

3D Cryo-Elektronenmikroskopie
des 4x6-Hämocyanins
der Vogelspinne *Eurypelma californicum*
unter Oxy- und Deoxybedingungen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Michael Stohr

Mainz, 2007



Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2007

INHALTSÜBERSICHT

(INHALTSVERZEICHNIS SEITE 134)

A.	Einleitung.....	1
1.	Motivation und das Projekt.....	1
2.	Ziel der Arbeit	1
3.	Transmissionselektronenmikroskopie	2
4.	3D-Rekonstruktion.....	3
5.	Spendertier <i>Eurypelma californicum</i>	4
6.	Hämocyanine	6
B.	Material und Methoden	24
1.	Material	24
2.	Methoden	29
C.	Ergebnisse.....	61
1.	Primärdaten.....	61
2.	Prozessierte Daten.....	64
3.	Vergleich von Rekonstruktionen von deoxy- und oxy-EcHc.....	69
4.	Visualisierung.....	70
5.	Rekonstruktionssymmetrie des 4x6-EcHc-Moleküls.....	82
6.	Dimensionen, Winkel und Symmetrien der 4x6-, 2x6- und 1x6-Strukturen.....	83
D.	Diskussion.....	89
1.	Allgemeines	89
2.	Geometrie.....	90
3.	Geometrievergleich mit Strukturmodellen.....	94
4.	Einpassung von hochaufgelösten molekularen Strukturen	101
5.	Konklusion.....	123
E.	Anhang.....	125
1.	Zusammenfassung.....	125
2.	Publikationen	126
3.	127
F.	Verzeichnisse	130
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	130
2.	Abbildungsverzeichnis	131
3.	Tabellenverzeichnis	133
4.	Inhaltsverzeichnis	134
5.	Literaturverzeichnis	136

A. Einleitung

1. Motivation und das Projekt

Vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Projektes in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Markl[®] angefertigt, welches zur Aufklärung der Quartärstruktur der Atmungsproteine der Arthropoden beitragen soll. Diese als Hämocyanine (Hc) bezeichneten Proteine kommen bei verschiedenen Arthropodentaxa, in unterschiedlichen Aggregationsformen einer hexameren (1x6) Grundstruktur (Abbildung 6 - Abbildung 16), gelöst in der Hämolymphe vor. Dieses Projekt startete mit meiner Diplomarbeit 2001, in der das von mir aus transmissionselektronenmikroskopischen Daten rekonstruierte 1x6-Hämocyanin der Languste *Palinurus elephas* (PeHc; Abbildung 16) mit der publizierten Röntgenkristallstruktur des 1x6-Hämocyanins der Languste *Panulirus interruptus* (PiHc) (Gaykema et al., 1984) verglichen wurde (Meissner et al., 2003). Die gute Übereinstimmung dieser Daten motivierte das Vorhaben, auch die höheren Aggregationsformen - in dieser Arbeit das aus 4 Hexameren (4x6) bestehende Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (EcHc) - der Arthropodenhämocyanine zu untersuchen, mit den bekannten Strukturen der Langustenhämocyanine als inneren Standard.

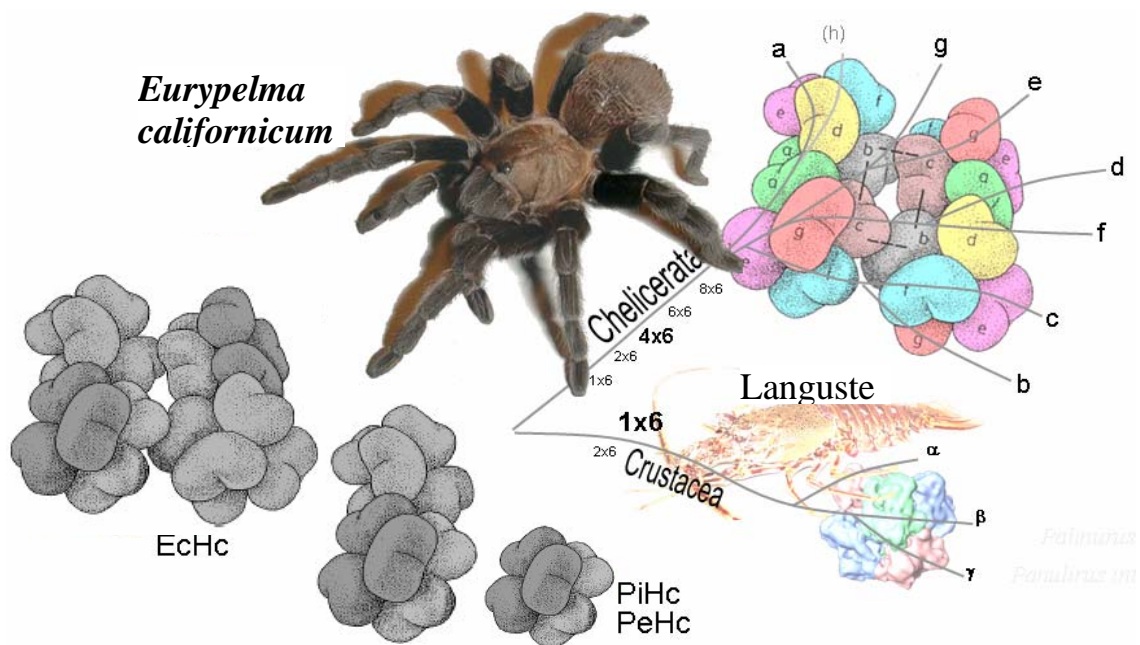


Abbildung 1. Hämocyanine der Arthropoden.

Hämocyanine (Hc) der Arthropoden sind Oligo-Hexamere und in den beiden Unterstämmen der Chelicerata (Kieferklauenträger) und der Crustacea (Krebstiere) zu finden.

2. Ziel der Arbeit

Es sollte versucht werden, mittels Einzelpartikelanalyse (4. 3D-Rekonstruktion) aus EM-Projektionsbildern eine 3D-Rekonstruktion des 4x6-Hämocyanins von *Eurypelma californicum* anzufertigen und dessen zahlreiche Interhexamerkontakte und deren Auswirkung auf die Gesamtstruktur zu analysieren. Eine gelungene Rekonstruktion der Quartärstruktur sollte, in Bezug auf die Hexamere, der publizierten 3D-Rekonstruktionen des 1x6-Hämocyanins von *Palinurus elephas* (Meissner et al., 2003) und der publizierten molekularen Röntgenkristallstruktur

des 1x6-Hämocyanins von *Panulirus interruptus* (Gaykema et al., 1984) konforme Strukturen zeigen, folglich durch diese verifiziert werden. Vergleich mit aus verschiedenen Methoden gewonnenen Quartärstrukturen höherer Arthropodenhämocyaninen (4x6, 8x6) früherer Publikationen sollte Unterschiede und Übereinstimmungen aufdecken. Durch Einpassung von publizierten molekularen Daten aus der Röntgenstrukturanalyse (Hazes et al., 1993) für eine Untereinheit war angedacht, ein molekulares Modell des Untereinheiten-Arrangements abzuleiten, welches sich auf eine natürliche Konformation der Quartärstruktur und der EM-Rekonstruktion stützt.

In dieser Arbeit sollten Abschätzungen des Einflusses des O₂-Sättigungszustandes auf die Tertiär- und Quartärstruktur durch präparative Fixierung und Rekonstruktion der beiden Grenzkonformationen erfolgen. Es galt herauszufinden, ob auf dieser Ebene ein Unterschied zwischen der oxygenierten und der deoxygenierten Form des Proteins zu erkennen ist. Im Speziellen war eine Hypothese aus experimentellen und modellierten Röntgen-Kleinwinkel-Streuungsdaten (SAXS) (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001; Leidescher and Decker, 1990) Gegenstand einer Überprüfung, die eine drastische Verschiebung und Rotation der Hexamere (A.6.4 Seite 21) im oxygenierten EcHc relativ zum deoxygenierten EcHc postulieren.

3. Transmissionselektronenmikroskopie

Das Elektronenmikroskop liefert, im Hellfeld-Transmissions-Modus (TEM) betrieben, Primärdaten in Form von bildhaften Repräsentationen der zu untersuchenden Makromoleküle, welche auf belichteten und prozessierten, Silberhalogenidkristall-beschichteten Filmmaterial dauerhaft gehalten werden. Die beschleunigten Elektronen passieren das Objekt und liefern so ein Transmissions- oder Projektionsbild desselben. Diese (Real-)Bilder entstehen dabei durch Rücktransformation aus einem imaginären Fourier-Transformations-Zwischenbild der rückseitigen Fokusebene. Da es Projektionsbilder sind, lassen sich die in ihnen latent enthaltenen 3D-Informationen zur Strukturrekonstruktion heranziehen. Im Zuge der Bildverarbeitung ist es sinnvoll, die digitalisierten Realbilder zeitweise wieder in Transformationsbilder zurückzurechnen.

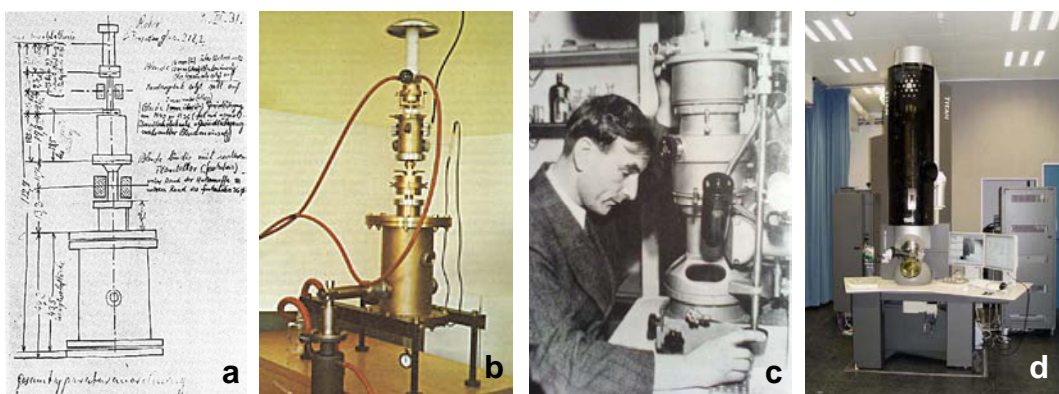


Abbildung 2. Frühes Elektronenmikroskop und sein Erfinder Ernst Ruska (1906-1988).

- a) Ruskas Skizze des ersten Elektronenmikroskops von 1931 (b). c) Ruska am „Übermikroskop 100“ von Siemens im Jahr 1949 produziert. d) Ein Modernes Elektronenmikroskop im Ernst-Ruska-Centrum in Jülich. Ernst Ruska erhielt 1986 den Nobelpreis für Physik.

Theoretisch lassen sich mit modernen Elektronenmikroskopen (EM) Strukturen im fast atomaren Bereich darstellen, jedoch sind biologische Moleküle bei den dafür geforderten Intensitäten der bildgebenden Elektronenstrahlung nicht stabil, so dass submaximale Wirkenergiedichten verwendet werden müssen. Der mangelnden Qualität dieser so gewonnenen Bilder, die sich in einem ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnis ausdrückt, muss mit Quantität entgegengewirkt werden (B.2.2.8 Seite 54), um in immer besser Auflösungsgebiete vorzudringen. Das verwendete TECNAI F30 ST Elektronenmikroskop ermöglicht eine Dosiswirkungsmessung (Intensität) in $(e) \text{ nm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Damit kann man eine reproduzierbare und bewährte Bestrahlungsstärke einstellen, die einen Kompromiss zwischen Strahlenschäden und Abbildungsgüte darstellt.

4. 3D-Rekonstruktion

In den letzten Jahren hat die 3D-Rekonstruktion von Proteinstrukturen aus elektronenmikroskopischen Bildern bahnbrechende Erfolge erzielt und wurde auch bei Hämocyanine angewendet (de Haas et al., 1997b; Lamy et al., 1993; Lamy et al., 2000; Martin et al., 2007; Meissner, 2000; Meissner et al., 2000; Meissner et al., 2003; Orlova, 2000; Orlova et al., 1999; Orlova et al., 2000; van Heel and Dube, 1994). Mit 3D-Rekonstruktion aus Einzelpartikel¹ (single particle analysis) wird das Erschließen der räumlichen Struktur eines Objektes aus dessen bildlichen Repräsentation von sehr vielen individuellen Instanzen des Objektes in Form von 2D-Projektionen bezeichnet (B.2.2 Bildbearbeitung). Der Begriff ‚Rekonstruktion‘ könnte implizieren, dass die Struktur in irgendeiner Phase der Präparation zerstört worden wäre und im Verlauf der Rekonstruktion wieder zusammengebaut würde, was natürlich nicht der Fall ist. Die Struktur eines Moleküls möglichst unversehrt zu erhalten ist ja gerade das Ziel der Präparation. Der Begriff Rekonstruktion bezieht sich auf die Tatsache, dass aus der impliziten Tiefeninformation aus zweidimensionalen Projektionsbildern die dreidimensionale Struktur rekonstruiert wird. Die Aufnahmebedingungen sollten möglichst strukturerhaltend, also wenig strahlenbelastend für die biologischen Moleküle, gewählt werden. Dies ist die Voraussetzung, um überhaupt verlässliche Strukturaussagen treffen zu können. Dabei versucht man, die natürliche Struktur zu erhalten und ein möglichst originalähnliches Abbild derselben zu rekonstruieren, das heißt, die Struktur sichtbar zu machen. Man könnte somit von einer “3D Visualisierung der Struktur“ sprechen.

Die Röntgenkristallographie bietet sicher noch lange eine bessere Auflösung für viele, untersuchte Objekte. Doch lassen sich sehr große Proteine damit nicht analysieren, da sich aus diesen meist keine genügend großen Einkristalle bilden lassen, um diese mit geforderter Genauigkeit messen zu können. Der Zeitaufwand kann mehrere Jahre betragen. Mit der 3D-Elektronenmikroskopie lassen sich vor allem größere Proteine geeignet bearbeiten. Der Zeitaufwand kann bei vorhandenem Vorwissen über die Struktur wesentlich geringer ausfallen. Außerdem werden für die Herstellung der Kristalle oft extreme pH-Werte benötigt, die außerhalb der physiologischen Pufferbereiche liegen (z. B. PiHc (Volbeda and Hol, 1989) bei pH = 3,8). Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Röntgenkristallographie eventuell

¹ Die quasikristalline Einzelpartikel-Analyse oder single particle analysis von Makromolekülen wie Atmungsproteinen ist möglich, weil diese in hoher Anzahl vorkommen und strukturell gleich sind, anders als z. B. bei supermakromolekularen Strukturen wie Geweben oder Organellen, wie z. B. Mitochondrien, bei denen jede Instanz strukturell ein Unikat ist.

artifizielle, nicht physiologische Strukturen der dynamischen Konformationsvariabilität der untersuchten Proteine zeigt. Hier ist die EM-Rekonstruktion durch ihre In-Lösung-Präparation unter nahezu physiologischen Bedingungen überlegen und kann zur Wahrheitsfindung beitragen. Die Protein-Puffer-Lösung wird dabei blitzartig auf fast Flüssigstickstofftemperatur gefroren und so die native Konformation der Proteine konserviert. Außerdem kommt die 3D-Elektronenmikroskopie mit sehr kleinen Mengen an Probenmaterial aus.

5. Spendertier *Eurypelma californicum*

Das untersuchte und rekonstruierte Hämocyanin stammt aus der Hämolymphe eines kieferklauentragenden (cheliceraten) Arthropoden, der nordamerikanischen Vogelspinne *Eurypelma californicum* (Abbildung 3). Sie ist im Vergleich zu vielen anderen Vogelspinnen wenig auffällig gefärbt, was sie für Spinnenliebhaber wenig begehrt macht, sie aber damit für die Laborhaltung prädestiniert. Sie ist mit wenig Aufwand zu halten und stellt, da die Hämocyaninspende für die Tiere ein leicht zu verkraftender Eingriff ist, eine quasi nur durch das natürliche Lebensalter der Tiere begrenzte Hämocyaninquelle dar. Tierversuche an wirbellosen Tieren sind zwar nach §7 TierSchG genehmigungsfrei, vorab Gesagtes ermöglichte aber für diese Arbeit ein wissenschaftliches Arbeiten ohne Tieropfer. Die Vergleichshämocyanine (Diskussionsteil) stammen von anderen Arthropodenordnungen (siehe unten). Arthropoden besitzen offene Bluttransportsysteme. Die Vogelspinnen atmen vor allem mit zwei Buchlungenpaaren und Tracheen (Abbildung 23) wie die Skorpione. Schwertschwänze und Crustaceen beziehen über Kiemen Sauerstoff aus dem umgebenden Wasser.



Abbildung 3. Spendertier Vogelspinne *Eurypelma californicum*

Rostral sind die dem Unterstamm namensgebenden (orthognathen) Cheliceren zu sehen, welche die Giftdrüsen tragen; daneben die Pedipalpen ohne Bulben (weibliches Tier). Caudal sitzt am, die Extremitäten tragenden, Prosoma das Opistosoma mit den Spinndrüsen, welches zur Hämolymphegewinnung im oberen Teil punktiert wird (Abbildung 23).

Vogelspinnen traten bereits im Karbon ab ca. 360 mya (million years ago) auf. Ihr Lebensraum sind vorrangig tropische bis subtropische Klimazonen. Zum ersten Mal wurde eine Vogelspinne wissenschaftlich von Linné beschrieben (*Avicularia avicularia* Linnaeus, 1758). Ihren deutschen Trivialnamen verdanken die Vogelspinnen (Theraphosidae; *engl.*: Tarantula) wohlmöglich der Frankfurter Insektenforscherin Maria Merian (1647-1717), die wahrscheinlich bei ihren Studien an Schmetterlingen in Surinam zufällig eine ‚großen Spinne‘ mit ihrer ungewöhnlichen, wahrscheinlich nicht selbst erlegten, Kolibri-Beute beobachten konnte. Normalerweise ernähren sich Vogelspinnen vorzugsweise von Insekten, aber auch von kleinen Amphibien, Reptilien und Säugern, welche sie mit ihrem, mittels ihrer Cheliceren injizierten, Gift töten. Das Gift nur sehr weniger Vogelspinnenarten ist für Menschen toxischer als das der Hornissen. Vielmehr sollte man sich vor ihren Brennhaaren am Hinterleib in Acht nehmen. Diese könne bei Gefahr für die Spinne von ihr mit schnellen Bewegungen der hinteren Beinpaare abgestreift werden und verursachen, eingeatmet, durch ihre Widerhaken schwere Atemwegsprobleme beim vermeintlichen Angreifer.

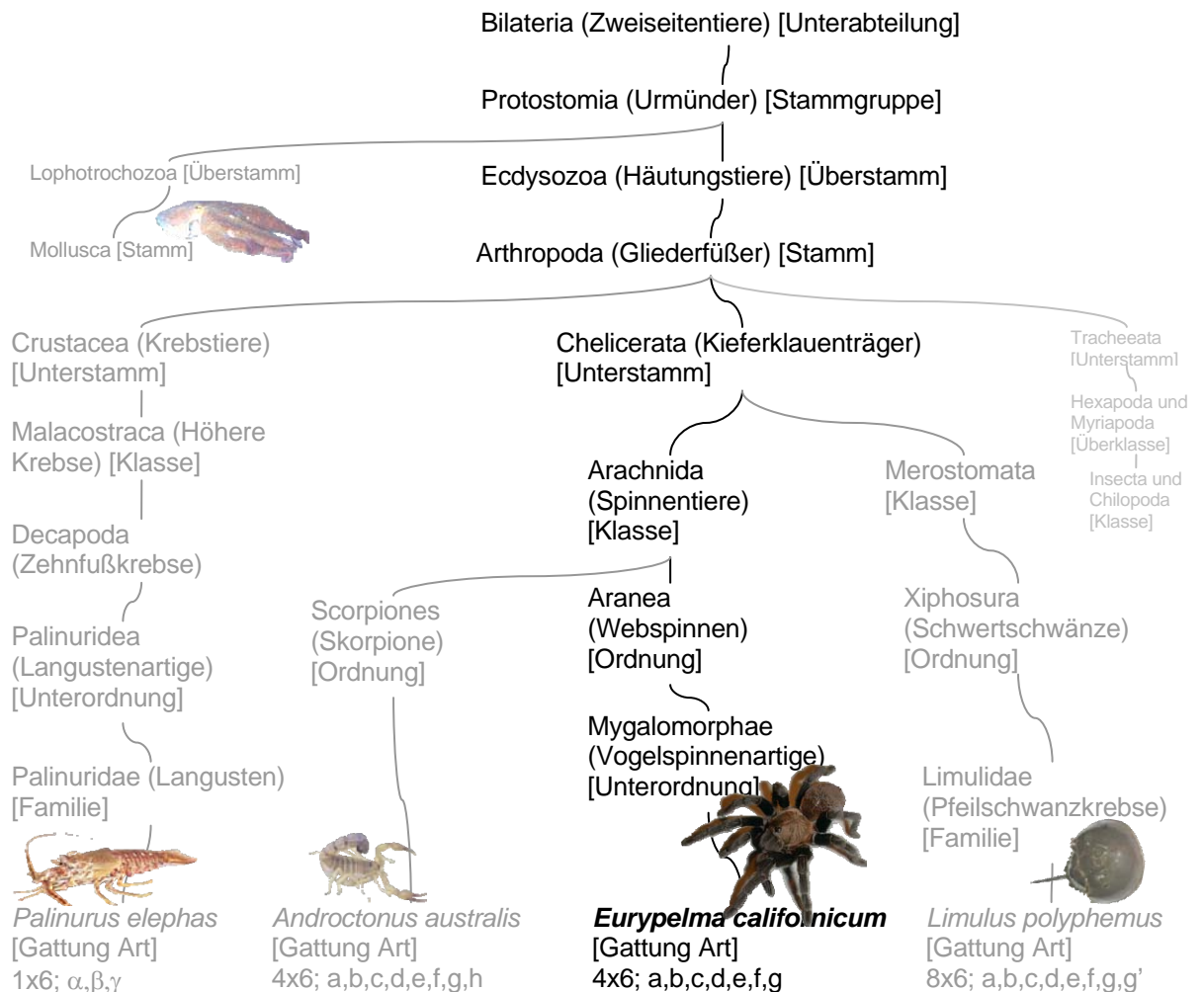


Abbildung 4. Systematik des Spindertiers *Eurypelma californicum*

Tiere, die relevante Vergleichshämocyanine besitzen, sind mit aufgeführt (grau), um die relative Verwandtschaft zu zeigen; [Hierarchie in der Systematik], letzte Zeile: Aggregationskomplex; Untereinheitstypen, siehe Material- und Diskussionsteil. *Palinurus elephas* steht hier auch stellvertretend für *Panulirus interruptus*. Für Artbeispiele der Aggregationsformen 2x6 und 6x6 siehe Legendentext von Abbildung 13. Zu erwähnen sind noch die hexameren lavalen Speicherproteine der Insekten (Burmester et al., 1998; Markl et al., 1992), die dem gleichen Grundbauplan folgen und bei manchen Insekten vorkommen.

Die Unterordnung der Vogelspinnen gehört zu der Ordnung der Webspinnen (Unterordnungen: Vogelspinnenartige und echte Webspinnen) und unter anderen mit der Ordnung der Skorpione (Vergleichshämocyanin von *Androctonus australis* (AaHc); Diskussion) zur Klasse der Spinnentiere (Abbildung 4). Mit der Klasse der Merostomata, zu der die Pfeilschwanzkrebse (Vergleichshämocyanin von *Limulus polyphemus* (LpHc); Diskussion) gehören, sind sie dem Unterstamm der Cheliceraten im Stamm der Arthropoden zugeordnet. Das hexamere Hämocyanin weiterer Arthropoden, der dekapoden (Crustacea) Languste *Palinurus elephas* (PeHc) und *Panulirus interruptus* (PiHc), wird als Vergleich und Referenz herangezogen. Die ebenfalls zwei Kupferionen im Bindungszentrum tragenden Hämocyanine der Mollusken stehen, als zu den Lophotrochozoa gehörenden Stamm, den zu den Ecdysozoa, den Häutungstieren, gehörenden Arthropodenstamm gegenüber.

6. Hämocyanine

6.1. Hämocyanine als Atmungsproteine in der Hämolymphe

Aufgrund von, wahrscheinlich im Neuen Proterozoikum, aufkommender photosynthetischer Organismen, existiert eine sauerstoffangereicherte Atmosphäre seit, so Schätzungen, über einer Milliarde Jahren. Der verfügbare Sauerstoff hat vermutlich auch bald Organismen mit aerobem Metabolismus evolvieren lassen, welche diesen zur effektiven oxidativen Energiegewinnung nutzen. Komplexe stoffwechselaktive Tiere konnten ihren gesteigerten Bedarf an Sauerstoff bald nur noch mit spezialisierten Kreislaufsystemen decken; die Versorgung über diffusiven Körperoberflächenaustausch, wie bei kleinen flachen Tieren, reichte nicht mehr aus. Vermutlich wurden Proteine, welche ursprünglich gegen die Toxizität des nun hochkonzentrierten Sauerstoffs eingesetzt wurden, zu in Kreislaufsystemen verteilten Sauerstofftransportproteinen umfunktioniert (van Holde et al., 2001). Das wird zeitlich im Neoproterozoikum vor der Kambrischen Radiation des Tierreichs angesiedelt (Beginn des Kambrium ca. 540 mya). Solche, auch als Atmungspigmente bezeichneten Proteine sind in verschiedenen Tiergruppen mehrfach entstanden – Abbildung 4 zeigt die in der Natur vorkommenden Atmungspigmente. Das mittels der Transportproteine geordnete und hochverfügbare Energiepotenzial der Sauerstoffnutzung hat vermutlich zur „sprunghaften“ Ausprägung der Radiation der Arten beigetragen. Hämocyanine sind respiratorische Hämolympheproteine vieler Arten der Stämme Mollusca und Arthropoda. Es handelt sich dabei um hoch aggregierte Kupferproteine mit sehr komplexer Struktur und Funktion.

Physiologisch liegen die riesigen Respirationsproteine der Arthropoden und Mollusken kolloidal gelöst in der Hämolymphe (Abbildung 4 d, e) dieser Tiere vor und werden so, im meist offenen Kreislaufsystem, zu den sauerstoffverbrauchenden Organen transportiert. Dort kann bei Bedarf der molekulare Sauerstoff abgegeben werden, welcher im speziellen Respirationsorgan reversibel an zwei Kupferionen gebunden wurde. Hämocyanine sind große Aggregate aus vielen Sauerstoffbindungseinheiten und erhöhen damit die Sauerstofftransportleistung der Hämolymphe überproportional zur Teilchenzahl. Dies stellt eine adäquate Sauerstoffversorgung der Verbrauchsorgane bei geringer kolloidosmotischer Belastung der Hämolymphe und Gewebe sicher. Hämocyanine erweisen sich als physiologisch sehr flexible molekulare Schnittstellen (Markl, 1986b) von Außenmedium und innerer Sauerstoffversorgung. Das sich strukturell unterscheidende Hämocyanin der Mollusken (Abbildung 4 e, Abbildung 6) ist mit dem der

Arthropoden nur rudimentär verwandt (Decker and Terwilliger, 2000; Jaenicke and Decker, 2004; Markl and Decker, 1992; van Holde et al., 2001), (Abbildung 7). Im Gegensatz zum funktionell analogen, Eisen tragenden Hämoglobin (Hb, Abbildung 4 a), welches akkumuliert in Erythrozyten im Blutstrom transportiert wird, kommt Hämocyanin hochkonzentriert, bis 1/10 des Hämolympfvolumens, frei in der Hämolymphe vor. Gelöstes Hämoglobin (Abbildung 4 c) in einer hoch aggregierte Form mit über hundert Untereinheiten kommt beim Stamm der Annelida vor, wie z. B. beim Regenwurm *Lumbricus terrestris* (de Haas et al., 1997a; Lamy et al., 1996; Taveau et al., 1999).

Arthropodenhämocyanin transportiert Sauerstoff vor allem in den Unterstämmen Crustacea und Chelicerata (Abbildung 4). Aber auch in manchen Insekten (Hagner-Holler et al., 2004), Hundertfüßern (Kusche et al., 2003), Diplopoden (Kusche and Burmester, 2001) und Onychophoren (Kusche et al., 2002) kommt es vor. Also in Tieren, welche zumindest adult Tracheen besitzen und in denen es als nicht notwendig für den Atemgastransport vermutet wurde. Zu erwähnen sind noch die hexameren larvalen Speicherproteine, die so genannten Hexamerine (Burmester et al., 1998; Markl et al., 1992; Meissner et al., 2004; Mousseron-Grall et al., 1997), einiger Vertreter der Klasse der Insekten. Diesen kommt aufgrund des fehlenden Kupferzentrum keine Transportaufgabe für Sauerstoff zu (Burmester, 1999; Telfer and Kunkel, 1991), folgen aber dem gleichen Bauplan und erfüllen wahrscheinlich Speicherfunktion für Aminosäuren für die Metamorphose.

