde. Dass einige Lipidmoleküle sehr stark und wahrscheinlich spezifisch gebunden waren, demonstrierte der Nachweis von Lipiden, die am Protein gebunden von der SMART-Säule eluierten. Dies verwundert nicht, seitdem bekannt ist, dass in LHC-II ein Lipidmolekül für die Trimerisierung verantwortlich ist (Hobe et al. 1994) und in verschiedenen Membranproteinstrukturen hydrophobe Acylreste von Lipiden gefittet werden konnten (Bacteriorhodopsin (Essen et al. 1998, Luecke et al. 1999), Cytochrom bc_1 (Lange et al. 2001)).

Des Weiteren konnte sich die freie Detergenzkonzentration erheblich von der theoretischen Detergenzkonzentration nach der Solubilisierung unterscheiden, da ein Teil an PSII und Lipide gebunden war. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass durch die Verdünnung nach der zweiten Solubilisierung die HTG-Konzentration auf 0,9% (30 mM) gesenkt wurde. Dieser Wert entsprach der CMC des Detergenz und erleichterte das Ausfällen von LHC-II.

Auch auf Seiten des Proteins konnte keine absolute Homogenität garantiert werden, wie die Ergebnisse der Gelfiltration aufdeckten. Obwohl eine höhere Reinheit des PSII-Komplexes wünschenswert war, konnte schon in der Diplomarbeit beobachtet werden, dass eine Verunreinigung mit LHC-II der 2D-Kristallisation nicht schadete, sondern das Vorkommen von guten 2D-Kristallen vielfach begünstigte.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich mittels Massenspektrometrie die post-translationalen Modifikationen, wie Palmylierung, Phosphorylierung und Oxidation, von PSII nachweisen lassen (Gomez et al. 2001). Es wäre interessant gewesen, festzustellen, wie homogen das gereinigte PSII war und welchen Einfluß die aufgeführten Modifikationen auf das Kristallisationsverhalten hatten. Zudem wären weitere Untersuchungen über die Stabilität des PSII-Komplexes in Abhängigkeit vom Detergenz sicherlich informativ gewesen.

Kristallisation des monomeren Subkomplexes

PSII aus Spinat ist ein dimerer Komplex aus 25 Genprodukten, die meisten davon integrale Membranproteine mit vielen Kofaktoren (Barber et al. 1997). Dieser Komplex verliert leicht die extrinsischen Untereinheiten und den Mangancluster und ist überdies durch seine Pigmente lichtempfindlich. All dies verdeutlicht, dass es sich um keinen einfachen Kandidaten für die 2D-Kristallisation handelt.

Erschwerend kommt hinzu, dass der PSII-Komplex unter den gewählten Bedingungen nicht in seiner Gesamtheit kristallisierte, sondern ein Subkomplex (CP47-RC) mit etwa der halben Masse (160 kDa). Daher sind theoretisch zwei Kristallisationsabläufe vorstellbar:

Erstens kann der gesamte PSII-Komplex in der Membran rekonstituieren, zerfällt dann in den Subkomplex und ordnet sich abschließend zu einem 2D-Kristall. Zweitens könnte der Komplex im solubilisierten Zustand schon zerfallen, nur der Subkomplex in die sich bildende Membran inserieren und zuletzt 2D-Kristalle formen.

Zwar können nur wenige Aussagen über die Übergangszustände gemacht werden, da zum Beispiel ein nicht-kristalliner Vesikel negativkontrastiert im EM keinen Aufschluß über den Zustand des Komplexes zuläßt. Trotzdem gibt es indirekte Hinweise, dass beide Prozesse parallel stattfinden können, wobei der zweite Ablauf in diesem Fall vorherrscht und zu den 2D-Kristallen von CP47-RC führt.

Der erste Mechanismus setzt voraus, dass der gesamte Komplex erst nach Membraninsertion zerfällt. Dies würde implizieren, dass CP43 und die anderen kleineren Untereinheiten entweder in nicht-kristallinen Bereichen der Vesikel sammeln oder aus der

Membran herausgedrängt werden müssten. Dagegen sprechen die Beobachtung aus der Diplomarbeit, worin eine CP47-angereicherte (besser CP43-arme) Fraktion mittels Zentrifugation aus dem Kristallisationsansatz gewonnen werden konnte, sowie geordnete 2D-Kristallvesikel, die vollständig aus dem CP47-RC-Komplex aufgebaut waren. Außerdem ist es sehr unwahrscheinlich, dass CP43 mit seinen sechs *tm* Helices, aber auch andere kleine, integrale Membranproteine, aus der Membran in die Lösung übergehen.

Dies heißt nicht, dass eine Rekonstitution von intaktem PSII unmöglich ist. Unter anderen Bedingungen konnten sogar 2D-Kristalle gezüchtet werden (Lyon 1998, Hankamer et al. 2001). In beiden Fällen ergaben sich erhebliche Probleme mit der Größe der 2D-Kristalle, die vorwiegend von sehr schmaler, tubulärer Morphologie waren, der Ausbeute an guten Kristallen und der Reproduzierbarkeit.

Für den zweiten Mechanismus spricht, dass während der Gelfiltration PSII-Komplexe mit relativ weniger CP43 eluierten. Es könnte sich dabei zwar um ein Artefakt der Gelfiltration bedingt durch die lange Eluationszeit auf der Säule gehandelt haben. Unabhängig davon ist aber schon bekannt, dass CP43 (und LHCII) weniger stark als CP47 mit dem PSII-Komplex verbunden ist (Dekker et al. 1990, Ghanotakis et al. 1989) und dass das Detergenz HTG die Dissoziation von CP43 zusätzlich begünstigt (Büchel et al. 2000).

Es können also Argumente gegen den ersten und für den zweiten Ablauf gefunden werden. Somit ist anzunehmen, dass ein großer Teil des PSII-Komplexes durch HTG begünstigt schon in Lösung zerfällt und die anschließende Rekonstitution die Kristallisation des Subkomplexes CP47-RC favorisiert.

5.1.3. Strukturuntersuchungen am CP47-RC-Komplex

Als Erfolg kann gewertet werden, dass das an den dünnen 3D-Kristallen (gestapelte 2D-Kristalle, „stacked sheets“) direkt gemessene Beugungsmuster erstmalig starke Reflexe jenseits von 5 Å aufwies. Es ist denkbar, dass sowohl die Addition der Beugungskraft der einzelnen Schichten, als auch die Fixierung der extrinsischen Proteinbereiche durch die dreidimensionale Stapelung dafür verantwortlich sind.

Dünne 3D-Kristalle sind aber für die Kristallographie nur bedingt geeignet. Da meistens die Anzahl der Schichten nicht konstant ist, ist die Erstellung einer 3D-Struktur durch Kippserien im EM mit den momentan zur Verfügung stehenden Methoden schwer möglich. Auf der anderen Seite können sie für Röntgenbeugungsexperimente zu dünn bzw. zu klein sein oder eine geringe Ordnung in der dritten Dimension führt zu einer hohen Mosaizität des Datensatzes (z.B. LHC-II, Matteo Lamborghini, persönliche Kommunikation). Manfred Auer (1998) war es erst durch langwierige Experimente geglückt, das Wachstum der Kristalle zu steuern, so dass er doppelagige Schichten der H⁺-ATPase an der Wasser-Luft-Grenzfläche bzw. Wasser-Kohlefilm-Grenzfläche erhielt. David Stokes hatte ähnliche Probleme mit der Ca²⁺-ATPase (Ogawa et al. 1998), deren Struktur am Ende durch die Röntgenstrukturanalyse an sehr dünnen 3D-Kristallen gelöst wurde (Toyoshima et al. 2000). Im Falle von PSII war selbst durch einen sehr feinen Screen der Zinkacetat-Konzentration keine Optimierung hin zu einlagigen Schichten zu erreichen. Vielleicht wäre jedoch eine 3D-Kristallisation von solubilisiertem PSII mit Zinkacetat möglich.

Falls es durch die Kontakte der Schichten im 3D-Kristall zu einer Ordnung der extrinsischen Proteinbereiche kommt, so könnte dies umgekehrt ein Grund dafür sein, weshalb die besten 2D-Kristallvesikel nie besser als 5 Å beugten. Besonders die Flexibilität der großen extrinsischen Domäne (etwa 200 Aminosäuren) zwischen Helix V und VI von CP47 (PsbB) (Barber et al. 1997), die durch das Fehlen der extrinsischen Proteine PsbO, P und Q noch erhöht sein könnte, könnte zu einer verringerten Ordnung im gesamten Kristall führen. Die meisten Membranproteine, die elektronenkristallographisch mit einer hohen Auflösung in 3D gelöst wurden, weisen nur sehr kurze, extrinsische Loops (z.B. Bakteriorhodopsin, LHC-II, Aquaporin) auf.

5.1.4. Ausblick

Die Verbesserung einer 3D-Struktur, die schon zu einer Auflösung von 8 Å gelöst wurde, setzt erheblich verbesserte 2D-Kristall voraus. (In ihrer Doktorarbeit (1998) geht K.H. Rhee sogar von einer Auflösung von 6 Å für den CP47-RC-Komplex aus.) Dieses Ziel konnte trotz einiger ermutigenden Ergebnisse nicht erreicht werden. Weder konnte die Ordnung der bekannten 2D-Kristallform verbessert werden, noch konnten einlagige,

große Schichten gezüchtet werden, mit denen Elektronenbeugung im EM durchgeführt werden konnte. Bisher ist aber noch keine 3D-Struktur mit einer Auflösung von unter 5 Å ohne Beugungsdaten gelöst worden (Henderson et al. 1986, Kühlbrandt et al. 1994, Murata et al. 2000).

Das momentan veröffentlichte Strukturmodell des dimeren PSII aus *Synechococcus elongatus*, dem eine 3,9 Å Elektronendichtekarte zu Grunde liegt, ist ein nur sehr grobes Modell, das nur die Lage der tm Helices und der Chlorophylle angibt (Zouni et al. 2000). In einem neueren Modell, das auf Konferenzen gezeigt wurde, konnten in der Zwischenzeit viele der anfänglich fehlenden Proteindichten gefittet werden. Zwar sind einige Fragen immer noch unbeantwortet (detaillierte Struktur des Manganclusters und die Position des wichtigen Calciumions), aber es ist abzusehen, dass wie bei der Lösung der PSI-Struktur (Jordan et al. 2001, Krauss et al. 1996) die Struktur Jahr für Jahr verbessert wird und sehr bald schon eine Auflösung nahe oder unter 3 Å erreichen wird.

In diesem Auflösungsbereich kann die Elektronenkrystallographie mit der Röntgenkrystallographie nicht konkurrieren. Möglicherweise interessante Konformationsänderungen, die auf Grund der 3D-Kristallpackung verhindert werden, aber im 2D-Gitter möglich sind, sind im Falle von PSII nicht zu erwarten, da die Hauptaufgabe des Proteinanteils die Bindung und optimale Ausrichtung der Pigmente und Kofaktoren zur Energieumwandlung von Licht in chemische Energie ist. Anders verhält es sich bei Bakteriorhodopsin, wo die Isomerisierung des gebundenen Retinals zu einer Konformationsänderung dreier tm Helices führt (Vonck 2000b).

Es bleibt abzuwarten, welchen Beitrag die Elektronenkrystallographie zur Strukturklärung des PSII bzw. der Photosynthese in Zukunft leisten kann. Beide Gebiete haben sich über einen langen Zeitraum gegenseitig intensiv befruchtet.

5.2. c-Ring aus *Ilyobacter tartaricus*

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des undecameren c-Rings der Na⁺-translozierenden F₁F₀-ATPase aus *Ilyobacter tartaricus* zeigt anschaulich, wie durch die Zusammenarbeit von zwei Arbeitsgruppen in kurzer Zeit ein Projekt zu einem erfolgreichen Abschluß gebracht werden kann. Gleichzeitig veranschaulicht es die Schwierigkeiten die Qualität des Proteins konstant zu halten

5.2.1. Ausgangsmaterial

Während beim ersten Projekt alles in einer Hand lag, wurde beim zweiten Projekt das Protein an der ETH Zürich gereinigt. Kontinuierlich wurde dort versucht die Ausbeute zu steigern, die Reinheit zu verbessern und das Protokoll zeitlich und arbeitstechnisch zu optimieren. Besonders beim letzten Schritt, der Aufkonzentrierung des Proteins, kamen unterschiedlichste Methoden zum Einsatz (Ultrafiltration, Ultrazentrifugation, Ausfällung).

Dies hatte zur Folge, dass die Qualität des Proteins von Charge zu Charge variierte. Welche Faktoren dies waren konnte nicht festgestellt werden. Vielleicht enthielten gerade die frühen Aufreinigungen, die die besten 2D-Kristalle lieferten, etwas spezifisch gebundenes Lipid. Später konnte eine Lipidverunreinigung ausgeschlossen werden, da durch eine sensitive Phosphatbestimmung keine Lipide in der Protein-Charge nachgewiesen werden konnten (Thomas Meier, persönliche Kommunikation).

Es bleibt weiterhin als größte Unsicherheit die genaue Konzentration des Detergenz und dessen Einfluß auf den c-Ring. Zuletzt wurde zwar das Ausfällen und anschließende Aufnehmen in einem Puffer mit bekannter Detergenzkonzentration als Methode zur Aufkonzentrierung genutzt. Vorher wurde aber nicht so genau auf die Konzentration des Detergenz geachtet. Dies trifft in besonderem Masse auf das Detergenz Laurylsarcosin (LS) zu. Gerade mit der ersten Protein-Charge, die LS enthielt, konnten die besten 2D-Kristalle gezüchtet werden.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass nach allem was bekannt ist der isolierte c-Ring seine native Struktur behielt. Der c-Ring aus *Ilyobacter tartaricus* wies eine

ungewöhnlich hohe Stabilität auf. So widerstand er fünf Minuten kochen in SDS (Neumann et al. 1998). Die Auswertung von SDS-PAGE-Gelen erbrachte keinen Unterschied im Laufverhalten der oligomeren c-Untereinheit, unabhängig, ob die intakte F_1F_0 -ATPase, der isolierte c-Ring oder die rekonstituierten 2D-Kristalle aufgetragen wurden, so dass vermutlich keine c-Untereinheiten während der Aufreinigung und 2D-Kristallisation verloren ging (Thomas Meier, persönliche Kommunikation). Auch funktionelle Untersuchungen, in denen der oligomere c-Ring mit den Untereinheiten a und b sowie dem F_1 -Kopf rekonstituiert wurde, ergaben einen nativen F_1F_0 -Komplex (Wehrle et al. 2002). Abschließend kann noch das nicht zu unterscheidende Verhalten des gesamten Komplexes und des c-Rings gegenüber der Markierung mit DCCD, als Argument für die native Struktur des undecameren c-Ringes angeführt werden (Meier et al. in Vorbereitung).

