

**Kristallisation des membranständigen Teils
der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase
aus *Neurospora crassa***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Katharina Lecher
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2006

Aus dem Institut für Biochemie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Referent: Prof. Dr. H. Weiss
Koreferent: PD Dr. M. Grieshaber
Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	5
2.1 Die oxidative Phosphorylierung.....	5
2.2 Komplex I, die protonenpumpende NADH-Ubichinon Oxidoreduktase	8
2.3 Mechanismen der anderen Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung	13
2.3.1 Mechanismus von Komplex III.....	13
2.3.2 Mechanismus von Komplex IV	15
2.3.3 Mechanismus der ATP-Synthase	17
2.4 Modelle der Energieübertragung in Komplex I	20
2.4.1 Q-Zyklus Theorie.....	20
2.4.2 Reduktion und Oxidation von FeS-Zentrum N2	21
2.4.3 Indirekt gekoppelter Protonentransport.....	22
2.5 Röntgen-Kristallographie.....	24
2.5.1 Warum Röntgenbeugung am Kristall zur Strukturanalyse?.....	24
2.5.2 Kristallisation von Biomakromolekülen	26
2.5.3 Kristallisation von Membranproteinen.....	33
2.5.4 Dynamische Lichtstreuung einer Proteinlösung.....	40
2.5.5 Theoretische Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse.....	45
2.5.6 Röntgenquellen	55
2.5.7 Datenaufnahme.....	58
2.6 Thema der Arbeit	63
3. Material und Methoden.....	64
3.1 Präparation des Membranarms von Komplex I.....	64
3.1.1 Anzucht von <i>Neurospora crassa</i>	64
3.1.2 Präparation der Mitochondrienmembranen.....	64
3.1.3 Präparation von Komplex I	65
3.1.4 Reindarstellung des Membranarms von Komplex I.....	65
3.1.5 Analytische Methoden	66
3.2 Präzipitationsstudien.....	68
3.2.1 Untersuchung des Einflusses sinkender Ionenstärke auf die Präzipitation	68
3.2.2 Messung der dynamischen Lichtstreuung	68
3.2.3 Einfluß von Lösungsparametern auf die Präzipitation des Membranarms	69
3.3 Kristallisation.....	70

4. Ergebnisse und Diskussion	72
4.1 Präparation des Membranarms von Komplex I aus <i>Neurospora crassa</i>	72
4.1.1 Solubilisierung der Mitochondrienmembran und Darstellung von Komplex I ..	72
4.1.2 Spaltung von Komplex I und Isolation des membranständigen Teils	74
4.1.3 Größenausschlußchromatographie der Membranarmfraktionen	75
4.1.4 Bilanz der Präparation	76
4.2 Präzipitationsstudien des Membranarms von Komplex I	80
4.2.1 Ausgangslage	80
4.2.2 Kristallisationsstrategie - Erniedrigung der Ionenstärke	82
4.2.3 Lösungsparameter und Präzipitation des Membranarms	86
4.3 Kristallisationstechnik	92
4.4 Kristalle	95
5. Ausblick	99
6. Literaturverzeichnis	102

1. Zusammenfassung

Die Kristallstrukturen der energieumwandelnden Atmungskettenkomplexe III und IV und der ATP-Synthase liegen heutzutage vor und eröffnen ein vertieftes Verständnis ihrer molekularen Funktionsweisen. Die Struktur des Atmungskettenkomplexes I, der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, wurde bislang allerdings noch nicht gelöst.

Komplex I koppelt den bergab gerichteten Fluß von Elektronen von NADH auf Ubichinon entlang eines FMN und bis zu sieben FeS-Clustern mit dem bergauf gerichteten, transmembranen Transport von Protonen. Entgegen den anderen Atmungskettenkomplexen ist Komplex I in der Lage zwei Protonen pro übertragenem Elektron zu transportieren, was auf einen bislang noch vollkommen unverstandenen Energieübertragungsmechanismus hinweist.

Komplex I hat eine ungewöhnliche L-förmige Struktur, die sich aus zwei sogenannten Armen zusammensetzt, einem peripheren, bei Bakterien ins Cytosol, bei Eukaryonten in die Mitochondrienmatrix ragender Arm und einem Membranarm. Die Struktur des peripheren Arms, in dem sich auch alle bekannten Redoxgruppen befinden, wurde dieses Jahr gelöst. Dieser Teil des Komplex I scheint jedoch nur als Elektronenzulauf zum Zentrum der Energiekopplung im membranständigen Teil zu fungieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Kristallisationsstrategie für diesen Teil des Komplex I auszuarbeiten und ihn somit für eine Röntgenstrukturanalyse zugänglich zu machen.

Als Modellorganismus stand der Pilz *Neurospora crassa* zur Verfügung, dessen Komplex I in vielen vorangegangenen Doktorarbeiten biochemisch gut charakterisiert worden war. Mit ausgearbeiteten Verfahren wurde der Komplex I durch Ultrazentrifugation und Flüssigkeitschromatographie in Octylglucosid isoliert, dann durch Kaliumrhodanid in Anwesenheit von Decylmaltosid in den Membranarm und in Bruchstücke des peripheren Arms zerlegt und daraus durch Ultrazentrifugation und Größenausschlußchromatographie der Membranarm rein dargestellt.

In folgenden Präzipitationsstudien unter Kontrolle der dynamischen Lichtstreuung wurde nachgewiesen, daß der Membranarm durch Erniedrigung der Ionenstärke aus der Lösung verdrängt wird und hierbei einen Phasenwechsel durchläuft. Eine Optimierung der Lösungsparameter Ionenart und -stärke, Detergenzart und -konzentration, pH-Wert und Temperatur führte zu einer Stabilisierung des monomeren Proteinanteils auch in Anwesenheit eines hohen Präzipitationsdruckes. Es wurden Techniken entwickelt, die die Kristallisation des Proteins im Gegensatz

zur amorphen Präzipitation kinetisch begünstigen. Hierzu wurde der Einfluß verschiedener Dialyseverfahren mit unterschiedlichen Konzentrationsgefällen im Hinblick auf die Stabilität des monomeren Membranarms in Lösung untersucht.

Hieraus resultierte die Strategie, dem Membranarm etappenweise über eine kleine Dialysoberfläche das umgebende Salz zu entziehen und nach erfolgter Kristallkeimung das Kristallwachstum durch Vermeidung weiteren Präzipitationsdruckes zu begünstigen. Diese Vorgehensweise führte zu Kristallen, die in ihrer Untereinheitenzusammensetzung mit dem Membranarm von Komplex I übereinstimmen. Während ihrer Wachstumsphase diskriminieren diese Kristalle Verunreinigungen im umgebenden Milieu und bauen in einem „reinigenden Effekt“ nur monomeres Membranarmprotein in den wachsenden Kristall ein. Leider wurden bislang nur wenige Kristalle geeigneter Größe erhalten. Eine erste Diffraktionsanalyse am ESRF in Grenoble ergab eine Auflösung von 7.5 Å

2. Einleitung

2.1 Die oxidative Phosphorylierung

Unter oxidativer Phosphorylierung versteht man die durch Zellatmung getriebene Synthese von ATP. Sie stellt den Endpunkt des Energie liefernden Katabolismus aerober Organismen dar. Alle Schritte des Kohlenhydrat-, Fett- und Aminosäureabbaus münden in dieses letzte Stadium, bei der die gespeicherte Oxidationsenergie der Katabolite die ATP-Synthese antreibt. Von den meisten Organismen wird ständig ATP synthetisiert und hydrolysiert. Der Mensch setzt zur Deckung seines energetischen Grundumsatzes täglich eine Menge an ATP um, die in etwa seinem Körpergewicht entspricht.

In Eukaryoten findet die oxidative Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran statt, bei Bakterien in der äußeren Cytoplasmamembran. Die in Form von NADH und Ubichinol als Reduktionsäquivalenten angelieferte Energie aus dem Katabolismus wird zum Aufbau eines Protonengradienten über die jeweilige Membran genutzt, welcher letztlich die ATP-Synthese antreibt (Harris, 1995). Erzeuger des Protonengradienten ist die Atmungskette, eine Folge von drei großen membranständigen Enzymkomplexen, die den bergab gerichteten Fluß von Elektronen von NADH über Ubichinol und Cytochrom c auf Sauerstoff mit dem bergauf gerichteten Transport von Protonen über die Membran koppeln (Hatefi, 1985). Sauerstoff als Endakzeptor der Elektronen zu Wasser reduziert (Abb. 1).

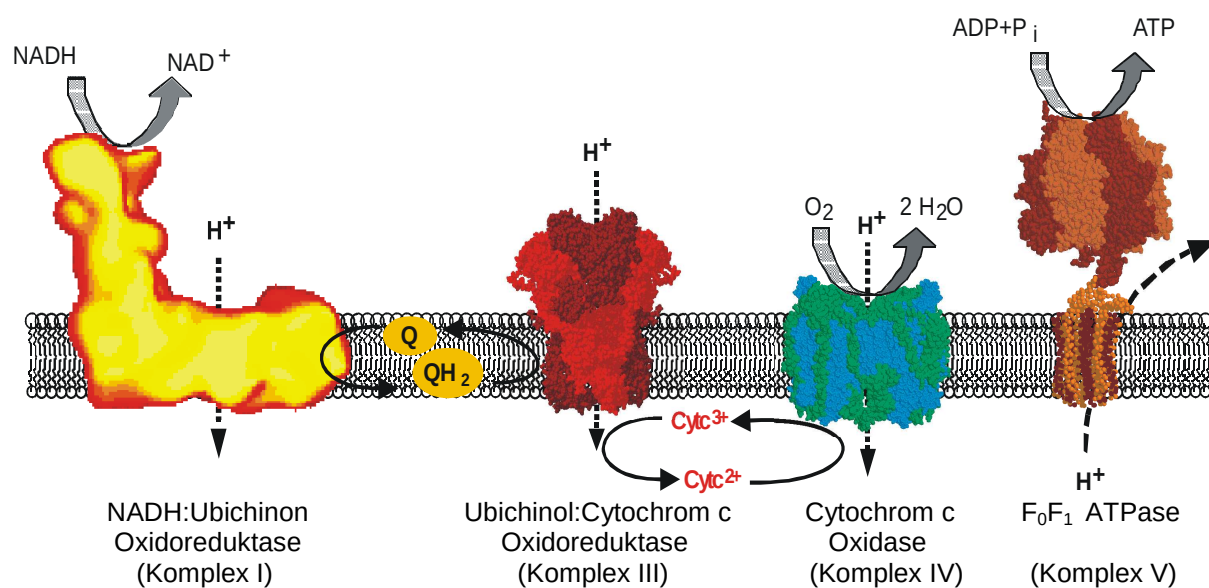


Abb. 1: Die Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien. Die Struktur von Komplex I wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Einzelpartikeln bestimmt; die Komplexe III, IV und V durch Röntgenkristallographie. Q: Ubichinon, QH₂: Ubichinol, Cyt c: Cytochrom c.

Die chemiosmotische Theorie von Mitchell (Mitchell, 1961) besagt, daß nicht nur der Konzentrationsgradient der Protonen sondern insbesondere die Ladungsdifferenz über der Membran zur Höhe des resultierenden Synthesepotentials beiträgt.

Der Elektroneneintritt in die Atmungskette erfolgt über Komplex I, die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase. Zwei Elektronen werden von NADH ($E^0 = -320\text{mV}$) auf Ubichinon ($E^0 = +60\text{mV}$) übertragen. Das reduzierte Ubichinol diffundiert in der Membran zu Komplex III, der Cytochrom c Reduktase; bc_1 -Komplex, der je ein Elektron auf Cytochrom c ($E^0 = +220\text{mV}$) überträgt. Das reduzierte Cytochrom c wandert membranassoziiert zu Komplex IV, der Cytochrom c Oxidase, wo letztlich O_2 ($E^0 = +820\text{mV}$) zu H_2O reduziert wird. Pro über die Membran transportiertem Proton wird eine Energie ΔG^0 von ca. 20 kJmol^{-1} gespeichert. Die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat setzt unter physiologischen Bedingungen einen Energiegehalt ΔG^0 von etwa 60 kJmol^{-1} frei. Für die Synthese von einem Mol ATP ist somit der Rückfluß von etwa 3 Mol Protonen erforderlich (Boyer, 2001).

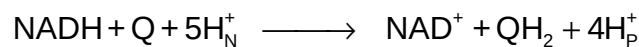
In Eukaryoten sind die vier Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung (Abb. 1) dualen genetischen Ursprungs. Die meisten ihrer Untereinheiten werden kernkodiert, an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert und posttranslational in die Mitochondrien transportiert. Sieben membranständige Untereinheiten des Komplex I, eine des Komplex III, drei des Komplex IV und zwei des ATPase-Komplexes werden jedoch vom mitochondrialen Genom kodiert und an mitochondrialen Ribosomen translatiert (Attardi und Schatz, 1988; Chomyn und Attardi, 1992). Insbesondere die mitochondrial kodierten membranständigen Untereinheiten sind genetisch hoch konserviert, was evolutionär betrachtet auf ein hoch effizientes System hinweist (Manchekar, 2006).

Die Kristallstrukturen der Atmungskomplexe III (Zhang et al., 1998; Xia et al., 1997; Lange und Hunte, 2000) und IV (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1996) sowie der ATP-Synthase (Abrahams et al., 1994; Meier et al., 2005) liegen mittlerweile vor und ermöglichen die Aufklärung ihrer molekularen Mechanismen. Der zunächst widersprüchlich erscheinende Q-Zyklus von Komplex III (von Jagow and Link, 1986; Link et al., 1993; Brandt and Trumpower, 1994; Croft and Berry, 1998), die Ein-Elektronen-Übertragung auf molekularen Sauerstoff an den Kupferzentren von Komplex IV (Saraste, 1990; Soulimane et al. 2000) sowie die Aufklärung der

Rotationskatalyse der ATP-Synthase (F_1 -Teil Abrahams et al., 1994; F_0 -Teil Meier et al., 2005) stellen Meilensteine der biochemischen Forschung dar (s. hierzu Kap. 2.3). Auch in der klinischen Forschung erhofft man sich daraus Aufschluß über Therapiemöglichkeiten für Krankheiten, die eng mit einem fehlerhaften Ablauf der oxidativen Phosphorylierung verbunden sind, wie glücklicherweise seltene neuromuskuläre und neuroendokrine Degenerationen (Ataxie, Cardiomyopathie) aber auch bestimmte Formen der Parkinsonschen Krankheit (Schapira, 1999; Wallace, 1999; Sato et al., 2006).

2.2 Komplex I, die protonenpumpende NADH-Ubichinon Oxidoreduktase

Die Atmungskette in Mitochondrien aber auch in vielen Bakterien beginnt mit der Oxidation von NADH zu NAD^+ und der damit verbundenen Reduktion von Ubichinon (Q) zu Ubichinol (QH_2). Gekoppelt wird diese Reaktion mit der Translokation von vier Protonen über die innere Mitochondrien- bzw. die Cytoplasmamembran. Katalysiert wird diese energetische Kopplung durch den Atmungskettenkomplex I, der protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase. Die Reaktion folgt der Gleichung:



N: negativ geladene Matrixseite; P: positiv geladener Intermembranraum

Nahe verwandte Formen des Komplex I kommen in der inneren Mitochondrienmembran der meisten Eukaryoten, der Cytoplasmamembran vieler Eukaryoten und Archaeobakterien und der Thylakoidmembran von Chloroplasten vieler Pflanzen vor (Friedrich und Scheide, 2000). Darüber hinaus enthalten Hydrogenosomen das NADH-Dehydrogenase Modul des mitochondrialen Komplex I (Hirdy et al., 2004).

Gut untersucht sind der mitochondriale Komplex I aus *B. taurus* (Fearnly und Walker, 1992) und aus *N. crassa* (Schulte und Weiss, 1997) sowie der bakterielle Komplex I aus *E. coli* (Friedrich et al., 1995) und *Paracoccus denitrificans* (Yagi, 1993).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Komplex I aus *E. coli* und *N. crassa* zeigen eine L-förmige Struktur, mit zwei etwa 25 nm langen Armen, die senkrecht aufeinander stehen (Hofhaus et al., 1991; Guénebaut et al., 1997 und 1998). Ein Arm ist in die Membran eingebettet (Membranarm), der andere ragt ins Cytoplasma bzw. in die mitochondriale Matrix (peripherer Arm). Der Winkel zwischen den beiden Armen des Komplexes ist variabel. Der *E. coli* Komplex zeigt bei niedrigen Salzkonzentrationen eine hufeisenförmige Struktur (Böttcher et al., 2002).

Der bakterielle Komplex I stellt mit 14-15 Untereinheiten die Minimalform des Enzyms dar (Weidner et al., 1993; Leif et al., 1993). Im eukaryotischen Komplex I kommen zusätzlich zu den Homologen dieser Untereinheiten bis zu 30 weitere sogenannte akzessorische Untereinheiten vor (Weiss et al., 1991; Walker, 1992; Schulte und Weiss, 1995; Buchanan und Walker, 1996; Videira und Duarte, 2001). Daher ergibt

sich für den eukaryotischen Komplex I eine annähernd doppelt so hohe molekulare Masse von etwa 1MDa gegenüber etwa 500kDa des bakteriellen Komplex I (Abb. 2). Sieben membranständige Untereinheiten des eukaryotischen Komplex I, die zusammen ca. 60 Transmembranhelices ausbilden sind mitochondrialgenetischen Ursprungs. Sie werden von den Genen ND1 bis ND6 und ND4L auf der mitochondrialen DNA kodiert und an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert. Alle anderen Untereinheiten des eukaryotischen Komplex I werden kernkodiert und posttranslational in die Mitochondrien importiert.

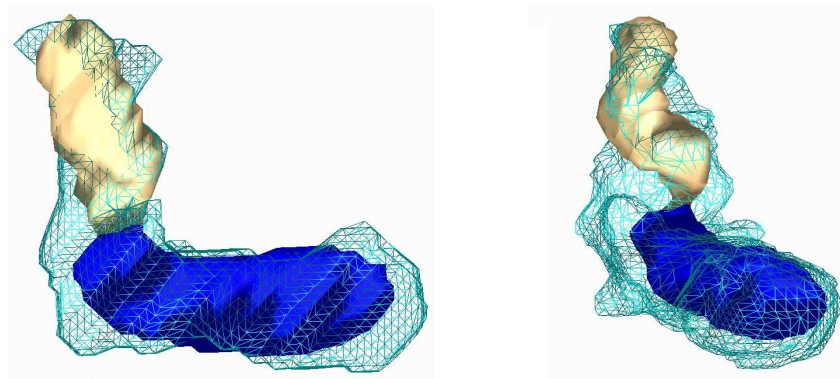


Abb. 2: Überlagerte Darstellung der dreidimensionalen Bilder von Komplex I aus *E. coli* (ausgefüllt) und *Neurospora crassa* (Drahtgitter). Die Bilder wurden aus Einzelpartikelanalyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen errechnet (Guénebaut et al., 1998). Der Membranarm ist dunkel, der periphere Arm hell dargestellt.

Die akzessorischen Untereinheiten spielen keine tragende Rolle im Elektronen- oder Protonentransfer. Vielmehr scheinen sie ein isolierendes Gerüst um die, den bakteriellen Untereinheiten homologen, essentiellen Grundeinheiten zu bilden. Vermutlich wirken sie als Abschirmung vor Elektronenverlust und vermeiden somit die Erzeugung von Sauerstoffradikalen (Robinson, 1998). Sie könnten jedoch auch als Andockstelle für andere Atmungskettenkomplexe bei der Bildung eines hoch effizienten katalytischen Superkomplexes dienen (Budde et al., 2000).

Zwei akzessorische Untereinheiten werden im Zusammenhang mit anabolen Stoffwechselwegen diskutiert. Eine 9,6 kDa Untereinheit wurde als Acylcarrier-Protein (ACP) mit einer Phosphopantotheingruppe als Cofaktor identifiziert. Diese Untereinheit scheint bei der Biogenese des Komplex I eine Rolle zu spielen (Schneider et al., 1995). Es gibt Diskussionen, ob das ACP auch an der mitochondrialen Fettsäuresynthese beteiligt ist (Mikolajczyk et al., 1990; Yagi et al., 2003). Eine 40 kDa periphere Untereinheit zeigt Verwandtschaft zu Reduktase-Isomerasen und besitzt ein festgebundenes NADPH (Fearnly und Walker, 1992;

Zensen et al., 1992). Andere Untereinheiten werden im Zusammenhang mit der Regulierung der Komplex I Aktivität diskutiert. Die Phosphorylierung der AQDQ-Untereinheit des *B. taurus* Komplex I steigert die Enzymaktivität (Scacco et al., 2000). Eine äquivalente 21 kDa Untereinheit wurde in *N. crassa* identifiziert (Ferrinha et al., 1999). Des Weiteren wurde die Ähnlichkeit zwischen der 9,8 kDa Untereinheit von *N. crassa* bzw. der MWFE Untereinheit in *B. taurus* mit einem Teil einer Untereinheit des bakteriellen Na⁺-transportierenden Komplex I festgestellt (Marques et al., 2003).

Die NADH-Bindestelle sowie alle bekannten Redoxgruppen des Komplex I befinden sich im peripheren Arm des Enzyms (Hinchcliff und Sazanov, 2005). Bei den redoxaktiven Gruppen handelt es sich um ein Flavinmononukleotid (FMN) und acht bei Eukaryoten bzw. neun bei Prokaryoten Eisenschwefelzentren (FeS-Zentren). In *N. crassa* wurden durch ESR-Spektroskopie die FeS-Zentren N-1, N-2, N-3 und N-4 (Wang et al., 1991) und durch UV-VIS-Spektroskopie die FeS-Zentren N-6a und N-6b nachgewiesen (Rasmussen et al., 2001). Der Komplex I aus *B. taurus* enthält zwei zweikernige FeS-Zentren N-1a und N-1b (Onishi, 1979; Uhlmann und Friedrich, 2005). Darüber hinaus konnte in *B. taurus* ein weiteres vierkerniges FeS-Zentrum N-5 (Djafarzadeh et al., 2000) nachgewiesen werden und in *E. coli* sogar das vierkernige FeS-Zentrum N7 (Nakamaru–Ogiso et al., 2005). Im mitochondrialen Komplex I scheint dieses N-7 zu fehlen.

Die Bindung und Reduktion des Ubichinon findet im Membranarm des Enzyms statt (Friedrich et al., 1990). Es werden zwei Ubichinon-Bindestellen diskutiert, da zwei Klassen von Hemmstoffen, kompetitive wie Piericidin und nicht-kompetitive wie Rotenon, an der Ubichinonreduktion angreifen (Friedrich et al., 1994). Aufgrund der hohen Potentialspanne zwischen dem redoxpositivsten letzten FeS-Zentrum N-2 mit einem Mittenredoxpotential von $E_{m,7} = -160\text{mV}$ und dem Ubichinon mit $E_{m,7} = +60\text{mV}$ wird eine zusätzliche Redoxgruppe postuliert, da eine Umkehr des Elektronenweges ohne diese nicht möglich wäre (Gutman et al., 1972). UV/VIS und FT-IR spektroskopische Untersuchungen weisen auf das Vorhandensein einer chinoiden Gruppe mit einem Redoxpotential von etwa -80mV hin (Schulte et al., 1998; Abelmann 2000; Friedrich et al., 2000).

Die Struktur des peripheren Arms wurde dieses Jahr durch Röntgenbeugung mit einer Auflösung von $2.8 \text{ \AA}$ identifiziert (Sazanov und Hinchcliff, 2006). Die Struktur bestätigt und ergänzt die spektroskopischen Daten (Abb. 3). Der periphere Arm

besitzt eine Y-förmige Struktur mit einer Höhe von 140Å. Der gesamte Elektronenweg bis zum FeS-Zentrum N-2 ist 84Å lang. Der Abstand zum Membranarm beträgt etwa 15Å.

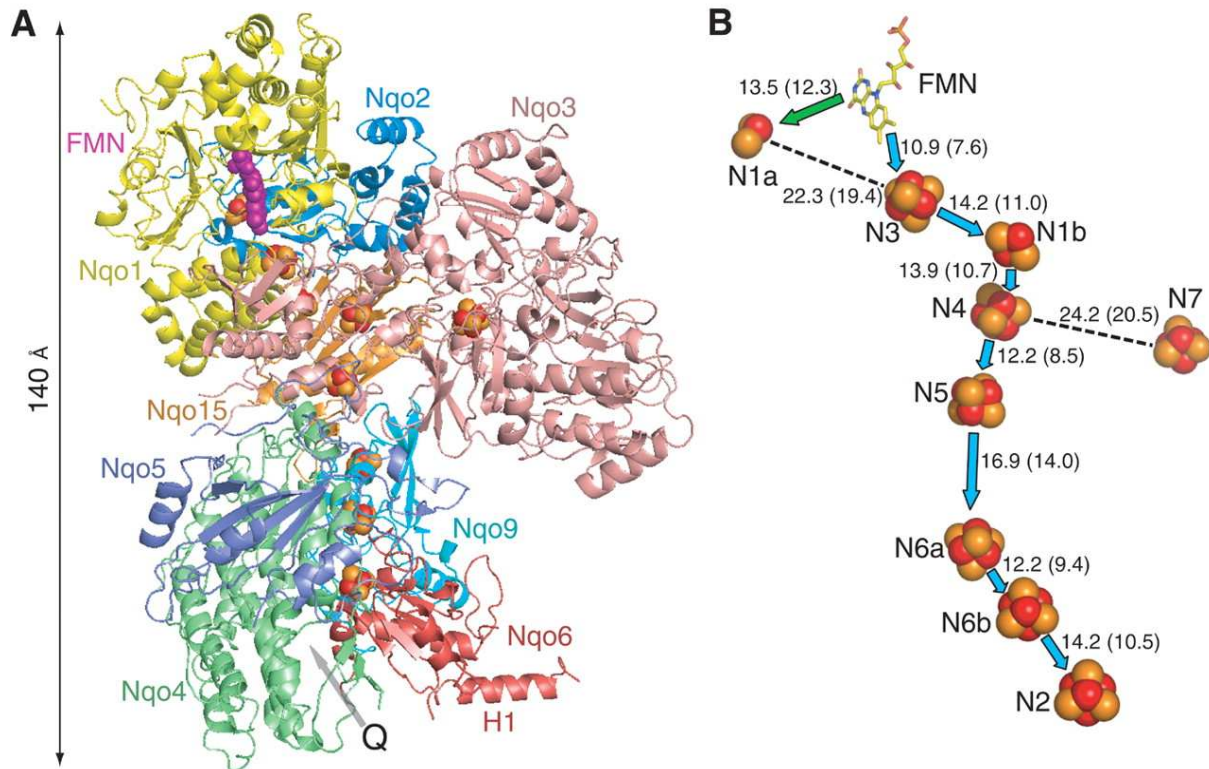


Abb. 3: A: Kristallstruktur des peripheren Arms von Komplex aus *T. thermophilus*. Proteinogene Untereinheiten sind als Bänderstrukturen dargestellt, Redoxgruppen als eingelagerte Kugeln (FMN: violett; FeS-Zentren: gelb-rot). Die vermutliche Ubichinon-Bindestelle ist durch ein Q markiert. B: Elektronenweg entlang des FMN und der 8 FeS-Zentren durch den peripheren Arm.

In der Nähe des FMN befindet sich eine dem Lösungsmittel zugängliche NADH-Bindestelle. Der Elektronentransfer erfolgt von NADH über die FeS-Zentren N-3, N-1b, N-5, N-6a und N-6b auf N-2, von wo auf noch immer ungeklärtem Weg die Übertragung auf Ubichinon stattfindet. An der Schnittstelle zwischen peripherem und Membranarm konnte eine amphipathische α -Helix H1 identifiziert werden, die eine hydrophile und eine hydrophobe Seite besitzt, und vermutlich den Kontakt zwischen beiden Armen und damit auch die Elektronenweiterleitung bewerkstelligt. N-1a könnte in Kooperation mit dem nahen FMN als Radikalfänger wirken. Flavine sind bekannt für ihre Neigung zur Radikalbildung. Die Hypothese wird durch einen dem N-1a nahen Cys-Rest (Cys182) gestützt, einem redoxsensitiven Thiol, das nur 6Å vom FMN entfernt ist. Das Eisenschwefelzentrum N-7 ist zu weit vom Elektronenweg

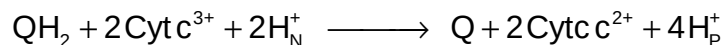
entfernt um Bestandteil dessen zu sein. Es dient vermutlich der strukturellen Stabilisierung.

Fraglich ist nach wie vor die Art der Energiekopplung. Die Diskussion hierzu lässt sich in zwei große Lager teilen. Das Eine geht von einer direkten, redoxgetriebenen Kopplung aus, das Andere von einer indirekten, durch Konformationsänderung hervorgerufenen Energieübersetzung. Für beide Annahmen gibt es strukturelle Hinweise. Das FeS-Zentrum N-2 ist pH-abhängig, was auf eine direkte Redoxkopplung hinweist. Auch seine von polaren Aminosäureresten geprägte Proteinumgebung stützt diesen Ansatz. Andererseits sprechen die ermittelten Abstände zwischen den Redoxgruppen und die hohen Beweglichkeitsgrade ihrer proteinogenen Untereinheiten für den indirekten Mechanismus via Konformationsänderung. Das Verhältnis von zwei transportierten Protonen pro einem geflossenen Elektronen lässt auch eine Kombination der beiden Annahmen möglich erscheinen.

2.3 Mechanismen der anderen Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung

2.3.1 Mechanismus von Komplex III

Komplex III, auch Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase oder Cytochrom-bc₁-Komplex genannt, koppelt den Transfer von zwei Elektronen von Ubichinol (QH₂) zum Cytochrom c mit dem Transfer von vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum nach folgender Reaktion:



N: negativ geladene Matrixseite; P: positiv geladener Intermembranraum

Die Röntgenstruktur des Enzyms aus Rind (Xia et al., 1997; Iwata et al., 1998), Huhn (Zhang et al., 1998) und Hefe (Lange and Hunte, 2000) liegen mittlerweile vor. Komplex III ist ein Dimer, dessen monomerer Teil aus je elf verschiedenen Untereinheiten besteht. Zu den redoxaktiven Untereinheiten gehören die Cytochrome b und c₁ und ein Eisen-Schwefel-Protein, das nach seinem Entdecker benannte Rieske-Protein (Abb. 4) (Leggate, 2005).

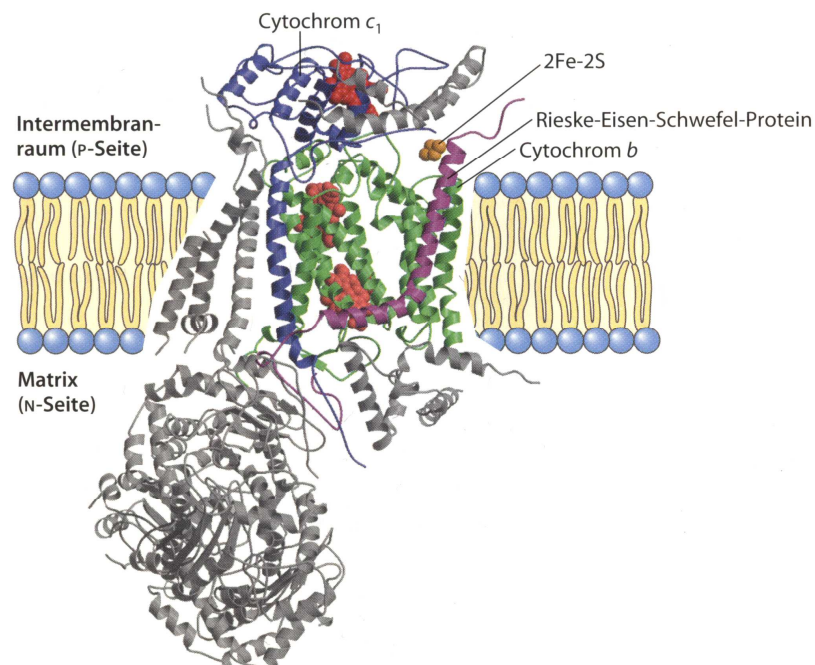


Abb. 4: Kristallstruktur eines Komplex III Monomers aus Hefe. Der funktionelle Kern besteht aus 3 Untereinheiten: Cytochrom b (grün) mit seinen Hämen b_L und b_H (hellrot); Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (violett) mit seinem Häm (rot); Cytochrom c₁ (blau) mit seinem Häm (rot) (Abb. aus Lehninger, „Biochemistry“ 3. Auflage).

Das membranständige Cytochrom b trägt die Hämzentren b_H (engl. high potential) und b_L (low potential), die in einem Bündel von Transmembranhelices eingelagert sind. Cytochrom b besitzt zwei Bindestellen für Ubichinol, ein Ubichinol-Oxidationszentrum Q_o (engl. output) auf der Intermembranseite und ein Ubichinol-Reduktionszentrum Q_i (input) auf der Matrixseite. Q_o und Q_i sind über die Häm-b-Zentren „elektrisch“ verbunden. Ebenfalls auf der Intermembranseite sitzt das Cytochrom c_1 mit seiner Häm- c_1 -tragenden Domäne nahe dem Eisen-Schwefel-Zentrum des Rieske-Proteins.

Komplex III überträgt die von Ubichinol gelieferten Elektronen via Eisen-Schwefel-Zentrum auf Cytochrom c und transportiert gleichzeitig zwei Protonen über die innere Mitochondrienmembran (Abb. 5). Initial dockt Ubichinol an das Q_o -Zentrum an. Hier gibt es eine „Weggabelung“: Ein erstes Elektron von Ubichinol wird via Fe_2S_2 und Häm c_1 auf die Hämgruppe eines ersten Cytochrom c Moleküls transferiert. Dabei entsteht am Q_o -Zentrum ein Ubisemichinonmolekül ($Q \cdot^-$), das unter Abgabe eines weiteren Elektrons zum Ubichinon (Q) reduziert wird. Dieses Elektron fließt nun über Häm b_L und Häm b_H zum Q_i -Zentrum an der Matrixseite. Dort ist ein Ubichinonmolekül (Q) gebunden, das das zweite Elektron „parkt“. Damit ist der 1. Halbzyklus abgeschlossen.

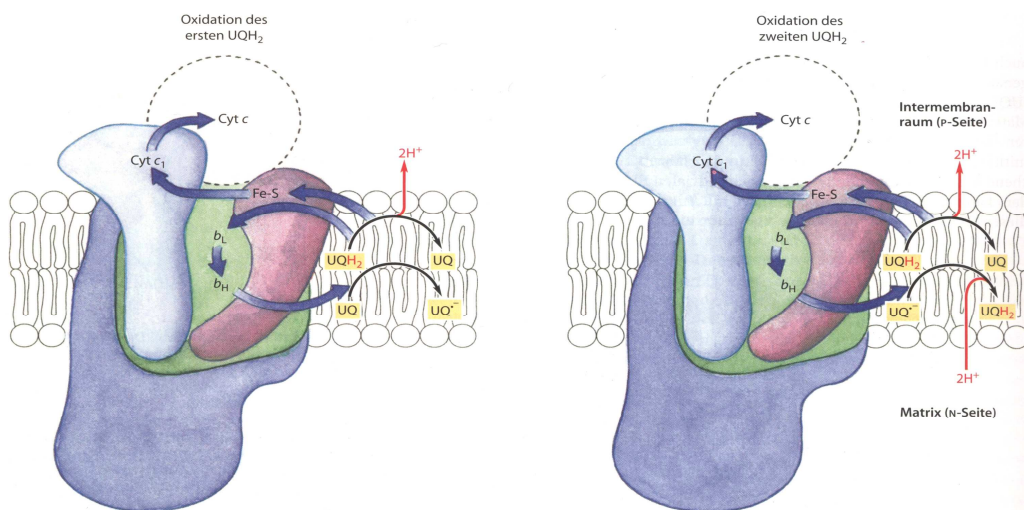


Abb. 5: Mechanismus des Q-Zyklus. Der Weg der Elektronen ist durch blaue Pfeile dargestellt; UQ: Ubichinon; UQH_2 : Ubichinol; $UQ \cdot^-$: Ubisemichinon. Pro Halbzyklus wird ein Cyt c reduziert und zwei Protonen über die innere Mitochondrienmembran transportiert. Die Farbgebung der Untereinheiten ist analog zu der Bänderfarbe in der Kristallstruktur in **Abb. 4** (Abb. aus Lehninger „Biochemistry“, 3. Auflage).

Nun bindet ein zweites Ubichinol am Q_o -Zentrum und verteilt seine beiden Elektronen auf die beiden Wege: Ein Elektron reduziert ein weiteres Cytochrom c; das andere nimmt seinen Weg von Q_o über b_L und b_H und trifft auf das „geparkte“ Elektron im

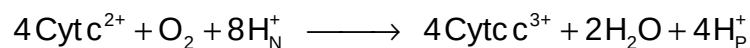
Semichinon ($Q \cdot^-$). Unter Aufnahme von zwei Protonen aus dem Matrixraum wird schließlich am Q_i -Zentrum ein Ubichinol (QH_2) regeneriert, das in die innere Mitochondrienmembran entlassen wird.

In diesem so genannten Q-Zyklus wird netto ein Molekül Ubichinol zu Ubichinon oxidiert und dabei zwei Protonen auf die Intermembranseite transferiert. Diese Protonen werden nicht „gepumpt“. Vielmehr bewerkstelligt ein Elektronenrecycling über die Membran den Ladungstransport.

Die beiden Elektronen des Ubichinols werden letztlich auf Cytochrom c, ein kleines evolutionär hoch konserviertes wasserlösliches Protein im Intermembranraum, übertragen, das die Verbindung zwischen Komplex III und IV herstellt.

2.3.2 Mechanismus von Komplex IV

Komplex IV, auch Cytochrom-c-Oxidase genannt, überträgt insgesamt vier Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff unter der Bildung von Wasser und pumpt während dieses Vorganges vier Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Der Reaktion liegt folgende Gleichung zugrunde:



N: negativ geladene Matrixseite; P: positiv geladener Intermembranraum

Die Kristallstrukturen des Enzyms aus *Thermus thermophilus* (Soulimane, 2000), *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995; Ostermeier et al., 1997) sowie aus *Bos taurus* (Tsukihara, 1996; Yoshikawa et al. 1998) liegen vor. Die mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase ist ein komplexes Membranprotein aus 13 Untereinheiten, wobei die drei größten (UE1-3) vom mitochondrialen Genom kodiert werden. Die Untereinheit UE1 trägt die zwei Redoxzentren, Häm a und ein binucleares Zentrum aus Häm a_3 und Cu_B , während UE2 das Redoxzentrum Cu_A mit zwei Kupferionen trägt (Abb. 6).

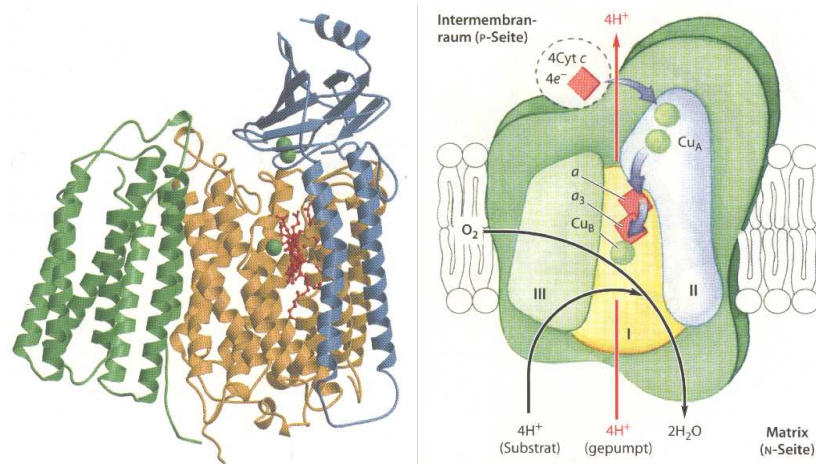


Abb. 6: Kristallstruktur und daraus abgeleiteter Mechanismus von Komplex IV. Das funktionelle Zentrum besteht aus 3 Untereinheiten. UE1 (gelb) weist die beiden Häme a und a_3 auf (rot), sowie ein Kupferion (grün). Häm a_3 und Cu_B bilden ein zweikerniges Fe-Cu-Zentrum. UE2 (blau) enthält zwei Cu_A -Ionen (grün), die durch Cys-Reste komplexiert werden (Rieske-Protein). Die Funktion von UE 3 (hellgrün) ist noch unklar (Abbildung verändert nach Lehninger „Biochemistry“, 3. Auflage).

Die Bindestelle für Cytochrom c befindet sich in der Nähe des Cu_A -Zentrums im Intermembranraum. Dort dockt der mobile Überträger Cytochrom c an und überträgt ein Elektron via Cu_A -Zentrum auf Häm a. Von dort wird es zum binuklearen Häm a_3 / Cu_B -Zentrum und von hier auf Sauerstoff geleitet. Unter Aufnahme von vier „chemischen“ Protonen aus der Matrix entstehen dabei zwei Wassermoleküle. Gleichzeitig werden vier „Pump“-Protonen über einen bislang noch nicht vollständig aufgeklärten Weg von der Matrix- zu Intermembranseite transportiert (Babcock und Wickström, 1992; Rottenberg, 1998).