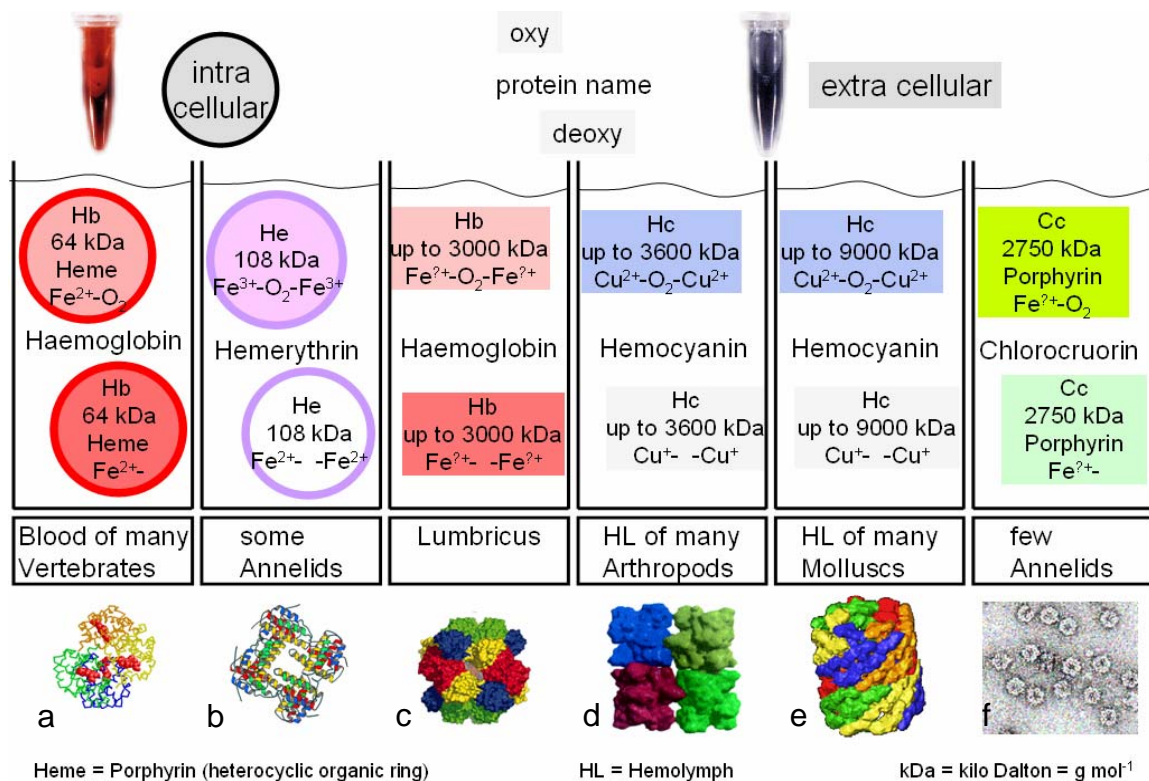


Abbildung 5. In der Natur realisierte Atmungsproteine.

a) und b) sind in Zellstrukturen zusammengefasst, um hohe Teilchenkonzentrationen zu vermeiden. c) bis e) vermeiden dies durch Bildung großer extrazellulärer Aggregationsformen mit vielen Bindungsstellen in einem Molekül. Hämocyanin ist im oxygenierten Zustand blau und deoxygeniert farblos. Es ist mit bis zu 9000 kDa das größte lösliche Protein. Die Molekülbilder sind hier nicht maßstabsgetreu relativ zueinander. a) Röntgenkristallstruktur des Hämoglobins, b) Röntgenkristallstruktur von Hämyerithrin, c) Modell des Regenwurmhämoglobins (*Lumbricus terrestris*), d) 4x6-meres Röntgenkleinwinkel-Streuungs-Modell eines Cheliceratenhämocyanin (*Eurypelma californicum*), e) 3D-Rekonstruktion eines Schnecken-Hämocyanin (*Haliois tuberculata*), f) Elektronenmikroskopisches Bild von Chlorocruorin (*Sabella spallanzanii*). Kupfer als Bindungsatom scheint einmalig zu sein.

Hämoglobin stand evolutiv auch den Wirbellosen zur Verfügung (Markl, 1986a), aber dennoch kommt bei den beiden großen Tiergruppen mit offenem Kreislaufsystem, den Mollusken und Arthropoden, frei flottierendes Hämocyanin als Atmungsprotein vor. Es fällt die Tendenz auf, dass vor allem Thermoregulierer Hämoglobin und Thermokonformer Hämocyanin für den Sauerstofftransport benutzen. Hämocyanin ist offensichtlich im Vergleich zu Hämoglobin weniger leistungsfähig, was die Transportfähigkeit für Sauerstoff in Bezug auf die aufzuwendende Molekülmasse angeht (Abbildung 10, Tabelle 2). Dieser Nachteil wird aber aus physiologischer Sicht scheinbar durch eine plastische Modellierbarkeit und funktionelle Flexibilität der extrazellulären Hämocyanine wieder ausgeglichen (Markl, 1986a). Arthropodenhämocyanine zeigen ausgeprägte Kooperativität der Sauerstoffbindung (Abbildung 11) mit sehr hoher Kooperativität und Hillkoeffizienten bis zu 9 (Erker, 2001), welche vom Bohreffekt (Markl, 1986a; Sterner and Decker, 1994) abhängen. Den Tieren, die es besitzen, bringt es scheinbar Vorteile große, extrazelluläre heteromere Systeme mit vielen Untereinheiten als Schnittstelle (Markl, 1986b) zwischen Außenmedium und innerer Sauerstoffversorgung zu verwenden, die den Organismus schnell an wechselnde Bedingungen der Sauerstoffversorgung anpassen können (Markl, 1986a). Anatomisch könnte auch ein rein strömungsmechanischer Gesichtspunkt auf die Selektion für Hämolymphe ohne große Blutzellen ausgewirkt haben: Fehlende Kapillare der offenen Kreislaufsysteme würde ein energieaufwendiges Hindurchströmen der Blutzellen durch das Gewebe nötig machen (Mangum, 1985).

6.2. Hämocyanine

Die Hämocyanine kommen bei Mollusken und Arthropoden vor, weisen stark unterschiedliche Primärstruktur(längen) auf und falten sich zu grundverschiedenen Tertiär- und Quartärstrukturen und werden daher als zwei Familien angesehen (Burmester, 2001; Decker and Terwilliger, 2000; van Holde et al., 2001).

Ein Molluskenhämocyanin formt immer einen Hohlzylinder mit helicaler fünfzähligerotationssymmetrischer (C₅, D₅) Wandtextur (Abbildung 6 oben). Die minimale Aufbaueinheit des Molluskenhämocyanins (van Holde and Miller, 1982), ein Protein aus zehn Untereinheiten (Dekamer) mit je sieben bis acht globulären funktionellen Sauerstoffbindungsdomänen (welche je ein O₂ binden), hat eine Molekülmasse von bis zu 4 Mda (Tabelle 2). Die 3D-Struktur des Hämocyanins der Großen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* und des Seeohrs *Haliotis tuberculata*, beides Didekamere, wurde in der Arbeitsgruppe Markl in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen aufgeklärt (Meissner, 2000; Meissner et al., 2000; Orlova et al., 1997). In Publikation befindet sich die hoch aufgelöste Rekonstruktion des Cephalopoden-Hämocyanins von *Nautilus pompilius* (Perlboot).

Vollkommen anders faltet sich eine Polypeptidkette eines Arthropodenhämocyanins zu bohnenförmiger Gestalt und lagert sich mit fünf weiteren Untereinheiten zu Hexameren (1x6) zusammen, welche eine gemeinsame 3-fach und drei 2-fach Rotations-Symmetrieachse besitzen (im Falle einer angenommenen idealisierten Homogenität der Untereinheiten-Sequenzen). Diese können artspezifische, geradzahlige Aggregate aus 2, 4, 6 oder 8 Hexameren formen (2x6, 4x6, 6x6, 8x6; Abbildung 6 unten und Abbildung 13), welche immer niedrigere Symmetrien (C₂, D₂) aufweisen als die Molluskenhämocyanine, genauer im Abschnitt A.6.3 Arthropodenhämocyanine ab Seite 14 beschrieben.

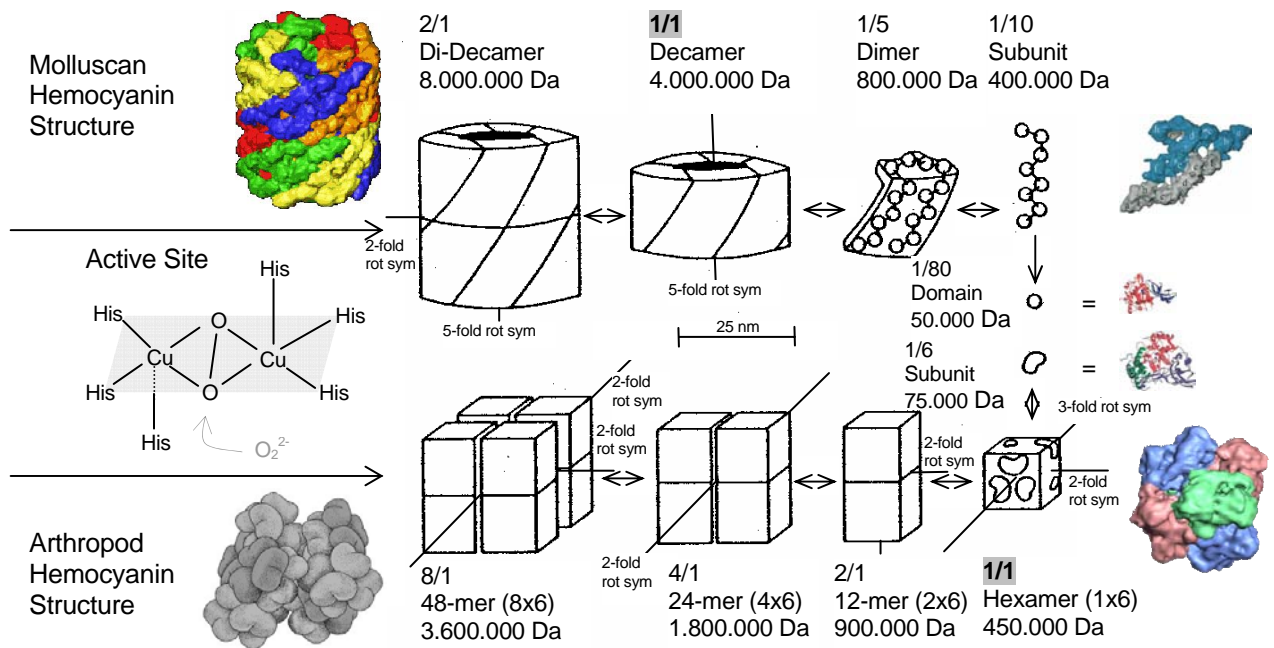


Abbildung 6. Arthropoden- und Molluskenhämocyanin.

Innen: Prinzipielle, geometrische Anordnung der aufbauenden Einheiten nach Markl (Markl and Decker, 1992) verändert; erweitert durch Farbbilder. Außen: Beispiele für gefundene Strukturen (Rekonstruktion (Quartärstrukturen) und Kristallstrukturen (Untereinheit)). Bruchangaben stellen die das Verhältnis zur (minimalen) stammspezifischen Aufbaueinheit (fett, grau unterlegt) der Quartärstruktur dar. Gemeinsamkeiten und Unterschiede: Konserviertes Bindungszentrum, aber divergente Primär-, Subtertiär- (Domänen-), Tertiär- und Quartärstrukturen. Links zentriert ist die den beiden Hämocyanintypen gemeinsame O₂-Bindungsstelle ("Active Site") dargestellt: Der Sauerstoff wird als Peroxyd in side-on-Konformation gebunden. Mit Ausnahme der beiden axialen Histidinstickstoffe liegen alle Bindungspartner in einer Ebene. Oben links: Hämocyanin von *Haliotis tuberculata* (HtHc). Unten links: Hämocyanin von *Limulus polyphemus* (LpHc) (schematisch). Zu beiden Letztgenannten: Die Farben in HtHc dienen der Sichtbarmachung der Dimere und sollen keine Heterogenität der Untereinheiten implizieren, wohingegen LpHc tatsächlich aus 8 verschiedenen Untereinheitstyp aufgebaut ist, dies aber in dieser Darstellung nicht gezeigt ist. Oben rechts: Dimer von *Haliotis tuberculata*. Unten rechts: Hexamer von *Panulirus elephas*. Zur abstrakten Abbildung des 48-mer (8x6 = 2x4x6) muss gesagt werden, dass diese zu sehr vereinfacht dargestellt ist, da die beiden 24-mer (4x6) in Wirklichkeit um ca. 42° gegeneinander verdreht sind.

Hämocyanine von Arthropoden und Mollusken weisen trotz struktureller Unterschiede im aktiven Zentrum eine konservierte (räumliche) Struktur auf (Abbildung 7), welche drei (Mollusken) bis vier (Arthropoden) Helices, sechs Histidine (His) und zwei Kupfer(I)Ionen beinhaltet, zwischen denen der Sauerstoff gebunden wird. Bei beiden Hc-Klassen werden die beiden sauerstoffbindenden Kupfer(I)Ionen (Typ 3 COP²; Copper Oxygen binding Protein (Decker and Terwilliger, 2000)) von je drei Histidinen (das von N-Terminus gesehen primäre CuA- und das folgende CuB-Ligandentriplet), in die zwischen den Helices liegende Bindungstasche exponiert. Das Sauerstoffmolekül wird bei beiden in 'side-on-Konformation' (Magnus et al., 1994) als Peroxyd (O₂²⁻) gebunden (Abbildung 9) und oxidiert damit das Kupferion in die 2+ Oxidationsstufe (Decker and Terwilliger, 2000; Freedman et al., 1976) (Abbildung 8), was für die Blaufärbung der oxidierten Hämolymphe verantwortlich ist (van Holde and Miller, 1995).

² Nach der aus hauptsächlich der Elektronen-Paramagnetischen-Resonanz (EPR) abgeleiteten Konvention unterscheidet man drei in Kupferproteinen gefundene aktive Kupferzentren: Die blauen Typ 1 und die nicht-blauen Typ 2 Kupferzentren mit je einem Kupferatom und die Typ 3 Kupferzentren mit zwei Kupferatomen, zu denen die Hämocyanine gehören.

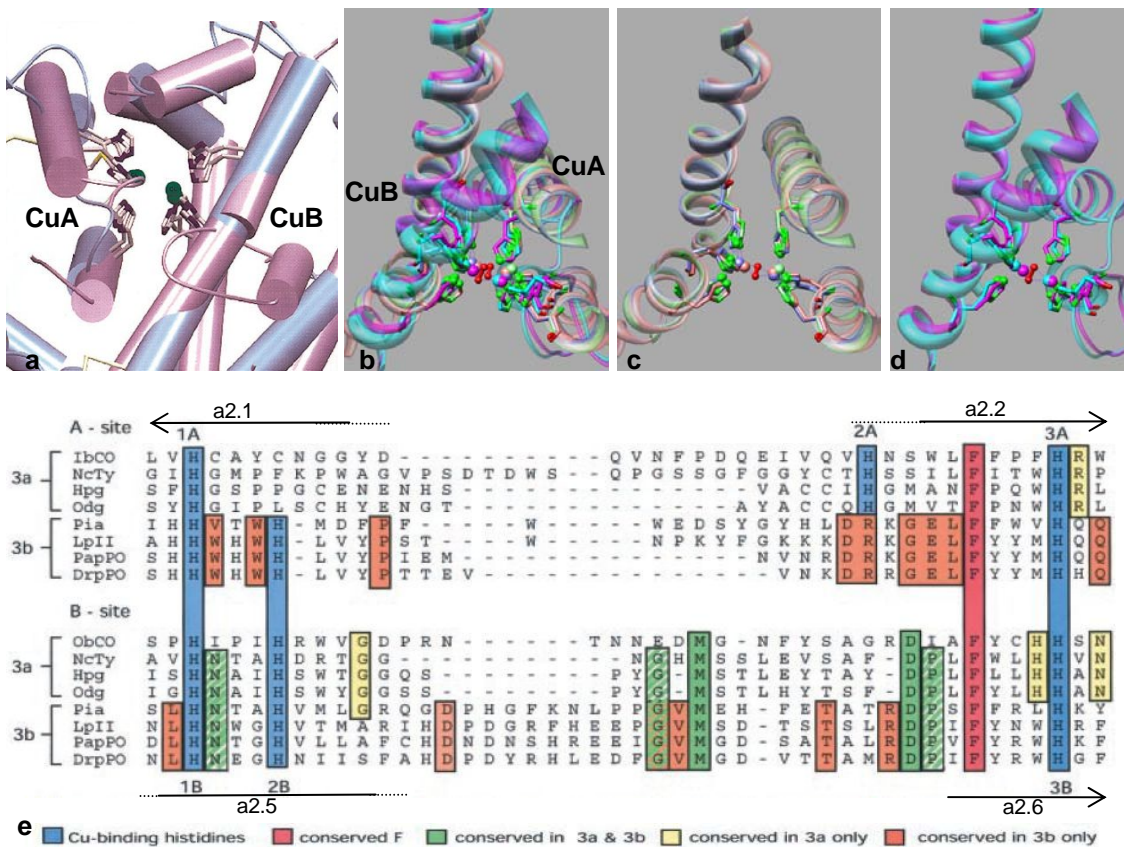


Abbildung 7. Bindungszentrum von Mollusken- und Arthropoden-Hc.

a) Überlagerung der Bindungszentren von *Limulus polyphemus* (violett) Untereinheit II mit dem Bindungszentrum einer funktionellen Einheit von *Octopus dofleini* (blau) nach (van Holde et al., 2001). b) Überlagerung von den fünf verfügbaren Röntgenkristallstrukturen der Bindungszentren von 2 Arthropodenhämocyaninen (c) und 2 Molluskenhämocyaninen (d): *Panulirus interruptus* deoxygeniert (Volbeda and Hol, 1989) (rot), *Limulus polyphemus* deoxygeniert (Hazes et al., 1993) (grün) und oxy (Hazes et al., 1996) (blau), *Octopus dofleini* oxygeniert (Cuff et al., 1998) (türkis), *Rapana thomasiana* deoxygeniert (Perbandt et al., 2003) (violett) (vergleiche Tabelle 1). e) Sequenzvergleich der A- und B-Bindungsgebiete einiger Typ-3-Kupfer-Proteine (van Holde et al., 2001). Van Holde definiert zwei Klassen von Typ-3-Proteinen: 3a beinhaltet Molluskenhämocyanin, Tyrosinasen und Catecholoxidase. Zu 3b zählen Arthropodenhämocyanine und -Phenoloxidasen. (Mehr Daten: siehe (Burmeister and Scheller, 1996; Durstewitz and Terwilliger, 1997)) Spezies-Code: IbCO, sweet potato catechol oxidase; NcTy, *Neurospora crassa* tyrosinase; Hpg, *Helix pomatia* hemocyanin, functional unit g; Odg, *Octopus dofleini* hemocyanin, functional unit g; Pia, *Panulirus interruptus* hemocyanin, subunit a; LpII, *Limulus polyphemus* hemocyanin, subunit II; PapPO, *Pacifasticus leniusculus* phenol oxidase; DrpPO, *Drosophila melanogaster* phenol oxidase. Pfeile: Teile der vier Helices in Typ3b-Proteinen. A2.1, a2.2, a2.5 und a2.6 sind die die Histidine tragenden Helices.

Tabelle 1. Struktureigenschaften der Sauerstoff-Bindungszentren.

Längen der Helices, Positionen der Histidine und deren Abstände von den verfügbaren Röntgenkristallstrukturen PiHc-a, LpHc-II, OdHc und RtHc. Von der EcHc-a-Sequenz sind die entsprechenden abgeleiteten Eigenschaften mit aufgeführt (Voit et al., 2000). Die relative Anordnung der Histidine (Spalte Histidin-Position und Δ AS (Abstand Aminosäuren)) der Bindungszentren und die Längen (Spalte #AS (Anzahl)) der Helices sind relativ konserviert (vergleiche Abbildung 7).

Helix	Arthropoden									Mollusken						
	PiHc			LpHc			EcHc-a (Sequenz)			OdHc			RtHc			
	#AS (Hel)	His-Pos	Δ AS (His)	#AS (Hel)	His-Pos	Δ AS (His)	#AS (Hel)	His-Pos	Δ AS (His)	#AS (Hel)	His-Pos	Δ AS (His)	#AS (Hel)	His-Pos	Δ AS (His)	
2.1	13	194	4	13	173	4	13	175	4	CuA	41	19	9	41	20	
		198			177			179								60
2.2	19	224	22	22	204	27	22	206	22		49	69	44	70		
		344			324			326			169	181				
2.5	10	348	4	10	328	36	10	330	36		20	173	4	20		185
		384			364			366			173	185				
2.6	17	384	18	364	366	18	366	366	366	CuB	24	200	23	212	4	
										20	169	4	20	181		

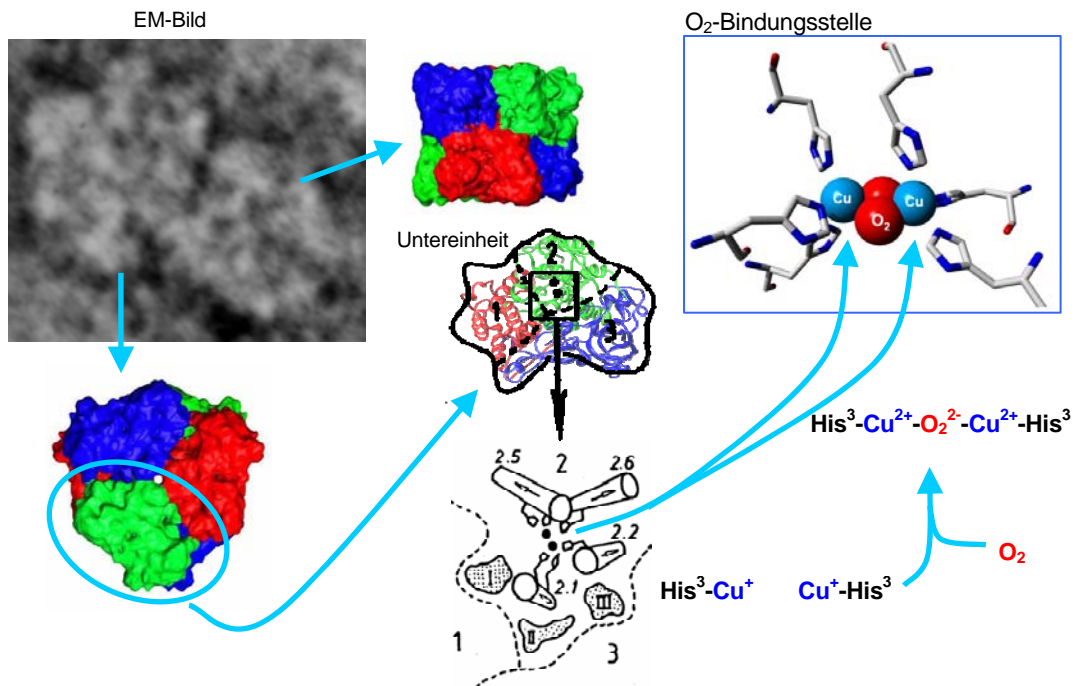


Abbildung 8. Die O₂-Bindungsstelle im Arthropodenhäemocyanin ist in Domäne 2 lokalisiert.

Im Gegensatz zum Molluskenhäemocyanin ist beim Arthropodenhäemocyanin nur jede 3. Domäne in die Sauerstoffbindung involviert. Die Vergrößerungsreihe zeigt am Beispiel eines Dodekamers, dass die Sauerstoff-Bindungsstelle in der Domäne 2 lokalisiert ist. Die Domänen 1 und 3 wirken regulatorisch auf den Oxygenierungs/Deoxygenierungs-Zyklus vermittelt durch Tertiär-/Quartärstruktur-Konformation-Änderung. Das Sauerstoffmolekül wird in 'side-on-Konformation' (Magnus et al., 1994) als Peroxyd (O₂²⁻) gebunden und oxidiert damit das Kupferion in die 2+ Oxidationsstufe (Freedman et al., 1976) (Decker and Terwilliger, 2000).

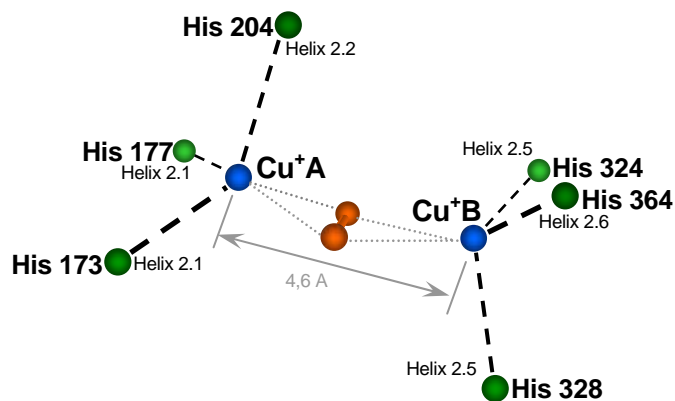


Abbildung 9. Bindungszentrum von Kupfer-Sauerstoff-Bindungs-Proteinen

Nach (Decker and Terwilliger, 2000) erweitert. Blau: Kupferionen, grün: Histidinstickstoffe, orange: Sauerstoff. Häemocyanine werden nach der EPR-Konvention zu den Typ 3 Kupfer-Proteinen gerechnet: Ein Sauerstoffmolekül ist in seitlicher Konfiguration zwischen zwei Kupferionen 'gebunden'. Hier zu sehen ist die Röntgenstruktur der Oxyform von *Limulus polyphemus* Häemocyanin (Magnus et al., 1994). Mit 4,6 Å ist Cu-Cu-Distanz im LpHc unerwartet größer also im PiHc (3,4 Å). Das Kupfer A Zentrum liegt N-terminal.

Tabelle 2. Eigenschaften der Hämocyaneine im Vergleich.

