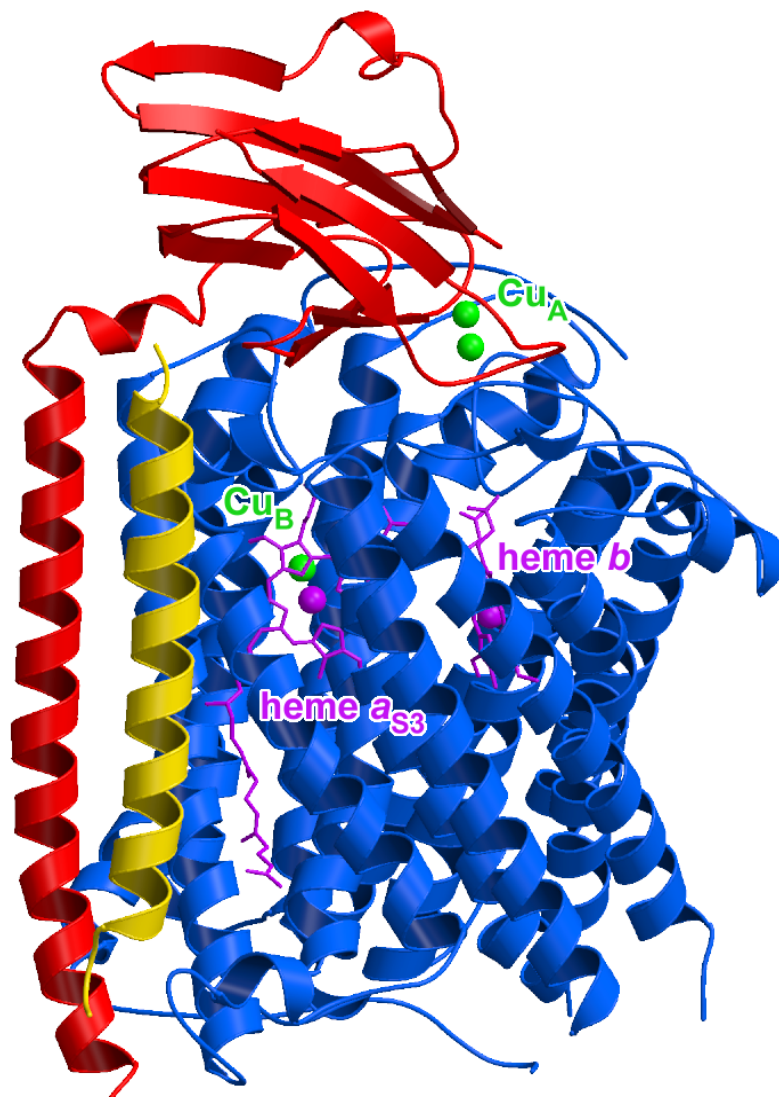


**Röntgenstrukturanalyse der *ba*<sub>3</sub> Cytochrom-*c*  
Oxidase aus *Thermus thermophilus* und ihres  
Substrates Cytochrom-*c*<sub>552</sub>**



Manuel E. Than  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung  
D-82152 Martinsried



Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

**Röntgenstrukturanalyse der *ba*<sub>3</sub> Cytochrom-*c* Oxidase  
aus *Thermus thermophilus* und ihres Substrates  
Cytochrom-*c*<sub>552</sub>**

Manuel E. Than

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

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. H. Schmidbaur
Prüfer der Dissertation	1. apl.-Prof. Dr. Dr. h. c. R. Huber 2. Univ.-Prof. Dr. M.-E. Michel-Beyerle 3. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 10.04.2000 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18.05.2000 angenommen.



***Meinen Eltern***



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturforschung des Max-Planck-Institutes für Biochemie in Planegg-Martinsried von August 1996 bis März 2000 unter der Leitung Herrn von Prof. Dr. Robert Huber angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die Überlassung der interessanten Themen, seine Unterstützung und sein fortwährendes Interesse am Fortschritt der Projekte danken. Seine stete Diskussionsbereitschaft, viele Anregungen und die große Freiheit bei der Arbeit haben zu einer sehr angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre beigetragen, die ich nicht missen möchte.

Herrn Dr. Tewfik Soulimane, RWTH-Aachen, danke ich für die Kristallisation des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> und der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase aus *Thermus thermophilus* sowie für die Einführung in die Proteinkristallisation. Ohne die Bereitstellung von unzähligen Kristallen der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase wäre die Charakterisierung des Transformationsverhaltens und damit die Strukturaufklärung dieses Proteins nicht möglich gewesen. Viele gemeinsame Diskussionen bezüglich dieser beiden Projekte aber auch so manche gemeinsame, freie Stunde waren für mich von großem Wert.

Herrn Dr. Reiner Kiefersauer danke ich für die Entwicklung einer Anlage zur kontrollierten Feuchteänderung von Proteinkristallen sowie für die Unterstützung bei vielen Versuchen zur Transformation von Kristallen der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase.

Herrn Dr. Wolfgang Reuter danke ich für die Kristalle des Allophycocyanin-Linker-Komplexes, AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup>, aus *Mastigocladus laminosus*. Frau Prof. Dr. Maria Romão sowie Herrn João Dias gilt mein Dank für die Unterbreitung des interessanten Phasierungsproblems bei der Strukturaufklärung der Nitrat Reduktase aus *Desulfovibrio desulfuricans*.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Hans Bartunik und Herrn Dr. Gleb Bourenkov für die ausgezeichnete Unterstützung bei den Aufenthalten am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

Großen Dank verdienen unsere Sekretärinnen, Frau Gina Beckmann und Frau Renate Rüller für die Hilfe bei der Überwindung unzähliger bürokratischer Hürden sowie die Herren Werner Dersch und Herbert Fischer für die Aufrechterhaltung der Funktion vieler Geräte und die Hilfe bei technischen Sonderwünschen.

Den Mitarbeitern des Institutsrechenzentrums, insbesondere Herrn Günther Franz, möchte ich für die Bereitstellung und Wartung der elektronischen Infrastruktur danken. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Dr. Dusan Turk, Jozef Stefan Institute in Ljubljana, für die Entwicklung meines bevorzugten kristallographischen Programmes MAIN.

Bei meinen Kollegen der Abteilung Strukturforschung, insbesondere bei Martin Augustin, Gerd Bader, Dr. Andreas Bergner, Dr. Tim Clausen, Anja Dorowski, Stephan Ehlert, Oliver Einsle, Daniela Jozic, Jens Kaiser, Dr. Peter Sondermann, Dr. Stefan Steinbacher und Tobias Ullrich, bedanke ich mich für das gute und hilfsbereite Arbeitsklima sowie die vielen schönen gemeinsamen Stunden. Mein besonderer Dank gilt den Herrn Dr. Peter Hof und Dr. Hans-Georg Beisel für die Einführung in die Kristallographie und unzählige Programme, Herrn Holger Dobbek für den engen Erfahrungsaustausch über die Transformation von Proteinkristallen sowie den Herren Ulf Marquardt und Dr. Jörg Schnackenberg für die Einführung in neue Labormethoden und die schöne Zeit bei vielen gemeinsamen, dienstlichen und außerdienstlichen Projekten.

Der Max-Planck-Gesellschaft vertreten durch Herrn Prof. Dr. Robert Huber sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft vertreten durch Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode danke ich für die finanzielle Unterstützung während der Zeit meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung, ihre Liebe und ihr Vertrauen in schwierigen und in schönen Zeiten. Ohne sie wäre mein Lebensweg und diese Dissertation nicht möglich gewesen. Ich teile mit ihnen die Freude an dieser Arbeit.



Teile dieser Arbeit sind bzw. werden veröffentlicht in:

T. Soulimane, M. von Walter, P. Hof, M. E. Than, R. Huber & G. Buse (1997) Cytochrome-*c*<sub>552</sub> from *Thermus thermophilus*: A functional and Crystallographic Investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 572-576.

M. E. Than, P. Hof, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, G. Buse & T. Soulimane (1997) *Thermus thermophilus* Cytochrome-*c*<sub>552</sub>: A New Highly Thermostable Cytochrome-*c* Structure Obtained by MAD Phasing. *J. Mol. Biol.* **271**, 629-644.

W. Reuter, G. Wiegand, R. Huber & M. E. Than (1998) Structural analysis at 2.2 Å of orthorhombic crystals presents the asymmetry of the allophycocyanin-linker complex, AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup>, from phycobilisomes of *Mastigocladus laminosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1363-1368.

J. Schnackenberg, M. E. Than, K. Mann, G. Wiegand, R. Huber & W. Reuter (1999) Amino Acid Sequence, Crystallization and Structure Determination of Reduced and Oxidized Cytochrome *c*<sub>6</sub> from the Green Alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Mol. Biol.* **290**, 1019-1030.

J. M. Dias, M. E. Than, A. Humm, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, S. Bursakov, J. Calvete, J. Caldeira, C. Carneiro, J. JG. Moura, I. Moura & M. J. Romão (1999) Crystal structure of the first dissimilatory nitrate reductase at 1.9 Å solved by MAD methods. *Structure*, **7**, 65-79.

T. Soulimane, G. Buse, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber & M. E. Than (2000) Structure and Mechanism of the Aberrant *ba*<sub>3</sub>-Cytochrome *c* Oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* **19**, 1766-1776.

T. Soulimane, M. E. Than, M. Dewor, R. Huber & G. Buse (2000) Primary Structure of a Novel Subunit in *ba*<sub>3</sub>-Cytochrome Oxidase from *Thermus thermophilus*. *Prot. Sci.* im Druck.

M. E. Than & T. Soulimane (2000) *ba*<sub>3</sub>-Cytochrome *c* Oxidase from *Thermus thermophilus*: An Aberrant Member of the Heme-Copper Oxidase Superfamily. *Handbook of Metalloproteins*, ed. K. Wieghardt, R. Huber, T. L. Poulos & A. Messerschmidt, John Wiley & Sons, in Vorbereitung.

R. Kiefersauer, M. E. Than, H. Dobbek, L. Gremer, M. Melero, S. Strobl, J. M. Dias, T. Soulimane & R. Huber (2000) A novel free-mounting system for protein crystals: Transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *J. Appl. Cryst.* im Druck.

Kongreßberichte:

M. E. Than, P. Hof, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, G. Buse & T. Soulimane (1997) A new cytochrome-*c* structure is responsible for the high thermostability of *Thermus thermophilus* *c*<sub>552</sub>. Vortrag bei der 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, 10.-12. März 1997 in Hamburg. Die Zusammenfassung ist abgedruckt in: *Z. Kristallogr. Suppl.* **12**, 19.

M. E. Than, P. Hof, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, G. Buse & T. Soulimane (1997) *Thermus thermophilus* cytochrome-*c*<sub>552</sub>: a new highly thermostable cytochrome-*c* structure obtained by MAD phasing. Poster Präsentation beim 11<sup>th</sup> Symposium der Protein Science Society, 12.-16. Juli 1997 in Boston, MA, USA. Die Zusammenfassung ist abgedruckt in: *Prot. Sci.* **6**, **Suppl. 2**, 95.

M. E. Than, A. Bergner, J. M. Dias, M. J. Romão & R. Huber (1999) Cluster phasing via PC-Refinement: Application to MIR & MAD cases. Poster Präsentation beim 5<sup>th</sup> European Workshop on Crystallography of Biological Macromolecules, 16.-20. Mai 1999 in Como, Italien.

M. E. Than (1999) Crystal transformation and MAD phasing leading to the structure of the *ba*<sub>3</sub> cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. Vortrag beim Workshop on Membrane Protein Structure Determination, 22.-25. September 1999 auf Schloß Ringberg.

M. E. Than, R. Kiefersauer, R. Huber, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, G. Buse & T. Soulimane (2000) Crystal Transformation and MAD-phasing leading to the Structure of the *ba*<sub>3</sub> Cytochrome *c* Oxidase from *Thermus thermophilus*. Vortrag beim der 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie, 13.-16. März in Aachen. Die Zusammenfassung ist abgedruckt in: *Z. Kristallogr. Suppl.* **17**, 12.

M. E. Than, R. Kiefersauer, T. Soulimane, G. Buse & R. Huber (2000) Crystal structure of the aberrant *ba*<sub>3</sub>-cytochrome-*c* oxidase from *Thermus thermophilus*: Crystal transformation and functional implications. Vortrag beim 2<sup>nd</sup> Symposium on Protein Structure Analysis for Biomedical Research, 30. März – 1. April in Murnau.

M. E. Than, R. Kiefersauer, T. Soulimane, G. Buse, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik & R. Huber (2000) The crystal structure of the thermophilic *ba*<sub>3</sub>-type cytochrome *c* oxidase; crystal transformation and MAD phasing. Vortrag bei der International School of Crystallography of Molecular Biology, 25. Mai – 4. Juni in Erice, Sizilien, Italien.

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abbildungsverzeichnis .....	iv
Tabellenverzeichnis.....	vi
Zusammenfassung .....	vii
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen .....</b>	<b>11</b>
2.1 Einkristalle von Proteinen .....	13
2.2 Erzeugung von Röntgenstrahlen .....	15
2.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen .....	17
2.4 Datensammlung und Datenauswertung.....	20
2.5 Das Phasenproblem .....	22
2.5.1 Isomorpher Ersatz.....	23
2.5.2 Multiple Anomale Dispersion .....	26
2.5.3 Molekularer Ersatz .....	28
2.6 Elektronendichtemodifikation .....	30
2.7 Interpretation der Elektronendichtekarte.....	31
2.8 Verfeinerung makromolekularer Strukturen .....	33
<b>3 Cytochrom-<i>c</i><sub>552</sub> aus <i>Thermus thermophilus</i> .....</b>	<b>37</b>
3.1 Materialien und Methoden .....	37
3.1.1 Kristallisation .....	37
3.1.2 Datensammlung und –auswertung .....	37
3.1.3 MAD-Phasierung.....	38
3.1.4 Modellbau und Verfeinerung .....	39
3.1.5 Strukturanalyse.....	39

---

3.1.6	Präparation reduzierter Kristalle und deren Analyse .....	40
3.2	Ergebnisse .....	41
3.2.1	Kristallisation .....	41
3.2.2	Datensammlung und –auswertung .....	41
3.2.3	MAD-Phasierung .....	41
3.2.4	Modellbau, Verfeinerung und Qualität der Modelle.....	42
3.2.5	Strukturbeschreibung .....	43
3.2.6	Vergleich zu anderen Cytochromen- <i>c</i> .....	45
3.2.7	Vergleich der reduzierten und oxidierten Struktur .....	52
3.3	Diskussion.....	54
3.3.1	Vergleich zu anderen Cytochromen- <i>c</i> .....	54
3.3.2	Thermostabilität .....	56
3.3.3	Redox Unterschiede .....	58
<b>4</b>	<b><i>Ba</i><sub>3</sub>-Typ Cytochrom-<i>c</i> Oxidase aus <i>Thermus thermophilus</i> .....</b>	<b>61</b>
4.1	Materialien und Methoden .....	61
4.1.1	Kristallisation .....	61
4.1.2	Transformation der Kristalle .....	61
4.1.2.1	Transformation mittels Öl.....	61
4.1.2.2	Transformation mittels Feuchteregulierung.....	62
4.1.3	Datensammlung und –auswertung .....	62
4.1.3.1	Daten zur MAD-Phasierung.....	62
4.1.3.2	Daten der verschiedenen Kristallzustände .....	63
4.1.4	MAD-Phasierung .....	64
4.1.5	Modellbau und Verfeinerung .....	65
4.1.6	Strukturanalyse.....	66
4.2	Ergebnisse .....	66

---

4.2.1	Kristallisation .....	66
4.2.2	Transformation der Kristalle .....	67
4.2.3	Datensammlung und –auswertung .....	72
4.2.4	MAD-Phasierung.....	73
4.2.5	Modellbau, Verfeinerung und Qualität der Modelle .....	74
4.2.6	Strukturbeschreibung.....	77
4.2.7	Vergleich zu anderen Cytochrom- <i>c</i> Oxidasen.....	85
4.2.8	Vergleich zwischen den verschiedenen Kristallzuständen.....	90
4.3	Diskussion .....	93
4.3.1	Kristalltransformation und Kryokristallographie .....	93
4.3.2	Vergleich zu anderen Cytochrom- <i>c</i> Oxidasen.....	99
4.3.3	Mechanistische Betrachtungen.....	100
4.3.3.1	Inter- und intramolekularer Elektronentransfer.....	101
4.3.3.2	Aktives Zentrum und Sauerstoffchemie.....	102
4.3.3.3	„Wasserpool“.....	105
4.3.3.4	Protonenkanäle .....	106
4.3.3.5	Kopplung von Sauerstoffchemie und Protonenpumpaktivität .....	108
4.3.3.6	Sauerstoffkanal.....	109
<b>5</b>	<b>Der AP•LC<sup>7,8</sup> Komplex aus <i>Mastigocladus laminosus</i>.....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Phasierung der <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Nitrat-Reduktase .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>119</b>
7.1	Kristallographische Begriffe .....	119
7.2	Nomenklatur der 20 proteinogenen Aminosäuren .....	121
7.3	Abkürzungen .....	122
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Schematische Darstellung der Atmungskette.....	3
Abb. 2: Katalytischer Zyklus der Cytochrom- <i>c</i> Oxidasen.....	6
Abb. 3: Schematische Darstellung der <i>ba</i> <sub>3</sub> Cytochrom- <i>c</i> Oxidase .....	8
Abb. 4: Anzahl der pro Jahr in der PDB hinterlegten Proteinstrukturen. ....	12
Abb. 5: Schematische Darstellung der Löslichkeitskurve eines Proteins .....	13
Abb. 6: Die Ewald Kugel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahles. ....	18
Abb. 7: Konstruktion der Proteinphasen beim Isomorphen Ersatz.....	24
Abb. 8: Dispersionsterme des Cytochrome- <i>c</i> <sub>552</sub> Kristalls.....	38
Abb. 9: Experimentelle Elektronendichtekarte des Cytochroms- <i>c</i> <sub>552</sub> .....	43
Abb. 10: Stereo-Ribbon-Darstellung des Cytochroms- <i>c</i> <sub>552</sub> aus <i>T. thermophilus</i> .....	45
Abb. 11: Stereodarstellung des Strukturvergleichs von Cytochrom- <i>c</i> <sub>552</sub> – Teil I.....	46
Abb. 12: Stereodarstellung des Strukturvergleichs von Cytochrom- <i>c</i> <sub>552</sub> – Teil II.....	47
Abb. 13: Stereodarstellung des Strukturvergleichs von Cytochrom- <i>c</i> <sub>552</sub> – Teil III .....	48
Abb. 14: Lage der Wassermoleküle im Pferdeherzcytochrom- <i>c</i> und Cytochrom- <i>c</i> <sub>552</sub> .....	50
Abb. 15: Oberflächenladungsverteilung im Pferdeherzcytochrom- <i>c</i> und Cytochrom- <i>c</i> <sub>552</sub> .53	
Abb. 16: Vergleich der beiden Oxidationszustände des Cytochroms- <i>c</i> <sub>552</sub> .....	54
Abb. 17: Apparatur zur Kristalltransformation mittels Feuchteregulierung.....	62
Abb. 18: Dispersionsterme des <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase Kristalls .....	64
Abb. 19: Veränderung der Zellabmessungen bei „nativen“ Kristallen der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase.....	67
Abb. 20: Diffraktionsbilder der Kristalltransformation mittels Öl .....	69
Abb. 21: Transformation der Kristalle der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase im Feuchtegradienten .....	71
Abb. 22: Experimentelle Elektronendichtekarte der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase .....	75
Abb. 23: Aminosäuresequenz der neuen Untereinheit IIa der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase .....	77
Abb. 24: Stereo-Ribbon-Darstellung der <i>ba</i> <sub>3</sub> Cytochrom- <i>c</i> Oxidase aus <i>T. Thermophilus</i> .77	
Abb. 25: Schematische Darstellung der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase in der Membran .....	79
Abb. 26: Koordination der Metallzentren in Untereinheit I.....	80

---

Abb. 27: Aktives Zentrum der $ba_3$ -Oxidase .....	80
Abb. 28: Koordination des $Cu_A$ -Zentrums .....	81
Abb. 29: Sauerstoff- und Protonenkanäle in der $ba_3$ -Oxidase .....	82
Abb. 30: Strukturbasiertes Sequenzalignment der Cytochrom- <i>c</i> Oxidasen .....	86
Abb. 31: Stereodarstellung der Elektronentransferwege in der $ba_3$ -Oxidase.....	87
Abb. 32: Elektronentransferkomplex der Rinderherz- und der $ba_3$ -Oxidase .....	88
Abb. 33: Vergleich der Untereinheiten I, II & IIa der $ba_3$ - und <i>P. denitrificans</i> Oxidasen .	89
Abb. 34: Kristallpackung der verschiedenen Kristallzustände .....	91
Abb. 35: Aktives Zentrum im 172 Å - Kristallzustand .....	93
Abb. 36: Mechanismus der Sauerstoffchemie in der $ba_3$ -Oxidase.....	104
Abb. 37: Ribbon-Darstellung des Allophycocyanin-Linker-Komplexes, AP•LC <sup>7,8</sup> .....	112
Abb. 38: Patterson-Korrelationsverfeinerung des [4Fe-4S]-Clusters .....	116
Abb. 39: Vergleich verschiedener Elektronendichtekarten der Nitrat-Reduktase .....	117

---

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Statistik der Datensammlung des Cytochroms- <i>c</i> <sub>552</sub> .....	42
Tab. 2: Statistik der Verfeinerung des Cytochroms- <i>c</i> <sub>552</sub> .....	44
Tab. 3: Ionenpaare im <i>T. thermophilus</i> Cytochrom- <i>c</i> <sub>552</sub> .....	51
Tab. 4: Statistik der Datensammlung der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase .....	73
Tab. 5: Statistik der Verfeinerung der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase .....	76
Tab. 6: Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen im <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase Kristall .....	92
Tab. 7: Kristallzustände der <i>ba</i> <sub>3</sub> -Oxidase .....	95



---

## **Zusammenfassung**

Die Cytochrom-*c* Oxidasen nehmen einen zentralen Platz im Energiemetabolismus aerober Organismen ein. Diese integralen Membranproteine katalysieren den letzten Schritt in der Elektronentransportkette, die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser, unter Konservierung der Energie in Form eines Transmembranpotentials, welches für die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), dem Hauptenergieträger in biologischen Systemen, notwendig ist.

Die dreidimensionale Struktur der *ba*<sub>3</sub> Cytochrom-*c* Oxidase aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus* wurde im Rahmen dieser Arbeit mit den Methoden der Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 2,4 Å aufgeklärt. Sie ist das erste Membranprotein, dessen Struktur mit Hilfe der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD) zur Bestimmung der Proteinphasen gelöst wurde. Hierbei wurde eine neue, dritte Untereinheit der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase identifiziert. Das strukturelle Verständnis von Funktion und Mechanismus dieses Enzyms wurde durch die Aufklärung der Struktur des Elektronendonors der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase, dem löslichen Cytochrom-*c*<sub>552</sub>, bei einer Auflösung von 1,28 Å vervollständigt.

Der auf den dreidimensionalen Strukturen basierende Sequenzvergleich der phylogenetisch sehr entfernten *ba*<sub>3</sub>-Oxidase zu den strukturell ebenfalls bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen aus *Paracoccus denitrificans* und dem Rinderherz führte zur Identifikation von Sequenzmotiven und strukturellen Details, die für die Funktion der terminalen Häm-Kupfer-Oxidasen essentiell erscheinen. Es konnte ein bisher unbeschriebener intramolekularer Elektronentransferweg, der vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum direkt zum Cu<sub>B</sub>-Atom des aktiven Zentrums führt, identifiziert werden. Die in allen strukturell bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen vorhandene Ansammlung von Wassermolekülen oberhalb der Häm-Propionate („Wasserpool“), fungiert mit hoher Wahrscheinlichkeit als primärer Akzeptor für gepumpte Protonen und das chemisch gebildete Wasser. Zu den spezifischen Eigenschaften der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase, die für die Funktion dieses Enzyms unter hohen Temperaturen und bei geringer Verfügbarkeit von Sauerstoff notwendig sind, gehören die Ausbildung eines hydrophob ausgekleideten und ausgedehnten Sauerstoffkanals, der von der Moleküloberfläche in der Mitte der Membran zum aktiven Zentrum führt sowie Veränderungen an den Protonenkanälen. Die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase enthält neben den klassischen K- und D-Protonenkanälen den zusätzlichen, potentiellen Q-Protonenkanal. Der binäre,

intermolekulare Elektronentransferkomplex aus Cytochrom-*c*<sub>552</sub> und der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase wird im Gegensatz zu anderen Enzymen dieser Klasse nicht durch elektrostatische Wechselwirkungen, sondern vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Weitere Aspekte der Protonenpumpaktivität dieser und anderer, terminaler Häm-Kupfer-Oxidasen werden diskutiert.

Die Struktur des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> führte weiterhin zur Identifizierung einer für die Thermostabilität dieses Proteins verantwortlichen Strukturvariationen, eine C-terminale Klammer, die den Rest des Proteins fest umschließt. Weiterhin tragen die hohe Hydrophobizität und Kompaktheit des Molekülinneren zur erhöhten Stabilität bei.

Die für die Strukturaufklärung der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase notwendige Charakterisierung des Transformationsverhaltens dieser Kristalle führte zur Entwicklung von Methoden, die für viele Proteinkristalle von großem Interesse sind. Durch eine gezielte Dehydratisierung durchlaufen die Kristalle der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase mehrere bevorzugte Zustände. Im Vergleich zu den nativen Kristallen führt dies zu einer starken Zunahme in der Streuleistung der Kristalle. Ein erfolgreiches Schockfrieren zur Vermeidung von Strahlenschäden während der Messung ist nur bei solchen Kristallen möglich, die durch Dehydratisierung in einen bei geringerem Lösungsmittelgehalt liegenden Zustand überführt wurden.

Im Rahmen der Strukturaufklärung der periplasmatischen Nitrat Reduktase aus *Desulfovibrio desulfuricans* konnten die Koordinaten der vier Eisenatome des [4Fe-4S]-Clusters unter Verwendung der bekannten Geometrie des Clusters und Patterson-Korrelationsverfeinerungen bestimmt werden, wodurch eine Phasierung mit den gemessenen MAD-Daten bis zu hoher Auflösung möglich wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin die Struktur des ersten Biliprotein-Linker-Komplexes aufgeklärt werden, was durch die Überwindung von statistischer Unordnung bei der Kristallisation in einer neuen Raumgruppe möglich wurde.

## 1 Einleitung

Die Zellen aller lebenden Organismen enthalten neben Wasser und verschiedenen kleinen organischen und anorganischen Substanzen eine Vielzahl von biologisch aktiven Makromolekülen, die sich in Proteine, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate unterteilen lassen. Die Proteine bilden hierbei die vielfältigste Gruppe. Neben strukturellen Funktionen sind sie als Enzyme an fast jeder chemische Reaktion, die in der Zelle stattfindet, beteiligt.

Proteine bestehen hauptsächlich aus den zwanzig proteinogenen  $\alpha$ -L-Aminosäuren, die in unterschiedlicher Anzahl und unterschiedlicher Abfolge eine über Peptidbindungen verknüpfte Polypeptidkette bilden. Die extreme Vielfalt an biochemischen Aktivitäten der Proteine, wird durch die räumliche Anordnung dieser verschiedenen Aminosäuren und eventueller Kofaktoren bestimmt. Die Analyse der drei dimensional Struktur der Proteine nimmt somit eine zentrale Stellung ein, um Funktion und Reaktionsmechanismus der Proteine zu verstehen und, soweit gewünscht, beeinflussen zu können.

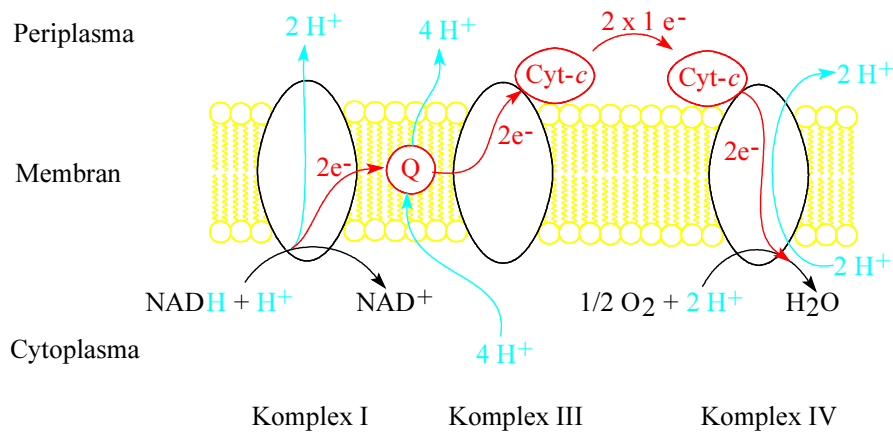
Neben vielen spektroskopischen Methoden, die in der Regel nur Informationen über einzelne oder wenige Parameter, wie zum Beispiel bestimmte Bindungslängen oder -winkel, liefern, kommen für die Strukturaufklärung von Proteinen im wesentlichen drei Methoden, die Kernresonanzspektroskopie, die Elektronenmikroskopie und die Röntgenstrukturanalyse, zum Einsatz. Während die Kernresonanzspektroskopie die Untersuchung von Proteinen in wässriger Lösung und somit in biologisch relevanter Umgebung ermöglicht, kann sie zur Zeit nur für biologische Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von maximal 30 kDa (ca. 300 Aminosäuren) eingesetzt werden. Die Elektronenmikroskopie stellt im Prinzip keinerlei Limits an die Größe der zu untersuchenden Makromoleküle oder Komplexe. Allerdings ist hier die Auflösung oft der limitierende Faktor. Die Röntgenstrukturanalyse liefert strukturelle Daten in fast atomarer Auflösung und findet Anwendung für Makromoleküle oder Komplexe bis zu einem Molekulargewicht von mindestens 2.000 kDa (20.000 Aminosäuren). Sie kann damit für die meisten biologisch relevanten Systeme sinnvoll eingesetzt werden.

Die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen und Proteinkomplexen hat sich in den letzten Jahren als eine zentrale Methode in der biochemischen Forschung etabliert, was sich vor allem auf zwei Punkte zurückführen läßt. Dies ist zum einen das große Maß an detaillierten strukturellen Informationen, die mit dieser Methode zugänglich sind und damit verbunden tiefgreifende Einsichten in die Funktionsweise der untersuchten Moleküle oder Komplexe. Hierbei sei besonders auf das auf Röntgenstrukturen beruhende, gezielte Design von biologisch aktiven Kleinmolekülen hingewiesen, eine Methode, die vor allem für die Entwicklung neuer Pharmaka, Herbizide oder Pestizide zunehmend an Interesse gewinnt. Zum anderen haben insbesondere während der letzten zehn bis fünfzehn Jahre viele neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Röntgenstrukturanalyse selbst aber auch auf den Gebieten der Molekularbiologie und der Rechentechnik die zum Erstellen einer solchen Röntgenstruktur benötigte Zeit deutlich verringert.

Jede lebende Zelle ist darauf angewiesen, ausreichend Energie in einer biologisch verwertbaren Form für alle lebensnotwendigen Vorgänge bereitzustellen. Dieser Energiemetabolismus basiert entweder primär auf der Energie des Sonnenlichtes (autotrophe Organismen) oder auf der gezielten exothermen Verbrennung von energiereichen organischen oder anorganischen Verbindungen (heterotrophe Organismen). In beiden Fällen spielen vielfältige Redox-Reaktionen sowie ein gezielter Transfer von Elektronen zwischen verschiedenen Molekülen oder allgemeiner eine hoch regulierte und kontrollierte Umsetzung des primären Energieträgers in biologisch verwertbare und speicherbare Energieformen eine zentrale Rolle. Die gezielte Umsetzung von Energie verhindert, daß ein lebender Organismus ins thermodynamische Gleichgewicht gelangt und stellt zusammen mit der Fähigkeit zur Reproduktion die Charakteristiken dar, die die lebende von der nicht lebenden Materie unterscheiden. Die Untersuchung des Energiemetabolismus der verschiedenen Organismen ist somit ein Schlüssel, um den historisch auch als „Lebenskraft“ bezeichneten Unterschied zwischen der lebenden und der nicht lebenden Materie zu verstehen.

Die Atmungskette stellt eine funktionelle Einheit innerhalb des heterotrophen Energiemetabolismus aerober Organismen dar, die den Hauptanteil der in der Nahrung gespeicherten Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) für den Organismus bereitstellt. Die mit der Nahrung aufgenommenen energiereichen organischen Verbindungen, wie z.B. Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße werden von verschiedenen

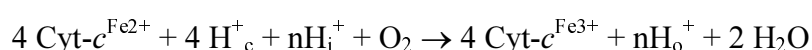
Enzymen zum Zweck der Energiegewinnung primär in biologisch gebundenen Wasserstoff (reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid,  $\text{NADH}/\text{H}^+$ ) umgewandelt. Die Atmungskette katalysiert die biologisch kontrollierte Verbrennung dieses Wasserstoffes unter Konservierung der Energie in Form eines Transmembranpotentials, welches von der  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATPase zur Bildung von ATP konsumiert wird (Saraste, 1999; Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Atmungskette**

Die integralen Membranproteinkomplexe der Atmungskette liegen bei aeroben Bakterien in der Zellmembran und bei Eukaryonten in der inneren Mitochondrienmembran. Das membranlösliche Coenzym Q ist durch „Q“ und das lösliche Cytochrom-c durch Cyt-c symbolisiert. Die Richtung des vektoriellen Protonentransfers verläuft vom Cytoplasma (Bakterien) bzw. der Matrix (Mitochondrien) zum Periplasma (Bakterien) bzw. Intermembranraum (Mitochondrien).

Die Elektronen werden schrittweise von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf molekularen Sauerstoff übertragen. Lösliches Cytochrom-c ist hierbei für den Transfer der Elektronen von  $bc_1$ -Komplex (Komplex III) zur Cytochrom-c Oxidase (Komplex IV) verantwortlich. Die terminale Oxidase katalysiert die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser, wobei zur Konservierung der Energie in Form des Transmembranpotentials sowohl der Verbrauch von Protonen und Elektronen auf entgegengesetzten Seiten der Membran als auch das vektorielle Pumpen von zusätzlichen Protonen beitragen. Einige bakterielle, terminale Oxidasen benutzen Ubichinol als Substrat (Chinol Oxidasen). In Einklang mit der Homologie ihrer Primärstrukturen werden beide Formen der terminalen Oxidasen in die Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen („heme copper oxidases“) eingeordnet (Saraste, 1990; Garcia-Horsman *et al.*, 1994; Ferguson-Miller & Babcock, 1996). Die von den Cytochrom-c Oxidasen katalysierte Reaktion lautet wie folgt:



Hierbei beschreiben  $H^+_i$  und  $H^+_o$  die Protonen, die von der Innenseite (i, Cytoplasma in Bakterien) zur Außenseite (o, Periplasma bei Bakterien) der Membran gepumpt werden und  $H^+_c$  die Protonen, die für die Wasserbildung „chemisch“ (c) verbraucht werden.

Viele Aspekte der Funktion der terminalen Oxidasen innerhalb der Atmungskette konnten in den letzten Jahrzehnten aufgeklärt werden. Dazu gehören der Nachweis der Protonenpumpaktivität (Wikström, 1977), die Bestimmung der Stoichiometrie der Redox-Zentren und die Zuordnung von zwei Kupferatomen zu einem binuklearen  $Cu_A$ -Zentrum in Untereinheit II (Steffens *et al.*, 1987; Steffens *et al.*, 1993) sowie die Etablierung eines Mechanismus für die Sauerstoffchemie am aktiven Zentrum verbunden mit der Identifikation der Schritte im Reaktionsmechanismus, die zum Pumpen von Protonen gekoppelt sind (Wikström, 1989; Babcock & Wikström, 1992). Neuere Daten, widerlegen diese klassischen Arbeiten zum Mechanismus der Cytochrom-*c* Oxidasen jedoch zum Teil, so daß sowohl die Details der Sauerstoffchemie als auch die energetische Kopplung dieser zur Protonenpumpaktivität momentan sehr kontrovers diskutiert werden (Gennis, 1998b,c; Michel, 1998a,b; Michel, 1999; Verkhovsky, 1999). Die Identifikation von Intermediaten der Sauerstoffchemie basiert im wesentlichen auf spektroskopischen Untersuchungen (Kitagawa & Ogura, 1997; Michel *et al.*, 1998a) wobei MacMillan *et al.* (1999) zeigen konnten, daß im sogenannten Peroxy-Zustand der Oxidasen ein Tyrosin-Radikal vorliegt. Hierdurch konnte endgültig nachgewiesen werden, daß in diesem Zustand die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung bereits durch eine Radikalreaktion gebrochen ist (Gennis, 1998a; Buse *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). Die energetische Kopplung von Sauerstoffchemie und Protonenpumpaktivität wird im wesentlichen durch zeitaufgelöste Studien zur Bildung des Transmembranpotentials untersucht (Zaslavsky *et al.*, 1993; Verkhovsky *et al.*, 1997; Jasaitis *et al.*, 1999; Siletsky *et al.*, 1999b).

Die Kristallstrukturen von zwei terminalen Oxidasen, der Cytochrom-*c* Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*, bestehend aus entweder 2 (Ostermeier *et al.*, 1997) oder 4 Untereinheiten (Iwata *et al.*, 1995), sowie der 13 Untereinheiten umfassenden Rinderherz Cytochrom-*c* Oxidase (Tsukihara *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998) konnten in den letzten Jahren gelöst werden. Weiterhin wurden zwei Strukturen der löslichen, Kupfer bindenden Domäne (Untereinheit II ohne Transmembrananker) berichtet. Diese stammen von der *Escherichia coli* Chinol Oxidase (Wilmanns *et al.*, 1995), wobei hier Mutationen zur Wiederherstellung des in den Chinol Oxidasen nicht vorhandenen

Cu<sub>A</sub>-Zentrums eingeführt wurden, sowie von der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase aus *T. thermophilus* (Williams *et al.*, 1999).

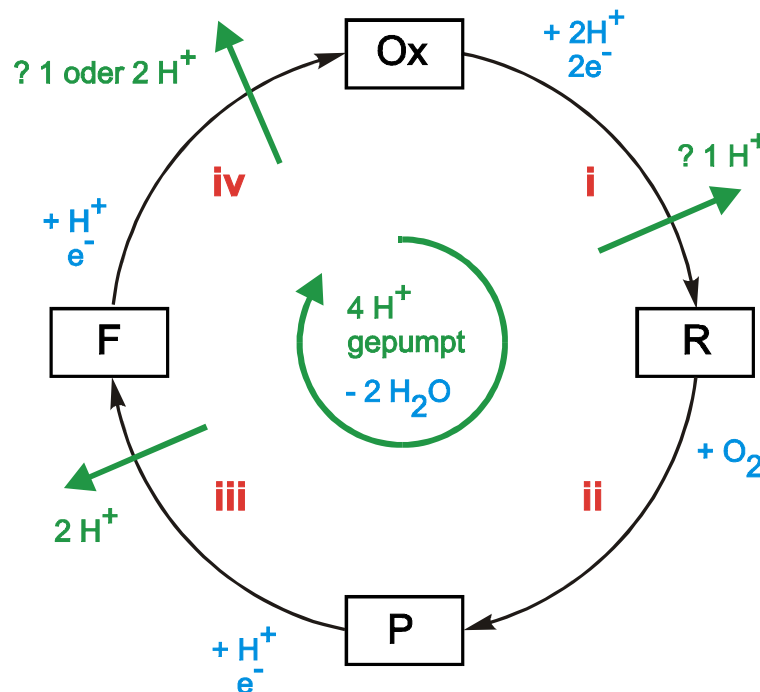
Zwei wichtige Aussagen dieser Strukturuntersuchungen sind neben der generellen strukturellen Charakterisierung dieser Enzyme (i) die Identifizierung einer kovalenten Bindung am aktiven Zentrum zwischen His-233 und Tyr-237 (Numerierung entsprechend der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase), die durch proteinchemische Untersuchungen bestätigt wurde (Buse *et al.*, 1999) sowie (ii) die Beschreibung von Kanälen (Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996; Ostermeier *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1998), die für den gerichteten Transport der Protonen durch das hydrophobe Innere des Transmembranbereiches der Enzyme verantwortlich sind. Diese Protonenkanäle werden als K-, D- und H- (Rinderherzoxidase) oder E-Kanäle (*P. denitrificans* Oxidase) entsprechend den konservierten Aminosäureresten Lys-354<sup>P\*</sup>, Asp-124<sup>P</sup> und His-413 (Rinderherzoxidase) oder Glu-442<sup>P</sup> (Pfitzner *et al.*, 1998) bezeichnet. Die K- und D- Protonenkanäle wurden ursprünglich durch Mutagenese-Experimente postuliert und ihre funktionelle Relevanz durch weitere Mutagenese-Studien bestätigt (Gennis, 1998a).

Trotz dieser Vielfalt an strukturellen, spektroskopischen und kinetischen Daten bezüglich verschiedener Häm-Kupfer-Oxidasen und zahlreicher Mutanten, sind viele Details der Sauerstoffchemie, der Protonenpumpaktivität und des Elektronentransfers bisher nur teilweise oder nicht verstanden. Im Rahmen des aktuellen Verständnisses, kann der katalytische Zyklus der Cytochrom-*c* Oxidasen im wesentlichen in vier Schritten beschrieben werden (Abb. 2): (i) Die Reduktion des oxidierten Enzyms durch zwei Elektronen die parallel zur Aufnahme von zwei Protonen von der Innenseite der Membran verlaufen, bereitet das aktive Zentrum zum Binden von Sauerstoff vor. (ii) Der molekulare Sauerstoff wird durch diese beiden Elektronen zum Peroxy-Redoxzustand reduziert und die Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung in einer Radikalreaktion durch den Transfer eines Wasserstoffatoms vom Tyr-237 des aktiven Zentrums gebrochen. (iii) Die Reduktion des Enzyms durch das dritte Elektron und die Aufnahme eines weiteren Protons von der Innenseite der Membran führt die Oxidase in der Ferryl-Zustand über, der durch ein

---

\* Die unmarkierte Aminosäurenummerierung bezieht sich auf die *T. thermophilus ba*<sub>3</sub>-Oxidase. Aminosäuren, die sich auf die Cytochrom-*c* Oxidase aus *P. denitrificans* (Ostermeier *et al.*, 1997) beziehen sind durch ein hochgestelltes „P“ gekennzeichnet.

vierwertiges Häm  $a_3$  Eisen ( $\text{Fe}^{\text{IV}}$ ) gekennzeichnet ist. (iv) Die Reduktion durch das vierte Elektron, die wiederum zur Aufnahme eines Protons von der Innenseite der Membran gekoppelt ist, vollendet den katalytischen Zyklus und resultiert in der oxidierten Form des Enzyms. Während dieses Prozesses werden zwei Wassermoleküle gebildet und weitere Protonen von der Innenseite zur Außenseite der Membran gepumpt. Die ersten beiden Schritte werden auch als Eu-Oxidase-Halbreaktion und die letzten beiden Schritte als Peroxidase-Halbreaktion bezeichnet. Die funktionelle Relevanz des K-Protonenkanals konnte spezifisch der Eu-Oxidase-Aktivität und die des D-Protonenkanals der Peroxidase-Aktivität zugewiesen werden (Konstantinov *et al.*, 1997).



**Abb. 2: Katalytischer Zyklus der Cytochrom-*c* Oxidasen**

Die vier Schritte des Katalytischen Zyklus (i-iv), die durch den oxidierten (Ox), den reduzierten (R), den Peroxy- (P) und den Ferrylzustand (F) der Oxidasen führen sind mit der Aufnahme von insgesamt 4 Elektronen, 4 Protonen und einem Sauerstoffmolekül gekoppelt und führen zur Bildung von 2 Wassermolekülen (blau). Zusätzlich werden bei den „typischen“ Cytochrom-*c* Oxidasen 4 Protonen von der Innenseite zur Außenseite der Membran gepumpt (grün). Diese Protonenpumpaktivität bezieht sich nach den momentan diskutierten Modellen entweder auf die Schritte i, iii und iv (Michel, 1998b) oder nur auf die Schritte iii und iv (Wikström, 1989). Für eine nähere Diskussion siehe auch Gennis (1998c).

Die für den katalytischen Zyklus der Cytochrom-*c* Oxidasen erforderlichen Elektronentransferschritte können in den intermolekularen Elektronentransfer vom Cytochrom-*c* zum binuklearen  $\text{Cu}_A$ -Zentrum von Untereinheit II und den folgenden intramolekularen Transfer der Elektronen zum aktiven Zentrum unterteilt werden. Der

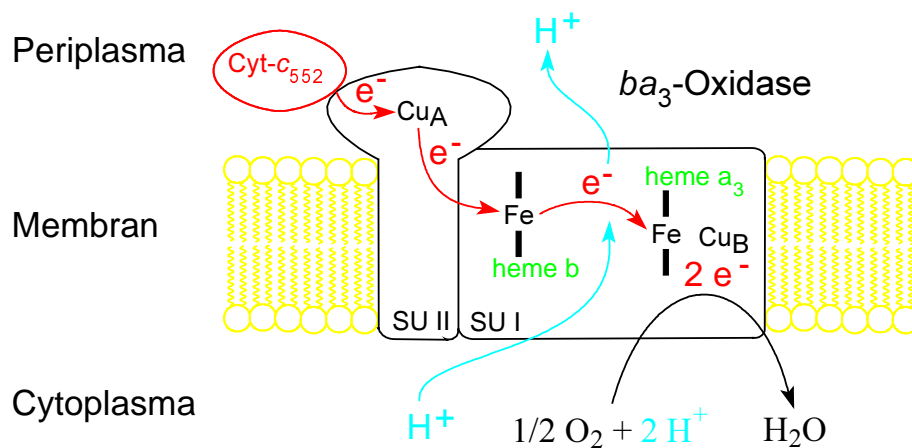


erste Schritt stellt eine bimolekulare Reaktion dar, bei der sowohl die Ausbildung des Elektronentransferkomplexes aus der membrangebundenen Oxidase und dem löslichen Cytochrom-*c* als auch die Kinetik des eigentlichen Elektronenübergangs auf das Cu<sub>A</sub>-Zentrum von Bedeutung sind. Das üblicherweise basische Cytochrom-*c* bindet hierbei an einen negativ geladenen Bereich der periplasmatischen Oberfläche von Untereinheit II in der Nähe des Cu<sub>A</sub>-Zentrums und für den eigentlichen Elektronentransferweg vom solvensexponierten Pyrrol-Ring C des Cytochroms zum Cu<sub>A</sub>-Zentrum werden aromatische Aminosäureseitenketten von Untereinheit II diskutiert (Witt *et al.*, 1998a,b). Für den intramolekularen Elektronentransfer vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum zu dem aus Häm *a*<sub>3</sub> und dem Cu<sub>B</sub>-Atom bestehenden aktiven Zentrum wird im wesentlichen ein über das zweite Häm führender Weg beschrieben. Zwei stark konservierte Arginine überbrücken hierbei den Weg vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum zu den Propionaten des Häms *a* (entspricht dem Häm *b* in der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase; Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996). Alternativ wird ein ausschließlich auf quantenmechanische Tunneleffekten beruhender intramolekularer Elektronentransfermechanismus diskutiert (Page *et al.*, 1999).

Das thermophile Eubakterium *T. thermophilus*, das bei ca. 70 °C wächst, setzt in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Medium zwei unterschiedliche terminale Cytochrom-*c* Oxidasen, die *caa*<sub>3</sub>- und die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase, ein (Fee *et al.*, 1980; Zimmermann *et al.*, 1988). Die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase wird nur unter Sauerstoffmangel exprimiert und ist zusammen mit ihrem Substrat Cytochrom-*c*<sub>552</sub> für die funktionelle Erhaltung der Elektronentransportkette unter diesen Bedingungen verantwortlich. Die *caa*<sub>3</sub>-Oxidase zeigt wahrscheinlich keine ausreichende katalytische Effizienz unter geringen Sauerstoffkonzentrationen (Soulimane *et al.*, 1997). Das unter diesen Bedingungen verringerte chemische Potential für die Reduktion von molekularem Sauerstoff könnte hierbei durch die verringerte Protonenpumpaktivität der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase von nur 0,4 – 0,5 gepumpten Protonen pro Elektron im Vergleich zu einer Stoichiometrie von 1,0 H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> kompensiert werden (Kannt *et al.*, 1998).

Die von der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase katalysierte Reaktion ist schematisch in Abb. 3 dargestellt. Sie zeigt im Vergleich zu den entsprechenden Enzymen anderer Organismen zusammen mit ihrem Substrat Cytochrom-*c*<sub>552</sub> (Soulimane *et al.*, 1997) eine Reihe von atypischen Eigenschaften. Neben der verringerten Protonenpumpaktivität zeigt dieses Enzym eine untypische Reaktivität gegenüber exogenen Häm *a*<sub>3</sub> Liganden (z.B.: CN<sup>-</sup>, CO, NO oder

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cyanid bindet an das reduzierte aber nicht an das oxidierte Häm a<sub>3</sub> der ba<sub>3</sub>-Oxidase, während die Bindung im oxidierten Zustand anderer Oxidasen deutlich stärker ist (Giuffré *et al.*, 1999). Die Affinität des Cu<sub>B</sub> Atoms für Kohlenmonoxid ist hingegen 50-100 fach höher für die ba<sub>3</sub>-Oxidase. Silietzky *et al.* (1999) konnten weiterhin zeigen, daß die ba<sub>3</sub>-Oxidase im oxidierten Zustand nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagiert. Soulimane *et al.* (1997) haben nachgewiesen, daß das Cytochrome-c<sub>552</sub> der natürlich Elektronendonator für die ba<sub>3</sub>-Oxidase ist und daß diese nicht mit anderen Cytochromen-c reagiert.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der ba<sub>3</sub> Cytochrom-c Oxidase**

Das Cytochrom-c<sub>552</sub> bindet in der Nähe des binuklearen Cu<sub>A</sub> Zentrums der Untereinheit II. Die Elektronen werden vom löslichen Cytochrom zunächst auf das Cu<sub>A</sub>-Zentrum übertragen und von dort an die anderen Metallzentren weitergeleitet. Die Sauerstoffreduktion an dem aus Häm a<sub>3</sub> und dem Cu<sub>B</sub>-Atom bestehenden aktiven Zentrum ist neben dem Verbrauch von 4 Protonen von der cytoplasmatischen Seite der Membran zur Bildung von Wasser mit dem Pumpen von ca. 2 weiteren Protonen vom Cytoplasma zum Periplasma gekoppelt.

Die ba<sub>3</sub>-Oxidase wird als aus zwei Untereinheiten bestehend beschrieben (Keightley *et al.*, 1995; Soulimane *et al.*, 1995). Die Aminosäuresequenz der Untereinheit I zeigt eine klare aber sehr geringe Homologie zu anderen eubakteriellen Häm-Kupfer-Oxidasen, während die Homologie zu archebakteriellen Oxidasen wesentlich höher ist. Dies könnte auf eine Genduplikation zurückzuführen sein, die vor der evolutionären Trennung der Eubakterien und Archebakterien aufgetreten ist (Castesana & Saraste, 1995). Die archebakteriellen Oxidasen und die hier untersuchte ba<sub>3</sub>-Oxidase gehören zum SoxB-Typ während die meisten anderen eubakteriellen und eukaryontischen Oxidasen zum SoxM-Typ gehören. Sequenzvergleiche bezüglich Untereinheit II der ba<sub>3</sub>-Oxidase aus *T. thermophilus* zeigen, daß die ca. 60 N-terminalen Aminosäurereste einschließlich der ersten Transmembranhelix fehlen, was eine weitere typische Eigenschaft der SoxB-Typ Oxidasen ist (Mattar &

Engelhard, 1997). Des weiteren entspricht das Häm A der  $ba_3$ -Oxidase dem sogenannten Häm As, welches in der terminalen Oxidase vom SoxB-Typ aus *Sulfolobus acidocaldarius* vorkommt. Die in den Hämen A der Oxidasen vom SoxM-Typ existierende Farnesyl-Seitenkette am Pyrrol-Ring B ist hier durch eine um 5 Kohlenstoffatome längere Geranylgeranyl-Seitenkette ersetzt (Lübben & Morand, 1994).

Die beiden strukturell bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen sind bezüglich der Untereinheiten I und II einander sehr ähnlich in Struktur und Sequenz (> 50% Identität). Die  $ba_3$ -Oxidase zeigt neben den untypischen kinetischen Charakteristiken eine sehr geringe Sequenzhomologie (< 20 % Identität, Keightley *et al.*, 1995). Insbesondere sind die meisten Aminosäuren, die bei anderen Oxidasen stark konserviert sind und die Protonenkanäle bilden, in der  $ba_3$ -Oxidase nicht erhalten, obwohl auch dieses Enzym Protonenpumpaktivität zeigt.

Aufgrund der geringen Sequenzhomologie sind strukturelle Aussagen, die für die Kristallstrukturen der Cytochrom-*c* Oxidasen aus *P. denitrificans* und dem Rinderherz getroffen wurden, kaum oder nur sehr begrenzt auf die  $ba_3$ -Oxidase übertragbar. Die experimentelle Bestimmung der dreidimensionalen Struktur dieses Enzyms ist somit von entscheidender Bedeutung, um dessen Funktion und Mechanismus verstehen zu können. Die Röntgenkristallographie kommt hierfür als einzige Methode in Betracht. Sie ermöglicht die Bestimmung der Struktur in fast atomarer Auflösung ohne daß das relativ hohe Molekulargewicht der  $ba_3$ -Oxidase zu experimentellen Einschränkungen führt. Die Analyse der Röntgenstruktur dieses Enzyms und deren Vergleich zu anderen Strukturen von Cytochrom-*c* Oxidasen läßt neue Einsichten in die Funktion und die mechanistischen Details aller Häm-Kupfer-Oxidasen sowie in die besonderen Charakteristika der  $ba_3$ -Oxidase erwarten. Strukturelle Bereiche, die trotz der niedrigen Sequenzhomologie und der untypischen kinetischen Charakteristiken dieses Enzyms in der  $ba_3$ -Oxidase konserviert sind, weisen auf eine generelle Bedeutung dieser Strukturmerkmale hin. Besonderheiten, die nur in der  $ba_3$ -Oxidase gefunden werden, könnten die besonderen Erfordernisse für die Aktivität dieses Enzyms bei hohen Temperaturen und niedrigen Sauerstoffkonzentrationen erklären.

