

Die Kristallstruktur zweier  
Atmungsproteine:  
das Hämoglobin des Meerschweinchens  
und  
das 24-mere Hämocyanin des  
Kaiserskorpions

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

von

Bruno Pairet  
geboren in Castres (Frankreich)

Mainz, 2010



## Zusammenfassung

Im Verlauf der vorgestellten Arbeit konnten die Kristallstrukturen zweier Atmungsproteine gelöst werden. Da diese Strukturen mit verschiedenen Auflösungen gelöst wurden, wurden für die beiden Modelle unterschiedliche Methoden verwendet.

Die Kristalle des Hämoglobins des Meerschweinchens *Cavia porcellus* erlaubten eine Messung von Streureflexen bis zu einer Auflösung von 1.7 Å. Damit konnten das Molecular Replacement und das folgende Refinement mit geringen Vorgaben durchgeführt werden.

Anhand der ermittelten Struktur konnte gezeigt werden, dass die Höhenadaptation des Hämoglobins des Meerschweinchens auf einer Stabilisierung des R2-Zustandes und einer gleichzeitigen Destabilisierung des T-Zustandes beruht. Die zu Grunde liegenden Aminosäureaustausche konnten identifiziert und der resultierende Mechanismus postuliert werden.

Die Durchführung von Mutagenese-Experimenten am Hämoglobin des Meerschweinchens könnte die vorgestellte Hypothese bestätigen.

Die Kristallstruktur des 24-meren Hämocyanins aus *Pandinus imperator* konnte durch eine Kombination von Röntgenkristallographie und Homologiemodellierung mit einer Auflösung von 6.5 Å gelöst werden. Allerdings wäre die Bestimmung der Phasen durch Molecular Replacement ohne die vor kurzem publizierte Kryo-EM Struktur nicht möglich gewesen [Cong *et al.*, 2009].

Damit ist es durch die Kombination verschiedener Methoden erstmalig gelungen die Struktur eines Hämocyanins dieser Größe ( $M_w = 1.7$  MDa) zu lösen. Die Auflösung von 6.5 Å, eine für die Kristallographie relativ geringe Auflösung, erlaubte die Bestimmung des  $C_\alpha$ -Traces des Proteins mit hoher Genauigkeit.

Durch die Kristallstruktur konnte das zu Grunde liegende Kryo-EM Modell aus [Cong *et al.*, 2009] bestätigt werden. Insbesondere die Position der  $\alpha$ -Helices konnte mittels Kristallographie mit einer höheren Genauigkeit bestimmt werden. Durch die Verwendung von OMIT-Maps wurde sichergestellt, dass die Struktur nicht „kopiert“ wurde. Die Übereinstimmung ist deshalb auf die Struktur des Hämocyanins im gemessenen Kristall zurückzuführen, nicht auf einen Bias bei der Auswertung.

Anhand der Kristallstruktur konnten für die Kooperativität im Trimer potentiell entscheidende Aminosäuren identifiziert werden. Diese Aminosäuren könnten im Vergleich zur bekannten trimeren Struktur aus *Limulus polyphemus* zur Ausbildung zusätzlicher Bindungen zwischen den Untereinheiten führen. Diese Bindungen könnten eine wichtige Rolle beim Konformationsübergang zwischen dem T- und R-Zustand spielen.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Atmungsproteine . . . . .	1
1.2 Hämoglobin . . . . .	3
1.3 Hämocyanin . . . . .	7
1.4 Überblick . . . . .	10
<b>2 Grundlagen der Kristallographie</b>	<b>11</b>
2.1 Kristallisation von Proteinen . . . . .	11
2.2 Die Bragg'sche Gleichung . . . . .	14
2.3 Gitterkoordinaten und das reziproke Gitter . . . . .	15
2.4 Streuung an einem Proteinkristall . . . . .	16
2.5 Die Ewald Kugel . . . . .	20
2.6 Berechnung der Elektronendichte . . . . .	21
2.7 Lösen des Phasenproblems durch Molecular Replacement . . . . .	22
2.8 R-Werte in der Kristallographie . . . . .	23
<b>3 Experimenteller Aufbau</b>	<b>25</b>
3.1 Prinzipieller Aufbau eines Streuexperiments . . . . .	25
3.2 Verwendete Apparatur . . . . .	26
3.3 Probenvorbereitung . . . . .	28
3.4 Durchführung der Messungen . . . . .	28
3.5 Datenanalyse . . . . .	29
3.5.1 Datenreduktion . . . . .	29
3.5.2 Molecular Replacement . . . . .	31
3.5.3 Refinement und Model-Building . . . . .	31
3.5.4 Analyse und graphische Darstellung . . . . .	31
3.6 Homologie-Modellierung . . . . .	32
<b>4 Probenpräparation</b>	<b>33</b>
4.1 Verwendete Lösungen und Puffer . . . . .	33
4.2 Aufreinigung des Hämoglobins . . . . .	33
4.3 Kristallisation von <i>Cavia porcellus</i> -Hämoglobin . . . . .	34

4.4	Gewinnung der Hämolymphe und Aufreinigung des Hämocyans . .	34
4.5	Überprüfung der Proben . . . . .	35
4.6	Kristallisation von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Ergebnisse: Höhenadaptation im Meerschweinchen-Hämoglobin</b>	<b>41</b>
5.1	Kristalle . . . . .	41
5.2	Messung der Streuamplituden . . . . .	41
5.3	Bestimmung der Struktur mit Molecular Replacement . . . . .	45
5.4	Allgemeine Beschreibung der Struktur . . . . .	51
5.5	Konformation des Hämoglobins . . . . .	51
5.6	Salzbrückenbindungen zwischen den $\beta$ -Untereinheiten . . . . .	52
5.7	Veränderungen in der „Switch Region“ . . . . .	54
<b>6</b>	<b>Diskussion: Höhenadaptation im Meerschweinchen-Hämoglobin</b>	<b>57</b>
6.1	Qualität des Datensatzes . . . . .	57
6.2	Warum nicht über die Homologie-Modellierung? . . . . .	60
6.3	Die Höhenanpassung im Meerschweinchen-Hämoglobin . . . . .	64
6.3.1	Stabilisierung der R2-Konformation . . . . .	64
6.3.2	Destabilisierung der T-Konformation . . . . .	66
6.3.3	Die resultierende Höhenadaptation . . . . .	68
<b>7</b>	<b>Ergebnisse: <i>Pandinus imperator</i>-Hämocyanin</b>	<b>69</b>
7.1	Kristalle . . . . .	69
7.2	Messung der Streuamplituden . . . . .	72
7.3	Molecular Replacement . . . . .	76
7.4	Homologie-Modellierung . . . . .	77
7.5	Refinement . . . . .	85
7.6	Beschreibung der Struktur . . . . .	88
7.6.1	Allgemeiner Aufbau . . . . .	88
7.6.2	Konformation des 24-mers . . . . .	93
<b>8</b>	<b>Diskussion: <i>Pandinus imperator</i>-Hämocyanin</b>	<b>99</b>
8.1	Kristallisation und Messung der Streureflexe . . . . .	99
8.2	Unterschiede zwischen den Untereinheiten . . . . .	103
8.3	Qualität des resultierenden Modells . . . . .	108
8.4	Bedeutung der Auflösung . . . . .	111
8.5	Vorteile der Kristallstruktur gegenüber der Kryo-EM-Struktur . . .	115
8.6	Kontakte zwischen den Untereinheiten im Trimer . . . . .	117
8.7	Zusammenfassung . . . . .	124
	<b>Literatur</b>	<b>125</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Å	$10^{-10}$ m
AS	Aminosäure
BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
Da	Dalton, äquivalent zur atomaren Masseneinheit u $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
EM	Elektronenmikroskopie
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FWHM	Full Width Half Maximum (Halbwertsbreite)
Hb	Hämoglobin
Hc	Hämocyanin
IFT	Inverse Fourier Transformation
KNF	Koshland, Némethy, Filmer; bezieht sich auf den Namen eines Allosterie-Modells.
$M_w$	Molekulargewicht
MWC	Monod Wyman Changeux; bezieht sich auf den Namen eines Allosterie-Modells.
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDB	Dateiformat der Protein Data Bank [PDB, n.d.]
$R_g$	Gyrationsradius
RMSD	Quadratisch gemittelte Abweichung (engl. Root Mean Square Deviation)
SAS	Small Angle Scattering
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRIS	Tris[hydroxymethyl]amionomethan
UV	Ultraviolett
Vis	Visible; sichtbarer Bereich des Lichtes



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Atmungsproteine

Da sich Sauerstoff nur sehr schlecht in wässrigen Lösungen löst, sind in größeren Organismen sauerstofftransportierende Proteine notwendig. In den Vertebraten übernehmen Hämoglobin und Myoglobin diese Aufgabe. Bei den Invertebraten findet man zusätzlich Hämocyanine in Arthropoden und Mollusken und Hämerythrine bei marinen Invertebraten wie Ringelwürmern [Terwilliger, 1998].

In dieser Arbeit werden in zwei separaten Projekten sowohl ein Hämoglobin, als auch ein Hämocyanin behandelt. Die Struktur des Hämoglobins des Meerschweinchens *Cavia porcellus* sowie des Hämocyanins aus dem Kaiserskorpion *Pandinus imperator* werden vorgestellt. Diese zwei Sauerstofftransportproteine sind grundlegend verschieden, obwohl sie primär die selbe Funktion erfüllen. Das eisenhaltige Hämoglobin kommt meist in den Erythrozyten von Säugetieren vor, das kupferhaltige Hämocyanin in der Hämolymphe von Arthropoden und Mollusken. Ein auffälliger Unterschied ist in Abbildung 1.1 dargestellt: während eine konzentrierte Hämoglobinlösung eine rote Farbe aufweist, zeigt die entsprechende Hämocyaninlösung eine blaue Färbung. Dieser Farbunterschied ist auf die unterschiedlichen Metallzentren der beiden Proteine zurückzuführen. Das Eisen bewirkt die rote Farbe des Hämoglobins, im Hämocyanin ist das Kupfer für die blaue Farbe verantwortlich.

Die sehr hohen Anforderungen an die Moleküle beim Sauerstofftransport und die molekularen Mechanismen, die zur Erfüllung dieser Anforderungen führen, machen die Struktur dieser Proteine so interessant. Ein wichtiger Schritt in der Evolution dieser zwei sauerstofftransportierenden Proteine war deshalb die Oligomerisierung. Der Aufbau aus mehreren funktionellen Untereinheiten zum Oligomer erlaubt Kooperativität und allosterische Regulierung bei der Bindung von Sauerstoff. Die Kooperativität zwischen den Untereinheiten bei der Bindung von Sauerstoff ist für die Funktion notwendig und ist deshalb in beiden Proteinen zu finden. Die Kooperativität zeigt sich in einem sigmoidalen Verlauf der Sauerstoffbindungskurve, wenn man graphisch den Anteil an gebundenem Sauerstoff gegen den Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung aufträgt. Dieser Verlauf ist ein Zeichen für eine allosterische



Abbildung 1.1: Hämoglobin und Hämocyanin im Vergleich. Aufgrund der unterschiedlichen Metallzentren der beiden Proteine zeigen sie unterschiedliche Farben. Das eisenhaltige Hämoglobin (links) ist im oxygenierten Zustand rot, das kupferhaltige Hämocyanin (rechts) ist blau. Abbildung entnommen aus [Markl, 1996].

Interaktion der Sauerstoffbindungsstellen. Für die Sauerstoffbindung bedeutet dies, dass ein  $O_2$ -Molekül umso einfacher gebunden werden kann, wenn das Hämocyanin- oder Hämoglobinmolekül an einem anderen aktiven Zentrum schon ein anderes  $O_2$ -Molekül gebunden hat. Dies ist für die Funktion des Proteins wichtig, da auf diese Weise im Gewebe, wo ein geringer Sauerstoffpartialdruck herrscht, Sauerstoff wesentlich effizienter abgegeben werden kann [Voet *et al.*, 2002]. Diese Kooperativität lässt sich durch verschiedene Modelle beschreiben. Die Modelle können anhand der Struktur der Proteine verifiziert werden. Vor allem bei den sehr großen Hämocyaninen, bei denen eine sehr ausgeprägte Kooperativität vorkommen kann, ist dieser Aspekt bei der Untersuchung der Struktur von besonderem Interesse. Beim wesentlich kleineren Hämoglobin-Tetramer ist der Konformationsübergang und damit der molekulare Mechanismus, der zur Kooperativität führt schon sehr ausführlich beschrieben (z.B. [Yonetani *et al.*, 2002]). Im Folgenden werden die beiden sehr unterschiedlichen Proteine einzeln näher beschrieben.

## 1.2 Hämoglobin

Hämoglobin ist das weitaus bekannteste Sauerstofftransportprotein. Es kann in einer Vielzahl von Arten gefunden werden, von Bakterien bis zum Menschen reichend [Wakabayashi *et al.*, 1986]. Die Struktur des Hämoglobins wurde schon sehr früh erforscht [M. F. Perutz *et al.*, 1960, Perutz, 1960]. Deshalb und wegen seiner Bedeutung im menschlichen Organismus kann die Struktur des Hämoglobins als eine der am ausführlichsten beschriebenen Proteinstrukturen angesehen werden. Im Folgenden wird sich die Beschreibung auf das tetramere Hämoglobin der Vertebraten beschränken, da ein solches Molekül in dieser Arbeit untersucht wurde.

Das Hämoglobin-Tetramer der Vertebraten besteht aus je 2  $\alpha$ -Ketten und 2  $\beta$ -Ketten mit einem Molekulargewicht von je  $\approx 15$  kDa. Die beiden Ketten unterscheiden sich in ihrer Sequenz nur leicht voneinander. Jede Untereinheit für sich zeigt die typische Faltung globulärer Proteine und enthält eine Hämgruppe an deren zentralem Eisenatom Sauerstoff reversibel gebunden werden kann. Das Gesamtmolekül liegt ebenfalls in einer globulären Form vor, mit einem Durchmesser von 50-55 Å [Paoli & Nagai, 2004].

Die Kooperativität und allosterische Regulierung machen das intrazelluläre Hämoglobin zu einem sehr vielseitigen sauerstofftransportierenden Protein, dessen Bindungseigenschaften über die Verwendung allosterischer Effektoren, wie Protonen oder 2,3-Bisphosphoglycerat (BPG) über einen sehr weiten Bereich angepasst werden können [Paoli & Nagai, 2004, Dickerson & Geiss, 1983]. BPG bindet bevorzugt an Hämoglobin in der deoxygenierten Konformation und stabilisiert diese. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen den Konformationen in Richtung der deoxygenierten Form. Bei Vögeln wird das BPG durch Inositolpentaphosphat (IPP) ersetzt, wobei der Mechanismus nahezu identisch ist [Zhang *et al.*, 1996]. Die kooperative Sauerstoffbindung kann mit dem MWC-Modell [MONOD *et al.*, 1965] nach Monod, Wyman und Changeux erklärt werden. Dabei werden zwei Zustände für das Protein angenommen: die Zustände T (Tense) ohne Ligand und R (Relaxed) mit gebundenem Ligand. Diese zwei Zustände wurden für diverse Hämoglobin-Moleküle beschrieben [Perutz, 1970, Baldwin & Chothia, 1979].

Später wurde für das beladene Hämoglobin eine dritte Quartärstruktur beschrieben, die mit R2 bezeichnet wird [Silva *et al.*, 1992]. Die räumlichen Veränderungen relativ zur bekannten R-Konformation sind von der selben Größenordnung wie die Veränderung zwischen den T- und R-Konformationen. Anfangs wurde vermutet, dass der R2-Zustand eine Zwischenstufe beim Übergang von T nach R darstellt, das heißt  $T \rightarrow R2 \rightarrow R$  [Silva *et al.*, 1992]. Später wurde postuliert, dass der R2-Zustand den Endpunkt des Übergangs darstellt, also  $T \rightarrow R \rightarrow R2$  [Schumacher *et al.*, 1997, Srinivasan & Rose, 1994]. Inzwischen wurden noch weitere Quartärstrukturen hinzugefügt, die im Abschnitt 6.3 näher beschrieben werden. Wie bereits angesprochen ist der molekulare Mechanismus des Konformationsübergangs beim Hämoglobin schon beschrieben worden [Perutz, 1970, Baldwin & Chothia, 1979]. Abbildung 1.2 zeigt diesen Konformationsübergang schematisch. Im Wesentlichen kommt es dabei zu einer Drehung von einem  $\alpha$ - $\beta$ -Dimer um circa  $15^\circ$  gegen das andere.

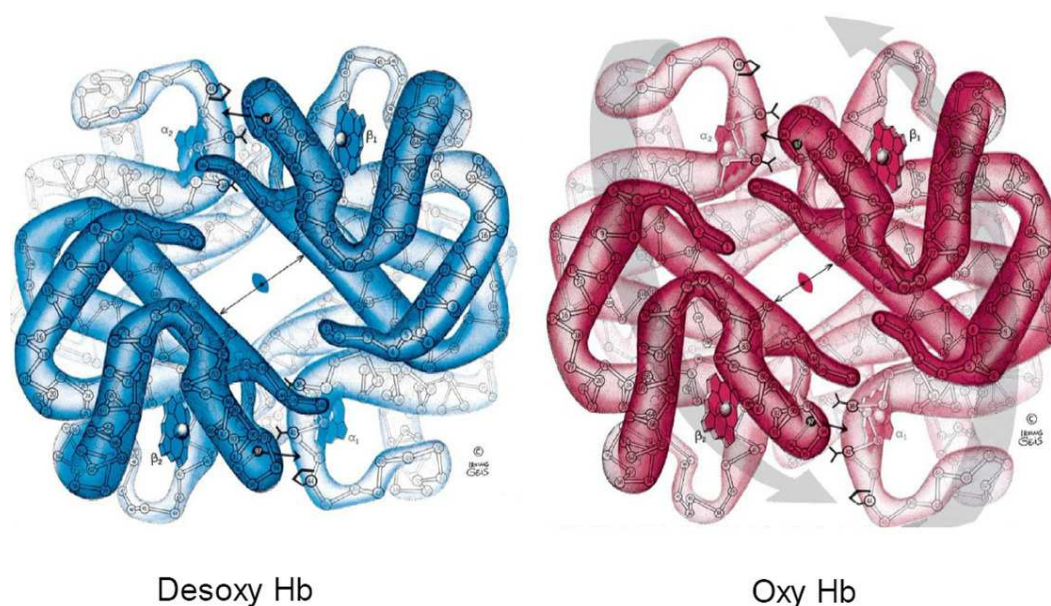


Abbildung 1.2: Konformationsübergang beim tetrameren Hämoglobin. Links ist der deoxygenierte, rechts der oxygenierte Zustand schematisch dargestellt. Der Konformationsübergang beruht im Wesentlichen aus einer Drehung eines  $\alpha$ - $\beta$ -Dimer gegenüber dem anderen. In dieser Zeichnung sind auch die sogenannten „Switch regions“ eingezeichnet, diese sind für die Stabilisierung der beiden Konformationen wichtig. Diese Abbildung wurde übernommen aus [Voet *et al.*, 2002].

Die Motivation bei der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturaufklärung war also nicht der Übergang an sich, sondern eine andere Eigenschaft des Vertebraten-Hämoglobins: die Höhenadaptation. Das Leben in der Höhe ist vorwiegend geprägt durch eine niedrige Sauerstoffverfügbarkeit. Vertebraten zeigen eine bemerkenswerte Fähigkeit sich an diese Begebenheit anzupassen. Es wurden dabei verschiedene Strategien entwickelt um die Auswirkungen der Sauerstoffknappheit zu verringern. Dazu gehören Strategien, die den gesamten Organismus einbeziehen, aber auch Strategien auf molekularer Ebene [Storz *et al.*, 2008, Weber, 2007, Winslow, 2007]. Dabei ist das Hämoglobin das wesentliche Ziel für die Adaptation auf einer molekularen Ebene.

Für die genetische Adaptation des Hämoglobin-Moleküls sind verschiedene Strategien bekannt. Das Hämoglobin der Neuweltkamele wie Lamas und Vikunjas, die in einer Höhe von bis zu 5000 m über dem Meeresspiegel leben, hat eine partiell degenerierte Bindungsstelle für den allosterischen Effektor BPG. Diese Degeneration wird ausgelöst durch eine Mutation von His2  $\rightarrow$  Asn auf der  $\beta$ -Kette, wodurch einer der 7 Kontakte zwischen dem BPG und dem Hämoglobin-Molekül entfernt wird. Durch die verringerte Bindung des BPG an das Hämoglobin erhöht sich effektiv die Sauerstoffaffinität des Transportproteins in der Zelle [Kleinschmidt *et al.*, 1986,



Piccinini *et al.*, 1990, Bauer *et al.*, 1980]. Ein anderes Beispiel zeigt die Streifengans, die auf einer Höhe von bis zu 9000 m fliegen kann. Das Hämoglobin dieser Gans zeigt eine Mutation an der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\beta 1$ . Diese Mutation erhöht die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, indem es die Spannung im Gesamtmolekül herabsetzt [Jessen *et al.*, 1991].

Eine ganz andere Strategie wird bei der Hirschmaus *Peromyscus maniculatus* verfolgt. In dem Blut dieser Tiere finden sich mehrere Hämoglobinvarianten mit verschiedenen Affinitäten. Die Anpassung erfolgt dann über die vermehrte Expression der Varianten mit der geforderten Affinität [Storz *et al.*, 2007].



Abbildung 1.3: Das Meerschweinchen *Cavia porcellus*. Das Meerschweinchen ist in den Anden beheimatet und wird als genetisch höhenadaptiert angesehen.

Das Meerschweinchen *Cavia porcellus* (Abbildung 1.3) ist in den Anden beheimatet und wird als genetisch höhenadaptiert angesehen. Diese Annahme beruht auf der Beschreibung einer erhöhten Sauerstoffaffinität seines Blutes und der Beobachtung, dass Meerschweinchen nur eine moderate Erythrozytose entwickeln, wenn sie einer chronischen Hypoxie ausgesetzt werden. Diese zwei Befunde gelten auch für Tiere, die auf Höhe des Meeresspiegels geboren und gezüchtet wurden [Turek *et al.*, 1980]. Das Blut eines Meerschweinchens hat typischerweise einen  $p_{50}$ -Wert von 25 Torr bei einem pH von 7.4 [Bard & Shapiro, 1979, Ostojic *et al.*, 2002, Rivera *et al.*, 1995]. Die Reaktion gegenüber dem Effektor BPG ist normal [Bunn, 1971]. Verglichen mit anderen Tieren vergleichbarer Größe und Lebensweise, wie Ratte, Spitzmaus, Igel oder Hirschmaus, die alle  $p_{50}$ -Werte um 36 Torr haben, ist die Sauerstoffaffinität des Meerschweinchen-Hämoglobins sehr hoch [Rivera *et al.*, 1995, Bartels *et al.*, 1969, Snyder *et al.*, 1988].

---

Das Blut von Meerschweinchen enthält eine Hämoglobin-Hauptkomponente und zwei Nebenkomponten, die allerdings nur in sehr geringen Mengen vorkommen [Braunitzer *et al.*, 1979]. Die Sequenz der Hauptkomponente des Hämoglobins ist bekannt [Braunitzer *et al.*, 1979]. Da bisher allerdings keine Kristallstruktur für das Hämoglobin des Meerschweinchens vorlag, konnte die erhöhte Sauerstoffaffinität nicht auf molekularer Ebene erklärt werden. Das Ziel dieses Projektes war deshalb die Bestimmung der Kristallstruktur der Hauptkomponente des Meerschweinchen-Hämoglobins, um anhand der Struktur beantworten zu können wie die erhöhte Sauerstoffaffinität des Moleküls zustande kommt.

### 1.3 Hämocyanin

Die deutlich größeren Hämocyanine sind die Sauerstofftransporter von vielen Mollusken wie auch Arthropoden. Im Gegensatz zu den Hämoglobinen der Vertebraten sind Hämocyanine extrazelluläre Atmungsproteine. Das Molekulargewicht der Hämocyanine kann zwischen 0.5 MDa und 9 MDa variieren. Diese sehr unterschiedlichen Massen gehen aus der stark schwankenden Anzahl der Untereinheiten von Tierart zu Tierart hervor. Jede funktionelle Einheit ist in der Lage ein Sauerstoffmolekül zu binden. Am aktiven Zentrum einer solchen Einheit befinden sich zwei Kupferatome, welche jeweils durch drei Histidine kovalent gebunden werden [Magnus *et al.*, 1994]. Proteine mit solchen aktiven Zentren nennt man Typ3 Kupferproteine. Weitere Typ3 Kupferproteine sind die Tyrosinasen und Catecholoxidasen [Koval *et al.*, 2006]. In Abbildung 1.4 ist das aktive Zentrum eines Typ3 Kupferproteins am Beispiel des Hämocyanins des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* schematisch dargestellt.

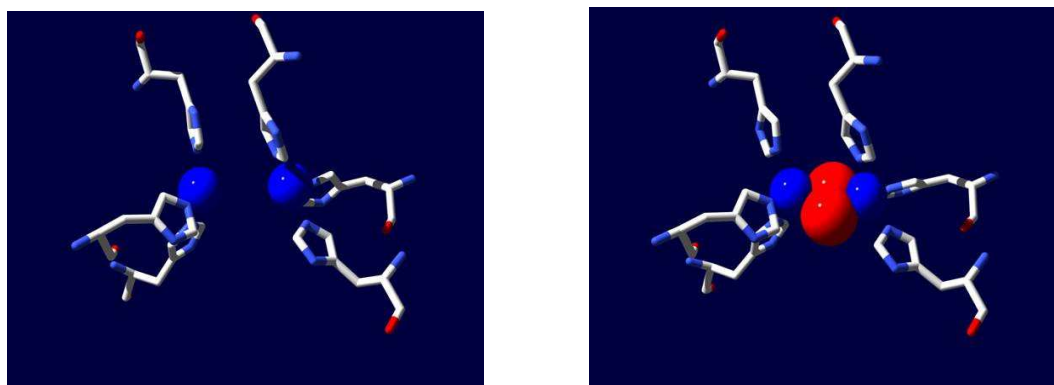


Abbildung 1.4: Aktives Zentrum eines Typ3 Kupferproteins; links ohne, rechts mit gebundenem O<sub>2</sub>-Molekül (Kristallstruktur 1lla und 1oxy). Zur Verfügung gestellt von Thorsten Schweikardt.

Bei Arthropoden-Hämocyaninen findet man Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von etwa 72 kDa (unter anderem in [Gaykema *et al.*, 1984, Markl, 1986]), die sich zunächst zu Hexameren zusammenlagern. Diese aggregieren zu ganzzahligen Vielfachen, so dass die Hämocyanine der Arthropoden als 6-mer, 2 × 6-mer, 4 × 6-mer, 6 × 6-mer oder auch 8 × 6-mer vorkommen.

Beim Mollusken-Hämocyanin hat die Untereinheit eine Masse von 350 bis 450 kDa. Diese Polypeptidkette faltet sich in 7 bis 8 verschiedene globuläre Domänen, die je ein Sauerstoffmolekül binden können [van Holde & Miller, 1995]. Je 10 dieser Ketten aggregieren in Form eines Zylinders mit 5-zähliger Rotationsymmetrie. Diese Decamere besitzen eine Masse von etwa 4 MDa. Bei Gastropoden kann es zur Bildung von Didecameren kommen, wie bei dem Hämocyanin der Schlüssellockschnecke *Megathura crenulata* (engl.: Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) [Orlova *et al.*, 1997], wobei die Halbmoleküle der Didecamere nicht strukturidentisch mit den Decameren der Cephalopoden sind.

Der besondere Aufbau aus mehreren funktionellen Untereinheiten ermöglicht eine hohe Kooperativität bei der Sauerstoffbindung von Hämocyaninen. Die zwei standardmäßig verwendeten Modelle für die Kooperativität, das bereits erwähnte MWC-Modell [MONOD *et al.*, 1965] nach Monod, Wyman und Changeux und das KNF-Modell [Koshland *et al.*, 1966] nach Koshland, Nemethy und Filmer können die Kooperativität bei großen Komplexen wie dem Hämocyanin nicht ausreichend genau beschreiben. Um die Sauerstoffbindungseigenschaften des Hämocyanins beschreiben zu können, wurde deshalb das sogenannte Nesting-Modell vorgeschlagen [Decker, 1986]. Bei diesem Modell werden den Hierarchien der verschiedenen Strukturelemente allosterische Gleichgewichte, wie  $L = \frac{T}{R}$  in Abbildung 1.5, zugeordnet.

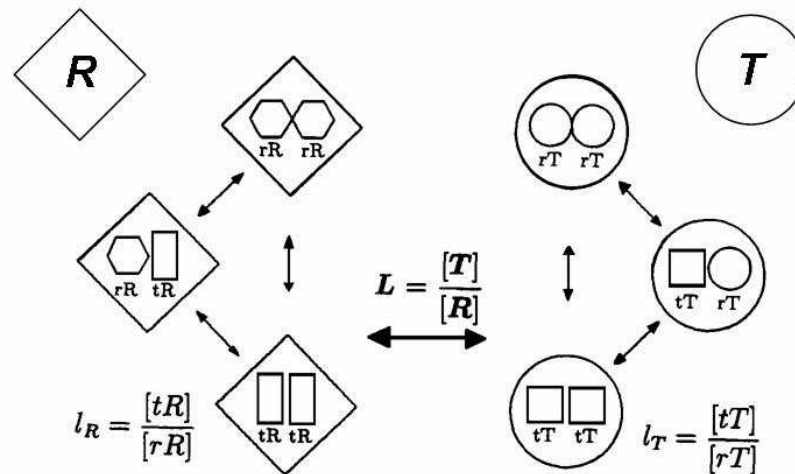


Abbildung 1.5: Darstellung der möglichen Zustände für die O<sub>2</sub>-Bindung des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* nach dem Nesting-Modell [Decker & Sterner, 1990]. Allosterische Gleichgewichte ( $L = \frac{T}{R}$ ) können durch Effektoren verschoben werden, die nicht am aktiven Zentrum binden.

In der genannten Abbildung 1.5 bezeichnet R den nieder-affinen und T den hoch-affinen Zustand. Es gibt für das Gesamtmolekül ein Gleichgewicht zwischen den zwei Zuständen R und T. Innerhalb dieser Zustände können die Halbmoleküle als kleinste identische Einheiten selbst zwei verschiedene Zustände einnehmen. Befindet sich das Gesamtmolekül zum Beispiel im Zustand R, so können die Halbmoleküle die Zustände rR oder tR einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass sich mit diesem Modell die Sauerstoffbindungseigenschaften für das Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* erklären lassen [Decker & Sterner, 1990].

Für das besagte Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* konnte schon gezeigt werden, dass die Kooperativität über eine Konformationsänderung des Moleküls während der Oxygenierung respektive Deoxygenierung realisiert ist [Decker *et al.*, 1996]. An dieser Änderung der Konformation sind alle Hierarchie-

Ebenen der Struktur beteiligt [Hartmann & Decker, 2002].

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von diesen großen Proteinkomplexen erweist sich jedoch als große Herausforderung. Die Standardmethode in der Strukturbiologie ist die Röntgenstrukturanalyse. Diese erfordert allerdings Proteinkristalle, deren Herstellung sehr schwierig sein kann.

Häufig wird als Alternative die Elektronenmikroskopie (EM) eingesetzt, bei der keine Kristalle benötigt werden. Allerdings ist es dabei extrem schwierig bei der Probenpräparation eine einzige Konformation sicher zu stellen [Cheng *et al.*, 2006]. Da bei den Bildern aus dem Elektronenmikroskop auch die Unterscheidung zwischen verschiedenen Konformationen schwierig ist, ist diese Methode zur Untersuchung von Konformationsübergängen nicht optimal geeignet. Außerdem ist im allgemeinen die erreichbare Auflösung im Vergleich zur Kristallographie kleiner.

Eine weitere Alternative zu diesen Methoden findet sich, sowohl für Arthropoden wie auch für Mollusken, in der Röntgenkleinwinkelstreuung (engl.: Small Angle X-ray Scattering, SAXS) [Hartmann & Decker, 2004, Hartmann *et al.*, 2004]. Das Protein wird dabei in wässriger Lösung untersucht. Dies ermöglicht es, das Protein unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen und damit Konformationsübergänge zu verfolgen [Svergun & Koch, 2002]. Ein weiterer Vorteil der Röntgenkleinwinkelstreuung gegenüber der Elektronenmikroskopie ist die Möglichkeit kleinere Moleküle zu untersuchen, dies ist bei der EM aufgrund des Kontrastes nicht ohne weiteres möglich [Adrian *et al.*, 1998]. Da die Proben in Lösung allerdings nicht geordnet sind, kann die Kleinwinkelstreuung nur eine eindimensionale Strukturinformation liefern. Um ein genaues Bild der Quartärstruktur eines Proteins zu gewinnen, reicht die Kleinwinkelstreuung alleine also nicht aus. Sie ist als komplementäre Methode zu den anderen vorgestellten Methoden zu sehen.

Bei der Untersuchung der Struktur von Hämocyaninen spielt der angesprochene Konformationsübergang zwischen dem T- und R-Zustand und somit die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Untereinheiten immer eine wichtige Rolle. Allerdings ist dies längst nicht der einzige Grund, weshalb diese Proteine so interessant sind. Neben ihrer Funktion als Sauerstoff-transportierende Moleküle werden diese Proteine auch für so variable Aufgaben gebraucht wie die Unterstützung des Immunsystems oder der Pigmentierung der Haut. Hämocyanine werden sogar in klinischen Anwendungen verwendet, wo sie als sogenannte „Hapten-Carrier“ eingesetzt werden. Um die Vielfältigkeit dieser Proteine zu verstehen ist deshalb die Kenntnis ihrer Struktur notwendig.

In der hier vorgestellten Arbeit wird die Struktur des Hämocyanins des in Abbildung 1.6 dargestellten Skorpions *Pandinus imperator* mittels Kristallographie untersucht. Dieses Hämocyanin wurde schon mittels Kleinwinkelstreuung [Pairet, 2007] und Elektronenmikroskopie [Cong *et al.*, 2009] untersucht. Der Informationsgehalt der resultierenden Modelle ist allerdings durch das Auflösungsvermögen der beiden Methoden begrenzt. Bei diesem speziellen Hämocyanin wurde die Aktivierung des Proteins zur Phenoloxidase mittels SDS beschrieben [Baird *et al.*, 2007]. Ein möglicher Mechanismus dieser Aktivierung wird in [Cong *et al.*, 2009] beschrieben.

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war deshalb die Bestimmung der Kris-



Abbildung 1.6: Der Kaiserskorpion *Pandinus imperator*. Das Hämocyanin dieses Skorpions wurde im Folgenden untersucht.

tallstruktur des Hämocyanins in einer möglichst nativen Konformation. Mit dieser Kristallstruktur können die bestehenden Modelle bestätigt werden, außerdem wird von der Kristallstruktur eine höhere Auflösung erwartet. Eine wichtige Fragestellung, die durch diese neue Struktur erarbeitet werden könnte, ist wie die Kooperativität im Hämocyanin von *Pandinus imperator* zustande kommt.

## 1.4 Überblick

Diese Arbeit behandelt zwei methodisch eng verwandte Themen, die aber inhaltlich voneinander abweichen. Deshalb werden die Ergebnisse dieser beiden Teilprojekte getrennt voneinander vorgestellt. Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über die Gliederung der Arbeit.

Im Kapitel 2 werden die physikalischen Grundlagen der Kristallstrukturanalyse erörtert. Das anschließende Kapitel 3 zeigt die verwendete Apparatur bei der Aufnahme der Streureflexe, die notwendigen vorbereitenden Messungen und erläutert die Datenanalyse. Im Anschluss daran werden im Kapitel 4 die verschiedenen Methoden für die Aufreinigung und Überprüfung der Proben vorgestellt. Die Ergebnisse werden anschließend getrennt präsentiert. Als erstes werden die Ergebnisse zum Hämoglobin des Meerschweinchens *Cavia porcellus* im Kapitel 5 vorgestellt und im folgenden Kapitel 6 diskutiert. Im Anschluss werden im Kapitel 7 die Ergebnisse zum Hämocyanin des Skorpions *Pandinus imperator* vorgestellt. Die Diskussion dieser Ergebnisse folgt im Kapitel 8.

## Kapitel 2

# Grundlagen der Kristallographie

Das Ziel der Röntgen-Kristallographie ist die Bestimmung der Struktur eines Moleküls aus der Streuung von Röntgenstrahlen. Die Strahlen werden an den Hüllenelektronen gestreut, so dass auf dem Detektor ein zur räumlichen Anordnung der Atome zueinander korrespondierendes Streubild entsteht. Der geringe Wirkungsquerschnitt für die Streuung von Röntgenstrahlen durch Elektronen ( $\sigma = 1.64 \cdot 10^{-23} \text{ mm}^2$  [Taylor, 2005]) verhindert die Untersuchung von einzelnen Molekülen. Es besteht deshalb die Notwendigkeit viele Moleküle gleichzeitig zu untersuchen.

Eine Realisierung ist zum Beispiel die Kleinwinkelstreuung, bei der das Licht an Molekülen gestreut wird, die in Flüssigkeit gelöst vorliegen. Dadurch werden aber gleichzeitig verschiedene Orientierungen erfasst, so dass das resultierende Streubild ein Mittel über alle Orientierungen ist. Es kann daraus eine Abstandsverteilungsfunktion gewonnen werden, an die ein Modell angepasst werden kann. Durch den geringen Informationsgehalt kann allerdings keine neue Struktur bestimmt werden.

Bei der Kristallographie soll eine einheitliche Orientierung gewährleistet werden, um diesen Informationsverlust zu verhindern. Deshalb nutzt man Proteinkristalle in der die Moleküle regelmäßig und in der gleichen Orientierung angeordnet sind. Dadurch sind die Streusignale der einzelnen Moleküle identisch und verschiedene Orientierungen können gezielt betrachtet werden. Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen der Röntgenkristallographie erläutert.

### 2.1 Kristallisation von Proteinen

Die erste Voraussetzung für die Kristallographie ist die Herstellung von Kristallen. Das Ziel ist die Herstellung möglichst makelloser Kristalle durch langsame Präzipitation des Proteins aus der Lösung. Obwohl dieser Schritt für die Strukturbestimmung entscheidend ist, ist dieser auch der am wenigsten untersuchte Prozess dieser Methode [Drenth, 1994]. Zwar hat das Interesse an der Proteinkristallisation zugenommen, was man zum Beispiel an aufwendigen Versuchen in der Mikrogravitation sieht [Littke & John, 1984, McPherson *et al.*, 1999]. Trotzdem ist der Prozess noch nicht vollständig verstanden. Die idealen Bedingungen für die Kristallisati-

on eines gegebenen Proteins sucht man noch durch systematisches Ausprobieren. In dieser Richtung gibt es zumindest schon Möglichkeiten das Suchen der idealen Bedingungen (screening) zeitlich effizienter zu machen, indem, wie am Hauptmann Woodward Institute in Buffalo (Vereinigte Staaten), sogenannte „High Throughput Screening“ Methoden angewendet werden [Luft *et al.*, 2003].

Die Kristallisation eines Proteins geschieht in den folgenden 3 Schritten:

1. Das Protein wird in eine passende Lösung überführt. Dabei ist das Fällungsmittel noch in einer Konzentration, die zu keiner Präzipitation führt.
2. Die Löslichkeit des Proteins wird so weit herabgesetzt bis es ausfällt. In diesem Schritt bilden sich kleine Aggregate, die Nukleationskeime genannt werden. Dieser Schritt geschieht bei einer hohen Übersättigung der Lösung.
3. Sobald die Nukleationskeime gebildet sind, beginnt das Kristallwachstum. Hierfür sollte die Übersättigung niedriger sein als im vorherigen Schritt, da sonst weitere Keime und damit vermehrt kleine Kristalle gebildet werden.

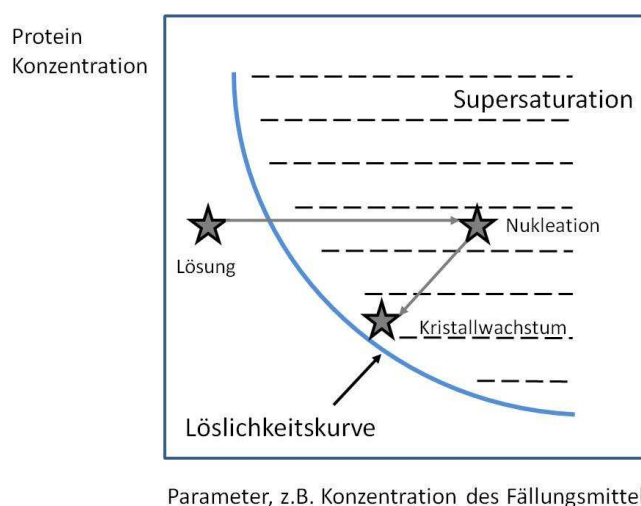


Abbildung 2.1: Löslichkeitskurve als Funktion der Fällungsmittelkonzentration oder eines ähnlichen Parameters. Die besten Ergebnisse liefert die Kristallisation, wenn während des Kristallwachstums die Übersättigung niedriger ist als es für die Bildung von Nukleationskeimen notwendig war.

Diese drei Schritte sind in Abbildung 2.1 zusammengefasst. Es gibt verschiedene Methoden um die Kristallisation im Labor zu realisieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Kristalle wurden alle über die sogenannte „Hanging drop“ Methode gewonnen. Die Methode ist ein Wasserdampfdiffusionsverfahren und wird in Abbildung 2.2 beschrieben.



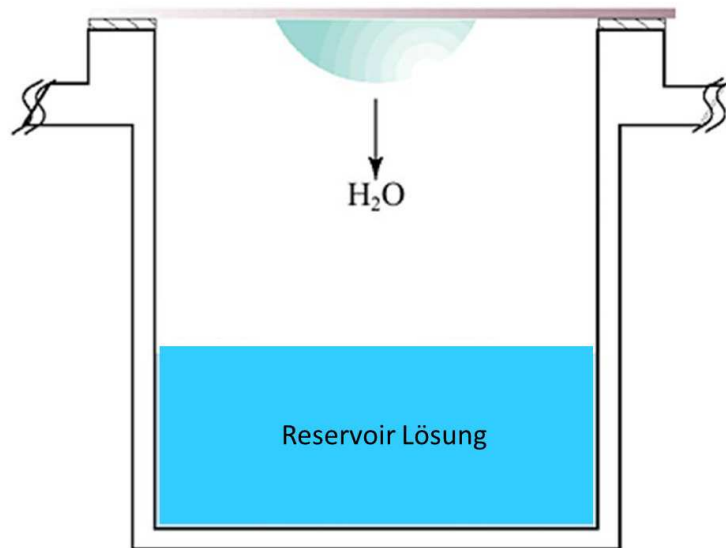


Abbildung 2.2: Das „Hanging drop“ Verfahren. Die Proteinlösung hängt am Deckglass über einer Reservörlösung. Die Konzentration des Fällungsmittels ist in der Reservörlösung anfangs doppelt so hoch wie im Tropfen. Durch Diffusion kommt es zum Austausch von Wasser zwischen dem Tropfen und der Reservörlösung und damit zu einer Veränderung der Konzentrationsverhältnisse im Tropfen.

Ein Tropfen der Proteinlösung wird auf ein Deckglass aufgebracht. Mit letzterem wird dann ein Reservoir der entsprechenden Präzipitationslösung verschlossen. Über Diffusion geht nun Wasser vom Tropfen in die Reservörlösung über. Die Übersättigung im Tropfen steigt also an bis sich die ersten Nukleationskeime bilden. Die daraus folgende Abnahme der Proteinkonzentration sorgt dann für eine geringere Übersättigung, in der das Kristallwachstum erfolgen kann.

## 2.2 Die Bragg'sche Gleichung

Um die Streuung von Röntgenstrahlen an einem Proteinkristall anschaulich zu verstehen, müssen erst die geometrischen Voraussetzungen für das Auftreten von Interferenzmaxima bei der Addition von Wellen beschrieben werden. Diese Voraussetzungen folgen aus der Bragg-Gleichung, die sich an Abbildung 2.3 herleiten lässt.

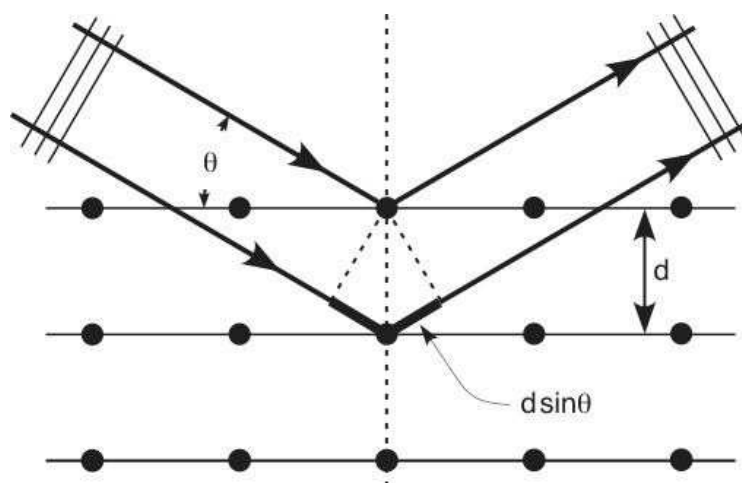


Abbildung 2.3: Die Bragg-Bedingung. Für das Auftreten eines Interferenzmaximums müssen sich die Phasen der beiden Wellen um ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge unterscheiden.

Der Wegunterschied zwischen den beiden Teilwellen beträgt  $2 \cdot d \cdot \sin \theta$ . Ein Interferenzmaximum ergibt sich nur dann, wenn die Phasendifferenz ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Bragg-Bedingung:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad (2.1)$$

Lässt man für diese Überlegung die Anzahl der Netzebenen unendlich werden, ist die Intensität nur in diesen Interferenzmaxima ungleich Null, da jede andere Phasenverschiebung  $\phi$  dazu führt, dass es im weiteren Verlauf Wellenzüge mit der Phasendifferenz  $n \cdot \phi$  gibt wobei  $n$  für jede Ebene verschieden ist. Dies führt bei einer hohen Anzahl an Netzebenen dazu, dass jede Phasendifferenz gleich häufig vertreten ist und somit zu destruktiver Interferenz. Ist die Bragg-Bedingung erfüllt, ist der Phasenunterschied  $n \cdot \lambda$ . Für weitere Ebenen ist dieser dann  $m \cdot n \cdot \lambda$  und ändert sich somit nicht. Die scharfen Intensitätsmaxima, die hierdurch entstehen werden Bragg-Reflexe genannt. Diese anschauliche Betrachtung lässt sich auch auf einen Proteinkristall übertragen.

Die Entstehung der Bragg-Reflexe lässt sich aber auch verstehen indem man die Streuung an einem Proteinkristall mathematisch nachvollzieht. Dies soll in Abschnitt

2.4 entwickelt werden. Vorher müssen aber zwei spezielle Koordinatensysteme definiert werden, die die mathematische Beschreibung der Streuung an einem Kristall erheblich erleichtern.

## 2.3 Gitterkoordinaten und das reziproke Gitter

Im Gitterkoordinatensystem dienen die Basisvektoren der Einheitszelle als Basisvektoren für das Koordinatensystem. Dies hat den Vorteil, dass Gittervektoren, also die Vektoren vom Ursprung einer Einheitszelle zum Ursprung einer anderen, sich darstellen lassen durch ganzzahlige Vielfache der Basisvektoren, d.h. es gilt immer

$$\vec{G} = u \cdot \vec{a} + v \cdot \vec{b} + w \cdot \vec{c} \quad (2.2)$$

wobei  $u$ ,  $v$  und  $w$  ganzzahlig sind. Ein beliebiges Atom  $j$  in einer gegebenen Einheitszelle mit dem Ortsvektor  $\vec{R}_j$  bezüglich des Ursprungs der Einheitszelle lässt sich dann in jeder Einheitszelle  $i$  wiederfinden mit  $\vec{r}_i = \vec{G}_i + \vec{R}_j$ . Dieses Koordinatensystem sorgt dann durch die ganzzahligen Komponenten des Gittervektors für eine vereinfachte Darstellung des Kristallgitters.

Einen Nachteil hat dieses Koordinatensystem allerdings, die Basisvektoren des Gitters müssen im allgemeinen nicht senkrecht aufeinander sein. Dadurch wird in diesem System das Skalarprodukt unhandlich. Bei einem rechtwinkligen Koordinatensystem gilt immer  $a_i \cdot a_j = \delta_{ij}$ , dadurch ist  $\vec{a} \cdot \vec{b} = a_1 b_1 + a_2 b_2 + c_1 c_2$ . Ist das Koordinatensystem nicht rechtwinklig kommen Kreuzterme hinzu.

Dieses Problem umgeht man, indem man ein zweites Koordinatensystem einführt: das „reziproke Gitter“. Die Basisvektoren des reziproken Gitters müssen nun so gewählt werden, dass das Skalarprodukt wieder die aus dem kartesischen Koordinatensystem bekannte Form annimmt. Ziel ist also ein Koordinatensystem mit den Basisvektoren  $\vec{a}_i^*$  zu finden, so dass gilt:

$$a_i^* \cdot a_j = \delta_{ij} \quad (2.3)$$

Dies wird erreicht durch die Definition der folgenden Basisvektoren:

$$\vec{a}^* = \frac{\vec{b} \times \vec{c}}{V_{ez}} \quad \vec{b}^* = \frac{\vec{c} \times \vec{a}}{V_{ez}} \quad \vec{c}^* = \frac{\vec{a} \times \vec{b}}{V_{ez}} \quad (2.4)$$

Der Nenner  $V_{ez}$  ist das Volumen der Einheitszelle. Aus diesen Definitionen folgt, dass jeder reziproke Gittervektor senkrecht auf zwei der Gittervektoren ist und damit die Gleichung 2.3 erfüllt. Beschreibt man also einen Vektor im Gitterkoordinatensystem und den anderen in den Koordinaten des reziproken Gitters, so nimmt das Skalarprodukt die aus den kartesischen Koordinaten bekannte Form an. Mit

$$\vec{G} = u \cdot \vec{a} + v \cdot \vec{b} + w \cdot \vec{c} \quad \text{und} \quad \vec{H} = h \cdot \vec{a}^* + k \cdot \vec{b}^* + l \cdot \vec{c}^*$$

ergibt sich das Skalarprodukt

$$\vec{G} \cdot \vec{H} = uh + vk + wl$$

## 2.4 Streuung an einem Proteinkristall

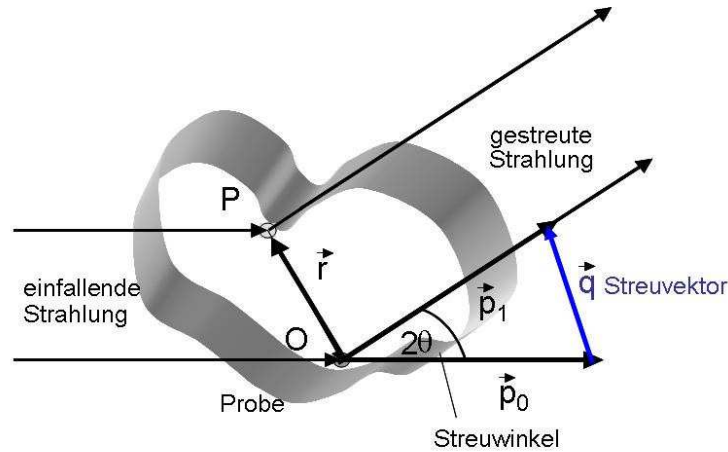


Abbildung 2.4: Streuung an zwei Streuzentren. Die Impulse der einfallenden bzw. reflektierten Welle sind  $\vec{p}_0$  und  $\vec{p}_1$ . Aus der Differenz der beiden Vektoren ergibt sich der Streuvektor  $\vec{q}$ .

Das Streubild eines Proteinkristalls beschreibt man am besten über die einzelnen Komponenten und überträgt das Ergebnis dann auf die übergeordneten Strukturen. Das Streubild eines einzelnen Atoms lässt sich über die Summe der Streuung der Elektronen beschreiben, oder aber durch das Integral über die Elektronendichte  $\rho(\vec{r})$ .

$$f = \int_{\vec{r}} \rho(\vec{r}) e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{H}} d\vec{r} \quad (2.5)$$

In Abbildung 2.4 sind der Ortsvektor  $\vec{r}$  und der sogenannte Impulsübertrag  $\vec{q} = \vec{p}_1 - \vec{p}_0$  beschrieben. Letzterer wird aus der Differenz der Wellenvektoren zwischen einfallender und gestreuter Welle berechnet. Handlicher ist allerdings die hier verwendete Beschreibung über die Differenz der Wellenvektoren:  $\vec{H} = \frac{\vec{q}}{h} = \frac{\vec{p}_1}{h} - \frac{\vec{p}_0}{h} = \vec{k}_1 - \vec{k}_0$ . Im Weiteren wird für ein Atom eine radial symmetrische Elektronendichteverteilung angenommen. Damit ist die Streuung auch radial symmetrisch bezüglich des Röntgenstrahls und es gilt  $\vec{F}(\vec{q}) = \vec{F}(|\vec{H}|)$ , mit  $|\vec{H}| = H = 2 \cdot \sin \theta$ . Es gilt insbesondere  $\rho(\vec{R}) = \rho(-\vec{R})$ , weshalb Gleichung 2.5 umgeschrieben werden kann zu

$$\begin{aligned} F(H) &= \int_{\vec{r}} \rho(\vec{r}) (e^{2\pi i \vec{r} \cdot \vec{H}} + e^{-2\pi i \vec{r} \cdot \vec{H}}) d\vec{r} \\ &= \int_{\vec{r}} \rho(\vec{r}) \cdot \cos(2\pi \vec{r} \cdot \vec{H}) d\vec{r} \end{aligned}$$

Mit dieser Gleichung lässt sich nun  $F$  für ein gegebenes Atom in Abhängigkeit des Streuwinkels berechnen.  $F$  ist dabei eine positive reelle Zahl. Diese sogenannten

Atomformfaktoren sind für alle Atome als Funktion von  $H$  tabelliert. Die Formfaktoren können also in den folgenden Betrachtungen als gegeben betrachtet werden.