Von Interesse ist die Aufklärung des Mechanismus der Sauerstoffreduktion am binuklearen Zentrum des Enzyms. Zunächst reduziert das von einem ersten Cytochrom c angelieferte Elektron Cu^{2+} zu Cu^+ . Ein weiteres Molekül Cytochrom c liefert ein zweites Elektron zur Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} ; damit ist das Häm a_3 / Cu_B -Zentrum vollständig reduziert. Nun bindet O_2 an das binukleare Zentrum und reoxidiert die beiden Metallzentren. Formal entsteht dabei ein gebundenes Peroxid anion O_2^{2-} ; tatsächlich liefert aber ein benachbarter Tyrosinrest ein drittes Elektron an, sodass das Sauerstoffmolekül augenblicklich gespalten wird. Bei diesem Vorgang fällt ein Sauerstoffatom in vollständig reduzierter Form an (OH^-), während das zweite unter Bildung eines Oxoferryintermediats ($Fe=O^{2+}$) an Häm a_3 bindet. In diesem Komplex nimmt das Eisenatom die ungewöhnliche Oxidationsstufe +4 an. Das Elektron des dritten Cytochrom c reduziert dann das Tyrosylradikal. Schließlich reduziert das Elektron des vierten Cytochrom c das Fe^{4+} -Ion im Häm a_3 zu Fe^{3+} ; das zweite, nun vollständig reduzierte Sauerstoffatom bleibt als OH^- an diesem Zentrum

gebunden. Die beiden zunächst noch im binuklearen Zentrum verbliebenen Hydroxylgruppen werden nach Aufnahme von zwei Protonen – vermutlich erst im nächsten Reaktionszyklus – als Wassermoleküle in den Matrixraum abgegeben (Soulimane et al., 2000).

Netto überträgt Komplex IV also vier Elektronen von vier Molekülen Cytochrom c auf ein Molekül O_2 , das zu zwei Molekülen H_2O reduziert wird; dabei werden vier „chemische“ Protonen benötigt. Gleichzeitig werden vier „gepumpte“ Protonen durch Kanäle, die am binuklearen Zentrum der UE1 vorbeiführen, von der Matrix in den Intermembranraum transportiert. Ein bemerkenswerter Aspekt bei der Sauerstoffreduktion ist das „Vorladen“ des binuklearen Zentrums mit zwei Elektronen und die Bereitstellung eines dritten Elektrons aus einem benachbarten Tyrosylrest. Damit werden die Superoxid- und Peroxidstufe des Sauerstoffs praktisch übersprungen und die Freisetzung von partiell reduziertem Sauerstoff in Form eines Superoxidanions $O_2^{\cdot-}$ oder als Hydroperoxylradikal $HO_2^{\cdot}$ effektiv verhindert (Michel et al., 1998). Diese reaktiven Sauerstoffspezies sind stark cytotoxisch. Der heutige Komplex IV stellt somit die evolutive Quintessenz eines Enzyms dar, das eine äußerst gefährliche aber doch absolut notwendige Reaktion für die aerobe Zelle überhaupt erst als Lebensgrundlage nutzbar macht.

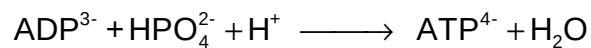
2.3.3 Mechanismus der ATP-Synthase

Die ATP-Synthase ist ein ca. 500kDa großer membranständiger Proteinkomplex aus zwei Segmenten: Ein F_1 -Teil, an dem die ATP-Synthese abläuft, ragt kugelförmig in den Matrixraum hinein, während der F_0 -Teil in die innere Mitochondrienmembran integriert ist. Von beiden Teilen liegen Kristallstrukturen vor (F_1 -Teil aus *Bos taurus*: Abrahams et al., 1994; F_0 -Teil aus *Ilyobacter tartaricus*: Meier et al., 2005) (Abb. 7).

Der F_1 -Teil von Säuger-ATP-Synthasen umfasst fünf verschiedene Untereinheiten: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Der F_0 -Teil besteht aus elf verschiedenen Untereinheiten wobei die Untereinheiten a_1c_{10} einen zentralen Protonenkanal bilden und b_2OSCP_1 , (OSCP: engl. Oligomycin sensitivity conferring protein) den F_1 - und den F_0 -Teil verbindet. Fließen nun Protonen an einem kritischen Aspartatrest der c-Untereinheiten vorbei, so lösen sie eine Drehbewegung des c_{10} -Rings von F_0 in der mitochondrialen Membran aus. Zusammen mit den matrixseitig fixierten Untereinheiten $\gamma\delta\epsilon$ von F_1 bildet dieser Ring einen Rotor. Als Stator dienen die asymmetrisch befestigten

Untereinheiten a, b und OSCP, die das Mitdrehen des über den Rotor gestülpten $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers verhindern. Die Rotation der konisch zulaufenden γ -Untereinheit im Zentrum des Hexamers bewirkt periodische Konformationsänderungen in den katalytischen Zentren an den Grenzflächen der drei $\alpha\beta$ -Dimere, die letztlich die Energie zur ATP-Synthese liefern. Mit einem Durchmesser von ca. 10 nm ist Komplex V der kleinste bisher identifizierte Motor. Er arbeitet mit einem Wirkungsgrad von nahezu 100% (Boyer, 1997; Bianchet et al., 1998).

Die ATP-Synthase Aktivität von F_1 katalysiert die Synthese von ATP aus ADP und P_i . Dabei wird sie von der protonenmotorischen Kraft des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran angetrieben. Die katalysierte Reaktion folgt der Gleichung:



Wie funktioniert nun die Kopplung von energiekonservierendem Protonengradient und endergoner ATP-Synthese? Im F_1 -Hexamer verfügen die drei β -Untereinheiten über je ein aktives Zentrum. Diese nehmen drei unterschiedliche Konformationen ein, wobei jede nur einmal pro Enzymkomplex vorkommt: O = offener Zustand; L = lose Bindung; T = feste Bindung (engl. tight). Die Reaktionstriade startet im L-Zustand mit der Bindung von ADP und P_i . In der folgenden T-Konformation erfolgt die Kondensation von ADP und P_i zu ATP unter Knüpfung der Phosphodiesterbindung. Schließlich setzt der O-Zustand das Produkt ATP frei, geht dann in den L-Zustand über und startet damit die nächste Syntheserunde. Durch den Protonengradienten angetrieben rotiert der „Nanomotor“ und überführt mit seiner asymmetrischen γ -Komponente eine β -Untereinheit vom T- in den O-Zustand. Durch die strikte Kooperativität der aktiven Zentren wird mit dem T-O-Übergang gleichzeitig an den benachbarten β -Untereinheiten ein L-T bzw. O-L-Übergang induziert. Nach dreimaliger Drehung des γ -Rotors um jeweils 120° ist der Ausgangszustand wie der erreicht: Jede β -Untereinheit hat dabei drei Zustände durchlaufen und jeweils ein Molekül ATP synthetisiert (Kinosita et al. 1998; Khan, 1997; Sambongi et al., 1999). Der protonengetriebene Zyklus der O-, L- und T-Zustände erlaubt somit eine kontinuierliche Produktion. Pro Umlauf entstehen drei Moleküle ATP. Unter der Annahme, dass der Rotor pro zurückgeflossenen Proton um eine von zehn c-Untereinheiten weiterdreht (Junge et al. 1997), fließen im Mittel $3 \frac{1}{3}$ Protonen pro

Molekül synthetisiertem ATP vom Intermembranraum in die Matrix zurück (Hinkle et al., 1991).

Die Lösung der Struktur des Enzyms sollte klären, wie eine chemische Reaktion mechanisch angetrieben werden kann. Der Trick der Natur besteht darin, dass die mit der Drehbewegung des γ -Rotors einhergehenden Konformationsänderungen der β -Untereinheiten neu synthetisiertes, fest gebundenes ATP aus seiner Bindungstasche regelrecht herausdrücken (O-Zustand). Die zweite Konformation (L-Zustand) schließt H_2O aus der Bindungstasche des aktiven Zentrums aus und begünstigt somit die Bildung der Phosphorsäureanhydridbindung zwischen ADP und P_i . Schließlich besitzt die dritte Konformation (T-Zustand) eine weitaus höhere Affinität für ATP als für ADP und P_i und senkt dadurch die Gleichgewichtskonstante der Reaktion auf nahezu eins, d.h. Substrate und Produkte liegen unter Standardbedingungen äquimolar vor. Zunächst „zahlt“ also die Proteinumgebung des aktiven Zentrums einen energetischen Preis für die Synthese, der ihr dann durch mechanisches Aufbrechen der Wechselwirkungen zum Produkt der Reaktion zurückerstattet wird (Weber und Senior, 1997; Walker, 1998; Stock et al. 1999). Die strikte Kooperativität zwischen aktiven Zentren von F_1 verhindert einen „Leerlauf“ des Systems bei niedrigen ADP-Konzentrationen (Skou, 1998).

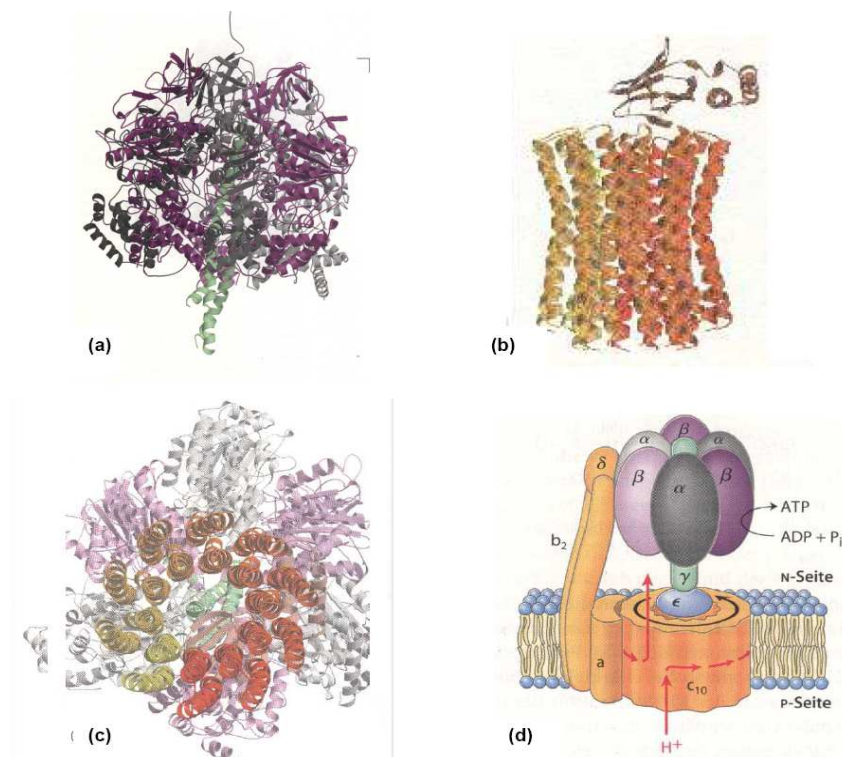


Abb. 7: (a) Kristallstrukturen des F_1 - Teils aus Rindermitchondrien und (b) des F_0 -Teils aus Hefemitchondrien. (c) Sicht von unten entlang des F_0 -Teils in Richtung F_1 - Teil (in silico zusammengefügtes System). (d) Schematische Darstellung des zusammengesetzten Motors (Abb. verändert nach Lehninger „Biochemistry“, 3. Auflage).

2.4 Modelle der Energieübertragung in Komplex I

Im Verlauf der letzten Jahre wurden verschiedene Modelle zur Funktionsweise des Komplex I entwickelt. Diese sollten drei Kriterien erfüllen: a) Der Mechanismus muß reversibel sein, b) es müssen vier Protonen pro oxidiertem NADH über die Membran transportiert werden und c) der vorgeschlagene Weg muß effizient sein, so daß keine NADH-Oxidation ohne Protonentranslokation stattfinden kann (Osyczka, 2004). Da bislang wenig experimentelle Hinweise auf den tatsächlichen Mechanismus von Komplex I existieren, basieren die Vorschläge größtenteils auf den Erkenntnissen, die aus der Struktur-Funktions-Korrelation anderer großer membranständiger Enzyme gewonnen werden konnten.

Im Grunde lassen sich die Denkansätze in zwei Richtungen einteilen, in einen direkten Kopplungsmechanismus zwischen Elektronentransfer und Protonentranslokation, und in eine mehr oder weniger große konformationelle Umorientierung des Enzyms während dieses Vorgangs.

Die direkte Kopplung kann entweder über Chinone erfolgen (Vinogradov, 2001; Steuber, 2002) oder mit Hilfe einer Art Q-Zyklus (Brandt, 2006). Bei der indirekten Energieübertragung erfolgt die konformationelle Umorientierung des Proteins vermutlich im membranständigen Teil des Enzyms (Ohnishi, 2005). Auch eine Kombination aus beiden Wegen wird diskutiert (Friedrich, 2001).

In direkt gekoppelten Mechanismen ist die Protonentranslokation auf engem Raum mit dem Elektronenweg verknüpft. Um ein geladenes Proton über die hydrophobe Membran zu transportieren wird die positive Ladung durch ein Elektron kompensiert, und so die elektrische Feld Barriere minimiert. Diese Reaktion findet meist in enger Nachbarschaft zu hydrophoben Bereichen des Proteins oder der umgebenden Membran statt. Hierbei wird Ubichinol als mobiler Protonen/Elektronen-Carrier genutzt. Beim indirekt gekoppelten Mechanismus hingegen ist der Elektronentransfer räumlich weit vom Ort der Protonenübertragung entfernt. Die Energie wird durch Interaktion mit der Proteinstruktur über lange Wege übertragen.

2.4.1 Q-Zyklus Theorie

Dutton et al. (1998) sowie Steuber (2002) und Brandt (2006) schlagen vor, daß Komplex I nach einem zum bc_1 -Komplex reversen Q-Zyklus funktioniert und das FMN sowie die FeS-Zentren nur als Elektronenlieferanten dienen. Diese Theorie

würde jedoch nur zwei gepumpte Protonen pro oxidiertem NADH erklären, die Herkunft der restlichen zwei transportierten Protonen bleibt somit fraglich (Abb. 8). Des Weiteren würde während des Q-Zyklus ein Semichinonradikal entstehen, vermutlich gekoppelt an das FeS-Zentrum N2. Dies konnte jedoch bisher nicht beobachtet werden. Auch fehlen nach wie vor eindeutige Hinweise auf einen Cofaktor im membranständigen Teil des Enzyms, der den Elektronentransfer zwischen den Q-Bindestellen bewerkstelligen könnte (Osyczka, 2004). Über den hier vorgestellten Mechanismus hinaus sind noch weitere Varianten des Q-Zyklus in der Diskussion. Da diese jedoch noch weniger Verwandtschaft zu bislang bekannten Systemen der Energieübertragung aufweisen, bleiben sie sehr spekulativ.

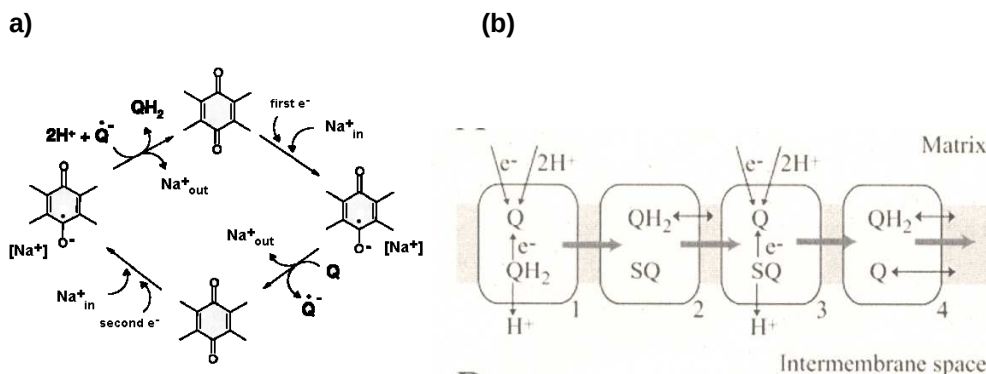


Abb. 8: (a) Komplex I (NDH I) in *Klebsiella pneumoniae* arbeitet als Na⁺-Pumpe. Durch den vorgeschlagenen Q-Zyklus kann jedoch nur die Translokation von zwei statt tatsächlichen vier Protonen erklärt werden (nach Steuber, 2002). (b) Der reverse Q-Zyklus in Analogie zum Mechanismus des bc₁-Komplex kann auch nur den Pumpvorgang von zwei Protonen pro oxidiertem NADH nachweisen (nach Brandt, 2006). (1) Das Ubichinol übernimmt ein Elektron vom FeS-Zentrum N2 und ein Elektron vom Ubichinol (reverser Q-Zyklus Gabelungsschritt); (2) Die Ubichinol-Stelle wird durch neues Ubichinon eingenommen; (3) Wiederholung von (1) um cytoplasmatisches Q zu regenerieren; (4) QH₂ und Q werden ausgetauscht um die Startposition wieder zu erreichen.

2.4.2 Reduktion und Oxidation von FeS-Zentrum N2

Das FeS-Zentrum N2 wird schon lange im Zusammenhang mit dem Protonen-Pump Mechanismus von Komplex I diskutiert. Seine Lage am Ende des peripheren matrix-ständigen Teils von Komplex I, nahe dem Membranarm des Enzyms, prädestiniert es geradezu als direkter Elektronendonator Ubichinon zu reduzieren und gleichzeitig den Protonentransport über die nahe gelegene Membran zu kontrollieren. Das Reduktionspotential von N2 ist pH-abhängig, ein Hinweis auf eine mögliche Protonenaufnahme bzw. -abgabe (Ingledew, 1980; Ohnishi, 1979), und es reagiert auf Veränderungen im umgebenden Membranpotential (Ohnishi, 1976 und 1979). Bislang ist jedoch unklar ob die pK_{ox} und pK_{red} Werte, die mit einer Reduktion bzw.

Oxidation des N_2 einhergehen, weit genug auseinander liegen, um eine effiziente Protonenpumpe zu bilden.

FT-IR spektroskopische Studien an Komplex I aus *E. coli* haben ergeben, daß mit einer Änderung des Oxidationsstatus von N_2 auch eine große Zahl von Aminosäureresten ihren Protonierungsgrad ändern. Damit könnte eine redoxgekoppelte konformationelle Umorientierung des Enzyms einhergehen (Hellwig, 2000; Flemming 2003) (Abb. 9).

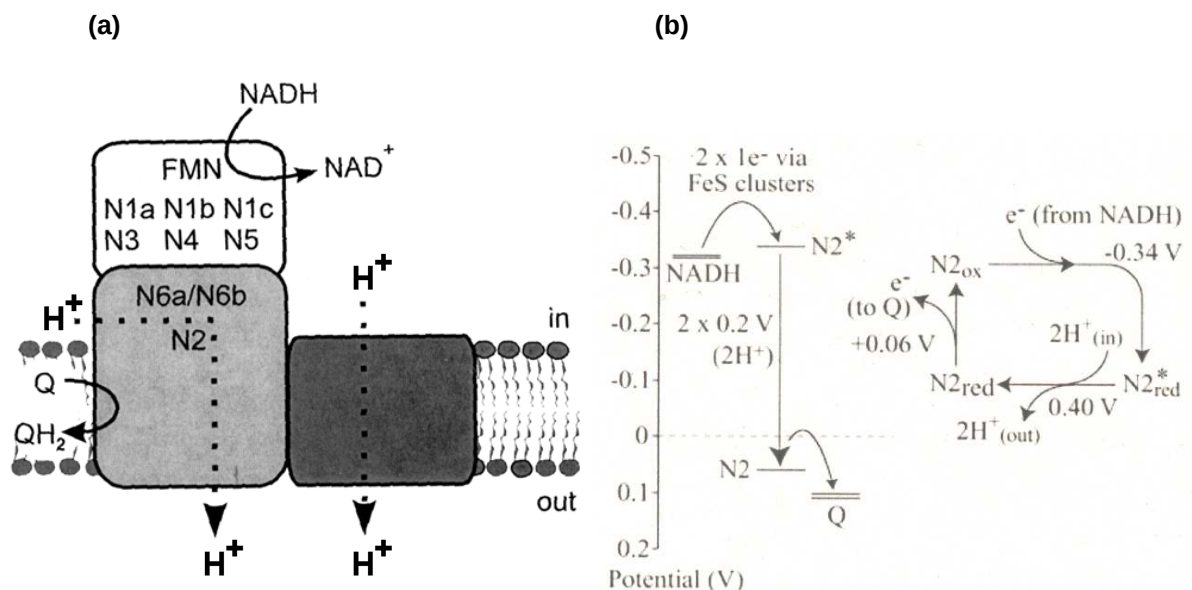


Abb. 9: (a) Möglicher Energiekopplungsmechanismus nach Friedrich (2001). Die Reduktion von N_2 führt neben einer direkten Protonentranslokation zu einer konformationellen Strukturänderung im membranständigen Teil des Enzyms wodurch pro ein geflossenes Elektron ein zusätzliches Proton über die Membran transportiert wird. (b) Schema der Energiekopplung am FeS-Zentrum N_2 (nach Hirst, 2005). Der Elektronenfluß von NADH -0.34 V über N_2 hin zu Ubichinon (Q) $+0.06$ V liefert das für eine Translokation von zwei Protonen erforderliche Redoxpotential von 0.40 V.

2.4.3 Indirekt gekoppelter Protonentransport

In Komplex I übernimmt ein langer Elektronen“zulauf“ aus FMN und FeS-Zentren den Energietransfer zwischen dem hydrophilen und dem hydrophoben Bereich des Enzyms. Daher war lange nicht klar, warum Komplex I überhaupt einen indirekten Mechanismus der Energiekopplung besitzen sollte. Auch ist nicht jede konformationelle Änderung mit einem indirekten Kopplungsmechanismus verknüpft. Während des Q-Zyklus im bc_1 -Komplex tritt auch eine konformationelle Umorientierung bei der Weggabelung des Elektronentransfers auf, die jedoch keine energetische Kopplung bedeutet (Zhang, 1998).

Im Zusammenhang mit Komplex I wird von verschiedenen Konformationsänderung berichtet. Eine Hufeisen-Form unter Hochsalzbedingungen (Böttcher, 2002) wurde von anderen Arbeitsgruppen jedoch in Frage gestellt (Sazanov, 2003). Ebenso wird eine „Öffnung“ der NADH-Bindestelle (Mamedova, 2004) heute angezweifelt. Auch Änderungen im cross-linking sowie Trypsinolyse der hydrophilen Untereinheiten nach Reaktion mit NADH-Substraten (Yamaguchi, 1998) bleiben uneindeutig. Eine konformationelle Umstrukturierung findet auch bei dem Ansatz von Ohnishi (2005) (Abb. 10) statt. Ein Elektron von NADH erreicht auf seinem Weg durch Komplex I einen chinoiden Cofaktor, eventuell gekoppelt an N2, der daraufhin zwei Protonen an der matrixständigen Membranseite aufnimmt. Er ändert seine räumliche Orientierung und gibt die beiden Protonen zur anderen Membranseite hin ab. Nach zwei Durchläufen wurden somit vier Protonen gepumpt. Die Elektronen werden mit zwei weiteren chemischen Protonen aus der Matrix auf ein freies Ubichinon übertragen.

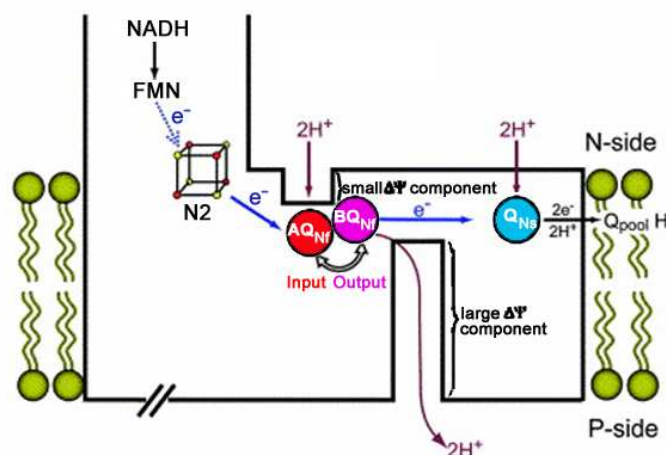


Abb. 10: Modell der Energieübertragung nach Ohnishi (2005). Über einen chinoiden Cofaktor (AQ_{NF}) werden pro geflossenes Elektron zwei Protonen gepumpt. Zunächst wird eine kurze Potentialdifferenz von den Protonen durch den nahen Elektronenfluß bewältigt. Hiernach strukturiert sich die proteinogene Umgebung des Cofaktors um (BQ_{NF}), so dass die Protonen zwangsläufig den Weg der langen Potentialspanne als Ausgang nehmen müssen.

All diesen Theorien gemein ist die Tatsache, daß es einer Lösung der Proteinstruktur bedarf um endlich Klarheit zu schaffen. Die Hinweise aus spektroskopischen Daten auf den Mechanismus von Komplex I sind rar. Einzig und allein die Röntgenstrukturanalyse mit ihrer atomaren Auflösung der Proteinstruktur kann Erkenntnisse über die Wirkungsweise dieses gigantischen Komplexes liefern. Die bisherige Ratlosigkeit der Interessenten läßt auf ein umso verblüffenderes Ergebnis hoffen.

2.5 Röntgen-Kristallographie

2.5.1 Warum Röntgenbeugung am Kristall zur Strukturanalyse?

Heutzutage stehen für die Strukturbestimmung von kleinen organischen Molekülen bis hin zu Proteinen im Wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung. Die Röntgenstrukturanalyse und die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR). Die NMR-Spektroskopie geht auf Versuche von Bloch und Purcell im Jahre 1945 zurück, die erstmalig die Resonanzanregung von Wasserstoffkernen durch Radiowellen (MHz-Bereich) im Magnetfeld beobachteten und dafür 1952 den Nobelpreis für Physik erhielten. Die Verfügbarkeit von supraleitenden Magneten und die Fortschritte in der Datenverarbeitung führten zur Anwendung höherer Feldstärken und zur Möglichkeit der Nutzung der NMR zur Proteinstrukturaufklärung unter Anwendung mehrdimensionaler Pulstechniken (Wüthrich Nobelpreis, 2002). Von großem Vorteil ist, daß die NMR Technik die Messung der Teilchen in Lösung erlaubt, wohingegen die Röntgenstrukturanalyse auf einen Festkörperkristall angewiesen ist. Problematisch ist jedoch die hohe Datenmenge, die bei der NMR Messung eines Proteins > 100 kDa auftritt. Heute ist eine akzeptable Auflösung nur bei Proteinen bis zu 70 kDa möglich. Die Röntgenstrukturanalyse hingegen besitzt keine obere Grenze für die Strukturbestimmung von Proteingrößen (Abb. 11). Sie stellt daher die einzige Möglichkeit der Strukturanalyse von großen Proteinkomplexen wie dem Komplex I dar. Es müssen jedoch geeignete Kristalle des Proteins vorliegen.

Im Gegensatz zur NMR, wo Kernspins mit Hilfe von Radiowellen angeregt werden, arbeitet die Kristallstrukturanalyse mit Röntgenstrahlen, die Wellenlängen im Bereich von Atombindungsabständen im Proteinkristall besitzen (ca. 100 pm). Sie werden daher an den Gitterebenen des Kristalls gebeugt. Max von Laue vermutete schon 1912, daß Röntgenstrahlen beim Durchtritt durch einen Kristall gebeugt werden müßten. Walter Friedrich und Paul Knipping bewiesen dies kurze Zeit später mit Hilfe eines Kupferkristalls und bestätigten damit die Wellennatur der Röntgenstrahlen. Ein Jahr später bestimmten William und Laurence Bragg als erste die Kristallstruktur von Kochsalz, wofür sie 1915 den Nobelpreis für Physik erhielten.

Lange Zeit war die Beugung von Röntgenstrahlen an Biomolekülen die einzige Methode, diese in atomarer Auflösung abzubilden. James Watson und Francis Crick lösten 1953 die Doppelhelix-Struktur von DNA aufgrund der Analyse von Röntgenbeugungsbildern. Im Jahre 1957 folgte dann der erste Strukturvorschlag des

Sauerstoffspeicherproteins Myoglobin durch Kendrew und Perutz (Nobelpreis im Jahre 1962). Mitte der achtziger Jahre wurde dann die erste atomare Struktur eines Membranproteins, ein bakterielles photosynthetisches Reaktionszentrum, durch Roland Huber, Hartmut Michel und Johann Deisenhofer (Nobelpreis 1988) gelöst. 1997 konnte dank Röntgenstrukturanalyse der Rotationsmechanismus der ATPase (Nobelpreise für Boyer und Walker, 1997) und der Na^+/K^+ -Pumpe (Skou, Nobelpreis 1997) aufgeklärt werden. Roderick McKinnon gelang 2002 die Struktur- und Funktionsaufklärung des spannungsabhängigen K^+ -Kanals (Nobelpreis, 2003). Bis zum heutigen Tag ist jedoch die Kristallisation von Membranproteinen ein schwieriges Unterfangen. Gerademal ein Prozent aller veröffentlichten Kristallstrukturen von Proteinen in der ProteinDataBase (PDB) Datenbank stammt von Membranproteinen (Abb. 11).

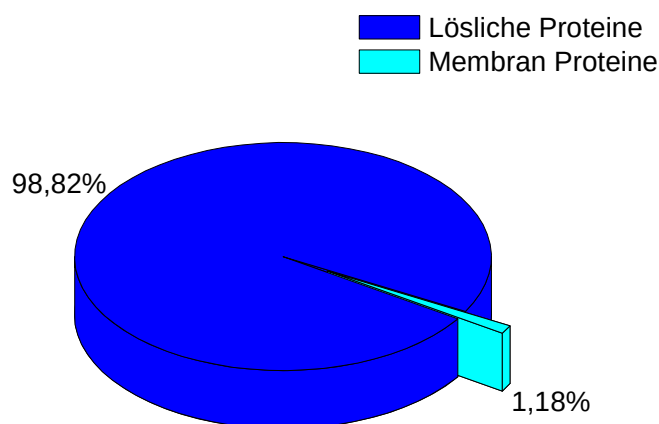
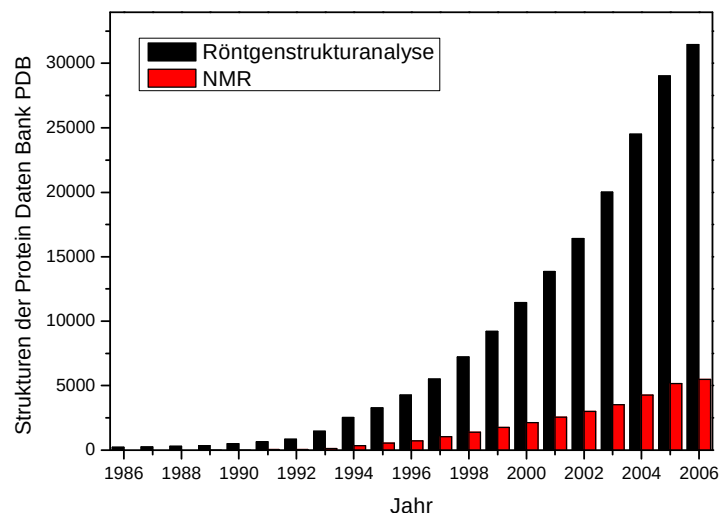


Abb. 11: Oben: Zuwachs an bekannten Proteinstrukturen ermittelt durch Röntgenstrukturanalyse vs. NMR-Spektroskopie. Unten: Der Anteil bekannter Strukturen von Membranproteinen beträgt nur etwas mehr als 1% an der Gesamtzahl gelöster Proteinstrukturen.

2.5.2 Kristallisation von Biomakromolekülen

Der erste Schritt für eine Strukturaufklärung durch Röntgenbeugung – und auch gleichzeitig die größte Schwierigkeit – stellt das Züchten von ausreichend großen Einkristallen dar. Einzelne Proteinmoleküle müssen in genau definierter periodischer Anordnung einen hochmolekularen Verbund eingehen.

Um von der gelösten zur kristallinen Form der Moleküle zu gelangen, muß zunächst die Löslichkeit des betreffenden Teilchens verringert werden. Im non-kristallinen System kommt es daraufhin zu einem amorphen Niederschlag (Präzipitat). Sind die Bedingungen jedoch so gewählt, daß ein Überschuß an komplementären Bereichen auf der Oberfläche der Proteinmoleküle existiert, kann es zu spezifischen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen kommen. Liegen diese geometrisch günstig, kann eine Kristallisation des Proteins erfolgen.

Bei der Kristallisation unterscheidet man prinzipiell zwei Schritte: 1. die Keimbildung (Nukleation) und 2. das Kristallwachstum. Für die Nukleation wird ein höheres Maß an Übersättigung benötigt als für das Wachstum des Kristalls. Der Keimbildungsbereich wird als labile Zone, der Wachstumsbereich als metastabile Zone bezeichnet. Zur Keimbildung muß man die labile Zone erreichen. Allerdings kommt es dann auch zu schnellerem Kristallwachstum und es besteht die Gefahr, daß zwar viele Kristalle entstehen, diese jedoch zu zahlreich und zu klein sind für das Beugungsexperiment (Kantenlänge mind. 50 µm). Um möglichst große Kristalle zu erhalten, ist es daher wichtig, das nicht zu viele Keime entstehen. Dies wiederum bedeutet eine langsame Annäherung an den Nukleationsbereich, so daß den entstehenden Keimen genügend Zeit zum Wachsen bleibt. Die Vorgänge beim Übergang von einer stabilen zu einer übersättigten Lösung können am einfachsten anhand eines Phasendiagramms beschrieben werden (Abb. 12).

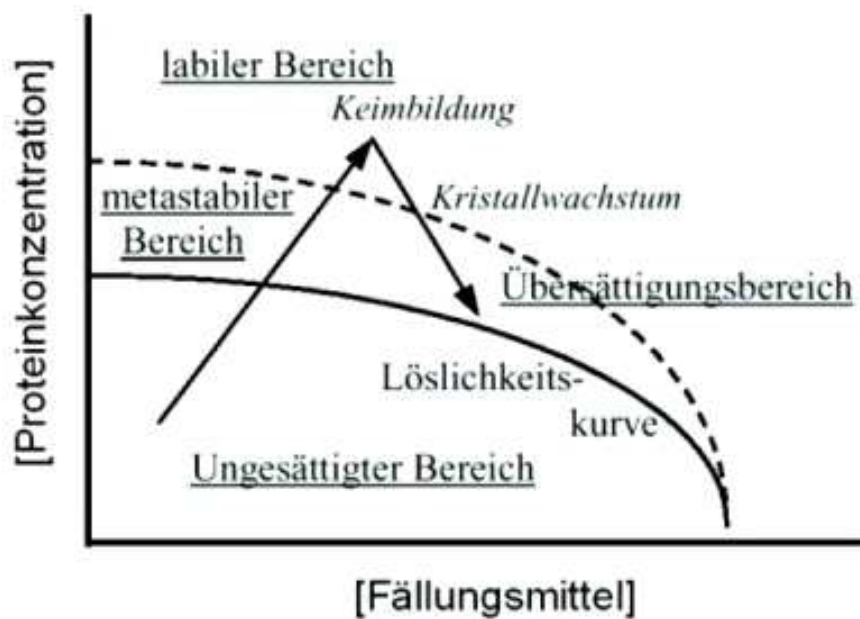


Abb. 12: Schematisches Phasendiagramm eines Protein-Fällungsmittel-Gemisches. Der Übersättigungsbereich wird unterteilt in labilen und metastabilen Bereich. Keimbildung erfolgt im labilen, Kristallwachstum im metastabilen Bereich.

Die Übersättigung einer Lösung wird im Wesentlichen durch eine Erhöhung der Protein- und/oder der Präzipitantenkonzentration erreicht. Die physikalischen Prozesse, die man zur Konzentrationsänderung einsetzen kann, sind die Dialyse und die Diffusion. In beiden Fällen wird Materie transportiert. Im Gegensatz zur Dialyse kann die Diffusion auch über den Gasraum erfolgen, wohingegen die Dialyse auf ein fluides System angewiesen ist.

Grundsätzlich können viele Parameter zu einer Präzipitation des Proteins führen. Klassisch wird zunächst das Puffersystem, hier insbesondere der pH-Wert, die Ionenart und -stärke, die Proteinkonzentration und die Temperatur im Hinblick auf Kristallisationsbedingungen näher untersucht. In unserem Fall handelt es sich beim Atmungskettenkomplex I um ein Membranprotein. Daher muß zusätzlich noch ein geeignetes Detergenz gefunden werden, daß zum Einen das Protein stabil und monodispers in Lösung hält, zum Anderen aber nicht die Ausbildung von Kristallkontakten zwischen den einzelnen Proteinmolekülen als Abstandhalter verhindert (näheres hierzu s. Kap. 2.5.3).

Statistisch betrachtet haben bestimmte Parametereinstellungen in der Vergangenheit häufiger zum Kristallisationserfolg geführt als andere. Im Folgenden soll an 32 Beispielen von erfolgreichen Membranprotein-Kristallisationen der Einsatz und die Einstellung der unterschiedlichen Parameter vorgestellt werden (vgl. Tabelle 1).

Tab. 1: Kristallisationsbedingungen für 32 erfolgreiche Membranproteinkristallisationen

Protein	Source	Protein solution					Reservoir solution								Temp(deg)	Resolution (Å)	
		Protein conc. (µM)	Primary det.	Conc. (%)	Secondary det.	Conc. (%)	Sample Buffer	Conc. (mM) / pH	Res. Buffer	pH	Salt 1	Conc. (mM)	Salt 2	Conc. (mM)			Precipitant
bc1 complex (P6522)	bovine mitochondria	42	DDM	0.015		KPB	57.5	KPB	50/6.6	NaCl	100			PEG 4000	7%	S	3
bc1 complex (P65)	bovine mitochondria	42	DDM	0.015	HM	0.014	KPB	57.5	KPB	50/6.6	NaCl	100		PEG 4000	7%	H/S	4
bc1 complex (I41212)	bovine mitochondria	42	ME10	0.200		AA	207.2	AA	50/7.2	KCl	500			PEG 4000	12%	VD	2
bc1 complex	chicken mitochondria	100	DDM	0.010	OG	2.000	MOPS	207.5	MOPS	20/6.7	NaCl	175		PEG 4000	6%	VD	4
bc1 complex	Saccharomyces cerevisiae	UDM	UDM	0.050		KPB	50/6.9	KPB	100/8.0					PEG 4000	6%	S	2.3
cytochrome oxidase (4sub.)	Paracoccus denitrificans	40	DDM	0.030		Tris	10/8.0	Tris	400/7.0					MMP 2000	11%	S	14
cytochrome oxidase (2sub.)	Paracoccus denitrificans	123	UDM	0.060		Tris	107.5	Tris	100/5.5					MMP 2000	8%	H	20
cytochrome oxidase	Rhodobacter sphaeroides	111	DM	0.240	DDM	0.014	Tris	10/8.0	SC	100/6.0	NaCl	100	MgCl ₂	20 PEG 400	20%	H	4
cytochrome oxidase	bovine mitochondria	225	DM	0.200				NaPB	40/6.8					PEG 4000		B	4
cytochrom oxidase	Thermus thermophilus	94	NG	0.400		Tris	107.0	Bis-Tris	207.0					PEG 2000	14%	S	20
ubiquinol oxidase	Escherichia coli	138	OG	1.000	(DOC)	Tris	207.5	HEPES	100/7.0	NaCl	100	MgCl ₂	100	PEG 1500	10%	H	4
ATP synthase (F1-c10)	Saccharomyces cerevisiae	22	DDM	0.100		Tris	20/8.0	Tris	100/8.0	NaCl	150			PEG 6000	12%	B	4
formate dehydrogenase	Escherichia coli	34	OG	1.000		Tris	207.5	HEPES	100/8.0	NaCl	100	MgCl ₂	100	PEG 1500	9%	H	4
succinate dehydrogenase	Escherichia coli	63	C12E9	0.150		MOPS	207.4	(SF)	(4000/7.4)				SF	4M	H	10	
fumarate reductase	Escherichia coli	120	C12E9	0.700		Tris	207.4	SC	100/5.8			MgAc ₂	85 PEG 10000	8%	H	18	
fumarate reductase	Wollinella succinogenes	50	DDM	0.010	DM	0.100	HEPES	207.3	SC	20/5.6	NaCl	150		PEG 3350	11%	S	18
reaction centre	Rhodospseudomonas viridis	82	LDAO	0.100		NaPB	207.0	(AS)	(3000/6)				AS	3.0M	S	18	
reaction centre (P21212)	Rhodobacter sphaeroides	66	LDAO	0.120		Tris	30/8.0	NaCl	600					PEG 4000	22%	S	22
reaction centre (P3121)	Rhodobacter sphaeroides	100	LDAO	0.090		Tris	10/8.0	(KPB)	(1500/6.8)					KPB	1.5M	S	18
reaction centre	Thermochromatium tepidum	312	OG	1.000				NaPB	207.0	NaCl	455			PEG 4000	7%	S	4
light harvesting complex	Rhodospirillum rubrum	222	UDAO	0.200				KPB	150/6.5					AS	4M	S	20
light harvesting complex	Rhodospirillum rubrum	44	OG	1.000				(KPB)	(900/9.5)					PB	0.9M	VD	20
photosystem II	Synechococcus elongatus	70	DDM	0.030		MES	206.5	HEPES	100/7.5				AS	100 PEG 4000	10%	VD	20
KcsA	Streptomyces lividans	183	LDAO	0.120		Tris	507.5	HEPES	100/7.5	KCl	150	CaCl ₂	200	PEG 400	48%	S	20
KcsA + Fab	Streptomyces lividans	50	DM	0.240		Tris	507.5	SA	50/5.3	NaCl	148	MgAc ₂	50	PEG 400	23%	S	20
CiC	Salmonella typhimurium	118	OM	2.000		Tris	107.5	Tris	50/7.5	NaCl	75	Li ₂ SO ₄	100	PEG 400	33%	S	20
CiC	Escherichia coli	118	OM	2.000		Tris	107.5	SA	50/4.6	NaCl	75	Li ₂ SO ₄	175	PEG 400	29%	S	20
Aquaporin-1	bovine erythrocytes	179	NG	0.400		Tris	207.5	Tris	107.5					MMP 550	20%	S	4
GlpF	Escherichia coli	151	OG	1.000		Bicine	100/8.9					MgCl ₂	300	PEG 2000	28%	S	22
MscL	Mycobacterium tuberculosis	167	DDM	0.050		Tris	207.5	Glycine	100/3.7			AS	110	TEG	25%	S	4
MsbA	Escherichia coli	100	α-DDM	0.050		Tris	207.5	SC	150/5.1			Li ₂ SO ₄	100	PEG 300	18%	S	5
rhodopsin	bovine ROS membranes	450	NG	0.500				MES	30/6.4			ZnAc ₂	80	AS	0.85M	H	5
bacteriorhodopsin	Halobacterium halobium	263	OG	0.500				(NaPB)	(3000/5.5)					NaPB	3M	VD	4

AA: ammonium acetate; AS: ammonium sulfate; SC: sodium citrate; Tris: Tris-HCl; SF: sodium formate; KPB: potassium phosphate; NaPB: sodium phosphate; PB: phosphate buffer; SA: sodium acetate; MMP: PEG monomethylether; TEG: triethylene glycol; DDM: dodecylmaltoside; ME10: MEGA10; OG: octylglucoside; DM: decylmaltoside; UDM: undecylmaltoside; LDAO: N,N-dimethyldodecylamine-N-oxide; UDAO: N,N-dimethylundecylamine-N-oxide; NG: nonylglucoside; OM: octylmaltoside; HM: HECAMEG; DOC: deoxycholate; S: sitting drop; H: hanging drop; VD: vapour diffusion; B: batch

(aus So Iwata „Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins“, IUL Series 2003)

Der pH-Wert

Durch einen unterschiedlichen Protonierungsgrad der umgebenden Lösung und damit auch an der Proteinoberfläche kann es zu Interaktionen zwischen komplementären Molekülteilen kommen. Da es sich bei Proteinen im Gegensatz zu organischen oder anorganischen Substanzen um physiologische Makromoleküle handelt, gilt der Wahl des geeigneten pH-Milieus besondere Aufmerksamkeit. Da das Protein auch im Verlauf der Kristallisation in nativer Konformation erhalten bleiben soll und eine Denaturierung durch einen zu hohen oder zu niedrigen pH-Wert darüber hinaus zu einer vermehrten unerwünschten Aggregation führen würde, sind der experimentellen Vielfalt hier Grenzen gesetzt. Wie erwartet schlägt sich dies auch in der Statistik nieder (Abb. 13). 88% der erfolgreichen Kristallisationsansätze wurde in einem pH-Bereich zwischen 5 und 9, 60% innerhalb eines Bereiches von pH 6-8 durchgeführt. Erstaunlicherweise gab es jedoch auch einen Erfolg bei pH 10. Das Protein stammt hier aus dem acidophilen Organismus *Rhodospirillum acidophila*. Neben abnormen pH-Wert Toleranzen bieten andere extrem lebende Organismen auch hohe Temperatur- oder Salztoleranzen an, die dem Kristallographen bei der Proteinpräparation und/oder der Kristallisation Vorteile bieten können, siehe beispielsweise Kristallisationserfolge aus *Thermus thermophilus* (Sazanov, 2006).