Das Cytochrom- $c_{552}$  gehört zu den „class I“ Cytochromen und zeigt im Vergleich zu anderen Cytochromen dieser Klasse ein recht hohes Molekulargewicht von 14,5 kDa (131 Aminosäuren) und eine sehr geringe Homologie der Primärstruktur (Titani *et al.*, 1985;

---

Moore & Pettigrew 1990). Aufgrund der geringen Sequenzhomologie sind aus der Primärstruktur keinerlei Aufschlüsse über die beobachtete hohe Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung (Hon-Nami & Oshima, 1977; Nojima *et al.*, 1978; Fee *et al.*, 1986) zu ziehen. Des Weiteren läßt die hohe Selektivität mit der die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase dieses Cytochrom gegenüber anderen „class I“ Cytochromen als Substrat bevorzugt (Soulimane *et al.*, 1997), besondere strukturelle Eigenschaften erwarten, die die Ausbildung des Elektronentransferkomplexes beeinflussen. Neben der Bereicherung der Familie der strukturell bekannten „class I“ Cytochrome-*c* ist die Struktur des Cytochrom-*c*<sub>552</sub> unerlässlich für eine nähere Betrachtung der Interaktion der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase mit ihrem Substrat.

Die Präsenz der anomal streuenden Eisenatome im Häm bzw. in den Kupferzentren der beiden Proteine ermöglicht die Phasierung mit Hilfe der Multiplen Anomalen Dispersion (MAD, siehe 2.5.2), eine elegante Phasierungsmethode für die Proteinkristallographie. Diese beiden Proteine sind somit auch von einem technischen Gesichtspunkt der Proteinkristallographie sehr interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, daß sich die Kristalle der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase durch eine Änderung im Solvensgehalt in mehrere Kristallzustände überführen lassen. Die gezielte Transformation von Proteinkristallen, die zu einer dramatischen Steigerung in der Streuleistung führen kann, wurde bisher nur in wenigen, ausgewählten Fällen beobachtet (Kiefersauer, 1998). Die systematische Charakterisierung dieses Effektes sowie die daraus resultierenden generellen Erkenntnisse bezüglich Kristalltransformation und Kryokristallographie sind von zentraler Bedeutung für das Verständnis dieser Kristalle und für die Entwicklung allgemein nutzbarer Methoden.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die strukturelle Aufklärung des letzten Schrittes in der Elektronentransportkette von *Thermus thermophilus*, an dem das Cytochrom-*c*<sub>552</sub> und die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase beteiligt sind, sowie über die Strukturen dieser außergewöhnlichen Proteine die Funktion und den Mechanismus der terminalen Häm-Kupfer-Oxidasen sowie die generellen Prinzipien zur Thermostabilität von Proteinen besser verstehen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere kristallographische Projekte bearbeitet, die in den Kapiteln 5 und 6 kurz dargestellt sind und zur Struktur des ersten Billiprotein-Linker-Komplexes sowie zur Strukturlösung der Nitrat-Reduktase aus *Desulfovibrio desulfuricans* führten.

## 2 Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

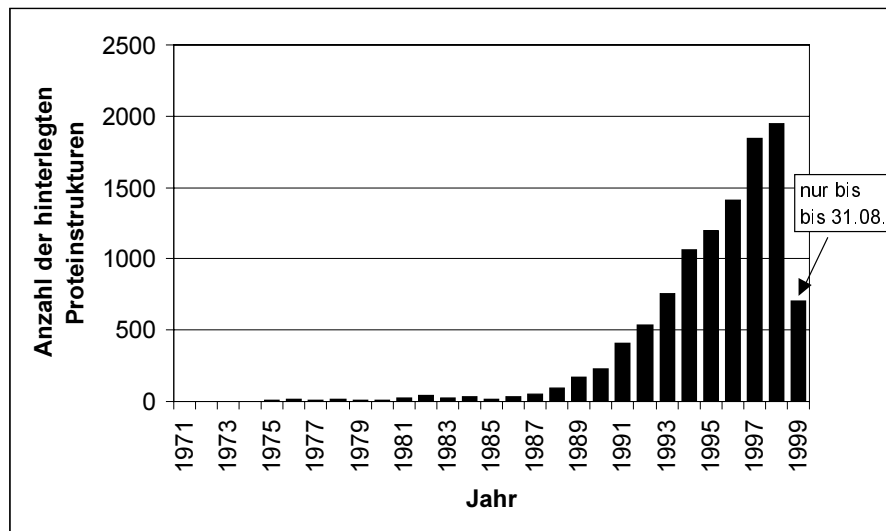
Lichtmikroskope können die zur Visualisierung von atomaren Details notwendige Auflösung nicht erzielen. Der Einsatz eines „Röntgenmikroskopes“ wäre zwar prinzipiell denkbar, allerdings konnten bisher keine für diese Strahlungsart geeigneten Linsen konstruiert werden. Die Methoden der Kristallographie schaffen einen „Umweg“, um atomare Details mit Hilfe von elektromagnetischen Wellen abzubilden.

Die Grundlage der Röntgenkristallographie wurde mit der Entdeckung der nach ihm benannten Strahlen bei Kathodenstrahlversuchen durch Wilhelm Conrad Röntgen (Röntgen, 1895) geschaffen. Nachdem die Diffraktion von Röntgenstrahlen das erste mal von W. Friedrich, P. Knipping und M. v. Laue (Friedrich, *et al.*, 1912) gezeigt wurde, folgten die ersten Strukturbestimmungen an Natrium- und Kaliumchloridkristallen mittels Röntgenstrahlung durch W. L. Bragg (Bragg, 1913). Die Theorie zur Interpretation der Diffraktion von Röntgenstrahlen durch Kristalle wurde von vielen Forschern entwickelt. Als Meilenstein sei hier noch die Etablierung der reziproken Gitters als bequemes Hilfsmittel zur Konstruktion der beobachteten Reflexe durch P. P. Ewald (1921) genannt.

Über Kristalle von Proteinen wurden bereits im Jahre 1840 (Hünefeld, 1840) berichtet. Allerdings dauerte es bis 1934 ehe die ersten Röntgendiffraktionsbilder von Proteinkristallen durch J. D. Bernal und D. Crowford (Bernal & Crowford, 1934; Crowford, 1935) veröffentlicht wurden. Diese Arbeiten zeigten, daß sich auch Makromoleküle in Kristallgittern periodisch anordnen können und deren Strukturen somit prinzipiell mit Hilfe der Kristallographie aufklärbar sind. Der Durchbruch von Bernal und Crowford gelang dadurch, daß die Proteinkristalle während der Diffraktionsexperimente in einer Glaskapillare montiert und in ihrer Mutterlauge belassen wurden. Das freie Montieren von Proteinkristallen an Luft führte bei früheren Versuchen regelmäßig zum Abdampfen des im Kristall enthaltenen Lösungsmittels und somit zum Zusammenbruch des Kristallgitters. Nachdem gezeigt wurde, daß die Methode des isomorphen Ersatzes grundsätzlich auch für Proteine möglich ist (Green *et al.*, 1954), konnten die Strukturen von Myoglobin (Kendrew *et al.*, 1960) und Hämoglobin (Perutz *et al.*, 1960) als erste

Proteinstrukturen gelöst werden. Bald darauf folgte die erste in Deutschland gelöste Proteinstruktur, das Erythrocyruorin (Huber *et al.*, 1968; Huber *et al.*, 1969).

Während in den frühen Jahren der Proteinkristallographie es nur in vereinzelt Fällen gelang, die Struktur eines Proteins aufzuklären, hat sich diese Methode zunehmend als Standardanalyse für biologisch interessante Makromoleküle entwickelt. Um dies zu unterstreichen sei hier die exponentielle Entwicklung der pro Jahr gelösten Proteinstrukturen aufgeführt (Abb. 4).



**Abb. 4: Anzahl der pro Jahr in der PDB hinterlegten Proteinstrukturen.**

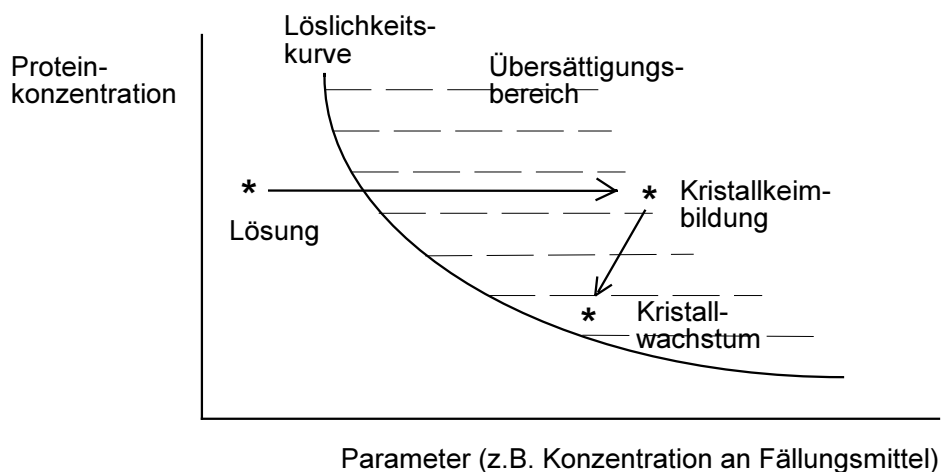
Die Anzahl der pro Jahr in der „Protein Data Base“ (PDB) hinterlegten Proteinstrukturen wurde mit Hilfe des 3DB-Browsers bestimmt und als Funktion der Jahreszahl aufgetragen.

Die zur Lösung einer Proteinstruktur notwendigen Schritte beinhalten im Prinzip (i) die Bereitstellung von reinem Protein, (ii) das Finden geeigneter Kristallisationsbedingungen, (iii) die Datensammlung und Datenauswertung, (iv) die jeweils spezifische Lösung des Phasenproblems, (v) die Interpretation der Elektronendichtekarte, d.h. die Erstellung eines atomaren Modells und (vi) die Verfeinerung dieses Modells. Vielfältige Entwicklungen auf all diesen Gebieten in Form von neuen Methoden oder empirischen Erfahrungen haben zusammen mit der stetigen Steigerung der Leistungsfähigkeit der Computer die rasante Zunahme an gelösten Proteinstrukturen ermöglicht.

Auf die verschiedenen Etappen und Methoden der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen wird im Folgenden näher eingegangen. Für eine ausführliche Darstellung siehe z.B.: Drenth, 1999; McRee, 1993; Stout & Jensen, 1989 oder Rhodes, 1993.

## 2.1 Einkristalle von Proteinen

Die erfolgreiche Kristallisation eines Proteins bildet die Grundlage zur Strukturbestimmung durch kristallographische Methoden und steht somit am Beginn jedes proteinkristallographischen Projektes. Um so unerfreulicher ist es, daß dieser Schritt im wesentlichen unverstanden ist und somit hauptsächlich auf dem Prinzip von „Versuch und Irrtum“ beruht. In Analogie zur theoretisch deutlich besser verstandenen Kristallbildung bei Kleinmolekülen, geht man davon aus, daß das in einem geeigneten Lösungsmittel gelöste Protein zunächst deutlich in den Sättigungsbereich des Löslichkeitsdigrammes gebracht werden muß, damit sich Kristallkeime bilden können. Das weitere Wachstum dieser Kristallkeime sollte dann in einem Bereich geringer Übersättigung stattfinden, um die Bildung weiterer Kristallkeime zu vermeiden und somit wenige große anstelle von vielen kleinen Kristallen oder einem nichtkristallinen Präzipitat zu erhalten (Abb. 5).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Löslichkeitskurve eines Proteins**

Der Sättigungspunkt des Proteins ist in Abhängigkeit von Proteinkonzentration und Fällungsparameter (z.B. Konzentration des Fällungsmittels) aufgetragen. Zur Kristallisation muß das System aus dem Bereich der Lösung zunächst deutlich in den Bereich der Übersättigung gebracht werden, damit sich Kristallkeime bilden. Anschließend erfolgt das weitere Wachstum dieser Keime in einem Bereich geringerer Übersättigung.

Während dieses grundsätzliche Prinzip der Kristallisation weithin anerkannt ist, hängt die praktische Umsetzung von vielen Parametern ab. Sie stellt somit eine Suche in einer mehrdimensionalen Matrix voneinander abhängiger Parameter dar. Diese beinhalten die Konzentration des Proteins, die Art und Konzentration des/der Fällungsmittel(s), die zur Pufferung der wäßrigen Lösung eingesetzte Substanz, den pH-Wert, die Temperatur sowie die Art und Konzentration eventuell notwendiger Additive. Im Fall von Membran-

proteinen, die normalerweise nur durch Detergenzien in Lösung gehalten werden können, kommen die Art und Konzentration des Detergenz als weitere Parameter hinzu.

Es gibt verschiedene Methoden, um die Kristallisation eines Proteins unter Variation der oben genannten Parameter zu realisieren. Am häufigsten kommt die Dampf-diffusionsmethode zur Anwendung. Hierbei wird eine gewisse Menge der Proteinlösung mit einer Lösung, die eine bestimmte Variation der oben genannten Parameter enthält (Präzipitanzlösung) gemischt und die resultierende Mischung in einem abgeschlossenen Gefäß über die Dampfphase mit einem größeren Volumen der Präzipitanzlösung (Reservoir) bei konstanter Temperatur äquilibriert. Das Wasser diffundiert dabei vom weniger konzentrierten Proteintropfen in das Reservoir wobei sich die Konzentration von Protein und Präzipitanz im Tropfen gleichmäßig erhöht. Zu Beginn werden viele Kombinationen der verschiedenen Parameter in sogenannten „factorial screens“ erprobt. Sind aussichtsreiche Kristallisationsbedingungen gefunden (z.B. noch viel zu kleine Proteinkristalle oder feinkristallines Präzipitat), können diese oft in systematischen Versuchsreihen optimiert werden.

Empirische Erfahrungen zeigen, daß die Reinheit des zur Kristallisation eingesetzten Proteins ein weiterer wesentlicher Faktor ist. In den meisten Fällen ist es notwendig, die Proteine in nahezu 100 prozentiger Reinheit und Homogenität bereitzustellen. Die oben beschriebenen Kristallisationsansätze erfordern eine bestimmte Mindestmenge an Protein (typische Werte: 20 µg - entsprechend 2 µl einer ca. 10 mg/ml konzentrierten Proteinlösung). In der Regel sind mehrere hundert oder sogar tausende Kristallansätze erforderlich, um die optimalen Kristallisationsbedingungen zu ermitteln. In günstigen Fällen genügen einige Milligramm an Protein, um eine ausreichende Anzahl an Kristallen in der geforderten Qualität zu erhalten. Meist sind es jedoch mehr als 10–20 mg und nicht selten auch deutlich mehr. Somit, stellt jedes proteinkristallographische Projekt harte Anforderungen an die Bereitstellung ausreichender Mengen an sauberem Protein. Diese können nur mit Hilfe von effizienten Reinigungsmethoden und bei natürlich in geringen Mengen vorkommenden Proteinen nur mit Hilfe molekularbiologischer Methoden bereitgestellt werden.

Proteinkristalle enthalten im Gegensatz zu Salz- oder Kleinmolekülkristallen relativ große Mengen an ungeordnetem Lösungsmittel (ca. 30–70 %). Die Moleküle sind demzufolge relativ locker gepackt und die Kristallpackungskräfte sind deutlich schwächer, als bei



Kleinmolekülkristallen. Dies hat zur Folge, daß im Proteinkristall chemische Reaktionen möglich sind. Dadurch kann man Schwermetallderivate durch Inkubieren mit geeigneten Schwermetallverbindungen herstellen oder biologisch relevante Reaktionen im Kristall ablaufen lassen. Andererseits sind Proteinkristalle in Hinblick auf Strahlenschäden, mechanische Beanspruchungen oder den Verlust von Kristallwasser deutlich labiler. Die Proteinkristalle müssen während der Messung entweder in Kapillaren montiert und im Gleichgewicht mit der Mutterlauge gehalten werden, oder durch andere Methoden in einer Umgebung konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten werden, die eine ungewünschte Austrocknung des Kristalls verhindert. Alternativ werden die Kristalle in einer geeigneten Matrix in kleinen Schlaufen („cryo-loop“) montiert und rasch auf die Temperatur des flüssigen Stickstoffs abgekühlt. Die letzte Methode, die sogenannte Kryokristallographie hat den Vorteil, daß so gefrorenen Kristalle stabiler sind in Hinblick auf eventuelle Strahlenschäden oder mechanische Einwirkungen.

Proteinkristalle bestehen weiterhin nicht aus einem einheitlichen, idealen Gitter. Sie bestehen aus mehreren kleinen Blöcken mit idealer Ordnung, die im Gesamtverband leicht gegeneinander verkippt sind. Diese Verkipfung wird als Mosaikbreite bezeichnet und kann zwischen ca.  $0.1^\circ$  und mehreren Grad betragen. Interferenz der gebeugten Röntgenstrahlen findet nur innerhalb dieser Blöcke statt.

Eine weitere wichtige Besonderheit der Proteinkristalle resultiert aus den im Vergleich zu Kleinmolekülen deutlich größeren Einheitszellen. Die Kristalle enthalten daher bei gleicher Abmessung wesentlich weniger Einheitszellen, was zusammen mit der geringeren Ordnung im Kristall zu einer deutlich verringerten Streukraft führt. Für die erfolgreiche Strukturlösung ist somit der Einsatz leistungsfähiger Röntgenquellen erforderlich.

## **2.2 Erzeugung von Röntgenstrahlen**

Um Beugungsphänomene ausnutzen zu können, darf die Wellenlänge der verwendeten elektromagnetischen Strahlung nicht größer sein als die Größenordnung der aufzulösenden Abstände des untersuchten Gegenstandes. Zur Auflösung atomarer Abstände kommen Wellenlängen im Bereich von ca.  $1 \text{ \AA}$  und darunter in Betracht. Der entsprechende Bereich des elektromagnetischen Spektrums ( $1000\text{--}0,1 \text{ \AA}$ ) wird als Röntgenstrahlung bezeichnet. Da mit abnehmender Wellenlänge die Wechselwirkung der Strahlung mit Materie abnimmt, was die Detektion der gestreuten Röntgenstrahlen zunehmend erschwert, benutzt

man zur Röntgenkristallographie bevorzugt elektromagnetische Strahlung im Bereich von ca. 0,6–2,0 Å.

Röntgenstrahlen können durch verschiedene Methoden erzeugt werden. Im kristallographischen Labor kommen vorwiegend Drehanodengeneratoren zum Einsatz. In diesen treffen von einer Glühkathode emittierte und im elektrischen Feld beschleunigte Elektronen mit hoher kinetischer Energie auf das Anodenmaterial. Durch Abbremsen der Elektronen vor der Kathode wird ein Teil der kinetischen Energie über einen großen Wellenlängenbereich als Bremsstrahlung abgegeben. Der andere Teil der Energie der beschleunigten Elektronen verursacht das Herausschlagen von Elektronen aus den Atomen des Anodenmaterials. Die entstehenden Fehlstellen innerhalb der atomaren Energieniveaus werden unter Emission charakteristischer Röntgenstrahlung (Strahlung definierter Wellenlänge) durch Elektronen aus höheren Energieniveaus sofort wieder aufgefüllt. Im Fall der Standard Kupferanode handelt es sich um Übergänge, die von der L-Schale ausgehen und auf der K-Schale des Kupfers enden. Die verwendete Wellenlänge ist eine Mischung aus  $K_{\alpha 1}$  (1.54051 Å) und  $K_{\alpha 2}$  (1.54433 Å). Andere Anteile, insbesondere die deutlich schwächere Bremsstrahlung, werden mit Hilfe von Monochromatoren für die Beugungsexperimente herausgefiltert.

Bremsstrahlung von deutlich höherer Intensität wird an Synchrotronen durch sich auf einer Kreisbahn befindliche und daher beschleunigte Ladungen freigesetzt. Noch stärkere Röntgenstrahlung kann hierbei erzielt werden, wenn außer der zur Einhaltung der Kreisbahn notwendigen Beschleunigung zusätzliche Magnetfelder auf den Teilchenstrahl wirken, die in einer zusätzlichen, räumlich limitierten Zickzack-Bahn der Ladungen resultiert. Die entsprechenden Geräte, die ein Teil des Synchrotrons sind, werden als Undulatoren und Wiggler bezeichnet.

Während bei Drehanodengeneratoren die Wellenlänge der Röntgenstrahlung durch die Lage der atomaren Energieniveaus festgelegt ist, emittieren Synchrotrone Bremsstrahlung über einen weiten Wellenlängenbereich. Die für das Experiment gewünschte Wellenlänge kann über einen durchstimbaren Monochromator ausgewählt werden. Dies ist neben der höheren Intensität ein entscheidender Vorteil und ermöglicht Experimente bei denen die Wellenlänge der Röntgenstrahlung frei wählbar sein muß (siehe auch Abschnitt 2.5.2).

### 2.3 *Beugung von Röntgenstrahlen an Einkristallen*

Röntgenstrahlen, die auf ein Kristallgitter aus Atomen bzw. Molekülen treffen, regen die Elektronen der im Gitter angeordneten Atome zu Schwingungen mit der Frequenz der einfallenden elektromagnetischen Welle an. Diese Elektronen senden dann ihrerseits elektromagnetische Strahlen derselben Frequenz aus. Die beobachtete Strahlung ist die Summe aller einzelnen von den Elektronen ausgesandten Wellen. In den meisten Richtungen summieren sich diese Wellen zu null. Nur in ausgezeichneten Richtungen kommt es zur positiven Interferenz, d.h., es entsteht eine von null verschiedene Streustrahlung. Solange die Energie der einfallenden Röntgenstrahlung nicht mit diskreten energetischen Übergängen innerhalb der Atome bzw. Moleküle übereinstimmt, was für die leichten Atome, wie Kohlenstoff, Stickstoff oder Sauerstoff immer gilt, kann man die beobachteten Streueffekte als Beugung an freien Elektronen behandeln.

Es gibt viele Wege, diesen Sachverhalt mathematisch zu beschreiben. In Analogie zur Beugung von sichtbarem Licht läßt sich die Bragg'sche Gleichung wie folgt formulieren:

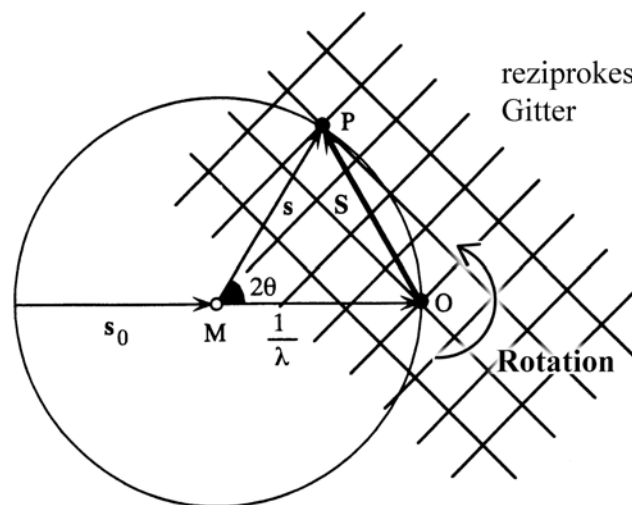
$$2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} = n\lambda \quad (1)$$

Ihr liegt die Vorstellung der Spiegelung von Röntgenstrahlen mit der Wellenlänge  $\lambda$  an Gitterebenen mit dem Abstand  $d$  unter dem Glanzwinkel  $\theta$  zugrunde. Jeder Kristall enthält viele solche Gitterebenen, die mit den Miller'schen Indizes  $hkl$  bezeichnet werden. Hierbei schneidet die Ebene  $hkl$  die x-Achse in  $a/h$ , die y-Achse in  $b/k$  und die z-Achse in  $c/l$ . Index 0 heißt, daß die entsprechende Achse nicht geschnitten wird, d.h. die Gitterebene läuft parallel zur Achse. Positive Interferenz tritt nur auf, wenn der Gangunterschied ( $2d \sin \theta$ ) ein vielfaches der Wellenlänge ist. Aufgrund der sonst vernachlässigbaren Intensität werden im Folgenden nur die Interferenzen erster Ordnung ( $n=1$ ) betrachtet. Unter Berücksichtigung eines feststehenden Eingangsstrahles und eines sich drehenden Kristalls, lassen sich die Richtungen der beobachtbaren gestreuten Strahlen ermitteln, wobei bei einer gegebenen Kristallorientierung sowohl  $d$  als auch  $\theta$  von der Wahl der Gitterebene anhängen.

Eine wesentlich praktischere Methode zur Konstruktion der gestreuten Strahlen stellt die Anwendung des reziproken Gitters und der Ewald Kugel dar. Das reziproke Gitter ist ein Gedankenkonzept, daß mit dem realen Kristallgitter wie folgt verbunden ist: Jedem Reflex

$hkl$  ist ein Punkt im reziproken Gitter mit den Indizes  $hkl$  zugeordnet. Jeder dieser Punkte bildet den Endpunkt des Vektors  $\mathbf{S}^\dagger$ , der senkrecht auf der Gitterebene  $hkl$  steht und die Länge  $1/d_{hkl}$  hat. Es läßt sich entsprechend eine reziproke Zelle definieren. Sie besteht aus den Achsen  $\mathbf{a}^*$ ,  $\mathbf{b}^*$  und  $\mathbf{c}^*$ . Jede dieser reziproken Achsen (z.B.  $\mathbf{a}^*$ ) steht senkrecht auf der Ebene, die aus den beiden anderen realen Achsen (z.B.  $\mathbf{b}$  und  $\mathbf{c}$ ) aufgespannt wird und hat als Länge den Reziprokwert der entsprechenden realen Achse (z.B.  $1/a$ ). Die Punkte des reziproken Gitters lassen sich somit in Vektorschreibweise auch als  $\mathbf{S} = h \mathbf{a}^* + k \mathbf{b}^* + l \mathbf{c}^*$  beschreiben.

Es läßt sich zeigen, daß in einer Konstruktion entsprechend Abb. 6 die oben beschriebene Bedingung zur konstruktiven Interferenz immer dann erfüllt ist, wenn ein Punkt des Reziproken Gitters die Ewald Kugel schneidet. Während sich das reziproke Gitter zusammen mit dem Kristall dreht, kommen die verschiedenen Punkte des reziproken Gitters in Streuposition. Der gestreute Strahl zeigt dann in Richtung des Vektors  $\mathbf{MP}$ .



**Abb. 6: Die Ewald Kugel zur Konstruktion des gestreuten Röntgenstrahles.**

Der Radius der Kugel um den Mittelpunkt M beträgt  $1/\lambda$  und das Zentrum des reziproken Gitters liegt auf der Kugeloberfläche bei O. Das reziproke Gitter dreht sich mit dem Kristall (dem realen Gitter) um den Punkt O. Der eintretende Strahl  $s_0$  wird im Winkel von  $2\theta$  als Strahl  $s$  gestreut.

Diese Betrachtung zeigt eine weitere wichtige Charakteristik der Kristallographie. Die Punkte des reziproken Gitters und somit das Streubild eines Kristalls hängen nur von der

<sup>†</sup> Alle Vektoren werden im Folgenden durch Fettdruck von skalaren Größen unterschieden.

Einheitszelle, aber nicht vom Inhalt der Zelle ab. Die Information über den Zellinhalt, d.h. über das Protein, ist in den Intensitäten und Phasen der verschiedenen Reflexe enthalten.

Das reale Gitter, sprich der Kristall mit dem darin enthaltenen Protein, und das reziproke Gitter sind über eine Fouriertransformation eindeutig miteinander verknüpft. Dies ist letztendlich die Voraussetzung, um die räumliche Struktur der Proteine mit Hilfe der Kristallographie aufklären zu können. Die wichtigsten Gleichungen, die diesen Zusammenhang widerspiegeln, sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Ein Strukturfaktor  $F_{hkl}$  ist eine Kombination von  $N$  Wellen in der Richtung  $hkl$ , die von den  $N$  Atomen in der Elementarzelle bei einem Beugungsexperiment ausgehen. Jede dieser Wellen hat die Amplitude  $f_i$  (atomarer Streufaktor) und die Phase  $\alpha_i$ , die ein Ausdruck der räumlichen Position des Atoms  $i$  in der Elementarzelle ist. Jeder Strukturfaktor  $F_{hkl}$  besteht somit ebenfalls aus Amplitude und Phase und läßt sich als komplexe Zahl wie folgt beschreiben:

$$F_{hkl} = A_{hkl} + iB_{hkl} \quad (2)$$

wobei:

$$A_{hkl} = \sum_N f_i \cos 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i) \quad (3)$$

$$B_{hkl} = \sum_N f_i \sin 2\pi(hx_i + ky_i + lz_i) \quad (4)$$

Der atomare Streufaktor  $f_i$  hängt von der Auflösung ( $2\sin\theta/\lambda$ ) ab, da die Elektronenwolke um ein Atom eine räumliche Ausdehnung besitzt. Mit zunehmendem Streuwinkel nimmt der Gangunterschied zwischen den an verschiedenen räumlichen Positionen innerhalb des Atoms gestreuten Röntgenstrahlen zu. Da diese inneratomaren Distanzen deutlich kleiner sind, als die bisher betrachteten Abstände zwischen den einzelnen Gitterebenen  $d_{hkl}$  und somit der Gangunterschied nur Bruchteile der Wellenlänge ausmacht führt dies nicht zu den weiter oben beschriebenen kompletten Auslöschungen. Die Intensität des gestreuten Strahles nimmt jedoch mit zunehmender Auflösung ab. Berücksichtigt man außer der statischen Ausdehnung noch die dynamische Beweglichkeit der Atome, das heißt die Möglichkeit thermischer Bewegung um eine Gleichgewichtsposition, so muß im einfachsten Fall der isotropen Bewegung noch der Temperaturfaktor  $B$  eingeführt werden:

$$f_{i,dynamisch} = f_{i,statisch} \exp\left(-B_i \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right) \quad (5)$$

Man kann zeigen, daß  $B$  mit der mittleren quadratischen Auslenkung  $\overline{u^2}$  des Atoms, wie folgt, zusammenhängt:

$$\overline{u^2} = \frac{B}{8\pi^2} \quad (6)$$

Die im Beugungsexperiment bestimmbare Strukturfaktoramplitude ist dann durch

$$|F_{hkl}| = \sqrt{A_{hkl}^2 + B_{hkl}^2} \quad (7)$$

gegeben und die Phase  $\alpha$  des jeweiligen Reflexes durch

$$\alpha_{hkl} = \arctan \frac{B_{hkl}}{A_{hkl}} \quad (8)$$

In umgekehrter Richtung wird die Elektronendichteverteilung in einem Kristall am Ort  $(x,y,z)$  durch folgende Fouriersumme berechnet:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}| \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha_{hkl}] \quad (9)$$

Die Elektronendichteverteilung ist die primäre Information über den Kristallinhalt, die mit den Methoden der Kristallographie zugänglich ist. In ihr steckt natürlich auch die Information über die Lage der einzelnen Atome, da die beugenden Elektronen zu den Atomen gehören.

## 2.4 Datensammlung und Datenauswertung

Das klassische Medium zur Aufnahme der Diffraktionsbilder von Kristallen ist der photographische Film. Aufgrund seiner relativ geringen Empfindlichkeit, seines geringen dynamischen Bereiches und der zeitlich recht aufwendigen Handhabung wurde er zunehmend von Detektionsmethoden verdrängt, die ein direktes, digitales Bild liefern. Zu diesen gehören die proportionalen Flächenzähler („multiwire proportional counter“), Video Systeme, CCD-Detektoren, und als die momentan am meisten verbreiteten Systeme, die

„image plates“. Das letztere System enthält eine Platte, die mit einem röntgensensitiven Material beschichtet ist. Durch das Auftreffen von Röntgenquanten auf diese Schicht, werden Elektronen in langlebige, metastabile Zustände angehoben. Nach Ende der Belichtung wird das Bild durch das rote Licht eines Lasers örtlich aufgelöst ausgelesen. Dabei wird der Übergang der Elektronen aus den metastabilen Zuständen in den Grundzustand ermöglicht und die bei diesem Übergang freiwerdende Energie in Form von blauem Licht emittiert. Die Intensität dieser Strahlung ist in gewissen Grenzen proportional zur Anzahl der während der Belichtung eingefangenen Röntgenquanten.

In der Regel wird zur Aufnahme der Diffraktionsbilder eines Kristalls monochromatische Strahlung verwendet. Während der Messung wird der Kristall pro Bild um einen bestimmten Winkel, üblicherweise zwischen  $0.2^\circ$  und  $2.0^\circ$  gedreht. Es werden mehrere Bilder unter fortlaufender Drehung des Kristalls aufgenommen, bis ein hinreichender Bereich des reziproken Raumes erfaßt ist.

Der nächste Schritt ist die Indizierung der Streubilder, d.h., die Zuordnung der Indizes  $hkl$  zu den einzelnen gemessenen Reflexen. Die zugrunde liegende Theorie ist insbesondere bei der heutzutage üblichen Messung der Kristalle in willkürlicher Orientierung recht komplex. Allerdings sind mehrere leistungsfähige Programmpakete vorhanden, die diesen Schritt zuverlässig bewältigen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt auch die Zuordnung des Kristallgitters zu einem der Bravais-Gitter. Sind die Orientierung des Kristalls und die Zellkonstanten somit bestimmt, können die an den verschiedenen Orten im reziproken Raum gemessenen Reflexe vorhergesagt und unter Berücksichtigung von Polarisations-, Absorptions- und Lorentzkorrekturen integriert werden. Nach der relativen Skalierung der einzelnen Aufnahmen, die über die Intensitäten symmetrierverwandter Reflexe auf den verschiedenen Bildern berechnet wird, erfolgt die Datenreduktion. Hier werden die verschiedenen symmetrieverwandten Beobachtungen eines jeden Reflexes gemittelt. Die Qualität des resultierenden, reduzierten Datensatzes wird mit Hilfe des R-Faktors (z.B.,  $R_{sym,l}$ ) bestimmt:

$$R_{sym,l} = \frac{\sum_{hkl} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N |I_{hkl} - I_{hkl}(j)|}{\sum_{hkl} I_{hkl}} \quad (10)$$

Hierbei beschreiben  $I_{hkl}$  den Mittelwert aller Beobachtungen des Reflexes  $hkl$  und  $I_{hkl}(j)$  die  $j$ -te von  $N$  Beobachtungen dieses Reflexes. Nimmt man eine falsche kristallographische Rotationssymmetrie an, so erhöht sich der Wert von  $R_{sym,I}$  deutlich, da in diesem Fall Reflexe als gleich angenommen werden, die in Wirklichkeit voneinander unabhängig sind.

Dies dient auch der Unterscheidung von Raumgruppen (z.B. P4 oder P422), welche zum gleichen Bravais-Gitter gehören, und damit zu einer identischen Lage der Reflexe im reziproken Raum führen. Die Präsenz von Schraubenachsen, also das Vorhandensein von zu den Rotationssymmetrien zugehörigen Translationskomponenten, kann an systematischen Auslöschungen erkannt werden. Bei Raumgruppen, die enantiomorphe Paare bezüglich der Anordnung der Moleküle in der Zelle bilden (z.B. P4<sub>1</sub>22 oder P4<sub>3</sub>22), kann die endgültige Entscheidung über die korrekte Raumgruppe erst während der Phasierung durch MIR, MAD oder Pattersonsuche (siehe 2.5) erfolgen. Als letzter Schritt erfolgt die Berechnung der Strukturfaktoramplituden  $|F_{hkl}|$  aus den gemessenen Intensitäten  $I_{hkl}$  durch Ziehen der Wurzel (siehe Formel (7) ) und absolute Skalierung. Der auf den Strukturfaktoramplituden,  $F_{hkl}$ , beruhende R-Faktor ( $R_{sym}$  oder  $R_{sym,F}$ ), welcher zur Charakterisierung der Qualität von Datensätzen gebräuchlicher ist, berechnet sich in Analogie zu Gleichung (10).

Eine andere Variante der Datenaufnahme ist die Laue-Technik. Hier wird der zu untersuchende Kristall einem breiten Spektrum an Wellenlängen ausgesetzt. Dies führt dazu, daß ein großer Teil des reziproken Raumes mit nur einer Aufnahme gemessen werden kann, was insbesondere für die zeitaufgelöste Messung dynamischer Effekte, z.B. enzymatischer Reaktionen, von großem Vorteil ist. Allerdings gibt es in der Praxis deutliche Probleme zum einen bei der Trennung der oft stark überlappenden Reflexe und zum anderen aufgrund der deutlich unter 100% liegenden Vollständigkeit der Datensätze. In der Praxis erweist sich das Einfrieren interessanter Intermediate mittels Kryokristallographie gefolgt von klassischen Rotationsaufnahmen meist als die praktikablere Herangehensweise.

## **2.5 Das Phasenproblem**

Wie bereits unter 2.3 beschrieben, sind der reziproke und der reale Raum über die Fourier Transformation direkt in einander überführbar. Die mit den Methoden der Kristallographie meßtechnisch zugänglichen Größen sind allerdings nur die Amplituden der

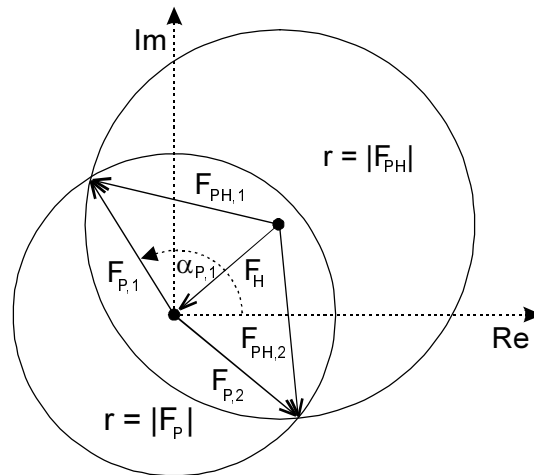


Strukturfaktoren. Die für die erfolgreiche Berechnung der Elektronendichteverteilung innerhalb des Kristalls notwendigen Phasen müssen über verschiedene Umwege erhalten werden. Ein „phasensensitiver Detektor“ wäre natürlich sehr wünschenswert, ist aber aus verschiedenen Gründen bisher nicht konstruierbar. Dieses Problem der „Nichtmeßbarkeit“ der zu den Strukturfaktoren gehörigen Phasen wird als das Phasenproblem in der Kristallographie bezeichnet.

Neben den weiter unten beschriebenen Methoden des Isomorphen Ersatzes, der Multiplen Anomalen Dispersion und des Molekularen Ersatzes kommen prinzipiell noch die sogenannten Direkten Methoden zur Bestimmung der Phasen zum Einsatz. Die direkten Methoden zeichnen sich dadurch aus, daß als experimentelle Daten zur Bestimmung der Phasen und somit der Struktur lediglich ein nativer Datensatz, also ein Satz an Strukturfaktoramplituden benötigt wird. Diese Methoden beruhen auf den einschränkenden statistischen Beziehungen zwischen den Phasen einzelner Reflexe und/oder der Identifikation von Teilmodellen mit Hilfe der Pattersonsynthese. Sie werden heutzutage in der Kleinmolekülkristallographie als Standard zur Strukturbestimmung eingesetzt. Ihre Anwendung auf Proteinstrukturen gelingt bisher nur in seltenen Fällen bei kleinen Proteinen und sehr guter Auflösung. Sie sind für die meisten proteinkristallographischen Projekte bisher nicht sinnvoll einsetzbar (Hauptmann, 1997; Sheldrick, 1990; Weeks & Miller, 1999).

### 2.5.1 Isomorpher Ersatz

Der Isomorphe Ersatz (Green, *et al.*, 1954) beruht auf einer lokalen Änderung in der Elektronendichteverteilung des Kristalls, wobei der Rest des Kristalls unverändert bleiben muß (Isomorphie). Es gibt verschiedene Methoden, derartige Veränderungen herbeizuführen. Kristalle können in Schwermetallsalzlösungen eingelegt werden, Aminosäuren können gegen Varianten, die ein schwereres Atom enthalten, ausgetauscht werden oder sich bereits im Kristall befindliche Metallionen können herausgelöst bzw. durch schwerere Ionen ersetzt werden. Natürlich muß diese Änderung von hinreichender Größe sein, um nicht im Rauschen unterzugehen. Mit Hilfe der gelösten Teilstruktur dieser Veränderung, z.B., der Koordinaten zusätzlich eingebrachter Schweratome, und der Strukturfaktoramplituden sowohl des nativen  $|F_P|$  als auch des veränderten Kristalls  $|F_{PH}|$ , können die Phasen bestimmt werden (Abb. 7).



**Abb. 7: Konstruktion der Proteinphasen beim Isomorphen Ersatz**

Der Strukturfaktor des bekannten Schweratom Teilmodelles wird als Vektor dargestellt ( $F_H$ ). Um sein Ende und seinen Beginn wird je ein Kreis mit dem Radius der Strukturfaktoramplitude des Nativen ( $|F_P|$ ) und des Derivatdatensatzes ( $|F_{PH}|$ ) gezogen. Die Schnittpunkte der beiden Kreise ergeben die beiden Möglichkeiten für die Proteinstrukturfaktoren ( $F_{P,1}$  und  $F_{P,2}$ ) und damit auch die Phase des Proteinstrukturfaktors (z.B.  $\alpha_{P,1}$ ). Diese Ambiguität kann durch ein weiteres Derivat oder mit Hilfe des anomalen Streubeitrages gelöst werden.

Dieser Konstruktion liegt zugrunde, daß sich die Strukturfaktoren des Gesamtmodells  $F_{gesamt, hkl}$  als vektorielle Summe der Strukturfaktoren der einzelnen Atome  $F_{i, hkl}$  darstellen lassen:

$$F_{gesamt, hkl} = \sum_i F_{i, hkl} = F_{P, hkl} + F_{H, hkl} \quad (11)$$

$F_P$  und  $F_H$  sind hierbei die Strukturfaktoren des Protein- und des Schweratomteilmodells im Schweratome enthaltenden Kristall.

Der erste Schritt zur Bestimmung der Proteinphasen ist die Lösung der Teilstruktur der Schweratome. Die Strukturfaktoramplituden der Schweratom-Teilstruktur  $|F_H|$  lassen sich aus den Strukturfaktoramplituden des nativen  $|F_P|$  und des Derivatdatensatzes  $|F_{PH}|$  berechnen:

$$|F_H| = |F_{PH}| - |F_P| + \Delta \quad (12)$$

Der Parameter  $\Delta$  beinhaltet hierbei Meßfehler, Fehler durch die nie 100%-ige Isomorphie zwischen nativem und Derivatdatensatz und Phasenfehler, da Formel (12) eigentlich nur in vektorieller Behandlung gilt. Diese verschiedenen Fehler tragen zum Rauschen in der

weiteren Betrachtung bei. Da für die meisten Indizes  $hkl$  sowohl  $|F_{PH}(hkl)|$  als auch  $|F_P(hkl)|$  deutlich größer sind als  $|F_H(hkl)|$ , läßt sich  $|F_H(hkl)|$  als Differenz aus  $|F_{PH}(hkl)|$  und  $|F_P(hkl)|$  hinreichend annähern.

Das Schweratom Teilmodell läßt sich somit nach einer relativen Skalierung von Nativ- und Derivatdatensatz unter Verwendung von  $|F_{PH}|-|F_P|$  als Strukturfaktoramplitude des Teilmodells mit Hilfe von direkten oder Pattersonmethoden (siehe auch 2.5.3) bestimmen. Die sogenannte Differenz-Pattersonfunktion stellt eine Fouriersummitation mit den Koeffizienten  $(|F_{PH}|-|F_P|)^2$  und einem Phasenwinkel von null dar. Es kann gezeigt werden, daß die Peaks dieser Funktion den Abständen zwischen den Atomen des Schweratom Teilmodelles entsprechen. Unter Beachtung der Raumgruppensymmetrie lassen sich die Koordinaten  $x,y,z$  des Teilmodells bestimmen. Aufgrund der Zentrosymmetrie der Pattersonfunktion kann nicht zwischen den Koordinaten  $x,y,z$  und  $-x,-y,-z$  unterschieden werden. Die folgende Berechnung der Proteinphasen erfolgt in der Regel mit beiden möglichen Koordinaten. Die korrekten Koordinaten liefern hierbei die wahre Elektronendichtekarte des Proteins, während die dazu invertierten Koordinaten das Spiegelbild liefern, mit z.B. linksgängigen anstelle von rechtsgängigen  $\alpha$ -Helices. Die Entscheidung wird durch eine vergleichende Betrachtung der beiden Elektronendichtekarten gefällt.

Sind einmal Proteinphasen berechnet, z.B. von einem Derivat, können weitere Schweratomlagen in sogenannten Differenzfourier Elektronendichtekarten lokalisiert werden. Diese beruhen auf einer Fourier-Summitation mit den Koeffizienten  $|F_{PH}|-|F_P|$  und dem Protein-Phasenwinkel  $\alpha_p$ . Peaks in diesen Elektronendichtekarten korrespondieren mit den Lagen der entsprechenden Schweratome. Weiterhin zeigen die Differenzfourier Dichten einen höheren Kontrast als entsprechende Patterson Analysen und sie liefern die Koordinaten des neuen Derivates mit Bezug auf den gleichen Ursprung, wie das Derivat, welches zur Phasierung, also zur Berechnung von  $\alpha_p$  benutzt wurde.

Die bisherigen Betrachtungen gehen von freien Elektronen aus, bei denen die Phase des gestreuten Strahles exakt um  $180^\circ$  gegenüber der des einfallenden Strahles verschoben ist. Diese Näherung ist nicht mehr gültig, wenn die eingestrahelte Röntgenstrahlung energetisch in die Nähe einer Absorptionskante des untersuchten Materials kommt. Dabei werden Elektronen aus den inneren Schalen der betreffenden Atome angeregt bzw. aus ihrer

Schale herausgeschlagen. Dies führt zu einer von  $180^\circ$  verschiedenen Phasenverschiebung zwischen dem einfallenden und dem gestreuten Strahl. Durch diese anomale Dispersion wird das Friedel'sche Gesetz für die anomal streuenden Atome durchbrochen, d.h., für diese Atome gilt nicht mehr  $F_{hkl} = F_{-h-k-l}$ . Die Differenz zwischen  $F_{hkl}$  und  $F_{-h-k-l}$  entspricht hierbei zuzüglich eines Phasenfehlers den Strukturfaktoramplituden der anomal streuenden Atome, also der Schweratome. Unter Verwendung dieser anomalen Differenz lassen sich zusätzliche Beziehungen in die Konstruktion laut Abb. 7 einbringen und somit kann die Phasenambiguität gelöst werden. Die anomalen Differenzen können auch unter Verwendung der oben beschriebenen direkten oder Pattersonmethoden zur Bestimmung des Schweratom Teilmodells eingesetzt werden. Obwohl diese anomalen Differenzen meist sehr klein sind, enthalten sie wichtige Informationen, da sie innerhalb eines Datensatzes bestimmt werden und somit keine Fehler durch Nicht-Isomorphie eingehen.

### 2.5.2 Multiple Anomale Dispersion

Die Multiple Anomale Dispersion (MAD) kann im einfachsten Fall als besondere Form des Isomorphen Ersatzes betrachtet werden. Sie erfordert Röntgenstrahlung von frei wählbarer Wellenlänge, also Synchrotronstrahlung, und das Vorhandensein anomal streuender Atome im Kristall, welche entweder in dem entsprechenden Protein natürlich vorkommen (z.B. Fe in Häm enthaltenden Proteinen) oder als Schwermetallderivate analog zum Isomorphen Ersatz präpariert werden. Als besonders häufig angewandte Methode sei hier noch die Expression des gewünschten Proteins in einem Selen-Methionin enthaltenden Medium genannt (Doublé, 1997), was zum biologischen Einbau dieser Selen-Verbindung anstelle der natürlichen Aminosäure Methionin führt. Die Änderung des realen Streubeitrages, hier als dispersive Differenz bezeichnet, wird durch die Messung bei verschiedenen Wellenlängen, von denen eine genau der Absorptionskante entspricht, aufgrund von Absorptionseffekten realisiert. Des Weiteren wird der anomale Effekt, also die in der Nähe der Absorptionkante auftretende Differenz zwischen  $F_{h,k,l}$  und  $F_{-h,-k,-l}$  zur Phasierung benutzt. Bei Proteinen, die natürlich anomal streuende Atome enthalten, entfällt die oft sehr langwierige Suche nach geeigneten Derivatisierungsagenzien und -bedingungen.

Der atomare Formfaktor eines anomal streuenden Atoms,  $f_{anom.}$ , läßt sich unter Beachtung der von der Wellenlänge abhängigen  $f(\lambda)$  und unabhängigen  $f_0$  Anteile darstellen. Die von der Wellenlänge abhängigen Anteile führen aufgrund von Absorptionseffekten sowohl zu

einer Verringerung der Streukraft ( $f'(\lambda) < 0$ ), als auch zu der bereits unter 2.5.1 angesprochenen Phasenverschiebung ( $if''(\lambda)$ ).

$$f_{anom.} = f_0 + f(\lambda) = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda) \quad (13)$$

Sowohl die dispersive Differenz, die auf unterschiedlichen Werten von  $f(\lambda)$  bei verschiedenen Wellenlängen beruht, als auch die anomale Differenz, die in Abhängigkeit von der Größe  $if''(\lambda)$  die Friedel-Symmetrie innerhalb eines Datensatzes aufhebt, sind bis auf die bereits früher angesprochenen Phasenfehler proportional zu den Strukturfaktoramplituden des Schweratom Teilmodells. Somit läßt sich mit diesen Differenzen das Schweratom Teilmodell lösen und, da beide Terme orthogonal zu einander sind, auch das Phasenproblem eindeutig lösen. Zu diesem Zweck würde das Messen von zwei Datensätzen des gleichen Kristalls bei verschiedenen Wellenlängen theoretisch genügen. Um beide Differenzen zu maximieren, wird in der Regel ein Datensatz bei maximalem  $f''$ , ein Datensatz bei minimalem  $f'$  und ein dritter Datensatz bei einer von der Absorptionskante weit entfernten Wellenlänge aufgenommen. Der dritte Datensatz, bei dem  $f'$  nahe null ist, erlaubt es die dispersive Differenz zu maximieren.

Wie bereits für den anomalen Streubeitrag im Rahmen der Phasierung durch den Isomorphen Ersatz angesprochen, treten bei der MAD-Phasierung keine Fehler durch Nicht-Isomorphie auf, da alle Daten von ein und demselben Kristall gemessen werden können. Die führt zu einer oft ausgezeichneten Bestimmung der Phasen, obwohl die für die Phasierung benutzten anomalen und dispersiven Differenzen in der Größenordnung des Meßfehlers für die Strukturfaktoramplituden liegen.

Ein weiterer Vorteil der MAD-Phasierung gegenüber der Phasierung mittels Isomorphem Ersatz liegt in der unterschiedlichen Auflösungsabhängigkeit der Wellenlängen abhängigen und unabhängigen Anteile des atomaren Streufaktors begründet. Während  $f_0$  alle Elektronen des anomalen Streuers einbezieht und somit eine „normale“ Abnahme der Streukraft mit der Auflösung zeigt, tragen zu den von der Wellenlänge abhängigen Termen  $f'(\lambda)$  und  $f''(\lambda)$  nur die inneren Elektronen des anomalen Streuers bei. Diese Terme sind in Abhängigkeit von der Auflösung praktisch konstant. Der relative Beitrag dieser von der Wellenlänge abhängigen Terme und damit die Qualität der Phasenbestimmung („phasing power“) nimmt also mit zunehmender Auflösung zu, während im Fall des Isomorphen Ersatzes aufgrund der nie 100%-igen Isomorphie der Beitrag zur Phasenbestimmung mit

zunehmender Auflösung abnimmt. In der Praxis lassen sich sinnvolle Phasen mit der Methode der Isomorphen Ersatzes meist nur bis ca. 3 Å berechnen, während im Fall der MAD-Phasierung die Streukraft der Kristalle das Limit darstellt.

Der einzige Nachteil der MAD-Phasierung ist die Notwendigkeit einer Röntgenquelle mit wählbarer Wellenlänge, also Synchrotronstrahlung. Mit dem rasch zunehmenden Aufbau von leistungsfähigen Synchrotron-Meßstationen („beamlines“) wird dieses Problem allerdings zunehmend geringer.

### 2.5.3 Molekularer Ersatz

Beim Molekularen Ersatz werden die Phasen durch ein entsprechend des nativen Proteindatensatzes korrekt positioniertes Proteinmodell mit hinreichender Ähnlichkeit zur aktuellen Struktur bestimmt. Unter Verwendung der vom Suchmodell berechneten Phasen und der gemessenen Strukturfaktoramplituden wird dann eine Elektronendichteverteilung berechnet, die bei einem hinreichend ähnlichen Suchmodell das Lösen der neuen Struktur ermöglicht. Ob diese Ähnlichkeit gegeben ist, muß im Einzelfall ausprobiert werden. Ein Erfahrungswert besagt, daß die Standardabweichung der C<sup>α</sup>-Atome nicht mehr als 1 Å betragen sollte. Diese strukturelle Ähnlichkeit wird bei Protein-Inhibitor-Komplexen im Vergleich zum freien Protein oder bei Proteinen mit einer hohen Identität der Primärstruktur (> 20-30 %) oft erfüllt. Mit der rasanten Zunahme an bekannten Proteinstrukturen (siehe Abb. 4) steigt die Chance, eine ausreichend ähnliche, bereits gelöste Struktur zu finden.

Nachdem ein aussichtsreiches Suchmodell vorliegt, besteht die weitere Aufgabe in der korrekten Positionierung dieses Modells innerhalb der Einheitszelle. Im allgemeinen ergeben sich 3 Rotations- und 3 Translations-, also insgesamt 6 Freiheitsgrade. Eine solche Suche im 6 dimensionalen Raum ist zwar im Prinzip möglich, erfordert aber meist einen nicht realisierbaren Rechenaufwand. Die Benutzung der Pattersonfunktion (Patterson, 1934), ermöglicht es die Rotations- und Translationsfreiheitsgrade getrennt abzusuchen, was in zwei dreidimensionalen Suchen resultiert, deren rechnerischer Aufwand realisierbar wird. Die zu dieser Methode führenden Schritte sind in (Hoppe, 1957; Rossmann & Blow, 1962; Huber, 1965) und in vielen kristallographischen Lehrbüchern beschrieben.