Der nächste Schritt ist dann die Betrachtung eines Moleküls, das aus  $N$  Atomen besteht. Hier ergibt sich der Strukturfaktor aus der Addition der Streuwellen der einzelnen Atome.

$$\mathbf{F}(\vec{H}) = \sum_{j=1}^N f_j \cdot e^{2\pi i \vec{H} \vec{r}_j} \quad (2.6)$$

Hier ist  $N$  die Zahl der Atome,  $f_j$  der Atomformfaktor und  $\vec{r}_j$  der Ortsvektor vom Atom  $j$ . Beim Übergang zum Kristall ist die einzige Änderung, dass dieses Molekül mehrfach vorliegt. Die Beschreibung im Kristall ist also analog, die Streuwellen der einzelnen Einheitszellen müssen nur aufaddiert werden. Hierbei ist zu beachten, dass jede Einheitszelle gegenüber dem Ursprung um einen Gittervektor  $\vec{G}_n$  verschoben ist. Man ersetzt also in Gleichung 2.6  $\vec{r}_j$  durch  $(\vec{r}_j + \vec{G}_n)$  und es ergibt sich für die Einheitszelle  $n$  mit dem Ursprung  $\vec{G}_n$  die folgende Streuamplitude.

$$\begin{aligned} \mathbf{F}^n(\vec{H}) &= \sum_{j=1}^N f_j(H) \cdot e^{2\pi i \vec{H}(\vec{r}_j + \vec{G}_n)} \\ &= \sum_{j=1}^N f_j(H) \cdot e^{2\pi i \vec{H} \vec{r}_j} \cdot e^{2\pi i \vec{H} \vec{G}_n} \\ &= \mathbf{F}(\vec{H}) \cdot e^{2\pi i \vec{H} \vec{G}_n} \end{aligned}$$

Der Strukturfaktor wird gegenüber der am Ursprung liegenden Einheitszelle also nur mit einem Phasenfaktor  $P_n = e^{2\pi i \vec{H} \vec{G}_n}$  multipliziert. Die Streuamplitude des gesamten Kristalls  $\mathbf{F}^K$  ergibt sich daraus durch die Summe über alle Einheitszellen  $n$ .

$$\begin{aligned} \mathbf{F}^K(\vec{H}) &= \sum_{n=1}^N \mathbf{F}^n(\vec{H}) \\ &= \sum_{n=1}^N \mathbf{F}(\vec{H}) \cdot e^{2\pi i \vec{H} \vec{G}_n} \\ &= \mathbf{F}(\vec{H}) \cdot \sum_{n=1}^N e^{2\pi i \vec{H} \vec{G}_n} \\ &= \mathbf{F}(\vec{H}) \cdot \mathbf{GF}(\vec{H}) \end{aligned}$$

Hier hat man den Gitterfaktor  $\mathbf{GF}(\vec{H}) = \sum_{n=1}^N e^{2\pi i \vec{H} \vec{G}_n}$  eingeführt. Nun lässt sich, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben der Gittervektor  $\vec{G}_n$  im Gitterkoordinatensystem

als ganzzahlige Linearkombination der Basisvektoren schreiben  $\vec{G}_n = u \cdot \vec{a} + v \cdot \vec{b} + w \cdot \vec{c}$ . Der Streuvektor  $\vec{H}$  seinerseits lässt sich als Linearkombination der Basisvektoren des reziproken Gitters beschreiben.

$$\begin{aligned}
\mathbf{GF}(\vec{H}) &= \sum_{n=1}^N e^{2\pi i \vec{H} \vec{G}_n} \\
&= \sum_{u,v,w} e^{2\pi i (h \cdot \vec{a}^* + k \cdot \vec{b}^* + l \cdot \vec{c}^*) \cdot (u \cdot \vec{a} + v \cdot \vec{b} + w \cdot \vec{c})} \\
&= \sum_{u,v,w} e^{2\pi i \cdot (hu + kv + lw)} \\
&= \sum_u e^{2\pi i \cdot (hu)} \cdot \sum_v e^{2\pi i \cdot (kv)} \cdot \sum_w e^{2\pi i \cdot (lw)} \\
&= \mathbf{A}_1(h) \cdot \mathbf{A}_2(k) \cdot \mathbf{A}_3(l)
\end{aligned}$$

Für  $N \rightarrow \infty$  kann man jetzt zeigen, dass der Gitterfaktor  $\mathbf{GF}$  nur für ganzzahlige Vielfache von  $h$ ,  $k$  und  $l$  von Null verschieden ist. Daraus folgt, dass die Streuamplitude des Kristalls nur in speziellen Richtungen von Null verschieden ist. In diesen Richtungen liegen also die in Abschnitt 2.2 erwähnten Bragg-Reflexe.

Die Streuamplitude des beschriebenen idealen Kristalls gibt also die Streuamplitude der Einheitszelle wieder, allerdings wird diese in den Bragg-Reflexen verstärkt, sonst ausgelöscht. Eine schematische Darstellung dieses Zusammenhangs findet sich in Abbildung 2.5. Fasst man nun die letzten beiden Gleichungen zusammen, so kann der Strukturfaktor beschrieben werden durch

$$\mathbf{F}_{h,k,l} = \sum_{j=1}^N f_j(H) \cdot e^{2\pi i \vec{H} \vec{R}_j} = \sum_{j=1}^N f_j(H) \cdot e^{2\pi i \cdot (hx_j + ky_j + lz_j)} \quad (2.7)$$

$N$  ist die Zahl der Atome in der Einheitszelle,  $f_j(H)$  der Atomformfaktor,  $\vec{H} = (h, k, l)$  der reziproke Gittervektor und  $\vec{R}_j$  der Koordinaten des Atoms  $j$  mit den Gittervektoren  $\vec{a}, \vec{b}, \vec{c}$  als Basis. Analog zur Gleichung 2.5 kann der Strukturfaktor auch aus der Elektronendichte berechnet werden.

$$\mathbf{F}_{h,k,l} = \int_0^1 \int_0^1 \int_0^1 \rho(x, y, z) \cdot e^{2\pi i \cdot (hx_j + ky_j + lz_j)} dx dy dz \quad (2.8)$$

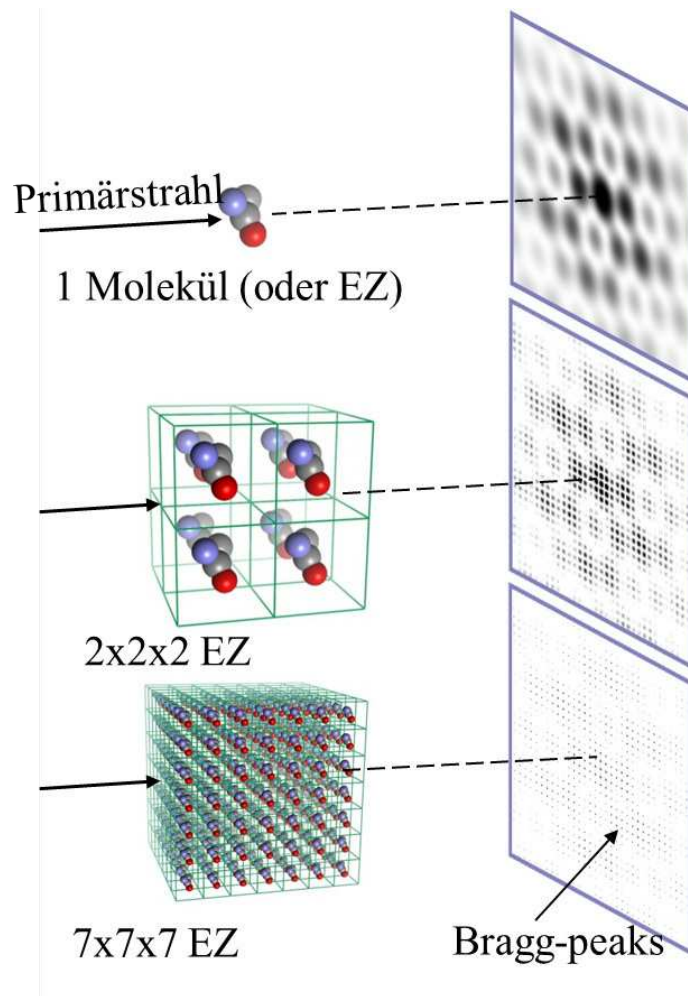


Abbildung 2.5: Streuung am einzelnen Molekül und am Molekülkristall. Mit steigender Zahl der Einheitszellen konzentriert sich das Signal mehr und mehr in den Bragg-Reflexen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Hermann Hartmann.

## 2.5 Die Ewald Kugel

Im letzten Kapitel (Kap. 2.4) wurde gezeigt, dass ein Kristall nur in Richtungen streut, für die der Streuvektor  $\vec{H}$  ganzzahlige Komponenten  $h, k, l$  hat. Diese ganzzahligen Komponenten werden auch Miller'sche Indizes genannt. Wie in Abbildung 2.4 gezeigt wurde, halbiert der Streuvektor  $\vec{H}$  den Winkel zwischen einfallender und reflektierter Welle. Damit lässt sich der Streuvorgang als Teilreflexion des Primärstrahls an einer Netzebenenschar mit dem Normalenvektor  $\vec{H}$  betrachten. Hierbei legt  $\vec{H}$  nicht nur die Orientierung der Netzebene fest, sondern über seine reziproke Länge auch den Abstand der Ebenen innerhalb einer Netzebenenschar an der die Reflexion stattfindet. Mit der in Abschnitt 2.2 eingeführte Bragg-Bedingung (Gleichung 2.1) lässt sich das leicht zeigen, mit

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad \text{und} \quad H = |\vec{H}| = \frac{2}{\lambda} \cdot \sin \theta \quad (2.9)$$

folgt:

$$n = d \cdot H \quad (2.10)$$

Aus dieser Überlegung geht aber auch hervor, dass ein Bragg-Reflex zu einem gegebenen Triplet  $h, k, l$  nur dann entsteht, wenn die Orientierung des Kristalls bezüglich des Primärstrahls stimmt. Der Kristall muss also gegenüber dem Primärstrahl gedreht werden, damit eine gegebene Netzebenenschar das Bragg'sche Gesetz erfüllt. Eine anschauliche Darstellung für diesen Zusammenhang liefert die so genannte Ewald Kugel.

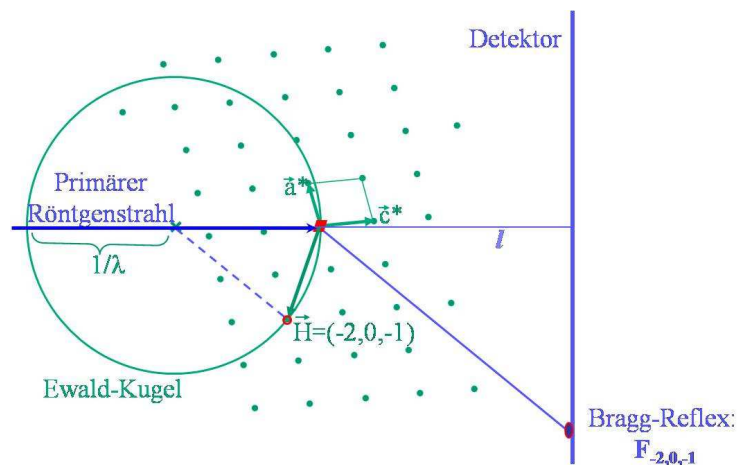


Abbildung 2.6: Ewald-Konstruktion. Nur wenn ein reziproker Gittervektor  $\vec{H}$  auf der Kugeloberfläche liegt ist die Bragg-Bedingung für diese Netzebenenschar erfüllt. Die Verbindungslinie von der Mitte der Kugel zum Gitterpunkt gibt die Richtung des Reflexes vor. Zur Verfügung gestellt durch Hermann Hartmann.



Diese Konstruktion wird in Abbildung 2.6 erläutert. Anschaulich wird in das reziproke Gitter eine Kugel mit Radius  $1/\lambda$  gelegt, wobei der Ursprung des Gitters auf der Kugeloberfläche liegt. Außerdem werden die Richtung des Primärstrahls und der Detektor wie in der reellen experimentellen Anordnung eingezeichnet. Der Kristall liegt in dieser Darstellung am Ursprung des reziproken Gitters. Nun ist für jeden reziproken Gittervektor  $\vec{H}$  auf der Kugeloberfläche das Bragg'sche Gesetz erfüllt. Die Richtung des Reflexes ist durch die Verbindungslinie vom Mittelpunkt der Kugel zum reziproken Gitterpunkt gegeben. Während einer Messung wird der Kristall und damit das reziproke Gitter gedreht, damit werden verschiedene Gitterpunkte durch die Kugeloberfläche gehen.

## 2.6 Berechnung der Elektronendichte

Um eine Proteinstruktur lösen zu können ist aber nicht der Strukturfaktor, sondern die Elektronendichte der Einheitszelle notwendig. Wie die Gleichung 2.8 zeigt, geht  $\mathbf{F}(h, k, l)$  aus einer Fouriertransformation von  $\rho(x, y, z)$  hervor. Die Umkehr über die Rücktransformation muss dann aber auch gelten.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V_{EZ}} \sum_{h,k,l} \mathbf{F}(h, k, l) \cdot e^{-2\pi i \cdot (hx+ky+lz)} \quad (2.11)$$

Dabei ist der Strukturfaktor  $\mathbf{F}_{h,k,l}$  komplex, er besteht also aus Betrag und Phase:  $\mathbf{F}_{h,k,l} = F_{h,k,l} \cdot e^{i\phi_{h,k,l}}$ . Da im Experiment nur die Intensitäten jeden Reflexes gemessen werden können, fehlt diese Phase. Um die inverse Fouriertransformation durchzuführen ist diese aber notwendig. Dies wird als das Phasenproblem der Kristallographie bezeichnet. Es gibt verschiedene Methoden um die benötigten Phasen zu bekommen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das sogenannte „Molecular Replacement“ verwendet. Dieses wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

## 2.7 Lösen des Phasenproblems durch Molecular Replacement

Beim Molecular Replacement nutzt man die Phasen eines zweiten, bekannten Moleküls (das sogenannte Testmolekül), mit möglichst hoher Homologie zur Zielstruktur. Jedem gemessenen  $F_{h,k,l}$  wird dann mit dem Testmolekül eine Phase  $\phi_{h,k,l}$  zugeordnet und daraus die Elektronendichte berechnet. Der entscheidende Punkt hierbei ist die in Abbildung 2.7 skizzierte Positionierung und Orientierung des Testmoleküls in der Einheitszelle. Als Maß für die Richtigkeit dieser Parameter dient die Übereinstimmung der für das Testmolekül berechneten Strukturfaktoren mit den gemessenen Strukturfaktoren.

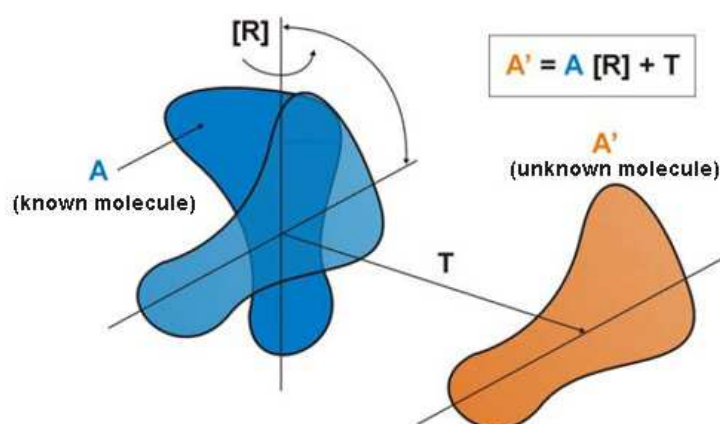


Abbildung 2.7: Die Methode des Molecular Replacement. Entscheidend ist die richtige Orientierung und Positionierung des Testmoleküls in der Einheitszelle.  $R$  ist die Rotations-,  $T$  die Translationsmatrix.

Theoretisch wäre eine Suche nach der besten Übereinstimmung über den gesamten Parameterraum denkbar. Es ergeben sich allerdings 3 Translations- und 3 Rotationsparameter, was zu so hohen Rechenzeiten führt, dass dieses Vorgehen nicht praktikabel ist. Stattdessen macht man sich die Patterson-Funktion zu nutze, um das 6-parametrische Problem in zwei unabhängige 3-parametrische überzuführen. Die Patterson-Funktion ist gegeben als

$$P(\vec{u}) = \int_V \rho(\vec{x})\rho(\vec{x} + \vec{u})d\vec{x} \quad (2.12)$$

Vektoren zwischen Atomen in der Struktur erscheinen also mit der Patterson-Funktion als Vektoren vom Ursprung zu Dichtemaxima in der Karte. Für das Molecular Replacement ist dabei von besonderem Interesse, dass in dieser Darstellung Atompaare innerhalb eines Moleküls zu Vektoren führen, die ihren Endpunkt nahe am Ursprung haben. Ohne intermolekulare Vektoren wäre diese Region nahe am Ursprung sogar bis auf eine Rotation für ein gegebenes Molekül unabhängig von seiner Position immer gleich. Bei homologen Molekülen ist sie zumindest ähnlich. Damit lässt sich aus

diesen Vektoren die Rotation zwischen Zielstruktur und Teststruktur bestimmen. Die Translation kann dann aus den intermolekularen Patterson-Vektoren bestimmt werden. Durch diese Aufteilung bleibt der Rechenaufwand in einem vertretbaren Rahmen.

## 2.8 R-Werte in der Kristallographie

An vielen Stellen in der Kristallographie treten  $R$ -Werte als Gütekriterien auf. Diese sollen im Folgenden kurz erläutert werden. Grundsätzlich gibt es zwei „Varianten“ des Kristallographischen  $R$ -Faktors. Der  $R_{merged}$  oder  $R_{sym}$ <sup>1</sup> gibt Auskunft über die Güte der primären Streudaten und bezieht sich auf die gemessenen Intensitäten. Der „eigentliche“  $R$ -Faktor bewertet die Übereinstimmung der aus dem Modell gerechneten mit den observierten Struktur Faktoren.

Erst soll hier auf  $R_{merged}$  eingegangen werden. Dieser Wert berechnet sich aus Mehrfachmessungen von gleichen oder symmetrieäquivalenten Reflexen. Es sei  $I_{k,i}$  die  $i$ -te Intensitätsmessung von Reflex  $k$ ,  $\bar{I}_k$  der Mittelwert aller Messungen des selben Reflexes  $k$ . Dann ist  $R_{merged}$  definiert durch

$$R_{merged} = \frac{\sum_k \sum_i |\bar{I}_k - I_{k,i}|}{\sum_k \sum_i I_{k,i}} \quad (2.13)$$

Die in dieser Arbeit verwendete Software für die Datenreduktion, XDS [Kabsch, 1988] verwendet noch eine weitere Definition zur Validierung der Daten, genannt  $R_{meas}$ . In der Praxis zeigt sich, dass  $R_{merged}$  von der Multiplizität der Messungen abhängt.  $R_{meas}$  führt einen zusätzlichen Korrekturfaktor ein, um diesen Effekt auszugleichen [Diederichs & Karplus, 1997].

$$R_{meas} = \frac{\sum_k \sqrt{\frac{n_k}{n_k-1}} \sum_i |\bar{I}_k - I_{k,i}|}{\sum_k \sum_i I_{k,i}} \quad (2.14)$$

Die Zahl  $n_k$  gibt dabei die Multiplizität des Reflexes wieder. Es gibt noch weitere abgewandelte Formen des  $R$ -Faktors, die die Qualität des Datensatzes beschreiben, im folgenden soll sich aber immer nur auf  $R_{merged}$  und  $R_{meas}$  bezogen werden.

Der zweite  $R$ -Faktor auf den sich im weiteren Verlauf bezogen wird gibt die „Nicht-Übereinstimmung“ zwischen den gemessenen und den aus dem Modell berechneten Struktur Faktoren an. Dieser ist definiert als

$$R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum F_{obs}} \quad (2.15)$$

Zusätzlich wird meistens parallel zum  $R$ -Faktor ein zweiter Wert  $R_{free}$  angegeben. Dieser ist genauso definiert wie der zuletzt beschriebene  $R$ -Wert, allerdings

<sup>1</sup>Diese werden manchmal auch schlicht mit  $R$  bezeichnet.

---

wird dabei nur über spezielle Reflexe summiert. Diese Reflexe werden aus dem vorhergehenden Refinement der Struktur ausgeschlossen. Meistens werden hierfür 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt. Dies soll dazu führen, dass ein Überfitten der Daten durch eine große Diskrepanz zwischen den beiden Faktoren erkannt werden kann [Brünger, 1992].

# Kapitel 3

## Experimenteller Aufbau

### 3.1 Prinzipieller Aufbau eines Streuexperimentes

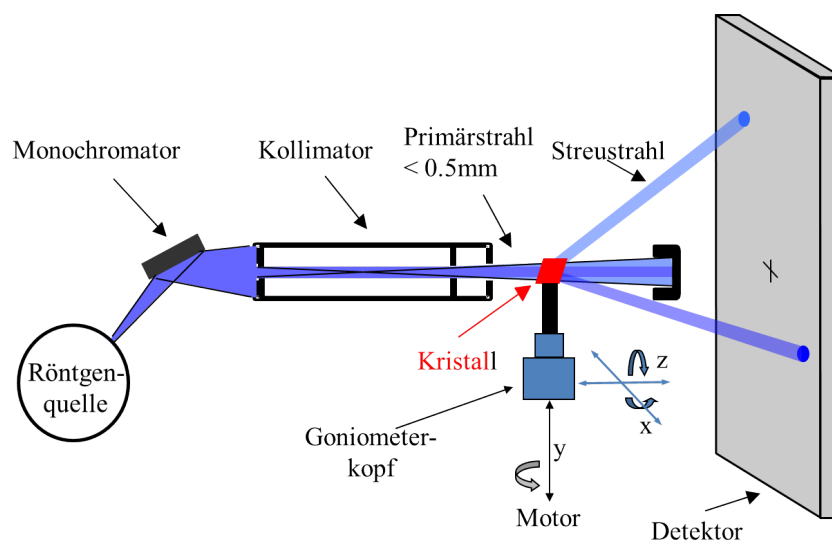


Abbildung 3.1: Prinzip eines Streuexperimentes. Diese Schemazeichnung zeigt die Bestandteile des experimentellen Aufbaus. Benötigt werden: Röntgenquelle, Monochromator, Kollimationssystem, eine drehbare Halterung für den Kristall, Primärstrahlfänger und Detektor.

Die Abbildung 3.1 erklärt den prinzipiellen Aufbau des Streuexperimentes. Benötigt werden eine Quelle für Röntgenstrahlung, ein Monochromator um die gewünschte Wellenlänge einzustellen, die Kollimationsoptik zur Fokussierung des monochromatischen Strahls bevor dieser auf die drehbar gelagerte Probe trifft und schließlich ein Detektor, der die Streueignisse registriert. Der Primärstrahlfänger sorgt dafür, dass der Detektor nicht durch die starke Intensität des Primärstrahls beschädigt wird. Im Folgenden wird der am Institut für Molekulare Biophysik ver-

wendete Aufbau vorgestellt.

## 3.2 Verwendete Apparatur

Die Messungen wurden durchgeführt an einer „Microstar Rotating Anode Generator“ Anlage von Bruker AXS, Karlsruhe. Die Drehanode kann mit einer Leistung von bis zu 2,7 kW (45 kV, 60 mA) betrieben werden. Die Abbildung 3.2 (A) und (B) zeigen die gesamte Anlage. In den Abbildungen 3.2 (C) und (D) wird die Probeumgebung hervorgehoben. Für die Monochromatisierung und Kollimation verwendet die Anlage ein Vielschichten-Spiegel-System („Montel 200 Optics“) der gleichen Firma.

Für Tieftemperaturmessungen wurde ein „Cryostream“-System von Oxford cryosystems, Oxford, Großbritannien verwendet. Dieses hält den Kristall konstant auf einer voreingestellten Temperatur. Dazu wird flüssiger Stickstoff über ein Zwei-Wege-System erst verdampft und dann wieder gekühlt, um dann über einen Gasstrom den Kristall zu kühlen. Um Eisbildung zu vermeiden wird dieser Gasstrom durch einen Trockenluftstrom mit gleichem Fluss gegen die Raumluft abgeschirmt<sup>1</sup> (AD41 dry air unit, ebenfalls Oxford cryosystems). Das Nachfüllen des Stickstoffbehälters musste im Dauerbetrieb circa alle 70 h erfolgen, konnte allerdings ohne Beeinträchtigung während der Messung durchgeführt werden. Der Nachweis der gestreuten Röntgenstrahlung erfolgte über einen „mar345“ Imaging-Plate-Detektor der Firma MARresearch, Norderstedt, Deutschland.

---

<sup>1</sup>Das Wasser aus der Raumluft würde gefrieren und mit dem Gasstrahl auf die Probe treffen. Bei abweichenden Flussraten zwischen  $N_2$  und Trockenluft würde turbulente Strömung auftreten, die Raumluft in den Gasstrahl bringen würde.

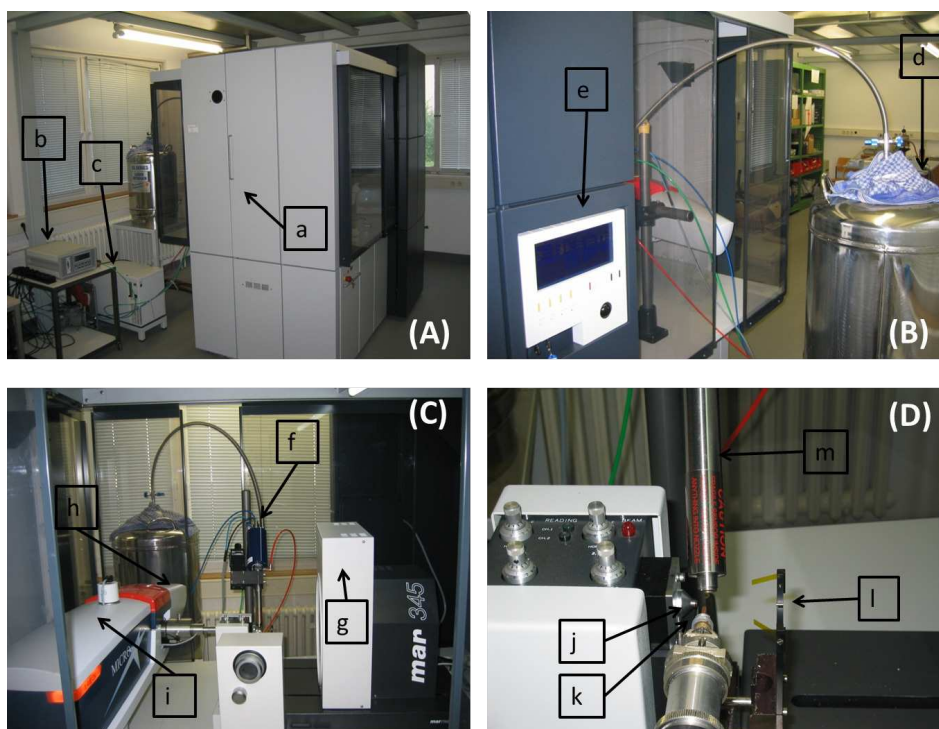


Abbildung 3.2: Microstar Rotating Anode Generator. (A): Gesamtansicht der Anlage, in (a) ist die Microstar Anlage untergebracht, (b) ist die Steuerungseinheit für den Cryostream, (c) die „dry air unit“; (B): Ansicht von der gegenüberliegenden Seite, (d) ist der  $N_2$ -Behälter, (e) die Steuerungseinheit der Microstar Anlage; (C): Innenansicht im Überblick, (f) ist die Cryogun, (g) der Detektor, (h) und (i) zeigen auf die Positionen der Glühkathode bzw. der Drehanode innerhalb des Gehäuses; (D) Vergrößerung auf die Probenumgebung, (j) ist das Austrittsfenster für die Röntgenstrahlung und (k) der Goniometerkopf auf dem die Probe befestigt wird. Die Marke (l) zeigt das Endstück der Cryostream-Anlage und (m) den Primärstrahlblocker.

### 3.3 Probenvorbereitung

Mit der hier verwendeten Anlage haben wir die Möglichkeit, Messungen sowohl bei Raumtemperatur als auch unter Kryo-Bedingungen durchzuführen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Datensätze wurden ausschließlich unter Kryo-Bedingungen gemessen. Durch die Kryo-Kristallographie lassen sich unter anderem Strahlenschäden an der Probe reduzieren [Garman & Owen, 2006]. Allerdings können beim Einfrieren der Kristalle Schäden durch das eingeschlossene Wasser entstehen. Deshalb wird versucht den Kristall so einzufrieren, dass sich amorphes Eis bildet. Dieses dehnt sich nicht so stark aus, so dass die Schäden beim Einfrieren geringer sind. Außerdem produziert es durch die Unordnung eine geringere Hintergrundstreuung als kristallines Eis. Um diesen amorphen Zustand zu erreichen muss der Einfrierprozess möglichst schnell sein. Man spricht von „flash freezing“. Lässt sich das Einfrieren nicht schnell genug durchführen, behilft man sich durch die Zugabe von Gefrierschutzmitteln, die den Gefrierpunkt herabsetzen. Dadurch kann auch ein Kristall in flüssigem Stickstoff oder direkt im Gasstrahl der Cryogun so eingefroren werden, dass amorphes Eis entsteht. Als Gefrierschutzmittel wurden in dieser Arbeit Glycerin und PEG verwendet. Diese können entweder bei der Kristallisation zugegeben werden oder nachträglich beim sogenannten „Soaking“-Verfahren gegen Wasser ausgetauscht werden [Heras & Martin, 2005].

Die beschriebenen Messungen wurden mit nachträglichem Soaking in 25 % Glycerin durchgeführt. Dazu wurde das Deckglass von der 24-well Platte entfernt und die Kristalle unter dem Mikroskop in Kryo-Loops (Hampton Research, Aliso Viejo, Vereinigte Staaten) aufgenommen. Anschließend wurden die Kristalle kurz durch die Glycerinlösung gezogen und dann direkt im Strahl eingefroren. Die Kryo-Datensätze wurden immer bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt.

### 3.4 Durchführung der Messungen

Vor Beginn der Messungen wurde die Anlage graduell auf die Betriebswerte hochgefahren. Die meisten Messungen wurden bei einer Leistung von 2,1 KW (45 kV, 50 mA) durchgeführt. Anschließend wurde die Anlage nachjustiert, um eine maximale Strahlintensität sicherzustellen. Nachdem diese Einstellungen abgeschlossen waren, wurde der sich im Kryo-Loop befindliche Kristall mit Hilfe der Einstellschrauben am Goniometerkopf auf den Strahl justiert.

Zuerst wurde dann eine kurze Testmessung durchgeführt um die Qualität und die Auflösung des Kristalls abzuschätzen. Abhängig von dieser Messung wurde dann beschlossen, ob und mit welchem Detektorabstand die Messung fortgeführt werden sollte. Bei dem gewählten Abstand wurden anschließend weitere kurze Messungen durchgeführt um den idealen Abstand des Primärstrahlblockers und die Schrittweite für die Rotation  $\varphi$  festzulegen.

Nach Abschluß dieser vorbereitenden Messungen wurden dann die Datensätze aufgenommen. Für die Aufnahme eines Datensatzes müssen in der verwendeten



Steuerungssoftware „Mar345“ von MARresearch folgende Parameter vorgegeben werden:

- Anzahl der Bilder. Es wurde immer versucht einen Datensatz über die kompletten  $360^\circ$  zu messen, da a priori nichts über die Symmetrie bekannt ist.
- Detektorabstand. Dieser lässt sich von 100 mm bis 430 mm einstellen.
- Belichtungszeit pro Bild, abhängig von der Streuintensität des Kristalls. Belichtungszeiten über 1 h sind wenig sinnvoll, da es dann zu einem spontanen Zerfall der angeregten Zustände der „Imaging Plate“ kommt, wodurch die Intensität abschwächt wird. Die Lebensdauer der angeregten Zustände liegt bei dem hier verwendeten Detektor bei circa 45 Minuten.
- Auflösung des Detektors. Hier wurden meistens  $2300 \times 2300$  Pixel verwendet.
- Drehung des Kristalls pro Bild ( $\delta\varphi$ ). Abhängig von der erwarteten Mosaizität des Kristalls. Hier wurden Werte zwischen  $0,5^\circ$  pro Bild und  $1,5^\circ$  pro Bild verwendet.

Die Auswertung der Messung kann zu jedem Zeitpunkt online erfolgen, so dass eine falsche Wahl eines Parameters früh erkannt und korrigiert werden kann.

## 3.5 Datenanalyse

### 3.5.1 Datenreduktion

Unter Datenreduktion versteht man die Umwandlung des aufgenommenen Datensatzes, welcher aus einer Folge von einzelnen Aufnahmen besteht, zu einer Auflistung der Intensitäten für die einzelnen Reflexe. Dieser Schritt wurde mit der Software *XDS* von Wolfgang Kabsch durchgeführt [Kabsch, 1993].

Der Ausgangspunkt sind einzelne Aufnahmen, die mit der hier verwendeten Auflösung aus  $2300 \times 2300$  Bildpunkten bestehen. Jedem Bildpunkt wird ein Intensitätswert zugeschrieben. Zuerst wird vorgegeben, welche Bereiche der Aufnahmen überhaupt betrachtet werden sollen („trusted regions“). Danach berechnet das Programm automatisch eine Hintergrundmaske für die Aufnahmen. Dazu wird die Intensität eines Datenpunktes über eine vorgegebene Anzahl (typisch sind 10) von Aufnahmen gemittelt. Liegt nun die Intensität des Datenpunktes in einer Aufnahme signifikant (Voreinstellung ist  $3\sigma$ ) über diesem Mittelwert, erkennt die Software einen möglichen Reflex und dieser Wert wird nachträglich aus dem Mittelwert für diesen Punkt entfernt. Damit nicht Reflexe als Hintergrund deklariert werden ist deshalb wichtig, dass die vorgegebene Anzahl der Bilder dafür sorgt, dass der getestete Drehwinkelbereich groß genug ist. Ist dies für alle Bildpunkte gemacht worden legt *XDS* eine Datei an, in der die Hintergrundwerte für jeden Bildpunkt angegeben sind. Diese wird im weiteren Verlauf der Auswertung verbessert.

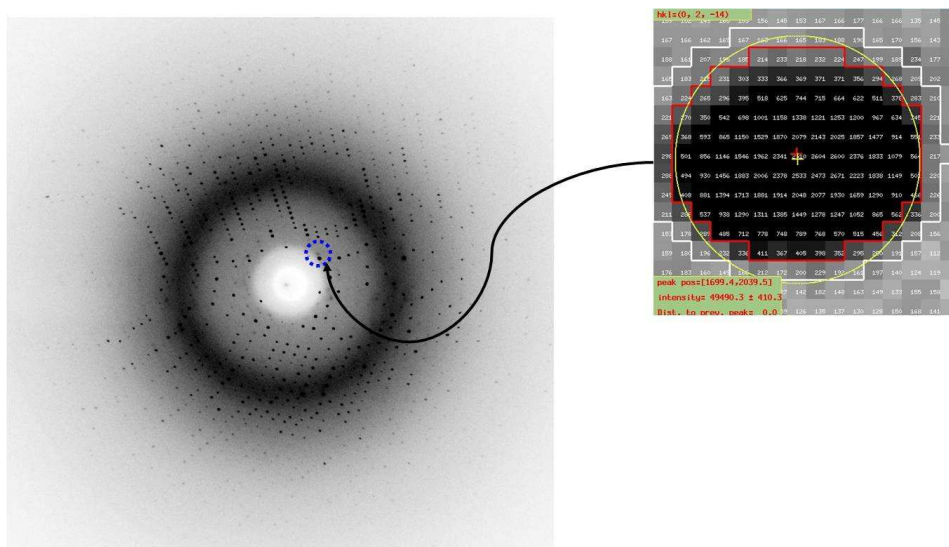


Abbildung 3.3: Automatische Suche von Reflexen. Eine Anhäufung starker Pixel, die bestimmte geometrische Anforderungen erfüllt, definiert einen Reflex.

Die nächste Aufgabe ist nun die Erkennung von Streureflexen. Dazu werden erst starke Pixel identifiziert, das heißt Bildpunkte mit hoher Intensität. Anschließend wird nach Anhäufungen von starken Pixeln gesucht, die bestimmte Kriterien erfüllen müssen (Intensitätsmaximum im Zentrum, Anzahl von Pixeln im richtigen Intervall usw.). Diese werden dann als Reflexe abgespeichert. In Abbildung 3.3 ist ein solcher Reflex zu sehen.

Ausgehend von den gefundenen Reflexen versucht das Programm nun die Einheitszelle des Kristalls zu bestimmen [Kabsch, 1988]. Zusätzlich wird noch eine Liste mit den möglichen Raumgruppen ausgegeben. Der Benutzer muss dann eine der aufgelisteten Raumgruppen für die weitere Auswertung auswählen. Da die Symmetrie erst nach der Integration bestimmt werden kann, wurde bei der ersten Auswertung an dieser Stelle immer auf eine Symmetrievorgabe verzichtet und der Datensatz mit der primitivsten Raumgruppe P1 ausgewertet. Aus dem dann berechneten MTZ-file konnte die Raumgruppe nachträglich mit dem Programm *POINTLESS* von P.R. Evans bestimmt werden [Evans, 2006]. Mit diesen Informationen über die Raumgruppe werden dann die Reflexe indiziert und über alle Aufnahmen integriert. Außerdem werden während dieses letzten Schrittes die vorgegebenen Parameter und Masken verbessert.

Das Ergebnis dieser Auswertung ist dann eine Reduktion der Aufnahmen auf eine Liste von Reflexen, in der im Wesentlichen für jeden Reflex die Miller'schen Indizes, die Intensität und die Standardabweichung der Intensität angegeben werden. Für die meisten weiteren Auswertungsschritte wurden Programme der *CCP4 PROGRAM SUITE* verwendet [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994].

### 3.5.2 Molecular Replacement

Die Phasen wurden über Molecular Replacement mit dem Programm Phaser bestimmt [McCoy *et al.*, 2007].

Für die Struktur des Hämoglobins wurde ein Hämoglobin vom Pferd mit der Zugriffsnummer 2D5X in der PDB Datenbank verwendet.

Für die Struktur des Hämocyanins des Skorpions wurde als Testmolekül ein Dodekamer aus einem EM basierten Modell desselben Hämocyanins verwendet [Cong *et al.*, 2009]. Die Zugriffsnummer in der PDB Datenbank lautet 3XIV. Da für das Testmolekül allerdings noch nicht die Aminosäuresequenz von *Pandinus imperator* verwendet wurde, wurde das Dodekamer vorher mit dem Programm *CHAINSAW* [Stein, 2008] auf eine Poly-Alanin-Kette gekürzt.

### 3.5.3 Refinement und Model-Building

Das Refinement des Modells gegen die gemessenen Amplituden wurde mit dem Programm *REFMAC5* [Murshudov *et al.*, 1997] aus der *CCP4*-Suite durchgeführt. Mit diesem Programm ist es möglich das Refinement mit verschiedenen Methoden durchzuführen. Verwendet wurden in dieser Arbeit das Rigid-Body und das Restrained Refinement.

Beim Rigid-Body-Refinement werden Teile des Moleküls (wie einzelne Untereinheiten) als feste Einheiten relativ zueinander angepasst.

Das Restrained Refinement ist ein individuelles Refinement der Atome mit einstellbaren Restriktionen (sogenannten „Restraints“). Dabei wird durch die Restriktionen sichergestellt, dass während des Anpassens des Modells an die Elektronendichte die Geometrie des Proteins (v.a. Bindungsabstände und -winkel) erhalten bleibt.

Außerdem wurde das Programm *COOT* verwendet [Emsley *et al.*, 2010] um das Modell optisch an die Elektronendichte anzupassen. Die Qualität der Struktur Faktoren und deren Übereinstimmung mit dem Modell wurden mit dem Programm *SFHECK* aus dem *CCP4*-Paket überprüft [Vaguine *et al.*, 1999].

### 3.5.4 Analyse und graphische Darstellung

Für die Analyse und die graphische Darstellung der Modelle wurden die folgenden Programme verwendet:

- *YASARA* [Krieger *et al.*, 2002]
- *CHIMERA* [Pettersen *et al.*, 2004]
- *CCP4-MG* [Potterton *et al.*, 2002]
- *PYMOL*<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup>The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC. Bisher keine Publikation in Fachzeitschriften. Beschreibung online unter [www.pymol.org](http://www.pymol.org)

- *COOT* [Emsley *et al.*, 2010]

### 3.6 Homologie-Modellierung

Die Homologie-Modellierung der *Pandinus imperator*-Untereinheiten wurde mit dem Programm *MODELLER 9v8* durchgeführt [Sali & Blundell, 1993]. Dieses Programm ist in der Lage anhand experimentell gelöster Strukturen verwandter Proteine (sogenannte „Templates“) die Konformation eines anderen Proteins mit ähnlicher Primärstruktur vorherzusagen. Dies geschieht in drei Schritten:

1. Alignment der Sequenz der bekannten Struktur mit der des Zielproteins
2. Bestimmung von räumlichen Randbedingungen aus dem Alignment
3. Modellierung der Struktur unter Anwendung der Randbedingungen

Dieses Verfahren ist möglich, weil eine geringfügige Abweichung der Sequenz auch eine geringfügige Änderung der Struktur zur Folge hat [Chothia & Lesk, 1986].

Das Alignment mit der Zielsequenz erfolgte mit den Programmen *CLUSTALX* [Jeanmougin *et al.*, 1998] und *GENEDOC* [Nicholas *et al.*, 1997]. Die Genauigkeit der Vorhersage hängt dabei von der Homologie zwischen Template und Zielprotein und von der Qualität des Alignments ab. Bei der Interpretation der Vorhersage ist es also notwendig das Alignment zu berücksichtigen. Dabei variiert die Genauigkeit mit der die Struktur vorhergesagt werden kann innerhalb des Proteins. Stark konservierte Abschnitte des Proteins können dabei wesentlich besser vorhergesagt werden als variable Abschnitte. Daraus ergibt sich insbesondere für Loop-Regionen im Protein eine geringe Genauigkeit der Vorhersage.

# Kapitel 4

## Probenpräparation

### 4.1 Verwendete Lösungen und Puffer

Es wurden im Laufe der Arbeit die folgenden Lösungen verwendet (die Namen sind willkürlich zur eindeutigen Abkürzung gewählt):

- *Pandinus*-TRIS-Puffer:  
TRIS-HCl pH 7, 8: 100 mMol/l  
CaCl<sub>2</sub>: 10 mMol/l  
MgCl<sub>2</sub>: 10 mMol/l
- Meerschweinchen-Hb-Puffer:  
Natriumphosphat-Puffer pH 7, 0: 10 mMol/l
- Alsever:  
2,05 % D-Glucose 0,42 % NaCl 0,8 % Natrium-Citrat 0,06 % Citronensäure  
in aq. dest.

Alle Puffer wurden bei Raumtemperatur (20 – 25 °C) auf ihren pH-Wert eingestellt. Nach der Herstellung wurden alle Puffer gefiltert und entgast. Kalzium und Magnesium dienen der Stabilisierung des Hämocyanins, die Mengen wurden aus [Decker, 1990] entnommen.

### 4.2 Aufreinigung des Hämoglobins

Meerschweinchen-Blut (*Cavia porcellus*) in Alsever wurde über Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Aufreinigung des Hämoglobins aus dem Blut wurde nach Paoli und Nagai [Paoli & Nagai, 2004] basierend auf den Protokollen von Perutz [Perutz, 1968] durchgeführt:

Durch Zentrifugation bei 100 g für 15 Minuten wurden die Erythrozyten vom Plasma getrennt<sup>1</sup>. Anschließend wurden die Erythrozyten mit isotonischer Salzlösung (0,9 %) gewaschen. Danach wurde durch Zugabe des selben Volumens an Wasser die Salzkonzentration halbiert und so die Erythrozyten lysiert. Das frei gewordene Hämoglobin wurde dann stabilisiert, indem die Salzkonzentration wieder auf 3 % erhöht wurde. Schließlich wurden die Zellreste abzentrifugiert. Da das Lysat der Erythrozyten zu 98 % aus Hämoglobin besteht, war keine weitere Aufreinigung notwendig.

### 4.3 Kristallisation von *Cavia porcellus*-Hämoglobin

Die Kristallisation des Meerschweinchen-Hämoglobins wurde in 24-well Platten von Hampton Research durchgeführt. Dabei wurde das „Hanging drop“-Verfahren bei einer Temperatur von 20 °C gewählt. Die Tropfen enthielten 5  $\mu\text{l}$  Hämoglobinlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml und 5  $\mu\text{l}$  der Reservoirlösung. Diese wurden gegen 1 ml der selben Reservoirlösung equilibriert. Die Reservoirlösung bestand für die im folgenden präsentierten Hämoglobinkristalle aus 2,6 M Ammoniumsulfat und 100 mM Natriumphosphat-Puffer bei pH 6,5. Die Startbedingungen wurden aus [Perutz, 1968] entnommen und dann für das Hämoglobin vom Meerschweinchen verbessert. Bis die Kristalle eine für das Streuexperiment geeignete Größe erreicht hatten, dauerte es durchschnittlich 1 bis 2 Wochen.

Da bei der Herstellung der Kristalle kein Gefrierschutzmittel verwendet wurde, wurde für die Hämoglobinkristalle für Tieftemperaturmessungen nachträglich ein Soaking in 25 % Glycerin durchgeführt. Weil die Hämoglobinkristalle in der Glycerinlösung instabil wurden, wurde nur ein sehr kurzes Soaking durchgeführt. Die Zeiten lagen zwischen 30 und 60 Sekunden.

### 4.4 Gewinnung der Hämolymphe und Aufreinigung des Hämocyanins

Die Gewinnung des Hämocyanins von *Pandinus imperator* erfolgte aus institutseigenen Tieren. Diese wurden von Carolina Biological Supply aus Charlotte in den USA bezogen. Die Haltung am Institut erfolgt in Plastikwannen, welche mit Sand und Rindenmulch ausgelegt sind.

Gewonnen wurde das Hämocyanin durch dorsale Punktion des Herzmuskelschlauches, wodurch das Austreten von Hämolymphe erreicht wurde. Diese wurde dann mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in 2 ml-Mikroreaktionsgefäße überführt. Um eine Gerinnung der Proben zu vermeiden wurde in die Sammelgefäße circa 100  $\mu\text{l}$  Puffer (*Pandinus*-TRIS-Puffer) vorgelegt. Durch Zentrifugation mit einer Beschleunigung von 4109 g für einige Minuten wurden grobe Rückstände pelletiert, bevor die Aufreinigung mittels Gelfiltrationschromatographie durchgeführt wurde. Verwendet

<sup>1</sup>mit  $g$  wird hier die Erdbeschleunigung bezeichnet,  $g = 9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$

wurden die zwei Zentrifugen Universal 16 R und Universal 32 R der Firma Hettich und die Zentrifuge Z 233 MK2 der Firma Hermle.

Die Aufreinigung erfolgte mit einer Sephacryl-Säule (S-300 26/60) der Firma GE Healthcare, München. Die Säule wurde an einer FPLC-Anlage der Firma Bio-Rad betrieben. Vor jedem Lauf wurde die Säule über Nacht mit dem entsprechenden Puffer equilibriert. Danach wurden 4 ml gereinigte Hämolymphe-Lösung in die Probenschleife gegeben und der Lauf gestartet. Dabei wird zunächst der Inhalt der Probenschleife auf die Säule gegeben und dann mit Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler (Modell 2110) der Firma Bio-Rad aus München in 1 ml Fraktionen gesammelt. Über die Absorption bei 280 nm wurden dann die Fraktionen bestimmt, in denen sich nur Hämocyanin befand. Ein Beispiel für ein solches Chromatogramm ist in Abbildung 4.1 zu sehen. Die Abbildung zeigt das Hämocyanin, welches sich im ersten Peak bei einem Elutionsvolumen von 148 ml bis 181 ml befindet. Ein zweiter Peak zeigt ein Begleitprotein, welches allerdings noch nicht näher charakterisiert ist.

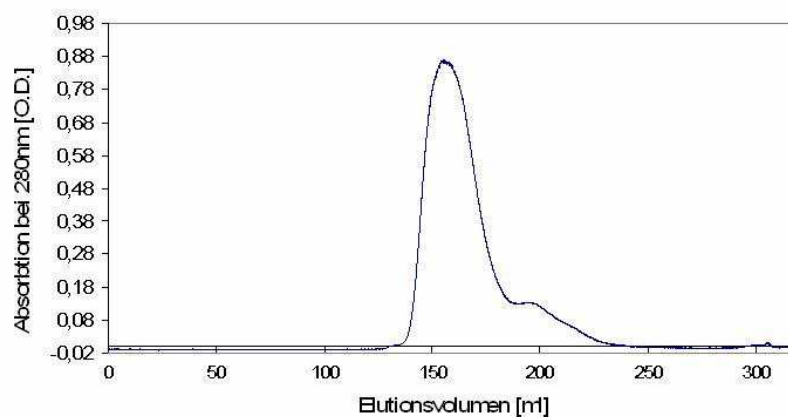


Abbildung 4.1: Chromatogramm für eine Aufreinigung von *Pandinus imperator*-Hämocyanin. Das Hämocyanin befindet sich im ersten Peak, also bei einem Elutionsvolumen von 148 ml bis 181 ml. Der zweite Peak zeigt ein Begleitprotein, welches allerdings noch nicht näher charakterisiert ist.

## 4.5 Überprüfung der Proben

### Absorptionsspektroskopie

Zur Bestimmung der Konzentration und Sauerstoffbeladung der Proben wurden an einem Photometer der Firma Varian (Typ: Cary 1E UV-Vis) Absorptionsspektren aufgenommen. Die Konzentration der Proben wurde aus den Absorptionsspektren bestimmt, indem sie mit dem bekannten Extinktionskoeffizienten  $\epsilon =$

1,1 l/mol·cm [Loewe, 1978] aus der optischen Dichte bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) errechnet wurde. Mit  $I_0$  als die Ausgangsintensität und  $I$  als die transmittierte Intensität, ist die optische Dichte definiert über

$$OD = \log \frac{I_0}{I},$$

womit man die Konzentration mit der folgenden Gleichung bestimmen kann:

$$c = \frac{OD_{280} \cdot \mu}{\epsilon \cdot l}$$

Hierbei ist  $\mu$  der Verdünnungsfaktor der jeweiligen Messung. Die Verdünnung wurde immer so gewählt, dass die  $OD_{280}$  zwischen 0.5 und 1.2 lag, da bei höheren optischen Dichten die Linearität des Photometers nicht mehr gewährleistet ist und unterhalb von 0.5 wegen des Abzugs der Leermessung das Signal zu klein wäre. Insbesondere der Wert  $OD_{340}$  würde sehr klein und ungenau werden. Die Länge der Messzelle  $l$  in Strahlrichtung betrug dabei 1 cm.

### Statische Lichtstreuung

Da für die Strukturanalyse eine homodisperse Lösung erforderlich ist, wurden die Proteinlösungen mit Hilfe der statischen und dynamischen Lichtstreuung kontrolliert. Für die statische Lichtstreuung wurden die folgenden Geräte verwendet:

- Superose 6 HR 10/30 Größenausschluß Säule der Firma Pharmacia LKB Biotechnology Co.
- HPLC-Pumpe HP 1100 der Firma Hewlett Packard.
- UV/Vis-Detektor UV-1806 der Firma Bio-Rad.
- Laser Photometer DAWN DSP mit He/Ne Laser ( $\lambda = 632,8\text{nm}$ ) der Firma Wyatt Technology, Dernbach.
- Refraktometer Optilab DSP der Firma Wyatt Technology.

Die Abbildung 4.2 zeigt den für die statische Lichtstreuung verwendeten Aufbau. Dabei wird das Protein analog zur in Abschnitt 4.4 besprochenen Methode über eine Probenschleife auf die Superose 6 Säule gegeben. Danach folgt die Elution der Probe. Nach der Säule durchläuft das Eluat den UV/Vis-Detektor, das Laser-Photometer und das Refraktometer. Mit dieser Methode lässt sich über die Rayleigh-Streuung das Molekulargewicht der Bestandteile der Lösung bestimmen. Die dafür verwendete Formel ist [Winter & Noll, 1998]:

$$M = \frac{R_\theta}{K \cdot c} \quad (4.1)$$



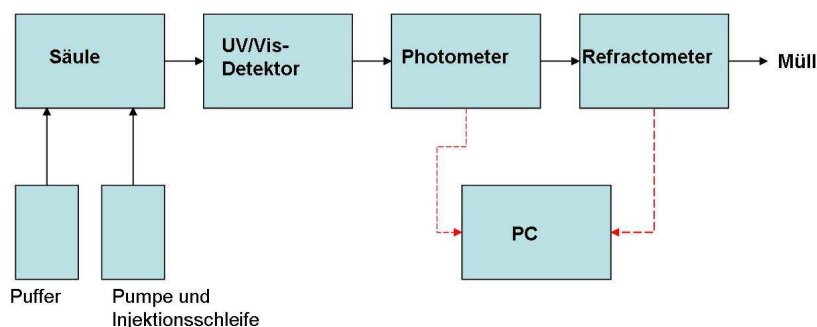


Abbildung 4.2: Schemazeichnung für den verwendeten Aufbau zur Messung der Lichtstreuung.