Zum weiteren Vergleich sind auch die Eigenschaften des Hämoglobins (Hb) mit aufgeführt. Hc = Hämocyanin, # = Anzahl, AS = Aminosäure, UE = Untereinheit, BS = Bindungsstelle (für O₂). ⁽¹⁾ für EcHc genauer 2(2x6), die Symmetrie-Quartärstruktur ist hier das Dodekamer. ⁽²⁾ bei angenommener (idealisierter) Homogenität der Untereinheiten. TtHc *Tachypleus tridentatus*, PiHc *Panulirus interruptus*, LpHc *Limulus polyphemus*. ⁽³⁾ Diplomarbeit Leidescher, T. 1983. ⁽⁴⁾ Supersekundärstrukturen. ⁽⁵⁾ Kurzform für 1(177)177, 178(225)402, 403(264)657. ⁽⁶⁾ (Johansen and Petersen, 1975)

	Arthropoden-Hc	Mollusken-Hc	Hämoglobin
Grobform	Hexagon, Quader, Platte, unregelmäßig	Hohlzylinder (helikale Textur)	Tetraeder (Kugel)
Durchmesser ca.	12 (1x6 <i>Palinurus</i>) bis 25 nm (8x6 <i>Limulus</i>)	35 nm (Didekamer)	5,5 nm
Höhe ca.	10 (1x6 <i>Palinurus</i>) bis 25 nm (8x6 <i>Limulus</i>)	36 nm (Didekamer)	5,5 nm
Vorkommen	Limulus (Xiphosuren) Skorpione, Spinnen, dekapode Krebse, immer extrazellulär	Prosobranchier Helix (Pulmonaten), Cephalopoden, immer extrazellulär	Bei Vertebraten in Erythrocyten bis 108, einige Invertebraten: Nemetinen; Cucumaria (Echinodermen)
Metallion deoxy (Typ)	Cu ⁺ Cu ⁺ (Typ3)	Cu ⁺ Cu ⁺ (Typ3)	Fe ²⁺
Metallion oxy (Typ)	Cu ²⁺ Cu ²⁺ (Typ3)	Cu ²⁺ Cu ²⁺ (Typ3)	Fe ²⁺
Fixierung des Metalls (M)	6 Histidine	6 Histidine	Porphyrinring (Häm)
Koordination des M (deoxy)	tria	tria	penta
Koordination des M (oxy)	penta	penta	hexa
Farbe Oxy/deoxy	blau/farblos	blau/farblos	hellrot/dunkelrot
Hill-Koeffizient	ca. 3 (Pe-, LpHc) – 7 (EcHc)	ca. 3	
P ₅₀	ca. 5 – 40 mmHg		ca. 24 – 28 mmHg
Molekülmasse /UE	75.000 Da	400.000 Da	16.000 Da
Molekülmasse / Domäne	19.930 / 25.340 / 29.730 Da	50.000 Da	
# AS/UE	622 (TtHc) - 657 (PiHc)	ca. 3.500	ca. 150
# Domänen/UE	3	7 / 8	1
# AS/Domäne	PiHc: 177, (225)402, (264)657 LpHc: 152, (230)382, (246)628 ⁵	ca. 440	
# Atome/UE	ca. 10.000	ca. 52.500	ca. 2.250
# Helices/UE	20 (helical bundle ⁴)		
# Sheets/UE	18 beta (7 (beta-barrel ⁴))		
# BS/UE	1	7 / 8	1
# AS/BS	ca. 620 (Chelic.) - 660 (Crusta.)	ca. 440	ca. 150
# Atome/BS	ca. 10.000	ca. 6.560	ca. 2.250
# S-S-Brücken	2 (Chelic.) – 3 (Crusta.)		
# assoziierte UE	1x6,2x6,4x6 ¹ ,6x6,8x6	2(5x2), n(5x2)	4
# UE-Typen	1-8 (α-γ; a-h; I-VIII)	2	2 (α, β)
Minimale Quartärstruktur M(Minimale Quartärstruktur)	Hexamer ca. 450.000 Da	Dekamer ca. 4.000.000 Da	Tetramer ca. 64.000 Da
# AS(Min. Quartärstruktur)	ca. 3.900	ca. 35.000	ca. 600
Symmetrie ⁽²⁾	D3, D2, C2, C1	C5, D5	C4
Minimale funktionelle Einheit M(Min. funktionelle Einheit)	UE, heterogen Ca. 75.000 Da	Domäne, heterogen ca. 50.000 Da	UE, heterogen ca. 16.000 Da
Konzentration in Hämolymphe	ca. 20-100 mg/ml	ca. 5-20 mg/ml	Ca. 150 mg/ml
pH(-Bereich) der Hämolymphe	7,8 (<i>Euryp.</i>) ³ , 7,1-7,5 (<i>Limul.</i>) ⁶		

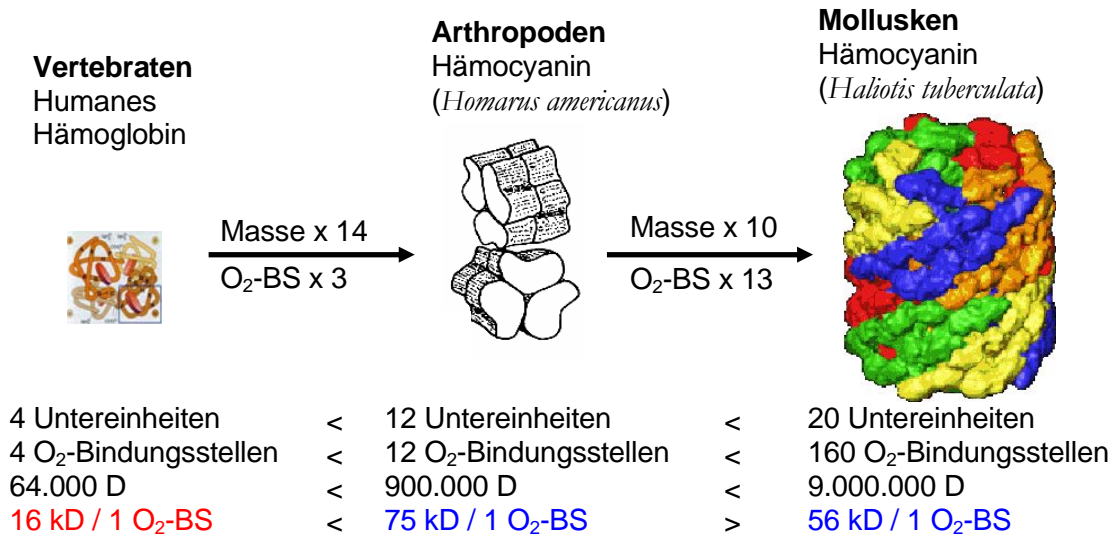


Abbildung 10. Leistungsvergleich verschiedener Atmungsproteine.

Eine nicht ganz die wahren Größenverhältnisse widerspiegelnde Darstellung des Vertebraten-Hämoglobins und der beiden Hämocyanin-Tierstamm-Formen. Das Hämocyanin der Thermoregulierer hat die höchste Effektivität. Unter den Mollusken gibt es hoch komplexe Formen mit äußerst leistungsfähigen Bewegungsapparat und Sinnesverarbeitung (*Octopus*, *Sepia*), was die rein O₂-bindungseffektive Überlegenheit von Molluskenhämocyanin gegenüber dem Arthropodenhämocyanin erklären könnte. O₂-BS = Bindungsstellen für Sauerstoffmoleküle. Die Pfeile dürfen nicht als Ableitung voneinander interpretiert werden, sie stellen nur einen Vergleich der angegebenen Eigenschaften dar.

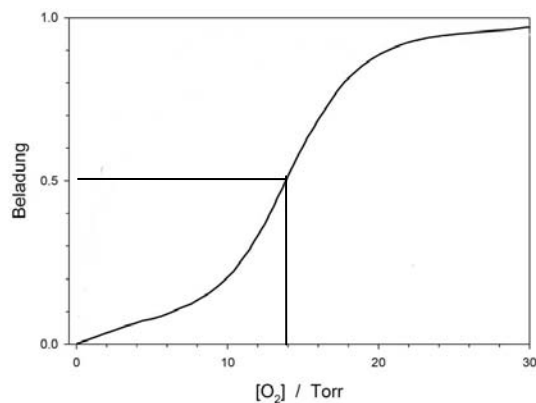


Abbildung 11. Sauerstoffbindungskurve eines Hämocyanin-Moleküls.

Die Sauerstoffbeladung (Erker, 2001) von höher aggregierten Hämocyaninen weist eine ausgeprägte sigmoidale Charakteristik auf. Hier stellt sich für den Stukturauflärer die Frage nach den diesem Phänomen zugrunde liegende Strukturänderungen während der Oxygenierung.

Für Arthropoden- und Molluskenhämocyanine wird aufgrund des konservierten Sauerstoffbindungszentrums eine konvergente Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorgänger diskutiert, was von jüngsten Sequenzvergleichen zwischen Mollusken- und Arthropodenhämocyaninen unterstützt wird (Burmester, 2001; Decker and Terwilliger, 2000; Markl, 1986a; Markl and Decker, 1992; van Holde et al., 2001).

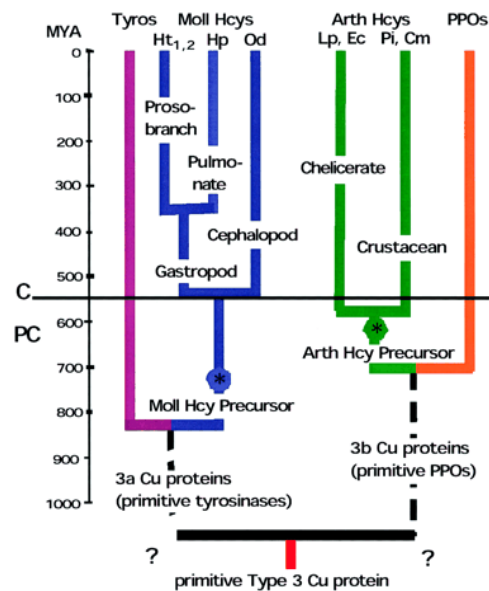


Abbildung 12. Spekulationes Evolutionsschema für Typ 3 Kupferproteine

Aus (van Holde et al., 2001). Die Sterne markieren die angenommenen Ursprünge der beiden Hämocyanintypen. Die horizontale Linie markiert die Cambrium/Präkambrium-Grenze. Tyros, Tyrosinasen; PPO, Prophenoloxidase; Ht, *Haliotis tuberculata*; Hp, *Helix pomatia*; Od, *Octopus dofleini*; Lp, *Limulus polyphemus*; Ec, *Eurytelma californicum*; Pi, *Panulirus interruptus*; Cm, *Cancer magister*.

Trotz der oben erwähnten Unterschiede in der Struktur sind beide Hämocyanin-Familien wahrscheinlich unabhängig voneinander aus sauerstoffreduzierenden Enzymen evolviert (Decker and Terwilliger, 2000; Markl, 1986a; van Holde et al., 2001). Dies sind sehr alte Enzyme, welche wahrscheinlich, bei der im Proterozoikum einsetzenden photosynthetischen Energiegewinnung und einhergehender Anreicherung des Luftsauerstoffs, zum Zellschutz dienten (Jaenicke and Decker, 2004). Die sich entwickelnden Aerobier konnten zwar nun viel Energie gewinnen, mussten aber einen Weg finden, den toxischen Gefahren der sich bildenden hoch reaktiven Nebenproduktderivate Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxylradikale zu entgehen (Abbildung 12). Diese Enzyme, zu denen die Tyrosinase/Phenoloxidase (Catecholoxidase), Superoxiddismutase, Katalase, Peroxidase (POD), Monooxygenase (MPO) und die Dioxygenase zählen, lassen diese Stoffe meist in zwei Schritten mit Sauerstoff reagieren und bilden harmlose Endprodukte, darunter meist Wasser. Für diese Hypothese sprechen auch die physikochemischen Eigenschaften: So zählen diese Enzyme mit den Hämocyaninen zu den Typ-3 Sauerstoffbindenden-Kupfer-Proteinen (COP; Cooper Oxygen binding Protein). Außerdem weisen Hämocyaninen bei partieller Entfaltung (Zugang für größere Phenolmolekülen) Phenoloxidaseaktivität (Decker and Terwilliger, 2000) auf.

6.3. Arthropodenhämocyanine

Arthropoden stellen, gefolgt von den Mollusken, den artenreichsten Tierstamm dar. Viele seiner Vertreter erhöhen die Sauerstofftransportkapazität ihres Blutes durch den Besitz von Hämocyanin. Die transportsystemvermittelte Versorgung der Mitochondrien mit Sauerstoff ist, weil von ihr die effektive Energiegewinnung aus den Nährstoffen abhängt, für große aktive Tiere die vitalste Wechselwirkung mit der Umwelt. Weil die gesamte oxidative Energieversorgung durch die Atmungskette letztendlich von dieser Schnittstelle abhängt, ist eine genaue Kenntnis der vermittelnden Moleküle von grundlegendem Interesse für das Verständnis der Physiologie der Arthropoden. Daher werden Atmungsmoleküle vielfach biochemisch,

molekularbiologisch und strukturell untersucht; z. B. liegen die Primär-Sequenzen für alle sieben Untereinheitstypen von *Eurytelma*-Hämocyanin mittlerweile vollständig vor (Schartau et al., 1983; Voit and Schneider, 1986; Schartau et al., 1990; Voit and Feldmaier-Fuchs, 1990; Voit et al., 2000).

Man versucht, das Wissen von der biologischen Funktion der Proteine zu präzisieren, um Interaktion zwischen Proteinen, Wirkvorgänge (Katalyse, Sauerstofftransport) und kooperative Charakteristika und deren Dynamiken besser zu verstehen. Arthropodenhämocyanine stellen Paradebeispiele für besonders große lösliche Proteinkomplexe und für kooperative Proteine mit hohen Hillkoeffizienten bis zu 9 dar. Dabei ist Cheliceratenhämocyanin komplexer gebaut als Crustaceenhämocyanin (Trennung von Cheliceratenhämocyanin und Crustaceenhämocyanin ca. 600 mya (Burmester, 2001)), und abgesehen von den Xiphosuren (*Limulus polyphemus*) sind Vogelspinnen mit die größten Cheliceraten und damit als Blutspender besonders gut geeignet.

Arthropodenhämocyanine sind mit ihrer großen Anzahl an Bindungseinheiten ausgezeichnete Studienobjekte für interaktives Substratbindungsverhalten ohne Substratumsatz mit theoretischen Hillkoeffizienten im zweistelligen Bereich. Da aber nur Hillkoeffizienten bis zu 9 realisiert sind, stellt sich die Frage nach der Größe der involvierten Bereiche der komplexen, spezieabhängig sehr variantenreichen, Quartärstrukturen, ob dies durch zusätzliche allosterische Effektoren manipuliert wird und welche Rolle die auffällige, für Hämocyanine spezifische, Heterogenität der funktionellen Einheit spielt. In Bezug auf die Arthropodenhämocyanine liegt die Kommunikation zwischen den Hexameren noch im Dunkeln. Da sich diese aus der Raumstruktur der Proteine ableiten, sind hier die strukturaufklärenden Verfahren gefragt. Die Cryo-EM-Rekonstruktion kann hier in Zukunft durch ihre Flexibilität und ihre native Präparation gegenüber der Röntgenkristallographie wichtige Informationen liefern.

Die Konzentration an Hämocyanin im Blut von Arthropoden schwankt aufgrund physiologischer Änderungen wie Ernährung, Häutung oder osmotischem Stress zwischen 20 und 100 mg/ml (Depledge and Bjerregaard, 1989; Hagerman, 1983) sogar zwischen Individuen derselben Spezies (Senozan and Briggs, 1989) und wird bei *Eurytelma* nicht streng kontrolliert. Im Rahmen der Hämatopoese durch Biosynthese von EcHc wird dieses an freien Ribosomen in Bildungszellen der Herzwand, so genannte Cyanocyten oder Hemocyten (Fahrenbach, 1970; Markl et al., 1990) und deren Ruptur (keine Signalsequenz bei Cheliceraten) wieder aufgefüllt (Kempter, 1983).

Durch das Vorkommen in gelöster Form war es möglich, Hämocyanine schon früh zu isolieren. Über seine Struktur, Funktion und Evolution gibt es zahlreiche Publikationen (Burmester, 2002; Decker and Sterner, 1990; Decker and Terwilliger, 2000; Markl, 1986a; Markl and Decker, 1992; van Holde and Miller, 1995; van Holde et al., 2001) und es liegen über 100 komplette cDNA-Sequenzen von Polypeptiden der Arthropoden vor (Burmester, 2001). Durch ihre Größe von bis zu 25 nm und molekularer Masse von bis zu 3.6 MDa bei Arthropoden (Tabelle 2) sind sie als präparative kontrastierte Proben relativ leicht im Transmissionselektronenmikroskop abzubilden. Andererseits gelang bisher eine Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie nur beim Hexamer (1x6, 450 kDa) (Gaykema et al., 1984). Der Zugang zu Quartärstrukturen komplexerer Aggregate (2x6, 4x6, 6x6, 8x6, Abbildung 13) ist aufgrund ihrer Größe dieser

Methode bislang verschlossen geblieben, was die Analyse dieser Strukturen mittels EM-Rekonstruktion prädestiniert. Die Anordnung der Hexamere in oligohexameren Hämocyaninen ist näherungsweise durch Computeranalyse elektronenmikroskopischer Bilder bestimmt worden (Bijlholt et al., 1982; van Heel and Frank, 1981).

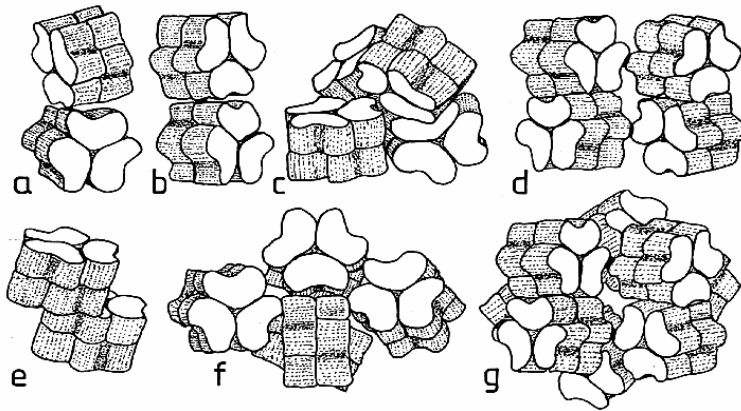


Abbildung 13. Quartärstrukturen der Arthropodenhämocyanine.

Alle Quartärstrukturen der Arthropodenhämocyanine (Markl and Decker, 1992) beinhalten 1x6-Einheiten wie in Abbildung 15, wie sie viele Arthropoden exklusiv oder zusätzlich besitzen. a) 2x6 Hämocyanin vieler dekapoden Crustaceen (z.B. *Homarus americanus*) (Stöcker et al. 1988; De Haas et al. 1990), b) 2x6 Hämocyanin vieler Spinnen (z. B. *Cupiennius salei*) (Markl, 1980), c) 4x6-Hämocyanin einiger Garnelen (z.B. *Callinassa californiensis*) (van Bruggen, 1983; Cavellec et al. 1990), d) 4x6-Hämocyanin vieler Arachniden (z.B. *Eurypelma californicum*) (Lamy et al., 1981; Markl et al., 1981b; Bijlholt et al.; 1982), e) 2x6 Hämocyanin des Fangschreckenkrebses *Squilla mantis* (Bijlholt and van Bruggen; 1986), f) 6x6 Hämocyanin der Myriapoden (z.B. *Scutigera coleoptrata*) (Mangum et al.; 1985), g) 8x6 Hämocyanin von *Limulus polyphemus* (Lamy et al.; 1982, 1986; Bijlholt, 1986).

Die minimale Quartärstruktur der Arthropodenhämocyanine ist ein Hexamer (1x6), dessen nierenförmig gefalteten Untereinheiten mit je 75 kDa etwa so groß sind wie ein ganzes Hämoglobinmolekül (64 kDa; Tabelle 2). Ein Hexamer ist ein D₃-symmetrisches trigonales Antiprisma, das sich aus zwei aufeinander gelegten Trimeren (Abbildung 15) aufbaut, die in Bezug zu ihrer Dreifachsymmetrie um 60° gegeneinander verdreht sind. Dieses „Modell-Hexamere“ wurde an dem originär hexameren Hämocyaninen der amerikanischen Languste *Panulirus interruptus* (Gaykema et al., 1984; Volbeda and Hol, 1989) (Abbildung 16 a) in der deoxygenierten Form, röntgenkristallographisch mit 0,32 nm aufgelöst. Mit der sub-10-Å-3D-Rekonstruktion der europäischen Languste *Palinurus elephas* (Meissner et al., 2003) (Abbildung 16 b) wird diese Struktur durch eine zweite unabhängige Methode unterstützt.

Die Intrahexamere-Kontakte, also die Bindungen, welche die Untereinheiten (Abbildung 15, Abbildung 16) eines Hexamers zusammenhalten, sind zwischen den nebeneinander stehenden Untereinheiten eines Trimers weniger stark als zwischen den übereinander stehenden Untereinheiten der beiden Trimere. Ein Hexamer ist eher ein „Trimer von Dimeren“ als ein „Dimer von Trimeren“ (Linzen et al., 1985). Der Kontakt zwischen den Dimeren wird wahrscheinlich durch viele hydrophobe Wechselwirkungen erzeugt. Für die Kontakte zwischen den Untereinheiten der Trimere wurden nur je zwei Regionen gefunden (Volbeda et al., 1989)(Abbildung 15 d, e).

Assoziation zweier verschiedener Hexamere führt, im Falle von EcHc, zum Dodekamer (2x6) mit einer idealisierten 2-fach-Rotationssymmetrieachse, der gemeinsamen Symmetriestruktur der 2ⁿx6-Aggregationen der Cheliceraten, mit n = 1, 2, 3 (Abbildung 14). Bei EcHc unterscheiden

sich die beiden Hexamere in einer Untereinheit (Abbildung 18). Zwei identische, antiparallel angeordnete Kopien des Dodekamers bilden das 4x6-mere EcHc. Beim größten Vertreter der Familie der Arthropodenhämocyanine, dem 8x6-Hämocyanin von *Limulus polyphemus*, sind es zwei identische 4x6-mere, welche dessen, in der Größenordnung von Ribosomen liegende, Quartärstruktur aufbauen.

Aus der speziellen (nicht planaren) Anordnung der Hexamere ergeben sich quartärstrukturspezifische Geometrien für die Arthropodenhämocyanine, z. B. eine Zweiseitigkeit (Flip-Flop) und ein Winkel zwischen den Dodekamern, der in einem charakteristischen (theoretischen) Kippverhalten des Moleküls auf einer gedachten Ebene führt ("Rocking"; Abbildung 19).

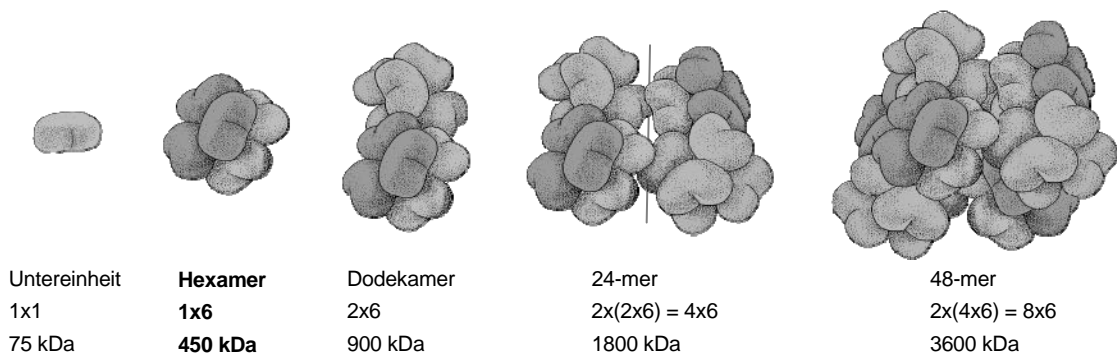


Abbildung 14. Prinzipieller Aufbau der Cheliceratenhämocyanine.

Cheliceratenhämocyanine bauen sich hierarchisch aus 2^n (mit $n = 0, 1, 2, 3$) Hexameren auf. Die minimale Aufbauform der Arthropodenhämocyanine, das Hexamer, ist fett gekennzeichnet. Die natürliche Assemblierung findet nur bei Untereinheitenheterogenität statt (siehe auch Abbildung 17 und Abbildung 18).

Die Hexamere sind aus unterschiedlichen Untereinheiten-Typen zusammengesetzt wie auch die Hexamer-Aggregationsformen aus verschiedenen Hexamer-Typen bestehen. Die nativen Hexamer-Aggregationslevel sind für Taxa charakteristisch (Ghiretti, 1968; Huber and Lerch, 1986; van Holde and Miller, 1982). So findet man im Unterstamm der Crustacea meist 1x6 und 2x6 und bei den Chelicerata überwiegend Aggregate größer oder gleich 2x6 (Markl, 1986a; Markl and Decker, 1992). Die komplexe, hierarchische Assemblierung der Arthropodenhämocyanine hängt von der Heterogenität der aufbauenden Untereinheiten ab (Abbildung 1, Abbildung 17), daher von der Präsenz eines speziesspezifischen Satzes unterschiedlicher Untereinheitstypen (Markl and Decker, 1992; Savel-Niemann et al., 1988), siehe 6.3 Seite 14.

Die unterschiedlichen Primärstrukturen innerhalb einzelner Arthropodenhämocyanine werden vermutlich von verschiedenen Genen exprimiert (Jolles et al., 1979; Linzen et al., 1985; Soeter et al., 1987; Voll and Voit, 1990). Man hat bis zu 17 elektrophoretisch trennbare Untereinheiten gefunden (Busselen, 1970; Lamy et al., 1970). Bei den Cheliceraten wurde nachgewiesen, dass sieben bis acht (für EcHc a-h) verschiedene Untereinheiten (Abbildung 1, Abbildung 17, Abbildung 18 a) benötigt werden, um deren Aggregationsformen mit vier und acht Hexameren aufzubauen (Markl et al., 1984). Es lassen sich aus manchen dieser Untereinheiten Homo-Hexamere formen, die aber keine stabilen Oligo-Hexamere aufbauen können. Für die dekapoden Krebse (zu denen auch *Palinurus elephas* gehört) wurden bis zu acht unterschiedliche Hämocyanin-Untereinheiten identifiziert (Johnson et al., 1987; Makino, 1988; Makino and Kimura, 1988; Murray and Jeffrey, 1974) und von Markl und Mitarbeitern in drei Klassen

(α , β , γ) eingeteilt (Markl et al., 1981b; Markl et al., 1981c; Markl et al., 1981d; Stöcker et al., 1988). Die Heterogenität der Untereinheiten ist eine wichtige Eigenschaft, die bei 3D-Rekonstruktionen von Oligo-Hexameren berücksichtigt werden sollte, da sie eine Voraussetzung für deren Stabilität ist und somit mittelbar ein Strukturmerkmal darstellt. Markl (Markl, 1986b; Markl and Decker, 1992) sieht in ihr auch die Quelle für die funktionelle Flexibilität der Hämocyanine.

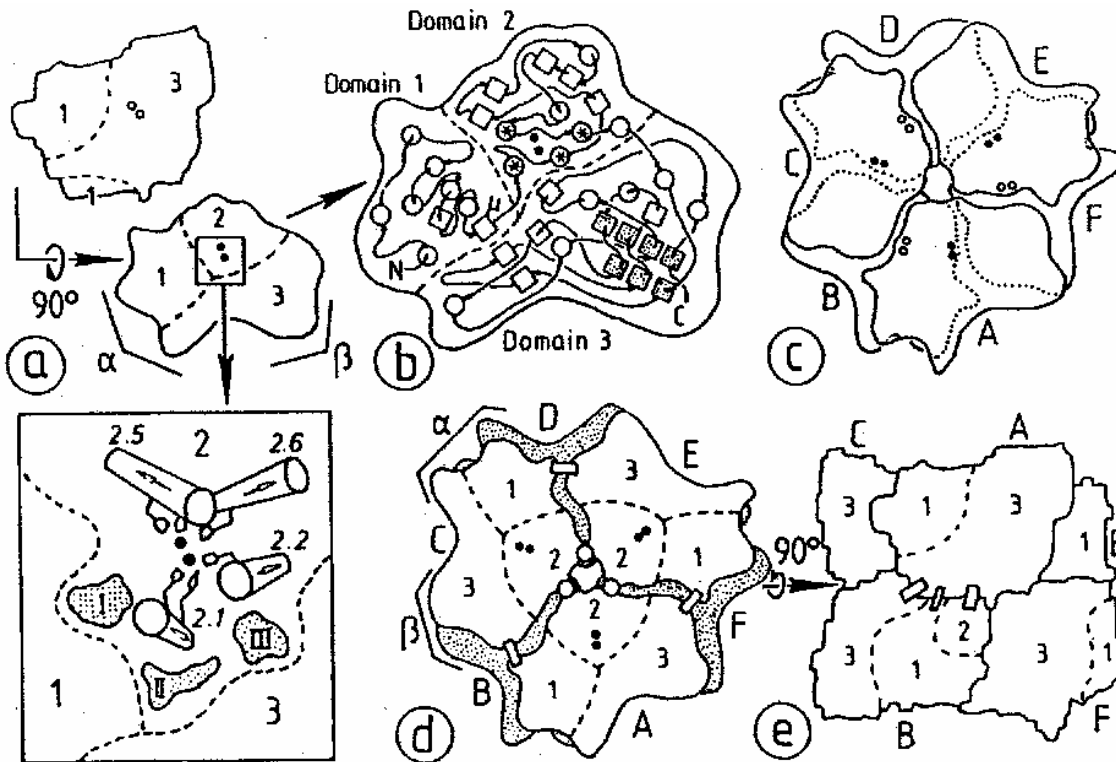
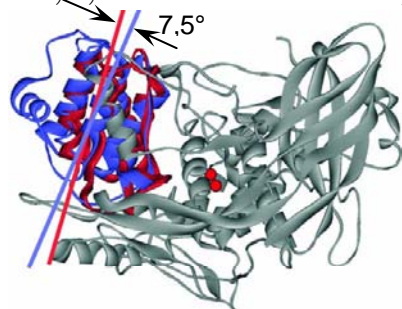


Abbildung 15. Lokalisationen im Hämocyanin-Hexamer.

Schematische Darstellung des Arthropoden-Hexamers, nach Markl und Decker (Markl and Decker, 1992), abgeleitet aus (Gaykema et al., 1984; Gaykema, 1995). a) eine Untereinheit, links oben (wie e)) orthogonal zur Hexamer-Hauptsymmetrieachse. Alle anderen entlang der Hexamer-Hauptsymmetrieachse gesehen. b) Untereinheit mit dem Verlauf des Proteinrückgrats, schematischen Sekundärstrukturen und Domänen (gestrichelt). c) Untereinheiten im Hexamer. d) Domänen im Hexamer und Kupfer-Ionen (gefüllte Kreise). A-F: Die sechs Untereinheiten; 1-3: Die drei Domänen jeder Untereinheit; α : vorwiegend α -Helices, β : vorwiegend β -Faltblatt. e) und d) Blick auf die 3fach Rotationssymmetrieachse. d) und e) mit Bindungen zwischen den Untereinheiten (Rechtecke und Kreise). Legendenbild rechts: Untereinheit II von LpHc: Domäne 1 rot, 2 grün (Kupfer-Ionen blau), 3 blau. Domäne 1 ist hier im Vergleich zur PiHc-Untereinheit um $7,5^\circ$ gekippt relativ zu den beiden anderen Domänen (Hazes et al., 1993), siehe Legendenbild rechts.