Die Pattersonfunktion  $P(\mathbf{u})$  ist die Selbstfaltung der Elektronendichteverteilung  $\rho(\mathbf{r})$  in der Elementarzelle. Sie enthält die Information über sämtliche Vektoren  $\mathbf{u}=(u,v,w)$  die einen

interatomaren Abstand von einem Atom an Position  $\mathbf{r}=(x,y,z)$  zu einem Atom an Position  $\mathbf{r}+\mathbf{u}$  beschreiben und läßt sich ohne Phaseninformation berechnen. Wichtig ist hierbei, daß die intramolekularen Vektoren  $\mathbf{u}$ , die Abstände innerhalb eines Moleküls beschreiben, nur von der Orientierung (Rotationsfreiheitsgrade) eines Moleküls abhängen, während in die intermolekularen Vektoren sowohl die Orientierung, als auch die Lage der Moleküle in der Einheitszelle (Rotations- und Translationsfreiheitsgrade) eingehen.

$$P(\mathbf{u}) = \int_r \rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r} + \mathbf{u})d\mathbf{r} \quad (14)$$

$$P(\mathbf{u}) = P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw) \quad (15)$$

Das Prinzip der Pattersonsuche beruht darauf, daß das Suchmodell in einer dreidimensionalen Suche jeweils um gewisse Inkremente gedreht wird und von jeder der resultierenden Orientierungen, Strukturfaktoren ( $F_{calc}$ ) und daraus eine Patterson-Dichte gerechnet wird. Diese wird mit der Patterson-Dichte des gemessenen Protein-Datensatzes ( $F_{obs}$ ) verglichen und die Übereinstimmung mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten  $C(|F_{obs}|^2, |F_{calc}|^2)$  quantisiert.

$$C(P_{obs}, P_{calc}) = \int_u P(|F_{obs}|^2, \mathbf{u}) \times P(|F_{calc}|^2, \mathbf{u}) d\mathbf{u} \quad (16)$$

Stimmt die aktuelle Orientierung des Suchmodells mit der Orientierung des Proteins in der zum gemessenen Datensatz gehörigen Einheitszelle überein, so erhält man einen Peak für den Korrelationskoeffizienten. Im zweiten Schritt wird das so orientierte Suchmodell wieder in Inkrementen in einer dreidimensionalen Suche durch die Einheitszelle geschoben. Die Bewertung der korrekten Lage kann hier sowohl über den Kristallographischen R-Faktor (siehe 2.8) als auch über den Korrelationskoeffizienten erfolgen. Dieses grundsätzliche Prinzip wird in verschiedenen Programmen rechnerisch unterschiedlich umgesetzt, was in verschiedenen Rotations- und Translationsfunktionen resultiert. Dabei wird nicht immer, wie oben beschrieben, das Suchmodell selbst bewegt.

Es sei noch angefügt, daß die hier beschriebene Aufteilung des eigentlich 6-dimensionalen Suchproblems in zwei 3-dimensionale Suchen zu einer Verringerung des Kontrastes bei der Patterson Rotationssuche führt. Manchmal können durch Symmetriüberlegungen die

Freiheitsgrade der Suche soweit eingeschränkt werden, daß eine Suche über alle verbleibenden Dimensionen rechnerisch möglich wird. In der resultierenden Direktraum-Suche können dann unter Verwendung des kristallographischen R-Faktors als Bewertungskriterium oft Suchmodelle noch gefunden werden, die mit Hilfe der Patterson Methode nicht plaziert werden konnten.

## **2.6 Elektronendichtemodifikation**

Nicht immer liefern die mit einer der unter 2.5 beschriebenen Methoden bestimmten experimentellen Phasen  $\alpha_{exp}$  zusammen mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden  $|F_{obs}|$  eine Elektronendichtekarte von ausreichender Qualität. Die Methoden der Elektronendichtemodifikation beruhen darauf, daß in die vorhandene Elektronendichtekarte zusätzliche Informationen eingebracht werden. Nach einer Rücktransformation der entsprechend modifizierten Elektronendichteverteilung ergeben sich verbesserte Phasenwinkel  $\alpha_{mod}$ , die dann zusammen mit den gemessenen Strukturfaktoramplituden  $|F_{obs}|$  zur Berechnung einer verbesserten Elektronendichtekarte führen. Da die gemessenen Strukturfaktoramplituden  $|F_{obs}|$  im Gegensatz zu den experimentell bestimmten Phasen sehr genau sind, werden sie immer zur Berechnung der Elektronendichtekarten benutzt. Dieser Zyklus wird in der Regel bis zur Konvergenz wiederholt. Die hierzu angewandten Modifikationen der Elektronendichteverteilung beruhen auf verschiedenen Beobachtungen.

Zum einen gibt es in Proteinen getrennte Bereiche von Protein und Lösungsmittel. Dabei wird z.B. nach einem Algorithmus von Wang (Wang, 1985) bestimmt, welche Teile der Einheitszelle zum Protein und welche zum Lösungsmittel gehören. Dann wird die Elektronendichte im Lösungsmittelbereich auf einen kleinen, konstanten Wert gesetzt, wie es physikalisch sinnvoll ist („solvent-flattening“). Zur Bestimmung der Proteingrenzen ist hierfür die Kenntnis vom ungefähren Solvensgehalt erforderlich, was in Abhängigkeit von der Raumgruppe, der Größe der Einheitszelle, dem Molekulargewicht und der Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit abgeschätzt werden kann (Matthews, 1968).

Existieren von einem Protein zwei verschiedenen Kristallformen, oder sind mehrere Moleküle des Proteins in der asymmetrischen Einheit des Kristalls enthalten, kann man die Werte der Elektronendichte dort mitteln, wo sie aufgrund der vergleichbaren Position im Protein, gleich sein sollte (Kleywegt & Read, 1997). Natürlich ist es dafür notwendig,



sowohl die Proteingrenzen als auch die genaue Lage der einzelnen Proteinmoleküle in den Kristallen zu kennen.

Es wurde gezeigt, daß die relative Anzahl der Gitterpunkte in der Elektronendichtekarte, die einen gewissen Wert aufweisen, nur von der Auflösung des Datensatzes, aber nicht vom Protein selbst abhängig ist (Zhang & Main, 1990). Die Anpassung des experimentellen Elektronendichtehistogramms, also die Auftragung der Anzahl der Gitterpunkte, die einen gewissen Elektronendichtewert aufzeigen gegen den Wert der Elektronendichte, an das optimale Histogramm kann hierbei zur Verbesserung der Elektronendichtekarte genutzt werden („histogramm-matching“).

Weitere Methoden, um die experimentelle Elektronendichtekarten zu verbessern, sind z.B. die Skeletonisierung (Baker *et al.*, 1993; Swanson, 1994), die Anwendung der Sayre'schen Gleichung (Sayre, 1974; Zhang & Main, 1990) und das sogenannte „solvent-flipping“, als eine Erweiterung des „solvent-flattening“ (Bricogne, 1974).

Des weiteren werden oft mehrere der hier beschriebenen Verfahren nacheinander oder gleichzeitig angewandt, was zu einer Elektronendichtekarte von weitaus höherer Qualität führt, als jedes einzelne Verfahren erreichen würde. Auch werden diese Verfahren vielfach zur Phasenexpansion benutzt.

## **2.7 Interpretation der Elektronendichtekarte**

Für den Bau des atomaren Proteinmodelles werden Computer mit der Möglichkeit zur Stereodarstellung verwendet. Es gibt verschiedene Modellbauprogramme. Sie haben gemeinsam, daß man die Konturlinien der nach den weiter oben beschriebenen Methoden berechneten Elektronendichtekarten darstellen kann, so daß innerhalb der als schlauchförmige Käfige vorstellbaren Konturen eine höhere und außerhalb eine niedrigere Elektronendichte vorliegt. Außerdem stellen die Programme die Standardamino-säuren und verschiedene Kofaktoren als atomare Modelle bereit, die als Stabmodelle dargestellt dann in die Bereiche hoher Elektronendichte bewegt und dort zur Aminosäurekette des Proteins verbunden werden können. Die verschiedenen Modellbauprogramme stellen auch zusätzliche Funktionen bereit, mit denen z.B. ein gewisser Bereich des Modells rechnerisch in die ihn umgebende Elektronendichteverteilung optimal eingepaßt werden kann.

Wird die Elektronendichteverteilung mit Hilfe des isomorphen Ersatzes oder MAD gewonnen, so hält man in der „leeren Elektronendichtekarte“ zunächst nach typischen Sekundärstrukturelementen wie  $\alpha$ -Helices und Faltblättern Ausschau. Diese Bereiche werden zunächst als Poly-Alanin modelliert. Hat man einen Teil der Karte so interpretiert, versucht man, gegebenenfalls nach einer Verfeinerung des Modells, Phasenkombination und neuerlicher Phasierung (siehe 2.8), fehlende Konnektivitäten zu finden und die Seitenketten der Aminosäuren zuzuordnen. Für die Zuordnung der Seitenketten wird zunächst versucht Bereiche der Primärstruktur, die ein typisches Aussehen der Elektronendichteverteilung zur Folge haben (z.B. aromatische Aminosäuren, insbesondere Tryptophane, aber auch Kofaktoren) in die Elektronendichtekarte einzupassen. Ist die Primärstruktur innerhalb der Proteinkette in der Elektronendichtekarte fixiert, können die weiteren Seitenketten entsprechend der Aminosäureabfolge zugeordnet werden. Ist die initiale Elektronendichtekarte von sehr guter Qualität, kann man auch gleich zu Beginn die Primärstruktur innerhalb dieser fixieren und dann das Modell mit den korrekten Aminosäuren erweitern ohne zunächst ein Poly-Alanin Modell zu erstellen.

Wurde die Elektronendichteverteilung mit Patterson Suchmethoden gewonnen, liegt nach der unter 2.5.3 beschriebenen Platzierung des Suchmodelles bereits dieses Modell in der mit Modellphasen berechneten Elektronendichtekarte. Man versucht nun die Bereiche des Suchmodelles, die nicht mit dem untersuchten Protein übereinstimmen, zu finden und entsprechend der Elektronendichtekarte zu verändern. Hierbei ergibt sich das Problem, daß keine experimentellen Phasen vorliegen und mit Modellen berechnete Elektronendichtekarten immer stark dazu neigen das zur Phasierung benutzte Modell wiederzugeben („model bias“). Zunächst versucht man in den Bereichen, wo im Suchmodell keine Atome vorhanden aber im untersuchten Protein zu erwartet sind (z.B. im Suchmodell nicht vorhandene Seitenketten oder Liganden), diese auch in der Elektronendichtekarte zu sehen. Gelingt dies, so kann man davon ausgehen, daß eine sinnvolle Lösung bearbeitet wird.

Um den „model bias“ im Falle vom Molekularen Ersatz aber auch generell in Bereichen nicht klar definierter Elektronendichteverteilung zu verringern kommen sogenannte „omit maps“ zum Einsatz. Dies sind Elektronendichtekarten, für die die Phasen ohne die fraglichen Bereiche des aktuellen Modells berechnet wurden. Der zur Phasierung verbleibende Rest kann zusätzlich noch durch verschiedene Methoden „aufgeschüttelt“

werden (Turk, 1992), um den im restlichen Modell bezüglich des fraglichen Bereiches verbleibenden „model bias“ zu minimieren.

In beiden Fällen sind mehrere Zyklen der Interpretation der Elektronendichtekarte, gefolgt von der Verfeinerung (siehe 2.7) des aktuellen Modells und erneuter Berechnung der Elektronendichteverteilung mit Phasen, die vom verfeinerten Modell gewonnen wurden, notwendig. Eine Verbesserung des Modells führt zu verbesserten Phasen, was wiederum eine verbesserte Elektronendichtekarte zur Folge hat. Dieser Zyklus wird in der Regel bis zur Konvergenz wiederholt.

In der letzten Zeit wurden auch automatisierte Varianten des Modellbauens entwickelt. Dazu zählt die Skeletonisierung der Elektronendichtekarte (Swanson, 1994), was das Auffinden von Sekundärstrukturelementen erleichtern kann, das Absuchen von Rotamer-Bibliotheken für die Wahl der optimalen Seitenkettengeometrie (Jones, *et al.*, 1991) und Verfahren bei denen eine automatische Veränderung des aktuellen Modells und die kristallographische Verfeinerung zyklisch bis zur Konvergenz durchlaufen wird (Lamzin, & Wilson, 1997). Das letztere Verfahren kann bei einer Auflösung von mindestens 2.5 Å für den automatischen Einbau von im Kristallgitter definierten Wassermolekülen in ein sonst fertiges Proteinmodell standardmäßig benutzt werden. Für das automatische Erstellen von kompletten Proteinstrukturen in experimentelle Elektronendichtekarten (Isomorpher Ersatz oder MAD) bzw. das Umbauen des via Molekularen Ersatz platzierten Suchmodells zum endgültigen Modell sind momentan noch sehr hohe Auflösungen (ca. 1.5 Å oder besser) und im ersten Fall ausgezeichnete experimentelle Phasen erforderlich, so daß die vollautomatisierte Methode in den meisten Fällen keine wirkliche Alternative zum „Bauen von Hand“ darstellt.

## **2.8 Verfeinerung makromolekularer Strukturen**

Nach der ursprünglichen Interpretation der Elektronendichtekarte bzw. nach jedem weiteren Zyklus der Modellverbesserung wird das Modell in der Regel gegen die experimentell ermittelten Strukturfaktoramplituden verfeinert. Dies ist ein Versuch, die aus dem aktuellen Modell berechneten Strukturfaktoramplituden  $|F_{calc}|$  in bessere Übereinstimmung mit den beobachteten Werten  $|F_{obs}|$  zu bringen. Dabei werden sowohl die Positionen der einzelnen Atome verändert („positional refinement“), als auch die B-Faktoren angepaßt („B-factor refinement“). Da im Fall der Proteinkristallographie die

Anzahl der gemessenen Werte, also die Anzahl der bei gegebener Auflösung beobachteten Strukturfaktoramplituden, die Anzahl der zu bestimmenden Parameter nicht ausreichend übersteigt, kann hierbei nicht nur die Übereinstimmung von  $|F_{obs}|$  und  $|F_{calc}|$  in die Berechnung eingehen. Es werden zusätzliche geometrische Restraints, die auf den deutlich genauer bestimmbareren Kleinmolekülstrukturen der einzelnen Aminosäuren beruhen (Engh & Huber, 1991) als Kraftfelder in die Verfeinerung mit einbezogen. Weiterhin sollten in der Struktur benachbarte Atome eine vergleichbare Dynamik, also einen ähnlichen B-Faktor aufweisen, was als Restraint für die Abweichung der B-Faktoren benachbarter Atome genutzt wird.

Die Qualität der Übereinstimmung von  $|F_{obs}|$  und  $|F_{calc}|$  wird durch den kristallographischen R-Faktor ausgedrückt:

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs,hkl}| - k |F_{calc,hkl}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs,hkl}|} \quad (17)$$

$k$  ist hierbei ein Skalierungsfaktor, um die gemessenen und die aus dem aktuellen Modell berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine einheitliche Skala zu bringen. Ein Modell gilt als richtig, wenn der R-Faktor bei einer sinnvollen Geometrie nahe bei oder unter 20% liegt. Weiterhin wird noch der „freie R-Faktor“ ( $R_{free}$ ) als weitere Größe zur Beurteilung der Modellqualität eingesetzt. Für dessen Berechnung (Brünger, 1992) wird ein gewisser Prozentsatz der beobachteten Reflexe (5-10 %) nicht in die Berechnungen für die Verfeinerung einbezogen. Die Übereinstimmung dieser Reflexe mit ihren vom Modell berechneten Partnern wird am Ende der Verfeinerung als Kriterium gewertet, ob das verfeinerte Modell wirklich besser an die Realität angepaßt wurde, oder ob die Annäherung der  $|F_{calc}|$  an die  $|F_{obs}|$  eher aus einer besseren „Modellierung“ des Rauschens und der Meßfehler resultiert (Überverfeinerung). Die Differenz zwischen R und  $R_{free}$  sollte hierbei für ein gut verfeinertes Modell 5% nicht übersteigen.

Weiterhin gibt es die Möglichkeit molekulardynamischer Simulationen, um den Konvergenzradius der Verfeinerung zu erhöhen. Das Proteinmolekül wird unter Beachtung der kristallographischen (R-Faktor) und geometrischen Restraints rein rechnerisch erhitzt. Das heißt, die einzelnen Atome werden nach den Prinzipien der Molekulardynamik in Bewegung versetzt und ihre Position unter Verwendung der Newton'schen Dynamik

berechnet. Die Temperatur wird während der Verfeinerung zuerst auf 3000 – 4000 K gebracht und dann langsam erniedrigt, so daß die Atome zunehmend geringer um ihre Gleichgewichtsposition schwingen („simulated annealing“, Brünger *et al.*, 1990). Die Vergrößerung des Konvergenzradius liegt darin begründet, daß sich der Verfeinerungsprozeß mit dieser Methode aus lokalen Minima herausheben läßt.



### **3 Cytochrom-c<sub>552</sub> aus *Thermus thermophilus***

#### **3.1 Materialien und Methoden**

##### **3.1.1 Kristallisation**

Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode mit „sitzendem Tropfen“ in CrysChem-Platten (Charles Supper Co., USA). 8 µl der Proteinlösung (10 mg/ml, 10 mM Tris-HCl Puffer) wurden mit 2 µl der Präzipitanzlösung (100 mM Tris-HCl, pH 8.2, 2.8 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gemischt und bei 18°C gegen ein Reservoir aus 1ml der Präzipitanzlösung äquilibriert.

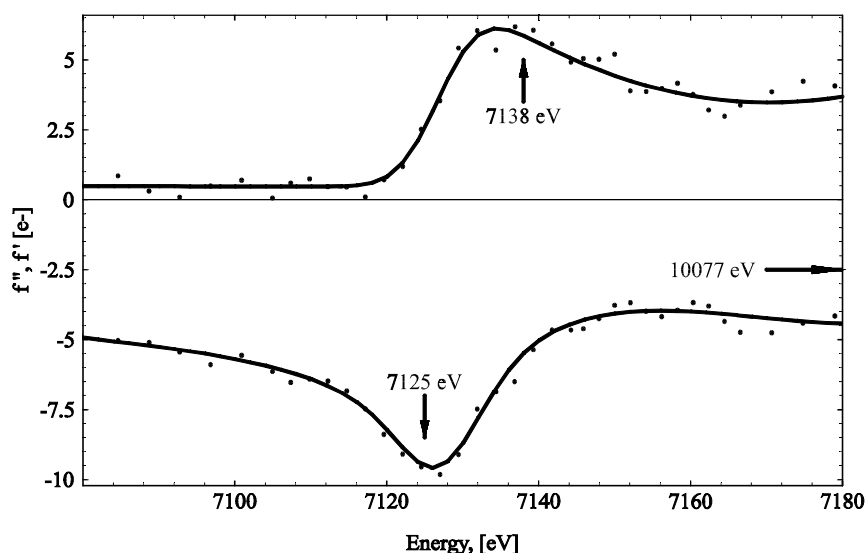
##### **3.1.2 Datensammlung und –auswertung**

Zur Messung von Diffraktionsdaten wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert und bei Raumtemperatur in einer Serie von Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkel von 1° an einem Drehanodengenerator (Rigaku RU 200) mit Graphit Monochromator vermessen. Die Daten wurden mit Hilfe eines 300 mm „image plate“ Detektors (Marresearch, Hamburg) aufgezeichnet.

Für die MAD-Phasierung (siehe 3.1.3) wurden die Kristalle an der „wiggler-beamline“ BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY), Hamburg vermessen. Zur Vermeidung von Strahlenschäden durch die deutlich stärkere Strahlungsintensität wurden die Kristalle in eine Lösung aus 100 mM Tris-HCl, pH 8.1, 3.0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 35 % Saccharose (Kryopuffer) überführt, schnell mit einem „cryo-loop“ herausgefischt und in einem Stickstoffstrom bei 90 K (Oxford Cryosystems) eingefroren. Zuerst wurde ein Röntgenfluoreszenzspektrum in der Nähe der Fe-K Absorptionskante vom gefrorenen Kristall unter Verwendung eines NaJ(Tl) Scintillationszählers aufgenommen und mit dem Programm DISCO (Eichhorn, 1985) ausgewertet (Abb. 8).

Diffraktionsdaten zur MAD-Phasierung wurden dann bei drei verschiedenen Wellenlängen (Maximum  $f'$ : 7138 eV,  $\lambda_1=1.7369$  Å; Minimum  $f'$ : 7125 eV,  $\lambda_2=1.7402$  Å & „Remote Point“: 10.077 eV,  $\lambda_3=1.230$  Å) mit einem 300 mm „image plate“ Detektor (MarResearch,

Hamburg) unter einem Drehwinkel von  $2.0^\circ$  pro Bild aufgezeichnet. Die Messung erfolgte jeweils über ein kontinuierliches Winkelsegment von  $90^\circ$ , gefolgt von weiteren  $90^\circ$  in inverser Strahlgeometrie zum direkten Messen der Friedel-Paare. Ein vierter Datensatz wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda_4=1.05 \text{ \AA}$  in Inkrementen von  $1.5^\circ$  aufgezeichnet, um Hochauflösungsdaten bis  $1.28 \text{ \AA}$  zu erhalten. Die Daten ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  &  $\lambda_3$ ) wurden zur MAD-Phasierung mit den Programmen DENZO/SCALEPACK (Otwinowsky & Minor, 1993) integriert und skaliert. Für die Verfeinerung zu hoher Auflösung wurden die Daten ( $\lambda_3$  &  $\lambda_4$ ) mit dem Programm MOSFLM v5.23 (Leslie, 1991) integriert und mit den Programmen ROTAVATA, AGROVATA und TRUNCATE (Collaborative Computational Project, 1994) skaliert.



**Abb. 8: Dispersionsterme des Cytochrome- $c_{552}$  Kristalls**

Die Dispersionsterme,  $f''$  und  $f'$ , des anomalen Streubeitrages wurden mittels eines Röntgenfluoreszenzspektrums und dem Programm DISCO (Eichhorn, 1995) vom gefrorenen Kristalle vor der MAD-Datensammlung bestimmt.

### 3.1.3 MAD-Phasierung

Von allen MAD-Datensätzen wurden anomale und dispersive Differenzpattersondichten berechnet und die Koordinaten des Eisenatoms mit dem Programm RSPS (Knight, 1989) bestimmt. Die Proteinphasen wurden unter Benutzung der drei MAD-Datensätze ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  &  $\lambda_3$ ) mit den Programmpaketen MADSYS (Hendrickson, 1991) und MADPRB (Friedmann, 1996) berechnet. Zuerst wurden mit MADSYS die Friedel-Paare zugeordnet und ein lokaler Skalierungsalgorithmus angewandt. Anschließend wurden die anomalen Streubeiträge,  $f'$  und  $f''$ , mit MADPRB verfeinert und die MAD-Gleichungen gelöst. Die



Strukturfaktoren und Phasendifferenzen der einzelnen Beobachtungen von einander entsprechenden Friedel-Paaren wurden dann mit MADSYS gemittelt, die Koordinaten und der B-Faktor des Fe-Atoms verfeinert und die Proteinphasen berechnet. Parallel wurde die MAD-Phasierung mittels XPLOR (Brünger, 1992b) berechnet. Dabei wurden die Proteinphasen in beiden möglichen Raumgruppen,  $P4_1$  und  $P4_3$ , berechnet. Anschließend wurde die experimentelle Elektronendichteverteilung durch 10 Zyklen „solvent-flattening“ und „histogramm-matching“ mit DM (Cowtan, 1994) unter Annahme eines Solvensgehaltes von 55% modifiziert.

### 3.1.4 Modellbau und Verfeinerung

Das atomare Modell des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> wurde mit FRODO (Jones, 1978) erstellt. Das Modell wurde in XPLOR (Brünger, 1992b) zunächst unter Verwendung des „Remote Point“-Datensatzes bis 2.1 Å verfeinert und Wassermoleküle wurden automatisch mit MAIN (Turk, 1992) erzeugt. Die Auflösung wurde in mehreren Zyklen von Modellbau und Verfeinerung bis auf 1.28 Å expandiert. Zu Beginn wurden nur die Atompositionen verfeinert, während in den späteren Verfeinerungszyklen ebenfalls die B-Faktorverfeinerung sowie das „simulated annealing“ Anwendung fanden. Während der gesamten Verfeinerung wurden die geometrischen Restraints von Engh & Huber (1991) benutzt und ein einheitliches „test-set“ zur Berechnung des freien R-Faktors (Brünger, 1992a) eingehalten. Die untere Auflösungsgrenze wurde während der Verfeinerung bei 8.0 Å gesetzt, um den Einfluß der im Proteinkristall enthaltenen Lösungsmittelbereiche auf die niedriger aufgelösten Strukturfaktoren auszuschließen. Die  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  und  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Differenzfourier Elektronendichtekarten wurden stets mit allen gemessenen Strukturfaktorampplituden berechnet. Die Qualität des atomaren Modells wurde mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) kontrolliert.

### 3.1.5 Strukturanalyse

Die Sekundärstruktur des komplett verfeinerten Modells wurde mit dem Programm DSSP (Kabsch & Sander, 1983) analysiert. Die Struktur wurde mit verschiedenen „class I“ Cytochromen-*c* mittels RMS-Überlagerung der neun Hämatome FE, CHA, CHB, CHC, CHD, C2A, C2B, C2C und C2D in MAIN (Turk, 1992) verglichen. Diese Strukturen wurden so ausgewählt, daß sie alle bekannten strukturellen Eigenschaften der verschiedenen „class I“ Cytochrome-*c* abdecken.

Um die Anzahl der in den verschiedenen mesophilen und thermophilen Cytochromen-*c* vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen zu vergleichen wurden die Wasserstoffatome zunächst aus den Strukturen entfernt und unter einheitlichen Randbedingungen mittels XPLOR neu erstellt (Tanner *et al.*, 1996). Die Grenzwerte für die Bestimmung von Wasserstoffbrückenbindungen betragen 90° für Bindungswinkel und 3.5 Å für Bindungslängen. Die Proteinoberfläche, die Ladungsverteilung auf dieser Oberfläche, das Volumen und interne Kavitäten der Proteine wurden mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) bestimmt und analysiert.

### 3.1.6 Präparation reduzierter Kristalle und deren Analyse

Cytochrome-*c*<sub>552</sub> Kristalle (siehe 3.1.1) wurden in eine Lösung aus 3.5 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 8.2 (Erntepuffer) überführt und in eine Anaerobkammer (Eigenbau, Restgehalt an O<sub>2</sub> unter 0.1 vol. %) gebracht. Der den Kristall umgebende Erntepuffer und die Reservoirlösung wurden auf 1.5 mM Natriumdithionit gebracht und der Kristall 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Kristall in der Anaerobkammer in eine Quarzkapillare montiert und diese mit Glaswachs luftdicht verschlossen. Röntgendiffraktionsaufnahmen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben an einem Drehanodengenerator aufgenommen und ausgewertet. Zur Kontrolle des Oxidationszustandes wurden reduzierte Kristalle vor und nach den Röntgenaufnahmen in der Anaerobkammer mit sauerstofffreiem Erntepuffer mehrfach gewaschen, bis kein Reduktionsmittel im der Waschlösung mehr nachweisbar war, anschließend in sauerstofffreiem Wasser gelöst und Absorptionsspektren in verschlossenen Küvetten aufgenommen. Sauerstofffreie Lösungen wurden durch mehrfaches Evakuieren und Begasen mit Argon hergestellt und mit dem Redox-Indikator Resazurin überprüft.

Zur Bestimmung der Struktur des reduzierten Cytochroms-*c*<sub>552</sub> wurde das verfeinerte Modell des oxidierten Proteins herangezogen. Die Wassermoleküle wurden entfernt und das resultierende Modell zunächst als starrer Körper gegen den neuen Datensatz verfeinert („rigid body refinement“). Anschließend folgten mehrere Zyklen von Modellbau in MAIN (Turk, 1992) und Verfeinerung in XPLOR (Brünger, 1992b), die sowohl die Positionen der Atome, deren B-Faktoren und „simulated annealing“ beinhalteten sowie das automatische Erstellen der definierten Wassermolekülen mit ARP (Lamzin, 1997). Der Vergleich zwischen der oxidierten und reduzierten Form wurde mittels r.m.s. Überlagerung der C<sup>α</sup>-Atome beider Strukturen in MAIN (Turk, 1992) durchgeführt.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Kristallisation

Die Kristalle des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> gehören zu einer der Raumgruppen des enantiomorphen Paares  $P4_1 / P4_3$  und enthalten ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Die Zellkonstanten betragen  $a = b = 48,5 \text{ \AA}$ ,  $c = 68,3 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . Beim Einfrieren änderten sich diese leicht zu  $a = b = 47,1 \text{ \AA}$ ,  $c = 68,8 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ , was einem Matthews-Koeffizienten von  $2,58 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  bzw. einem Lösungsmittelgehalt von 52 % entspricht (Matthews, 1968). Die Kristalle streuen an einem Drehanodengenerator bis zu einer Auflösung von ca.  $2 \text{ \AA}$  und bei Verwendung von Synchrotronstrahlung bis zu einer Auflösung von weniger als  $1,3 \text{ \AA}$ .

### 3.2.2 Datensammlung und –auswertung

Für den oxidierten, gefrorenen Kristall konnten am Synchrotron Daten bis  $2,1 \text{ \AA}$  Auflösung zur MAD Phasierung und ein hochaufgelöster Datensatz bis  $1,28 \text{ \AA}$  Auflösung zur Verfeinerung des Modells gesammelt werden. Alle Daten waren von ausgezeichneter Qualität mit einem  $R_{\text{sym}}$  von 3-5% für die MAD-Datensätze und 3,3 % für den Höchauflösungsdatensatz. Der reduzierte Kristall streute bis  $1,95 \text{ \AA}$  an einem Drehanodengenerator ( $R_{\text{sym}} = 6,5 \%$ ). Die Datensammlung ist in Tab. 1 zusammengefaßt.

### 3.2.3 MAD-Phasierung

Bereits die ersten beiden Datensätze ( $\lambda_1$  &  $\lambda_2$ ) lieferten gute Phaseninformationen. Elektronendichtekarten, die mit diesen beiden Datensätzen berechnet wurden, zeigten klar die Lage des Häms und weitere strukturelle Details. Der dritte Datensatz ( $\lambda_3$ ) erlaubte aufgrund der hier vernachlässigbaren Absorptionseffekte die lokale Skalierung und damit die weitere Verringerung von systematischen Fehlern sowie die Maximierung der dispersiven Differenzen. Die Verfeinerung der Dispersionsterme gegen die Diffraktionsdaten der drei Wellenlängen resultierte in Werten, die gut mit den Röntgenfluoreszenzspektren übereinstimmten (siehe Tab. 1). Die Entscheidung zwischen den beiden möglichen, enantiomorphen Raumgruppen ( $P4_1$  oder  $P4_3$ ) konnten unter Betrachtung der entsprechenden Elektronendichtekarten und des Verhaltens der R-Faktoren während der Dichtemodifikation zu Gunsten von  $P4_1$  gefällt werden. Die aus allen drei Datensätzen resultierende Phaseninformation war mit einer „figure of merit“ (FOM) von 0.84 sehr gut.

**Tab. 1: Statistik der Datensammlung des Cytochroms-*c*<sub>552</sub>**

Datensatz	$f'$ -Maximum ( $\lambda_1$ )	$f'$ -Minimum ( $\lambda_2$ )	Remote Point ( $\lambda_3$ )	Hochauflösung ( $\lambda_4$ )	Verfeinerung ( $\lambda_3$ & $\lambda_4$ )	Reduziert
Wellenlänge [Å]	1,7369	1,7402	1,230	1,05	1,230 & 1,05	1,54178
Auflösung [Å]	27-2,1	23-2,1	21-2,1	4,9-1,28	14,6-1,28	24,2-1,95
$f'$ [e <sup>-</sup> ]	-6,0 (-7,1)	-9,4 (-8,7)	0,0	-	-	-
$f''$ [e <sup>-</sup> ]	6,1 (5,2)	2,2 (2,8)	2,21	-	-	-
Vollständigkeit [%] †, ‡	95,1 (91,7)	95,1 (91,6)	96,6 (94,6) 95,4 (96,1)	86,2 (78,2)	93,6 (78,2)	94,6 (91,3)
Zahl der Reflexe †, §	7.412	7.408	7.534 8.508	33.007	36.004	10.896
Multiplizität †	3,9	3,9	3,8 7,1	3,5	4,6	4,5 (4,5)
R <sub>sym</sub> [%] ‡	4,6 (6,6)	4,7 (6,6)	2,5 (3,8)	5,8 (35,7)	3,3 (35,7)	6,5 (31,7)

\* Die Werte von  $f'$  und  $f''$  nach der Verfeinerung mit MADPRB (Friedman, 1996) sind in Klammern angegeben. Die Werte für  $\lambda_3$  wurden nach Brennan & Cowan (1992) berechnet und während der Verfeinerung konstant gehalten.

† Die Werte in der oberen Zeile korrespondieren zur Auswertung mit DENZO & SCALEPACK (Otwinowsky & Minor, 1993) für die MAD-Phasierung, wobei nur komplette Friedel-Paare und hierbei die beiden entsprechenden Beobachtungen als unabhängig betrachtet wurden. Die Werte in der unteren Zeile korrespondieren zur Auswertung mit MOSLFM (Leslie, 1991) zur Verfeinerung unter Annahme vollständiger Friedel-Symmetrie.

‡ Die Werte in Klammern korrespondieren zur letzten Ausflösungsschale: 2,23-2,15 Å für die MAD-Datensätze, 1,31-1,28 für den Hochauflösungsdatensatz und 1,95-2,02 für den Datensatz des reduzierten Kristalls.

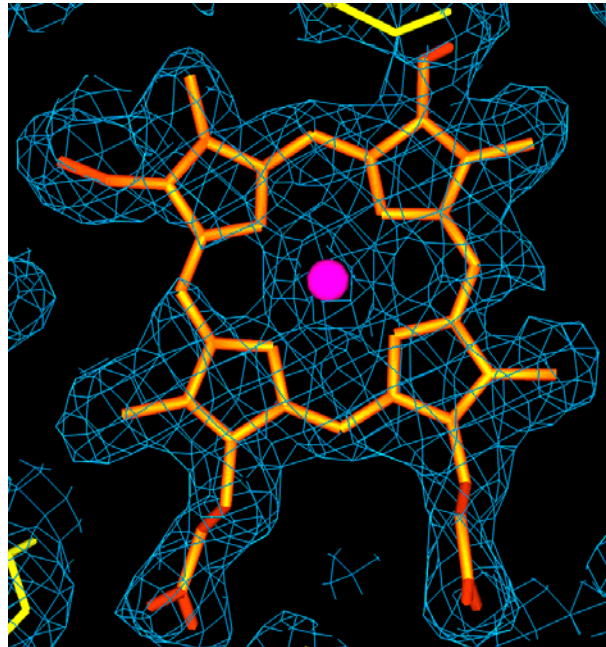
§ Angegeben ist die Anzahl der unabhängigen Reflexe.

### 3.2.4 Modellbau, Verfeinerung und Qualität der Modelle

Die ausgezeichnete Qualität der MAD-Elektronendichtekarte (Abb. 9) erlaubte bereits im ersten Modellbauzyklus den Einbau des Häms und der Aminosäurereste 4 bis 126 inklusive Seitenketten. Nach dem automatischen Einbau von Wassermolekülen und der Benutzung des Hochauflösungsdatensatzes ( $\lambda_3$  &  $\lambda_4$ ) zur Verfeinerung konnte das atomare Modell auf die Aminosäurereste 3 bis 130 ausgeweitet und bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 19,08 % ( $R_{\text{free}} = 22,4$  %) bei guter Stereochemie verfeinert werden (Tab. 2).

Die komplett verfeinerte Struktur des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> besteht aus 128 Aminosäureresten (Reste 3 bis 130 in der Primärstruktur), dem Häm und 196 Wassermolekülen. Die Seitenketten der Reste Lys-6, Glu-40, Gln-57, Lys-64, Glu-78, Lys-95 und Glu-106 sowie die terminalen Reste Gln-1, Ala-2 und Lys-131 sind nicht vollständig in der Elektronendichtekarte definiert, was auf die hohe Beweglichkeit dieser an der Oberfläche des Moleküls liegenden Seitenketten zurückgeführt werden kann. Im „Ramachandran Plot“ (Ramachandran & Sasissekharan, 1968) liegen fast alle Reste in den bevorzugten (91,5 %) und zusätzlich erlaubten (7,5 %) Regionen. Die einzige Ausnahme bildet Aminosäure

Gln-16, deren untypische Konformation jedoch sehr gut in der  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte definiert ist.



**Abb. 9: Experimentelle Elektronendichtekarte des Cytochroms-*c*<sub>552</sub>**

Dargestellt ist die experimentelle Elektronendichtekarte (bei  $1\sigma$  konturiert) nach MAD-Phasierung und Elektronendichtemodifikation im Bereich des Häm zusammen mit dem verfeinerten Modell. Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Zum Erstellen der Struktur des reduzierten Cytochroms-*c*<sub>552</sub> waren außer den verschiedenen Verfeinerungszyklen kaum manuelle Eingriffe notwendig. Diese beschränkten sich auf die Korrektur von kristallographisch definierten Wassermolekülen und wenigen Seitenketten. Die Verfeinerungsstatistik für die reduzierte Struktur ist ebenfalls in Tab. 2 zusammengefaßt.

### 3.2.5 Strukturbeschreibung

Die Gesamtstruktur des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> von *T. thermophilus* ist in Abb. 10 gezeigt. Sie besteht aus einer Proteinkette, die sich um das Häm faltet und acht  $\alpha$ -Helices sowie ein zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt bildet. Entsprechend der Sekundärstrukturzuordnung von DSSP (Kabsch & Sander, 1983) sind 56 % der 131 Aminosäuren in  $\alpha$ -helicaler oder  $\beta$ -Strangkonformation. Andere Teile der Struktur, die von DSSP als „random coil“ bestimmt wurden, zeigen ebenfalls  $\alpha$ -helicale Wasserstoffbrückenbindungen. Das N-terminale „Helix-Loop-Helix“ Motiv (Asp-3 bis His-15), kann auch als eine leicht

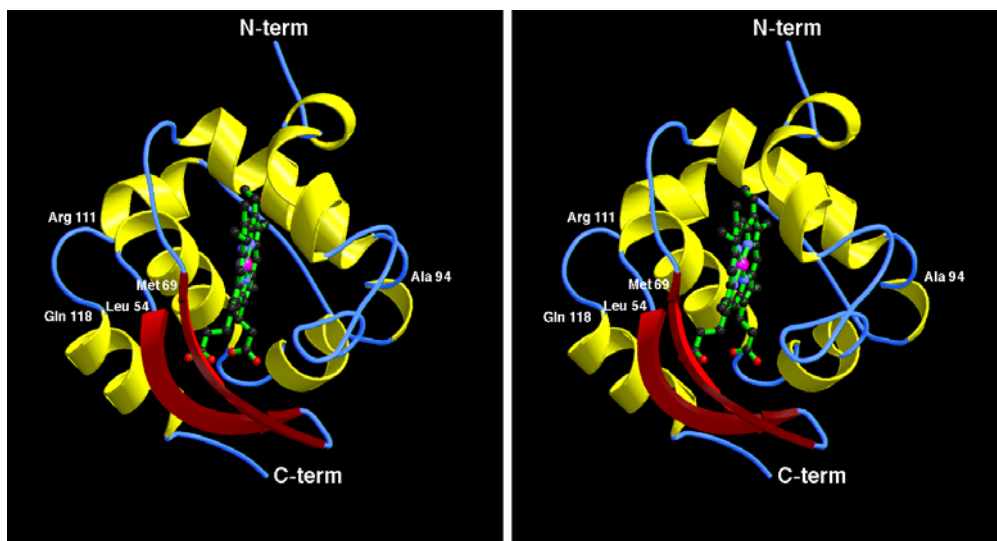
gebogene  $\alpha$ -Helix beschrieben werden. Die beiden kovalent zum Häm gebundenen Cysteine (Cys-11 & Cys-14) sowie der fünfte koordinative Eisenligand (His-15) sind Bestandteil dieser N-terminalen Helix. Der sechste koordinative Eisenligand (Met-69) gehört zu dem ausgeprägten zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches sich von Leu-54 bis Met-69 erstreckt. Die Existenz eines so ausgeprägten  $\beta$ -Faltblattes ist unüblich für die sonst fast ausschließlich  $\alpha$ -helicalen „class I“ Cytochrome (Moore & Pettigrew, 1990).

**Tab. 2: Statistik der Verfeinerung des Cytochroms-*c*<sub>552</sub>**

Statistischer Wert	Oxidierter Struktur	Reduzierte Struktur
Auflösungsbereich [Å]	8,0 – 1,28	8,0-2,0
Zahl der Reflexe – gesamt	35.906	10.895
– working set	34.081	10.364
– test set	1.825	531
Vollständigkeit [%]	93,3	95,0
– working set	88,5	90,5
– test set	4,7	4,6
R-Faktor [%] *	19,08 (32,75)	19,75 (31,42)
R <sub>free</sub> [%] *	22,40 (30,42)	25,94 (44,99)
Anzahl der Atome (außer H)	1.236	1.090
– Davon Solvesmoleküle	196	50
RMS Abweichung von Idealwerten		
– Bindungslängen [Å]	0,012	0,011
– Bindungswinkel [°]	1,453	1,498
– Diederwinkel [°]	23,157	23,402
B-Faktor Statistik		
– Mittlerer B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	15,1	24,8
– Hauptkette [Å <sup>2</sup> ]	13,2	22,3
– Seitenkette [Å <sup>2</sup> ]	17,1	27,0
– Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	33,7	39,8
– Häm [Å <sup>2</sup> ]	8,62	12,7
– RMS Abweichung gebundener Atome [Å <sup>2</sup> ]	2,70	3,64

\* Werte für die letzte Auflösungsschale (oxidiert: 1,28 – 1,29 Å; reduziert: 2,00 – 2,02 Å) sind in Klammern angegeben.

Die Häm-Gruppe ist fast komplett in eine hydrophobe Tasche des Proteins eingebettet. Nur wenige Atome des Pyrrol-Ringes C sind dem Solvens ausgesetzt. Außer den oben beschriebenen kovalenten und koordinativen Bindungen ist das Häm weiterhin durch eine Salzbrücke zwischen der Carboxyl-Gruppe von Ring A und Arg-125 stabilisiert. Die Ladung der zweiten Carboxyl-Gruppe des Häms wird nicht durch eine positiv geladenen Aminosäureseitenkette neutralisiert. Das Häm selbst ist, wie in Cytochromen üblich, nicht vollständig planar, sondern leicht in eine Sattelform verbogen.



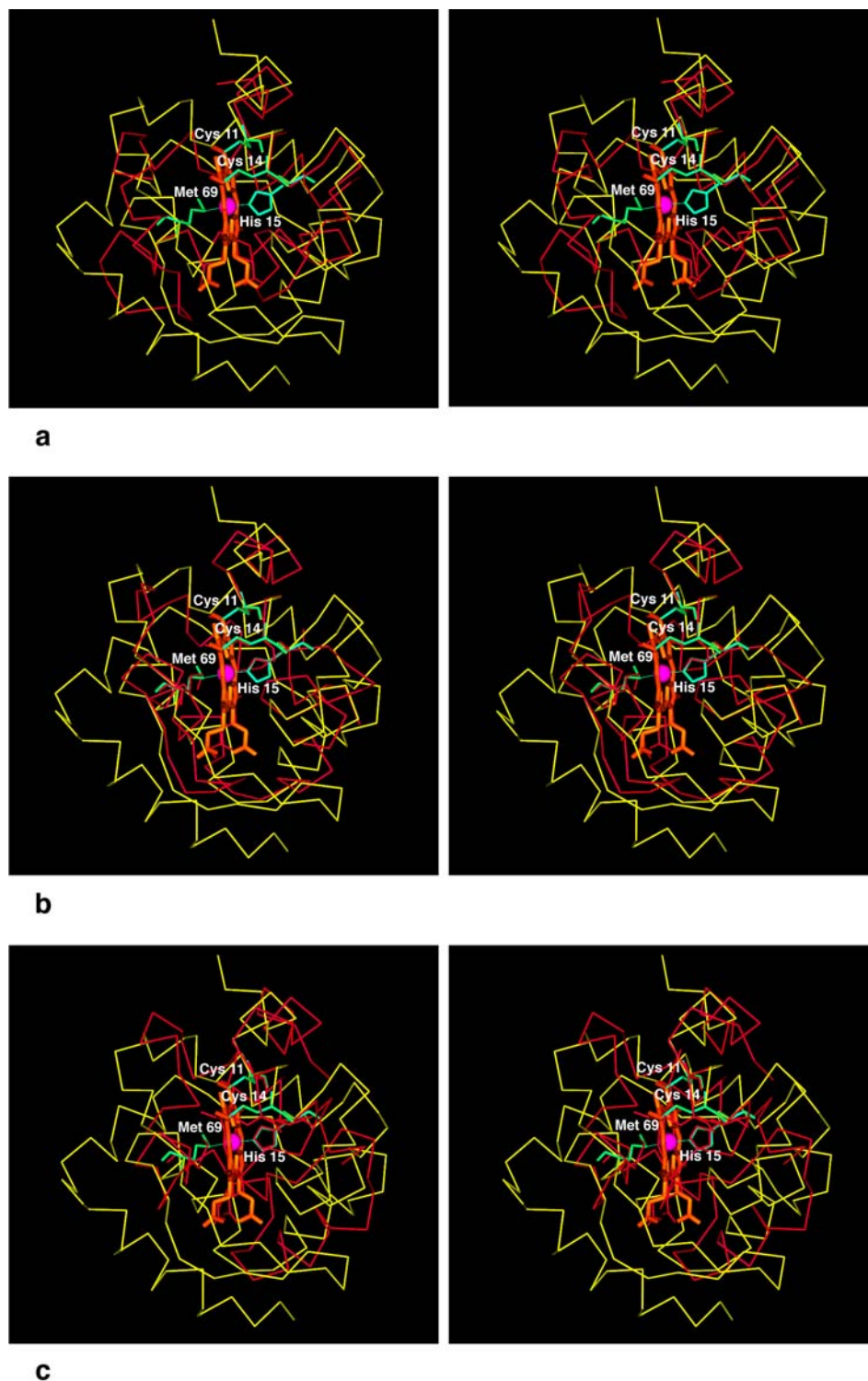
**Abb. 10: Stereo-Ribbon-Darstellung des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> aus *T. thermophilus***

Die Darstellung ist in Standard-Orientierung, wobei der Blick auf den solvensexponierten Pyrrol-Ring C des Häms zeigt und der Eisen-Ligand His-15 auf der rechten Seite liegt. Die Häm-Gruppe ist als „Ball-and-Stick“ Modell dargestellt. Das ausgedehnte  $\beta$ -Faltblatt (Leu-54 bis Met-69) ist in rot im unteren Bereich der Struktur zu sehen. Die beiden Termini und der Beginn der C-terminalen stabilisierenden Klammer („Thermo-Helices“) sind beschriftet. Diese Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erzeugt und mit RASTER3D (Merritt & Murphy, 1994) gerendert.

Das Innere der Proteins ist stark hydrophob und enthält im Gegensatz zu vielen anderen Cytochromen keine Wassermoleküle. Es konnten zwei interne Kavitäten auf der rechten Seite hinter dem Häm gefunden werden (Betrachtung in Standardorientierung wie in Abb. 10). Sie sind fast kugelförmig, haben einen Radius von ca. 1.8 Å und 1.6 Å und sind vollständig von hydrophoben Aminosäureseitenketten umgeben.

### 3.2.6 Vergleich zu anderen Cytochromen-*c*

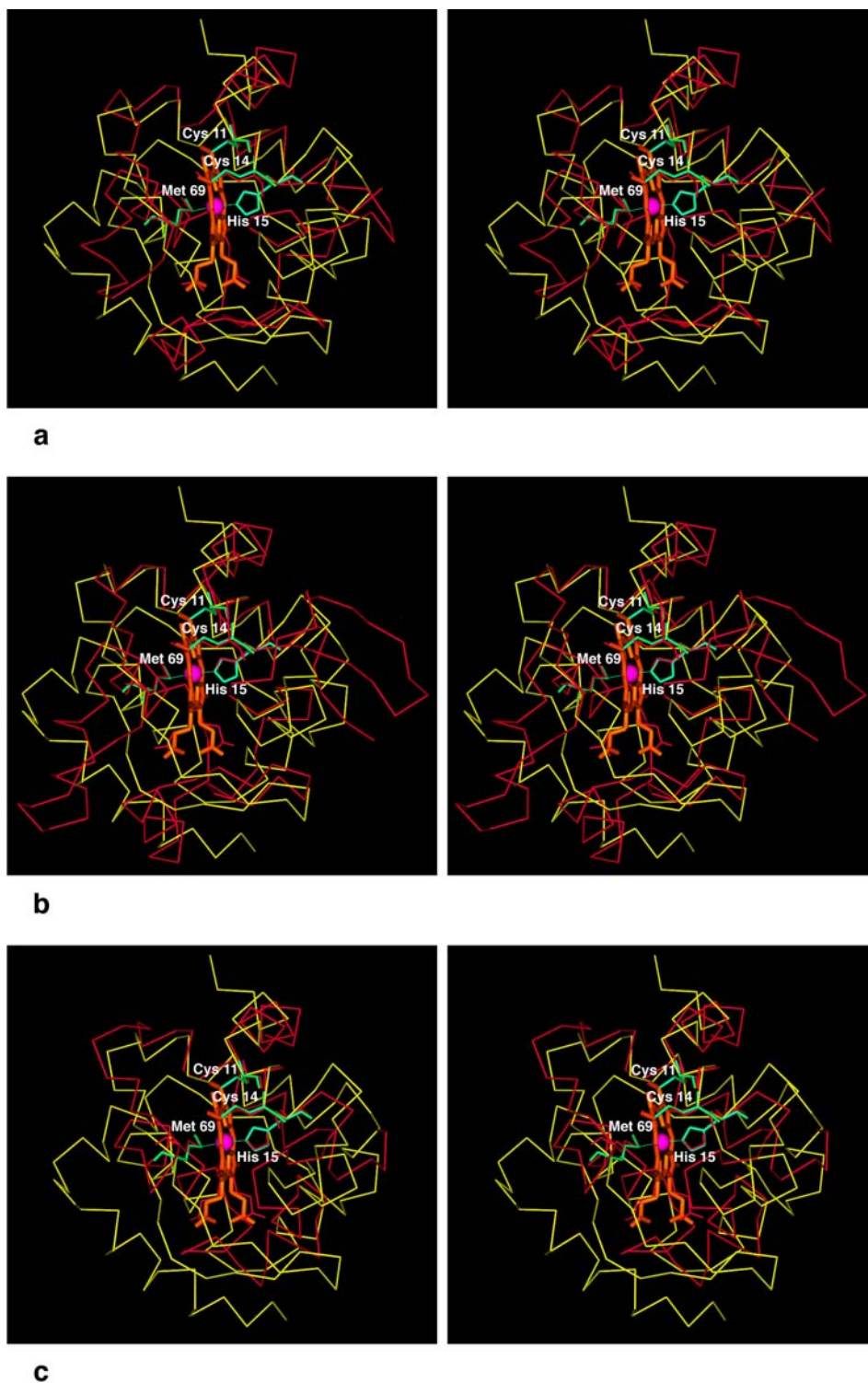
Die Strukturvergleiche von Cytochrome-*c*<sub>552</sub> zu sechs anderen bakteriellen und mitochondrialen „class I“ Cytochromen-*c* sind in Abb. 11 und Abb. 12 gezeigt. Diese sechs Modelle wurden so ausgewählt, daß sie alle bekannten strukturellen Eigenschaften der „class I“ Cytochrome-*c* abdecken. Von sehr ähnlichen Cytochrom-Strukturen (z.B. die mitochondrialen Thunfisch-, Pferdeherz- und Reiscytochrome) wurde jeweils nur eine Struktur zum Vergleich ausgewählt.



**Abb. 11: Stereodarstellung des Strukturvergleichs von Cytochrom-c<sub>552</sub> – Teil I**

Die Lage der C<sup>α</sup>-Atome des Cytochroms-c<sub>552</sub> wurde mit den C<sup>α</sup>-Atomen von a) Cytochrom-c<sub>553</sub> aus *Desulfovibrio vulgaris* (PDB-Nummer: 1C53; Nakagawa *et al.*, 1990), b) Cytochrom-c<sub>551</sub> aus *Pseudomonas aeruginosa* (PDB-Nummer: 351C; Almassy & Dickerson, 1978) und c) Cytochrom-c<sub>5</sub> aus *Azotobacter vinelandi* (PDB-Nummer: 1CC5; Carter *et al.*, 1985) wie unter 3.1.5 beschrieben mit MAIN (Turk, 1992) überlagert. Der C<sup>α</sup>-Trace von Cytochrome-c<sub>552</sub> ist in gelb, dessen Häm in orange und die Häm-Liganden in grün dargestellt. Die überlagerten anderen Cytochrome sind komplett in rot dargestellt.