Dabei ist  $R_\theta$  proportional zur gestreuten Intensität  $I_\theta$ , welche im Photometer gemessen wird und  $K$  proportional zu  $\frac{dn}{dc}$ , eine Größe die man durch das Refraktometer bekommt. Der Wert  $n$  bezeichnet den Brechungsindex. Die Herleitung dieser Gleichung und die dafür verwendeten Näherungen entnimmt man zum Beispiel aus [Schmidt, 1994].

Es wurde mit dieser Methode beispielsweise sichergestellt, dass sich in der untersuchten Lösung nur 24-mere befanden. Bei einer beschädigten Probe können dissoziierte Teile oder Aggregate des Hämocyanins nachgewiesen werden, da sie langsamer beziehungsweise schneller als das 24-mere Hämocyanin durch die Säule laufen.

### Dynamische Lichtstreuung

Aus Zeitgründen war es nicht sinnvoll für jede Probe eine Überprüfung mittels der statischen Lichtstreuung durchzuführen. Deshalb wurden die meisten Proben mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht. Dabei wird die Streuintensität unter einem festen Winkel mehrmals hintereinander gemessen, und aus der zeitlichen Korrelation dieser Werte auf den Diffusionskoeffizienten der Moleküle in der Lösung geschlossen. Aus dem Diffusionskoeffizienten kann man den hydrodynamischen Radius der Moleküle berechnen. Sind nun in der Lösung Moleküle oder Molekülaggregate mit deutlich unterschiedlicher Größe vorhanden, werden Peaks mit unterschiedlichem hydrodynamischem Radius gemessen. Bei ähnlicher Größe ergibt sich zumindest eine Verbreiterung des Peaks.

Eine Lösung, die vorher über die statische Lichtstreuung kontrolliert worden ist, wurde als Standard für die nachfolgenden Messungen verwendet. Ob eine Verbreiterung oder andere Peaks gegenüber der Referenzprobe auftraten, wurde als Test für die Reinheit der weiteren Proben verwendet. So wurde das Hämocyanin von *Pandinus imperator* nach jeder Aufreinigung auf seine Homodispersität hin überprüft. Näheres zur dynamischen Lichtstreuung entnehme man wie oben aus [Schmidt, 1994] oder [Winter & Noll, 1998].

Die Messungen wurden an einem „Zetasizer Nano-S Size“ der Firma Malvern instruments durchgeführt. Bei der verwendeten Lichtquelle handelt es sich um einen

Helium-Neon Laser, welcher Strahlung mit einer Wellenlänge von 632.8 nm produziert.

### **Native PAGE**

Eine weitere Methode zur Überprüfung des Oligomerisierungsgrades ist die native PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Dabei wurde die folgende Zusammensetzung verwendet:

- Trenngel:
  - 7.5 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 30 : 1)
  - 370 mM Tris, pH 7.5
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- Sammelgel:
  - 3 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid : Bisacrylamid = 30 : 1)
  - 120 mM Tris, pH 6.8
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- Laufpuffer:
  - 20 mM Tris, pH 8.8
  - 150 mM Glycin
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- Probenpuffer:
  - 50 % (v/v) Glycin
  - 0.1 % BPB (=Bromphenolblau)

Die Elektrophorese wurde bei 4 °C mit einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Das Gel wurde mit 0,2 % (w/v) Coomassie R250 in 50 % (w/v) Methanol, 10 % (w/v) Essigsäure und 40 % (w/v) Wasser gefärbt und fixiert. Mit einer Lösung aus 80 % (w/v) Methanol und 20 % (w/v) Eisessig wurde es dann entfärbt. Digitalisiert wurde das Gel mit einem Scanner der Firma Bio-Rad (GS-800 Calibrated Densitometer).

## 4.6 Kristallisation von *Pandinus imperator*-Hämocyanin

Auch für das Hämocyanin vom Skorpion wurden die weiter oben erwähnten 24-Well Platten von Hampton Research verwendet. Die Temperatur, die Tropfengröße und das Volumen der Reservoirlösung wurden beibehalten. Da keine Kristallisationsbedingungen bekannt waren, musste in diesem Fall das Screening sehr breit angelegt werden.

Die Hämocyaninkristalle sind außerdem sehr anfällig gegenüber Strahlenschäden, deshalb wurden im Zuge dieser Screenings auch Lösungen mit Gefrierschutzmittel ausprobiert. Kristalle wurden auch unter diesen, für die Kryo-Kristallographie geeigneten Bedingungen gezogen. Allerdings hat sich beim Testen des Streuvermögens der Kristalle herausgestellt, dass die Qualität der Aufnahmen mit diesen Kristallen schlechter war als die der hier vorgestellten Datensätze mit Kristallen die nachträglich dem Soaking in Glycerin unterzogen wurden.

Für die in dieser Arbeit gemessenen Kristalle wurde die folgende Lösung verwendet: 10 mM  $CaCl_2$ , 10 mM  $MgCl_2$ , 2% PEG6000 und 1 M  $NaCl$  in 100 mM TRIS, pH 7, 8. Auch PEG6000 wird als Kryoprotektant verwendet, allerdings nur in deutlich höheren Konzentrationen. Bei höheren PEG6000 Konzentrationen konnte aber kein Kristallwachstum erreicht werden. Anders als beim vorgestellten Hämoglobin, konnte sich bei den Kristallen des Hämocyanins von *Pandinus imperator* das Wachstum über mehrere Monate hinziehen.



## Kapitel 5

# Ergebnisse: Höhenadaptation im Meerschweinchen-Hämoglobin

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchungen am Hämoglobin vom Meerschweinchen *Cavia porcellus* vorgestellt. Teile der hier vorgestellten Ergebnisse finden sich auch in [Jaenicke & Pairet, 2009] und [Pairet & Jaenicke, 2010]. Die Struktur des Hämoglobins von *Cavia porcellus* wurde in der PDB Datenbank hinterlegt (Zugangsschlüssel 3HYU).

### 5.1 Kristalle

Wie schon in Abschnitt 4.3 beschrieben, wurden die Hämoglobinkristalle in einer Lösung mit 2.6 M Ammoniumsulfat und 100 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6.5 gezogen. Nach 1 bis 2 Wochen ergaben sich die in Abbildung 5.1 gezeigten Kristalle. Die Kristallform blieb auch unter einer geringfügigen Variation der Kristallisationsbedingungen erhalten (getestet pH:  $\pm 1$ , Ammoniumsulfat:  $\pm 0.4$  M).

Die besten Kristalle wurden unter den oben genannten Bedingungen bei einer Konzentration von 5 bis 10 mg/ml Hämoglobin gezogen. Dabei zeigte sich, dass eine höhere Hämoglobinkonzentration eher das Wachstum vieler kleinerer Kristalle begünstigt. Mit den in Abbildung 5.1 gezeigten Kristallen wurden verschiedene Datensätze sowohl bei Raumtemperatur als auch unter Kryo-Bedingungen aufgenommen.

### 5.2 Messung der Streuamplituden

Insbesondere für zwei der durchgeführten Messungen wurden Datensätze mit ausreichend guten  $R$ -Werten und Vollständigkeit für eine weitere Auswertung gemessen. Der erste dieser Datensätze, über den auch in [Jaenicke & Pairet, 2009] berichtet wird, wurde mit einem einzigen Kristall bei 3 verschiedenen Detektorabständen gemessen (100, 170 und 400 mm). Der zweite wurde durchgehend bei einem Abstand von 120 mm gemessen [Pairet & Jaenicke, 2010].

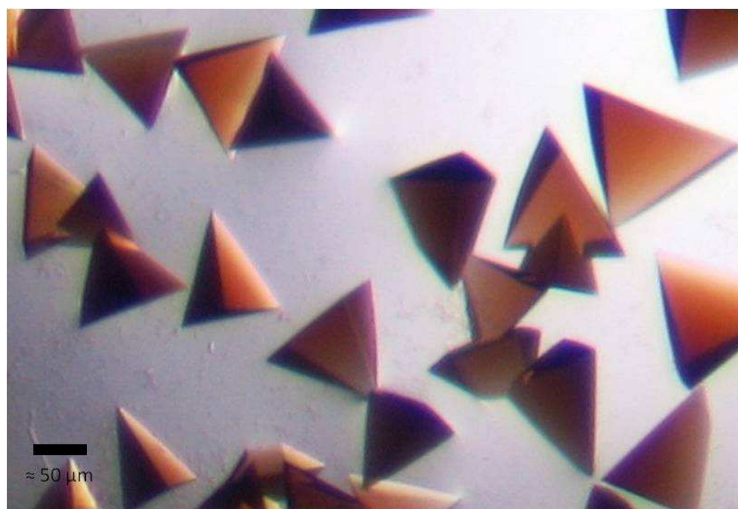


Abbildung 5.1: Kristalle von Meerschweinchen-Hämoglobin. Die Kristalle hatten eine Größe von 50 bis 200  $\mu\text{m}$ . Die tetraedrische Form war in allen erfolgreichen Ansätzen zu erhalten.

Die hier vorgestellten Ergebnisse beziehen sich auf den zweiten Datensatz, da dieser eine bessere Auflösung zulässt und einen größeren Prozentsatz der messbaren Reflexe abdeckt. Durch Vereinigung der beiden Datensätze war keine signifikante Verbesserung zu erreichen, deshalb wurde nur der zweite Datensatz berücksichtigt. Die folgenden Parameter wurden bei der Aufnahme des Datensatzes verwendet:

- Anzahl der Bilder: 240.
- Detektorabstand: 120 mm, damit ist die maximale Auflösung 1.67 Å.
- Auflösung des Detektors:  $2300 \times 2300$  Pixel, damit beträgt die Pixelgröße 0.15 mm.
- $\Delta\varphi$ :  $1.5^\circ$  pro Bild.

Ein Beispiel für eine Aufnahme mit einer Drehung des Kristalls um  $1.5^\circ$  ist in Abbildung 5.2 wiedergegeben. Man erkennt Reflexe bis an die Grenze des Auflösungsgebietes. Während der Auswertung des Datensatzes zeigte sich, dass der Kristall in der Raumgruppe 20 ( $C222_1$ ), mit folgender Einheitszelle:  $a = 83.462$   $b = 89.943$   $c = 82.712$  ;  $\alpha = 90.000$   $\beta = 90.000$   $\gamma = 90.000$  vorlag. In Tabelle 5.1 ist die Statistik für diesen Datensatz aufgelistet, wie sie in der PDB Datenbank hinterlegt ist. Die Statistiken in dieser Tabelle bestätigen die sehr gute Qualität der Daten. Der Completeness-Wert (Vollständigkeit) gibt an welcher Prozentsatz der theoretisch messbaren Reflexe auch tatsächlich gemessen wurde. Dieser Wert ist mit 99.7 % sehr hoch, so dass von einem vollständigen Datensatz ausgegangen werden kann.

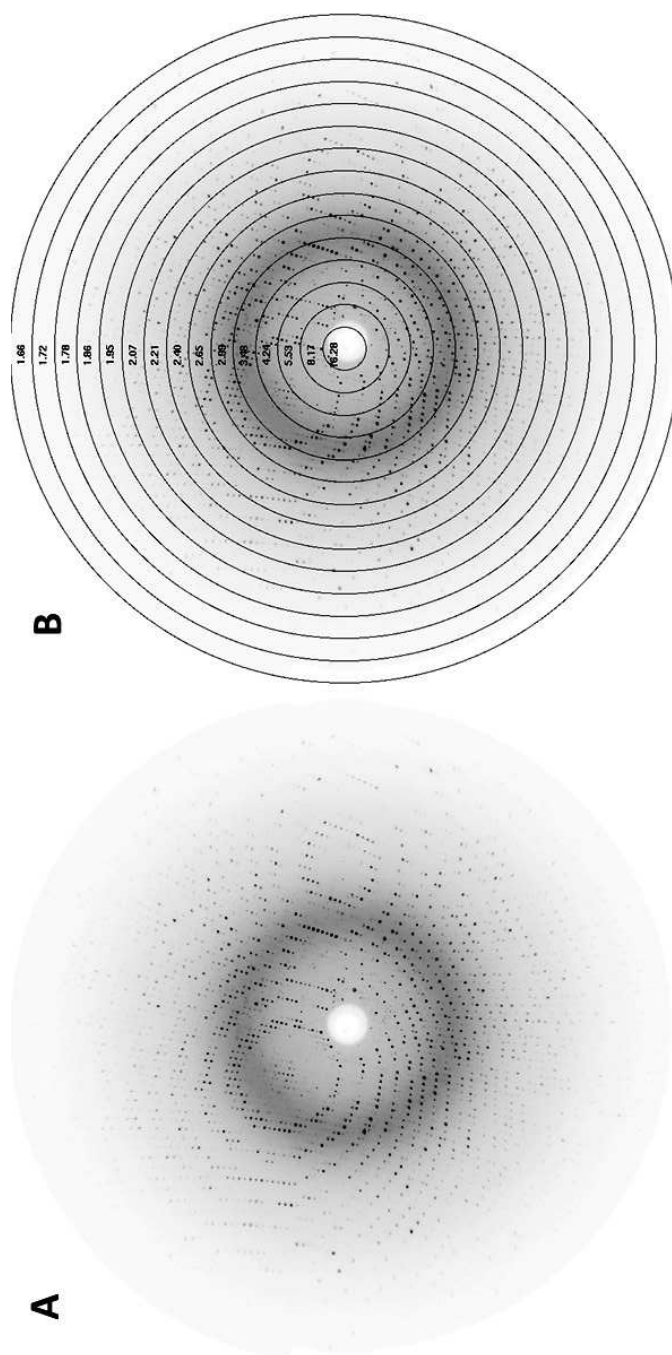


Abbildung 5.2: Typisches Streubild für *Cavia porcellus* Hämoglobin. Die Aufnahme wurde bei einem Detektorabstand von 120 mm aufgenommen, der Kristall während der Aufnahme um  $1.5^\circ$  gedreht. A zeigt das Streubild ohne, B mit Auflösungsringen.

Wellenlänge	1.54 Å
Raumgruppe	C222 <sub>1</sub>
Auflösung	19.6-1.67 Å (1.71-1.67 Å)
Anzahl der Reflexionen	36376 (2466)
$R_{merged}$	0.052 (0.255)
$I/\sigma(I)$	35.8 (9.95)
completeness	99.7 % (92.0) %

Tabelle 5.1: Statistik für den *Cavia porcellus* Hämoglobin Datensatz, der zur Lösung der Struktur verwendet wurde. In Klammern angegeben sind die Werte für die letzte Auflösungsstufe.

Auch die Werte für  $R_{merged}$  und  $I/\sigma(I)$  bestätigen die gute Statistik des Datensatzes. Insbesondere sind diese Werte in der letzten Auflösungsstufe noch als sehr gut zu bewerten, was zeigt, dass der Datensatz auch bis zur Auflösungsgrenze von 1.67 Å ohne Einschränkungen verwendet werden kann.



### 5.3 Bestimmung der Struktur mit Molecular Replacement

Die Struktur wurde durch Molecular Replacement gelöst. Hierfür wurde als Testmolekül ein Dimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette einer Struktur vom Pferdähämoglobin mit gebundenem Kohlenstoffmonoxid gewählt (PDB Zugangsschlüssel 2D5X [Yokoyama *et al.*, 2006]). Es wurde das vollständige Modell verwendet, Aminosäureaustausche wurden nachträglich durchgeführt.

Mit einem Molekulargewicht von 31 kDa für diese Zusammensetzung ergab sich dann für den Kristall ein Matthews Koeffizient von  $V_m = 2.49 \frac{\text{\AA}^3}{\text{Da}}$ , was einem Lösungsmittelgehalt von 50.9 % entspricht. Dieser Wert liegt in einem Intervall, das eine hohe Wahrscheinlichkeit aufweist. Der Matthews Koeffizient spricht also dafür, dass die gewählte Komposition richtig ist. Der R-Faktor nach dem Molecular Replacement lag bei 0.34, was ein guter Startwert ist.

Anschließend wurden anhand eines Sequenzalignments die Aminosäuren, die zwischen den beiden Hämoglobinen verschieden sind, mit dem Programm *COOT* ersetzt. Die Sequenz der hier modellierten Hauptkomponente des Hämoglobins des Meerschweinchens wurde aus [Braunitzer *et al.*, 1979] entnommen. Die neu eingesetzten Aminosäuren wurden direkt an die Elektronendichte angepasst. Das Alignment ist in Abbildung 5.3 gezeigt.

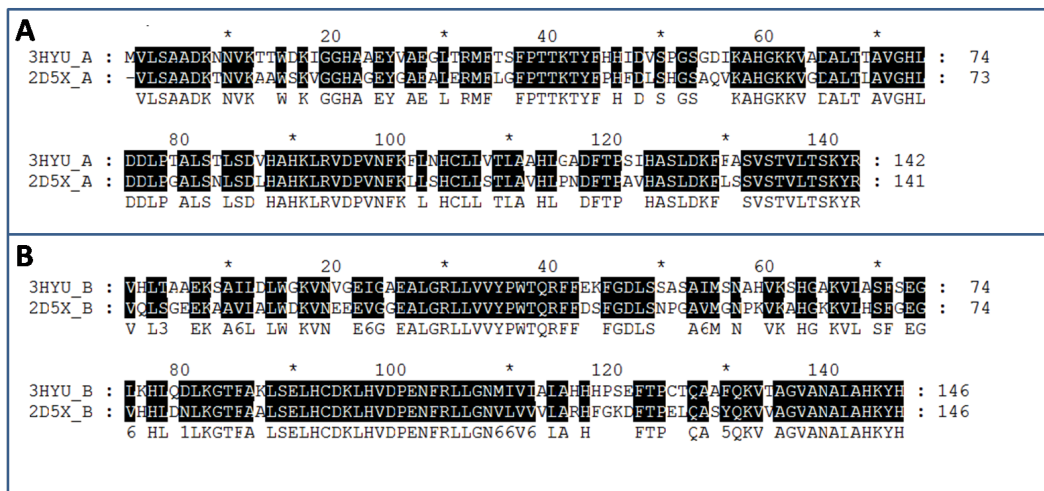


Abbildung 5.3: Alignment zwischen den Hämoglobinsequenzen aus dem Pferd (2D5X) und dem Meerschweinchen (3HYU). (A) zeigt das Alignment der beiden  $\alpha$ -Ketten, (B) der  $\beta$ -Ketten. Identische Aminosäuren sind mit einer schwarzen Schattierung hervorgehoben.

Das resultierende Modell mit der korrigierten Aminosäuresequenz wurde dann mit Refmac an die experimentellen Daten angepasst. Nach dem ersten Refinement-Durchlauf stimmte das Modell sehr gut mit der experimentell bestimmten Elektro-

nendichte überein.

Es war allerdings zu erkennen, dass die C-terminalen Enden der  $\alpha$ -Ketten im Modell fehlerhaft waren. Die letzten 4 Aminosäuren am C-Terminus wurden deshalb mit dem Programm *COOT* nachträglich in die Dichte eingepasst. Dazu wurde die Elektronendichte ohne diese 4 Aminosäuren neu berechnet und die Aminosäuren dann in die resultierende Dichte (auch „OMIT Map“ genannt) wieder zu dem Modell hinzugefügt. So wurde sichergestellt, dass an dieser Stelle kein Bias durch die gewählte Startstruktur eingeführt wurde. In Abbildung 5.4 ist die Elektronendichte für die letzten 4 C-terminalen Aminosäuren gezeigt. Man erkennt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem verbesserten Modell und der Elektronendichte.

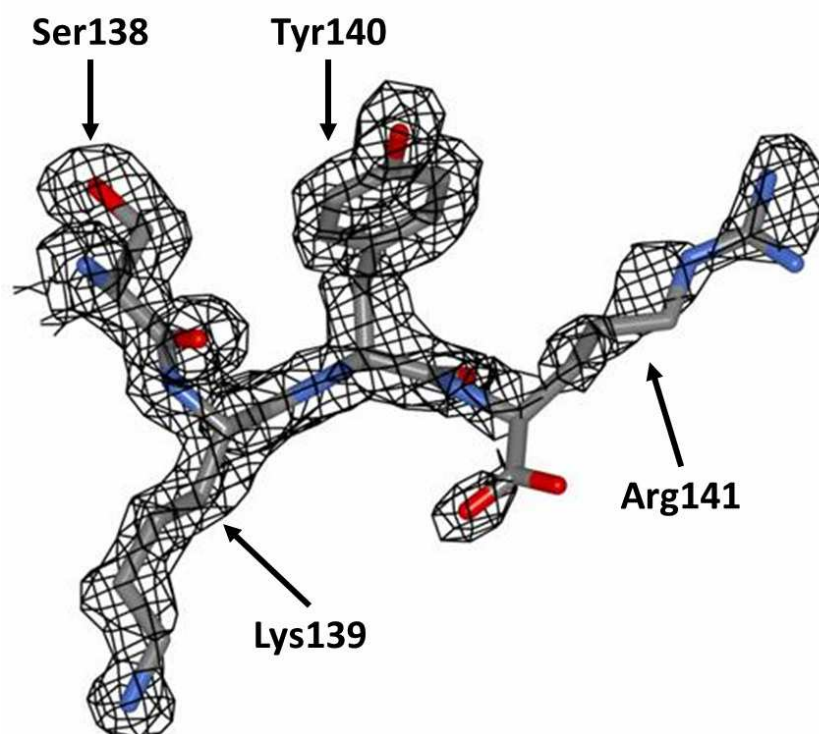


Abbildung 5.4: Elektronendichte am C-Terminus der  $\alpha$ -Ketten. Die Elektronendichte ist bei einem Wert von  $1\sigma$  angezeigt. Die Atome werden in der Stick-Darstellung angezeigt. Für die Atome gilt die folgende Farbkodierung: Kohlenstoff ist grau dargestellt, Stickstoff blau und Sauerstoff rot.

Anschließend musste die Oxidationsstufe des Eisens am aktiven Zentrum bestimmt werden. Die Elektronendichte zeigt zwar, dass ein kleines Molekül am Eisen gebunden ist, allerdings ist selbst bei der hier erreichten Auflösung nicht zweifelsfrei

feststellbar, ob es sich um ein Sauerstoffmolekül (oxygenierter Zustand des Hämoglobins) oder um ein Wassermolekül (Met-Zustand des Hämoglobins) handelt. Tendenziell lässt die Elektronendichte, wie man in Abbildung 5.5 sieht, eher auf den Met-Zustand schließen, die Frage nach dem Liganden kann aber nicht eindeutig beantwortet werden.

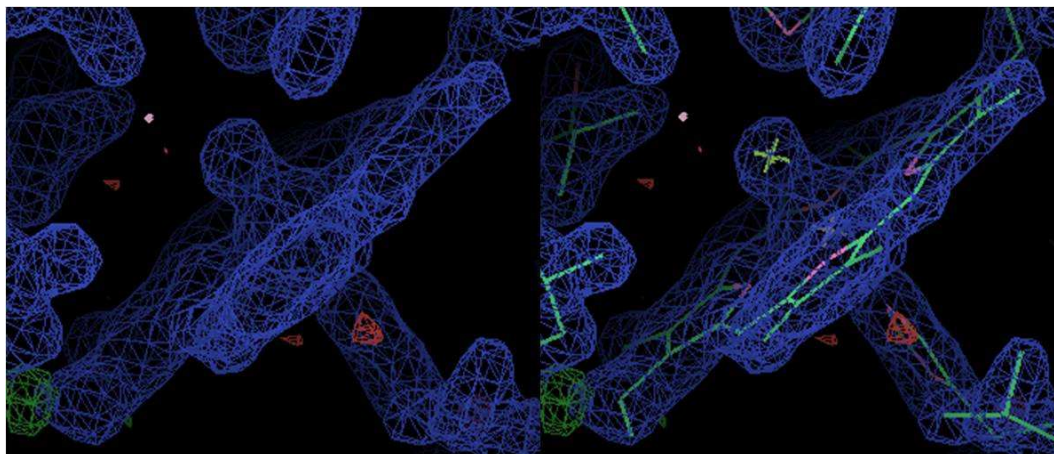


Abbildung 5.5: Elektronendichte am aktiven Zentrum. Links ist die Elektronendichte in blau ( $1\sigma$ ) ohne, rechts mit dem Modell in der „baton“-Darstellung gezeigt. In rot beziehungsweise grün ist die Differenzdichte ( $F_0 - F_c$ ) bei einem Wert von  $3\sigma$  dargestellt, rot zeigt einen Elektronendichte-Überschuss im Modell an, grün eine fehlende Dichte im Modell. Eine Unterscheidung zwischen einem an die Hämgruppe gebundenen Wasser- oder Sauerstoffmolekül ist anhand der Elektronendichte nicht eindeutig möglich. Die hier gezeigte Dichte wurde mit einem gebundenen Wassermolekül berechnet. Die Differenzdichte zeigt keinen Fehler für das Modell an.

Der Zustand wurde deshalb überprüft, in dem Hämoglobinkristalle aufgelöst und dann ein Absorptionsspektrum der Lösung gemessen wurde. Anhand dieses Spektrums ließ sich der Met-Zustand eindeutig identifizieren. Im Modell wurde deshalb ein Wassermolekül in die Dichte am aktiven Zentrum eingefügt. Nach der Verbesserung des C-Terminus und des aktiven Zentrums des Modells mit *COOT*, wurde das neue Modell nochmals mit *REFMAC* an die Dichte angepasst.

Die Statistiken nach dem Refinement sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

<b>Refinement</b>	
R-Faktor	0.179
R-free	0.203
Anzahl der Atome (Protein)	2308
Anzahl der Atome (Wasser)	229
<b>Mittlere B-Faktoren</b>	
Alle Atome	12.37 Å <sup>2</sup>
Rückgrat-Atome	10.03 Å <sup>2</sup>
Seitenkette und Wasser	14.31 Å <sup>2</sup>
<b>Ramachandran-Diagramm</b>	
Bevorzugte Regionen	98.6 %
Erlaubte Regionen	1.4 %
<b>Mittlere quadratische Abweichung vom Idealwert</b>	
Bindungslänge	0.011 Å
Bindungswinkel	1.165 °

Tabelle 5.2: Statistik für das Refinement der Hämoglobin-Struktur.

Die *R*-Faktoren zeigen eine hohe Korrelation zwischen dem Modell und dem gemessenen Datensatz. Auch die *B*-Faktoren sind sehr niedrig und sprechen für eine hohe Genauigkeit der Atomkoordinaten, sowohl beim Proteinrückgrat als auch bei Atomen der Seitenkette und bei Wasseratomen. Im Ramachandran-Diagramm sind keine Winkelpaare außerhalb der erlaubten Bereiche zu finden und es befinden sich mit 98.6 % vergleichsweise viele in den bevorzugten Bereichen. Auch die Werte für die mittlere quadratische Abweichung der Bindungslänge und Winkel sind klein und bestätigen eine hohe Genauigkeit der Koordinaten. Das resultierende Modell ist in Abbildung 5.6 zu sehen. Abbildung 5.7 stellt die Elektronendichte am aktiven Zentrum dar.

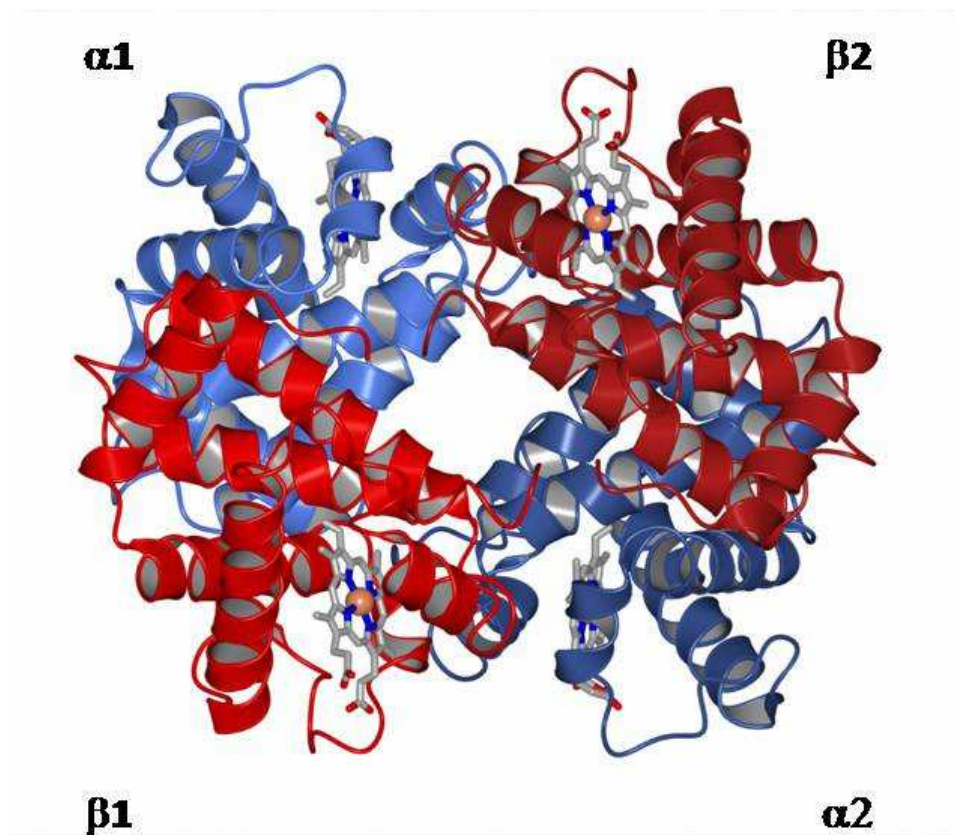


Abbildung 5.6: *Cavia porcellus*-Hämoglobin. Ansicht entlang der Symmetrieachse des Moleküls. Die Ketten wurden nach folgendem Schema eingefärbt: Dimer 1:  $\alpha 1$  hellblau,  $\beta 1$  hellrot; Dimer 2:  $\alpha 2$  blau,  $\beta 2$  rot.

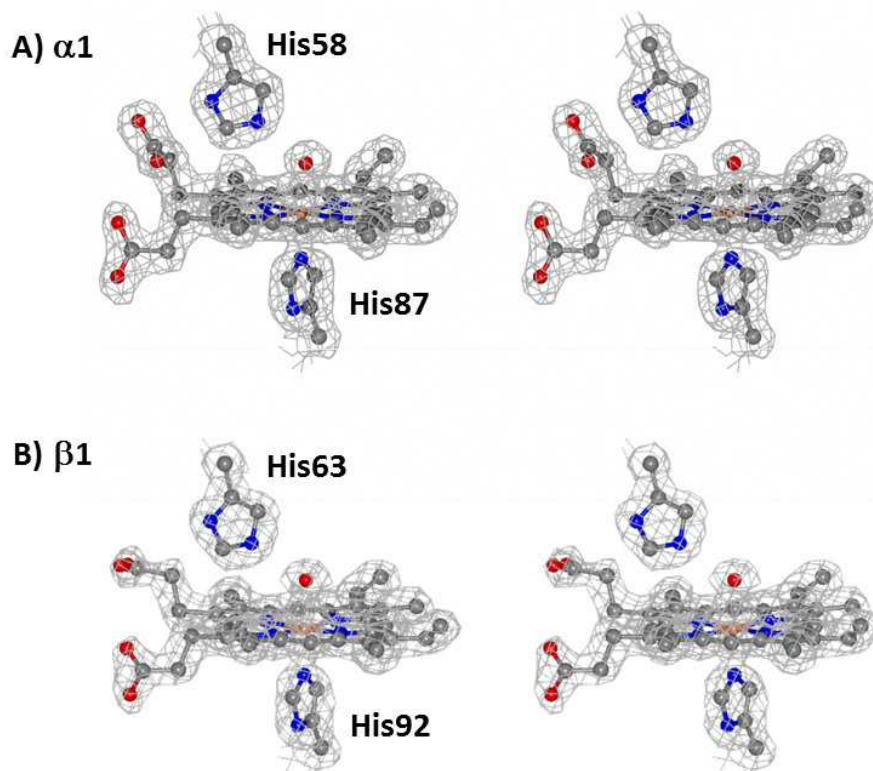


Abbildung 5.7: Elektronendichte am aktiven Zentrum. (A) zeigt in einer Stereodarstellung das aktive Zentrum der  $\alpha 1$ -Untereinheit, (B) das aktive Zentrum der  $\beta 1$ -Untereinheit. Die Elektronendichte ist bei einem Wert von  $1\sigma$  angezeigt.

## 5.4 Allgemeine Beschreibung der Struktur

Die Struktur des *Cavia porcellus*-Hämoglobins entspricht der typischen Hämoglobin-Struktur in Vertebraten. Je eine  $\alpha$ -Untereinheit mit 141 und eine  $\beta$ -Untereinheit mit 146 Aminosäureresten bilden ein Dimer. Zwei dieser Dimere bilden ein Tetramer (Abbildung 5.6). Die Sequenzidentität mit anderen Hämoglobinen ist hoch, verglichen zum Beispiel mit menschlichem Hämoglobin haben die  $\alpha$ -Ketten 75 % die  $\beta$ -Ketten 63 % identische Aminosäuren.

Um die erhöhte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins des Meerschweinchens zu erklären wurde die Struktur zunächst bezüglich ihrer Gesamtkonformation untersucht. Dazu wurde das Modell des Meerschweinchen-Hämoglobins mit dem menschlichen Hämoglobin in den verschiedenen Konformationen verglichen.

## 5.5 Konformation des Hämoglobins

Um festzustellen in welcher Konformation sich das Hämoglobin in der hier vorgestellten Struktur befindet, wurde das Modell mit humanem Hämoglobin in der T-, R- und R2-Konformation überlagert (T, PDB Schlüssel: 1A3N, [Tame & Vallone, 2000]; R, PDB Schlüssel: 1HHO, [Shaanan, 1983]; R2, PDB Schlüssel: 1BBB, [Silva *et al.*, 1992]).

Der optische Vergleich zeigt eine deutlich größere Übereinstimmung mit dem R2-Zustand. Um diese Tendenz zu untermauern wurden mit dem Programm *CHIMERA* die quadratisch gemittelten Abweichungen (RMSD-Werte) der 3 Konformationen mit dem Modell des Meerschweinchen-Hämoglobins berechnet<sup>1</sup>. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Diese Werte bestätigen, dass die Quartärstruktur der gelösten Hämoglobinstruktur der Quartärstruktur des menschlichen Hämoglobins im R2-Zustand entspricht.

Modell	Konformation	RMSD-Wert [Å]
1A3N	T	3.29
1HHO	R	1.66
1BBB	R2	1.09

Tabelle 5.3: Abweichung zu den humanen Modellen für die 3 Konformationen des Hämoglobins. Die hier vorgestellte Struktur zeigt die geringste Abweichung gegenüber der R2-Konformation.

Wie später erläutert wird, war diese Konformation aufgrund der Kristallisationsbedingungen nicht zu erwarten. Es muss also im Meerschweinchen-Hämoglobin strukturelle Unterschiede zum menschlichen Hämoglobin geben, die dafür sorgen, dass der R2-Zustand stabilisiert wird. Das Modell wurde deshalb bezüglich einer möglichen Stabilisierung des R2-Zustandes analysiert.

<sup>1</sup>Die Abbildung 6.3 zu dieser Überlagerung befindet sich im nächsten Kapitel auf Seite 63.



## 5.6 Salzbrückenbindungen zwischen den $\beta$ -Untereinheiten

Für die erhöhte Sauerstoffaffinität des Hämoglobins könnte die bessere Stabilisierung der R2-Konformation ein wichtiger Faktor sein. Im Vergleich mit menschlichem Hämoglobin, welches im R2-Zustand von 41 Salzbrücken stabilisiert wird, finden sich in der Struktur des Meerschweinchen-Hämoglobins deren 44. Von diesen Salzbrücken sind 32 in beiden Strukturen vorhanden, die anderen sind für die jeweilige Struktur spezifisch. Die meisten dieser Bindungen entstehen hierbei innerhalb einer Untereinheit und dienen dazu diese zu stabilisieren.

Für die Quartärstruktur sind die Bindungen wichtig, die zwischen verschiedenen Untereinheiten ausgebildet werden. Hier sind je eine Salzbrücke zwischen  $\alpha 1$  und  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\beta 2$ ,  $\alpha 1$  und  $\beta 2$  und schließlich zwischen  $\alpha 2$  und  $\beta 1$  in beiden Strukturen vorhanden. An der Grenzfläche zwischen den  $\beta 1$  und  $\beta 2$  Untereinheiten des menschlichen Hämoglobins im R2 Zustand finden sich keine Salzbrückenbindungen. Im vorgestellten Modell des Hämoglobins des Meerschweinchens finden sich zwei solcher Bindungen, wie in Abbildung 5.8 dargestellt.

Eine Bindung wird zwischen dem N-Terminus der  $\beta 1$  und dem C-Terminus der  $\beta 2$  Untereinheiten ausgebildet, die andere analog zwischen dem N-Terminus der  $\beta 2$  und dem C-Terminus der  $\beta 1$  Untereinheit. Die Bindung erfolgt dabei zwischen dem Val1 der einen und dem His146 der anderen Untereinheit. Diese liegen in einem Abstand von 2.6 Å zueinander.



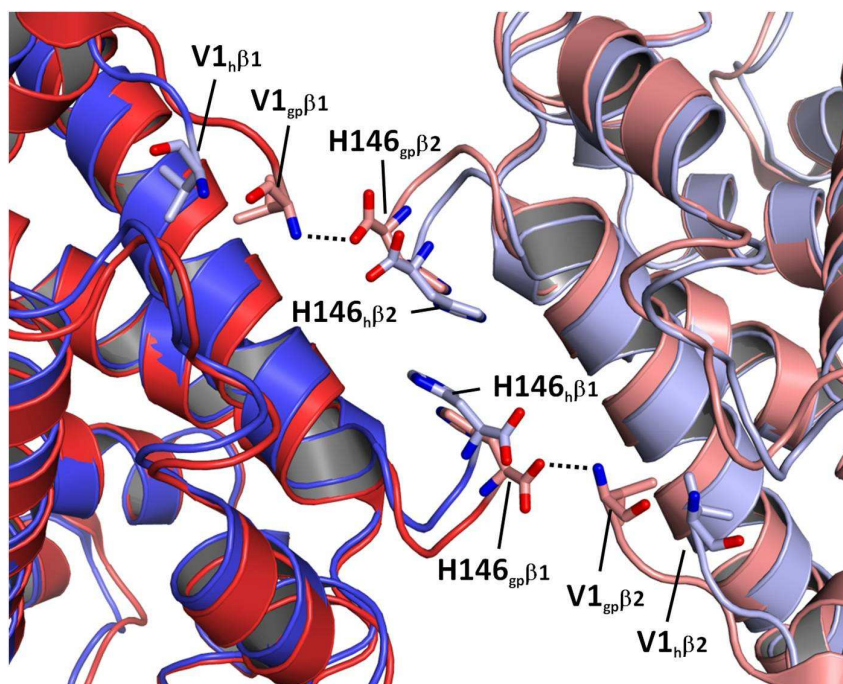


Abbildung 5.8: Stabilisierung der R2 Konformation durch Salzbrückenbindungen zwischen den  $\beta$ -Untereinheiten. Meerschweinchen-Hämoglobin ( $\beta$ 1 in rot,  $\beta$ 2 in hellrot) und humanes Hämoglobin ( $\beta$ 1 in blau,  $\beta$ 2 in hellblau) im R2-Zustand (1BBB, [Silva *et al.*, 1992]) wurden überlagert. Bei der Benennung der Aminosäuren geben die tiefgestellten Buchstaben die Strukturzugehörigkeit wieder: *gp* für das Hämoglobin des Meerschweinchens, *h* für das menschliche Molekül. Die Salzbrücken werden durch gestrichelte Linien angezeigt. Die Grenzfläche wird stabilisiert durch zwei Salzbrücken zwischen der N-terminalen Aminogruppe vom Val1 der  $\beta$ 1 Untereinheit und der C-terminalen Carboxylgruppe der  $\beta$ 2 Untereinheit und umgekehrt. Die Salzbrücken fehlen im menschlichen Hämoglobin.

## 5.7 Veränderungen in der „Switch Region“

Die Stabilisierung des R2-Zustandes ist nur ein Faktor, der zu einer erhöhten Sauerstoffaffinität führen kann. Ein anderer Faktor, der dazu beitragen könnte, ist die Destabilisierung des T-Zustandes. Das Modell wurde deshalb auch diesbezüglich analysiert.

Dabei zeigte sich, dass das Hämoglobin des Meerschweinchens gegenüber dem des Menschen Unterschiede in einer Region aufweist, die beim Konformationsübergang von R nach T maßgeblich beteiligt ist. Wie in [Baldwin & Chothia, 1979] für das menschliche Hämoglobin erstmals beschrieben, bilden die Aminosäurereste 38 – 44 der  $\alpha 1$  Untereinheit (Helix C und CD Übergang) zusammen mit den Resten 97 – 102 der  $\beta 2$  Untereinheit (FG Übergang und Helix G) die sogenannte „Switch Region“. Während des Konformationsübergangs gleitet das His97 $\beta 2$  entlang der Helix C der Untereinheit  $\alpha 1$ . Im T-Zustand liegt das Histidin zwischen Thr41 und Pro44, im R-Zustand zwischen Thr38 und Thr41. Im R2-Zustand bewegt sich das Histidin sogar noch weiter und nimmt eine Position auf der Höhe von Thr38 ein. Diese wichtige Region wird im menschlichen Hämoglobin durch eine Salzbrücke zwischen Glu30 und His50 stabilisiert.

Beim Meerschweinchen fallen zwei wichtige Unterschiede zum menschlichen Hämoglobin auf. Der erste ist das Fehlen der für das menschliche Hämoglobin beschriebenen Salzbrücke zwischen Glu30 und His50. Wie in Abbildung 5.9 zu sehen ist, liegt das an zwei Aminosäureaustauschen beim Hämoglobin des Meerschweinchens. Die Glutaminsäure an Position 30 wird durch ein Threonin ersetzt, das Histidin an Position 50 durch ein Prolin. Dabei vergrößert sich der Abstand zwischen den nächsten Atomen dieser Aminosäuren von 2.62 Å beim Menschen auf 4.25 Å beim Meerschweinchen. Durch das Fehlen dieser Bindung gewinnt die „Switch Region“ an Flexibilität.

Der zweite Unterschied ist in Abbildung 5.10 dargestellt und findet sich auf Position 44 der  $\alpha$  Untereinheit. Im T-Zustand des humanen Hämoglobins liegt das bereits angesprochene His97 auf der Höhe von Pro44. Im Meerschweinchen wird das Pro44 aber durch ein Histidin an dieser Stelle ersetzt. Dies führt zu einer sterischen Hinderung zwischen den beiden Histidinen. Diese sterische Hinderung bewirkt dann wahrscheinlich eine geringere Stabilität des T-Zustandes und damit eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen T-, R- und R2-Zustand zu den sogenannten „relaxed states“ R und R2.

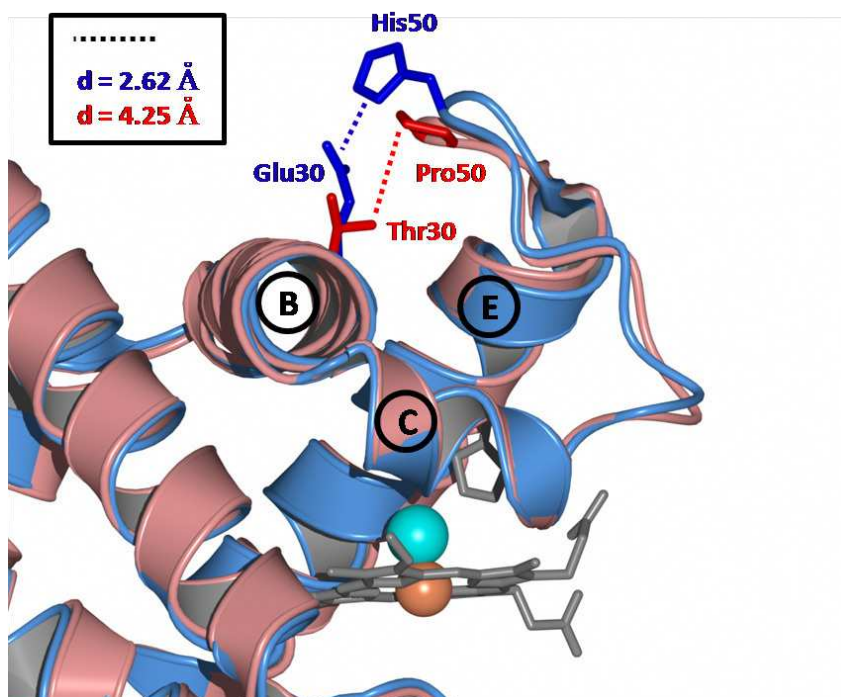


Abbildung 5.9: Austausch an den Positionen 30 und 50 der  $\alpha$ -Untereinheit. Das menschliche Hämoglobin ist in blau dargestellt, das Meerschweinchen-Hämoglobin in rot. Die kürzesten Abstände zwischen den Aminosäuren sind in der jeweiligen Farbe angegeben. Die Salzbrücke zwischen der Glutaminsäure und dem Histidin im Menschen ist beim Meerschweinchen zwischen einem Threonin und einem Prolin nicht möglich. Die „Switch Region“ gewinnt an Flexibilität.

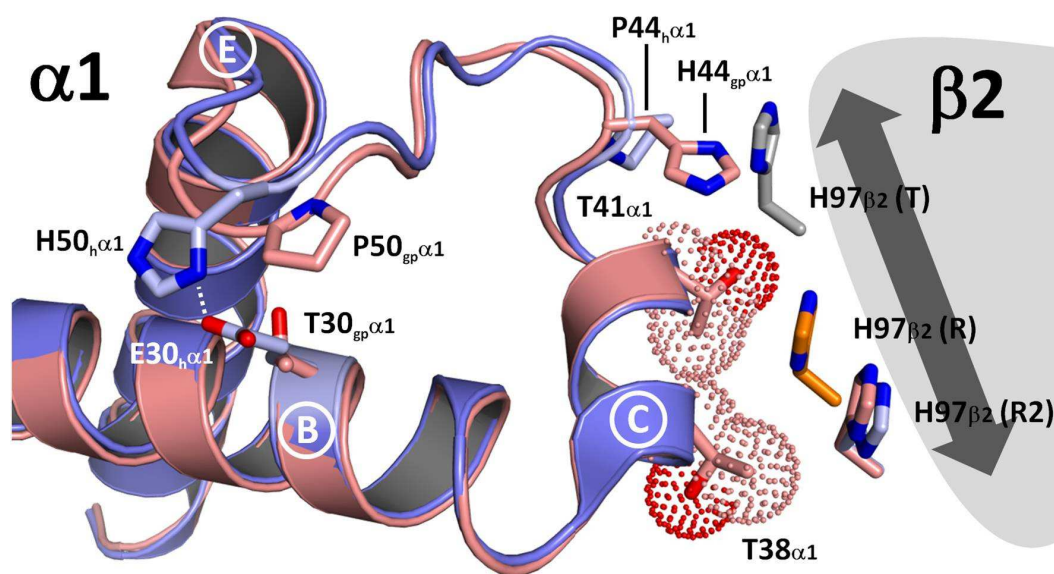


Abbildung 5.10: Die Switch Region in der Übersicht. Die  $\alpha 1$  und  $\beta 2$  Untereinheiten des Meerschweinchen- (rot) und des humanen (blau, 1BBB, [Silva *et al.*, 1992]) Hämoglobins wurden überlagert. Die beteiligten Aminosäuren sind durch Sticks, die Atome dieser Reste nach der Elektronegativität dargestellt. Die Position der  $\beta 2$  Untereinheit ist grau gekennzeichnet. Die Bewegung entlang der Helix C während des Konformationsübergangs ist durch einen grauen Pfeil dargestellt. Die Position vom His97 im Meerschweinchen-Hämoglobin wird rot angezeigt. Zusätzlich wurden die Positionen für das His97 in humanem Hämoglobin im T- (grau, PDB Schlüssel: 1A3N, [Tame & Vallone, 2000]), R- (orange, PDB Schlüssel: 1HHO, [Shaanan, 1983]) und R2-Zustand (blau, PDB Schlüssel: 1BBB, [Silva *et al.*, 1992]) eingezeichnet. Zwischen dem His44 der  $\alpha 1$  und dem His97 der  $\beta 2$  Untereinheit kommt es zu einer sterischen Hinderung, die zu einer geringeren Stabilität des T-Zustands im Meerschweinchen-Hämoglobin führen kann. In dieser Abbildung ist auch die Position der fehlenden Salzbrücke zwischen den Aminosäuren 30 und 50 der  $\alpha$  Untereinheit zu sehen.

## Kapitel 6

# Diskussion: Höhenadaptation im Meerschweinchen-Hämoglobin

### 6.1 Qualität des Datensatzes

In der Abbildung 6.1 ist ein Auszug der Ausgabe des Programms *SFCHECK* zu sehen. Dort werden die Werte, die als Gütekriterien verwendet werden können, nochmals berechnet und angegeben. Alle Werte, die hier angegeben werden, bestätigen die hohe Qualität des gemessenen Datensatzes und eine gute Übereinstimmung des Modells mit den gemessenen Strukturfaktoren. Zum Vergleich liegen, für alle Einträge in der PDB-Datenbank bis zum Jahr 2000, für die diese Werte angegeben wurden, die mittlere Auflösung bei 2.17 Å, der mittlere *R*-Wert bei 0.19 und der mittlere *R<sub>free</sub>*-Wert bei 0.25 [Kleywegt & Jones, 2002].

In der PDB-Datenbank wurden bisher keine Strukturen von Nager-Hämoglobinen hinterlegt<sup>1</sup>. Dies ist bei der großen Anzahl an Hämoglobinstrukturen, die in dieser Datenbank hinterlegt wurden sehr verwunderlich. Eine mögliche Begründung findet sich beim Betrachten des Hämoglobins von zwei der offensichtlichsten Kandidaten für die Untersuchung eines Nager-Hämoglobins: die Hausmaus *Mus musculus* und die Wanderratte *Rattus norvegicus*. Bei diesen beiden Nagern, wie bei vielen anderen, kommt ein für die Strukturaufklärung erschwerender Faktor hinzu. Das Hämoglobin kommt nämlich in verschiedenen Varianten vor. Zum Beispiel sind bei der Hausmaus 5 Isoformen der  $\beta$ -Untereinheit bekannt [Sato *et al.*, 2008], bei der Wanderratte deren 6 [Stein *et al.*, 1971]. Dabei kommen im Blut der Tiere signifikante Anteile verschiedener Isoformen vor [Condò *et al.*, 1981], was vor allem bei der Kristallisation der Hämoglobine sehr störend ist.

Beim Meerschweinchen ist, wie schon in Abschnitt 1.2 erläutert wurde, nur eine Hauptkomponente im Blut zu finden. Die zwei Nebenkomponten kommen nur in geringen Mengen vor. Hierdurch ist der Kristallisationsprozess für das Hämoglobin

---

<sup>1</sup>Die phylogenetische Stellung des Meerschweinchens ist nicht unumstritten [Graur *et al.*, 1991, D'Erchia *et al.*, 1996, Sullivan & Swofford, 1997]. Derzeit geht man allerdings von einer Zuordnung zu den Nagetieren aus [Sullivan & Swofford, 1997].

"Judge not, that you be not judged" Bible, Matthew, ch.7

## Structure Factor Check GPHB

Title: CRYSTAL STRUCTURE OF GUINEA PIG HEMOGLOBIN Date: 26-MAR-09 PDB code: GPHB	
<b>Crystal</b> Cell parameters: a: 83.54 A    b: 89.95 A    c: 82.72 A $\alpha$ : 90.00 $\beta$ : 90.00 $\gamma$ : 90.00 Space group: C 2 2 21	<b>Structure Factors</b> <b>Input</b> Nominal resolution range: 19.6 – 1.67 A Reflections in file: 36376 Unique reflections above 0: 36376 above 1 $\sigma$ : 36373 above 3 $\sigma$ : 34035  <b>SFCHECK</b> Nominal resolution range: 19.6 – 1.67 A <small><sup>05</sup>max. from input data, min. from author<sup>05</sup></small> Used reflections: 36310 Reflections out of resolution: 66 Completeness: 99.7 % R_stand(F) = $\langle \sigma(F) \rangle / \langle F \rangle$ : 0.017 Anisotropic distribution of Structure Factors ratio of eigen values: 1.0000 0.9924 0.9961 B_overall (by Patterson): 20. A <sup>2</sup> Optical resolution: 1.32 A Expected opt. resol. for complete data set: 1.32 A Estimated minimal error: 0.010 A
<b>Model</b> 2537 atoms (229 water molecules) Number of chains: 6 Volume not occupied by model: 28.8 % $\langle B \rangle$ (for atomic model): 12.4 A <sup>2</sup> $\sigma(B)$ : 6.83 A <sup>2</sup> Matthews coefficient: 2.19 Corresponding solvent % : 43.33	<b>Model vs. Structure Factors</b> R-factor for all reflections: 0.185 Correlation factor: 0.940 R-factor: 0.189 for $F > 2.0\sigma$ nom. resolution range: 19.59 – 1.67A reflections used: 36304  Rfree: 0.215 Nfree: 1819 R-factor without free-refl.: 0.188 Non free-reflections: 34485 $\langle u \rangle$ (error in coords by Luzzati plot): 0.166 A Estimated maximal error: 0.086 A DPI: 0.090 A  <b>Scaling</b> Scale: 1.004 Bdiff: -0.46 Anisothermal Scaling (Beta): 0.4949 0.5141 0.5088 0.0000 0.0000 0.0000 Solvent correction – Ks, Bs: 0.900 224.328
<b>Refinement</b> Program: REFMAC 5.5.0072 Nominal resolution range: 19.6 – 1.67 A Reported R-factor: 0.177 Number of reflections used: 34554 Reported Rfree: 0.20 Sigma cut-off: N.A.	