Die Aminosäureketten falten sich mit ihren 622 - 657 Resten in 3 Strukturdomänen unterschiedlicher Funktionen in die Form einer Niere. Drei dieser Untereinheiten fügen sich mit der konvexen Fläche der Domäne 2 so zusammen, dass diese ein gemeinsames Zentrum bilden. Eine Untereinheit der Arthropodenhämocyanine bindet ein Sauerstoffmolekül im Inneren der zum Zentrum des Hexamers lokalisierten Domäne 2 (Abbildung 15). Die Domäne 2 übernimmt Speichenfunktion, während die Domänen 1 und 3 die Peripherie bilden. Die sechs Untereinheiten zusammen bieten bei Aufsicht die Form eines Hexagons von ca. 12 nm Durchmesser. Das Hexamer von der Seite betrachtet zeigt sich als Rechteck von ca. 10 nm Höhe. Die zwei Kupferionen der aktiven Zentren sind in der Domäne 2 lokalisiert. Diese werden von sechs Histidinresten ligandiert, die aus vier verschiedenen

Helices stammen. Zwischen den beiden Kupferionen wird bei Oxygenierung ein O_2 -Molekül gebunden. Die das konservierte aktive Zentrum tragende Domäne 2 stellt mit 225-230 Aminosäuren ca. ein Drittel der gesamten Polypeptidkette (Tabelle 1, Tabelle 3, Abbildung 7 bis Abbildung 9). Domäne 1 mit 152 - 177 Aminosäuren könnte für die kooperative Sauerstoffbindungseigenschaft wichtig sein. Sie beeinflusst bei Oxygenierung durch die Verschiebung eines konservierten Phenylalanins an Position 49 bzw. 75 (Cheliceraten bzw. Crustaceen, Tabelle 3) die Zugänglichkeit der Bindungsstelle für das Substrat. Domäne 1 erfährt dabei eine Rotation um $7,5^\circ$ relativ zu Domäne 2 und 3 (Gaykema et al., 1984; Hazes et al., 1993; Jaenicke and Decker, 2004; Volbeda et al., 1989). Domäne 3 mit 246 - 255 Aminosäuren trägt vermutlich zur Stabilität der Tertiärstruktur bei. Sie greift mit zwei antiparallelen β -Faltblattstrukturen weit um Domäne 1 herum und wird über meist zwei, in der Domäne 3 lokalisierten, konservierte Disulfidbrücken gefestigt (Tabelle 3). Umfangreiche Sequenzvergleiche der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Drei-Domänen-Struktur der Untereinheit für alle Arthropodenhämocyanine gilt (Burmester and Scheller, 1996). Die gegen Denaturierung robuste Konformation der nativen Aggregate zeigt an, dass die Quartärstruktur sowohl von hydrophoben als auch polaren Kräften stabilisiert wird (Dolashka-Angelova et al., 2005).

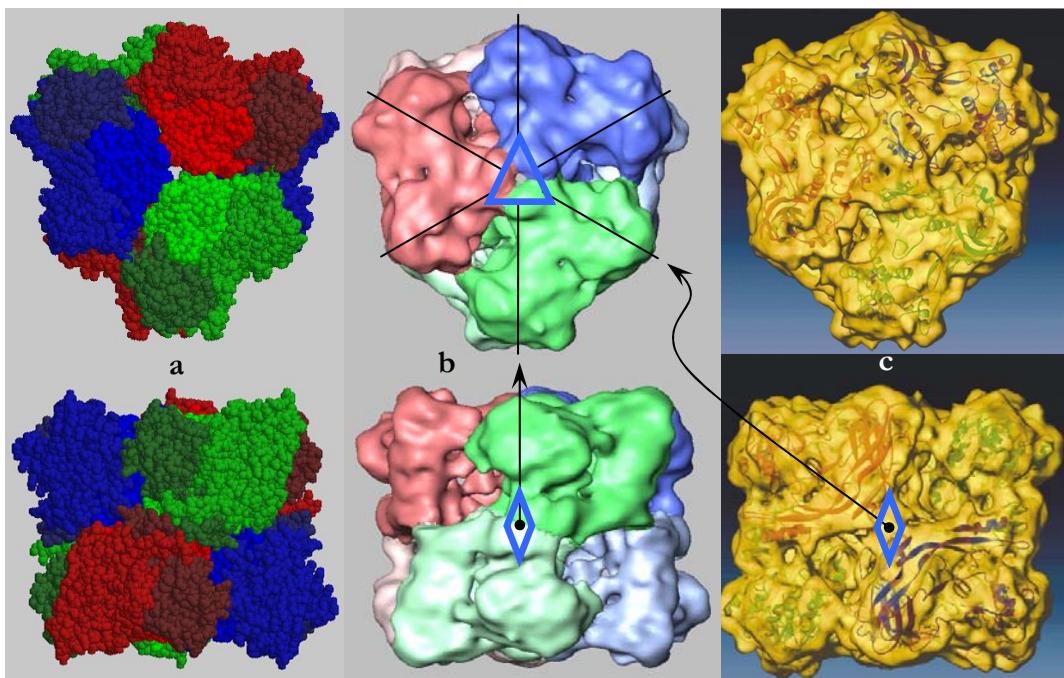


Abbildung 16. Röntgenstruktur und 3D-Rekonstruktion der Langusten-Hc.



Originär hexamere (1x6) Hämocyanine zweier Langusten (dekapode Crustaceen) nach zwei unterschiedlichen Methoden strukturaufgelöst: a) Röntgenkristallographische Struktur des 1x6-Hämocyanins von *Panulirus interruptus* nach Gaykema (Gaykema et al., 1984) (Darstellung mit Atomradien). b) 3D-Rekonstruktion von *Palinurus elephas* (Legendenbild) (Meissner et al., 2003). c) Vergleich von a) mit b) durch Einpassen (Meissner et al., 2003). Röntgenkristallographische Struktur als abstrakte Ribbon-Darstellung. Oben: Aufsicht, Blick auf ein Trimer und die dreifache Rotationssymmetrieachse. Unten: Seitenansichten, bei a) und b) mit Blick auf ein Dimer und die zweifache Rotationssymmetrieachse. Sie weisen quasi ideale D_3 -Symmetrie auf. Die Farbgebung dient der besseren Unterscheidung, es besteht kein Zusammenhang mit den Untereinheitstypen. Hexamere Arthropodenhämocyanine weisen bei angenommener Homogenität der Untereinheiten eine 3_2 -Symmetrie auf: In der Aufsicht in b) oben weist die dreifache Δ Rotationssymmetrieachse (R3SA) durch das Zentrum des Moleküls in Blickrichtung und bildet mittig den Schnittpunkt für die drei senkrecht auf ihr und im 120° Winkel zueinander stehenden zweifachen \diamond Rotationssymmetrieachsen (R2SA); zwei der sechs möglichen Sichten entlang der R2SA in den Seitenansichten in b) und c) unten dargestellt.

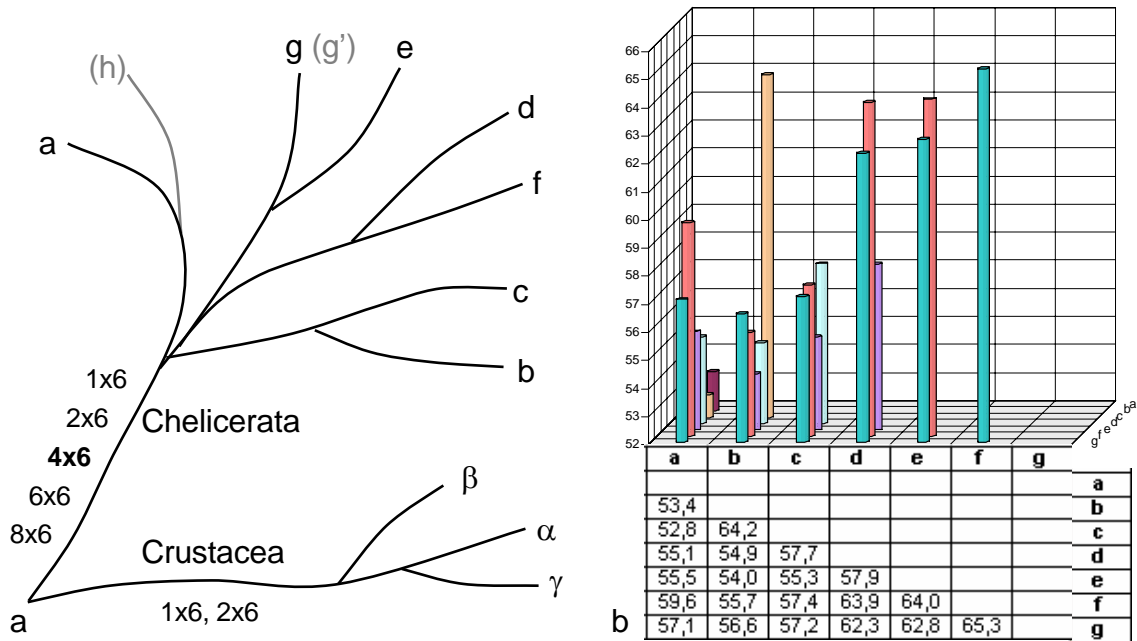


Abbildung 17. Untereinheitstypen.

a) Phylogenetische Ableitung aus (Markl, 1986a; Markl, 1986b), verändert. *Eurypelma californicum* besitzt 7 Untereinheitstypen (a-g). Ein achter Untereinheitstyp kommt bei *Androctonus australis* (AaHc) (h; EcHc + h ≈ AaHc) und bei *Limulus polyphemus* (g'; EcHc + g' ≈ LpHc) vor, deren Zusammensetzung an Untereinheiten bis auf diese achte der von EcHc gleicht (Markl, 1986a). Jeweils d/f, e/g, b/c und a/h sind phylogenetisch nahe stehend. b) Paarweise Sequenz-Identität (%) von EcHc-Untereinheiten (Voit et al., 2000). Legendentabelle zu (a) rechts: Linker Teil: Vergleich der korrespondierenden Untereinheitstypen von EcHc (Markl et al., 1981c) und den Vergleichsmolekülen AaHc (Boisset et al., 1990; Lamy et al., 1980a; Lamy et al., 1980b) und LpHc (Lamy et al., 1979; Lamy et al., 1982) und die phylogenetische Ableitung in der Arthropodenfamilie nach (Lamy et al., 1983; Markl, 1986a). Rechter Teil: Verwandtschaftliche Verbindung der Untereinheitstypen; eine Aussage zu einer übergeordneten Relation (wie z. B. (e zu g) zu (d zu f)) wird in der Literatur nicht gemacht. A-Hc = Arthropodenhämocyanin, UET = Untereinheitstyp(en).

AaHc-4x6 Lamy	AaHc-4x6 EcHc-Äquival.	EcHc-4x6 Markl	LpHc-8x6 EcHc-Äquival.	LpHc-8x6 Lamy	phylogen. A-Hc-UET Relation
3A	a / h	a	a	II	4x6, 8x6
3C, 5B	b, c	b, c	b, c	V, VI	a zu h
5A	d	d	d	IV	b zu c
6	e	e	e	I	d zu f
2	f	f	f	IIIb	e zu g
4	g	g	g, g'	IIa, IIIa	

Viele Arthropodenhämocyanine zeigen eine von geringer O₂-Affinität, hoher Kooperativität und Bohreffekt geprägte Charakteristik der Sauerstoffbindung, welche so bei den isolierten Untereinheiten nicht zu finden ist (Lamy et al., 1980a; Sullivan et al., 1974). Untereinheiten von *Eurypelma*-Hämocyanin sind nicht kooperativ, weisen keinen Bohreffekt auf und binden O₂ mit hoher Affinität (Decker et al., 1979; Markl et al., 1981a). O₂-Affinität und Bohreffekt sind für (n≥1)x6 gleich, doch die Kooperativität wächst mit der Aggregationsgröße (Savel-Niemann et al., 1988). Homohexamere aus LpHc-II-Untereinheiten zeigen O₂-Bindungs- und regulatorische Eigenschaften des nativen Komplexes; Chlorid reduziert die O₂-Affinität, Protonen erhöhen diese (negativer Bohr-Effekt) und O₂ bindet kooperativ (Brenowitz et al., 1984). Markl sieht die emergenten Bindungseigenschaften von oligomeren Hämocyaninen in den Interaktionen der verschiedenen Untereinheiten durch Konformationsübergänge begründet (Markl and Decker, 1992).

Tabelle 3. Sequenzeigenschaften von Arthropodenhämocyanin-Untereinheiten.

Vergleich der wichtigsten abgeleiteten Primär- und Sekundärstruktureigenschaften der Untereinheitstypen von EcHc mit den gefundenen Eigenschaften der **Röntgenkristallstrukturen** (**fett gedruckt**) von **LpHc-II** (Hazes et al., 1993; Hazes et al., 1996) und **PiHc-a** (Gaykema et al., 1984; Volbeda et al., 1989). Kristallwachstum von LpHc-II bei annähernd physiologischen pH von 7,1-7,5 (Johansen and Petersen, 1975), bei pH 6,5-7 und Auflösung von 2.18 Å. Kristallwachstum von PiHc-a bei pH 3,8 und Auflösung von 3,2 Å. Die Sekundäreigenschaften der sieben EcHc-Primärstrukturen (Seq, Sequenzen) sind aus den Röntgenkristallstrukturdaten (X-ray) von LpHc abgeleitet (Voit et al., 2000) (rein auf Ähnlichkeitsvergleich basierende Zahlen sind grau dargestellt). CuA, CuB = Ligandentriplets; Do = Domäne; Phe = konserviertes Phenylalanin 49 (Hazes et al., 1993; Jaenicke and Decker, 2004); a2.n = α -Helix 2.n; Cn = Cystein n (Disulfidbrücke zwischen Cn und Cn+1). Das Phenylalanin 49 von LpHc-II bzw. dessen Abstand zu den angegebenen Histidinen ist auch in EcHc und AaHc konserviert. Für die Positionen und Abstände der His siehe Tabelle 1. ExPASy Sequenzdatenbank Zugangsnummern. Zugangs-codes zur **Protein-Datenbank (PDB)** für **LpHc-II** ist **1LLA** und für **PiHc-a** ist **1HCY** (siehe B.1.1.3 Programme und Datenbanken Seite 27). # = Anzahl, AS = Aminosäure, UE(I) = Untereinheit(styp), Do = Domäne, His = Histidin, kDa = kiloDalton, Phe = Phenylalanin, C = Cystein, a2.1 = Helix 2.1, ExPASy = Expert Protein Analysis System des Swiss Institute of Bioinformatics.

Hc	EcHc	EcHc	EcHc	EcHc	EcHc	EcHc	EcHc	LpHc	AaHc	PiHc	PiHc	PiHc	PeHc
UET	a	b	c	d	e	f	g	II	aa6	a	b	c	4
Struktur	Seq	Seq	Seq	Seq	Seq	Seq	Seq	X-ray	Seq	X-ray	Seq	Seq	Seq
ExPASy	P14750	Q9NFH9	Q9NFL6	P02241	P02242	Q9NFL5	Q9NFL4	P04253	P80476	P04254	P10787	P80096	Q8IFT5
Referenz	Voit 1990	Voit 2000	Voit 2000	Schartau 1983	Schnei der 1983	Voit 2000	Voit 2000	Hazes 1993/6	Buzy 1995	Gaykema 1984	Jekel 1988	Neutebo om 1992	Kusche 2002
#AS(UE)	631	627	629	627	624	629	629	628	626	657	657	661	656
m[kDa]	72,19	71,97	72,44	71,99	71,54	72,02	71,86	72,63	71,79	75,70	75,39	75,87	75,80
#AS(Do1)	156	154	156	152	150	153	152	152	-	177	-	-	-
AS1(Do2)	157	155	157	153	151	154	153	153	-	178	-	-	-
#AS(Do2)	227	227	227	227	227	228	227	230	-	225	-	-	-
AS1(Do3)	384	382	384	380	378	382	380	383	-	403	-	-	-
#AS(Do3)	248	246	246	248	247	248	250	246	-	255	-	-	-
Phe	48	48	49	46	45	46	47	49	48	75	75	78	75
#AS(a2.1)	13	13	13	13	13	13	13	13	-	13	-	-	-
His1	175	173	175	171	169	172	171	173	170	194	194	200	194
His2	179	177	179	175	173	176	175	177	174	198	198	204	198
#AS(a2.2)	22	22	22	22	22	22	22	22	-	19	-	-	-
His3	206	204	206	202	200	203	202	204	201	224	224	230	224
#AS(a2.5)	10	10	10	10	10	10	10	10	-	10	-	-	-
His4	326	324	326	322	320	324	322	324	321	344	344	350	344
His5	330	328	330	326	324	328	326	328	325	348	348	354	348
#AS(a2.6)	18	18	18	18	18	18	18	18	-	17	-	-	-
His6	366	364	366	362	360	364	362	364	361	384	384	390	384
C1	536	532	535	529	527	532	532	534	531	483	483	3	482
C2	579	575	578	572	570	575	575	576	574	502	502	557	501
C3	538	534	537	531	529	534	534	536	533	562	562	-	561
C4	586	582	585	579	577	582	582	583	581	609	609	-	608
C5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93	93	-	93
C6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98	98	-	98

CuA
CuB

6.4. Hämocyanin von *Eurypelma californicum* (EcHc)

Das Hämocyanin der Vogelspinnen bildet Quartärstrukturen aus 4 Hexameren (4x6) aus. Das in dieser Arbeit untersuchte EcHc besteht aus den 7 verschiedenen Untereinheitstypen a-g in den Proportionen 4 : 2 : 2 : 4 : 4 : 4 : 4 - Abbildung 17 zeigt die Untereinheitstypen von EcHc in ihrer phylogenetischen Ableitung, Abbildung 18 a zeigt diese in der topographischen Anordnung.

Markl und Mitarbeiter (Markl et al., 1981c) erstellten 1981 ein Quartärstrukturmodell von EcHc (Abbildung 18 b), welches von Voit und Mitarbeitern (Voit et al., 2000) mit modellierten Sequenzdaten verfeinert wurde. Sie konnten die Primärsequenzen von EcHc für die bis dahin noch lückenhaften Untereinheiten b, c, f, g (a, d, e: (Schartau et al., 1983; Schartau et al., 1990; Schneider et al., 1983; Voit and Feldmaier-Fuchs, 1990; Voit and Schneider, 1986)) ergänzen. Mit diesen wurde ein Homologie-Modelle der Untereinheiten auf der Basis der von Hazes und Magnus gefundenen Röntgenstruktur der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* (Hazes et al., 1993), welche als Vorlage diente, konstruiert. Abgeleitet aus elektronenmikroskopischen Bildern

und SAXS-Daten (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001), führten sie diese modellierten Untereinheiten probeweise zu einem Quartärstrukturmodell (Abbildung 18 b) zusammen, welches mit dem Modell von Markl (Markl et al., 1981c) übereinstimmt.

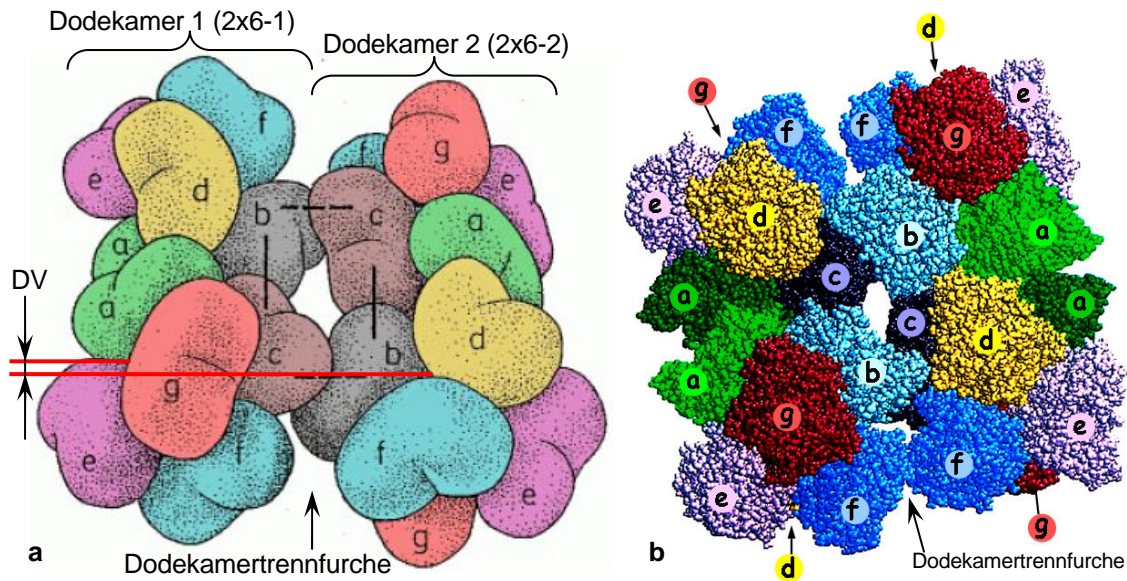


Abbildung 18. Untereinheitstypen-Topologie von 4x6-EcHc.

a) Anordnung der verschiedenen Untereinheitstypen im 4x6-Hämocyanin von *Eurypelma californicum* (Markl et al., 1981c), aus (Erker, 2001). Blick auf die gekippte Flop-Aufsicht (Erklärung siehe Abbildung 19, Abbildung 64 und Abbildung 65). Die beiden 2x6-mere sind entlang der Dodekamertrennfurche gegeneinander verschoben; DV = Dodekamerverschiebung. Für Untereinheitstypen-Zuordnung aus anderen Perspektiven siehe Abbildung 59 - Abbildung 61. b) An LpHc-Struktur modellierte Quartärstruktur aus EcHc-Sequenzen von Voit (Voit et al., 2000), ergänzt mit Bezeichnungen der Untereinheitstypen.

Die Selbstassemblierung von EcHc findet nur bei Präsenz aller sieben Untereinheitstypen statt (Markl and Decker, 1992; Savel-Niemann et al., 1988). Lösungen mit Teilmengen dieser Gesamtheit führen zu teilassemblierten Molekülen (Markl et al., 1982). Besondere Bedeutung kommt dabei dem stabilen Heterodimeren aus b- und c-Untereinheiten zu, welche als Brücken zwischen Hexameren fungieren. Das wird durch Dissoziationsversuche bestätigt, bei denen 19-mere (Abbildung 89 g) oder 7-mere (Abbildung 89 e) vorkommen (Markl et al., 1981b). Wie Beispiele dieser potentiellen Aggregationsstufen aussehen könnten (Tabelle 15), soll anhand der konstruierten Abbildung 89 veranschaulicht werden.

Alle einzelnen Untereinheiten von EcHc verhalten sich nicht kooperativ (Decker et al., 1979; Markl et al., 1981a) und zeigen nur geringen Halbsättigungswert (P_{50}) von ca. 5 mm Hg. Sie sind somit hoch sauerstoffaffin und reagieren nicht auf pH-Wert-Änderung (Markl, 1986a). Das hierarchisch aufgebaute 4x6-EcHc hingegen zeigt relativ dazu geringe Sauerstoffaffinität mit P_{50} -Wert von ca. 30 mm Hg (bei pH=7,5) und lässt mit Hill-Koeffizienten bis zu 8 (bei pH=8) ausgeprägte und zudem stark vom pH-Wert abhängige Kooperativität erkennen, welche auch von Calcium- und Magnesium-Ionen beeinflusst werden (Loewe, 1978). *Eurypelma californicum* profitiert also von den systemisch auftretenden Funktionen von EcHc, welche aus dem hierarchischen Zusammenschluss vieler (verschiedener) Untereinheiten herrühren.

Van Heel (van Heel and Dube, 1994) gibt für die Dodekamerverschiebung 1,7 nm an und beschreibt das 4x6 als nicht planar; es werden ihm zwei verschiedene Aufsichten zugeordnet

und mit Flip und Flop bezeichnet – bei Blick auf die Fliplage überragt das rechte Dodekamer das linke (siehe auch Abbildung 55). Jede der beiden Aufsichten kann zwei stabile Kipplagen einnehmen, welche als Flip1 und Flip2 bzw. Flop1 und Flop2 bezeichnet werden. Dieses Kippverhalten wird von van Heel als “Rocking” bezeichnet (Abbildung 19). Das auf einer Ebenen liegende Molekül wechselt dabei über eine diagonale Kipplinie in diese Lagen. Der von ihm angegebene “Rocking”-Winkel von insgesamt 12° gibt die relative Lage der beiden Dodekamerachsen zueinander an. Für detaillierte Beschreibung der Literatur-Parameter der EcHc-Quartärstruktur und deren Gegenüberstellung mit der EcHc-Rekonstruktion dieser Arbeit siehe Abbildung 59, Seite 74 im Ergebnisteil und Diskussionsteil ab Seite 89.

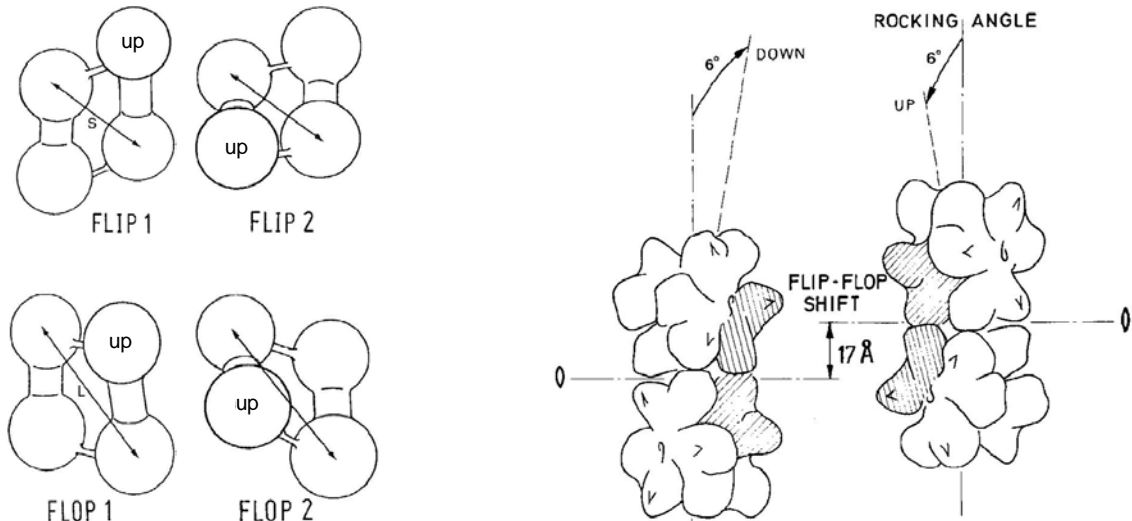


Abbildung 19. EcHc ist nicht planar. “Rocking”-Verhalten.

Abbildungen aus (van Heel and Dube, 1994). Sie beschreiben das EcHc-Molekül als nicht planar und definieren vier verschiedene Möglichkeiten der Lage des Moleküls auf dem Probenfilm mit den Bezeichnungen Flip1, Flip2 mit einer kurzen Diagonalen (S) und Flop1, Flop2 mit einer langen Diagonal (L). Die Hexamere sind hier durch Kugeln repräsentiert und die Dodekamere durch Kugeln, welche über die dicke Brücke verbunden sind. (Abbildung 64 und Abbildung 65 ab Seite 78; Abbildung 90, Seite 110). Der Unterschied zwischen Flip und Flop resultiert aus dem Flip-Flop-Shift und der Unterschied zwischen 1 und 2 aus dem “Rocking” angle.

B. Material und Methoden

1. Material

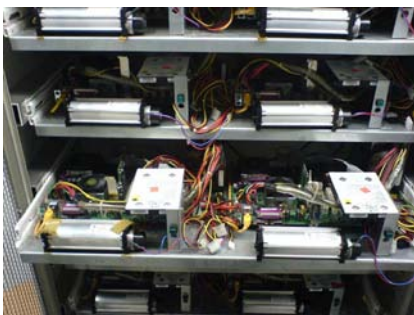
1.1. Substanzen, Geräte und Software-Programme

Das gesamte Vorgehen, von einem Protein eine räumliche Struktur zu erhalten, beinhaltet natürlich auch präparative Aufbereitung des Proteins, also dessen Gewinnung, eventuell dessen Reinigung und dessen Isolierung. Die Hämolymphentnahme am Tier (Abbildung 23) nahm für diese Arbeit ein Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Decker, Molekulare Biophysik, vor. Das Protein Hämocyanin der Vogelspinne *Eurytelma californicum* wurde von Prof. Dr. Jaenicke aus derselben Arbeitsgruppe säulenchromatographisch durch Größenausschluss isoliert und zur Verfügung gestellt. Es lag in einer Konzentration von 10 mg ml^{-1} vor. Das Protein wurde auf 1 mg ml^{-1} für die Cryo-EM-Präparation verdünnt.

Die Präparation sollte erstmals eine Rekonstruktion der extremen Oxygenierungszustände ermöglichen und Ziel war es diese als Konformationsänderung sichtbar zu machen. Dazu wurde die Cryo-Grid-Präparation der EchHc-Proben in N_2 -Atmosphäre bzw. in O_2/N_2 - Atmosphäre mit 1/4-Verhältnis in einer Atmosphärenkammer vorgenommen (Abbildung 26).