5.2.2. 2D-Kristallisation

Die Ergebnisse der 2D-Kristallisation ähnelten den oben beschriebenen von PSII besonders in der Hinsicht, dass die Morphologie der 2D-Kristalle über einen weiten Bereich sehr konstant und von der Protein-Charge abhängig war. Glücklicherweise war es einmal möglich die Größe der Vesikel durch Absenkung der Detergenzkonzentration gezielt zu beeinflussen und so die großen, tubulären Kristalle zu züchten, auf die alle Aufnahmen von gekippten Kristallen zurückgehen.

Lagerung

Bei dem oben angesprochenen Kristallisationsansatz wurde aber auch noch eine entscheidende Verbesserung der Ordnung durch die lange Lagerung erzielt. Sofort nach der Ernte waren zwar schon viele große Vesikel mit einem in Negativkontrast gut erkennbaren Gitter vorhanden, aber unter Cryo-Bedingungen wurde eine hohe Mosaizität und dadurch bedingt niedrige Auflösung sichtbar. Routinemäßig wurden bis zu mehrere Monate alte Kristallisationsansätze, die schon beim ersten Screening Erfolg versprechend aussahen (mit großen, tubulären Vesikel, die große Kristallflächen ohne Risse und Falten auf dem Kohlefilm bildeten), aber nicht gut genug geordnet waren, wiederholt überprüft. Es ist nicht unüblich, dass 2D-Kristalle mit der Zeit besser werden (Cécile Breyton, persönliche Kommunikation), da ungeordnete Bereiche sich sehr

langsam ordnen oder Zwillingskristalle sich aussortieren können (z.B. im Falle von Bakteriorhodopsin).

Welche Vorgänge könnten während der Lagerung zu einer Verbesserung der 2D-Kristalle geführt haben? Die Kristallisationsansätze (25-100 μl) wurden aus der Dialysevorrichtung in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml Volumen) überführt. Nach dem Sedimentieren der Proteinvesikel wurde der Überstand gegen frischen Puffer ausgetauscht. Dadurch konnte noch vorhandenes Detergenz weiter verdünnt werden und störendes überschüssiges Lipid abgetrennt werden. Schaute man sich nach einigen Tagen das Reaktionsgefäß, das in der Zwischenzeit bei 4°C gelagert worden war, wieder an, so hatte sich relativ viel Kondenswasser am Deckel niedergeschlagen. Oft blieb eine so geringe Flüssigkeitsmenge am Gefäßboden übrig, dass das Gefäß leer erschien. Erst durch Niederschlagen der Kondensflüssigkeit fand sich wieder das ursprüngliche Volumen am Gefäßboden. Dieser Vorgang konnte sich wiederholen, da der Kristallisationsansatz mehrmals überprüft wurde. Diese Zyklen aus Aufkonzentrieren und Verdünnen könnten für ein weiteres Ordnen der 2D-Kristalle verantwortlich gewesen sein.

Die Projektionsdichtekarte (siehe Abb. 35) zeigt, wie sechs c-Ringe um eine große Fläche aus Lipid gruppiert sind. Außerdem sind die Kristallkontakte zwischen den Ringen nicht sehr ausgeprägt. Diese schwache Proteininteraktion und unterschiedliche Proteinverteilung im Kristall könnte ein weiterer Grund für einen längeren Reifungsprozess sein. Interessanterweise ist die Fläche pro tm Helix mit 169,7 \AA^2 im Bereich der dicht gepackten 2D-Kristalle von Bakteriorhodopsin (BR) und OxIT (160,6 \AA^2 und 164,6 \AA^2 , siehe Tab. 3 für eine komplette Auflistung), obwohl etwa ein Drittel der Fläche der 2D-Kristalle der c-Ringe nur Lipid enthält. Dies unterstreicht die enge Packung der inneren Helices noch einmal. Im Falle der DCCD-markierten Kristalle kommt es zu einer bisher noch nicht beobachteten, dichten Packung der tm Helices (135,1 \AA^2 pro tm Helix), da hier der 2D-Kristall keine ausgedehnten Lipidflächen beinhaltet (siehe Abb. 32a).

	Einheitszelle (Å) a x b, γ	Symmetrie	Fläche (Å ²)	Tm Helices je Einheitszelle	Fläche je tm Helix
BR (1)	62,4 x 62,4, 120°	<i>p</i> 3	3.372	21 (3 x 7)	160,6
OxIT (2)	100,3 x 79, 90°	<i>p</i> 2 ₂ 1 ₂ 1	7.900	48 (4 x 12)	164,6
c-Ring	89,7 x 91,7, 55,2°	<i>p</i> 1	7.467	44 (2 x 22)	169,7
NhaA (3)	48 x 181, 90°	<i>p</i> 2 ₂ 1 ₂ 1	8.688	48 (4 x 12)	181,0
Halorhodopsin (4)	102 x 102, 90°	<i>p</i> 4 ₂ 1 ₂	10.404	56 (2 x 4 x 7)	185,8
Rhodopsin (5)	32 x 83, 91°	<i>p</i> 2	2.656	14 (2 x 7)	189,7
SecYEG (6)	102 x 56, 90°	<i>p</i> 1 ₂ 1 _b	5.712	30 (2 x 15)	190,4
Aquaporin (7)	96 x 96, 90°	<i>p</i> 4 ₂ 1 ₂	9.216	48 (2 x 4 x 6)	192,0
-				56 *	164,6
Gap junction (8)	76,8 x 76,8, 120°	<i>p</i> 6	5.108	24 (6 x 4)	212,8
GlpF (9)	104 x 104, 90°	<i>p</i> 4	10.816	48 (2 x 4 x 6)	225,3
-				56 *	193,1
MGST-I (10)	82 x 82, 120°	<i>p</i> 6	5.823	24 (2 x 3 x 4)	242,6
RC-CP47 (11)	168 x 156, 90°	<i>p</i> 2 ₂ 1 ₂ 1	26.208	92 (4 x 23)	284,9
RC-CP47/43 (12)	127 x 175, 107,7°	<i>p</i> 2	21.173	68 (2 x 34)	311,4
LHC-II (13)	129 x 129, 120°	<i>p</i> 3 ₂ 1	14.412	18 (2 x 3 x 3)	800,6
c-Ring DCCD	108 x 111, 90°	<i>p</i> 1 ₂ 1	11.890	88 (4 x 22)	135,1

Tab. 3 Auflistung von 2D-Kristallen sortiert nach der Fläche je tm Helix im 2D-Kristallgitter. Aufgeführt sind nur Membranproteine mit einer gesicherten Anzahl von tm Helices und überwiegend membranintegriertem Proteinanteil. Chlorophyll-bindende Proteine sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt und abgesetzt, da ein beträchtlicher Teil ihrer Masse auf die Kofaktoren entfällt und somit die Werte verzerrt.

Neben der Anzahl von tm Helices in der Einheitszelle ist in Klammern die Aufteilung in die Anzahl der asymmetrischen Einheitszellen, der Monomere und ihrer tm Helices angegeben. Die Fläche der Einheitszelle berechnet sich nach der Formel $a \cdot b \cdot \sin \gamma$.

* Anzahl der tm Helices, wenn die durch zwei Halbhelices gebildete tm Helix hinzugerechnet wird.

(1) Henderson et al. 1990, (2) Heymann et al. 2001, Hirai et al. 2002 (3) Williams 2000, (4) Havelka et al. 1995, (5) Unger et al. 1997, (6) Collinson et al. 2001, (7) Walz et al. 1997, (8) Unger et al. 1999, (9) Stahlberg et al. 2000, (10) Schmidt-Krey et al. 2000, (11) Rhee et al. 1998, (12) Hankamer et al. 2001, (13) Kühlbrandt et al. 1994.

5.2.3. Interpretation der symmetrisierten 3D-Dichtekarte

Die 3D-Dichtekarte ergibt zusammen mit den AFM-Daten (Stahlberg et al. 2001) ein sehr vollständiges und schlüssiges Modell des c-Rings und des Aufbaus der 2D-Kristalle.

Lipiddoppelschicht

Auch wenn die Lipiddoppelschicht, in die die c-Ringe im 2D-Kristall eingebettet sind, nicht in der Dichtekarte zu sehen ist, so kann man ihre Lage herleiten. Durch die entgegengesetzte Ausrichtung der beiden c-Ringe lässt sich die Mitte der Membran finden und wenn nun von einer typischen Membrandicke von 35 Å (hydrophober Bereich ohne die polaren Kopfgruppen) (Büldt et al. 1978) ausgegangen wird, so können die Grenzen der Membran 17,5 Å oberhalb und unterhalb der Mitte in die 3D-Dichtekarte eingezeichnet werden (Abb. 39). Der Knick in der äußeren Helix und die schmalste Stelle des c-Rings liegen damit in der Mitte der Membran.

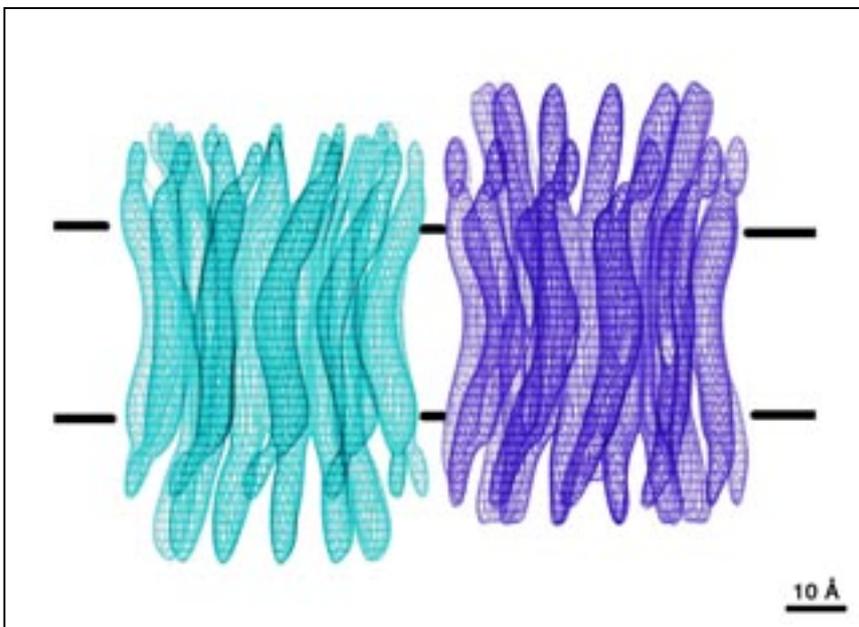


Abb. 39 Symmetrisierte 3D-Dichtekarte mit den eingezeichneten Grenzen des hydrophoben Bereichs der Lipidmembran.

Zur weiteren Diskussion soll auf das von Janet Vonck erstellte C- α Modell (Abb. 40, Abb. 42) zurückgegriffen werden. Es wurde mit Hilfe der folgenden Annahmen erstellt:

1. Die konservierte Region Arg45-Gln46-Pro47 befindet sich im cytoplasmatischen Loop, der die N- und C-terminalen Helices verbindet (Watts et al. 1995, Hermolin et al. 1999).
2. Bis auf den kurzen Loop ist das Protein α -helikal.
3. Die N-terminale Helix bildet den inneren Ring (siehe S. 103).
4. Die Glycinreste 27, 29, 31 and 33 stehen in seitlichem Kontakt zu benachbarten Untereinheiten im c-Ring (siehe S. 103).
5. Die Aminosäure Gln32 zeigt zur C-terminalen Helix (Kaim et al. 1997).
6. Umgekehrt zeigen Glu65 and Ser66 zur N-terminalen Helix (Kaim et al. 1997).

Phospholipide

Auf AFM-Topographien der 2D-Kristalle zeigte sich, dass die zentrale Vertiefung der weiter aus der Lipidschicht herausragenden Seite des c-Rings durch einen Pfropfen gefüllt war (Stahlberg et al. 2001). Die 3D-Dichtekarte zeigt deutlich, dass es sich hierbei um die periplasmatische Seite mit dem C- und N-Terminus handelt. Der Pfropfen konnte durch Phospholipase-Behandlung in AFM-Topographien entfernt werden und muss daher aus Phospholipiden bestehen (Meier et al. 2001). Im Modell zeigen auf der periplasmatischen Seite hydrophobe Reste in die Mitte, welche die Bindung von Phospholipiden erleichtern, während auf der cytoplasmatischen eine Reihe von großen, polaren Seitenketten (Tyr34, Lys38, Glu41) den Innenraum auskleiden. Da keine Lipide am gereinigten c-Ring vor der 2D-Kristallisation nachgewiesen werden konnten (Meier et al. 2001), muß der Pfropfen während der 2D-Kristallisation entstanden sein und daher aus POPC bestehen. Es ist zu vermuten, dass auch *in vivo* ein Lipidpfropfen an dieser Stelle die hydrophoben Kontakte zum Protein absättigt und eine Undichtigkeit des Innenraums verhindert.

Packung der inneren Helices

Normalerweise kann die Elektronenkristallographie tm Helices gut auflösen, besonders wenn sie senkrecht zur Membran stehen und gerade verlaufen (Henderson et al. 1990, Kühlbrandt et al. 1994, Walz et al. 1997, Williams 2000). In dieser Hinsicht ist der c-Ring aus *I. tartaricus* ungewöhnlich, da bei einer x,y-Auflösung von 8 Å der innere Ring in der Mitte als ein kontinuierlicher Zylinder erscheint. Erst durch das Hinzufügen von Daten

bis zu einer Auflösung von 4 Å in der Ebene können die einzelnen Helices aufgelöst werden (Abb. 38c).