SP5582CK 7.01.10

Abbildung 6.1: Auszug der Ausgabe der Validationssoftware *SFCHECK*. Die angegebenen Werte bestätigen die hohe Qualität des Datensatzes und eine gute Übereinstimmung des Modells mit den Strukturfaktoren.

des Meerschweinchens im Vergleich zu anderen Nagern sicherlich vereinfacht. Dieser Isomorphismus des Hämoglobins in vielen Nagern ist vielleicht einer der Gründe, warum bisher keine Struktur für ein Nager-Hämoglobin hinterlegt wurde.

Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, dass 2009 von Sundaresan, Ramesh und Ponnuswamy eine Hämoglobinstruktur der Hausmaus unter der PDB-Zugriffsnummer 3HRW hinterlegt wurde. Zu dieser Struktur ist allerdings bisher keine weitere Publikation erschienen, womit jegliche Beschreibung der Struktur fehlt.

Da unter den Einträgen für Hämoglobin kein weiteres Nagerhämoglobin vorhanden war, musste bei der Analyse die Struktur mit dem menschlichen Hämoglobin verglichen werden. Insbesondere die Struktur der R2-Konformation ist nur für das menschliche Hämoglobin hinterlegt, wodurch einzig diese Struktur als Referenz verwendet werden konnte. Die Tatsache, dass mit der hier vorgestellten Struktur erstmals ein Nagerhämoglobin in der Datenbank hinterlegt wurde, dürfte sich bei zukünftigen Untersuchungen an diesen Molekülen als sehr hilfreich erweisen.

## 6.2 Warum nicht über die Homologie-Modellierung?

Bei der hohen Anzahl an Hämoglobinstrukturen, die in der PDB-Datenbank hinterlegt sind und bei der hohen Sequenzidentität zwischen diesen Hämoglobinen zwingt sich die Frage auf, ob eine Strukturbestimmung mittels Kristallographie und dem damit verbundenen Aufwand notwendig ist oder ob die Struktur auch über das Verfahren der Homologie-Modellierung hätte gelöst werden können.

Oft sind die Strukturen, die sich aus beiden Methoden ergeben, sehr ähnlich, wobei die Kristallographie natürlich als experimentelle Methode eine größere Gewissheit für das berechnete Modell liefern kann. Um die Ergebnisse beider Methoden vergleichen zu können, wurde mit dem Programm *MODELLER* eine Homologie-Modellierung durchgeführt, bei der, ausgehend von dem für das Molecular Replacement verwendeten Modell des Pferde-Hämoglobins (2DX5), ein Modell für das Hämoglobin des Meerschweinchens berechnet wurde. Außerdem wurde mit dem Programm *YASARA* eine Moleküldynamik-Simulation für das Meerschweinchen-Hämoglobin durchgeführt, simuliert wurden dabei 2 ns mit dem Kraftfeld *YAMBER3* [Krieger *et al.*, 2004].

Das Ziel der beiden Experimente war die Betrachtung des C-Terminus der  $\alpha$ -Ketten. Der Verlauf im Meerschweinchen-Modell entspricht dem Verlauf im humanen Hämoglobin in der R2-Konformation. Der Verlauf bei der Struktur des Pferde-Hämoglobins entspricht der humanen R-Konformation. Wie man in Abbildung 6.2 sehen kann, gibt es in diesem speziellen Fall einen weiteren Vorteil der experimentellen Methode, die Kristallisation erfolgte nämlich in einer unerwarteten Konformation. Die Homologie-Modellierung kann aber eine Änderung der Konformation nicht voraussagen. Aus der Abbildung 6.2 entnimmt man die folgenden drei Einsichten:

1. Mit einer, wie in diesem Fall, naiven Homologie-Modellierung bekommt man die Struktur des Proteins in einer dem humanen R-Zustand ähnlichen Konformation.
2. Bei der Homologie-Modellierung gibt es am C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheiten keinen Unterschied zur Startstruktur.
3. Die Konformation am C-Terminus bleibt auch bei einer Moleküldynamik-Simulation erhalten.

Der erste Punkt ist hierbei selbstverständlich, da ein Startmodell in der R-Konformation für die Homologie-Modellierung vorgegeben wurde. Dies zeigt aber nochmals die Notwendigkeit des Experiments, um neue Einsichten in das untersuchte Molekül zu bekommen. Ohne Experiment hätte man eine Kristallisation im R-Zustand mit dem üblichen Verlauf des C-Terminus erwartet.

Der zweite Punkt deutet darauf hin, dass die Konformation des C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheiten nicht alleine auf isolierte Aminosäureaustausche zurückgeführt werden kann, da solche Unterschiede in der Sequenz zu einer Veränderung in der modellierten Struktur geführt hätten.



Der dritte Punkt zeigt, dass die Veränderung am C-Terminus nicht als Folge der Kristallisation interpretiert werden kann. Es wurde eine wässrige Umgebung simuliert, das heißt eine im Kristall künstlich festgehaltene Konformation hätte sich sehr schnell verändert. In diesem Fall ergaben sich nicht einmal erhöhte B-Faktoren<sup>2</sup> am C-Terminus. Die Konstanz der B-Faktoren am C-Terminus ist auch ein Hinweis dafür, dass auch bei einer längeren Simulationszeit kein Unterschied entstanden wäre.

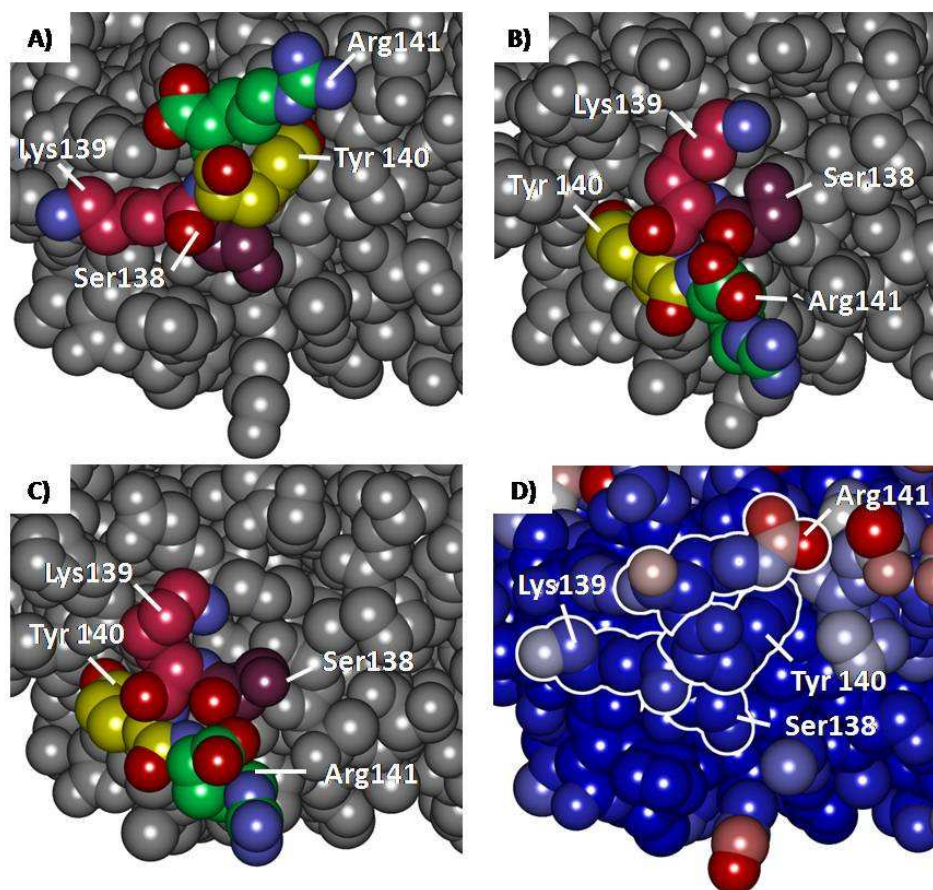


Abbildung 6.2: C-Terminus der  $\alpha$ -Kette. (A) zeigt das Modell vom Meerschweinchen-Hämoglobin, (B) das für das Molecular Replacement verwendete Pferde-Hämoglobin, (C) ein Homologie-Modell basierend auf dem Pferde-Hämoglobin und (D) die Endstruktur einer Moleküldynamik-Simulation über 2 ns. Dabei sind in (A), (B) und (C) die betrachteten C-terminalen Aminosäuren farblich hervorgehoben. In (D) sind die Atome nach ihren B-Faktoren eingefärbt. Weitere Erklärungen im Text.

Diese Überlegungen zeigen, dass eine Homologie Modellierung keinen Hinweis auf

<sup>2</sup>B-Faktoren sind ein Maß für die Beweglichkeit der Atome im Molekül. Erhöhte B-Faktoren hätten hier eine niedrige Stabilität der Konformation angezeigt.

den im vorgestellten Hämoglobin speziellen C-Terminus gegeben hätte. Wie weiter oben erwähnt wird, ist dieser Verlauf des C-Terminus identisch mit dem von humanem Hämoglobin im R2-Zustand. In Abbildung 6.3 wird das Meerschweinchen-Hämoglobin mit den Strukturen des humanen Hämoglobins in der R-, R2- und T-Konformation verglichen. Die Abbildung zeigt das Meerschweinchen-Hämoglobin, welches mit dem jeweiligen Modell überlagert und nach RMSD-Werten eingefärbt wurde. Dieser Vergleich bestätigt, dass die Struktur insgesamt mit der R2-Konformation des humanen Hämoglobins übereinstimmt. Keine Antwort liefern diese Überlegungen allerdings auf die Frage warum die Hämoglobinkristalle des Nagers in der R2-Konformation vorgelegen haben. Dies soll im nächsten Abschnitt erörtert werden.

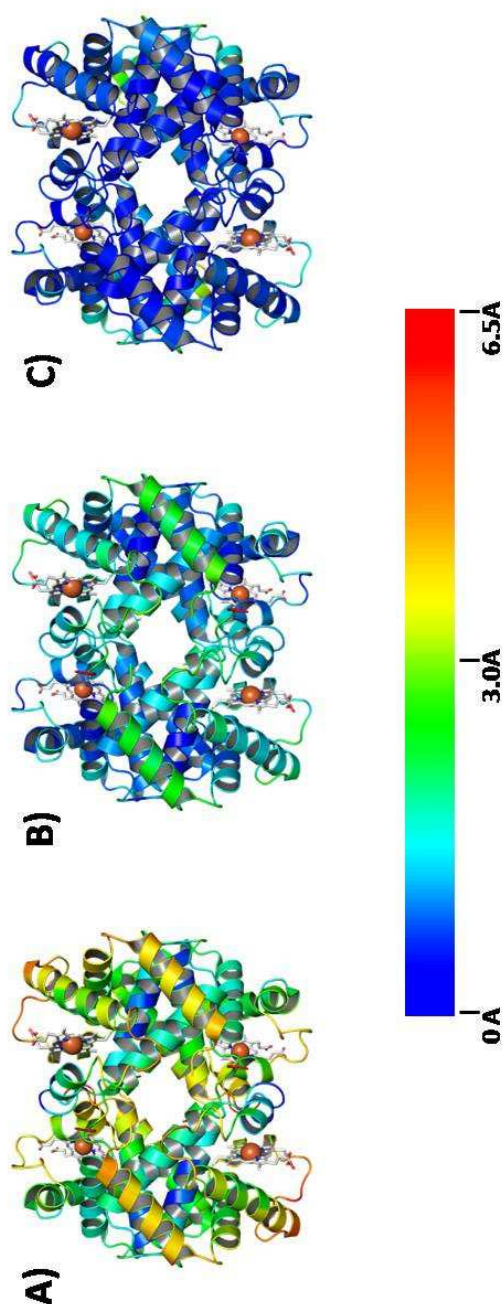


Abbildung 6.3: Vergleich vom *Cavia porcellus*-Hämoglobin mit humanem Hämoglobin. Die Strukturen wurden überlagert, das Hämoglobin dann nach dem RMSD-Wert für die  $C_{\alpha}$ -Atome eingefärbt. In (A) sieht man die Abweichung zum T-Zustand, in (B) zum R-Zustand und in (C) zum R2-Zustand. Die Übereinstimmung ist im dritten Vergleich am größten.

## 6.3 Die Höhenanpassung im Meerschweinchen-Hämoglobin

Das Ziel bei der Untersuchung der Struktur des Hämoglobins des Meerschweinchens war die Identifizierung von Mechanismen der Höhenadaptation. In Vertebraten kann diese Adaptation kurzfristig erfolgen oder sich über einen langen Zeitraum ereignen. Kurzfristige Adaptationsmechanismen erfolgen zumeist über die Anpassung von allosterischen Wechselwirkungen im Blut [Weber, 2007], Langzeitanpassungen hingegen beruhen auf genetischen Veränderungen, die meistens eine Anpassung des Hämoglobin-Moleküls zur Folge haben.

Man findet in diesem Zusammenhang verschiedene Mechanismen bei welchen (wie bei denen in Abschnitt 1.2 erwähnten Neuweltkamelen) durch Mutationen an der BPG-Bindungsstelle die effektive Sauerstoffaffinität des Hämoglobins erhöht wird [Bunn, 1971]. Die Höhenadaptation kann auch über multiple Hämoglobin-Varianten mit verschiedenen Sauerstoffaffinitäten gesteuert werden, wie im Falle der Hirschmaus (*Peromyscus maniculatus*) [Storz *et al.*, 2007]. Auch über Veränderungen an Kontaktstellen zwischen einzelnen Untereinheiten des Hämoglobin-Moleküls wurde schon berichtet, wie zum Beispiel bei der in Abschnitt 1.2 erwähnten Streifengans [Zhang *et al.*, 1996]. Bei diesem Hämoglobin wird über eine Mutation an der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\beta 1$  der T-Zustand destabilisiert.

Wie schon in Kapitel 1 beschrieben, ist beim Hämoglobin des Meerschweinchens die erhöhte Sauerstoffaffinität auch bei Tieren nachweisbar, die auf Meeresebene gezüchtet werden. Damit muss auch in diesem Fall im Laufe der Evolution eine Langzeitanpassung stattgefunden haben, die sich anhand der Struktur des Hämoglobin-Moleküls erklären lässt. Es wurde schon angesprochen, dass die Kristallisation im R2-Zustand nicht zu erwarten war. In diesem Zusammenhang wurden Anhaltspunkte bezüglich einer Stabilisierung der R2-Konformation beziehungsweise einer Destabilisierung der T-Konformation gefunden. Dies könnte einen Mechanismus erklären, ähnlich dem der Streifengans, bei dem das Konformationsgleichgewicht zu Gunsten der hochaffinen Form verschoben wird.

Die Stabilisierung der R2-Konformation beziehungsweise die Destabilisierung der T-Konformation, sollen deshalb im Folgenden im Zusammenhang mit der Höhenadaptation des Meerschweinchens betrachtet werden.

### 6.3.1 Stabilisierung der R2-Konformation

Bisher wurde die Kristallisation im R2-Zustand nur beobachtet, wenn die Hämoglobinkristalle unter Niedrig-Salz Bedingungen gezogen wurden<sup>3</sup>. Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei diesem Zustand um den physiologisch relevanten Endzustand des oxygenierten Hämoglobins handeln könnte und dass der R-Zustand nur ein Zwischenzustand ist, den das Protein durch die Hoch-Salz Bedingungen bei der

<sup>3</sup>In [Safó *et al.*, 2004] wird von einer Ausnahme berichtet, allerdings sind auch diese Bedingungen sehr verschieden von den hier verwendeten.

Kristallisation einnimmt [Srinivasan & Rose, 1994, Schumacher *et al.*, 1997]. Inzwischen wurden noch weitere Konformationen entdeckt, so dass sich die in Abbildung 6.4 wiedergegebene Übersicht ergibt [Safó & Abraham, 2005].

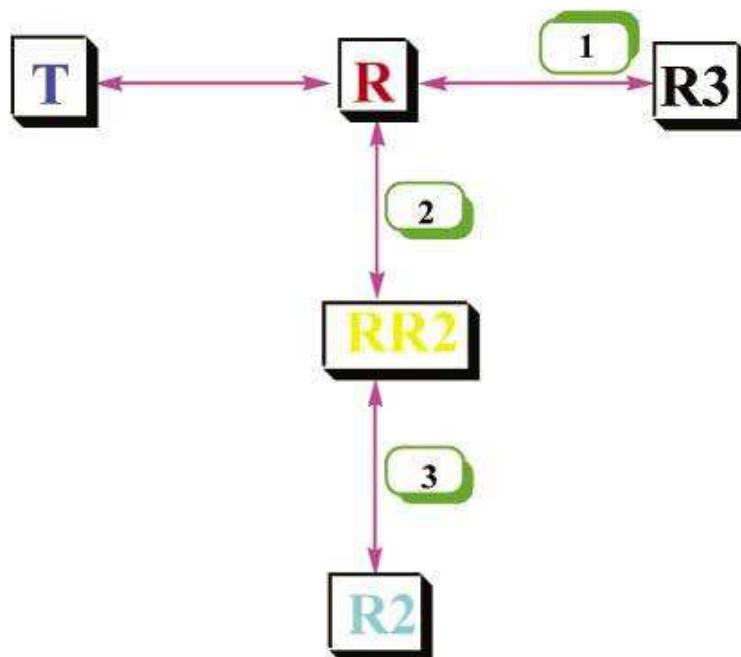


Abbildung 6.4: Schematische Übersicht der Konformationsübergänge im Hämoglobin. Sowohl R2 als auch R3 sind dabei als Endzustände eines allosterischen Signalweges anzusehen. Als Übergangs-Struktur dient in beiden Fällen die R-Konformation, beim Übergang zum R2-Zustand ist eine intermediäre Quartärstruktur, der RR2-Zustand zwischengeschaltet. Diese Abbildung wurde aus [Safó & Abraham, 2005] entnommen.

Durch diese Vielzahl an möglichen Quartärstrukturen lassen sich die vielfältigen Effektormechanismen beim Hämoglobin eher verstehen als mit einem Modell mit nur 2 Zuständen [Jenkins *et al.*, 2009]. Übersichtlicher werden die Betrachtungen durch diese Vielzahl an Modellen allerdings nicht. Im weiteren Verlauf werden weiterhin nur die menschlichen T-, R- und R2-Zustände thematisiert, da diese für eine vergleichende Analyse des hier vorgestellten Hämoglobins hinreichend sind.

Die Tatsache, dass das Meerschweinchen-Hämoglobin in der hier vorgestellten Arbeit trotz der Hoch-Salz Bedingungen im R2-Zustand kristallisiert, könnte darauf hinweisen, dass im Meerschweinchen der R2-Zustand die physiologisch relevante der beiden R-Konformationen ist. Während man im menschlichen Hämoglobin durch NMR Experimente zeigen konnte, dass eine ausgeglichene Verteilung der R- und R2-Konformationen vorliegt [Lukin *et al.*, 2003], scheint hier also die Verteilung von R2- und R-Zustand mehr zum R2-Zustand zu tendieren.

In der hier vorgestellten Struktur konnte ein Faktor gefunden werden, der eine

höhere Stabilität und damit auch eine höhere Wahrscheinlichkeit der Kristallisation des R2-Zustandes erklären könnte: die in Kapitel 5 Abschnitt 5.6 gezeigten Salzbrückenbindungen zwischen den  $\beta$ -Untereinheiten. Die Abstände zwischen dem Valin an erster Position der einen  $\beta$ -Untereinheit und dem des Histidins an letzter Position der anderen  $\beta$ -Untereinheit sind im Meerschweinchen durch eine leicht unterschiedliche Gesamtkonformation des Moleküls geringer als im menschlichen Hämoglobin im R2-Zustand, wo diese Bindungen nicht auftreten. Der Abstand beträgt beim menschlichen Hämoglobin 8.7 Å, beim Meerschweinchen 2.6 Å. Dieser Unterschied in der Konformation konnte nicht auf eine oder mehrere spezifische Aminosäuren zurückgeführt werden, so dass die Ursache für diese Bindung ungeklärt bleibt. Nichtsdestotrotz können diese Salzbrücken als wichtiger Faktor für die erhöhte Stabilität des R2-Zustandes im Hämoglobin des Meerschweinchens angesehen werden.

### 6.3.2 Destabilisierung der T-Konformation

Wie in Abschnitt 5.7 beschrieben wurde, finden sich über die Stabilisierung des R2-Zustandes hinaus noch Hinweise auf eine Destabilisierung des T-Zustandes. Es handelt sich dabei um Aminosäureaustausche an zwei wichtigen Positionen der „Switch Region“ des Hämoglobins. Der erste Austausch an den Stellen 30 (Glu→Thr) und 50 (His →Pro) in der  $\alpha$ -Untereinheit verhindert die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen diesen zwei Aminosäuren. Die fehlende Bindung zwischen den Positionen 30 und 50 und der Bereich, der dadurch an Flexibilität gewinnen könnte, wurde in Abbildung 5.10 im letzten Kapitel gezeigt.

Der Abstand von 4.3 Å zwischen dem Thr30 und dem Pro50 und vor allem die Ladungseigenschaften der Aminosäuren schließen eine Ionenbindung aus. In der Folge kann die Schleife, die zwischen diesen beiden Positionen liegt an Flexibilität gewinnen. Die Auswirkungen dieser höheren Flexibilität sind allerdings schwer abzuschätzen. Die Bewegung vom His97 der  $\beta$ -Untereinheit entlang der C-Helix der  $\alpha$ -Untereinheit sollte durch die größere Beweglichkeit begünstigt werden. Da dies allerdings für beide Richtungen gilt, kann so keine Präferenz für eine Konformation erklärt werden.

Eine ähnliche Mutation (30:Glu→Gln und 50:His→Pro) ist im Hämoglobin der Ratte (*Rattus norvegicus*, [Chua *et al.*, 1975]) zu finden, wo allerdings keine erhöhte Sauerstoffaffinität beschrieben wurde. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass der Effekt beim Hämoglobin der Ratte vorhanden ist und an anderer Stelle durch einen anderen Austausch ausgeglichen wird.

Bestätigt wird die Hypothese durch Beobachtungen an der Hirschmaus. Es wird in [Storz *et al.*, 2007] und [Storz *et al.*, 2008] beschrieben, dass dieser Nager sich an verschiedene Bedingungen angepasst hat, indem es verschiedene Hämoglobine mit unterschiedlichen Sauerstoffaffinitäten exprimiert. Dort wird gezeigt, dass die Mutation von Histidin zum Prolin an der korrespondierenden Stelle mit einer höheren Sauerstoffaffinität des Hämoglobins korreliert. Obwohl der genaue Mechanismus noch unklar ist, ist dies ein deutliches Indiz dafür, dass diese Mutation auch beim Meerschweinchen zu einer erhöhten Sauerstoffaffinität führt.



Der zweite Austausch, der in Abschnitt 5.7 beschrieben wurde, ist der des Prolins 44 der  $\alpha$ -Untereinheit im humanen Hämoglobin, das beim Meerschweinchen durch ein Histidin ersetzt wird. Wie in Abbildung 6.5(A) zu sehen ist, liegt beim humanen Hämoglobin im T-Zustand das Histidin 97 der  $\beta$ -Untereinheit gegenüber des angesprochenen Prolins an Position 44. Im Vergleich zum Prolin nimmt das Histidin ein deutlich größeres Volumen ein wodurch eine sterische Abstoßung mit dem His97 entsteht.

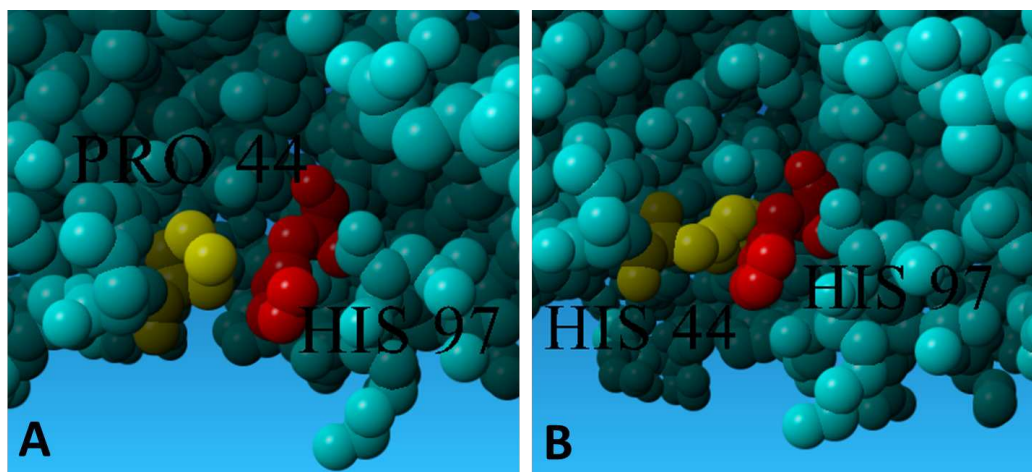


Abbildung 6.5: Position des His97 im humanen Hämoglobin in der T-Konformation. (A): Das His97 der  $\beta$  Untereinheit liegt gegenüber dem Pro44 auf der  $\alpha$ -Kette. (B): Das Prolin wurde hier im Modell durch ein Histidin ersetzt, die resultierende sterische Hinderung ist offensichtlich.

Stellt man sich also das Hämoglobin des Meerschweinchens, das ein Histidin an Stelle des Prolins besitzt, in der T-Konformation des humanen Hämoglobins vor (wie in Abbildung 6.5(B) konstruiert), so ist eine Positionierung des His $\beta$ 97 analog zum humanen Hämoglobin aufgrund des His $\alpha$ 44 nicht möglich. Für das Hämoglobin des Meerschweinchens bedeutet dies eine Destabilisierung des T-Zustandes. Diese Hypothese wird durch Beobachtungen an menschlichen Hämoglobin-Mutanten bestätigt. Sowohl die Milledgeville- (Pro44  $\rightarrow$  Leu) und Kawachi-Mutanten (Pro44  $\rightarrow$  Arg) zeigen eine stark erhöhte Sauerstoffaffinität [Honig *et al.*, 1980, Harano *et al.*, 1982]. Während diese Position sonst im Hämoglobin von Vertebraten stark konserviert ist, findet sich beim Hämoglobin der Ratte und von zahlreichen Fischen eine Mutation vom Prolin zu Serin ohne dass von einer erhöhten Sauerstoffaffinität berichtet wurde.

Diese Beobachtungen lassen sich nun leicht auf die formulierte Hypothese zurückführen: Bei der Ratte wird das Prolin durch ein Serin, also einer relativ kleinen Aminosäure ersetzt. Dadurch ist keine sterische Hinderung zu erwarten. Bei den zwei humanen Mutanten stehen mit Leucin und Arginin, ähnlich wie beim Meer-

schweinchen, große Aminosäuren an der Stelle des Prolins, was zu einer sterischen Hinderung führt. Diese Betrachtungen bestätigen deshalb die Annahme, dass die T-Konformation im Hämoglobin des Meerschweinchens destabilisiert ist.

### 6.3.3 Die resultierende Höhenadaptation

Durch die Bestimmung der Kristallstruktur des Meerschweinchen-Hämoglobins konnte gezeigt werden, dass im Hämoglobin des Meerschweinchens der T-Zustand destabilisiert ist, während der R2-Zustand stabilisiert wird.

Die Folge ist die Kristallisation des Hämoglobins im eher untypischen R2-Zustand. Diese Stabilisierung des R2-Zustandes und Destabilisierung des T-Zustandes führt aber auch zu einer Verschiebung des Konformations-Gleichgewichts zu den „relaxed“-Zuständen R und R2. Diese besitzen eine höhere Sauerstoffaffinität als der T-Zustand. Daraus folgt eine erhöhte Affinität im Blut des Meerschweinchens.

Die funktionellen Eigenschaften des R2-Zustandes wurden bisher nie ausführlich beschrieben. Damit muss für die hier dargestellte Hypothese angenommen werden, dass das Hämoglobin in der R2-Konformation eine höhere Sauerstoffaffinität besitzt als in der T-Konformation. Dies wurde noch nicht gezeigt, ist jedoch sehr wahrscheinlich, wenn man den R2-Zustand als Endzustand des allosterischen Signalweges ansieht, wie in Abbildung 6.4 schematisiert. Die Tatsache, dass beim Menschen für beladenes Hämoglobin eine ausgeglichene Verteilung der beiden Konformationen nachgewiesen wurde ([Lukin *et al.*, 2003]), spricht ebenfalls für diese Annahme.



## Kapitel 7

# Ergebnisse: *Pandinus* *imperator*-Hämocyanin

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung des 24-meren Hämocyanins aus dem Skorpion *Pandinus imperator* vorgestellt.

### 7.1 Kristalle

Es gab bisher für dieses oder ähnlich große Hämocyanine keine Beschreibung von Bedingungen, bei denen eine Kristallisation erfolgt wäre. Bisher wurden erfolgreiche Strukturuntersuchungen mittels Kristallographie nur an Untereinheiten und nie an nativen multimeren Hämocyaninen, die größer als Hexamere waren, durchgeführt.

Unter den bisher publizierten Strukturen befindet sich das Hexamer des 48-meren Hämocyanins der kalifornischen Languste *Panulirus interruptus* [Gaykema *et al.*, 1984, Volbeda & Hol, 1989] und ein Homohexamer aus der Untereinheit 2 des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* [Hazes *et al.*, 1993, Magnus *et al.*, 1991, Magnus *et al.*, 1994].

Die Bedingungen aus diesen Untersuchungen führten nicht zur Kristallisation des Hämocyanins aus *Pandinus imperator*. Deshalb wurde das Screening nach geeigneten Bedingungen sehr breit angesetzt. Dazu wurde parallel zu den Screening-Versuchen in Mainz ein sogenanntes „high throughput screening“ am Hauptmann-Woodward Institute in Buffalo (USA) durchgeführt. Diese Art des Screenings ist weitgehend automatisiert [Luft *et al.*, 2003] und erlaubt es mit einer relativ geringen Probenmenge ( $\approx 10$  mg Protein) insgesamt 1500 verschiedene Bedingungen zu testen [Cumbaa *et al.*, 2003].

Beispiele für erfolgreiche Kristallisationsansätze sind in Abbildung 7.1 dargestellt. Wie schon bei dieser Zusammenfassung zu sehen ist, sind verschiedene Kristallformen abhängig von den Bedingungen aufgetaucht. Außerdem zeigt Abbildung 7.1, dass die Oberflächen der Kristalle nicht so glatt sind, wie die vorgestellten Hämoglobinkristalle. Dies weist optisch schon auf eine schlechtere Eignung der Kristalle für Streuexperimente hin. Bei den Bildern der Ansätze des „high throughput scree-

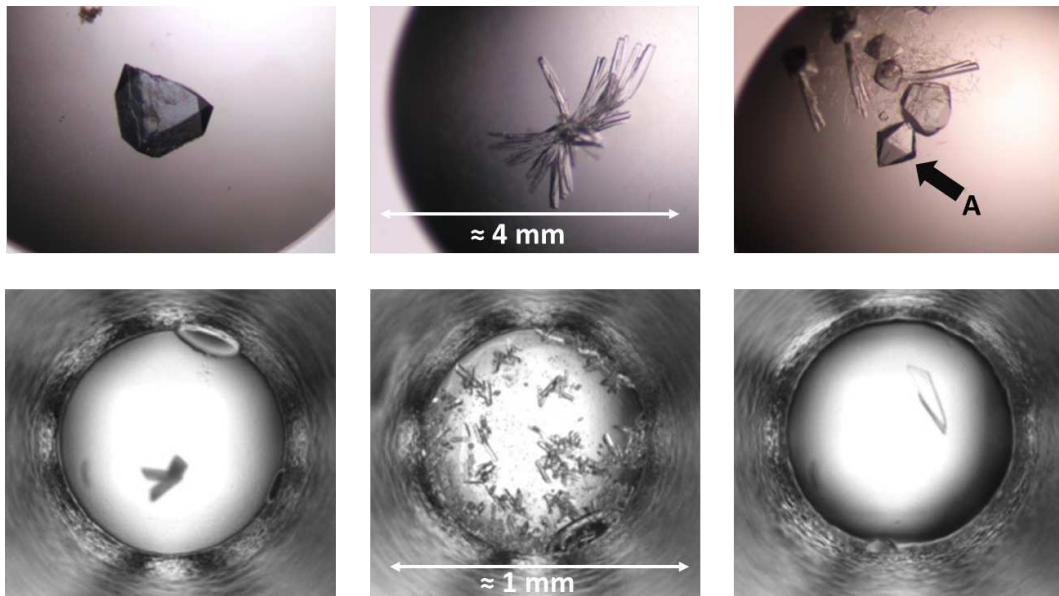


Abbildung 7.1: Auswahl erfolgreicher Kristallisationsansätze. In der oberen Reihe sind Ergebnisse aus Experimenten, welche in Mainz durchgeführt wurden, in der unteren Reihe sind Ergebnisse des „high throughput screening“ in Buffalo zu sehen (anhand der Skala ist zu erkennen, dass deutlich kleinere Tropfen verwendet wurden). Diese Abbildung zeigt, wie unterschiedlich die Kristallformen für das Hämocyanin sind. Geeignet für spätere Messungen waren Kristalle mit makellosen Oberflächen, wie zum Beispiel der mit dem Buchstaben A markierte Kristall im oberen rechten Bild. An dieser Abbildung wird auch die Schwäche des „high throughput screening“ offensichtlich: Es stehen nur die Bilder zur Verfügung, nicht die Ansätze. Dadurch wird es sehr schwer zum Beispiel zwischen Protein- und Salzkristallen zu unterscheiden.

ning“ aus Buffalo ist außerdem die Schwäche dieses Verfahrens erkennbar. Da nur die Bilder, nicht aber die Ansätze selbst, zur Verfügung stehen, ist die Auswertung des Screenings schwierig. Es ist zum Beispiel nicht möglich eine andere Orientierung bezüglich der Lichtquelle zu wählen oder Tests durchzuführen, um zwischen Salz- und Proteinkristallen zu unterscheiden.

Eine Bedingung für das Kristallwachstum wurde gefunden bei 1 M NaCl, 2 % PEG 6000,  $c_{prot} = 20$  mg/ml. Dabei ergaben sich Kristalle ähnlich dem in Abbildung 7.2 gezeigten Kristall. Die Konzentration an Poly-Ethylen-Glykol bei diesen Bedingungen ist allerdings nicht geeignet, um den Kristall vor Schäden beim späteren Schockgefrieren zu schützen. Es konnten auch mit anderen Kryoprotektanten keine geeigneten Kristalle gezogen werden. Für die folgenden Messungen wurde deshalb nachträglich ein Soaking in Glycerin durchgeführt.

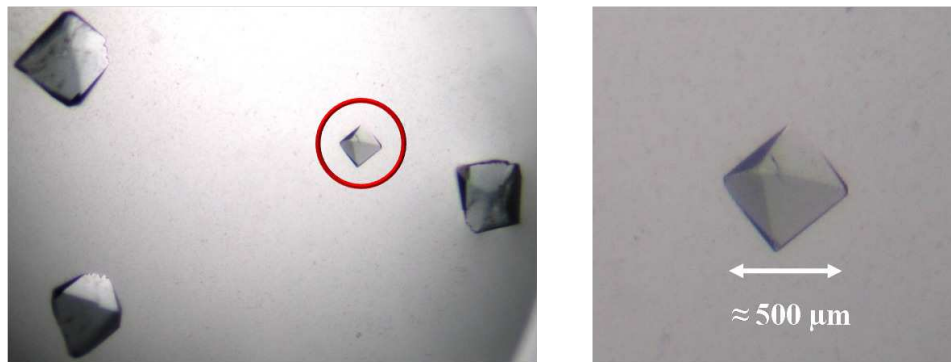


Abbildung 7.2: Kristalle, gewachsen in einer Lösung aus 1 M NaCL und 2 % PEG 6000. Links sind mehrere Kristalle aus diesem Ansatz zu sehen, der eingekreiste Kristall ist rechts nochmals gesondert dargestellt. Dieser Kristall wurde für die weiteren Experimente verwendet.

## 7.2 Messung der Streuamplituden

Es wurden verschiedene Kristalle auf ihr Streuvermögen hin getestet. Mit einem Kristall konnte ein Datensatz mit ausreichender Qualität für eine weitere Auswertung gemessen werden. Dieser Datensatz wurde bei 3 verschiedenen Detektorabständen aufgenommen: 250 mm, 350 mm und 2 Sätze bei 400 mm. Bei der Skalierung der Datensätze aufeinander, zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen den 2 Datensätzen bei 400 mm und dem Datensatz bei 350 mm. Die Messung bei 250 mm zeigte eine zu geringe Korrelation zu den anderen Datensätzen und konnte somit nicht skaliert und verwendet werden. Die bei der Messung verwendeten Parameter sind in der folgenden Tabelle 7.1 zusammengefasst.

Datensatz	350 mm	400 mm D1	400 mm D2
Bilder	65	106	63
Belichtungszeit p. Bild [s]	1200	2400	2400
Auflösung des Detektors	2300 × 2300	3450 × 3450	3450 × 3450
$\delta\varphi$ [deg]	0.75	1.0	1.0
$\varphi$ Gesamt [deg]	48.75	106.00	63.00

Tabelle 7.1: Gewählte Parameter bei der Messung der Streuung der *Pandinus imperator*-Hämocyanin Kristalle. Diese Werte wurden bei den 3 in der Folge vorgestellten Datensätzen verwendet. Der Kristall wurde auch bei einem Abstand von 250 mm gemessen, diese Messung konnte jedoch nicht verwendet werden.

Die Abbildung 7.3 zeigt als Beispiel für diese Messungen ein typisches Streubild bei einem Kristall-Detektor-Abstand von 250 mm. Klare Reflexe sind bis ungefähr 6.0 Å zu erkennen. Der Untergrund auf den Streubildern ist, aufgrund der deutlich längeren Belichtungszeit, höher als es bei den vorher vorgestellten Messungen an Hämoglobinkristallen der Fall war. In der unteren Hälfte des Bildes ist der Schatten der Halterung des Primärstrahlblockers zu sehen. Dadurch wird diese Detektorfläche zwar für die Messung unbrauchbar, in diesem Auflösungsbereich konnten bei diesen Kristallen allerdings ohnehin keine Reflexe nachgewiesen werden. An dieser Stelle könnte die Messung allerdings optimiert werden, indem ein kleinerer Primärstrahlblocker eingesetzt wird. Entscheidend war bei den Messungen ein möglichst großer Abstand zwischen dem Kristall und dem Primärstrahlblocker, da aufgrund der sehr großen Einheitszelle viele Reflexe im inneren Bereich gemessen werden mussten. In der folgenden Abbildung 7.4 ist eine Aufnahme des selben Kristalls bei einem Abstand von 350 mm zwischen dem Kristall und dem Detektor zu sehen. Bei diesem Abstand ist der Auflösungsbereich, in dem der Schatten der Primärstrahlblocker-Halterung bei 250 mm zu sehen war nun nicht mehr auf der Detektorfläche.

Aus der Auswertung dieser Datensätze ergibt sich eine Einheitszelle mit der Raumgruppe Nr. 5 (C121), mit den Parametern:  $a = 311.61$   $b = 246.58$   $c = 251.10$   $\alpha = 90.00$   $\beta = 90.02$   $\gamma = 90.00$ . Die Statistik für diesen Datensatz ist in Tabelle 7.2 angegeben. Es wurden Reflexe bis zu einer Auflösung von 6.0 Å gemessen, allerdings reicht die Statistik nicht aus, um die Reflexe bis zu dieser Auflösungs-

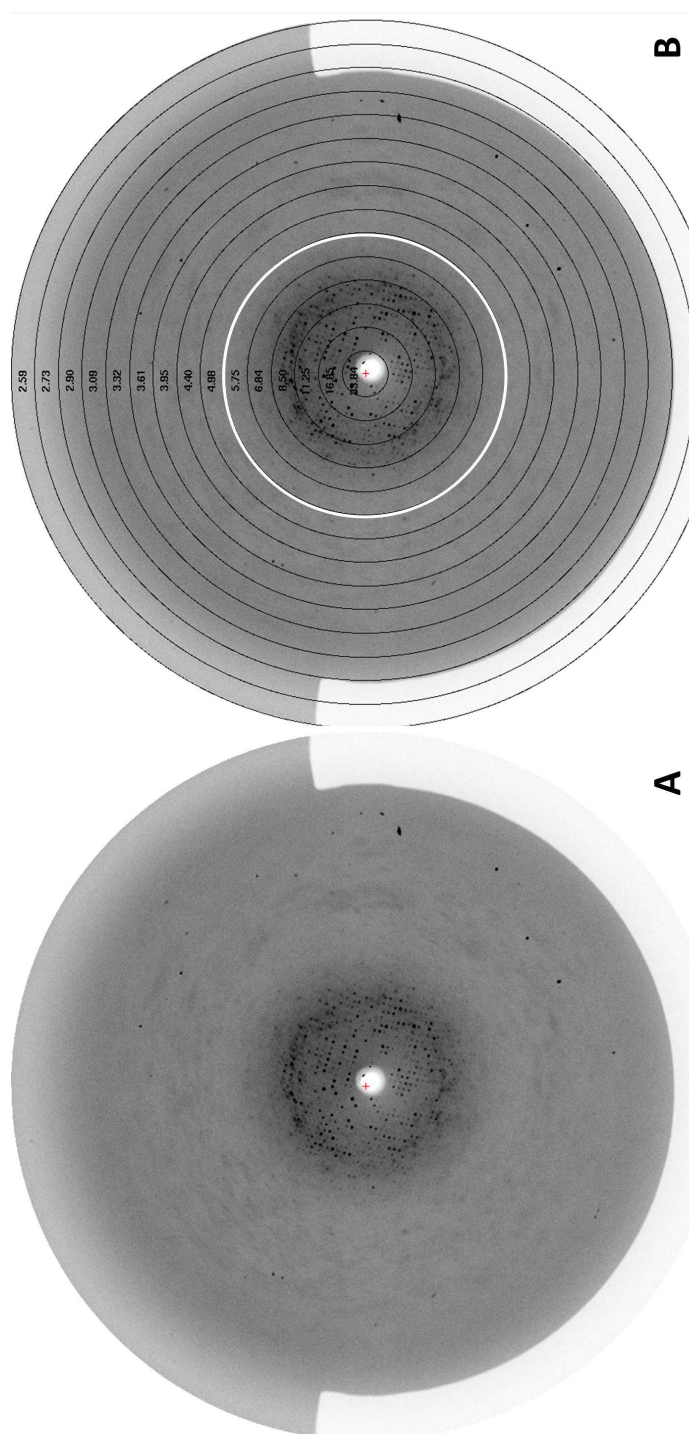


Abbildung 7.3: Eine exemplarische Aufnahme aus den Messungen an Kristallen des Hämocyanins des Skorpions *Pandinus imperator* bei einem Detektor-Abstand von 250 mm. (A) zeigt das Streubild ohne, (B) mit Auflösungsringen. Reflexe sind auf den Aufnahmen bis zu einem Auflösungsbereich von circa 6 Å zu erkennen. Der entsprechende nächste Auflösungsring bei 5.75 Å ist in (B) weiß markiert. In der unteren Bildhälfte ist der Schatten der Halterung des Primärstrahlblockers zu erkennen.

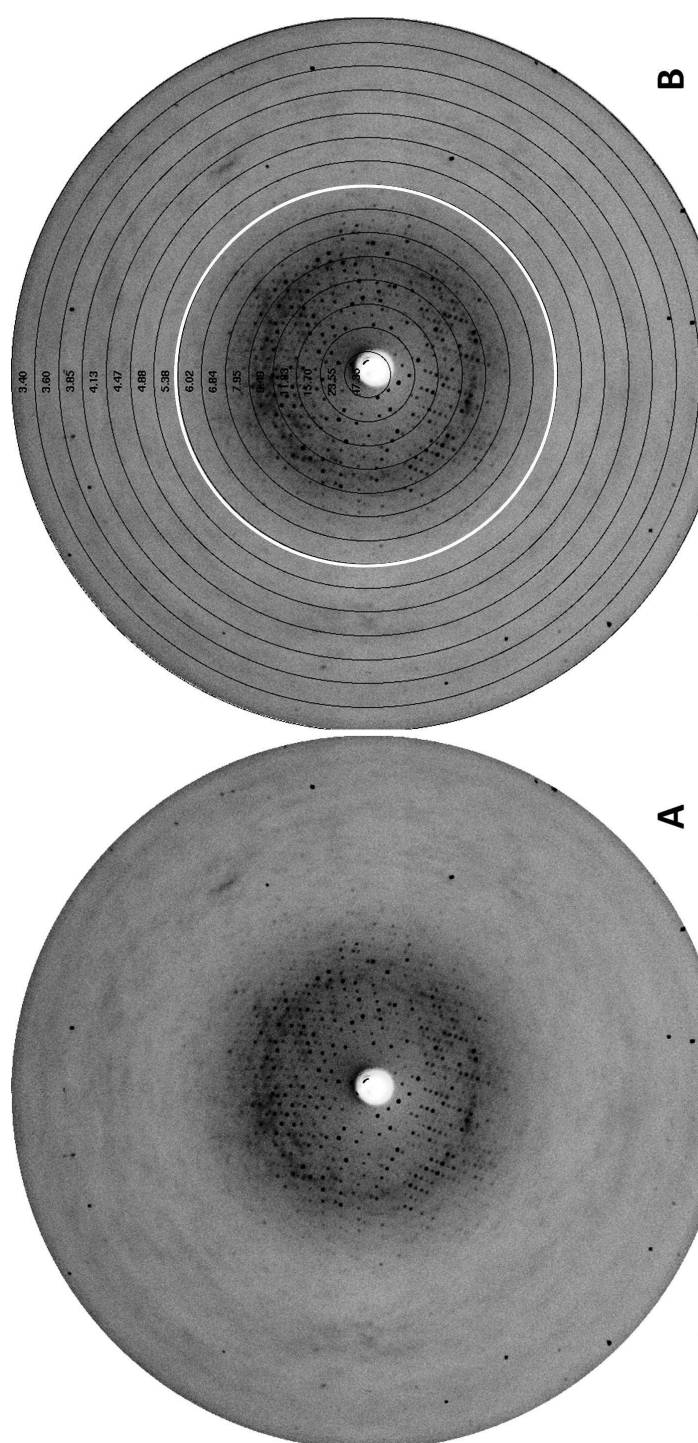


Abbildung 7.4: Eine weitere exemplarische Aufnahme aus den Messungen an Kristallen des Hämocyanins des Skorpions *Pandinus imperator* bei einem Detektor-Abstand von 350 mm. (A) zeigt das Streubild ohne, (B) mit Auflösungsringen. Da es sich um den selben Kristall wie bei der vorangehenden Abbildung handelt, waren auch hier Reflexe bis zu einer Auflösung von circa 6 Å zu erkennen. Dementsprechend wurde in (B) der Auflösungsring bei 6.05 Å weiß markiert.

grenze zu verwenden. Die Auflösungsgrenze wurde nach dem  $I/\sigma \geq 2$ -Kriterium gewählt. Mit diesem Kriterium ergibt sich eine maximale Auflösung von 6.5 Å. Die letzte Auflösungsschale enthält die Reflexe in einem Auflösungsbereich von 6.7 bis 6.5 Å.

Die relativ hohen  $R_{merged}$ -Werte<sup>1</sup> zeigen an, dass die Qualität des Datensatzes nicht optimal ist, was aufgrund der Größe des Proteins und der daraus folgenden hohen Empfindlichkeit der Kristalle gegenüber Strahlenschäden zu erwarten war. Bei einem solchen Datensatz kann es hilfreich sein, nicht alle Reflexe zu verwenden, sondern nur solche Reflexe, die mit ausreichender Statistik gemessen wurden. Mit dem Programm *XDS* kann dies durchgeführt werden, indem Reflexe über das Signal zu Untergrund Verhältnis, angegeben als  $I/\sigma$ , separiert werden. Durch diese Vorgehensweise verbessern sich die  $R_{merged}$ -Werte, die Vollständigkeit („Completeness“) wird allerdings geringer. In den weiteren Schritten der Auswertung wurde zwar der Standardwert von *XDS* verwendet ( $I/\sigma \geq -3$ ), ein zweites mtz-file mit einer strengerer Bedingung ( $I/\sigma \geq 0$ ) wurde jedoch regelmäßig verwendet, um die Ergebnisse zu kontrollieren. In Tabelle 7.2 sind deshalb die Statistiken für beide Bedingungen in separaten Spalten angegeben.

	$I/\sigma \geq -3$	$I/\sigma \geq 0$
Wellenlänge	1.54 Å	
Raumgruppe	C121	
Auflösung (Hoch)	26.8-6.5 Å (6.7-6.5 Å)	
Anzahl der Reflexionen	36109 (2694)	31547 (2113)
$R_{merged}$	0.18 (0.76)	0.16 (0.55)
$I/\sigma(I)$	7.49 (2.04)	8.72 (2.83)
completeness	97.3 % (99.2) %	85.0 % (55.0) %

Tabelle 7.2: Statistik für den vorgestellten Datensatz an einem Kristall des Hämocyanins aus dem Skorpion *Pandinus imperator*. In Klammern angegeben sind die Werte für die letzte Auflösungsschale.

Wie in dieser Tabelle zu sehen ist, verbessern sich auch hier die  $R_{merged}$ -Werte wie erwartet von 0.18 auf 0.16 für den gesamten Datensatz und von 0.76 auf 0.55 für die letzte Auflösungsschale. Gleichzeitig fällt die Vollständigkeit deutlich von 97.3 auf 85.0 % insgesamt, beziehungsweise von 99.2 auf 55.0 % in der letzten Auflösungsschale. Legt man das Auswahlkriterium noch stärker aus, wird die Vollständigkeit so gering, dass der Datensatz nicht sinnvoll ausgewertet werden kann. Bei einem Ausschlußkriterium von  $I/\sigma \geq 3$  werden zum Beispiel nur noch knapp über 20 % der theoretisch messbaren Reflexe tatsächlich erfasst.

<sup>1</sup>Die Definition des  $R_{merged}$ -Wertes befindet sich auf Seite 23 in Abschnitt 2.8.

## 7.3 Molecular Replacement

Die Phasenbestimmung wurde auch in diesem Fall über Molecular Replacement mit dem Programm *PHASER* durchgeführt. Als Referenzstruktur wurde das Modell 3IXV verwendet, bei dem das 24-mer Hämocyanin aus *Pandinus imperator* mittels Kryo-Elektronenmikroskopie aufgelöst wurde. Bei diesem Modell handelt es sich ebenfalls um das 24-mer *Pandinus imperator*-Hämocyanin in der oxygenierten Form. Allerdings besteht das Modell aus 24 in der Sequenz identischen Untereinheiten. Die Sequenz dieser Untereinheit entspricht der Untereinheit As6 eines anderen Skorpions, *Androctonus australis* [Buzy *et al.*, 1995].

Die Vorgabe von a priori Information beim Molecular Replacement kann leicht zu einem Bias in der gelösten Struktur führen, deshalb ist es sinnvoll bei diesem Schritt ein Modell mit möglichst wenig Information zu verwenden. Um das zu erreichen wurden zwei Veränderungen an der Referenzstruktur durchgeführt:

- Es wurde nur das Dodekamer verwendet, damit die Anordnung des 24-mers nicht vorgegeben wird, sondern sich aus der Orientierung der Dodecamere in der Einheitszelle ergibt.
- Mit Hilfe des *CCP4*-Programms *TRUNCATE* wurden alle Aminosäuren in Alanin umgewandelt.

Nach diesen Manipulationen wurde folglich ein Dodekamer aus 12 Poly-Alanin Ketten identischer Länge als Testmolekül für das Molecular Replacement verwendet<sup>2</sup>.

Der Matthews Koeffizient für dieses Ensemble ergab  $2.79 \frac{\text{\AA}^3}{\text{Da}}$ . Dieser Wert entspricht einem Lösungsmittelgehalt des Kristalls von 56 %. Der R-Faktor lag nach dem Molecular Replacement bei 0.43. Der Wert ist sehr hoch und deutet auf eine geringe Korrelation zwischen Modell und Datensatz hin. Allerdings ist zu bedenken, dass bei der erreichten Auflösung von 6.5 Å ein hoher R-Faktor zu erwarten war. Dieser Wert kann nicht mit R-Werten von Strukturauflösungen bei höherer Auflösung verglichen werden, da es eine Abhängigkeit zwischen der Auflösung und dem R-Wert gibt, wie später in Abschnitt 8.3 beschrieben wird. Insgesamt kann die Lösung also trotz des hohen R-Wertes als korrekt angesehen werden.

Das Ergebnis des Molecular Replacement wurde anschließend mit dem Programm *COOT* überprüft und es war zu erkennen, dass Modell und Dichte im allgemeinen gut übereinstimmen. Über Rigid-body Refinement wurden die einzelnen Untereinheiten als Ganzes an die Streudaten angepasst, wodurch sich eine leichte Verbesserung des Modells auf einen R-Wert von 0.41 erreichen ließ. Es wurde in diesem Stadium „nur“ ein Rigid-body Refinement gemacht, da zu diesem Zeitpunkt noch die Poly-Alanin Ketten verwendet wurden. Zunächst wurde also nur die Orientierung der einzelnen Untereinheiten innerhalb des 24-meren Moleküls optimiert. Für

---

<sup>2</sup>Die Durchführung des Molecular Replacement mit einem Hexamer als Testmolekül wurde versucht, war jedoch aufgrund der zusätzlichen Freiheitsgrade nicht erfolgreich.



die weiteren Schritte bezüglich des Refinements des Modells wurden die Strukturen der einzelnen Untereinheiten benötigt. Diese wurden in Zusammenarbeit mit Mathias Schmitt und Herrmann Hartmann am Institut für Molekulare Biophysik in Mainz anhand der *Pandinus imperator*-Hämocyanin Sequenzen [Roeding *et al.*, 2009] mit der *MODELLER9*-Software modelliert. Dieser Schritt wird im nächsten Abschnitt erläutert.