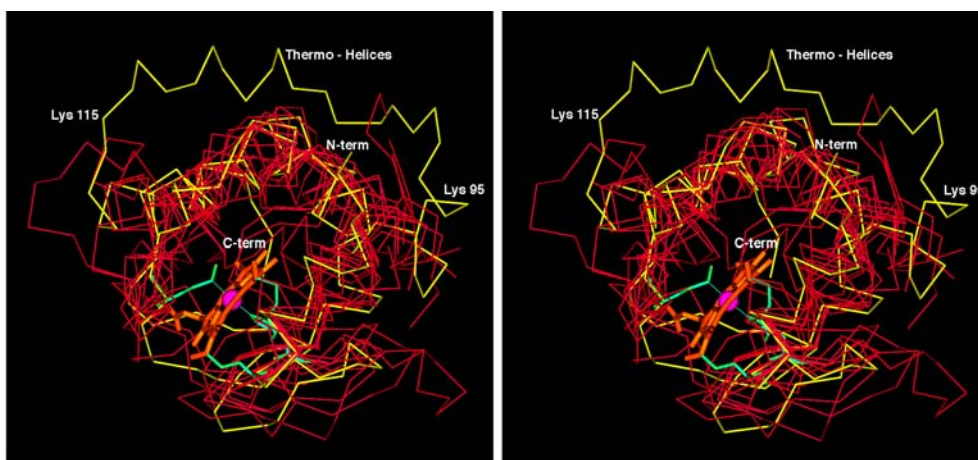




**Abb. 12: Stereodarstellung des Strukturvergleichs von Cytochrom- $c_{552}$  – Teil II**

Die Lage der  $C^\alpha$ -Atome des Cytochroms- $c_{552}$  wurde mit den  $C^\alpha$ -Atomen von a) Pferdeherz-Cytochrom- $c$  (PDB-Nummer: 1HRC; Bushnell *et al.*, 1990), b) Cytochrom- $c_2$  aus *Rhodobacter sphaeroides* (PDB-Nummer: 1CXC; Axelrod *et al.*, 1994) und c) Cytochrom- $c_6$  aus *Monoraphidium braunii* (PDB-Nummer: 1CTJ; Frazão *et al.*, 1995) überlagert. Diese Abbildung wurde analog zu Abb. 11 erstellt.

Keine der sechs Strukturen zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem *T. thermophilus* Cytochrom-*c*<sub>552</sub>. Der deutlichste Unterschied ist am C-Terminus zu sehen. Während die N-terminalen Aminosäuren bis Ala-94 des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> direkt das Häm umschließen und dabei Positionen im Raum einnehmen, die auch bei den anderen Cytochromen mit Protein belegt sind, gibt es für den C-Terminus kein Äquivalent in den anderen Strukturen (Abb. 13). Dieser Bereich der Primärstruktur (Ala-94 bis Lys-131) besteht aus drei  $\alpha$ -Helices sowie verbindenden „random-coil“ Segmenten und bildet eine Art Klammer, die den Rest der Struktur umschließt.



**Abb. 13: Stereodarstellung des Strukturvergleichs von Cytochrom-*c*<sub>552</sub> – Teil III**

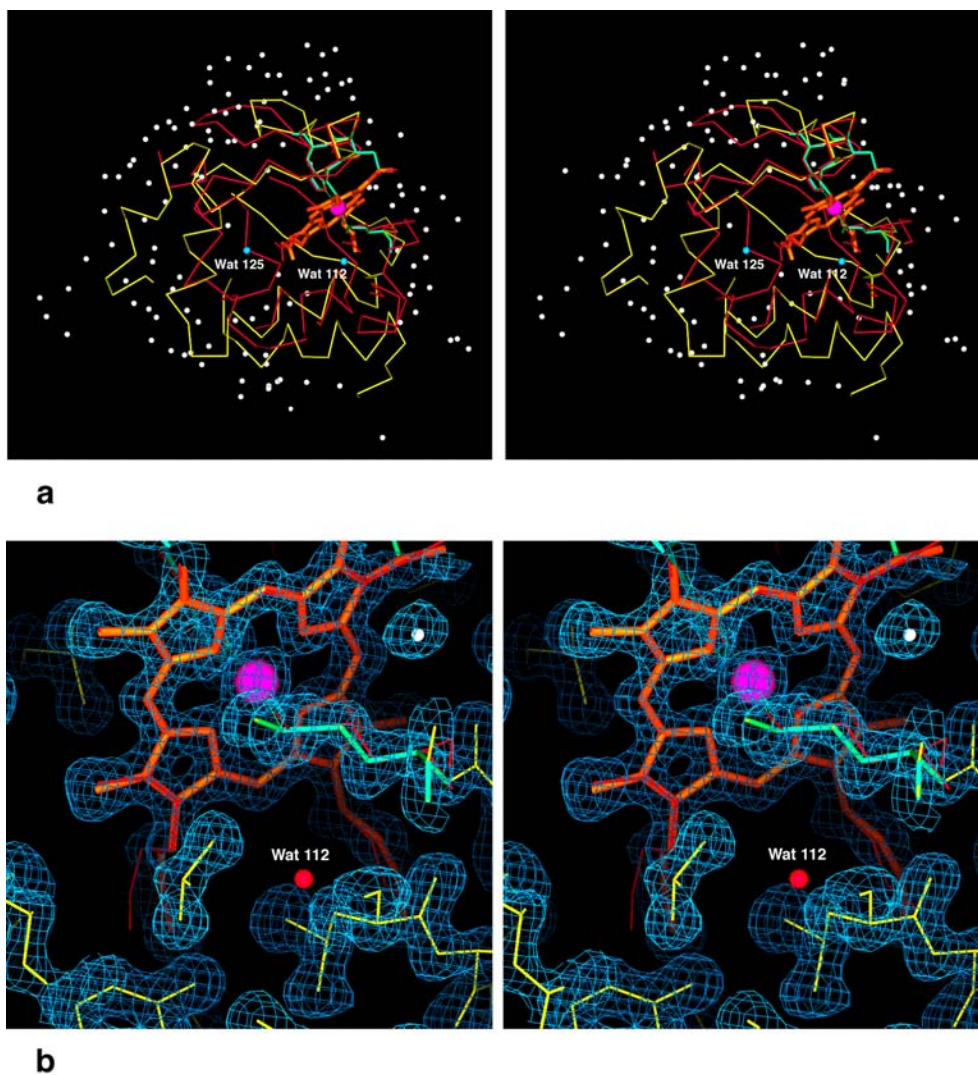
Die Lage der C <sup>$\alpha$</sup> -Atome des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> (gelb) ist mit allen sechs in Abb. 11 und Abb. 12 zum Vergleich ausgewählten Cytochromen überlagert. Diese Abbildung wurde analog zu Abb. 11 erstellt. Die Aminosäuren 95 bis 115 der stabilisierenden Klammer („Thermo Helices“) sind nur im Cytochroms-*c*<sub>552</sub> vorhanden.

Eine detailliertere Analyse des Strukturvergleiches zeigt, daß auch der N-terminale Bereich der Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Struktur deutliche Unterschiede aufweist. Entsprechend der recht geringen aber vorhandenen Homologie der Primärstruktur der N-Termini zwischen *T. thermophilus* Cytochroms-*c*<sub>552</sub> und dem Cytochrom-*c*<sub>553</sub> aus *Desulfovibrio vulgaris* (Titani *et al.*, 1985; Moore & Pettigrew, 1990) zeigen die 20 N-terminalen Aminosäuren dieser beiden Proteine die beste Übereinstimmung in ihrer dreidimensionalen Struktur (Abb. 11a). Leider sind im PDB-Eintrag für Cytochrom-*c*<sub>553</sub> (Nakagawa *et al.*, 1990) nur die Koordinaten der C <sup>$\alpha$</sup> -Atome enthalten, so daß ein struktureller Vergleich der Seitenketten nicht möglich ist. Cytochrom-*c*<sub>6</sub> von *Monoraphidium braunii* (Abb. 12c; Frazão *et al.*, 1995) zeigt dann die zweitbeste Übereinstimmung der überlagerten Strukturen.

Die meisten der hier verglichenen Cytochrome zeigen sehr ähnliche Konformationen in den Aminosäureseitenketten, die das Häm ligandieren. Obwohl diese Aminosäuren entweder zu vergleichbaren oder verschiedenen Sekundärstrukturelementen gehören, ist die räumliche Anordnung dieser das Häm ligandierenden Aminosäuren fast immer identisch. Ausnahmen bilden hierbei alle Häm bindenden Aminosäuren des Cytochroms-*c*<sub>5</sub> von *Azotobacter vinelandii* (Carter *et al.*, 1985) sowie der sechste Eisenligand in der Cytochrom-*c*<sub>6</sub> Struktur von *M. braunii* (Frazão *et al.*, 1995). Aber auch in den Fällen, wo die Häm koordinierenden Aminosäuren nicht gut mit der Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Struktur überlagern, liegen die Atome, die für die Bindung zum Häm verantwortlich sind (S<sup>γ</sup> in den kovalent gebundenen Cysteinen, N<sup>ε2</sup> in den koordinativ bindenden Histidinen und S<sup>δ</sup> in den koordinativ bindenden Methioninen) an fast identischen Positionen im Raum.

Eine Besonderheit des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> ist das ausgedehnte β-Faltblatt (Leu-54 bis Met-69), welches typischerweise nicht in den „class I“ Cytochromen gefunden wird (Bushnell *et al.*, 1990; Moore & Petigrew, 1990; Nakagawa *et al.*, 1990; Axelrod *et al.*, 1994; Frazão *et al.*, 1995). Es besteht aus zwei über Wasserstoffbrückenbindungen verbrückten antiparallelen β-Strängen, von je sieben Aminosäuren, die durch einen engen „type I' reverse turn“ (Crawford, *et al.*, 1973; Richardson, 1981) verbunden sind. Obwohl die Existenz von β-Faltblättern in Cytochromen nicht komplett neu ist (siehe Abb. 11b), wurde ein so ausgedehntes β-Faltblatt bisher in Cytochromen-*c* noch nicht beobachtet.

Eine weitere Besonderheit der Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Struktur ist das vollständige Fehlen von internen Wassermolekülen. Abb. 14 zeigt die überlagerten Strukturen des *T. thermophilus* Cytochroms-*c*<sub>552</sub> und des Pferdeherzcytochroms-*c*. Die Wassermoleküle Wat-125 und Wat-112 des Pferdeherzcytochroms (Bushnell *et al.*, 1990) sind in Eukaryonten evolutionär konserviert und existieren ebenfalls in einigen bakteriellen Cytochromen. Der Vergleich mit der Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Struktur zeigt, daß dort alle strukturell gebundenen Wassermoleküle an der Oberfläche liegen. Es gibt keine nach der Interpretation verbleibende Elektronendichte im Inneren des Molekül, welche als weniger gut geordnetes Wassermolekül gedeutet werden könnte (Abb. 14b). Dieses vollständige Fehlen von internen Wassermolekülen ist wahrscheinlich auf die hohe Packungsdichte und Hydrophobizität im Inneren des Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Moleküls zurückzuführen.



**Abb. 14:** Lage der Wassermoleküle im Pferdeherzcytochrom-*c* und Cytochrom-*c*<sub>552</sub>

Stereoüberlagerung der Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Struktur (gelb und weiße Bälle) mit der Pferdeherzcytochrom-Struktur und den darin enthaltenen evolutionär konservierten Wassermolekülen (rot): a) Vergleich der Strukturen unter Betrachtung der kristallographisch definierten Wassermoleküle im Cytochrom-*c*<sub>552</sub>. b) Nahansicht der Umgebung des Häms (orange), einschließlich des Wassers Wat-112 der Pferdeherzstruktur und der  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte (konturiert bei  $1,3 \sigma$ ) des Cytochroms-*c*<sub>552</sub>. Das Wasser in der rechten oberen Ecke von (b) liegt in der Nähe des solvensexponierten Häm-Ringes und befindet sich an der Oberfläche des Moleküls. Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Die Aminosäurezusammensetzung des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> wurde mit der mittleren Häufigkeit der verschiedenen Aminosäuren (Klapper, 1977; Chou & Fasman, 1978) verglichen. Die einzige signifikante Differenz besteht im erhöhten Auftreten der positiv geladenen Aminosäure Lysin im C-terminalen Bereich des Proteins. Weiterhin wurde eine erhöhte Tendenz zum Auftreten der Aminosäuren Isoleucin, Cystein, Histidin und Arginin gefunden, aber die statistische Relevanz dieser letzten Beobachtung ist schwer abschätzbar.

Die Ausbildung von Ionenpaaren wurde in der Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Struktur unter Benutzung eines 4 Å Grenzwertes für den Abstand der geladenen Atome (Barlow & Thornton, 1983) untersucht. Die Ionenpaare sind im C-terminalen Drittel des im Cytochroms-*c*<sub>552</sub> konzentriert, welches die in anderen Cytochromen nicht vorhandene zusätzliche Klammer um den Rest des Moleküls ausbildet (Tab. 3). Die Anzahl der Ionenpaare pro Aminosäure bewegt sich mit 0,05 im Bereich des für Proteine üblichen Wertes (0,04 Ionenpaare pro Aminosäure; Barlow & Thornton, 1983), wenn alle Aminosäuren des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> in die Betrachtung einbezogen werden. Hierbei beinhalten vier der insgesamt sieben Ionenpaare Aminosäuren der C-terminalen Klammer (Reste 94 bis 131, „Thermo Helices“), was in einer deutlich über dem Durchschnitt liegenden Konzentration von 0,11 Ionenpaaren pro Aminosäure für diesen C-terminalen Teil der Struktur resultiert. Diese erhöhte Konzentration an Ionenpaaren, sowie viele hydrophobe Kontakte zwischen den Aminosäureseitenketten dieses Bereiches und dem Rest der Struktur, scheinen diese Klammer fest an die restliche Struktur zu binden.

**Tab. 3: Ionenpaare im *T. thermophilus* Cytochrom-*c*<sub>552</sub>**

Aminosäure 1 und Atom (positive Ladung)	Aminosäure 2 und Atom (negative Ladung)	Abstand [Å] *
His-32: N <sup>ε2</sup>	Häm: O1A	2,69
Arg-43: N <sup>η2</sup>	Glu-107: O <sup>ε1</sup>	2,81*
Lys-64: N <sup>ζ</sup>	Glu-59: O <sup>ε1</sup>	3,38
Lys-76: N <sup>ζ</sup>	Glu-79: O <sup>ε2</sup>	3,30
Arg-112: N <sup>η1</sup>	Asp-77: O <sup>δ1</sup>	2,81*
Arg-125: N <sup>η2</sup>	Häm: O1A	2,85*
Lys-127: N <sup>ζ</sup>	Glu-124: O <sup>ε1</sup>	2,79*

\* Es wurden nur Ionenpaare mit einem Abstand der gegensätzlich geladenen Gruppen bis zu 4,0 Å (Barlow & Thornton, 1983) betrachtet. Ionenpaare, die mindestens einen Partner innerhalb der C-terminalen Klammer („Thermo Helices“, Reste 94-131) haben, sind mit einem Stern markiert.

Es wurden weitere Parameter der Cytochrom-*c*<sub>552</sub> Struktur untersucht, die bei anderen Proteinen als ausschlaggebende Kriterien für deren Thermostabilität diskutiert wurden (Florens, *et al.*, 1995; Goldman, 1995; Henning *et al.*, 1995; Hess *et al.*, 1995; Jaenicke, 1996; Pace *et al.*, 1996; Tanner *et al.*, 1996), wie z. B.: die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen (sowohl einschließlich als auch ausschließlich der Wasserstoffbrückenbindungen der Hauptkette) oder das Verhältnis aus Proteinoberfläche



und –volumen. Keiner dieser Werte korrelierte im Vergleich zu den anderen sechs Cytochromen mit der experimentell beobachteten Thermostabilität des Cytochroms-*c*<sub>552</sub>.

Die Moleküloberfläche sowie die Ladungsverteilung auf dieser Oberfläche wurde für das Cytochrom-*c*<sub>552</sub> und die anderen sechs Cytochrome berechnet (Nicholls *et al.*, 1992). Zusätzlich zu den Standard-Ladungen für die verschiedenen Aminosäureseitenketten wurde die Ladung des Häm-Eisens dabei auf +3 (oxidiertes Cytochrom) und die der Sauerstoffatome der Häm-Propionate auf –0,5 gesetzt.

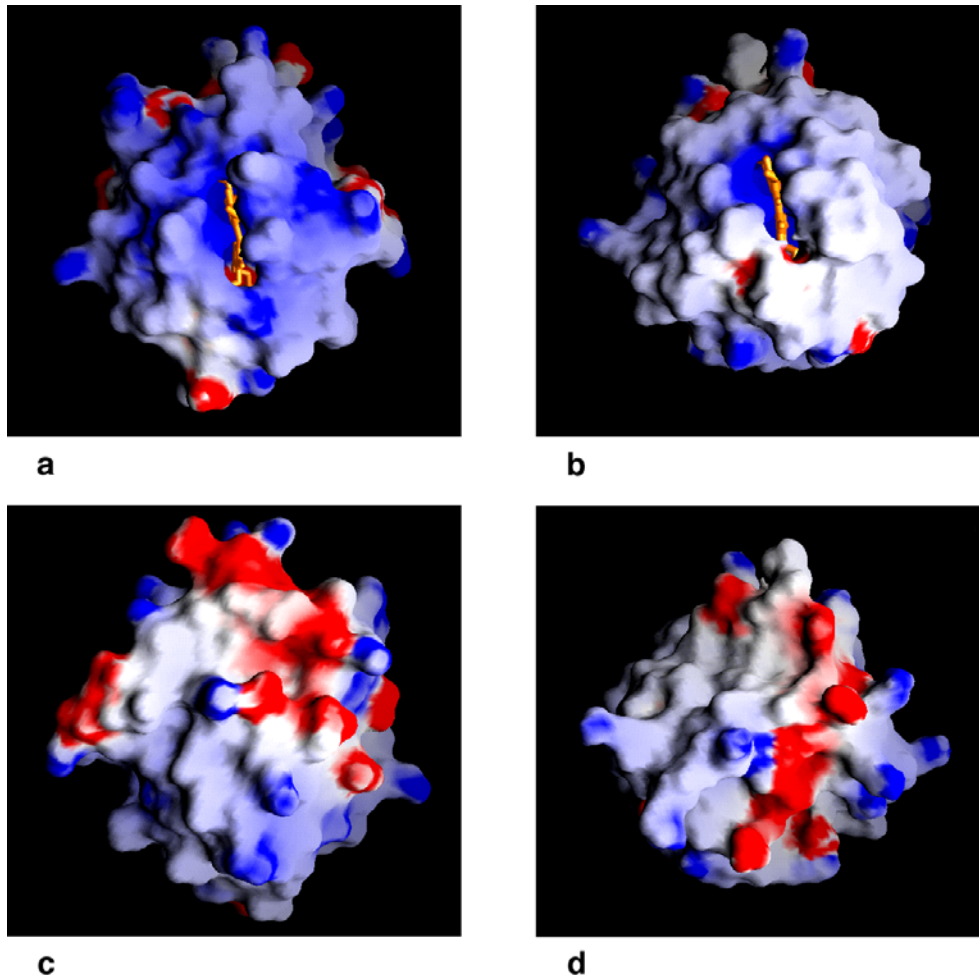
Der Vergleich der Ladungsverteilung an der Oberfläche zwischen Cytochrom-*c*<sub>552</sub> und dem Pferdeherzcytochrom (Abb. 15) zeigt, daß diese deutlich verschieden sind. Das Pferdeherzcytochrom zeigt die für Cytochrome der Atmungskette typische, positive Ladung an der Vorderseite, welche durch mehrere Lysine erzeugt wird, die in der Umgebung des solvensexponierten Häm-Ringes liegen (Moore & Pettigrew, 1990). Negativ geladene Aminosäureseitenketten sind neben wenigen positiv geladenen Aminosäuren im wesentlichen an den Seiten und auf der Rückseite des Moleküls zu finden. Beim Cytochrom-*c*<sub>552</sub> treten in der Umgebung des solvensexponierten Häm-Ringes hingegen nur ungeladenen Aminosäuren auf. Das positive Potential in unmittelbarer Nähe des Häms resultiert hierbei ausschließlich von der stark positiven Ladung des Häm-Eisens. Positiv bzw. negativ geladene Aminosäuren sind beim Cytochrom-*c*<sub>552</sub> auf die Seiten und die Rückseite des Moleküls beschränkt.

Die unterschiedliche Verteilung der geladenen Aminosäuren in den verschiedenen Cytochromen resultiert in unterschiedlichen Dipolmomenten. Für alle betrachteten “class I” Cytochrome-*c* liegt das Dipolmoment in erster Näherung parallel zur Häm-Ebene. Die Richtung innerhalb dieser Ebene ist für die einzelnen Vertreter unterschiedlich, wobei sich das Cytochrom-*c*<sub>552</sub> von allen anderen betrachteten Cytochromen am deutlichsten abhebt.

### 3.2.7 Vergleich der reduzierten und oxidierten Struktur

Mit Hilfe der unter 3.1.6 beschriebenen spektroskopischen Kontrolle der Kristalle konnte sichergestellt werden, daß der reduzierte Kristall innerhalb der spektroskopischen Fehlergrenzen sowohl vor als auch nach der Datensammlung komplett reduziert war. Die Struktur des unbehandelten Kristalls entspricht der vollständig oxidierten Spezies, was durch entsprechende Spektren vom zur Kristallisation eingesetzten Protein und den

erhaltenen Kristallen sichergestellt wurde. Das Vermessen von schockgefrorenen Kristallen verhinderte weiterhin eine mögliche Reduktion durch Einwirkung der Röntgenstrahlung.



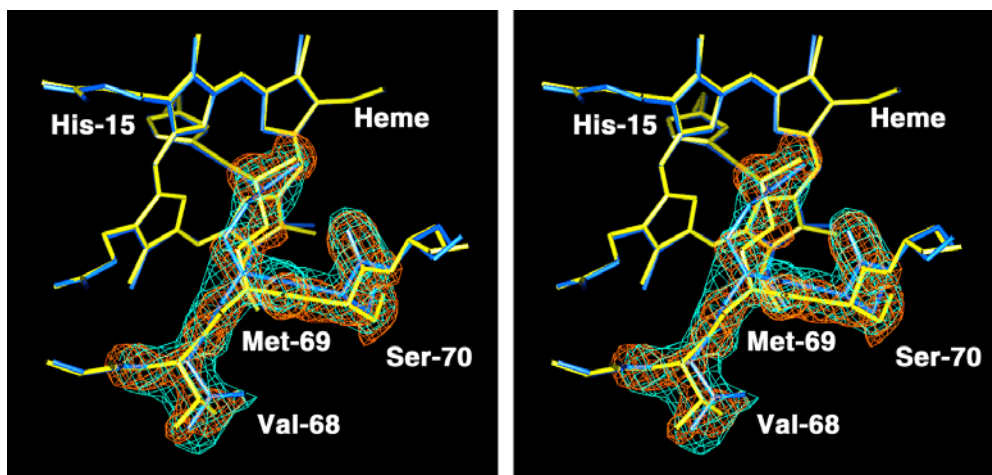
**Abb. 15: Oberflächenladungsverteilung im Pferdeherzcytochrom-*c* und Cytochrom-*c*<sub>552</sub>**

Die Färbung wurde gemäß dem berechneten elektrostatischen Potential der oxidierten Moleküle zwischen  $-3$  kT/e (intensiv rot) und  $15$  kT/e (intensiv blau) variiert. Das Häm ist als Stabmodell in orange eingezeichnet: a) Vorderseite des Pferdeherzcytochroms-*c*, b) Vorderseite des Cytochrom-*c*<sub>552</sub>, c) Rückseite des Pferdeherzcytochroms-*c*, d) Rückseite des Cytochrom-*c*<sub>552</sub>. Diese Abbildung wurde mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1992) erstellt.

Die Struktur des reduzierten Cytochroms-*c*<sub>552</sub> zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Faltung des Moleküls oder an der Proteinoberfläche. Die RMS-Abweichung aller C<sup>α</sup>-Atome beträgt für die überlagerten Strukturen  $0,38$  Å. Bis auf das Häm koordinierende Met-69, die benachbarten Aminosäuren sowie wenige solvensexponierte Seitenketten lassen sich auch bei einer näheren Betrachtung der beiden Oxidationzustände des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> keine strukturellen Unterschiede feststellen. Die beobachteten

Unterschiede in den Seitenketten von wenigen an der Oberfläche des Moleküls liegenden Aminosäuren sind nicht als signifikant zu betrachten, da diese Seitenketten außerhalb des Kristallverbundes mit Sicherheit beweglich sind.

Die Änderung des Oxidationszustandes des Häm-Eisens führt zu einer Änderung der Koordination des Eisen-Atoms, was in einer Konformationsänderung des koordinierenden Met-69 und der dazu benachbarten Aminosäuren resultiert (Abb. 16). Der Bindungswinkel His-15-N<sup>ε2</sup> Häm-Fe Met-69-S<sup>δ</sup> bleibt dabei fast unverändert (reduziert: 176,9°; oxidiert 172,1°). Allerdings ändert sich der Diederwinkel um die His-15-N<sup>ε2</sup> Häm-Fe Bindung um ca. 180°, was zu einer Verschiebung des S<sup>δ</sup>-Atoms des Met-69 von 0,6 Å führt. Diese Verschiebung resultiert in einer kompletten Neuordnung der Met-69 Haupt- und Seitenkette sowie in einer veränderten Orientierung der Seitenkette des benachbarten Val-68.



**Abb. 16:** Vergleich der beiden Oxidationszustände des Cytochroms-c<sub>552</sub>

Stereodarstellung des Häms, des Eisen koordinierenden Met-69 und der benachbarten Aminosäuren sowie des His-15 im oxidierten (gelb) und reduzierten Zustand (blau). Die finalen  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarten sind in braun (oxidiert, konturiert bei 1,4  $\sigma$ ) und blau (reduziert, konturiert bei 1,2  $\sigma$ ) für die Reste Val-68 bis Ser-70 ebenfalls eingezeichnet.

### 3.3 Diskussion

#### 3.3.1 Vergleich zu anderen Cytochromen-c

Viele „class I“ Cytochrome sind strukturell bekannt. Trotz beachtlicher Unterschiede in Primärstruktur und Größe, zeigen sie alle die typische Cytochrom-Faltung, welche aus vier bis fünf  $\alpha$ -Helices besteht, die das Häm umschließen. Die meisten Unterschiede in der



Größe werden durch die verschiedene Länge von an der Oberfläche liegenden „loops“ hervorgerufen (Moore & Pettigrew, 1990).

Das Cytochrom-*c*<sub>552</sub> ist deutlich verschieden von den anderen „class I“ Cytochromen in Bezug auf seine Größe und Primärstruktur. Es enthält 20-40% mehr Aminosäuren und seine Primärstruktur zeigt kaum Homologie. Die vorhandene Sequenzhomologie ist hierbei ausschließlich auf die ca. 20 N-terminalen Aminosäuren beschränkt (Titani *et al.*, 1985; Moore & Pettigrew, 1990). Die Struktur des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> zeigt erwartungsgemäß eine relativ geringe Ähnlichkeit in der Struktur, sowie mehrere Eigenschaften, die in den anderen „class I“ Cytochromen nicht gefunden werden.

Die Aufgabe der löslichen Cytochrome-*c* besteht im Übertragen von Elektronen zwischen verschiedenen Redox-Komplexen in der Zelle (siehe auch Abb. 1). Die Elektronen werden vom Cofaktor, dem Häm, aufgenommen, wobei die Hauptaufgabe des Proteinanteils dann im Abschirmen des Häms gegenüber dem Solvens, im Bereitstellen von Oberflächeneigenschaften zur Erkennung und Bindung an die entsprechenden Oxidasen und Reduktasen und in der Feinregulierung des Redox-Potentials zu sehen ist.

Die Aminosäuren 54 bis 69 bilden das für „class I“ Cytochrome-*c* unübliche lange  $\beta$ -Faltblatt, welches eine Ecke des Häms umschließt, die in anderen Cytochromen entweder durch „random-coil“ Segmente abgeschirmt ist, oder unbedeckt bleibt. Die Funktion dieses  $\beta$ -Faltblattes ist wahrscheinlich in der Abschirmung dieses Häm-Bereiches zu sehen, wobei die Ausbildung eines Faltblattes im Vergleich zu einem „random-coil“ Segment sicher eine höhere intrinsische Stabilität des entsprechenden Protein-Abschnittes bewirkt. Allerdings kann diese Argumentation das Fehlen von  $\beta$ -Faltblätter in den anderen „class I“ Cytochromen-*c* nicht erklären.

Die deutlichste Differenz zu den anderen Cytochromen-*c* bildet der C-terminale Bereich (Reste 94-131) des Cytochroms-*c*<sub>552</sub>. Wie oben bereits beschrieben, umgibt dieser Bereich das bereits abgeschirmte Häm in einer Art zweiten Lage von Protein-Abschirmung, die in den anderen „class I“ Cytochromen-*c* nicht zu finden ist. Es bildet dabei eine Art Klammer aus, die durch mehrere Lysine ebenfalls stark geladen ist. Die Einführung dieser Ladungen kann aber nicht die Hauptaufgabe dieses C-terminalen Bereiches darstellen, da diese Ladungen in gleicher Weise in die sonst ausschließlich existierende erste Lage an Proteinabschirmung integriert werden könnten. Weiterhin ist die Wechselwirkung des

Cytochroms-*c*<sub>552</sub> mit seinen Redox-Partnern in der Umgebung des solvensexponierten Häm-Ringes C lokalisiert (Salemme *et al.*, 1973; Ferguson-Miller *et al.*, 1978; Pelletier & Kraut, 1992), während der C-terminale Bereich die Oberfläche an der Rückseite des Moleküls beeinflusst. Er scheint eher für eine zusätzliche Stabilisierung des Moleküls verantwortlich zu sein, indem es eine Klammer ausbildet, die fest an die erste Lage der Häm-Abschirmung gebunden ist.

Viele Proteine enthalten in ihrem Inneren strukturell gebundene Wassermoleküle, welche entweder für den katalytischen Zyklus des Proteins notwendig sind oder strukturell gebunden sind und Wasserstoffbrücken zwischen verschiedenen Aminosäuren vermitteln. Die Cytochrome-*c* enthalten üblicherweise ebenfalls solche Wassermoleküle, von denen einige unter den eukaryontischen Cytochromen-*c* evolutionär konserviert sind (z.B. Wat-112 und Wat-125 im Pferdeherzcytochrom-*c*; Bushnell *et al.*, 1990; Lett *et al.*, 1996; Luntz *et al.*, 1989; Berghuis *et al.*, 1994). Auch wenn diese evolutionär konservierten Wassermoleküle nicht in allen bakteriellen Cytochromen-*c* existieren, enthalten diese jedoch interne Wassermoleküle an unterschiedlichen Positionen. Cytochrom-*c*<sub>552</sub> nimmt durch das völlige Fehlen solcher interner Wassermoleküle eine Außenseiterstellung ein. Es beinhaltet lediglich zwei Kavitäten, die von ausreichender Größe wären, um ein Wasser aufzunehmen. Diese sind jedoch komplett von hydrophoben Aminosäuren umgeben und in der  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte sind auch keine Bereiche von schwacher Elektronendichte zu sehen, die auf partiell besetzte oder weniger gut geordnete Wassermoleküle hinweisen.

### 3.3.2 Thermostabilität

Manche Proteine zeigen eine erhöhte Stabilität gegenüber thermischer Denaturierung. Im Vergleich zu deren mesophilen Partnern werden viele Eigenschaften diskutiert, die für diese Thermostabilität verantwortlich sind (Florens *et al.*, 1995; Goldman, 1995; Henning *et al.*, 1995; Hess *et al.*, 1995; Jaenicke, 1996; Pace *et al.*, 1996). So zeigen die thermostabilen Proteine oft eine höhere Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen (Macedo-Ribeiro *et al.*, 1996; Tanner *et al.*, 1996), eine erhöhte Anzahl von Salzbrücken (Kelly *et al.*, 1993; Goldman, 1995; Henning *et al.*, 1995; Korndörfer *et al.*, 1995; Machius *et al.*, 1995) und/oder einen kompakteren Aufbau des thermophilen Proteins, was durch ein niedrigeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen (Tanner *et al.*, 1996), durch weniger oder kleinere Kavitäten in der Struktur (Russel *et al.*, 1994; Goldman, 1995) und kürzere

„surface-loops“ (Russel *et al.*, 1994) realisiert werden kann. Des Weiteren zeigen manche der thermostabilen Proteine einen höheren Vernetzungsgrad durch weitere Faktoren, wie z.B. durch prosthetische Gruppen (Florens *et al.*, 1995) oder Disulfidbrücken (Wakarchuk *et al.*, 1994).

Der energetische Unterschied zwischen nativem und denaturiertem Zustand von Proteinen ist sehr klein im Verhältnis zur Größe der einander fast aufhebenden stabilisierenden (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und Hydrophobe Wechselwirkungen) und destabilisierenden (im wesentlichen entropische Faktoren) Kräfte. In den thermophilen Proteinen ist dieser energetische Unterschied im Verhältnis zur absoluten Größe dieser Wechselwirkungen nur unwesentlich höher und kann von verschiedener Natur sein (Jaenicke, 1996).

Aufgrund der geringen Homologie der Primärstruktur und der dreidimensionalen Struktur vom Cytochrom-*c*<sub>552</sub> zu den anderen „class I“ Cytochromen ist es unmöglich, die Diskussion bezüglich dessen Thermostabilität an einzelnen Regionen oder Aminosäure-Austauschen festzumachen. Dies kompliziert zum einen die Identifikation der für die beobachtete Thermostabilität verantwortlichen strukturellen Merkmale, aber es hat auch den großen Vorteil, daß nur wirklich signifikante Unterschiede zu den mesophilen Partnern festgestellt werden können.

Die strukturelle Analyse des thermostabilen Cytochroms-*c*<sub>552</sub> und dessen Vergleich mit anderen mesophilen „class I“ Cytochromen zeigt vor allem die Präsenz der C-terminalen Klammer inklusive der erhöhten Konzentration an Salzbrücken und der starken hydrophoben Wechselwirkungen, die diese Klammer fest mit dem Rest der Moleküls verbinden, als Besonderheit, die für die Thermostabilität verantwortlich zu sein scheint. Das Vorhandensein oder Fehlen von Aminosäuren alleine kann hierbei sicher nicht zur Thermostabilität beitragen (Russel *et al.*, 1994), jedoch läßt die Tatsache, daß diese C-terminale Klammer ausschließlich im Cytochrom-*c*<sub>552</sub> vorhanden ist und als eine Art zweite Schale an Aminosäuren den Rest des Moleküls fest umklammert eine solche Funktion als wahrscheinlich erscheinen.

Die interne Kompaktheit eines Proteins wird als weiterer Faktor zu erhöhter Thermostabilität diskutiert. Das Verhältnis aus Oberfläche und Volumen korreliert hierbei nicht mit der beobachteten Thermostabilität des Cytochroms-*c*<sub>552</sub>. Die ausgeprägte

Hydrophobizität im Inneren des Moleküls sowie das komplette Fehlen von internen Wassermolekülen deutet jedoch auf eine Optimierung der Hydrophobizität im Inneren des Moleküls, was ebenfalls als Faktor für eine erhöhte Stabilität diskutiert wird (Goldman, 1995; Korolev *et al.*, 1995; Pace *et al.*, 1996). Dieses Argument wird weiter durch Mutagenese-Studien am mitochondrialen Iso-1-Cytochrom-*c* unterstützt, wo der Verlust eines der evolutionär konservierten internen Wassermoleküle zu einer erhöhten Thermostabilität führte (Berghuis *et al.*, 1994; Lett *et al.*, 1996). Des Weiteren kann die Ausbildung des  $\beta$ -Faltblattes (Reste 54-69) anstatt eines „random coil“ Segmentes als Bestandteil der Häm-Abschirmung sowie das Fehlen von langen „surface-loops“ zur Thermostabilität beitragen.

Weiterhin wurden die Wasserstoffbrückenbindungen im Cytochrom-*c*<sub>552</sub> mit denen der anderen „class I“ Cytochrome verglichen. Aufgrund der deutlichen strukturellen Unterschiede ist eine Diskussion von lokalen Änderungen nicht möglich. Die Gesamtzahl der Wasserstoffbrückenbindungen (sowohl einschließlich als auch ausschließlich der Wasserstoffbrücken der Hauptkette; Tanner *et al.*, 1996) ist im Cytochrom-*c*<sub>552</sub> jedoch nicht erhöht (experimentelle Daten nicht gezeigt).

### 3.3.3 Redox Unterschiede

Die Analyse der Unterschiede zwischen den reduzierten und oxidierten Zuständen des Cytochroms-*c* ist in Bezug auf dessen Wechselwirkung mit den entsprechenden Reduktasen und Oxidasen, einem Einfluß auf des Redox-Potential, sowie der Auswirkung der unterschiedlichen Ladungen am Häm-Eisen auf die Struktur selbst von großem Interesse und führte bisher zu teilweise sehr gegensätzlichen Ergebnissen (Moore & Pettigrew, 1990). Für einige eukaryontische Cytochrome konnte hierbei die Verschiebung eines der evolutionär konservierten Wassermoleküle (Wat-112 in der Pferdeherzstruktur) beobachtet werden (Berghuis & Brayer, 1992). Ein möglicher Einfluß auf das Redox-Potential wurde hier ausführlich diskutiert (Berghuis *et al.*, 1994a,b).

Der Vergleich des reduzierten und oxidierten Zustandes des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> zeigt deutlich eine Konformationsänderung des Häm koordinierenden Met-69. Diese Änderung ist unter Beachtung der ausführlichen Kontrolle des Oxidationszustandes der vermessenen Kristalle mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Änderung der Ladung am Häm-Eisen zurückzuführen. Eine fast identische Konformationsänderung konnte beim Vergleich der

beiden Oxidationszustände des Cytochroms-*c*<sub>6</sub> aus *Scenedesmus obliquus* festgestellt werden (Schnackenberg *et al.*, 1999), was auf einen allgemeineren Charakter dieser Änderung hinweist. Beide Cytochrome enthalten das evolutionär konservierte Wassermolekül nicht, welches seine Position im Vergleich der beiden Oxidationszustände in den eukaryontischen Cytochromen ändert.

Der Einfluß der beiden Konformationen des Häm koordinierenden Methionins auf das Redox-Potential des Cytochroms ist ohne eine detaillierte Analyse schwer abschätzbar. Die Veränderung der Geometrie der Eisen-Koordination läßt einen solchen Effekt jedoch erwarten.

Diese beiden unterschiedlichen Beobachtungen lassen keine Verallgemeinerung bezüglich des strukturellen Einflusses des Oxidationszustandes bei den Cytochromen-*c* zu. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um festzustellen, ob die Bewegung des evolutionär konservierten Wassermoleküls eine Änderung der Konformation des Häm koordinierenden Methionins ausschließt. Für das Cytochrom-*c*<sub>552</sub> und das Cytochrom-*c*<sub>6</sub> aus *S. obliquus* ist eine Bewegung von internen Wassermolekülen in jedem Fall auszuschließen.

Interessanterweise zeigen die Cytochrome-*c* in Abhängigkeit vom Oxidationszustand keine Änderung an der Oberfläche bzw. der Ladungsverteilung an dieser. In Hinblick auf die Wechselwirkung mit den Redox-Partnern der Cytochrome, die primär von den Oberflächeneigenschaften bestimmt werden, läßt dies eine Unterscheidung der beiden Oxidationszustände für die Bildung von Elektronen-Transfer-Komplexen unwahrscheinlich erscheinen. Unter Betrachtung des „Velcro Modells“ (McLendon, 1990) für die Ausbildung des Elektronentransferkomplexes, welches vor der korrekten Ausbildung des Komplexes zunächst ein grob orientiertes Binden des Cytochroms-*c* in der Umgebung der eigentlichen Bindungstasche vorhersagt, ist eine solche Unterscheidung zwischen den Oxidationszuständen noch unwahrscheinlicher. Entsprechend ist ein Mechanismus anzunehmen, bei dem statistisch verteilt entweder reduziertes oder oxidiertes Cytochrom-*c* an seinen Redox-Partner bindet und der Elektronentransfer nur dann stattfindet, wenn das gebundene Cytochrom-*c* den „korrekten“ Oxidationszustand aufweist.

Es wurde ein weiterer oxidiertes Kristall des Cytochroms-*c*<sub>552</sub> ungefroren am Synchrotron bis zu einer Auflösung von 1.6 Å vermessen. Dieser zeigte nach der kristallographischen

Analyse eine Mischung aus den beiden Zuständen des Met-69, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine teilweise Reduktion des Kristalls durch die Einwirkung intensiver Röntgenstrahlung auf den ungeschützten Kristall zurückzuführen ist (Jones *et al.*, 1987; Burmeister, 1999; Weik *et al.*, 2000). Eine alternative Erklärung für das Auftreten verschiedenen Konformationen des Häm koordinieren Methionins könnte die vom Oxidationszustand unabhängige, gleichzeitige Existenz dieser Konformationen sein, wie sie für die NMR-Struktur des Cytochroms-*c*<sub>6</sub> von *Monoraphidium braunii* beschrieben wurde (Campos *et al.*, 1993). Diese Erklärung scheint jedoch unwahrscheinlich in Hinblick auf das klar vom Oxidationszustand abhängige Auftreten dieser beiden Konformationen in der kristallographischen Analyse.

## **4 Ba<sub>3</sub>-Typ Cytochrom-c Oxidase aus *Thermus thermophilus***

### **4.1 Materialien und Methoden**

#### **4.1.1 Kristallisation**

Die Kristallisationsansätze wurden nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen (siehe auch 3.1.1) mit 6 µl Proteinlösung (8 mg / ml in 0,4 % w/v Nonyl-β-D-Glukopyranosid enthaltendem 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,0) und 2,5 µl Präzipitanzlösung (14 % w/v Polyethylenglykol 2000 in 20 mM Bis-Tris Puffer, pH 7,0) durchgeführt. Die Kristallisation erfolgte außerdem nach der „batch“-Methode, wo 0,5 ml der Proteinlösung in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, auf 6 % w/v Polyethylenglykol 2000 eingestellt, und verschlossen wurden. Kristalle bildeten sich bei beiden Varianten nach ca. fünf Tagen bei 20 °C.

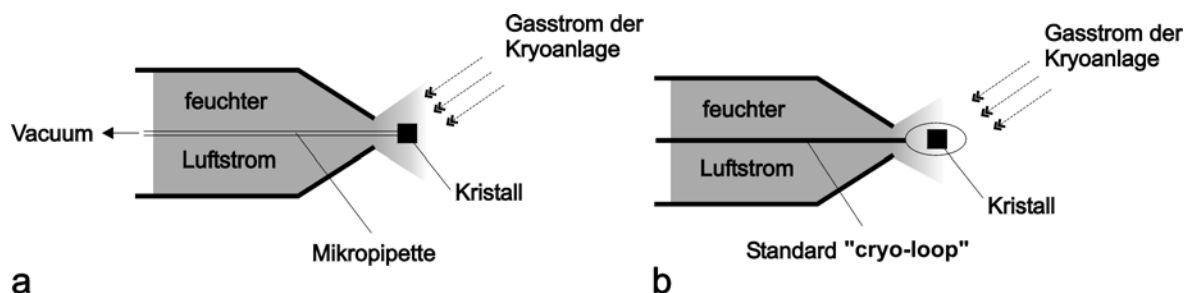
#### **4.1.2 Transformation der Kristalle**

##### **4.1.2.1 Transformation mittels Öl**

Die Kristalle wurden mit wenig Mutterlauge auf einen Objektträger überführt und mit einem Gemisch aus dickflüssigem Paraffinöl (entsprechend DAB 8, Henry Lamotte, Bremen) und n-Heptan im Verhältnis 9:2 überschichtet. Die Mutterlauge wurde mit Filterpapier vollständig entzogen, der Kristall mit einem „cryo-loop“ aufgenommen und auf die Röntgenkamera montiert. Alternativ wurde zum Kristallisationsansatz vorsichtig Perfluorpolyether (PFPE, Stockpunkt -60 °C, Dr. R. Kiefersauer, MPI für Biochemie, München) zugegeben, wobei dieser aufgrund der höheren Dichte zu Boden sinkt und die Mutterlauge komplett vom leicht angewachsenen Kristall entfernt. Nach Absaugen der Mutterlauge wurde der Kristall vorsichtig vom Boden gelöst und mit einem „cryo-loop“ montiert. Von den so montierten Kristallen wurde eine Reihe von Röntgendiffraktionsbildern aufgenommen, ohne den Kristall zu frieren. Nach Erreichen des optimalen Streuverhaltens wurde der Kristall durch rasches Abkühlen auf 100 K im Stickstoffstrom (Oxford Cryo-Systems) eingefroren.

#### 4.1.2.2 Transformation mittels Feuchteregulierung

Die Kristalle wurden im „cryo-loop“ mit Öl (siehe 4.1.2.1) oder unter Benutzung des „Freemounting-Systems“ komplett ohne Mutterlauge in einem Luftstrom regulierter Luftfeuchtigkeit auf die Röntgenkamera montiert (Kiefersauer, 1998; siehe Abb. 17). Die Luftfeuchtigkeit war vorher auf den Wasserdampfdruck der Mutterlauge (und damit des nativen Kristalls) eingestellt worden (Kiefersauer, 1998). Die Transformation wurde durch Änderung der relativen Luftfeuchtigkeit des den Kristall umströmenden Luftstromes mit verschiedenen Feuchte-Zeit-Profilen durchgeführt. Anschließend wurde der Kristall entweder gefroren (siehe 4.1.2.1) oder bei konstanter Feuchte im ungefrorenen Zustand vermessen. Die Kontrolle des Kristallzustandes erfolgte über Röntgendiffraktionsaufnahmen.



**Abb. 17: Apparatur zur Kristalltransformation mittels Feuchteregulierung**

Im „Freemounting-System“ (Kiefersauer, 1998) werden die Kristalle auf der Spitze einer Mikropipette durch ein leichtes Vakuum angesaugt (a). Für die Montage der Kristalle im „cryo-loop“ wird Öl als „Kryopuffer“ verwendet. (b). Die Kristalle werden in beiden Fällen von einem Luftstrom geregelter Luftfeuchtigkeit umströmt, um das Austrocknen der Kristalle zu verhindern, bzw. um diese durch Änderungen in der Luftfeuchtigkeit gezielt zu transformieren. Der Kaltgasstrom der Kryoanlage kann optional zugeschaltet werden, um die Kristalle nach der Transformation zu konservieren.

#### 4.1.3 Datensammlung und –auswertung

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Diffraktionsaufnahmen an einem Drehanodengenerator (Rigaku RU 200) mit Graphit-Monochromator und einem 300 mm „image plate“ Detektor (Mar Research, Hamburg) aufgenommen. Zur initialen Charakterisierung der Kristalle wurden diese in Kapillaren montiert und in einer Serie von Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkel von 1° pro Bild vermessen (siehe auch 3.1.2).

##### 4.1.3.1 Daten zur MAD-Phasierung

Die Daten für die MAD-Phasierung wurden an der „wiggler-beamline“ BW6 am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY), Hamburg, aufgenommen. Die Kristalle wurden



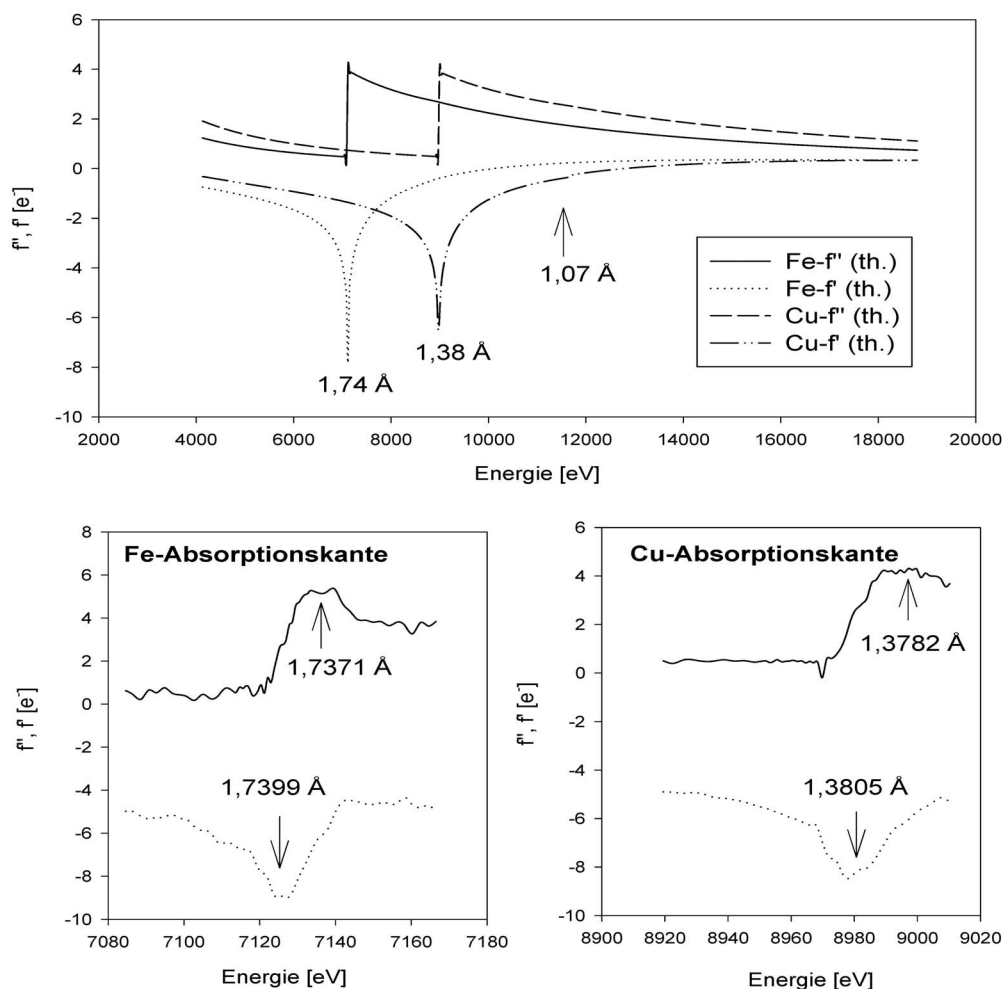
zunächst wie unter 4.1.2.1 beschrieben in Paraffinöl/n-Heptan montiert und Diffraktionsbilder im Abstand von 10 s mittels eines 130 mm MAR CCD-Detektors (Mar Research, Hamburg) bei verminderter Strahlungsintensität aufgenommen. Nach ca. 10 bis 15 min war die optimale Streuleistung erreicht. Die Kristalle wurden jetzt durch Öffnen einer ferngesteuerten Abschirmung („shutter“, Eigenbau) der Kryoanlage schockgefroren.

Zunächst wurde ein Röntgenfluoreszenzspektrum in der Nähe der Fe-K und Cu-K Absorptionskanten vom gefrorenen Kristall unter Verwendung eines NaJ(Tl) Scintillationszählers aufgenommen und mit dem Programm DISCO (Eichhorn, 1985) ausgewertet (Abb. 18). Die Diffraktionsdaten wurden bei fünf verschiedenen Wellenlängen (Maximum Fe-*f'*: 7.137 eV,  $\lambda_1=1,7371$  Å; Minimum Fe-*f'*: 7.126 eV,  $\lambda_2=1,7399$  Å; Maximum Cu-*f'*: 8.996 eV,  $\lambda_3=1,3782$  Å; Minimum Cu-*f'*: 8.981 eV,  $\lambda_4=1,3805$  Å & „Remote Point“: 11.574 eV,  $\lambda_5=1,07$  Å) mittels CCD-Detektor unter einem Drehwinkel von 0.2° pro Bild aufgezeichnet. Die Messung erfolgte jeweils über ein kontinuierliches Winkelsegment von 70°, gefolgt von weiteren 70° in inverser Strahlgeometrie zum direkten Messen der Friedel-Paare. Die Daten wurden mit den Programmen DENZO/SCALEPACK (Otwinowsky & Minor, 1992) integriert und skaliert.

#### 4.1.3.2 Daten der verschiedenen Kristallzustände

Um die Reaktion der Kristalle auf die Feuchteänderung zu charakterisieren, wurden verschiedene Serien von Diffraktionsbildern ohne Kristallrotation aufgenommen. Dies erfolgte unter möglichst kurzer Belichtung (2-3 min) an einem Drehanodengenerator (Rigaku RU 200) mit Graphit Monochromator und einem 300 mm „image plate“ Detektor (Mar Research, Hamburg). Die Kristalle wurden wie unter 4.1.2.2 beschrieben montiert und die Feuchte entweder unter Betrachtung des Streuverhaltens von Hand oder mittels eines programmierten Gradienten variiert.

Um komplette Datensätze bei den verschiedenen Kristallzuständen aufzunehmen, wurden die Kristalle im „Freemounting-System“ montiert und zunächst wie oben beschrieben transformiert. Hierbei wurde für die Aufnahme der Daten des „nativen“ Kristalls eine c-Achse von 178 Å gewählt (siehe 4.3.1). Anschließend wurde eine Reihe von Diffraktionsbildern mit einem Drehwinkel von 1° unter „normaler Belichtung“ (ca. 30 min pro Bild) bei konstanter Feuchte aufgenommen, mit MOSFLM v6.00 (Leslie, 1991) integriert und mit SCALA (Collaborative Computational Project, 1994) skaliert.



**Abb. 18: Dispersionsterme des  $ba_3$ -Oxidase Kristalls**

Der obere Bildabschnitt zeigt die theoretische Lage (Brennan & Cowan, 1992) der K-Absorptionskanten der Elemente Eisen und Kupfer, sowie die Lage der Referenz-Wellenlänge im MAD-Experiment. Die Dispersionsterme,  $f''$  und  $f'$ , des anomalen Streubeitrages wurden mittels eines Röntgenfluoreszenzspektrums und dem Programm DISCO (Eichhorn, 1995) vom gefrorenen Kristall vor der MAD-Datensammlung bestimmt und sind im unteren Abschnitt dargestellt.

#### 4.1.4 MAD-Phasierung

Von allen MAD-Datensätzen wurden anomale und dispersive Differenzpattersonkarten berechnet, wodurch die Koordinaten eines Eisenatoms bestimmt werden konnte. Die Koordinaten der anderen Metallatome wurden in mehreren Schritten durch Phasierung mit den bekannten Koordinaten in SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) und Analyse der verschiedenen Differenzfourierkarten bestimmt. Hierbei wurde auch die Wahl zwischen den beiden möglichen, enantiomorphen Raumgruppen ( $P4_{1/3}2_12$ ) getroffen. Die endgültigen Phasen wurden mit den Koordinaten aller Metallatome sowie den Daten aller fünf Wellenlängen in SHARP berechnet. Anschließend wurde die experimentelle

Elektronendichtekarte durch 130 Zyklen „solvent-flattening“ mit SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) unter Annahme eines Solvensgehaltes von 63 % entsprechend der in SHARP implementierten Prozedur modifiziert.