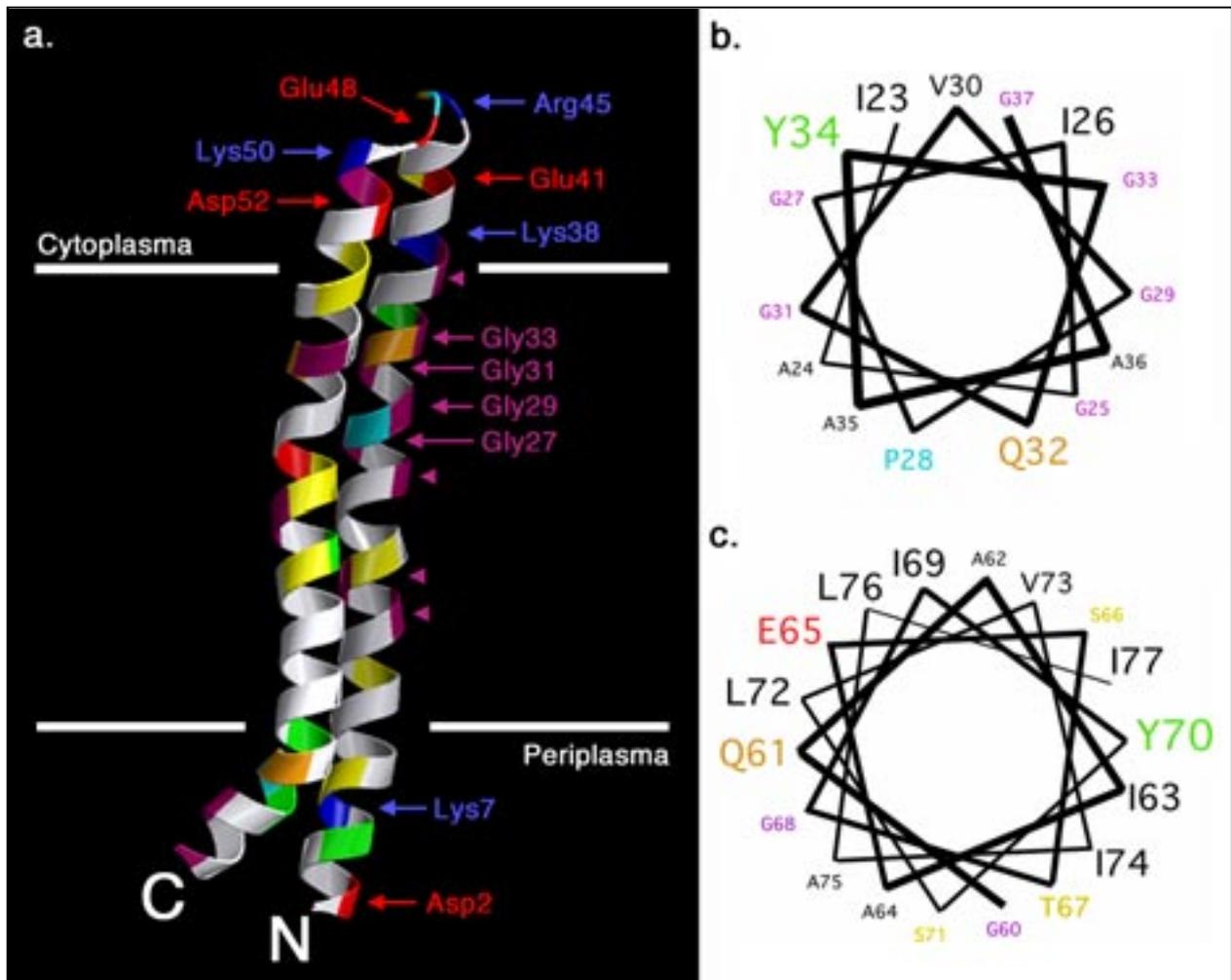


Abb. 40 a. C- α -Modell einer c-Untereinheit. Beschriftet sind zum einen die Glyzinreste des xGxGxGxG-Motives der inneren Helix (die restlichen Glyzinreste sind durch Pfeilköpfe markiert), die die enge Packung des inneren Rings ermöglichen und zum anderen die möglichen Ionenbindungs-paare im cytoplasmatischen Loop und dem N-Terminus. Farbkodierung der Reste: rot - negativ; blau - positiv; ocker - polar (Asn, Gln); gelb - polar (Ser, Thr); grün - aromatisch; magenta - Glyzin; cyan - Prolin; grau (schwarz) - andere hydrophob. Membrangrenzen sind markiert. **b.** und **c.** Schematische Darstellung der Helixstruktur („helical wheel“) für einen Teil der inneren (Ile23-Gly37) und äußeren (Gly60-Ile77) Helix von der cytoplasmatischen Seite gesehen. Die Größe der Schrift entspricht der Größe der Seitenketten.

Die extrem dichte Packung der inneren tm Helices mit einem Zentrum-zu-Zentrum-Abstand von nur 6,5 Å kann durch das Vorkommen einer Reihe von kleinen Aminosäureresten erklärt werden, die die Kontaktflächen zu den Nachbarn bilden.

In *I. tartaricus* findet sich ein Abschnitt von 26 Aminosäuren, der mit Ala12 beginnt und 9 Alanine und 8 Glyzine enthält. Vier Glyzine (27, 29, 31 and 33 in *I. tartaricus*) sind Teil eines charakteristischen Musters xGxGxGxG, welches über alle bekannten Species

(Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien) konserviert ist (Abb. 41) und anscheinend ein allgemeiner struktureller Bestandteil des c-Rings der F_1F_0 -ATPasen ist.

Es kann spekuliert werden, dass auch die dichte Packung der inneren Helices wie der Lipidpfropfen eine unkontrollierte Diffusion von Ionen in den Innenraum verhindern soll.

Bacterial Na ⁺	1	10	20	30	40	50	60	70	80	89
1 <i>I. tartaricus</i>	MCMLFARTYVLAASAVGAGTANIAGIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	KGDIISTMVLGQAI	ESTG	YISLVIALILLYANPFVGLLG				
2 <i>P. modestum</i>	MCMLVLAQYVLAASAVGAGAAMIAGIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	KGDIISTMVLGQAI	ESTG	YISLVIALILLYANPFVGLLG				
3 <i>A. woodii</i>	MEGLDFIKACSAIGAGIAMIAGVGF	GIGCGYAAGKAVESVARQ	EA	QSDIIRTMLLGAAVA	ETG	YIGLIVALILLYANPFVGLLG				
Bacterial H ⁺	1	10	20	30	40	50	60	70	80	79
4 <i>E. coli</i>	MENLNMDLLYMAAAVMEGLAAIG	GAAGIGILOGKFLGGAARQ	PLI	PLLRTPQFFIVMGLV	AI	PIAVGLGLYVFAVA				
5 <i>Anabaena</i> sp.	MDPLVSAASVLAALAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
6 <i>Bacillus firmus</i>	MAFLGAARVLAALAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
7 <i>Aquifex aeolicus</i>	ASVAKGLLYLGLAGLAIGLAGL	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
8 <i>Bacillus subtilis</i>	MNLIAAAIAIGLGAIGAGI	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
9 <i>B. alcalophilus</i>	MGLLGAARVLAALAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
10 <i>B. megaterium</i>	MGLIASRAIAIGLGAIGAGI	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
11 <i>Clostridium</i>	MICSHITFLGMQYLGAGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
12 <i>Mycoplasma</i>	NVLTLNHVGAYIGAGMAMTAAG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
13 <i>Enterococcus hirae</i>	MNYIAAAIAIMGAIGAGI	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
14 <i>Haemophilus infl.</i>	MEVTITATIIGASILLAPAAIG	GAAGIGILOGKFLGGAARQ	PLI	PLLRTPQFFIVMGLV	AI	PIAVGLGLYVFAVA				
Chloroplast:										
15 <i>Antithamnion</i> sp.	MDSIIISAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
16 <i>Chlorella vulgaris</i>	MNPPIVAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
17 <i>Galdieria</i>	MDSIIISAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
18 <i>Cyanophora paradox</i>	MDATVSAASVIAALAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
19 <i>Euglena gracilis</i>	MNPIICAAVIGAGLAIIGLGAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
20 <i>Guillardia theta</i>	MNPIVSAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
21 <i>Ochrosphaera nesp.</i>	MNPIVSGASVVAAGLAIIGLGAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
22 <i>Odontella sinensis</i>	MDSIIISAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
23 <i>Pisum sativum</i>	MNPLIAAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
24 <i>Pinus thunbergii</i>	MDPLISAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
25 <i>Porphyra purpurea</i>	MDSIIVSAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
26 <i>Spinacia oleracea</i>	MNPLIAAASVIAAGLAVGLAAIG	GVGCGYAAGKAVESVARQ	EA	RGKIRGTLLSLAFK	EAL	TIYGLVVALVLLFANFFA				
Mitochondrial:										
27 <i>Bos taurus</i>	...NDIDTAAKFIGAGAATVGVAGS	AGIGITVFGSLIIGYARN	SL	QQLFSAIILGFALS	AM	GLFCIMVAFILIFAM				
28 <i>Mercurialis polymorpha</i>	MLEGAKLIGAGAATIALAGAAVGI	GNVFSLLINSVARN	SL	AKQLFGYAILGFALT	AI	ALFALMMAFLILFVF				
29 <i>Paramecium</i>	MLLVLAIKTLVGLCLMPLISAAL	GVGILFACYNIAVSRNP	DE	ALTIIFNGTLMGFALV	ET	PFVMSFFFGVIVYFI				
30 <i>Arabidopsis thaliana</i>	MLEGAKSIGAGAATIASAGAATIGI	GNVFSLLINSVARN	SL	AKQSPGYAILGFALT	AI	ALFALMMAFLILFVF				
31 <i>Chondrus crispus</i>	MNVTLQSAKHMIGAGLATIGLTV	GVGAVGVIVFGSLVMAYARN	SL	QQLFGYAILGFALT	AV	ALFALMMAFLILFVF				
32 <i>Pisum sativum</i>	MLEGAKSIGAGAATIASAGAATIGI	GNVFSLLINSVARN	SL	AKQLFGYAILGFALT	AI	ALFALMMAFLILFVF				
33 <i>Petunia</i> sp.	MLEGAKSMGAGAATNASAGAATIGI	GNVFSLLINSVARN	SL	AKQLFGYAILGFALT	AI	ANSAFALMMAFLISFVQVR				
34 <i>Nicotiana tabacum</i>	MLEGAKLMGAGAATIALAGAAATIGI	GNVFSLLINSVARN	SL	AKQLFGYAILGFALT	AI	ALFALMMAFLISFVF				
35 <i>Trichophyton rubrum</i>	MIQAAKIIGTGLATTGLIGAGVGI	GVVFGALILGVARN	SL	RGLFSAIILGFALF	AT	GLFALMMAFLILLYVA				
36 <i>Triticum aestivum</i>	MLEGAKLIGAGAATIALAGAAVGI	GNVFSLLINSVARN	SL	AKQLFGYAILGFALT	AI	ALFALMMAFLILFVF				
37 <i>Hansenula wingei</i>	MQLVLAARYIGAAIATIGLLGAGI	GIIVFAALINGTSSNP	SL	RNTLFPFALIGFALS	AT	GLFCIMISFLLLYGV				
38 <i>S. cerevisiae</i>	MQLVLAARYIGAAIATIGLLGAGI	GIIVFAALINGTSSNP	SL	RNTLFPFALIGFALS	AT	GLFCIMISFLLLYGV				

Abb. 41 Sequenzvergleich der c-Untereinheit aus 38 Arten. 1-3: bakterielle Na⁺-translozierend, 4-14: bakterielle H⁺-translozierend, 15-26: Chloroplasten, 27-38: Mitochondrien. Die Nummerierung der Aminosäuren ist für die Sequenz von *I. tartaricus* und *E. coli* angegeben. Hervorgehoben sind positiv (blau) und negativ (rot) geladene Reste sowie Proline (grün). Konservierte Reste sind gelb hinterlegt. Die letzte Zeile markiert den Bereich mit vorhergesagter helikaler Sekundärstruktur.

Ionenbrücken

Die Verteilung der geladenen Aminosäuren in der c-Untereinheit liefert eine mögliche Erklärung der hohen Temperaturstabilität des c-Rings verglichen mit anderen ATP-Synthasen. Nimmt man die Sequenzen von *Acetobacter woodii* und *Propionium modestum* hinzu, so erkennt man, dass die geladenen Reste, mit Ausnahme von Glu65, welches die Ionenbindungsstelle definiert und in der Mitte der äußeren Helix liegt, immer

in Paaren von positiv und negativ geladenen Aminosäuren vorkommen (Abb. 41). Das Paar Arg45 / Glu48 ist Äquivalent zu Arg41 / Asp44 in *E.coli* und damit vermutlich an der Bindung der ϵ -Untereinheit beteiligt (Hermolin et al. 1999). Die anderen drei Paare besitzen die Möglichkeit Salzbrücken untereinander auszubilden. So legt das Modell nahe, dass das N-terminale Paar Asp2 / Lys 7 Teil der alpha-Helix ist und durch den Abstand von 5 Aminosäuren auf entgegengesetzten Seiten dieser zu liegen kommen. Diese Lage zueinander würde eine Salzbrücke zwischen jeweils benachbarten Untereinheiten im c-Ring begünstigen. Ähnliches gilt für die Paare Lys50 / Asp52 und Lys38 / Glu41 an der Innen- und Außenseite des cytoplasmatischen Loops (Abb. 40). Alle drei Salzbrücken zusammen genommen könnten für die außergewöhnliche Stabilität verantwortlich sein. *E.coli* weist im gleichen Kontext nur eine Salzbrücke auf (Dimitriev et al. 1999), was gut mit der niedrigeren Temperaturstabilität des Komplexes in Einklang steht. Unterstützt wird diese Hypothese auch durch die Beobachtung, dass der undecamere c-Ring aus *I. tartaricus* und *P. modestum* bei niedrigem pH in einzelne c-Untereinheiten zerfällt (Thomas Meier, persönliche Kommunikation). Die Protonierung der Carboxylgruppen von Aspartat und Glutamat führt wahrscheinlich zu einer Schwächung der Ionenbindung.

5.2.4. Ionenbindungsstelle

Lage der Ionenbindungsstelle

Von großer funktioneller Wichtigkeit ist, dass sich die Reste der Na⁺-Bindungsstelle (Gln32, Glu65 und Ser66) in der Mitte der Membran befinden. Diese Lokalisation stimmt hervorragend mit neueren Cross-linking-Daten überein. Sie zeigen, dass ein photoaktivierbares Derivat von DCCD, nachdem es kovalent an Glu65 gebunden und aktiviert wurde, nur mit den Fettsäureresten der Lipide reagiert (von Ballmoos et al. 2002).