## 7.4 Homologie-Modellierung

In [Roeding *et al.*, 2009] werden 8 verschiedene Sequenzen für die Untereinheiten des Hämocyanins angegeben. Diese wurden mit Modeller und anhand der Templates 1LLA und 1LL1 modelliert. Bei beiden Modellen handelt es sich um Beschreibungen der Untereinheit 2 des Hämocyanins des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*. In 1LLA wurde die Kristallstruktur anhand eines Homo-Hexamers aus dieser Untereinheit gelöst [Hazes *et al.*, 1993]. Bei 1LL1 handelt es sich um ein ähnliches Konstrukt wie 1LLA, bei dem das aktive Zentrum allerdings in der met-Form vorliegt. Zur hinterlegten Struktur in der PDB-Datenbank findet sich für 1LL1 bisher von den Autoren dieser Struktur (Liu, S., Ton-That, H., Magnus, K.) kein Verweis auf eine beschreibende Publikation in einer Fachzeitschrift. Die Abbildung 7.5 zeigt das Alignment zwischen der Sequenz der Untereinheit 2 von *Limulus polyphemus* (Sequenz aus [Nakashima *et al.*, 1986]) und den Sequenzen der beiden Modelle 1LLA und 1LL1.

Wie das Alignment zeigt wurden bei den verwendeten Templates mehrere Bereiche der Struktur nicht gelöst. Die Homologie-Modellierung wurde dort also ohne Restriktionen durchgeführt. Besonders für die zwei größten dieser Bereiche von Position 21 bis 29 und von 132 bis 139 kann das Startmodell deshalb falsch sein. Um dieses auszuschließen wurden die angesprochenen Abschnitte nach dem Refinement über eine sogenannte OMIT-Dichte überprüft. Wie im nächsten Abschnitt erläutert wird, wird das OMIT-Verfahren zur Reduzierung von Fehlern aufgrund von a priori Information verwendet.

Die verwendeten *Pandinus imperator* Sequenzen sind außerdem für die zwei Untereinheiten *Hc2* und *Hc4* unvollständig [Roeding *et al.*, 2009]. Bei den Untereinheiten *Hc2* und *Hc4* fehlen am N-terminalen Ende je 8 bis 12 Aminosäuren. An dieser Stelle wird das Modell im Vergleich zur gemessenen Elektronendichte eine zu geringe Dichte aufweisen. Dies kann zu Fehlern in der Modellierung führen, wie später in Abschnitt 8.2 erläutert wird.

```

*          20          *          40          *          60          *          80          *
Limulus : TLHDKQIRICHLFELSSATVIGDGDKKHSDRLKRVGKLPQGAIFSCFHPDHLEEARHLYEVFWEAGDFNDFIEIAKEARTFVNEGLFA : 90
1LLA   : -LHDKQIRICHLFELSSAT-----HSDRLKRVGKLPQGAIFSCFHPDHLEEARHLYEVFWEAGDFNDFIEIAKEARTFVNEGLFA : 80
1LL1   : TLHDKQIRVCHLFEQLSSAT-----VHRLKRVGKLPQGAIFSCFHPDHLEEARHLYEVFWEAGDFNDFIEIAKEARTFVNEGLFA : 80
        LHDKQIRGCHLFEQLSSAT                RLKRVGKLPQGAIFSCFHPDHLEEARHLYEVFWEAGDFNDFIEIAKEARTFVNEGLFA

*          100         *          120         *          140         *          160         *          180
Limulus : FAAEVAVLHRDDCKGLYVPPVQEIFPDKFIPSAINEAFKKAHVRPEFDESEFLLVDVQDTGNILDPEYRLAYREDVGINAHHWHHLVY : 180
1LLA   : FAAEVAVLHRDDCKGLYVPPVQEIFPDKFIPSAINEAFKK-----ESELVDV--GNILDPEYRLAYREDVGINAHHWHHLVY : 160
1LL1   : FAAEVAVLHRDDCKGLYVPPVQEIFPDKFIPSAINEAFKK-----LLVDV--GNILDPEYRLAYREDVGINAHHWHHLVY : 156
        FAAEVAVLHRDDCKGLYVPPVQEIFPDKFIPSAINEAFKK                LLVDV                GNILDPEYRLAYREDVGINAHHWHHLVY

*          200         *          220         *          240         *          260         *
Limulus : PSTWNPYFGKKDRKGELEFYMHQQMCARYDCERLSNGMHRMLPFNNFDEPLAGYAPHLTHVASGKYSPRPDGLKLRDLGDIIESEM : 270
1LLA   : PSTWNPYFGKKDRKGELEFYMHQQMCARYDCERLSNGMHRMLPFNNFDEPLAGYAPHLTHVASGKYSPRPDGLKLRDLGDIIESEM : 250
1LL1   : PSTWNPYFGKKDRKGELEFYMHQQMCARYDCERLSNGMHRMLPFNNFDEPLAGYAPHLTHVASGKYSPRPDGLKLRDLGDIIESEM : 246
        PSTWNPYFGKKDRKGELEFYMHQQMCARYDCERLSNGMHRMLPFNNFDEPLAGYAPHLTHVASGKYSPRPDGLKLRDLGDIIESEM

*          280         *          300         *          320         *          340         *          360
Limulus : RMRERILDSIHLGYVISEDGSHKTLDELHGTDILGALVESSYESVNHYYGNLHNWGHVTMARIHDPDGRFHEEPGVMSDTSTSLRDFIE : 360
1LLA   : RMRERILDSIHLGYVISEDGSHKTLDELHGTDILGALVESSYESVNHYYGNLHNWGHVTMARIHDPDGRFHEEPGVMSDTSTSLRDFIE : 340
1LL1   : RMRERILDSIHLGYVISEDGSHKTLDELHGTDILGALVESSYESVNHYYGNLHNWGHVTMARIHDPDGRFHEEPGVMSDTSTSLRDFIE : 336
        RMRERILDSIHLGYVISEDGSHKTLDELHGTDILGALVESSYESVNHYYGNLHNWGHVTMARIHDPDGRFHEEPGVMSDTSTSLRDFIE

*          380         *          400         *          420         *          440         *
Limulus : YNWHRFIDNIFHEYKNTLKPVDHVLNFPDIQVQDVTLHARVDNVVHTFMREQELELKHGINPGNARSIKARYYHLDHEPFSYAVNVQNN : 450
1LLA   : YNWHRFIDNIFHEYKNTLKPVDHVLNFPDIQVQDVTLHARVDNVVHTFMREQELELKHGINPGNARSIKARYYHLDHEPFSYAVNVQNN : 430
1LL1   : YNWHRFIDNIFHEYKNTLKPVDHVLNFPDIQVQDVTLHARVDNVVHTFMREQELELKHGINPGNARSIKARYYHLDHEPFSYAVNVQNN : 426
        YNWHRFIDNIFHEYKNTLKPVDHVLNFPDIQVQDVTLHARVDNVVHTFMREQELELKHGINPGNARSIKARYYHLDHEPFSYAVNVQNN

*          460         *          480         *          500         *          520         *          540
Limulus : SASDKHATVRIFLAPKYDELGNEIKADELRRTAIELDKFKTDLHPGKNTVVRHSLDSSVTLHQPTFEDLLHGVGLNEHKS EYCSGWP : 540
1LLA   : SASDKHATVRIFLAPKYDELGNEIKADELRRTAIELDKFKTDLHPGKNTVVRHSLDSSVTLHQPTFEDLLHGVGL----SEYCSGWP : 516
1LL1   : SASDKHATVRIFLAPKYDELGNEIKADELRRTAIELDKFKTDLHPGKNTVVRHSLDSSVTLHQPTFEDLLS-----EYCSGWP : 507
        SASDKHATVRIFLAPKYDELGNEIKADELRRTAIELDKFKTDLHPGKNTVVRHSLDSSVTLHQPTFEDLL                EYCSGWP

*          560         *          580         *          600         *          620
Limulus : HLLVPRGNIKGMEYHLFVMLTDWDKDKV---SACVDVAVSYCGARDHKYPDKKPMGPFDRPIHTEHISDFLTNNMFIKDIKIFHE : 628
1LLA   : HLLVPRGNIKGMEYHLFVMLTDWDKDKV---SACVDVAVSYCGARDHKYPDKKPMGPFDRPIHTEHISDFLTNNMFIKDIKIFHE : 600
1LL1   : HLLVPRGNIKGMEYHLFVMLTDWDKDKV---VACVDVAVSYCGARDHKYPDKKPMGPFDRPIHTEHISDFLTNNMFIKDIKIFHE : 590
        HLLVPRGNIKGMEYHLFVMLTDWDKDKV                VACVDVAVSYCGARDHKYPDKKPMGPFDRPIHTEHISDFLTNNMFIKDIKIFHE

```

Abbildung 7.5: Alignment der Untereinheit 2 und der Modelle 1LLA und 1LL1. Das Alignment zeigt in der oberen Zeile (Limulus) die Sequenz der Untereinheit 2 des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus* [Nakashima *et al.*, 1986]. In den anderen Zeilen sind die Sequenzen der beiden als Template verwendeten Modelle 1LLA und 1LL1 zu sehen. Man erkennt vor allem zwei größere Bereiche, in denen keines der beiden Templates gelöst wurde: Position 21 bis 29 und 132 bis 139. In diesen Bereichen kann es durch die Homologie-Modellierung zu Fehlern in den Startmodellen kommen.

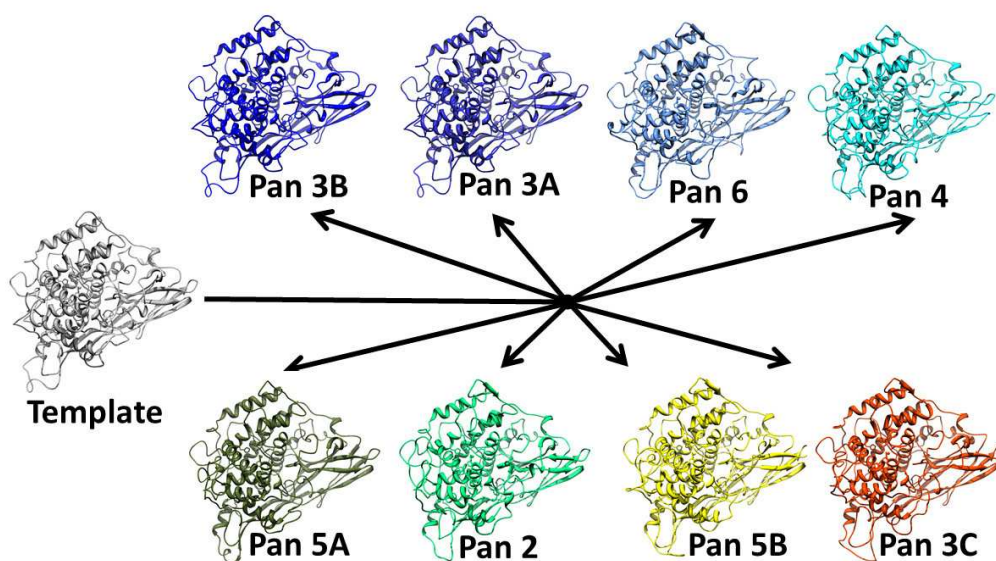


Abbildung 7.6: Homologiemodellierung der einzelnen Untereinheiten. Ausgehend von der Struktur der Untereinheit 2 aus *Limulus polyphemus* wurden die *Pandinus imperator* Untereinheiten anhand ihrer Sequenzen ([Roeding *et al.*, 2009]) modelliert. Diese Untereinheiten werden später in das Modell für das 24-mere Molekül integriert und anhand der Elektronendichte angepasst.

Der nächste Schritt war die topologische Zuordnung der modellierten Untereinheiten in das Modell für das 24-meren Hämocyaninmolekül. Die Positionierung der Untereinheiten in das Modell erfolgte gemäß [Cong *et al.*, 2009]. Dort wurden, analog zum 24-meren Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum*, nur 7 verschiedene Untereinheiten verwendet [Voit *et al.*, 2000]. Für das *Pandinus imperator*-Hämocyanin wurde jedoch die Sequenzierung von 8 Untereinheiten beschrieben [Roeding *et al.*, 2009]. Die Position der verschiedenen Untereinheiten auf der Basis des Hämocyanins aus *Eurypelma californicum* ist in Abbildung 7.7 dargestellt. Die Benennung der Untereinheiten dieses Hämocyanins wurde dabei aus früheren Studien übernommen [Markl *et al.*, 1981, Decker *et al.*, 1996].

Da diese topologische Zuordnung nur für das Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* bekannt ist, nicht aber für *Pandinus imperator*, mussten die modellierten Untereinheiten aus *Pandinus imperator* erst einer Untereinheit aus *Eurypelma californicum* zugeordnet werden. Nach dieser Zuordnung konnte das Modell dann analog zum Modell aus [Cong *et al.*, 2009] aufgebaut werden.

Der Verwandtschaftsgrad zwischen den Untereinheiten des Hämocyanins des Skorpions und denen aus der Vogelspinne wurde deshalb mit einem multiplen Alignment mit dem *COBALT*-Tool in Blast überprüft. Das Alignment ist in Abbildung 7.8 graphisch dargestellt, die resultierende Zuordnung der Untereinheiten des *Pandinus imperator*-Hämocyanins mit den Untereinheiten aus *Eurypelma californicum* ist in Tabelle 7.3 wiedergegeben. Die Bezeichnung der Untereinheiten aus dem Hämocyanin von *Eurypelma californicum* erfolgte nach [Markl *et al.*, 1981]. Für die Sequenzen der Untereinheiten aus *Pandinus imperator* wurden die Bezeichnungen aus [Roeding *et al.*, 2009] verwendet<sup>3</sup>.

<i>Eurypelma</i>	Eury A	Eury B	Eury C	Eury D	Eury E	Eury F	Eury G
<i>Pandinus</i>	Pan 3A	Pan 5B	Pan 3C	Pan 5A	Pan 6	Pan 2	Pan 4

Tabelle 7.3: Zuordnung der Untereinheiten des *Pandinus imperator*-Hämocyanins (untere Zeile) zu den Untereinheiten aus *Eurypelma californicum* (obere Zeile). Die Bezeichnung der *Pandinus imperator* Sequenzen wurde aus [Roeding *et al.*, 2009] übernommen, für die Untereinheiten aus *Eurypelma californicum* wurde die Bezeichnung aus [Markl *et al.*, 1981] verwendet. Die Sequenz Pan 3B wurde nicht verwendet, da sie keiner Untereinheit eindeutig zugeordnet werden konnte.

Die meisten Untereinheiten des *Pandinus imperator*-Hämocyanins lassen sich hiernach durch den Sequenzvergleich eindeutig einer Untereinheit des Hämocyanins der Vogelspinne zuordnen. Schwierig ist die Zuordnung für die Untereinheitenpaare Eury D und Eury F, beziehungsweise Eury E und Eury G. Für diese Paare wäre aufgrund des gezeigten Alignments auch eine umgekehrte Zuordnung nicht auszuschließen, also (Eury D, Pan 2) und (Eury F, Pan 5a) für das erste Paar, beziehungsweise (Eury E, Pan 4) und (Eury G, Pan 6) für das zweite. Die in der Tabelle 7.3

<sup>3</sup>Die Bezeichnung der Untereinheiten wurde in [Roeding *et al.*, 2009] analog zur Bezeichnung der Untereinheiten aus *Androctonus australis* in [Jollès *et al.*, 1979] festgelegt.

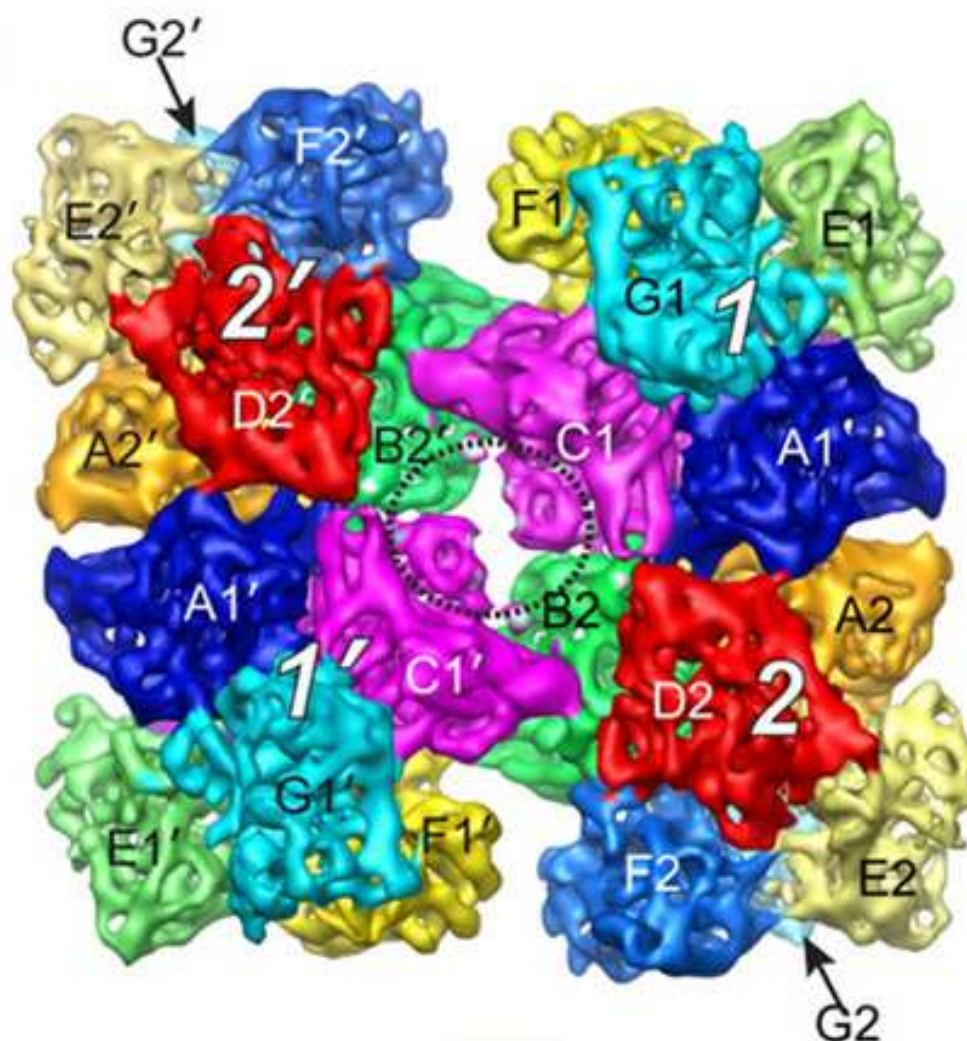


Abbildung 7.7: Position der Untereinheiten im 24-meren Hämocyanin von *Pandinus imperator*. Die Benennung der Untereinheiten dieses Hämocyanins wurde dabei aus [Decker *et al.*, 1996] übernommen. In jedem Hexamer bildet sich je ein Trimer aus den Untereinheiten A, E und G, ein zweites aus den Untereinheiten D, F und B beziehungsweise C. Die Untereinheiten B und C haben eine spezielle Position, weil sie an der Grenzfläche zwischen den beiden Dodecameren positioniert sind. Die Abbildung wurde übernommen aus [Cong *et al.*, 2009].

angegebene Lösung wurde auch mit anderen Methoden bestätigt <sup>4</sup>, weshalb diese Zuordnung angenommen wurde.

<sup>4</sup>Persönliche Mitteilung von Prof. Thorsten Burmester.



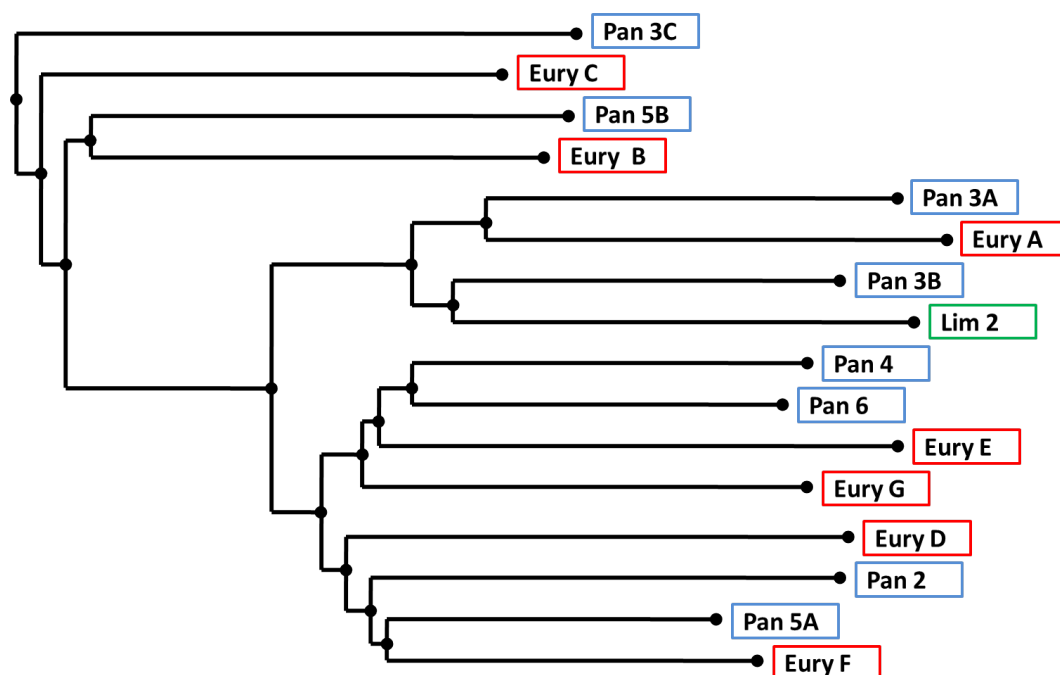


Abbildung 7.8: Multiples Alignment nach der „Fast Minimum Evolution“-Methode. Die Sequenzen der Untereinheiten der Hämocyanine des Skorpions *Pandinus imperator* (blau umrandet) und der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (rot umrandet) wurden hier überlagert. Zusätzlich wurde die bei der Modellierung als Template verwendete Untereinheit 2 des *Limulus polyphemus*-Hämocyanins in das Alignment integriert (grüner Rand). Anhand dieses Alignments lassen sich die modellierten Untereinheiten des Skorpions ihrem Gegenpart im Spinnenhämocyanin zuordnen.

Der Untereinheit Eury A im Spinnen-Hämocyanin können zwei verschiedene Sequenzen zugeordnet werden, Pan 3A und Pan 3B. Denkbar wäre ein Modell mit je zwei verschiedenen Untereinheiten A. Dabei würde man ähnlich wie für die Untereinheiten B und C beim Spinnen-Hämocyanin jedem Dodecamer je eine Untereinheit A1 und A2 zuordnen, die der Untereinheit Pan 3A beziehungsweise Pan 3B entsprechen würden. Die beiden Sequenzen sind sehr ähnlich (73 %) und haben beide die gleiche Länge. Deshalb konnte bei der vorliegenden Auflösung keine Verbesserung des Modells durch die Verwendung einer zusätzlichen Untereinheit erreicht werden. Aus diesem Grund wurde die bekannte Topologie mit 7 Untereinheiten verwendet und die Sequenz Pan 3B im Weiteren nicht berücksichtigt.

Die anschließende Vorgehensweise ist in Abbildung 7.9 schematisiert. Die Position der einzelnen Untereinheiten im Modell ist aus Abbildung 7.7 bekannt. Die auf die Sequenz basierte Zuordnung der modellierten *Pandinus imperator*-Untereinheiten zu den *Eurypelma californicum*-Untereinheiten wurde oben erläutert. Als nächstes wurden die modellierten Untereinheitstypen mit der entsprechenden Untereinheit im, aus Poly-Alanin-Ketten bestehenden, Start-Modell überlagert. Die alte Untereinheit wurde dann durch die neue modellierte Untereinheit ersetzt. Das finale Modell enthält somit die modellierten Untereinheiten in der Orientierung der Poly-Alanin Untereinheiten des Startmodells. In Abbildung 7.9 sowie für die weiteren Ausführungen werden die Untereinheiten nun analog zu den Untereinheiten aus *Eurypelma californicum* umbenannt (siehe Tabelle 7.3).

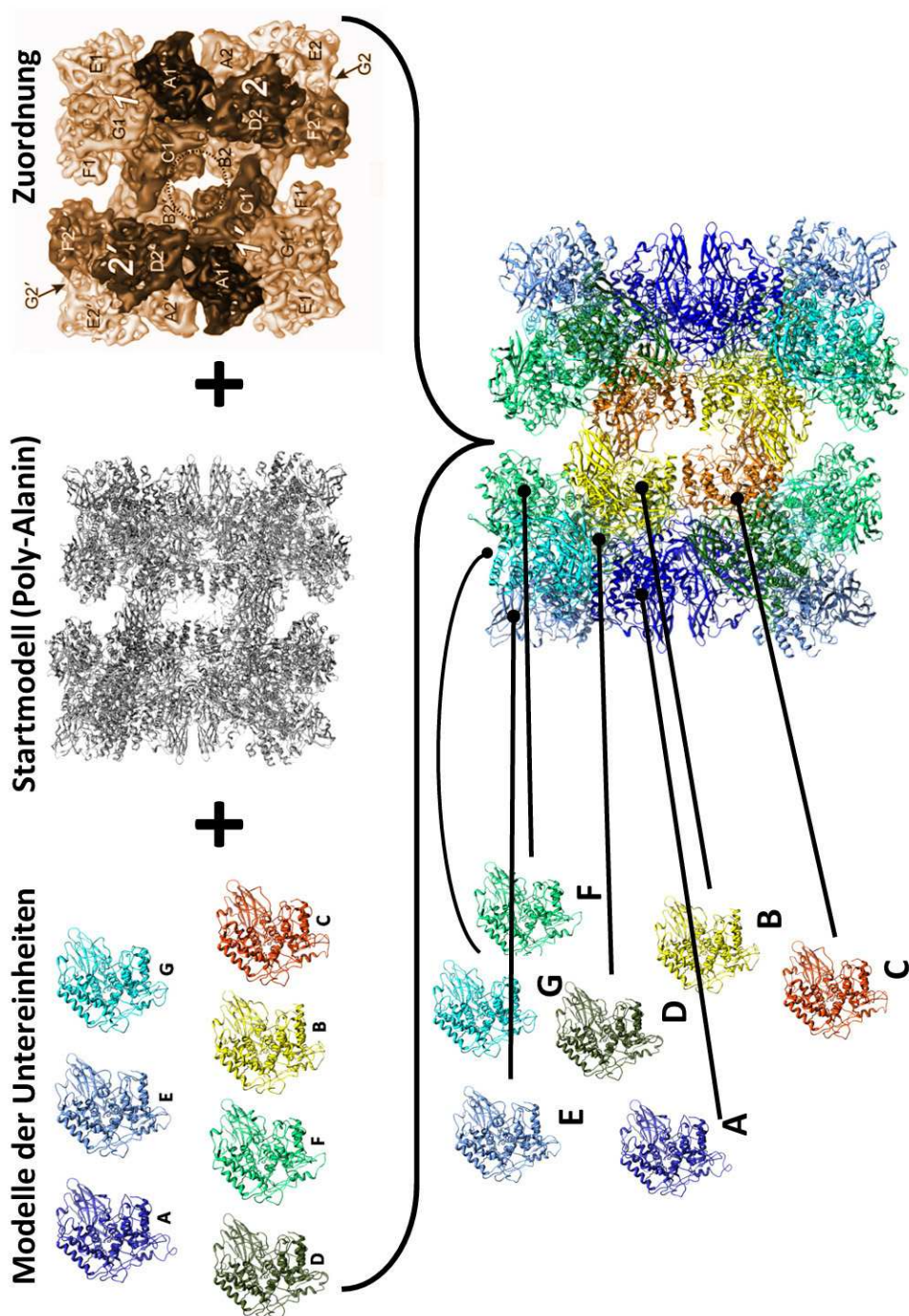


Abbildung 7.9: Vorgehensweise beim Modellieren des 24-meren *Pandinus imperator*-Hämocyanin. Die modellierten Untereinheiten wurden analog zur bekannten topologischen Anordnung aus dem *Eurypelma californicum*-Hämocyanin in das Startmodell eingefügt. Die *Pandinus imperator* Untereinheiten wurden mit der entsprechenden (Poly-Alanin) Untereinheit des Startmodells überlagert und ausgetauscht. Die Benennung der Untereinheiten erfolgt hier analog zu den Untereinheiten aus *Eurypelma californicum* (siehe Tabelle 7.3).



## 7.5 Refinement

Das vollständige Modell des *Pandinus imperator*-Hämocyanins wurde anschließend mit dem Programm *REFMAC* an die kristallographischen Daten angepasst. Das Refinement entwickelte sich in diesem Fall zu einer großen Herausforderung, aufgrund der enormen Größe des Proteins einerseits und der geringen Auflösung andererseits. Bei dieser Auflösung sind die Atome der Seitenketten nicht sichtbar. Ein individuelles Restrained Refinement mit den gängigen geometrischen Restriktionen kann in diesem Fall nicht eingesetzt werden, da das Ergebnis aufgrund zu hoher Freiheitsgrade Konformationen einnehmen kann, die nicht sinnvoll sind.

Die Methoden, die zur Verfügung stehen, sind deshalb das Rigid-body-Refinement, bei dem die einzelnen Untereinheiten als feste Körper definiert wurden, und das Restrained Refinement, bei dem allerdings die Restriktionen sehr hoch gewertet wurden, um so die Freiheitsgrade einzuschränken. Bei größeren Bereichen, in denen die Abweichung zwischen Modell und Dichte optisch sichtbar war, wurde das Modell optisch mit der Software *COOT* nachgebessert.

Diese Einschränkungen beim Refinement sollen garantieren, dass das Modell nicht überfittet wird, was am Ansteigen des  $R_{free}$ -Wertes erkennbar wäre. Allerdings werden dabei auch die gewünschten Verbesserungen am Modell während des Refinements limitiert. Die R-Faktoren der Struktur des Hämocyanins ergeben sich zu  $R = 0.35$  und  $R_{free} = 0.40$ . Im allgemeinen werden bei Kristallstrukturen R-Faktoren  $R \leq 0.25$  angestrebt. Aufgrund der geringen Auflösung wurden diese R-Faktoren allerdings erwartet. Wie später in Abschnitt 8.3 erläutert wird, gibt es beim R-Faktor eine Auflösungsabhängigkeit, die dazu führt, dass der R-Faktor dieser Struktur nicht mit dem R-Faktor einer Struktur mit einer wesentlich besseren Auflösung verglichen werden kann.

In Abbildung 7.10 ist exemplarisch das aktive Zentrum der Untereinheit B in der zugehörigen OMIT-Dichte in dem Programm *COOT* zu sehen. Die OMIT-Dichte wurde nach der Methode von [Bhat, 1988] mit dem Programm *SFHECK* der *CCP4*-Suite berechnet [Vaguine *et al.*, 1999]. Der Vorteil der Berechnung einer OMIT-Dichte ist die Reduzierung von Fehlern in der Dichte, die auf a priori Information beruhen würden. Diese können zum Beispiel vom Molecular Replacement oder der Homologie-Modellierung kommen. Die zu Grunde liegende Idee ist die Reduzierung des Teils der Information in der Dichte, welcher vom Modell geliefert wird. Da die kristallographischen Reflexe aber für die Berechnung der Elektronendichteverteilung nicht hinreichend sind, kann das Modell nicht völlig vernachlässigt werden. Um die Information trotzdem zu minimieren wird die Ausgangselektronendichte in Würfeln eingeteilt. In jedem Würfel wird dann unabhängig voneinander die Elektronendichte auf Null gesetzt und die Phasen neu berechnet. Aus den Streufaktoren und dieser neuen Phase wird dann eine neue Dichteverteilung für den entsprechenden Würfel berechnet. Am Ende wird die Dichte aus den einzelnen Würfeln zusammengesetzt. Mit dieser Prozedur erreicht man, dass für den gerade betrachteten Abschnitt der Elektronendichte das Modell ausgeblendet wird. Die gute Übereinstimmung des Modells mit dieser OMIT-Dichteverteilung zeigt, dass wirklich das Modell an die

Streu Faktoren und nicht die Dichte an das Modell angepasst wurde. Durch dieses Verfahren kann sichergestellt werden, dass die Strukturinformation wirklich aus der Messung kommt und nicht a priori vorgegeben wurde. Die Abbildung zeigt das  $C\alpha$ -Trace des Modells und die OMIT-Elektronendichteverteilung. Man erkennt, dass das Modell insgesamt gut mit dieser Dichte übereinstimmt. Am Beispiel der Markierung (B) wird deutlich, dass die Helices am aktiven Zentrum klar erkennbar sind. Es ist selbst das aktive Zentrum in der Mitte des Bildes bei Markierung (A) erkennbar. Anhand dieser Dichteverteilung lassen sich allerdings auch Teile des Modells finden, für die wie bei Markierung (C) nur eine geringe Elektronendichte vorliegt. Dies kann auf eine geringe Übereinstimmung des Modells mit der Dichte hinweisen, was auf Fehler im Modell oder aber auf schlecht aufgelöste Abschnitte der Elektronendichte zurückzuführen sein könnte.

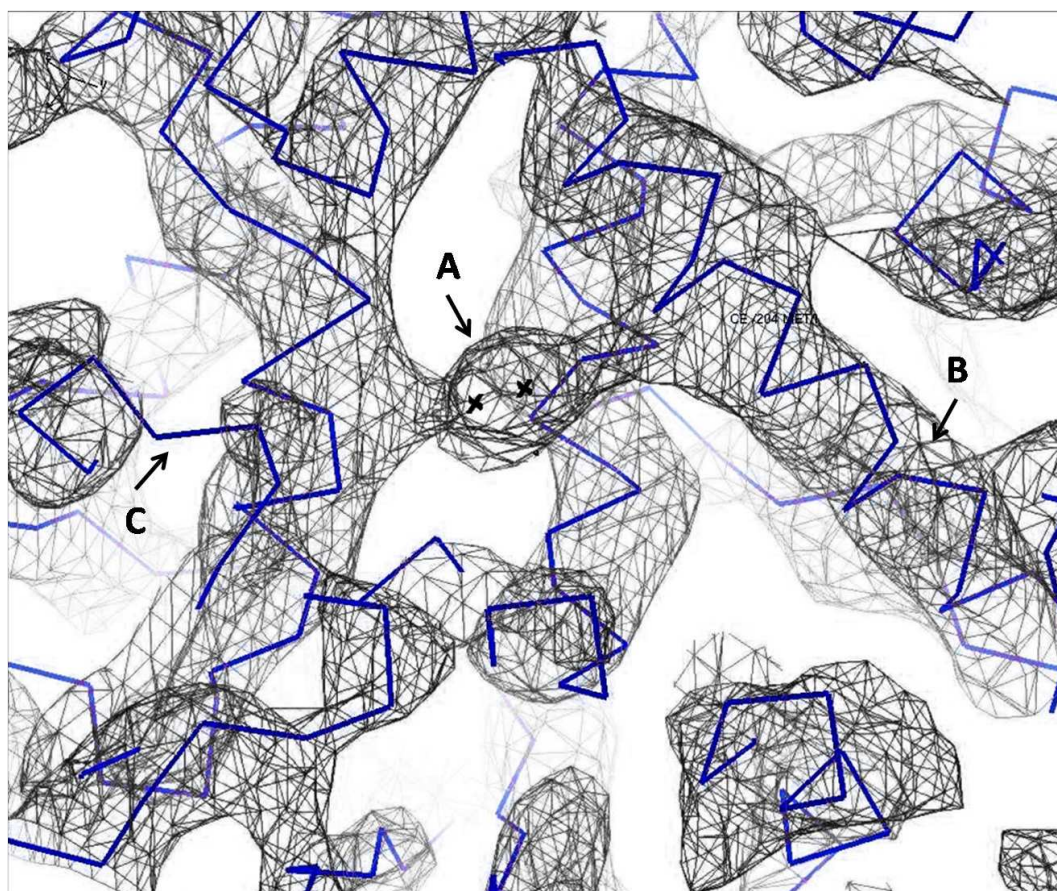


Abbildung 7.10:  $C\alpha$ -Trace der Untereinheit B der Kristallstruktur. Das  $C\alpha$ -Trace des Modells ist blau, während die Elektronendichte als schwarzes Gitter dargestellt ist. Es handelt sich um eine OMIT-Dichte bei einem Wert von  $1.5\sigma$ . Die beiden Kupferatome sind als schwarze Kreuze in der Mitte des Bildes (Markierung (A)) zu sehen. Die Seitenketten sind zwar nicht sichtbar, allerdings sind das aktive Zentrum und die Helices um das Zentrum, wie zum Beispiel bei Markierung (B), sehr gut in der Dichte zu erkennen. Die Markierung (C) zeigt einen Teil vom Modell für den nur eine geringe Elektronendichte aus den Streubildern errechnet wurde.

## 7.6 Beschreibung der Struktur

### 7.6.1 Allgemeiner Aufbau

Der allgemeine Aufbau des Oligomers ist in Abbildung 7.11 anhand der neuen Struktur beschrieben. Drei Untereinheiten bilden ein Trimer, zwei lagern sich zum Hexamer zusammen. Je zwei dieser Hexamere bilden über eine enge Kontaktfläche das Dodecamer, zwei Dodecamere bilden dann das 24-mere Protein. Dieser Aufbau ist identisch mit dem Aufbau aus der für das Molecular Replacement verwendeten Struktur, die durch Kryo-EM gelöst wurde [Cong *et al.*, 2009]. Der Gewinn durch die neue Struktur liegt darin, dass diese Oligomere nun aus den modellierten Untereinheiten bestehen und somit die bekannte Sequenzinformation [Roeding *et al.*, 2009] beinhalten. Auf diese Weise können neue Erkenntnisse in Bezug auf die Kontakte zwischen den Untereinheiten auf den verschiedenen Oligomerisierungsebenen gewonnen werden. Dieser Punkt wird in Kapitel 8 näher ausgeführt.

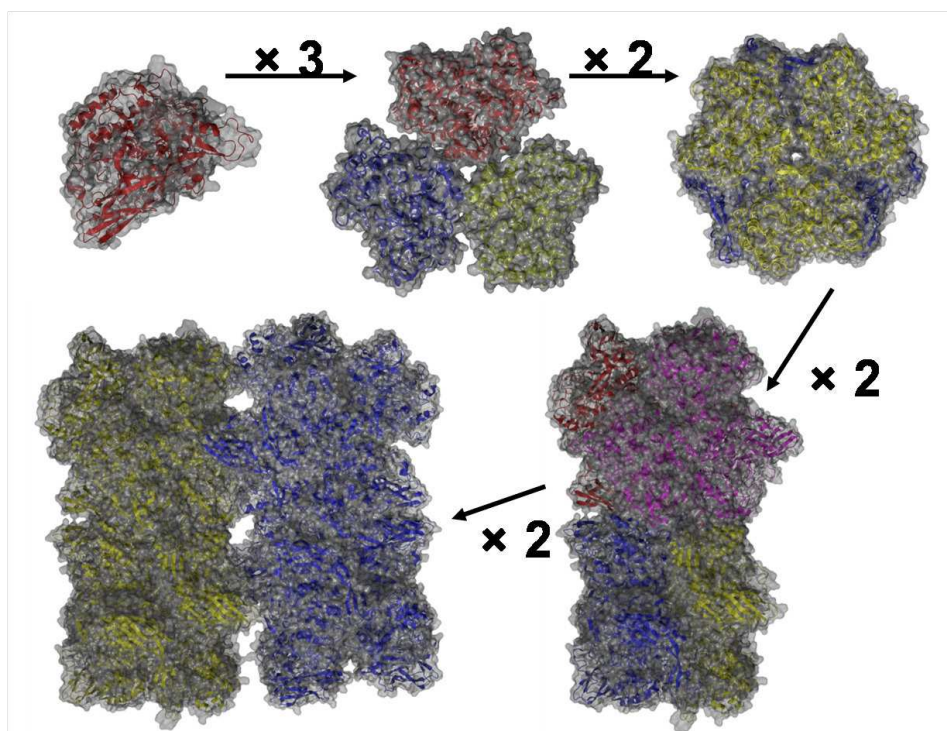


Abbildung 7.11: Aufbau des 24-meren Hämocyansins anhand der gelösten Struktur. Drei UE bilden ein Trimer, zwei Trimere ein Hexamer, zwei Hexamere ein Dodecamer. Das Gesamtmolekül wird dann durch zwei Dodecamere gebildet. Die Winkel zwischen den Hexameren und den zwei Dodecameren werden im nächsten Unterabschnitt angegeben (siehe Abbildung 7.13).

Vergleicht man die in dieser Arbeit vorgestellte Kristallstruktur des *Pandinus imperator*-Hämocyansins mit der zu Grunde liegenden Kryo-Elektronenmikroskopie-

basierten Struktur findet man bezüglich des  $C\alpha$ -Rückgrats keine großen Abweichungen. Dies ist in Abbildung 7.12 dargestellt. Hier wurden beide Modelle überlagert und anschließend die kristallographische Struktur nach der mittleren quadratischen Abweichung der  $C\alpha$ -Atome eingefärbt. Es sind kaum Abweichungen über 1.5 Å festzustellen, die Ausnahmen finden sich an Kettenenden und am äußeren Rand des Moleküls. Unterschiede zwischen den beiden Modellen erklären sich in erster Linie durch die unterschiedlichen Untereinheiten. Das auf Kryo-EM basierende Modell verwendet ausschließlich die Untereinheit As6 des Skorpions *Androctonus australis*, während für das auf Kristallographie basierende Modell Homologie-modellierte Untereinheiten verwendet wurden. Die Unterschiede zwischen den beiden Modellen werden im Abschnitt 8.5 gesondert erläutert. Im Inneren des Moleküls zeigen die beiden Modelle eine sehr hohe Übereinstimmung, insbesondere zwischen den Untereinheiten B und C sind nur geringe Abweichungen festzustellen. Die Kontaktfläche zwischen diesen Untereinheiten ist deshalb von besonderem Interesse, weil dort die zwei Dodekamere zum 24-mer stabilisiert werden.

Interessant, bezüglich der Quartärstruktur des 24-meren Hämocyanins, ist auch der Vergleich mit bekannten Modellen basierend auf Kleinwinkelstreuung (engl. Small Angle X-ray Scattering, SAXS). Diese Methode liefert zwar eine geringere Auflösung, dafür können die Proteine in Lösung unter nahezu nativen Bedingungen studiert werden. SAXS-Modelle sind bekannt für das Hämocyanin von *Pandinus imperator* [Pairet, 2007] aber auch für das verwandte 24-mer Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* [Decker *et al.*, 1996, Hartmann & Decker, 2002]. In beiden Fällen gibt es Modelle mit niedriger Auflösung für die oxygenierte und deoxygenierte Konformation. Diese Modelle wurden, wie in [Hartmann & Decker, 2002] beschrieben durch Parametrisierung und Anpassung an die SAXS-Daten gewonnen. Dabei wurde diese Anpassung jeweils für Hämocyanin im oxygenierten und deoxygenierten Zustand durchgeführt. Bei den *Pandinus imperator* Modellen konnte allerdings keine solche Anpassung durchgeführt werden [Pairet, 2007], zur Verfügung steht hier nur der Gyrationradius. Die gleichen Parameter wurden für die detaillierteren Modelle aus Elektronenmikroskopie im enzymatisch inaktiven und aktivierten Zustand und Kristallographie berechnet <sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup>Der Vergleich der Parameter wurde von Hermann Hartmann am Institut für Molekulare Biophysik durchgeführt.



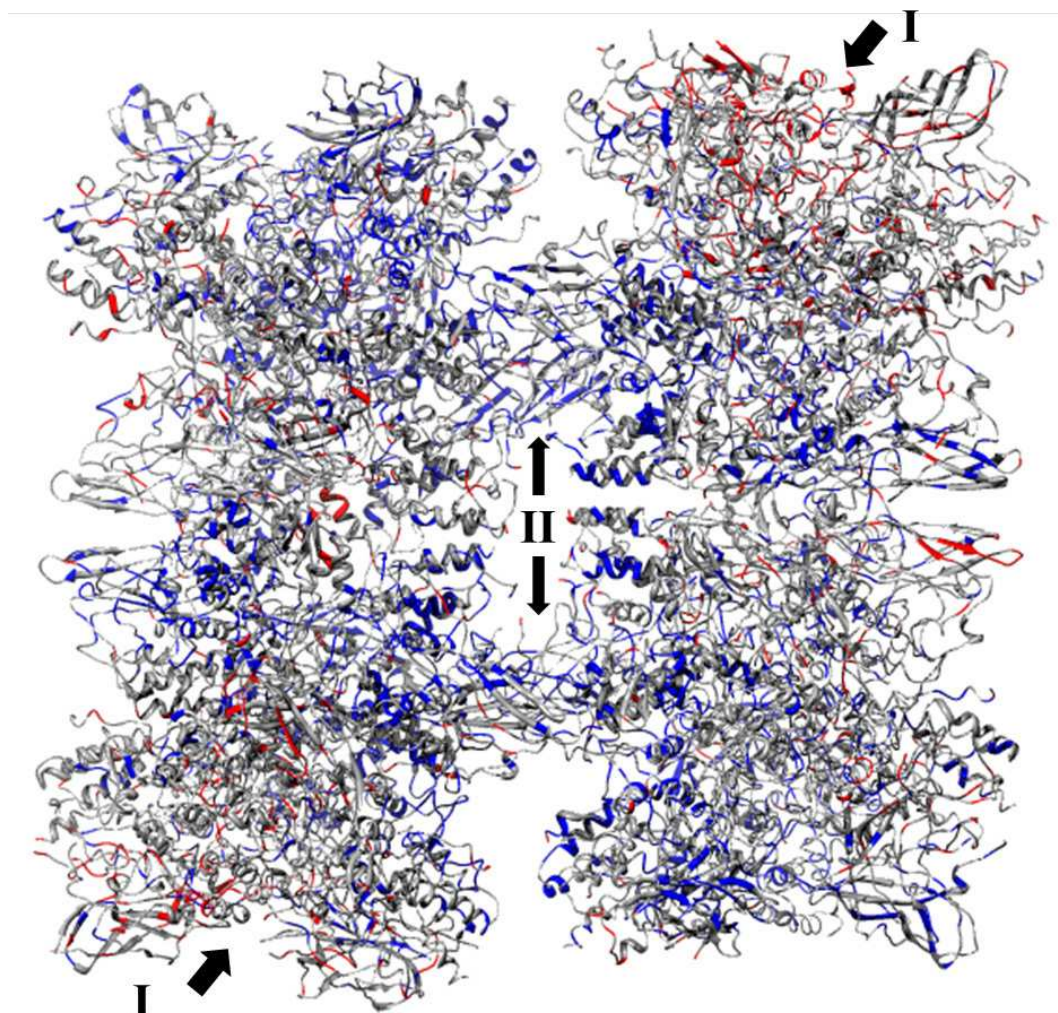


Abbildung 7.12: Abweichungen zwischen Kristall- und Kryo-EM-Struktur. Das kristallographische Modell des *Pandinus imperator*-Hämocyanins wurde mit der Kryo-EM-basierten Struktur aus [Cong *et al.*, 2009] überlagert. Das dargestellte kristallographische Modell wurde dann nach den RMSD-Werten des Proteinrückgrats eingefärbt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei der Farbkodierung eine vereinfachte Darstellung verwendet: blau  $\leq 0.5$  Å, grau  $0.5 - 1.5$  Å und rot  $\geq 1.5$  Å. Insgesamt ist eine hohe Übereinstimmung zwischen beiden Modellen zu erkennen. Die größten Abweichungen finden sich an den Kettenenden und am äußeren Rand des Moleküls, zwei solcher Bereiche sind mit Pfeilen vermerkt (I). Im Inneren des Proteins ist die Übereinstimmung sehr hoch, die Markierung bei (II) zeigt, dass insbesondere zwischen den Untereinheiten B und C, die wichtig für die Stabilität des 24-mers sind, nur geringe Abweichungen zwischen den Modellen existieren.

In der Abbildung 7.13 ist der Vergleich dieser Parameter dargestellt, die untere Graphik dient der Erklärung der verwendeten Parameter:  $d_{hex}$  bezeichnet den Abstand der Massenschwerpunkte der Hexamere im Dodecamer,  $d_{dode}$  den entsprechenden Abstand für die Dodecamere.  $S_{dode}$  bezeichnet die Verschiebung der beiden Dodecamere zueinander, wobei diese Verschiebung entlang einer Achse gemessen wird, die die Schwerpunkte der Hexamere verbindet.  $\varphi_{hex}$  gibt die Drehung der Hexamere zueinander innerhalb des Dodecamers wieder, während  $\varphi_{dode}$  die Drehung der Dodecamere relativ zueinander quantifiziert.  $R_g$  ist der Gyrationradius, eine Größe, die Rückschlüsse über die Kompaktheit des Moleküls zulässt.

Wie man anhand dieser Tabelle sieht, besteht der auffälligste Unterschied zwischen dem oxygenierten und deoxygenierten *Eurypelma californicum*-Hämocyanin in der Veränderung der Parameter  $\varphi_{dode}$  um  $13^\circ$  und  $S_{dode}$  um  $14 \text{ \AA}$ . Die Änderung des Gyrationradius ist mit der Veränderung dieser Parameter verknüpft. Für das *Pandinus imperator*-Hämocyanin wird ein ähnlicher Effekt erwartet, allerdings stehen die einzelnen Parameter hier nicht zur Verfügung, einzig der Gyrationradius ist mit  $87.5 \text{ \AA}$  im oxygenierten und  $85.6 \text{ \AA}$  im deoxygenierten Zustand bestimmt worden. Bei den 3 angesprochenen Parametern  $d_{dode}$ ,  $S_{dode}$  und Gyrationradius entsprechen die Werte, die für die hier vorgestellte Kristallstruktur berechnet wurden, der oxygenierten Konformation der SAXS-Modelle aus *Eurypelma californicum* und *Pandinus imperator*.

Der erneute Vergleich der Kristallstruktur und der Kryo-EM basierten Struktur des *Pandinus imperator*-Hämocyanins zeigt auch anhand dieser Tabelle keine signifikanten Abweichungen. Dies ist zu erwarten, da hier Parameter verglichen werden, die bei einer sehr geringen Auflösung beobachtet werden können. In dieser Auflösung sind die weiter oben beschriebenen Unterschiede nicht zu erkennen. Der Vergleich wurde mit dem Kryo-EM Modell im sogenannten „Resting State“, wie auch im „Activated State“ durchgeführt, bei dem das Hämocyanin mittels SDS zur Phenoloxidase aktiviert wurde [Cong *et al.*, 2009].

	$d_{\text{hex}}[\text{\AA}]$	$d_{\text{dode}}[\text{\AA}]$	$s_{\text{dode}}[\text{\AA}]$	$\varphi_{\text{hex}} [^\circ]$	$\varphi_{\text{dode}} [^\circ]$	$R_g [\text{\AA}]$
Pandinus_Cryst	102.40	107.90	13.59	107.0	11.6	88.2
EM resting	102.85	108.24	13.62	105.9	13.0	88.3
EM activated (a)	103.26	108.03	13.44	104.9	14.0	88.5
Eury_oxy_SAXS	105.1 +-1.3	104.4 +-1.2	18 +-3	105+-7	19 +-4	88.0
Eury_deoxy_SAXS (b)	104.5 +-0.8	103.5 +-0.8	4 +-2	131+-3	6 +-3	86.5
Pandinus_oxy_SAXS			n.b.			87.5
Pandinus_deoxy_SAXS (c)			n.b.			85.6

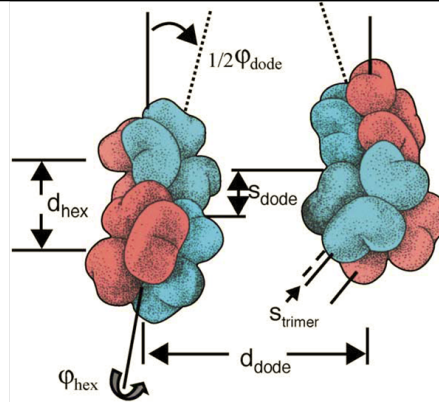


Abbildung 7.13: Vergleich der Kristallstruktur mit Modellen des Hämocyanins aus *Pandinus imperator* und des verwandten Hämocyanins aus *Eurypelma californicum*. Die Modelle wurden mit verschiedenen Methoden gewonnen. Weitere Informationen zu den Experimenten befinden sich im Text. Die in der Tabelle angegebenen Parameter wurden für verschiedene Modelle berechnet, für die SAXS-Modelle von *Pandinus imperator* steht nur der Gyrationradius zur Verfügung. Die untere Graphik aus [Hartmann & Decker, 2002] erklärt die Bedeutung der verschiedenen Parameter. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Kristallstruktur dem Kryo-EM-Modell sehr ähnlich ist. Aus dem Vergleich mit den SAXS-Modellen schließt man darauf, dass das Hämocyanin in der oxygenierten Form vorliegt. Diese Abbildung wurde von Herrmann Hartmann zur Verfügung gestellt. Referenzen: (a) [Cong *et al.*, 2009], (b) [Hartmann & Decker, 2002], (c) [Pairet, 2007].