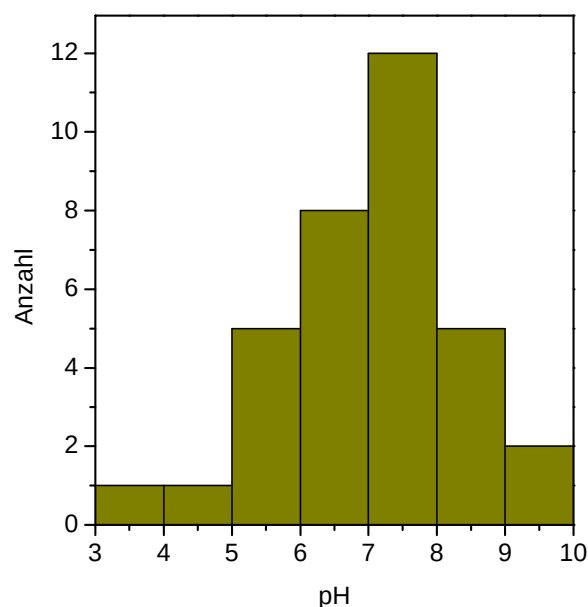


Abb. 13: Einsatz von pH-Werten bei der Kristallisation von Membranproteinen. In der Nähe eines physiologischen pH-Wertes von etwa pH 7 konnten die meisten Kristallisationserfolge verzeichnet werden. Insgesamt wurden 32 Kristallisationen untersucht (verändert nach So Iwata „Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins“, IUL Series 2003).

Die Ionenart und –stärke

Am häufigsten werden NaCl oder KCl für Kristallisationszwecke eingesetzt. In 58% der Fälle führten diese zu einer erfolgreichen Kristallisation des Proteins. MgCl_2 , CaCl_2 oder ZnCl_2 folgen mit 27%iger Erfolgsquote, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Li_2SO_4 belegen den dritten Platz mit einer Quote von 19%. Oftmals werden auch Gemische aus ein- und zweiwertigen Ionenarten eingesetzt. Die Ionenstärke hängt insbesondere von der Valenz des verwendeten Ions ab. Monovalente Ionen werden in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt als bi- oder trivalente Ionen. Polyvalente Kationen oder Anionen können als Linker bei der Vermittlung von Kristallkontakten fungieren.

Ist die Ionenstärke nicht der kritische Faktor im Kristallisationsprozess wird oftmals die Salzkonzentration aus der Proteinpräparation einfach beibehalten um eine optimale Stabilisierung des Proteins zu gewährleisten. Eine zu hohe Salzkonzentration kann allerdings als Konkurrent auftreten und Kristallisationskontakte zwischen Proteinmolekülen verhindern, wohingegen eine zu niedrige Konzentration oftmals zur amorphen Fällung eines Proteins führt. In den meisten Fällen wird eine Salzkonzentration von 100-300 mM verwendet (Abb.14).

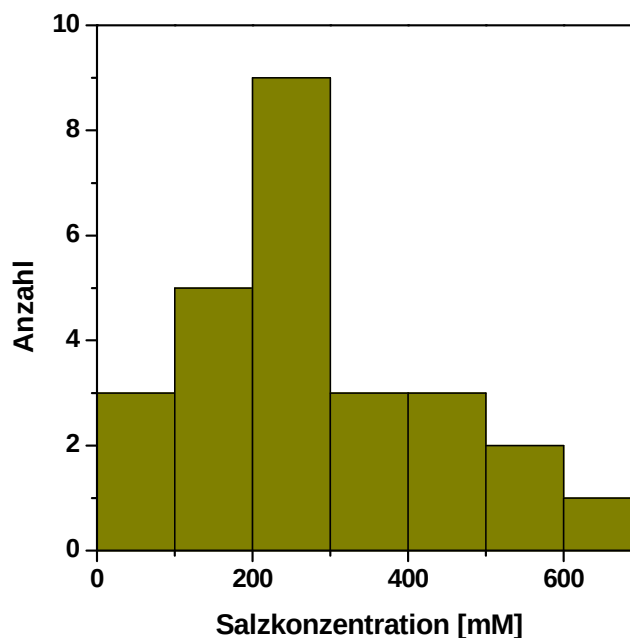


Abb. 14: Eingesetzte Salzkonzentrationen in der Kristallisation. Die meisten erfolgreichen Ansätze wurden in Gegenwart von etwa 250 mM Salz durchgeführt (verändert nach So Iwata „Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins“, *IUL Series* 2003).

Die Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration in einem Kristallisationsansatz stellt eine kritische Größe dar. Es muß eine genügend hohe Teilchendichte im Medium vorhanden sein um eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit von Kristallkontakten zu gewährleisten. Andererseits ist die Konzentration von Proteinlösungen ein Vorgang, der oftmals zur Aggregation der Proteinmoleküle führt. Daher ist eine ausgewogenen Balance der Proteinkonzentration im Kristallansatz notwendig, um möglichst viele Einzelmoleküle stabil und in großer Nähe zueinander in Lösung zu halten. Da eine Angabe in mg/ml abhängig vom Molekulargewicht des betrachteten Teilchens ist, wird im Folgenden die Stoffmenge in μM angegeben. Die meisten erfolgreichen Kristallisationsansätze fanden bei einer Proteinkonzentration von 40-80 μM statt (Abb. 15). Für ein großes Membranprotein wie dem Membranarm von Komplex I mit einem Molekulargewicht von 500 kDa, bedeutet dies eine Massenkonzentration von 20-40 mg/ml. Sehr viel höhere Konzentrationen führen fast immer zu einer Aggregation des Proteins.

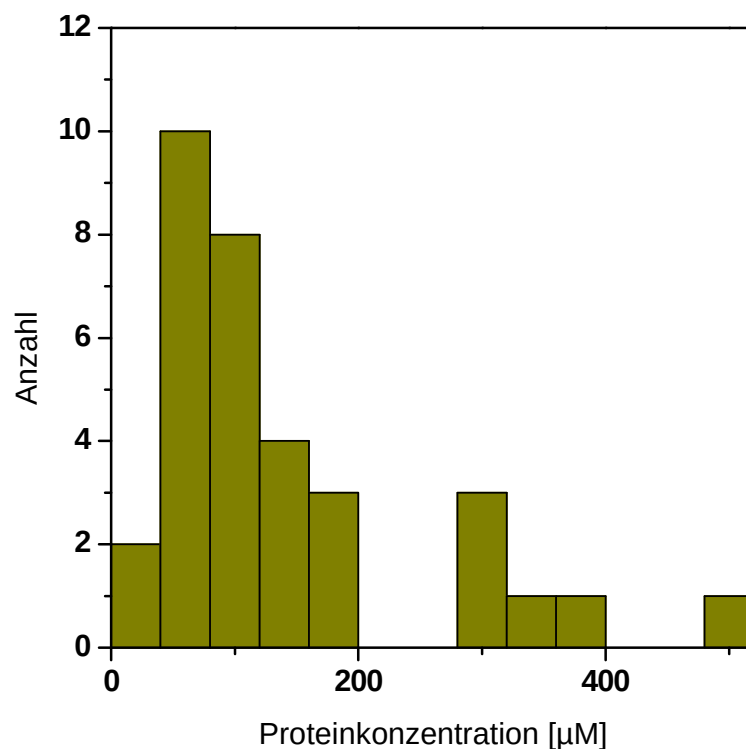


Abb. 15: Erfolgreiche Kristallisationsansätze in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Die meisten Ansätze wurden bei einer Proteinkonzentration von etwa 60 μM durchgeführt. Niedrigere Konzentrationen führen zu einer geringen Teilchendichte des zu kristallisierenden Teilchens, höhere zu einer Aggregation des Proteins (verändert nach So Iwata „Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins“, IUL Series 2003).

Die Temperatur

Die meisten Kristallansätze, die zum Erfolg führten wurden bei 4°C angesetzt. Dicht gefolgt von der Raumtemperatur (18-20°C). Dieses Fazit kann jedoch sicherlich auch auf die räumlichen und instrumentellen Gegebenheiten im Labor zurückgeführt werden. Stoßsichere Kristallisationsschränke für die Verwahrung der Ansätze und Mikroskopiereinrichtungen bei verschiedenen Temperaturen zu unterhalten ist teuer. Die Kristallzucht bei einer und die mikroskopische Analyse bei einer anderen Temperatur durchzuführen ist sehr unbeliebt, da durch den Temperaturwechsel entstehendes Kondenswasser die Mikroskopie deutlich erschwert.

Additiva

Bei der Optimierung von Membranprotein-Kristallisationsansätzen waren die Alkohole 1,2,3-Heptantriol (HT, 1-6%), Glycerol (10-20%) und Ethanol (5-10%) sehr erfolgreich. Darüber hinaus wurden auch Erfolge mit Benzamidinen (2-4%) und DMSO (5-10%) erzielt (Chang et al., 1998).

Die ersten Beobachtungen im Verlauf einer erfolgreichen Kristallisationsgeschichte sind recht unspektakulärer Natur. Zunächst können im Kristallisationsansatz meistens Phasen-Separationen beobachtet werden. Hier läßt sich prinzipiell zwischen einer flüssig-flüssigen oder einer flüssig-festen Phasen-Separation unterscheiden. Die flüssige Phasentrennung erfolgt in Form von kleinen Tröpfchen, die feste Phasenabtrennung kann in Form von amorphem Präzipitat, Spheruliten oder Kristallen erfolgen (Abb. 16).

Die ersten auftretenden Kristalle sind fast immer Salz- oder Detergenzkristalle, da diese eine viel höhere Neigung zur Kristallisation besitzen als Proteinmoleküle. Zur Diskriminierung dieser „falschen“ Kristalle können mehrere Methoden herangezogen werden. Die Röntgenbeugung entlarvt den falschen Kristall aufgrund seiner wenigen Beugungsreflexe mit hoher Intensität schnell, nicht jedes Institut verfügt jedoch über eine geeignete Röntgenquelle für eine derartige Messung im Laboralltag. Die Epi-Fluoreszenzmethode bietet die Möglichkeit, aufgrund der Eigenfluoreszenz von Tryptophanresten im Proteinkristall diesen von anderen Kristallen zu unterscheiden. Eine Kristallanalyse per SDS-PAGE kann manchmal auch schon recht eindeutige Hinweise liefern, ebenso erhält man oft durch das Wasch- und Impfverhalten von Kristallen gute Indizien auf die Zusammensetzung eines Kristalls.

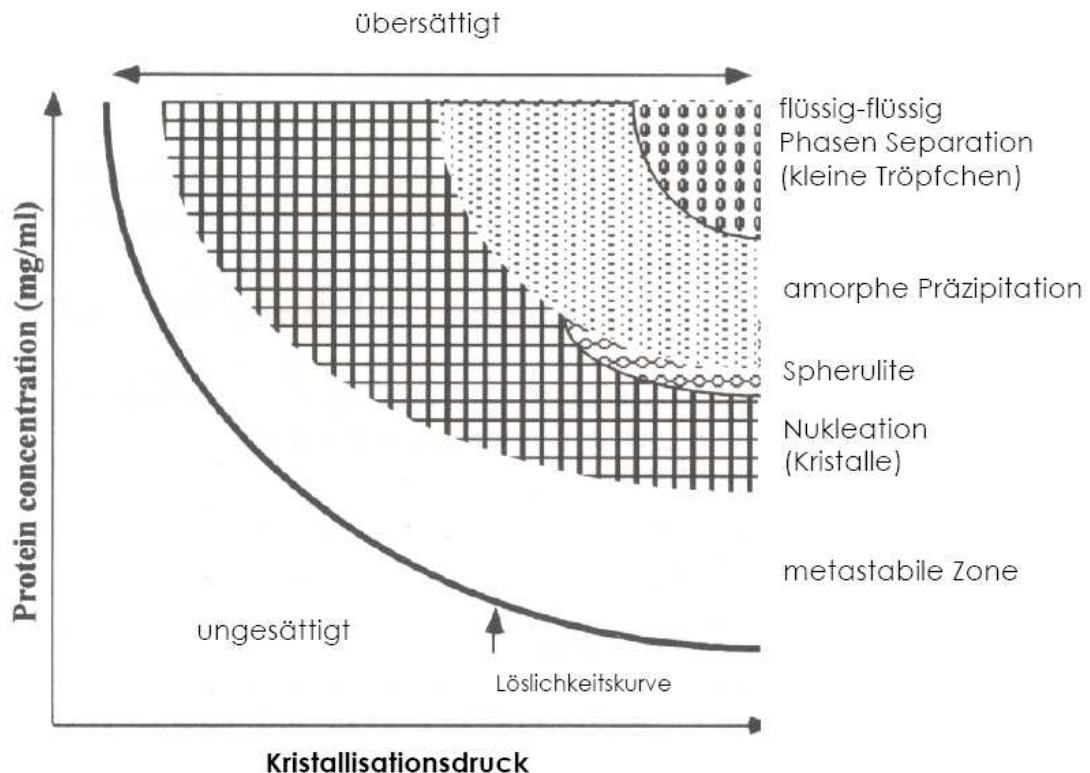


Abb. 16: Schematisches Phasendiagramm. Dargestellt ist die Entwicklung der Phasen-Separation in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration und dem Kristallisationsdruck. Flüssige Phasentrennung erfolgt in Form von Tröpfchen, als feste Phasen treten amorphes Präzipitat, Spherulite und Kristalle auf. Das Kristallwachstum erfolgt in der metastabilen Phase.

2.5.3 Kristallisation von Membranproteinen

Membranproteine stellen nach wie vor eine Herausforderung für den Kristallographen dar. Da sie große hydrophobe Bereiche besitzen, müssen sie mit Hilfe von Detergenzien aus der Zellmembran isoliert und hiernach als Einzelmoleküle in Lösung gehalten werden um für den Einbau in einen Kristall zur Verfügung zu stehen. Oftmals fällt dies bei Proteinen, die größtenteils wasserlöslich und nur über einen Anker mit der Membran verbunden sind, deutlich leichter als bei einem intrinsischen Protein wie dem Komplex I mit bis zu 60 Transmembranhelices.

Detergenzien können als amphipathische Moleküle mit ihrem hydrophilen Bereich in Kontakt mit dem wässrigen Lösungsmittel und mit ihrem hydrophoben Anteil in Wechselwirkung mit einem Lipidmolekül oder einem unpolaren Proteinbereich treten. Die Einlagerung der Detergenzmoleküle in die proteinumgebende Lipidschicht erfolgt konzentrationsabhängig. Zunächst werden einzelne Moleküle in die Membran eingelagert, ab einer bestimmten Konzentration (cmc – critical micellar concentration)

bilden die Detergenzmoleküle Mizellen und die Membran zerfällt in einzelne Teile. Im Verlauf der Solubilisierung bilden sich Lipid-Seife-Mizellen und Lipid-Seife-Protein-Komplexe. Je höher die Detergenzkonzentration ansteigt, desto stärker werden die verbleibenden Lipidmoleküle in der Seife-Lipid-Mizelle vereinigt und das Protein wird letztlich nur noch von Seife-Molekülen umgeben (Abb. 17).

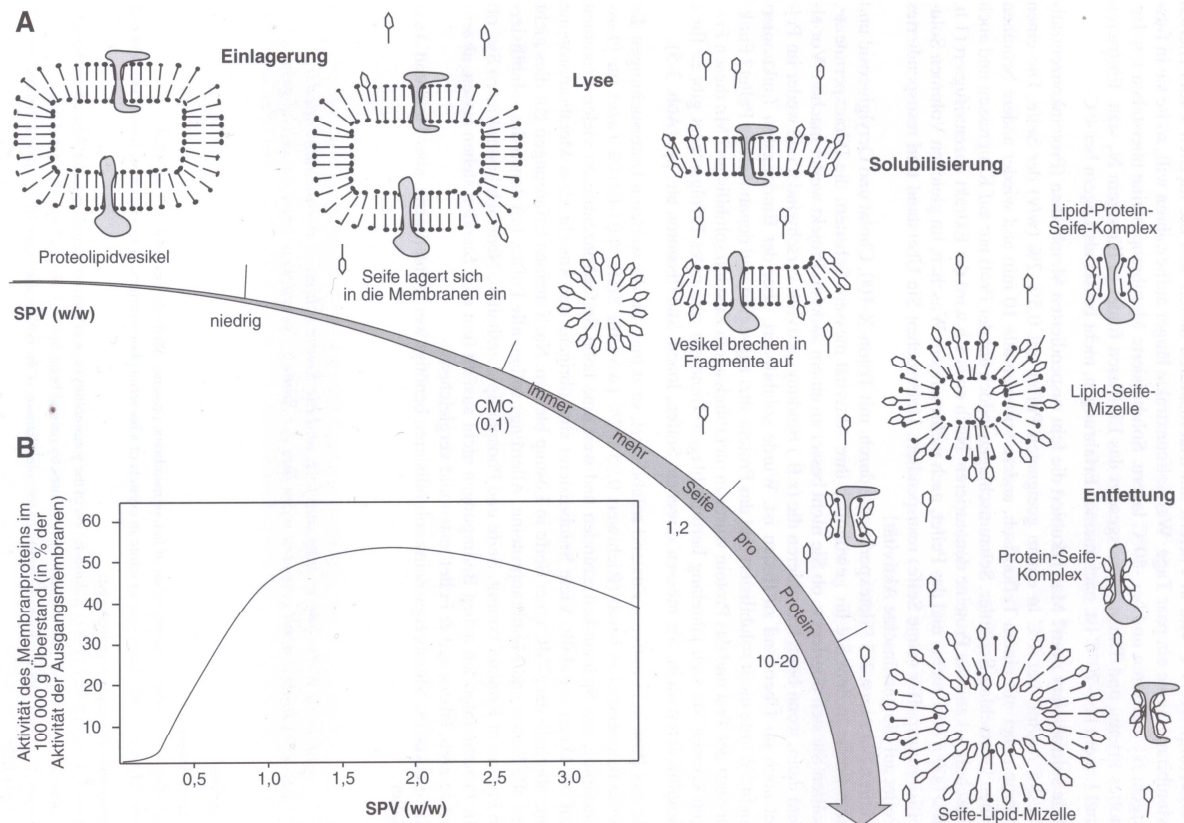


Abb. 17: Veränderungen eines Seife-Membranprotein Gemisches in Abhängigkeit steigender Seifenkonzentration. Die Membran wird mit zunehmender Seifenkonzentration lysiert, bei cmc wird das Membranprotein solubilisiert und in Anwesenheit mehrfacher cmc vollständig entfettet. Ab einem Seife zu Protein Massenverhältnis (SPV) von etwa 1/1 liegt das Membranprotein vollständig solubilisiert in Lösung vor und es treten keine unlöslichen Aggregate mehr auf, die durch Zentrifugation sedimentiert werden können (aus Hubert Rehm „Proteomics“ Spektrum Verlag 4. Auflage, 2002).

Die Zugabe von Detergenzien setzt die Oberflächenspannung von Wasser herab. Darüber hinaus existieren verschiedene Teilchenzustände in der Detergenzlösung. Unterhalb der cmc liegen die Detergenzmoleküle größtenteils als Monomer, oberhalb der cmc als Mizellen vor. Die cmc hängt in erster Linie von der hydrophoben Kettenlänge ab. Je länger die Alkylkette, desto niedriger ist die cmc. Wasserstörende Substanzen wie Urea führen zu einer Erhöhung der cmc, ebenso wie die Einführung

von Doppelbindungen in die Alkylkette. Bei ionischen Detergenzien führt eine Erhöhung der Ionenstärke zu einer Erniedrigung der cmc und zu einer Erhöhung der Aggregationszahl (Zahl Detergenzmoleküle pro Mizelle), da Gegenionen eine Abstoßung der polaren gleichgeladenen Kopfgruppen verhindern.

Die cmc wird bei einer bestimmten Temperatur (cmt) erreicht. Unterhalb der cmt existiert ein zunehmendes Gleichgewicht zwischen der monomeren und einer kristallinen Form des Detergenz, oberhalb der cmt liegen die Detergenzmoleküle in Abhängigkeit von ihrer Konzentration als Monomere oder als Mizellen vor. Der Punkt an dem alle drei Phasen parallel existieren heißt Kraft Punkt. Er fällt bei den meisten Detergenzien mit der cmt zusammen (Abb. 18).

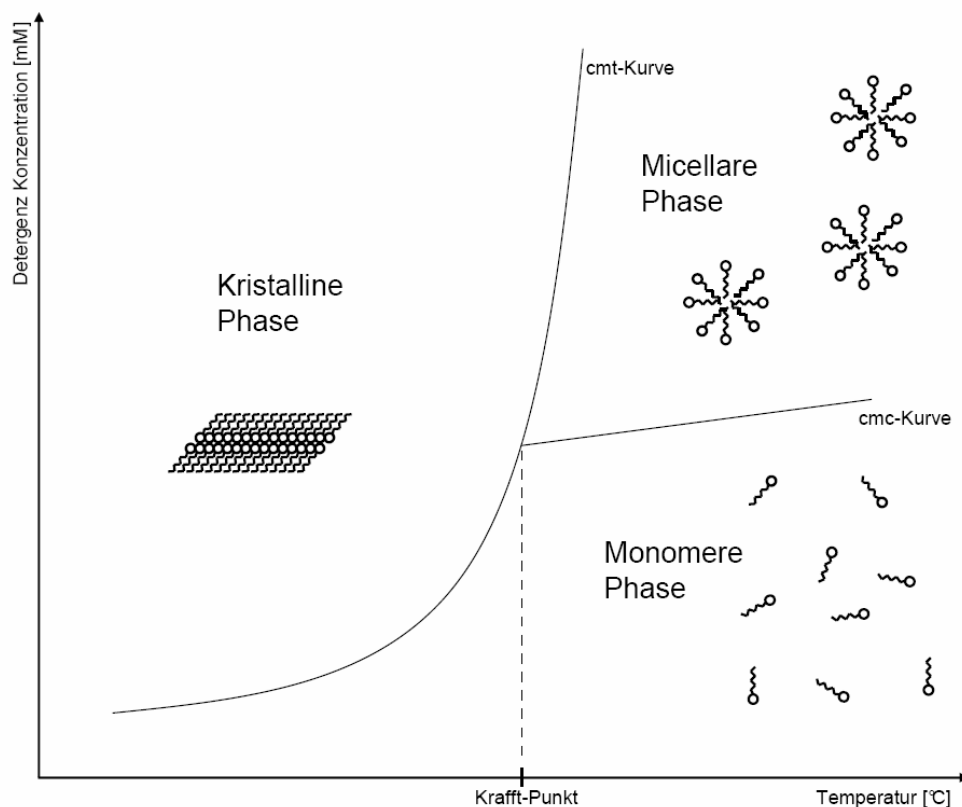


Abb. 18: Abhängigkeit der kritischen micellaren Temperatur (cmt) und der kritischen micellaren Konzentration (cmc) von der Detergenzkonzentration und der Temperatur. Am Kraftpunkt existieren kristalline, monomere und mizellare Phasen nebeneinander (verändert nach Srirama Bhairi „Detergents - A guide to the properties and uses of detergents in biological systems“, Calbiochem 2001).

Wichtig während der Solubilisierungsphase ist die Erhaltung der nativen Konformation des zu isolierenden Proteins. Viele Detergenzien eignen sich zwar hervorragend für eine Membranauslösung des Proteins wirken jedoch aufgrund ihrer hohen cmc, also vielen Einzelmolekülen in Lösung, sehr aggressiv und damit

denaturierend auf das Protein. Entscheidend für die Eigenschaften eines Detergenz ist seine chemische Zusammensetzung und damit seine Fähigkeit mit dem Protein bzw. dem umgebenden Milieu in Wechselwirkung zu treten.

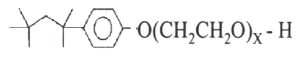
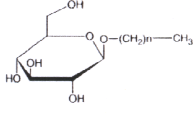
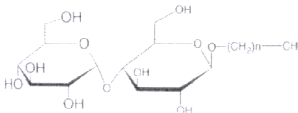
Es werden drei Klassen von Detergenzien unterschieden: a) ionische, b) nicht-ionische und c) zwitterionische Detergenzien.

Die hydrophile Kopfgruppe ionischer Detergenzien kann kat- und anionisch sein (Trimethyl- oder Sulfatgruppen), die hydrophobe Einheit ist entweder eine Alkylkette oder eine Gallensäure. Gängigster Vertreter der ionischen Detergenzien ist das Sodium Dodecyl Sulfat (SDS). Ionische Detergenzien eignen sich aufgrund ihrer hohen cmc gut um Protein-Protein Wechselwirkungen zu lösen. Sie wirken somit denaturierend und kommen daher nicht für Kristallisationszwecke in Frage.

Nicht-ionische Detergenzien besitzen entweder Polyoxyethylene oder Zuckergruppen als hydrophile Einheit, als hydrophober Teil kommen eine Alkylkette und/oder ein Phenylring vor. Lubrol und Triton X-100 sind bekannte Beispiele für Polyoxyethylendetergenzien, die hier verwendeten Detergenzien basieren jedoch auf einer Zuckerkomponente als polare Einheit. Neben Sucrose dienen wie in unserem Fall Glucose und Maltose als Kopfgruppe mit einem acht (Octyl-) bis zwölf (Dodecyl-) CH₂-Einheiten langen Schwanz (Tab. 2). Nicht-ionische Detergenzien eignen sich gut um Lipid-Lipid bzw. Lipid-Protein Wechselwirkungen zu unterbinden, wirken jedoch dabei nicht denaturierend. Daher sind diese Detergenzien besonders gut für eine Analyse des nativen Proteins und zu Kristallisationszwecken geeignet. Im Gegensatz zu den ionischen Detergenzien sind die nicht-ionischen Detergenzien nicht so stark von der Ionenstärke abhängig. Dafür aber umso mehr von der Temperatur. Die cmc nimmt mit zunehmender Temperatur stark ab. Nicht-ionische Detergenzien besitzen einen Wolkenpunkt. Oberhalb einer bestimmten Temperatur fällt das Detergenz aus. Der Wolkenpunkt eines Detergenz ist abhängig von seiner Hydratisierbarkeit

Zwitterionische Detergenzien wie N,N-dimethyldodecylamine-N-oxide (LDAO) vereinen sowohl Eigenschaften der ionischen wie auch der nicht-ionischen Detergenzien und erweitern damit das zu Verfügung stehende Repertoire. Einige Vertreter wirken denaturierend (CHAPS), andere wie LDAO können jedoch auch in der nativen Präparation Anwendung finden.

Tab. 2: Strukturformeln und Eigenschaften einiger in der Membranbiochemie häufig eingesetzter nicht-ionischer Detergenzien.

Verbindung	cmc (mol/l)	Anzahl der Monomere pro Mizelle	ungefähre Mizellengröße (Da)	Handelsname	Strukturformel
$C_{12}E_9$	$1 \cdot 10^{-4}$	110	$70 \cdot 10^3$	Lubrol	$CH_3(CH_2)_Y - O(CH_2CH_2O)_X - H$ $Y = 11; X = 9$
tert.- $C_8\phi E_9$	$3 \cdot 10^{-4}$	140	$90 \cdot 10^3$	Triton X-100	 $X = 9-10$
α -D- C_8 Glucosid	$2 \cdot 10^{-2}$	84	$25 \cdot 10^3$	Octylglucosid	 $n = 7$
α -D- C_{12} Maltosid	$1 \cdot 10^{-4}$	98	$50 \cdot 10^3$	Laurylmaltosid	 $n = 11$

Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Solubilisierung ist eine gute Detergenz-Protein Wechselwirkung unter gleichzeitigem Kontakt mit Wasser. Die Größe des polaren Anteils eines Detergenz ist wichtig für eine gute Löslichkeit, der unpolare Teil stellt den Protein- bzw. Lipidkontakt her. Das Verhältnis aus hydrophilem zu lipophilem Teil eines Detergenz wird als HLB (hydrophile/lipophile Balance) bezeichnet und ist ein Maß für die Solubilisierungskraft eines Detergenz. Detergenzien mit kleiner HLB können gut Lipide lösen, eine mittlere HLB findet Einsatz bei der Solubilisierung von intrinsischen Membranproteinen wie Komplex I, eine hohe HLB wird bei extrinsischen Proteinen verwendet (Helenius, 1975).

Je nach Lipid- bzw. Detergenzgehalt unterscheidet man drei Typen von Kristallen: a) 2D Kristalle (nach Solubilisierung rekonstituierte Proteine in zweidimensionalen Lipidfilmen), b) Typ I 3D Kristalle in lipider kubischer Phase (nach Solubilisierung dreidimensional rekonstituierte Proteine) und c) Typ II detergenzhaltige 3D Kristalle (nach Solubilisierung direkt ohne Rekonstitution kristallisierte Proteine) (Abb. 19). In unserem Fall handelt es sich um den letzten Typ.

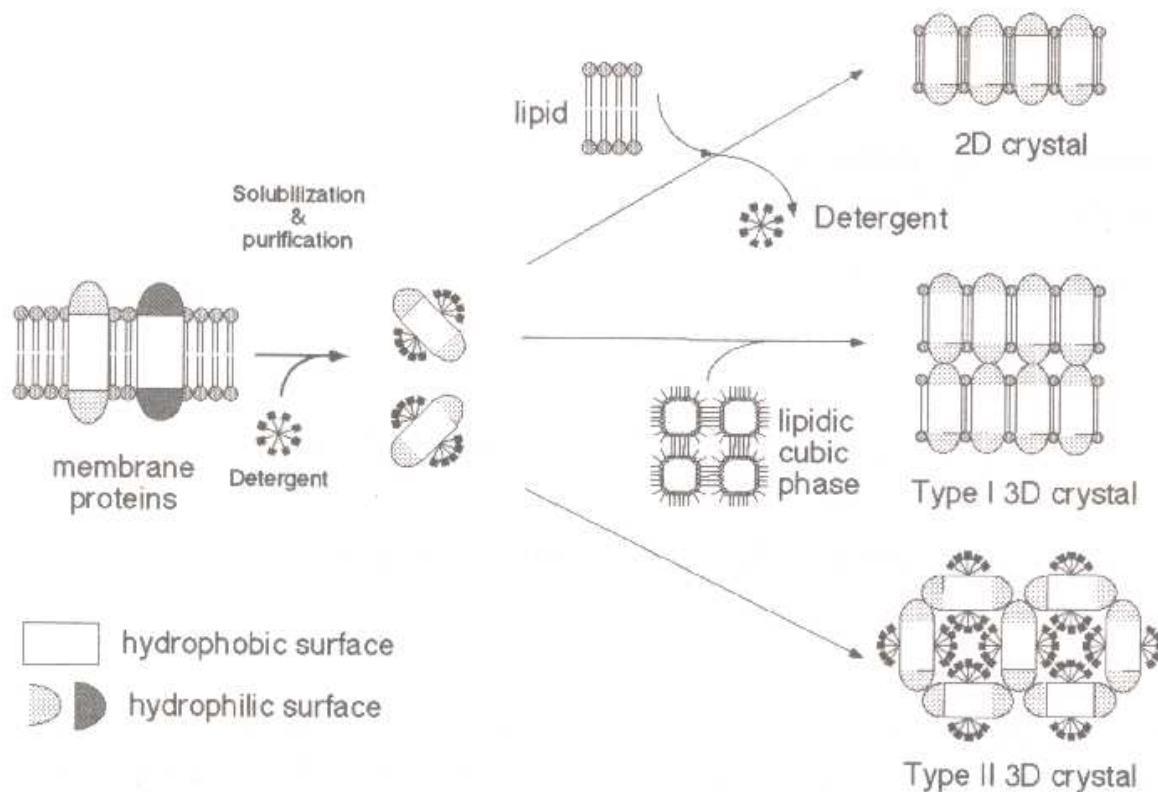


Abb. 19: Die drei Klassen von Kristalltypen. 2D Kristalle entstehen durch Rekonstitution des Membranproteins in einen Lipidfilm. 3D Kristalle können entweder ohne Detergenz in LCP rekonstituiert (Typ I) oder mit Detergenz kristallisiert werden (Typ II) (aus So Iwata „Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins“, 2003).

Da das Detergenz also während der Kristallisation am Protein verbleibt, ist die Größe der Detergenzmoleküle ein kritischer Punkt. Im Kristallverband wirkt das Detergenz als Abstandshalter. Im Idealfall sollte es also möglichst klein sein. Mit abnehmender Kettenlänge des unpolaren Anteils nimmt jedoch die cmc und damit die Aggressivität des Detergenz zu. Eine Verkleinerung des polaren Restes hingegen sorgt für eine geringere Löslichkeit des Detergenz und führt damit zu vermehrter Aggregation des Detergenz-Protein-Komplexes. Es muß daher auf eine ausgewogene Balance bei der Wahl des geeigneten Detergenz geachtet werden. In der Kristallisationspraxis sind Dodecylmaltosid und Octylglucosid die beiden bislang am erfolgreichsten eingesetzten Detergenzien, dicht gefolgt von Zwitterdetergenz LDAO (Abb. 20).

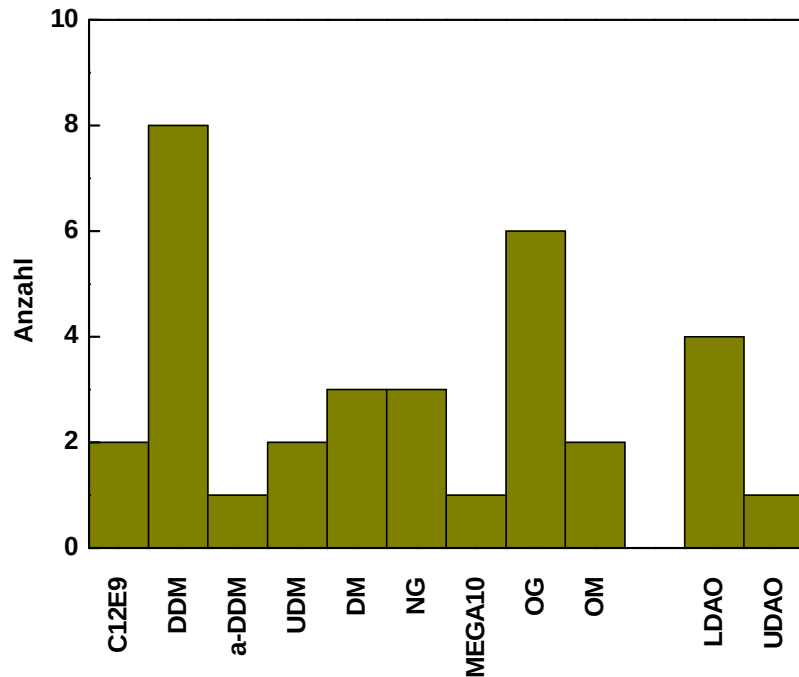


Abb. 20: Einsatz von Detergenzien in erfolgreichen Kristallisationsansätzen. Nicht-ionische zuckerhaltige Detergenzien wie Dodecylmaltosid und Octylglucosid waren bislang deutlich erfolgreicher als ionische oder zwittergente Detergenzien (aus So Iwata „Methods and Results in Crystallization of Membrane Proteins“, 2003).

Immer häufiger wird in der Fachliteratur auch der Einsatz von Phospholipid analogen FOS-Detergenzien diskutiert (Oxenoid, 2001; Sanders, 2000). Diese im einfachsten Fall FOS-Cholin an ein Ethanolamin gekoppelte phosphathaltige Alkylkette scheint große Vorteile in der Proteinpräparation jedoch auch Nachteile während der Kristallisation aufgrund zu starker Stabilisierung des Proteins entgegen jeden Präzipitationsdruck mit sich zu bringen.

2.5.4 Dynamische Lichtstreuung einer Proteinlösung

Die Lichtstreuung an einem Teilchen kann elastisch (statisch), quasielastisch (dynamisch) oder inelastisch (z.B. Raman-Streuung) sein. Die statische Streuung von Licht ist abhängig vom Verhältnis Teilchenradius zu Wellenlänge. Ist das betrachtete Teilchen kleiner als $\lambda/20$ entspricht die Streuung einer Rayleigh-Streuung, entspricht die Partikelgröße in etwa der Größenordnung der eingestrahlten Wellenlänge tritt Interferenz nach Mie auf. In unserem Fall handelt es sich um Rayleigh-Streuung, da die Wellenlänge des anregenden Lasers sehr viel größer als das gelöste Teilchen ist. Ist die vorliegende Lösung stark verdünnt können Wechselwirkungen zwischen den Teilchen vernachlässigt werden und die Streustrahlung folgt der Gleichung

$$R_{\Theta} = KMC, \quad \text{mit } R_{\Theta} = \frac{i_{\Theta}}{I_0} \frac{r^2}{1 + \cos^2 \Theta} \quad \text{und} \quad K = \frac{2\pi n_0^2}{N_A \lambda^4} \left(\frac{\partial n}{\partial C} \right)^2$$

R_{Θ} stellt den Zusammenhang zwischen der Intensität der Streuung i_{Θ} und dem Radius des Teilchens r her. K ist abhängig von der Viskosität des Lösungsmittels η , der Wellenlänge λ und der Avogadrozahl N_A . Die Intensität der Streuung ist somit umso höher, je größer der Radius des Teilchens und je kürzer die eingestrahlte Wellenlänge ist. Zur Bestimmung der molaren Masse wird die Gleichung zu

$$M = \frac{R_{\Theta}}{KC}$$

umgeformt, wobei C die Massenkonzentration des Teilchens in Lösung ist.

Im Gegensatz zum elastischen Meßexperiment ist die Registrierzeit bei der Methode der dynamischen Lichtstreuung (engl.: Dynamic Light Scattering, DLS) sehr kurz und liegt im Bereich einer Translations-, Rotations- oder intermolekularen Bewegung von Biomakromolekülen (10^{-8} s). Es können daher auch Konformationsänderungen von Molekülen in Lösung beobachtet werden. In erster Linie hängen die hydrodynamischen Eigenschaften eines Teilchens jedoch von seiner Form und Größe ab. Ziel der dynamischen Lichtstreuung ist es aus dem Diffusionskoeffizienten des Teilchens den hydrodynamischen Radius zu berechnen und bei Kenntnis der

Molmasse Rückschlüsse auf Teilchenpopulationen und –verteilungen innerhalb der Lösung zu ziehen.