Ionenbindungsstelle

Die Ionenbindungsstelle wird aus den Resten dreier, gestaffelt angeordneten Helices gebildet. Eine c-Untereinheit steuert mit dem Ser66 in der äußeren Helix, sowie Pro28 und Gln32 in der inneren Helix drei Aminosäurereste bei, während das essentielle Glu65 in der benachbarten äußeren Helix liegt (Abb. 42a). Obwohl die genaue Position und Ausrichtung der Seitenketten bei dieser Auflösung in der 3D-Dichtekarte nicht zu

erkennen ist und daher nicht im Modell eingezeichnet werden können, legt das Modell nahe, dass zumindest Glu65, Pro28 und Ser66 zu einem gemeinsamen Zentrum ausgerichtet sind.

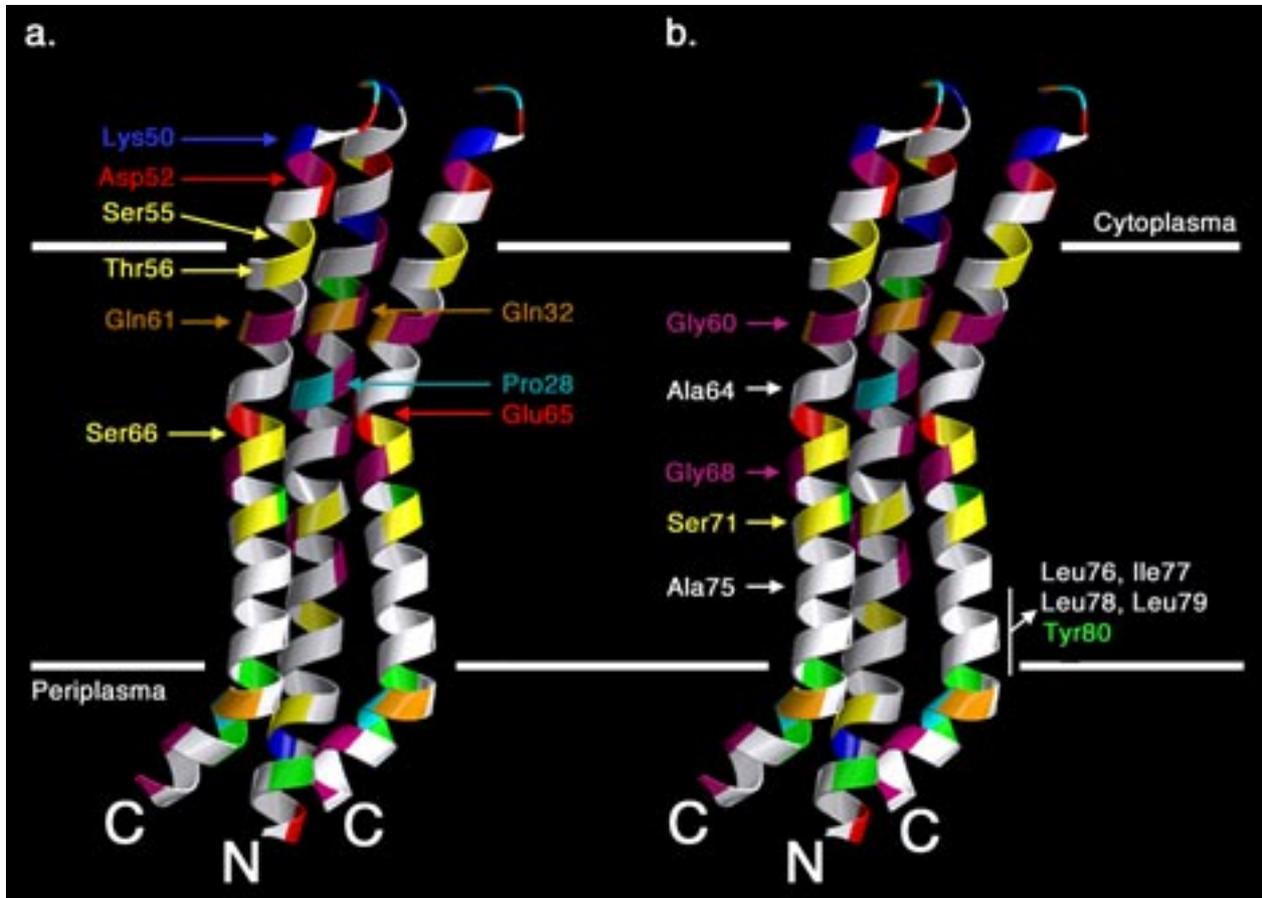


Abb. 42 C- α -Modell einer c-Untereinheit und der benachbarten C-terminalen Helix. **a.** Beschriftet sind die Reste der Ionenbindungsstelle und des möglichen Zugangs zum Cytoplasma. **b. links:** Beschriftet sind die kleinen Reste, die möglicherweise mit der a-Untereinheit in Kontakt stehen. **rechts:** Hydrophober Bereich, der den Zugang des Ions zum Periplasma versperrt. Die Membrangrenzen sind markiert. Farbkodierung siehe Abb. 40.

Proline

Der Position und Rolle von Prolinen in der c-Untereinheit sollte besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. In einer kürzlichen Veröffentlichung wurde in *E. coli* Pro64 (Gly68 ist der korrespondierende Rest in *I. tartaricus*) zu Alanin mutiert und zum Ausgleich ein Prolin in der inneren Helix anstelle von Ala20 (Ala24 in *I. tartaricus*) eingesetzt (Dmitriev & Fillingame 2001). Das resultierende Protein war funktionsfähig. Darüberhinaus konnte in NMR-Untersuchungen der isolierten c-Untereinheit in organischem Lösungsmittel ein Knick der N-terminalen Helix nachgewiesen werden, während die C-terminale Helix gerade verlief. Dies entspricht der umgekehrten Situation des Wildtyps.

Basierend auf der Beobachtung, dass fast alle c-Untereinheiten ein Prolin in der einen oder anderen Helix in der Nähe der Position des wichtigen Carboxylrests (Glu65 in *I. tartaricus*) besitzen, wurde vorgeschlagen, dass dies eine gewisse, strukturelle Flexibilität in die Umgebung der Ionenbindungsstelle bringt (Dmitriev & Fillingame 2001). *I. tartaricus* besitzt an dieser Stelle das schon oben erwähnte Pro28, welches in den Na⁺-translozierenden ATPasen konserviert ist (Rahlfs & Müller 1997) (siehe Abb. 41). Dieses Prolin ist in das konservierte xGxGxGxGx-Motiv der inneren Helix, die sehr gerade verläuft, eingebettet. Die hohe Dichte der Karte in diesem Bereich (Abb. 37, Abb. 38b) deutet auf eine wohl geordnete Struktur und eher wenig Flexibilität hin. Wahrscheinlich ist die Funktion des Prolins in der Nähe der Ionenbindungsstelle eine weitere Wasserstoffbrückenbindung in der polaren Umgebung zur Verfügung zu stellen, und so die Bindung des Ions in der Mitte der Membran zu erleichtern.

Die äußere Helix, die im Gegensatz zur inneren kein Prolin in der Membran enthält, weist gerade bei Glu65 einen deutlichen Knick auf. Interessanterweise wurde in einem NMR-Experiment der verwandten c-Untereinheit von *P. modestum* an dieser Stelle eine Unterbrechung der α -helikalen Struktur gefunden (Matthey et al. 1999). Von anderer Seite kam der Vorschlag, dass Serin und Threonin mit ihren Seitenketten Wasserstoffbrückenbindungen zum Rückgrat („backbone“) ausbilden und so das α -helikale Bindungsmuster unterbrechen könnten (Dmitriev & Fillingame 2001). Tatsächlich findet sich in vielen c-Untereinheiten ohne Pro68 mindestens ein Serin oder Threonin in der Nähe des Glu65, wohingegen Arten mit einem Prolin ohne auskommen (Abb. 41). *I. tartaricus* fällt in die erste Gruppe und besitzt mit Ser66 und Thr67 gleich zwei Kandidaten für die Rolle des Helixbrechers. Für Ser66 konnte gezeigt werden, dass es an der Na⁺-Bindung beteiligt ist (Kaim et al. 1997), womit nur noch Thr67 für diese Funktion übrig bleibt.

Zugang zur Ionenbindungsstelle

Bisher gingen die Vertreter der Ein-Kanal-Theorie (Abb. 8b) davon aus, dass die Ionenbindungsstelle an der Membranoberfläche liegen würde. Man kam zu diesem Schluß, da es zahlreiche biochemische Hinweise gibt, dass Na⁺ von der cytoplasmatischen Seite freien Zugang zur Bindungsstelle in der c-Untereinheit hat ohne auf die Mitwirkung der a-Untereinheit angewiesen zu sein (Kaim & Dimroth 1998, Kaim et al. 1998). Schon die Lage des essentiellen Glu65 in der Mitte der äußeren Helix scheint aber dagegen zu

sprechen. Endgültig durch Crosslinking-Studien (von Ballmoos et al. 2002) und der Herleitung der Membrangrenzen im 2D-Kristall kann belegt werden, dass sich die Ionenbindungsstelle in der Mitte der Membran befindet.

Dieser interessante Widerspruch lässt sich nun mit Hilfe des Modells auflösen, indem man einen möglichen Zugangsweg zwischen dem inneren Ring aus Helices und jeweils zwei benachbarte äußeren Helices postuliert. Das Ion könnte über eine Kette von polaren und geladenen Aminosäureresten (Glu61, Thr56, Ser55, Asp52, Lys50) vom Cytoplasma zur Bindungsstelle gelangen (Abb. 42 a). Umgekehrt ist der Weg zur periplasmatischen Seite durch große, hydrophobe Seitenketten (Leu, Ile, Phe und Tyr) in der C-terminalen Helix versperrt (Abb. 42 b). Die elektrostatische Potentialverteilung auf der Oberfläche eines vorläufigen Aminosäuremodells verdeutlicht diesen Befund (Abb. 43). Die Innenfläche des c-Rings und die periplasmatische Hälfte der Außenfläche ist weitgehend neutral (eine Ausnahme bildet die Ionenbrücke Glu41 / Lys38), während neben der Ionenbindungsstelle die überwiegend negativ geladene cytoplasmatische Hälfte der Außenfläche auffällt.

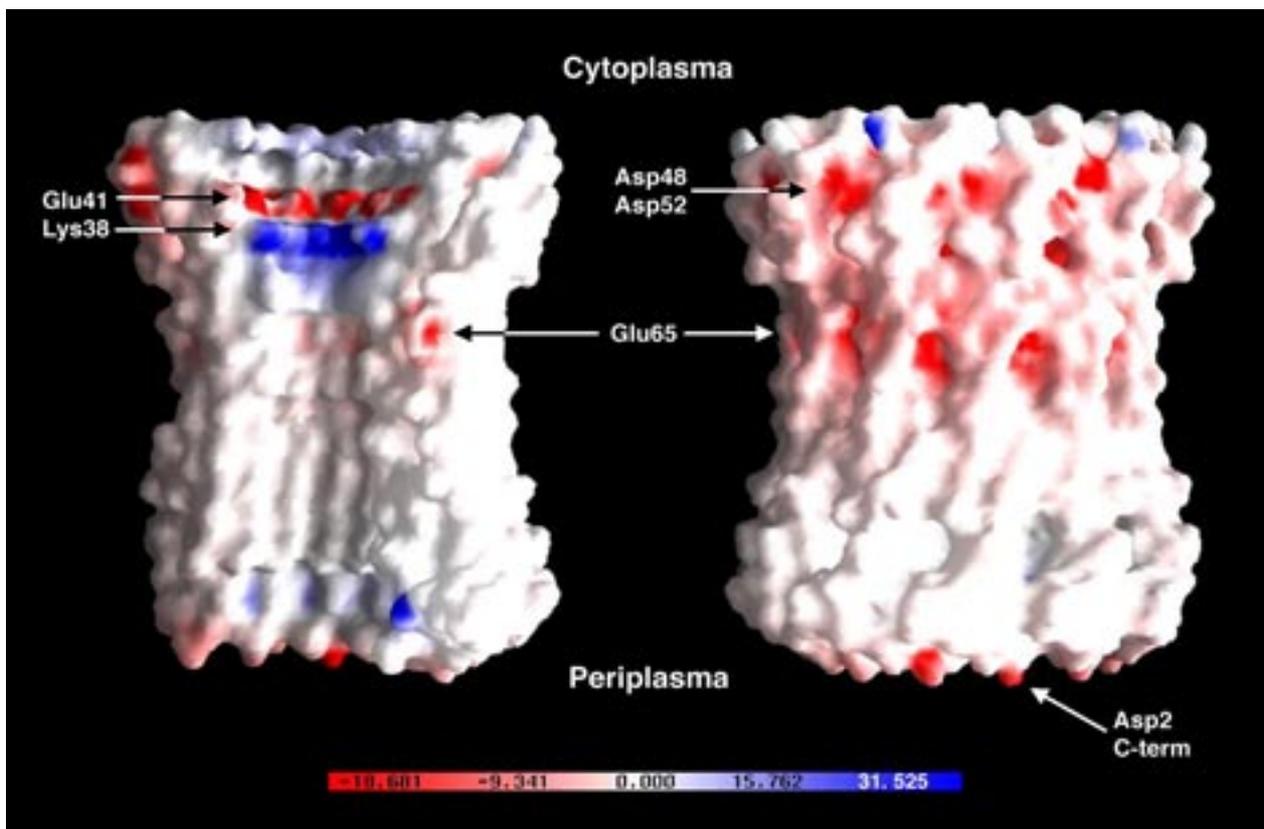


Abb. 43 Darstellung der Oberfläche und elektrostatischen Potentialverteilung. **Links:** Innenansicht des aufgeschnittenen c-Rings, **rechts:** Außenansicht. Farbkodierung entsprechend der Skala des elektrostatischen Potentials.

An den Positionen 60, 62, 64, 66, 68, 71 und 75 finden sich konservierte, kleine Reste (Gly, Ala, Ala, Ser, Gly, Ser, Ala z.B. in *I. tartaricus*). Mit der Ausnahme von Ala62 und Ser66 liegen sie alle auf einer Seite der Helix (Abb. 40 c). Im Modell zeigt diese Seite nach außen, wo sich möglicherweise die α -Untereinheit befindet. Die Abwesenheit von großen Seitengruppen in diesem Bereich mag notwendig sein, damit die α -Untereinheit mit ihrem konservierten Arginin in engen Kontakt mit der Ionenbindungsstelle im c-Ring treten kann.