### 7.6.2 Konformation des 24-mers

Die bläuliche Farbe der Kristalle weist darauf hin, dass Sauerstoff am aktiven Zentrum des Hämocyanins gebunden ist. Der Vergleich mit SAXS-Modellen zeigt, dass das 24-mere Molekül in der R-Konformation vorliegt. Die SAXS-Modelle und das kristallographische Modell im Vergleich dazu sind in Abbildung 7.14 dargestellt [Pairet, 2007]. In dieser Abbildung sind die SAXS-basierten Modelle des *Pandinus imperator*-Hämocyanins in der oxygenierten (A) und deoxygenierten (B) Form dargestellt, (C) zeigt das hier vorgestellte Modell. Die Darstellung gibt eine Ansicht entlang der 2-zähligen Symmetrieachse wieder. In dieser Ansicht zeigt sich der Unterschied zwischen den beiden Oxygenierungsgraden in einer Verschiebung von  $\approx 14 \text{ \AA}$  der zwei Dodecamere gegeneinander. Dabei liegen sich in der deoxygenierten Form die beiden Dodecamere gegenüber, in der oxygenierten Form wird eine Verschiebung sichtbar. Für die Darstellung des kristallographischen Modells wurde die gleiche Ansicht verwendet. Man erkennt in dieser Abbildung die gerade angesprochene Verschiebung zwischen den beiden Dodecameren. Wie weiter oben beschrieben wurde, ist diese Verschiebung und eine Drehung der beiden Dodecamere um  $\approx 13^\circ$  gegeneinander auch beim Konformationsübergang vom verwandten 24-meren *Eurypelma californicum*-Hämocyanin beschrieben worden [Hartmann & Decker, 2002]. Dieser Vergleich mit den SAXS-Modellen bestätigt, dass die Kristallstruktur des *Pandinus imperator*-Hämocyanins in der oxygenierten Konformation vorliegt.

Die hexameren Strukturen aus *Panulirus interruptus* (1HC1, [Gaykema *et al.*, 1984, Volbeda & Hol, 1989]) und aus *Limulus polyphemus* (1LLA, [Magnus *et al.*, 1991, Hazes *et al.*, 1993]) liegen in verschiedenen Konformationen vor. Die Struktur des oxygenierten Hämocyanins aus *Panulirus interruptus* wurde im oxygenierten Zustand gelöst, während das Hämocyanin aus *Limulus polyphemus* im deoxygenierten Zustand gelöst wurde. Später wurde die Struktur des *Limulus polyphemus*-Hexamers allerdings auch am oxygenierten Hämocyanin gelöst (1OXY, [Magnus *et al.*, 1994]).

Der Vergleich zwischen den beiden *Limulus polyphemus*-Modellen 1LLA und 1OXY lieferte jedoch nur geringe Unterschiede [Magnus *et al.*, 1994]. Aus diesem Grund wurde postuliert, dass die beiden Modelle 1LLA und 1OXY die gleiche Konformation T einnehmen, während das Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* in der R-Konformation kristallisiert wurde [Magnus *et al.*, 1994]. Deshalb wird 1HC1 als Modell für die R-Konformation verwendet, während 1LLA als T-Konformation angesehen wird [Hazes *et al.*, 1993]. Der Vergleich des Hämocyanins aus *Pandinus imperator* mit diesen beiden Modellen ermöglicht eine Zuordnung der Konformation<sup>6</sup>.

---

<sup>6</sup>Die Zuordnung von 1LLA (bzw. 1OXY) als Modell für die T- und von 1HC1 für die R-Konformation wurde bisher allerdings nur postuliert [Magnus *et al.*, 1994].

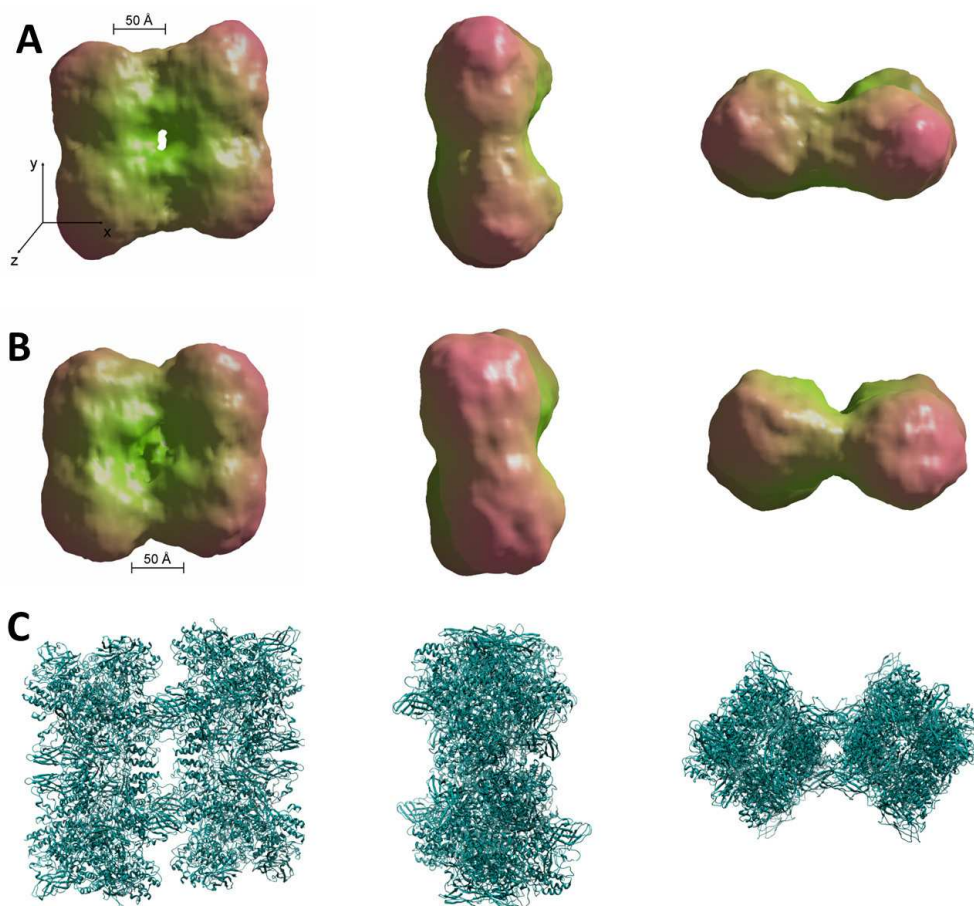


Abbildung 7.14: Vergleich mit SAXS Modellen des *Pandinus imperator* Hämocyanins in der oxygenierten und deoxygenierten Konformation. In der oberen Reihe ist das SAXS basierte Modell für die oxygenierte Konformation, in der mittleren Reihe in der deoxygenierten Konformation in drei verschiedenen Ansichten zu sehen. Die Farben sind willkürlich gewählt und dienen der räumlichen Darstellung. In der unteren Reihe ist das kristallographische Modell zu sehen. Die Ansicht links zeigt den Blick entlang der zweizähligen Symmetrieachse (hier die z-Achse), in der Mitte wurde das Molekül um  $90^\circ$  bezüglich der y-Achse gedreht und rechts wurde die erste Ansicht um  $90^\circ$  bezüglich der x-Achse gedreht. Die Verschiebung zwischen den Dodecameren in der ersten Ansicht deutet auf die oxygenierte Konformation hin. Die Drehung zwischen den zwei Dodecameren (Parameter *dode* in Abbildung 7.14) ist in dieser Darstellung nicht eindeutig erkennbar.

Ein Hexamer des hier vorgestellten Modells des *Pandinus imperator*-Hämocyans wurde in YASARA mit den hexameren Strukturen 1HC1 und 1LLA überlagert und die mittlere quadratische Abweichung berechnet (RMSD). Der RMSD-Wert zwischen dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell und 1HC1 liegt bei 5.2 Å, der Vergleich mit 1LLA ergibt eine mittlere quadratische Abweichung von 2.3 Å (Abbildung 7.15). Die Struktur des Hexamers des *Pandinus imperator*-Hämocyans entspricht also eher der Konformation von 1LLA.

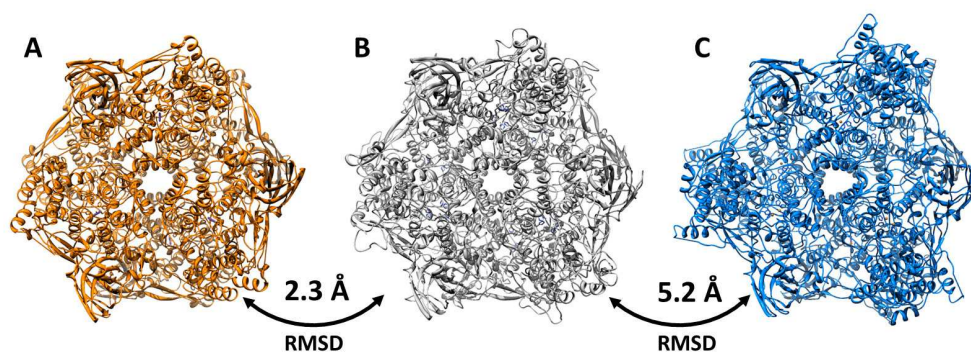


Abbildung 7.15: Aufsicht auf das Hexamer im Vergleich zu den Strukturen 1LLA und 1HC1. (A) zeigt das Hexamer des *Limulus polyphemus*-Hämocyans (1LLA), (B) zeigt das Hexamer der hier vorgestellten Kristallstruktur und (C) das Modell des *Panulirus interruptus*-Hämocyans (1HC1). Diese Hexamerstrukturen wurden überlagert, die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) zwischen den Modellen ist in der Abbildung angegeben. Die hier berechneten Abweichungen zeigen eine größere Ähnlichkeit der *Pandinus imperator*-Struktur mit 1LLA. Dies würde auf den oxygenierten Zustand hinweisen, die Unterschiede in der Quartärstruktur sind jedoch sehr gering, weshalb der selbe Vergleich nochmals auf der Ebene der Untereinheiten durchgeführt wurde.

Der analoge Vergleich wurde auf der Ebene der Untereinheiten durchgeführt. In Abbildung 7.16 sind in der Teilabbildung (A) die Domänen I, II und III in verschiedenen Farben zu sehen. Die Domäne I ist grün eingefärbt, Domäne II blau und Domäne III rot. In den Teilabbildungen sind die Abweichungen zwischen der Untereinheit A des *Pandinus imperator*-Hämocyans und den Untereinheiten der weiter oben angesprochenen Modelle 1LLA für das *Limulus polyphemus*-Hämocyans (B) und 1HC1 für das *Panulirus interruptus*-Hämocyans (C) dargestellt. Diese Abbildung zeigt die deutlich größere Übereinstimmung des Modells des Skorpion-Hämocyans mit 1LLA, dem Modell der oxygenierten Konformation. Besonders in Domäne I zeigt sich an der Farbskalierung, dass das Modell gut mit 1LLA übereinstimmt und gegenüber 1HC1 große Abweichungen vorliegen. Der Konformationsübergang zwischen dem oxygenierten und dem deoxygenierten Zustand zeigt sich in einer Drehung dieser Domäne I um 7° gegen die restliche Untereinheit [Magnus *et al.*, 1994, Jaenicke & Decker, 2004]. Die für das Hämocyans von *Limulus polyphemus* auf-

gestellte Hypothese, wonach durch die Rotation das Phe49 aus dem Kanal gezogen wird und so das aktive Zentrum zugänglicher gemacht wird [Hazes *et al.*, 1993], wurde für das Hämocyanin aus *Pandinus imperator* durch eine Kryo-EM Untersuchung bestätigt [Cong *et al.*, 2009].

Die Untereinheiten entsprechen der T-Konformation, die für das *Limulus polyphemus*-Hexamer angenommen wird. Über die Vergleiche mit den Modellen der Kleinwinkelstreuung wurde aber gezeigt, dass das 24-mer in der R-Konformation vorliegt. Demnach liegt das 24-mer *Pandinus imperator*-Hämocyanin also in einer Konformation vor, die bisher nur durch das Nested-Modell berücksichtigt wird [Decker, 1990]. Nach dem Nested-Modell ist es möglich, dass die Dodecamere als allosterische Einheit in der hochaffinen R-Konformation vorliegen, während die Untereinheiten in der niederaffinen T-Konformation vorliegen. Diese Konformation wird durch das Nested-Modell als tR-Konformation bezeichnet [Decker & Sterner, 1990].

Die Bestimmung der Konformation anhand der beiden Modelle 1LLA und 1HC1 sollte allerdings kritisch betrachtet werden, da die Zuordnung von 1LLA als Modell für die T-Konformation und von 1HC1 als Modell für die R-Konformation bisher nur postuliert und nie nachgewiesen wurde [Hazes *et al.*, 1993]. Die Anordnung des Hexamers in 1LLA ist darüber hinaus kein natives Hexamer. Vielmehr handelt es sich um ein Homohexamer aus der Untereinheit *II* des *Limulus polyphemus*-Hämocyanins. Dieses Konstrukt wurde für die Kristallisation benötigt und ist deshalb als „Kristallisationsartefakt“ anzusehen, nicht als das native Oligomer.

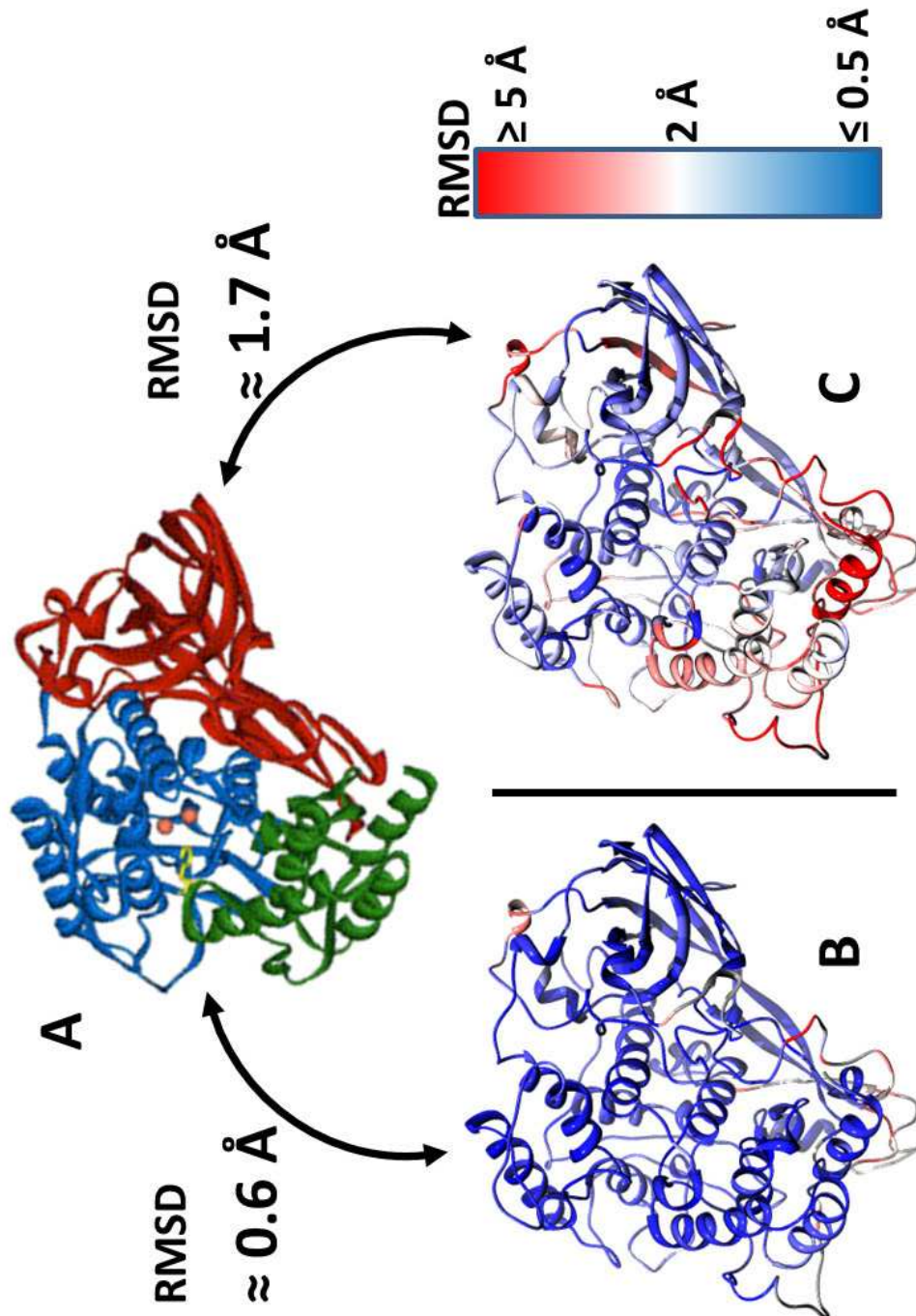


Abbildung 7.16: Überlagerung der Untereinheit A der vorgestellten Struktur aus *Pandinus imperator* mit den Untereinheiten der bekannten Strukturen 1OXY aus *Limulus polyphemus* ([Hazes *et al.*, 1993]) und 1HC1 aus *Panulirus interruptus* ([Volbeda & Hol, 1989]). (B) zeigt den Vergleich mit 1LLA, (C) zeigt den selben Vergleich mit 1HC1. In (A) sind die verschiedenen Domänen farblich gekennzeichnet. Man erkennt, dass vor allem in Domäne 1 eine größere Übereinstimmung mit 1LLA vorliegt. Die rechtsseitige Farbskalierung für die RMSD-Werte gilt für die Teilabbildungen (B) und (C). Die Teilabbildung (A) wurde übernommen aus [Decker & Jaenicke, 2004]



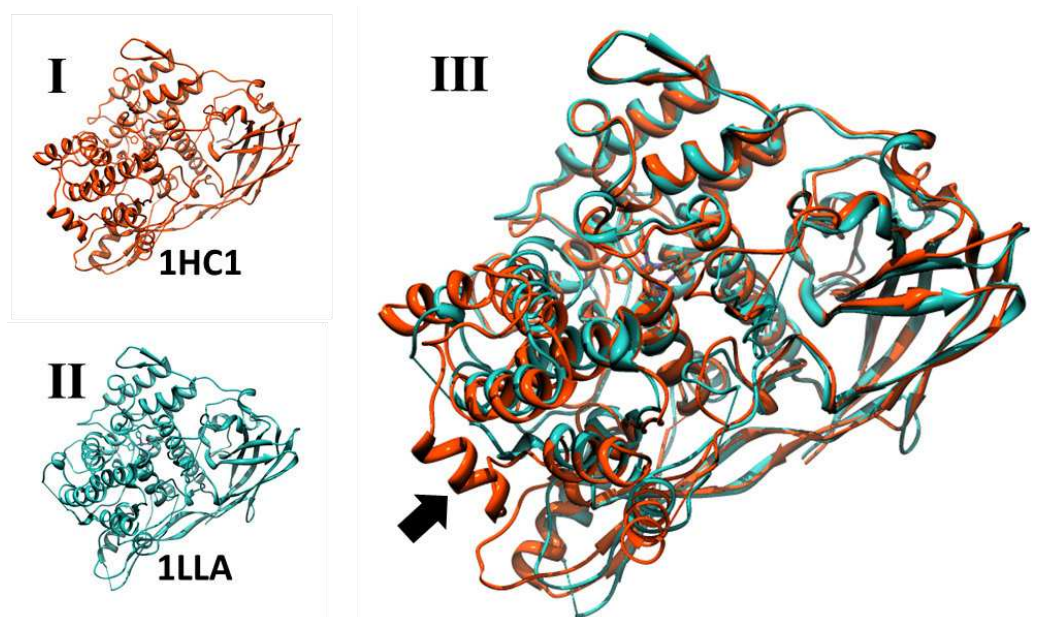


Abbildung 7.17: Vergleich zwischen den Untereinheiten aus 1LLA und 1HC1. Die Modelle der Untereinheiten der Hämocyanine aus *Panulirus interruptus* (I, orange) und *Limulus polyphemus* (II, blau) können nur bedingt als zwei Konformationen eines Moleküls angesehen werden. Der Vergleich der beiden Modelle (III) zeigt, dass das Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix in Domäne I besitzt.

Beim Vergleich der Untereinheiten mit 1LLA und 1HC1 sollte außerdem die Tatsache berücksichtigt werden, dass sich die Untereinheiten der beiden Modelle, wie Abbildung 7.17 zeigt, nicht ausschließlich durch die Konformation unterscheiden. Die beiden Untereinheiten sind sich zwar sehr ähnlich (RMSD-Wert von 0.95 Å bei der Überlagerung der beiden Modelle) allerdings erkennt man in der Abbildung eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix in der Domäne I der Untereinheit aus *Panulirus interruptus*. Diese zusätzliche  $\alpha$ -Helix bedingt eine Änderung in der Struktur, insbesondere in der am nächsten gelegenen Domäne I. Diese Veränderung kann aber keinem Konformationsübergang zugeschrieben werden. Um eine Abschätzung über die Konformation auf der Grundlage dieser beiden Modelle durchzuführen, wie in Abbildung 7.16 gezeigt, muss also die Annahme gemacht werden, dass der Unterschied in der Struktur der Untereinheiten gering ist gegenüber der durch die Konformationsänderung hervorgerufene Veränderung.

## Kapitel 8

# Diskussion: *Pandinus* *imperator*-Hämocyanin

### 8.1 Kristallisation und Messung der Streureflexe

Die Kristallisation ist bei der Bestimmung der Struktur ein wesentlicher Schritt. Da die Auflösung für die hier vorgestellte Kristallstruktur deutlich unter der bisher erreichten Auflösung bei den Hämocyaninen von *Panulirus interruptus* und *Limulus polyphemus* liegt, stellt sich die Frage nach den Kristallisationsbedingungen.

Bei der 3.2 Å Struktur von *Panulirus interruptus* wurden die Kristalle des nativen Hämocyanin-Hexamers bei einem pH-Wert von 4.5 gezogen [Gaykema *et al.*, 1984, Volbeda & Hol, 1989]. Bei der Aufnahme der Datensätze waren keine Reflexe über einer Auflösung von 3.16 Å zu beobachten, die Vollständigkeit des Datensatzes beträgt hierbei 77.7 %, beziehungsweise 50.6 % in der letzten Auflösungsschale.

Die Kristalle des Hämocyanins aus *Limulus polyphemus* im oxygenierten Zustand wurden bei einem pH von „knapp über 6“ gezogen [Magnus *et al.*, 1991]. Die übrigen Kristallisationsbedingungen waren denen in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten für *Pandinus imperator* sehr ähnlich. Insbesondere liegt die Poly-Ethylen-Glycol Konzentration bei nur 5 % und es wurde auch sonst kein Kryoprotektant verwendet. Durch die hohe Salzkonzentration von 0.5 M Natrium-Chlorid kommt es zur Aggregation der Untereinheit 2 des *Limulus polyphemus*-Hämocyanins zu Homo-Hexameren [Magnus *et al.*, 1991]. Aus diesen Homo-Hexameren wurden dann die Kristalle gezogen. Für den deoxygenierten Zustand wurden ähnliche Bedingungen verwendet, allerdings bei einem pH von „knapp unter 7“ [Hazes *et al.*, 1993]. Die Kristalle wurden nachträglich in der Kapillare deoxygeniert. Dazu wurde in die Kapillare eine Flüssigkeitssäule aus Puffer mit 250 mM Na-Dithionit so angebracht, dass ein Luftvolumen den Kristall von der Flüssigkeitssäule trennte. Die Vollständigkeit ist hier deutlich höher als beim *Panulirus interruptus*-Datensatz und beträgt 97 % beziehungsweise 92 % in der letzten Auflösungsschale.

Für beide Messungen ist anzumerken, dass die Datensätze bei Raumtemperatur gemessen wurden und nicht, wie für die hier vorgestellte Struktur des Skorpion-

Hämocyanins unter Kryo-Bedingungen.



Abbildung 8.1: Gemischtes „Well“: Es zeigen sich verschiedene Kristallformen innerhalb eines Wells. Die Extraktion eines gewünschten Kristalls wird durch die stabförmigen Kristalle erschwert. An dieser Stelle könnten leicht Bruchstücke am gewünschten Kristall haften und zu einem Twinning im Datensatz führen.

Bei der Kristallisation des *Pandinus imperator*-Hämocyanins gab es zwei wesentliche Hürden. Erstens dauerte die Kristallisation sehr lang, zweitens bildete das Protein verschiedene Kristallformen bei identischen Bedingungen (Abbildung 8.1). Um auszuschließen, dass dafür verschiedene Oligomerisierungszustände verantwortlich waren, wurde die Stammlösung mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Es wurde bereits angesprochen, dass für die Monomere aus *Limulus polyphemus* eine Aggregation der Monomere zu Hexameren schon bei einer NaCl Konzentration von 0.5 M zu beobachten war. Die *Pandinus imperator* Kristalle wurden bei einer NaCl Konzentration von 1.0 M gezogen, deshalb wäre die Aggregation von Monomeren nicht auszuschließen. Das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung ist in Abbildung 8.2 dargestellt und zeigt, dass es sich hier um eine monodisperse Lösung handelt. Auch nach einer 4-monatigen Lagerung der Hämocyaninlösung bei 4°C ist keine Veränderung festzustellen. Die Lösung enthält demnach ausschließlich die 24-mere Form des Hämocyanins. Untereinheiten oder dazwischenliegende Oligomerisierungsstufen sind höchstens in, mittels dynamischer Lichtstreuung, nicht nachweisbaren Mengen vorhanden.

Aus diesem Grund können verschiedene Oligomerisierungszustände nicht die Erklärung für verschiedene Kristallformen sein. Mögliche Erklärungen könnten Konzentrationsschwankungen innerhalb des Tropfens oder veränderte Bedingungen an den Grenzflächen im Tropfen sein. Das heißt aber auch, dass das Problem mit ver-



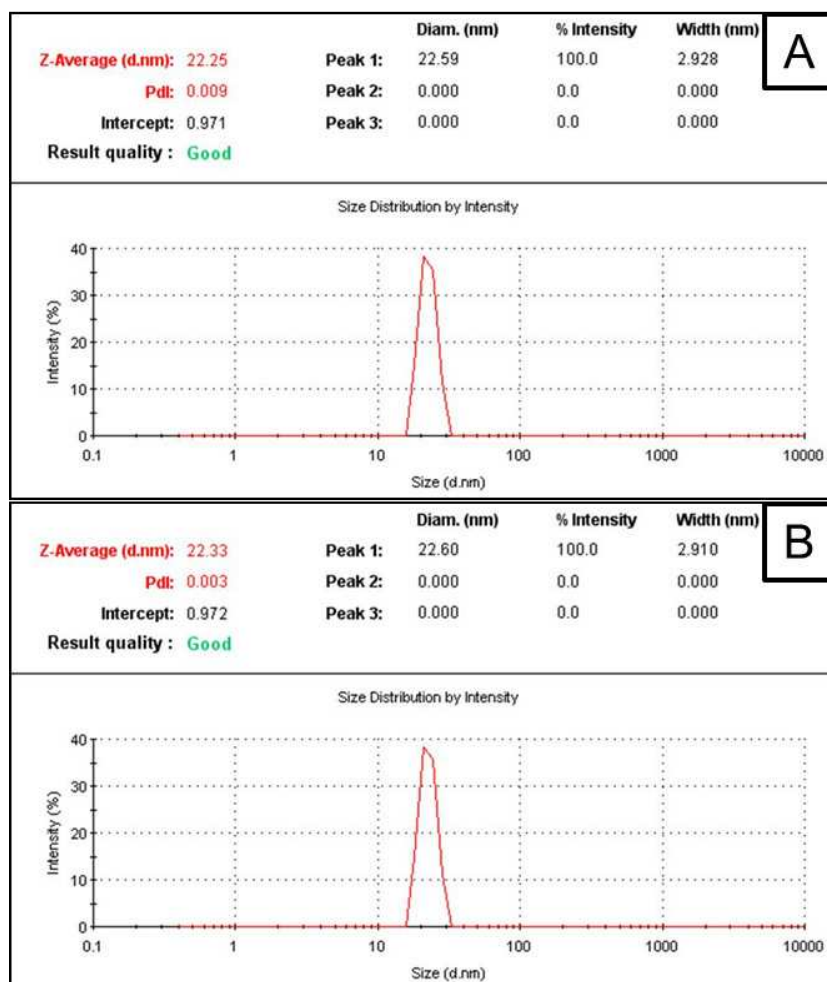


Abbildung 8.2: Dynamische Lichtstreuung an den Hämocyaninlösungen. (A) zeigt die Ergebnisse für frisch aufgereinigtes Hämocyanin, (B) zeigt die Ergebnisse nach einer 4-monatigen Lagerung bei 4°C. Die dynamische Lichtstreuung zeigt anhand des Pdl-Wertes, dass die Hämocyaninlösung monodispers ist. Die Messung von zwei Proben mit verschiedenen Lagerzeiten zeigt außerdem, dass eine Dissoziation des Proteins während der Kristallisation nicht zu erwarten ist. Der hydrodynamische (Z-Average) Durchmesser ist bei beiden Messungen nahezu identisch und stimmt mit den Erwartungen für das 24-mer überein.

schiedenen Kristallformen nicht durch einfache Manipulationen, wie Zentrifugation oder Filtration der Proteinlösung, beeinflusst werden kann. Gemischte „Wells“ mit verschiedenen Kristallformen wie in Abbildung 8.1 sind also nicht zu verhindern. Des Weiteren sind die Kristalle mechanisch sehr empfindlich, was die Handhabung zusätzlich erschwert. In diesem Zusammenhang machen gemischte „Wells“ wie in Abbildung 8.1 das Extrahieren des gewünschten Kristalls aus dem „Well“ schwieri-

ger.

Die PEG Konzentration reicht nicht aus, um als Kryoprotektant zu dienen, deshalb mussten die Kristalle nachträglich einem Soaking unterzogen werden. Die Empfindlichkeit der Kristalle hat auch dabei einen störenden Einfluß: läßt man die Kristalle zu lange in der Glycerinlösung, kommt es sehr schnell zur Auflösung. Damit konnten die Kristalle nur durch die Glycerinlösung gezogen werden, um dann möglichst ohne Verzögerung eingefroren zu werden. Dadurch kann allerdings nur das umgebende Lösungsmittel effektiv ersetzt werden, nicht aber das Lösungsmittel innerhalb des Kristalls. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für Schäden beim Einfriervorgang. An dieser Stelle könnten zukünftige Versuche ansetzen, um die Qualität der Kristalle zu verbessern und damit eine höhere Auflösung zu erzielen. Das Ziel dieser Kristallisationsexperimente müsste darin liegen, entweder stabilere Kristalle herzustellen, damit diese die nachfolgenden Prozeduren unbeschadet überstehen können, oder den Kryoprotektanten schon bei der Kristallisation zuzugeben, um das Soaking zu überspringen. Die Messungen bei Raumtemperatur durchzuführen, wie bei den beiden bisher veröffentlichten Kristallstrukturen ist nicht möglich, da sehr schnell Strahlenschäden auftreten: bei zwei Testbildern mit je 600 s Belichtungszeit zeigt sich schon von Bild 1 zu Bild 2 ein signifikanter Abfall der Streuintensität des Kristalls. Die niedrige Vollständigkeit beim Datensatz des *Panulirus interruptus*-Hämocyanins lässt darauf schließen, dass auch hier Strahlenschäden aufgetreten sind. Die Homo-Hexamere aus *Limulus polyphemus* scheinen diesbezüglich resistenter zu sein, da die Datensätze nahezu vollständig sind. Für die oxygenierten Kristalle wird bei Verwendung eines konventionellen Röntngengenerators eine Lebensdauer von 50 bis 200 Stunden angegeben [Magnus *et al.*, 1991].

Um die Struktur einzelner Untereinheiten zu bestätigen könnte deshalb auch für das Hämocyanin vom Skorpion versucht werden eine Aggregation und Kristallisation von Homo-Hexameren zu erreichen. Dabei würde sich die Untereinheit A anbieten, da diese, wie in Abbildung 7.8 gezeigt wurde der *Limulus polyphemus* 2 Untereinheit in der Sequenz am ähnlichsten ist. Die Messung an diesen stabileren Kristallen aus Homo-Hexameren könnte dann analog zur *Limulus polyphemus*-Struktur bei Raumtemperatur durchgeführt werden, wodurch Schäden durch den Einfriervorgang verhindert werden könnten. Auf diese Weise könnte für einzelne Untereinheiten eine bessere Auflösung erreicht werden. Eine native Konformation allerdings wäre auf diese Weise nicht zu erwarten.

Im Vergleich zu den Kristallstrukturen aus *Panulirus interruptus* und *Limulus polyphemus* liegt hier ein wesentlicher Vorteil der vorgestellten *Pandinus imperator*-Struktur. Der pH liegt im physiologischen Bereich und das Molekül als 24-mer vor, womit eine native Konformation des Hämocyanins angenommen werden kann.

## 8.2 Unterschiede zwischen den Untereinheiten

Die Neuerung gegenüber den bestehenden Modellen ist die Modellierung der nativen Konformation aus den einzelnen Untereinheiten. Die Qualität des resultierenden Modells hängt deshalb stark von der Qualität der einzelnen Untereinheiten ab. In diesem Abschnitt soll deshalb erörtert werden, wie unterschiedlich die verschiedenen Untereinheiten sind und inwiefern deren Primärstruktur bei der Interpretation der Struktur hilfreich sein kann.

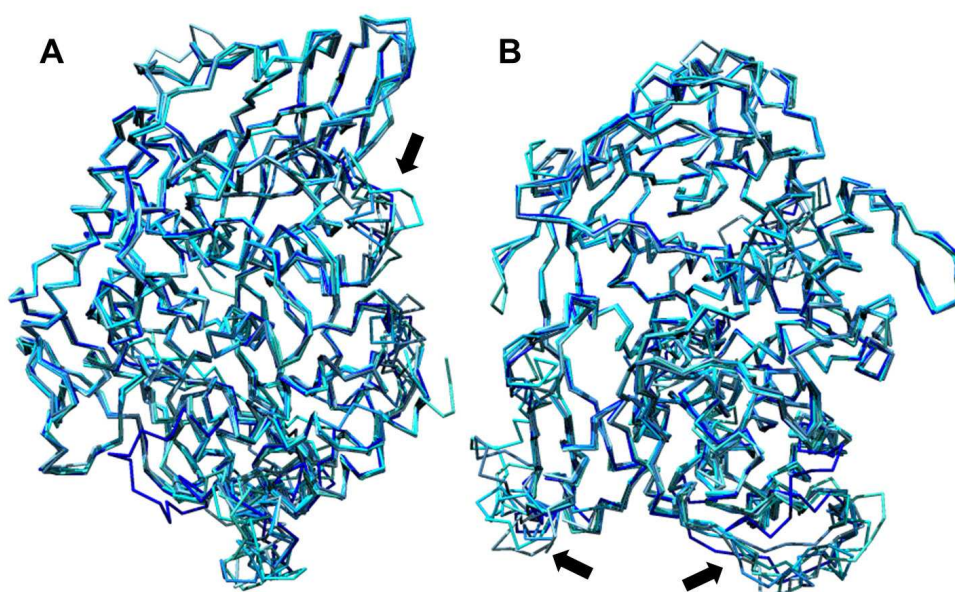


Abbildung 8.3: Überlagerung des  $C_{\alpha}$ -Traces der 7 verschiedenen Untereinheiten, die in das Modell des 24-meren Hämocyanins eingebaut wurden. Jede Untereinheit wurde in einem anderen Farbton dargestellt. (B) zeigt eine Ansicht, die gegenüber (A) um  $90^{\circ}$  um die Y-Achse gedreht wurde. Die Abbildung zeigt im Allgemeinen eine hohe Übereinstimmung zwischen den Untereinheiten. In wenigen Bereichen (Pfeile), weichen die Verläufe voneinander ab.

In Abbildung 8.3 sind die verschiedenen Untereinheiten überlagert dargestellt. Die Untereinheiten sind untereinander sehr ähnlich, an manchen Positionen sind jedoch Abweichungen im Proteinrückgrat zu erkennen. Diese Positionen sind in der Übersicht schwer zu erkennen. In Abbildung 8.4 wurde deshalb eine andere Darstellung gewählt. Hier wurde nur die Untereinheit A dargestellt, wobei diese nach der quadratisch gemittelten Abweichung der  $C_{\alpha}$ -Atome der einzelnen Untereinheiten bei der Überlagerung eingefärbt wurde.

Die relativ hohe Variabilität in den rot dargestellten Bereichen ist der Homologie-Modellierung zuzuschreiben, da es sich um Bereiche handelt, in denen gegenüber den als Template verwendeten Strukturen Sequenzabschnitte inseriert wurden. Durch

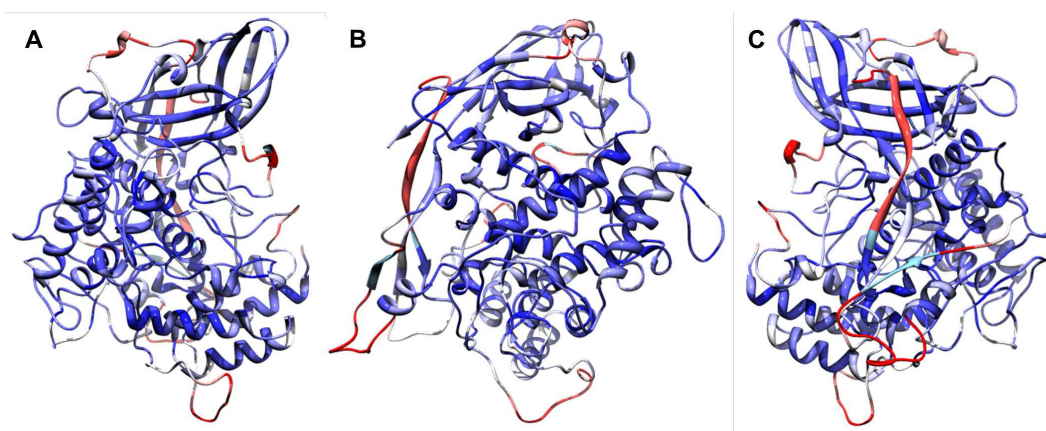


Abbildung 8.4: Quadratisch gemittelten Abweichungen zwischen den Untereinheiten des *Pandinus imperator*-Hämocyanins. Die Farbe entspricht der quadratisch gemittelten Abweichung (RMSD) zwischen den  $C_{\alpha}$ -Atomen der einzelnen Untereinheiten. Blau entspricht dabei einer Abweichung kleiner als 1 Å, rot einer Abweichung größer als 5 Å. (A) zeigt die Ausgangsansicht aus Abbildung 8.3 (A), (B) ist um 90° um die Y-Achse gedreht, für (C) wurde nochmals um 90° gedreht. Die Bereiche mit großen Abweichungen entsprechen den Bereichen, in denen Sequenzabschnitte gegenüber dem Template inseriert wurden.

diese Insertionen werden Bereiche eingefügt, für die im Template keine Vorgaben vorhanden sind. Dies führt dann zu einer Modellierung ohne Restriktionen seitens des Templates. Der Verlauf wird also durch die Sequenz, vor allem aber durch die Anzahl der inserierten Aminosäuren bestimmt. Die Gesamtlänge der Ketten variiert auch zwischen den Untereinheiten, so dass vor allem am N-terminalen Ende Unterschiede zu beobachten sind. Exemplarisch zeigt Abbildung 8.5 die Überlagerung zwischen der Untereinheit mit der kürzesten (UE F) und der längsten Kette (UE C). Am N-terminalen Ende ist der Unterschied deutlich. Die Begründung liegt allerdings in den verwendeten Sequenzen des *Pandinus imperator*-Hämocyanins. Die ersten 8 bis 12 Aminosäuren konnten nicht bestimmt werden und fehlen deshalb in der Sequenz der Untereinheit F. Auch für Untereinheit G konnten die ersten 8 bis 12 Aminosäuren nicht bestimmt werden [Roeding *et al.*, 2009]. Am N-terminalen Ende der F und G Untereinheiten fehlen also diese 8 bis 12 Aminosäuren in den modellierten Untereinheiten der Kristallstruktur.

Mit Ausnahme der angesprochenen Untereinheiten F und G, sind die Kettenlängen zwischen den Untereinheiten sehr ähnlich. Eine Auflistung findet sich in Tabelle 8.1. Addiert man die fehlenden  $\approx 10$  Aminosäuren für die Untereinheiten F und G sind die Längen von 5 der 7 Untereinheiten fast identisch. Die Ausnahme bilden einzig die Untereinheiten B und C die etwa 10 Aminosäuren länger sind, als die übrigen Ketten.

In den längeren Ketten befinden sich die zusätzlichen Aminosäuren meistens

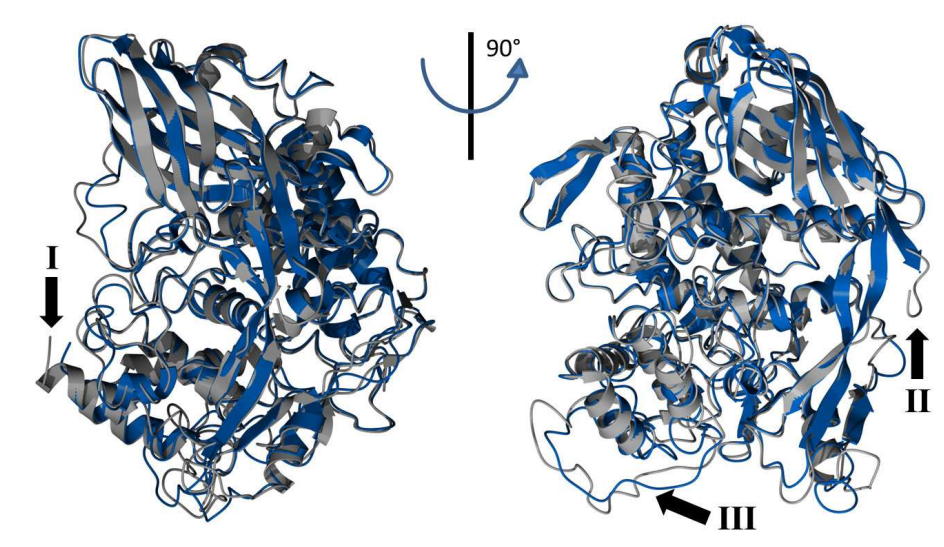


Abbildung 8.5: Vergleich zwischen der längsten (C, grau) und der kürzesten (F, blau) Untereinheit. Am N-terminalen Ende (I) ist die Untereinheit F kürzer als die Untereinheit C, dies liegt allerdings daran, dass in der Sequenz der Untereinheit F die ersten 8 bis 12 Aminosäuren nicht bestimmt werden können und deshalb fehlen [Roeding *et al.*, 2009]. Am C-terminalen Ende (II) sind die unterschiedlichen Längen sichtbar, dort ist die Untereinheit C um  $\approx 8$  Aminosäuren länger. Unterschiede in der Länge können sich auch durch verschiedene Verläufe in längeren Loops ergeben (III).

Untereinheit	A	E	G	B	C	F	D
Anzahl AS	627	625	616	633	637	616	627

Tabelle 8.1: Anzahl der Aminosäuren pro Kette für die verschiedenen Untereinheiten.

in den Loop-Regionen. Aus diesem Grund ist es nur schwer möglich anhand der Dichte an N- und C-Terminus auf die richtige Untereinheit zu schließen. Bei der Zuordnung der Untereinheiten musste deshalb die Analogie zum Spinnhämocyanin wie beschrieben verwendet werden, da eine eindeutige Zuordnung allein mit Hilfe der Elektronendichte nicht möglich gewesen wäre.



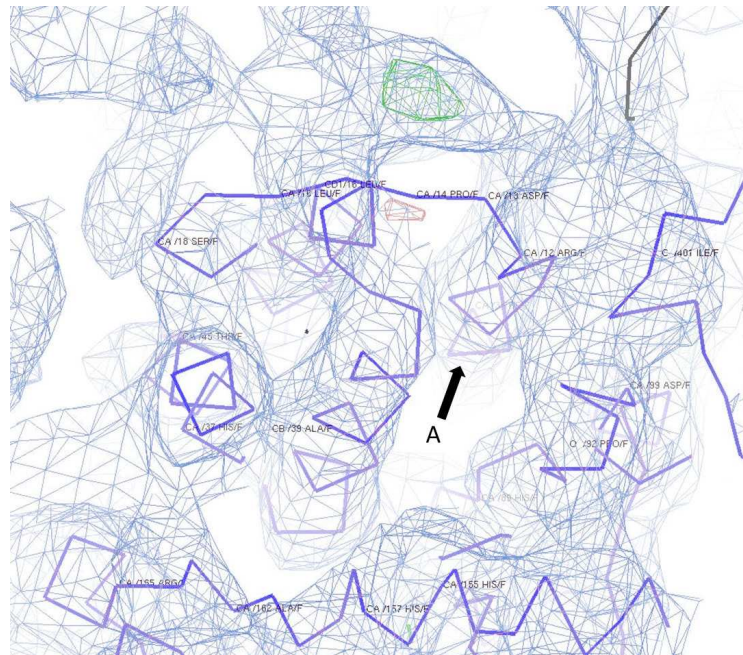


Abbildung 8.6: Fehlerhafter Verlauf im Modell für einen Loop-Bereich nahe dem N-terminalen Ende der Untereinheit F. Die Markierung (A) kennzeichnet den N-Terminus der Untereinheit F. Aus der Elektronendichte lässt sich auf einen alternativen Verlauf des  $C_{\alpha}$ -Traces in diesem Bereich schließen.

Bei Untereinheit F war das Ergebnis der Homologie-Modellierung im ersten Loop-Bereich fehlerhaft. Diese Tatsache wurde beim Vergleich mit der Dichte offensichtlich, wie in Abbildung 8.6 zu sehen ist.

In Abbildung 8.7 ist dieser Bereich vor und nach der Korrektur dargestellt. Der Verlauf des Loops konnte anhand der Dichte korrigiert werden. Die N-terminale  $\alpha$ -Helix musste allerdings aufgelöst werden, da das Modell für die Modellierung des Loops nach oben aus der  $\alpha$ -Helix „herausgezogen“ wurde. Die Auflösung dieser  $\alpha$ -Helix könnte deshalb auf die fehlenden 8 bis 10 Aminosäuren am N-terminalen Ende zurückzuführen sein. Mit einer korrigierten, vollständigen Sequenz könnte der Loop möglicherweise angepasst werden während die  $\alpha$ -Helix erhalten bleibt.

Die Korrektur eines längeren Abschnitts ( $\approx 20$  AS) des Modells anhand der Elektronendichte bestätigt, dass die Elektronendichte kein Bias aufweist, der auf das Modell zurückzuführen wäre.

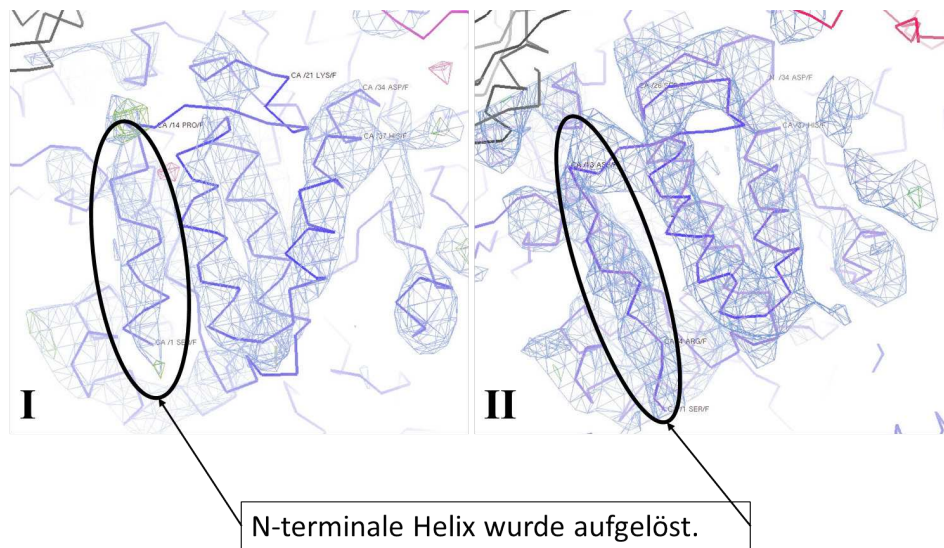


Abbildung 8.7: Korrektur am Loop-Bereich nahe dem N-terminalen Ende der Untereinheit F. Gegenüber Abbildung 8.6 wurde zur besseren Darstellung der N-terminalen  $\alpha$ -Helix die Ansicht geändert. Das Modell ist in lila vor (I) und nach (II) der Korrektur dargestellt. Die Elektronendichte ist in blau dargestellt ( $0.9 \sigma$ ). Die N-terminale  $\alpha$ -Helix wurde aufgelöst während der flexible Loop an die Dichte angepasst wurde. Dem Modell der Untereinheit F fehlen 8 bis 12 Aminosäuren am N-Terminus. Durch diese zusätzlichen Aminosäuren könnte die Auflösung der Helix bei der Anpassung des Loops unnötig sein. Die Teilabbildungen (I) und (II) unterscheiden sich bezüglich ihrer Orientierung.

### 8.3 Qualität des resultierenden Modells

Trotz der im ersten Unterabschnitt (8.1) angesprochenen Schwierigkeiten, konnte ein Kristall gefunden werden, aus dem ein auswertbarer Datensatz gewonnen werden konnte. Die Statistiken für diesen Datensatz wurden im letzten Kapitel unter Abschnitt 7.2 zusammengefasst und kommentiert. Auch die Phasenbestimmung durch die Methode des Molecular Replacement wurde beschrieben, wobei dieser Schritt durch die Struktur aus [Cong *et al.*, 2009] deutlich vereinfacht wurde. Das Vorgehen beim Refinement der Struktur wurde ebenfalls beschrieben, wobei in erster Linie die sehr hohen  $R$ -Faktoren aus Abschnitt 7.5 aufgefallen sind. Die finalen  $R$ -Faktoren liegen bei  $R = 0.35$  und  $R_{free} = 0.40$ . Bei den zwei bisher hinterlegten Kristallstrukturen von Hämocyaninen liegt der  $R$ -Wert bei 0.20 (*Panulirus interruptus*) und 0.17 (*Limulus polyphemus*). Der Vergleich mit diesen Strukturen ist allerdings aus zwei Gründen schwierig:

- Die Auflösung ist bei beiden Strukturen wesentlich besser (3.2 bzw. 2.2 Å).
- Als die Strukturen publiziert wurden, war die Angabe eines  $R_{free}$ -Wertes noch keine gängige Praxis.

Die Auflösung wirkt sich wegen des Lösungsmittels auf den  $R$ -Wert aus. Bei der in dieser Arbeit vorgestellten Struktur reicht die Auflösung nur bis 6.5 Å. In diesem Auflösungsbereich werden aber Inhomogenitäten des Lösungsmittels erfasst. Im Modell wird eine homogene Lösungsmittelverteilung angenommen. Da das Modell die Inhomogenitäten in der Lösungsmittelverteilung nicht wiedergeben kann, ist bei geringer Auflösung die Übereinstimmung zwischen dem Modell und den gemessenen Reflexen kleiner. Aus diesem Grund erreicht der  $R$ -Wert sein Minimum im Allgemeinen erst bei Auflösungswerten von 4 bis 2 Å, bevor er dann wegen der geringeren Vollständigkeit des Datensatzes zum Auflösungsminimum hin ansteigt. Bei einer Auflösung von 6.5 Å ist deshalb ein höherer  $R$ -Wert zu erwarten.

Das Fehlen des  $R_{free}$ -Wertes erschwert den Vergleich zusätzlich. Dieser Wert ist ein Index für das Überfitten der Daten. Für das hier vorgestellte Modell wurde das Refinement stark eingeschränkt, um ein solches Überfitten zu verhindern. Bei einem Testlauf für ein Refinement mit nur leichten Restriktionen wurden  $R$ -Werte bis zu 0.28 % erreicht. Allerdings war zu erkennen, dass diese Art des Refinements für die hier vorliegenden Daten nicht sinnvoll ist:

- Der  $R_{free}$ -Wert zeigt einen Anstieg während der  $R$ -Wert abfällt.
- Sekundärstrukturelemente werden an unpassenden Positionen aufgelöst.

Vor allem durch die Auflösung lassen sich die hohen  $R$ -Werte erklären. Die  $R$ -Werte wurden deshalb in Kauf genommen und das Refinement mit starken Restriktionen durchgeführt. Das Verhältnis von  $R$  zu  $R_{free}$ -Wert (0.35 zu 0.40) liegt in einem akzeptablen Bereich [Kleywegt & Jones, 2002] und weist darauf hin, dass die Daten beim Refinement nicht überfittet wurden.



Dass die Struktur gut in die Dichte gefittet werden kann, wurde schon in Abschnitt 7.5 auf Seite 85 gezeigt. Abbildung 8.8 zeigt die Übereinstimmung zwischen der Dichte und dem Modell im Bereich des aktiven Zentrums einer Untereinheit vor der Homologie-Modellierung. Diese Abbildung macht deutlich, dass die Orientierung der einzelnen Untereinheiten in der Dichte eindeutig war und grobe Fehler im Modell auszuschließen sind. Im letzten Abschnitt (8.2) wurde schon anhand der Korrektur eines Loops der Untereinheit F exemplarisch gezeigt, dass das Modell anhand der Elektronendichte verbessert werden konnte.

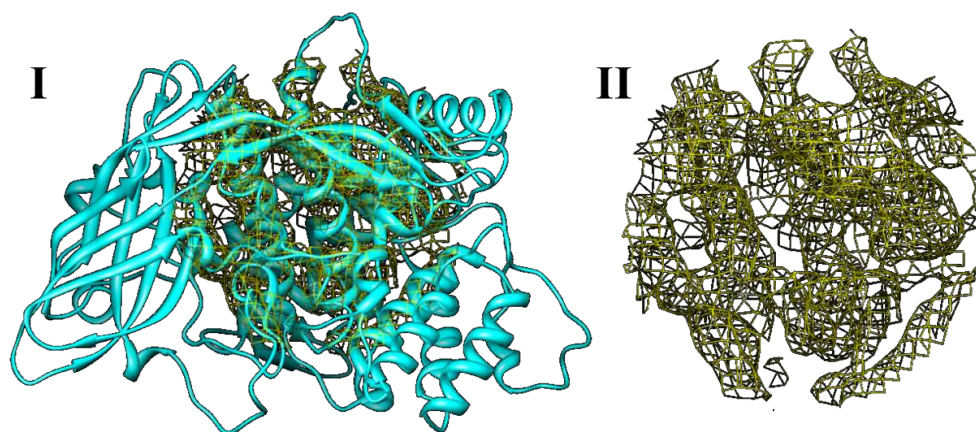


Abbildung 8.8: Übereinstimmung zwischen Elektronendichte und Modell im Bereich des aktiven Zentrums vor der Homologie-Modellierung. In (I) ist die Elektronendichte am aktiven Zentrum einer Untereinheit mit dem dazugehörigen Modell dargestellt, in (II) ohne das Modell. Bei der dargestellten Untereinheit handelt es sich um eine Untereinheit des für das Molecular Replacement verwendeten Modells. Das  $C_{\alpha}$ -Trace entspricht demnach noch dem Kryo-EM Modell aus [Cong *et al.*, 2009]. Wie in der Abbildung zu sehen ist, lässt sich die Orientierung der Untereinheiten in der Elektronendichte schon für das Startmodell eindeutig festlegen.