Die Cryo-EM-Aufnahmen wurden in einem Tecnai F30 Transmissions-Elektronen-Mikroskop (Abbildung 27) mit Feldemissionskathode bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV mit einer 59.000-fachen Vergrößerung und bei $1,0 - 5,0 \text{ }\mu\text{m}$ Defokus im Hellfeldmodus bei einer Belichtungsdauer von einer Sekunde angefertigt. Die über die Belichtungsdauer integrierte Bildinformation wurde auf Kodak So-163 Silberhalogenidkristall-Filmen konserviert und nach chemischer Umwandlung in Kodak D-19 Entwickler sichtbar. Mit einem ‚Primescan‘ Rotationsscanner der Firma HEIDELBERGER DRUCKMASCHINEN wurde das Filmmaterial mit $9,1 \text{ }\mu\text{m}$ Schrittweite in die digitalisierte Form überführt. Mit diesen EM-Bildern im Tiff-Bild-Format wurde diese Arbeit angefertigt.

Die Berechnungen wurden auf einem Tyan Cluster-Rechnern mit 16 Prozessoren (8 Dualplatinen) und 1800 MHz mit 256 MB RAM und Linux 9 Betriebssystem durchgeführt (Abbildung 20). Das Programm UCSF CHIMERA kam zum Einsatz, um Bilder der Röntgenstrukturen zu erstellen. Das Visualisierungs-Programm AMIRA 4 der Firma MERCURY (ehemals TGS) wurde für die Darstellung der Rekonstruktionsdaten und deren gemeinsame Darstellung („Fitting“) mit den Röntgenstrukturdaten verwendet. Diese Programme liefen auf Rechnern mit Microsoft Windows XP Betriebssystem. Die Daten wurden mittels FTP zwischen den Plattformen ausgetauscht.



Die Rechner mit Dualprozessoren-Platinen.

Abbildung 20. Die benutzten Rechner.

Die Bildbearbeitungs-Software IMAGIC-5 wurde von der Firma Image Science in Berlin bezogen. Es handelt sich hierbei nicht um ein einzelnes Programm, sondern um ein kommandogesteuertes modulares System von multifunktionalen Spezialprogrammen.

Skriptfähigkeit erlaubt Automatisierung von Bildbearbeitungsschritten. Die einzelnen Programme werden an entsprechender Stelle erklärt und auch in Übersichtsdiagrammen mit aufgeführt.

Die Berechnungsalgorithmen der meisten Programme bedienen sich der Transformation³ in den Fourierraum (Frequenzraum, 1/Länge), der die gleiche Bildinformation enthält wie der Realbildraum (Ortsraum, Länge). Dadurch werden die Ausführungen mancher Berechnungen in zeitlich angemessenem Rahmen erst möglich. Mathematisch wird mit der Fourier-Transformation das zu lösende Problem zwecks seiner Vereinfachung in eine andere Darstellungsweise, die Frequenzbereich-Repräsentation, überführt. Die Fourier-Transformation (F) separiert die periodische Funktionen mit verschiedenen Frequenzen, aus denen sich ein Signal, in diesem Fall die ortsabhängigen Bildsignale, zusammensetzt (Brigham, 1995). Das Ergebnis, die Fourier-Transformierte, wird in einem Diagramm dargestellt, in welchem die Amplitude gegen die Frequenz der Perioden aufgetragen wird. Mit der inversen Fourier-Transformation (F⁻¹) kann die Information wieder in den Bildraum zurück transformiert werden, nachdem es elegant im Fourierraum manipuliert wurde. Im Weiteren wird in diesem Zusammenhang der Begriff der Orts- oder Ortsfrequenz benutzt. Hiermit ist die Frequenz gemeint, mit der die Grauwerte der Bilder in ihrer Intensität schwanken (Eins and Stiller, 1995). Hohe Ortsfrequenzen (1/Länge) entsprechen Intensitätsänderungen auf kurzen Distanzen, niedrige entsprechen Größenänderungen auf langer Distanz. Erstere werden im Fourierbild außen, zweite im Zentrum dargestellt (nahe dem Ursprung des Koordinatensystems, also der Null-Frequenz). Das erhaltene Fourier-Transformierte Bild entspricht dem Beugungsbild des Objektes. Der Fourierraum wird auch reziproker Raum genannt, Änderungen über große Intervalle im Realraum werden als niedrige Frequenzen im Fourierraum dargestellt. Fouriertransformation ist die Basis für die Röntgenstrukturanalyse und einige Rekonstruktionsalgorithmen: Wenn man nämlich die Fouriertransformierte eines Objektes erhalten kann, kann man auch das Objekte selbst regenerieren.

1.1.1. Stoffe, Materialien und Chemikalien

Tabelle 4. Verwendete Materialien und Chemikalien

Hämocyanin von <i>Eurypelma californicum</i> (EcHc)	Rekonstruiertes Protein. Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Decker, Institut für Molekulare Biophysik, Mainz.
100 mM Tris-HCl-Puffer mit 10 mM Ca ²⁺ , 10 mM Mg ⁺² pH = 7,8	Stabilisierung der Hämocyanin-Proteine (Tris-HCl-Synonym: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride)
Ionenaustauscher Säule mit Sephacryl S300	Aufreinigung der Hämolymphe durch das Institut für Molekulare Biophysik, Herrn Prof. Dr. Decker.
Uranylacetat 1 vol%-ig T+ (sehr giftig)	Schwermetall zur negativen Kontrastierung der Proben im Elektronenstrahl des EM für die

³ Auf Digitalrechnern, genauer die diskrete Fourier-Transformation

R26/28/33 S20/21/45	Probenkontrolle vor der Cryo-Präparation.
Ammoniummolybdat 5 vol%-ig Xn (gesundheitsschädlich) R22-36/37/38 S26-36	Schwermetall zur negativen Kontrastierung der Proben im Elektronenstrahl des EM für die Probenkontrolle vor der Cryo-Präparation.
Stickstoff N ₂ flüssig	Kühlmedium zum schnellen Abkühlen der Probenlösung
Ethan C ₂ H ₆ flüssig	Kühlmedium zum schnellen Abkühlen der Probenlösung
Trichlormethan CHCl ₃	Lösungsmittel für Polyvinyl. Zum Entfernen des Stützfildes aus Polyvinyl.
Formvar-Lösung	Polyvinyl formal in Trichlormethan zur Erstellung von Plastikfilmen die als Stützfildes für die Holy-Carbon-Film-Herstellung dienen
Kohlenstoff in Graphit-Stäben	Verdampfung im Vakuum, um die Trägernetzchen überspannende Kohlefilme herzustellen. Lochgrößen bei Holey Carbon Filmen: 3 – 7 µm.
Stickstoff N ₂ (gasförmig)	O ₂ -freie Atmosphäre der Probenpräparation
Technische Luft, Gasmisch aus 75 vol% N ₂ , 25 vol% O ₂	Luftatmosphäre mit der Stickstoffatmosphäre über flüssigen Stickstoff bei der Probenpräparation verdrängt wird, um O ₂ -gesättigte Proben herzustellen.
Trägernetzchen (Grids) Copper Old 400	Probenträger aus Kupfer zum Einschleusen in das EM mit einer Lochkantenlänge von 50 µm
Filterpapier Wortman	Absaugen der überschüssigen Probenlösung bei der Probenpräparation
Filmsplatten, Kodak Elektron Image Film SO-163 http://www.kodak.com	Filmmaterial (80 mm x 100 mm) mit elektronensensitiver Schicht aus Silberhalogenidkristallen für das EM.
Film-Entwickler Kodak D-19 (Hydrochinon)	Erzeugung der Bildschwärzung durch Reduzierung der belichteten Silberhalogenidkristalle zu metallischem Silber
Film-Fixierer Agfa Agifix (Ammoniumthiosulfat)	Unterbinden einer ungewollten Folgeschwärzung durch Auflösen überschüssiger Silberhalogenidkristalle

1.1.2. Geräte / Apparaturen

Tabelle 5. Verwendete Apparaturen

Zeiss Lichtmikroskop	Kontrolle der Lochgröße und Lochverteilung in im Kohlefilm und der Unversehrtheit des Kohlefilmes auf den Grids
Edwards Vakuum-Verdampfungsanlage	Kohleverdampfung, um Kohlfilme zu erstellen. Ionisierung der Kohlefilem durch Hochspannung, um die Benetzbarkeit zu erhöhen.
Plunge-Apparatur mit Atmosphärenkammer (beides Eigenbau)	Transfer der Proben in das Kühlmedium unter definierter Gasatmosphäre in Überdruck-Stömungs-System (Abbildung 25, Abbildung 26)
Precision Digitizer PC-Eye	Kontrolle der EM-Bilder auf Astigmatismus durch berechnete Powerspektren.
Photometer Ultrospec 3100	Spektroskopische Bestimmung der Hämocyanin-Konzentration – Konzentrationsannahme $OD = 1 = 1 \text{ mg ml}^{-1} = c(\text{Protein})$.
Tecnai 30 F Transmissions-Elektronenmikroskop mit max. 300 kV Beschleunigungsspannung, Field Emission Gun, Supertwin-Linsen-System und Low-Dose-System http://www.tecna.com/ http://www.feicompany.com/	Hellfeld-Cryo-Transmissions-Aufnahmen bei niedriger Strahlenbelastung der Hämocyanin-Proteine auf Kodak SO-163 Filmmaterial bei 49000 (nach Korrektur 59000) facher Vergrößerung, 200 kV (Kilovolt) und 1 Sekunde im Hellfeldmodus.
Gatan Cryo-Probenhalter mit Unterdruck-Kühleinheit http://www.gatan.com/	Einbringen der Cryo-Proben in des EM bei $T < -150 \text{ }^\circ\text{C}$, um Kristallbildung zu vermeiden.
Entwicklerbad-Mischer	Laminarfreie Mischung der Filmentwicklerlösung durch Stickstoffgas Einleitung in Intervallen.
Heidelberger Trommelscanner an Macintosh-Rechner http://www.heidelberg.com/	Densitometrie und Digitalisierung des entwickelten Filmmaterials.
Thyan-AMD-16-Prozessor-Cluster unter Linux 9 Betriebssystem	Hardware-Ausstattung zur Berechnung der 3D-Rekonstruktion
Z Corporation 3D-Drucker http://www.zcorp.com/	Erstellung von konkreten räumlichen Struktur-Modellen der rekonstruierten Proteine

1.1.3. Programme und Datenbanken

Tabelle 6. Verwendete Programme und Datenbanken

IMAGIC-5 der Firma Image Science Berlin http://www.imagescience.de	Programm-Ausstattung zur Berechnung der 3D-Rekonstruktion anhand von Einzel-Partikel-Analyse und EM-Bild-Analyse
CTF-Explorer von Max Sidorov	Simulation der Kontrast-Transfer-Funktion

http://www.maxsidorov.com/ctfexplorer																									
Ctffind3 von Niko Grigorieff http://emlab.rose2.brandeis.edu	Bestimmung des Aufnahmefokus der EM-Bilder																								
MolRep als Teil des CCP4-Paketes http://www.ccp4.ac.uk	“Molecular Replacement” Programm. In der Strukturfindung aus röntgenkristallographischen Daten, zur Lösung des Phasenproblems, durch Einpassen ähnlicher bekannter Strukturen in die gemessene Dichtemappe, eingesetzt. Für diese Arbeit zum Einpassen von PDB-Daten in EM-Daten genutzt.																								
AMIRA und AMIRAMol 3.1 / 4.0 / 4.1 der Firma Mercury, ehemals TGS http://www.tgs.com http://www.mc.com	Visualisierung der 3D-Daten und Einpassung von PDB-Daten in die EM-Daten																								
EMAN und Boxer von Steve Ludtke (National Center for Macromolecular Imaging) http://ncmi.bcm.tmc.edu/~stewel/EMAN	Programm-Ausstattung zur Berechnung der 3D-Rekonstruktion anhand von Einzel-Partikel-Analyse und EM-Bild-Analyse. Inklusive Programm Boxer für Partikelselektion.																								
DEEP VIEW Swiss-PDB Viewer http://www.expasy.org/spdbv des Swiss Institute of Bioinformatics http://www.isb-sib.ch	Visualisierung von PDB-Daten und Modellierung (Expert Protein Analysis System)																								
UCSF CHIMERA http://www.cgl.ucsf.edu/chimera	Visualisierung von PDB-Daten und Einpassung (“Fitting”) von Röntgendaten in Rekonstruktionsdaten. (Pettersen et al., 2004)																								
SITUS von Biomachina http://biomachina.org	Einpassung (“Fitting”) von Röntgendaten in Rekonstruktionsdaten.																								
WabLabViewer 4 http://www.accelrys.com RasMol	Visualisierung von PDB-Daten http://www.umass.edu/microbio/rasmol																								
ClustalX ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX , Genedoc http://www.psc.edu/biomed/genedoc	Multiple Sequence Alignment (Editor)																								
Photoshop, CorelDraw, Visio http://www.adobe.com/products/photoshop	2D Darstellungen http://www.corel.de																								
GNU-C-Compiler http://gcc.gnu.org	Erstellung von Bearbeitungssoftware ergänzender Programme (create-class-plt)																								
RCSB Protein Data Bank of Research Laboratory for Structural Bioinformatics http://www.pdb.org	Zugang zu molekularen Strukturen als Referenzen oder zum Vergleich. Die Zugangsnummern der benutzten Röntgenkristallstrukturen: UET = Untereinheitstyp <table border="1"> <thead> <tr> <th>Protein</th> <th>UET</th> <th>Zugang</th> <th>Taxon</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>LpHc</td> <td>ll</td> <td>1LLA</td> <td><i>Limulus polyphemus</i></td> </tr> <tr> <td>LpHc</td> <td>ll</td> <td>1NOL</td> <td><i>Limulus polyphemus</i></td> </tr> <tr> <td>PiHc</td> <td>a</td> <td>1HCY</td> <td><i>Panulirus interruptus</i></td> </tr> <tr> <td>OdHc</td> <td>a</td> <td>1JS8</td> <td><i>Octopus dofleini</i></td> </tr> <tr> <td>RtHc</td> <td>a</td> <td>1LNL</td> <td><i>Rapana thomasi</i></td> </tr> </tbody> </table>	Protein	UET	Zugang	Taxon	LpHc	ll	1LLA	<i>Limulus polyphemus</i>	LpHc	ll	1NOL	<i>Limulus polyphemus</i>	PiHc	a	1HCY	<i>Panulirus interruptus</i>	OdHc	a	1JS8	<i>Octopus dofleini</i>	RtHc	a	1LNL	<i>Rapana thomasi</i>
Protein	UET	Zugang	Taxon																						
LpHc	ll	1LLA	<i>Limulus polyphemus</i>																						
LpHc	ll	1NOL	<i>Limulus polyphemus</i>																						
PiHc	a	1HCY	<i>Panulirus interruptus</i>																						
OdHc	a	1JS8	<i>Octopus dofleini</i>																						
RtHc	a	1LNL	<i>Rapana thomasi</i>																						
ExpASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) http://www.expasy.org	Zugang zu Proteinsequenzen, siehe Tabelle 3.																								

2. Methoden

Die Bildbearbeitung von elektronenmikroskopischen Bildern zum Zwecke der Strukturuntersuchung ist ein komplexer Prozess mit vielen unbestimmten Parametern, die teilweise extreme Auswirkungen auf die Qualität des Ergebnisses haben. Die Abbildung 21 soll zeigen, wie man sich die Abschnitte in Bearbeitungssequenzen verschiedener Hierarchieebenen eingeteilt denken kann. Diese beinhalten Bearbeitungsschritte, die im Falle der Bildbearbeitung in etwa auch einigen Einzelprogrammen der Bildbearbeitungssoftware IMAGIC-5 und im Groben auch der Einteilung im Text entsprechen. Abbildung 22 soll einen Überblick (vereinfacht) geben, welche Bilder und Zwischenergebnisse bei der Einzelpartikel-Rekonstruktion generiert werden.

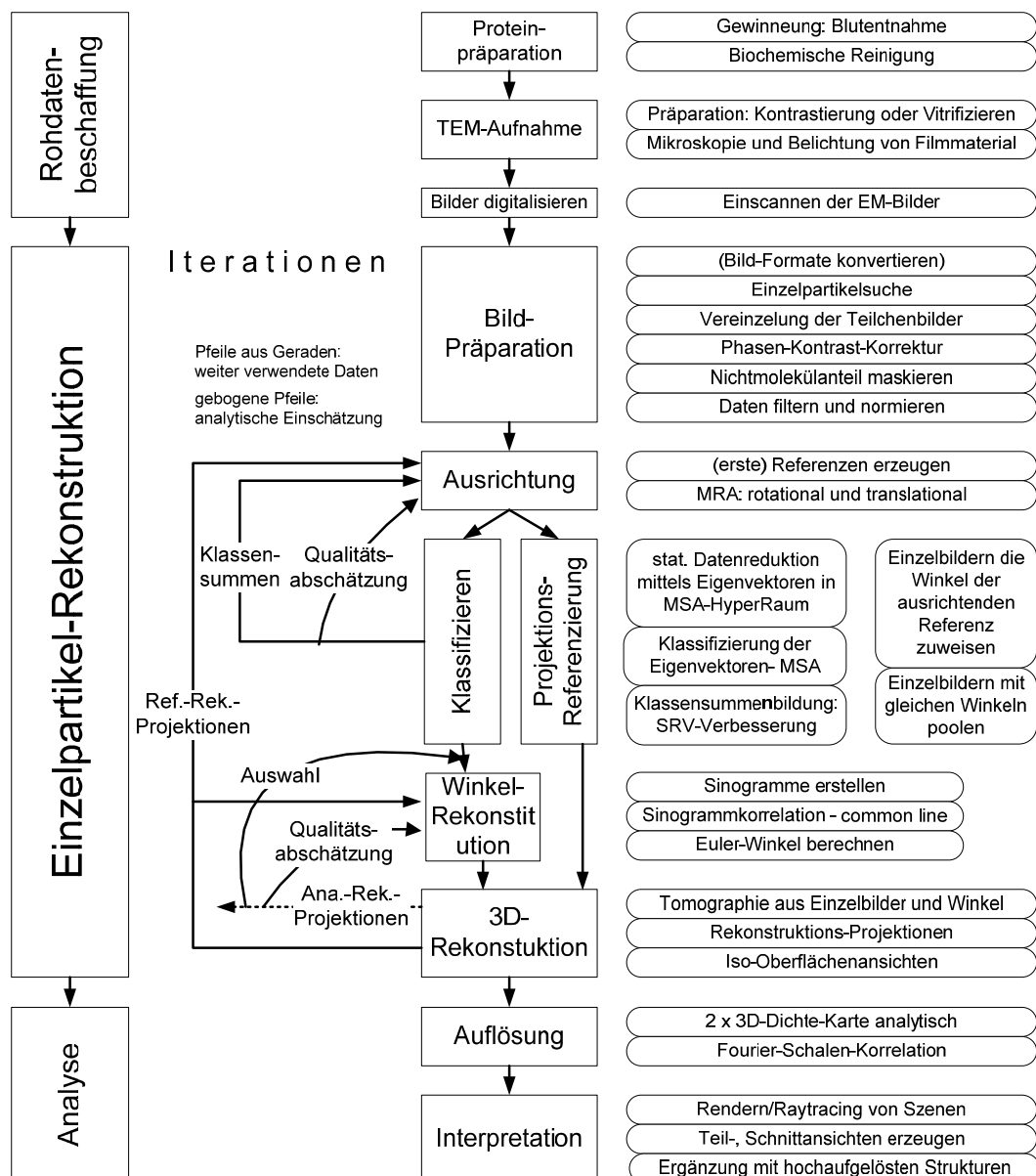


Abbildung 21. Prinzip der Bildbearbeitungs-Methoden - prozessorientiert.

Zuerst sind die Schritte aufgelistet, die unternommen werden müssen, um die Information über das Molekül in einer Form zu erhalten, die mit Rechnern verarbeitet werden kann, die Rohdatenbeschaffung. Im zweiten Abschnitt sind alle Prozesse zusammengefasst, welche die eigentliche Bildrekonstruktion beinhalten, das heißt, die auf den Erhalt der 3D-Strukturdaten abzielen. Auf diesem wird das Schwergewicht der Ausführungen liegen. Der letzte Abschnitt, die Analyse der erhaltenen Daten, beinhaltet ebenfalls teilweise bildbearbeitende Methoden; dieser wird hier aber für analytische Betrachtungen herangezogen. Hier muss dazugesagt werden, dass im zweiten Abschnitt ebenfalls Bildbearbeitungsmethoden analytisch angewandt werden, da es sich um einen iterativen Prozess handelt, der wiederholt Ergebnisse als Eingabedaten bzw. die Auswahl von Eingabedaten anhand von (Zwischen-) Ergebnissen, benötigt.

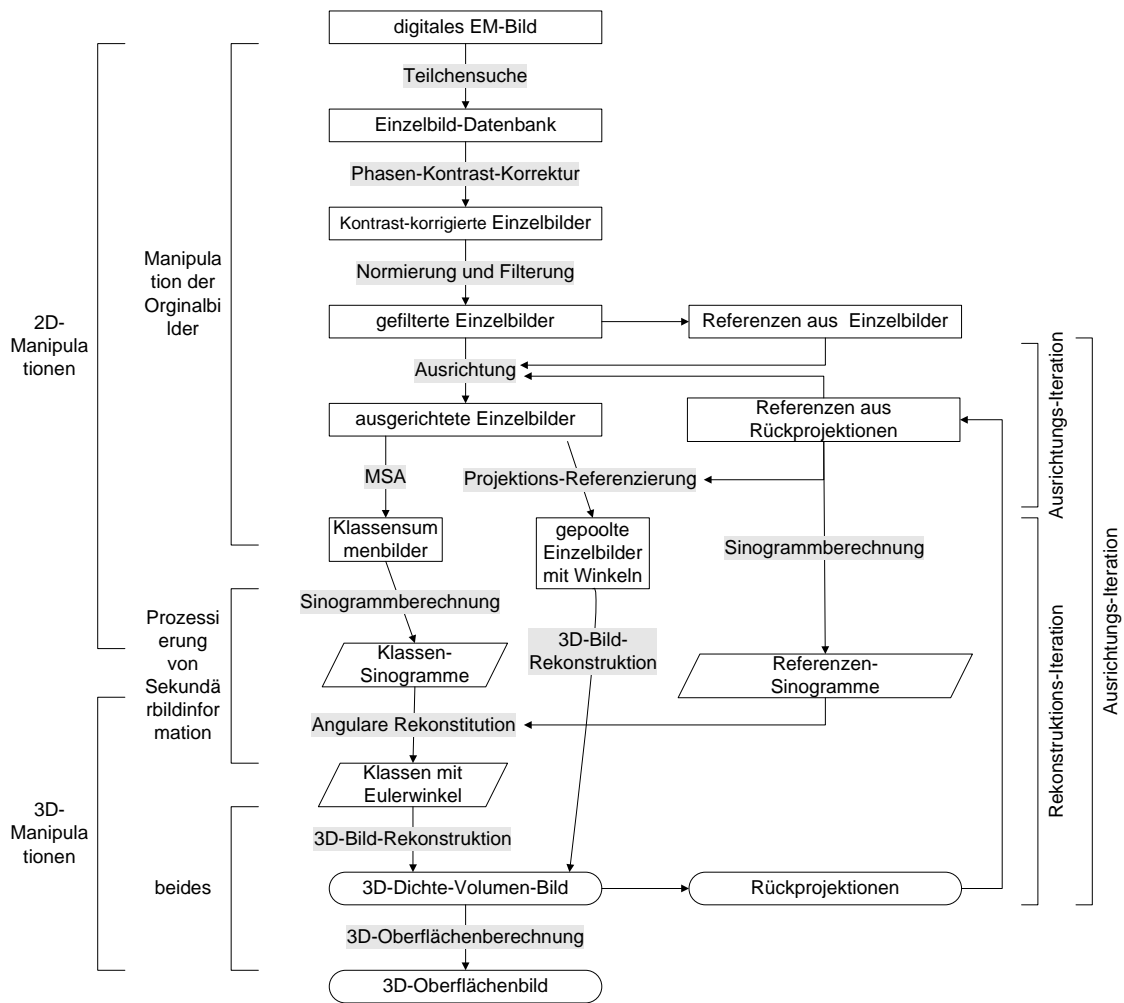


Abbildung 22. Prinzip der Bildbearbeitungs-Methode - bild- oder ergebnisorientiert.

Mit Umrandung: Bilder; Rechtecke: Bilder in Vorbereitung, Parallelogramme: Bilder der Winkelrekonstruktion, Ovale: 3D-Bilder. Pfeile mit grau hinterlegter Schrift: Bearbeitungsschritt. Klammer links: Informationsart. Klammer rechts: Iterationsart. MSA und Projektions-Referenzierung stellen alternative Bearbeitungswege dar.

2.1. Rohdatenbeschaffung

2.1.1. Proteinpräparierung

Das Spendertier wurde mit einer Kanüle punktiert (Abbildung 23). Aus den Blutlakunen des offenen Blutgefäßsystems konnte Hämolymphe entnommen werden. Die Tiere werden dazu durch Unterkühlung narkotisiert. Gerinnungsfaktoren werden mit den Blutzellen abgetrennt. In der Ultrazentrifuge bildete Hämocyanin aufgrund seiner Größe ein Pellet, das wieder gelöst, anschließend chromatographiert wurde und danach in homogener Form vorlag (Markl, 1996).

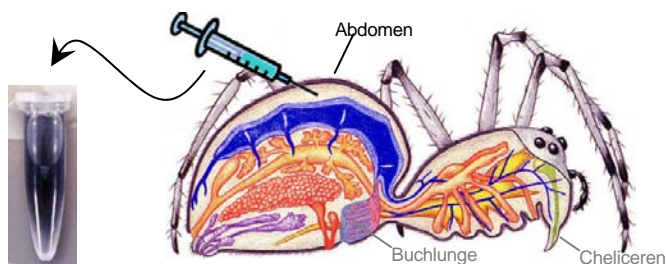


Abbildung 23. Gewinnung der Spinnen-Hämolymphe.

Links: Hämocyaninhaltige Hämolymphe. Rechts: Die Vogelspinne (Abbildung 3) wird an ihrem Abdomen im Bereich der Blutlakune (blau) ihres offenen Blutkreislaufsystems punktiert, die austretende Hämolymphe mit einer Kanüle/Spritze abgesaugt und in Tris-Stabilisierungspuffer pH=7-8 aufgenommen.

2.1.2. Aufnahme der Cryo-transmissionselektronenmikroskopischen Bilder

Warum werden elektronenmikroskopische Bilder herangezogen, um Strukturaussagen über (biologische) Moleküle zu treffen, wenn doch mit der Röntgenstrukturanalyse eine Methode zu Verfügung steht, die im atomaren Bereich auflöst? Elektronenmikroskope versprechen zumindest theoretisch eine sehr hohe Auflösung. Diese hängt bekanntermaßen von der Wellenlänge der benutzten Strahlung ab. Mit stark beschleunigten Elektronen (60 – 200 kV Beschleunigungsspannung) lassen sich Strahlen von Wellenlängen um 0,05 bis 0,02 nm erzeugen, womit realistische Auflösungen im Makromolekülbereich erreicht werden. Wie der Name sagt, sind EM-Bilder Transmissionsbilder, also zweidimensionale Projektionsbilder (Abbildung 24), welche die Mittelung der Helligkeitsinformation, und somit die Raumstrukturinformation, über die gesamte Durchstrahlungstrecke (und auch über die Belichtungsdauer) enthalten. Im Gegensatz dazu enthalten Reflexionsbilder nur die Information über die Struktur der Oberfläche eines Körpers. Im Unterschied zur Röntgenkristallanalyse lässt sich diese Information mit relativ geringem präparativen Aufwand erhalten, denn es werden keine dreidimensionalen Kristalle der Proteine benötigt und das Phasenproblem, wie bei der Verwendung von Diffraktionsbildern stellt sich hier auch nicht. Bei Arthropoden konnte bisher nur von dem 1x6-Molekül, der kleinsten Aggregationsform, die Röntgenstruktur aufgeklärt werden (Gaykema et al., 1984; Hazes, 1993; Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994). Es wird zudem diskutiert, ob die Kristallform verlässliche Aussagen über die native funktionelle Proteinkonformation liefert. Hier können die auf EM-Bildern basierenden Bildbearbeitungsmethoden zusätzliche Daten für die Diskussion liefern, da sie die Proteine (mehr oder weniger) in Lösung abbilden.