5.2.5. Vergleich zu anderen Strukturen und Modellen

c-Untereinheit

Die NMR-Struktur der monomeren c-Untereinheit von *E. coli* in organischem Lösungsmittel (Girvin et al. 1998, Rastogi & Girvin 1999) und die hier vorgestellte 3D-Dichtekarte stimmen gut in ihrem allgemeinen Aussehen einer geraden N-terminalen und geknickten C-terminalen Helix überein. Die NMR-Struktur bei pH 5, deren Asp61 protoniert ist, ähnelt der von *I. tartaricus* stärker als die bei pH8, wo die Carboxylgruppe deprotoniert ist. Im Detail fallen aber Unterschiede im Verlauf der äußeren Helix auf. Diese sind höchstwahrscheinlich ein Ergebnis der Interaktion zwischen den Untereinheiten im oligomeren c-Ring. Darüber hinaus ist nicht gewiß, ob eine in organischem Lösungsmittel isolierte und gemessene c-Untereinheit die native Struktur widerspiegelt. Im Gegensatz dazu behielt der c-Ring aus *I. tartaricus* seinen oligomeren Zustand während der Aufreinigung und wurde in eine natürliche Umgebung aus Lipid eingebettet. Zuletzt sei noch erwähnt, dass *E. coli* und *I. tartaricus* nur 19% Sequenzidentität (und 46% Homologie) besitzen, was sich wiederum in kleinen Unterschieden niederschlagen kann.

c-Ring-Modelle

Verschiedene Modelle des c-Rings aus *E. coli*, die auf der NMR-Struktur des Monomers beruhen, sind vorgeschlagen worden (Dmitriev et al. 1999, Rastogi & Girvin 1999) (Abb. 44c, d). Überdies wurde das NMR-Modell benutzt, um die Dichte des c-Rings in der 3D-Dichtekarte des F_1C_{10} -Komplexes aus Hefe auszufüllen (Abb. 44b). Der Durchmesser und die Höhe der c-Ringe hängen direkt von der Anzahl der Untereinheiten bzw. der

Proteinlänge ab. Allen Modellen ist gemeinsam, dass der innere Ring aus der N-terminalen Helix und der äußere aus der C-terminalen Helix gebildet wird. Die äußere Helix weist einen Knick in ihrer Mitte (in der Nähe des konservierten Carboxylrestes) auf.

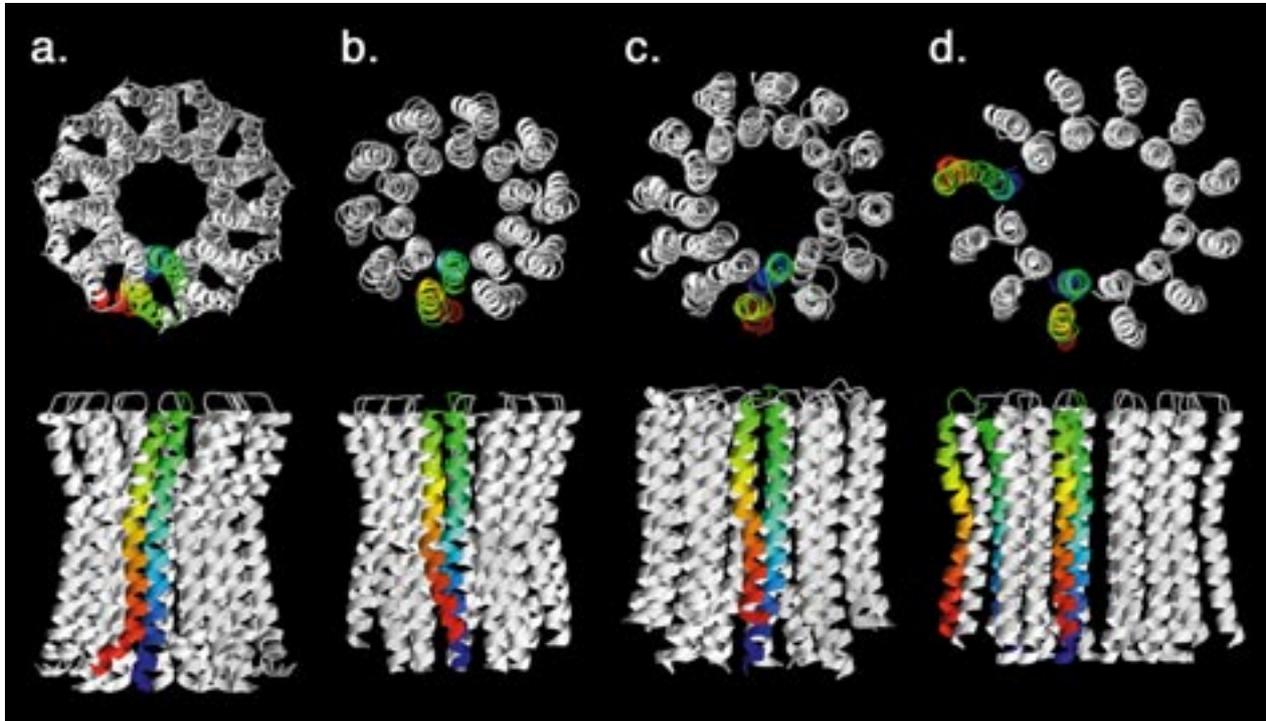


Abb. 44 Vergleich verschiedener c-Ring-Modelle. **Obere Reihe:** Aufsicht der cytoplasmatischen Seite senkrecht zur Membran. **Untere Reihe:** Seitenansicht. Eine Untereinheit ist von blau (N-Terminus) nach rot (C-Terminus) farblich hervorgehoben. **a.** *I. tartaricus* c_{11} -Modell, **b.** Mitochondrialer c_{10} -Ring aus Hefe (PDB 1qo1, Stock et al. 1999), **c.** *E. coli* c_{12} -Modell (PDB 1j7f, Dmitriev et al. 1999), **d.** *E. coli* c-Ring des ac_{12} -Modells. Eine deprotonierte c-Untereinheit ist links in Farbe dargestellt (PDB 1c17, Rastogi & Girvin 1999).

Die deutlichsten Unterschiede treten in der Anordnung der Helices des inneren und äußeren Ringes zueinander auf. Bis auf das *E. coli*-Modell von Rastogi & Girvin (1999) liegt die äußere Helix in einer Grube zwischen zwei inneren Helices. Wie oben besprochen kommt es dadurch zu einem engen Kontakt von drei Helices in der Mitte der Membran. In der offenen Konformation (Abb. 44d) müßte die Ionenbindungsstelle also anders aussehen. Sowohl die Bildung einer Li^+ -Bindungsstelle durch Mutation in *E. coli*, als auch die Protonen pumpende Triple-Mutante in *P. modestum* legen nahe, dass die Ionenbindungsstelle aller c-Untereinheiten ähnlich aufgebaut ist (Zhang & Fillingame 1995, Kaim et al. 1997).

Da aber die Modelle von Hefe und *I. tartaricus* auf kristallographischen Strukturen der oligomeren c-Untereinheit beruhen, scheint die gestaffelte Anordnung den *in vivo*-

Zustand darzustellen. Selbst das Modell von Dmitriev et al. (1999) kommt zu diesem Schluß. Im Gegensatz zu Rastogi & Girvin (1999) wurden die NMR-Abstände der Helices eines Monomers nicht eingeschränkt. Es ist gut vorstellbar, dass sich die Interaktion der inneren und äußeren Helix durch die Oligomerisierung verändert. So ließen sich die Differenzen der beiden letzten Modell erklären (Abb. 44c, d).

Große Unterschiede zwischen dem Arrangement der Untereinheiten im Ring von Hefe und *I. tartaricus* gehen auf unterschiedliche Winkel zwischen Teilen der Helices zurück (Abb. 44a, b). Der Grund dafür muss in der Interaktion der Seitenketten liegen. Vielleicht zwingen auch die Salzbrücken in *I. tartaricus* die Helices in eine andere Anordnung. Unter Umständen ist dies auch die Ursache für die unterschiedliche Anzahl an Untereinheiten im c-Ring.

5.2.6. Symmetry-Mismatch

Die bisher strukturell untersuchten c-Ringe weisen mit 10 in Hefe (Stock et al. 1999), 11 in *I. tartaricus* und 14 in Chloroplasten aus Spinat (Seelert et al. 2000) eine nicht durch drei teilbare Anzahl an c-Untereinheiten auf. Die langezeit postulierten 12 c-Untereinheiten pro Rotor in *E.coli* (Jones & Fillingame 1998, Jones et al. 1998) mußte in der Zwischenzeit auf 10 revidiert werden (Jiang et al. 2001), wodurch das Gesamtbild stimmig wird.

Obwohl in genetischen Experimenten (Jiang et al. 2001, Jones & Fillingame 1998) gezeigt werden konnte, dass c-Ringe mit ein oder zwei Untereinheiten mehr oder weniger funktionell sein können, darf davon ausgegangen werden, dass der Ring *in vivo* immer nur in einem oligomeren Zustand vorliegt (Müller et al. 2001).

Damit deutet alles auf einen „symmetry mismatch“ hin. Dieses Phänomen konnte schon bei anderen rotierenden Proteinkomplexen gefunden werden. Im Falle der DNA-Verpackungsmaschinerie des Bakteriophagen $\phi 29$ dreht sich der Konnektor mit 12 Untereinheiten in dem fünffach symmetrischen Vortex des Capsids unter ATP-Verbrauch (Simpson et al. 2000, Morais et al. 2001). Die ATP-abhängige Protease ClpAP aus *E. coli* besteht aus einem heptameren ClpA-Dimer, der von zwei axialen hexameren ClpA-Ringen in die Mitte genommen wird (Beuron et al. 1998). Der bisher

komplexeste, rotierende Motor wurde im Flagellenantrieb gefunden. Der so genannte Basalkörper-Komplex besteht aus Vielzahl von Proteinen, darunter sind zwei Ringe (Ring M aus 34 FlIF- und Ring C aus 26 FlIM/FlIN-Untereinheiten), die sich gegen 8 (oder 10) Generatoren (MotA-MotB) drehen (Thomas et al. 1999). Die Rotationsenergie stammt wie bei der F_1F_0 -ATP-Synthase aus einem Protonengradienten über der cytoplasmatischen Membran.

Auf alle Beispiele und die F_1F_0 -ATP-Synthase läßt sich die Theorie von Hendrix (1978) anwenden. Durch den Symmetry-Mismatch wird die Interaktionsenergie zweier oligomerer Ringstrukturen, die sich ineinander drehen, minimiert. Es wirkt wie ein Kugellager oder eine Schmierschicht (Abb. 45).

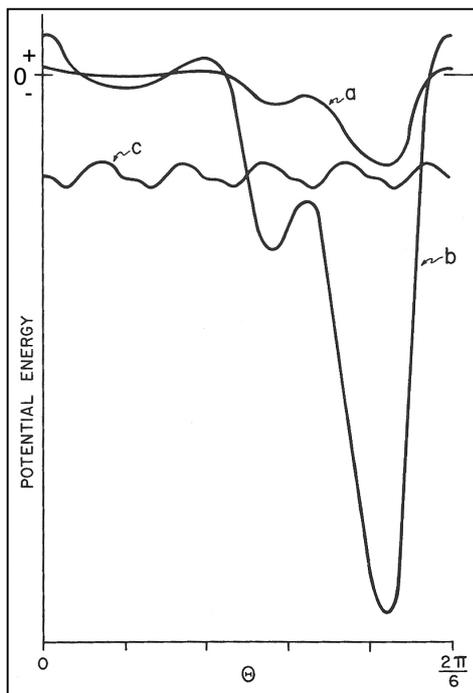


Abb. 45 Rotation mit und ohne Symmetry-Mismatch. Dargestellt ist die Beziehung zwischen der Interaktionsenergie und dem Rotationswinkel θ für zwei Proteinringe A und B. Null Potentialenergie repräsentiert keine Wechselwirkung, während negative Werte eine darstellen. **a:** Hypothetische Kurve für die Interaktion zwischen *einer* Untereinheit im Ring A und B. **b:** Kurve der *gesamten* Interaktion zwischen den Ringen A und B für die *gleiche* Anzahl von Untereinheiten abgeleitet von der Kurve a. **c:** Kurve der *gesamten* Interaktion zwischen den Ringen A und B für eine *ungleiche* Anzahl von Untereinheiten abgeleitet von der Kurve a (aus Hendrix 1978).

Für die F_1F_0 -ATP-Synthase folgt daraus, dass die drei Energieminima des F_1 -Kopfes bei der Dissoziation des gebildeten ATPs nicht mit Energieminima der Wechselwirkung zwischen der a- und c-Untereinheit zusammenfallen.

In einem Punkt unterscheidet sich die ATPase von den oben genannten Beispielen. Durch den zentralen Stiel der γ -Untereinheit enthält sie noch ein zusätzliches elastisches Element zwischen dem F_1 - und F_0 -Teil. Es besteht also keine direkte Wechselwirkung zwischen den oligomeren Komplexen, was die Rotation weiter erleichtern kann bzw. Energie zwischenspeichert (Junge et al. 2001, Cherapanov et al. 1999).

5.2.7. DCCD-markierte Kristalle

Obwohl durch das oben vorgestellte Modell eine grobe Lokalisation der Ionenbindungsstelle möglich wurde, wäre die Aufklärung der genauen Position von Glu65 wünschenswert gewesen. Da abzusehen war, dass ein atomares Modell, in dem man die Bindungsstelle anhand der Seitenkette (Glu65) identifizieren hätte können, nicht zu erreichen sein würde, mußte nach einem alternativen Weg gesucht werden. Es bestand die Hoffnung, dass durch die Markierung mit DCCD, das kovalent und spezifisch an die Carboxylgruppe von Glu65 bindet, eine genügend große Elektronendichte ($M_r = 206.33$) hinzugefügt werden würde, um in einer zu erstellenden Elektronendichtedifferenzkarte eine positive Dichte detektieren zu können.

Zur Erstellung einer solchen Differenzkarte ist es zwingend notwendig, dass beide 2D-Kristalle die gleiche Einheitszelle aufweisen, da einfach die Amplituden der beiden Datensätze voneinander abgezogen werden, um die Unterschiede in einer 3D-Differenzdichtekarte zu lokalisieren (Vonck 2000b).