#### 4.1.5 Modellbau und Verfeinerung

Das atomare Modell der *ba*<sub>3</sub> Cytochrom-*c* Oxidase wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt und in CNS v0.3 (Brünger *et al.*, 1998) verfeinert. Während der ersten Modellbau- und Verfeinerungszyklen erwies sich die Phasenkombination mit SFALL und SIGMAA (Collaborative Computational Project, 1994) zwischen experimentellen und Modellphasen gefolgt von Elektronendichtemodifikation mit SOLOMON oder DM (Cowtan & Main, 1993; Cowtan, 1994) hilfreich, um weniger gut geordnete Aminosäurereste oder Seitenketten in der Elektronendichtekarte zu lokalisieren. Während der gesamten Verfeinerung wurden die geometrischen Restraints von Engh & Huber (1991) benutzt. Die Verfeinerungsalgorithmen beinhalteten sowohl die Atompositionen, die B-Faktoren als auch „simulated annealing“. In den letzten Verfeinerungszyklen wurde eine „bulk-solvens“-Korrektur und eine allgemeine anisotrope Korrektur der B-Faktoren eingeführt. Die Wassermoleküle wurden mit ARP (Lamzin, 1997) automatisch erstellt und in den letzten Modellbauzyklen überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Zur Bestimmung der Strukturen der verschiedenen Kristallzustände wurde das verfeinerte MAD-Modell herangezogen. Die Wassermoleküle wurden entfernt und das resultierende Modell als starrer Körper gegen den neuen Datensatz bei steigender Auflösung in mehreren Zyklen verfeinert („rigid body refinement“). Anschließend folgten mehrere Zyklen von Modellbau, Verfeinerung und die automatische Erstellung der Wassermoleküle, wie oben beschrieben. Für die Struktur des „nativen Kristallzustandes“ (*c*-Achse = 178 Å) wurden im Gegensatz zu den beiden anderen Strukturen lediglich gruppierte B-Faktoren verfeinert (jeweils 1 B-Faktor pro Aminosäurerest), da das Verhältnis aus Meßwerten zu Parametern die Verfeinerung von individuellen B-Faktoren nicht sinnvoll zuließ.

Die  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  und  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Differenzfourier Elektronendichteverteilungen wurden stets mit allen gemessenen Strukturfaktoramplituden berechnet. Die Qualität der atomaren Modelle wurde mit den Programmen PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und SFCHECK (Collaborative Computational Project, 1994) kontrolliert.

#### 4.1.6 Strukturanalyse

Die Sekundärstruktur des komplett verfeinerten Modells wurde mit dem Programm DSSP (Kabsch & Sander, 1983) analysiert. Einzelne Reste innerhalb der Transmembran-Helices, die keine ideale,  $\alpha$ -helicale Geometrie aufweisen, wurden den entsprechenden Helices zugeordnet. Die Struktur wurde mit den Cytochrom-*c* Oxidase Strukturen aus dem Rinderherz (PDB-Nummer: 2OCC, Tsukihara *et al.*, 1996) und aus *P. Denitrificans* (PDB-Nummer: 1AR1, Ostermeier *et al.*, 1997) mittels RMS-Überlagerung der fünf Metallatome in MAIN (Turk, 1992) verglichen. Der Vergleich zu den Strukturen der löslichen Fragmente aus Untereinheit II der *T. thermophilus*  $ba_3$ -Oxidase (PDB-Nummer: 2CUA, Williams *et al.*, 1999) und der *E. coli* Chinol Oxidase (PDB-Nummer: 1CYX, Wilmanns *et al.*, 1995) erfolgte durch RMS-Überlagerung der beiden Kupferatome sowie der dazu direkt koordinativ gebundenen Atome. Die Proteinoberfläche, die Ladungsverteilung auf dieser Oberfläche sowie interne Kavitäten bzw. Kanäle wurden mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) bestimmt und analysiert.

Die Strukturen der verschiedenen Kristallzustände wurden entweder unter Beachtung des gleichen Ursprunges direkt verglichen, um Änderungen in der Elementarzelle darzustellen, oder nach RMS-Überlagerung der  $C^\alpha$ -Atome die Veränderungen der molekularen Struktur analysiert. Die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen im Kristallverbund wurde mit CONTACT (Collaborative Computational Project, 1994) bestimmt.

## 4.2 Ergebnisse

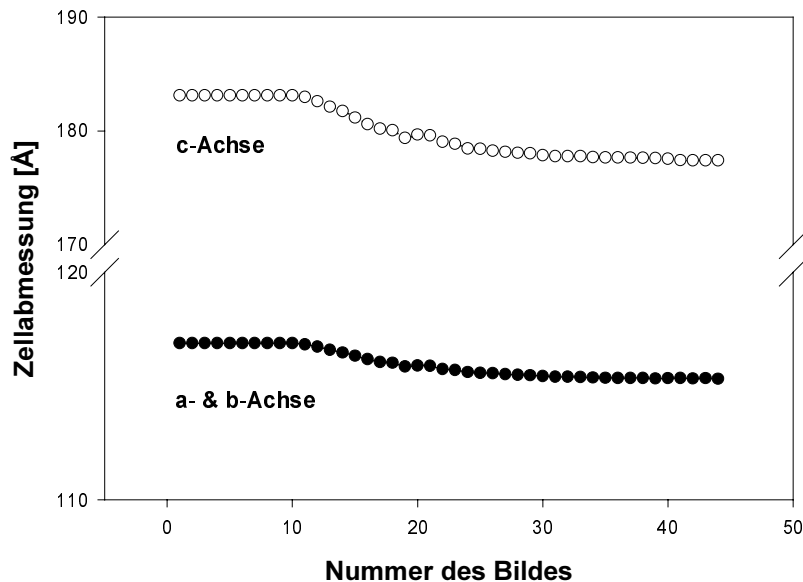
### 4.2.1 Kristallisation

Die Kristalle der  $ba_3$ -Oxidase gehören zu einer der Raumgruppen des enantiomorphen Paares  $P4_12_12 / P4_32_12$  und enthalten ein Molekül in der asymmetrischen Einheit. Im „nativen“, ungefrorenen Zustand zeigen sie eine große Variabilität in den Zellabmessungen<sup>‡</sup> ( $a = b = 112 - 116 \text{ \AA}$ ,  $c = 174 - 190 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ ), sowohl

---

<sup>‡</sup> Zur Beschreibung der Einheitszelle der  $ba_3$ -Oxidase-Kristalle wird aufgrund der hohen Variabilität im allgemeinen der Ausdruck „Zellabmessung“ benutzt. Der sonst übliche Ausdruck „Zellkonstante“ wurde für komplette Datensätze bzw. für die „bevorzugten Zustände“ reserviert.

zwischen verschiedenen Kristallen, als auch innerhalb eines in einer Quarzkapillare aufgenommenen Datensatzes (Abb. 19). Diese Änderungen lassen sich nicht mit den Meßbedingungen korrelieren und betragen innerhalb eines Datensatzes bis zu 10 Å für die *c*-Achse.



**Abb. 19:** Veränderung der Zellabmessungen bei „nativen“ Kristallen der  $ba_3$ -Oxidase

Die mit MOSFLM (Leslie, 1991) während der Integration verfeinerten Zellabmessungen sind in Abhängigkeit von der Nummer des Bildes dargestellt. Aufgrund der Mittelung der Zellabmessungen über 10 Bilder sind die Werte für die ersten Bilder hierbei artifiziell konstant gehalten.

Es wurde zunächst versucht, die Kristalle unter Verwendung eines wäßrigen Kryopuffers einzufrieren. Es konnten hierbei Pufferbedingungen gefunden werden, die sich sowohl ohne Eisbildung frieren ließen als auch den Kristallaufbau nicht zerstörten, d.h. Kristalle, die in den Puffer überführt, aber nicht gefroren wurden, zeigten das gewohnte Streuverhalten der nativen Kristalle. In jedem Fall resultierte das Frieren jedoch in einer Mosaikbreite von mehreren Grad und einer deutlich reduzierten Streuleistung, was auf das Zusammenbrechen des Kristallgitters während des Frierens deutet.

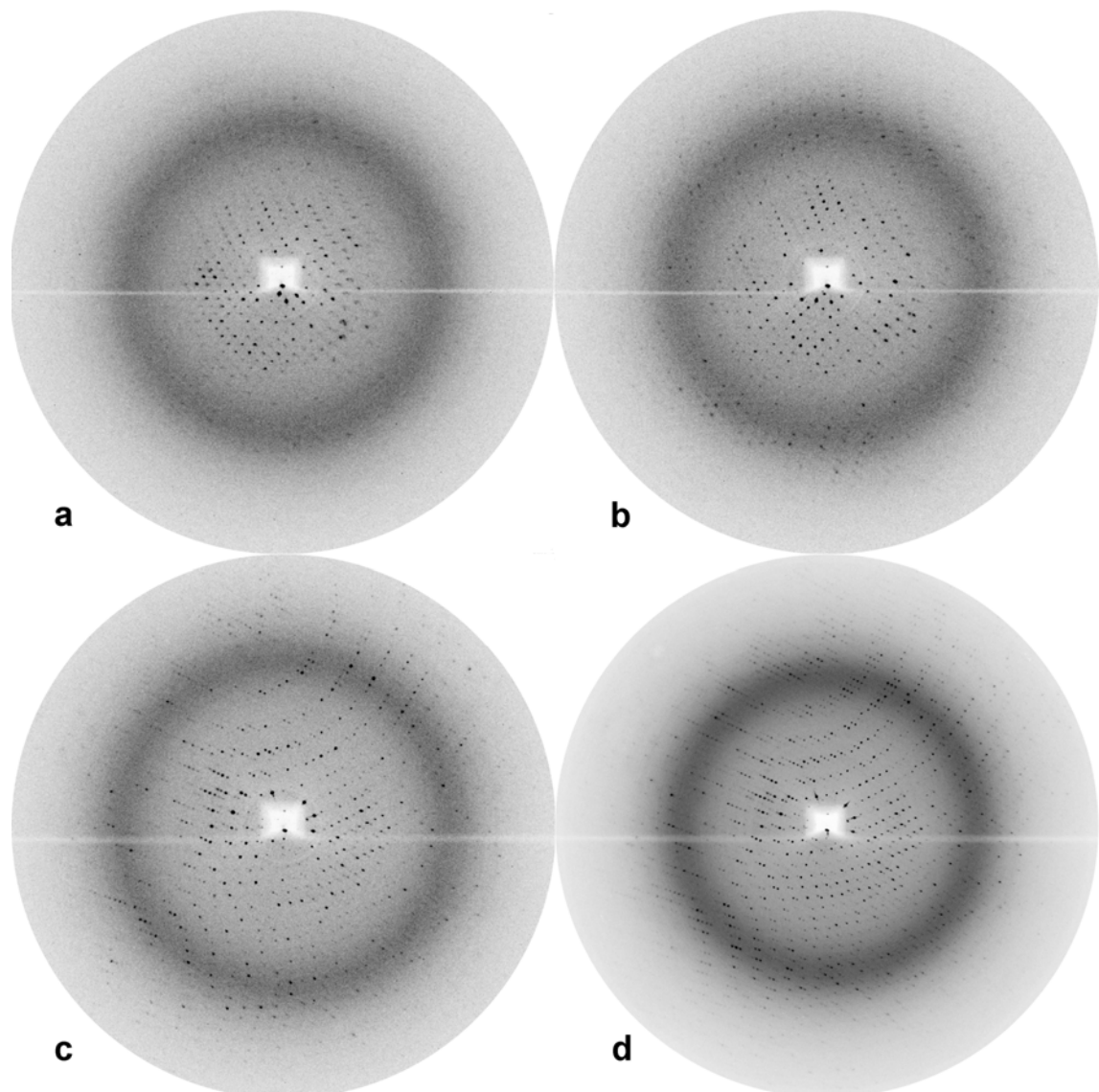
#### 4.2.2 Transformation der Kristalle

Unter Verwendung von Öl als „Kryopuffer“ konnten die Kristalle der  $ba_3$ -Oxidase erfolgreich gefroren werden. Dabei stellte sich heraus, daß sich die Zellabmessungen deutlich stärker verändert hatten, als dies vom Verhalten anderer Proteinkristalle während des Gefriervorganges zu erwarten gewesen wäre. Ein Beispiel der folgenden

systematischen Versuchsreihen zum Transformieren und Frieren der Kristalle mit der Öl-Methode ist in Abb. 20 dargestellt. Ein Kristall, der in einer Kapillare bis ca. 4 Å Auflösung gestreut hätte, wurde entsprechend 4.1.2.1 montiert. Das erste Diffraktionsbild (Abb. 20a) zeigt eine relative Abnahme der Streuleistung und Zunahme der Mosaikbreite durch die einsetzende Transformation. Das folgende Diffraktionsbild (Abb. 20b), welches ca. 5 min (Belichtungs- plus Auslesezeit) später aufgenommen wurde, zeigt bereits eine deutliche Zunahme der Streuleistung. Das Frieren des Kristalls führt zu einer weiteren Zunahme der Streuleistung (Abb. 20c) und stoppt das Fortschreiten der Dehydratisierung. Nach der Transformation zeigt der Kristall eine Streuleistung von unter 3.0 Å auf einem Drehanodengenerator (Abb. 20d). Diese Zunahme an Streuleistung ging einher mit einer Abnahme in den Zellabmessungen auf  $a = b = 111,7 \text{ \AA}$ ,  $c = 158,8 \text{ \AA}$ .

Die für die erfolgreiche Transformation notwendige Zeit beträgt unter Verwendung von Paraffinöl/n-Heptan ca. 10 – 15 min, was bei einer minimalen Zeitauflösung von ca. 4 – 5 min (minimale Belichtung- plus Auslesezeit) an einem Drehanodengenerator mit „image-plate“ als Detektor nur 2 Aufnahmen bis zum Frieren zulässt. Da der optimale Kristallzustand eine recht kurze Lebensdauer hat (ca. 10 sec oder kürzer), ist die Bestimmung des korrekten Zeitpunktes zum Frieren mit diesen Instrumenten sehr problematisch. Entsprechend konnte bei weniger als einem von 100 Kristallen der korrekte Zeitpunkt gefunden werden konnte. Des weiteren sind die Einflüsse der Messumgebung (z.B. Luftfeuchtigkeit, Temperatur, usw.) kaum zu steuern, sodaß eine erfolgreiche Transformation und Konservierung des transformierten Kristalls sehr schwer reproduzierbar ist.

Eine deutliche Verbesserung wird durch die Verwendung von intensiverer Synchrotronstrahlung und einem CCD-Detektor erreicht, was eine Zeitauflösung von ca. 10 s ermöglicht. Diese Kombination wurde zum Transformieren der Kristalle für das MAD-Experiment benutzt (siehe auch 4.1.3.1). Hier konnte eine mehrfache, zeitabhängige Zu- und Abnahme der Streuleistung beobachtet werden, was auf das Durchlaufen mehrerer bevorzugter Kristallzustände während der Transformation durch stetige Dehydratisierung des Kristalls deutet. Allerdings bereiten die kaum kontrollierbaren Einflüsse der Messumgebung auch hier Probleme.



**Abb. 20: Diffraktionsbilder der Kristalltransformation mittels Öl**

Der Kristall wurde, wie unter 4.1.2.1 beschrieben montiert und Diffraktionsbilder bei einer Belichtungszeit von 3 min nacheinander aufgenommen (a & b). Anschließend wurde der Kristall gefroren (c) und ein weiteres Diffraktionsbild unter Rotation von 1° und einer Belichtungszeit von 30 min aufgenommen (d). Der Rand der Aufnahme entspricht in a bis c einer Auflösung von 3.0 Å und in d 2.8 Å.

Zunächst wurde versucht, die Transformation mittels „Freemounting-System“ (siehe 4.1.2.2) und kontrollierter Feuchtereulation deutlich langsamer (ca. 1 % pro 0,5 – 1 h) durchzuführen, um die bei der Ölmethode beobachtete hohe Mosaikbreite der transformierten und gefrorenen Kristalle verringern zu können. Dabei konnte ein Streuoptimum festgestellt werden, welches ca. 2 % unter der Luftfeuchtigkeit der „nativen“ Kristalle lag und einer Zellabmessung von ca. 172 Å für die c-Achse entspricht. Eine weitere langsame Reduktion der Luftfeuchtigkeit resultierte im irreversiblen

Zusammenbrechen des Kristallgitters. Die deutlich geringeren Zellabmessungen, die bei der Ölmethode beobachtet wurden, konnten hierbei nicht mit der entsprechenden Qualität der Diffraktionbilder erreicht werden.

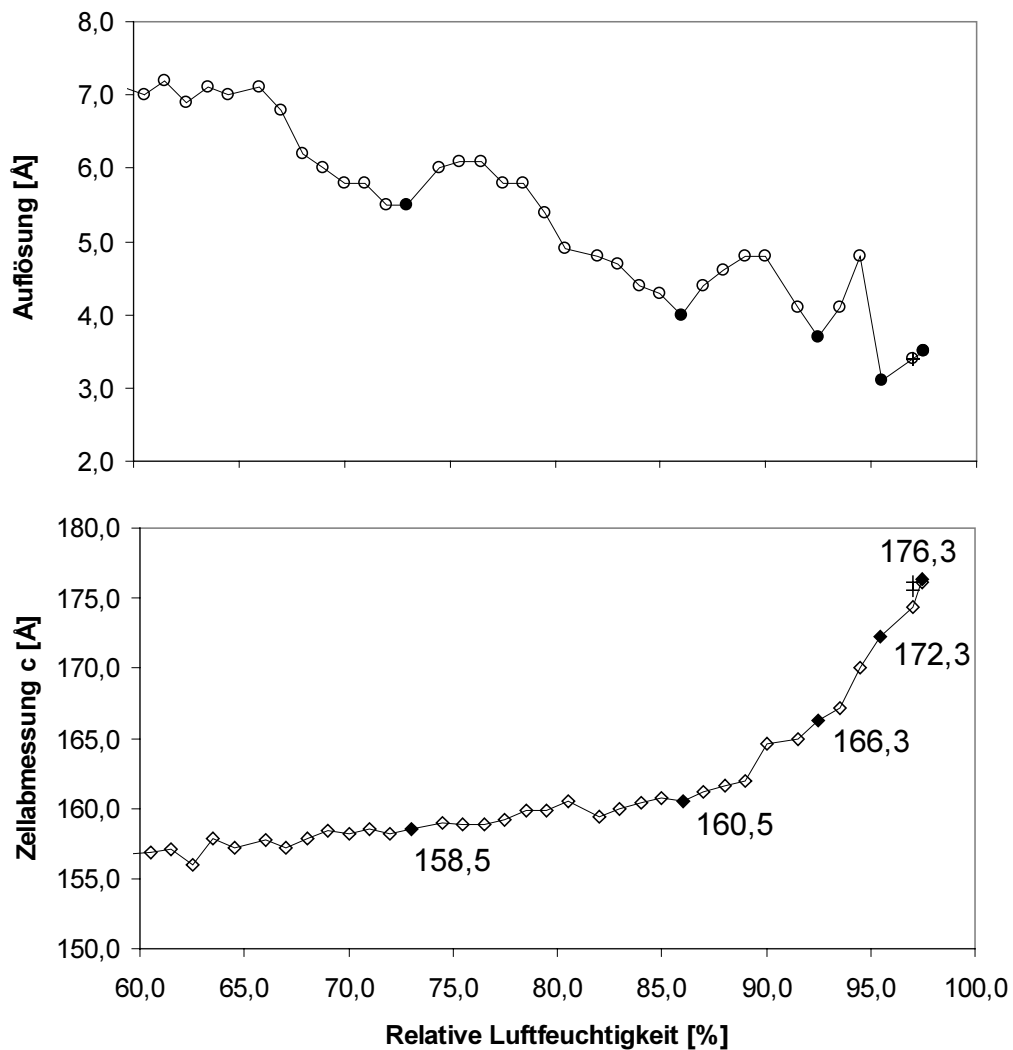
Im nächsten Schritt wurde der Einfluß der Geschwindigkeit der Feuchteänderung auf die Transformation untersucht. Die Kristalle wurden im „Freemounting-System“ montiert und die Feuchte unter Verwendung verschiedener Gradienten geändert. Dabei konnte eine erfolgreiche Transformation sowie das Vorhandensein mehrerer bevorzugter Kristallzustände beobachtet werden (Abb. 21).

Die Zellabmessungen korrelierten bei diesen Versuchen unter Verwendung verschiedener Feuchtegradienten sehr gut mit der relativen Luftfeuchtigkeit. Allerdings war die Streuleistung der bevorzugten Kristallzustände sehr stark von der Kinetik abhängig, wobei sowohl eine zu langsame als auch eine zu schnelle Feuchteänderung in weniger stark ausgeprägten Streuoptima oder irreversibler Kristallschädigung resultierte. Gradienten von mehr als 1 % pro 4 min., die im Vergleich zu Abb. 21 wahrscheinlich zu einer besseren Streuleistung geführt hätten, waren aufgrund der beschränkten Zeitauflösung des Drehanodengenerator/„image-plate“ Systems nicht mehr sinnvoll analysierbar. Die Qualität der Diffraktionsbilder ist generell sowohl von der Größe der Kristalle als auch von der Kinetik der Transformation abhängig. Somit ist nur die relative Änderung der in Abb. 21 gezeigten Streuleistung zu anderen Kristallen direkt vergleichbar.

Es ist bemerkenswert, daß bei einer geeigneten Kinetik von z.B. 1 % pro 4 min die relative Luftfeuchtigkeit bis auf 30 % (Differenz zum „nativen Kristall“ mehr als 67 %) reduziert werden konnte, ohne daß irreversible Kristallschäden auftraten. Nach Rückkehr auf den Anfangswert der Luftfeuchte waren sowohl das Streuverhalten als auch die Zellabmessungen nicht von frisch montierten Kristallen zu unterscheiden (Abb. 21). Die Kristalltransformation ist unter diesen Bedingungen also vollständig reversibel.

Das Frieren der im „Freemounting-System“ montierten Kristalle war nur bei den niedrigerer Luftfeuchtigkeit entsprechenden Streuoptima reproduzierbar möglich und resultierte bei den „nativen“ Kristallen immer und bei den Kristallen des ersten Optimums ( $c$ -Achse = 172 Å) meist im Zusammenbrechen des Kristallgitters.





**Abb. 21: Transformation der Kristalle der  $ba_3$ -Oxidase im Feuchtegradienten**

Die Kristalle der  $ba_3$ -Oxidase wurden entsprechend 4.1.2.2 im "Freemounting-System" bei 97,5 % relativer Luftfeuchte montiert. Unter diesen Bedingungen zeigte der Kristall bereits etwas kleinere Zellabmessungen und eine um ca. 0,5 Å bessere Streuleistung als in der Kapillare montierte, „native“ Kristalle. Die Feuchte wurde mit einem Gradienten von 1 % / 4 min gleichmäßig reduziert. Parallel wurde eine Serie von Diffraktionsbildern bei einer Belichtungszeit von 2 min aufgenommen und die Streuleistung sowie die Zellabmessungen mit MOSFLM (Leslie, 1991) bestimmt. Für die „bevorzugten Kristallzustände“ sind die ermittelten Zellabmessungen im unteren Bildabschnitt angegeben. Nach Erreichen von 30 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde diese wieder auf 97,5 % eingestellt und der Kristall über Nacht äquilibriert. Die Datenpunkte der anschließend aufgenommenen Diffraktionsbilder sind mit „+“ gekennzeichnet.

Kristalle, die mit Öl in einen Standard-„cryo-loop“ montiert und anschließend mittels kontrollierter Änderung der Luftfeuchtigkeit transformiert wurden (siehe 4.1.2.2), konnten gezielt für die Vermessung am Synchrotron vorbereitet werden. Das den Kristall umgebende Öl stellte besonders unter Verwendung von PFPE-Öl eine deutliche Barriere zur Dehydratisierung dar. Eine rasche Transformation der Kristalle konnte nur durch eine

sprunghafte Änderung der Luftfeuchtigkeit vom Wert der nativen Kristalle auf einen deutlich niedrigeren Wert realisiert werden. Die Geschwindigkeit der Dehydratisierung des Kristalls war hierbei sowohl von der Dicke der Ölschicht als auch von der Größe des initialen Feuchtesprunges abhängig. Es zeigte sich insbesondere bei der Verwendung von PFPE-Öl, daß eine zu dicke Ölschicht zu einer sehr langsamen Transformation führt. In diesem Fall waren Zellabmessungen unterhalb von ca. 172 Å zwar noch erreichbar, allerdings nur unter sehr schlechtem Streuverhalten und der bereits weiter oben beschriebenen irreversiblen Schädigung des Kristalls. Die Verwendung von „cryo-loops“ die im Verhältnis zur Kristallgröße relativ klein waren, resultierte in einer ausreichend dünnen Ölschicht.

Durch einen großen initialen Feuchtesprung, gefolgt von einer Gegenregulation der Luftfeuchtigkeit auf den Wert des gewünschten Streuoptimums kurz vor Erreichen der zugehörigen Zellabmessungen, konnten die verschiedenen bevorzugten Kristallzustände gezielt eingestellt werden. Hierbei zeigte das erste Streuoptimum (*c*-Achse = 172 Å), wie auch bereits bei den Gradientenversuchen, das beste Streuverhalten. In diesem Zustand resultierte das Frieren allerdings bisher immer in einer deutlichen Zunahme der Mosaikbreite, sowie einer deutlichen Abnahme in der Streuleistung. Die bei niedrigerer Feuchte liegenden, bevorzugten Kristallzustände, insbesondere das bei einer *c*-Achse von ca. 160 Å, erlauben ein reproduzierbares Frieren ohne Qualitätsverluste im Vergleich zum ungefrorenen Kristall. Die Streuleistung ist hier im Vergleich zum ersten Optimum um ca. 0,3 Å schlechter, allerdings deutlich höher als im „nativen“ Kristall.

### 4.2.3 Datensammlung und –auswertung

Für den nach der Ölmethode transformierten und gefrorenen Kristall konnten Daten bis 2,4 Å zur MAD-Phasierung und Strukturlösung am Synchrotron aufgenommen werden. Aufgrund der hohen Mosaikbreite und der relativ großen Zellachsen, konnte der Kristall pro Bild nur um 0,2° gedreht werden. Der Kristall streute zu Beginn bis mindestens 2,1 Å Auflösung, wobei aufgrund der hohen Mosaikbreite und der daraus resultierenden möglichen Überlappung von Reflexen die Daten nur bis 2,4 Å Auflösung gesammelt wurden. Alle MAD-Datensätze waren von guter Qualität ( $R_{\text{sym}} = 4,3 - 4,8 \%$ , siehe Tab. 4).

Die Datensätze zur strukturellen Charakterisierung der verschiedenen Kristallzustände konnten am Drehanodengenerator bis 2,8 Å (*c*-Achse = 172 Å) bzw. 3,2 Å

(c-Achse = 178 Å) aufgenommen werden. Durch die sehr stabile Regelung der Luftfeuchtigkeit auf eine Genauigkeit vom weniger als  $\pm 0,5$  % bei einem zeitlichen Abstand der Meßpunkte von 10 s und weniger als  $\pm 0,1-0,2$  % im Mittelwert über zehn Minuten konnten die bei Messungen in der Kapillare beobachteten starken Schwankungen in den Zellabmessungen hierbei vermieden werden. Für den „nativen“ Kristall (c-Achse = 178 Å) betragen die Änderungen der in MOSFLM (Leslie, 1991) verfeinerten Zellabmessungen weniger als 0,7 Å und für den Kristall im ersten Optimum (c-Achse = 172 Å) weniger als 0,2 Å. Entsprechend war die Aufnahme von in sich isomorphen Datensätzen durch den im „Freemounting-System“ montierten Kristall bei gutem  $R_{\text{sym}}$  möglich (Tab. 4). Durch das Vermessen der Kristalle am Drehanodengenerator ist die Auflösung dieser beiden Datensätze schlechter, als für den MAD-Datensatz. Diese beiden Datensätze erlauben zusammen mit der im MAD-Experiment bestimmten Struktur, die deutlich kleinere Zellkonstanten aufweist ( $a = b = 112,11$  Å,  $c = 161,41$  Å), einen Vergleich der verschiedenen Kristallzustände auf struktureller Ebene.

**Tab. 4: Statistik der Datensammlung der ba<sub>3</sub>-Oxidase**

Datensatz	Wellenlänge [Å]	Auflösung [Å]	$R_{\text{sym}}$ [%] *	Vollständigkeit [%] †	Zahl der Reflexe ‡	Multiplizität §
Fe- $f''$ -Maximum ( $\lambda_1$ )	1,7371	20,0-2,4	4,7 (29,5)	99,9 / 99,9	40.293	ca. 8
Fe- $f''$ -Minimum ( $\lambda_2$ )	1,7399	20,0-2,4	4,7 (18,6)	99,8 / 99,8	40.384	ca. 8
Cu- $f''$ -Maximum ( $\lambda_3$ )	1,3782	20,0-2,4	4,8 (29,3)	99,8 / 99,8	40.351	ca. 8
Cu- $f''$ -Minimum ( $\lambda_4$ )	1,3805	20,0-2,4	4,7 (30,5)	99,7 / 99,6	40.219	ca. 8
Remote Point ( $\lambda_5$ )	1,07	20,0-2,4	4,3 (14,7)	99,6 / 99,5	39.379	ca. 8
172 Å – Zelle **	1,54178	34,0-2,8	11,6 (46,9)	99,9	28.682	4,5
178 Å – Zelle ††	1,54178	36,0-3,2	12,4 (36,4)	97,7	20.077	3,0

\* Die Werte in Klammern korrespondieren zur letzten Auflösungsschale: 2,49-2,40 Å für alle MAD-Datensätze, 2,95-2,80 Å für den Datensatz der 172 Å – Zelle und 3,37-3,20 Å für den Datensatz der 178 Å – Zelle.

† Für die MAD-Datensätze sind die allgemeine und die anomale Vollständigkeit angegeben.

‡ Angegeben ist die Anzahl der unabhängigen Reflexe.

§ Für die MAD-Datensätze beträgt die Multiplizität unter Verwendung der Friedel-Symmetrie ungefähr 8. Entsprechend wurde jeder Reflex der Friedel-Paare im Durchschnitt vierfach gemessen.

\*\* Die Zellkonstanten für den Datensatz der „172 Å – Zelle“ betragen:  $a = b = 114,16$  Å,  $c = 171,82$  Å

†† Die Zellkonstanten für den Datensatz der „178 Å – Zelle“ betragen:  $a = b = 115,74$  Å,  $c = 177,65$  Å

#### 4.2.4 MAD-Phasierung

Die Durchführung eines MAD Experimentes an fünf verschiedenen Wellenlängen, welches die K-Absorptionskanten von zwei verschiedenen Elementen beinhaltet, erlaubte eine sehr genaue experimentelle Bestimmung der Phasen (FOM nach SHARP: azentrische

Reflexe 0,71, zentrische Reflexe 0,61; nach SOLOMON: 0,83). Im Vergleich zur gleichen Anzahl von identischen, anomal streuenden Atomen, resultiert die Präsenz von verschiedenen anomalen Streuern in zusätzlichen, unabhängigen Phaseninformationen.

#### 4.2.5 Modellbau, Verfeinerung und Qualität der Modelle

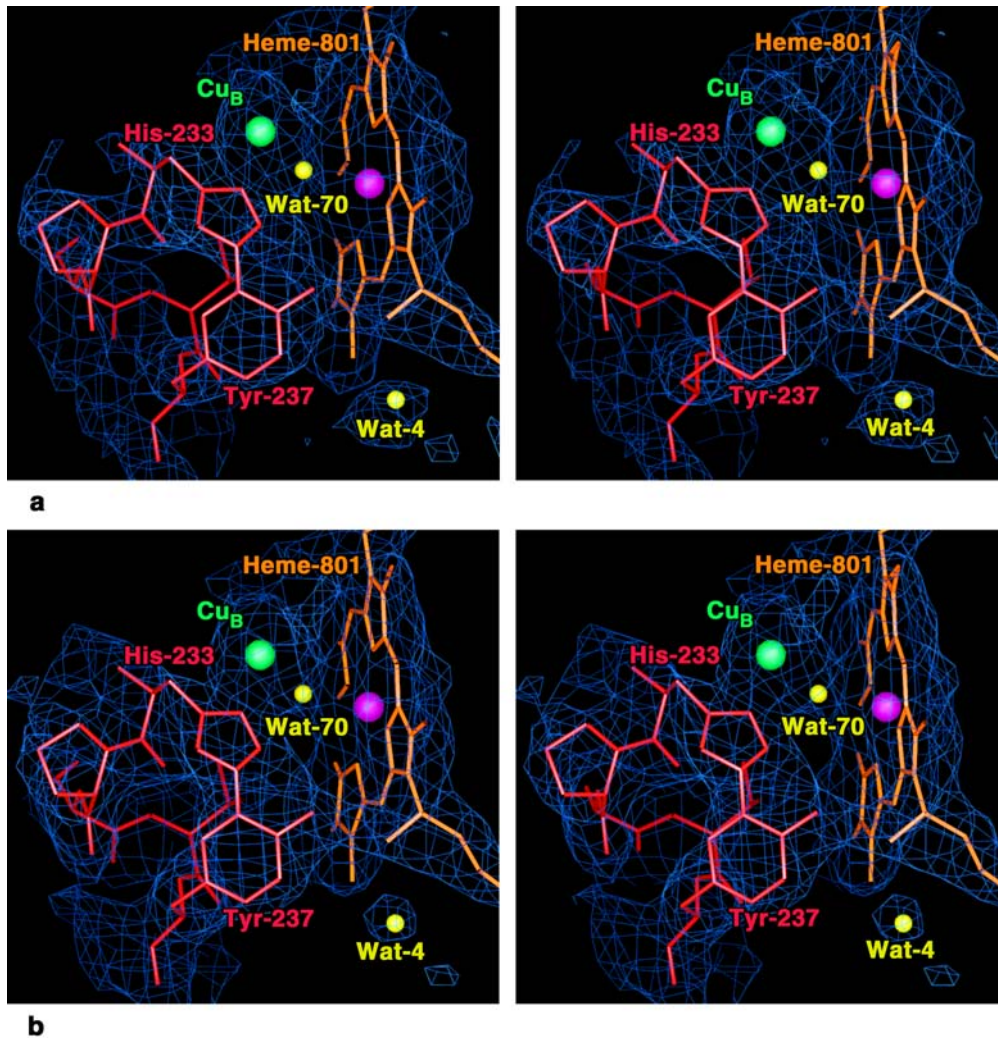
Die ausgezeichnete Qualität der MAD-Elektronendichtekarte (Abb. 22) erlaubte bereits im ersten Modellbauzyklus den Einbau aller Kofaktoren, sowie der meisten Aminosäurereste inklusive Seitenketten. Einige gut geordnete Wassermoleküle waren bereits in der experimentellen Elektronendichtekarte sichtbar. Unter Verwendung von Phasenkombination aus den experimentellen und Modellphasen konnte das Modell rasch vervollständigt und bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 22,4 % ( $R_{\text{free}} = 26,4$  %) bei sehr guter Geometrie und Stereochemie verfeinert werden (Tab. 5).

Nach dem Einbau aller sichtbaren Aminosäurereste der Untereinheiten I und II konnte eine weitere Transmembranhelix in der Elektronendichtekarte gefunden werden. Die entsprechende Untereinheit konnte isoliert und ihre Aminosäuresequenz mittels automatisiertem Edman-Abbau bestimmt werden (Abb. 23; Soulimane *et al.*, 2000).

Das komplett verfeinerte Modell der  $ba_3$  Cytochrom-*c* Oxidase besteht aus 743 Aminosäureresten der drei Untereinheiten I, II und IIa, dem binuklearen Zentrum Häm  $a_3$  /  $Cu_B$ , Häm *b* und dem  $Cu_A$ -Zentrum. Außer den 13 N-terminalen Aminosäureresten und den Resten Glu-496 bis Glu-500 von Untereinheit I, zwei N-terminalen Resten von Untereinheit II und einem N-terminalen Rest von Untereinheit IIa sowie wenigen solvensexponierten Seitenketten sind alle Aminosäuren sehr gut in der Elektronendichtekarte definiert.

Die Analyse der Kristalle mittels automatisiertem Edman-Abbaus zeigt, daß die N-terminalen neun Aminosäuren (MAVRASEIS) der Untereinheit I in den Kristallen nicht vorhanden sind. Im „Ramachandran Plot“ (Ramachandran & Sasissekharan, 1968) liegen fast alle Reste in den bevorzugten (90,7 %) und zusätzlich erlaubten (8,7 %) Regionen. Zwei Reste (Phe-135 und Trp-403, Untereinheit I) liegen im „großzügig erlaubten“ und zwei Reste (Phe-369 und Leu-132, Untereinheit I) im „nicht erlaubten“ Bereich. Alle vier Aminosäuren sind in dieser untypischen Konformation jedoch sehr gut in der  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte definiert. Leu-132 und Phe-135 bilden eine starke Wasserstoffbrückenbindung aus (Abstand zwischen Leu-132:O und Phe-132:N 2,9 Å). Das

Modell enthält vier *cis*-Peptidbindungen (vor Pro-38 von Untereinheit I sowie Phe-88, Pro-92 und Pro-94 von Untereinheit II), die ebenfalls sehr gut in der Elektronendichtekarte definiert sind.



**Abb. 22: Experimentelle Elektronendichtekarte der  $ba_3$ -Oxidase**

Dargestellt ist die experimentelle Elektronendichtekarte (bei  $1\sigma$  konturiert) nach der MAD-Phasierung (a) und nach „solvent-flattening“ (b) im Bereich des binuklearen Zentrums Häm  $a_3$  /  $Cu_B$  zusammen mit der verfeinerten Struktur. Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Zum Erstellen der Strukturen der verschiedenen Kristallzustände der  $ba_3$ -Oxidase waren außer den verschiedenen Verfeinerungszyklen kaum manuelle Eingriffe notwendig. In den Kristallen des ersten Streuoptimums ( $c$ -Achse = 172 Å) waren der N-Terminus sowie die Aminosäurereste von Glu-496 bis Glu-500 der Untereinheit I deutlich besser geordnet und somit in der Elektronendichtekarte sichtbar. Das entsprechende atomare Modell besteht somit aus 750 Aminosäureresten, wobei die neun N-terminalen Reste der Untereinheit I,

drei N-terminale Reste der Untereinheit II sowie zwei N-terminale Reste der Untereinheit IIa nicht in der Elektronendichtekarte definiert sind. Das Modell der „nativen-Kristalle“ (c-Achse = 178 Å) besteht aus 743 Aminosäureresten, wobei die 13 N-terminalen Reste der Untereinheit I, sechs N-terminale Reste der Untereinheit II und zwei N-terminale Reste der Untereinheit IIa nicht in der Elektronendichtekarte definiert sind. Außer dem Einfügen der zusätzlich definierten Aminosäurereste beschränkten sich die manuellen Eingriffe beim Erstellen dieser beiden Strukturen auf die Korrektur von kristallographisch definierten Wassermolekülen und wenigen Seitenketten. Die Statistik der Verfeinerung ist für die verschiedenen Kristallzustände ebenfalls in Tab. 5 zusammengefaßt.

**Tab. 5: Statistik der Verfeinerung der ba<sub>3</sub>-Oxidase**

Statistischer Wert	MAD-Struktur (c-Achse = 161 Å)	1. Streuoptimum (c-Achse = 172 Å)	Nativer Kristall (c-Achse = 178 Å)
Auflösungsbereich [Å]	20,0-2,4	20,0-2,8	20,0-3,2
Zahl der Reflexe – gesamt	39.379	28.544	19.961
- working set	37.407	27.156	18.988
- test set	1.972	1.388	973
Vollständigkeit [%]	96,3	99,9	97,4
- working set [%]	91,3	95,0	92,5
- test set [%]	5,0	4,9	4,9
R-Faktor [%] <sup>*</sup>	22,2 (25,4)	20,4 (27,0)	21,8 (29,1)
R <sub>free</sub> [%] <sup>*</sup>	26,4 (29,9)	24,7 (30,7)	26,9 (31,7)
Anzahl der Atome (außer H)	6.144	6.053	5.963
Davon Proteinatome	5.851	5.918	5.851
davon Solvensmoleküle	119	24	1
davon Detergenz- & Kofaktoratome	174	111	111
RMS Abweichung von Idealwerten			
- Bindungslängen [Å]	0,008	0,007	0,006
- Bindungswinkel [°]	1,6	1,5	1,5
B-Faktor Statistik			
- Mittlerer B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	50,6	47,4	68,0
- Hauptkette [Å <sup>2</sup> ]	50,1	47,4	68,2
- Seitenkette [Å <sup>2</sup> ]	51,2	48,0	68,2
- Wassermoleküle [Å <sup>2</sup> ]	45,4	42,9	30,3
- Kofaktoren [Å <sup>2</sup> ]	52,5	35,5	58,6
- RMS Abweichung gebundener Atome [Å <sup>2</sup> ]	3,85	1,48	†

\* Werte für die letzte Auflösungsschale (MAD-Struktur: 2,49-2,40 Å, 172-er Zelle: 2,90-2,80 Å, 178-er Zelle: 3,31-3,20) sind in Klammern angegeben.

† Wert nicht verfügbar, da das dieses Modell mit gruppierten B-Faktoren verfeinert wurde.

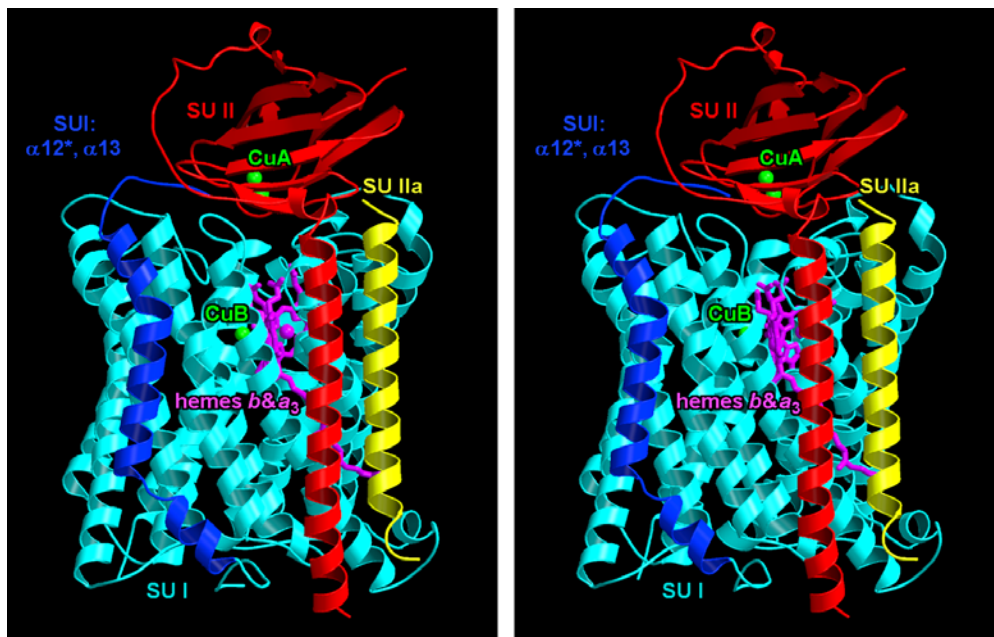
1                    11                    21                    31 34  
 MEEKPKGALA VILVLTILTIL VFWLGVIYAVF FARG

**Abb. 23: Aminosäuresequenz der neuen Untereinheit IIa der  $ba_3$ -Oxidase**

Die Aminosäuresequenz der Untereinheit IIa wurde mittels automatisiertem Edmann-Abbau und C-terminaler Sequenzierung bestimmt. Die Reste, die in der Struktur  $\alpha$ -helicale Konformation zeigen, sind durch Fettdruck hervorgehoben

#### 4.2.6 Strukturbeschreibung

Die Gesamtstruktur der  $ba_3$  Cytochrom-*c* Oxidase ist in Abb. 24 gezeigt. Sie besteht aus den drei Untereinheiten I, II und IIa, welche ein zylinderförmiges Transmembranhelix-Bündel mit einem Durchmesser von 50 Å und einer Höhe von 54 Å sowie eine kleinere periplasmatische Domäne von 35 Å × 29 Å × 20 Å bilden. Die Transmembranhelices sind leicht gegeneinander verdreht und somit nicht komplett senkrecht zur Membranebene.



**Abb. 24: Stereo-Ribbon-Darstellung der  $ba_3$  Cytochrom-*c* Oxidase aus *T. Thermophilus***

Die 12 Transmembran-Helices der Untereinheit I (SU I), die auch in den beiden anderen strukturell bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen vorhanden sind, wurden in hellblau und das zusätzliche Transmembransegment (Helices  $\alpha 12^*$  und  $\alpha 13$ ) in dunkelblau dargestellt. Die Untereinheit II (SU II) ist in rot und die neue Untereinheit IIa (SU IIa) in gelb dargestellt. Die Häm-Gruppen sind als Stabmodell in violett und die Kupferatome als grüne Bälle dargestellt. Diese Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erzeugt und mit RASTER3D (Merritt & Murphy, 1994) gerendert.

Die große Domäne wird im wesentlichen von den 13 Transmembranhelices ( $\alpha 1$ : 17-48,  $\alpha 2$ : 65- 97,  $\alpha 3$ :103-125,  $\alpha 4$ : 143-173,  $\alpha 5$ : 181-212,  $\alpha 6$ : 221-254,  $\alpha 7$ : 262-283,

$\alpha_8$ : 292-326,  $\alpha_9$ : 344-366,  $\alpha_{10}$ : 380-409,  $\alpha_{11}$ : 415-444,  $\alpha_{12}$ : 461-493,  $\alpha_{13}$ : 527-550) sowie fünf weiteren, kleinen  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_{1^*}$ : 52-58,  $\alpha_{8^*}$ : 334-338,  $\alpha_{9^*}$ : 369-375,  $\alpha_{11^*}$ : 453-455,  $\alpha_{12^*}$ : 517-524) der Untereinheit I gebildet und bindet die beiden Häme und das  $Cu_B$ . Sie wird durch je eine fest gebundene Transmembranhelix der Untereinheiten II und IIa vervollständigt. Die kleinere periplasmatische Domäne wird ausschließlich von der Untereinheit II gebildet und enthält das  $Cu_A$ -Zentrum, welches die Elektronen vom löslichen Cytochrom- $c_{552}$  übernimmt. Diese Domäne bildet ein zehn-strängiges „ $\beta$ -barrel“ ( $\beta_1$ : 71-75,  $\beta_2$ : 78-86,  $\beta_3$ : 89-91,  $\beta_4$ : 95-97,  $\beta_5$ : 102-108,  $\beta_6$ : 114-118,  $\beta_7$ : 124-127,  $\beta_8$ : 133-138,  $\beta_9$ : 143-148,  $\beta_{10}$ : 161-166) und zeigt gewisse Ähnlichkeiten zu den „class I“ Kupferproteinen. Die Verbindung von der Transmembranhelix der Untereinheit II ( $\alpha_1$ ) zu diesem „ $\beta$ -barrel“ wird von zwei kleinen  $\alpha$ -Helices ( $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ ) sowie einen „random-coil“ Bereich gebildet. Alle N-Termini der drei Untereinheiten befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran und alle C-Termini auf der periplasmatischen Seite.

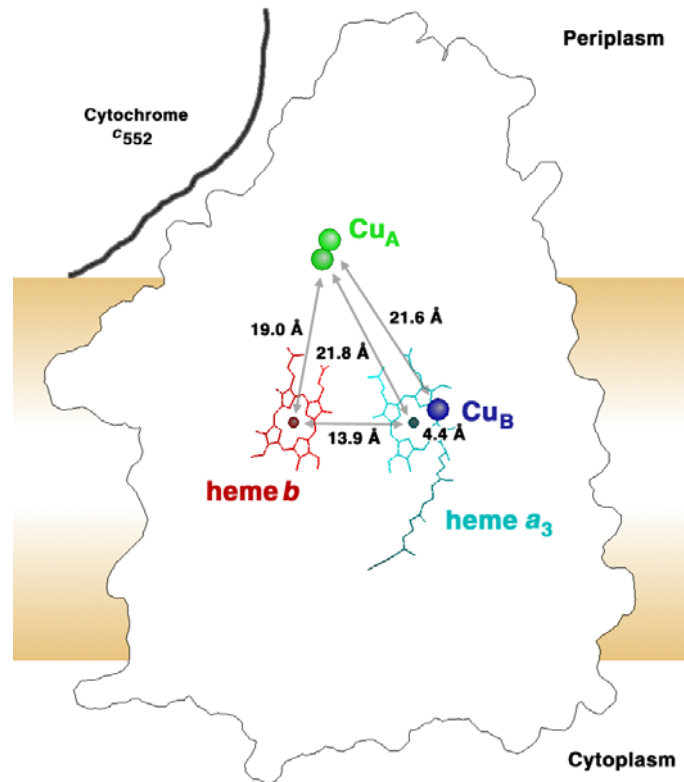
Häm  $b$  und Häm  $a_3$  befinden sich im hydrophoben Inneren der Untereinheit I und haben zur periplasmatischen Oberfläche der Membran einen Abstand von ca. 15 Å. Die Abstände zwischen den verschiedenen Metallzentren, die Lage des Moleküls in der Membran sowie die in Analogie zu Witt *et al.* (1998a,b) beschriebene Cytochrom- $c_{552}$  Bindungsstelle in der Nähe des  $Cu_A$ -Zentrums sind in Abb. 25 schematisch dargestellt. Es konnten weiterhin drei Nonyl- $\beta$ -D-Glukosid Detergenzmoleküle, jedoch keine Phospholipid-Moleküle oder weitere Metalle in der Elektronendichtekarte lokalisiert werden, was der Analyse der Proteinpräparation auf die Elemente P, Mg, Ca und Zn mittels IPC-AES entspricht (Atomemissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma; Daten nicht gezeigt).

Die Struktur der  $ba_3$ -Oxidase zeigt bei einer Betrachtung von der periplasmatischen Seite die bereits bei den anderen Oxidasen beschriebenen Poren A, B und C (Iwata *et al.*, 1995). Pore A ist durch mehrere aromatische Aminosäureseitenketten blockiert, während Pore B das binukleare Zentrum Häm  $a_3$  /  $Cu_B$  und Pore C das Häm  $b$  enthalten. Das C-terminale Ende von Untereinheit I (Aminosäurereste 551 bis 560) liegt auf der periplasmatischen Seite des Moleküls an der Grenze von Untereinheit I und II.

Das Häm  $b$  stellt das am einfachsten aufgebaute Protohäm mit einem „low-spin“ Eisen dar und ist durch die Histidine His-71/ $\alpha_2$  und His-386/ $\alpha_{10}$  koordiniert. Es ist symmetrisch



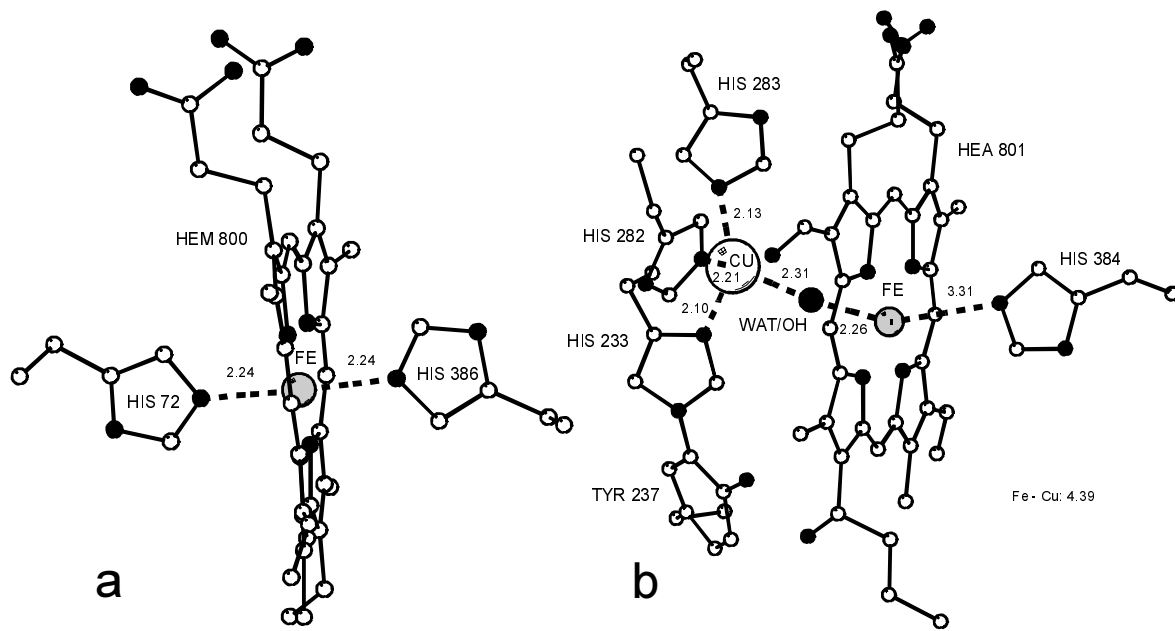
zwischen den beiden Histidinen gelegen, wobei der Abstand vom Häm-Fe zu den Histidin- $N^{\epsilon 2}$ -Atomen 2,2 Å beträgt (Abb. 26a).