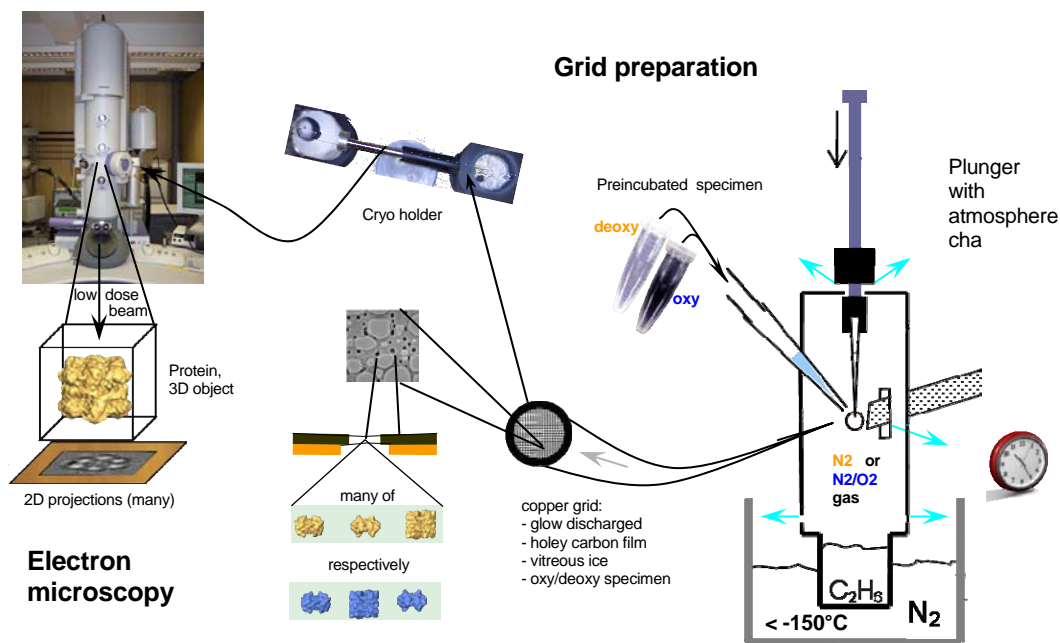


Abbildung 24. Präparation und Elektronenmikroskopie.

Die Cryo-Grid-Präparation wurde in einer Atmosphärenkammer (Abbildung 26) unter definierten Gasbedingungen durchgeführt. Die Holy-Carbon-Grids, mit den in vitrifiziertem Puffer eingeschlossenen Molekülen, wurden bei durchgehender Kühlung auf Flüssigstickstofftemperatur mittels des Kryohalters in den Strahlengang des Elektronenmikroskops eingebracht. Das EM liefert im Transmissionsmodus zweidimensionale Projektionsbilder des im Strahlengang befindlichen dreidimensionalen Objektes.

Die computergestützte 3D-Bild-Rekonstruktion anhand von EM-Bildern ist eine außerordentlich erfolgreiche Methode, da sie die Lücke zwischen der Röntgenstrukturanalyse

und EM schließt. Da für die Röntgenanalyse Kristalle notwendig sind, diese aber nur aus relativ kleinen Proteinen und bei weitem auch nicht von allen erhalten werden können, ist die 3D-Rekonstruktion aus EM-Bildern oft die einzige Methode eine komplexe Proteinstruktur aufzuklären. Die bildverarbeitenden Methoden in der Elektronenmikroskopie gewinnen daher laufend an Bedeutung. Mit verbesserten Algorithmen und höherer Computerleistung stößt diese Technik immer öfter in Auflösungsbereiche unter 1 nm vor (Schatz, 1992; van Heel et al., 2000; van Heel et al., 1992a; van Heel et al., 1992b). Für Moleküle, für die es schon eine Röntgenstruktur gibt und die bildbearbeitungstechnisch auswertbar sind, steht momentan der Aspekt der Verifizierung der Struktur im Vordergrund, denn die statische Kristallstruktur kann von der natürlichen oder funktionellen Struktur des Proteins abweichen und die ist auf jeden Fall eine dynamische. So geht man von Konformationsänderungen (Bronw et al., 1980) durch die Ligandenbindung aus, im speziellen Fall der respiratorischen Proteine, vom Oxygenierungsgrad. Insgesamt verspricht man sich von der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eine genaue Funktionsbeschreibung der Substratwechselwirkung, der Allosterie und Kooperativität, Aufklärung der Bindungen und eine Hilfe beim Verstehen der Faltungsmechanismen.

Mittels der Transmissionselektronenmikroskopie wurden für diese Arbeit die Primärdaten, die projektiven Repräsentationen der Hämocyaninmoleküle, hergestellt. Für die Kontrolle der Proben wurden mit Uranylacetat kontrastierte Proben ("negative stained") und für die Rekonstruktion unkontrastierte Cryo-Proben verwendet. Dem Transmissionselektronenmikroskop (EM) werden die Proben auf Trägernetzchen (Grids) aus Kupfer mit Lochkantenlänge 50 µm der Firma Plano zugeführt.

2.1.2.1. Präparation der Objekte für das EM

Als durchstrahlte Trägerschicht für die zu untersuchenden Teilchen kommen nur solche in Frage, die keine oder nur geringe und gleichmäßige Eigenstrukturen aufweisen und strahlungsresistent sind. Bewährt hat sich das Aufbringen auf einen aufgedampften amorphen Kohlefilm, der wiederum von einem Kupfernetz getragen wird. Für biologische Belange als besser geeignet hat sich eine neuere Methode herausgestellt. Dabei dient die in kürzester Zeit (Vermeidung von Kristallbildung) eingefrorene Protein-Puffer-Lösung (die möglichst strukturlos sein sollte) selbst als Trägerschicht. Man nennt diese Einbettung in vitrifizierten (glasartigem) Eis oder Cryo-Fixierung. Auf Grund der hohen Abkühlrate des durch Stickstoff ($T = -196\text{ °C}$) gekühlten verflüssigten Ethans ($T = -183\text{ °C}$), die bei Proben mit einer Dicke von weniger als einem Mikrometer 106 K/s beträgt, bildet sich kein kristallines Eis aus, sondern amorphes (kristallfreies) Eis, welches die native Struktur bis auf atomare Dimensionen konserviert.

Biologische Moleküle zeigen im EM nur geringe Kontraste gegenüber dem Trägermedium, Einbettungsmedium oder dem Hintergrund. Um visuell auswertbare Aufnahmen zu bekommen muss dieser künstlich aufgebessert werden. Zur Kontrastierung im EM kommen zwei Methoden in Frage: Zum einen die Negativkontrastierungsmethode, zum anderen die Aufnahme bei Defokuseinstellung. Erstere Methode wird angewandt, um gut sichtbare bzw. kontrastierte Bilder von den interessierenden Partikeln zu erhalten mit denen zweidimensionale Dimensionen, Formen und die Partikelkonzentration abgeschätzt werden können. Als

Primärdaten für die eigentliche Rekonstruktion nutzt man diese Bilder heute nicht mehr, da mit der zweitgenannten Methode eine nativere und realitätstreuer Repräsentation der Partikel zur Verfügung steht.

Der Proteinlösung werden bei der Negativkontrastierungsmethode Schwermetallverbindungen wie Uranylacetat zugegeben, die sich um die Proteine legen. Die Schwermetalle stellen effektive Streuzentren für Elektronen dar und sind dadurch im EM-Bild deutlich von den heller erscheinenden Proteinen zu unterscheiden. Nachteilig ist, dass die Proteinlösung auf dem hierbei verwendeten Kohlefilm eingetrocknet wird. Hinzu kommt, dass die Probenkammer des EM evakuiert sein muss, um Stöße der Elektronen mit Luftmolekülen möglichst zu vermeiden. Dadurch wird der Dampfdruck herabgesetzt und die Struktur biologischer Moleküle ist in der Probenkammer nicht stabil, da sie durch verstärkte Austrocknung verändert wird. Auch wurden von Schatz (Schatz, 1992) bei dieser Methode Präparationsartefakte festgestellt, die aus Ungleichverteilung des Kontrastmittels und aus Abflachungseffekten (flatening) resultieren (van Heel and Dube, 1994). Außerdem schrumpfen die Moleküle aufgrund des Lösungsmittelentzugs durch die Lufttrocknung; der Kontrast auf dem Bild stellt also nicht mehr den des Moleküls dar sondern den der leeren Kontrastmittelhülle.

Die neuere Methode, welche die Proteine in vitrifizierten Eis auf den Objektträger einschließt, verhindert eine Austrocknung weitgehend. Diese Methode verändert die Struktur der Teilchen fast nicht und es sollen sogar verschiedene Funktionszustände abgebildet werden können (Schatz, 1992). Um die Kontrastierung eiseingebetteter Präparate, durch Phasenverschiebung gestreuter Elektronenwellen (Phasenkontrast), zu erhöhen nimmt man diese bei Defokuseinstellung auf⁴. Die Konturen werden dann zwar unschärfer aber besser sichtbar. Aufnahmen eiseingebetteter Moleküle sind viel stärker verrauscht als die herkömmlicher Präparationsmethoden, da sie in der Regel nicht kontrastiert werden und das umgebende Eis selbst schon einen Kontrast bildet. Molekülinformation wird also nur sichtbar, wenn deren Kontrast über dem dieses Hintergrundkontrastes liegt. Um die, aufgrund des hohen Rauschanteils, fehlenden Informationen zu erhalten werden mittelnde Bildbearbeitungsverfahren von großen Quantitäten an Bildern angewandt.

Das Problem, weswegen man nicht die theoretisch mögliche Auflösung bei EM-Aufnahmen erreicht, ist die zerstörende Wirkung von Elektronenstrahlen auf biologische Moleküle. Um die möglichst unzerstörte Struktur der Moleküle in den Bildern zu erhalten, werden Proben nur mit geringen Energien bestrahlt bzw. nur sehr kurzen Belichtungszeiten ausgesetzt und jedes Molekül möglichst wenigen Belichtungsvorgängen ausgesetzt, am besten nur einem einzigen. Die geringen Strahlendosen bedingen ebenfalls einen hohen Rauschanteil bzw. wenig Detailinformation der Bilder.

⁴ Der hier angestrebten Strukturbereich von unter 1 - 2 nm ist dadurch charakterisiert, dass die gestreute Elektronenwelle einen anderen Weg durch die Objektivlinse nimmt als die ungestreute Elektronenwelle, so dass die aufgrund unterschiedlicher optischer Weglänge auftretende Phasendifferenz bei der Vereinigung beider Wellenzüge in der Nähe der Fokusebene zu Interferenzerscheinungen führt, den Phasenkontrast.

2.1.2.2. Die Cryo-Grid-Präparation unter definierten Bedingungen

Die Herstellung der Protein-Proben unter definierten Gasbedingungen bedurfte einer speziellen Apparatur. Für einen Cryo-Plunger (Adrian et al., 1984; Dubochet et al., 1988; Dubochet et al., 1982; Harris, 1997; Harris and Adrian, ; van Heel et al., 2000) (Abbildung 25 links) gab es unseres Wissens so etwas noch nicht. 2002 machte ich dazu einen Vorschlag eines kleinvolumigen Strömungssystems, um die Plunge-Apparatur zu bauen. Es wurde aber erst eine Atmosphärenkammer (Abbildung 25 Mitte) nach einem Vorschlag von Herrn Depoix erprobt, welche sich als unhandlich und sehr verschwenderisch in Bezug auf das verbrauchte Gasvolumen herausstellte, da ein sehr großer Gasraum ausgetauscht und ständig durchströmt werden musste. Das Prinzip der kleinen Strömungskammer wieder aufgreifend, wurde eine Plexiglasröhre entworfen, welche längsgeteilt (Abbildung 26 rechts) ein leicht zu öffnendes und zusammengesetzt ein die Plunge-Einheit umschließendes Kammersystem darstellt in dem sich die Pinzette ungehindert bewegen kann (Abbildung 25 rechts). Die um den Plunge-Arm geschlossene Kammer stelle einen, durch permanenten leichten auswärts gerichteten Gasstrom, strömungsdichten und nach unten zum flüssigen Ethan hin abgedichteten Gasraum dar. Eine Verteilung des eingeleiteten Gases wird über Umleitungen an der Einströmöffnung gewährleistet. Das Proben-Grid an der Pinzette kann so für eine Inkubationszeit unter definierten Gasbedingungen verweilen, um die Proteine an den gewünschten Oxygenierungszustand zu adaptieren und sich so über den gesamten Fallweg in einer definierten Gasatmosphäre bewegen.



Abbildung 25. Cryo-Plunger und Atmosphärenkammern.

Links: Cryo-Plunger. Mitte: Atmosphärenkammer. Rechts: Strömungskammer am Cryo-Plunger montiert.

Bei der Präparation der Grids mit Ziel einer oxygenierten Proteinprobe (Gasgemisch in der Kammer: 75 % N₂ / 25 % O₂) kann man sich den ungünstigen Fall vorstellen, dass sich über dem flüssigen Ethan eine O₂-freie Ethangasschicht bildet die beim Durchfallen des Grids die Proteine deoxygeniert. Angenommen diese Schicht wäre einen cm dick (was bei dem ständigen Austausch des Gases schon viel wäre) so würde die Zeit, welche das Grid an dieser Stelle zum Durchfallen dieser Schicht bräuchte ca. 1/1000 s betragen. Berechnung dazu:

Grid-Fallweg = 0,12 m (a); Ethangas-Schichtdicke = 0,01 m (b)

Wie lange braucht die Probe zum Durchfallen der Strecke b?

Fallzeit(b) = Fallzeit(a) – Fallzeit(a-b) mit a-b = 0,11 m

Fallgesetz: $s = \frac{1}{2} g t^2 \iff t = (2s/g)^{1/2}$ (Reibung nicht berücksichtigt)

$$t(a) = 0,156 \text{ s}; t(a-b) = 0,155 \text{ s}; t(a) - t(a-b) = 0,001 \text{ s}$$

Somit müsste unter diesen hypothetischen, ungünstigen Bedingungen eine (teilweise) Deoxygenierung innerhalb von 1/1000 s stattfinden. Frau Dr. Hellmann vom Institut für Biophysik Mainz konnte mir aufgrund neuester Kinetikmessungen, welche sie mit EcHc durchführte, mitteilen, dass EcHc um mindestens eine Größenordnung langsamer deoxygeniert. Ein anderer Punkt ist, dass man keine Aussage darüber machen kann, wie sich ein präpariertes (gefrorenes) Grid zeitlich (Lagerung) in Bezug auf eine mögliche Oxygenierung bzw. Deoxygenierung unter N₂-Gas, flüssigen N₂ bzw. Luft (N₂-Gas-Luft-Gemisch) verhält. Es gibt eine kritische Stelle an der Luftkontakt bzw. eine Temperaturerhöhung des vitrifizierten Eises über die Umkristallisationsgrenze von -150 °C denkbar wäre: Die Überführung des schockgefrorenen Grids vom flüssigen Ethan in den flüssigen Stickstoff. Wir gehen davon aus, dass Luftkontakt vermieden wird, da sich in dem Stickstoffbehälter aufgrund der starken Evaporationseigenschaft des Stickstoffes eine N₂-Gasschicht bildet, in welche überführt wird. Da die diffusive Durchmischung stark wegabhängig ist, ist davon auszugehen, dass in unserem abgedeckten Stickstoffbehälter (flüssig) weitestgehend N₂-Gas vorhanden ist, so dass eine unter N₂-Gas präparierte Probe sich nicht oxygenieren sollte. Um beim Überführen einen definierten Gasraum über dem flüssigen Ethan und Stickstoff zu gewährleisten, kann man einen Teilgasstrom direkt über den Ethan leiten.

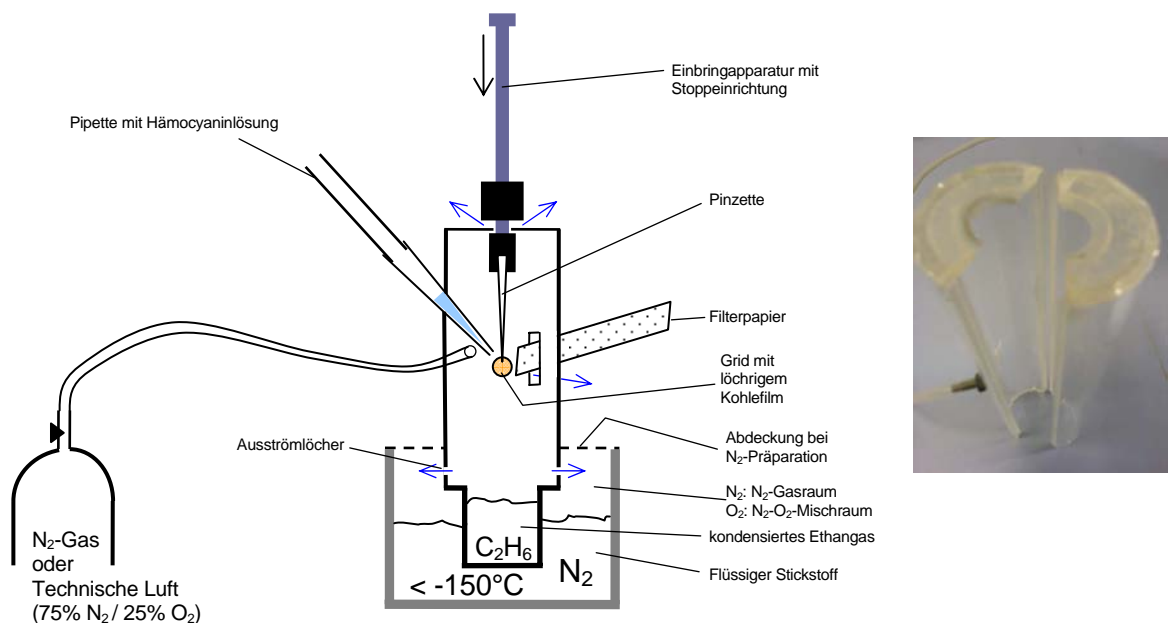


Abbildung 26. Prinzip der Atmosphären-Strömungskammer.

Die Kammer besteht aus zwei Halbröhren (rechts) die zusammengesetzt die Pinzette im Cryo-Plunger umschließen. Das mit Hc-Lösung beladene Grid wird für eine Inkubationszeit in der Kammer an die gewünschte Oxygenierungsbedingung anpassen gelassen, bevor es in den flüssigen Ethan eingeschossen wird. Das Abnehmen der vorderen Hälfte (links) ermöglicht das Beladen der Pinzette mit dem Grid und der Proteinlösung und das Bergen des präparierten Grids unter Stickstoff. Die blauen Pfeile stellen den Weg des ausströmenden Gases bei geschlossener Kammer dar. Es wird mit geringem Überdruck gearbeitet, so dass kein Gas von Außen einströmen bzw. eindiffundieren kann. Der Gasraum über dem flüssigen Stickstoff wird bei Deoxypräparation mit einer Abdeckung verschlossen. Bei oxy-Präparation wird der Gasraum über dem flüssigen Stickstoff durch die unteren Austrittslöcher in der Röhre mit N₂-O₂-Gasgemisch geflutet.

2.1.2.3. Cryo-EM (Belichtung, Aufnahmeprinzipien)

Für die Berechnung von dreidimensionalen Rekonstruktionen aus zweidimensionalen EM-Projektions-Bildern werden verschiedene Ansichten der zu untersuchenden Moleküle benötigt. Die einfachste Art diese zu erhalten ist es, ein und dasselbe Teilchen mehrfach aus unterschiedlichen Winkeln aufzunehmen. Sind diese Winkel zudem bekannt und decken einen

ausreichenden Winkelbereich ab, ist eine direkte Berechnung der Rekonstruktion mit gängigen Algorithmen relativ einfach möglich (Tomographie). Aus oben genannten Gründen ist es aber vorteilhaft, jedes Teilchen nur einmal der Bestrahlung mit Elektronen auszusetzen. Um dennoch Rekonstruktionen der Struktur durchführen zu können, muss man sehr viele verschiedene Moleküle in verschiedenen (und ausschließlich unbekannt) Ansichtswinkeln aufnehmen. Günstig ist dabei, wenn viele aller potentiellen Ansichten vertreten sind, da jede Ansicht andere Strukturinformationen zur Rekonstruktion beitragen kann. Die Einbettung der Teilchen in vitrifiziertem Eis und anschließende Cryo-Aufnahme ist die Methode der Wahl, da diese eine statistische Verteilung der Ansichten verspricht. Bei der Präparation auf Kohlefilm, treten meist wenige Ausrichtungswinkel bevorzugt auf.

Wegen des oben angesprochenen geringen Kontrasts und Signal-Rausch-Verhältnis bedürfte es bei der Cryo-Methode aber einer hohen Strahlungsdosis. Man muss aber, wegen der geringen Strahlenresistenz der Biomoleküle, für eine einzelne EM-Aufnahme einen Kompromiss zwischen detektierbarer Grauwertinformation/-intensität, also der Detailhaltigkeit und dem Verlust von Details durch die zerstörerische Natur der wechselwirkenden Elektronen mit dem Objekt finden. Das erstere fordert ein Minimum an Strahlungsdosis, das zweite begrenzt das Maximum an auf biologische Moleküle einwirkende Strahlendosis. Die Strahlendosis wurde hier über die Belichtungsdauer von einer Sekunde integriert, um die Strahlenintensität (Dosisleistung, Dosis/Zeit) zu reduzieren. Damit geht man eine vertretbare Mittelung der Strukturdetails über die Zeit ein, um ein Ableiten der Probenerwärmung durch Konversion in thermische Energie umgewandelte Strahlungsenergie zu ermöglichen. Kürzere Einwirkzeiten bei entsprechend höheren Intensitäten führen zu größeren inakzeptablen Strahlenschäden an den Molekülen. Die Moleküle werden also unter so genannten "Low-Dose"-Bedingungen aufgenommen, welche dann oben erwähnte Nachteile mit sich bringen. Die maximale Elektronendosis für biologische Präparate beträgt ca. 20 bis 100 $e^-/\text{Å}^2$ (de Haas et al., 1991; Dubochet et al., 1988; Saad et al., 2001). Die ab dieser Dosis erkennbaren strukturellen Veränderungen beruhen auf der Bildung und der Diffusion von freien Radikalen und den durch sie ausgelösten Reaktionen.

Auch zu beachten beim (Cryo-)Elektronenmikroskopieren (neben der Sphärischen Aberration, welche in die Kontrast-Transfer-Funktion eingeht, siehe unten):

- Chromatische Aberration der Objektivlinse - Energieverlust der Elektronen im Objekt
- Defokuslevel der Objektivlinse – Defokus zu niedrig: Objekte nicht mehr zu sehen; zu hoch: Realitätstreue nimmt wegen Nulldurchgänge der Kontrast-Transfer-Funktion ab.
- Astigmatismus der Objektivlinse – elektronen-optische (Aperturen-)Missjustierung des Mikroskops
- Thermische Ausdehnung/Mechanische Vibrationen - Bewegung während der Aufnahmezeit (wurde durch Equilibrierungszeit vor der Aufnahme vermieden)
- Elektrostatische Aufladung des Objektes durch die Elektronen
- Rückstreuung von Elektronen auf das Objekt von einem Metall-Filmhalter
- Dicke des Präparateises – Kontrastabschwächung/Informationsverlust durch Bremsung der Elektronen (Signal-Rausch-Verhältnis)
- Potentielle Auflösung der Information in den EM-Bildern (nimmt mit der Ausdehnung der Thon-Ringe im Powerspektrum zu)

Zusammengefasst erhält man sehr kontrastarme, verrauschte Bilder, weil sie in Eis eingebettet wurden, keine Kontrastmittel zugegeben wurde und mit geringer Dosis aufgenommen wurden. Diese Bilder weisen ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) auf. Das Prinzip, das angewandt wird, um das Signal-Rausch-Verhältnis wieder in strukturauflösende Bereiche zu heben ist ein Bildmittelungsverfahren (letztendlich aber doch nur Quantität der Bilder – man könnte auch die Einzelbilder weiterverwenden doch kann man mit der Mittelung Rechenzeit sparen), das durch Ausrichtung und Klassifizierung der Bilder vorbereitet wird. Es müssen dazu sehr viele isolierte und ausgerichtete Bilder, von möglichst nicht identischen (Strahlungsschäden) Molekülen, aber natürlich von der gleichen Molekülart, aufgenommen werden. Diese werden statistisch aufsummiert. Das heißt, der durchschnittliche Helligkeitswert eines jeden Pixels aus allen Bildern wird ermittelt. Anschaulich kann man sich die Bilder transparent und übereinander gelegt vorstellen. Je besser die Struktur der einzelnen Bilder übereinstimmt, umso besser ist das Signal-Rausch-Verhältnis. An Stellen mit Molekülinformation wird diese in fast allen Bildern enthalten sein und diese hervorgehoben. Bei Aufsummierung unendlich vieler Bilder, würden die Helligkeitswerte der entsprechenden Bildpunkte gegen ihre durchschnittlichen Werte konvertieren. An Stellen mit Nichtmolekülinformation, also Rauschen, wird diese ebenfalls in fast allen Bildern an derselben Stelle auftreten. Da das Rauschen eine nicht gerichtete Information enthält, sondern statistisch verteilt ist, mittelt es sich heraus. Bei unendlich vielen aufsummierten Bildern konvergiert der Helligkeitswert der Rauschinformation statistisch zu Null. Da man nie unendlich viele Bilder zur Verfügung hat, wird man immer mit teilweise verrauschten Bildern weiterarbeiten müssen. Letztendlich erhält man aber (Summen-) Bilder, die erheblich mehr Details zeigen als die Originalaufnahmen aus dem EM. Legitim ist diese Methode, falls die Information auf den Bildern gleich ist (was streng genommen nur bei unverrauschten Bildern zutreffen könnte). Dazu müssen die Bilder das gleiche Objekt zeigen sowie in geeigneten Weisen ausgerichtet und in Formenklassen eingeteilt werden. Eine Mischung von Molekülspezies muss durch die Präparation ausgeschlossen werden. Die Ausrichtung kann in der Bildebene (zweidimensional) stattfinden (siehe B.2.2.3 Ausrichtung (Alignment) Seite 44) oder die Projektion des dreidimensionalen Objektes (räumliche Ansicht) betreffen, (siehe B.2.2.4 Klassifizierung und Winkel-Findung versus Projektions-Referenzierung ab Seite 47).



Abbildung 27. Elektronenmikroskop und Cryo-EM-Vorbereitung.

Oben: Das Tecnai F30 Elektronenmikroskop. Unten: der Cryo-Proben-Halter für das stickstoffgekühlte Einbringen der Proben in die Probenschleuse des EM.

2.1.2.4. Kontrast-Transfer-Funktion

Bei hochauflösenden Bildern nicht kontrastierter Proben aus der Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie stammt der Kontrast vorwiegend aus Phasenverschiebung der gestreuten Elektronenstrahlen und weniger aus deren Elimination. Deswegen sollten dabei möglichst kleine Aperturen verwendet werden, um viele der hohen Ortsfrequenzen zu erhalten. Die Kontrast-Transfer-Funktion (‘‘Contrast Transfer Function‘‘ CTF, Abbildung 28)

$$\text{CTF}(k) = \sin\left(C_s \lambda^3 k^4 \frac{\pi}{2} + \pi \Delta z \lambda k^2\right)$$

C_s : Sphärische Aberration
 λ : Wellenlänge
 k : Ortsfrequenz
 z : Defokus

beschreibt, wie die Kontraststrukturen des Objektstrahls auf den Projektstrahl abgebildet werden. Die Strahlenelektronen wechselwirken mit den Teilchen der Objektatome unter dem Phänomen der Beugung (Wellen-Teilchen-Dualismus), was zu Interferenzen der gebeugten, also phasenverschobenen Wellen mit den ungebeugten (phasenoriginalen) Wellen mit den gebeugten bzw. mit anderen gebeugten Wellen führt. Im Focus sind diese minimiert, nehmen aber mit Defokussierung zu. Aufnahme im Defokus ist notwendig, um die Strukturen sichtbar zu

machen (Punkt-Verbreiterungs-Funktion), führt aber zu Fehlinformation der Bildkontraste (oszillierenden Vorzeichen (Nulldurchgänge) in der CTF, Abbildung 28) welche korrigiert werden müssen. Die negativen Werte stellen Falsch- oder Fehlinformationen dar. Wo die Frequenzintervalle der negativen Werte liegen, hängt vom speziellen Aufnahmegerät ab und von den Parametern unter denen die Aufnahmen gemacht wurden. Mit der CTF lassen sich mittels dieser Parameter die Intervalle ermitteln und ins Positive umkehren (siehe unten); damit wird die Bildinformation vervollständigt.

Da eine Phasenverschiebung eine zeitliche Größe darstellt, ist sie für das Auge auf einem statischen EM-Bild nicht erkennbar und das Objekt unsichtbar. Zu sehen ist aber die daraus resultierende Amplitudenmodulation (sichtbarer Kontrast entsteht immer durch Amplitudenunterschiede). Maximale Realitätstreue ist bei einem Gangunterschied von $\pi/2$ gegeben, den nach Otto Scherzer benannten Scherzer-Fokus. Leider lässt sich das nicht für alle Beugungswinkelbereiche gleichzeitig realisieren, ein Sachverhalt der in der Kontrastübertragungsfunktion (CTF, Abbildung 28) ausgedrückt wird. Sie stellt den Verlauf des Kontrastes (Maximalwert = 1; schwarz-weiß) als Funktion der Ortsfrequenz $1/m$ (also im Fourierraum) da.