2D-Kristallisation

Die Ergebnisse der Kristallisation des markierten Proteins und der Markierung der 2D-Kristalle sind im Endeffekt die selben, nur der Weg zu den beiden Kristallgittern war unterschiedlich. In beiden Fällen konnten keine großen, gut geordneten Kristalle vom $p1$ -Typ gezüchtet werden.

Die Veränderung der Ordnung der oligomeren c-Untereinheit in den 2D-Kristallen kann als Beweis gelten, dass eine effiziente Markierung mit DCCD erreicht wurde, obwohl nicht unter Natrium-freien Bedingungen gearbeitet wurde (zumindest wurden die 2D-Kristalle vor der Markierung in einen NaCl-freien Puffer überführt). Um dies sicher zu stellen, wurde aber auch ein zehnfach höhere DCCD-Konzentration wie bei der Markierung des c-Rings eingesetzt und länger inkubiert (Vergleiche zu Meier et al., in Vorbereitung).

Die Ursache für das geänderte Kristallisationsverhalten kann eigentlich nicht an einer sterischen Hinderung durch die DCCD-Reste liegen, da die Na^+ -Bindungsstelle in der Mitte des c-Rings liegt und der Abstand der beiden c-Ring an dieser Stelle mit etwa 12 Å

maximal ist (siehe Abb. 37). Vielmehr kann spekuliert werden, dass der große, hydrophobe DCCD-Rest den Glutamatrest aus der Ionenbindungsstelle herauszieht und dadurch die Konformation der äußeren Helix ändert. Diese Konformationsänderung könnte sich bis zu den Enden der Helix fortsetzen und dort den Kristallkontakt stören, bzw. eine engere Packung ermöglichen.

In der 2D-Projektionsdichtekarte konnte kein Unterschied zu den unmarkierten c-Ringen bzw. keine zusätzliche Dichte, die dem DCCD zugeordnet werden konnte, gefunden werden. Dafür ist die Masse von DCCD einfach zu gering. Größere Konformationsänderungen lassen sich aber ausschließen.

5.2.8. Ausblick

Die vorliegende 3D-Dichtekarte und das davon abgeleitete Modell der oligomeren c-Untereinheit aus *I. tartaricus* hat die Strukturaufklärung der F_1F_0 -ATPase ein großen Schritt weiter gebracht. Viele Einzelergebnisse aus Mutationsstudien und biochemischen Experimenten konnten integriert werden. Zum ersten Mal konnten strukturelle Beweise für das Ein-Kanal-Modell geliefert werden. Zusammen mit Daten aus anderen Organismen ergibt sich langsam ein einheitliches Bild.

Trotzdem muss betont werden, dass selbst eine hochauflösende Struktur des c-Rings das Rätsel der Kopplung des Ionentransports an die Drehung des Rotors und damit die Funktion des F_0 -Teiles nicht lösen könnte. Ohne das Pendant der a-Untereinheit läßt sich der Mechanismus nicht aufklären.

Die a-Untereinheit ist also das große Fragezeichen. Hier könnte die Methode der 2D-Kristallisation unter Umständen eine schnelle Antwort über den groben Aufbau geben. Da momentan noch nicht einmal klar ist, ob die a-Untereinheit die Membran fünf oder sechsmal durchspannt (Valiyaveetil & Fillingame 1998, Jäger et al. 1998), wäre eine aussagekräftige 2D-Projektionsdichtekarte, die die Anzahl der transmembranen α -Helices und deren Packung erkennen läßt, von großer Bedeutung. Ein darauf aufbauendes Topologiemodell könnte wiederum die vielen Einzelergebnisse vereinigen, zu einem Modell für die Interaktionsfläche zur c-Untereinheit führen und neue Experimente anregen.

6. Zusammenfassung

Das Photosystem II (PSII) und die F_1F_0 -ATP-Synthase, zwei Membranproteinkomplexen der Energieumwandlung, wurden im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet. Mittels zweidimensionaler (2D) Kristallisation und elektronenkristallographischen Methoden sollte die dreidimensionale (3D) Struktur aufgeklärt werden.

PSII katalysiert den ersten Schritt der Lichtreaktion der Photosynthese. Es ist für das Einfangen von Lichtquanten, die Anregung von Elektronen, die Freisetzung von Sauerstoff aus Wasser verantwortlich. Über 25 Untereinheiten sind an diesem Prozess in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten beteiligt. Ziel des ersten Projekts war die Verbesserung der 8 Å-Struktur des CP47-RC-Subkomplexes durch neue oder bessere 2D-Kristalle. Die Aufreinigung aus Spinat lieferte reproduzierbar eine gute Ausbeute an aktivem PSII. Das solubilisierte PSII enthielt genug endogenes Lipid, um es ohne den Zusatz von weiterem Lipid direkt durch Mikrodialyse zu rekonstituieren. Während der Rekonstitution verlor der PSII-Komplex CP43 und andere Untereinheiten, wahrscheinlich durch das Detergenz begünstigt, und ergab hoch geordnete Membranen aus CP47-RC. Die besten vesikulären 2D-Kristalle hatten eine tubuläre Morphologie und waren bis zu 1 µm breit und 3 µm lang. Elektronenmikroskopische Bilder unter Cryo-Bedingungen von ihnen aufgenommen zeigten nach der Bildverarbeitung Daten bis 6 Å. Durch Erhöhung der Zinkacetatkonzentration im Dialysepuffer konnten dünne 3D-Kristalle gezüchtet werden, die aus 2D-Kristallstapeln bestanden. Obwohl Elektronenbeugungsmuster Reflexe bis 4,5 Å aufwiesen, konnte auf Grund der unbekanntenen und veränderlichen Anzahl von Schichten keine 3D-Struktur erstellt werden. Weitere Versuche die Qualität der 2D-Kristalle von CP47-RC zu verbessern waren nicht erfolgreich. Durch die kürzliche Veröffentlichung der Röntgenkristallstruktur des dimeren PSII-Komplexes aus *Synechococcus elongatus* wurden weitere Untersuchungen eingestellt.

Im letzten Schritt der Energieumwandlungskette bildet die F_1F_0 -ATP-Synthase unter Ausnutzung eines elektrochemischen Gradienten schließlich ATP, die universelle Energieeinheit der Zelle. Die Struktur und Funktion des löslichen, katalytischen F_1 -Teils sind seit einigen Jahren im Detail bekannt. Im Gegensatz zeichnet sich die Struktur des membranintegrierten, Ionen-translozierenden F_0 -Teiles aus den Untereinheiten $a_b_2c_x$

erst langsam ab. Der c-Ring besteht in Hefe aus 10 und in Spinatchloroplasten aus 14 Untereinheiten. Ziel des zweiten Projekts war die Aufklärung der 3D-Struktur des sehr stabilen, undecameren c-Rings aus dem Bakterium *Ilyobacter tartaricus*, welches Na^+ als Kopplungsnutz nutzt. Große, tubuläre 2D-Kristalle mit einer Einheitszelle von $89,7 \times 91,7 \text{ \AA}$ und $p1$ -Symmetrie bildeten sich nach der Rekonstitution von gereinigten c-Ringen mit dem Lipid Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin, nachdem das Detergenz durch Mikrodialyse entzogen wurde. Bilder von in Trehalose eingebetteten 2D-Kristallen wurden im Elektronenmikroskop JEOL 3000 SFF bei 4 K aufgenommen. Ein 3D-Datensatz, bestehend aus 58 Bildern bis zu einem Kippwinkel von 45° , ermöglichte die Berechnung einer 3D-Dichtekarte mit einer Auflösung von 4 \AA in der Membranebene und 15 \AA senkrecht dazu. Die elffach symmetrisierte Karte eines c-Rings zeigt einen taillierten Zylinder mit einer Höhe von 70 \AA und einem äußeren Durchmesser von 50 \AA , der aus zwei konzentrischen Ringen von transmembranen α -Helices besteht. Ein C- α -Modell der c-Untereinheit, die eine helikale „hair pin“ bildet, konnte in die Dichte eingepaßt werden. Die inneren Helices sind nur $6,5 \text{ \AA}$ (Zentrum-zu-Zentrum-Abstand) voneinander entfernt um eine zentrale Öffnung von 17 \AA Durchmesser angeordnet. Die dichte Helixpackung wird durch ein konserviertes Motiv aus vier Glycinresten ermöglicht. Jede innere Helix ist mit einer äußeren, C-terminalen Helix über einen kurzen, wohl geordneten Loop auf der cytoplasmatischen Seite verbunden. Die äußere Helix weist in der Nähe der Ionenbindungsstelle einen Knick auf, der gleichzeitig in der Mitte der Membran liegt, wo sich die äußeren und inneren Helices am nächsten kommen. Dadurch wird es möglich, dass die Ionenbindungsstelle aus den Resten von zwei äußeren (Glu65, Ser66) und einer inneren Helix (Pro28) geformt wird. Zur Unterstützung der Ein-Kanal-Modell der Ionentranslokation konnte ein Zugang von der Ionenbindungsstelle zum Cytoplasma durch polare Reste in der c-Untereinheit vorgeschlagen werden. Des Weiteren kann spekuliert werden, dass drei Ionenbrücken zwischen den c-Untereinheiten für die hohe Temperaturstabilität des Oligomers von *I. tartaricus* verantwortlich sind.

Die Vorstellung dieses 3D-Modells des c-Rings ist ein erster Schritt hin zum Verständnis der Kopplung der Ionentranslokation an die Rotation der F_1F_0 -ATP-Synthase. Wenn die Struktur der a-Untereinheit gelöst worden ist, wird hoffentlich auch der Mechanismus des kleinsten, biologischen Rotationsmotors entschlüsselt werden.

7. Abstract

Photosystem II (PSII) and F_1F_0 ATP synthase, two membrane protein complexes involved in energy conversion, were studied in this thesis. Using two-dimensional (2D) crystals and electron crystallographic methods the determination of three dimensional (3D) structures of subcomplexes was the ultimate goal.

PSII catalyzes the first step of the light reaction in photosynthesis. It carries out the absorption of light quanta, energizes electrons to an excited state, and hydrolyzes water to liberate oxygen. PSII contains over 25 protein subunits and is found in the thylakoid membranes of chloroplasts. Aim of this study was to grow better or new crystals of the CP47-RC subcomplex to improve a current model at 8 Å resolution.

The purification from spinach leaves reproducibly provided active PSII with a good yield. Detergent solubilized PSII contained endogenous lipid, permitting the reconstitution by microdialysis without the addition of additional lipid. During reconstitution the PSII-complex lost CP43 and other subunits, probably facilitated by the detergent, yielding highly ordered arrays of the CP47-RC. Vesicular 2D-crystals suitable for electron crystallographic analysis had a tubular morphology and dimensions of up to 1 µm width and 3 µm length. Electron micrographs of these 2D-crystals taken under cryo conditions showed data to 6 Å after image processing. An increase in zinc acetate concentration in the dialysis buffer produced thin 3D-crystals consisting of stacks of 2D-crystals. Although electron diffraction patterns showed reflections up to 4.5 Å resolution, determination of a 3D structure was not possible, due to the unknown and variable number of layers. Further attempts to improve the quality of 2D-crystals of the CP47-RC subcomplex have not been successful. Recently, the structure of the dimeric PSII complex from *Synechococcus elongatus* was solved to 3.8 Å by x-ray crystallographic analysis, thus terminating further investigation.

In the last step of energy conversion F_1F_0 ATP synthase produces ATP by energetically coupling ATP synthesis to the flow of ions down their electrochemical gradient. Both structure and function of the soluble, catalytic F_1 -part have been elucidated. In contrast, the structure of the membrane integral ion translocating F_0 -part, comprising subunits a,

b, and c with ab_2c_x stoichiometry, is just starting to emerge. The c-ring has in yeast 10 and in spinach chloroplasts 14 c subunits. The objective of this work was to solve the 3D structure of the highly stable, eleven membered c-ring from the bacterium *Ilyobacter tartaricus*, which uses Na^+ as the coupling ion.

Large, tubular 2D-crystals with a unit cell of $89.7 \times 91.7 \text{ \AA}$ and $p1$ symmetry were formed by mixing purified oligomeric c subunit with the lipid palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine and detergent removal by microdialysis. Images of 2D-crystals embedded in trehalose were collected in a JEOL 3000 SFF electron microscope at a temperature of 4 K. The data set, including 58 images up to a tilt angle of 45° , allowed the calculation of a 3D density map with a resolution of 4 \AA in the membrane plane and 15 \AA normal to it.

The elevenfold symmetrised map of the c-ring shows a cylinder with a height of 70 \AA and an outside diameter of 50 \AA consisting of two concentric rings of transmembrane α -helices. A C- α -model of the c subunit, which forms a helical hairpin, could be fitted into the density. The inner helices are arranged around a central opening with a diameter of 17 \AA and are only 6.5 \AA (center to center distance) apart from each other. The tight helix packing is established through a highly conserved motif of four glycine residues in the N-terminal helix. Each inner helix is connected by a short loop on the cytoplasmic side with an outer, C-terminal helix. The outer helix has a kink near the ion-binding site, which lies in the middle of the membrane, where the outer helix most closely approaches the inner helices. Thereby, the ion-binding site is formed out of residues from two outer helices (Glu65, Ser66) and an inner helix (Pro28). In support of the one-channel model of ATPase ion translocation, possible access from the ion-binding site to the cytoplasm via polar residues in the c subunit is proposed. The periplasmatic half of the c-ring is largely hydrophobic, suggesting an entrance channel in the a subunit. Moreover three inter-subunit ion-bridges may account for the high temperature stability of the c-ring of *I. tartaricus*.

Presenting a 3D model for the c-ring is a first step towards understanding how the F_1F_0 ATP synthase couples ion translocation to rotation. When the structure of the a subunit is solved, we will hopefully elucidate the mechanism of this smallest rotatory motor in biology.