Das grundlegende Prinzip der dynamischen Lichtstreuung ist der Doppler-Effekt. Bewegt sich eine Wellen (Schall, Licht) aussendende Quelle mit einer bestimmten Geschwindigkeit v relativ zum Beobachter, so erleidet die Welle beim Beobachter eine Frequenzverschiebung $\Delta\nu = \nu - \nu_0$. Die Wellengeschwindigkeit ist damit gegeben durch

$$\nu = \frac{\nu_0}{1 - v/v_0}.$$

Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung bewegen sich die Moleküle in allen Raumrichtungen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Je größer ein Teilchen ist, desto langsamer bewegt es sich und desto kleiner ist sein Diffusionskoeffizient. Das bedeutet, daß durch die Lichtstreuung ein Spektrum von zur Frequenz des Primärlichtes verschobenen Frequenzen entsteht. Dieses Spektrum wird optisches Doppler-Shift-Spektrum genannt und besteht aus einer Summe von Lorentz-Funktionen, die die Intensitätsfluktuationen in der Lösung wiedergeben (Abb. 21).

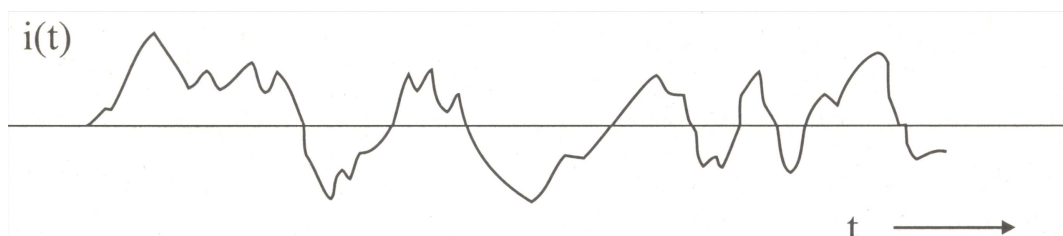


Abb. 21: Intensitätsfluktuationen der Streustrahlung aufgrund der Brownschen Molekularbewegung der streuenden Teilchen (aus Hans-Joachim Galla „Spektroskopische Methoden in der Biochemie“ Thieme Verlag, 1988).

Mathematisch sind Frequenzspektren und Autokorrelationsfunktionen gleichwertig und durch Fourier-Transformation beliebig ineinander überführbar. Um eine möglichst hohe Auflösung bei der Bestimmung der Frequenzverbreiterung zu erzielen, bedient man sich daher nicht eines mit dem Interferometer gemessenen Frequenzspektrums sondern der Autokorrelationsmethode.

Ziel der Autokorrelation ist es, mit entsprechenden elektronischen Geräten (Korrelatoren), die Intensitätsfluktuationen in der Lösung quantitativ und zeitlich hochaufgelöst zu erfassen. Anstelle der Frequenzverschiebung $\Delta\nu$ werden die zu

verschiedenen Zeiten von der Signalquelle ankommenden Photonen registriert und man vergleicht den Meßwert $X(t)$ eines Signals zum Zeitpunkt t mit dem Wert zum Zeitpunkt $X(t + \tau)$ und mittelt das Produkt über einen größeren Zeitraum von t . Dieser Mittelwert entspricht der Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$. τ gibt hierbei den Arbeitstakt an, mit dem Intensitätssignale im Korrelator verarbeitet werden. Bei kleinem τ , also bei geringem zeitlichem Abstand zweier Meßpunkte ist die Korrelation der beiden Ereignisse hoch, die Autokorrelationsfunktion ist positiv. Je größer der zeitliche Abstand zwischen zwei Meßpunkten desto geringer wird die Korrelation zwischen den beiden Ereignissen, die Werte für $X(t)$ und $X(t + \tau)$ können positive und negative Werte annehmen, $g(\tau)$ wird annähernd null (Abb. 22).

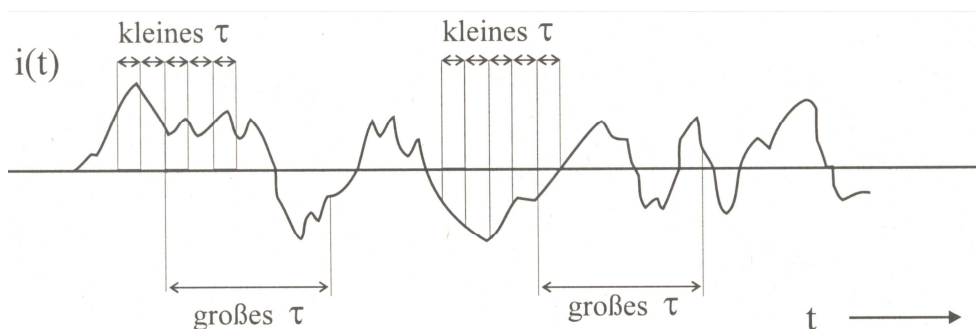


Abb. 22: Autokorrelation für verschieden große τ -Werte. Je größer τ desto unwahrscheinlicher ist die Korrelation zwischen zwei Ereignissen. Die Korrelationsfunktion geht gegen null (aus Hans-Joachim Galla „Spektroskopische Methoden in der Biochemie“ Thieme Verlag, 1988).

Für starre Kugeln in einem monodispersen System gilt ein exponentieller Abfall der Autokorrelationsfunktion, wobei $g(\tau)$ direkt abhängig ist vom Diffusionskoeffizienten D des Teilchens mit dem hydrodynamischen Radius R_h und der Lösungsmittelviskosität η gemäß der Stokes-Einstein-Beziehung

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}.$$

In polydispersen Proben ist der mittlere Radius der Teilchen um einen Mittelwert breit verteilt. Die Teilchen besitzen ihrer Größe entsprechende Diffusionskoeffizienten und ihre Korrelationsfunktion kann dann nicht mehr als einfache Exponentialfunktion beschrieben werden, sondern entspricht vielmehr einer Überlagerung von solchen

Exponentialfunktionen. Die einzelnen Funktionen müssen zusätzlich durch ihre Streuintensitätsbeiträge F gewichtet werden

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^\infty F(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma, \quad \Gamma = q^2 D.$$

Die Auswertung dieser Integralbeziehung ist naturgemäß schwierig und wird in der Praxis, wie auch in unserem Fall von einer Computer-Software übernommen. Die Software paßt an die gemessene Autokorrelationsfunktion die Funktion

$$g(\tau) = \exp(-Dq^2 \tau)$$

an. q und τ können aus der Messung bestimmt werden, der Diffusionskoeffizient ergibt sich hiernach durch Auflösen der Gleichung. Aus der logarithmierten Autokorrelationsfunktion

$$\log(\tau) = a + b\tau + c\tau^2$$

ergibt sich der Polydispersitätsindex PI mit

$$PI = c/b^2.$$

Für eine ideale monodisperse Probe liegen die Meßpunkte der logarithmierten Autokorrelationsfunktion alle exakt auf einer Geraden. PI ist gleich null.

Eine schematische Darstellung einer Meßapparatur zur Messung der dynamischen Lichtstreuung einer Lösung ist in Abb. 23 dargestellt.

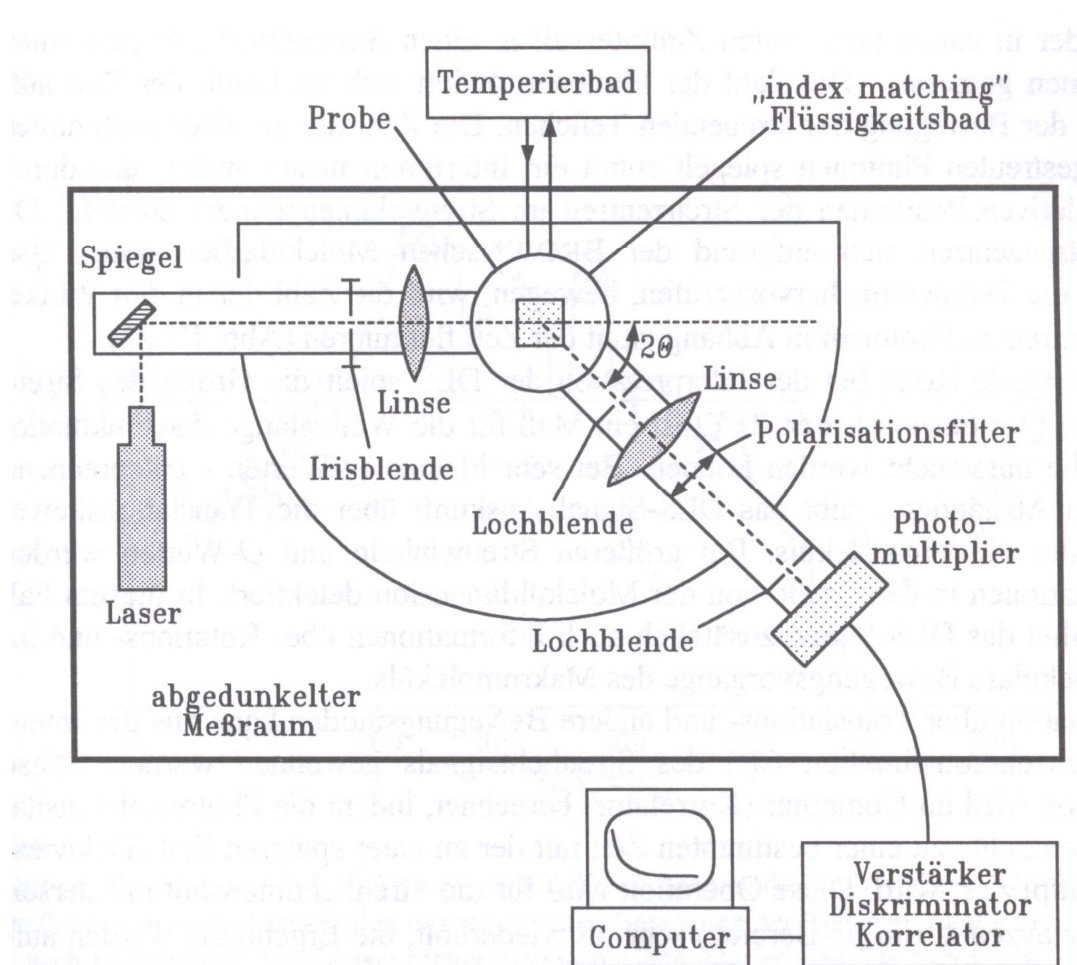


Abb. 23: Schematische Darstellung einer Meßapparatur zur Messung der dynamischen Lichtstreuung. Die von der Probe gestreuten Photonen werden im Winkel 2θ vom Photomultiplier registriert und im Korrelator verrechnet.

2.5.5 Theoretische Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse

Kohärente Thomson-Streuung

Für die Wechselwirkung zwischen Röntgenstrahlen und Materie sind drei Prozesse von Bedeutung: 1) Absorption, 2) inkohärente Streuung (Compton-Effekt) und 3) kohärente Streuung. Inkohärente oder inelastische Streuung entsteht durch Stöße zwischen den Röntgen-Photonen und den Hüllenelektronen der Atome. Die gestreute Strahlung weist eine etwas größere Wellenlänge auf, als die einfallende Strahlung. Sie ist nicht interferenzfähig und erhöht lediglich den Streuuntergrund. Bei der kohärenten oder elastischen Streuung werden die Hüllenelektronen der Atome zu erzwungenen Schwingungen angeregt, die dann selbst elektromagnetische Wellen gleicher Wellenlänge abstrahlen. Der Streufaktor $f(2\theta)$ ist direkt proportional zur Kernladungszahl Z und dem Elektronenradius r_{el} .

$$f(2\theta) \propto Z \cdot r_{el} \quad (II.1)$$

Die Interferenz der von den verschiedenen Atomen ausgehenden elastisch gestreuten Partialwellen bildet die Grundlage für die Röntgenstrukturanalyse an Kristallen. Nur für bestimmte Beugungswinkel 2θ weisen benachbarte Wellenzüge die gleiche Phase auf, so daß konstruktive Interferenz erfolgt. Durch Auswertung des Beugungsmusters kann die Kristall- bzw. Molekülstruktur bestimmt werden.

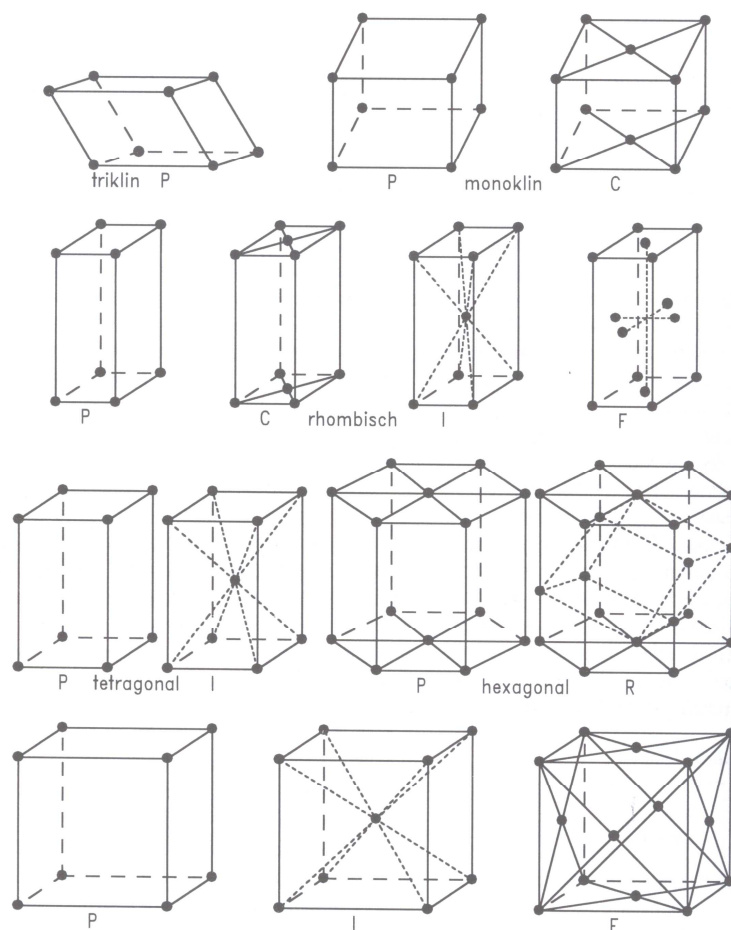
Kristallmorphologie

Bei der kohärenten Thomson-Streuung wird ein Elektron von der einfallenden Röntgenstrahlung zu einer erzwungenen Schwingung angeregt. Um von der Streuung am einzelnen Atomkern zur Beugung am Kristallgitter zu kommen, müssen die Kugelwellen der Einzelatome aufsummiert werden. Ein Kristallgitter baut sich aus einzelnen Elementarzellen auf. Die Elementarzelle ist die kleinste Einheit eines Kristalls, die sich periodisch wiederholt. Ihre Kantenlängen (Gitterkonstanten) werden mit a , b , c und ihre Winkel mit α , β , γ bezeichnet. Die Achsen werden so gewählt, daß sie mit Richtungen hoher Symmetrie übereinstimmen. Die Elementarzelle enthält im einfachsten Fall die Kristallatome auf ihren Ecken; in komplizierten Systemen, wie bei Proteinen, kann die Elementarzelle ein oder mehrere Proteine mit je tausenden von Atomen beinhalten. Die Kristallsysteme lassen sich in sieben Klassen einteilen (Tab. 3).

Tab. 3: Die sieben aus der klassischen Geometrie abgeleiteten Kristallsysteme

Kristallsystem	Achsenabschnitte	Achsenwinkel
triklin	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$
monoklin	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
rhombisch	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
rhomboedrisch	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
kubisch	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Für einfache Punktgitter kann man darüber hinaus 14 sogenannte Bravais-Gitter unterscheiden (Abb. 24).


Abb. 24: Die 14 verschiedenen Bravais-Gitter (P: primitive Zellen; C: einfach zentrierte Gitter; F: flächenzentrierte Gitter; R: rhomboedrische Gitter).

Durch Ineinandersetzen dieser einfachen Translationsgitter kann man sich auch den Aufbau komplizierterer Strukturen vorstellen. Durch Inversion, Rotation und Spiegelung sowie durch spätere Translation können die Symmetrieelemente kombiniert werden, so daß letztlich 230 Raumgruppen möglich sind, die die Art und räumliche Lage der Symmetrieelemente im Kristall widerspiegeln. Von einer Struktureinheit ausgehend, reproduzieren die Operationen der Raumgruppe die gesamte Kristallstruktur.

Kristallnetzebenen, also der Ursprung der Beugungsreflexe, werden durch sog. Millersche Indizes hkl angegeben. Die Indizes stellen die Schnittpunkte der betrachteten Netzebene mit den Kristallachsen dar (Abb. 25).

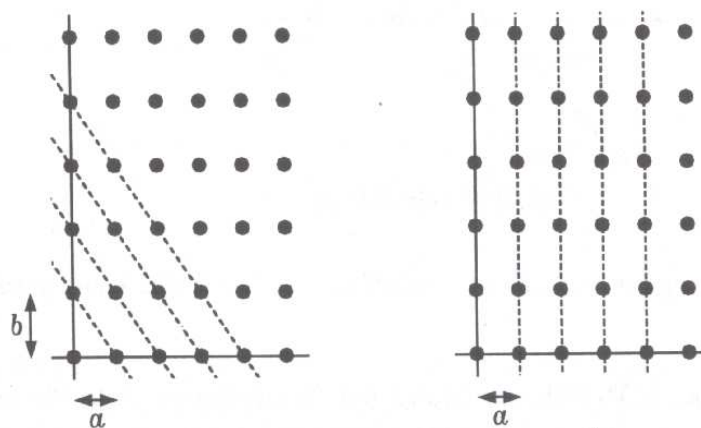


Abb. 25: Gitterebenen und Miller'sche Indizes. Links: Achsenabschnitte a , b , ∞ (c -Achse steht senkrecht auf der Papierebene), Miller'sche Indizes: 110. Rechts: Achsenabschnitte a , ∞ , ∞ , Miller'sche Indizes 100.

Aus dem periodischen Aufbau der Kristalle folgt, daß es zur Ebene im Kristall viele parallele Netzebenen gibt, die in gleichbleibendem Abstand angeordnet sind. Dieser Gitterabstand d_{hkl} ist wichtig in der Beugungstheorie. Für einen rhombischen Kristall ergibt sich aus geometrischen Zusammenhängen

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (\text{II.2})$$

und für ein kubisches Gitter ($a = b = c$)

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2 + k^2 + l^2}{a^2} \quad (\text{II.3})$$

Das reziproke Gitter

Wenn monochromatische Röntgenstrahlung der Wellenlänge λ in einem bestimmten Winkel α_0 auf eine Netzebene trifft, tritt nur dann eine Verstärkung der Streustrahlung auf, wenn der Abstand zwischen zwei Wellenläufen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist (Abb. 26). Der Zusammenhang folgt der Laue-Gleichung in allen drei Raumrichtungen a, b und c:

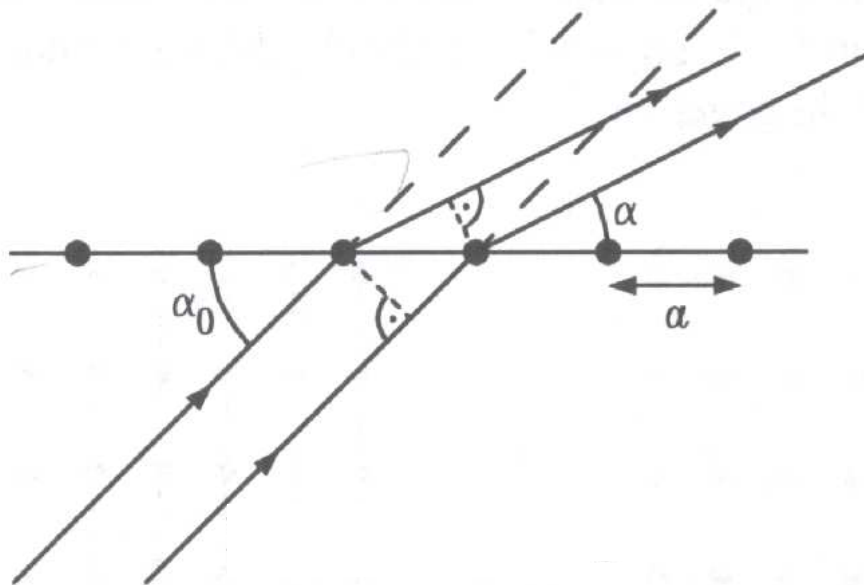


Abb. 26: Streugeometrie im eindimensionalen Fall (übertragbar auf alle drei Raumrichtungen).

$$\begin{aligned}
 h \cdot \lambda &= a (\cos \alpha - \cos \alpha_0) & \text{mit: } h=0,1,2,\dots \\
 k \cdot \lambda &= b (\cos \beta - \cos \beta_0) & \text{mit: } k=0,1,2,\dots \\
 l \cdot \lambda &= c (\cos \gamma - \cos \gamma_0) & \text{mit: } l=0,1,2,\dots
 \end{aligned}
 \tag{II.4}$$

Die Millerschen Indizes h , k und l sind ganze Zahlen, a , b und c stellen die Abstände der Streuzentren in der jeweiligen Raumrichtung des Kristalls dar. Die Winkel α_0 , β_0 , und γ_0 geben die Richtung der einfallenden bzw. α , β und γ die Winkel der gestreuten Strahlung an. In allen anderen Raumrichtungen wird bei genügend hoher Zahl an Streuzentren die Streustrahlung ausgelöscht. Fällt senkrechte Röntgenstrahlung entlang der Raumrichtung a auf das Gitter, erhält man als Beugungsmuster eine Reihe paralleler Linien. Der Abstand der Linien a^* im Beugungsmuster verhält sich reziprok zum Gitterabstand a im Kristallgitter. Ebenso verhält es sich mit den beiden

anderen Raumrichtungen b und c . Das Beugungsmuster eines Kristallgitters wird daher auch als reziprokes Gitter beschrieben. Dieses Gitter besitzt die Gitterkonstanten a^* , b^* , c^* und die Winkel α^* , β^* und γ^* . Analog zum normalen Gittervektor $\vec{r} = u\vec{a} + v\vec{b} + w\vec{c}$ im Kristallgitter, definiert man einen reziproken Gittervektor $\vec{S}_{hkl} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$. Der Betrag dieses reziproken Gittervektors ist dem reziproken Gitterebenenabstand proportional $|\vec{S}_{hkl}| = 1/d_{hkl}$. Der reziproke Gittervektor steht senkrecht auf der Netzebenenschar hkl . Wenn man jeder Gitterebene einen s-Vektor zuordnet, spannen die Vektoren ein reziprokes Gitter auf, das als mathematisches Konstrukt bei der Ermittlung von Gittervektorbeträgen sehr hilfreich ist. Aus dem Betrag kann über den Gitterebenenabstand d_{hkl} auf die Gitterkonstanten rückgeschlossen werden.

Die Braggsche Gleichung

1913 erkannte Bragg, daß die Kristallbeugung einer Reflexion gleicht. Konstruktive Interferenz der „reflektierten“ Strahlung tritt auf, wenn die Wegdifferenz zweier an aufeinanderfolgenden Netzebenen reflektierter Strahlen gerade das n -fache der Wellenlänge beträgt. D ist der Gitterebenenabstand; Θ , der sog. Bragg-Winkel, ist für die ein- bzw. ausfallende Welle gleich groß (Abb. 27).

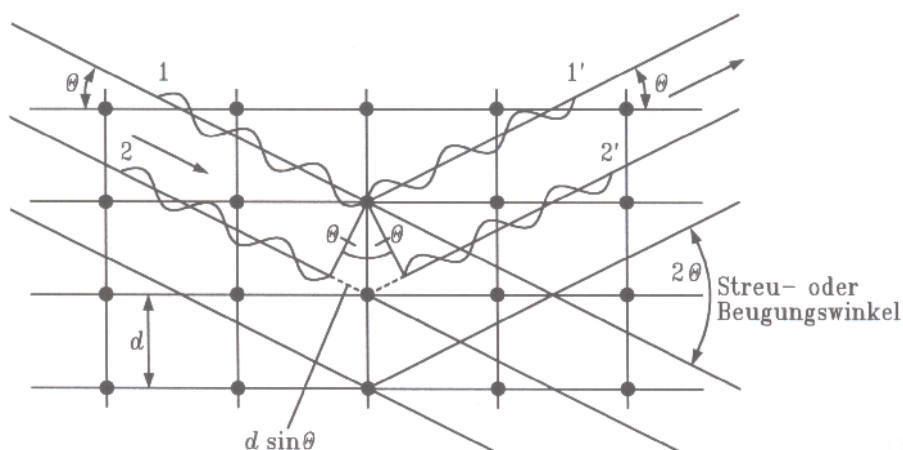


Abb. 27: Die Braggsche Reflexionsbedingung. Die Phasen der gebeugten Wellen 1' und 2' unterscheiden sich bei konstruktiver Interferenz um ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge. Der Wegunterschied zwischen den benachbarten Wellen beträgt $2d\sin\Theta$.

$$n\lambda = 2d\sin\Theta \quad \text{mit } n = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{II.5})$$

Das reziproke Gitter stellt das Beugungsbild eines Kristallgitters dar. Jeder Punkt des reziproken Gitters hat seinen Ursprung in einer „Reflexion“ an einer bestimmten Netzebene (hkl). Die zugehörigen Intensitäten sind eine Folge der unterschiedlichen Lage der Atome zu den Netzebenen der Elementarzelle. Die Laue-Gesetze und die Bragg-Gleichung beschreiben somit auf unterschiedliche Weise dasselbe physikalische Phänomen.

Die Ewald-Kugel

Beugungsbilder sind „Photographien“ des reziproken Gitters. Jeder Reflex stammt von einer ganz bestimmten Gitterebene (hkl).

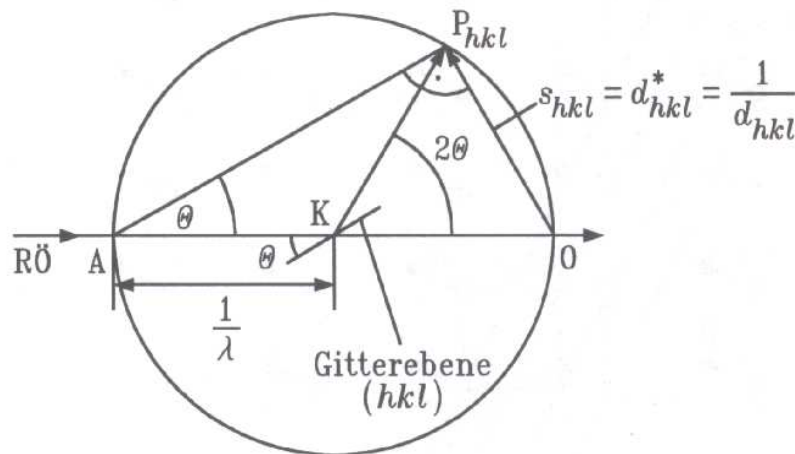


Abb. 28: Reflexionsbedingung im reziproken Raum nach Ewald. R θ : einfallender Röntgenstrahl, K: Kristall, O: Ursprung des reziproken Gitters, P: reziproker Gitterpunkt, 2 θ : Streuwinkel.

Wenn der einfallende Röntgenstrahl von A nach O verläuft (Abb. 28), beträgt der Winkel zwischen AO und AP Θ . AP muß dann der Lage der reflektierten (hkl)-Ebene entsprechen, die durch K geht. Der in K reflektierte Strahl hat die Richtung KP und der reziproke Gittervektor $s = OP$ steht senkrecht zur Gitterebene. s zeigt zu dem reziproken Gitterpunkt P_{hkl} und O ist der Ursprung des reziproken Raumes. Für alle reziproken Gitterpunkte, die auf der Kugeloberfläche zu liegen kommen, ist die Reflexionsbedingung erfüllt und der gebeugte Strahl mit dem Radius $AK = KO = 1/\lambda$ führt zu einem Reflex auf dem Detektor.

Die Elektronendichtekarte

Die Lage der Beugungsreflexe gibt Aufschluß über den Gittertyp, die Intensitäten der Reflexe lassen Aussagen über die Anordnung der Atome in der Elementarzelle zu.

Anhand eines einfachen zweidimensionalen AB-Moleklkristalles soll im Folgenden der Zusammenhang zwischen Elektronendichte und Beugungsverhalten erklärt werden. Da die Atome A und B unterschiedlich sind besteht zwischen ihnen, bei einer Wegdifferenz δ , eine Phasendifferenz $\Delta\varphi$ in allen drei Raumrichtungen von

$$\Delta\varphi = \varphi_A - \varphi_B = 2\pi/\lambda = 2\pi(hx+ky+lz). \quad (II.6)$$

Die Intensität der Streuung $I(hkl)$ hängt von der Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ und dem individuellen Streufaktor der Atome f_j ab

$$I(hkl) \propto |F(hkl)|^2 = \left| \sum_{j=1}^n f_j e^{i\varphi_j} \right|^2 = \left| \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j+ky_j+lz_j)} \right|^2 \quad (II.7)$$

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^n f_j e^{i\varphi_j} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j+ky_j+lz_j)} \quad (II.8)$$

$F(hkl)$ wird als Strukturfaktor der Elementarzelle bezeichnet. Er ist den Amplituden der gestreuten Wellen, die durch Reflexion an bestimmten (hkl) -Ebenen herrühren proportional und ist somit direkt abhängig von den relativen Positionen der unterschiedlichen Atome innerhalb der Elementarzelle.

Der Streufaktor $f_j = f_j(2\theta)$ beschreibt das Streuverhalten ruhender Atome. Infolge der natürlichen Wärmebewegung führen Atome jedoch Schwingungen um ihre Gitterposition aus. Daher mu mit einem Dämpfungsglied $\exp(-B_j \sin^2\theta/\lambda^2)$, dem Temperaturfaktor B nach Debye und Waller, gerechnet werden. Dieser bewirkt, da die Streukurven mit zunehmendem Beugungswinkel schneller an Intensität verlieren. Da die streuenden Atomelektronen nicht streng lokalisiert sind, führt man anstelle der Streufaktoren f_j die Elektronendichte $\rho_e(x, y, z)$ ein. Der Strukturfaktor kann dann durch das Fourier-Integral über das Volumen der Elementarzelle V_z umgeformt werden zu

$$F(hkl) = \int_{V_z} \rho_e(x,y,z) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV. \quad (II.9)$$

Die Anzahl der Elektronen am Ort (x, y, z) , also die Elektronendichteverteilung in der Elementarzelle ergibt sich durch Fourier-Transformation

$$\rho_e(x,y,z) = \frac{1}{V_z} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(hkl) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}. \quad (II.10)$$

Die Strukturfaktoren hkl sind demnach die Fourierkoeffizienten, die Koordinaten x, y, z entsprechen den Kantenlängen der Elementarzelle. Kennt man die F_{hkl} kann man die Elektronendichteverteilung in der Elementarzelle für jeden Punkt (x, y, z) bestimmen. In der Praxis genügt es, in einem Punkteraster mit etwa $0,2 \text{ \AA}$ Abstand Dichtewerte einzutragen um dann durch Interpolation die vorhandenen Elektronendichtemaxima zu lokalisieren. Aus den vorangegangenen Gleichungen wird deutlich, daß die Kenntnis der zugehörigen Phase notwendig ist um die Fourier-Beziehung zu lösen.

Das Phasenproblem

Wie bereits gezeigt, ist nur die Amplitude des Strukturfaktors $F(hkl)$ experimentell aus der gemessenen Intensität bestimmbar, jedoch nicht der Phasenwinkel $\varphi(hkl)$. Die Phaseninformation geht bei der Intensitätsmessung verloren. Der R-Wert gibt an, wie weit man mit einem Strukturmodell an die richtige Struktur herangekommen ist. Es wird die Summe über alle gemessenen Reflexe gebildet und mit den aus dem Strukturmodell berechneten Intensitäten verglichen. Je kleiner der R-Wert umso näher liegt das Modell an der Wirklichkeit.

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F(hkl)|_{\text{beob.}} - |F(hkl)|_{\text{ber.}} \right|}{\sum_{hkl} |F(hkl)|_{\text{beob.}}} \cdot 100 [\%] \quad (\text{II.11})$$

Die Patterson-Funktion hingegen zeigt, daß in den gemessenen Intensitäten auch Informationen über die zugehörigen Phasen stecken. Die Gleichung erfordert lediglich die Kenntnis der Strukturfaktoramplitude $|F|$, nicht aber der Phasen. Sind n Atome in einer Elementarzelle vorhanden, so werden $n(n-1)+1$ Vektoren berechnet, die alle von einem Punkt ausgehen. Die Funktion ergibt damit ein Histogramm der atomaren Abstandsverteilungen in der Elementarzelle, gewichtet nach der Streukraft der einzelnen Atome. Kennt man alle Maxima der Patterson-Funktion einer nicht allzu komplizierten Struktur, ist es möglich das jeweilige Strukturproblem zu lösen.

$$P(u,v,w) = \frac{1}{V_z} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)] \quad (\text{II.12})$$

Mit Hilfe der sog. Schweratommethode kann die Lage einiger weniger Atome mit hoher Ordnungszahl (z.B. Br^- , I^- , Hg^+ , Pt^+) neben vielen leichten Atomen in der

Elementarzelle im Allgemeinen recht einfach bestimmt werden. Da die Schweratome durch ihr großes Streuvermögen die Phasen vieler Interferenzen dominieren, können durch Fourier-Reihen auch die Positionen vieler leichter Atome lokalisiert werden. In der Praxis werden die Koordinaten der Schweratome meist aus der Differenz-Patterson-Funktion von Original- und Derivatkristall bestimmt.

Anormale Dispersion

Die anormale Dispersion dient der Kontrastverschärfung einzelner Atome im Kristall und kann damit auch der Lösung des Phasenproblems in Anwesenheit schwerer Atome dienen.

Die bisherige Ermittlung der Strukturfaktoren $F(hkl)$ erfolgte unter Annahme klassischer elastischer Thomson-Streuung der Röntgenstrahlen. Wenn die innere Anregungsenergie der streuenden Atome jedoch sehr hoch ist, also ihre Absorptionskante in der Nähe der eingestrahlten Wellenlänge liegt, kann es zu einer anormalen Streuung an den Atomen des Kristalls kommen. Die Atome im Kristallverband treten in Resonanz und ihre Streustrahlung erfährt Änderung in ihrer Amplitude und Phase. Dies kann jedoch bewußt genutzt werden um durch Variation der Photonenenergie (z.B. am Synchrotron im Bereich von 100 eV) Veränderungen bis zu 10% in den Streulängen bestimmter Atome zu erreichen. Hierdurch kann der Kontrast des betreffenden deutlich Atoms verschärft werden. Im Zusammenhang mit Schweratomen kann durch eine signifikante Variation des Streufaktors Δf_j sogar eine Phasenanalyse erfolgen.

Interpretation der Ergebnisse

Das Ergebnis der Strukturanalyse ist eine Elektronendichtekarte, da die Röntgenstrahlen an den Elektronen des Proteinkristalls gebeugt wurden. Die Auflösung der Struktur hängt von der Qualität des vermessenen Kristalls ab. Baufehler oder Mischformen der Gittertypen innerhalb eines Kristalls reduzieren die Auflösung. Bei niedermolekularen Strukturen ist die Auflösung meist so gut, daß ihre Atome als getrennte Maxima in der Elektronendichte erscheinen. Bei Proteinstrukturen liegt die Auflösung meist in der Größenordnung einer Bindungslänge. Daher ist hier eine direkte Zuordnung der Atome zur Elektronendichte nicht möglich. Da aber nur zwanzig Aminosäuren als Bausteine in Frage kommen, kann aus Erfahrungswerten für Winkel- und Bindungslängen eine

idealisierte Zuordnung vorgenommen werden, auch wenn die Dichtekarte keine atomare Auflösung besitzt.

Eine Verbesserung der Auflösung kann durch die Methode des isomorphen Ersatzes erlangt werden. Schweratome diffundieren in die Hohlräume des Kristalls ein und nehmen dort definierte neue Positionen im Kristall ein, die vorher unbesetzt waren. Es ist daher kein wirklicher Ersatz sondern vielmehr eine Besetzung von Leerstellen in der Proteinstruktur durch Schweratome, die teilweise durch Aminosäurereste koordiniert werden. Durch Kombination der Informationen aus verschiedenen Schweratom-Derivaten (multiple isomorphous replacement – MIR) kann eine Phasenbestimmung der Strukturfaktoren erfolgen. Zur Phasenbestimmung kann auch die anormale Dispersion herangezogen werden (multi-wavelength anomalous diffraction - MAD).

Die Interpretationsmöglichkeiten der Elektronendichtekarte hängt von der Auflösung der gemessenen Daten ab. Daten geringer Auflösung liegen vor, wenn die kleinsten Netzebenenabstände, denen Reflexe zugeordnet werden können, größer als 5 Å sind. Der Fourier-Synthese kann dann nur die Gestalt des Moleküls und seine Abmessungen entnommen werden. Bei einer Auflösung von 3 Å kann der Verlauf der Polypeptidketten identifiziert werden und erst ab einer Auflösung von 1.5 Å können einzelne Atome und Seitenketten zugeordnet werden.

Ein großes Problem der Proteinkristallographie ist die Lokalisation von Wasserstoffatomen innerhalb einer Proteinstruktur. Aufgrund ihres geringen Streuverhaltens, die Amplitude der Streuung ist der Elektronanzahl des Atoms proportional, muß eine hohe Auflösung $< 1\text{\AA}$ vorliegen, um eine eindeutige Zuordnung der Wasserstoffatome zu bestimmten Beugungsreflexen vornehmen zu können. Um das Problem der geringen Amplitude zu umgehen, werden für die Lokalisation von Wasserstoffatomen Neutronenbeugungsanalysen vorgenommen. Neutronenstrahlung wird an Atomkernen gebeugt. Hier ist nicht die Anzahl der Elektronen sondern vielmehr das Kernpotential entscheidend für eine starke Streuung. Die Aufnahmen werden im Optimalfall an 1mm Einkristallen aus Deuteriumderivaten (noch stärkerer Streuer) über eine Meßzeit von mehreren Wochen durchgeführt.

Da die Wasserstoffatome so schwer lokalisierbar sind, ergibt sich ein weiteres Problem für die Röntgenstrukturanalyse. Es ist sehr schwierig protonierte von deprotonierten Aminosäureresten zu unterscheiden. Auch die Zuordnung der

restlichen Aminosäurebestandteile Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff fällt aufgrund ihrer ähnlichen Elektronenanzahl schwer. Es ist daher nahezu unmöglich genaue Angaben zur Konformation einzelner Aminosäurereste in Relation zueinander zu machen. Eine mechanistische Interpretation der Daten läßt sich somit nur unter Berücksichtigung des gesamten Wasserstoffbrückennetzwerkes vornehmen. Darüber hinaus fällt auch noch die Unterscheidung von Natriumionen und Wassermolekülen schwer, da beide die gleiche Anzahl Elektronen besitzen. Einziges Indiz ist hier die Koordination durch Wasser. Wasser wird seinerseits tetraedrisch von anderen Wassermolekülen umgeben, wohingegen Natriumionen oktaedrisch durch Wasser koordiniert werden.

Neben der Strukturanalyse statischer Systeme, steigt das Interesse an Aufnahmen biologischer Prozessabläufe mit Hilfe der Röntgenbeugung. Hierzu wird die Energiedichte (10^{12} Photonen mit 6-40 keV) und Pulsbarkeit von Synchrotronstrahlungsquellen genutzt. Im Abstand von etwa 50 ps wird mit Röntgenpulsen ein Beugungsbild aufgenommen. Durch Variation der Verzögerungszeit zwischen den Messpulsen wird letztlich ein zeitaufgelöstes Bild der strukturellen Kinetik des Prozesses erhalten. Die Substrate müssen hierzu schon während der Kristallisation als geschützte „caged“ Substanzen eingebaut werden, um dann im Verlauf der Messaufnahme durch Laserbeschuß aktiviert werden zu können. Da viele biochemische Prozesse in Zeitbereichen von ps bis ms arbeiten, muß für diese Art der Messung sehr energiereiche Röntgenstrahlung (Synchrotron) eingesetzt werden. Kinetische Diffraktionsstudien wurden bereits an stimulierten Muskelfasern (Poole, 1991) und anhand des protonenpumpenden Photozyklus von Bacteriorhodopsin (Koch, 1991) erfolgreich durchgeführt.

2.5.6 Röntgenquellen

Bei der Abbremsung schneller Elektronen durch direkte oder indirekte Konversion der kinetischen Energie in Strahlung entsteht Röntgenstrahlung mit Wellenlängen von 1 bis 100 Å. Zwei Produzenten von Röntgenstrahlung finden heutzutage in der Röntgenkristallographie Anwendung, die Röntgenröhre und das Synchrotron.

In einer Röntgenröhre wird ein Elektronenstrahl durch Hochspannung von ca. 50 kV auf eine Anode aus Kupfer oder Molybdän gelenkt. Dabei werden an der Anode

größere Mengen an Wärme frei, so daß diese während der Messung gedreht und mit Wasser gekühlt werden muß um höhere Intensitäten zu erreichen.

In der Anode wird Röntgenstrahlung durch zwei Prozesse freigesetzt. Durch Abbremsen der Elektronen entsteht weiße Bremsstrahlung mit kontinuierlicher Energieverteilung. Der Bremsstrahlung überlagert ist die charakteristische Röntgenstrahlung, die dadurch entsteht, daß Elektronen aus der untersten Elektronenschale des Atoms (K-Schale) herausgeschlagen werden. Ein Elektron aus den nächsthöheren Schalen (M- oder L-Schale) springt in die Lücke der K-Schale und relaxiert so den entstandenen instabilen Zustand wieder. Die Energiedifferenz der beiden Energieniveaus wird als Röntgenstrahlung ($K\alpha$ -Strahlung) definierter Wellenlänge ($1.54 \text{ \AA}$ für Kupferanoden und $0.71 \text{ \AA}$ für Molybdänanoden) emittiert, wobei sogar eine Aufspaltung der unterschiedlichen Schwingungsniveaus aus denen das Elektron relaxiert als diskrete Wellenlänge nachgewiesen werden kann ($K\alpha_1$ und $K\alpha_2$) (Abb. 29). Einkristallmonochromatoren aus Graphit oder Quarz werden in definierter Orientierung in den Röntgenstrahl gebracht, so daß nur die $K\alpha$ -Strahlung die Bedingung für konstruktive Interferenz erfüllt. So erhält man als Primärstrahl monochromatische Röntgenstrahlung.