Ein wichtiger Punkt beim Refinement von Strukturen anhand von Elektronendichten mit niedriger Auflösung ist die a priori Information, die sowohl beim Molecular Replacement, als auch bei der Homologie-Modellierung verwendet wurde. Bei der Phasenbestimmung durch Molecular Replacement wurde durch die Verwendung einer reinen Polyalanin-Kette der Informationsgehalt auf ein Minimum reduziert, allerdings kann auch hier ein Bias eingebracht werden. Ein daraus resultierender Fehler im Modell würde während des Refinements gegenüber den reinen Streuamplituden korrigiert werden oder in der OMIT-Map auffallen und nachträglich korrigiert werden. Das selbe gilt für lokale Fehler im Verlauf des Proteinrückgrates durch die Homologie-Modellierung. In Bereichen mit geringer Information seitens der Streudaten können solche Fehler problematisch werden, da diese nicht korrigiert werden können. Bei diesen Bereichen handelt es sich hauptsächlich um die Seitenkettenatome und Loop-Bereiche mit hoher Beweglichkeit und folglich niedriger oder

verschmierter Elektronendichte. Dort wird das Modell von den Informationen aus der Homologie-Modellierung dominiert.

Die Genauigkeit der Vorhersage hängt bei der Homologie-Modellierung entscheidend vom Alignment und von der Position im Protein ab. Dies gilt sowohl für das Proteinerückgrat als auch für die Seitenketten. Damit ist für die sequentiell hochkonservierten Domänen, wie zum Beispiel das  $\alpha$ -Helix-Bundle um das aktive Zentrum, auch eine hohe Genauigkeit der Seitenketten zu erwarten. Für die Stellen an denen das Template keine Atomkoordinaten enthält, bedeutet dies, dass auch nach der Korrektur des  $C_\alpha$ -Traces die Lage der Seitenketten mit einer hohen Ungenauigkeit behaftet sein wird.

Zusammenfassend kann also die in Abschnitt 7.6 dargelegte gute Übereinstimmung mit den früheren Modellen als Bestätigung für die Korrektheit des hier vorgestellten Modells angesehen werden. Die Seitenkettenatome und einzelne Loops mit niedriger Elektronendichte sollten bei der Interpretation allerdings als Ergebnis der Homologie-Modellierung angesehen werden, da keine Verifikation durch die gemessenen Daten erfolgen konnte. In den sonstigen Bereichen, insbesondere auf der Ebene der Sekundärstruktur ergänzen sich Homologiemodellierung und Kristallstruktur. Das Modell kann im betrachteten Auflösungsbereich als korrekt angesehen und interpretiert werden.

## 8.4 Bedeutung der Auflösung

Die geringe Auflösung des Datensatzes mit dem die Kristallstruktur gelöst wurde ist schon mehrmals angesprochen worden. In diesem Abschnitt sollen die Folgen für die Interpretation der Elektronendichte erläutert werden. Die Qualität der Elektronendichte bei einer Auflösung von 6.5 Å soll exemplarisch an einer  $\alpha$ -Helix zwischen den Positionen 260 und 280 der Untereinheit A demonstriert werden. An dieser Stelle soll auf die Schwierigkeit bei der Modellierung hingewiesen werden. Deshalb wurde bewusst keine  $\alpha$ -Helix ausgewählt, bei der eine besonders hohe Übereinstimmung zwischen dem Modell und der Elektronendichte vorliegt.

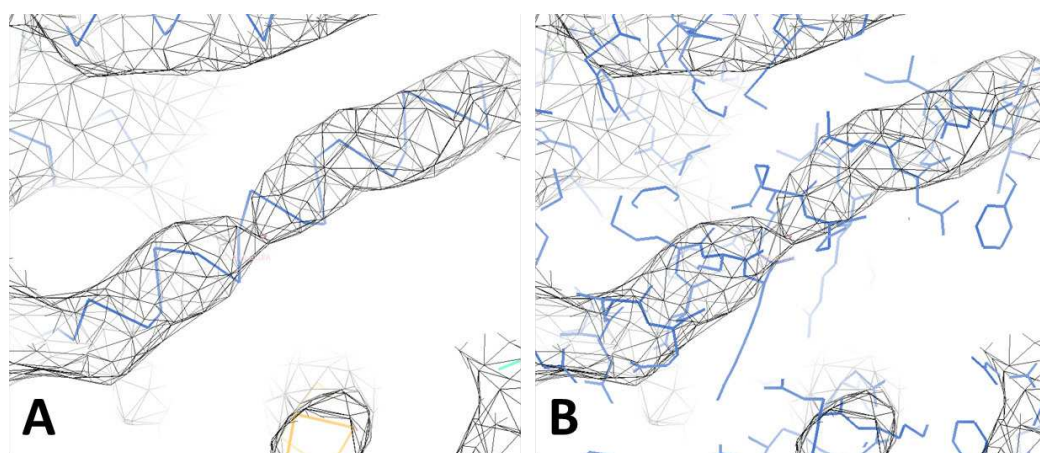


Abbildung 8.9: Auflösung der Elektronendichte. Die Elektronendichte ist bei  $0.9\sigma$  schwarz dargestellt, das Modell in blau als  $C_{\alpha}$ -Trace (A) beziehungsweise mit Seitenketten (B). Zu erkennen ist, dass die Information der Elektronendichte im Allgemeinen nicht ausreicht, um einzelne Seitenketten anzupassen.

Die Abbildung 8.9 zeigt diese  $\alpha$ -Helix mit der zugehörigen Elektronendichte ( $0.9\sigma$ ). Die Teilabbildung (A) zeigt, dass die  $\alpha$ -Helix und damit das  $C_{\alpha}$ -Trace leicht in die Dichte angepasst werden können. In der Teilabbildung (B) sind zusätzlich die Seitenketten angezeigt. Man sieht, dass aus der Elektronendichte keine eindeutige Information über diese Seitenketten entnommen werden kann.

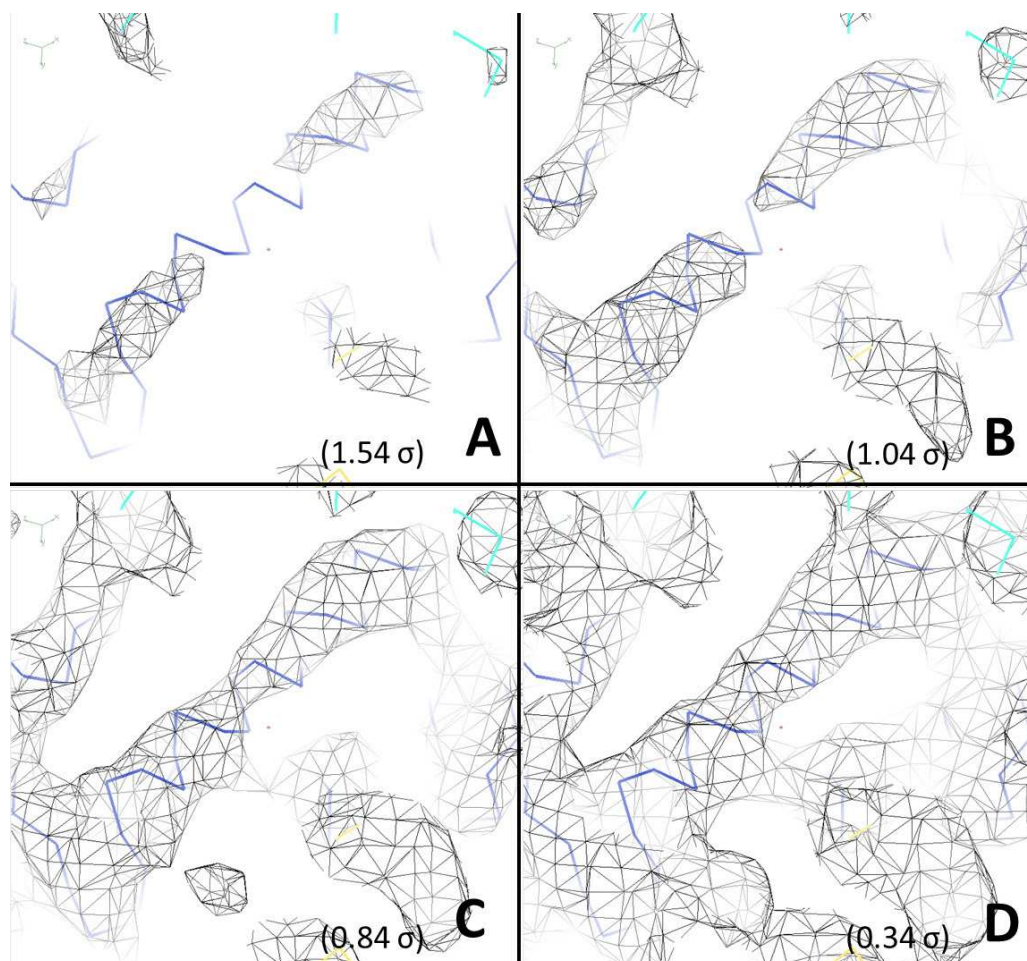


Abbildung 8.10: Darstellung des Modells mit verschiedenen Elektronendichte-Isoflächen. Die Abbildung zeigt die Auswirkung der Wahl des angezeigten Elektronendichte-Wertes. In (A) werden nur Bereiche mit sehr hoher Dichte dargestellt, in (B) und (C) sind Bereiche zu sehen, in denen Anpassungen am Modell vorgenommen werden können. In (D) sieht man, dass die Wahl eines zu geringen Wertes durch Rauschen die Qualität der Dichte verschlechtert.

Die Abbildung 8.10 zeigt die gleiche Helix, wobei die Elektronendichte-Isofläche bei 4 verschiedenen Werten angezeigt wurde. Die Abbildung stellt die Auswirkung der Wahl des angezeigten Elektronendichte-Wertes dar. Man erkennt anhand der Abbildung, dass ein zu hoher Wert (A) das Modellieren erschwert, da viele Bereiche nicht in dieser Qualität aufgelöst wurden. Bei einem zu geringen Wert (D) wird das Rauschen nicht mehr unterdrückt, die Qualität der angezeigten Elektronendichte erscheint geringer. Für die Modellierung und die in dieser Arbeit präsentierten Abbildungen wurde stets ein mittlerer Wert verwendet, wie es in den Teilabbildungen (C) und (D) der Fall ist.

Im nächsten Abschnitt wird die Kristallstruktur mit der Kryo-EM-Struktur aus [Cong *et al.*, 2009] verglichen, die eine Auflösung von 6.8 Å aufweist und als Basis für das Molecular Replacement verwendet wurde. Um einen Vergleich zwischen der Qualität der beiden Elektronendichten zu erlauben, wurde eine zur Abbildung 8.10 analoge Abbildung für die Kryo-EM-Struktur generiert. Aufgrund einer abweichender Skalierung in der Elektronendichte der Kryo-EM-Struktur sind allerdings die Werte für die Elektronendichte nicht vergleichbar. In Abbildung 8.11 wurden daher Werte gewählt, bei denen die resultierenden Elektronendichte-Isoflächen mit den vorherigen vergleichbar sind.

Der Vergleich bestätigt die etwas bessere Auflösung, die für die Kristallstrukturanalyse erreicht worden ist. Allerdings zeigt er auch, dass die Qualität der Elektronendichte beider Methoden die selbe Modellierung zulässt. Das  $C_\alpha$ -Trace kann im Allgemeinen in beiden Fällen durch die Dichte verbessert werden, die Modellierung der Seitenketten ist bei dieser Auflösung nicht möglich.

In dem gegebenen Auflösungsbereich zeigt der Vergleich allerdings, dass die Identifizierung von  $\alpha$ -Helices durch die etwas bessere Auflösung der Kristallstruktur einfacher wird.



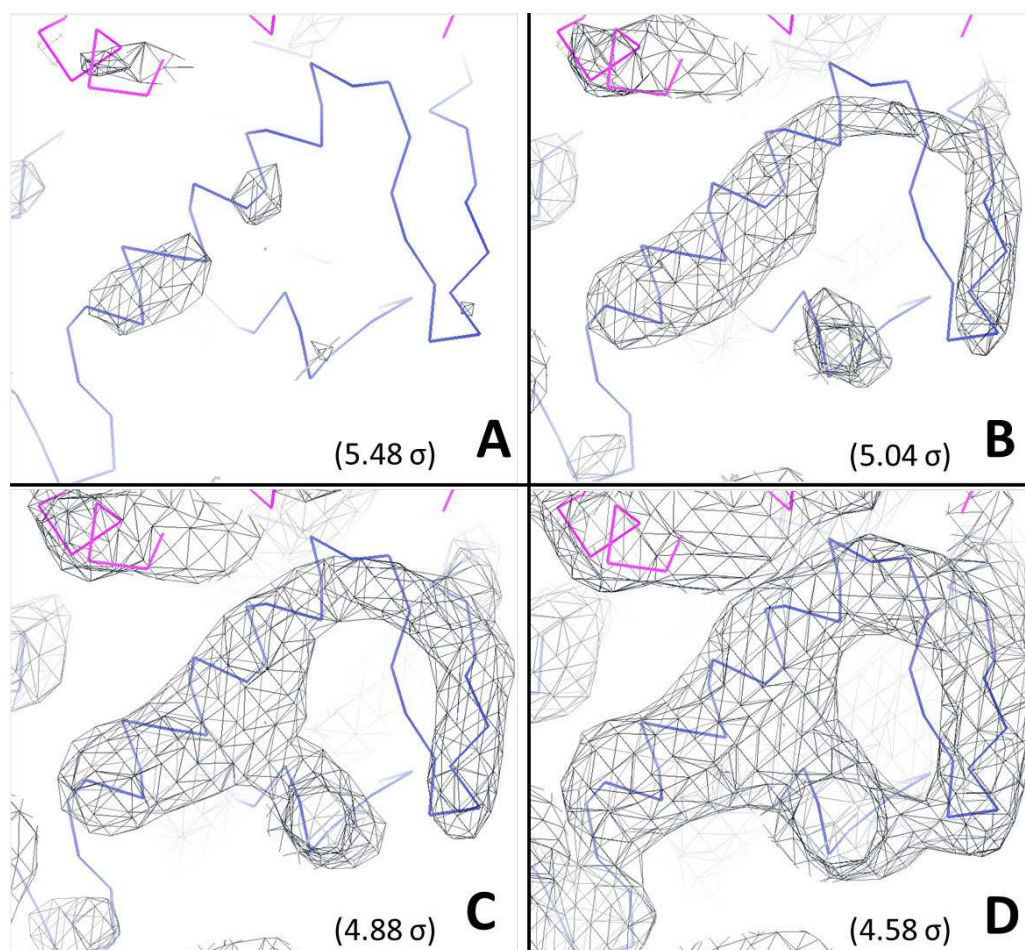


Abbildung 8.11: Modell und Elektronendichte für die Kryo-EM-Struktur aus [Cong *et al.*, 2009]. Hier wurde ebenfalls die Abbildung für verschiedene Elektronendichte-Werte erstellt. Die Absolutwerte sind allerdings wegen einer abweichenden Skalierung nicht mit den Werten aus Abbildung 8.10 zu vergleichen. Die Teilabbildungen (A) und (D) sind durch die extreme Wahl des Wertes der Elektronendichte ähnlich mit den entsprechenden Teilabbildungen für das kristallographische Modell. An den Teilabbildungen (B) und (C) zeigt sich die geringere Auflösung des Kryo-EM-Modells, da eine Definition der  $\alpha$ -Helix analog zur Teilabbildung (C) in Abbildung 8.10 nicht möglich ist.

## 8.5 Vorteile der Kristallstruktur gegenüber der Kryo-EM-Struktur

Im Abschnitt 8.3 wurde gezeigt, dass das hier vorgestellte Modell im Rahmen der gegebenen Auflösung mit hoher Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Struktur des Proteins nahe kommt. Nun stellt sich die Frage, inwiefern die Kristallstruktur überhaupt einen Vorteil gegenüber der beim Molecular Replacement verwendeten Kryo-EM-Struktur darstellt. Diese Frage soll in diesem Abschnitt auf drei Ebenen diskutiert werden: Methode, resultierende Struktur und Genauigkeit der Struktur.

### Methodik:

Auf der methodischen Ebene liegt ein Vorteil in der zusätzlich angewandten Methode. Da sich bei jeder Methode der Strukturbestimmung individuelle Schwächen finden lassen, die zu Fehlern in den Modellen führen können, ist die Bestimmung der Struktur über verschiedene Methoden die einzige Möglichkeit, solche Fehler auszuschließen. Ein weiterer Vorteil durch Kristallstrukturanalyse ist das „Entwicklungspotential“ des Modells beziehungsweise der Aufklärung. Mit der hier vorgestellten ersten Aufklärung der Struktur sind die Ausgangsparameter für weitere Experimente bekannt, die nun angepasst werden können. Wie bereits erwähnt besteht die Möglichkeit, ausgehend von den hier vorgestellten Bedingungen, die Kristallisationsbedingungen anzupassen. Ein weiterer Verbesserungsansatz wäre die Messung an einer anderen Strahlenquelle, wie zum Beispiel einem Synchrotron, wo durch die verbesserte Apparatur die Auflösung verbessert werden könnte. Durch die Möglichkeit den Primärstrahlblocker am Synchrotron feiner zu justieren wäre eventuell auch eine bessere Auflösung der inneren Reflexe möglich. Durch das begrenzte Zeitfenster bei der Durchführung von Experimenten am Synchrotron müssten die Kristalle jedoch vorher schon getestet und eingefroren werden.

### Struktur:

Bezüglich der Struktur zeigt sich eine große Ähnlichkeit zwischen der Kristall- und der Kryo-EM-Struktur (Abbildung 7.12). Wie im letzten Abschnitt angesprochen wurde, ist die Übereinstimmung als Bestätigung beider Modelle anzusehen. Die Abbildung 7.12 zeigt allerdings auch, dass die Kristallstruktur nur geringe Verbesserungen auf der Ebene des Proteinrückgrates erlaubt, und sich die Sekundärstrukturelemente zwischen beiden Modellen kaum unterscheiden. Die  $\alpha$ -Helices können in der Kristallstruktur mit höherer Genauigkeit angepasst werden.

### Genauigkeit:

Die Auflösung konnte von 6.8 Å in der Kryo-EM-Rekonstruktion auf 6.5 Å in der Kristallstruktur verbessert werden. Vergleicht man die Elektronendichten der beiden Modelle miteinander, sind die  $\alpha$ -Helices in der Elektronendichte der Kristallstruktur deutlicher erkennbar als in der Kryo-EM-Elektronendichte (siehe Abbildungen 8.10 und 8.11). Die  $\alpha$ -Helices sind wichtig, da sie bei der Orientierung der Untereinheiten in der Elektronendichte ein starkes Gewicht haben. Eine genaue Identifizierung der

$\alpha$ -Helices sorgt deshalb für eine Erhöhung der Genauigkeit des ganzen Modells. Ein objektiver Vergleich der Genauigkeit des gesamten Modells ist nicht möglich, da beiden Methoden ein gemeinsames Gütekriterium fehlt. In der Kristallographie werden die mehrmals angesprochenen  $R$ -Faktoren verwendet, in der Elektronenmikroskopie wird eine Korrelation zwischen Dichte und Modell angegeben. Diese beiden Kriterien können weder ineinander überführt werden, noch auf die andere Methode angewandt werden. Die Korrelation wird gegen die Elektronendichte berechnet, die in der Kristallographie aber nicht unabhängig vom Modell ist. Für die Berechnung von  $R$ -Faktoren müsste die EM-Dichte über eine Fourier-Transformation in Streufaktoren umgewandelt werden. Für diese Transformation würde allerdings das eingeschränkte Volumen der EM-Dichte auf ein unendliches Volumen extrapoliert werden, dadurch würde der  $R$ -Faktor die Objektivität verlieren.



## 8.6 Kontakte zwischen den Untereinheiten im Trimer

Auf kristallographische Daten bezogene Analysen von Kontakten zwischen verschiedenen Untereinheiten eines Arthropodenhämocyanins findet man für das *Panulirus interruptus*-Hämocyanin [Gaykema *et al.*, 1984, Volbeda & Hol, 1989] und für das *Limulus polyphemus*-Hämocyanin [Hazes *et al.*, 1993, Magnus *et al.*, 1994]. Die Struktur des deoxygenierten Hämocyanin-Hexamers aus *Limulus polyphemus* 1LLA wurde bei der Modellierung der Untereinheiten verwendet. Die zu 1LLA sehr ähnliche Struktur 1OXY wird in [Magnus *et al.*, 1994] beschrieben. Es handelt sich dabei um die Struktur des oxygenierten Hämocyanins aus dem gleichen Tier. Die Konformation ist der aus 1LLA jedoch sehr ähnlich [Magnus *et al.*, 1994].

Eine Kontaktstellenanalyse, wie sie für 1LLA und 1OXY, beziehungsweise 1HC1 durchgeführt wurde, kann bei der Kristallstruktur des Hämocyanins aus *Pandinus imperator* aufgrund der unzureichenden Auflösung nicht durchgeführt werden. Die Kontaktbereiche der bekannten Modelle können allerdings mit der Kristallstruktur verglichen werden.

Ein Vergleich der Kontaktstellen wurde zwischen der Kristallstruktur des *Pandinus imperator*-Hämocyanins und der Struktur des *Limulus polyphemus*-Hexamers 1OXY durchgeführt<sup>1</sup>. Dazu wurden mit Hilfe des Programms *YASARA* in der Kristallstruktur des Skorpions Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten gesucht. Das Programm sucht dabei nach Aminosäuren, deren Mindestabstand kleiner als eine vorgegebene Grenze ist (hier wurde 4 Å verwendet). Die Kontaktstellen wurden dann mit den beschriebenen Kontaktstellen der *Limulus polyphemus*-Struktur verglichen. Dabei fällt unter den Kontakten des Trimers ein möglicherweise für die Kooperativität wichtiger Unterschied auf. Die Kontaktstellen im Trimer werden deshalb im Folgenden näher beschrieben.

Im Trimer befinden sich die Kontakte zwischen den Untereinheiten fast ausschließlich auf der  $\alpha$ -Helix 2.3 der Domäne 2. Die Kontaktstellen im Modell des *Pandinus imperator*-Hämocyanins wurden mit den Kontaktstellen innerhalb des Trimers im Modell des *Limulus polyphemus*-Hämocyanins 1OXY verglichen. Hierfür wurde, wie in Abbildung 8.12 dargestellt, das Trimer aus den Untereinheiten A, E und G mit *YASARA* überlagert. Es zeigt sich, dass die meisten Kontakte in beiden Strukturen übereinstimmen. Ausgehend von dieser Überlagerung konnten jedoch auch Kontakte identifiziert werden, die nur in der Struktur des *Pandinus imperator*-Hämocyanins zu finden sind. Diese Kontakte sind für die Untereinheiten A und E in Abbildung 8.13 in der Stick-Darstellung zu sehen.

---

<sup>1</sup>1OXY wurde ausgewählt, da es das Modell mit der geringsten Abweichung bei der Überlagerung mit der Kristallstruktur ist.

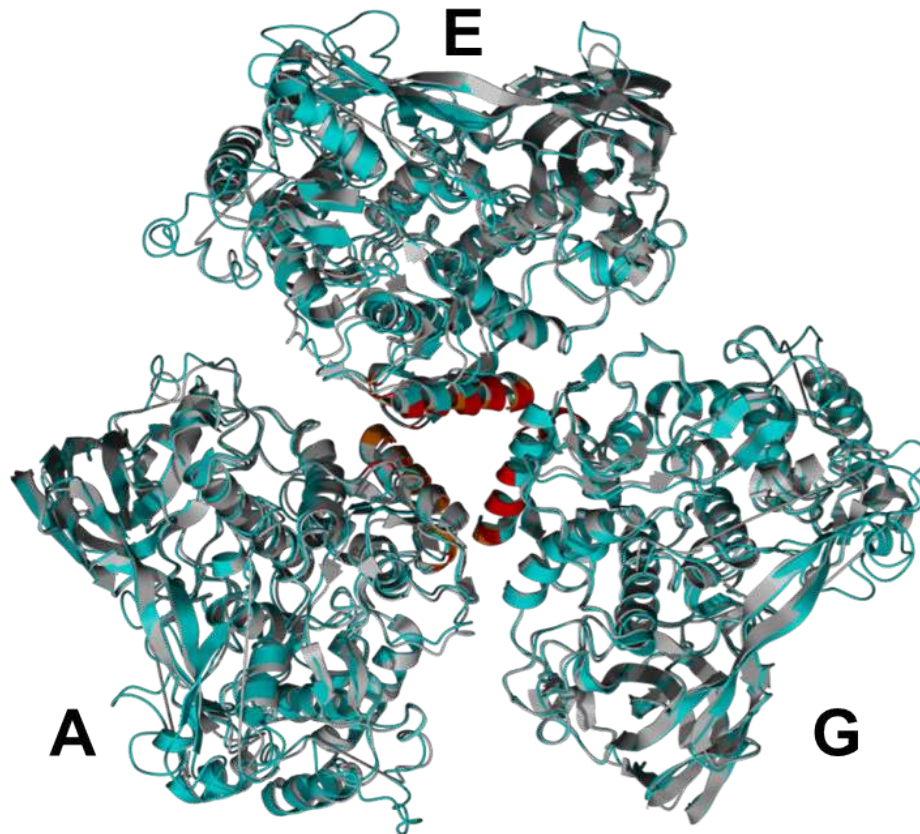


Abbildung 8.12: Überlagerung der Trimere aus dem *Pandinus imperator*-Hexamer mit den Trimeren aus dem *Limulus polyphemus*-Modell 1OXY. Überlagert wurde das Trimer aus den Untereinheiten A, E und G, diese sind in der Abbildung durch die entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Das *Pandinus imperator*-Modell ist grün, die Position der Kontakte zwischen den Untereinheiten des Skorpion-Hämocyanins rot dargestellt. Das *Limulus polyphemus*-Modell ist grau dargestellt, die Position der zugehörigen Kontakte orange. Diese Übersicht zeigt die Konzentration der Kontaktstellen auf den Bereich um die  $\alpha$ -Helix 2.3 der Domäne 2. Aus diesem Vergleich wurden die Kontakte identifiziert, die nur in der Struktur des *Pandinus imperator*-Hämocyanins zu finden sind.

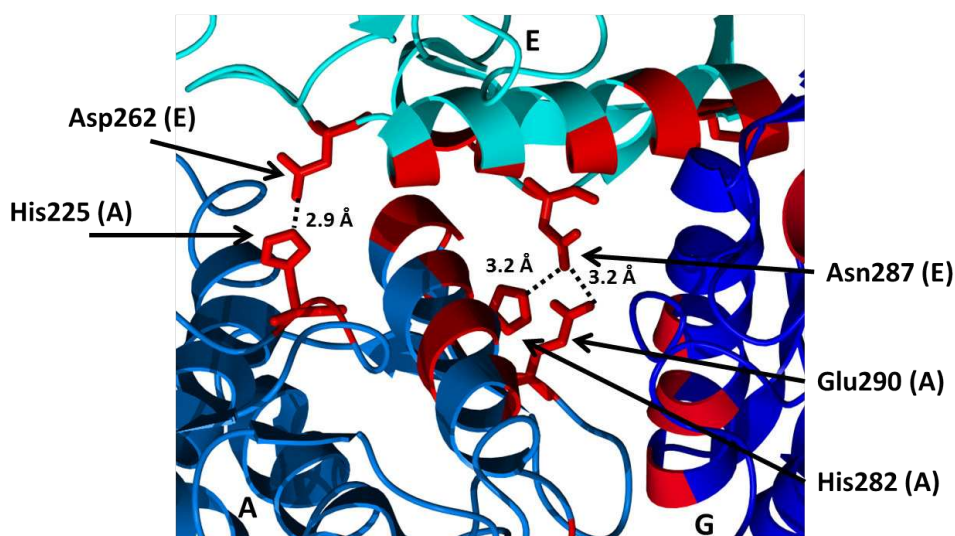


Abbildung 8.13: Unterschiede in den Kontaktstellen zwischen den trimeren Strukturen des *Pandinus imperator*-Hämocyanins und der Struktur des *Limulus polyphemus*-Hämocyanins 1OXY. Die verschiedenen Untereinheiten sind durch die Farbkodierung angedeutet: E in cyan, A in hellblau, G in dunkelblau. Die Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten sind rot eingefärbt. Die Kontakte zwischen den Untereinheiten A und E, die ausschließlich im *Pandinus imperator*-Modell zu finden sind, sind in der Stick Darstellung gezeigt. Zwischen dem Asparagin 287(E) und dem Histidin 282(A) beziehungsweise Glutamin 290(A) ist aufgrund der Ladungsverteilung keine Bindung zu erwarten. Zwischen der Asparaginsäure 262(E) und dem Histidin 225(A) ist eine Bindung sehr wahrscheinlich.

Man erkennt in Abbildung 8.13 zwei zusätzliche Kontakte zwischen den beiden Untereinheiten. Der erste Kontakt befindet sich zwischen dem Asparagin 287 der Untereinheit E und dem gegenüberliegenden Histidin 282 und Glutamin 290 der Untereinheit A. Eine Bindung ist allerdings trotz der kurzen Abstände von je 3.2 Å aufgrund der Ladungsverteilung weder zwischen Asp287(E) und Glu290(A) noch zwischen Asp287(E) und His282(A) zu erwarten. Im Gegensatz dazu ist beim zweiten Kontakt zwischen der Asp262(E) und dem His225(A) im Abstand von  $\approx 2.9$  Å eine Bindung sehr wahrscheinlich.

Die Annahme einer Bindung zwischen Asp262(E) und His225(A) wird bei der Betrachtung der äquivalenten Positionen im restlichen Trimer bestätigt. Wie die Abbildung 8.14 zeigt, ist diese mögliche Bindungsstelle zwischen einem Histidin und einer Asparaginsäure an dieser Position zwischen allen Paaren von Untereinheiten im Trimer vorhanden.

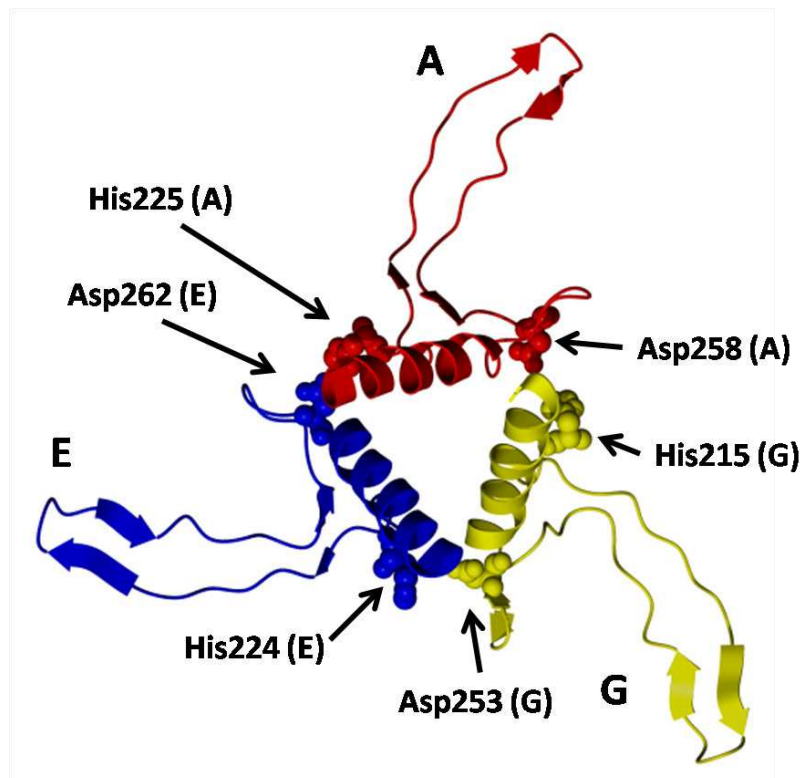


Abbildung 8.14: Eine mögliche Bindungsstelle zwischen Asp und His befindet sich zwischen allen Untereinheiten im Trimer. Die  $\alpha$ -Helix 2.3 und die angrenzende Schleife zwischen dem His225 oder Asp262 ist für die Untereinheit A rot dargestellt. Der entsprechende Bereich ist für Untereinheit E in blau und Untereinheit G in gelb dargestellt. Zwischen allen Untereinheiten ist eine Bindung analog zur Bindung zwischen His225 und Asp262 aus Abbildung 8.13 möglich.

Aufgrund der geringen Auflösung ist die Vorhersage von Bindungsstellen an der hier vorgestellten Kristallstruktur kritisch zu betrachten. Die Abbildung 8.15 demonstriert den Informationsgehalt der Elektronendichte bezüglich der Seitenketten. Die Kontaktstelle zwischen Asp262(E) und His225(A) mit der gemessenen Elektronendichte ist exemplarisch dargestellt. Die Teilabbildung II zeigt den C $\alpha$ -Trace während in Teilabbildung III auch die Seitenketten dargestellt werden.

Die Seitenketten sind normalerweise in der Elektronendichte nicht erkennbar. Die Abbildung 8.15 zeigt jedoch zwischen His225 (A) und Asp262 (E) (schwarzer Pfeil in der Abbildung) eine erhöhte Elektronendichte an. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die zwei Aminosäuren bei einer Bindung an der angezeigten Position einen geringen Abstand zueinander aufwiesen. Durch die niedrige Auflösung kann zwischen den beiden einzelnen Aminosäuren nicht unterschieden werden, weswegen im überlappenden Bereich eine höhere Dichte angezeigt wird. Obwohl aus der Elektronendichte nicht auf die Position der Seitenkettenatome geschlossen werden kann, weist die Erhöhung der Elektronendichte zwischen den beiden Untereinheiten in Abbildung 8.15 auf zwei räumlich eng benachbarte Aminosäurereste hin. Damit liefert auch die Elektronendichte einen Hinweis<sup>2</sup> auf eine Bindung zwischen den beiden Untereinheiten an dieser Position.

Im Folgenden werden die Auswirkungen der postulierten Bindung auf die Kooperativität des Hämocyanins betrachtet. Die Asparaginsäure (258 in Untereinheit A, 262 in UE E 253 in UE G) liegt am Anfang der jeweiligen  $\alpha$ -Helix 2.3. Das Histidin (225 in UE A, 224 in UE E und 215 in UE G) liegt am Ende einer an die Helix angrenzenden Schleife. Wie die Abbildung 8.14 zeigt, bilden die Bindungen zwischen Histidin und Asparaginsäure „Knotenpunkte“ zwischen der Schleife und der  $\alpha$ -Helix 2.3. Aus diesen zusätzlichen Bindungen könnte sich eine Fixierung der  $\alpha$ -Helix 2.3 ergeben.

Das Homo-Hexamere aus 1LLA beziehungsweise 1OXY zeigt fast keine Kooperativität [Magnus *et al.*, 1994]. Für das Hämocyanin vom Skorpion wird allerdings erwartet, dass ähnlich wie beim verwandten Spinnenhämocyanin aus *Eurypelma californicum* alle Strukturebenen am Konformationsübergang involviert sind [Hartmann & Decker, 2002]. Für das Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* wurde vorgeschlagen, dass die Rotation der Domäne I um 7° nur dann möglich ist, wenn die zwei Trimere im Hexamer gegeneinander gedreht werden [Decker, 1991]. Zusätzlich entfernen sich die beiden Trimere um etwa 2 Å voneinander. Um eine Trennung der Kontakte zwischen den beiden Trimeren zu verhindern, wird die Domäne III näher an die drei-zählige Symmetrie-Achse verschoben. Dabei wird der zentrale Kanal, in dem sich auch die  $\alpha$ -Helix 2.3 befindet, verengt [Hartmann & Decker, 2002].

Die Fixierung der  $\alpha$ -Helix 2.3 könnte deshalb entscheidend für die Kooperativität im Hexamer sein. In Abbildung 8.14 zeigt sich, dass ohne die zusätzliche Bindung die  $\alpha$ -Helix 2.3 durch den angrenzenden Loop eine hohe Beweglichkeit hat. Durch die

---

<sup>2</sup>Diese Erhöhung kann nur als Hinweis angesehen werden, da eine solche Erhöhung der Elektronendichte hier auch als Auswirkung des Rauschens angesehen werden könnte. Obwohl es unwahrscheinlich ist, kann es nicht ausgeschlossen werden.



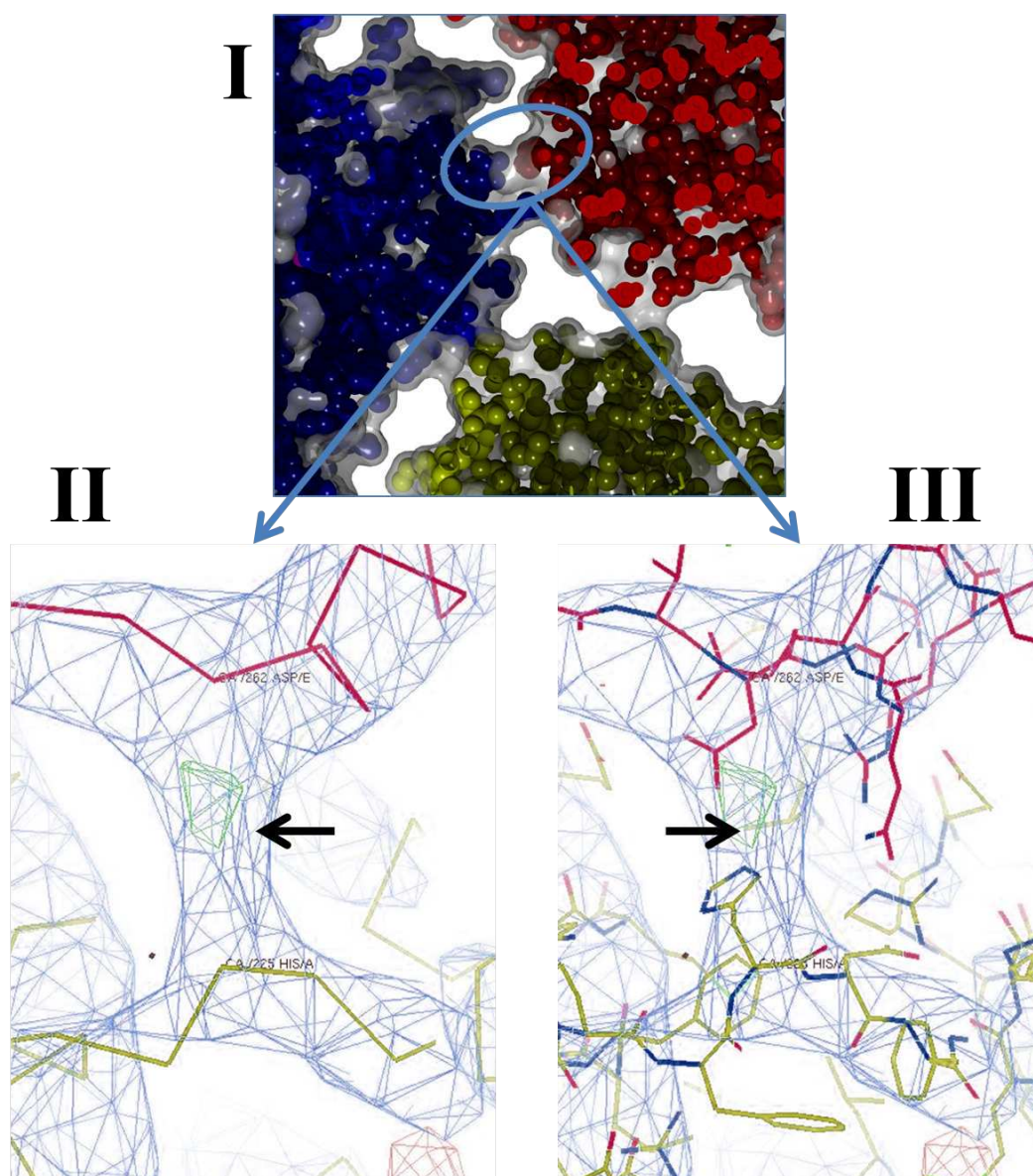


Abbildung 8.15: Gemessene Elektronendichte ( $0.9 \sigma$ ) an der postulierten Bindungsstelle zwischen den Untereinheiten A und E. Die Umgebung der möglichen Bindungsstelle zwischen der Asparaginsäure 262 der Untereinheit E und dem Histidin 225 der Untereinheit A aus (I) wurde in *COOT* mit der gemessenen Elektronendichte dargestellt. In (II) ist der Verlauf des  $C_{\alpha}$ -Traces, in (III) sind auch die Seitenketten im „Baton mode“ dargestellt. Diese Abbildung zeigt die Qualität aber auch den bezüglich der Seitenketten relativ niedrigen Informationsgehalt der Elektronendichte. Zwischen dem His225 der Untereinheit A und dem Asp262 der Untereinheit E (schwarzer Pfeil) erkennt man jedoch eine erhöhte Elektronendichte, die durch die Bindung erklärt werden könnte. Die einzelnen Aminosäuren sind in der Dichte normalerweise nicht erkennbar. Durch eine Bindung wären aber zwei Aminosäuren in einem geringen Abstand an der angezeigten Position zu finden. Durch die niedrige Auflösung kann zwischen den beiden Aminosäureresten nicht unterschieden werden, was im überlappenden Bereich zu einer erhöhten Elektronendichte führt.

Fixierung verliert die Helix diese Beweglichkeit. Auf der anderen Seite ist die Helix durch eine kurze Verbindung mit der  $\alpha$ -Helix 2.4 verbunden. Diese kurze Verbindung spricht dafür, dass das obere Ende der Helix eine eher geringe Beweglichkeit aufweist.

Mit einer starren  $\alpha$ -Helix als einzige Bindung zwischen den Untereinheiten lassen sich nun zwei vereinfachte Darstellungen finden. Die Untereinheit 1 führt einen Konformationsübergang aus, die Veränderung wird über  $\alpha$ -Helix 2.3 an die Untereinheit 2 weitergegeben:

- Die  $\alpha$ -Helix ist flexibel „gelagert“. Damit kann sich die Helix gegenüber der restlichen Untereinheit 2 bewegen. Die Veränderung der Untereinheit 1 kann durch die Helix amortisiert werden und wird somit nicht weitergegeben.
- Die  $\alpha$ -Helix ist fixiert. Eine Bewegung der  $\alpha$ -Helix von Untereinheit 1 wird an die angrenzende Untereinheit 2 über die entsprechende  $\alpha$ -Helix weitergegeben.

In diesem vereinfachten Modell würde nun die zusätzliche Bindung die fehlende Kooperativität im *Limulus polyphemus*-Hexamer erklären und eine kooperative Sauerstoffbindung für das *Pandinus imperator*-Hexamer vorhersagen. Der vorgeschlagene Mechanismus ist jedoch nur eine Hypothese, die noch der Überprüfung bedarf. Obwohl die Ausrichtung der beteiligten Aminosäuren im Modell sehr wahrscheinlich erscheint, kann eine falsche Orientierung der Seitenketten bei der hier erreichten Auflösung nicht ausgeschlossen werden. Außerdem wurden hier nur die Kontakte der Domäne II innerhalb eines Trimers betrachtet. Das Hexamer ist allerdings als ein Trimer von Dimeren aufgebaut, wobei viele starke Kontakte zwischen den beiden Trimeren über die Domäne III erfolgen [Hartmann & Decker, 2002]. Die Hypothese müsste also durch einen vollständigen Vergleich aller Kontakte im Hexamer noch bestätigt werden. Dafür ist jedoch eine Struktur mit einer höheren Auflösung erforderlich.

Die Exaktheit dieser Hypothese könnte nur über eine Verbesserung der Auflösung und die funktionelle Überprüfung des *Pandinus imperator*-Hämocyanins nach einer Punktmutation der an der Bindung beteiligten Aminosäuren verifiziert werden.

## 8.7 Zusammenfassung

Die Kristallstruktur des 24-meren Hämocyanins aus *Pandinus imperator* konnte durch eine Kombination von Röntgenkristallographie und Homologie-Modellierung mit einer Auflösung von 6.5 Å gelöst werden. Allerdings wäre die Bestimmung der Phasen durch Molecular Replacement ohne die vor kurzem publizierte Kryo-EM Struktur nicht möglich gewesen [Cong *et al.*, 2009].

Damit ist es durch die Kombination verschiedener Methoden erstmalig gelungen die Struktur eines Hämocyanins dieser Größe ( $M_w = 1.7$  MDa) zu lösen. Die Auflösung von 6.5 Å, eine für die Kristallographie relativ geringe Auflösung, erlaubte die Bestimmung des C $_{\alpha}$ -Traces des Proteins mit hoher Genauigkeit.

Durch die Kristallstruktur konnte das zu Grunde liegende Kryo-EM-Modell aus [Cong *et al.*, 2009] bestätigt werden. Insbesondere die Position der  $\alpha$ -Helices konnte mittels Kristallographie mit einer höheren Genauigkeit bestimmt werden. Durch die Verwendung von OMIT-Maps wurde sichergestellt, dass die Struktur nicht „kopiert“ wurde. Die Übereinstimmung ist deshalb auf die Struktur des Hämocyanins im gemessenen Kristall zurückzuführen, nicht auf einen Bias bei der Auswertung.

Anhand der Kristallstruktur konnten für die Kooperativität im Trimer potentiell entscheidende Aminosäuren identifiziert werden. Diese Aminosäuren könnten im Vergleich zur bekannten trimeren Struktur aus *Limulus polyphemus* zur Ausbildung zusätzlicher Bindungen zwischen den Untereinheiten führen. Diese Bindungen könnten eine wichtige Rolle beim Konformationsübergang zwischen dem T- und R-Zustand spielen.



# Literaturverzeichnis

- [PDB, n.d.] *Protein Data Bank*. <http://www.pdb.org>.
- [Adrian *et al.*, 1998] Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S. D., & Harris, J. R. 1998. Cryo-negative staining. *Micron*, **29**(2-3), 145–160.
- [Baird *et al.*, 2007] Baird, Sharon, Kelly, Sharon M, Price, Nicholas C, Jaenicke, Elmar, Meesters, Christian, Nillius, Dorothea, Decker, Heinz, & Nairn, Jacqueline. 2007. Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation. *Biochim Biophys Acta*, Aug.
- [Baldwin & Chothia, 1979] Baldwin, J., & Chothia, C. 1979. Haemoglobin: the structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J Mol Biol*, **129**(2), 175–220.
- [Bard & Shapiro, 1979] Bard, H., & Shapiro, M. 1979. Perinatal changes of 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity in mammals not having fetal type hemoglobins. *Pediatr Res*, **13**(3), 167–169.
- [Bartels *et al.*, 1969] Bartels, H., Schmelzle, R., & Ulrich, S. 1969. Comparative studies of the respiratory function of mammalian blood. V. Insectivora: shrew, mole and nonhibernating and hibernating hedgehog. *Respir Physiol*, **7**(3), 278–286.
- [Bauer *et al.*, 1980] Bauer, C., Rollema, H., Till, H., & Braunitzer, G. 1980. Phosphate Binding by Lama and Camel hemoglobin. *Journal of Comparative Physiology*, **136**, 67–70.
- [Bhat, 1988] Bhat, T. N. 1988. Calculation of an OMIT map. *Journal of Applied Crystallography*, **21**, 279–281.
- [Braunitzer *et al.*, 1979] Braunitzer, G., Schrank, B., Stangl, A., & Wiesner, H. 1979. [Respiration at high altitudes, phosphate-protein interaction: the sequence of hemoglobins from guinea pig and dromedary (author's transl)]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **360**(12), 1941–1946.
- [Brünger, 1992] Brünger, A. T. 1992. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**(6359), 472–475.

- [Bunn, 1971] Bunn, H. F. 1971. Differences in the interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. *Science*, **172**(987), 1049–1050.
- [Buzy *et al.*, 1995] Buzy, A., Gagnon, J., Lamy, J., Thibault, P., Forest, E., & Hudry-Clergeon, G. 1995. Complete amino acid sequence of the Aa6 subunit of the scorpion *Androctonus australis* hemocyanin determined by Edman degradation and mass spectrometry. *Eur J Biochem*, **233**(1), 93–101.
- [Cheng *et al.*, 2006] Cheng, Yifan, Wolf, Elmar, Larvie, Mykol, Zak, Olga, Aisen, Philip, Grigorieff, Nikolaus, Harrison, Stephen C, & Walz, Thomas. 2006. Single particle reconstructions of the transferrin-transferrin receptor complex obtained with different specimen preparation techniques. *J Mol Biol*, **355**(5), 1048–1065.
- [Chothia & Lesk, 1986] Chothia, C., & Lesk, A. M. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*, **5**(4), 823–826.
- [Chua *et al.*, 1975] Chua, C. G., Carrell, R. W., & Howard, B. H. 1975. The amino acid sequence of the alpha chain of the major haemoglobin of the rat (*Rattus norvegicus*). *Biochem J*, **149**(1), 259–269.
- [COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, 1994] COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, NUMBER 4. 1994. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.*, **D50**, 760–763.
- [Condò *et al.*, 1981] Condò, S. G., Giardina, B., Barra, D., Gill, S. J., & Brunori, M. 1981. Purification and functional properties of the hemoglobin components from the rat (Wistar). *Eur J Biochem*, **116**(2), 243–247.
- [Cong *et al.*, 2009] Cong, Y., Zhang, Q., Woolford, D., Schweikardt, T., Khant, H., Dougherty, M., Ludtke, S. J., Chiu, W., & Decker, H. 2009. Structural mechanism of SDS-induced enzyme activity of scorpion hemocyanin revealed by electron cryomicroscopy. *Structure*, **17**(5), 749–758.
- [Cumbaa *et al.*, 2003] Cumbaa, Christian A, Lauricella, Angela, Fehrman, Nancy, Veatch, Christina, Collins, Robert, Luft, Joe, DeTitta, George, & Jurisica, Igor. 2003. Automatic classification of sub-microlitre protein-crystallization trials in 1536-well plates. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **59**(Pt 9), 1619–1627.
- [Decker, 1986] Decker, Roberts, Gill. 1986. *Nesting - an extension of the allosteric model and its application to tarantula hemocyanin*. Springer-Verlag.
- [Decker, 1990] Decker, H. 1990. Nested allostery in scorpion hemocyanin (*Pandinus imperator*). *Biophys Chem*, **37**(1-3), 257–263.
- [Decker, 1991] Decker, H. 1991. *Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers*. Springer Verlag.

- [Decker & Sterner, 1990] Decker, H., & Sterner, R. 1990. Hierarchien in der Struktur und Funktion von sauerstoffbindenden Proteinen. *Naturwissenschaften*, **77**, 561–568.
- [Decker *et al.*, 1996] Decker, H., Hartmann, H., Sterner, R., Schwarz, E., & Pilz, I. 1996. Small-angle X-ray scattering reveals differences between the quaternary structures of oxygenated and deoxygenated tarantula hemocyanin. *FEBS Lett*, **393**(2-3), 226–230.
- [Decker & Jaenicke, 2004] Decker, Heinz, & Jaenicke, Elmar. 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev Comp Immunol*, **28**(7-8), 673–687.
- [D'Erchia *et al.*, 1996] D'Erchia, A. M., Gissi, C., Pesole, G., Saccone, C., & Arna-son, U. 1996. The guinea-pig is not a rodent. *Nature*, **381**(6583), 597–600.
- [Dickerson & Geiss, 1983] Dickerson, R., & Geiss, I. 1983. *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology*. Benjamin/Cummings.
- [Diederichs & Karplus, 1997] Diederichs, K., & Karplus, P. A. 1997. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol*, **4**(4), 269–275.
- [Drenth, 1994] Drenth, Jan. 1994. *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer Verlag.
- [Emsley *et al.*, 2010] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **66**(Pt 4), 486–501.
- [Evans, 2006] Evans, Philip. 2006. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **62**(Pt 1), 72–82.
- [Garman & Owen, 2006] Garman, Elspeth F, & Owen, Robin Leslie. 2006. Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **62**(Pt 1), 32–47.
- [Gaykema *et al.*, 1984] Gaykema, W. P. J., Hol, W. G. J., Vereijken, J. M., Soeter, N. M., Bak, H. J., & Beintema, J. J. 1984. 3.2 [angst] structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein Panulirus interruptus haemocyanin. *Nature*, **309**(5963), 23–29.
- [Graur *et al.*, 1991] Graur, D., Hide, W. A., & Li, W. H. 1991. Is the guinea-pig a rodent? *Nature*, **351**(6328), 649–652.
- [Harano *et al.*, 1982] Harano, T., Harano, K., Ueda, S., Shibata, S., Imai, K., Ohba, Y., Shinohara, T., Horio, S., Nishioka, K., & Shirotani, H. 1982. Hemoglobin Kawachi [alpha 44 (CE2) Pro leads to Arg]: a new hemoglobin variant of high oxygen

- affinity with amino acid substitution at alpha 1 beta 2 contact. *Hemoglobin*, **6**(1), 43–49.
- [Hartmann & Decker, 2002] Hartmann, Hermann, & Decker, Heinz. 2002. All hierarchical levels are involved in conformational transitions of the 4 x 6-meric tarantula hemocyanin upon oxygenation. *Biochim Biophys Acta*, **1601**(2), 132–137.
- [Hartmann & Decker, 2004] Hartmann, Hermann, & Decker, Heinz. 2004. Small-angle scattering techniques for analyzing conformational transitions in hemocyanins. *Methods Enzymol*, **379**, 81–106.
- [Hartmann *et al.*, 2004] Hartmann, Hermann, Bongers, André, & Decker, Heinz. 2004. Small-angle X-ray scattering-based three-dimensional reconstruction of the immunogen KLH1 reveals different oxygen-dependent conformations. *J Biol Chem*, **279**(4), 2841–2845.
- [Hazes *et al.*, 1993] Hazes, B., Magnus, K. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K. H., & Hol, W. G. 1993. Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci*, **2**(4), 597–619.
- [Heras & Martin, 2005] Heras, Begoña, & Martin, Jennifer L. 2005. Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **61**(Pt 9), 1173–1180.
- [Honig *et al.*, 1980] Honig, G. R., Vida, L. N., Shamsuddin, M., Mason, R. G., Schlumpf, H. W., & Luke, R. A. 1980. Hemoglobin Milledgeville (alpha 44 (CD2) Pro leads to Leu): a new variant with increased oxygen affinity. *Biochim Biophys Acta*, **626**(2), 424–431.
- [Jaenicke & Decker, 2004] Jaenicke, Elmar, & Decker, Heinz. 2004. Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron*, **35**(1-2), 89–90.
- [Jaenicke & Pairet, 2009] Jaenicke, Elmar, & Pairet, Bruno. 2009. Crystallization of the altitude adapted hemoglobin of guinea pig. *Protein Pept Lett*, **16**(4), 444–446.
- [Jeanmougin *et al.*, 1998] Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, **23**(10), 403–405.
- [Jenkins *et al.*, 2009] Jenkins, Joy D, Musayev, Faik N, Danso-Danquah, Richmond, Abraham, Donald J, & Safo, Martin K. 2009. Structure of relaxed-state human hemoglobin: insight into ligand uptake, transport and release. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **65**(Pt 1), 41–48.
- [Jessen *et al.*, 1991] Jessen, T. H., Weber, R. E., Fermi, G., Tame, J., & Braunitzer, G. 1991. Adaptation of bird hemoglobins to high altitudes: demonstration of molecular mechanism by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(15), 6519–6522.