8. Literaturverzeichnis

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E. Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, 621-8 (1994)
- Amos, L.A., Henderson, R. and Unwin, P.N. Three-Dimensional Structure Determination by Electron Microscopy of Two-Dimensional Crystals. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **39**, 183-231 (1982)
- Auer, M. Röntgen- und elektronenkristallographische Untersuchungen an Membranproteinen. Dissertation, Frankfurt (1998)
- von Ballmoos, C., Appoldt, Y., Brunner, J., Granier, T., Vasella, A. & Dimroth, P. Membrane topography of the coupling ion binding site in Na⁺-translocating F₁F₀ ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3504-10 (2002)
- Barber, J., Andersson, B. Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 61-7 (1992)
- Barber, J., Nield, J., Morris, E., Zheleva, D., Hankamer, B. The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol. Plant.* **100**, 817-27 (1997)
- Belnap, D.M., Kumar, A., Folk, J.T., Smith, T.J., Baker, T.S. Low-resolution density maps from atomic models: how stepping "back" can be a step "forward". *J Struct Biol.* **125**, 166-75 (1999)
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-42 (2000)
- Berry, E.A., Huang, L.S., Zhang, Z., Kim, S.H. Structure of the avian mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *J Bioenerg Biomembr.* **31**, 177-90 (1999)
- Berthold, D.A., Babcock, G.T., Yocum, C.F. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.* **134**, 231-4 (1981)
- Beuron, F., Maurizi, M.R., Belnap, D.M., Kocsis, E., Booy, F.P., Kessel, M., Steven, A.C. At sixes and sevens: characterization of the symmetry mismatch of the ClpAP chaperone-assisted protease. *J Struct Biol.* **123**, 248-59 (1998)
- Blankenship, R.E., Prince, R.C. Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 382-3 (1985)
- Boekema, E., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A., Barber, J., Rögner, M. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 175-9 (1995)

- Boekema, E., Stuart, M., Koning, R.I., Keegstra, W., Brisson, A., Verheij, H.M., Dekker, J. A 7.4-Å projection structure of outer membrane phospholipase A from *E. coli* by electron crystallography. *J. Struct. Biol.* **123**, 67-71 (1998b)
- Boyer, P.D. The binding change mechanism for ATP synthase - some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta*, **1140**, 215-250 (1993)
- Braig, K., Menz, R.I., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., Walker, J.E. Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase inhibited by Mg(2+) ADP and aluminium fluoride. *Structure Fold Des.* **8**, 567-73 (2000)
- Bratt, C.E., Åkerlund, H.-E. Quantification of *n*-octyl β-D-glucopyranoside and *n*-dodecyl β-D-maltoside in biological samples by thin layer chromatography. *Physiol. Biochem.* **32**, 313-5 (1994)
- Brenner, S., Horne, R. A negative staining method for high-resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 103-10 (1959)
- Büchel, C., Morris, E., Barber, J. Crystallisation of CP43, a chlorophyll binding protein of photosystem II: an electron microscopy analysis of molecular packing. *J Struct Biol.* **131**, 181-6 (2000)
- Büldt, G., Gally, H.U., Seelig, A., Seelig, J., Zaccai, G. Neutron diffraction studies on selectively deuterated phospholipid bilayers. *Nature*, **271**, 182-4 (1978)
- Bullough, P.A., Henderson, R. Use of spot-scan procedure for recording low-dose micrographs of beam-sensitive specimens. *Ultramicroscopy*, **21**, 223-30 (1987)
- Butt, H.J., Wang, D.N., Hansma, P.K., Kühlbrandt, W. Effect of surface roughness of carbon support films on high-resolution electron diffraction of two-dimensional protein crystals. *Ultramicroscopy*, **36**, 307-18 (1991)
- Byrne, B., Iwata, S. Membrane protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 239-43 (2002)
- Cate, J.H., Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Earnest, T.N., Noller, H.F. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science*, **285**, 2095-104 (1999)
- Cherepanov, D.A., Mulkidjanian, A.Y., Junge, W. Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase. *FEBS Lett.* **449**, 1-6 (1999)
- Chiu, W., Schmid, M.F., Prasad, B.V. Teaching electron diffraction and imaging of macromolecules. *Biophys. J.* **64**, 1610-25 (1993)
- Cole, S.T., Condon, C., Lemire, B.D., Weiner, J.H. Molecular biology, biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase, a complex membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **811**, 381-403 (1985)

- Collaborative Computational Project, Number 4.. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-3 (1994)
- Collinson, I., Breyton, C., Duong, F., Tziatzios, C., Schubert, D., Or, E., Rapoport, T., Kühlbrandt, W. Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. *EMBO J.* **20**, 2462-71 (2001)
- Crowther, R.A., Henderson, R., Smith, J.M. MRC image processing programs. *J. Struct. Biol.* **116**, 9-16 (1996)
- Deisenhofer, J., Michel, H. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu Rev Cell Biol.* **7**, 1-23 (1991)
- Dekker, J.P., Betts, S.D., Yocum, C.F., Boekema, E.J. Characterization by electron microscopy of isolated particles and two-dimensional crystals of the CP47-D1-D2-cytochrome b-559 complex of photosystem II. *Biochemistry*, **29**, 3220-5 (1990)
- Dmitriev, O., Fillingame, R.H. Structure of Ala20Pro/Pro64Ala substituted subunit c of *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase in which the essential proline is switched between transmembrane helices. *J. Biol. Chem.* **276**, 27449-54 (2001)
- Dmitriev, O., Jones, P.C., Fillingame, R.H. Structure of the subunit c oligomer in the *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7785-90 (1999)
- Downing, K.H. Observations of restricted beam-induced specimen motion with small-spot illumination. *Ultramicroscopy*, **24**, 387-98 (1988)
- Downing, K.H. Spot-scan imaging in transmission electron microscopy. *Science*, **251**, 53-9 (1991)
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69-77 (1998)
- Dunn, S.D., Revington, M., Cipriano, D.J., Shilton, B.H. The b subunit of *Escherichia coli* ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr.* **32**, 347-55 (2000)
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowell, A.W., Schultz, P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quart. Rev. Biophys.* **21**, 129-228 (1988)
- Dux, L., Martonosi, A. Two-dimensional arrays of proteins in sarcoplasmic reticulum and purified Ca²⁺-ATPase vesicles treated with vanadate. *J. Biol. Chem.* **258**, 2599-603 (1983)
- Dux, L., Taylor, K.A., Ting-Beall, H.P., Martonosi, A. Crystallization of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum by calcium and lanthanide ions. *J. Biol. Chem.* **260**, 11730-43 (1985)

- Enami, I., Kamino, K., Shen, J.R., Satoh, K., Katoh, S. Isolation and characterization of photosystem II complexes which lack light-harvesting chlorophyll a/b proteins but retain three extrinsic proteins related to oxygen evolution from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, **977**, 33-9 (1989)
- Engel, A., Hoenger, A., Hefti, A., Henn, C., Ford, R.C., Kistler, J., Zulauf, M. Assembly of 2-D membrane protein crystals: Dynamics, crystal order, and fidelity of structure analysis by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **109**, 219-34 (1992)
- Esnouf, R.M. An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graphics Mod.* **15**, 132-4 (1997)
- Esnouf, R.M. Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Crystallogr. D*, **55**, 938-40 (1999)
- Essen, L., Siegert, R., Lehmann, W.D., Oesterhelt, D. Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**, 11673-8 (1998)
- Fork, D.C. Oxygen electrode. *Meth. Enzym.* **24**, 113-22 (1972)
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L.J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., Stroud, R.M. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, **290**, 481-6 (2000)
- Fujiyoshi, Y. High resolution cryo-electron microscopy for biological macromolecules. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, **38**, 97-101 (1989)
- Fujiyoshi, Y., Mizusaki, T., Morikawa, K., Yamagishi, H., Aoki, Y., Kihara, H., Harada, Y. Development of a Superfluid Helium Stage for High-Resolution Electron Microscopy. *Ultramicroscopy*, **38**, 241-51 (1991).
- Ghanotakis, D.F., de Paula, J.C., Demetriou, D.M., Bowlby, N.R., Babcock, G.T., Yocum, C.F. Isolation and characterization of the 47 kDa protein and the D1-D2-cytochrome b-559 complex. *Biochim. Biophys. Acta* **974**, 44-53 (1989)
- Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E. The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055-61 (2000)
- Girvin, M.E., Rastogi, V.K., Abildgaard, F., Markley, J.L., Fillingame, R.H. Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F₁F₀ ATP synthase. *Biochemistry*, **37**, 8817-24 (1998)
- Gomez, S.M., Nishio, J.N., Faull, K.F., Whitelegge, J.P. The chloroplast grana proteome defined by intact mass measurements from liquid chromatography mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **1**, 46-59 (2002)

- Grigorieff N. Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J. Mol. Biol.* **277**, 1033-46 (1998)
- Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., Friedrich, T. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **276**, 105-12 (1998)
- Guidotti, G. Membrane proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 731-52 (1972)
- Hadley, C., Jones, D.T. A systematic comparison of protein structure classifications: SCOP, CATH and FSSP. *Structure Fold Des.* **7**, 1099-112 (1999)
- Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Gerle, C., Barber, J. Three-dimensional structure of the photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy. *J Struct Biol.* **135**, 262-9 (2001)
- Havelka, W.A., Henderson, R., Oesterhelt, D. Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution. *J Mol Biol.* **247**, 726-38 (1995)
- Henderson, R., Structure of purple membrane from halobacterium halobium: Recording, measurement and evaluation of electron micrographs at 3.5 Å resolution. *Ultramicroscopy*, **19**, 147-78 (1986)
- Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Downing, K.H., Zemlin, F., Beckman, E. A model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **213**, 899-929 (1990)
- Henderson, R., Unwin, P.N. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature*, **257**, 28-32 (1975)
- Hendrix, R.W. Symmetry mismatch and DNA packaging in large bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4779-83 (1978)
- Hermolin, J., Dmitriev, O.Y., Zhang, Y. & Fillingame, R.H. Defining the domain of binding of F₁ subunit ε with the polar loop of F₀ subunit c in the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17011-6 (1999)
- Herz, J.M., Thomsen, W.J., Yarbrough, G.G. Molecular approaches to receptors as targets for drug discovery. *J Recept Signal Transduct Res*, **17**, 671-776 (1997)
- Heymann, J.A., Sarker, R., Hirai, T., Shi, D., Milne, J.L., Maloney, P.C., Subramaniam, S. Projection structure and molecular architecture of OxIT, a bacterial membrane transporter. *EMBO J.* **20**, 4408-13 (2001)
- Hirai, T., Heymann, J.A., Shi, D., Sarker, R., Maloney, P.C., Subramaniam, S. Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 597-600 (2002)
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex. *EMBO J.* **13**, 3423-9 (1994)

- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T., Michel, H. Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc_1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure Fold. Des.*, **8**, 669-84 (2000)
- International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921 (2001)
- Iverson, T.M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G., Rees, D.C. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science*, **284**, 1961-6 (1999)
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., Michel, H. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, **376**, 660-9 (1995)
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science*, **281**, 64-71 (1998)
- Jäger, H., Birkenhager, R., Stalz, W.D., Altendorf, K., Deckers-Hebestreit, G. Topology of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* **251**, 122-32 (1998)
- Jiang, W., Hermolin, J., Fillingame, R.H. The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4966-71 (2001)
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., Kjeldgaard, M. Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A*, **47**, 110-9 (1991)
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauss, N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**, 909-17 (2001)
- Junge, W., Panke, O., Cherepanov, D.A., Gumbiowski, K., Müller, M., Engelbrecht, S. Inter-subunit rotation and elastic power transmission in F_0F_1 -ATPase. *FEBS Lett.* **504**, 152-60 (2001)
- Kaim, G., Dimroth, P. Formation of a functionally active sodium-translocating hybrid F_1F_0 ATPase in *Escherichia coli* by homologous recombination. *Eur. J. Biochem.* **218**, 937-44 (1993)
- Kaim, G. & Dimroth, P. A double mutation in subunit c of the Na^+ -specific F_1F_0 -ATPase of *Propionigenium modestum* results in a switch from Na^+ to H^+ -coupled ATP synthesis in the *Escherichia coli* host cells. *J. Mol. Biol.* **253**, 726-38 (1995)
- Kaim, G., Dimroth, P. Voltage-generated torque drives the motor of the ATP synthase. *EMBO J.* **17**, 5887-95 (1998)

- Kaim, G., Matthey, U. & Dimroth, P. Mode of interaction of the single a subunit with the multimeric c subunits during the translocation of the coupling ions by F₁F₀ ATPases. *EMBO J.* **17**, 688-95 (1998)
- Kaim, G., Wehrle, F., Gerike, U., Dimroth, P. Molecular basis for the coupling ion selectivity of F₁F₀ ATP synthases: probing the liganding groups for Na⁺ and Li⁺ in the c subunit of the ATP synthase from *Propionigenium modestum*. *Biochemistry*, **36**, 9185-94 (1997)
- Kessel, M., Brennan, M.J., Trus, B.L., Bisher, M.E., Steven, A.C. Naturally crystalline porin in the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J. Mol. Biol.* **203**, 275-8 (1988)
- Klug, A., Berger, J.E. An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs and some observations on the mechanism of negative staining. *J. Mol. Biol.* **10**, 565-9 (1964)
- Krauss, N., Schubert, W.D., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H.T., Saenger, W. Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 965-73 (1996)
- Kraulis, P.J. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-50 (1991)
- Kühlbrandt, W. Two-dimensional crystallization of membrane proteins. *Quart. Rev. Biophys.* **25**, 1-49 (1992)
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y. Atomic model of light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, **367**, 614-21 (1994)
- Kunji, E.R., von Gronau, S., Oesterhelt, D., Henderson, R. 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. USA*, **97**, 4637-42 (2000)
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5 (1974)
- Lancaster, C.R., Kroger, A., Auer, M., Michel, H. Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature*, **402**, 377-85 (1999)
- Lange, C., Nett, J.H., Trumpower, B.L., Hunte, C. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc₁ complex structure. *EMBO J.* **20**, 6591-600 (2001)
- Laubinger, W., Dimroth, P. The sodium ion translocating adenosinetriphosphatase of *Propionigenium modestum* pumps protons at low sodium ion concentrations. *Biochemistry*, **28**, 7194-8 (1989)