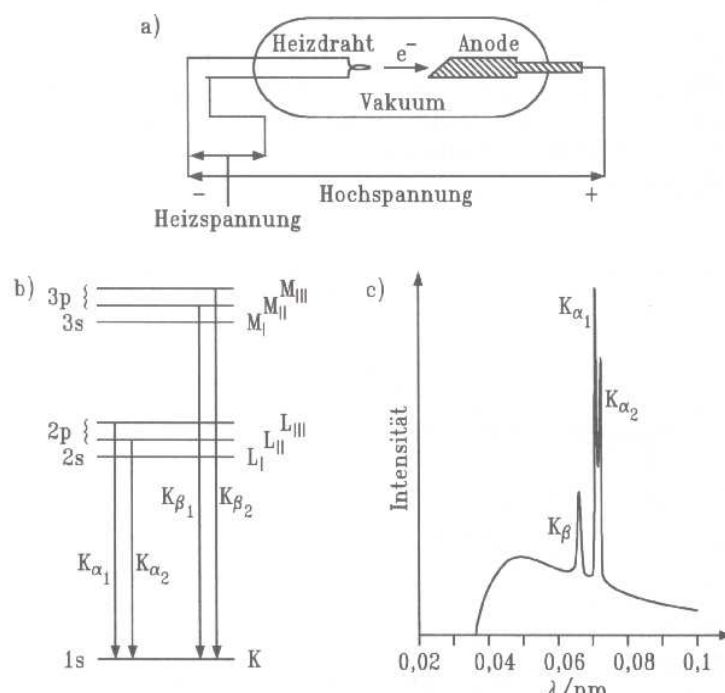


Abb. 29: Schematische Darstellung einer Röntgenröhre (a) und das Zustandekommen des charakteristischen Röntgenspektrums (b). Neben den Linienspektren aus der Elektronenrelaxation entsteht auch kontinuierliche Bremsstrahlung. Gebräuchlich sind die Anodenmaterialien Cu ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$), Mo ($\lambda = 0.71 \text{ \AA}$) und Cr ($\lambda = 2.23 \text{ \AA}$). (c) zeigt das charakteristische Röntgenspektrum einer Mo-Röhre bei 35 kV Beschleunigungsspannung.

Synchrotronstrahlung ist Bremsstrahlung von Elektronen oder Positronen, die durch ein Magnetfeld auf einer Kreisbahn gehalten werden. Wegen der hohen Geschwindigkeit der Elektronen wird die Strahlung scharf nach vorne abgestrahlt, wobei der Öffnungswinkel etwa 10^{-2} Grad beträgt. Speicherringe dienen zur Bereitstellung konstanter Strahlenenergie und hoher Ringströme von etwa 100 mA. Höhere Leuchtdichten werden durch magnetische Multipolstrukturen (Wiggler) erreicht, die eine periodische Ablenkung des Elektronenstrahls bewirken.

Die hohen Intensitäten der Synchrotronstrahlung liegen 3 bis 4 Größenordnungen über den konventioneller Röntgenröhren und erlauben daher auch die Durchführung von Streuexperimenten an sehr kleinen Probenvolumina (Abb. 30).

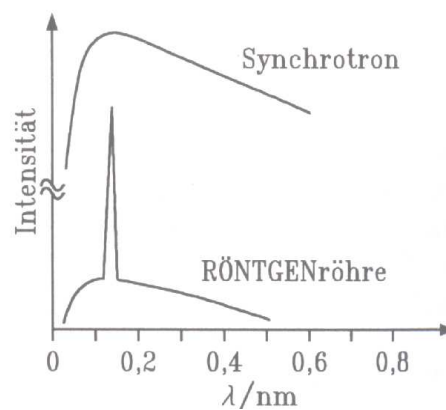


Abb. 30: Die Intensität der Synchrotronstrahlung ist um mehrere Größenordnungen höher als die der Röntgenröhre und die Wellenlängenverteilung ist deutlich breiter.

Die maximale Energie, die ein Synchrotron erzeugen kann hängt vom Radius des Rings (r), der Stärke des angelegten Magnetfeldes (B) und der Ladung des Teilchens (q) sowie von der Lichtgeschwindigkeit (c) ab.

$$E_{\max} = r \cdot q \cdot B \cdot c \quad (\text{II.13})$$

Die Elektronen umlaufen das Synchrotron in Form von „bunches“, wobei in periodischen Abständen Röntgenblitze ausgesandt werden. Die Pulsdauer beträgt normalerweise 0,1 ns, die Pulsfolge etwa 1-1000 ns. Die Strahlung weist eine Wellenlängenverteilung auf, wobei ihr Mittelwert $\lambda_c = 5,6 \cdot RE^{-3}$ beträgt (R ist der Radius des Speicherrings und E die Energie der Elektronen in GeV). Der Ring der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble hat einen Radius von 20m und arbeitet mit einer Energie von 6 GeV, so daß $\lambda_c = 0,6 \text{ \AA}$ beträgt. Die Brillanz

der Synchrotronquelle liegt bei 10^{12} bis 10^{14} Photonen bei 0,1 % relativer Wellenlängenbreite wohingegen eine konventionelle Röntgenröhre nur eine Brillanz von 10^6 bis 10^7 Photonen bei 0,1 % Wellenlängenbreite aufweist. Die hohe Brillanz der Synchrotronquelle wird auch von anderen Beamline-Benutzern wie Material- und Grenz- bzw. Oberflächenwissenschaften genutzt (Abb. 31).

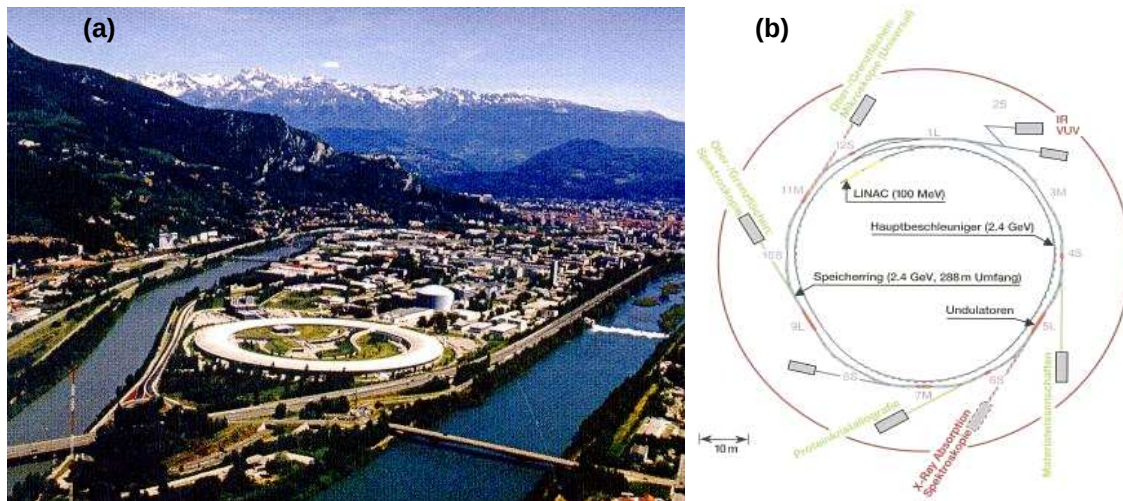


Abb. 31: (a) ESRF in Grenoble. (b) Schematischer Aufbau eines Synchrotrons und potentielle Endabnehmer von Röntgenstrahlung.

2.5.7 Datenaufnahme

Präparation des Kristalls

Die Kristalle werden aus den Ansätzen mit Hilfe von entsprechendem Kristallbesteck isoliert bzw. in Mini-Loops aufgenommen, so daß sie für die Vermessung im Diffraktometer als Einzelkristalle handhabbar sind. Proteinkristalle enthalten zwischen 30% und 70% Wasser. Sie können daher während der Messung nicht wie Kristalle niedermolekularer organischer oder anorganischer Substanzen behandelt werden, da sie sonst austrocknen und damit ihre Kristallstruktur zerstört werden würde. Die Proteinkristalle werden daher nach Aufnahme in einen Loop in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren, so daß die internen Wassermoleküle in den Kristallkanälen nicht zu Eiskristallen werden, die den Kristall zerstören würden. Der Kristall wird auch während der Messung ständig gekühlt, so daß auch lange Aufnahmezeiten möglich sind. Eine Messung bei Raumtemperatur würde zu einer viel schnelleren Zerstörung des Kristalls durch die Röntgenstrahlung führen. Desweiteren führt die tiefe Temperatur zu einem besseren Signal/Rausch-Verhältnis, da der Einfluß von Gitterschwingungen auf die Messung geringer ist.

Eine weitere Methode stellt die Vermessung der Kristalle in Kapillaren dar. Der Kristall wird durch Adhäsionskräfte an der Glaswand einer verschlossenen Kapillare gehalten und durch einen in der Nähe applizierten Tropfen Mutterlauge in einer gesättigten Atmosphäre gehalten. Die Glaskapillare bzw. der in Loops tiefgefrorene Kristall wird auf dem Goniometerkopf des Röntgendiffraktometers montiert und so justiert, daß er bei allen Aufnahmewinkeln während der Drehung des Goniometerkopfes im Röntgenstrahl zentriert bleibt.

Aufnahmetechniken

Das Beugungsexperiment ist zunächst recht einfach aufgebaut. Ausgehend von einer Röntgenquelle wird der Röntgenstrahl in einem Kollimator vereinzelt und durch einen Monochromator eine diskrete Wellenlänge eingestellt. Nach Probendurchgang wird der gebeugte Strahl durch einen Analysator auf den Detektor geleitet und dort registriert (Abb. 32).

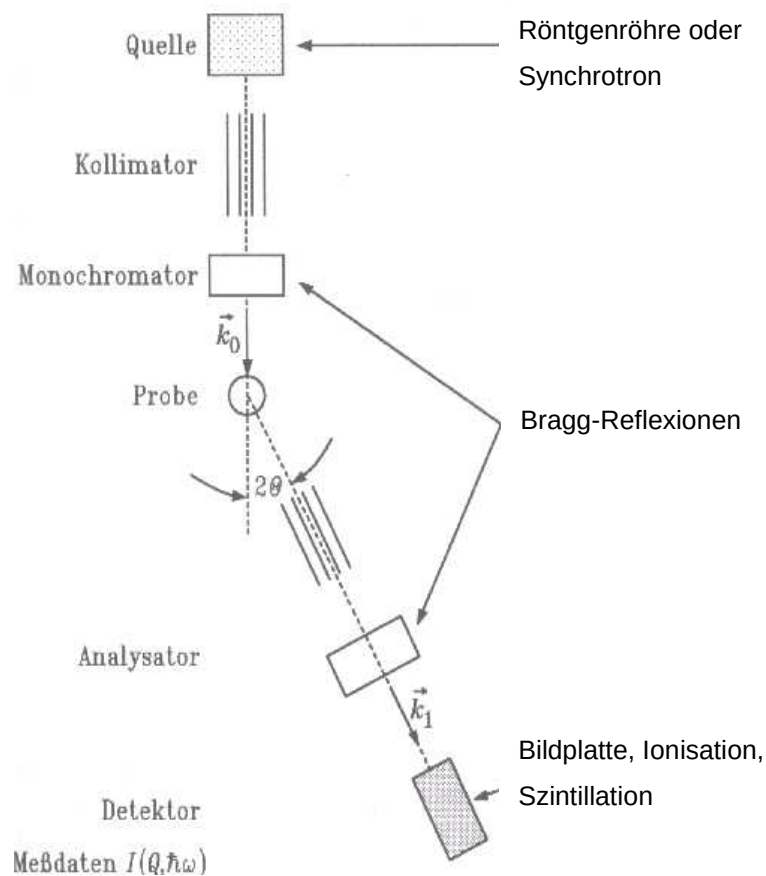


Abb. 32: Prinzipieller Aufbau eines Röntgenbeugungsexperimentes. k_0 bzw. k_1 geben die Richtungsvektoren vor bzw. nach Probendurchgang an.

Aus der Position der Röntgenreflexe im Beugungsbild können die Abmessungen der Elementarzelle ermittelt werden. Destruktive Interferenzen geben darüber hinaus Auskunft über den Typ des Translationsgitters und damit über die Raumgruppe. Die Ermittlung der genauen Position der einzelnen Atome innerhalb der Elementarzelle ist abhängig von der Kenntnis möglichst vieler Beugungsreflexintensitäten. Bei einem Kristallvolumen V_K und z Elementarzellen in der Volumeneinheit ergibt sich bei einer Drehung des Kristalls mit einer Drehfrequenz ω die Intensität $I(hkl)$ eines Reflexes mit dem Strukturfaktor $F(hkl)$ zu

$$I(hkl) \propto i_0 \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 m_0 c^2} \right)^2 |F(hkl)|^2 \frac{\lambda^3 z^2 V_K}{\omega R^2} \cdot \left(\frac{1 + \cos^2(2\Theta)}{2} \right) \cdot \frac{1}{\sin(2\Theta)}. \quad (II.13)$$

Die beiden letzten Terme (kombinierter Lorentz-Polarisationsfaktor) sind von der Aufnahmetechnik abhängig. Sie berücksichtigen die Polarisierung der Röntgenstrahlung und die Tatsache, daß die Netzebenen verschieden lange Verweildauern in Reflexionsstellung besitzen. Laut Braggscher Gleichung ist die Reflexionsbedingung erfüllt, wenn bei festem Streuwinkel 2Θ die Wellenlänge λ (Laue-Methode) oder bei festem λ (monochromatisches Röntgenlicht) 2Θ variiert wird. Die Variation von 2Θ kann entweder durch Messen eines statistisch orientierten Kristallpulvers (Pulvermethode) oder durch Drehen des Kristalls (Drehkristallmethode) erreicht werden.

Bei der Drehkristallmethode werden Einkristalle mit Dimensionen zwischen etwa 0,05 und 0,5 mm benötigt. Der zu untersuchenden Einkristall wird senkrecht zur Primärstrahlachse um eine Achse (z.B. die c-Achse) gedreht (Abb. 33). Die Reflexe mit gleichem l ($l = 1$ bzw. $l = -1$) liegen auf einer Kreislinie im gleichen Abstand ober- und unterhalb des Äquators. Aus dem Abstand der Schichtlinien unter Berücksichtigung des Abstands Kristall-Detektor kann somit die Gitterkonstante c berechnet werden. Die Gitterkonstanten a und b erhält man durch Drehkristallaufnahmen um die a- bzw. b-Achse.

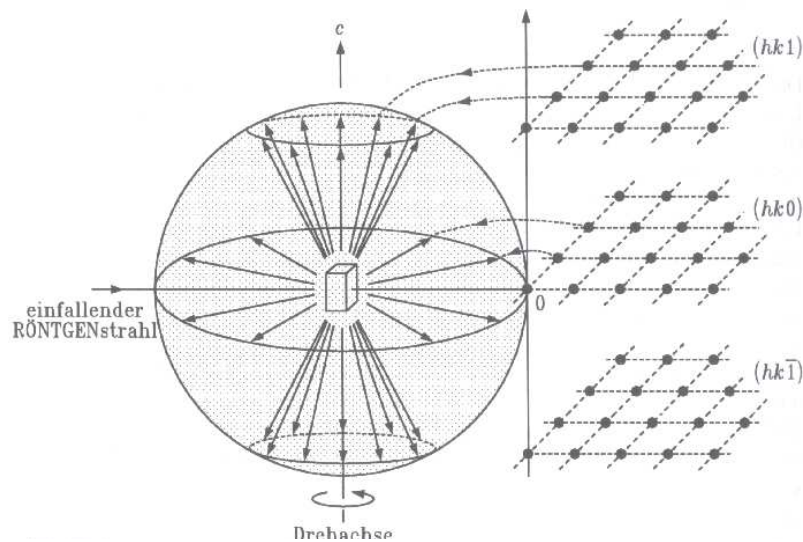


Abb. 33: Reziprokes Gitter beim Drehkristallverfahren. Alle Reflexe bei einer Rotation um die c-Achse stammen von $(hk0)$ -Ebenen. Die restlichen Schichtlinienreflexe liegen parallel zu den oben gezeigten.

Detektionsmethoden

Für Einkristallstrukturanalysen werden heute im Allgemeinen Vierkreis-Diffraktometer verwendet. Sie verfügen über vier unabhängige computergesteuerte Kreise, die beliebige Kristallorientierungen und Meßgeometrien ermöglichen. Der Kristall wird in zwei Dimensionen so gedreht, daß der reziproke Gittervektor des zu vermessenden Reflexes in die Äquatorialebene des umlaufenden Detektors fällt. Die dritte Dimension dient der Drehung des Kristalls unter 2θ Bragg-Bedingungen, in der vierten Dimension befindet sich der Detektor (Abb. 34).

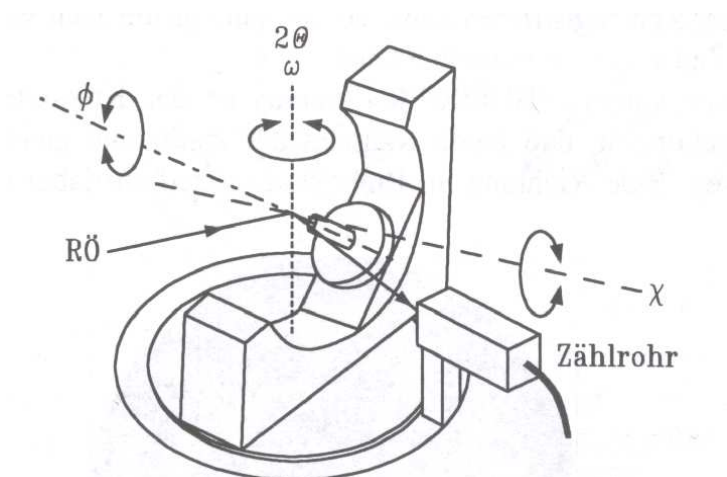


Abb. 34: Ein Vierkreis-Diffraktometer. Das Gerät ist in der horizontalen Ebene drehbar (ω -Kreis). Der Goniometerkopf ist in χ - und in ϕ -Richtung drehbar. Der Detektor ist coaxial zum ω -Kreis und gewährleistet die 2θ -Bedingung.

Detektiert werden die gebeugten Röntgenstrahlen mit Hilfe eines Flächendetektors, einer Ionisationskammer oder eines Zählrohrs.

Als Flächendetektoren werden heute Bildplatten „image plates“ oder CCD-Detektoren eingesetzt. Die Bildplatte arbeitet wie ein fotografischer Film. Sie besteht aus einer mit Eu^{2+} dotierten BaClF-Schicht, die durch Belichtung mit Röntgenstrahlen im Minutenbereich in metastabile Zustände angeregt werden kann. Bei der Auslesung der Platte werden die metastabilen Zustände durch Laserbestrahlung zur Emission von Photonen angeregt. Die Informationen auf der Platte können durch Belichtung mit sichtbarem Licht gelöscht und die Platte damit erneut eingesetzt werden.

Die Ionisationskammer und das Zählrohr sind mit einem geeigneten Gas (Ar bei 10^4 Pa) gefüllte Kammern, in denen ein dünner Metalldraht eingespannt ist. Zwischen dem Draht und der Kammerwand liegt eine Hochspannung von 1-2 kV an. Jedes Röntgenquant, das durch eine dünne Folie in die Kammer eindringt erzeugt in dem Gas Ionen und Elektronen. In dem angelegten elektrischen Feld werden die Elektronen beschleunigt, bilden durch Stoßionisation weitere Elektronen und Ionen und rufen letztlich eine stoßförmige Entladung zwischen Draht und Kammerwand hervor. Entweder wird der Entladestrom gemessen (Ionisationskammer) oder die Stromstöße werden einzeln gezählt (Zählrohr). In Szintillationszählern treffen Röntgenquanten auf einen Kristalldetektor, der ihre Energie in Fluoreszenz umwandelt. Die Lichtquanten wiederum lösen in einer Photokathode Elektronen aus, deren Strom von einem Sekundärvervielfacher verstärkt und elektronisch registriert werden kann.

2.6 Thema der Arbeit

Da Komplex I aus zwei makroskopischen Armen besteht, einem peripheren matrix- bzw. cytosolständigen und einem Membranarm, lag es nahe die beiden Arme getrennt voneinander zu kristallisieren. Die Kristallisation und Strukturaufklärung des peripheren Arms ist bereits gelungen, die Strukturlösung des Membranarms, der das energetische Kopplungszentrum beinhaltet, steht nach wie vor noch aus. Ziel dieser Arbeit war es, Bedingungen für eine Kristallisation des membranständigen Teils von Komplex I zu finden und eine erfolgsversprechende Kristallisationsstrategie zu entwickeln.

Als Modellorganismus wurde der Ascomycet *Neurospora crassa* verwendet. Es war bekannt, daß dessen Komplex I durch chaotrope Salze in die beiden Arme zerlegt werden und der membranständige Teil mit hoher Ausbeute isoliert werden kann.

Die Röntgenstrukturanalyse setzt die Existenz eines Einkristalls aus Proteinmolekülen voraus. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zunächst einen geeigneten Präzipitationsdruck zu finden, der einen möglichst geordneten Phasenübergang des Proteins erlaubt. Hiernach sollten, um ein optimales Kristallwachstum zu garantieren, Methoden zur Messung und Optimierung der Proteinstabilität unter Einfluß des Präzipitationsdruckes etabliert werden um einen möglichst hohen Anteil an konformationell einheitlichen monodispersen Proteinmolekülen in der Kristallisationslösung über den Zeitraum der Kristallisation hinweg zu erhalten und somit ein optimales Größenwachstum der Kristalle zu garantieren. Hierzu wurde der Einfluß der Lösungsparameter wie Ionenart und -stärke, Detergenzart und -konzentration, pH-Wert und Temperatur des Kristallisationsansatzes sowie die Auswirkungen der angewendeten Kristallisationstechnik auf die Proteinstabilität überprüft und optimiert.

Gewachsene Kristalle wurden am Röntgengenerator vermessen und ihr Diffraktionsmuster auf Hinweise einer proteinogenen Identität des Kristalls hin untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Präparation des Membranarms von Komplex I

3.1.1 Anzucht von *Neurospora crassa*

Die Makrokonidien von *Neurospora crassa* wurden nach Animpfung von 300 ml Erlenmeyerkolben mit Vogelsmedium aus 3 g/l Natriumcitrat, 0,1 g/l CaCl_2 ; 2 H_2O , 5 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l NH_4NO_3 , 0,2 g/l MgSO_4 ; 7 H_2O , 5 $\mu\text{g/l}$ Biotin, 20 g/l Saccharose und 0,1 ml/l Spurenelementlösung aus 50 g/l Zitronensäure; H_2O , 50 g/l ZnSO_4 ; 7 H_2O , 2,5 g/l CuSO_4 ; 5 H_2O , 0,5 g/l MnSO_4 ; H_2O , 10 g/l $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$; 6 H_2O , 0,5 g/l Na_2MoO_4 ; 2 H_2O , 0,5 g/l H_3BO_4 und 0,2 % Agar gewonnen (Vogel, 1956; Davis und de Serres, 1970). Die ersten 2 Tage wurden die Kulturen im Dunkeln, danach im Licht bei 26 – 28 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Anzucht der Hyphen erfolgte in mit Preßluft belüfteten 8 l Batchkulturen mit Vogelsmedium (Weiss et al., 1970; Davies und de Serres, 1970). Nach 24 – 26 h Wachstum bei 26 - 28 °C wurde das Mycel über einen 40 cm Büchnertrichter abfiltriert. Die abfiltrierten Hyphen wurden in Aluminiumfolie bei –70 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3.1.2 Präparation der Mitochondrienmembranen

Die folgenden Präparationsschritte wurden alle bei 4 °C durchgeführt. Eine 800 g Portion tiefgefrorene *N. crassa* Hyphen wurden mechanisch mit einem Hammer zerkleinert. Die grob zerkleinerten Hyphen wurden mit 5 L Isolationsmedium (50 mM TrisCl pH 7,5 und 15 % Saccharose) in einem Küchenmixer (Fa. Rotor AG, Modell G 800) homogenisiert und in einer Korund-Mühle zum Aufschluß der Zellen gemahlen. Pro Liter aufgeschlossenem Rohextrakt wurde 1 ml Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung (PMSF; 0,1 M in Isopropanol) zur Hemmung von Proteasen zugegeben. Durch 10 min Zentrifugation bei 6.000 g (4.500 rpm, 4 °C, Rotor H6000A/HBB6, Kühlzentrifuge RC 3B Plus, Fa. Du Pont Sorvall) wurden Zellkerne und Hyphenwände abgetrennt. Der Überstand wurde 120 min bei 10.000 g (7.500rpm, 4 °C, Rotor SLC-6000, Kühlzentrifuge Evolution RC, Fa. Kendro Sorvall), zur Sedimentierung der Mitochondrien zentrifugiert. Die Mitochondriensuspension wurde auf ein Volumen von 250 ml mit 0,3 M Tris-NaCl-Puffer pH 8,0 (0,3 M NaCl und 50 mM TrisCl pH 8,0) gebracht und mit einem Teflon-in-Glas-Homogenisator suspendiert. Hiernach wurden die Mitochondrien in einer French Press (Fa. SLM, Aminco) bei 1.100 psi aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Mitochondrien wurden

mit einer anschließenden 20 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) sedimentiert. Die Mitochondrienmembranen befanden sich im Überstand und wurden durch eine anschließende 120 min Ultrazentrifugation bei 175.000 g (50.000 rpm, Rotor 60 Ti, Ultrazentrifuge Discovery 90, Fa. Sorvall) abzentrifugiert und in 15 g Portionen bei – 70 °C aufbewahrt.

3.1.3 Präparation von Komplex I

Alle folgenden Schritten wurden bei 4 °C durchgeführt. Eine tiefgefrorene 15 g Portion Mitochondrienmembranen wurden zur Solubilisierung der Membranproteine mit 30 ml 7,5 % [w/v] β -D-Octylglucopyranosid (Fa. Biomol) in 20 mM Tris/HCl pH 8,0 mit einem Teflon-in-Glas-Homogenisator homogenisiert. Durch 30 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) wurde nicht solubilisiertes Protein abgetrennt. Der Überstand wurde in 6 ml Portionen auf 6 Zuckergradienten aus 10 – 30 % Saccharose, 0,7 - 0,1 % β -D-Decylmaltosid (Fa. Glykon) in 20 mM Tris/HCl pH 7.8 aufgetragen und 22 h bei 150.000 g (30.000 rpm, Rotor 630 Ti Fa. Sorvall, Ultrazentrifuge Discovery 90, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Die Zuckergradienten wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min durch eine Durchflußküvette ausgepumpt und in 2 ml Portionen fraktioniert. Mit einem Diodenarray Photometer mit Lichtleiteroptik (Fa. J&M Analysetechnik, Aalen) wurden kontinuierlich UV-Vis-Spektren von 250 bis 600 nm mit einer Integrationszeit von 70 ms und einem Scanintervall von 2 s aufgenommen. Die Komplex I haltigen Fraktionen wurden mittels ihrer NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität ermittelt und die Gipfelfraktionen vereinigt.

3.1.4 Reindarstellung des Membranarms von Komplex I

Die vereinigten Fraktionen wurden mit Hilfe einer Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d= 6,2 cm, Vol.= 400 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf 18 ml eingeeengt. Zur Verringerung der Zuckerkonzentration wurden 20 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 0,1% Decylmaltosid zugegeben und wieder auf 18 ml konzentriert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die eingeeengten Komplex I Fraktionen wurden mit festem Kaliumrhodanid (KSCN) auf 0,6 M gebracht und auf 6 Gradienten aus 10 – 30 % Saccharose in 0,1 % Decylmaltosid, 50 mM Tris/Cl pH 8,0 und 0,6 M KSCN, gegeben. Die Gradienten wurden 21 h bei 150.000 g (30.000 rpm, Rotor 630

Ti Fa. Sorvall, Ultrazentrifuge Discovery 90, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Mit einer Flußgeschwindigkeit von 2 ml/min werden sie durch eine Durchflußküvette ausgepumpt und in 0,75 ml Proben fraktioniert. Mit einem Diodenarray-Spektrometer mit Lichtleiteroptik (Fa. J&M Analysetechnik, Aalen) wurden kontinuierlich Spektren von 250 bis 600 nm mit einer Integrationszeit von 70 ms und einem Scan-Intervall von 2 s aufgenommen. Anhand der Absorption bei 280 nm wurden die Gipfelfraktionen größer der halbmaximalen Absorption des Membranarms bestimmt und vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (d= 4,6 cm, Vol.=200 ml Kammer, Fa. Amicon) bei 4 bar auf ein Endvolumen von 2 ml eingeengt. Das Konzentrat wurden auf einer Sephacryl Säule S300 (d= 1,6 cm, h= 60 cm, 120 ml Säulenvolumen) gelfiltriert, die vorher mit 120 ml Tris/Cl pH 8,0, 0,5 M NaCl und 0,1 % Decylmaltosid äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,1 ml/min. Das Eluat wurde kontinuierlich mit einem Diodenarray-Spektrometer wie oben spektroskopisch untersucht und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Gipfelfraktionen wurden vereinigt und bei -70 °C aufbewahrt. Die Reinheit des Proteins wurde bei allen Arbeitsschritten durch SDS-PAGE überprüft.

3.1.5 Analytische Methoden

Bestimmung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität

Die enzymatische Aktivität des Komplex I wurde photometrisch bei Raumtemperatur mit der NADH/Ferricyanid-Methode bestimmt. 3 µl Probe wurde in 1 ml einer Lösung aus 50 mM Tris/Cl pH 7,5, 0,1 % Triton-X-100, 50 mM NaCl, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und 0,1 mM NADH eingerührt und die folgende Extinktionsänderung bei 410 nm bestimmt. Die Messung erfolgte an einem Helios ThermoSpectronic UV/Vis-Spektralphotometer. Der molare Extinktionskoeffizient von Kaliumhexacyanoferrat(III) beträgt $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Friedrich et al., 1989).

Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Biuret-Methode (Beisenherz *et al.*, 1953) oder nach der Lowry-Methode (Lowry *et al.*, 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die UV/Vis spektroskopische Bestimmung von Proteinkonzentrationen

erfolgte an einem Diodenarray Spektrometer (J&M Tidas, Analysetechnik Aalen) in einer Quarzrührküvette mit einer Schichtdicke 0,2 cm. Als Referenz wurden der jeweiligen Puffer verwendet, in dem das Protein gelöst vorlag. Als apparenter molarer Extinktionskoeffizient von Komplex I bei 280 nm wurde $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet (Amling, 1996). Unter der vereinfachten Annahme das der Membranarm der halben molaren Masse des Komplex I entspricht, wurde für den Membranarm $\epsilon = 0,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

SDS-Gelelektrophorese

Es wurden je 50 µl Probe mit 20 µl Probenpuffer (2 % SDS, 0,5 M Saccharose, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 M Tris/Acetat pH 8,8; 2,5 mM EDTA und 3,5 mM Dithioerythriol) versetzt, etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf ein diskontinuierliches Gel aus einem 3 %igen Sammel- und einem 16 %igen Trenngel (Laemmli, 1970) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 180 V und 35 mA über 16 bis 18 h aufgetrennt. Der Kammerpuffer bestand aus 0,4 M Glycin, 0,05 M Tris/Acetat pH 8,3 und 0,1 % SDS. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel 2 h in 0,1 % Coomassie-Blau R 250, 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure gefärbt und anschließend in 12,5 % Isopropanol und 10 % Essigsäure über mehrere Stunden entfärbt.

3.2 Präzipitationsstudien

3.2.1 Untersuchung des Einflusses sinkender Ionenstärke auf die Präzipitation

Je 0,5 ml Lösung des Membranarmproteins (1mg/ml) wurden auf 4 4ml Sucrose-Gradienten (10-30 % Saccharose, 0,1 % α -D-Decylmaltosid, 10 mM TrisCl pH 7.7) mit unterschiedlichen Tri-Natrium-Citrat Konzentrationen (100 mM, 20 mM, 15 mM, 10mM) aufgetragen und 22 h bei 175.000 g (36.000 rpm, Rotor TST 60.4 Fa. Kontron, Ultrazentrifuge Discovery 90, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Die Gradienten wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,5 ml pro min eluiert und in 0,25 ml Portionen fraktioniert gesammelt. In einer Durchflußküvette wurden mit Hilfe eines Diodenarray-Spektrometers mit Lichtleiteroptik (Fa. J&M Analysetechnik, Aalen) kontinuierlich Spektren von 250 bis 600 nm mit einer Integrationszeit von 70 ms und einem Scan-Intervall von 2 s aufgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Extinktion bei 280 nm. Als apparenter molarer Extinktionskoeffizient wurde für den Membranarm $\varepsilon = 0,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet (Friedrich, 1998).

3.2.2 Messung der dynamischen Lichtstreuung

Für die Messung der dynamischen Lichtstreuung wurde eine Lösung des Membranarmproteins mit einer Konzentration von 5mg/ml (0,6 M NaCl, 0,1 % α -D-Decylmaltosid, 10 mM TrisCl pH 7.8) in einem Cellulose-Dialyseschlauch (Fa. SpectraPor, MWCO 12.000 kDa, d = 1cm) schrittweise gegen sinkende NaCl-Konzentrationen (300 mM, 150 mM, 110 mM, 90 mM, 50 mM) dialysiert. Das Dialysat equilibrierte jeweils 12 h unter Rühren bei 4 °C bevor eine Messprobe entnommen und die nächste Dialyselösung zugegeben wurde.

In der Praxis treten streng monodisperse Systeme mit einem Polydispersitätsindex PI von 0 nicht auf (s. hierzu Kap. 2.5.4). Normalerweise nimmt der PI einen Wert zwischen 0 und 1 an. Je näher der PI an 1 ist, desto schwieriger wird es die Autokorrelationsfunktion aufgrund zu starker Polydispersität auszuwerten. In unserem Fall half es die Probe kurz vor der Messung länger und bei höheren Drehzahlen zu zentrifugieren (30 min 15.000 rpm, Zentrifuge Eppendorf 5417 R, 4°C). Oberhalb eines PI von 0,7 diskriminierte die von uns eingesetzte Software die Meßdaten und brach die Messung automatisch ab. Auch zu hohe Streuungsintensitäten aufgrund zu hoher Laserintensität bzw. zu große oder zu viele Partikel in der Lösung führten zu einem Abbruch der Messung.

Bei der von uns eingesetzten Meßapparatur handelte es sich um das Modell DynaPro™. Die Frequenz des Lasers betrug $5 \cdot 10^{14}$ Hertz ($\lambda = 5\text{nm}$). Die Probe befand sich in einer 45 μl Küvette in einem temperierbaren Block, um den der Photomultiplier im Winkel Θ drehbar war. Die Messung erfolgte mit einer Laserstärke von 100 %, einer Akkumulationsdauer von 20 s und einer Aufnahme von mind. 20 Akkumulationsspektren pro Datensatz. Die Signale wurden vom Korrelator weiter an den Computer geleitet, wo die Meßdaten mit Hilfe der Software Dynamics™ (Version 6.3.14) ausgewertet werden konnten.

3.2.3 Einfluß von Lösungsparametern auf die Präzipitation des Membranarms

Eine Präparation des Membranarmproteins wurde nach der Spaltung mit KSCN auf 2,5 ml konzentriert (s. oben) und hiernach in 5 Portionen à 0,5 ml geteilt. Eine 33 ml Sephacryl S-300 Säule wurde mit 5 Puffern (alle 0,1 % α -D-Decylmaltosid, 10 mM TrisCl pH 7.8) mit jeweils 200 mM unterschiedlicher Ionenarten (Tri-Natrium-Citrat, Kalium-Natrium-Tartrat, NaCl, Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat) equilibriert und mit jeweils einer 0,5 ml Portion Membranarmlösung beschickt. Nach Aufkonzentration der vereinten membranarmhaltigen Fraktionen dieser Säulenläufe (50 ml Amicon Druckfiltrationskammer, Membran X 300 d= 4,6 cm) lag das Protein mit einer Konzentration von 50 mg/ml in den 5 Puffern mit je 200 mM der verschiedenen Salze vor. Die Ionenstärke der 5 Ansätze wurde schrittweise durch Dialyse (Cellulose-Schlauch Fa. SpectraPor, MWCO 12.000, d= 1cm) gesenkt und Proben zu verschiedenen Salzkonzentrationen entnommen. Die Proben wurden 15 min bei 4 °C mit 15.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5 417 R) zentrifugiert und die Proteinkonzentration im Überstand durch UV/VIS-Spektroskopie bei 280 nm unter Annahme eines apparenten molaren Extinktionskoeffizient für den Membranarm von $\varepsilon = 0,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.

Bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Enzymstabilität wurde ähnlich verfahren. In den Säulenpuffern und bei der späteren Dialyse wurde von 50 mM Tri-Natrium-Citrat (0,1 % α -D-Decylmaltosid, 10 mM TrisCl) und einer Proteinkonzentration von 50 mg/ml ausgegangen und der pH-Wert von 7,5 bis 8,0 in 0,1er Schritten variiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand verlief analog zu oben.

Die Temperaturabhängigkeit wurde ebenfalls wie oben bestimmt. Die Tri-Natrium-Citrat Konzentration wurde auf 50 mM und der pH-Wert auf 7,8 eingestellt, der

Säulenlauf sowie die anschließende Dialyse wurden jedoch bei unterschiedlichen Temperaturen (4° C, 8° C, 12° C, 16° C bzw. 20° C) im temperierbaren Mini-Coldlab (LKB Bromma 2023) durchgeführt.

Der Einfluß der Proteinkonzentration auf das Aggregationsverhalten des Membranarms wurde mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung bestimmt. Eine 1 mg/ml und eine 5 mg/ml Lösung des Membranarmproteins (0,2 M NaCl, 0,1 % α -D-Decylmaltosid, 10 mM TrisCl pH 7,8) wurden wie oben beschrieben an einem Dyna ProTM gemessen und die Daten mit Hilfe der Software DYNAMICSTM ausgewertet.

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde auch der Einfluß unterschiedlicher Detergenzien auf das Aggregationsverhalten des Membranarmproteins getestet. Eine Präparation des Membranarmproteins wurde nach der KSCN-Spaltung in 4 Portionen à 0,5 ml geteilt und mit Hilfe einer 33 ml Sephacryl S-300 Säule in das entsprechende Detergenz überführt. Die Säulenpuffern beinhalteten alle 0,5 M NaCl, und 10 mM TrisCl pH 7,8 zuzüglich 1 mM α -D-Dodecylmaltosid bzw. 3 mM α -D-Decylmaltosid, 12 mM α -D-Nonylmaltosid oder 50 mM β -D-Octylglucopyranosid (Konzentrationen in mM entsprechend 1,5-facher cmc). Die Messung und Auswertung der dynamischen Lichtstreuung erfolgte analog zu oben.

3.3 Kristallisation

Im Batch-Verfahren wurde eine Lösung des Membranarmproteins (0,1% α -D-Decylmaltosid, 100 mM Tri-Natrium-Citrat, TrisCl pH 7,8) mit einer Proteinkonzentration von 20 mg/ml über Nacht gegen 50 mM Tri-Natrium-Citrat (0,1 % α -D-Decylmaltosid, TrisCl pH 7,8) bei 4 °C dialysiert (Cellulose-Schlauch Fa. SpectraPor, MWCO 12.000, d= 1 cm) und hiernach als 5 μ l Tropfen auf eine Kristallisationsbrücke (Polypropylene Micro-Bridges, Fa. Crystal microsystems) übertragen. Die Kristallisationsbrücke wurde in eine 24 Well-Platte (Fa. Sarstedt) überführt und 1 ml H₂O als ReservoirLösung unter der Brücke appliziert. Der Well wurde mit einem 18 mm Deckgläschen (Fa. Menzel-Gläser) luftdicht verschlossen.

Ansätze mit einem zusätzlichen Präzipitationsdruck wurden durch Applikation eines zweiten Tropfens mit einer Tri-Natrium-Citrat Konzentration < 50 mM in direktem Kontakt mit dem Proteintropfen auf einer Deckgläschen Oberfläche (Fa- Menzel-

Gläser) hergestellt. Das Glas mit den zwei Tropfen wurde auf einer Kristallisationsbrücke über H₂O abgelegt und ebenfalls luftdicht verschlossen.

In Seeding Ansätzen wurden kleine Kristalle nach erster Wachstumsphase mit Hilfe eines Kristallisationsbestecks (Fa. Hampton Research) aus den Mutterlauge-Tropfen isoliert, in reiner Pufferlösung (0,1 % α -D-Decylmaltosid, 50 mM Tri-Natrium-Citrat, TrisCl pH 7,8) gewaschen und in neue Tropfen aus frischer Proteinlösung (kurz nach Dialyse) übersetzt.

Das Wachstum der Kristalle wurde mit Hilfe eines hochauflösenden Binokular-Lichtmikroskops (SZX-ILLD200, Olympus) beobachtet und mit einer Digitalkamera (C-3030, Olympus) dokumentiert.