**Abb. 25: Schematische Darstellung der  $ba_3$ -Oxidase in der Membran**

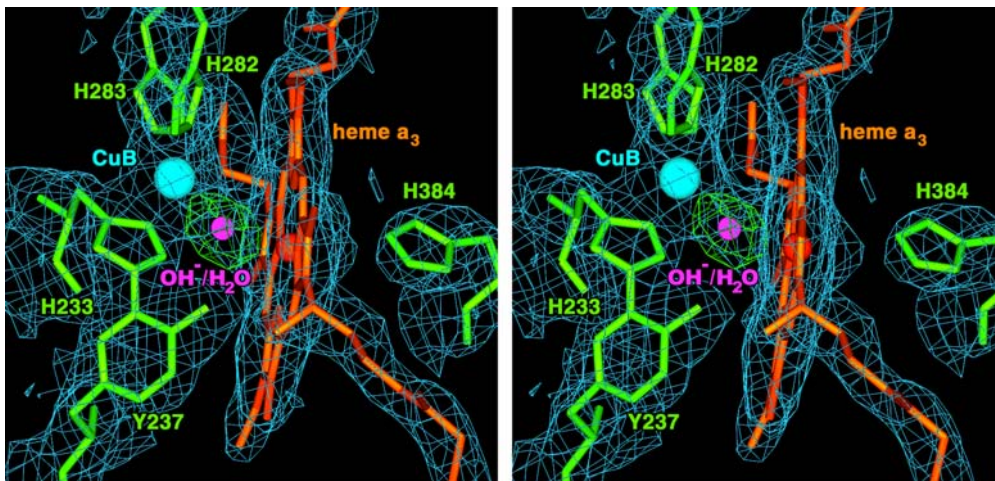
Die Lage der Metallzentren ( $Cu_A$ , Häm  $b$  & Häm  $a_3$  /  $Cu_B$ ) ist relativ zur Membran (gelb schattiert) und den Molekülgrenzen dargestellt. Für die Ausbildung des Elektronentransfer-Komplexes bindet das Substrat Cytochrom- $c_{552}$  in Analogie zu Witt *et al.* (1998a,b) auf der periplasmatischen Seite der Membran in der Nähe des  $Cu_A$ -Zentrums.

Das aktive Zentrum der  $ba_3$ -Oxidase wird durch das Häm  $a_3$  und das  $Cu_B$  gebildet (Abb. 26b). Das Eisenatom liegt in der Häm-Ebene und wird durch die vier Pyrrol-Ringe und den axialen His-384/ $\alpha 10$  Liganden koordiniert, wobei der Abstand zum Histidin- $N^{\epsilon 2}$ -Atom mit 3.3 Å deutlich länger ist als in den beiden anderen Cytochrom-*c* Oxidase Strukturen. Die Elektronendichteverteilung für die drei Histidin-Liganden des  $Cu_B$ -Atoms (His-238/ $\alpha 7$ , His-282/ $\alpha 7$  und His-233/ $\alpha 6$ ) sowie für die kovalente Bindung zwischen dem  $N^{\epsilon 2}$ -Atom des His-233 und dem  $C^{\epsilon 2}$  Atom des Tyr-237 ist gut definiert (Abb. 27). Der Abstand vom Häm  $a_3$  Fe zum Tyr-236 OH-Atom beträgt 5,6 Å. Die Bindungsstelle für den Sauerstoff liegt zwischen den beiden Metallatomen und ist im oxidierten Zustand des Enzyms mit einer aus einem Sauerstoffatom bestehenden Spezies ( $\mu$ -Oxo-Spezies, Hydroxidion oder Wassermolekül) in einer Entfernung von 2,3 Å zu beiden Metallen besetzt.



**Abb. 26: Koordination der Metallzentren in Untereinheit I**

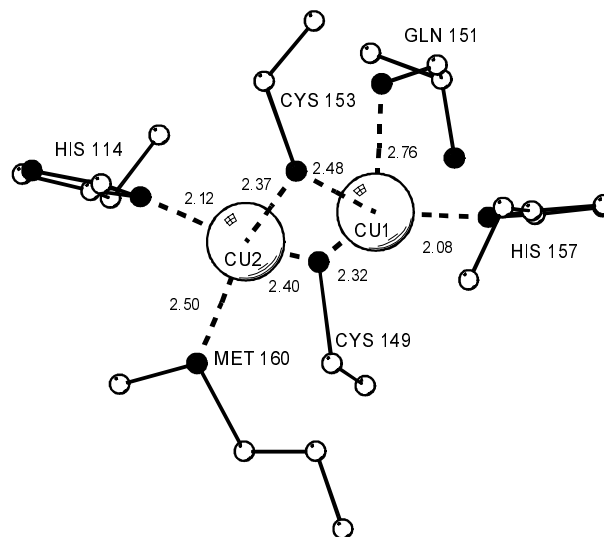
Die Koordination des Häm  $b$  (a) und des Häm  $a_3$  /  $Cu_B$  - binuklearen Zentrums (b) ist schematisch dargestellt. Die in der Kristallstruktur gemessenen Bindungslängen sind in Ångström [ $\text{\AA}$ ] angegeben. Diese Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erstellt.



**Abb. 27: Aktives Zentrum der  $ba_3$ -Oxidase**

Stereodarstellung des binuklearen Häm  $a_3$  /  $Cu_B$  Zentrums einschließlich der  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte (blau; konturiert bei  $1.0 \sigma$ ) des verfeinerten Modells. Das Häm ist in orange und die Histidin-Liganden, sowie das zum His-233 kovalent gebundene Tyr-237 sind in grün als Stabmodelle dargestellt. Die kovalente Bindung zwischen Tyr-237 und His-233 ist sehr gut in der Elektronendichtekarte definiert. Die  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Differenzelektronendichtekarte (grün, konturiert bei  $5.0 \sigma$ ) für den Brückenliganden zwischen dem Häm Eisen und dem  $Cu_B$ -Atom ist fast kugelförmig und kann am besten durch eine aus einem Sauerstoffatom bestehende Spezies ( $H_2O$ ,  $OH^-$  oder  $O^{2-}$ , violett) interpretiert werden. Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

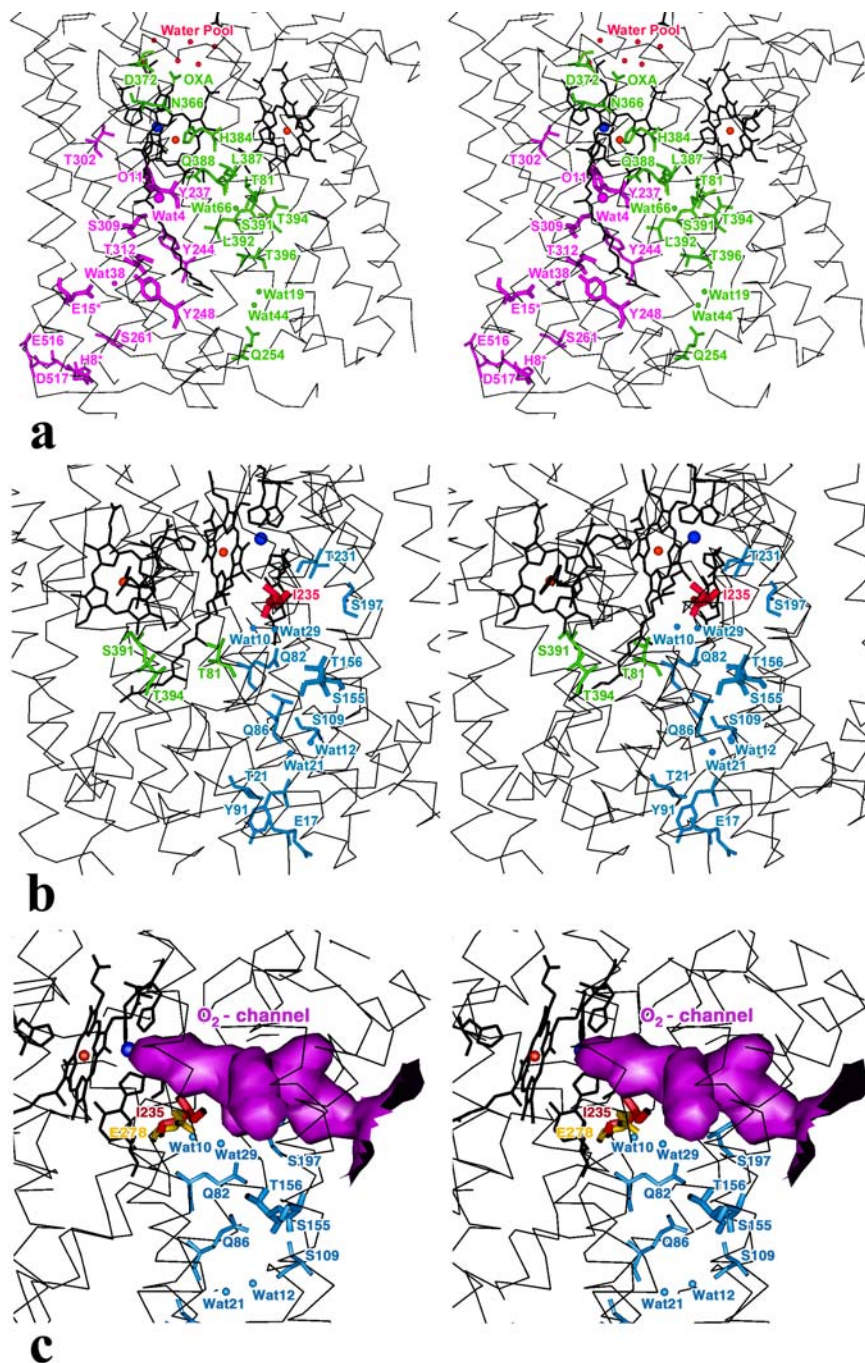
Die beiden Kupferatome des Cu<sub>A</sub>-Zentrums sind symmetrisch von zwei Histidinen (His-114 und His-157) und zwei Cysteinen (Cys-149 und Cys-153) der Untereinheit II ligandiert. Hierbei sind die Imidazol-Ringe der Histidine nicht parallel, wie es für die Struktur der rekombinant erzeugten löslichen Domäne der ba<sub>3</sub>-Oxidase beschrieben wurde (Williams *et al.*, 1999). Jedoch ist der Winkel zwischen diesen beiden Gruppen mit ca. 25° deutlich kleiner als bei den anderen beiden strukturell beschriebenen Oxidasen (Tsukihara *et al.*, 1996; Ostermeier *et al.*, 1997). Der Abstand zwischen den beiden Kupferatomen, die durch die Thiolat-Gruppen der beiden Cysteine Cys-149 und Cys-153 verbrückt sind, beträgt 2,4 Å. Die Koordination am Cu<sub>A</sub>-Zentrum ist in Abb. 28 schematisch dargestellt.



**Abb. 28: Koordination des Cu<sub>A</sub>-Zentrums**

Die beiden Kupferatome des Cu<sub>A</sub>-Zentrums sind zusammen mit den sie ligandierenden Aminosäureresten der Untereinheit II dargestellt. Die in der Kristallstruktur gemessenen Bindungslängen sind in Ångström [Å] angegeben. Diese Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erstellt.

Die Struktur zeigt drei mögliche Protonenkanäle, die jeweils aus mehreren polaren Aminosäuren und Wassermolekülen bestehen und ein internes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Sie beginnen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran und sind prinzipiell dazu geeignet, Protonen entweder zum aktiven Zentrum oder zur periplasmatischen Seite der Membran zu dirigieren. Zwei dieser Kanäle entsprechen von ihrer räumlichen Lage im Molekül den für die anderen Oxidasen diskutierten K- und D-Protonenkanälen (Iwata *et al.*, 1995), wobei die daran beteiligten Reste in der Aminosäuresequenz kaum konserviert sind (Abb. 29).



**Abb. 29: Sauerstoff- und Protonenkanäle in der  $ba_3$ -Oxidase**

Stereodarstellung der Protonenkanäle, des Sauerstoffkanals und des „Wasserpools“ der  $ba_3$ -Oxidase einschließlich der  $C^\alpha$ -Atome der Transmembranhelices (dünne schwarze Linien). Die beiden Häme sind als starke schwarze Linien und die Metallatome als rote (Fe) bzw. blaue (Cu) Bälle dargestellt: a) der neue Q-Protonenkanal (grün) und der K-Protonenkanal (violett) sind zusammen mit dem „Wasserpool“ (rote Bälle) dargestellt. b) Der D-Protonenkanal ist in blau und die Verbindung zum Q-Protonenkanal in grün dargestellt. c) Die hydrophobe Oberfläche des Sauerstoffkanals ist in violett zusammen mit dem oberen Teil des D-Protonenkanals (blau) dargestellt. Die in anderen Oxidasen hochkonservierte Aminosäure Glu-278<sup>P</sup> (gelb in Teilbild c) ist bei der  $ba_3$ -Oxidase durch ein hydrophobes Ile-235 (rot in b und c) ersetzt. Die zur Untereinheit II gehörenden Aminosäurereste sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet. Aminosäuren, die auch in den anderen Oxidasen zumindest als chemisch ähnliche Reste konserviert sind, wurden dicker gezeichnet. Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Der erste Protonenkanal wird hauptsächlich von Aminosäureseitenketten der Transmembranhelices  $\alpha_6$  und  $\alpha_8$  gebildet und führt zum Tyr-237 ( $\alpha_6$ ), welches eine kovalente Bindung zum Cu<sub>B</sub>-Ligand His-233 ausbildet und am aktiven Zentrum liegt (Abb. 29a). Die räumliche Lage dieses Protonenkanals im Molekül ist vergleichbar zum bereits bekannten K-Protonenkanal. Er beginnt auf der periplasmatischen Seite der Membran mit Asp-517 und Glu-516 von Untereinheit I sowie His-8 und Glu-15 von Untereinheit II. Die weiteren Bestandteile gehören alle zu Untereinheit I und sind Ser-261, Tyr-248, ein Wassermolekül (Wat-38), Thr-312, Tyr-244, Ser-309 und ein weiteres Wassermolekül (Wat-4). Am oberen Ende dieses Kanals liegen O11 des Häm  $\alpha_3$ , Tyr-237 vom aktiven Zentrum und eventuell Thr-302. Lediglich das obere Wassermolekül (Wat-4), Tyr-237 und Glu-15 von Untereinheit II sind zu den anderen Cytochrom Oxidasen konserviert. Die in den anderen Oxidasen strikt konservierten Reste Thr-351<sup>P§</sup> und Lys-354<sup>P</sup>, deren Mutation zu unpolaren Resten sonst zu entweder weniger aktiven oder komplett inaktiven Oxidasen führt (Konstantinov *et al.*, 1997; Gennis, 1998a), sind durch Ser-309 und Thr-312 ersetzt. Tyr-248 ist der einzige weitere Rest, der in der Primärstruktur noch zu den anderen Oxidasen vergleichbar ist (Ser-291<sup>P</sup>).

Der zweite Protonenkanal (Abb. 29b) beginnt bei Glu-17 ( $\alpha_1$ ) und führt über Tyr-91 ( $\alpha_2$ ) Thr-21( $\alpha_1$ ), zwei Wassermoleküle (Wat-21 und Wat-12), Ser-109 ( $\alpha_3$ ), Gln-86 ( $\alpha_2$ ), Ser-155 ( $\alpha_4$ ), Thr-156 ( $\alpha_4$ ) und Gln-82( $\alpha_2$ ) zu einer Kavität, die mit den Wassermolekülen Wat-10 und Wat-29 gefüllt ist. Der weitere Weg der Protonen ist weniger klar gezeichnet. Sie könnten von dieser Kavität aus entweder direkt (Distanz: 12,6 Å) oder via Ser-197 und Thr-231 auf das aktive Zentrum übertragen werden. Eine andere Möglichkeit wäre der Weg über Thr-81 und Thr-394 zu Ser-391, welches zum dritten Protonenkanal gehört. Der Abstand zwischen den O <sup>$\gamma$ 1</sup>-Atomen der beiden Threonine ist entsprechend der verfeinerten Kristallstruktur mit 8 Å hierbei ziemlich groß. Wenn man allerdings die Möglichkeit der Rotation der Seitenketten um die C <sup>$\alpha$</sup> -C <sup>$\beta$</sup>  Bindung betrachtet, verringert sich dieser Abstand auf ca. 5 Å. Dies liegt deutlich unter der Entfernung zwischen dem aktiven Zentrum und Thr-231 bzw. Wat-10/29. Die

---

§ Die unmarkierte Aminosäurenummerierung bezieht sich auf die *T. thermophilus ba*<sub>3</sub>-Oxidase. Aminosäuren, die sich auf die Cytochrom-*c* Oxidase aus *P. denitrificans* (Ostermeier *et al.*, 1997) beziehen, sind durch ein hochgestelltes „P“ gekennzeichnet.

räumliche Lage dieses Kanals innerhalb des Moleküls ist mit dem bereits bekannten D-Protonenkanal vergleichbar. Allerdings sind hier noch weniger Aminosäuren innerhalb der Primärstruktur zu den anderen Oxidasen konserviert. Nur Ser-155 und Thr-156 (Ser-192<sup>P</sup> und Ser-193<sup>P</sup>) sind innerhalb der Aminosäuresequenz als identische bzw. chemisch ähnliche Aminosäurereste erhalten. Insbesondere das in den anderen Oxidasen für die Protonenpumpaktivität des D-Protonenkanals essentielle Glu-278<sup>P</sup> (Gennis, 1998a) ist bei der  $ba_3$ -Oxidase durch ein hydrophobes Ile-235 ersetzt, was die Protonenpumpaktivität bei diesem Enzym jedoch nicht aufhebt (Kannt *et al.*, 1998).

Der dritte Protonenkanal (Abb. 29a), im folgenden als Q-Protonenkanal bezeichnet, ist neu für die  $ba_3$ -Oxidase und beginnt auf der cytoplasmatischen Seite der Membran mit Gln-254, welches in direktem Kontakt zum „bulk-solvens“ steht. Er führt weiter über zwei Wassermoleküle, Wat-44 und Wat-19, Thr-396 und den Carbonyl-Sauerstoff von Leu-392 zu Ser-391, welches über Thr-394 und Thr-81 die Verbindung zum D-Protonenkanal herstellt. Der weitere Weg der Protonen wird durch Gln-388, den Carbonyl-Sauerstoff von Leu-387, den Häm  $a_3$  Liganden His-384, Asn-366, Asp-372 und die Carboxylgruppe des Häm  $a_3$  Pyrrolringes A zu einer Ansammlung von Wassermolekülen geleitet, die sich oberhalb der Häm-Propionate befinden (im folgenden als „Wasserpool“ bezeichnet; siehe Abb. 29a). Der Q-Protonenkanal ist weder zum sogenannten H-Protonenkanal, welcher für die Rinderherzoxidase beschrieben wurde (Yoshikawa *et al.*, 1998) noch zu dem dazu ähnlichen E-Protonenkanal der Oxidase aus *P. denitrificans* (Ostermeier *et al.*, 1997; Pfitzner *et al.*, 1998) vergleichbar. Die Aminosäuren des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks dieser H- und E-Protonenkanäle sind in der  $ba_3$ -Oxidase nicht konserviert. Der Q-Protonenkanal könnte entweder selbständig Protonen von der cytoplasmatischen auf die periplasmatische Seite der Membran transportieren oder Protonen weiterleiten, die über Thr-81 und Thr-394 vom D-Protonenkanal kommen (Abb. 29a,b).

Die  $ba_3$  Cytochrom-*c* Oxidase zeigt einen sehr ausgeprägten Kanal, der von der Proteinoberfläche in der Mitte der Membran ausgehend zum aktiven Zentrum führt und komplett mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet ist (Abb. 29c). Der innere Durchmesser dieses ca. 25 Å langen Kanals variiert zwischen 2 Å und mehr als 7 Å. Ile-235, welches bei anderen Oxidasen durch das für die Protonenpumpaktivität des D-Protonenkanals essentielle Glu-278<sup>P</sup> ersetzt ist, bildet einen Teil der hydrophoben Auskleidung dieses Kanals. Innerhalb des Kanals ist keine signifikante Elektronendichte sichtbar. Dies schließt



die Existenz von sehr gut geordneten Molekülen (z.B. H<sub>2</sub>O oder O<sub>2</sub>) innerhalb des Kanals im Kristall jedoch nicht in der membrangebundenen, aktiven Oxidase aus.

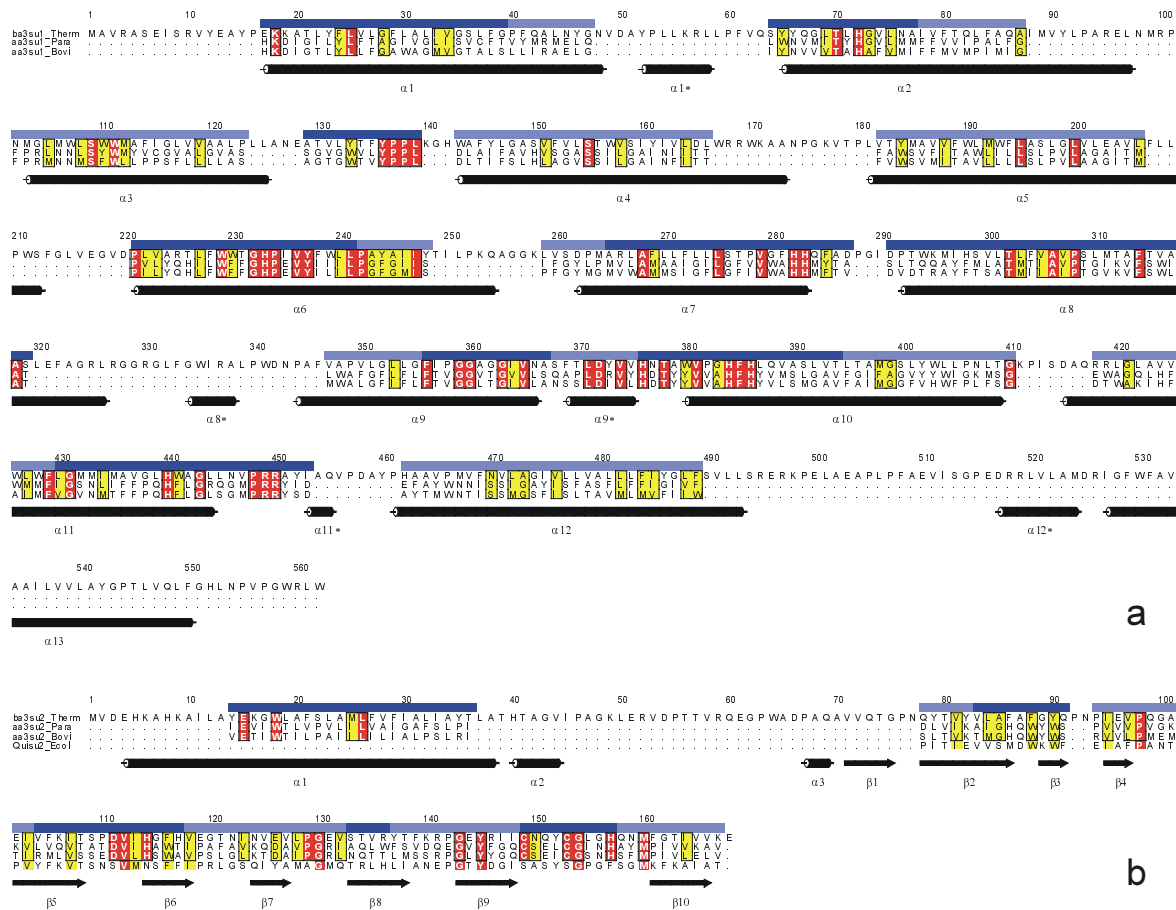
#### 4.2.7 Vergleich zu anderen Cytochrom-*c* Oxidasen

Der strukturbasierte Sequenzvergleich zwischen der *ba*<sub>3</sub> Cytochrom-*c* Oxidase und den Oxidasen aus *P. denitrificans* und dem Rinderherz sowie der gentechnisch manipulierten Untereinheit II der Chinol Oxidase aus *E. coli* (Abb. 30) zeigt, daß funktionell unbedingt notwendige Aminosäurereste konserviert sind. Dazu zählen die Aminosäuren, die für den intramolekularen Elektronentransfer vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum zu den Häms diskutiert werden (Hill, 1994; Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996), sowie die Häm- und Kupferliganden. Trotz der sonst sehr niedrigen Sequenzhomologie (<20 % Identität) sind einige weitere Aminosäuren zwischen den strukturell bekannten Cytochrom Oxidasen konserviert, was auf eine besondere Funktion dieser Reste hinweist. Einen besonders markanten Sequenzbereich stellt das hochkonservierte Sequenzmotiv YPPL (Reste 136-139) zwischen den Transmembranhelices  $\alpha$ <sub>3</sub> und  $\alpha$ <sub>4</sub> dar (Abb. 30a).

Tyrosin 136 bildet eine feste Wasserstoffbrückenbindung zum ebenfalls konservierten Trp-229 aus. Das entsprechende  $\pi$ -System dieser Aminosäure zeigt eine parallele „stacking“-Wechselwirkung zum  $\pi$ -System von His-283, einem der Cu<sub>B</sub>-Liganden (Abb. 31). Diese Reste könnten einen bisher unbeschriebenen intramolekularen Elektronentransferweg bilden, der vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum direkt zum Cu<sub>B</sub> Atom führt. Außer der relativ langen Distanz zwischen dem Cu<sub>A</sub>-Zentrum und dem  $\pi$ -System von Tyr-136 (10,5 Å) beinhaltet dieser Weg mehrere  $\pi$ -Systeme, die durch wenige, sehr starke, koordinative Bindungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen verknüpft sind. Für die Übertragung der Elektronen vom Cu<sub>A</sub> zum Phenylring von Tyr-136 können quantenmechanische Tunneleffekte, die bei einer Entfernung von ca. 10 Å Übertragungsraten von bis zu 10<sup>9</sup> s<sup>-1</sup> erreichen können (Moser *et al.*, 1992), oder der Cu<sub>A</sub>-Ligand Gln-151 in Betracht gezogen werden. Die beiden Proline und das Leucin (Pro-137, Pro-138 und Leu-139) sind wahrscheinlich aus strukturellen Gründen konserviert, um das Tyr-136 in der für den Elektronentransfer korrekten Konformation zu halten.

Nach dem derzeitigen Wissensstand werden die Elektronen durch Binden der Vorderseite des Cytochroms (Umgebung des solvensexponierten Häm-Pyrrolringes C) in der Nähe des Cu<sub>A</sub>-Zentrums an der Untereinheit II der Cytochrom Oxidase auf diese übertragen

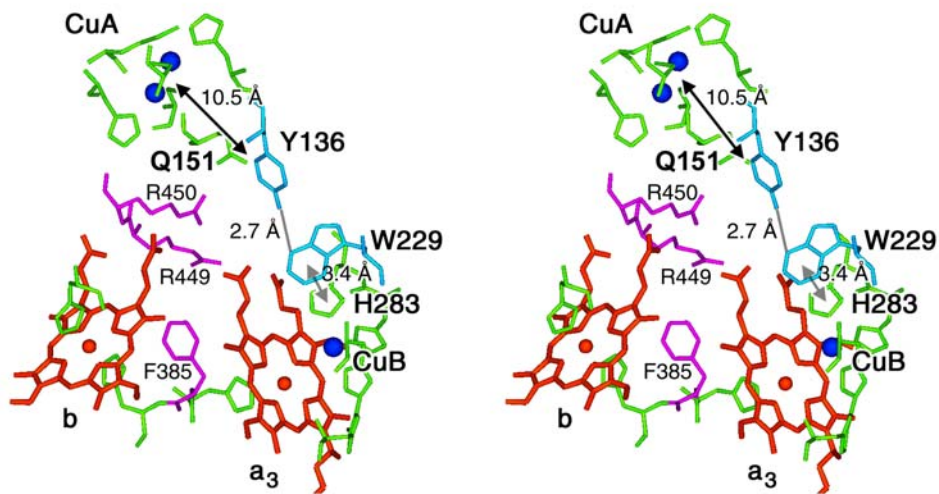
(Salemme *et al.*, 1973; Pelletier & Kraut, 1992). Ludwig und Mitarbeiter (Witt *et al.*, 1998a,b) haben vorgeschlagen, daß die bei anderen Oxidasen gut konservierten Aminosäuren Trp-121<sup>P</sup> und Tyr-122<sup>P</sup> in den Elektronentransfer involviert sind und daß die sauren Aminosäuren Glu-126<sup>P</sup>, Asp-135<sup>P</sup>, Asp-159<sup>P</sup> sowie Asp-178<sup>P</sup> Teil der Bindetasche sind. Die beiden aromatischen Reste sind entsprechend Abb. 30b bei der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase durch Phe-88 und Gly-89 ersetzt. Allerdings besetzt der Phenylring von Phe-86 fast die selbe räumliche Position wie Tyr-122<sup>P</sup>, so daß dieser zusammen mit Phe-88 für den intermolekularen Elektronentransfer bei der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase verantwortlich sein könnte. Die sauren Aminosäuren sind bis auf Asp-111 in der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase nicht konserviert.



**Abb. 30: Strukturbasiertes Sequenzalignment der Cytochrom-*c* Oxidasen**

Der Sequenzvergleich basiert auf den Kristallstrukturen der Cytochrom-*c* Oxidasen aus *T. thermophilus* (diese Arbeit), *P. denitrificans* (Ostermeier *et al.*, 1997) und dem Rinderherz (Tsukihara *et al.*, 1996), sowie der löslichen, Cu<sub>A</sub> bindenden Domäne aus der *E. coli* Chinol Oxidase (Wilmanns *et al.*, 1995). Die gekennzeichneten Sekundärstrukturelemente der Untereinheiten I (a) und II (b) entsprechen der Struktur der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase (siehe Seite 77f). Der Sequenzvergleich ist nur für solche Aminosäurereste gezeigt, die eine vergleichbare Position im Raum einnehmen (ca. 60 %). Aminosäurereste mit sehr ähnlichen Positionen im Raum sind durch einen dunkelblauen Balken und solche, deren Position im Raum noch vergleichbar ist, durch einen hellblauen Balken gekennzeichnet sind (RMS-Abweichungen der C<sup>α</sup>-Atome gleich 1,1 Å bzw. 2,0 Å). Diese Abbildung wurde mit ALSRIPT (Barton, 1993) erstellt.





**Abb. 31: Stereodarstellung der Elektronentransferwege in der  $ba_3$ -Oxidase**

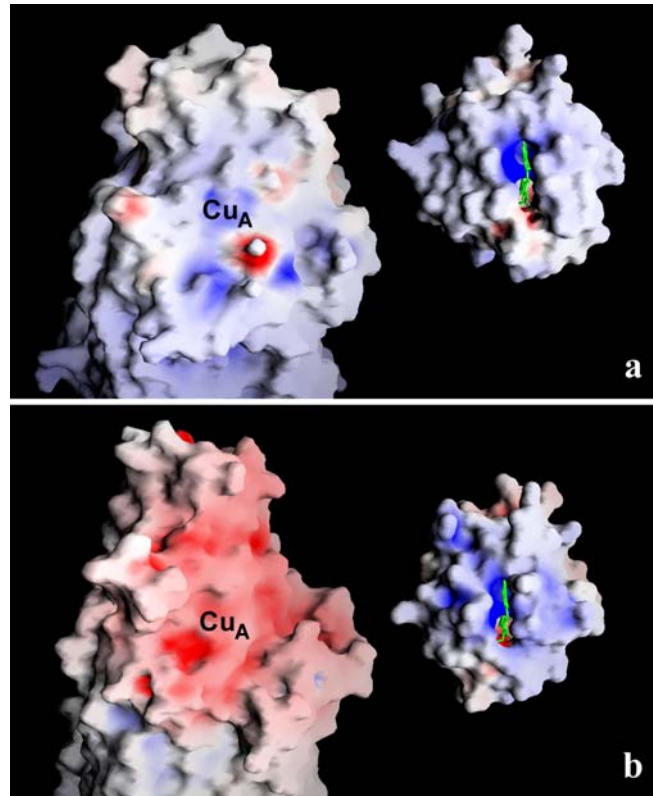
Die Häme  $b$  und  $a_3$  sind in orange, die Kupferatome in blau und die Metallliganden in grün dargestellt. Die beiden Arginine (Arg-449 & Arg-450) sowie Phe-385, die am Elektronentransfer vom  $Cu_A$ -Zentrum via Häm  $b$  zum aktiven Zentrum (Häm  $a_3$  /  $Cu_B$ ) beteiligt sind, wurden in violett eingezeichnet. Die Aminosäurereste, die den neu postulierten Elektronentransferweg vom  $Cu_A$  zum aromatischen Ringsystem vom Tyr-136 und von dort über Trp-229 zum  $Cu_B$ -Liganden His-238 bilden, sind einschließlich der relevanten Entfernungsangaben in hellblau dargestellt. Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Die Oberflächenladungsverteilung der Untereinheit II in der Umgebung des  $Cu_A$ -Zentrums zeigt bei der  $ba_3$ -Oxidase im Gegensatz zu den Oxidasen aus *P. denitrificans* oder Rinderherz fast ausschließlich hydrophobe Aminosäuren (Abb. 32). Das Cytochrom- $c_{552}$  zeigt entsprechend eine hydrophobe Oberfläche in der Umgebung des solvensexponierten Häm Ringes C. Daraus folgt, daß die Wechselwirkungen zur Ausbildung des Elektronentransferkomplexes zwischen diesen beiden Proteinen hauptsächlich hydrophober Natur sind.

Diese Aussage korreliert sehr gut mit der geringeren Stabilität von elektrostatischen Wechselwirkungen bei erhöhter Temperatur. Giuffré *et al.* (1999) haben weiterhin nachgewiesen, daß im Gegensatz zu den Oxidasen aus *P. denitrificans* oder dem Rinderherz zwischen der  $ba_3$ -Oxidase und ihrem Substrat Cytochrom- $c_{552}$  kein stabiler elektrostatischer Komplex („tight electrostatic complex“) ausgebildet wird.

Ein Vergleich der Untereinheiten II und IIa der  $ba_3$ -Oxidase mit der Untereinheit II der Oxidase aus dem Rinderherz oder *P. denitrificans* zeigt, daß die neue Untereinheit IIa die Position der bei den anderen Oxidasen vorhandenen ersten Transmembranhelix von Untereinheit II einnimmt (Abb. 33). Interessanterweise zeigt die Transmembranhelix von

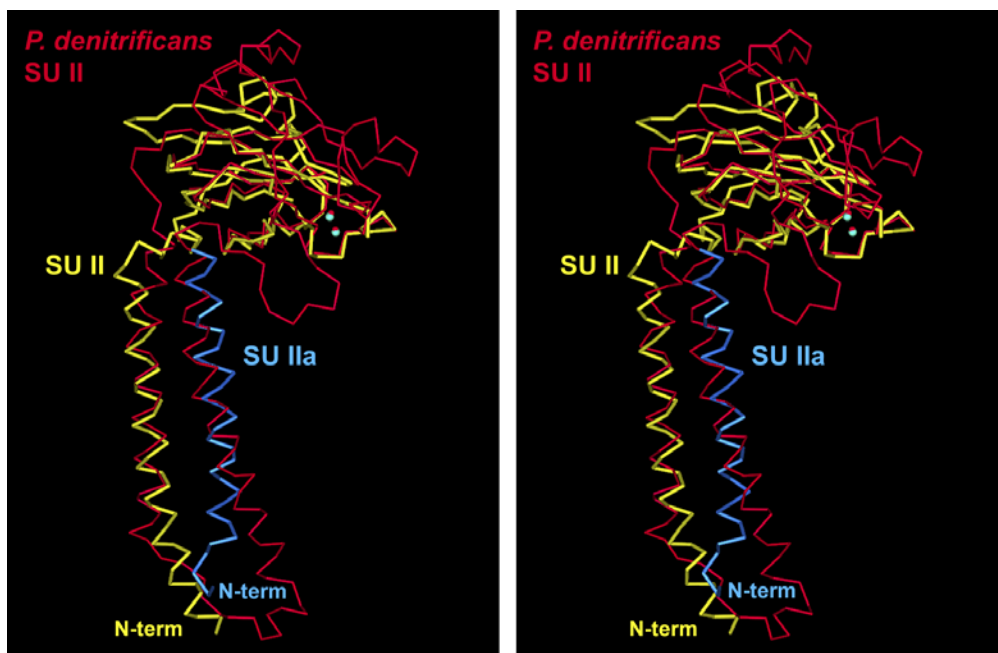
Untereinheit IIa eine zu den anderen Oxidasen entgegengesetzte Polarität. Ihr N-Terminus befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran, während der N-Terminus der Untereinheit II der anderen beiden Oxidasen und somit der Beginn der entsprechenden ersten Transmembranhelix auf der periplasmatischen Seite liegt.



**Abb. 32: Elektronentransferkomplex der Rinderherz- und der  $ba_3$ -Oxidase**

Die Oberflächenladungsverteilung der für die Ausbildung des Elektronentransferkomplexes zwischen Cytochrom-*c* Oxidase (links) und Cytochrom-*c* (rechts) miteinander wechselwirkenden Oberflächenbereiche ist für (a) die  $ba_3$ -Oxidase aus *T. Thermophilus* und ihr Substrat Cytochrom- $c_{552}$  und (b) die Rinderherzoxidase (Tsukihara *et al.*, 1996) und das Pferdeherzcytochrom-*c* (Bushnell *et al.*, 1990) dargestellt. Die Färbung wurde gemäß dem berechneten elektrostatischen Potential der oxidierten Oxidasen und reduzierten Cytochrome zwischen  $-40$  kT/e (intensiv rot) und  $40$  kT/e (intensiv blau) variiert. Diese Abbildung wurde mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1992) erstellt.

Die zweite Transmembranhelix von Untereinheit II der anderen beiden Oxidasen läßt sich gut mit der einzigen Transmembranhelix aus Untereinheit II der  $ba_3$ -Oxidase überlagern. Abb. 33 zeigt weiterhin, daß sich die zentralen Bereiche des „ $\beta$ -barrels“ der polaren periplasmatischen Domäne recht gut überlagern lassen, während die an der Oberfläche liegenden „loops“ unterschiedlich sind. Diese „surface-loops“ sind für die  $ba_3$ -Oxidase in beiden Untereinheiten in der Regel kürzer als bei den beiden anderen strukturell bekannten Oxidasen, eine typische Eigenschaft thermostabiler Proteine (Adams & Kelly, 1998).



**Abb. 33: Vergleich der Untereinheiten I, II & IIa der  $ba_3$ - und *P. denitrificans* Oxidasen**

Stereodarstellung der Überlagerung der  $C^\alpha$ -Atome der Untereinheiten II (gelb) und IIa (blau) der  $ba_3$ -Oxidase mit der Untereinheit II der  $aa_3$  Cytochrom-*c* Oxidase aus *P. denitrificans*. Die beiden Kupferatome des  $Cu_A$ -Zentrums sind als hellblaue bzw. rote Bälle dargestellt. Die N-Termini der  $ba_3$ -Oxidase sind gekennzeichnet. Alle C-Termini sowie der N-Terminus der Untereinheit II von *P. denitrificans* liegen auf der periplasmatischen Seite der Membran (oben). Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Das bereits unter 4.2.6 kurz beschriebene 13. Transmembransegment der Untereinheit I (Helices  $\alpha_{12}^*$  &  $\alpha_{13}$ ; siehe auch Abb. 24) ist eine weitere Besonderheit der  $ba_3$ -Oxidase. Untereinheit I besteht bei den meisten anderen Cytochrom-*c* und Chinol Oxidasen nur aus 12 Transmembranhelices. Diese zusätzliche Transmembranhelix läßt sich mit keiner der 22 Transmembranhelices der Cytochrom-*c* Oxidase aus *P. denitrificans* oder der 28 Transmembranhelices der Rinderherzoxidase überlagern.

Im Vergleich der  $ba_3$ -Oxidase zu den beiden anderen strukturell bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen konnte festgestellt werden, daß die unter 4.2.6 beschriebene Ansammlung von mehreren Wassermolekülen in einer Kavität oberhalb der Häm-Propionate („Wasserpool“, siehe Abb. 29a) in allen drei Strukturen konserviert ist. Weiterhin sind die meisten Aminosäuren, die diesen „Wasserpool“ umgeben, entweder strikt konserviert oder durch Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt. Es gibt mehrere sehr gut ausgeprägte Kanäle von über Wasserstoffbrückenbindungen verknüpften polaren Seitenketten oder weiteren Wassermolekülen, die diesen „Wasserpool“ mit der

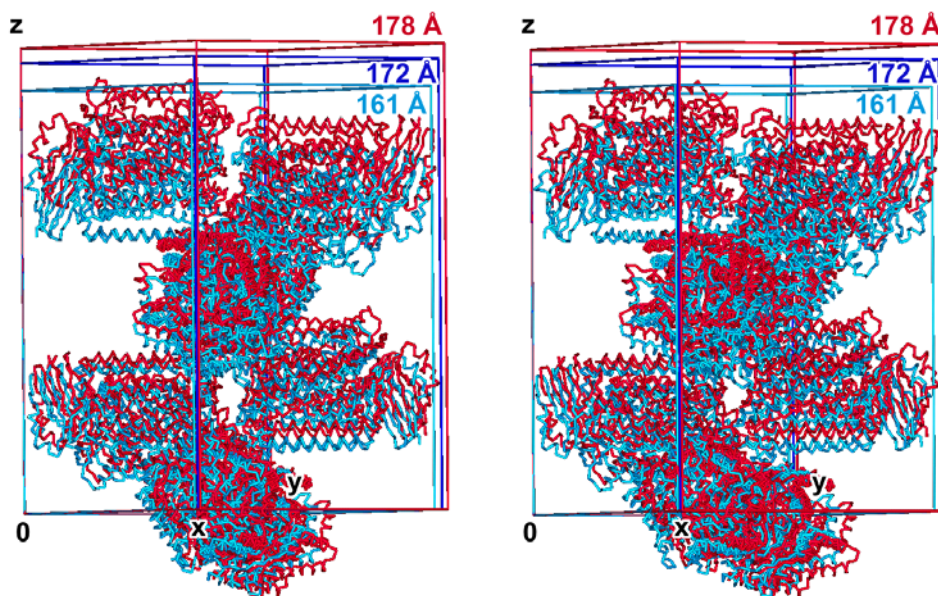
periplasmatischen Seite der Membran verbinden. Er scheint somit in einem schnellen Gleichgewicht zum „bulk-solvens“ auf der periplasmatischen Seite der Membran zu stehen. Seine Lage oberhalb der Häm Propionate und somit seine Nähe zum aktiven Zentrum und den Protonenkanälen der Oxidasen sowie das wahrscheinlich schnelle Gleichgewicht zum „bulk-solvens“ macht es wahrscheinlich, daß sowohl gepumpte Protonen sowie am aktiven Zentrum gebildetes Wasser primär von diesem „Wasserpool“ aufgenommen werden.

Der Vergleich der Strukturen der hier beschriebenen, kompletten  $ba_3$ -Oxidase und der gentechnisch erzeugten polaren Domäne der Untereinheit II (Williams *et al.*, 1999) ergibt, daß beide Strukturen im Bereich des zentralen „ $\beta$ -barrels“ der Untereinheit II erwartungsgemäß sehr ähnlich sind. Es gibt leichte Unterschiede in der Koordination der beiden Kupferatome des  $Cu_A$ -Zentrums. Die bei einer Auflösung von 1,6 Å verfeinerte Struktur der löslichen Domäne beschreibt die Imidazol-Ringe der Kupfer koordinierenden Histidine als parallel während für die Struktur des kompletten Enzyms zwischen den beiden Ringen ein Winkel von ca. 25° gefunden wurde. Weiterhin sind die Abstände vom Atom CU1 zu den ligandierenden Atomen der Untereinheit II in der Struktur der löslichen Domäne um ca. 0,2 Å kürzer. Die Aminosäuren zwischen der Transmembranhelix und dem zentralen „ $\beta$ -barrel“ von Untereinheit II („linker region“: Thr-39 bis Val-71) bilden in der hier beschriebenen Struktur des kompletten Proteins zwei kurze Helices ( $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ ; siehe Abb. 24 und Abb. 30) sowie einen „random coil“ Bereich. In der Struktur der löslichen Domäne sind die Aminosäuren vor Val-53 deutlich anders geordnet, was wahrscheinlich durch Kristallpackungskräfte beeinflusst wird (Williams *et al.*, 1999). Die hier beschriebene Struktur zeigt die natürliche Konformation der gesamten Untereinheit II, einschließlich der dazu gehörenden Transmembranhelix und dieses Verbindungsbereiches („linker region“).

#### 4.2.8 Vergleich zwischen den verschiedenen Kristallzuständen

Bereits beim Vergleich der Zellkonstanten der verschiedenen Kristallzustände (siehe 4.2.2 und 4.2.3) zeigt sich, daß die wesentlichen Änderungen während der Kristalltransformation entlang der z-Achse auftreten. Die einzelnen Moleküle der  $ba_3$ -Oxidase liegen immer paarweise parallel zur x-y-Ebene und sind entlang der z-Achse jeweils um 90° verdreht ( $P4_32_12$ -Anordnung). Dabei sind abwechselnd die cytoplasmatischen und periplasmatischen, hydrophilen Bereiche zur Mitte der Einheitszelle hin ausgerichtet. Die

Kristallpackung wird durch die Wechselwirkungen der hydrophilen Bereiche sowohl innerhalb einer solchen Ebene als auch zwischen den Ebenen stabilisiert. Die hydrophoben Transmembranbereiche sind von den ungeordneten und somit in der Röntgenstruktur nicht sichtbaren Detergenzmolekülen umgeben und nicht an der Stabilisierung des Kristallaufbaus beteiligt. Die Reduktion des Solvensgehaltes im Kristall während der Transformation führt zu einer Kompression dieses Aufbaues, wobei sich die hydrophilen Bereiche der Moleküle innerhalb einer solchen Ebene leicht (x- und y-Koordinaten) und die verschiedenen Ebenen deutlich stärker (z-Koordinate) annähern (Abb. 34). Die einzelnen Moleküle sind in den verschiedenen Kristallzuständen völlig parallel, d.h. es kommt zu keiner Verdrehung oder Verkipfung der einzelnen Moleküle während der Transformation. Bei einer RMS-Überlagerung der Strukturen der verschiedenen Kristallzustände konnte keine signifikante Änderung der Atomkoordinaten oder relative Verschiebung von bestimmten Molekülbereichen zueinander festgestellt werden. (RMS-Abweichungen der  $C^\alpha$ -Atome: 0,34 Å; aller Atome: 0,66 Å)



**Abb. 34: Kristallpackung der verschiedenen Kristallzustände**

Stereodarstellung der Einheitszellen in den drei strukturell charakterisierten Kristallzuständen (MAD-Struktur - c-Achse = 161 Å: hellblau; erstes Streuoptimum - c-Achse = 172 Å: dunkelblau; nativ - c-Achse = 178 Å: rot). Das Stabmodell der  $C^\alpha$ -Atome ist für die acht Moleküle in der asymmetrischen Einheit für den 161 Å - Zustand (hellblau) und den 178 Å - Zustand (rot) eingezeichnet. Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.

Im Kristallaufbau der nativen Kristalle existieren hierbei relativ wenige Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den verschiedenen Molekülen (Tab. 6). Beim Übergang zum ersten Streuoptimum (c-Achse = 172 Å) nimmt die Anzahl dieser Wechselwirkungen stark zu, was zu einem stabileren Kristallaufbau und somit einer Zunahme der Streuleistung führt. Hierbei werden die im nativen Kristall vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen getrennt und es bilden sich Bindungen zwischen anderen Aminosäureseitenketten aus. Bei der weiteren Kompression des Kristallaufbaues durch Dehydratation erhöht sich die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen nicht oder nur wenig (Tab. 6). Es kommt zum direkten Kontakt einiger Bereiche der Moleküle. Dies führt zur Verschiebung der entsprechenden Aminosäuren, so daß die N-terminalen Reste Arg-10 bis Glu-13 sowie die Reste Glu-496 bis Glu-500 von Untereinheit I in der MAD-Struktur ungeordnet und somit in der Elektronendichtekarte nicht mehr sichtbar sind.

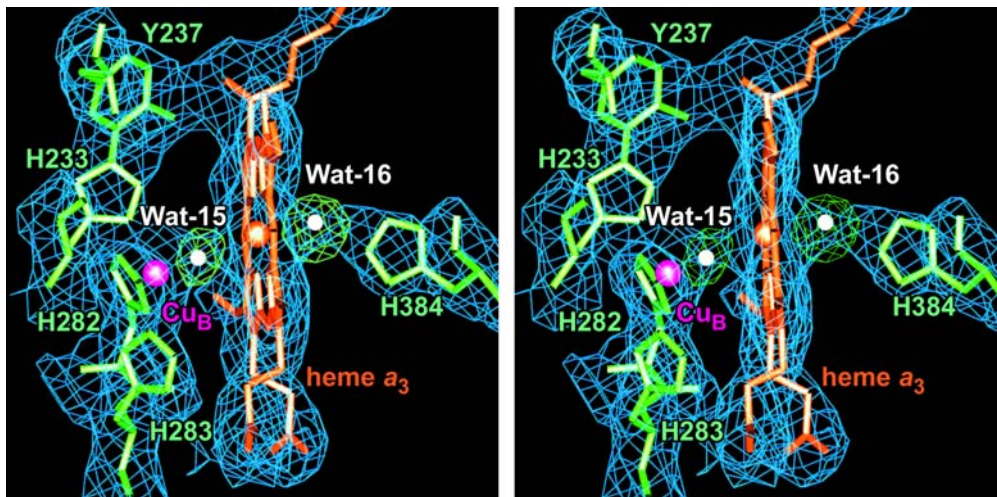
**Tab. 6: Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen im  $ba_3$ -Oxidase Kristall**

Kristallzustand:	Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen *	
	stark	Schwach
MAD-Struktur: c-Achse = 161 Å	26	12
1. Optimum: c-Achse = 172 Å	26	8
Nativ: c-Achse = 178 Å	6	4

\* Anzahl der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen, die für den Kristallaufbau verantwortlich sind. Die Bestimmung sowie die Unterteilung nach „stark“ und „schwach“ erfolgte mittels CONTACT (Collaborative Computational Project, 1994).

Bei der Betrachtung des aktiven Zentrums in der Struktur des ersten Streuoptimums (c-Achse = 172 Å) zeigte sich, daß der axiale Häm-Ligand His-384 deutlich weiter von Häm-Eisen entfernt ist als in der MAD-Struktur (Distanz vom His-384-N<sup>ε2</sup> zum Häm-Fe: 4,22 Å vs. 3,3 Å). Zwischen diesen beiden Atomen ist eine deutliche Differenzelektronendichte zu sehen, die als ein zweites Sauerstoffatom am aktiven Zentrum interpretiert werden kann (Abb. 35). Der Abstand von diesem Atom zum His-384-N<sup>ε2</sup> bzw. Häm-Fe beträgt in der verfeinerten Struktur 2,4 Å bzw. 2,1 Å. Diese Differenzelektronendichte kann aufgrund der sehr gut in der Elektronendichtekarte definierten Lage der Atome der Hauptkette von His-384 und der Transmembranhelix  $\alpha$ 10 nicht durch eine Verschiebung dieses Restes in Richtung Häm erklärt werden. Interessanterweise zeigt die Struktur der nativen Kristalle (c-Achse = 178 Å) die bereits in der MAD-Struktur (c-Achse = 161 Å) beobachtete Koordination des Häm  $a_3$  Eisens.





**Abb. 35: Aktives Zentrum im 172 Å - Kristallzustand**

Stereodarstellung des binuklearen Häm  $a_3$  /  $Cu_B$  Zentrums einschließlich der  $2F_{obs}-F_{calc}$  Elektronendichtekarte (blau: konturiert bei  $1,0 \sigma$ ) des verfeinerten Modells. Das Häm ist in orange und die Histidin-Liganden sowie das zum His-233 kovalent gebundene Tyr-237 sind in grün als Stabmodelle dargestellt. Die  $F_{obs}-F_{calc}$  Elektronendichtekarten für den Brückenliganden zwischen dem Häm-Eisen und dem  $Cu_B$ -Atom (Wat-15) sowie für ein weiteres Sauerstoffatom (Wat-16) zwischen dem Häm-Eisen und dem axialen Häm-Liganden His-384 sind in grün dargestellt und bei  $5,0 \sigma$  konturiert. Diese Abbildung wurde in MAIN (Turk, 1992) erstellt.

### 4.3 Diskussion

#### 4.3.1 Kristalltransformation und Kryokristallographie

Die Existenz verschiedener Kristallzustände oder Kristallformen, die sich durch Dehydratisierung, Änderungen im pH-Wert, Überführung in einen Puffer von höherer PEG-Konzentration oder einer Kombination dieser Variationen in einander überführen lassen, ist für verschiedene Systeme beschrieben. Diese Transformationen führen entweder zu einer Symmetrieänderung des Kristalls (Huxley & Kendrew, 1953; Salunke *et al.*, 1985; Weiss & Hilgenfeld, 1999), zu einer höheren Ordnung und damit zu einer gesteigerten Streuleistung (Schick & Journack, 1994; Stammer *et al.*, 1994; Kawashima *et al.*, 1996; Esnouf *et al.*, 1998), einer geringeren Strahlenschädigung der Kristalle (Zhang & Eisenberg, 1994) oder einer Kombination dieser Effekte (Cramer & Müller, 1997). Die meisten Beispiele lassen sich auf eine Veränderung des Solvensgehaltes im Kristall und damit auf einen primären Dehydratisierungseffekt zurückführen. Für eine detailliertere Diskussion des Transformationsverhaltens von Proteinkristallen siehe Kiefersauer (1998).

Bereits die hohe Variabilität der Zellabmessungen im nativen Zustand der  $ba_3$ -Oxidase Kristalle (siehe 4.2.2) ließ nur relativ geringe Kristallpackungskräfte erwarten. Die

Verwendung von Öl als Diffusionsbarriere für das Kristallwasser stellt eine technisch einfach zu realisierende Methode zur Untersuchung von Kristalltransformationen dar, über die das entsprechende Verhalten der  $ba_3$ -Oxidase Kristalle ursprünglich entdeckt wurde. Obwohl sich die Transformationsgeschwindigkeit in gewissen Grenzen über die Dicke und chemische Zusammensetzung der Ölschicht beeinflussen läßt, ist die gezielte Transformation von Kristallen nur schwer reproduzierbar. Dies ist vor allem auf die starke Abhängigkeit der Transformation von der Kristallumgebung sowie den Einfluß der chemischen Natur des Öls auf den Kristall zurückzuführen. Des Weiteren führt diese Methode zu einer kontinuierlichen Dehydratisierung des Kristalls, die nur durch das Frieren der Kristalle gestoppt werden kann.