- Li, X.P., Bjorkman, O., Shih, C, Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, **403**, 391-5 (2000)
- Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J.P., Lanyi, J.K. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **291**, 899-911 (1999)
- Lyon, M. Multiple crystal types reveal photosystem II to be a dimer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 403-19 (1998)
- Mannella, C.A. Phospholipase-induced crystallization of channels in mitochondrial outer membranes. *Science*, **224**, 165-6 (1984)
- Marr, K.M., McFeeters, R.L., Lyon, M. Isolation and structural analysis of two-dimensional crystals of photosystem II from *Hordeum vulgare viridis* zb63. *J. Struct. Biol.* **117**, 86-96 (1996)
- Matthey, U., Kaim, G., Braun, D., Wütrich, K., Dimroth, P. NMR studies of subunit c of the ATP synthase from *Propionigenium modestum* in dodecylsulphate micelles. *Eur. J. Biochem.* **261**, 459-467 (1999)
- Mattoo A., Hoffmann-Falk, H., Marder, J., Edelman, M. Regulation of protein metabolism: Degradation of the rapidly metabolized 32 kDa protein of the chloroplast membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1380-1384 (1984)
- Meier, T., Matthey, U., Henzen, F., Dimroth, P. & Müller, D.J. The central plug in the reconstituted undecameric c cylinder of a bacterial ATP synthase consists of phospholipids. *FEBS. Lett.* **505**, 353-6 (2001)
- Merritt, E.A., Bacon, D.J. Raster3D: Photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* **277**, 505-24 (1997)
- Michel, H. Membran proteins of known structure. <http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>, Stand: Juni 2002
- Michel, H., Deisenhofer, J. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochemistry*, **27**, 1-7 (1988)
- Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature*, **191**, 144-8 (1961)
- Mitchell, P. The proton motive Q cycle: A general formulation. *FEBS Lett.* **59**, 137-9 (1975)
- Morais, M.C., Tao, Y., Olson, N.H., Grimes, S., Jardine, P.J., Anderson, D.L., Baker, T.S., Rossmann, M.G. Cryoelectron-microscopy image reconstruction of symmetry mismatches in bacteriophage phi29. *J. Struct. Biol.* **135**, 38-46 (2001)
- Mosser, G., Breyton, C., Olofsson, A., Popot, J.L., Rigaud, J.L. Projection map of cytochrome b₆f complex at 8 Å resolution. *J Biol Chem.* **272**, 20263-8 (1997)

- Müller, D.J., Dencher, N.A., Meier, T., Dimroth, P., Suda, K., Stahlberg, H., Engel, A., Seelert, H., Matthey, U. ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor. *FEBS Lett.* **504**, 219-22 (2001)
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., Fujiyoshi, Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**, 599-605 (2000)
- Nakazato, K., Toyoshima, C., Enami, I., Inoue, Y. Two-dimensional crystallization and cryo-electron microscopy of photosystem II. *J. Mol. Biol.* **257**, 225-232 (1996)
- Neumann, S., Matthey, U., Kaim, G., Dimroth, P. Purification and properties of the F₁F₀ ATPase of *Ilyobacter tartaricus*, a sodium ion pump. *J. Bacteriol.* **180**, 3312-6 (1998)
- Nicholls, A., Sharp, K.A., Honig, B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins*, **11**, 281-96 (1991)
- Nield, J., Orlova, E.V., Morris, E.P., Gowen, B., van Heel, M., Barber, J. 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nat Struct Biol.* **7**, 44-7 (2000)
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. *Nature*, **386**, 299-302 (1997)
- Ogawa, H., Stokes, D.L., Sasabe, H., Toyoshima, C. Structure of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum: a view along the lipid bilayer at 9 Å resolution. *Biophys J.* **75**, 1-52 (1998)
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384-394 (1989)
- Rahlfs, S., Müller, V. Sequence of subunit c of the Na⁺-translocating F₁F₀ ATPase of *Acetobacterium woodii*: proposal for determinants of Na⁺ specificity as revealed by sequence comparisons. *FEBS Lett.* **404**, 269-71 (1997)
- Rastogi, V.K., Girvin, M.E. Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature*, **402**, 263-8 (1999)
- Reidlinger, J., Müller, V. Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na⁺-translocating F₁F₀-type enzyme. *Eur. J. Biochem.* **223**, 275-83 (1994)
- Reimer, L. Transmission electron microscopy, 3rd ed., Springer Verlag Berlin (1993)

- Rhee, K.H. Bestimmung der drei-dimensionalen Struktur des Photosystem-II-Reaktionszentrums mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie. Dissertation, Heidelberg (1998)
- Rhee, K.H., Morris, E.P., Kühlbrandt, W., Barber, J. Three-dimensional structure of photosystem II reaction center at 8 Å resolution. *Nature*, **396**, 283-6 (1998)
- Rhee, K.H., Morris, E.P., Zheleva, D., Hankamer, B., Kühlbrandt, W., Barber, J. Two-dimensional structure of plant photosystem II at 8 Å resolution. *Nature*, **389**, 522-6 (1997)
- Rigaud, J.L., Mosser, G., Lacapere, J.J., Olofsson, A., Levy, D., Ranck, J.L. Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J. Struct. Biol.* Apr;**118**, 226-35 (1997)
- Robinson, S.P. *Photosyn. Res.* **10**, 93-100 (1986)
- Rogl, H., Schodel, R., Lokstein, H., Kühlbrandt, W., Schubert, A. Assignment of spectral substructures to pigment-binding sites in higher plant light-harvesting complex LHC-II. *Biochemistry*, **41**, 2281-7 (2002)
- Rosenbusch, J.P. Stability of membrane proteins: relevance for the selection of appropriate methods for high-resolution structure determinations. *J. Struct. Biol.* **136**, 144-57 (2001)
- Sabbert, D., Engelbrecht, S., Junge, W. Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature*. **381**, 623-5 (1996)
- Schmidt-Krey, I., Lundqvist, G., Morgenstern, R., Hebert, H. Parameters for the two-dimensional crystallization of the membrane protein microsomal glutathione transferase. *J. Struct. Biol.* **123**, 87-96 (1998)
- Schmidt-Krey, I., Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Cheng, Y., Fujiyoshi, Y., Morgenstern, R., Hebert, H. The three-dimensional map of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution. *EMBO J.* **19**, 6311-6 (2000)
- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H., Muller, D.J. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**, 418-9 (2000)
- Simpson, A.A., Tao, Y., Leiman, P.G., Badasso, M.O., He, Y., Jardine, P.J., Olson, N.H., Morais, M.C., Grimes, S., Anderson, D.L., Baker, T.S., Rossmann, M.G. Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature*, **408**, 745-50 (2000)
- Singer, S.J., Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-31 (1972)
- Stahlberg, H., Braun, T., de Groot, B., Philippsen, A., Borgnia, M.J., Agre, P., Kühlbrandt, W., Engel, A. The 6.9-Å structure of GlpF: a basis for homology modeling of the glycerol channel from *Escherichia coli*. *J Struct Biol.* **132**, 133-41 (2000)

- Stahlberg, H., Müller, D.J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U., Dimroth, P. Bacterial Na⁺-ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO Reports* **2**, 229-33 (2001)
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G., Walker, J.E. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol.* **10**, 672-9 (2000)
- Stock, D., Leslie, A.G., Walker, J.E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-5 (1999)
- Stokes, D.L., Green, N.M. Structure of Ca-ATPase: electron microscopy of frozen-hydrated crystals at 6 Å resolution in projection. *J Mol Biol.* **213**, 529-38 (1990)
- Tate, C.G. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Lett.* **504**, 94-8 (2001)
- Terashima, I., Funayama, S., Sonoike, K. The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. *Planta* **193**, 300-6 (1994)
- Tews, I. Spotscan in der hochauflösenden Elektronenmikroskopie: Entwicklung und Anwendung. Diplomarbeit, Heidelberg (1991)
- The C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology. *Science*, **282**, 2012-8 (1998)
- Thomas, D.R., Morgan, D.G., DeRosier, D.J. Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**, 10134-9 (1999)
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, **405**, 647-55 (2000)
- Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F. Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* **389**, 203-6 (1997)
- Unger, V.M., Kumar, N.M., Gilula, N.B., Yeager, M. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* **283**, 1176-80 (1999)
- Unwin, P., Henderson, R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.* **94**, 425-40 (1975)
- Unwin, P.N., Zampighi, G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature*, **283**, 545-9 (1980)
- Valiyaveetil, F.I., Fillingame, R.H. Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase. *J Biol Chem.* **273**, 16241-7 (1998)

- Vik, S.B., Long, J.C., Wada, T., Zhang, D. A model for the structure of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochim Biophys Acta*. **1458**, 457-66 (2000)
- Volkman, N., Hanein, D. Quantitative fitting of atomic models into observed densities derived by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **125**, 176-84 (1999)
- Vonck, J. Parameters affecting specimen flatness of two-dimensional crystals for electron crystallography *Ultramicroscopy*, **85**,123-9 (2000a)
- Vonck, J. Structure of the bacteriorhodopsin mutant F219L N intermediate revealed by electron crystallography. *EMBO J.* **19**, 2152-60 (2000b)
- Walker, J.E., Saraste, M., Gay, N.J. The unc operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 164-200 (1984)
- Wallin, E., von Heijne, G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**, 1029-38 (1998)
- Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J.B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B.L., Agre, P. & Engel, A. The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature*, **387**, 624-7 (1997)
- Wang, D., Kühlbrandt, W. High-resolution electron crystallography of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex in three different media. *J. Mol. Biol.* **217**, 691-9 (1991)
- Watts, S.D., Tang, C., Capaldi, R.A. The stalk region of the *Escherichia coli* ATP synthase. Tyrosine 205 of the gamma subunit is in the interface between the F₁ and F₀ parts and can interact with both the epsilon and c oligomer. *J Biol Chem.* **271**, 28341-7 (1996)
- Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H. & Capaldi, R.A. The γ subunit in the *Escherichia coli* ATP synthase complex (ECF₁F₀) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F₀ part. *FEBS Lett.* **368**, 235-8 (1995)
- William, R.C., Fischer, H.W. Electron microscopy of tobacco mosaic virus under conditions of minimal beam exposure. *J. Mol. Biol.* **52**, 121-3 (1970)
- Williams, K.A. Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature*, **403**, 112-5 (2000)
- Williams, K.A., Geldmacher-Kaufer, U., Padan, E., Schuldiner, S., Kühlbrandt, W. Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0 Å resolution. *EMBO J.* **18**, 3558-63 (1999)
- Wriggers, W., Milligan, R.A., McCammon, J.A. Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **125**, 185-95 (1999)

- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. *Science*, **277**, 60-6 (1997)
- Yasuda R, Noji H, Kinosita K Jr, Yoshida M. F_1 -ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell*, **93**, 1117-24 (1998)
- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K. Jr., Itoh, H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F_1 -ATPase. *Nature*, **410**, 898-904 (2001)
- Zhang, Y., Fillingame, R.H. Changing the ion binding specificity of the *Escherichia coli* H^+ -transporting ATP synthase by directed mutagenesis of subunit c. *J. Biol. Chem.* **270**, 87-93 (1995)
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, **409**, 739-43 (2001)

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Krug von Nidda, Tassilo Godfrey Tesmar
Kelsterbacher Str. 44a
60528 Frankfurt am Main

Geboren am 05.10.1972 in Köln
Ledig, deutsch

Schulbildung

Aug. 1979 - Juni 1983
Aug. 1983 – Juni 1992
Aug. – Dez. 1989
Juni 1992

Kath. Grundschule Berrenrather Str. 179, Köln
Gymnasium Hildegard-von-Bingen Schule, Köln
Internat Denstone College, Staffordshire, England
Abitur an der Hildegard-von-Bingen Schule, Köln

Juli 1992 – Juni 1993

Wehrdienst

Juli - Sep. 1993

Praktikum in der Analytischen Abteilung des eco-Umweltlabors,
Engelbertstr., Köln

Studium

Nov. 1993 – Feb. 1999

Studium der Biochemie an der Universität Regensburg
Nebenfach: Röntgenstrukturanalyse (Prof. Range)
Forschungspraktika bei Prof. Buchner (Proteinchemie) und Prof
Kalbitzer (NMR)

Aug. 1996 – Juli 1997

Integriertes Auslandsstudium (IAS) an der University of Colorado at
Boulder im Rahmen eines DAAD-Stipendiums,
Forschung im Labor von Prof. C. Kundrot und Prof. J. Falke:
*Röntgenstrukturanalyse von GBP-Wildtyp und Mutanten mit
unterschiedlichen Metallionen im EF-Loop*

Juni 1998 – Jan. 1999

Externe Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik,
Frankfurt/Main (Prof. Kühlbrandt): *"2D Kristallisation und
Strukturuntersuchung am Photosystem-II Reaktionszentrum"*

Feb. 1999

Diplom in Biochemie

seit April 1999

Doktorand am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main in
der Abt. Strukturbiologie (Prof. Kühlbrandt)

Ergänzungen

Aug. 1998

XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Ungarn

Sep. 2000

EMBO Course: Cryo Electron Microscopy, Heidelberg

Nov. 2000

Jaques Monod Conference on Photosynthesis, Roscoff, Frankreich
(Poster, Postervortrag)

Juni 2001

Gordon Research Conference on 3D EM, Rhodes Island, USA
(Poster)

10. Danksagung

Ich danke ...

- ... *Dr. Werner Kühlbrandt* für die Möglichkeiten, die er mir in den letzten Jahren eröffnet hat.
- ... *Dr. Bernd Ludwig* für die offizielle Betreuung.
- ... *Dr. Janet Vonck* für die Zusammenarbeit am c-Ring-Projekt.
- ... *Thomas Meier* und der *Arbeitsgruppe Dimroth* für die Kooperation und den Gedankenaustausch im Falle des c-Ring-Projektes.
- ... *Dr. Vinzenz Unger*, meinem Mentor, der mir geholfen hat nicht nur die Bildverarbeitung zu verstehen, sondern die Prioritäten im Leben an sich.
- ... *Dr. Claudia Büchel* für hilfreiche Diskussion und Korrekturlesen im Zusammenhang mit dem PSII-Projekt.
- ... *Deryck Mills* für die Hilfe mit den Mikroskopen, *Johan Zeelen* für die gemeinsame Zeit im Labor und die Anzucht von Spinat.
- ... *Danka Elez* für die motivierenden Teestunden, *Matteo Lamborghini* für das gegenseitige Anspornen, *Sidonia v. Ledebur* für das Korrekturlesen.
- ... allen Kollegen im Labor und den Arbeitsgruppen von *Prof. Barber*, *Prof. Dismukes*, *Prof. Engel* und *Prof. Rögner* für den wissenschaftlichen Austausch und die Erweiterung meines Horizontes.
- ... allen, die noch bedacht werden sollten und hier in der Kürze nicht aufgeführt sind.

Techno ist tot! EBM ist tot! Es lebe die elektronische Tanzmusik!!! Peace!