Die Analyse der Kristallzusammensetzung erfolgte mit Hilfe eines Tris-Glycin Mini-Gel Systems (Fa. Invitrogen). Es wurden 10 Kristalle mit Kantenlängen von etwa 10 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ aus dem Kristallisationsansatz isoliert und 3mal mit Puffer (s.o.) gewaschen. Die sauberen Kristalle wurden vereinigt und mit 4 $\times$ Probenpuffer (2 % SDS, 0,5 M Saccharose, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 M Tris/Acetat pH 8,8, 2,5 mM EDTA und 3,5 mM Dithioerythriol) versetzt. Ein 16 %iges Tris-Glycine Mini-Gel (1.0 mm $\times$ 10 Well, Fa. Invitrogen) wurde mit der Kristallprobe und 15 μl Mutterlauge des Kristallisationsansatzes als Referenz beschickt und die Proteinbanden des Geles nach 2 h Laufzeit bei 180 V mit einem Silver Staining Kit (Fa. Invitrogen) gefärbt.

Die Aufnahme der Röntgenbeugungsspektren zur Diskriminierung von Salz- und Detergenzkristallen, Ergebnisse wurden hier nicht gezeigt, erfolgte standardmäßig an einem Röntgengenerator (Bruker FR 591) im Forschungszentrum Jülich. Das in Abb. 54 gezeigt Diffraktionsmuster des Proteinkristalls wurde in Grenoble am ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) an der Beamline ID14-1 mit dem Detektor MarCCD aufgenommen und mit Hilfe der Software MOSFLM analysiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Präparation des Membranarms von Komplex I aus *Neurospora crassa*

Ob Kristallisationsversuche überhaupt innerhalb eines zeitlich akzeptablen Rahmens durchführbar sind, hängt in erster Linie von der steten Verfügbarkeit ausreichend sauberen Proteinmaterials ab. Ein wöchentlicher Durchsatz von etwa 10 mg ist erstrebenswert, wobei der Reinheitsgrad der Präparation nach neueren Erkenntnissen nicht mehr zwingend im Vordergrund erfolgreicher Kristallisationsexperimente steht. Vielmehr gilt der Wahl des verwendeten Organismus gesonderte Aufmerksamkeit um gegebenenfalls Vorteile aus arttypischen Besonderheiten in Bezug auf das zu isolierende Protein zu ziehen. *N. crassa* bot in unserem Fall die Möglichkeit Komplex I chemisch in zwei Teile zu zerlegen und diese unabhängig voneinander zu präparieren. Da die Struktur des peripheren Teils des Enzyms mittlerweile aufgeklärt wurde, war die Struktur-Funktions-Beziehung des energiekoppelnden membranständigen Teils für uns von Interesse. Die Präparation basierte auf einer Solubilisierung des membranständigen Komplex I durch n-Octyl- β -D-glucopyranosid und anschließender Isolation mit Hilfe einer Zuckergradienten-Zentrifugation. Es folgte die Spaltung von Komplex I durch das chaotrope Salz Kaliumrhodanid und erneute Zuckergradienten-Zentrifugation, wonach der membranständige Teil des Enzyms durch Größenausschlußchromatographie in einen geeigneten Kristallisationspuffer überführt werden konnte. Der zunehmende Reinheitsgrad der Proteinpräparation wurde anhand einer SDS-PAGE überprüft.

4.1.1 Solubilisierung der Mitochondrienmembran und Darstellung von Komplex I

Das Detergenz n-Octyl- β -D-glucopyranosid besitzt eine sehr hohe kritische mizellare Konzentration (cmc) von 20-25 mM. Es liegt damit in hoher Konzentration in monomerer Form in Lösung vor und ist somit aggressiv. Dies führt dazu, daß während der Solubilisierung insbesondere die großen Enzymkomplexe der inneren Mitochondrienmembran zerlegt und teilweise denaturiert werden. Komplex I bleibt auch in Anwesenheit von n-Octyl- β -D-glucopyranosid stabil und übersteht trotz seiner Größe diesen Solubilisierungsvorgang. Ein Teil der denaturierten Proteine

bilden ein aggregates Netzwerk und fallen aus, die restlichen kleinen Untereinheiten der zerstörten Proteine verbleiben in Lösung. Komplex I besitzt aufgrund seiner hohen molekularen Masse einen großen Sedimentationskoeffizienten. Dies wurde zur Trennung durch Zentrifugation ausgenutzt. In Anwesenheit eines Sucrose-Gradienten wird hierbei eine Konvektion der zu zentrifugierenden Lösung verhindert. Die denaturierten Aggregate der Fremdproteine sedimentieren, wohingegen die kleinen zerstörten Untereinheiten aufgrund ihres geringen Sedimentationskoeffizienten langsamer einwanderten. Komplex I sedimentierte unter den gewählten Bedingungen ungefähr bis zur Hälfte des Gradienten (Abb. 35). Um eine Identifizierung der Komplex I-haltigen Fraktionen zu ermöglichen, wurde ein NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivitätstest durchgeführt. Komplex I kann durch seine prosthetische FMN-Gruppe Elektronen von NADH auf den künstlichen Endakzeptor $K_3(Fe^{+III}(CN)_6)^-$ übertragen. Der Farbumschlag des Blutlaugensalzes wurde anhand seiner Extinktion bei 410nm verfolgt.

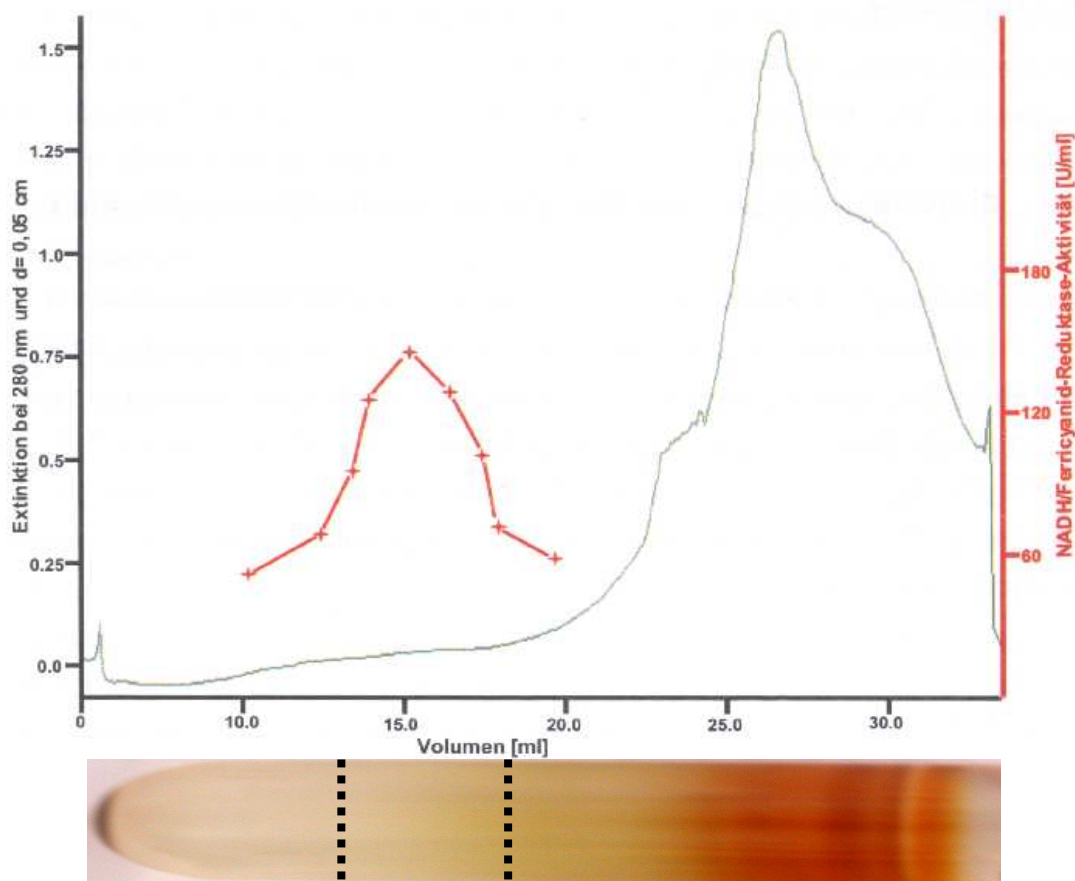


Abb. 35: Sedimentationsprofil einer 36 ml Zuckergradienten-Zentrifugation von Octylglucosid-solubilisierten Mitochondrienmembranen. 0 ml entspricht dem unteren Ende des Gradienten (Sediment), 36 ml der Auftragsfläche. Die NADH/Ferricyanid Aktivität (+ — +) wurde zur Identifizierung der Komplex I-haltigen Fraktionen herangezogen. Die Proteinverteilung im Gradienten wurde anhand der Extinktion bei 280 nm bestimmt.

Die Fraktionen mit der höchsten NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität wurden vereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert. Unter mehrmaligem Waschen mit Pufferlösung ohne Saccharose wurde die Zuckerkonzentration des Ultrafiltrats reduziert, um eine erneute Trennung durch Zuckergradienten-Zentrifugation im nächsten Schritt zu ermöglichen.

4.1.2 Spaltung von Komplex I und Isolation des membranständigen Teils

Das weitgehend zuckerfreie Proteinkonzentrat wurde mit 0,6 M des chaotropen Salzes KSCN versetzt. Chaotrope Salze bestehen aus Ionen mit kleiner Ladung und großem Radius und gehorchen damit einer entgegengerichteten Hofmeister-Reihe (Aussalz-Serie) (Abb. 36):

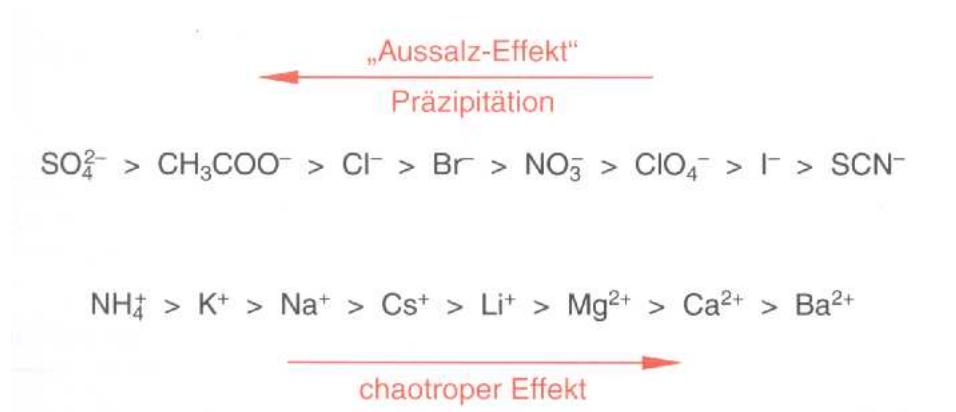


Abb. 36: Lyotrophe Ionen mit hoher Ladung und kleinem Radius wie SO_4^{2-} oder NH_4^+ sorgen für eine Erniedrigung der Entropie des umgebenden Systems und besitzen einen aussalzenden Effekt. Chaotrope Ionen mit großem Radius und kleiner Ladung erhöhen dagegen die Entropie und können damit zu einer Aufhebung des hydrophoben Effekts in Proteinen führen.

Chaotrope Salze setzen die Ordnung des Wassers in einer Lösung herab. Dadurch wird der hydrophobe Effekt proteinogener Wechselwirkungen, der maximale Freiheitsgrade für das Wassers garantiert, geschwächt. Diese Schwächung verursacht in unserem Fall ein Auseinanderfallen der beiden Proteinarme von Komplex I. Bei der hier gewählten Salzkonzentration wird der periphere Arm des Enzyms in seine Untereinheiten zerlegt, der Membranarm bleibt mit einem Molekulargewicht von etwa 550 kDa als Ganzes erhalten. Daher kann erneut aufgrund des großen Sedimentationskoeffizienten nun des membranständigen Teils von Komplex I im Gegensatz zu den kleinen zerlegten Untereinheiten des peripheren Arms eine Trennung durch Zuckergradienten-Zentrifugation erfolgen. Der Membranarm sedimentiert unter den gegebenen Bedingungen etwa bis zur Hälfte

des Gradienten, während die Bruchstücke des peripheren Arms aufgrund ihrer geringen Masse nur eine kurze Strecke in den Gradienten einwandern (Abb. 37).

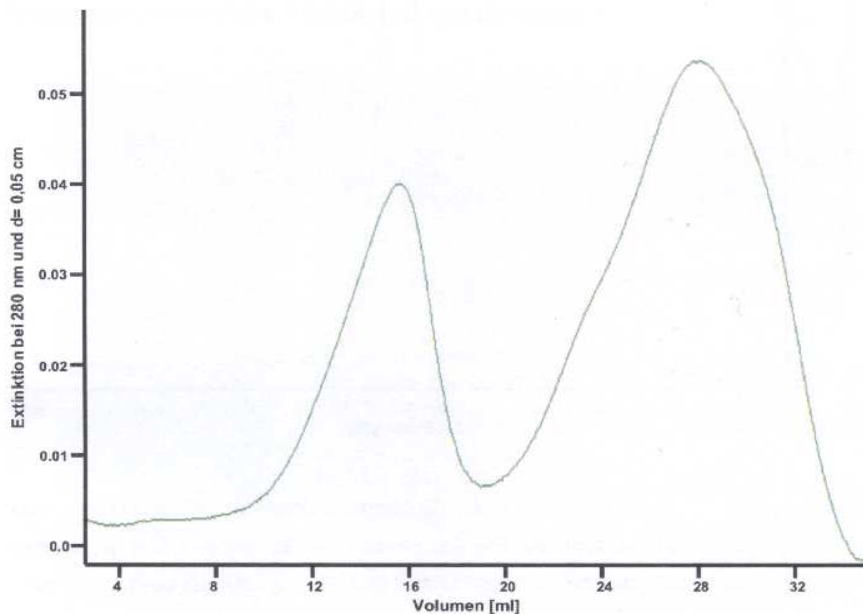


Abb. 37: Sedimentationsprofil der Zuckergradienten-Zentrifugation von KSCN behandeltem Komplex I. 4 ml entspricht dem unteren Ende des Gradienten, 36 ml der Auftragsfläche. Der Membranarm sedimentiert bis zu einem Gradientenvolumen zwischen 10 ml und 18 ml. Die Proteinverteilung wurde anhand der Extinktion bei 280 nm in einer Durchflußküvette bestimmt.

Da sich die für den NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivitätstest benötigte FMN-Gruppe im peripheren Arm von Komplex I befindet, ist nach der Spaltung eine Identifizierung der Membranarm-haltigen Fraktionen mit Hilfe eines Aktivitätstestes nicht mehr möglich. Aufschluß gab hier eine Analyse des Untereinheitenmusters nach SDS-PAGE Auftrennung (Abb. 39).

Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration eingeeengt. Die folgende Größenausschlußchromatographie diente zum Einen dem Puffer-, Salz- und Detergenzwechsel im Hinblick auf die anschließende Kristallisation, zum Anderen gab sie Aufschluß über Stabilität und Einheitlichkeit der Proteinpräparation.

4.1.3 Größenausschlußchromatographie der Membranarmfraktionen

Anhand der Symmetrie eines Proteingipfels nach Größenausschlußchromatographie können bei guter Säulenauflösung Aussagen über das Aggregations- oder zumindest Oligomerisierungsverhalten eines präparierten Proteins getroffen werden. Je nach Stabilität des Proteins unter den gewählten Pufferbedingungen treten Flanken oder sogar diskrete Nachbargipfel hin zu höherem Molekulargewicht, also kleinerem Säulenvolumen, neben dem Originalgipfel mit gleicher Untereinheiten-

Zusammensetzung nach SDS-PAGE Analyse auf. Aufgrund der höheren Streuung im UV-Bereich weisen diese Aggregationsphänomene auch keine diskrete Absorptionsbande bei 280nm, sondern vielmehr eine starke Bandenverbreiterung hin zu kleineren Wellenlängen auf. Wie sich im späteren Verlauf des Ergebnisteils zeigen wird, hat die Stabilität der Proteinpräparation große Auswirkungen auf den Kristallisationserfolg. Exemplarisch ist in Abb. 38 ein Elutionsprofil einer Größenausschlußchromatographie unter stabilen Präparationsbedingungen dargestellt.

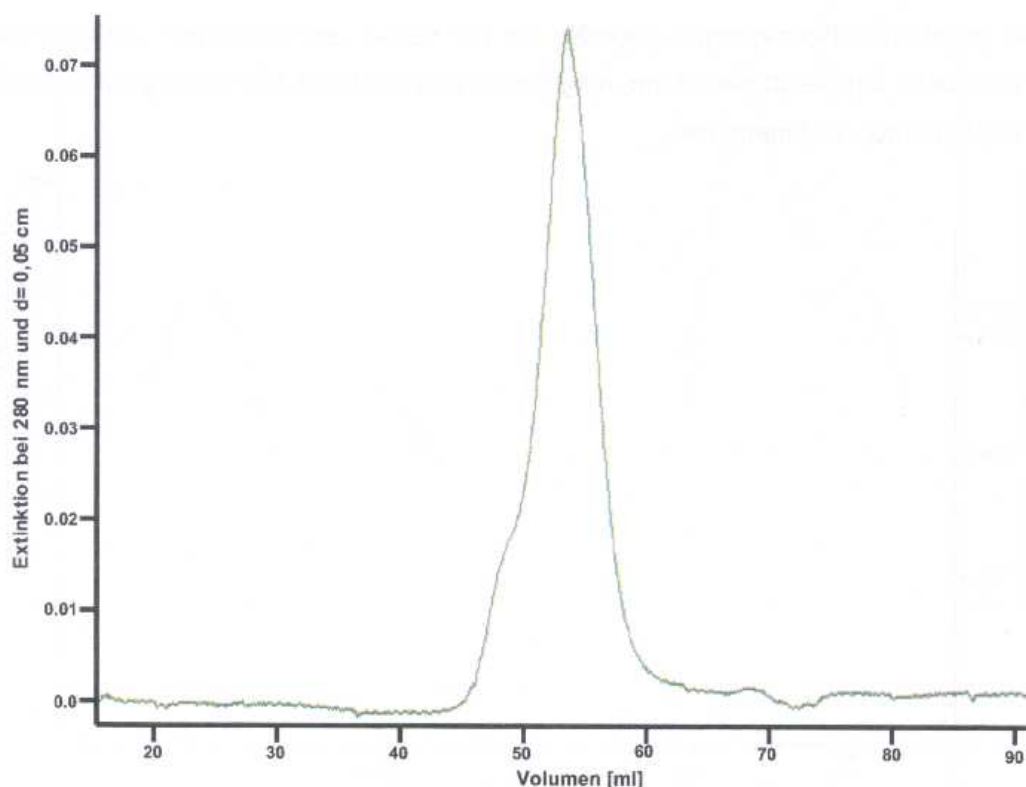


Abb. 38: Elutionsprofil einer Größenausschlußchromatographie des Membranarms. Das Gesamtsäulenvolumen betrug 120 ml. Die Proteinverteilung wurde durch Bestimmung der Extinktion bei 280 nm in einer Durchflußküvette bestimmt. Eine leichte Flanke hin zu größerem Molekulargewicht, kleinerem Säulenvolumen, läßt auf Aggregationsphänomene schließen.

4.1.4 Bilanz der Präparation

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Ausbeute und Reinheit nach den verschiedenen Reinigungsschritten der Membranarmpräparation. Ausgegangen wurde von 800 g *N. crassa* Hyphen bzw. 15 g Mitochondrienmembranen (Feuchtmasse). Nach der Spaltung von Komplex I durch Zugabe von Kaliumrhodanid konnte keine Aktivitätsbestimmung mit Hilfe des NADH/Ferricyanid-Reduktase Tests

mehr durchgeführt werden. Die Ausbeute wurde in den folgenden Schritten auf die Proteinmenge bezogen, da in den entsprechenden Fraktionen nach SDS-PAGE Analyse (Abb. 39) keine auffälligen Fremdproteinbanden mehr zu identifizieren waren und daher von einem nahezu reinen Komplex I-Gehalt der Proteinfractionen an diesem Punkt der Präparation ausgegangen werden konnte.

Mit dieser Art der Präparation war eine wöchentliche Verfügbarkeit von durchschnittlich 10 mg Membranarmprotein zu Kristallisationszwecken garantiert. Eine Ausbeute von 18% ist in Anbetracht eines vierstufigen Reinigungsprozesses ein vergleichsweise hoher Wert. Bei einem durchschnittlichen Verlust von etwa 50% pro Präparationsschritt wäre auch eine Ausbeute von 12,5 % noch akzeptabel gewesen.

Tab. 4: Quantitative Übersicht über den Präparationsverlauf

Präparationsschritt	Volumen	Protein	Aktivität			
			Gesamt	Volumen	spezifisch	Ausbeute
	[ml]	[mg]	[U]	[U/ml]	[U/mg]	[%]
Octylglucosid Extrakt	36	n.d	7200	200	n.d	100
1. Zuckergradienten-Zentrifugation	50	80	5000	100	125	69
2. Zuckergradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von KSCN	20	20	n.d	n.d	n.d	35
Größenausschlußchromatographie	10	10	n.d	n.d	n.d	18

Der Reinheitszugewinn durch die einzelnen Präparationsschritte wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 39). Auf dem Gel sind nach der Größenausschlußchromatographie keine Banden von Fremdproteinen mehr erkennbar. Der Reinheitsgrad der letztlich zur Kristallisation eingesetzten Proteinprobe auf > 95% geschätzt. Dies ist in erster Linie hilfreich, um von vorne herein eine Kristallisation von Fremdproteinen als Konkurrenzphänomen zu unterbinden. Je sauberer die Proteinpräparation, desto sicherer setzt sich ein späterer Kristall auch aus dem gewünschten und nicht aus einem fremden Protein zusammen. Eine Diskriminierung

„falscher“ Proteinkristalle ist an dieser Stelle schwierig. Erst die Strukturanalyse nach Röntgenbeugung ist in der Lage die Identität des Kristalls hinreichend zu klären. Daher ist man an frühen Selektionskriterien wie dem Reinheitsgrad der Präparation interessiert.

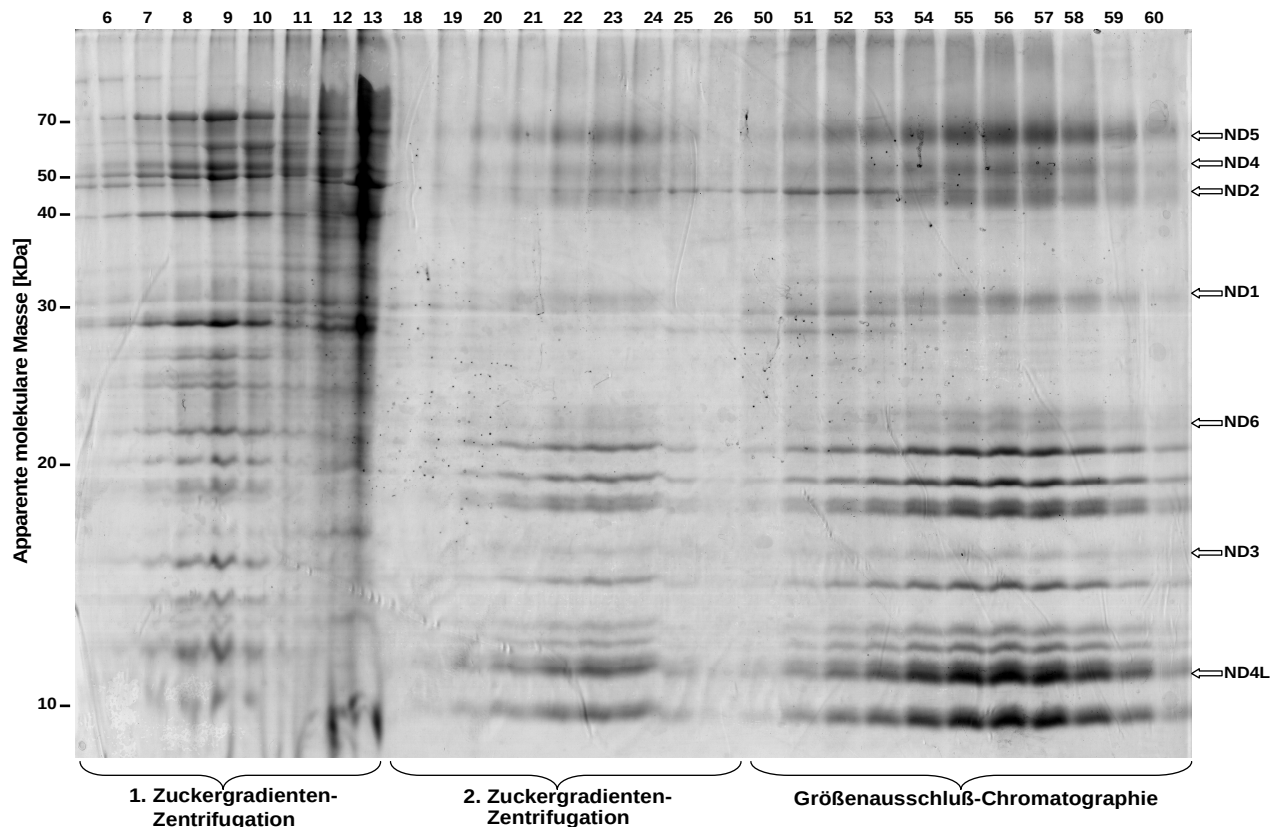


Abb. 39: SDS-PAGE der Komplex I-Fractionen nach der 1. Zuckergradienten-Zentrifugation, der Membranarmfraktionen nach der 2. Zuckergradienten-Zentrifugation in Anwesenheit von KSCN und nach der Größenausschlußchromatographie. Am oberen Rand sind die Fraktionen anhand ihres jeweiligen Sedimentations- bzw. Elutionsvolumens gekennzeichnet. Am linken Rand befindet sich eine logarithmische Skala des apparenten Molekulargewichts in kDa, am rechten Rand sind die mitochondrial kodierten Untereinheiten ND1 bis ND6 und ND 4L markiert.

Nach der ersten Zuckergradientenzentrifugation ist das Untereinheitenmuster des gesamten Komplex I erkennbar. In *N. crassa* besitzt Komplex I bis zu 45 Untereinheiten, wobei viele von ihnen recht ähnliche Molekulargewichte aufweisen und daher nicht als diskrete Banden einzeln identifizierbar sind. Nach der Spaltung durch KSCN während der zweiten Zuckergradienten-Zentrifugation lässt sich die Untereinheitenzusammensetzung des Membranarms erkennen. Eine eindeutige Zuordnung der mitochondrial kodierten membranständigen Untereinheiten (ND1-6 und ND4L) kann hier vorgenommen werden. Verunreinigte Fraktionen wie zu Beginn der Größenausschlußchromatographie erkennbar wurden bei der Weiterverarbeitung nicht berücksichtigt.

Mit dem vorgestellten Präparationsverfahren konnten wöchentlich etwa 10 mg > 95% sauberes Membranarmprotein aus 40 Litern *Neurospora crassa* Kultur bzw. 800 g Pilzhyphen hergestellt werden. Bezogen auf den Komplex I-Gehalt im ersten Präparationsschritt ergibt sich eine Membranarmausbeute am Ende der Präparation von etwa 18%. Dies stellt einen vergleichsweise hohen Wert für die Aufreinigung eines Membranproteins dar.

Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Kristallisation ist nicht zuletzt der Homogenitäts- und Monodispersitätsgrad der in die Kristallisation eingesetzten Proteinlösung. Aus dem Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie der vereinten Membranarmfraktionen lassen sich erste Rückschlüsse auf die Einheitlichkeit des Proteinpräparates ziehen. Ein hoher Aggregatanteil in der Proteinlösung würde als vordere Schulter des Proteingipfels bei kleinerem Elutionsvolumen entsprechend seinem größerem Molekulargewicht erscheinen und damit Hinweise auf amorphes Präzipitationsverhalten der Präparation liefern. Diese Tendenz läßt sich in unserem Fall aber nicht in großem Umfang erkennen (vgl. Abb. 38).

Der Grundstein für die Entwicklung einer erfolgsversprechenden Kristallisationsstrategie war in Anbetracht solch einer effizienten und qualitativ hochwertigen Proteinpräparation gelegt.

4.2 Präzipitationsstudien des Membranarms von Komplex I

4.2.1 Ausgangslage

Die Kristallisation eines Proteins erfordert einen großen experimentellen Aufwand. Das Protein muß aus der Lösung verdrängt werden, geordnete Kristallkeime bilden und bis zu einer messbaren Größe symmetrisch wachsen. Die Übersättigung einer Proteinlösung kann durch die Einstellung einer größeren Anzahl von Parametern erreicht werden. Insbesondere wenn eine Kombination von mehreren Parametern mit jeweils entsprechenden Variationen zum Einsatz kommt, steigt die Zahl der experimentellen Kombinationsmöglichkeiten ins Unermessliche (Abb. 40). Beispielweise kann eine Erhöhung der Salzkonzentration unter gleichzeitiger Beibehaltung eines bestimmten pH-Wertes und tiefer Temperatur zum Kristallisationserfolg führen. Um dies herauszufinden mußte im Vorfeld die Salzkonzentration und den pH-Wert im Kristallisationsansatz konstant gehalten während die Temperatur variiert wurde. Hiernach wurde ebenso mit den anderen beiden Parametern verfahren. Hochgerechnet auf alle denkbaren Kombinationsmöglichkeiten in Frage kommender Parameter einer Lösung werden schnell die gigantischen Ausmaße eines solchen Projektes klar.

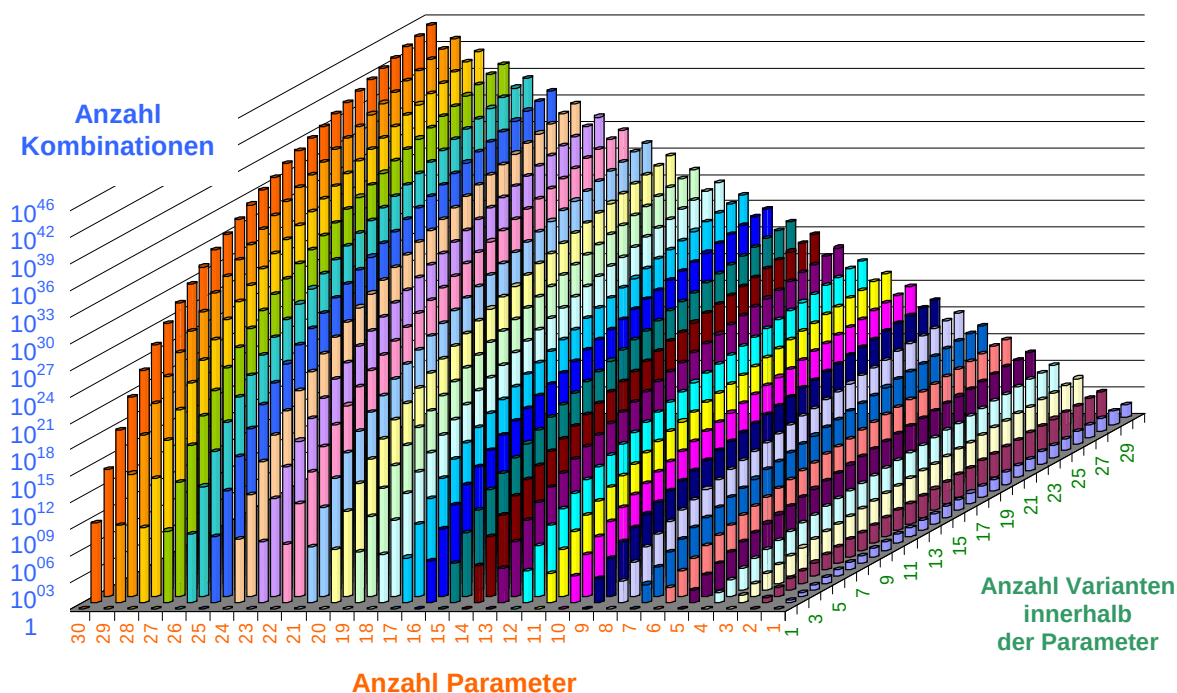


Abb. 40: Die experimentelle Kombinationsvielfalt auf der Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen für ein Protein. Schnell werden zweistellige Größenordnungen erreicht.

In unserem Fall kommt die Größe (550 kDa) und starke Hydrophobizität des Membranarmproteins erschwerend hinzu. Je größer das Protein desto stärker nivellieren sich für die Kristallisation gut geeignete Oberflächenextrema durch asymmetrische Aminosäureverteilungen. Bei großen Proteinen sorgt eine statistische Verteilung der Aminosäuren für wenig Angriffsfläche um das Protein physikalisch oder chemisch aus der Lösung zu verdrängen. Bei Membranproteinen wie Komplex I kommen darüber hinaus noch Probleme mit der Handhabung detergenzhaltiger Lösungen zum Tragen und erschweren zusätzlich die Arbeit des Kristallographen.

Aufgrund der unerschöpflichen Möglichkeiten ein Protein zu kristallisieren muß daher im Vorfeld solch einen Projektes eine Vorselektion der Kristallisationsbedingungen getroffen werden. In einem Zeitraum von zwei Jahren unter Einsatz eines Kristallisationsvolumens von ca. 5 µl und einer wöchentlich zur Verfügung stehenden Proteinmenge von etwa 10 mg (150 µl mit 50 mg/ml) können somit 30 Kombinationsmöglichkeiten pro Woche, also etwa 5000 Kombinationen im Verlauf einer Dissertation untersucht werden.

Sinnvoll ist es daher zunächst Statistik zu betreiben und aus bereits erfolgreichen Kristallisationen von großen Membranproteinen zu lernen (vgl. Kap. 2.5.2, S. 28 Tab. 1). Die statistisch beste Startbedingung wäre demnach eine Einstellung derjenigen Parameter, die bislang am häufigsten zu Kristallisationserfolgen großer Membranproteine geführt haben und im Bereich dieser Parameter ein breites Screenig-Verfahren durchzuführen.

Wir starteten daher unsere Kristallisationsexperimente mit einer stabilen Lösung des Membranarms nach Größenausschlußchromatographie in Anwesenheit 1,5-facher cmc des Detergenz α -D-Dodecylmaltosid, bei einem pH-Wert von 8,0, einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl, einer Proteinkonzentration von 40 mg/ml und einer Temperatur von 4 °C.

Da diese Bedingungen auf der Grundlage reiner Statistik beruhen stellen sie nicht zwangsläufig die besten Kristallisationsbedingungen für unser Membranarmprotein dar. Es wurden daher Fällungsstudien des Membranarms durchgeführt um die Einstellung der verschiedenen Parameter zu optimieren. Hierbei wurden Methoden etabliert, die eine Beobachtung und Quantifizierung der Präzipitationsprozesse in Lösung zumindest qualitativ erlaubten um Aussagen über eine möglichst erfolgsversprechende Kristallisationsstrategie zu ermöglichen.

4.2.2 Kristallisationsstrategie - Erniedrigung der Ionenstärke

Ziel war es zunächst eine Methode zu etablieren bei der das Protein kontinuierlich und nicht abrupt aus der Lösung verdrängt wird, um der Kristallbildung kinetisch einen Vorteil vor der amorphen Präzipitation des Proteins zu verschaffen. Nach der Debye-Hückel Theorie kann die Löslichkeit eines polyvalenten Teilchens, also auch eines Proteins, beschreiben werden durch:

$$\log S - \log S_0 = \frac{A \cdot z_+ \cdot z_- \cdot \mu^{1/2}}{1 + a \cdot B \cdot \mu^{1/2}}$$

S Löslichkeit des Proteins bei der Ionenstärke μ ; S_0 Löslichkeit des Proteins in Wasser

A und B sind Konstanten abhängig von der Temperatur und der Dielektrizitätskonstanten

z_+ und z_- sind die Wertigkeiten der Ionen; μ ist die Ionenstärke, $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2$

$a = 2 \cdot r$, r ist der Radius des Ions

Die Löslichkeit eines Proteins ist bei mittlerer Ionenstärke am höchsten (Abb. 41). Bei hoher Ionenstärke tritt das Salz mit dem Protein in Konkurrenz um das zur Solvatisierung benötigte Wasser. Darüber hinaus werden die Oberflächenladungen des Proteins von Gegenionen abgedeckt, so daß die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Wasser verloren gehen. Das Protein wird „ausgesalzen“. Bei niedriger Ionenstärke hingegen fehlen die Gegenionen auf der Proteinoberfläche. Dies führt zu einer vermehrten Wechselwirkung mit anderen Proteinen, was letztlich im günstigen Fall zur Kristallisation, im ungünstigen Fall zur amorphen Präzipitation des Proteins führen kann.

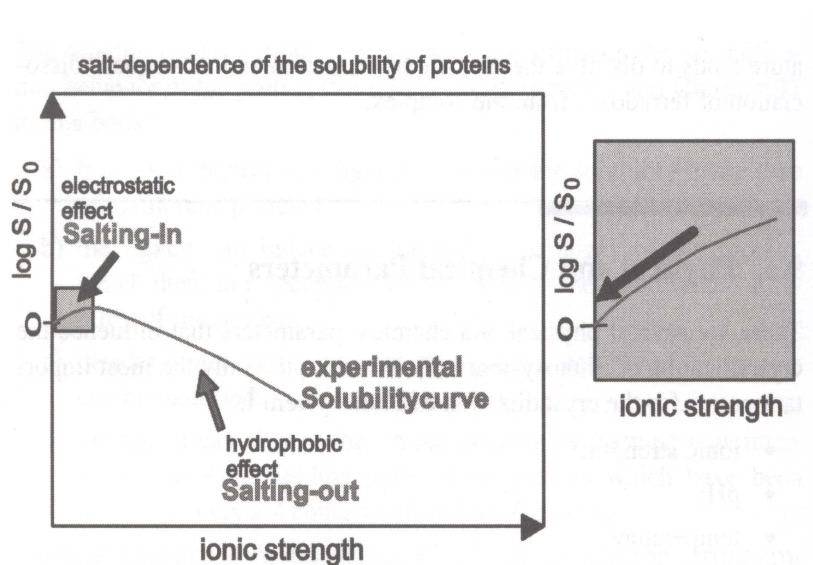


Abb. 41: Aussalz- und Einsalzeffekt eines Proteins in Abhängigkeit der Ionenstärke. S: Löslichkeit des Proteins bei der Ionenstärke μ ; S_0 : Löslichkeit des Proteins in Wasser. Das Verhältnis S / S_0 ist umso größer je löslicher das Protein ist (aus Petra Fromme „Crystallization of Photosystem I for structural analysis“ *Habilitationsschrift* 1998, Technische Universität Berlin).

Der Membranarm von Komplex I beginnt bei einer Erniedrigung der Ionenstärke zu präzipitieren. Gezeigt wurde dies durch sein Sedimentationsverhalten während einer Zuckergradienten-Zentrifugation und durch seine dynamische Lichtstreuung in Abhängigkeit sinkender Salzkonzentrationen.

In Anwesenheit von 100 mM Tri-Natrium-Citrat bei 0,1 % Decylmaltosid, 10 mM TrisCl, pH 7,7 liegt der Membranarm stabil in Lösung vor. Unter diesen Bedingungen sedimentiert das Protein weitgehend monodispers (Abb. 42:). Mit sinkender Ionenstärke nimmt der Proteingipfel in diesem Sedimentationsbereich deutlich ab und eine Massenzunahme des präzipitierten Sediments am Boden des Gradienten wird beobachtet. Die Erniedrigung der Ionenstärke führt somit zu einer vermehrten Protein-Protein Interaktion und damit zu einer Verdrängung des Proteins aus der Lösung. Aufgrund des hohen Molekulargewichtes des Membranarmproteins besitzt das Aggregat einen sehr großen Sedimentationskoeffizienten und sedimentiert bis zum Boden des Gradienten.

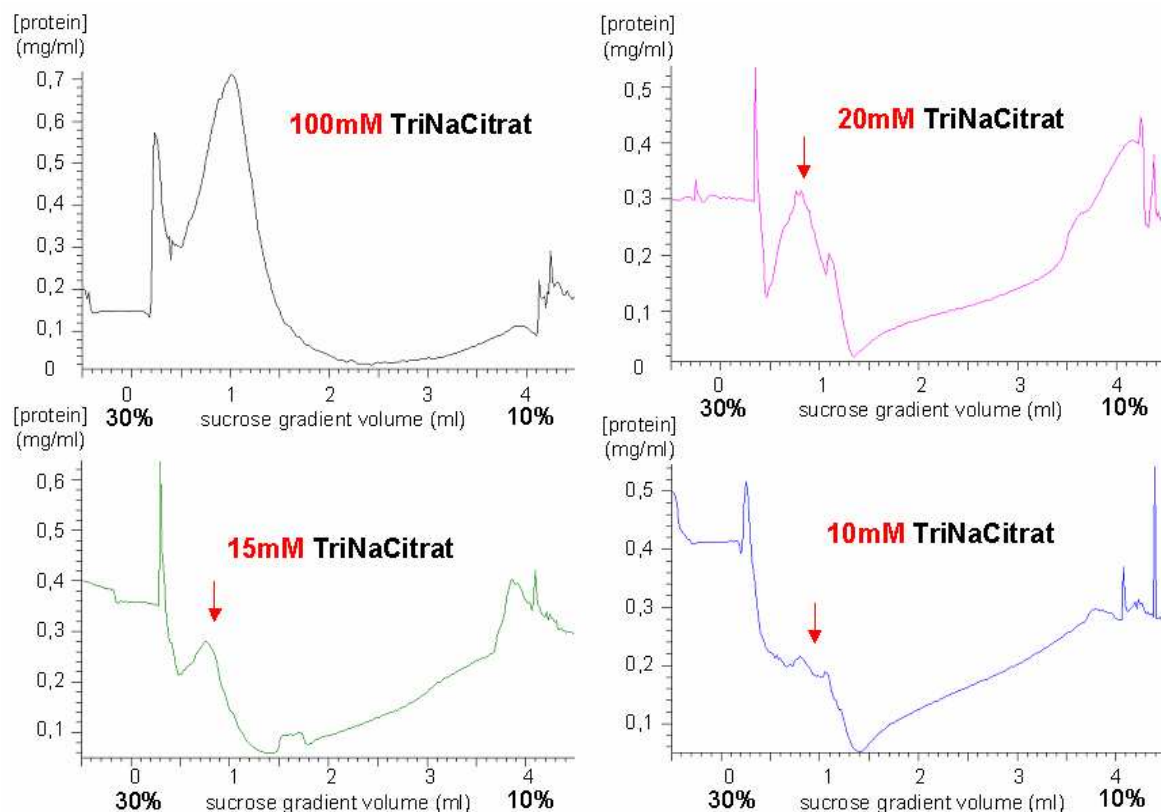


Abb. 42: Zunehmende Aggregationstendenz des Membranarmproteins in Abhängigkeit sinkender Ionenstärken. Das monomere Protein sedimentiert unter den gegebenen Bedingungen (100 mM TriNaCitrat, 0,1 % Decylmaltosid, 10 mM TrisCl, pH 7,7) $\frac{3}{4}$ des Weges durch den Gradienten. Dieser monomere Proteingipfel nimmt mit sinkender Ionenstärke ab. Das entstehende Aggregat sedimentiert aufgrund seines hohen Sedimentationskoeffizienten bis zum Boden des Gradienten.