Die Verwendung des unter 4.1.2.2 beschriebenen Apparates zur gezielten Feuchteregulierung des den Kristall umgebenden Luftstromes (Kiefersauer, 1998) ermöglichte eine systematische Charakterisierung des Transformationsverhaltens der Kristalle. Hierbei kann sowohl die Luftfeuchtigkeit selbst als auch die Kinetik, mit der die Dehydratisierung (bzw. Rehydratisierung) erfolgen soll, ohne den chemischen Einfluß weiterer Substanzen frei gewählt werden. Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber der Verwendung von Salzlösungen zur Einstellung der relativen Luftfeuchte (Huxley & Kendrew, 1953; Salunke, *et al.*, 1985) bzw. dem Umlegen der Kristalle in einen Puffer mit erhöhten Konzentrationen an wasserentziehenden Chemikalien (z.B. PEG: Schick & Journack, 1994; Kawashima *et al.*, 1996; Cramer & Müller, 1997; Weiss & Hilgenfeld, 1999) dar.

Das Verhalten der  $ba_3$ -Oxidase Kristalle in Abhängigkeit vom Solvensgehalt bzw. der relativen Feuchte der direkten Umgebung kann in zwei unterschiedliche Bereiche unterteilt werden (Tab. 7). Vom „nativen“ Zustand der Kristalle ( $c$ -Achse  $\geq 178$  Å) zum ersten Streuoptimum ( $c$ -Achse = 172 Å) findet ein kontinuierlicher Übergang statt, der nicht von der Kinetik der Transformation abhängig ist. Eine Reduktion der Luftfeuchtigkeit und somit des Solvensgehaltes im Kristall führt in diesem Bereich zu einer kontinuierlichen Reduktion der Zellabmessungen und einer ebenfalls kontinuierlichen Zunahme der Streuleistung. Am Ende dieses kontinuierlichen Bereiches (erstes Streuoptimum,  $c$ -Achse = 172 Å) zeigen die Kristalle die beste Streuleistung.



Tab. 7: Kristallzustände der ba<sub>3</sub>-Oxidase

Kristallzustand: c-Achse [Å]	Kristallzustand: Experimentelle Beobachtung	Relative Luftfeuchtigkeit [%] <sup>*</sup> (Differenz zum nativen Zustand)
176 – 178	Native Kristalle: Kapillarmessungen Feuchtigkeitsregelung Gleichgewicht Gradient	0,0
↑↓	••• Kontinuierlicher Übergang •••	
172	Erstes Optimum: Feuchtigkeitsregelung Gleichgewicht Gradient	1,8 – 2,0
166	Zweites Optimum: Feuchtigkeitsregelung Gradient Ölmethode	4,8 – 5,0
160	Drittes Optimum: Feuchtigkeitsregelung Gradient Ölmethode	9,0 – 11,5
158	Relatives Optimum: Feuchtigkeitsregelung Gradient	ca. 25
(155)	Gefrorener Kristall: Ölmethode	†

\* Da die absolute Kalibrierung der relativen Luftfeuchtigkeit bei Werten nahe 100 % sehr schwierig ist, sind die Luftfeuchtigkeitswerte als Differenz zur relativen Luftfeuchtigkeit des 178 Å Zustandes angegeben. Dieser Zustand wurde somit als „nativ“ definiert, und liegt bei ca. 97,5 ± 1,0 % relativer Luftfeuchtigkeit.

† Wert nicht verfügbar, da diese Zellabmessung bisher nur mit der Ölmethode beobachtet wurde.

Die weitere Reduktion des Solvensgehaltes führt in Abhängigkeit von der Kinetik der Transformation entweder zu einer irreversiblen Schädigung des Kristallgitters oder dem Durchlaufen mehrerer bevorzugter Kristallzustände (Tab. 7, Abb. 21). Diese entsprechen jeweils einem relativen Optimum an Streuleistung und charakteristischen Zellkonstanten. Die Änderung der Zellabmessungen in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit ist im Rahmen der Meßgenauigkeit eine stetige und bei vergleichbaren Feuchteprofilen eindeutige Funktion der Luftfeuchtigkeit, die allerdings gewisse Hysterese-Effekte zeigt. Das Auftreten von Diskontinuitäten, wie für das Transformationsverhalten von Kristallen der HIV-1 Reversen Transkriptase (Esnouf *et al.*, 1998) beschrieben, kann für diesen Bereich jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Streuleistung der Kristalle an den bevorzugten Zuständen ist hierbei stark von der Kinetik der Transformation abhängig. Eine zu langsame Dehydratisierung der Kristalle führte zu schwächer ausgeprägten Optima

bzw. zu einer irreversiblen Kristallschädigung. Unter einer geeigneten Kinetik ist dieses Transformationsverhalten vollständig reversibel. Hierbei waren selbst Kristalle, die einer relativen Luftfeuchtigkeit von nur 30 % ausgesetzt wurden, nach Equilibrierung bei einer den nativen Kristallen entsprechenden Luftfeuchte von diesen nicht zu unterscheiden. Die Zellabmessungen von Kristallen die nach der Ölmethode oder entsprechend 4.1.2.2 gefroren wurden, entsprechen mit kleinen Variationen stets einem dieser bevorzugten Kristallzustände.

Bei Kristallen, die eine *c*-Achse von mehr als 178 Å aufweisen, nimmt die Streuleistung mit steigendem Lösungsmittelgehalt, d.h. bei entsprechend höherer Luftfeuchtigkeit, sehr schnell ab. Für die weitere Betrachtung des Transformationsverhaltens sowie für die strukturelle Charakterisierung der verschiedenen Kristallzustände werden daher die Kristalle mit einer *c*-Achse von 178 Å als „nativ“ angesehen. Die Streuleistung von nicht transformierten (d.h., frisch gewachsenen) Kristallen ist jedoch meist deutlich schlechter (siehe auch 4.2.1).

Die Aufnahme kompletter Datensätze bei drei verschiedenen Kristallzuständen ermöglichte eine strukturelle Charakterisierung der Transformation. Im Bereich der kontinuierlichen Transformation (*c*-Achse  $\geq 172$  Å) findet eine ungehinderte Annäherung der Moleküle statt, die zu einer Zunahme an intermolekularen Wechselwirkungen führt. Die Zunahme der Streuleistung läßt sich aus der erhöhten Packungsdichte, d.h. der Zunahme an innerer Ordnung im Kristall erklären. Die weitere Reduktion des Solvensgehaltes und die damit verbundene weitere Annäherung der Moleküle im Kristallgitter führt zur Kollision einiger Bereiche der Moleküle. Die Anzahl der beobachteten intermolekularen Wechselwirkungen erhöht sich für diese bei geringerem Solvensgehalt liegenden Streuoptima im Vergleich zum ersten Streuoptimum nur noch gering. Die starke Abhängigkeit der Streuleistung von der Kinetik der Transformation kann durch verschiedene strukturelle Effekte der Molekülkollisionen erklärt werden. Bei einer schnellen Dehydratisierung werden während der beschriebenen Annäherung der Moleküle relativ rasch starke Spannungen an den kollidierenden Molekülbereichen aufgebaut. Dies führt zu einer lokalen Verschiebung einzelner Aminosäuren innerhalb der Kristallpackung und erlaubt die weitere, ungehinderte Annäherung der Moleküle. Die räumlich begrenzte Abnahme der Ordnung an den kollidierenden Molekülbereichen geht aufgrund der vergrößerten Packungsdichte mit einer höheren Ordnung im verbleibenden Teil des

Kristallgitters einher. Findet die Dehydratisierung unter einem geringeren Gradienten der Feuchteänderung statt, werden die Spannungen an den kollidierenden Molekülbereichen deutlich langsamer aufgebaut. Aufgrund von Gleichgewichtseffekten, die auf einer längeren Zeitskala ablaufen, überträgt sich die Deformationsenergie auf größere Bereiche der Moleküle, was zur Zerstörung der Kristallpackung führt. Dieses Verhalten entspricht zwei verschiedenen Pfaden in der Energielandschaft der Reaktion des Kristalles auf die Dehydratisierung. Der zur Zerstörung der Kristallpackung führende Weg ist hierbei kinetisch gehemmt. Nur bei einer ausreichend schnellen Feuchteänderung kann die höhere Aktivierungsenergie überwunden werden, welche die Barriere zu den Streuoptima mit kleineren Zellabmessungen bildet.

Die Kristallsymmetrie bleibt während der Transformation unverändert. Die Notwendigkeit einer ausreichend schnellen Änderung der Kristallumgebung für eine erfolgreiche Transformation wurde bereits für die durch einen Pufferaustausch herbeigeführte Umwandlung von Kristallen der Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RuBisCo) beobachtet (Zhang & Eisenberg, 1994).

Für das erfolgreiche Frieren von Proteinkristallen ist es notwendig, die Ausbildung von kristallinem Wasser im Kristall oder im umgebenden Puffer zu verhindern (Hope, 1990; Rodgers, 1994). Dies wird in der Regel durch Verwendung von Frostschutzmitteln im den Kristall umgebenden Puffer sowie rasches Frieren („flash-cooling“) erreicht. Hierbei geht der Puffer in einen metastabilen Glaszustand über, ohne daß die Kristallordnung durch die sonst auftretende Ausdehnung der wäßrigen Phase während des Frierens zerstört wird. Im Fall der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase Kristalle erwies sich die Verwendung von wäßrigen Puffern als nicht erfolgreich. Es kam beim Frieren stets zu einem Zusammenbruch des Kristallgitters, auch wenn die Eisbildung im Puffer selbst verhindert werden konnte. Dies läßt sich aufgrund der bereits oben beschriebenen geringen Kristallpackungskräfte und des hohen Solvensgehaltes der nativen Kristalle verstehen.

Durch die Verwendung von Öl als Kryopuffer ist die Eisbildung, welche zur Zerstörung der Kristalle führen würde, nur noch im Solvensbereich der Kristalle möglich. Systematische Frierversuche mit Kristallen die sich in einem der bevorzugten Zustände befanden (siehe Tab. 7) haben gezeigt, daß die Kristallordnung der nativen Kristalle durch das Frieren immer zerstört wurde und daß die beim Schockgefrieren auftretende Unordnung im Kristallgitter um so geringer wurde, je niedriger der Solvensgehalt der

Kristalle war. Der Entzug von Kristallwasser während der Transformation führt im Kristall zur Verkleinerung der Bereiche an „bulk-solvens“ und zur Erhöhung der Konzentration an löslichen Bestandteilen des Kristallisationspuffers. Dies verlangsamt die Ausbildung von kristallinem Eis und ermöglicht bei einer ausreichend schnellen Abkühlung den gewünschten Übergang in die Glasphase. Leider konnten die Kristalle im ersten Optimum ( $c$ -Achse = 172 Å), die die beste Streuleistung zeigen, bisher noch nicht erfolgreich gefroren werden. Nach der Transformation der Kristalle auf eines der bei niedrigerer Feuchte liegenden Optima (insbesondere das dritte Optimum bei einer  $c$ -Achse von 160 Å) ist das Schockfrieren jedoch reproduzierbar möglich. Leider zeigten diese Kristalle vor dem Frieren eine um ca. 0.3 Å schlechtere Streuleistung als im ersten Optimum. Die Zellabmessungen der mit der Ölmethode transformierten und anschließend gefrorenen Kristalle entsprachen ebenfalls mit geringen Variationen stets einem der niedriger liegenden Streuoptima. In jedem Fall führte das Schockfrieren zu einer weiteren Verkleinerung der Zellabmessungen von bis zu 3 Å im Vergleich zum ungefrorenen Kristall.

Für die Vermessung von Proteinkristallen am Synchrotron ist es von großem Vorteil, wenn diese bereits schockgefroren und in einem Standard „cryo-loop“ montiert sind. Im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen zum Transformationsverhalten der Kristalle der  $ba_3$ -Oxidase fand eine Weiterentwicklung des beim „Freemounting System“ (Kiefersauer, 1998) benutzten Kristallhalters statt. Die Kristalle werden mit Öl in einem „cryo-loop“ montiert und über einen Luftstrom geregelter Luftfeuchtigkeit gezielt transformiert. Nach dem Schockfrieren ist dieser Zustand stabil und die Kristalle können zusammen mit dem „cryo-loop“ in der gewohnten Form transportiert werden.

Die veränderte Koordination des Häm  $a_3$  im 172 Å Kristallzustand (erstes Optimum, siehe 4.2.8) ist klar in der Elektronendichtekarte belegt, jedoch ist eine befriedigende Interpretation bisher noch nicht möglich. Das zweite Wassermolekül in der Koordinationssphäre des Häm-Eisens und damit verbunden die längere Fe-His-385 Bindung wurde nur im Kristall des ersten Streuoptimums ( $c$ -Achse = 172 Å) gefunden. Da sowohl bei höherem als auch bei niedrigerem Solvensgehalt diese Strukturvariation nicht auftritt, scheiden reine Dehydratationseffekte als mögliche Erklärung aus. Hierbei ist zu beachten, daß sich die Auflösungen der drei Strukturen deutlich unterscheiden (3,2 Å, 2,8 Å und 2,4 Å). Der Brückenligand zwischen dem Häm  $a_3$  Eisen und dem  $Cu_B$ , sowie das im

172 Å Kristallzustand auftretende zusätzliche Wassermolekül zeigen vergleichbare B-Faktoren und sind in den entsprechenden Elektronendichtekarten stets sehr gut definiert. Falls dieses zusätzliche Wassermolekül auch im 178 Å Kristallzustand vorhanden wäre, sollte es somit in der entsprechenden Elektronendichtekarte sichtbar sein. Die Analyse der Entfernung zwischen dem Häm  $a_3$  Eisen und dem axialen Liganden, His-385, läßt ebenfalls auf die ausschließliche Präsenz dieses veränderten Bindungsmodus des Häm  $a_3$  im 178 Å Kristallzustand schließen. Wahrscheinlich existieren zwei verschiedene Koordinationsmöglichkeiten für das Häm  $a_3$ , wobei eine biologische Relevanz oder mechanistische Bedeutung des doppelt über Wasser koordinierten Häms, wie im 172 Å Kristallzustand beobachtet, bisher nicht festgelegt werden kann.

#### 4.3.2 Vergleich zu anderen Cytochrom-*c* Oxidasen

Trotz der geringen Homologie der Primärstrukturen (< 20 % Identität; Keightley *et al.*, 1995) sind in der  $ba_3$ -Oxidase die meisten Sekundärstrukturelemente der Untereinheiten I und II sowie die Aminosäuren, welche für die Koordination der Kofaktoren verantwortlich sind, zu den bereits bekannten Strukturen der Cytochrom-*c* Oxidasen aus *P. denitrificans* (Iwata *et al.*, 1995; Ostermeier *et al.*, 1997) und dem Rinderherz (Tsukihara *et al.*, 1995, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998) konserviert. Ein detaillierter Vergleich zeigt strikt konservierte Sequenzmotive und vergleichbare strukturelle Eigenschaften, die auf eine funktionelle Bedeutung dieser Bereiche für alle terminalen Häm-Kupfer-Oxidasen hinweisen. Weiterhin wurden klare Unterschiede gefunden, welche die besonderen Eigenschaften der  $ba_3$ -Oxidase, insbesondere ihre Aktivität bei hohen Temperaturen und geringem Sauerstoffgehalt im Medium (Keightley *et al.*, 1995; Soulimane *et al.*, 1997; Giuffrè *et al.*, 1999), erklären können.

Die Präsenz einer dreizehnten Transmembranhelix in der Untereinheit I der  $ba_3$ -Oxidase ist ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu anderen Enzymen der Oxidase-Superfamilie, die normalerweise nur 12 Transmembranhelices in dieser Untereinheit aufweisen. Diese dreizehnte Helix zeigt keine Übereinstimmung mit den 22 Transmembranhelices der Oxidase aus *P. denitrificans* oder den 28  $\alpha$ -Helices der Rinderherzoxidase. Eine genaue Funktion konnte dieser Helix bisher noch nicht zugeordnet werden.

Durch die Aufklärung der Struktur der bisher als aus zwei Untereinheiten bestehend beschriebenen  $ba_3$ -Oxidase konnte eine weitere Untereinheit IIa gefunden werden. Sie

bildet eine  $\alpha$ -Helix und ersetzt die in diesem Enzym nicht vorhandene erste Transmembranhelix der Untereinheit II. Die SoxB-Type Cytochrom-*c* und Chinol Oxidasen aus *Sulfolobus acidocaldarius* und *Natronobacterium pharaonis* bilden entsprechend ihrer Primärstruktur ebenfalls nur eine Transmembranhelix in Untereinheit II. Interessanteweise besitzen diese beiden Oxidasen auch eine weitere, kleine Untereinheit, die für diese Enzyme als SoxD bzw. Untereinheit IV bezeichnet wurde (Lübben *et al.*, 1992; Mattar & Engelhard, 1997). Die Sequenz dieser kleinen Untereinheit aus *N. pharaonis* zeigt eine Identität von 38 % im Vergleich zur Untereinheit IIa der  $ba_3$ -Oxidase. Die Präsenz der ersten Transmembranhelix von Untereinheit II, bzw. einer anderen Untereinheit, welche die räumliche Position dieser Helix einnimmt, scheint für die Funktionalität der Häm-Kupfer-Oxidasen essentiell zu sein. Eine genaue Funktion konnte auch hier bisher nicht zugeordnet werden.

#### 4.3.3 Mechanistische Betrachtungen

Trotz der bekannten strukturellen Daten (Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1995; 1996; Ostermeier *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1998) sowie vieler spektroskopischer, kinetischer und Mutagenesedaten (Kitagawa & Ogura, 1997; Gennis, 1998a; Michel, 1998a) sind die Details des katalytischen Mechanismus der Häm-Kupfer-Oxidasen bezüglich der Sauerstoffchemie, der Protonenpumpaktivität und des Elektronentransfers bisher nur unzureichend verstanden und werden kontrovers diskutiert (Gennis, 1998b; Michel, 1998b; Michel, 1999; Verkhowsky *et al.*, 1999). Der Mechanismus der Sauerstoffchemie der  $ba_3$ -Oxidase sollte dem der anderen Oxidasen sehr ähnlich sein, da sowohl die zentralen Eigenschaften des aktiven Zentrums als auch die katalysierte Reaktion identisch sind. Weiterhin sind die beiden möglichen intramolekularen Elektronentransferwege in allen drei strukturell bekannten Oxidasen konserviert (siehe auch 4.3.3.1). Im Gegensatz dazu weisen die Unterschiede in den kinetischen und spektroskopischen Charakteristika (Einarsdottir *et al.*, 1989; Surerus *et al.*, 1992; Woodruff, 1993; Soulimane *et al.*, 1997; Kannt *et al.*, 1998; Giuffre *et al.*, 1999; Siletskiy *et al.*, 1999a) und die spezifischen Bedingungen, unter denen die  $ba_3$ -Oxidase arbeitet, auf gewisse Unterschiede bezüglich der Protonenpumpaktivität, des katalytischen Verhaltens und der Bindung von Sauerstoff hin.

#### 4.3.3.1 Inter- und intramolekularer Elektronentransfer

Die Übertragung der Elektronen vom Cytochrom-*c*<sub>552</sub> zum terminalen Akzeptor, dem molekularen Sauerstoff, kann in zwei Schritte unterteilt werden. Diese bestehen aus dem intermolekularen Elektronentransfer vom Cytochrom-*c* zum primären Akzeptor, dem Cu<sub>A</sub>-Zentrum, sowie dem weiteren Transport zum aktiven Zentrum und damit zum Sauerstoff. Die am Elektronentransfer beteiligten Metallzentren sind in allen bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen konserviert. Insbesondere in Bezug auf den ersten Schritt zeigt die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase jedoch gewisse Unterschiede zu anderen Cytochrom-*c* Oxidasen.

Der erste Schritt wird als bimolekulare Reaktion durch die Ausbildung des Elektronentransferkomplexes zwischen dem löslichen Cytochrom-*c* und der periplasmatischen Domäne von Untereinheit II der Cytochrom-*c* Oxidase ermöglicht (Hill, 1991). Dieser Komplex wird im Fall der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase und ihres Substrates Cytochrom-*c*<sub>552</sub> in der Hauptsache durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert, während für die Cytochrom-*c* Oxidasen aus *P. denitrificans* und dem Rinderherz die komplementäre Ladungsverteilung auf den wechselwirkenden Oberflächen auf einen deutlich höheren Anteil von elektrostatischen Wechselwirkungen schließen lässt. Diese strukturellen Aussagen korrelieren sehr gut mit Studien des intermolekularen Elektronentransfers in Abhängigkeit von Temperatur, Ionenstärke des Reaktionspuffers und elektrostatischer Ladung des Elektronendonors (Giuffré *et al.*, 1999). Sie erklären weiterhin die beobachtete Spezifität, mit der die *ba*<sub>3</sub>-Oxidase ihr Substrat, das Cytochrom-*c*<sub>552</sub>, im Vergleich zu anderen Cytochromen-*c* bevorzugt (Soulimane *et al.*, 1997). Für die *P. denitrificans* und Rinderherzoxidasen werden die Aminosäuren Trp-121<sup>P</sup> und Tyr-122<sup>P</sup> als mögliche Reste für diesen intermolekularen Elektronentransfer diskutiert (Witt *et al.*, 1998a), die in der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase in ihrer räumlichen Lage durch Phe-86 und Phe-88 ersetzt sind. Alternativ kann dieser Elektronentransfer aufgrund der relativ kurzen Distanz von ca. 10-15 Å zwischen den wechselwirkenden Redox-Zentren auch durch reine quantenmechanische Tunneleffekte beschrieben werden (Moser *et al.*, 1992; Page *et al.*, 1999).

Der intramolekulare Elektronentransfer vom Cu<sub>A</sub>-Zentrum zum aktiven Zentrum der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase scheint im Vergleich zu den Cytochrom-*c* Oxidasen aus *P. denitrificans* und dem Rinderherz strikt konserviert zu sein. Die Aminosäuren, die den über Häm *b* und Häm *a*<sub>3</sub> führenden, klassischen Elektronentransferweg zum aktiven Zentrum beschreiben (Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996), sind in der *ba*<sub>3</sub>-Oxidase konserviert. Aufgrund

des Abstandes zwischen den beteiligten Redox-Zentren kann im Rahmen der Diskussion von Page *et al.* (1999) jedoch auch hier ein auf quantenmechanische Tunneleffekte beruhender Mechanismus beschrieben werden.

Die aktuellen Vorstellungen bezüglich des Reaktionsmechanismus am aktiven Zentrum der Cytochrom-*c* Oxidasen (Babcock & Wikström, 1992; Hill, 1994; Michel, 1998b) erfordern, daß mindestens eines der für die Sauerstoffreduktion benötigten Elektronen vom  $Cu_B$ -Atom auf den terminalen Elektronenakzeptor  $O_2$  übertragen wird. Der im Rahmen der Struktur der  $ba_3$ -Oxidase identifizierte zweite Elektronentransferweg, der vom  $Cu_A$ -Zentrum direkt zum  $Cu_B$ -Atom des aktiven Zentrums führt und auch in den anderen strukturell charakterisierten Cytochrom-*c* Oxidasen konserviert ist, könnte die entsprechende Versorgung des  $Cu_B$ -Atoms mit Elektronen übernehmen. Aufgrund des relativ langen Abstandes zwischen dem  $Cu_A$ -Zentrum und dem  $Cu_B$ -Atom von 21,6 Å ist eine Beschreibung aufgrund von reinen quantenmechanischen Tunneleffekten hier jedoch nicht möglich (Page *et al.*, 1999). Zur funktionellen Bestätigung dieses Elektronentransferweges sind weitere experimentelle Daten notwendig.

#### 4.3.3.2 Aktives Zentrum und Sauerstoffchemie

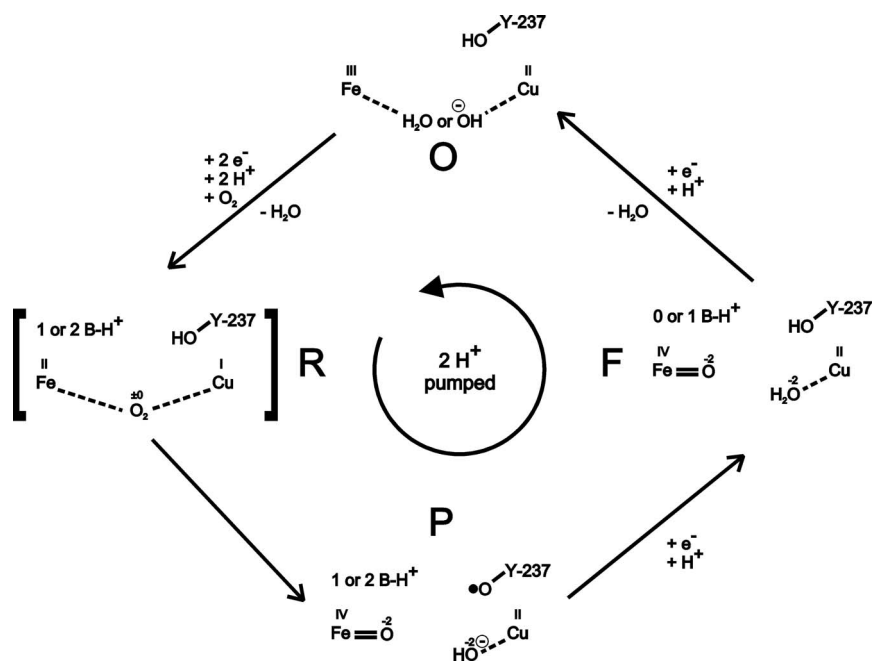
Die korrekte Beschreibung des Brückenliganden zwischen den beiden Metallen des aktiven Zentrums im oxidierten Zustand der Häm-Kupfer-Oxidasen ist für die Aufklärung des Mechanismus dieser Enzyme von großer Bedeutung (Michel, 1998b). In der Kristallstruktur des „resting state“ der Rinderherzoxidase wurde dieser Ligand als Peroxo-Spezies ( $O-O^{2-}$ ) beschrieben (Yoshikawa *et al.*, 1998), während für die Struktur der Cytochrom-*c* Oxidase aus *P. denitrificans* die Präsenz von zwei Liganden, einem Wassermolekül am Häm  $a_3$  Eisen und einem über eine Wasserstoffbrücke gebundenen Hydroxidion am  $Cu_B$ , bevorzugt wurde (Ostermeier *et al.*, 1997). Diese beiden Modelle wurden für die Struktur der  $ba_3$ -Oxidase untersucht. Sie führten jedoch zu einer deutlich schlechteren Übereinstimmung mit der beobachteten Elektronendichteverteilung und ergaben während der Verfeinerung sehr hohe B-Faktoren für das zweite Sauerstoffatom (33,4 Å<sup>2</sup> für das hier beschriebene  $Cu_B$ -OX-Fe Modell; 34,6 Å<sup>2</sup> und 51,3 Å<sup>2</sup> für das  $Cu_B$ -O-O-Fe Modell; 31,7 Å<sup>2</sup> und 58,1 Å<sup>2</sup> für das  $H_2O / OH^-$  Modell). Kürzlich publizierte elektrochemisch induzierte UV/VIS Differenzspektren (Hellwig *et al.*, 1999) zeigen weiterhin, daß im oxidierten Zustand der  $ba_3$ -Oxidase die Präsenz eines Peroxy-Liganden unwahrscheinlich ist. Für die Etablierung eines Reaktionsmechanismus der  $ba_3$ -Oxidase



kann man somit davon ausgehen, daß in deren oxidiertem Zustand der Brückeligand am aktiven Zentrum durch eine Spezies gebildet wird, die aus einem Sauerstoffatom besteht. Aufgrund der Abstände zu den beiden Metallen von ca. 2,3 Å scheint weiterhin die Präsenz eines koordinativ gebundenen Wassermoleküls oder Hydroxidions wahrscheinlicher als eine kovalent gebundene  $\mu$ -Oxo-Spezies.

Der im folgende vorgeschlagene Reaktionsmechanismus (Abb. 36) basiert auf dem aktuellen Verständnis des katalytischen Zyklus der Häm-Kupfer-Oxidasen (Babcock & Wikström, 1992; Kitagawa & Ogura, 1997; Ostermeier *et al.*, 1997; Gennis, 1998c; Michel, 1998b; Yoshikawa *et al.*, 1998) und berücksichtigt die strukturellen und kinetischen Unterschiede, welche für die  $ba_3$ -Oxidase beobachtet wurden. Dementsprechend ist der oxidierte Zustand der  $ba_3$ -Oxidase (O) durch die Präsenz von nur einem Wassermolekül oder Hydroxidion zwischen den beiden Metallen am aktiven Zentrum charakterisiert. Eine zwei Elektronen Reduktion, die zur Aufnahme von zwei Protonen von der cytoplasmatischen Seite der Membran gekoppelt ist, bereitet das aktive Zentrum zum Binden von Sauerstoff vor. Die im oxidierten Zustand gebundene Sauerstoffspezies wird in diesem Schritt als Wasser abgespalten, was im reduzierten, Sauerstoff gebundenen Zustand des Enzyms resultiert (R oder A). In Abhängigkeit von der Natur des Brückenliganden im oxidierten Zustand des Enzyms (O) werden ein oder zwei Protonen in der Nähe des aktiven Zentrums gebunden (B-H). Der weitere Reaktionsverlauf ist sehr schnell, da dieser Zustand des Enzyms für keine der Oxidasen bisher beobachtet wurde und er unter Umständen auch kein wirkliches Intermediat darstellt. Von jedem der beiden Metalle im aktiven Zentrum wird ein Elektron auf den Sauerstoff übertragen, was zum Peroxid Redoxzustand des Sauerstoffs ( $O_2^{2-}$ ) führt. Dieser Schritt wird durch den Transfer von einem Wasserstoffatom des Tyr-237 und den Bruch der O-O Bindung über eine Radikalreaktion vervollständigt (Gennis, 1998a; Buse *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; MacMillan *et al.*, 1999). Der resultierende Zustand des Enzyms (P) ist durch die Radikalform des Tyr-237 charakterisiert, welche durch den aromatischen Charakter dieser Aminosäureseitenkette und die kovalente Bindung zum His-233 stabilisiert wird. Durch den Transfer eines Elektrons vom Häm  $a_3$  Eisen zum zweiten Sauerstoffatom befindet sich dieses Metall im Ferryl-Oxidationszustand ( $Fe^{IV}$ ). Das primär gebildete Hydroxidion am  $Cu_B$  kann unter Bildung von Wasser mit einem Proton reagieren. Der weitere Verlauf der Reaktion beinhaltet die Reduktion des Systems durch ein Elektron, gekoppelt zur Aufnahme eines weiteren Protons vom Cytoplasma, wodurch das Tyr-237 wieder

hergestellt wird. Es entsteht die wahre Ferryl-Form des Enzyms (F). Ein oder kein Proton sind in Abhängigkeit von der Natur des Brückenliganden im oxidierten Zustand der  $ba_3$ -Oxidase (O) jetzt in der Nähe des aktiven Zentrums gebunden. Reduktion durch das vierte Elektron und die Aufnahme eines weiteren Protons führt zur Konversion von  $Fe^{IV}$  zu  $Fe^{III}$  und der Freisetzung des zweiten Wassermoleküls, entsprechend der Bildung des oxidierten Zustandes des Enzyms (O). Aufgrund der limitierten spektroskopischen Daten für die  $ba_3$ -Oxidase, kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieses zweite Wasser bereits während des P→F Überganges freigesetzt wird.



**Abb. 36: Mechanismus der Sauerstoffchemie in der  $ba_3$ -Oxidase**

Schematische Darstellung des vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus am aktiven Zentrum der  $ba_3$ -Oxidase basierend auf dem aktuellen Verständnis der Sauerstoffchemie in den Häm-Kupfer-Oxidase und den spezifischen Eigenschaften der  $ba_3$ -Oxidase. Für eine nähere Erklärung siehe Text.

Dieser Gesamtprozeß ist mit dem Pumpen von zwei Protonen gekoppelt (Kannt *et al.*, 1998), was durch die Aufnahme von zwei weiteren Protonen von der cytoplasmatischen Seite der Membran und deren Freisetzung auf der periplasmatischen Seite realisiert wird. Wenn diese beiden Prozesse nicht zur selben Zeit stattfinden, werden weitere Protonen in der Nähe des aktiven Zentrums gebunden.

#### 4.3.3.3 „Wasserpool“

Wie bereits unter 4.2.7 beschrieben ist die als „Wasserpool“ bezeichnete Ansammlung von mehreren Wassermolekülen in einer Kavität oberhalb der Häm Propionate in allen bisher strukturell bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen konserviert. Diese Ansammlung von Wassermolekülen wurde ebenfalls für die Struktur der *P. denitrificans* Cytochrom-*c* Oxidase beschrieben und eine mögliche Funktion als Teil des/der „proton exit channel(s)“ wurde zusammen mit Mutagenesedaten diskutiert (Ostermeier *et al.*, 1997; Puustinen & Wikström, 1999). In Anbetracht dieser Mutagenesedaten, der Lage dieses „Wasserpools“ in direkter Verbindung zu den Häm-Propionaten und der Präsenz von ausgeprägten Kanälen, die ihn mit dem periplasmatischen „bulk-solvens“ verbinden, scheint eine mögliche Funktion als primärer Akzeptor sowohl von gepumpten Protonen als auch von Wassermolekülen, die am aktiven Zentrum gebildet werden, sinnvoll. Neben diesen Kanälen, die auch in den anderen strukturell bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen an ähnlichen oder alternativen Positionen im Molekül existieren, deutet auch der generell stärker ausgeprägte hydrophile Charakter der periplasmatischen Domäne von Untereinheit II auf ein schnelles Gleichgewicht mit dem periplasmatischen „bulk-solvens“ hin.

In diesem Zusammenhang ist der Vergleich der Geschwindigkeit eines solchen Gleichgewichtes mit der katalytischen Aktivität der Cytochrom-*c* Oxidasen interessant, was unter Annahme von Diffusionsprozessen für den Austausch von Wasser in erster Näherung berechnet werden kann. Das geometrische Mittel der Strecke  $x$ , die Teilchen aufgrund von Diffusion in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  zurücklegen, läßt sich entsprechend Gleichung (19) berechnen:

$$x(t) = 2\sqrt{\frac{D_S t}{\pi}} \quad (19)$$

Für den Diffusionskoeffizient von Wasser durch eine Proteinmatrix sind leider nur wenige Arbeiten in der Literatur verfügbar. Wright *et al.* (1992) haben ihn unter Verwendung von Fluoreszenzquenching-Experimenten zu  $D_S = 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Sofern dieser Wert in der richtigen Größenordnung liegt, ergibt sich bei einer mittleren Wegstrecke von  $x = 25 \text{ \AA}$  (der Abstand vom „Wasserpool“ zum periplasmatischen „bulk-solvens“ variiert zwischen 15 und 25  $\text{\AA}$ ) die mittlere Zeit für die Diffusion eines Wassermoleküls über diese Strecke zu  $t = 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}$ . Entsprechend kann ein solcher Diffusionsprozeß in der Größenordnung von

$2 \cdot 10^3$  pro Sekunde stattfinden. Dieser Prozeß ist somit deutlich schneller, als die kinetische Konstante („turnover-number“) der Cytochrom-*c* Oxidasen (für die  $ba_3$ -Oxidase beträgt  $k_{\max} = 250 \text{ s}^{-1}$ ; Soulimane *et al.*, 1997) und die biologisch relevante „turnover-number“, welche in der Größenordnung von nur  $20 \text{ s}^{-1}$  liegt (Ferguson-Miller *et al.*, 1976). Die Präsenz der oben angesprochenen Kanäle, die den „Wasserpool“ mit dem periplasmatischen „bulk-solvens“ verbinden, führt zu einem noch schnelleren Austausch zwischen „Wasserpool“ und „bulk-solvens“. Unter diesen Annahmen kann somit für den Austausch von Wassermolekülen mit Sicherheit und für den Austausch von Protonen mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem schnellen Gleichgewicht zwischen dem „Wasserpool“ und dem periplasmatischen „bulk-solvens“ ausgegangen werden kann.

Die Präsenz eines solchen schnellen Gleichgewichtes hat entscheidende Auswirkungen auf die Interpretation von zeitaufgelösten Transmembranpotentialmessungen. Aufgrund des schnellen Austausches befindet sich der „Wasserpool“ auf dem gleichen Potential wie das periplasmatische „bulk-solvens“. Da seine Position innerhalb der Cytochrom-*c* Oxidasen unterhalb der Grenzfläche zwischen Membran und „bulk-solvens“ liegt, ist die periplasmatische Grenze des Transmembran-Dielektrikums, welches die wäßrigen Phasen auf beiden Seiten der Membran trennt, somit von der periplasmatischen Grenzfläche der Membran in Richtung Cytoplasma verschoben. Somit ändert sich auch die Position der Metallzentren von Untereinheit I in Relation zum Transmembran-Dielektrikum. Ladungsverschiebungen, die nur einen Teil des Dielektrikums durchqueren, führen zu einer meßbaren Änderung des Transmembranpotentials, welche dem Verhältnis von durchquerter Strecke zu Dicke des Dielektrikums proportional ist. Somit ist die Lage der Metallzentren von Untereinheit I innerhalb des Transmembrandielektrikums von großer Bedeutung für die Zuordnung der einzelnen Elektronen- und Protonentransferschritte im katalytischen Zyklus zu den beobachteten Änderungen des Transmembranpotentials (Hinkle & Mitchell, 1970; Wikström, 1989; Babcock & Wikström, 1992; Gennis, 1998c; Michel, 1998b).

#### 4.3.3.4 Protonenkanäle

Die Struktur der  $ba_3$ -Oxiase weist die unter 3.2.5 beschriebenen drei Protonenkanäle (K-, D- und Q-Protonenkanal) auf, die gewisse funktionelle Unterschiede zu den Protonenkanälen in anderen Häm-Kupfer-Oxidasen erwarten lassen. Bisher sind keine Mutagenese Studien für die  $ba_3$ -Oxidase beschrieben, so daß die folgenden Aussagen

ausschließlich auf der vorhandenen Analogie zu anderen Häm-Kupfer-Oxidase und der Struktur dieses Enzyms basieren.

Der K-Protonenkanal ist entsprechend der Struktur der  $ba_3$ -Oxidase in seiner räumlichen Lage im Molekül trotz der geringen Konservierung in der Primärstruktur komplett erhalten, so daß eine unveränderte Aktivität erwartet werden kann. Die besondere Bedeutung von Glu-15 (Untereinheit II), die aufgrund der strikten Konservierung zu erwarten ist, konnte kürzlich von Ma *et al.*, (1999) durch Mutagenese-Studien bestätigt werden.

Der D-Protonenkanal zeigt deutliche Unterschiede zu anderen Häm-Kupfer-Oxidase. Während der cytoplasmatische Teil dieses Kanals trotz der noch geringeren Konservierung der Primärstruktur in seiner räumlichen Lage im Molekül erhalten ist, ist in der Nähe des aktiven Zentrums das sonst essentielle Glu-278<sup>P</sup> durch ein hydrophobes Ile-235 ersetzt. Die Struktur der  $ba_3$ -Oxidase zeigt auch keine andere Aminosäure, die den strukturell konservierten Teil des D-Protonenkanals mit dem aktiven Zentrum an Stelle von Glu-278<sup>P</sup> direkt verbinden könnte. Da die  $ba_3$ -Oxidase trotz der Präsenz von Ile-235 Protonenpumpaktivität zeigt (Kannt *et al.*, 1998) und die Präsenz des Glu-278<sup>P</sup> bei anderen Oxidase für diese Aktivität essentiell ist (Adelroth *et al.*, 1997; Konstantinov *et al.*, 1997; Verkhovskaya *et al.*, 1997; Gennis, 1998a; Vygodina *et al.*, 1998; Jünemann *et al.*, 1999), stellt sich die Frage des weiteren Weges der Protonen, die vom cytoplasmatischen Teil des D-Protonenkanals kommen. Die Struktur der  $ba_3$ -Oxidase zeigt drei mögliche Wege auf, von denen zwei zum aktiven Zentrum führen und der dritte eine Verbindung zum weiter unten diskutierten, dritten Protonenkanal (Q-Protonenkanal) beinhaltet (siehe 4.2.6). Mutagenesestudien verbunden mit Untersuchungen bezüglich der Kinetik und Protonenpumpaktivität der  $ba_3$ -Oxidase könnten in Zukunft helfen, um zwischen diesen Möglichkeiten zu entscheiden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß der D-Protonenkanal im Verhältnis zu typischen Vertretern der Familie der Häm-Kupfer-Oxidase eine reduzierte Aktivität aufweist, die für die verringerte Protonenpumpaktivität der  $ba_3$ -Oxidase verantwortlich sein könnte.

Der Q-Protonenkanal wird in den anderen strukturell beschriebenen Cytochrom-*c* Oxidase nicht gefunden. Die Präsenz eines so ausgeprägten Netzwerks von hydrophilen Aminosäureseitenketten im sonst typisch hydrophoben Inneren der Untereinheit I läßt eine funktionelle Bedeutung als wahrscheinlich erscheinen. Der Q-Protonenkanal könnte

entweder unabhängig Protonen von der cytoplasmatischen Seite der Membran zum „Wasserpool“ transportieren und/oder über Thr-81 und Thr-394 Protonen vom D-Protonenkanal übernehmen und in deren weiteren Transport zum „Wasserpool“ involviert sein. Auch hier würden Mutagenese-Studien zur Klärung beitragen können. Interessanterweise beinhaltet der Q-Protonenkanal den axialen Häm  $a_3$  Liganden His-384, der im Vergleich zu den anderen strukturell bekannten Cytochrom-*c* Oxidasen einen längeren Koordinationsabstand zum Häm-Eisen aufweist und dessen Koordination im 172 Å Kristallzustand über ein Wassermolekül vermittelt wird. Man könnte postulieren, daß dieses His-384 in Verbindung mit dem katalytischen Zyklus dieses Enzyms konformationelle Änderungen erfährt und daß es somit eine aktive Rolle zum Pumpen von Protonen einnimmt. Die verringerte Protonenpumpaktivität (Kannt *et al.*, 1998) der  $ba_3$ -Oxidase ließe sich dann entweder mit den veränderten Koordinationscharakteristika des Häm  $a_3$  oder einem komplett verschiedenen Pumpmechanismus, der dieses His-384 und nicht Glu-278<sup>P</sup> beinhaltet, in Verbindung bringen. In Hinblick auf die wiederholt beobachtete hohe Konservierung von „essentiellen“ Strukturelementen zwischen den verschiedenen Häm-Kupfer-Oxidasen scheint ein einheitlicher Mechanismus zur energetischen Kopplung von Sauerstoffchemie und Protonenpumpaktivität jedoch wahrscheinlicher (siehe 4.3.3.5).

#### 4.3.3.5 Kopplung von Sauerstoffchemie und Protonenpumpaktivität

Die oben diskutierten Veränderungen an den Protonenkanälen, insbesondere die wahrscheinlich verringerte Aktivität des D-Protonenkanals (siehe 4.3.3.4), lassen sich gut mit der verringerten Protonenpumpaktivität der  $ba_3$ -Oxidase (Kannt *et al.* 1998) in Einklang bringen, wenn ein Protonenpumpmechanismus angenommen wird, der auf den Prinzipien von elektrostatischer Abstoßung und Ladungskompensation basiert (siehe z.B. Mitchell & Rich, 1994; Rich, 1995; Michel, 1998b). Eine verringerte Effizienz der Protonenaufnahme durch den D-Protonenkanal würde zu einer geringeren elektrostatischen Abstoßung am oder in der Nähe des aktiven Zentrums und somit zu einer verringerten Protonenpumpaktivität führen. Im Gegensatz dazu erscheinen Mechanismen, bei denen der primäre Schritt der Protonenpumpaktivität fest mit den Redoxzuständen an einem der Redoxzentren gekoppelt ist so daß jedes Elektron, das dieses Zentrum passiert, zum Pumpen von einem Proton führen muß, weniger wahrscheinlich. Ein solcher Mechanismus würde stets zum Pumpen von vier Protonen pro reduziertem

Sauerstoffmolekül führen, wie es für die nativen Cytochrom-*c* Oxidasen aus *P. denitrificans* oder dem Rinderherz beobachtet wird (Wikström, 1977; 1989). Die oben genannten Argumente würden ebenfalls viele Mutagenese-Studien bezüglich verschiedener Aminosäuren der Protonenkanäle in anderen Cytochrom-*c* Oxidasen (Gennis, 1998a) erklären. Es kann im Moment jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß verschiedene intramolekulare Elektronentransferwege existieren, die in den verschiedenen Oxidasen bzw. Mutanten in unterschiedlichen Verhältnissen benutzt werden und somit eine alternative Erklärung der unterschiedlichen Protonenpumpaktivitäten darstellen könnten.

#### 4.3.3.6 Sauerstoffkanal

Die Funktion des unter 4.2.6 beschriebenen, deutlich ausgeprägten, hydrophoben Kanals ist in der Zuführung von Substrat-Sauerstoff zum aktiven Zentrum der  $ba_3$ -Oxidase zu sehen. Er ermöglicht die relativ ungehinderte Diffusion der hydrophoben Sauerstoffmoleküle von der Mitte der Membran, wo im Vergleich zu den wäßrigen Bereichen die Sauerstoffkonzentration in der Zelle deutlich höher ist (Windrem & Plachy, 1980), zum aktiven Zentrum. Ein hydrophober Kanal von deutlich geringerem Ausmaß wurde bereits für die Struktur der *P. denitrificans* Cytochrom-*c* Oxidase gefunden und als Sauerstoffkanal diskutiert (Riistama *et al.*, 1996). Interessanterweise ist Ile-235 Bestandteil der hydrophoben Auskleidung dieses Kanals. Der Austausch des bei anderen Cytochrom-*c* Oxidasen für die Protonenpumpaktivität notwendigen Glu-278<sup>P</sup> zu dieser hydrophoben Aminosäure führt somit zu Optimierung dieses hydrophoben Kanals. Da die  $ba_3$ -Oxidase nur unter limitierter Sauerstoffkonzentration im Medium exprimiert wird und unter erhöhten Temperaturen verbunden mit einer geringeren Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser arbeitet, scheint die evolutionäre Ausbildung eines optimierten Sauerstoffkanals sinnvoll. Diese Argumentation wird durch den Austausch des Glu-278<sup>P</sup> zu einem hydrophoben Valin in den Primärstrukturen der archaebakteriellen *Sulfolobus acidocaldarius*  $aa_3$  Chinol und *Natronobacterium pharaonis*  $ba_3$  Cytochrom-*c* Oxidasen erhärtet. Beide Organismen wachsen ebenfalls bei erhöhten Temperaturen und unter geringen Sauerstoffkonzentrationen (Lübben *et al.*, 1992; Mattar & Engelhard, 1997). Der Austausch von Glu-278<sup>P</sup> durch das hydrophobe Ile-235 oder ein Valin führt zum Verlust eines zentralen Restes im D-Protonenkanal und kann für die im Fall der  $ba_3$ -Oxidase beobachtete verringerte Protonenpumpaktivität verantwortlich sein. Die Ausbildung eines

optimierten, hydrophob ausgekleideten Sauerstoffkanals und damit die Zuführung von ausreichenden Mengen an Sauerstoff zum aktiven Zentrum, scheint für die Funktionalität dieses Enzyms unter geringen Sauerstoffkonzentrationen wichtiger zu sein, als die Protonenpumpaktivität.

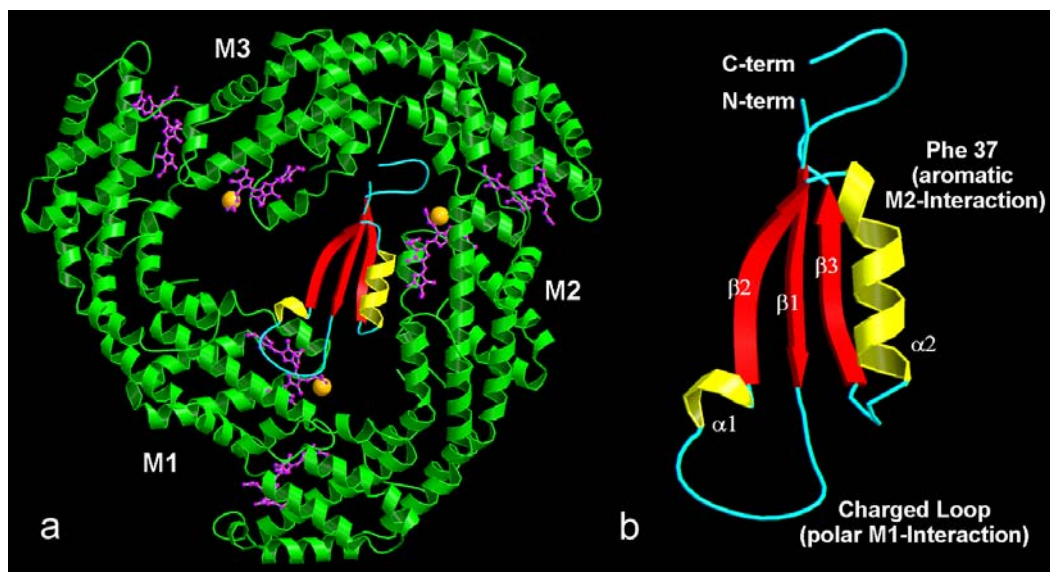


## 5 Der AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup> Komplex aus *Mastigocladus laminosus*

Phycobilisomen sind die Lichtsammlerkomplexe der Cyanobakterien und Rhodophyceen. Diese hochmolekularen Proteinkomplexe sind an der Außenseite der Thylakoidmembran lokalisiert und mit den in Reihen angeordneten membranintegralen Photosystem II Partikeln verankert. Sie bestehen aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen, einem zentralen „allophycocyanin-core“ und mehreren, darum strahlenförmig angeordneten „rods“. Die Phycobilisomen sind aus verschiedenen Phycobiliproteinen aufgebaut, die aus Chromophoren tragenden Heterodimeren ( $[\alpha\beta]$ ) bestehen, welche sich zu „Trimeren“ ( $[\alpha\beta]_3$ ) zusammenlagern. Ein solches „Trimer“ kann als Scheibe mit einem Durchmesser von ca. 110 - 120 Å und einer Höhe von ca. 25 - 35 Å beschrieben werden. Die verschiedenen „Trimeren“ werden über sogenannte Linkerpolypeptide miteinander verbunden, von denen die meisten keine Chromophoren enthalten (Glazer 1985; Reuter & Müller, 1993; Sidler, 1994; McColl, 1998). Je nach Spezies können die „rods“ entweder nur aus Phycocyanin oder aus Phycocyanin und Phycoerythrin bzw. Phycoerythrocyanin bestehen. Der bi- oder trizylindrische „core“ ist aus einem zentralen, hochmolekularen Komplex (AP<sub>CM</sub>) und daran seitlich angelagerten, trimeren Allophycocyanin B (APB) und Allophycocyanin AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup> Scheibchen aufgebaut. Das AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup> besteht aus drei identischen Allophycocyanin-Heterodimeren, die sich zu einem „Trimer“ zusammenlagern und das kleine Linkerpolypeptid L<sub>C</sub><sup>7,8</sup> (auch als L<sub>C</sub><sup>10</sup> oder L<sub>C</sub><sup>8,9</sup> bezeichnet) binden (Lundell & Glazer, 1983a,b,c; Reuter & Müller, 1993; Reuter & Nickel-Reuter, 1993). Die bisher beschriebenen Kristallstrukturen der wichtigsten Phycobiliproteinklassen Allophycocyanin (Brejc *et al.*, 1995), Phycocyanin (Schirmer *et al.*, 1985, 1986, 1987, Duerring *et al.*, 1991), Phycoerythrocyanin (Duerring *et al.*, 1990) und Phycoerythrin (Ficner *et al.*, 1992; Ficner & Huber, 1993; Chang *et al.*, 1996) wurden entweder ohne die funktionell wichtigen Linkerpolypeptide kristallisiert oder es konnte aufgrund von partieller Unordnung in den Kristallen nur die generelle Lage des Linkerpolypeptides aufgelöst werden (Ficner & Huber, 1993). Die Phycobiliproteine mit oder ohne Linkerpolypeptide kristallisierten vorwiegend in trigonalen oder hexagonalen Raumgruppen, wobei die „Trimeren“ auf dreizähligen, kristallographischen Symmetrieachsen lokalisiert waren. Aufgrund der dadurch erzwungenen absoluten, dreizähligen Symmetrie der

Elektronendichteverteilung führt dies zu einer statistischen Unordnung im Kristall. Daher waren die Linkerpolypeptide selbst und auch die durch diese Peptide hervorgerufenen, strukturellen Änderungen innerhalb des „Trimers“ nicht sichtbar. Durch die Kristallisation von AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup> in einer orthorhombischen Raumgruppe war eine strukturelle Analyse des Phycobiliproteins, des Linkerpolypeptides und der Auswirkungen der Linker-Biliprotein-Assoziation auf die „Trimer“-Struktur möglich.

Die Struktur des Allophycocyanin-Linker-Komplexes, AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup>, ist in Abb. 37 dargestellt. Die einheitliche Orientierung der „Trimeren“ im Kristallgitter konnte durch eine Realraumsuche nach alternativen Linker-Orientierungen nachgewiesen werden. Das Linkerpolypeptid hebt die im linkerfreien Allophycocyanin vorhandene dreizählige Symmetrie auf, indem es selbst keine solche Symmetrie besitzt und zu den drei „Monomeren“ unterschiedliche Kontakte ausbildet.



**Abb. 37: Ribbon-Darstellung des Allophycocyanin-Linker-Komplexes, AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup>**

Die Struktur des gesamten AP•L<sub>C</sub><sup>7,8</sup>-Komplexes ist in Teilfigur a dargestellt. Sie besteht aus den drei Allophycocyanin-Heterodimeren (M1-M3, grün), die pro Untereinheit einen Phycocyanobilin-Chromophoren (violett-graue Stabmodelle) binden. Die Methylierung von Asn-19 der  $\beta$ -Untereinheit ist in allen drei Heterodimeren vorhanden und als oranger Ball dargestellt. Das Linkerpolypeptid (Sekundärstrukturelemente in gelb, blau und rot) hebt die dreizählige Symmetrie des „Trimers“ auf. Der  $\beta$ -Chromophor von Heterodimer M1 wird durch den geladenen „loop“ zwischen  $\beta 1$  und  $\alpha 1$  des Linkers beeinflusst, während Phe-37 des Linkers die Konformation des  $\beta$ -Chromophors von M2 verändert und der Chromophor von M3 unbeeinflusst bleibt. Teilfigur b zeigt eine vergrößerte Darstellung des Linkerpolypeptides. Diese Abbildung wurde mit MOSCRIPT (Kraulis, 1991) erstellt und mit RASTER3D (Merritt & Murphy) gerendert.