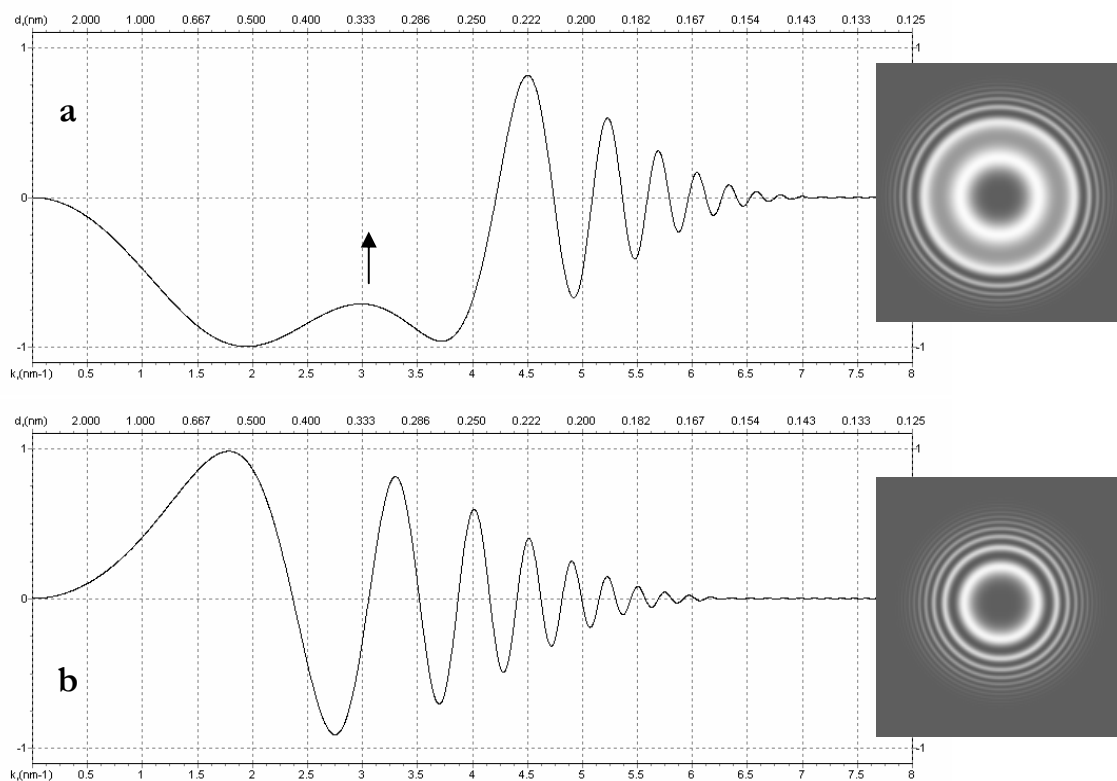


Abbildung 28. Kontrast-Transfer-Funktion CTF.

Links immer CTF in 1D-, rechts in 2D-Darstellung, erstellt mit CTF-EXPLORER von Max Sidorov. a) im Scherzer-Fokus: Unterfokus mit einer Phasenverschiebung über einen weiten Beugungswinkelbereich von ca. $\pi/2$. Die Kurve beginnt im Negativen Kontrastbereich und bleibt auch über einen großen Ortsfrequenzbereich (Abszisse) dort ohne zu oszillieren. Weitere Verschiebung in den Unterfokus erzeugt schon bei kleinen Ortsfrequenzen zusätzliche Kontrastübergänge (Pfeil) und damit mehr Bereiche mit geringem Kontrast (um null) aber auch für das Auge sichtbare Information. b) Überfokus, die Kurve beginnt bei kleinen Ortsfrequenzen im positiven Bereich.

Die aus der Natur der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von kleinen Objekten (Kontrast durch Phasendifferenz, siehe oben) herrührende Fehlinformation muss eliminiert werden. Die Korrektur verbessert die Ausrichtung und damit die Klassifizierung sowie die Rekonstruktion entscheidend. Ohne sie ist eine verlässliche Rekonstruktion aus solchen Bildern kaum möglich. Das Ergebnis der Arbeit am Hämocyanin von *Palinurus elephas* unterstreicht dies deutlich (Meissner and Stohr et al., 2003).

Der vorwiegend aus der Phasenverschiebung der abbildenden Elektronen herrührende Kontrast der EM-Bilder wurde mit dem Programm Ctffind3 ermittelt, als Defokuswert (Tabelle 7) erfasst und mittels der Flip-Methode des IMAGIC-5-Moduls `transfer` korrigiert (B.2.1.2.4, Seite 38), welches die negativen Teile der CTF-Kurve invertiert:

$$F'(k) = \begin{cases} -F(k) & \text{for } H(k) < 0 \\ F(k) & \text{for } H(k) > 0 \end{cases}$$

Ein weiterer Fehler, der Astigmatismus, also die strichförmige Verzeichnung von Bildpunkten, gilt es zu vermeiden. Bilder die diesen Fehler (in zu starken Masse) aufweisen sind als Primärdaten unbrauchbar, da sie artefaktische, also nicht realitätsgetreue Repräsentationen der Partikel zeigen. Anhand der Analysebilder von Ctffind3 (Abbildung 45, Seite 61) und deren Ellipsendurchmessern war eine optische und nominelle Überprüfung der Primärbilder auf Astigmatismus möglich. Es wurden nur aus solchen EM-Bildern die Einzelpartikelbilder für die Rekonstruktion mit dem Programm Boxer (EMAN) aus den EM-Bildern selektiert, welche einen tolerierbar kleinen Astigmatismusfehler aufwiesen.

2.1.3. Prozessierung des konkreten Filmmaterials nach Kodak

Die Objekte, können im Transmissionselektronenmikroskop auf dem Phosphorleuchtschirm bzw. einer CCD-Kamera direkt angeschaut werden. Um diese Bilder der Bildprozessierung zugänglich zu machen, wurden das Filmmaterial SO-163 der Firma Kodak mit den transmittierten Elektronen belichtet. Die Silberhalogenidkristalle auf dem Filmmaterial wurden mit Entwickler D-19 der Firma Kodak in eine mit Stickstoffgasblasen durchmischte Entwicklerkammer (Abbildung 29) zur ausreichenden Bildschwärzung (Überentwicklung nach Kodak bei Unterbelichtung) gebracht und mit dem Fixierer Agfa AGEFIX eine Folgeschwärzung unterbunden. Die Bilder wurden dazu 3-4 Minuten entwickelt, eine Minute mit Wasser gewaschen, fünf Minuten in Fixierlösung getaucht, 20 Minuten gewaschen und nach Benetzung mit Seifenlösung 40 Minuten im Luftstrom getrocknet.

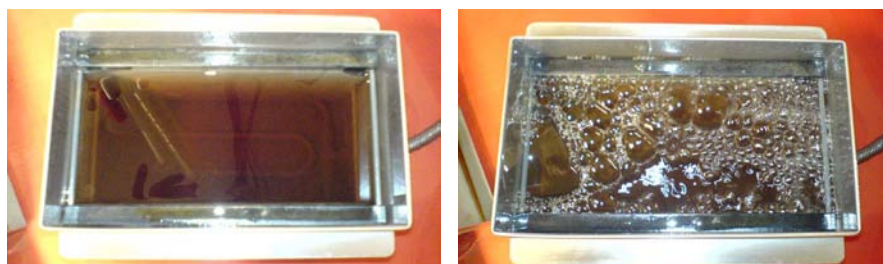


Abbildung 29. Film-Entwicklerkammer.

Links: Am Wannenboden ist die Gaseinleitungsröhre zu sehen. Rechts: Stickstoffgas durchströmt die Entwicklerlösung und vermeidet so laminare Schlieren auf dem Film.

2.1.4. Digitalisieren der Bilder (Densitometrie)

Die EM-Bilder werden mit weißem Licht durchstrahlt und das Signal über eine Vergrößerungsoptik einem CCD-Chip zugeleitet. Dieser setzt die optischen Helligkeitswerte bzw. Schwärzungswerte (Density) in diskrete, maschinenlesbare Bitwerte um, in diesem Fall 8 Bit pro Pixel, das heißt, es stehen 256 verschiedene Helligkeitswerte zu Verfügung, um ein Pixel zu repräsentieren. Aufgenommen wurden die Bilder mit einem Vergrößerungsfaktor von nominell 49.000 und korrigiert 59.000 (ein nm wird auf 59 μm abgebildet) und mit einer Auflösung von 0,154 nm pro Pixel eingescannt - ein nm wird von ca. 6,5 Pixel abgebildet (Beispiel siehe: Abbildung 44 Seite 61). Um eine Mischung von Enantiomeren auszuschließen wurden die Bilder alle in gleicher Ausrichtung auf die Scannerwalze aufgebracht.



Abbildung 30. Trommelscanner (Heidelberger Druckmaschinen).

Dieser mittlerweile nicht mehr hergestellte Scanner erlaubt Scangenaueigkeit bis 10000 dpi.

2.2. Bildbearbeitung

Mit Einzelpartikelanalyse oder -rekonstruktion (“single particle reconstruction”; siehe auch A.4 3D-Rekonstruktion) wird das Erschließen der räumlichen Struktur eines Objektes aus dessen bildlicher Repräsentation von individuellen Instanzen des Objektes in Form von 2D-Projektionen bezeichnet. Der Begriff Rekonstruktion könnte implizieren, dass die Struktur in irgendeiner Phase der Präparation zerstört worden wäre und im Verlauf der Rekonstruktion wieder zusammengebaut würde. Die Struktur eines Moleküls möglichst unversehrt zu erhalten ist aber gerade das Ziel dieser Präparation. Der Begriff Rekonstruktion bezieht sich auf die Tatsache, dass aus der impliziten Tiefeninformation aus zweidimensionalen Projektionsbildern die dreidimensionale Struktur rekonstruiert wird. Die Aufnahmebedingungen sollten möglichst strukturehaltend, also wenig strahlenbelastend für die biologischen Moleküle, gewählt werden. Dieses sind Voraussetzungen, um überhaupt verlässliche Strukturaussagen treffen zu können. Dabei versucht man, die natürliche Struktur zu erhalten und ein möglichst originalähnliches Abbild derselben zu erzeugen oder zu rekonstruieren, also die Struktur sichtbar zu machen. Man könnte also von einer “3D Visualisierung der Struktur“ sprechen. Die zur Verfügung stehenden Aufnahmebedingungen für biologische Moleküle können die theoretisch mögliche Auflösung des im Transmissionsmodus betriebenen Elektronenmikroskop wegen der geringen Strahlungsresistenz der Moleküle nicht ausschöpfen, so dass Strukturdetails durch die Techniken der Computer gestützten Bildbearbeitung rekonstruiert werden müssen. Hier spielt dann vor allem die Genauigkeit der Raumwinkelfindung für die Objektrepräsentationen und die statistische Bildqualitätsaufwertung durch Quantität der in die Bildrekonstruktion eingehenden Einzelobjekte, die einem Schnittaufnahmeverfahren (Tomographie (altgriech. *tome* - Schnitt)) entspricht, die entscheidende Rolle. Technisch gesehen geht man von einer überlagerungsbehafteten Darstellung (die Tiefeninformation aus vielen Projektionen aus unterschiedlichen Winkeln wird zu einem Mischwert überlagert), den 2D-Projektionsbildern aus und rechnet diese in eine überlagerungsfreie Darstellung, dem 3D-rekonstruierten Objekt, um (B.2.2.8 3D-Bild-Rekonstruktion ab Seite 54).

2.2.1. Teilchensuche und Vereinzelung der Teilchen

Die eingescannten Bilder (.tif) müssen zur weiteren Bearbeitung in IMAGIC einmalig mit dem IMAGIC-Konverter `em2em` in dessen eigenes Format (.img und .hed) überführt werden. Das konvertierte Bild zeigt bei gelungener Präparation und Aufnahme mehrere hundert oder gar tausend Teilchen als helle Strukturen (Hintergrund dunkel) mehr oder weniger gut sichtbar. Diese müssen vom Bearbeiter in einem interaktiven Prozess lokalisiert werden. IMAGIC-5 stellt hierfür in seinem interaktiven Ansichtsmodus `display` die benötigten Werkzeuge zur Verfügung. Mit der Funktion `scan` kann das Gesamtbild in Felder eingeteilt werden, die nacheinander vergrößert angezeigt werden können. Dies erleichtert das Auffinden eines interessierenden Teilchens und das Markieren (Picken) dessen ungefähren Zentrums; eine genauere Lage des Molekülschwerpunktes wird später bei der Ausrichtung bestimmt. Mit der Funktion `coos`, alles innerhalb von `display`, können die Koordinaten der gewählten Molekülzentren in einer Datei (im IMAGIC-Plot-Format .plt) festgehalten werden. Das Programmpaket EMAN von Steven J. Ludtke des "National Center for Macromolecular Imaging" gibt mit dem Modul `Boxer` eine wesentlich komfortablere Methode mit graphischer Oberfläche an die Hand und stellt Algorithmen für semiautomatische Partikelselektion zur Verfügung.

Das Kommando `subfile` benutzt die Koordinatensätze aus der von `coos` erzeugten Plot-Datei, um die Moleküle als Einzelbilder mit vom Bearbeiter bestimmten Kantenlängen aus dem Gesamtbild zu extrahieren. Die größte Ausdehnung des Teilchens sollte etwa zwei Drittel der Bildgröße einnehmen. Die isolierten Einzelmolekülbilder werden in einer neuen Bilddatei als Bildergalerie gespeichert (Abbildung 31). Die Einzelbilddateien aus verschiedenen Originalbildern werden mit `append-image` zusammengefasst.

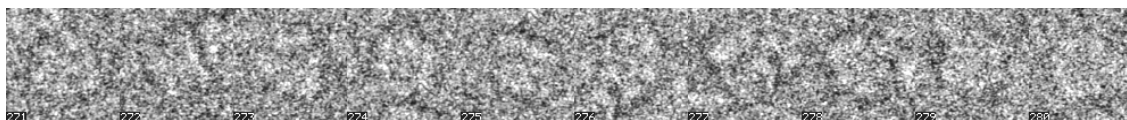


Abbildung 31. Extrahierte Einzelmoleküle in einer Beispiel-Bildergalerie.

Bilder wie sie aus einem EM-Bild extrahiert wurden, hier am Beispiel von PiHc.

2.2.2. Filtern und Normieren

Mit dem folgenden Schritt wird eine Maske in Form eines Innkreises eingepasst, welche die Helligkeitswerte der Pixel außerhalb des Kreisradius zu Null setzt. Damit werden grob die Nichtmolekülstrukturen und Nachbarmoleküle entfernt. Natürlich darf der Radius der Kreismaske nicht so gewählt werden, dass die gepickten Moleküle beschnitten werden. Mit dem Modul `incor-preparation` wird das erreicht und gleichzeitig eine Normierung und Filterung auf die Bilder angewandt.

In Digitalkameras werden die Helligkeitswerte des Bildes mit lichtempfindlichen Sensoren (in den Pixeln) "gemessen" und in digitale Werte (= Zahlen) umgewandelt. Bei diesem Prozess entsteht nicht nur ein Nutzsignal, sondern auch Störungen, welche Ursache des Bildrauschens sind. Das Resultat ist vergleichbar mit dem so genannten "Korn" bei der analogen Fotografie. Bei der Rekonstruktion aus analogen EM-Bildern treten, bei den konkreten Aufnahmen der

EM-Bilder und beim Digitalisieren desselben, also gleich zweifach Rauschphänomene auf, welche durch Filterung reduziert werden können.

Ein Hauptproblem bei dieser Arbeit war, dass es keine Bilder aus schon bekannten Rekonstruktionen gab, die als Referenzen für die Ausrichtungen (Alignment) und als Grundlage für eine Winkelannahme für die Winkelrekonstruktion hätten dienen können. Da eine zentrale Lage und vergleichbare Orientierung der einzelnen Teilchen Grundvoraussetzung für eine Aufsummierung und damit für eine Detailverbesserung ist, stellt das Alignment eine Schlüsseloperation dar. Von ihr hängen alle weiteren Ergebnisse ab. Der Erfolg der Ausrichtung hängt wiederum stark von der Eliminierung von Störinformationen und von der Wahl der Referenzen ab – der Ausrichtung liegt als Prinzip eine Übereinstimmungsanalyse (Korrelationsverfahren) zwischen ausgerichteter Referenz und auszurichtenden Teilchen zugrunde. Mit den hier und im Folgenden benutzten Referenzen sind konkrete, ausgezeichnete Bilder gemeint, aufgrund der in ihnen enthaltenen Information andere Bilder manipuliert werden. Diese sollten nicht mit der in der Einleitung angesprochenen Referenz, der Röntgenstruktur, verwechselt werden, welches als Strukturmodell, prinzipielle Verifikationsquelle und Diskussionsgrundlage dienen soll.

Störinformationen können a) statistisch verteilte falschwertige Pixel sein, das so genannte Rauschen oder b) graduelle Fluktuationen in der durchschnittlichen Dichte, die von der flächigen Ausleuchtung des Präparats oder der EM-Bilder abhängen⁵. Die verwendeten Termini sind für a) hohe, für b) niedrige Ortsfrequenzen. Das Rauschen kann durch einen Tief-Pass-Filter verringert werden, ist aber für die Ausrichtung nicht so störend wie die niedrigen Ortsfrequenzen. Diese können die Korrelation bei dem Alignment nachhaltig beeinflussen, indem sie als vermeintliche Molekülinformation eingehen. Auch diese können mit einem Hoch-Pass-Filter reduziert werden. In Kombination wirken beide zusammen als Band-Pass-Filter. Sie sind als Gausfilter ausgelegt, das heißt, es wird nicht einfach bei einer Ortsfrequenz abgeschnitten, sondern wirken progressiv in Abhängigkeit von der Ortsfrequenz (Abbildung 32). Dieses vermeidet Probleme mit scharfen Trennwerten (cutoffs) für die Ortsfrequenzen. Die Trennwerte spezifizieren die Tief- und Hoch-Pass-Filter im Bezug auf die durchgelassenen Frequenzen: Frequenzen unterhalb des Nieder-Frequenz Trennwerts werden verringert, oberhalb durchgelassen; entsprechendes gilt für den Hoch-Frequenz Trennwert.

⁵ Ungleichmäßigkeiten in der Kontrastierung spielen hier keine Rolle, da nicht angewandt.

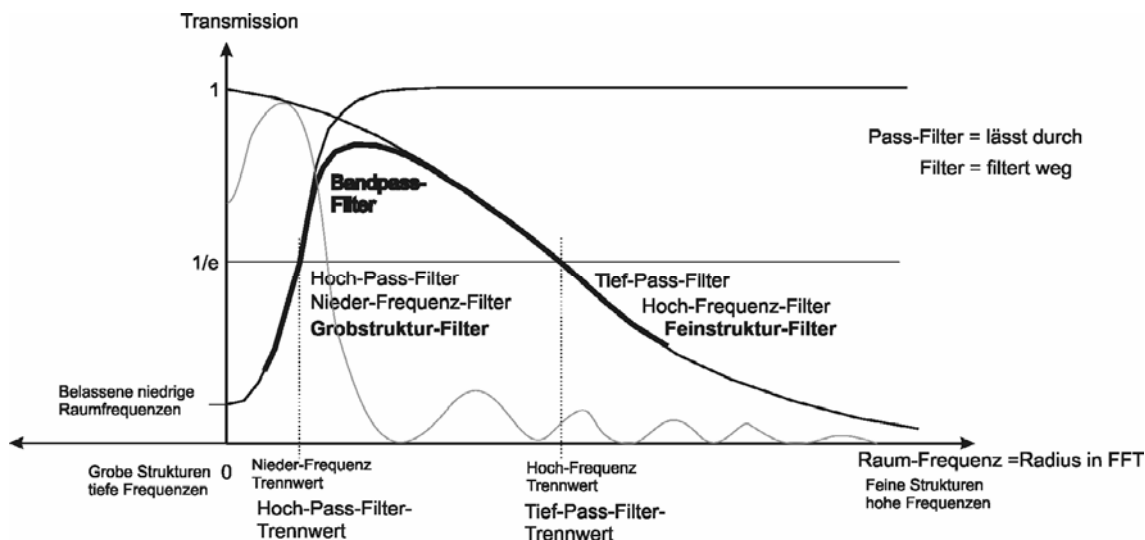


Abbildung 32. Band-Pass-Filter.

Hoch-Pass-Filter und Tief-Pass-Filter zusammen ergeben einen Band-Pass-Filter.

Der Filteralgorithmus von IMAGIC nutzt die Transformation in den Fourierraum, eine Darstellung in Abhängigkeit von den Ortsfrequenzen, welche mit einfachen mathematischen Operationen gezielt ausgeblendet werden können. Das gefilterte Bild wird zurück in den Bildraum (Realraum) transformiert. Beide Darstellungsarten enthalten die gleiche Information. Die Schwierigkeit besteht darin, dem Kommando `incore-prepare-filter` sinnvolle Parameter für die Trennwerte anzugeben, um nicht zuviel signifikante Teilcheninformation wegzufiltern und doch Störinformation möglichst zu eliminieren. Die Formeln

$$\text{High-pass cut off} = 2 * \text{Pixelgröße} / \text{Partikelgröße}$$

$$\text{Low-pass cut off} = 2 * \text{Pixelgröße} / \text{Auflösung}$$

für die Bestimmung der Filterwerte berücksichtigen die Größe des Objektes und die erwartete Auflösung und können einen Anhaltswert liefern, führen aber nicht zwangsläufig zu guten Ergebnissen – hier muss durch Ausprobieren ein Kompromiss gefunden werden. Ein Teil des Hintergrundes wird mit einer Kreismaske ausgeblendet. Anschließend werden die Bilder innerhalb der Kreismaske auf vergleichbare Helligkeitswerte normiert.

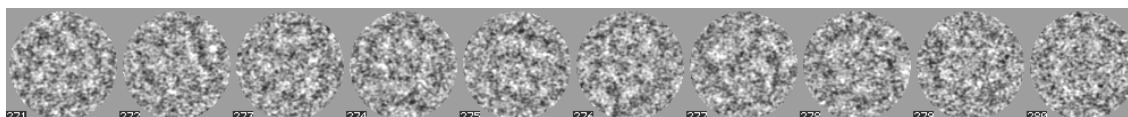


Abbildung 33. Maskierte und Band-Pass-gefilterte Beispiel-Einzelbilder.

Die selben Bilder wie in Abbildung 31 aber mit einem Band-Pass-Filter belegt.

2.2.3. Ausrichtung (Alignment)

Wie schon erwähnt, werden mit den Informationen aus „guten“ Bildern, den Referenzen, andere, „weniger gute“ Bilder manipuliert. Um Referenzen für das Ausrichtungsverfahren zu finden, muss man eine Vorstellung von der Struktur des Objektes haben. Eine Referenz aus dem SAXS-Modell des 24-mer basierend auf der Röntgenstruktur von *Panulirus interruptus* von Gaykema (Gaykema et al., 1984) von Herrn Dr. Hartmann (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002) vom Institut für Molekulare Biophysik führte nicht zum Erfolg, es konnte damit aber eine vermeintliche Aufsicht (Blickrichtung annäherungsweise entlang der

Hauptsymmetrieachse) und Seitenansichten der markanten Geometrie von EcHc den Projektionsbildern zugeordnet werden. Referenzen (hier sind EM-Bilder gemeint) sollten einige Kriterien erfüllen: die abgebildeten Teilchen sollten möglichst rauscharm, gut ausgerichtet und nicht beschädigt sein, und sie sollten isoliert von anderen Molekülen liegen.

Aus genannten Gründen kann man die Einzelbilder nur relativ wenig vom Rauschen befreien. Die ersten Referenzen müssen aber aus diesen ausgewählt werden, falls keine rauschfreien Referenzen aus vorherigen Bearbeitungen zur Verfügung stehen. IMAGIC stellt für die ersten Bearbeitungen der Referenzen und die ersten Alignments mit diesen verrauschten Referenzen darauf optimierte Werkzeuge bereit. Der Algorithmus von `ali-mass` versucht den Intensitätsschwerpunkt des Teilchens zu ermitteln und diesen im Zentrum zu justieren, um die per se nicht unbedingt bessere Zentrierung des Referenz-Teilchen zu optimieren. Diese Referenz sollte sich nun durch Annäherung an oben geforderte Kriterien von den restlichen Bildern hervorheben. Alle weiteren Referenzen aus dem verrauschten Datensatz werden so behandelt.

Für den Fall, dass schon eine Klassifizierung durchgeführt wurde (siehe weiter unten), können geeignete Klassenbilder als Referenzen für ein weiteres Alignment benutzt werden. Die gewählten Klassenbilder werden konturiert und in eine Datei zusammengefasst, die als Eingabedatei für ein weiteres Multi-Reference-Alignment dient. Mit diesen Referenzen ist eine Verbesserung des Alignments zu erwarten, da sie ein besseres SRV besitzen und besser ausgerichtet sein sollten.

Für den Fall, dass schon eine Rekonstruktion durchgeführt wurde (siehe weiter unten), können direkt Rückprojektionen von dieser als Referenzen für ein neues Alignment genommen werden. Diese Bilder müssen nicht weiter behandelt werden, da sie keinen störenden Hintergrund beinhalten, nicht verrauscht aber ausgerichtet sind.

Man muss also zwischen zwei Ausrichtungsarten unterscheiden: a) die zweidimensionale Orientierung (rotational) und Zentrierung (translational) der zweidimensionalen (2D) Projektionen der Teilchen in der Bildebene und b) die Ansicht der dreidimensionalen Teilchen, die dem Betrachter auf dem Bild geboten wird, also der Ansichtswinkel (Projektionswinkel) der Teilchen oder anders gesagt die räumliche (3D) Orientierung der Teilchen. A) wird mit dem Alignment (Abbildung 34) so optimiert, dass der Massenschwerpunkt jedes Teilchens so gut wie möglich in der Mitte seines Bildes zentriert wird. Jedes Teilchen wird, relativ zu den anderen, in die gleiche (definierte) Ausrichtung auf der Bildebene ausgerichtet (in Bezug auf die Symmetrie des Teilchens, genauer, der α -Winkel des Teilchens im Raum; siehe B.2.2.6.1 Winkeldefinition nach Euler Seite 51). Dies wird anhand von Vergleichen zu Referenzbildern durchgeführt, welche diese Kriterien schon möglichst gut erfüllen sollten. B) ist eine andere Problemklasse und wird innerhalb der später besprochenen Klassifizierung (B.2.2.5 Seite 48) auf andere Art gelöst; die Ansichten werden nicht auf eine Referenz ausgerichtet, sondern in Ansichtsklassen eingeteilt.

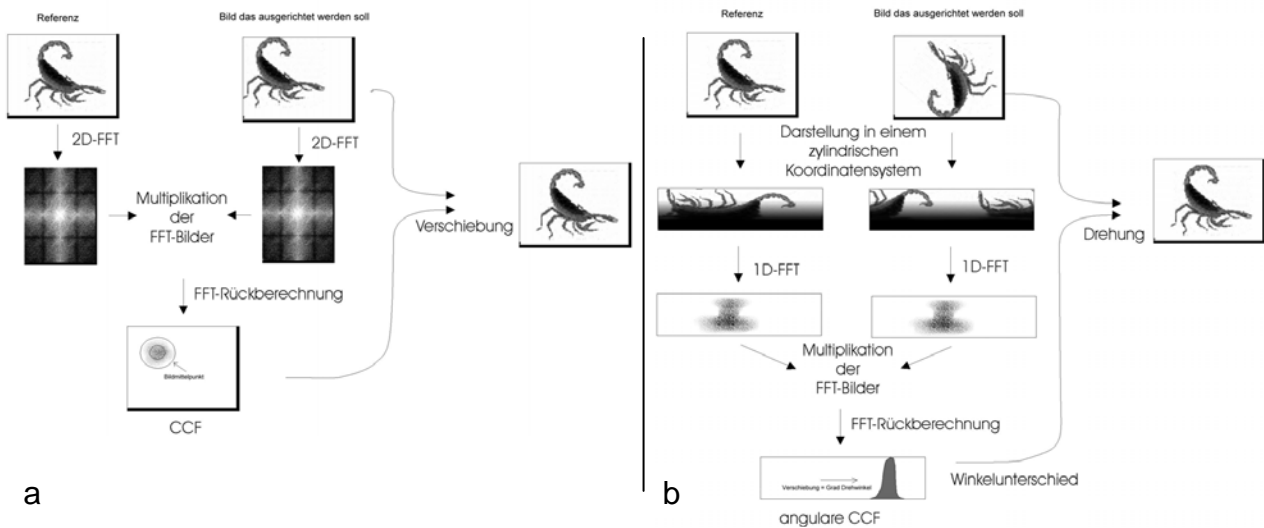


Abbildung 34. Ausrichtung der Objektbilder (Alignment).

a) Translationale Ausrichtung, der Verschiebungsvektor ergibt sich aus dem Maximum der Kreuz-Korrelations-Funktion (CCF). b) Rotationale Ausrichtung, der Drehwinkel ergibt sich aus dem Maximum in der Rotations-Korrelations-Funktion. Aus (Schatz, 1992).

Bei der Ausrichtung wird jedes Bild des Datensatzes mit jeder Referenz verglichen und der so genannte Kreuz-Korrelations-Koeffizient und der Rotations-Korrelations-Koeffizient zwischen beiden bestimmt. Aus den Koeffizienten lassen sich die Verschiebungsstrecken und –winkel, um welche die Bilder an die Referenz angepasst werden müssen, um Übereinstimmung in der Ausrichtung zu erzielen, ermitteln. Da die auszurichtenden Bilder zu Anfang weder zentriert sind noch eine einheitliche Ausrichtung besitzen, die zentrale Lage der Teilchen aber Voraussetzung ist für einen erfolgreichen Gestaltvergleich der Teilchen zum Zwecke ihrer rotationalen Ausrichtung und umgekehrt ist, ist eine einzige Ausrichtung nicht ausreichend, um verwertbare Ergebnisse zu erhalten; ein iteratives Vorgehen ist indiziert. Derselbe Datensatz wird mehrmals durch aufeinander folgende Alignments mit neuen Referenzen ausgerichtet, wobei die Ausgabedatei immer als Eingabedatei dient.