Darüber hinaus wurde das Aggregationsverhalten des Membranarmproteins in Abhängigkeit sinkender Salzkonzentrationen auch mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung dokumentiert. Die Streuung von Licht an einem Partikel ist in erster Linie abhängig von seiner Größe und von seiner Beweglichkeit in der Lösung, also seinem Diffusionskoeffizienten. Ein monomeres Protein besitzt einen kleineren Molekülradius als sein Aggregat und sein Diffusionskoeffizient ist um einiges größer als der des Multimers. Bei ausreichend guter Auflösung durch Einsatz kurzer Anregungswellenlängen sollte die vorherrschende Teilchenpopulation in der Lösung daher aufgrund ihrer Streueigenschaften gut identifizierbar sein.

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde eine sukzessive Zunahme des Teilchenradius von 14,5 nm bei hoher Ionenstärke (600 mM NaCl) auf 60,8 nm bei niedriger Ionenstärke (50 mM NaCl) beobachtet (Abb. 43).

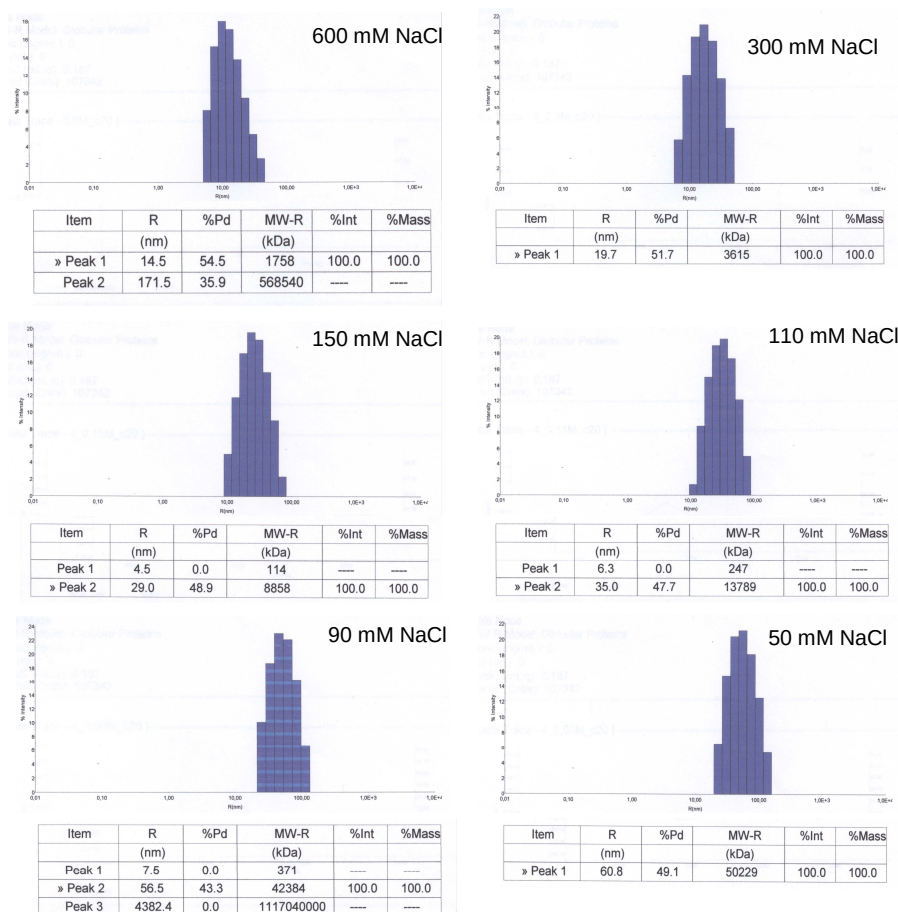


Abb. 43: Dynamische Lichtstreuung des Membranarms in Abhängigkeit von der NaCl Konzentration: Die Salzkonzentration einer Membranarmproteinlösung wurde bei gleichbleibender Proteinkonzentration schrittweise von 600 mM auf 50 mM NaCl durch Dialyse gesenkt und bei verschiedenen Ionenstärken Proben für die Streuanalyse entnommen. Es konnte eine Zunahme des durchschnittlichen Radius der Teilchenpopulation in der Dialyselösung beobachtet werden.

Das Monomer des Membranarmproteins besitzt wie wir aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen wissen (Hofhaus, 1991) eine Länge von etwa 18 nm und eine Breite von etwa 8 nm. Die dynamische Lichtstreuung nivelliert diese Werte auf etwa 14,5 nm. Das größte zu messende Aggregat des Membranarmproteins besitzt einen Radius von etwa 60 nm. Es handelt sich hierbei also um eine Zusammenlagerung weniger Monomere. Größere Oligomere sedimentieren während einer der Messung vorgeschalteten Zentrifugation. Ohne diese Zentrifugation wäre die Streuintensität der Probe so hoch, dass der Detektor die Messung automatisch abbrechen würde.

Erstaunlich ist, dass nicht zwei Populationen, also Monomer und Aggregat getrennt voneinander detektiert wurden, sondern vielmehr eine Population mit starker Polydispersität auftritt, deren mittlerer Radius im Verlauf der Messreihe zunimmt. Offensichtlich bilden sich als Reaktion auf den steigenden Präzipitationsdruck Oligomerstrukturen in einem kooperativen Modus. Zunächst werden Di- und Trimere und später hieraus größere Strukturen gebildet. Dieser Vorgang ähnelt einer amorphen Präzipitation. Für eine erfolgreiche Kristallisation müssen bis zum Ende des Kristallwachstums jedoch noch monomere Proteinmoleküle in der Lösung vorhanden sein um in der jeweils symmetrisch erforderlichen Orientierung in den Kristall eingebaut werden zu können.

Ziel mußte es daher jetzt sein, Parameter zu finden, die entgegen dem Präzipitationsdruck durch Erniedrigung der Ionenstärke einen eher stabilisierenden Einfluß auf das monomere Protein in der Kristallisationslösung ausüben, also die Löslichkeit des Proteins nicht noch zusätzlich reduzieren. Hierzu wurde der Einfluß verschiedener Ionenarten, der pH-Wert, die Temperatur, die Proteinkonzentration und die Art des Detergenz auf die Löslichkeit des Membranarmproteins hin untersucht.

4.2.3 Lösungsparameter und Präzipitation des Membranarms

Die Ionenart

Die Ionenstärke eines Salzes ist abhängig von seiner Wertigkeit und Konzentration. Daher beginnt die Präzipitation in trivalenter Citrat-haltiger Lösung bei kleinerer Konzentration als in monovalenter Chlorid-haltiger Lösung. Im Gegensatz zu hohen Ionenstärken ist bei niedrigen Ionenstärken der Einfluß der Kationen auf die Löslichkeit eines Proteins größer als der der Anionen. Natriumionen sorgen im Vergleich mit Ammoniumionen für eine bessere Löslichkeit. Ebenso begünstigen lyotrophe Anionen wie Chlorid die Löslichkeit eines Proteins wohingegen chaotrope Anionen wie Sulfat die Löslichkeit herabsetzen (Abb. 44). Den größten stabilisierenden Einfluß auf das Membranarmprotein besitzt Natrium-Citrat. Die folgenden Experimente wurden daher in Anwesenheit dieser Ionenart durchgeführt.

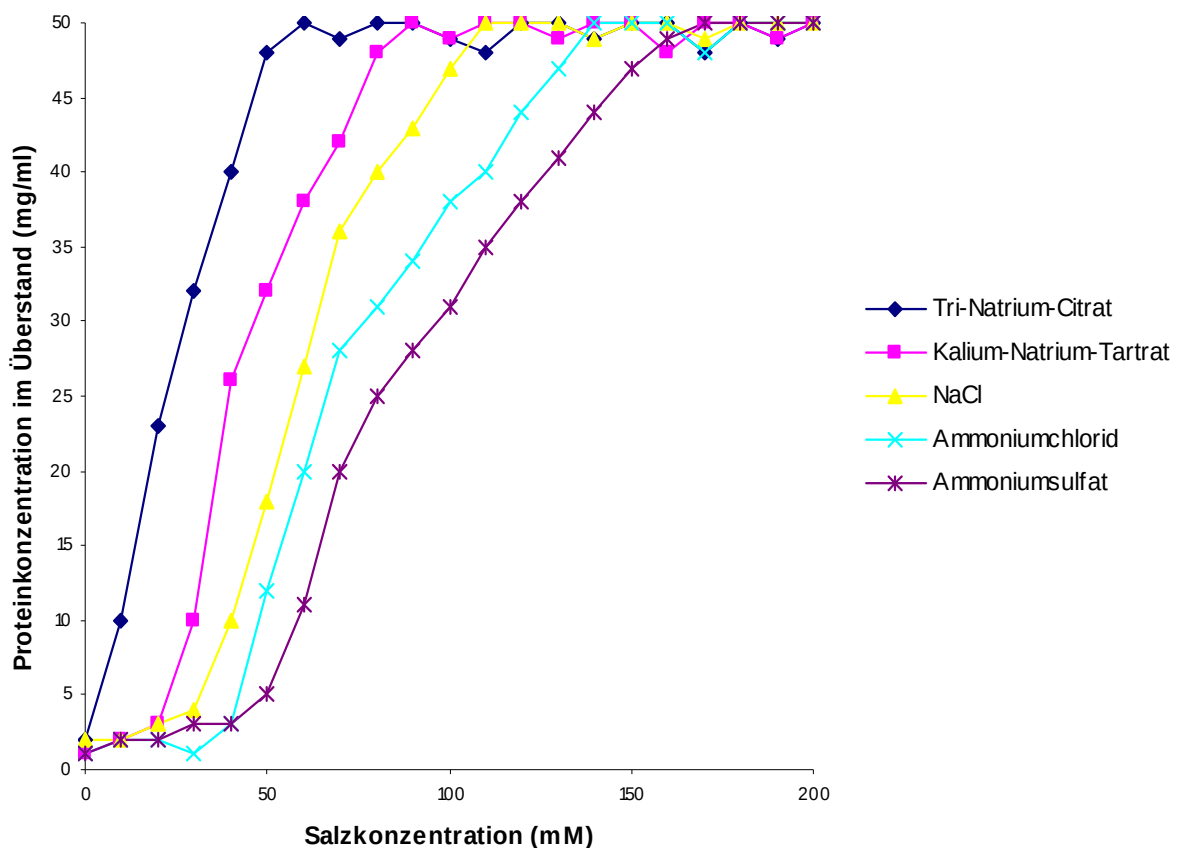


Abb. 44: Präzipitation des Membranarms in Abhängigkeit von Art und Konzentration verschiedener Salze: Proteinkonzentration im Überstand nach Sedimentation der Aggregate durch Zentrifugation. In Abhängigkeit von der Ionenart ergeben sich unterschiedliche Präzipitationsverläufe. Je nach Eigenschaft der anwesenden Ionen wird das Protein schon bei höheren oder erst bei niedrigeren Salzkonzentrationen aus der Lösung verdrängt.

Der pH-Wert

Die Löslichkeit von Proteinen ist pH-abhängig. An seinem isoelektrischen Punkt ist die Löslichkeit eines Proteins am geringsten. Der isoelektrische Punkt eines Membranproteins ist nicht diskret, da seine Ladungsoberfläche in Abhängigkeit seiner Assoziation mit unterschiedlich großen Phospholipidmengen Schwankungen unterworfen ist. Die Natur eines physiologischen Makromoleküls lässt jedoch aufgrund seiner großen pH-Wert Sensibilität sowieso nur einen recht engen experimentellen Spielraum zu. Untersucht wurde daher der Einfluß variierender pH-Werte im Bereich zwischen pH 7,5 und 8,0 auf die Löslichkeit des Membranarmproteins in Abhängigkeit sinkender Ionenstärke. Es zeigte sich, dass zwischen pH 7,7 und 7,8 der Membranarm am besten löslich ist (Abb. 45). pH-Werte < 7,5 bzw. > 8,0 führten zu einer schnellen Degradation des Proteins und sind somit nicht zu Kristallisationszwecken geeignet.

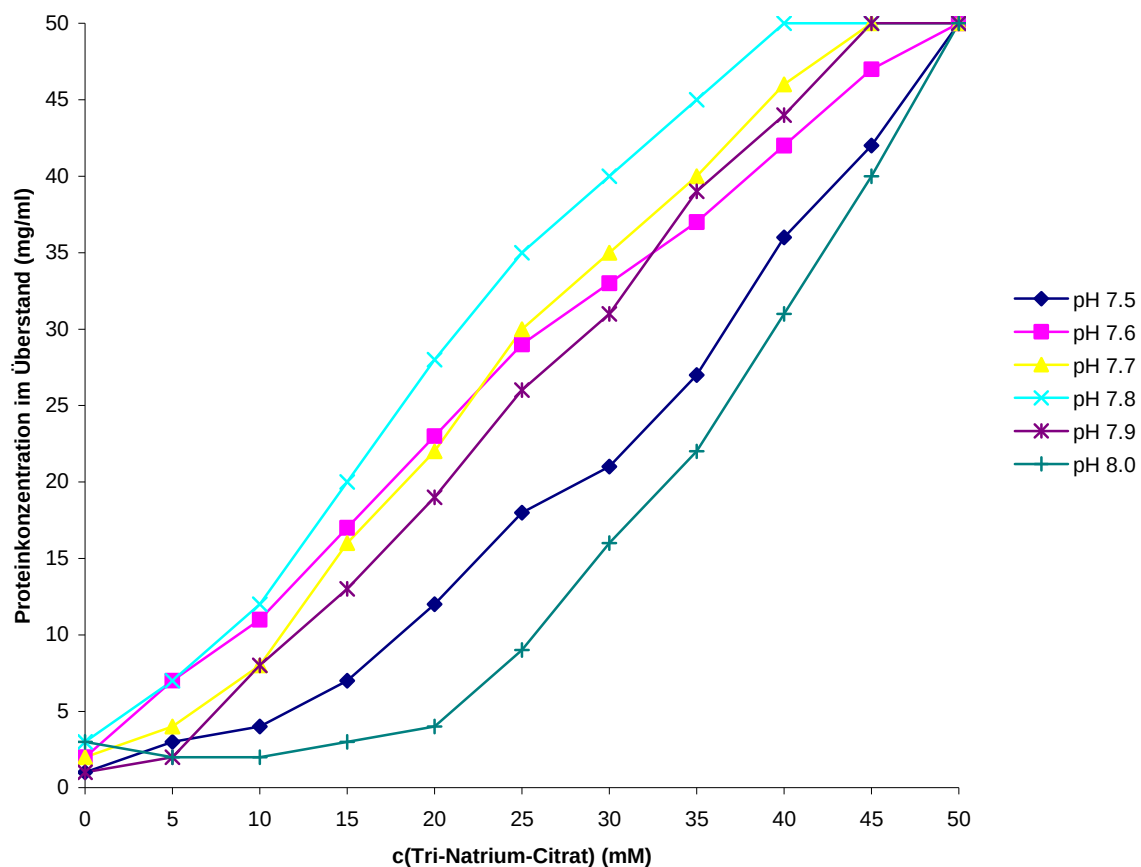


Abb. 45: Abhängigkeit der Löslichkeit des Membranarmproteins von der Citratkonzentration und vom pH-Wert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde nach Zentrifugation bestimmt. Ein pH-Wert zwischen 7,7 und 7,8 wirkt stabilisierend auf das Membranarmprotein.

Die Temperatur

In den meisten Fällen steigt die Löslichkeit eines Proteins mit zunehmender Temperatur zunächst an, sinkt jedoch drastisch bei Beginn der Hitzedenaturierung. Oftmals ist das kristallisierte Protein etwas hitzestabiler als das lösliche. Niedrige Temperaturen führen zu kleiner Nukleationsrate, also weniger Kristallisationskeimen, was durchaus wünschenswert ist. Zu niedrige Temperaturen verlangsamen jedoch das Kristallwachstum und es können Konkurrenzreaktionen wie bakterielle Degradation auftreten. Im Falle des Membranarmproteins muß auch die Löslichkeit des Detergenz beachtet werden. Unterhalb einer bestimmten Temperatur beginnt dieses zu präzipitieren und eine Mizellierung des Proteins kann nicht mehr gewährleistet werden. Entgegen der Erwartung, dass die Löslichkeit eines Proteins mit zunehmender Temperatur zunächst ansteigt, sinkt die Löslichkeit des Membranarmproteins annähernd linear mit steigender Temperatur (Abb. 46). Offensichtlich handelt es sich um ein stark temperatursensibles Protein, das auf Temperaturerhöhung mit zunehmender Aggregation reagiert.

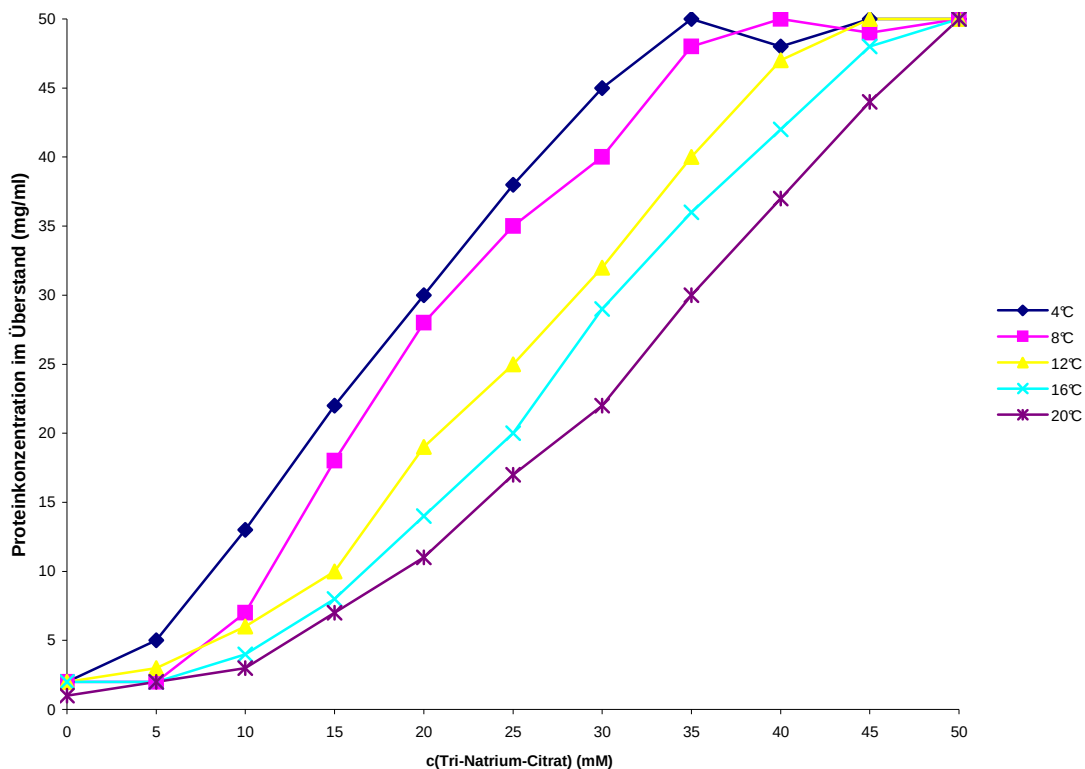


Abb. 46: Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit des Membranarmproteins: Eine Temperaturerhöhung wirkt destabilisierend auf das Protein. Es beginnt schon bei höheren Ionenstärken zu präzipitieren.

Die Proteinkonzentration

Je größer die Proteinkonzentration, desto öfter kommt es zu Proteinkontakten in der Lösung. Dies kann im positiven Fall zur Kristallisation, im schlechten Fall zur Aggregation des Proteins führen je nach Stabilität und Einheitlichkeit des monomeren Proteinteilchens. Ist das Protein beschädigt oder sind Teile des Proteins degradiert kann dies zu konformationellen Umorientierungen führen, die letztlich bei hoher Proteinkonzentration eine Aggregation begünstigen. Mehr Protein ist daher nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit einem Mehr an Kristallisation. Stabilisiert bei hoher Ionenstärke konnte die Zunahme der Aggregation des Proteins in Abhängigkeit von seiner Konzentration mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung messtechnisch verfolgt werden (Abb. 47).

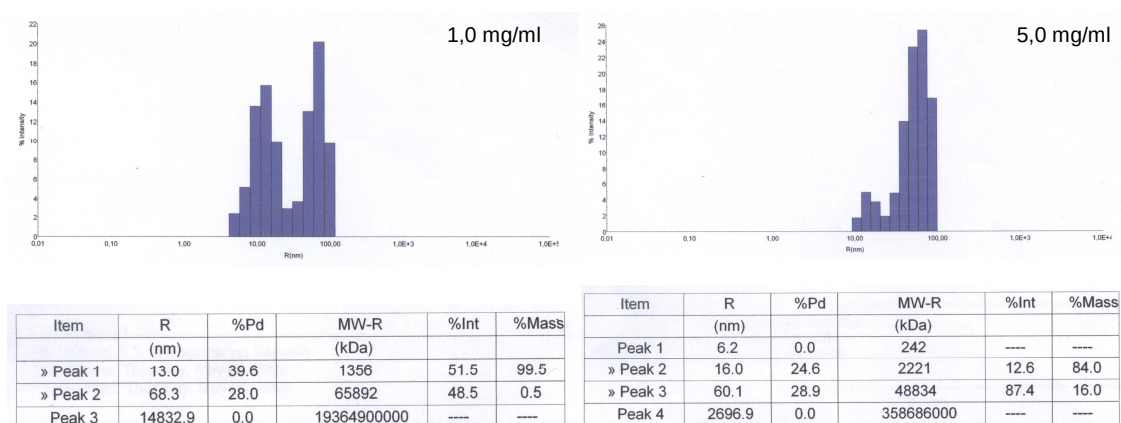


Abb. 47: Dynamische Lichtstreuung des Membranarmproteins bei zwei verschiedenen Konzentrationen. Zunahme der Aggregation bei steigender Proteinkonzentration. Die gemessene Streu-Intensität des monomeren Proteins geht von 51,5% auf 12,6% zurück während die Intensität des Aggregates von 48,5% auf 87,4% steigt. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund zu starker Streuung nicht vermessen werden.

Der hohe Streuintensitätsanteil des Aggregates geht auf seinen großen Radius zurück. Die Streuintensität eines Teilchens hängt in erster Linie von seinem Radius ab. Da das Aggregat viel größer als das monomere Proteinteilchen ist, stammt auch der größte Messintensitätsanteil von diesem. Um den Anteil monomeres Protein in Lösung zu errechnen, also das Konzentrations-verhältnis von Monomer zu Aggregat zu bestimmen, muß die Intensität mit Hilfe des ermittelten Radius zurückgerechnet werden. Die Software nimmt hierbei jedoch ein globuläres Teilchen an und vernachlässigt darüber hinaus den unterschiedlichen Mizellenumfang der Teilchen während der Rechnung. Dem angegebenen Massen-prozentsatz der einzelnen Teilchenpopulationen ist daher nur sehr bedingt Glauben zu schenken. Es ist davon

auszugehen. daß der Prozentsatz des Monomers in der Lösung deutlich höher ist als angegeben. Die angewandte Auswertungs-Software ist nur gut geeignet, um qualitative Aussagen über die Veränderungstendenzen der Teilchen als Reaktion auf äußere Einflüsse zu treffen. Eine quantitative Aussage über die Teilchenverhältnisse kann aus diesen Daten nicht gezogen werden.

Das Detergenz

In vielen Fällen wird empfohlen, das Protein in dem gleichen Detergenz zu kristallisieren, in dem es aufgereinigt wurde. Oftmals geht jedoch eine gute Stabilisierung des Proteins während der Präparation einher mit unerwünschten Eigenschaften des Detergenz für die Kristallisation. α -D-Dodecylmaltosid ist in der Lage den Membranarm von Komplex I sehr gut zu solubilisieren und während der Aufreinigung stabil in Lösung zu halten. Die Kohlenstoffkette ist jedoch mit zwölf C-Atomen recht groß und wirkt im Kristallverband als Abstandshalter zwischen den Proteinmolekülen. Andererseits zeigt eine Analyse des dynamischen Lichtstreuungsverhaltens kurzkettigerer Detergenzpräparationen des Membranarms eine deutliche Verschiebung des Monomeranteils zugunsten des Aggregatanteils der Lösung. Bei einer Verkürzung der Kohlenstoffkette von zwölf auf zehn bzw. neun C-Atome ist eine deutliche Zunahme des Aggregatanteils zu verzeichnen (Abb. 48). Diese Tendenz korreliert mit der steigenden cmc der kurzkettigeren Detergenzien. Sie sind aufgrund ihrer höheren Konzentration an freien Monomeren deutlich aggressiver, was im Falle des β -D-Octylglucosids zu einer nahezu vollständigen Aggregation des Membranarmproteins führte.

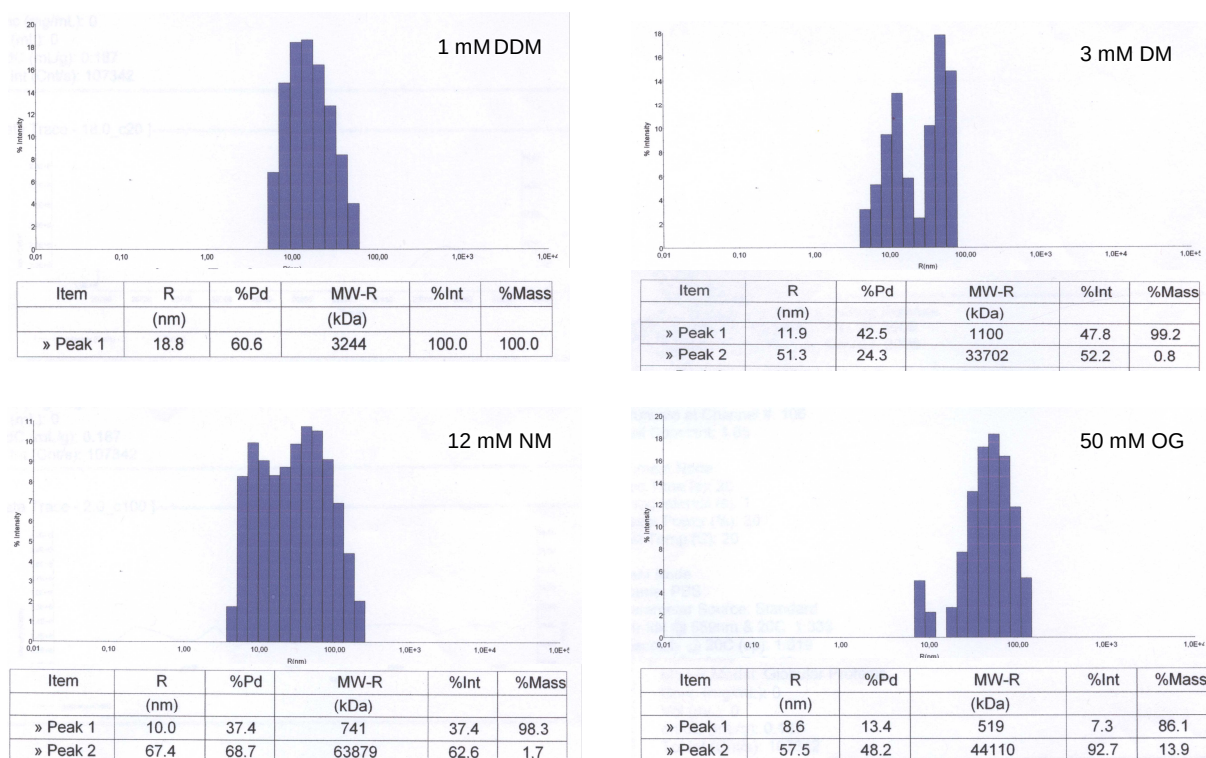


Abb. 48: Zunahme der Aggregationstendenz des Membranarmproteins in Abhängigkeit von Detergenzien verschiedener Kettenlänge. Mit abnehmender Anzahl der C-Atome der Fettalkoholkette steigt die cmc der Detergenzien und damit der degradierende Einfluß auf das Protein. DDM: Dodecylmaltosid, DM: Decylmaltosid, NM: Nonylmaltosid, OG: Octylglucosid.

Aus den oben aufgeführten Präzipitationsstudien ergaben sich Abweichungen für die Kristallisation des Membranarmproteins zu den aus der Literatur erfolgreicher Membranproteinkristallisationen abgeleiteten Bedingungen.

Wie auch beim Photosystem I (Fromme, 1998) führt eine Erniedrigung der Ionenstärke im umgebenden Milieu zu einer Verdrängung des Membranarms von Komplex I aus der Lösung. Im Gegensatz zum Gesamt-Komplex, der selbst noch bei Ionenstärken nahe null löslich ist, beginnt der Membranarm in Abhängigkeit von der Wertigkeit des eingesetzten Ions ab einer bestimmten Konzentrationsunterschreitung zu präzipitieren.

Problematisch erwies sich die Stabilität und Homogenität der Proteinpräparation über einen längeren Zeitraum hinweg bzw. unter Präzipitationsdruck im Kristallisationsansatz. Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung konnte ein zunehmender Verlust an freien Proteinmonomeren in der Lösung schon bei geringem Präzipitationsdruck nachgewiesen werden. Da sich der Kristall jedoch nur aus einzelnen Monomeren aufbauen kann, ist ein so früher Rückgang der Monomer-

Konzentration in der Kristallisationslösung von großem Nachteil. Es wurde daher nach stabilisierenden Bedingungen für eine Erhaltung der Monomere auch unter Kristallisationsbedingungen gesucht.

Präpariert wurde das Protein daher bei 4 °C um eine größtmögliche Stabilisierung im Verlauf der Aufreinigung zu gewährleisten. Da Proteinkontakte bei solch niedrigen Temperaturen aufgrund geringer Brownscher Molekularbewegung jedoch seltener auftreten, wurde bei 12 °C kristallisiert. Stabilisiert wurde das Protein durch einen pH-Wert von 7,8 und dem Einsatz von Tri-Natrium-Citrat. Die Proteinkonzentration betrug 20-30 mg/ml und als Detergenz wurde Decylmaltosid eingesetzt.

4.3 Kristallisationstechnik

Ziel musste es nun sein, der Kristallisation des Membranarmproteins einen Vorteil gegenüber der amorphen Präzipitation zu verschaffen. Aus kinetischer Sicht begünstigt ein hoher Präzipitationsdruck eher eine amorphe Fällung des Proteins wohingegen ein niedrigerer Druck über einen etwas längeren Zeitraum dem Nukleations- und Wachstumsprozess des Kristalls Chancen verleiht. Problematisch ist jedoch die Stabilität des Proteins über einen großen Zeitraum hinweg. Eine zu lange Inkubationszeit führt zu bakterieller Degradation des Proteins

Technisch betrachtet konnte der zeitliche Rahmen des Präzipitationsdruckes recht einfach modifiziert werden. Da das Membranarmprotein durch Erniedrigung der Ionenstärke aus der Lösung gedrängt werden sollte war die Dialyse die geeignete Methode der Wahl. Je nach Größe der austauschenden Oberfläche und Höhe des Ionenstärkegefälles Proteinlösung zu Puffersystem konnte der Präzipitationsdruck erhöht oder erniedrigt werden.

Es wurden daher Dialysemethoden etabliert, die eine unterschiedliche zeitliche Auflösung des Präzipitationsdruckes ermöglichten (Abb. 49). Eine hohe Austauschrate der Ionenstärke wurde durch ein starkes Salzkonzentrationsgefälle (200 mM Tri-Natrium-Citrat in der Proteinlösung dialysiert gegen 10 mM Tri-Natrium-Citrat) und eine große Dialysoberfläche erzielt. Als Dialysemethode wurde hierbei zunächst ein langer Dialyseschlauch mit kleinem Durchmesser, also maximaler Oberfläche eingesetzt. Dieser sehr hohe Präzipitationsdruck führte jedoch innerhalb weniger Stunden zur vollständigen amorphen Präzipitation des Membranarmproteins.

Daraufhin wurde ein kurzer dicker Dialyseschlauch eingesetzt, der jedoch auch noch eine zu hohe Austauschrate aufwies und zu baldiger Fällung des Proteins führte.

Eine zeitlich etwas moderatere Form der Dialyse stellte der Dispo-Dialysator dar. Aufgrund seiner geringeren Kontaktfläche mit dem umgebenden Milieu ermöglichte er die Beobachtung erster kleiner kristalliner Strukturen in der dialysierten Proteinlösung, deren Wachstum jedoch schnell zu einem Stillstand kam. Der Stoffaustausch und damit die Erniedrigung der Ionenstärke erfolgte immer noch zu schnell.

Mit Hilfe der Mikrodialyse (Abb. 49) konnten dann zunächst Kristalle mit Kantenlängen zwischen 10 μm und 30 μm erhalten werden.

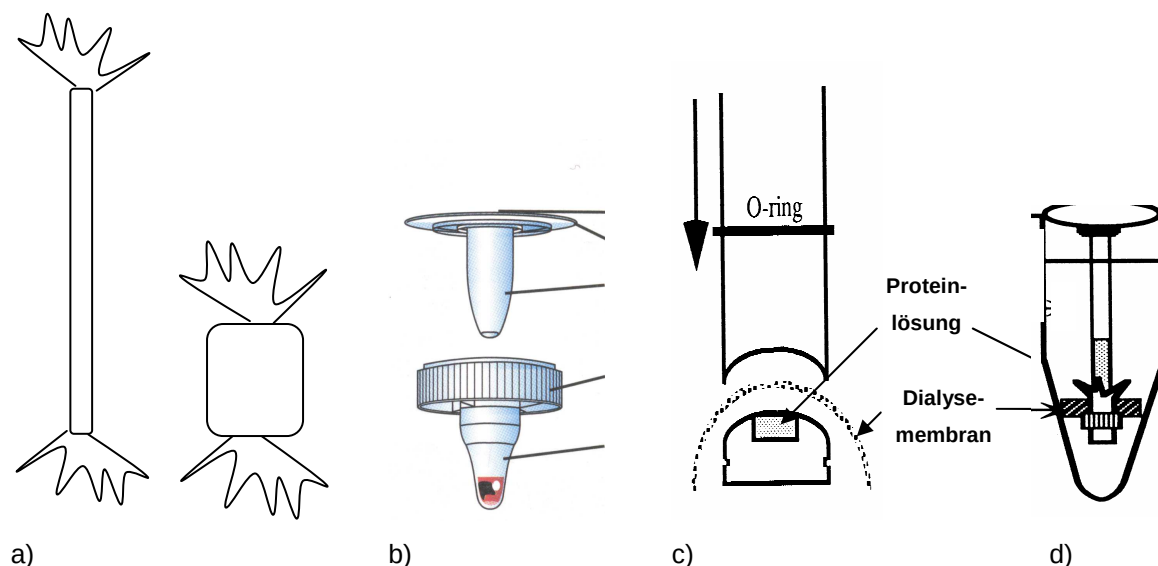


Abb. 49: Dialysemethoden sortiert nach sinkender Austauschrate. Die Größe der zum Stoffaustausch einsatzfähigen Dialysoberfläche nimmt von a) nach d) ab. a) Dialyse in langem und kurzem Schlauch, b) Dispo-Dialysator, c) Mikrodialyse, d) Stab-Dialyse.

Eine noch stärkere Reduzierung der Dialysoberfläche mit Einführung der Stab-Dialyse-Methode führte zu den bereits erwähnten bakteriellen Degradationsprozessen in der Proteinlösung. Nach zweimonatiger Inkubationszeit wurden die Kristallisationsansätze einer Überprüfung ihrer Proteinzusammensetzung durch SDS-PAGE unterzogen und zeigten hierbei einen vollkommen uneinheitlichen Degradationsverlauf in den verschiedenen Ansätzen (Abb. 50). Die Bandenzusammensetzung wich deutlich voneinander ab und ließ auch kein einheitliches Muster mehr erkennen. Kristallisationsversuche mit Hilfe dieser

Methode waren aufgrund der sehr kleinen Austauschoberfläche auf einen zu langen Inkubationszeitraum ausgerichtet und wurden damit eingestellt.

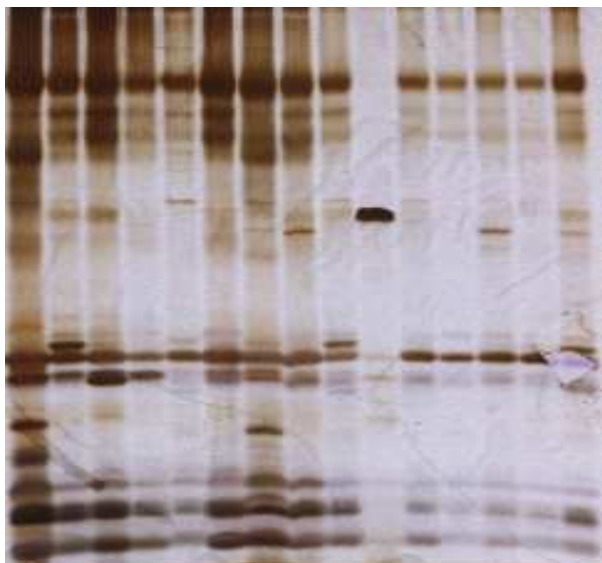


Abb. 50: SDS-PAGE von je 10 μ l Proteinlösungen aus 15 Kristallisationsansätzen nach 2 Monaten Inkubationszeit mit der Stab-Dialyse-Methode. Die ursprünglich in allen Ansätzen gleiche Untereinheitenzusammensetzung des Membranarmproteins hatte sich im Verlauf bakterieller Zersetzungsprozesse in den Ansätzen unterschiedlich stark verändert. Eine Kristallisation des Membranarms war unter diesen Umständen nicht mehr möglich.

Die Feinabstimmung der Dialysemethoden erfolgte durch Einstellung unterschiedlich starker Salzkonzentrationsgefälle zwischen der Protein- und der Dialyselösung. Aus den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung wußten wir, daß der Nukleationsprozeß problematisch ist, da sehr schnell höhere Oligomerstrukturen während einer Erniedrigung der Ionenstärke aufgebaut werden. Es wurde daher nur gegen ein kleines Konzentrationsgefälle von 100 mM Tri-Natrium-Citrat auf 50 mM Tri-Natrium-Citrat dialysiert, um die metastabile Zone in der Lösung zu erreichen. Hiernach wurde die Kristallisationslösung im Batch-Verfahren luftdicht verschlossen in H_2O -gesättigter Atmosphäre auf einer Kristallisationsbrücke ohne weiteren Kristallisationsdruck abgestellt um die Kristalle in Ruhe wachsen zu lassen, ohne eine weitere amorphe Multimerisierung des Proteins zu begünstigen. Die in Kapitel 4.4 vorgestellten Kristalle stammen aus solchen Ansätzen.

Darüberhinaus wurde in einigen Ansätzen ein zusätzlicher Präzipitationsdruck durch Applikation eines Tropfens geringerer TriNaCitrat Konzentration in direkter Nähe des Kristallisationstropfens geschaffen. Die Kristalle aus diesen Ansätzen werden ebenfalls in Kapitel 4.4 gezeigt.

4.4 Kristalle

Es gelang mit Hilfe einer Dialyse die Tri-Natrium-Citrat Konzentration einer Proteinlösung (20 mg/ml Membranarmprotein) von 100 mM auf 50 mM zu senken und nach einwöchiger Batch-Inkubation über H_2O in der Kristallisationsbrücke Kristalle mit einer Kantenlänge von etwa $5\text{ }\mu\text{m}$ zu beobachten. Nach 14 Tagen besaßen die Kristalle eine Kantenlänge von etwa $20\text{ }\mu\text{m}$, nach vier Wochen hatten sie die Dimensionen $10\text{ }\mu\text{m} \times 60\text{ }\mu\text{m}$ (Abb. 51).