---

Im Vergleich zum linkerfreien Allophycocyanin-„Trimer“ (Brejc *et al.*, 1995) bewirkt das Linkerpolypeptid eine leichte Kontraktion des Komplexes, die durch eine Rotation der Heterodimeren hervorgerufen wird, sowie eine Abflachung der Uhrglasform des „Trimer“-Scheibchens. Die beiden „Trimeren“, die in der asymmetrischen Einheit der AP•L<sub>C</sub><sup>7.8</sup>-Kristalle gefunden werden, weisen deutliche Unterschiede auf. Während die Strukturen des Linkerpolypeptides und die der einzelnen Heterodimeren fast identisch sind, dringen die beiden Linkerpolypeptide unterschiedlich tief in die „Trimeren“ ein und verändern spezifisch die beschriebene Kontraktion und Abflachung.

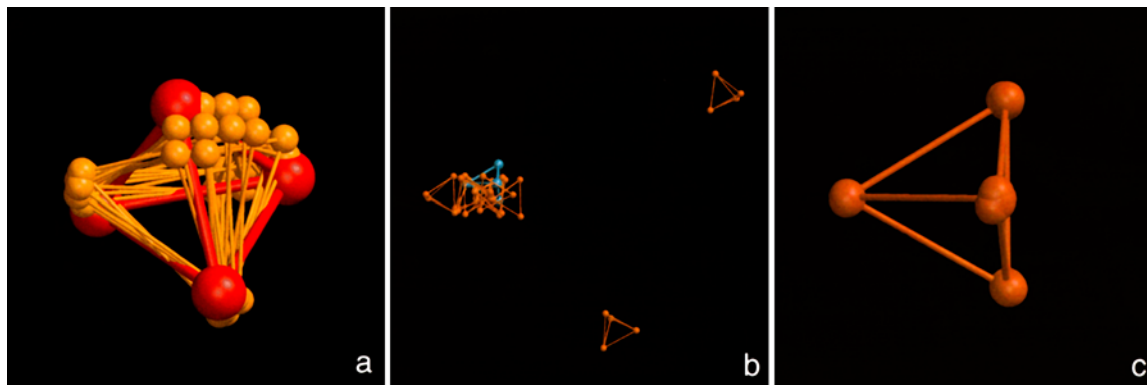
Die hohen B-Faktoren der Linkerpolypeptide sowie ihre unterschiedliche Lage in den „Trimeren“ bei sonst identischer Struktur weisen auf dynamische Fluktuationen zwischen verschiedenen energetischen Zuständen der AP•L<sub>C</sub><sup>7.8</sup>-Komplexe hin. Die Präsenz des Linkerpolypeptides differenziert die energetisch gekoppelten αβ-Chromophorenpaare in drei diskrete Spezies. Die funktionelle Bedeutung dieses Effektes wird durch die spektralen Unterschiede zwischen dem AP•L<sub>C</sub><sup>7.8</sup>-Komplex und linkerfreien Allophycocyanin-„Trimeren“ klar (Holzwarth *et al.*, 1990). Diese Asymmetrie innerhalb des nativen Allophycocyanin-Linker-Komplexes und wahrscheinlich auch innerhalb anderer Phycobiliprotein-Linker-„Trimeren“ steht klar im Gegensatz zur bisher angenommenen dreizähligen Symmetrie dieser Komplexe und ist essentiell für die Interpretation der spektralen Eigenschaften und das Verständnis des Energietransfers innerhalb der Phycobilisomen.



## 6 Phasierung der *Desulfovibrio desulfuricans* Nitrat-Reduktase

Die periplasmatische Nitrat-Reduktase (NAP) aus dem Sulfat reduzierenden Bakterium *Desulfovibrio desulfuricans* ist für das Wachstum dieses Organismus unter Verwendung von Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette verantwortlich. Dieses Enzym katalysiert die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und enthält neben einem Bis-molybdopterin-guanin-dinukleotid-Kofaktor ein [4Fe-4S]-Cluster (Bursakov *et al.*, 1995; 1997). Die Präsenz von vier Eisenatomen in dem 723 Aminosäuren enthaltenden Protein sollte die Phasierung mittels MAD (siehe 2.5.2) ermöglichen. Es wurden komplette MAD-Diffraktionsdaten von guter Qualität bis zu einer Auflösung von 2,27 Å bei drei verschiedenen Wellenlängen (entsprechend dem  $f''$ -Maximum, dem  $f'$ -Minimum und einem „Remote Point“) aufgenommen. Diese Daten zeigten starke anomale und dispersive Differenzen, die zu einer klaren Lösung für die Schwerpunktslage des [4Fe-4S]-Clusters in einer Differenz-Patterson-Analyse mit dem Programm RSPS (Knight, 1989) führten. Aufgrund der relativ kurzen Eisen-Eisen-Abstände im [4Fe-4S]-Cluster von ca. 2,6 Å war es jedoch nicht möglich, die Koordinaten der einzelnen Eisenatome mit Pattersonmethoden (RSPS und SHELXS, Sheldrick 1999) oder direkten Methoden (SHELXS) aufzulösen.

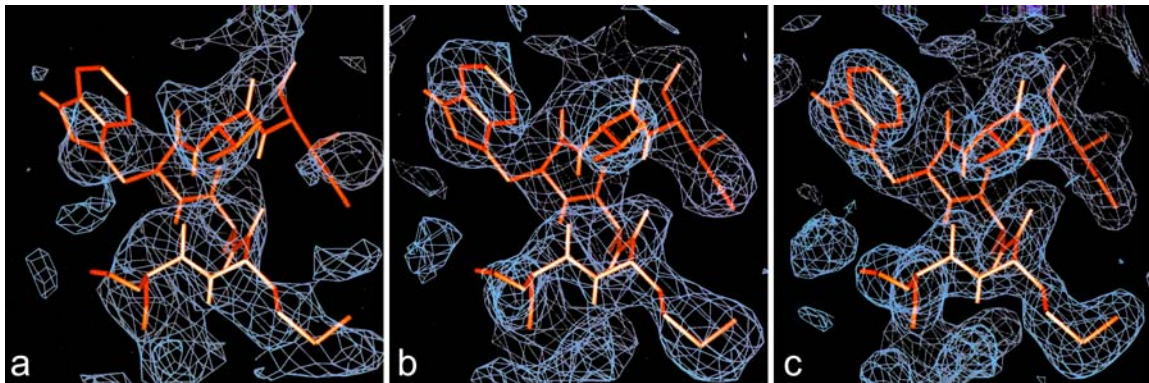
Knäblein *et al.* (1997) haben gezeigt, daß sich die Orientierung des  $\text{Ta}_6\text{Br}_{12}^{2+}$ -Clusters bei Kenntnis der Schwerpunktskoordinaten unter Verwendung der isomorphen Differenzen zwischen Derivat- und nativem Datensatz sowie der „rigid-body“-Patterson-Korrelationsverfeinerung (PC-Verfeinerung) von XPLOR (Brünger, 1992b) bestimmen läßt. Unter Verwendung eines Modellclusters (Chan *et al.*, 1995) für die Geometrie der vier Eisenatome im [4Fe-4S]-Cluster wurden entsprechende PC-Verfeinerungen mit den anomalen und dispersiven Differenzen der MAD-Datensätze der Nitrat-Reduktase berechnet. Diese resultierten in einer klaren Lösung für die Lage und Orientierung des [4Fe-4S]-Clusters wenn die PC-Verfeinerung mit den dispersiven Differenzen berechnet wurde (Abb. 38). Im Einklang mit dem stärkeren Rauschen in den anomalen Differenzen führte die PC-Verfeinerung mit diesen Daten zu keiner klaren Lösung.



**Abb. 38: Patterson-Korrelationsverfeinerung des [4Fe-4S]-Clusters**

Die Orientierung des [4Fe-4S]-Clusters in der Nitrat-Reduktase aus *D. desulfuricans* wurde über eine Gittersuche („grid-search“) unter Verwendung eines Modellclusters für die Lage der vier Eisenatome und der PC-Verfeinerungsroutine in XPLOR (Brünger, 1992b) bestimmt. a) Durch die schrittweise Rotation des Modellclusters am Koordinatenursprung um jede der drei kartesischen Achsen in Inkrementen von  $15^\circ$  wurden verschiedene Startorientierungen erzeugt. Jedes der vororientierten Modellcluster, welche die asymmetrische Einheit aller möglichen Orientierungen abdeckten, wurde an den zuvor bestimmten Schwerpunkt des Clusters translatiert und 75 Schritten PC-Verfeinerung unterzogen. b) Die Lage der zehn besten, verfeinerten Modelle, die unter Verwendung der anomalen Differenzen aus den verschiedenen Startorientierungen resultierten, ist in orange und die korrekte Lage des Clusters in blau dargestellt. c) Unter Verwendung der dispersiven Differenzen für die PC-Verfeinerung liegen die zehn besten verfeinerten Modelle sehr eng bei einander. Sie zeigen hohe und fast identische Pattersonkorrelationskoeffizienten und korrespondieren in erster Näherung zu identischen Koordinaten für die vier Eisenatome. Diese Abbildung wurde mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) erzeugt und mit RASTER3D (Merritt & Murphy) gerendert.

Die Kenntnis der genauen Koordinaten für die vier Eisenatome des [4Fe-4S]-Clusters ist essentiell für die Berechnung der Proteinphasen bis zu hoher Auflösung (Abb. 39). Unter Verwendung der Schwerpunktskoordinaten des Clusters können korrekte Phasen aufgrund der räumlichen Ausdehnung des Clusters grundsätzlich nur bis ca. 5 - 6 Å berechnet werden. Sind die genauen Koordinaten der einzelnen Atome im Cluster jedoch bekannt, so wird die Genauigkeit, mit der die Phasen berechnet werden können, von der Qualität der zur Phasierung verwendeten Datensätze bestimmt. Für die *D. desulfuricans* Nitrat-Reduktase konnten nach der Bestimmung der Koordinaten der vier Eisenatome über die oben beschriebene PC-Verfeinerung, der Phasierung der MAD-Daten mit SHARP (La Fortelle & Bricogne, 1997) und „solvent-flattening“ via SOLOMON (Abrahams & Leslie, 1996) experimentelle Phasen bis zu hoher Auflösung berechnet werden. Die daraus resultierenden Elektronendichtekarten waren von guter Qualität. Die mit den Schwerpunktskoordinaten des Clusters analog berechneten Elektronendichtekarten waren hingegen nicht interpretierbar (Abb. 39).



**Abb. 39: Vergleich verschiedener Elektronendichtekarten der Nitrat-Reduktase**

Dargestellt sind die experimentellen Elektronendichtekarten (alle blau und bei  $1\sigma$  kontouriert) unter Verwendung von a) Daten von  $20,0 - 5,0 \text{ \AA}$  und den Schwerpunktskoordinaten des Clusters und b) Daten von  $20,0 - 2,27 \text{ \AA}$  und den expliziten Koordinaten der vier Eisenatome sowie c) die  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte des endgültig verfeinerten Modelles (orange) in einer helicalen Region des Proteins. Wird die Phasierung mit Daten bis zur vollen Auflösung ( $2,27 \text{ \AA}$ ), jedoch nur mit den Schwerpunktskoordinaten des Clusters berechnet, so ist die Qualität der Elektronendichtekarte identisch zu Teilbild a). Diese Abbildung wurde mit MAIN (Turk, 1992) erstellt.





## 7 Anhang

### 7.1 Kristallographische Begriffe

Auflösung	Abstand der Gitterebenen gemäß Gleichung (1), siehe 2.3
Datensatz	Ergebnis der Auswertung einer Serie von Diffraktionsbildern, welches die gemessenen Reflexe in Form von numerischen Werten der Strukturfaktoramplituden ( $ F_{hkl} $ ) darstellt, siehe 2.4
Derivat-Datensatz	Datensatz von einem Proteinkristall, der durch Reaktion mit einer Schwermetallverbindung eine lokale Änderung der Elektronendichteverteilung aufweist, siehe 2.5.1
Differenz-Fourier	Fouriersumme, bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden: die resultierende Elektronendichtekarte gibt die molekularen Unterschiede wieder, welche die Differenzen in den Strukturfaktoramplituden erzeugen.
Differenz-Patterson	Pattersonfunktion bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden
$F_{\text{calc}}$	Strukturfaktoren, bzw. Strukturfaktoramplituden, die aus den Koordinaten einer Proteinstruktur errechnet wurden
$F_{\text{obs}}$	Strukturfaktoramplituden, die aus der Analyse der gemessenen Diffraktionsbilder resultieren
Figure of Merit	Charakterisierung der Qualität der experimentell ermittelten Proteinphasen als Kosinus des mittleren Phasenfehlers, siehe auch 2.5: für einen gegebenen Strukturfaktor, $F_{hkl}$ ergibt sich die Figure of Merit (FOM) zu: $m = \int_{\alpha} \{ P_{hkl}(\alpha) \exp[i\alpha] \} d\alpha ; \text{ wobei } 0 \leq m \leq 1.$ $P_{hkl}$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß für $F_{hkl}$ der Phasenwinkel $\alpha$ beträgt und wird während der Phasierung berechnet.
Freier R-Faktor	siehe $R_{\text{free}}$
Multiplizität	Mittelwert des Verhältnisses aus Anzahl der gemessenen Reflexe und der unter Beachtung der Kristallsymmetrie unabhängigen Reflexe
Nativer Datensatz	Datensatz von einem unveränderten Proteinkristall: dieser Ausdruck wird in Bezug auf MAD- oder MIR-Phasierungen für nicht mit Schwermetallverbindungen behandelte Kristalle verwendet. Im Zusammenhang mit Kristalltransformationen bezieht sich dieser Ausdruck auf die gewachsenen Kristalle, die nicht über eine Dehydratisierung verändert wurden.

R-Faktor	Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur als Funktion der Übereinstimmung von $ F_{calc} $ und $ F_{obs} $ gemäß Gleichung (17), siehe 2.8
$R_{free}$	R-Faktor für einen gewissen Prozentsatz der Daten, der nicht zur Verfeinerung des Modells herangezogen wurde, siehe 2.8
$R_{sym}$	Beschreibung der Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung von symmetrieverwandten Reflexen: Sie wird üblicherweise aus den gemessenen Strukturfaktoramplituden $ F_{hkl} $ berechnet: $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \left   F_{hkl}  -  F_{hkl}(j)  \right }{\sum_{hkl}  F_{hkl} }$ <p><math> F_{hkl} </math>: Mittelwert der <math>j</math> symmetrieverwandten Beobachtungen, <math> F_{hkl}(j) </math>, der Strukturfaktoramplitude des Reflexes <math>hkl</math>; siehe auch 2.4 und Gleichung (10) zur Berechnung von <math>R_{sym,l}</math></p>
Rigid Body	Bezeichnung für die Verfeinerung von ganzen Molekülen (oder Molekülteilen) als starre Körper („rigid body refinement“), siehe 2.8
r.m.s., bzw. RMS	Quadratisches Mittel („root mean square“), das in der Regel zur Charakterisierung von Abweichungen oder Differenzen benutzt wird: im Gegensatz zum Geometrischen Mittelwert werden hohe Differenzen stärker gewichtet: $\text{RMS-Abweichung} = \frac{1}{n} \sqrt{\sum_n (x_n - \bar{x})^2}$ <p><math>n</math>: Anzahl der Meßwerte, <math>x_n</math>: <math>n</math>-ter Meßwert, <math>\bar{x}</math>: Mittelwert oder Standardwert</p>
Simulated Annealing	Verfeinerungsalgorithmus in XPLOR und CNS bei dem im Rahmen einer Moleküldynamikrechnung die Temperatur des Systems rechnerisch erhöht wird, um so den Konvergenzradius der Verfeinerung zu verbessern, siehe 2.8
Solvensbereich	Zusammenhängende Bereiche in Proteinkristallen, die mit Lösungsmittel gefüllt sind, d.h. kein Protein enthalten
Solvensgehalt	Lösungsmittelgehalt eines Proteinkristalles
Test Set	Teil der Strukturfaktoren eines Datensatzes, der nur zur Berechnung von $R_{free}$ benutzt und nicht zur Verfeinerung herangezogen wird (in der Regel ca. 5 % der gemessenen Strukturfaktoramplituden)
Vollständigkeit	Prozentueller Anteil der wirklich gemessenen Reflexe im Vergleich zu den im entsprechenden Auflösungsbereich theoretisch möglichen Strukturfaktoren
Working Set	Teil der Strukturfaktoren eines Datensatzes, der zur Verfeinerung benutzt wird, d.h., alle Strukturfaktoren, die nicht zum „test set“ gehören
Zahl d. Reflexe	Anzahl der unabhängigen Reflexe, bzw. Strukturfaktoramplituden, die nicht über eine kristallographische Symmetrie verwandt sind

**7.2 Nomenklatur der 20 proteinogenen Aminosäuren**

Name	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

### 7.3 Abkürzungen

AES	Atomemissionsspektroskopie
AP•L <sub>C</sub> <sup>7.8</sup>	Allophycocyanin-Linker-Komplex mit dem „core“-Linker L <sub>C</sub> <sup>7.8</sup>
APB	Allophycocyanin B
AP <sub>CM</sub>	zentraler „core“ – Komplex der Phycobilisomen, der aus Allophycocyanin und zwei Molekülen des Ankerpolypeptids (Linker Protein L <sub>CM</sub> ) besteht
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis(2-Hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BW6	Meßstation („beamline“) für Proteinkristallographie am DESY
Cyt- <i>c</i>	Cytochrom- <i>c</i>
Da	Einheit Dalton (1 Da = 1 g · mol <sup>-1</sup> )
DAB	Deutsches Arzneibuch
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATPase	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-Synthase
FOM	„figure of merit“
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma AES (AES mit induktiv gekoppeltem Plasma)
kDa	Kilodalton (1000 Da)
L <sub>C</sub> <sup>7.8</sup>	7.8 kDa „core“-Linker
MAD	Multiple Anomale Dispersion
MIR	Multipler Isomorpher Ersatz
NAD	Nikotinamid-adeninin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nikotinamid-adeninin-dinucleotid
NAP	periplasmatische Nitrat-Reduktase aus <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz-Spektroskopie)
PC-Verfeinerung	Patterson-Korrelationsverfeinerung
PDB	Protein Data Base (Datenbank für Proteinstrukturen)
PEG	Polyethylenglycol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultravioletter Bereich des elektromagnetischen Spektrums
VIS	Sichtbarer Bereich des elektromagnetischen Spektrums
Wat-XXX	Bezeichnung von geordneten Wassermolekülen in Proteinstrukturen (XXX entspricht der Nummer des Restes in der PDB-Datei)
w/v	Angabe in Gewicht pro Volumeneinheit: 1 % w/v entspricht 1 g pro 100 ml.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adelroth, P., Ek, M. S., Mitchell, D. M., Gennis, R. B. & Brzezinski, P. (1997) Glutamate 286 in cytochrome  $aa_3$  from *Rhodobacter sphaeroides* is involved in proton uptake during the reaction of the fully-reduced enzyme with dioxygen. *Biochemistry*, **36**, 13824-13829.
- Almassy, R. J. & Dickerson, R. E. (1978) *Pseudomonas* Cytochrome  $c_{551}$  at 2.0 Å resolution: enlargement of the cytochrome  $c$  family. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, **75**, 2674-2678.
- Abrahams, J. P. & Leslie, A. G. W. (1996) Methods used in the Structure Determination of Bovine Mitochondrial F-1 ATPase. *Acta Cryst.* **D52**, 30-42.
- Axelrod, H. L., Feher, G., Allen, J. P., Chirino, A. J., Day, M. W., Hsu, B. T. & Rees, D. C. (1994) Crystallization and X-ray structure determination of cytochrome  $c_2$  from *Rhodobacter sphaeroides* in three crystal forms. *Acta Cryst.* **D50**, 596-602.
- Babcock, G. T. & Wikström, M. (1992) Oxygen activation and conservation of energy in cell respiration. *Nature*, **356**, 301-308.
- Baker, D., Bystroff, C., Fletterick, R. J. & Agard, D. A. (1993) PRISM: Topologically constrained phase refinement for macromolecular crystallography. *Acta Cryst.* **D49**, 429-439.
- Barlow, D. J. & Thornton, J. M. (1983) Ion-pairs in proteins. *J. Mol. Biol.* **168**, 867-885.
- Barton, G. J. (1993) ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Engineering*, **6**, 37-40.
- Berghuis, A. M. & Brayer, G. D. (1992) Oxidation State-dependent Conformational changes in Cytochrome  $c$ . *J. Mol. Biol.* **223**, 959-976.
- Berghuis, A. M., Guillemette, J. G., McLendon, G., Sherman, F., Smith, M. & Brayer, G. D. (1994a) The role of a conserved internal water molecule and its associated hydrogen bond network in cytochrome  $c$ . *J. Mol. Biol.* **236**, 786-799.
- Berghuis, A. M., Guillemette, J. G., Smith, M. & Brayer, G. D. (1994b) Mutation of tyrosine-67 to phenylalanine in cytochrome  $c$  significantly alters the local heme environment. *J. Mol. Biol.* **235**, 1326-1341.
- Bernal, J. D. & Crowford, D. (1934) X-ray Photographs of Crystalline Pepsin. *Nature (London)*, **133**, 794-795.

- 
- Bragg, W. L. (1913) The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X rays. *Proc. Roy. Soc.* **A89**, 248-277.
- Brejc, K., Ficner, R., Huber, R. & Steinbacher, S. (1995) Isolation, Crystallization, Crystal Structure Analysis and Refinement of Allophycocyanin from the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Mol. Biol.* **249**, 424-440.
- Brennan, S. & Cowan, P. L. (1992) A suite of programs for calculating X-ray absorption and diffraction performance for a variety of materials at arbitrary wavelength. *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 850-855.
- Bricogne, G. (1974) Geometric sources of redundancy in intensity data and their use for phase determination, *Acta Cryst.* **A30**, 395-405.
- Brünger, A. T., Krukowski, A. & Erickson, J. (1990) Slow-Cooling Protocols for Crystallographic Refinement by Simulated Annealing. *Acta Cryst.* **A46**, 585-593.
- Brünger, A. T. (1992a) The Free R Value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature*, **355**, 462-474.
- Brünger, A. (1992b) XPLOR Version 3.1, A System for X-ray Crystallography and NMR, Yale University Press, New Haven, CT.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998) Crystallography and NMR System – A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination. *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
- Burmeister, W. P. (1999) Poster beim 5<sup>th</sup> European Workshop on Crystallography of Biological Macromolecules. 16.-20. Mai 1999 in Como, sowie persönliche Kommunikation.
- Bursakov, S. A., Liu, M.-Y., Payne, W. J., LeGall, J., Moura, I. & Moura, J. J. G. (1995) Isolation and preliminary characterization of a soluble nitrate reductase from the sulfate reducing organism *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Anaerobe*, **1**, 55-60.
- Bursakov, S. A., Carneiro, C., Almendra, M. J., Duarte, R. O., Caldeira, J., Moura, I. & Moura J. J. G. (1997) Enzymatic properties and effect of ionic strength on periplasmic nitrate reductase (NAP) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 816-822.
- Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E. & Blüggel, M. (1999) Evidence for a copper-coordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase. *Prot. Sci.* **8**, 985-990.
- Bushnell, G. W., Louie, G. V. & Brayer, G. D. (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* **214**, 585-595.
- Campos, A. P., Aguiar, A. P., Hervas, M., Regalla, M., Navarro, J. A., Ortega, J. M., Xavier, A. V., De La Rosa, M. A. & Teixeira, M. (1993) Cytochrome *c*<sub>6</sub> from

- Monoraphidium braunii*. A cytochrome with an unusual heme axial coordination. *Eur. J. Biochem.* **216**, 329-341.
- Carter, D. C., Melis, K. A., O'Donnell, S. E., Burgess, B. K., Furey, W. F., Jr, Wang, B.-C. & Stout, C. D. (1985) Crystal structure of *Azotobacter* cytochrome *c*<sub>5</sub> at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **184**, 279-295.
- Castresana, J. & Saraste, M. (1995) Evolution of energetic metabolism: the respirationearly hypothesis. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 443-448.
- Chan, M. K., Mukund, S., Kletzin, A., Adams, M. W. & Rees, D. C. (1995) Structure of a hyperthermophilic tungstopterin enzyme, aldehyde ferredoxin oxidoreductase. *Science*, **267**, 1463-1469.
- Chang, W. R., Jiang, T., Wan, Z. L., Zhang, J. P., Yang, Z. X. & Liang, D. C. (1996) Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **262**, 721-731.
- Chen, Y. R., Sturgeon, B. E., Gunther, M. R. & Mason, R. P. (1999) Electron spin resonance investigations of the cyanyl and azidyl radical formation by cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* **274**, 24611-24616.
- Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251-276.
- Collaborative Computational Project (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Cowtan, K. D. & Main, P. (1993) Improvement of macromolecular electron-density maps by the simultaneous application of real and reciprocal space constraints. *Acta Cryst.* **D49**, 148-57.
- Cowtan, K. (1994) *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, **31**, 34-38.
- Cramer, P. & Müller, C. W. (1997) Engineering of diffraction-quality crystals of the NF-κB P52 homodimer: DNA complex. *FEBS Letters*, **405**, 373-377.
- Crawford, J. L., Lipscomb, W. N. & Shellman, C. G. (1973) The reverse turn as a polypeptide conformation in globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 538-542.
- Crowford, D. (1935) X-ray single Crystal Photographs of Insulin. *Nature (London)*, **135**, 591-592.
- Drenth, J. (1999) *Principles of Protein X-ray Crystallography*. 2. Auflage, Springer-Verlag, New York.
- Doublé, S. (1997) Preparation of Selenomethionyl proteins for phase determination. *Meth. Enzymol.* **276**, 523-530.

- Duerring, M., Huber, R. & Bode, W. (1990) Refined Three-Dimensional Structure of Phycoerythrocyanin from the Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* at 2.7 Å. *J. Mol. Biol.* **211**, 633-644.
- Duerring, M. Schmidt, G. B. & Huber, R. (1991) Isolation, Crystal Structure Analysis and Refinement of Constitutive C-Phycocyanin from the Chromatically Adapting Cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *J. Mol. Biol.* **217**, 577-592.
- Eichhorn, K. D. (1985) DISCO: Calculation of the Anomalous Dispersion Corrections,  $f'$  and  $f''$ , to the Atomic X-Ray Form Factor from both EXAFS and Theory. Deutsches Elektronen Synchrotron DESY, Hamburg.
- Einarsdottir, O., Killough, P. M., Fee, J. A. & Woodruff, W. H. (1989) An infrared study of the binding and photodissociation of carbon monoxide in cytochrome  $ba_3$  from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **264**, 2405-2408.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure and refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392-400.
- Esnouf, R. M., Ren, J., Graman, E. F., Somers, D. O'N., Ross, C. K., Jones, E. Y., Stammers, D. K. & Stuart, D. I. (1998) Continuous and Discontinuous Changes in the Unit Cell of HIV-1 Reverse Transcriptase Crystals on Dehydration. *Acta Cryst.* **D54**, 938-953.
- Ewald, P. P. (1921) Das 'reziproke Gitter' in der Strukturtheorie. *Zeitschrift für Kristallographie.* **56**, 129-156.
- Fee, J. A., Choc, M. G., Findling, K. L., Lorence, R. & Yoshida, T. (1980) Properties of a copper containing „ $c_1aa_3$ “ complex: A terminal oxidase of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 147-151.
- Fee, J. A., Kuila, D. Mather, M. W. & Yoshida, T. (1986) Respiratory proteins from extremely thermophilic, aerobic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **853**, 153-185.
- Ferguson-Miller, S., Brautigan, D. L. & Margoliasch, E. (1976) Correlation of the kinetics of electron transfer activity of various eucaryotic cytochromes  $c$  with binding to mitochondrial cytochrome  $c$  oxidase. *J. Biol. Chem.* **251**, 1104-1115.
- Ferguson-Miller, S., Brautigan, D. L. & Margoliasch, E. (1978) Definition of cytochrome  $c$  binding domains by chemical modification. *J. Biol. Chem.* **253**, 149-159.
- Ferguson-Miller, S. & Babcock, G. T. (1996) Heme/Copper Terminal Oxidases. *Chem. Rev.* **96**, 2889-2907.
- Ficner, R., Lobeck, K., Schmidt, G. & Huber, R. (1992) Isolation, Crystallization, Crystal Structure Analysis and Refinement of B-Phycoerythrin from the Red Alga *Porphyridium sordium* at 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **228**, 935-950.
- Ficner, R. & Huber, R. (1993) Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm resolution and localization of the  $\gamma$ -subunit. *Eur. J. Biochem.* **218**, 103-106.



- Florens, L., Bianco, P., Haladjian, J., Protasevich, I. & Makarov, A. (1995) Thermal stability of the polyheme cytochrome  $c_3$  superfamily. *FEBS Letters*, **375**, 280-284.
- Frazão, C., Soares, C. M., Carrondo, M. A., Pohl, E., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hervás, M., Navarro, J. A., De la Rosa, M. A. & Sheldrick, G. M. (1995) *Ab initio* determination of the crystal structure of cytochrome  $c_6$  and comparison with plastocyanin. *Structure*, **3**, 1159-1169.
- Friedmann, A. (1996) Abstract MS02.04.05 IUCr Congress, Seattle.
- Friedrich, W., Knipping, P. & Laue, M. (1912) Interferenz-Erscheinungen bei Röntgenstrahlen. *Sitzungsberichte der mathematisch-physikalischen Klasse der königlichen Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München*, 303-322.
- Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. & Gennis, R. B. (1994) The Superfamily of Heme-Copper Respiratory Oxidases. *J. Bacteriol.* **176**, 5587-5600.
- Gennis, R. B. (1998a) Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine. *Biochem. Biophys. Acta.* **1365**, 241-248.
- Gennis, R. B. (1998b) Cytochrome  $c$  oxidase: one enzyme, two mechanisms? *Science*, **280**, 1712-1713.
- Gennis, R. B. (1998c) How does cytochrome oxidase pump protons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12747-12749.
- Giuffrè, A., Forte, E., Antonini, G., D'Itri, E., Brunori, M., Soulimane T. & Buse G. (1999) Kinetic properties of the  $ba_3$ -oxidase from *Thermus thermophilus*: Effect of temperature. *Biochemistry*, **38**, 1057-1065.
- Glazer, A. N. (1985) Light harvesting by phycobilisomes. *Ann. Rev. Biol. Biophys. Chem.* **14**, 47-77.
- Green, D. W., Ingram, V. M. & Perutz, M. F. (1954) The structure of hemoglobin. IV. Sign detection by the isomorphous replacement method. *Proc. Roy. Soc. London*, **A225**, 287-307.
- Goldman, A. (1995) How to make my blood boil. *Structure*, **3**, 1277-1279.
- Hauptmann, H. (1997) Phasing methods for protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 672-680.
- Hellwig, P., Soulimane, T., Buse, G. & Mäntle, W. (1999) Electrochemical, FTIR and UV/VIS Spectroscopic Properties of the  $ba_3$ -Oxidase from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, **38**, 9648-9658.
- Hendrickson, W. A. (1991) Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science*, **254**, 51-58.
- Henning, M., Darimont, B., Sterner, R., Kirschner, K. & Jansonius, J. N. (1995) 2.0 Å structure of indole-3-glycerol phosphatase synthase from the hyperthermophilic

- Sulfolobus solfataricus*: possible determinants of protein stability. *Structure*, **3**, 1295-1306.
- Hess, D., Krüger, K., Knappik, A., Palm, P. & Hensel, R. (1995) Dimmer 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea. *Eur. J. Biochem.* **233**, 227-237.
- Hill, B. C. (1991) The reaction of the electrostatic cytochrome *c* – cytochrome oxidase complex with oxygen. *J. Biol. Chem.* **266**, 2219-1126.
- Hill, B. C. (1994) Modeling the sequence of electron transfer reactions in the single turnover of reduced, mammalian cytochrome *c* oxidase with oxygen. *J. Biol. Chem.* **269**, 2419-2425.
- Hinkle, P. & Mitchell, P. (1970) Effect of Membrane Potential on Equilibrium Poise Between Cytochrome *a* and Cytochrome *c* in Rat Liver Mitochondria. *Bioenergetics*, **1**, 45-60.
- Holzwarth, A. R., Bittersmann, E., Reuter, W. & Wehrmeyer, W. (1990) Studies on chromophore coupling in isolated phycobiliproteins: III Picosecond excited state kinetics and time-resolved fluorescence spectra of different allophycocyanins from *Mastigocladus laminosus*. *Biophys. J.* **57**, 145.
- Hon-Nami, K. & Oshima, T. (1977) Purification and some properties of cytochrome *c*-552 from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.* **82**, 769-776.
- Hope, H. (1990) Crystallography of Biological Macromolecules at Ultra-Low Temperatures. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 107-126.
- Hoppe, W. (1957) Die Faltmolekülmethode: Eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Cryst.* **10**, 750-751.
- Huber, R. (1965) Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Cryst.* **19**, 353-356.
- Huber, R., Formanek, H. & Epp, O. (1968) Die Kristallstrukturanalyse von erythrocyruorin (*Chironomus Thummi*). *Naturwiss.* **55**, 75-77.
- Huber, R., Epp, O. & Formanek, H. (1969) The 2.8 Å resolution fourier synthesis of the insect hemoglobin erythrocyruorin. *Acta Cryst.* **A25**, 15-28.
- Hünefeld, F. (1840) Die Chemismus in der thierischen Organization, Leipzig.
- Huxley, H. E. & Kendrew, J. C. (1953) Discontinuous Lattice Changes in Haemoglobin Crystals. *Acta Cryst.* **6**, 76-80.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. & Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, **376**, 660-669.
- Jaenicke, R. (1996) Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *FASEB J.* **10**, 84-93.

- Jasaitis, A., Verkhosvky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M. L. & Wikström, M. (1999) Assignment and Charge Translocation Stoichiometries of the Major Electrogenic Phases in the Reaction of Cytochrome *c* Oxidase with Dioxygen. *Biochemistry*, **38**, 2697-2706.
- Jones, G. D. D., Lea, J. S., Symons, M. C. R. & Taiwo, F. A. (1987) Structure and mobility of electron gain and loss centres in proteins. *Nature*, **330**, 772-773.
- Jones, T. A., (1978) A graphics model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Crystallog.* **11**, 268-272.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y. & Cowan, S. W. (1991) Improved Methods for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in these Models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-119.
- Jünemann, S., Meunier, B., Fisher, N. & Rich, P. R. (1999) Effects of Mutation of the conserved Glutamic Acid-286 in Subunit I of Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, **38**, 5248-5255.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Bamberg, E. & Michel, H. (1998) Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba*<sub>3</sub>-type cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. *FEBS Letters*, **434**, 17-22.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Cusack, S. & Leberman, R. (1996) Interconversion of Crystals of the *Escherichia coli* EF-Tu·EF-Ts Complex Between High- and Low-Diffraction Forms. *Acta Cryst.* **D52**, 799-805.
- Keightley, J. A., Zimmermann, B. H., Mather, M. W., Springer, P., Pastuszyn, A., Lawrence, D. M. & Fee, J. A. (1995) Molecular Genetic and Protein Chemical Characterization of the Cytochrome *ba*<sub>3</sub> from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.* **270**, 20345-20358.
- Kelly, C. A., Nishiyama, M., Ohnishi, Y., Beppu, T. & Birktoft, J. J. (1993) Determinants of protein thermostability observed in the 1.9 Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus flavus*. *Biochemistry*, **32**, 3913-3922.
- Kendrew, J. C., Dickerson, R. E., Strandberg, B. E., Hart, R. C. & Davies, D. R. (1960) Structure of myoglobin; a three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, **185**, 422-427.
- Kiefersauer, R. (1998) Kapillaren-freies Montieren von Proteinkristallen unter kontrollierter Feuchte: Vorrichtung und methodische Nutzung. Dissertation TU München, Deutschland.

- Kitagawa, T. & Ogura, T. (1997) Oxygen Activation Mechanism at the Binuclear Site of the Heme-Copper Oxidase Superfamily as Revealed by Time Resolved Resonance Raman Spectroscopy. *Progr. Inorg. Chem.* **45**, 431-479.
- Klapper, M. H. (1977) The independent distribution of amino acid near neighbour pairs into polypeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 1018-1024.
- Kleywegt, G. J. & Read, R. J. (1997) Not your average density. *Structure*, **5**, 1557-1569.
- Knäblein, J., Neufeind, T., Schneider, F., Bergner, A., Messerschmidt, A., Löwe, J., Steipe, B. & Huber, R. (1997)  $Ta_6Br_{12}^{2+}$ , a tool for phase determination of large biological assemblies by X-ray crystallography. *J. Mol. Biol.* **270**, 1-7.
- Knight, S. (1989) Ribulose 1,5-biphosphat carboxylase/oxygenase: a structural study. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A. & Gennis, R. B. (1997) The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effect of site directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9085-9900.
- Korndörfer, I., Steipe, B., Huber, R., Tomschy, A. & Jaenicke, R. (1995) The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**, 511-521.
- Korolev, S., Nayal, M., Barnes, W. M., Di Cera, E. & Waksman, G. (1995) Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5 Å resolution: structural basis for thermostability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9264-9268.
- La Fortelle, E. & Bricogne, G. (1997) Maximum Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods. *Meth. Enzymol.* **276**, 472-494.
- Lamzin, V. S. & Wilson, K. S. (1997) Automated Refinement for Protein Crystallography. *Meth. Enzymol.* **277**, 269-305.
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a programm to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallog.* **26**, 283-291.
- Leslie, A. G. W. (1991) Recent Changes to the MOSFLM Package for Processing Film and Image Plate DATA, SERC Laboratory, Daresbury, Warrington, WA 4AD, UK.
- Lett, C. M., Berghuis, A. M., Frey, H. E., Lepock, E. F. & Guilemette, J. G. (1996) The role of a conserved water molecule in the redox-dependent thermal stability of iso-1-cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **271**, 29088-29093.

- Lübben, M., Kolmerer, B. & Saraste, M. (1992) An archaeobacterial terminal oxidase combines core structures of two mitochondrial respiratory complexes. *EMBO J.* **11**, 805-812.
- Lübben, M. & Morand, K. (1994) Novel prenylated hemes as cofactors of cytochrome oxidase. Archaea have modified hemes A and O. *J. Biol. Chem.* **269**, 21473-21479.
- Lundell, D. J. & Glazer, A. N. (1983a) Molecular architecture of a light-harvesting antenna: Structure of the 18S core-rod subassembly of the *Synechococcus* 6301 phycobilisome. *J. Biol. Chem.* **258**, 894-901.
- Lundell, D. J. & Glazer, A. N. (1983b) Molecular architecture of a light-harvesting antenna: Core substructure in the *Synechococcus* 6301 phycobilisomes: Two new allophycocyanin and allophycocyanin B complexes. *J. Biol. Chem.* **258**, 902-908.
- Lundell, D. J. & Glazer, A. N. (1983c) Molecular architecture of a light-harvesting antenna: Quarternary interaction in the *Synechococcus* 6301 phycobilisome core as revealed by partial tryptic digestion and circular dichroism studies. *J. Biol. Chem.* **258**, 8708-8713.
- Luntz, T. L., Schejter, A., Garber, E. A. & Margoliasch, E. (1989) Structural significance of an internal water molecule studied by site-directed mutagenesis of tyrosine-67 in rat cytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3524-3528.
- Ma, J., Tsatsos, P. H., Zaslavsky, D., Barquera, B., Thomas, J. W., Katsonouri, A., Puustinen, A., Wikström, M., Brzezinski, P., Alben, J. O. & Gennis, R. B. (1999) Glutamate-89 in subunit II of cytochrome *bo<sub>3</sub>* from *Escherichia coli* is required for the function of the heme-copper-oxidase. *Biochemistry*, **38**, 15150-15156.
- Macedo-Ribeiro, S., Darimont, B., Sterner, R. & Huber, R. (1996) Small structural changes account for the high thermostability of [4Fe-4S] ferredoxin from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Structure*, **15**, 1291-1301.
- Machius, M., Wiegand, G. & Huber, R. (1995) Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **246**, 545-559.
- MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T. & Michel, H. (1999) Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide. *Biochemistry*, **38**, 9179-9184.
- Mattar, S. & Engelhard, M. (1997) Cytochrome *ba<sub>3</sub>* from *Natronobacterium pharaonis*. An archaeal four-subunit cytochrome-*c*-type oxidase. *Eur. J. Biochem.* **250**, 332-341.
- Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- McColl, R. (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* **124**, 311-334.
- McLendon, G. (1990) Control of Biological Electron Transport via Molecular Recognition and Binding: The „Velcro“ Model. *Structure and Bonding*, **75**, 159-174.
- McRee, D. E. (1993) Practical Protein Crystallography. Academic Press, San Diego.

- 
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A. & Kannt, A. (1998a) Cytochrome *c* Oxidase: Structure and Spectroscopy. *Ann Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329-356.
- Michel, H. (1998b) The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12819-12824.
- Michel, H. (1999) Cytochrome *c* oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping – a discussion. *Biochemistry*, **38**, 15129-15140.
- Mitchell, R. & Rich, P. R. (1994) Proton uptake by cytochrome *c* oxidase on reduction and on ligand binding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1186**, 19-26.
- Moore, G. R. & Pettigrew, G. W. (1990) Cytochromes *c*: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects. Springer Series in Molecular Biology, Springer Verlag, Berlin.
- Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S. & Dutton P. L. (1992) Nature of biological electron transfer. *Nature*, **355**, 796-802.
- Nakagawa, A., Higuchi, Y., Yasuoka, N., Katsube, Y. & Yagi, T. (1990). S-class cytochromes *c* have a variety of foldings patterns: structure of cytochrome *c*-553 from *Desulfovibrio vulgaris* determined by the multiwavelength anomalous dispersion method. *J. Biochem.* **108**, 701-703.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993) Grasp: graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.* **64**, A166.
- Nojima, H., Hon-Nami, K., Oshima, T. & Noda, H. (1978) Reversible thermal unfolding of thermostable cytochrome *c*-552. *J. Mol. Biol.* **122**, 33-42.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U. & Michel, H. (1997) Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome *c* oxidase complexed with an antibody Fv fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10547-10553.
- Otwinowsky, Z. & Minor, W. (1993) DENZO: A Film Processing Program for Macromolecular Crystallography, Yale University, New Haven, CT.
- Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M. & Gajiwala, K. (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* **10**, 75-83.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X. & Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunneling in biological oxidation-reduction. *Nature*, **402**, 47-52.
- Patterson, A. L. (1934) A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Phys. Rev.* **46**, 372-376.
- Pelletier, H. & Kraut, J. (1992) Crystal structure of a complex between electron transfer partners, Cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*. *Science*, **258**, 1748-1754.
- Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. & North, A. (1960) Structure of haemoglobin; a three dimensional fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by x-ray analysis. *Nature*, **185**, 416-422.

- Pfützner, U., Odenwald, A., Ostermann, T., Weingard, L., Ludwig, B. & Richter, O. M. (1998) Cytochrome *c* oxidase (heme *aa*<sub>3</sub>) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **30**, 89-97.
- Puustinen, A. & Wikström, M. (1999) Proton exit from the heme-copper oxidase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 35-37.
- Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Advan. Protein Chem.* **23**, 283-437.
- Reuter, W. & Müller, C. (1993) Adaptation of the photosynthetic apparatus of cyanobacteria to light and CO<sub>2</sub>. *J. Photochem. Photobiol.* **B21**, 3-27.
- Reuter, W. & Nickel-Reuter, C. (1993) Molecular assembly of the phycobilisomes from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J. Photochem. Photobiol.* **B18**, 51-66.
- Rhodes, G. (1993) Crystallography Made Crystal Clear: A guide for users of macromolecular models. Academic Press, San Diego.
- Rich, P. R. (1995) Towards an Understanding of the Chemistry of Oxygen Reduction and Proton Translocation in the Iron-Copper Respiratory Oxidases. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**, 479-486.
- Richardson, J. S. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advan. Protein Chem.* **34**, 167-339.
- Riistama, S., Puustinen, A., Garcia-Horsman, A., Iwata, S., Michel, H. & Wikström, M. (1996) Channeling of Dioxygen into the respiratory enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **1275**, 1-4.
- Rodgers, D. W. (1994) Cryocrystallography. *Structure*, **15**, 1135-1140.
- Röntgen, W. C. (1895) Über eine neue Art von Strahlen. *Sitzungsberichte der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, 132-141.
- Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962) The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24-31.
- Russel, R. J. M., Hough, D. W., Danson, M. J. & Taylor, G. L. (1994) The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic Archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Structure*, **2**, 1157-1167.
- Salemme, F. R., Kraut, J. & Kamen, M. D. (1973) Structural bases for function in cytochromes *c*. *J. Biol. Chem.* **248**, 7701-7716.
- Salunke, D. M., Veerapandian, B., Kodandapani, R. & Vijayan, M. (1985) Water-Mediated Transformations in Protein Crystals. *Acta Cryst.* **B41**, 431-436.
- Saraste, M. (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Q. Rev. Biophys.* **23**, 331-366.

- Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science*, **283**, 1488-1493.
- Sayre, D. (1974) Least-Squares refinement. II: High resolution phasing of a small protein. *Acta Cryst.* **A30**, 180-184.
- Schick, B. & Jurnack, F. (1994) Extension of the Diffraction Resolution of Crystals. *Acta Cryst.* **D50**, 563-568.
- Schirmer, T., Bode, W. & Huber, R. (1985) X-ray Crystallographic Structure of the Light-harvesting Biliprotein C-Phycocyanin from the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its Resemblance to Globin Structures. *J. Mol. Biol.* **184**, 257-277.
- Schirmer, T., Huber, R., Schneider, M. & Bode, W. (1986) Crystal Structure Analysis and Refinement at 2.5 Å of Hexameric C-Phycocyanin from the Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *J. Mol. Biol.* **188**, 651-676.
- Schirmer T., Bode W. & Huber R. (1987) Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution. A common principle of phycobilin-protein interaction. *J. Mol. Biol.* **196**, 677-695.
- Schnackenberg, J., Than, M. E., Mann, K., Wiegand, G., Huber, R. & Reuter, W. (1999) Amino Acid Sequence, Crystallization and Structure Determination of Reduced and Oxidized Cytochrome *c*<sub>6</sub> from the Green Alga *Scenedesmus obliquus*. *J. Mol. Biol.* **290**, 1019-1030.
- Sheldrick, G. M. (1999) Phase Annealing in *SHELX-90*: Direct Methods for Larger Structures. *Acta Cryst.* **A46**, 467-473.
- Sidler, W. A. (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structure. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, ed. Bryant, D. A., Kluwer Academic Dordrecht, S.139-216.
- Siletskiy, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T. V., Buse, G., Kaulen, A. and Konstantinov, A. (1999a) Time-resolved generation of membrane potential by *ba*<sub>3</sub> cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. Evidence for reduction-induced opening of the binuclear centre. *FEBS Letters*, **457**, 98-102.
- Siletsky, S., Kaulen, A. D. & Konstantinov, A. A. (1999b) Resolution of Electrogenic Steps Coupled to Conversion of Cytochrome *c* Oxidase from the Peroxo to the Ferryl-Oxo State. *Biochemistry*, **38**, 4853-4861.
- Soulimane, T., Gohlke, U., Huber, R. & Buse, G. (1995) Three-dimensional crystals of cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus* diffracting to 3.8 Å resolution. *FEBS Letters*, **368**, 132-134.
- Soulimane, T., von Walter, M., Hof, P., Than, M. E., Huber, R. & Buse, G. (1997) Cytochrome-*c*<sub>552</sub> from *Thermus thermophilus*: A functional and crystallographic investigation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 572-576.



- Soulimane, T., Than, M. E., Dewor, M. Huber, R. & Buse, G. (2000) Primary Structure of a Novel Subunit in *ba*<sub>3</sub>-Cytochrome Oxidase from *Thermus thermophilus*, *Prot. Sci.* in Vorbereitung.
- Stammers, D. K., Somers, D. O'N, Ross, C. K., Kirby, I., Ray, P. H., Wilson, J. E., Norman, M., Ren, J. S., Esnouf, R. M., Garman, E. F., Jones, E. Y. & Stuart, D. I. (1994) Crystals of HIV-1 Reverse Transcriptase Diffracting to 2.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **242**, 586-588.
- Steffens, G. C., Biewald, R. & Buse, G. (1987) Cytochrome *c* oxidase is a three-copper, two-heme-A protein. *Eur. J. Biochem.* **164**, 295-300.
- Steffens, G. C. M., Soulimane, T., Wolff, G. & Buse, G. (1993) Stoichiometry and redox behaviour of metals in cytochrome-*c* oxidase. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1149-1157.
- Stout, G. H. & Jensen, L. H. (1989) X-ray Structure Determination. John Wiley & Sons, New York.
- Surerus, K. K., Oertling, W. A., Fan, C., Gurbiel, R. J., Einarsdottir, O., Antholine, W. E., Dyer, R. B., Hoffman, B. M., Woodruff, W. H. & Fee, J. A. (1992) Reaction of cyanide with cytochrome *ba*<sub>3</sub> from *Thermus thermophilus*: spectroscopic characterization of the Fe(II)*a*<sub>3</sub>-CN.Cu(II)B-CN complex suggests four <sup>14</sup>N atoms are coordinated to CuB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3195-3199.
- Swanson, S. M. (1994) Core tracing: Depicting connections between features in electron density. *Acta Cryst.* **D50**, 695-708.
- Tanner, J. J., Hecht, R. M. & Krause, K. L. (1996) Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5 Å. *Biochemistry*, **35**, 2597-1609.
- Titani, K., Ericsson, L. H., Hon-nami, K. & Miyazawa, T. (1985) Amino acid sequence of cytochrome *c*-552 from *Thermus thermophilus* HB8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 781-787.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science*, **269**, 1069-1074.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996) The structure of the whole 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science*, **272**, 1136-1144.
- Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Dissertation TU München, Deutschland.
- Verkhovskaya, M. L., Garcia-Horsman, A., Puustinen, A., Rigaud, J. L., Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I. & Wikström, M. (1997) Glutamic acid 286 in subunit I of cytochrome *bo*<sub>3</sub> is involved in proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10128-10131.

- Verkhovskiy, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M. L. & Wikström, M. (1997) Translocation of electrical charge during a single turnover of cytochrome-*c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 6-10.
- Verkhovskiy, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E. & Wikström, M. (1999) Proton Translocation by Cytochrome *c* Oxidase. *Nature*, **400**, 480-483.
- Vygodina, T. V., Pecoraro, C., Mitchell, D., Gennis, R. & Konstantinov, A. A. (1998) Mechanism of Inhibition of Electron Transfer by Amino Acid Replacement K362M in a Proton Channel of *Rhodobacter sphaeroides* Cytochrome *c* Oxidase. *Biochemistry*, **37**, 3053-3061.
- Wakarchuk, W. W., Sung, W. L., Campbell, L., Cunningham, A., Watson, C. & Yaguchi, M. (1994) Thermostabilization of the *Bacillus circulans* xylanase by the introduction of disulfide bonds. *Protein Eng.* **7**, 1379-1386.
- Wang, B.-C. (1985) Resolution of phase ambiguity in macromolecular crystallography. *Meth. Enzymol.* **115**, 90-112.
- Weeks, C. M. & Miller, R. (1999) Optimizing *Shake-and-Bake* for proteins. *Acta Cryst.* **D55**, 492-500.
- Weik, M., Ravelli, R. B. G., Kryger, G., McSweeney, S., Raves, M. L., Harel, M., Gros, P., Silman, I., Kroon, J. & Sussman, J. L. (2000) Specific chemical and structural damage to proteins produced by synchrotron radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 623-628.
- Weiss, M. S. & Hilgenfeld, R. (1999) Dehydration leads to a phase transition in monoclinic factor XIII crystals. *Acta Cryst.* **D55**, 1858-1862.
- Wikström, M. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria. *Nature*, **266**, 271-273.
- Wikström, M. (1989) Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. *Nature*, **338**, 776-778.
- Williams, P. A., Blackburn, N. J., Sanders, D., Bellamy, H., Stura, E. A., Fee, J. A. & McRee, D. E. (1999) The Cu<sub>A</sub> domain of *Thermus thermophilus* ba<sub>3</sub>-type cytochrome *c* oxidase at 1.6 Å resolution. *Nature Struct. Biol.* **6**, 509-516.
- Wilmanns, M., Lappalainen, P., Kelly, M., Sauer-Eriksson, E. & Saraste, M. (1995) Crystal structure of the membrane-exposed domain from a respiratory quinol oxidase complex with an engineered dinuclear copper center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11955-11959.
- Windrem, D. A. & Plachy, W. Z. (1980) The Diffusion-Solubility of Oxygen in Lipid Bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 655-665.
- Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M. & Ludwig, B. (1998a) Tryptophan 121 of subunit II is the electron entry site to cytochrome-*c* oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **273**, 5132-5136.

- 
- Witt, H., Malatesta, F., Nicoletti, F., Brunori, M. & Ludwig, B. (1998b) Cytochrome-*c* binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **251**, 367-373.
- Woodruff, W. H. (1993) Coordination dynamics of heme-copper oxidases. The ligand shuttle and the control and coupling of electron transfer and proton translocation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 177-88.
- Wright, W. W., Owen, C. S. & Vanderkooi, J. M (1992) Penetration of Analogues of H<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> in Proteins Studied by Room Temperature Phosphorescence of Tryptophan. *Biochemistry*, **31**, 6538-6544.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fel, M. J., Libeu, C., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. & Tsukihara, T. (1998) The Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome *c* Oxidase at 2.3 Å. *Science*, **280**, 1723-1730.
- Zaslavsky, D., Kaulen, A. D., Smirnova, I. A., Vygodina, T. & Konstantinov, A. A. (1993) Flash-induced membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase. *FEBS Letters*, **336**, 389-393.
- Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F. & Munck, E. (1988) Properties of a copper containing cytochrome *ba*<sub>3</sub>: A second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5779-5783.
- Zhang, K. Y. J. & Main, P. (1990) The use of Sayre's equation with solvent flattening and histogram matching for phase extension and refinement of protein structures. *Acta Cryst.* **A46**, 377-381.
- Zhang, K. Y. J. & Eisenberg, D. (1994) Solid-State Phase Transition in the Crystal Structure of Ribulose 1,5-Biphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Acta Cryst.* **D50**, 258-262.