- [Jollès *et al.*, 1979] Jollès, J., Jollès, P., Lamy, J., & Lamy, J. 1979. Structural characterization of seven different subunits in *Androctonus australis* haemocyanin. *FEBS Lett*, **106**(2), 289–291.
- [Kabsch, 1988] Kabsch, Wolfgang. 1988. Automatic Indexing of Rotation Diffraction Patterns. *J. Appl. Cryst.*, **21**, 67–71.
- [Kabsch, 1993] Kabsch, Wolfgang. 1993. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 795–800.
- [Kleinschmidt *et al.*, 1986] Kleinschmidt, T., März, J., Jürgens, K. D., & Braunitzer, G. 1986. Interaction of allosteric effectors with alpha-globin chains and high altitude respiration of mammals. The primary structure of two tylopoda hemoglobins with high oxygen affinity: vicuna (*Lama vicugna*) and alpaca (*Lama pacos*). *Biol Chem Hoppe Seyler*, **367**(2), 153–160.
- [Kleywegt & Jones, 2002] Kleywegt, Gerard J, & Jones, T. Alwyn. 2002. Homo crystallographicus—quo vadis? *Structure*, **10**(4), 465–472.
- [Koshland *et al.*, 1966] Koshland, D. E., Némethy, G., & Filmer, D. 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry*, **5**(1), 365–385.
- [Koval *et al.*, 2006] Koval, Iryna A, Gamez, Patrick, Belle, Catherine, Selmeczi, Katalin, & Reedijk, Jan. 2006. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. *Chem Soc Rev*, **35**(9), 814–840.
- [Krieger *et al.*, 2002] Krieger, Elmar, Koraimann, Günther, & Vriend, Gert. 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field. *Proteins*, **47**(3), 393–402.
- [Krieger *et al.*, 2004] Krieger, Elmar, Darden, Tom, Nabuurs, Sander B, Finkelstein, Alexei, & Vriend, Gert. 2004. Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins*, **57**(4), 678–683.
- [Littke & John, 1984] Littke, W., & John, C. 1984. Materials: protein single crystal growth under microgravity. *Science*, **225**(4658), 203–204.
- [Loewe, 1978] Loewe, Renate. 1978. Hemocyanins in Spiders. *Journal of Comparative Physiology*, **128**, 161–168.
- [Luft *et al.*, 2003] Luft, Joseph R, Collins, Robert J, Fehrman, Nancy A, Lauricella, Angela M, Veatch, Christina K, & DeTitta, George T. 2003. A deliberate approach to screening for initial crystallization conditions of biological macromolecules. *J Struct Biol*, **142**(1), 170–179.

- [Lukin *et al.*, 2003] Lukin, Jonathan A, Kontaxis, Georg, Simplaceanu, Virgil, Yuan, Yue, Bax, Ad, & Ho, Chien. 2003. Quaternary structure of hemoglobin in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(2), 517–520.
- [M. F. Perutz *et al.*, 1960] M. F. Perutz, M. F., M. G. Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., & North, A. C. 1960. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, **185**(4711), 416–422.
- [Magnus *et al.*, 1991] Magnus, K. A., Lattman, E. E., Volbeda, A., & Hol, W. G. 1991. Hexamers of subunit II from *Limulus* hemocyanin (a 48-mer) have the same quaternary structure as whole *Panulirus* hemocyanin molecules. *Proteins*, **9**(4), 240–247.
- [Magnus *et al.*, 1994] Magnus, K. A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., & Hol, W. G. 1994. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins*, **19**(4), 302–309.
- [Markl, 1986] Markl, J. 1986. EVOLUTION AND FUNCTION OF STRUCTURALLY DIVERSE SUBUNITS IN THE RESPIRATORY PROTEIN HEMOCYANIN FROM ARTHROPODS. *Biol. Bull.*, **171**, 90–115.
- [Markl, 1996] Markl, J. 1996. Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine. *Chemie in unserer Zeit*, **30**, 6–18.
- [Markl *et al.*, 1981] Markl, J., Savel, A., & Linzen, B. 1981. Hemocyanins in spiders, XIV. Subunit composition of dissociation intermediates and its bearing on quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **362**(9), 1255–1262.
- [McCoy *et al.*, 2007] McCoy, Airlie J, Grosse-Kunstleve, Ralf W, Adams, Paul D, Winn, Martyn D, Storoni, Laurent C, & Read, Randy J. 2007. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, **40**(Pt 4), 658–674.
- [McPherson *et al.*, 1999] McPherson, Alexander, Malkin, Alexander J., Kuznetsov, Yurii G., Koszelak, Stan, Wells, Mark, Jenkins, Greg, Howard, Jeff, & Lawson, Greg. 1999. The effects of microgravity on protein crystallization: evidence for concentration gradients around growing crystals. *Journal of Crystal Growth*, **196**, 572–586.
- [MONOD *et al.*, 1965] MONOD, J., WYMAN, J., & CHANGEUX, J. P. 1965. ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. *J Mol Biol*, **12**(May), 88–118.
- [Murshudov *et al.*, 1997] Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **53**(Pt 3), 240–255.

- [Nakashima *et al.*, 1986] Nakashima, H., Behrens, P. Q., Moore, M. D., Yokota, E., & Riggs, A. F. 1986. Structure of hemocyanin II from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Sequences of the overlapping peptides, ordering the CNBr fragments, and the complete amino acid sequence. *J Biol Chem*, **261**(23), 10526–10533.
- [Nicholas *et al.*, 1997] Nicholas, KB, Jr, HB Nicholas, & Deerfield, DW. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW. NEWS*, **4**, 14.
- [Orlova *et al.*, 1997] Orlova, E. V., Dube, P., Harris, J. R., Beckman, E., Zemlin, F., Markl, J., & van Heel, M. 1997. Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *J Mol Biol*, **271**(3), 417–437.
- [Ostojic *et al.*, 2002] Ostojic, Hrvoj, Cifuentes, Veronica, & Monge, Carlos. 2002. Hemoglobin affinity in Andean rodents. *Biol Res*, **35**(1), 27–30.
- [Pairet, 2007] Pairet, B. 2007. *Roentgenkleinwinkelstreuung an Haemocyaninen - Untersuchung von Konformationsuebergaengen bei der Oxygenierung der Proteine*. M.Phil. thesis, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- [Pairet & Jaenicke, 2010] Pairet, B., & Jaenicke, E. 2010. Structure of the altitude adapted hemoglobin of guinea pig in the R2-state. *PLoS One*, **5**(8), e12389.
- [Paoli & Nagai, 2004] Paoli, M., & Nagai, K. 2004. *Handbook of metalloproteins*. Wiley-VCH.
- [Perutz, 1960] Perutz, M. F. 1960. Structure of hemoglobin. *Brookhaven Symp Biol*, **13**(Nov), 165–183.
- [Perutz, 1968] Perutz, M. F. 1968. Preparation of Haemoglobin Crystals. *Journal of Crystal Growth*, **2**, 54–56.
- [Perutz, 1970] Perutz, M. F. 1970. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, **228**(5273), 726–739.
- [Pettersen *et al.*, 2004] Pettersen, Eric F, Goddard, Thomas D, Huang, Conrad C, Couch, Gregory S, Greenblatt, Daniel M, Meng, Elaine C, & Ferrin, Thomas E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**(13), 1605–1612.
- [Piccinini *et al.*, 1990] Piccinini, M., Kleinschmidt, T., Jürgens, K. D., & Braunitzer, G. 1990. Primary structure and oxygen-binding properties of the hemoglobin from guanaco (*Lama guanacoë*, Tylopoda). *Biol Chem Hoppe Seyler*, **371**(7), 641–648.
- [Potterton *et al.*, 2002] Potterton, Elizabeth, McNicholas, Stuart, Krissinel, Eugene, Cowtan, Kevin, & Noble, Martin. 2002. The CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**(Pt 11), 1955–1957.

- [Rivera *et al.*, 1995] Rivera, M., León-Velarde, F., Huicho, L., & Monge, C. 1995. Ventilatory response to severe acute hypoxia in guinea-pigs and rats with low hemoglobin-oxygen affinity induced by phytic Acid. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, **112**, 411–416.
- [Roeding *et al.*, 2009] Roeding, Falko, Borner, Janus, Kube, Michael, Klages, Sven, Reinhardt, Richard, & Burmester, Thorsten. 2009. A 454 sequencing approach for large scale phylogenomic analysis of the common emperor scorpion (*Pandinus imperator*). *Mol Phylogenet Evol*, **53**(3), 826–834.
- [Safo & Abraham, 2005] Safo, M. K., & Abraham, D. J. 2005. The enigma of the liganded hemoglobin end state: a novel quaternary structure of human carbon-monoxo hemoglobin. *Biochemistry*, **44**(23), 8347–8359.
- [Safo *et al.*, 2004] Safo, Martin K, Abdulmalik, Osheiza, Danso-Danquah, Richmond, Burnett, James C, Nokuri, Samuel, Joshi, Gajanan S, Musayev, Faik N, Asakura, Toshio, & Abraham, Donald J. 2004. Structural basis for the potent antisickling effect of a novel class of five-membered heterocyclic aldehydic compounds. *J Med Chem*, **47**(19), 4665–4676.
- [Sali & Blundell, 1993] Sali, A., & Blundell, T. L. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, **234**(3), 779–815.
- [Sato *et al.*, 2008] Sato, Jun J, Shinohara, Akio, Miyashita, Nobumoto, Koshimoto, Chihiro, Tsuchiya, Kimiyuki, Nakahara, Ikuyo, Morita, Tetsuo, Yonekawa, Hiro-michi, Moriwaki, Kazuo, & Yamaguchi, Yasunori. 2008. Discovery of a new HBB haplotype w2 in a wild-derived house mouse, *Mus musculus*. *Mamm Genome*, **19**(3), 155–162.
- [Schmidt, 1994] Schmidt, Werner. 1994. *Optische Spektroskopie*. VCH.
- [Schumacher *et al.*, 1997] Schumacher, M. A., Zheleznova, E. E., Poundstone, K. S., Kluger, R., Jones, R. T., & Brennan, R. G. 1997. Allosteric intermediates indicate R2 is the liganded hemoglobin end state. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(15), 7841–7844.
- [Shaanan, 1983] Shaanan, B. 1983. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol*, **171**(1), 31–59.
- [Silva *et al.*, 1992] Silva, M. M., Rogers, P. H., & Arnone, A. 1992. A third quaternary structure of human hemoglobin A at 1.7-Å resolution. *J Biol Chem*, **267**(24), 17248–17256.
- [Snyder *et al.*, 1988] Snyder, L., Hayes, J., & Chappell, M. 1988. Alpha-Chain Hemoglobin Polymorphisms are Correlated with Altitude in the Deer mouse, *Peromyscus maniculatus*. *Evolution*, **42**, 689–697.



- [Srinivasan & Rose, 1994] Srinivasan, R., & Rose, G. D. 1994. The T-to-R transformation in hemoglobin: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(23), 11113–11117.
- [Stein, 2008] Stein, N. 2008. CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *Journal of Applied Crystallography*, **41**, 641–643.
- [Stein *et al.*, 1971] Stein, S., Cherian, M. G., & Mazur, A. 1971. Preparation and properties of six rat hemoglobins. Nonuniform biosynthesis in marrow erythroid cells. *J Biol Chem*, **246**(17), 5287–5293.
- [Storz *et al.*, 2007] Storz, Jay F, Sabatino, Stephen J, Hoffmann, Federico G, Gering, Eben J, Moriyama, Hideaki, Ferrand, Nuno, Monteiro, Bruno, & Nachman, Michael W. 2007. The molecular basis of high-altitude adaptation in deer mice. *PLoS Genet*, **3**(3), e45.
- [Storz *et al.*, 2008] Storz, Jay F, Hoffmann, Federico G, Opazo, Juan C, & Moriyama, Hideaki. 2008. Adaptive functional divergence among triplicated alpha-globin genes in rodents. *Genetics*, **178**(3), 1623–1638.
- [Sullivan & Swofford, 1997] Sullivan, J, & Swofford, D. L. 1997. Are Guinea Pigs Rodents? The Importance of Adequate Models in Molecular Phylogenetics. *Journal of Mammalian Evolution*, **4**, 77–85.
- [Svergun & Koch, 2002] Svergun, Dmitri I, & Koch, Michel H J. 2002. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol*, **12**(5), 654–660.
- [Tame & Vallone, 2000] Tame, J. R., & Vallone, B. 2000. The structures of deoxy human haemoglobin and the mutant Hb Tyralpha42His at 120 K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**(Pt 7), 805–811.
- [Taylor, 2005] Taylor, Barry N. 2005. The determination of best values of the fundamental physical constants. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, **363**(1834), 2105–2122.
- [Terwilliger, 1998] Terwilliger, N. B. 1998. Functional adaptations of oxygen-transport proteins. *J Exp Biol*, **201**(Pt 8), 1085–1098.
- [Turek *et al.*, 1980] Turek, Z., Ringnalda, B. E., Morán, O., & Kreuzer, F. 1980. Oxygen transport in guinea pigs native to high altitude (Junin, Peru, 4,105 m). *Pflugers Arch*, **384**(2), 109–115.
- [Vaguine *et al.*, 1999] Vaguine, A. A., Richelle, J., & Wodak, S. J. 1999. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **55**(Pt 1), 191–205.

- [van Holde & Miller, 1995] van Holde, K. E., & Miller, K. I. 1995. Hemocyanins. *Adv Protein Chem*, **47**, 1–81. CM1.
- [Voet *et al.*, 2002] Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. 2002. *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH.
- [Voit *et al.*, 2000] Voit, R., Feldmaier-Fuchs, G., Schweikardt, T., Decker, H., & Burmester, T. 2000. Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. Structure and intramolecular evolution of the subunits. *J Biol Chem*, **275**(50), 39339–39344.
- [Volbeda & Hol, 1989] Volbeda, A., & Hol, W. G. 1989. Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J Mol Biol*, **209**(2), 249–279.
- [Wakabayashi *et al.*, 1986] Wakabayashi, S., Matsubara, H., & Webster, D. A. 1986. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*, **322**(6078), 481–483.
- [Weber, 2007] Weber, Roy E. 2007. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respir Physiol Neurobiol*, **158**(2-3), 132–142.
- [Winslow, 2007] Winslow, Robert M. 2007. The role of hemoglobin oxygen affinity in oxygen transport at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol*, **158**(2-3), 121–127.
- [Winter & Noll, 1998] Winter, R., & Noll, F. 1998. *Methoden der Biophysikalischen Chemie*. Elsevier, Hensel, Hopf.
- [Yokoyama *et al.*, 2006] Yokoyama, Takeshi, Neya, Saburo, Tsuneshige, Antonio, Yonetani, Takashi, Park, Sam-Yong, & Tame, Jeremy R H. 2006. R-state haemoglobin with low oxygen affinity: crystal structures of deoxy human and carbonmonoxy horse haemoglobin bound to the effector molecule L35. *J Mol Biol*, **356**(3), 790–801.
- [Yonetani *et al.*, 2002] Yonetani, Takashi, Park, Sung-Ick, Tsuneshige, Antonio, Imai, Kiyohiro, & Kanaori, Kenji. 2002. Global allosteric model of hemoglobin. Modulation of O<sub>2</sub> affinity, cooperativity, and Bohr effect by heterotropic allosteric effectors. *J Biol Chem*, **277**(37), 34508–34520.
- [Zhang *et al.*, 1996] Zhang, J., Hua, Z., Tame, J. R., Lu, G., Zhang, R., & Gu, X. 1996. The crystal structure of a high oxygen affinity species of haemoglobin (bar-headed goose haemoglobin in the oxy form). *J Mol Biol*, **255**(3), 484–493.

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Hämoglobin und Hämocyanin im Vergleich. Aufgrund der unterschiedlichen Metallzentren der beiden Proteine zeigen sie unterschiedliche Farben. Das eisenhaltige Hämoglobin (links) ist im oxygenierten Zustand rot, das kupferhaltige Hämocyanin (rechts) ist blau. Abbildung entnommen aus [Markl, 1996]. . . . .	2
1.2	Konformationsübergang beim tetrameren Hämoglobin. Links ist der deoxygenierte, rechts der oxygenierte Zustand schematisch dargestellt. Der Konformationsübergang beruht im Wesentlichen aus einer Drehung eines $\alpha$ - $\beta$ -Dimer gegenüber dem anderen. In dieser Zeichnung sind auch die sogenannten „Switch regions“ eingezeichnet, diese sind für die Stabilisierung der beiden Konformationen wichtig. Diese Abbildung wurde übernommen aus [Voet <i>et al.</i> , 2002]. . . . .	4
1.3	Das Meerschweinchen <i>Cavia porcellus</i> . Das Meerschweinchen ist in den Anden beheimatet und wird als genetisch höhenadaptiert angesehen. . . . .	5
1.4	Aktives Zentrum eines Typ3 Kupferproteins; links ohne, rechts mit gebundenem O <sub>2</sub> -Molekül (Kristallstruktur 1lla und 1oxy). Zur Verfügung gestellt von Thorsten Schweikardt. . . . .	7
1.5	Darstellung der möglichen Zustände für die O <sub>2</sub> -Bindung des Hämocyanins der Vogelspinne <i>Eurypelma californicum</i> nach dem Nesting-Modell [Decker & Sterner, 1990]. Allosterische Gleichgewichte ( $L = \frac{T}{R}$ ,) können durch Effektoren verschoben werden, die nicht am aktiven Zentrum binden. . . . .	8
1.6	Der Kaiserskorpion <i>Pandinus imperator</i> . Das Hämocyanin dieses Skorpions wurde im Folgenden untersucht. . . . .	10
2.1	Löslichkeitskurve als Funktion der Fällungsmittelkonzentration oder eines ähnlichen Parameters. Die besten Ergebnisse liefert die Kristallisation, wenn während des Kristallwachstums die Übersättigung niedriger ist als es für die Bildung von Nukleationskeimen notwendig war. . . . .	12

2.2	Das „Hanging drop“ Verfahren. Die Proteinlösung hängt am Deckglass über einer Reservoirlösung. Die Konzentration des Fällungsmittels ist in der Reservoirlösung anfangs doppelt so hoch wie im Tropfen. Durch Diffusion kommt es zum Austausch von Wasser zwischen dem Tropfen und der Reservoirlösung und damit zu einer Veränderung der Konzentrationsverhältnisse im Tropfen. . . . .	13
2.3	Die Bragg-Bedingung. Für das Auftreten eines Interferenzmaximums müssen sich die Phasen der beiden Wellen um ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge unterscheiden. . . . .	14
2.4	Streuung an zwei Streuzentren. Die Impulse der einfallenden bzw. reflektierten Welle sind $\vec{p}_0$ und $\vec{p}_1$ . Aus der Differenz der beiden Vektoren ergibt sich der Streuvektor $\vec{q}$ . . . . .	16
2.5	Streuung am einzelnen Molekül und am Molekülkristall. Mit steigender Zahl der Einheitszellen konzentriert sich das Signal mehr und mehr in den Bragg-Reflexen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Hermann Hartmann. . . . .	19
2.6	Ewald-Konstruktion. Nur wenn ein reziproker Gittervektor $\vec{H}$ auf der Kugeloberfläche liegt ist die Bragg-Bedingung für diese Netzebenen-schar erfüllt. Die Verbindungslinie von der Mitte der Kugel zum Gitterpunkt gibt die Richtung des Reflexes vor. Zur Verfügung gestellt durch Hermann Hartmann. . . . .	20
2.7	Die Methode des Molecular Replacement. Entscheidend ist die richtige Orientierung und Positionierung des Testmoleküls in der Einheitszelle. $R$ ist die Rotations-, $T$ die Translationsmatrix. . . . .	22
3.1	Prinzip eines Streuexperimentes. Diese Schemazeichnung zeigt die Bestandteile des experimentellen Aufbaus. Benötigt werden: Röntgenquelle, Monochromator, Kollimationssystem, eine drehbare Halterung für den Kristall, Primärstrahlfänger und Detektor. . . . .	25
3.2	Microstar Rotating Anode Generator. (A): Gesamtansicht der Anlage, in (a) ist die Microstar Anlage untergebracht, (b) ist die Steuerungseinheit für den Cryostream, (c) die „dry air unit“; (B): Ansicht von der gegenüberliegenden Seite, (d) ist der $N_2$ -Behälter, (e) die Steuerungseinheit der Microstar Anlage; (C): Innenansicht im Überblick, (f) ist die Cryogum, (g) der Detektor, (h) und (i) zeigen auf die Positionen der Glühkathode bzw. der Drehanode innerhalb des Gehäuses; (D) Vergrößerung auf die Probenumgebung, (j) ist das Austrittsfenster für die Röntgenstrahlung und (k) der Goniometerkopf auf dem die Probe befestigt wird. Die Marke (l) zeigt das Endstück der Cryostream-Anlage und (m) den Primärstrahlblocker. . . . .	27
3.3	Automatische Suche von Reflexen. Eine Anhäufung starker Pixel, die bestimmte geometrische Anforderungen erfüllt, definiert einen Reflex. . . . .	30

4.1	Chromatogramm für eine Aufreinigung von <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin. Das Hämocyanin befindet sich im ersten Peak, also bei einem Elutionsvolumen von 148 ml bis 181 ml. Der zweite Peak zeigt ein Begleitprotein, welches allerdings noch nicht näher charakterisiert ist. . . . .	35
4.2	Schemazeichnung für den verwendeten Aufbau zur Messung der Lichtstreuung. . . . .	37
5.1	Kristalle von Meerschweinchen-Hämoglobin. Die Kristalle hatten eine Größe von 50 bis 200 $\mu\text{m}$ . Die tetraedrische Form war in allen erfolgreichen Ansätzen zu erhalten. . . . .	42
5.2	Typisches Streubild für <i>Cavia porcellus</i> Hämoglobin. Die Aufnahme wurde bei einem Detektorabstand von 120 mm aufgenommen, der Kristall während der Aufnahme um $1.5^\circ$ gedreht. A zeigt das Streubild ohne, B mit Auflösungsringen. . . . .	43
5.3	Alignment zwischen den Hämoglobinsequenzen aus dem Pferd (2D5X) und dem Meerschweinchen (3HYU). (A) zeigt das Alignment der beiden $\alpha$ -Ketten, (B) der $\beta$ -Ketten. Identische Aminosäuren sind mit einer schwarzen Schattierung hervorgehoben. . . . .	45
5.4	Elektronendichte am C-Terminus der $\alpha$ -Ketten. Die Elektronendichte ist bei einem Wert von $1\sigma$ angezeigt. Die Atome werden in der Stick-Darstellung angezeigt. Für die Atome gilt die folgende Farbkodierung: Kohlenstoff ist grau dargestellt, Stickstoff blau und Sauerstoff rot. . . . .	46
5.5	Elektronendichte am aktiven Zentrum. Links ist die Elektronendichte in blau ( $1\sigma$ ) ohne, rechts mit dem Modell in der „baton“-Darstellung gezeigt. In rot beziehungsweise grün ist die Differenzdichte ( $F_0 - F_c$ ) bei einem Wert von $3\sigma$ dargestellt, rot zeigt einen Elektronendichte-Überschuss im Modell an, grün eine fehlende Dichte im Modell. Eine Unterscheidung zwischen einem an die Hämgruppe gebundenen Wasser- oder Sauerstoffmolekül ist anhand der Elektronendichte nicht eindeutig möglich. Die hier gezeigte Dichte wurde mit einem gebundenen Wassermolekül berechnet. Die Differenzdichte zeigt keinen Fehler für das Modell an. . . . .	47
5.6	<i>Cavia porcellus</i> -Hämoglobin. Ansicht entlang der Symmetrieachse des Moleküls. Die Ketten wurden nach folgendem Schema eingefärbt: Dimer 1: $\alpha 1$ hellblau, $\beta 1$ hellrot; Dimer 2: $\alpha 2$ blau, $\beta 2$ rot. . . . .	49
5.7	Elektronendichte am aktiven Zentrum. (A) zeigt in einer Stereodarstellung das aktive Zentrum der $\alpha 1$ -Untereinheit, (B) das aktive Zentrum der $\beta 1$ -Untereinheit. Die Elektronendichte ist bei einem Wert von $1\sigma$ angezeigt. . . . .	50

5.8	Stabilisierung der R2 Konformation durch Salzbrückenbindungen zwischen den $\beta$ -Untereinheiten. Meerschweinchen-Hämoglobin ( $\beta$ 1 in rot, $\beta$ 2 in hellrot) und humanes Hämoglobin ( $\beta$ 1 in blau, $\beta$ 2 in hellblau) im R2-Zustand (1BBB, [Silva <i>et al.</i> , 1992]) wurden überlagert. Bei der Benennung der Aminosäuren geben die tiefgestellten Buchstaben die Strukturzugehörigkeit wieder: <i>gp</i> für das Hämoglobin des Meerschweinchens, <i>h</i> für das menschliche Molekül. Die Salzbrücken werden durch gestrichelte Linien angezeigt. Die Grenzfläche wird stabilisiert durch zwei Salzbrücken zwischen der N-terminalen Aminogruppe vom Val1 der $\beta$ 1 Untereinheit und der C-terminalen Carboxylgruppe der $\beta$ 2 Untereinheit und umgekehrt. Die Salzbrücken fehlen im menschlichen Hämoglobin. . . . .	53
5.9	Austausch an den Positionen 30 und 50 der $\alpha$ -Untereinheit. Das menschliche Hämoglobin ist in blau dargestellt, das Meerschweinchen-Hämoglobin in rot. Die kürzesten Abstände zwischen den Aminosäuren sind in der jeweiligen Farbe angegeben. Die Salzbrücke zwischen der Glutaminsäure und dem Histidin im Menschen ist beim Meerschweinchen zwischen einem Threonin und einem Prolin nicht möglich. Die „Switch Region“ gewinnt an Flexibilität. . . . .	55
5.10	Die Switch Region in der Übersicht. Die $\alpha$ 1 und $\beta$ 2 Untereinheiten des Meerschweinchen- (rot) und des humanen (blau, 1BBB, [Silva <i>et al.</i> , 1992]) Hämoglobins wurden überlagert. Die beteiligten Aminosäuren sind durch Sticks, die Atome dieser Reste nach der Elektronegativität dargestellt. Die Position der $\beta$ 2 Untereinheit ist grau gekennzeichnet. Die Bewegung entlang der Helix C während des Konformationsübergangs ist durch einen grauen Pfeil dargestellt. Die Position vom His97 im Meerschweinchen-Hämoglobin wird rot angezeigt. Zusätzlich wurden die Positionen für das His97 in humanem Hämoglobin im T- (grau, PDB Schlüssel: 1A3N, [Tame & Vallone, 2000]), R- (orange, PDB Schlüssel: 1HHO, [Shaanan, 1983]) und R2-Zustand (blau, PDB Schlüssel: 1BBB, [Silva <i>et al.</i> , 1992]) eingezeichnet. Zwischen dem His44 der $\alpha$ 1 und dem His97 der $\beta$ 2 Untereinheit kommt es zu einer sterischen Hinderung, die zu einer geringeren Stabilität des T-Zustands im Meerschweinchen-Hämoglobin führen kann. In dieser Abbildung ist auch die Position der fehlenden Salzbrücke zwischen den Aminosäuren 30 und 50 der $\alpha$ Untereinheit zu sehen. . . . .	56
6.1	Auszug der Ausgabe der Validationssoftware <i>SFCHECK</i> . Die angegebenen Werte bestätigen die hohe Qualität des Datensatzes und eine gute Übereinstimmung des Modells mit den Strukturfaktoren. . . . .	58

6.2	C-Terminus der $\alpha$ -Kette. (A) zeigt das Modell vom Meerschweinchen-Hämoglobin, (B) das für das Molecular Replacement verwendete Pferde-Hämoglobin, (C) ein Homologie-Modell basierend auf dem Pferde-Hämoglobin und (D) die Endstruktur einer Moleküldynamik-Simulation über 2 ns. Dabei sind in (A), (B) und (C) die betrachteten C-terminalen Aminosäuren farblich hervorgehoben. In (D) sind die Atome nach ihren B-Faktoren eingefärbt. Weitere Erklärungen im Text. . . . .	61
6.3	Vergleich vom <i>Cavia porcellus</i> -Hämoglobin mit humanem Hämoglobin. Die Strukturen wurden überlagert, das Hämoglobin dann nach dem RMSD-Wert für die $C_\alpha$ -Atome eingefärbt. In (A) sieht man die Abweichung zum T-Zustand, in (B) zum R-Zustand und in (C) zum R2-Zustand. Die Übereinstimmung ist im dritten Vergleich am größten.	63
6.4	Schematische Übersicht der Konformationsübergänge im Hämoglobin. Sowohl R2 als auch R3 sind dabei als Endzustände eines allosterischen Signalweges anzusehen. Als Übergangs-Struktur dient in beiden Fälle die R-Konformation, beim Übergang zum R2-Zustand ist eine intermediäre Quartärstruktur, der RR2-Zustand zwischengeschaltet. Diese Abbildung wurde aus [Safo & Abraham, 2005] entnommen. . .	65
6.5	Position des His97 im humanen Hämoglobin in der T-Konformation. (A): Das His97 der $\beta$ Untereinheit liegt gegenüber dem Pro44 auf der $\alpha$ -Kette. (B): Das Prolin wurde hier im Modell durch ein Histidin ersetzt, die resultierende sterische Hinderung ist offensichtlich. . . . .	67
7.1	Auswahl erfolgreicher Kristallisationsansätze. In der oberen Reihe sind Ergebnisse aus Experimenten, welche in Mainz durchgeführt wurden, in der unteren Reihe sind Ergebnisse des „high throughput screening“ in Buffalo zu sehen (anhand der Skala ist zu erkennen, dass deutlich kleinere Tropfen verwendet wurden). Diese Abbildung zeigt, wie unterschiedlich die Kristallformen für das Hämocyanin sind. Geeignet für spätere Messungen waren Kristalle mit makellosen Oberflächen, wie zum Beispiel der mit dem Buchstaben A markierte Kristall im oberen rechten Bild. An dieser Abbildung wird auch die Schwäche des „high throughput screening“ offensichtlich: Es stehen nur die Bilder zur Verfügung, nicht die Ansätze. Dadurch wird es sehr schwer zum Beispiel zwischen Protein und Salzkristallen zu unterscheiden. . . . .	70
7.2	Kristalle, gewachsen in einer Lösung aus 1 M NaCl und 2 % PEG 6000. Links sind mehrere Kristalle aus diesem Ansatz zu sehen, der eingekreiste Kristall ist rechts nochmals gesondert dargestellt. Dieser Kristall wurde für die weiteren Experimente verwendet. . . . .	71

7.3	Eine exemplarische Aufnahme aus den Messungen an Kristallen des Hämocyanins des Skorpions <i>Pandinus imperator</i> bei einem Detektor-Abstand von 250 mm. (A) zeigt das Streubild ohne, (B) mit Auflösungsringen. Reflexe sind auf den Aufnahmen bis zu einem Auflösungsbereich von circa 6 Å zu erkennen. Der entsprechende nächste Auflösungsring bei 5.75 Å ist in (B) weiß markiert. In der unteren Bildhälfte ist der Schatten der Halterung des Primärstrahlblockers zu erkennen. . . . .	73
7.4	Eine weitere exemplarische Aufnahme aus den Messungen an Kristallen des Hämocyanins des Skorpions <i>Pandinus imperator</i> bei einem Detektor-Abstand von 350 mm. (A) zeigt das Streubild ohne, (B) mit Auflösungsringen. Da es sich um den selben Kristall wie bei der vorangehenden Abbildung handelt, waren auch hier Reflexe bis zu einer Auflösung von circa 6 Å zu erkennen. Dementsprechend wurde in (B) der Auflösungsring bei 6.05 Å weiß markiert. . . . .	74
7.5	Alignment der Untereinheit 2 und der Modelle 1LLA und 1LL1. Das Alignment zeigt in der oberen Zeile (Limulus) die Sequenz der Untereinheit 2 des Hämocyanins aus <i>Limulus polyphemus</i> [Nakashima <i>et al.</i> , 1986]. In den anderen Zeilen sind die Sequenzen der beiden als Template verwendeten Modelle 1LLA und 1LL1 zu sehen. Man erkennt vor allem zwei größere Bereiche, in denen keines der beiden Templates gelöst wurde: Position 21 bis 29 und 132 bis 139. In diesen Bereichen kann es durch die Homologie-Modellierung zu Fehlern in den Startmodellen kommen. . . . .	78
7.6	Homologiemodellierung der einzelnen Untereinheiten. Ausgehend von der Struktur der Untereinheit 2 aus <i>Limulus polyphemus</i> wurden die <i>Pandinus imperator</i> Untereinheiten anhand ihrer Sequenzen ([Roeding <i>et al.</i> , 2009]) modelliert. Diese Untereinheiten werden später in das Modell für das 24-meren Molekül integriert und anhand der Elektronendichte angepasst. . . . .	79
7.7	Position der Untereinheiten im 24-meren Hämocyanin von <i>Pandinus imperator</i> . Die Benennung der Untereinheiten dieses Hämocyanins wurde dabei aus [Decker <i>et al.</i> , 1996] übernommen. In jedem Hexamer bildet sich je ein Trimer aus den Untereinheiten A, E und G, ein zweites aus den Untereinheiten D, F und B beziehungsweise C. Die Untereinheiten B und C haben eine spezielle Position, weil sie an der Grenzfläche zwischen den beiden Dodecameren positioniert sind. Die Abbildung wurde übernommen aus [Cong <i>et al.</i> , 2009]. . . . .	81



7.8	Multiples Alignment nach der „Fast Minimum Evolution“-Methode. Die Sequenzen der Untereinheiten der Hämocyanine des Skorpions <i>Pandinus imperator</i> (blau umrandet) und der Vogelspinne <i>Eurypelma californicum</i> (rot umrandet) wurden hier überlagert. Zusätzlich wurde die bei der Modellierung als Template verwendete Untereinheit 2 des <i>Limulus polyphemus</i> -Hämocyanins in das Alignment integriert (grüner Rand). Anhand dieses Alignments lassen sich die modellierten Untereinheiten des Skorpions ihrem Gegenpart im Spinnenhämocyanin zuordnen. . . . .	82
7.9	Vorgehensweise beim Modellieren des 24-meren <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanin. Die modellierten Untereinheiten wurden analog zur bekannten topologischen Anordnung aus dem <i>Eurypelma californicum</i> -Hämocyanin in das Startmodell eingefügt. Die <i>Pandinus imperator</i> Untereinheiten wurden mit der entsprechenden (Poly-Alanin) Untereinheit des Startmodells überlagert und ausgetauscht. Die Benennung der Untereinheiten erfolgt hier analog zu den Untereinheiten aus <i>Eurypelma californicum</i> (siehe Tabelle 7.3). . . . .	84
7.10	$C\alpha$ -Trace der Untereinheit B der Kristallstruktur. Das $C\alpha$ -Trace des Modells ist blau, während die Elektronendichte als schwarzes Gitter dargestellt ist. Es handelt sich um eine OMIT-Dichte bei einem Wert von $1.5\sigma$ . Die beiden Kupferatome sind als schwarze Kreuze in der Mitte des Bildes (Markierung (A)) zu sehen. Die Seitenketten sind zwar nicht sichtbar, allerdings sind das aktive Zentrum und die Helices um das Zentrum, wie zum Beispiel bei Markierung (B), sehr gut in der Dichte zu erkennen. Die Markierung (C) zeigt einen Teil vom Modell für den nur eine geringe Elektronendichte aus den Streubildern errechnet wurde. . . . .	87
7.11	Aufbau des 24-meren Hämocyanins anhand der gelösten Struktur. Drei UE bilden ein Trimer, zwei Trimere ein Hexamer, zwei Hexamere ein Dodecamer. Das Gesamtmolekül wird dann durch zwei Dodecamere gebildet. Die Winkel zwischen den Hexameren und den zwei Dodecameren werden im nächsten Unterabschnitt angegeben (siehe Abbildung 7.13). . . . .	88

- 7.12 Abweichungen zwischen Kristall- und Kryo-EM-Struktur. Das kristallographische Modell des *Pandinus imperator*-Hämocyanins wurde mit der Kryo-EM-basierten Struktur aus [Cong *et al.*, 2009] überlagert. Das dargestellte kristallographische Modell wurde dann nach den RMSD-Werten des Proteinrückgrats eingefärbt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei der Farbkodierung eine vereinfachte Darstellung verwendet: blau  $\leq 0.5 \text{ \AA}$ , grau  $0.5 - 1.5 \text{ \AA}$  und rot  $\geq 1.5 \text{ \AA}$ . Insgesamt ist eine hohe Übereinstimmung zwischen beiden Modellen zu erkennen. Die größten Abweichungen finden sich an den Kettenenden und am äußeren Rand des Moleküls, zwei solcher Bereiche sind mit Pfeilen vermerkt (I). Im Inneren des Proteins ist die Übereinstimmung sehr hoch, die Markierung bei (II) zeigt, dass insbesondere zwischen den Untereinheiten B und C, die wichtig für die Stabilität des 24-mers sind, nur geringe Abweichungen zwischen den Modellen existieren. . . . . 90
- 7.13 Vergleich der Kristallstruktur mit Modellen des Hämocyanins aus *Pandinus imperator* und des verwandten Hämocyanins aus *Eurytelma californicum*. Die Modelle wurden mit verschiedenen Methoden gewonnen. Weitere Informationen zu den Experimenten befinden sich im Text. Die in der Tabelle angegebenen Parameter wurden für verschiedene Modelle berechnet, für die SAXS-Modelle von *Pandinus imperator* steht nur der Gyrationradius zur Verfügung. Die untere Graphik aus [Hartmann & Decker, 2002] erklärt die Bedeutung der verschiedenen Parameter. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die Kristallstruktur dem Kryo-EM-Modell sehr ähnlich ist. Aus dem Vergleich mit den SAXS-Modellen schließt man darauf, dass das Hämocyanin in der oxygenierten Form vorliegt. Diese Abbildung wurde von Herrmann Hartmann zur Verfügung gestellt. Referenzen: (a) [Cong *et al.*, 2009], (b) [Hartmann & Decker, 2002], (c) [Pairet, 2007]. 92
- 7.14 Vergleich mit SAXS Modellen des *Pandinus imperator* Hämocyanins in der oxygenierten und deoxygenierten Konformation. In der oberen Reihe ist das SAXS basierte Modell für die oxygenierte Konformation, in der mittleren Reihe in der deoxygenierten Konformation in drei verschiedenen Ansichten zu sehen. Die Farben sind willkürlich gewählt und dienen der räumlichen Darstellung. In der unteren Reihe ist das kristallographische Modell zu sehen. Die Ansicht links zeigt den Blick entlang der zweizähligen Symmetrieachse (hier die z-Achse), in der Mitte wurde das Molekül um  $90^\circ$  bezüglich der y-Achse gedreht und rechts wurde die erste Ansicht um  $90^\circ$  bezüglich der x-Achse gedreht. Die Verschiebung zwischen den Dodecameren in der ersten Ansicht deutet auf die oxygenierte Konformation hin. Die Drehung zwischen den zwei Dodecameren (Parameter *dode* in Abbildung 7.14) ist in dieser Darstellung nicht eindeutig erkennbar. . . . . 94

7.15 Aufsicht auf das Hexamer im Vergleich zu den Strukturen 1LLA und 1HC1. (A) zeigt das Hexamer des *Limulus polyphemus*-Hämocyanins (1LLA), (B) zeigt das Hexamer der hier vorgestellten Kristallstruktur und (C) das Modell des *Panulirus interruptus*-Hämocyanins (1HC1). Diese Hexamerstrukturen wurden überlagert, die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) zwischen den Modellen ist in der Abbildung angegeben. Die hier berechneten Abweichungen zeigen eine größere Ähnlichkeit der *Pandinus imperator*-Struktur mit 1LLA. Dies würde auf den oxygenierten Zustand hinweisen, die Unterschiede in der Quartärstruktur sind jedoch sehr gering, weshalb der selbe Vergleich nochmals auf der Ebene der Untereinheiten durchgeführt wurde. . . . . 95

7.16 Überlagerung der Untereinheit A der vorgestellten Struktur aus *Pandinus imperator* mit den Untereinheiten der bekannten Strukturen 1OXY aus *Limulus polyphemus* ([Hazes *et al.*, 1993]) und 1HC1 aus *Panulirus interruptus* ([Volbeda & Hol, 1989]). (B) zeigt den Vergleich mit 1LLA, (C) zeigt den selben Vergleich mit 1HC1. In (A) sind die verschiedenen Domänen farblich gekennzeichnet. Man erkennt, dass vor allem in Domäne 1 eine größere Übereinstimmung mit 1LLA vorliegt. Die rechtsseitige Farbskalierung für die RMSD-Werte gilt für die Teilabbildungen (B) und (C). Die Teilabbildung (A) wurde übernommen aus [Decker & Jaenicke, 2004] . . . . . 97

7.17 Vergleich zwischen den Untereinheiten aus 1LLA und 1HC1. Die Modelle der Untereinheiten der Hämocyanine aus *Panulirus interruptus* (I, orange) und *Limulus polyphemus* (II, blau) können nur bedingt als zwei Konformationen eines Moleküls angesehen werden. Der Vergleich der beiden Modelle (III) zeigt, dass das Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix in Domäne I besitzt. . . . . 98

8.1 Gemischtes „Well“: Es zeigen sich verschiedene Kristallformen innerhalb eines Wells. Die Extraktion eines gewünschten Kristalls wird durch die stabförmigen Kristalle erschwert. An dieser Stelle könnten leicht Bruchstücke am gewünschten Kristall haften und zu einem Twinning im Datensatz führen. . . . . 100

8.2 Dynamische Lichtstreuung an den Hämocyaninlösungen. (A) zeigt die Ergebnisse für frisch aufgereinigtes Hämocyanin, (B) zeigt die Ergebnisse nach einer 4-monatigen Lagerung bei 4°C. Die dynamische Lichtstreuung zeigt anhand des Pdi-Wertes, dass die Hämocyaninlösung monodispers ist. Die Messung von zwei Proben mit verschiedenen Lagerzeiten zeigt außerdem, dass eine Dissoziation des Proteins während der Kristallisation nicht zu erwarten ist. Der hydrodynamische (Z-Average) Durchmesser ist bei beiden Messungen nahezu identisch und stimmt mit den Erwartungen für das 24-mer überein. . . . . 101

8.3	Überlagerung des $C_\alpha$ -Traces der 7 verschiedenen Untereinheiten, die in das Modell des 24-meren Hämocyanins eingebaut wurden. Jede Untereinheit wurde in einem anderen Farbton dargestellt. (B) zeigt eine Ansicht, die gegenüber (A) um $90^\circ$ um die Y-Achse gedreht wurde. Die Abbildung zeigt im Allgemeinen eine hohe Übereinstimmung zwischen den Untereinheiten. In wenigen Bereichen (Pfeile), weichen die Verläufe voneinander ab. . . . .	103
8.4	Quadratisch gemittelten Abweichungen zwischen den Untereinheiten des <i>Pandinus imperator</i> -Hämocyanins. Die Farbe entspricht der quadratisch gemittelten Abweichung (RMSD) zwischen den $C_\alpha$ -Atomen der einzelnen Untereinheiten. Blau entspricht dabei einer Abweichung kleiner als 1 Å, rot einer Abweichung größer als 5 Å. (A) zeigt die Ausgangsansicht aus Abbildung 8.3 (A), (B) ist um $90^\circ$ um die Y-Achse gedreht, für (C) wurde nochmals um $90^\circ$ gedreht. Die Bereiche mit großen Abweichungen entsprechen den Bereichen, in denen Sequenzabschnitte gegenüber dem Template inseriert wurden. . . . .	104
8.5	Vergleich zwischen der längsten (C, grau) und der kürzesten (F, blau) Untereinheit. Am N-terminalen Ende (I) ist die Untereinheit F kürzer als die Untereinheit C, dies liegt allerdings daran, dass in der Sequenz der Untereinheit F die ersten 8 bis 12 Aminosäuren nicht bestimmt werden können und deshalb fehlen [Roeding <i>et al.</i> , 2009]. Am C-terminalen Ende (II) sind die unterschiedlichen Längen sichtbar, dort ist die Untereinheit C um $\approx 8$ Aminosäuren länger. Unterschiede in der Länge können sich auch durch verschiedene Verläufe in längeren Loops ergeben (III). . . . .	105
8.6	Fehlerhafter Verlauf im Modell für einen Loop-Bereich nahe dem N-terminalen Ende der Untereinheit F. Die Markierung (A) kennzeichnet den N-Terminus der Untereinheit F. Aus der Elektronendichte lässt sich auf einen alternativen Verlauf des $C_\alpha$ -Traces in diesem Bereich schließen. . . . .	106
8.7	Korrektur am Loop-Bereich nahe dem N-terminalen Ende der Untereinheit F. Gegenüber Abbildung 8.6 wurde zur besseren Darstellung der N-terminalen $\alpha$ -Helix die Ansicht geändert. Das Modell ist in lila vor (I) und nach (II) der Korrektur dargestellt. Die Elektronendichte ist in blau dargestellt ( $0.9\sigma$ ). Die N-terminale $\alpha$ -Helix wurde aufgelöst während der flexible Loop an die Dichte angepasst wurde. Dem Modell der Untereinheit F fehlen 8 bis 12 Aminosäuren am N-Terminus. Durch diese zusätzlichen Aminosäuren könnte die Auflösung der Helix bei der Anpassung des Loops unnötig sein. Die Teilabbildungen (I) und (II) unterscheiden sich bezüglich ihrer Orientierung. . . . .	107

8.8 Übereinstimmung zwischen Elektronendichte und Modell im Bereich des aktiven Zentrums vor der Homologie-Modellierung. In (I) ist die Elektronendichte am aktiven Zentrum einer Untereinheit mit dem dazugehörigen Modell dargestellt, in (II) ohne das Modell. Bei der dargestellten Untereinheit handelt es sich um eine Untereinheit des für das Molecular Replacement verwendeten Modells. Das  $C_{\alpha}$ -Trace entspricht demnach noch dem Kryo-EM Modell aus [Cong *et al.*, 2009]. Wie in der Abbildung zu sehen ist, lässt sich die Orientierung der Untereinheiten in der Elektronendichte schon für das Startmodell eindeutig festlegen. . . . . 109

8.9 Auflösung der Elektronendichte. Die Elektronendichte ist bei  $0.9\sigma$  schwarz dargestellt, das Modell in blau als  $C_{\alpha}$ -Trace (A) beziehungsweise mit Seitenketten (B). Zu erkennen ist, dass die Information der Elektronendichte im Allgemeinen nicht ausreicht, um einzelne Seitenketten anzupassen. . . . . 111

8.10 Darstellung des Modells mit verschiedenen Elektronendichte-Isoflächen. Die Abbildung zeigt die Auswirkung der Wahl des angezeigten Elektronendichte-Wertes. In (A) werden nur Bereiche mit sehr hoher Dichte dargestellt, in (B) und (C) sind Bereiche zu sehen, in denen Anpassungen am Modell vorgenommen werden können. In (D) sieht man, dass die Wahl eines zu geringen Wertes durch Rauschen die Qualität der Dichte verschlechtert. . . . . 112

8.11 Modell und Elektronendichte für die Kryo-EM-Struktur aus [Cong *et al.*, 2009]. Hier wurde ebenfalls die Abbildung für verschiedene Elektronendichte-Werte erstellt. Die Absolutwerte sind allerdings wegen einer abweichenden Skalierung nicht mit den Werten aus Abbildung 8.10 zu vergleichen. Die Teilabbildungen (A) und (D) sind durch die extreme Wahl des Wertes der Elektronendichte ähnlich mit den entsprechenden Teilabbildungen für das kristallographische Modell. An den Teilabbildungen (B) und (C) zeigt sich die geringere Auflösung des Kryo-EM-Modells, da eine Definition der  $\alpha$ -Helix analog zur Teilabbildung (C) in Abbildung 8.10 nicht möglich ist. . . . . 114

8.12 Überlagerung der Trimere aus dem *Pandinus imperator*-Hexamer mit den Trimeren aus dem *Limulus polyphemus*-Modell 1OXY. Überlagert wurde das Trimer aus den Untereinheiten A, E und G, diese sind in der Abbildung durch die entsprechenden Buchstaben gekennzeichnet. Das *Pandinus imperator*-Modell ist grün, die Position der Kontakte zwischen den Untereinheiten des Skorpion-Hämocyanins rot dargestellt. Das *Limulus polyphemus*-Modell ist grau dargestellt, die Position der zugehörigen Kontakte orange. Diese Übersicht zeigt die Konzentration der Kontaktstellen auf den Bereich um die  $\alpha$ -Helix 2.3 der Domäne 2. Aus diesem Vergleich wurden die Kontakte identifiziert, die nur in der Struktur des *Pandinus imperator*-Hämocyanins zu finden sind. . . . . 118

- 8.13 Unterschiede in den Kontaktstellen zwischen den trimeren Strukturen des *Pandinus imperator*-Hämocyanins und der Struktur des *Limulus polyphemus*-Hämocyanins 1OXY. Die verschiedenen Untereinheiten sind durch die Farbkodierung angedeutet: E in cyan, A in hellblau, G in dunkelblau. Die Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten sind rot eingefärbt. Die Kontakte zwischen den Untereinheiten A und E, die ausschließlich im *Pandinus imperator*-Modell zu finden sind, sind in der Stick Darstellung gezeigt. Zwischen dem Asparagin 287(E) und dem Histidin 282(A) beziehungsweise Glutamin 290(A) ist aufgrund der Ladungsverteilung keine Bindung zu erwarten. Zwischen der Asparaginsäure 262(E) und dem Histidin 225(A) ist eine Bindung sehr wahrscheinlich. . . . . 119
- 8.14 Eine mögliche Bindungsstelle zwischen Asp und His befindet sich zwischen allen Untereinheiten im Trimer. Die  $\alpha$ -Helix 2.3 und die angrenzende Schleife zwischen dem His225 oder Asp262 ist für die Untereinheit A rot dargestellt. Der entsprechende Bereich ist für Untereinheit E in blau und Untereinheit G in gelb dargestellt. Zwischen allen Untereinheiten ist eine Bindung analog zur Bindung zwischen His225 und Asp262 aus Abbildung 8.13 möglich. . . . . 120
- 8.15 Gemessene Elektronendichte ( $0.9 \sigma$ ) an der postulierten Bindungsstelle zwischen den Untereinheiten A und E. Die Umgebung der möglichen Bindungsstelle zwischen der Asparaginsäure 262 der Untereinheit E und dem Histidin 225 der Untereinheit A aus (I) wurde in COOT mit der gemessenen Elektronendichte dargestellt. In (II) ist der Verlauf des  $C_{\alpha}$ -Traces, in (III) sind auch die Seitenketten im „Baton mode“ dargestellt. Diese Abbildung zeigt die Qualität aber auch den bezüglich der Seitenketten relativ niedrigen Informationsgehalt der Elektronendichte. Zwischen dem His225 der Untereinheit A und dem Asp262 der Untereinheit E (schwarzer Pfeil) erkennt man jedoch eine erhöhte Elektronendichte, die durch die Bindung erklärt werden könnte. Die einzelnen Aminosäuren sind in der Dichte normalerweise nicht erkennbar. Durch eine Bindung wären aber zwei Aminosäuren in einem geringen Abstand an der angezeigten Position zu finden. Durch die niedrige Auflösung kann zwischen den beiden Aminosäureresten nicht unterschieden werden, was im überlappenden Bereich zu einer erhöhten Elektronendichte führt. . . . . 122