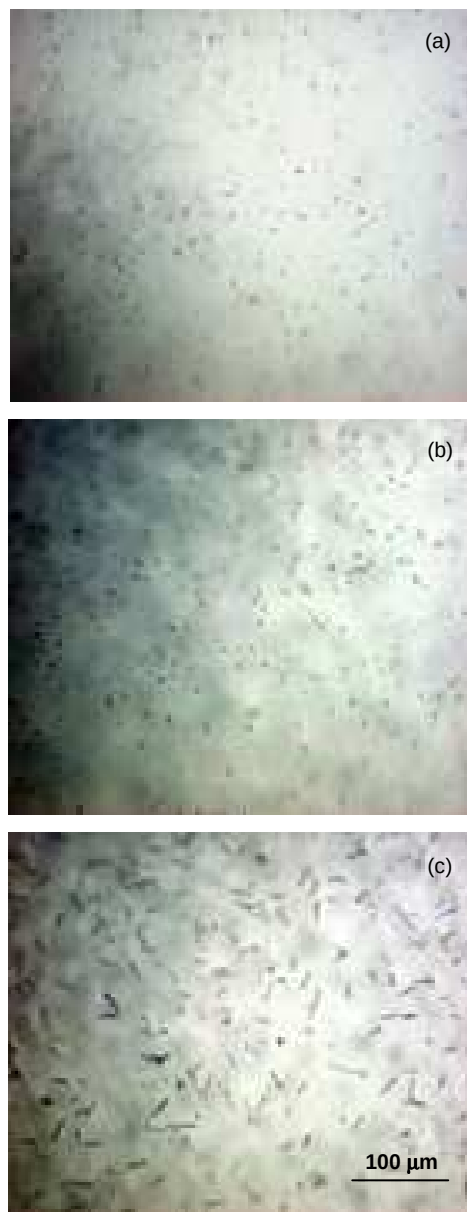


Abb. 51: Kristallwachstum in einem Kristallisationsansatz fotografiert nach (a) 7 d, (b) 14 d, (c) 30 d. Die stabförmigen Kristalle besaßen am Ende ihrer Wachstumsperiode eine Kantenlänge von $10\text{ }\mu\text{m} \times 60\text{ }\mu\text{m}$.

Eine Analyse der Proteinzusammensetzung der Kristalle durch ein Tris-Glycin Mini-Gel zeigte eine Abreicherung von Verunreinigungsbanden im Kristall im Vergleich zur Mutterlauge (Abb. 52).

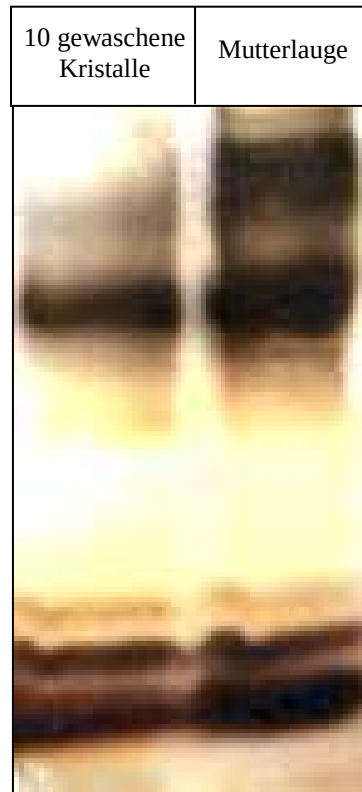


Abb. 52: Tris-Glycin Mini-Gel vorgewaschenen Kristallen (links) im Vergleich zu Mutterlauge (rechts). In der Mutterlauge sind im oberen Bandenbereich mehrere Verunreinigungen zu erkennen, deren Muster im Vergleich mit der Kristallzusammensetzung fehlt.

Mit Hilfe eines Pipettier-Roboters (Tecan evo 150) konnten die Batch-Kristallisationsansätze mittlerweile im Nanoliter Bereich (100 - 500 nl) angesetzt werden. Dies erhöhte die wöchentliche Durchsatzrate an Ansatzmöglichkeiten von 30 (150µl Proteinlösung, 5µl Kristallisationsvolumen) auf 300 – 1500.

Im Zuge dieser Experimente versuchen wir zur Zeit auch eine Zwei-Tropfen Methode zu etablieren, als Alternative zum Dialyse-Verfahren. Hierbei werden die Proteinlösung und der Puffer mit niedrigerer Ionenstärke in direkter Nähe zueinander auf einer planaren Oberfläche (Deckgläschen) pipettiert und durch einen winzigen Kontaktpunkt miteinander in Verbindung gebracht. Die Vermischung der Tropfenbestandteile erfolgt in erster Linie durch Konvektion entlang des Konzentrationsgefälles und ist somit stark temperaturabhängig

Durch den zusätzlichen Präzipitationsdruck im Zwei-Tropfen-Verfahren wurden stäbchenförmige Kristalle mit Kantenlängen von $20\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ erhalten (Abb. 53). Es waren die einzigen Kandidaten dieser Größe. Kristalle diesen makroskopischen Typs wurden einer Röntgenbeugungsanalyse unterzogen und zeigten ein proteintypisches Diffraktionsmuster mit einer großen Zahl an Beugungsreflexen unterschiedlich starker Auflösung (Abb. 54).

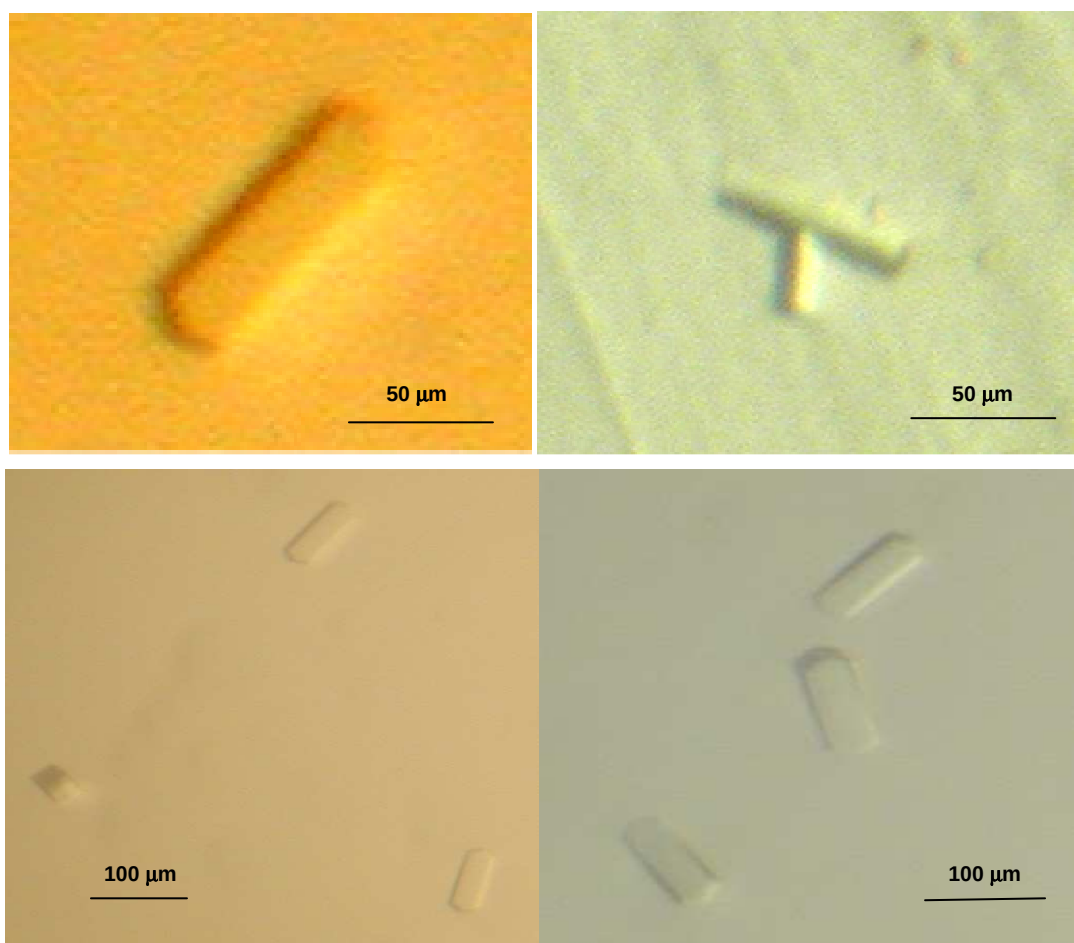


Abb. 53: Zur Röntgenbeugungsanalyse eingesetzte Kristalle mit Kantenlängen von etwa $20\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$. Oben: Kristalle im Batch-Verfahren ohne zusätzlichen Präzipitationsdruck gezüchtet. Unten: Kristalle im Zwei-Tropfen-Verfahren gezüchtet.

Ein Diffraktionsmuster ist in Abb. 54 gezeigt. Es stammt eindeutig von einem Proteinkristall, der bis zu einer Auflösung von $7.5\text{ }\text{\AA}$ beugte. Leider konnte von diesen Kristallen kein Datensatz aufgenommen werden. Mit Hilfe der Raumgruppeninformation I 4 konnten die Dimensionen der Einheitszelle mit $a = b = 36\text{ nm}$ und $c = 38\text{ nm}$ ermittelt werden. Aus der Kenntnis der ungefähren Länge des Membrarmarms aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Hofhaus, 1991) und den

Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung von etwa 18 nm, wurde unter Annahme eines zweifachen Einbaus des Proteins pro Kantenlänge der Wassergehalt des Kristalls zu 57 % mit Hilfe der Software MOSFLM ermittelt. Der Wassergehalt des Kristalls beträgt nach dieser Rechnung 57%, Proteinkristalle besitzen im Schnitt zwischen 40% und 70% Wasser.

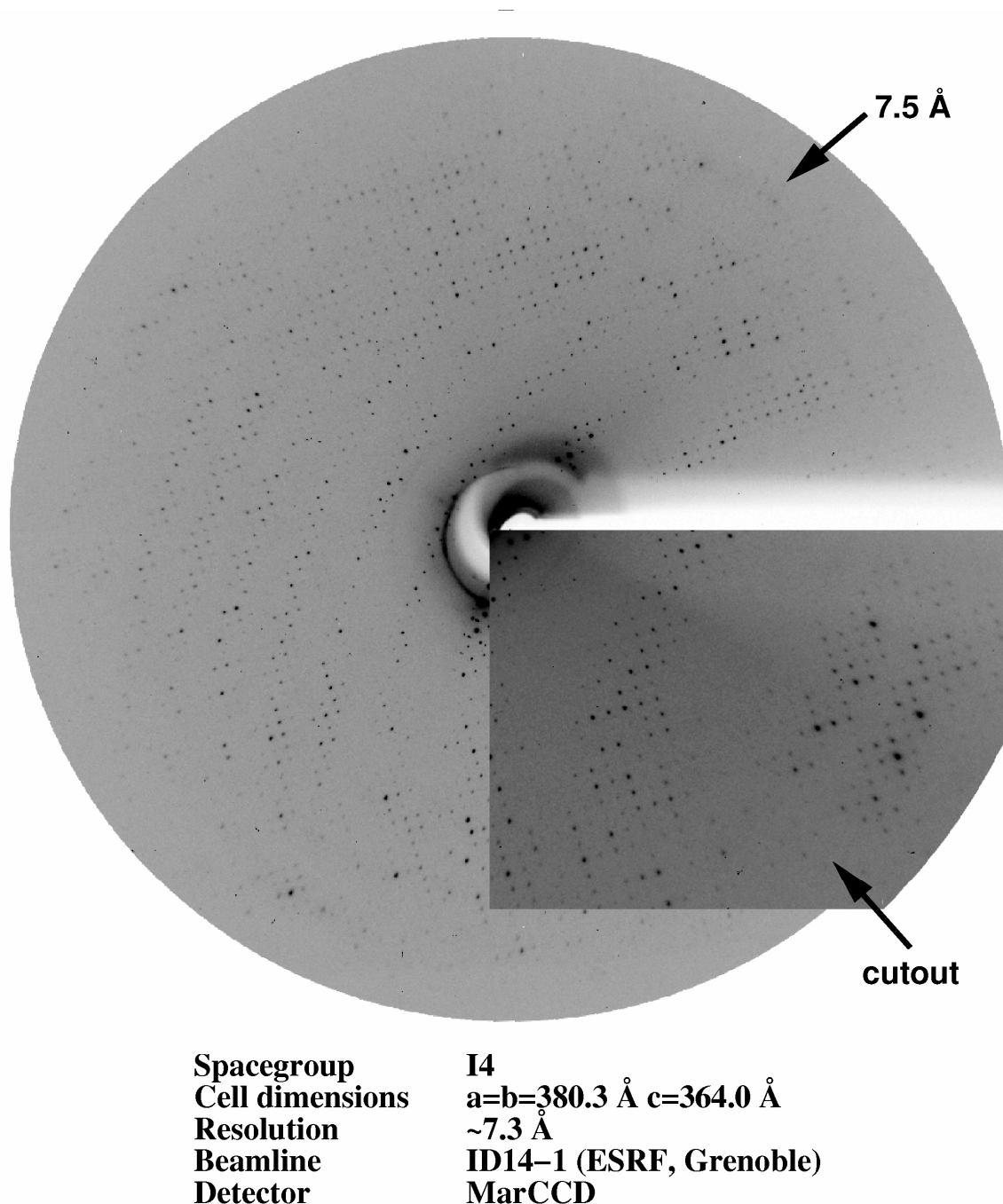


Abb. 54: Diffraktionsmuster des Proteinkristalls mit 7.5 Å Auflösung. Die Röntgenbeugungsreflexe streuen weiträumig im Gegensatz zu Nicht-Protein Kristallen. Aus dem Beugungsmuster konnten Informationen über Symmetrie und Raumgruppe, sowie über den Wassergehalt des Kristalls abgeleitet werden. Ein Datensatz zur mathematischen Strukturanalyse konnte während dieser Messung nicht aufgenommen werden.

5. Ausblick

Da die Kristallisationsstrategie prinzipiell funktioniert, konnte durch Einzelerfolge belegt werden. So konnten wir zeigen, daß die von uns gezogenen Kristalle tatsächlich das Proteinmuster des Membranarms von Komplex I besitzen und darüber hinaus in der Mutterlösung vorhandene Verunreinigungen nicht in den Kristall eingebaut wurden. Desweiteren konnte das Diffraktionsmuster eines Proteinkristalls mit einer Auflösung von 7.5 Å aufgenommen werden, dessen geometrische Daten einen zweifachen Einbau des Membranarms entlang jeder Raumrichtung pro Einheitszelle plausibel erklären würden.

Da es im Falle des Membranarms schwierig ist das Protein monomer unter einem Präzipitationsdruck stabil während des Kristallisationsvorganges in Lösung zu halten sind dem Kristallwachstum bislang immer Grenzen gesetzt gewesen, da schnell kein monomeres Protein mehr für das Kristallwachstum in der Lösung vorhanden ist. Dies wissen wir aus den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung.

Um das Problem des starken Monomer-Verlustes unter Präzipitationsdruck zu umgehen, verfolgen wir in letzter Zeit vermehrt die Methode des „Seeding“. Da nicht die Nukleation, also die Keimbildung, sondern das Wachstum des Kristalls aufgrund der geringen Monomer-Konzentration problematisch ist, werden kleine Kristalle in frische Proteinlösung übersetzt, die nur nahe an den Sättigungsbereich der Lösung herangeführt wurde. Da der Präzipitationsdruck hier gering ist, erhoffen wir uns durch die sehr viel höhere Monomer-Konzentration Kristalle in zweiter Phase erfolgreich größer wachsen lassen zu können. Es genügen einige kleine Kristalle aus vorangegangenen Kristallisationen als Wachstumskeime und ein geringer Präzipitationsdruck um die Kristalle in der metastabilen Phase weiter wachsen zu lassen. Diesen Vorgang nennt man Mikro-Seeding. Beim Makro-Seeding wird ein in zweiter Phase gezogener größerer Kristall in frische Proteinlösung übersetzt und die Lösung gar nicht erst in den gesättigten Zustand überführt sondern im ungesättigten Zustand belassen und nur nahe an die Sättigungszone herangeführt (Abb. 55). Unter diesen Bedingungen kann „frisches“ monomeres Membranarmprotein mehrfach neu in die Kristallisation eingeführt werden und die Stabilitätsprobleme des Proteinmonomers in der übersättigten Phase würden umgangen werden. Da es bislang wenig Probleme mit der Nukleation dafür aber umso mehr mit dem Wachstum von Membranarmproteinkristallen während unseren

bisherigen Versuchen gab scheint dies ein erfolgsversprechender Ansatz zu sein, dem wir zur Zeit intensiv nachgehen.

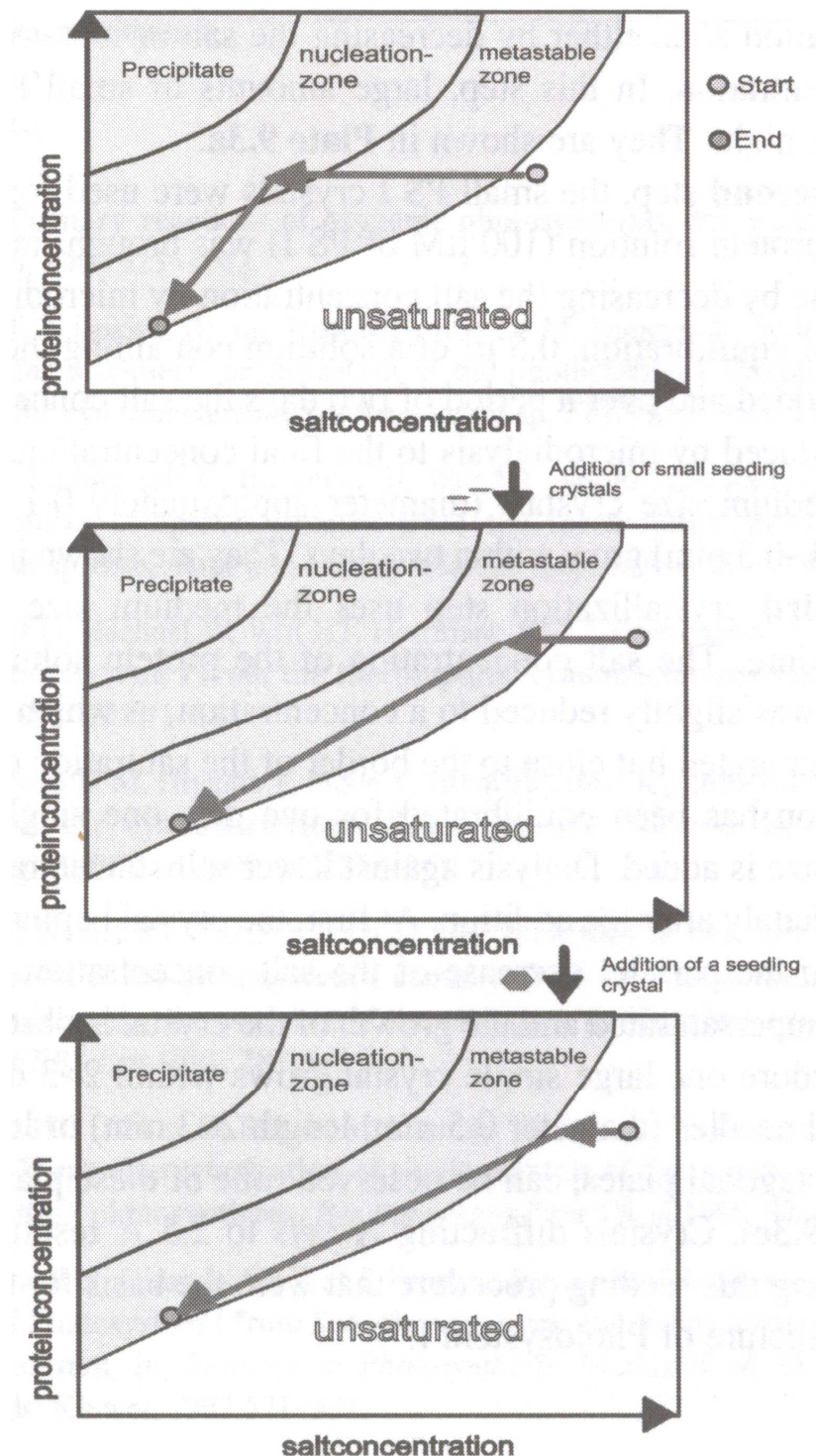


Abb. 55: „Seeding“-Technik unter Ionenstärke-Erniedrigungs Bedingungen. Beim Mikro-Seeding werden kleine Kristalle als Keime in frische Proteinlösung appliziert woraufhin diese erneut einem geringen Präzipitationsdruck (Erniedrigung der Ionenstärke) ausgesetzt wird. Beim Makro-Seeding wird eine frische Proteinlösung mit einem größeren Kristall angimpft und nur in die Nähe des Sättigungsbereiches gebracht. Das Membranarmprotein liegt in frischer Proteinlösung noch als Monomer vor und kann so in den wachsenden Kristall eingebaut werden (aus Petra Fromme „Crystallization of Photosystem I for structural analysis“ *Habilitationsschrift* 1998, Technische Universität Berlin).

Der Einsatz der „Seeding“-Methode zeigt erste Erfolge. Es konnten wieder vermehrt Kristalle mit Kantenlängen von ca. 50 μm beobachtet werden.

Ausschlaggebend für eine zeitlich effiziente Weiterentwicklung solch einen gigantischen Projektes ist nicht zuletzt die im angrenzenden Arbeitsbereich vorhandene apparative Infrastruktur. Entscheidend hierbei ist in erster Linie, die Möglichkeit „echte“ von „falschen“ Proteinkristallen möglichst zeitnah unterscheiden zu können.

Zur Zeit wird hierfür an unserem Institut ein Epi-Fluoreszenz Mikroskop umgebaut, um in der Zukunft viel Zeit mit der Unterscheidung Protein- oder Nicht-Protein-Kristall durch Detektion der Eigenfluoreszenz von Tryptophanresten in Proteinkristallen zu ersparen (Judge et al., 2005). Im Winter diesen Jahres soll dann an diesem Standort ein Röntgengenerator in Betrieb gehen. Ebenfalls im Gespräch ist auch die Anschaffung eines Pipettierroboters an der hiesigen Fakultät, was eine zukünftige Unabhängigkeit vom Standort Jülich unterstreichen würde. Eine weitere Verfolgung des Projektes über den Rahmen der Dissertation hinaus wird daher zur Zeit diskutiert

6. Literaturverzeichnis

- Abelmann A. (2000) Charakterisierung einer neuen Redoxgruppe im Atmungsketten Komplex I aus *Neurospora crassa*. *Dissertation*, HHU Düsseldorf
- Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Lutter R., Walker J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628
- Amling N. (1996) UV/VIS-spektroskopischer Nachweis einer unbekannten Redoxgruppe im Atmungskettenkomplex I. *Dissertation* Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Attardi G. und Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 289-333
- Babcock G.T. und Wickström M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**, 301-309
- Beisenherz G., Boltze H.J., Bücher T., Czok R., Garbade K.H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G. (1953) Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch* **8b**, 555-557
- Bianchet M.A., Hüllihen J., Pedersen P.L., Amzel L.M. (1998) The 2.8 Å structure of rat liver F₁-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis-hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 11065-11070
- Böttcher B., Scheide D., Hesterberg M., Nagel-Steger L., Friedrich T. (2002) A novel, enzymatically active conformation of the *E. coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* **277**, 17970-17977
- Boyer P.D. (1997) Energy, Life and ATP. *Nobel Foundation, Stockholm*
- Boyer P.D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749
- Boyer P.D. (2001) Toward an adequate scheme for the ATP synthase catalysis. *Biochemistry (Mosc)* **66** (10), 1058-1066 Review

- Brandt U. and Trumpower B.L. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **29**, 165-197
- Brandt U. (2006) Energy Converting NADH:Quinone Oxidoreductase (Complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 2006 Mar 10
- Buchanan S.K. and Walker J.E. (1996) Large-scale chromatographic purification of F1F0 ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **318**, 343-349
- Budde S.M., van den Heuvel L.P., Janssen A.J., Smeets R.J., Buskens C.A., DeMeirleir L., van Coster R., Baethmann M., Voit T., Trijbels J.M., Smeitink J.A: (2000) Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 63-68
- Chang G., Spencer R.H., Lee A.T., Barclay M.T., Rees D.C. (1998) Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel. *Science* **282**, 2220-2226
- Chomyn A. und Attardi G. (1992) Recent advances on mitochondrial biogenesis. *Mechanisms in Bioenergetics – Elsevier Science*, 483-509
- Crofts A.R. and Berry E.A. (1998) Structure and function of the cytochrome bc₁ complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 501-509
- Davis R.H. und de Serres F.J. (1970) Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **17A**, 79-143
- de Vries S. und Grievell L.A., (1988) Purification and characterisation of a rotenone-insensitive NADH-Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **176**, 377-384
- Degli-Esposti M., Ghelli A. (1994) The mechanism of proton and electron transport in mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1187(2)**, 116-20

- Djafarzadeh R., Kerscher S., Zwicker K., Lindahl M., Rademacher M., Brandt U. (2000) Biophysical und structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 230-238
- Douce R. und Neuberger M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 371-414
- Duarte M., Peter M., Schulte U. und Videira A. (2003) The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem. J.* **271**, 1-7
- Dutton P.L., Moser C.C., Sled V.D., Daldal F., Ohnishi T. (1998) A reductant-induced oxidation mechanism for complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**(2), 245-257
- Fearnly I.M. und Walker J.E. (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 105-134
- Ferrinha F., Duarte M., Melo A.M. und Videira A. (1999) Effects of disrupting the 21kDa subunit of complex I from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **342**, 551-554
- Flemming D., Hellwig P., Friedrich T. (2003) Involvement of tyrosines 114 and 139 of subunit NuoB in the proton pathway around cluster N2 in *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **278**(5), 3055-62
- Friedrich T., Hofhaus G., Ise W., Nehls U., Schmitz B, Weiss H. (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **180**, 173-180
- Friedrich T., Strohdeicher M., Hofhaus G., Preis D., Sahm H., Weiss H. (1990) The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase. *FEBS Lett.* **265**, 37-40
- Friedrich T., van Heek P., Leif H., Onishi T., Forche E., Kunze B., Jansen R., Trowitzsch-Kienast W., Höfle G., Reichenbach H., Weiss H. (1994) Two binding-sites of

- inhibitors in NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Eur. J. Biochem.* **219**, 691-698
- Friedrich T., Steinmüller K. und Weiss H. (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett.* **367**, 107-111
- Friedrich T. und Scheide D. (2000) The respiratory complex I of bacteria, archae and eucary aims its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.* **479**, 1-5
- Friedrich T., Brors B., Hellwig P., Kintscher L., Rasmussen T., Scheide D., Schulte U., Mäntele W., Weiss H. (2000) Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 305-309
- Friedrich T. (2001) Complex I: A chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J. Bioenerg. Biomem.* **33 (3)**, 169-177
- Fromme P. (1998) Crystallization of Photosystem I for structural analysis. *Habilitationsschrift* Technical University Berlin, Germany
- Gemperli A.C., Dimroth P., Steuber J. (2002) The respiratory complex I (NDH I) from *Klebsiella pneumoniae*, a sodium pump. *J. Biol. Chem.* **277(37)**, 33811-7
- Guénebaut V., Vincentelli R., Mills D., Weiss H., Leonard K., (1997) Three dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J. Mol. Biol.* **265**, 409-418
- Guénebaut V., Schlitt A., Weiss H., Leonard K., Friedrich T. (1998) Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH.ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **276**, 105-112
- Gutman M., Singer T.P., Beinert H. (1979) Relation of the respiratory chain linked reduced Nicotinamide-Adenine dinucleotide dehydrogenase to energy-coupling site. *Biochemistry* **11**, 556-562

- Hatefi Y. (1985) The mitochondrial elektron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1025-1069
- Harris D.A. (1995) Bioenergetics at a glance. *Blackwell Science, New York*
- Helenius A. und Simons K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* **415**, 29-79
- Hellwig P., Scheide D., Bungert S., Mäntele W., Friedrich T. (2000) FT-IR spectroscopic characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*: oxidation of FeS cluster N2 is coupled with the protonation of an aspartate or glutamate side chain. *Biochemistry* **39(35)**, 10884-91
- Hinchcliff P. and Sazanov L. (2005) Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex. *Science*, 309,771-774
- Hinchcliff P. and Sazanov L. (2006) Identification of a Novel Subunit of Respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry* **45**, 4413-4420
- Hinkle P.C., Kumar M.A., Resetar A., Harris D.L. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576-3582
- Hirdy I., Hirt R.P., Dolezal P., Bardonova L., Foster P.G., Tachezy J. und Embly T.M. (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**, 618-622
- Hofhaus G., Weiss H. und Leonard K. (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and the membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **221**, 1027-1043
- Hunte C., Koepke J., Lange C., Rossmannith T., Michel H. (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Nature Structure* **8**, 669-684

- Ingledeu W.J. and Ohnishi T. (1980) An analysis of some thermodynamic properties of iron-sulphur centres in site I of mitochondria. *Biochem. J.* **186**(1), 111-7
- Iwata S., Lee J.W., Okada K., Lee J.K., Iwata M., Rasmussen B., Link T.A., Ramaswaamy S. und Jap B.K. (1995) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* **281**, 64-71
- Judge R.A., Swift K, Gonzales C. (2005) An ultraviolet fluorescence-based method for identifying and distinguishing protein crystals. *Biol. Cryst.* **61**, 60-66
- Junge W., Lill H., Engelbrecht S. (1997) ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 420-424
- Keilin D. (1966) The History of Cell respiration and Cytochrome. *Cambridge University Press, London*
- Kennedy E.P. and Lehninger A.L. (1950) The products of oxidation of fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **185** (1), 275-85
- Khan S. (1997) Rotary chemiosmotic machines. *Biochim. Biophys. Acta* **1322**, 86-105
- Kinosita K., Yasuda R., Noji H., Ishiwata S., Yoshida M. (1998) F₁-ATPase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell* **93**, 21-24
- Koch M.H.C., Dencher M.A., Osterhelt D., Plöhn H.J., Rapp G., Büldt G. (1991) Time-resolved X-ray diffraction study of structural changes associated with the photocycle of bacteriorhodopsin. *EMBO J.* **10**(3), 521-6
- Kuhl H., Kruip J., Seidler A., Krieger-Liszkay A., Bunker M., Bald D., Scheidig A.J., Rogner M. (2000) Towards structural determination of the water-splitting enzyme. Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of the photosystem II from a thermophilic cyanobacterium. *J. Biol. Chem.* **7**, 20652-20659
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

- Lange C. and Hunte C. (2002) Crystal structure of the yeasts cytochrome bc₁ complex with its bound substrate cytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 2800-2805
- Lee J.W., Chan M., Law T.V., Kwon H.J., Jap B.K. (1995) Preliminary cryocrystallographic study of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex: improved crystallization and flashing-cooling of a large membrane protein. *J. Mol. Biol.* **252**, 15-19
- Leggate E.J., Hirst J. (2005) Roles of the disulfide bond and adjacent residues in determining the reduction potentials and stabilities of respiratory-type Rieske clusters. *Biochemistry* **44(18)**, 7048-58
- Leif H., Weidner U., Berger A., Spehr V., Braun M., van Heek P. Friedrich T., Onishi T., Weiss H. (1993) Escherichia coli NADH dehydrogenase I, a minimal form of the mitochondrial complex I. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 998-1001
- Li Q., Ritzel R.G., McLean L.L., McIntosh L., Ko T., Bertrant H. und Nargang F.E. (1996) Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics* **142**, 129-140
- Link T.A., Haase U., Brandt U., and Jagow G. (1993) What information do inhibitors provide about the structure of the hydroquinone oxidation site of ubiquinone:cytochrome c oxidoreductase? *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 221-232
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Luttic M.A., Overcamp K.M., Kotter P., de Vries S., van Dijken J.P. und Pronk J.T. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalysing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Bio. Chem.* **273**, 24529-24534
- Mamedova A.A., Holt P.J., Carroll J., Sazanov L.A. (2003) Substrate-induced conformational change in bacterial complex I. *J. Biol. Chem.* **279(22)**, 23830-6
- Manchekar M., Scisum-Gunn K., Song D., Khazi F., McLean S.L., Nielsen B.L. (2006) DNA recombination activity in soybean mitochondria *J. Mol. Biol.* **356 (2)**, 288-299

- Marques I., Duarte M., Videira A. (2003) The 9,8kDa subunit of complex I, related to bacterial Na⁺-translocating NADH dehydrogenases, is required for Enzyme assembly and fuction in *Neurospora crassa*. *J. Mol. Biol.* **329**, 283-290
- Marres C.A., de Vries S. und Grivell L .A. (1991) Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH :ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **195**, 857-862
- McKinnon R. (2003) Potassium Channels and the Atomic Basis of Selective Ion Conduction. *Nobel Foundation, Stockholm*
- Meier T., Polzer P., Dietrichs K., Welte W., Dimroth P. (2005) Structure of the Rotor Ring of Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. *Science* **308**, 659-662
- Michel H., Behr J., Harrenga A. und Kannt A. (1998) Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329-356
- Mikolajczyk S. und Brody S. (1990) De novo fatty acid synthesis mediated by acyl-carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **185** (2), 431-437
- Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148
- Mitchell P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and it's chemiosmotic consequences. *Science* **206**, 1148-1159
- Nakamara-Ogiso E., Takahiro Y., Yagi T. und Onishi T. (2005) Characterisation of the iron-sulfur cluster N-/N1c subunit NuoG of the proton-translocating NADH:quinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 301-307
- Ohnishi T. (1976) Studies on the mechanism of site I energy conservation. *Eur. J. Biochem.* **64**(1), 91-103
- Ohnishi T. (1979) The origin of cluster N2 of the energy-transducing NADH-Quinone Oxidoreductase: Comparisons of phylogenetically related enzymes. In *J. Bioenerg. Biomem.* June 2001 **Vol 33**, 213-221

- Onishi T. (1979) Mitochondrial iron-sulfur flavodehydrogenases. In "Membrane Proteins in Energy Transduction" Capaldi Ed. 1-87, *Dekker* New York
- Onishi T. and Salerno J.C. (2005) Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *FEBS Lett.* **579**, 4555-4561
- Ostermeier C., Harrenga A., Ermler U. and 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.* **94**, 10547-10553
- Osyczka A, Moser C.C., Daldal F., Dutton P.L. (2004) Reversible redox energy coupling in electron transfer chains. *Nature* **427(6975)**, 607-12
- Oxenoid K., Soennichsen F.D., Sanders C.R. (2001) Conformationally-specific misfolding of an integral membrane protein. *Biochemistry* **36**, 5111-5118
- Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M. (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **293**, 1793-1800
- Poole K.J., Maeda Y., Rapp G., Goody R.S. (1991) Dynamic X-ray diffraction measurements following photolytic relaxation and activation of skinned rabbit psoas fibres. *Adv. Biophys.* **27**, 63-75
- Rasmussen T., Scheide D., Brors B., Kinzschler L., Weiss H., Friedrich T. (2001) Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* **40**, 6124-6131
- Robinson B.H. (1998) Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 271-286
- Rottenberg H. (1998) The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 1-16

- Sambongi Y., Iko Y., Tanabe M., Omote H., Iwamoto-Kihara A., Ueda L., Yanagida T., Wada Y., Futai M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F₀F₁): direct observation. *Science* **286**, 1722-1724
- Sanders C.R., Oxenoid K. (2000) Customizing model membrane and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 129-145
- Saraste M. (1990) Structural features of cytochrome c oxidase. *Quart. Rev. Biophys.* **23**, 331-366
- Sato A., Nakada K., Hayashi J.I. (2006) Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim. Biophys. Acta*
- Sazanov L.A., Carroll J., Holt P., Toime L. Fearnley I.M. (2003) A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the Escherichia coli NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* **278**(21), 19483-91
- Sasanov L. and Hinchcliff P. (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory Complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430-1436
- Scacco S., Vergari R., Scarpulla R.C., Technikova-Dobrova Z., Sardanelli A., Lambo R., Lorusso V., Papa S. (2000) cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear-encoded 18kDa(IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* **275**, 17578-17582
- Schapira A.H.V. (1999) Mitochondrial disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 99-102
- Schulte U. und Weiss H. (1995) Generation and characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase mutants in *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **260**, 3-14
- Schulte U. und Weiss H. (1997) Structure, function and biogenesis of respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). In "Frontiers of cellular bioenergetics. Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology" *Plenum Press*, London

- Schulte U., Abelmann A., Amling N., Brors B., Friedrich T., Kintscher L., Rasmussen T., Weiss H. (1998) Search for novel redox groups in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by diode array. *BioFactors* **8**, 177-186
- Small W.C. und McAllister-Henn L. (1998) Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180**, 4051-4055
- Siedow J.N. (1990) Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis. *Plant Biology* **10**, Wiley-Liss Verlag, New York
- Skou J.C. (1997) The identification of the Sodium-Potassium Pump. *Nobel Foundation, Stockholm*
- Skou J.C. (1998) Die Identifizierung der Na⁺-K⁺-Pumpe. Nobel-Vortrag *Angew. Chem.* **110**, 2452-2461
- Soulimane T., Buse G., Bourenkov G., Bartunik H. D., Huber R., Than M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant ba₃-Cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* **19**, 1766-1776
- Stock D., Leslie A.G.W., Walker J.E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705
- Sui H., Han B.G., Lee J.K., Walian P., Jap B.K. (2001) Structural basis of water-specific transport trough the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872-878
- Sukumaran S., Hauser K., Maier E., Benz R., Mäntele W. (2006) Tracking the unfolding and refolding pathways of outer membrane protein porin from *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* **45** (12), 3972-80
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa K., Nakashima R., Yaono R. und Yohikawa S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8Å. *Science* **269**, 1069-1074

- Uhlmann M. und Friedrich T. (2005) EPR signals assigned to Fe/S cluster N1c of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase derive from cluster N1a. *Biochemistry* **44**, 1653-1658
- Videira A. und Duarte M. (2001) On complex I and other NADH:ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 197-203
- Vinogradov A.D. (2001) Respiratory complex I: structure, redox components, and possible mechanisms of energy transduction. *Biochemistry (Mosc)* **66(10)**, 1086-97
- Vogel H.J. (1956) A convenient growth media of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Genet. Bull.* **13**, 42-47
- von Jagow G., Link T.A. and Onishi T. (1986) Organization and function of cytochrome b and ubiquinonen in the cristae membrane of beef heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 157-179
- Wang D.C., Meinhardt S.W., Sackmann U., Weiss H., Onishi T. (1991) The iron-sulfur clusters in th two related forms of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase made by *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **197**, 257-264
- Walker J.E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quaterly Rev. Biophys.* **25**, 253-324
- Walker J.E. (1997) ATP synthesis by rotary catalysis. *Nobel Foundation, Stockholm*
- Walker J.E. (1998) ATP-Synthese durch Rotationskatalyse. Nobel-Vortrag *Angew. Chem.* **110**, 2438-2450
- Wallace D.C. (1999) Mitochondrail diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1487
- Weidner U., Geier S., Ptock A., Friedrich T. Leif H. ind Weiss H. (1993) The Gene locus of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of the mitochondrial complex I. *J. Mol. Biol.* **233**, 109-122

- Weiss H., von Jagow G., Klingenberg M., Bücher T. (1970) Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria: preparation with a grind-mill. *Eur. J. Biochem.* **14**, 75-82
- Weiss H., Friedrich T., Hofhaus G., Preis D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563-576
- Wüthrich K. (2002) NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules. *Nobel Foundation, Stockholm*
- Xia D., Yu C.A., Kim H.H., Kachurin A.M., Zhang L., Yu L. und Deisenhofer J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**, 60-66
- Yagi T. (1993) The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 1-17
- Yagi T. und Matsuno-Yagi A. (2003) The transducing Quinone oxidoreductase in the respiratory : The secret unlocked. *Biochemistry* **42**, 2266-2274
- Yamaguchi M., Belogradov G.I., Hatefi Y. (1998) Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). Effect of substrates on the fragmentation of subunits by trypsin. *J. Biol. Chem.* **273(14)**, 8094-8
- Yoshikawa S., Shinzawa-Itoh K., Nakasima R., Yaono R., Yamashita E., Inoue N., Yao M., Fei M., Libeu C.P., Mizushima T. et al. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* **280**, 1723-1729
- Yu C.A., Xia J.Z., Kachurin A.M., Yu L., Xia D., Kim H.H. und Deisenhofer J. (1996) Crystallisation and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1257**, 47-53
- Zensen R., Husmann H., Schneider R., Peine T. und Weiss H. (1992) De novo synthesis and desaturation of fatty acids at the mitochondrial acyl-carrier protein a subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **310**, 179-181

- Zhang Z., Huang L., Chi Y.I., Kim K.K., Kim S.H., Crofts A., Berry E.A. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁. *Nature* **392**, 677-684
- Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-48

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ich hatte gehofft von einem alten Meister lernen zu dürfen - ich durfte. Von ganzem Herzen danke ich Herrn Prof. Dr. Hanns Weiss für eine von großer menschlicher Sympathie und väterlicher Fürsorge geprägte Betreuung meiner Arbeit.

Auch meinem X-Ray Team im Forschungszentrum Jülich, PD Dr. Joachim Granzin und PD Dr. Jörg Labahn, danke ich herzlich, da sie mich auf allen nur denkbaren Wegen immer unterstützt und in meiner Arbeit immer weiter voran gebracht haben.

Für seine ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft danke ich auch Herrn PD Dr. Ulrich Schulte.

Obwohl nur noch zu Zweit - die letzten Überlebenden der Arche Noah Martina Wesemann und Yasmin Golestani waren als Team so toll wie es zwanzig Andere nie hätten sein können.

Als Neuzugänge freute ich mich auch sehr über die Lutz'sche Truppe Thorsten, Stefan, Nils, Robert, Jan, Petra und Sander.

Ich habe viel Zeit am Institut mit Menschen verbringen dürfen, die mir mitunter zu echten Freunden geworden sind wie Christine Oswald, Berna Mersinli, Leoni Oberbarnscheidt, Susanne Stefer und Cristina Batista-Paulino.

Meiner Liebe Justin Schmitz respektive Maria, Jakob und Johann danke ich für die große Geduld und Ausdauer mit der sie meine Allüren auch während dieser stressigen Zeit ertragen haben.

Und in tiefer Liebe danke ich meinen Eltern.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 18.09.2006

(Katharina Lecher)