Der Kreuz-Korrelations-Koeffizient wird erhalten indem die Bilder in den Fourierraum transformiert und komplex multipliziert werden (Abbildung 34). Das in den Bildraum zurücktransformierte Produkt zeigt ein Helligkeitsmaximum, das bei ähnlichen Bildern die in der Bildebene gegeneinander verschoben sind, um bestimmte x- und y-Werte aus der Mitte verschoben ist. Dieses Maximum kann in der Kreuz-Korrelations-Funktion gesucht werden, es stellt den Kreuz-Korrelations-Koeffizienten dar. Für die Findung des Rotations-Korrelations-Koeffizienten werden Bild und Referenz in Zylinderkoordinatenbilder umgewandelt und fouriertransformiert. Das Maximum der Rotations-Korrelations-Funktion ergibt den Verschiebungswinkel bezüglich der Referenz. Mit den ausgerichteten (und klassifizierten, siehe unten) Einzelbildern ist es nun möglich eine sinnvolle Aufsummierung durchzuführen (Abbildung 35). Ohne Ausrichtung ergibt das Summenbild nur eine diffuse Helligkeitsverteilung, mit Ausrichtung erkennt man das Projektionsbild des Teilchens.

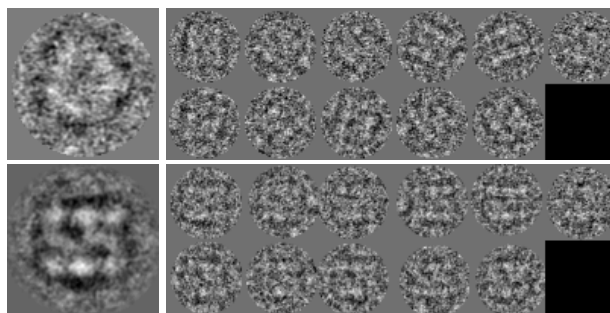


Abbildung 35. Vergleich von Summenbildern am Beispiel von PiHc.

Oben: nicht ausgerichtet. Unten: ausgerichtet (und klassifizierte, siehe Klassifizierung). Links: Summenbilder. Rechts: Einzelbilder, aus denen gemittelt wurde. Das Summenbild aus nicht ausgerichteten und nicht klassifizierten Einzelbildern (oben links) zeigt weniger sinnvolle Information als die Einzelbilder. Das Summenbild aus ausgerichteten Einzelbildern verstärkt die Information, welche die Molekülstruktur repräsentiert.

Im Falle, dass noch keine Referenz (und kein ausgerichteter Datensatz) vorhanden ist, muss man ein geeignetes Bild aus dem verrauschten (nicht ausgerichteten) Datensatz heranziehen. Ab dem zweiten Alignment mit dem Kommando `align-noisy-reference` spricht man von einer so genannten Multi-Referenz-Ausrichtung (MRA). Jede weitere verrauschte Referenz, die aus dem vorangegangenen Alignment genommen wird, geht im Prinzip mit einem `align-first-reference` in das Alignment ein. Zusätzlich wird ein so genanntes “equivalent rotation” angewandt. Die Verschiebungen und Rotationen aus mehreren Ausrichtungen werden dabei in einem Interpolationsschritt aus den originalen, gefilterten Bildern ausgeführt. Dieses vermindert Detailverluste, die durch wiederholte Iterationen entstehen können. Im abschließenden “conditional copy” werden die Kreuz-Korrelations-Koeffizienten der Bilder aus dem letzten und vorletzten Alignment verglichen und nur jene Bilder mit dem höheren Koeffizienten in die Ausgabedatei kopiert. Das Alignment mit der letzten Referenz wird also immer nur auf die Bilder wirklich angewandt, für die es eine bessere Ausrichtung bringt, die anderen Bilder waren in (irgend-) einer Iteration zuvor schon besser auf die zu dieser Iteration gehörenden Referenz ausgerichtet. Im Endeffekt wird also jedes Bild mit jeder Referenz verglichen. Der Aufwand kann also bei vielen Bildern im Datensatz (n) und vielen verwendeten Referenzen (m) enorm sein, er steigt linear an: $m \cdot n$. Die Ausrichtung ist neben der Winkelrekonstruktion (unten) die zeitaufwendigste Bearbeitung. Stehen nach einer MSA (siehe weiter unten) weniger verrauschte Bilder bzw. nach einer Rekonstruktion (siehe weiter unten) rauschfreie Bilder als Referenzen zur Verfügung, können mit dem IMAGIC Kommando `multi-reference-alignment` gleich mehrere Referenzen in einer Eingabedatei zusammengefasst, in ein Alignment eingehen. Die Arbeitsweise ist der von `align-noisy-reference` ähnlich, es wird aber kein initiales Alignment ausgeführt - die Referenzen sind schon von guter Qualität.

2.2.4. Klassifizierung und Winkel-Findung versus Projektions-Referenzierung

Eine Ausrichtung im Zuge der Einzelpartikel-Analyse ist wegen der Anwesenheit verschiedener Molekülansichten (siehe B.2.2.5 MSA) problematisch. Diese stellen grundsätzlich verschiedene Orientierungen im Raum dar und können damit per se nicht mit Bewegungen in der Bildebene ausgerichtet werden. Um das Problem zu lösen, kann man mittels einer Multistatistischen Analyse (MSA) versuchen diese Raumorientierungen nach oder vor einem Alignment zu trennen und ähnlich orientierte Teilchen in Klassen zusammenzufassen. Alternativ kann man quasi das Problem während des Alignments, durch Benutzung von (vielen)

Ausrichtungsreferenzen und Zuweisung derer Winkel zu den ausgerichteten Projektionen (Projektions-Referenzierung), umgehen. Letzteres hat den Vorteil, dass eine aufwendige Winkelfindung über eine Sinogrammkorrelation, wie bei der erstgenannten Methode nötig, entfällt, aber den Nachteil, dass die Winkel sich immer in diskreten Vorgaben bewegen. Dies kann aber durch gezielte Benutzung von mehr Referenzen verfeinert werden. Beide Methoden können letztendlich nur 2D-Bilder auswerten. Der Unterschied: i) Kreuz- und Rotationskorrelation im Fourierraum, Hauptachsenanalyse im Multidimensionalen Raum (MSA) und Sinogrammkorrelation zur Winkelfindung. ii) Kreuz- und Rotationskorrelation im Fourierraum, simple Zuweisung der Referenzwinkel. Bei ersterem ist bei der Ähnlichkeitsfindung im Zuge der MSA eine Rauschreduzierung inbegriffen aber die Ergebnisse sind oft zweifelhaft, wenn man sich die ungleichen Mitglieder einer Zusammenfassung ansieht. Die Sinogrammkorrelation bei der Winkelrekonstitution kann nur bei wenig verrauschten Bildern sinnvoll arbeiten. Das scheint der Vorteil der zweiten Methode zu sein, sie benötigt weniger Schritte und ist deshalb weniger fehleranfällig. Für einen Überblick siehe Abbildung 21 und Abbildung 22.

2.2.5. MSA, Klassifizierung

In Molekülpopulationen sind in der Regel mehrere Ansichten (Projektionen, siehe Ausrichtung) vorhanden. Um die, durch das Alignment relativ zueinander in der Bildebene ausgerichteten, Bilder der Teilchen nun zum Zwecke der Detailaufbesserung mitteln zu können, müssen diese die gleiche Ansicht der Teilchen repräsentieren. Die verschiedenen (charakteristischen) Ansichten müssen erkannt und klassifiziert werden. Hierzu kommt die Technik der Multivariaten Statistischen Analyse (MSA) zum Einsatz (van Heel and Frank, 1981). Sie bedient sich der Korrespondenz Analyse (eine spezielle Form der Haupt-Komponenten-Analyse), um relevante Information aus dem heterogenen Datensatz zu extrahieren. Die Projektionsklassen werden getrennt gemittelt. Mittelung nicht klassifizierter Bilder hätte den gleichen Effekt wie Mittelung nicht ausgerichteteter Bilder. Zudem wäre keine (sinnvolle) Zuweisung von Eulerwinkeln (Lagewinkel des Moleküls, siehe Winkelrekonstruktion) möglich, da nicht nur die Bilder einer charakteristischen Ansicht in einer Klasse vereint wären.

Meist müssen umfangreiche Datensätze mit tausenden von Bildern mit mehreren tausend Bildpunkten analysiert werden. Ein Vergleich aller Bildpunkte ist in keinem vernünftigen zeitlichen Rahmen durchführbar. Eine Datenreduktion ohne Einbuße an Signifikanz der Bild-Information und eine Möglichkeit des Vergleichs der Ähnlichkeit der Information ist erforderlich. Die MSA erfüllt diese Anforderungen und vermindert gleichzeitig den Einfluss des Rauschens.

Jedes Bild aus $n \times n = p$ Pixel kann durch einen Punkt (p -dimensionaler Vektor) in einem p -dimensionalen Raum repräsentiert werden, der gesamte Bildbestand bildet eine Wolke in diesem Raum, dem MSA-Hyperraum. Jede der p Achsen des MSA-Hyperraums repräsentiert einen Bildpunkt des Realbildraumes. Für ein Bild: Jede der p Achsen repräsentiert einen Bildpunkt (den gleichen für alle Bilder) des Realbildes und der Achsenabschnitt den zugehörigen Helligkeitswert. Ein Punkt oder der Vektor, der zu diesem Punkt zeigt, ist im Hyperraum also die Linearkombination der unabhängigen Achsenvektoren (Achsenabschnitte). Zwei Punkte (Bilder) liegen dicht zusammen (sind ähnlich) im Falle ihre korrespondierenden

Achsenabschnitte (Helligkeitswerte) von gleicher Größe sind. Charakteristische Projektionen bilden sich im MSA-Hyperraum als Unterwolken (Cluster) ab. Liegt eine diffuse Verteilung der Unterschiede in den Bildern vor, ist die abgebildete Punktwolke im MSA-Hyperraum strukturlos.

Die Korrespondenz Analyse passt der Datenwolke ein neues, rotiertes Koordinatensystem ein, in welchem die erste Achse in Richtung der größten Inter-Bild-Varianz zeigt (größte Ausdehnung der Wolke, also die unähnlichsten Bilder), die zweite orthogonale Achse in Richtung der größten verbleibenden Inter-Bild-Varianz, usw. Mathematisch führt die Anpassung an die Form der Datenwolke auf ein Eigenvektor-Eigenwert-Problem (Schatz, 1992). Die Datenwolke kann nun (auch) durch das neue Koordinatensystem beschrieben werden. Die Einheitsvektoren der Achsen des neuen Koordinatensystems sind selbst Punkte im Hyperraum und besitzen Bildcharakter wie die anderen Punkte in der Wolke. Sie werden deshalb auch Eigenbilder (Eigenvektoren) genannt. Eine Datenreduktion wird damit erreicht, dass nur die ersten, dominanten Eigenbilder (maximal 69) berücksichtigt werden. Nur die Achsen mit den größten Inter-Bild-Varianzen enthalten signifikante Information, die zur Unterscheidung der Bilder dienen kann, höhere Achsen repräsentieren zunehmend Rauschen. Der Informationsgehalt dieser Achsen zur Unterscheidung der Bilder ist gering und kann unberücksichtigt bleiben. Damit wird die Einwirkung der Rauschinformation auf den Prozess der Klassifizierung größtenteils ausgeschlossen. Der Vergleich der Teilchenbilder wird auf die Auswertung der Abstände in der Datenwolke umgesetzt. Die Datenmenge kann durch die Auswahl der signifikanten Hauptkomponenten um den Faktor 100 – 400 reduziert werden. Der angewandte Klassifizierungs-Algorithmus optimiert auf möglichst große Inter-Klassen-Varianz und kleine Intra-Klassen-Varianz. Er arbeitet nach einem aufsteigenden hierarchischem Prinzip, das ähnliche Bilder in Klassen zusammenfasst, die selbst wieder zu größeren Klassen zusammengefasst werden, bis eine vorgegebene Klassenanzahl erreicht ist. Das IMAGIC-Programm, das die Daten auf die signifikanten Signale reduziert und damit den Einfluss des Rauschens einschränkt und ähnliche Formen zueinander gruppiert wird mit `msa-run` aufgerufen. `msa-run` liefert die Information über die Ähnlichkeit der Bilder relativ zueinander, `msa-classify` teilt die Bilder in die Klassen ein und `msa-sum-classes` berechnet aus den zur jeweiligen Klasse gehörenden Einzelbildern der Klassen die gemittelten Klassenbilder. Es wird dabei kein eigener Bilddatensatz erzeugt, sondern nur die Information der Klassenzugehörigkeit der Einzelbilder festgehalten.

2.2.6. Winkel-Findung für die Objektbilder mittels 1D-Projektionen-Korrelationen

Denkbar, um den ausgerichteten Bildern ihre vermeintlichen Raumorientierungswinkel zuzuordnen sind, erstens: Ausrichtung, MSA und Sinogrammkorrelation; zweitens: Ausrichtung und "Projection-Matching". Der nun folgende Schritt der Winkel-Rekonstruktion befasst sich mit ersterem und hat letztendlich das Ziel die Voraussetzungen zu schaffen wie sie bei einer Tomographie, also der 3D-Bildrekonstruktion aus einer Kippserie, schon vorliegen. Dabei sind die Projektionswinkel definiert und es kann mit dem unten beschriebenen Vorgehen direkt eine dreidimensionale Repräsentation des Objektes erstellt werden. Die Winkel-Rekonstruktion (Angulare Rekonstitution) (van Heel, 1987) berechnet die a priori nicht bekannten Ansichtswinkel der verwendeten Klassenmittelbilder relative zu Referenzen und relativ zueinander. Die Winkel der Referenzen müssen vom Bearbeiter „geraten“ werden. Damit ist

gemeint, aus schon bestehenden Vorstellungen der Objektstruktur durch Schlussfolgerung mögliche Winkel abzuleiten und den Referenzen zuzuordnen. Für diese Arbeit stammten die Anhaltspunkte über die Struktur aus dem SAXS-Modell von Hartmann (Hartmann and Decker, 2002). Daraus konnte ein Winkel-Modell abgeleitet werden, das auf die Referenzen angewandt werden konnte.

Grundlage der Winkelfindung ist die Äquivalenz der Darstellung eines Objektes im Bild- und Fourierraum und das Projektionstheorem (Crowther et al., 1970): Jedes zwei-dimensionale Projektionsbild eines drei-dimensionalen Objektes entspricht im Fourierraum einem zentralen Schnitt (Ebene) durch das Zentrum der drei-dimensionalen Fouriertransformation des drei-dimensionalen Objektes. Liegen zwei verschiedene Projektionen des gleichen drei-dimensionalen Objektes vor, so liegen auch zwei verschiedene zentrale Schnitte im Fourierraum vor. Zwei zentrale Schnitte besitzen immer eine gemeinsame Gerade, die so genannte "common line" (Abbildung 37). Umgekehrt gilt daher auch, dass zwei Projektionsbilder des gleichen drei-dimensionalen Objektes immer eine ein-dimensionale Projektion im Bildraum gemeinsam haben, die der "common line" im Fourierraum entspricht. Das Auffinden der common line und somit die räumliche Zuordnung der Projektionen kann also ohne Umwege über den Fourierraum durchgeführt werden. Mit zwei Projektionen mit einer gemeinsamen Linie ist aber noch nicht ihr Rotationswinkel um diese Linie determiniert. Erst eine dritte Projektion mit einer weiteren "common line" die von der ersten abweicht legt alle Raumwinkel der drei Ebenen relativ zueinander fest (Abbildung 37, rechts). Die Händigkeit lässt sich auf diese Weisen nicht bestimmen (Klug and Finch, 1968).

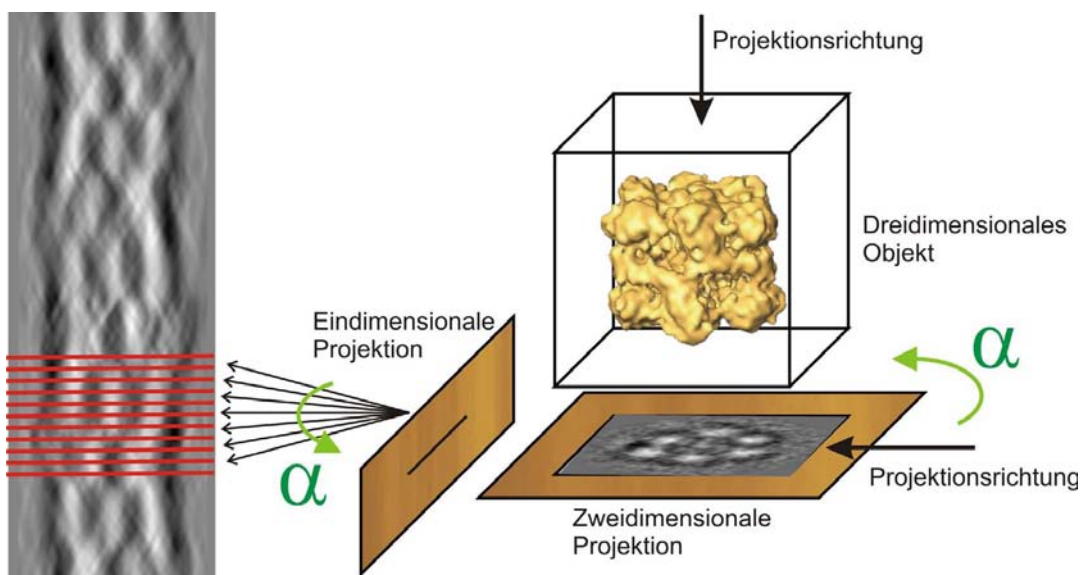


Abbildung 36. Sinogrammerstellung.

Sinogramme sind die in einem Linien-Kombinations-Bild untereinander dargestellten eindimensionalen Projektionen (Linien) von um den α -Winkel gedrehten 2D-Projektionen oder Klassensummen (Flächen) eines 3D-Objektes (Volumen).

IMAGIC bestimmt mit dem Kommando `sinogram` alle 1D-Projektionen in definiertem Winkelabstand und stellt diese Linien untereinander angeordnet in einem Bild dar, dem so genannten Sinogramm (Abbildung 36 links). Die eindimensionale Projektion erhält man, wenn entlang der Flächenausdehnung der zweidimensionalen Projektion durchstrahlt wird (Abbildung

36 rechts unten). So liegt die gesamte räumliche Information in einer Pixellinie gemittelt vor. Die Sinogrammkorrelation versucht dann, anhand der Linien in den Sinogrammen, zu je zwei Projektionsbildern deren gemeinsame Linie zu finden. Dazu werden zwischen allen Zeilen der Sinogramme die Kreuz-Korrelations-Koeffizienten bestimmt und als Helligkeitswerte untereinander in ein Sinogrammkorrelationsbild geschrieben (Abbildung 37). Das Maximum in diesem Bild liefert die Information über die gemeinsame Linie der beiden Bilder. Die Auswertung mehrerer Sinogrammkorrelationsbilder liefert die relative räumliche Zuordnung⁶.

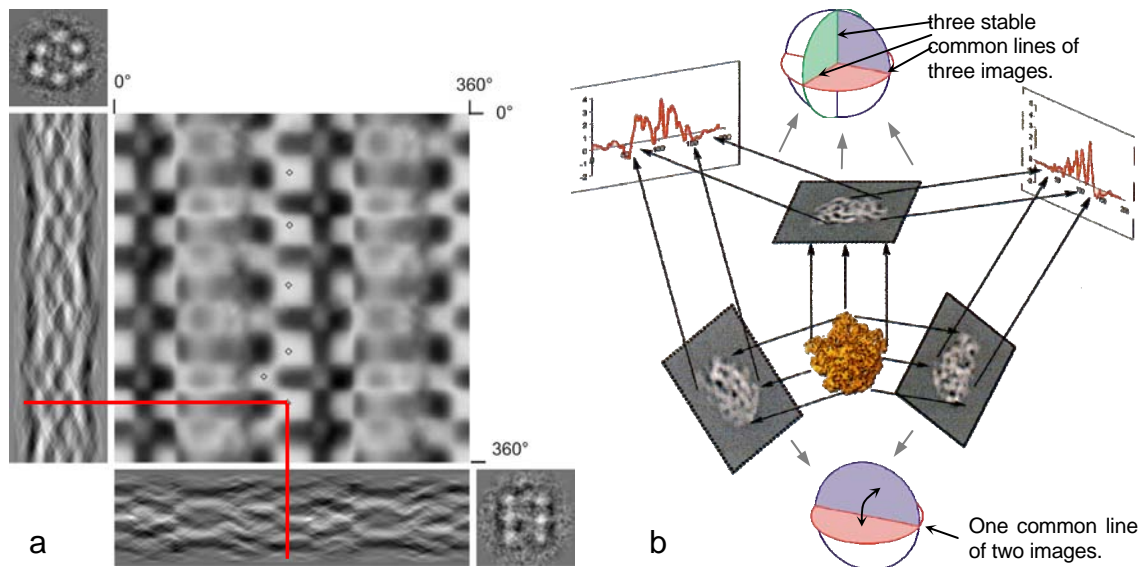


Abbildung 37. Sinogrammkorrelation und Common line.

a) Die Korrelation der beiden Sinogramme kann in Form eines Bildes (großes Quadrat) dargestellt, in dem das Maß der Übereinstimmung der Projektionslinien der beiden Sinogramme als Helligkeitswerte interpretiert werden. Die gemeinsame eindimensionale Projektion der Teilchen ist durch die sich im absoluten Maximum des Korrelationsbildes treffenden roten Linien gekennzeichnet. Ebenfalls dargestellt sind die Klassensummenbilder (kleine Quadrate) aus denen die Sinogramme (Rechtecke) erstellt wurden. b) Common line und Sinogrammkorrelation im räumlichen Bezug (van Heel et al., 2000). Unten: 2D, die beiden Ebenen können sich um die Achse (Common line) drehen. Oben: 3D, alle drei Ebenen sind räumlich relativ zueinander festgelegt

Die Sinogrammkorrelation ist in dem Programm *euler-angular-reconstitution* integriert, das auch deren Auswertung und die Zuordnung der Winkel zu den Klassensummenbildern vornimmt und als Liste ausgibt, so dass der Bearbeiter diese mit den Ansichten vergleichen und bewerten kann. Stehen Rückprojektionen samt Eulerwinkel als Referenzen zur Verfügung, können diese mit der Option *Anchor_set* als solche in die Berechnung eingehen. Sonst müssen den vom Bearbeiter ausgewählten Klassensummenbildern Eulerwinkel vorgegeben werden. Mit der Option *New* ist die Möglichkeit gegeben, sich bei der Zuweisung der Eulerwinkel zu den Ansichten unterstützen zu lassen. *IMAGIC* schlägt dabei einzelne, durch Sinogrammkorrelation berechneten, Winkel vor. Es sollte darauf geachtet werden, die Winkel so zu wählen, dass möglichst keine doppeldeutigen Händigkeiten oder Spiegelsymmetrien vorhanden sind.

2.2.6.1. Winkeldefinition nach Euler

Die mehrfach angesprochene Ausrichtung der Teilchen in der Bildebene und deren Orientierung im Raum bedarf einer Definition. EM-Projektionsbilder haben 6 Freiheitsgrade:

⁶ Bei unverrauschten Projektionen sind diese Zuordnungen eindeutig, so dass drei Bilder genügen.

x, y, z sind die Translations- oder Positions-Freiheitsgerade
 α, β, γ sind die Rotation- oder Winkel-Freiheitsgerade (Eulerwinkel⁷)

X und y spannen die Bildebene auf. Z ist der Normalenvektor auf der Bildebene, Der Betrachter blickt also entlang der z -Achse auf die Bildebene (Abbildung 38). Hier wird z als Teil des orthogonalen Koordinatensystems behandelt, das die Bildebene und die dazu relative Orientierung der Betrachtung definiert, nämlich orthogonal zur x - und y -Achse. Die Koordinate z gibt also hier an wie weit ein Punkt außerhalb, also vor oder hinter der Bildebene liegt.

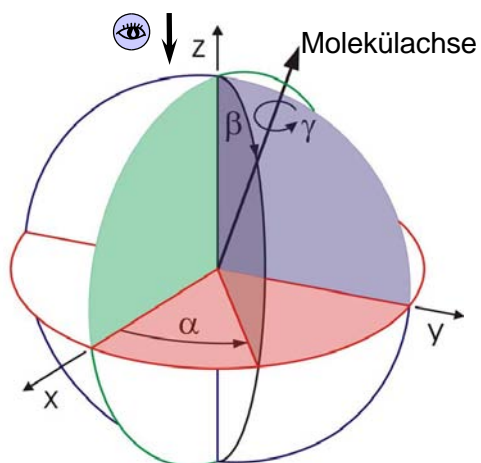


Abbildung 38. Koordinatensystem, Euler-Winkel, Molekülorientierung im Raum.

Auge: Betrachterblickrichtung. Raumorientierungen: Entlang der Koordinatenachsen: $x: \alpha = 0^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = ?$; $y: \alpha = 90^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = ?$; $z: \alpha = ?, \beta = 0^\circ, \gamma = ?$. Parallel zu einer Koordinatenebene: $xy: 0^\circ \leq \alpha \leq 360^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = ?$; $xz: \alpha = 0^\circ, 0^\circ \leq \beta \leq 360^\circ, \gamma = ?$; $yz: \alpha = 90^\circ, 0^\circ \leq \beta \leq 360^\circ, \gamma = ?$ (beispielhaft graue Pfeile). Beliebig: $\alpha = ?, \beta = ?, \gamma = ?$ (beispielhaft schwarzer Pfeil).

Die Molekülachse mit der höchsten Symmetrie wird als Molekül-Achse⁸ oder Molekül-Vektor definiert. An ihr werden die Eulerwinkel relativ zum Bild-Koordinatensystem abgemessen. Der Betrachter sähe die Projektion dieser gedachten Molekülachse auf der Bildebene. Die Molekülachse geht durch den Ursprung des Koordinatensystems.

Die z -Position des Moleküls wird als fest angenommen, da alle Moleküle in der gleichen, von x und y aufgespannten (ideal planare) Bildebene liegen, also gleichen Wert für z haben sollten. Es bleiben somit fünf Freiheitsgerade, die für 3D-Rekonstruktion ausgerichtet bzw. klassifiziert werden müssen:

x, y, α die In-Bildebene-Freiheitsgerade (1)

$\beta, \gamma, (z)$ die Nicht-Bildebene-Freiheitsgerade (2)

(1) x -, y -Koordinaten geben die Lage innerhalb der Bildebene wieder. Falls für den Mittelpunkt des Objektes gilt $x = y = \frac{1}{2}$ Bildabmessung, dann ist das Objekt zentriert. α wird für die

⁷ Spezielles Tripel zur Beschreibung der Lage der Raumachsen des Moleküls. Die Anwendung der Euler-Winkel kann man sich in etwa vorstellen wie die Polarkoordinaten die bei der Beschreibung der Erdsphäre benutzt werden. Für den Betrachter des Bildschirms ist das Koordinatensystem in IMAGIC um die y -Achse so gedreht, das die x -Achse nach unten, also Süden zeigt und die z -Achse nach vorn, der Ursprung also links oben liegt.

⁸ Die Molekülachse mit der höchsten Symmetrie zu benutzen ist sinnvoll, weil dann in vielen Fällen eine (definierte) Aussicht wahrscheinlich ist. Eine Molekül-Achse reicht aus um alle wichtigen Lage-Winkel des Moleküls relativ zum Bild-Koordinatensystem wohl zu definieren.

Ausrichtung der Projektion der Molekül-Achse in der Bildebene definiert, gemessen relativ zur x-Achse des Bild-Koordinatensystems. $\alpha = 0$ bedeutete die Molekül-Achse besitzt Süd-Ausrichtung. In IMAGIC heißt das, in Richtung der x-Achse des Bild-Koordinatensystems, da hier die x-Achse die vertikale Achse ist und die y-Achse die horizontale Achse und der Ursprung in der Ecke oben links liegt. X, y und α sollten durch kreuz-korrelations-basierte Ausrichtungen eingestellt werden können.

(2) β ist der Kippwinkel der Molekül-Achse relativ zur Blickrichtung des Betrachters, also der Winkel zwischen der Bild-Koordinatensystem-z-Achse und der Molekül-Achse (α und γ werden davon nicht beeinflusst. Bei Änderung von α wandert die Spitze des Molekül-Vektors auf einem Parallelkreis zu der Bildebene (falls β ungleich null). Eine optimale Seitenansicht hat $\beta = 90^\circ$, eine optimale Top-Ansicht $\beta = 0^\circ$. γ ist der Drehwinkel des Moleküls um dessen eigene Symmetrieachse, also der Molekül-Achse⁹; hierbei handelt es sich also um eine Rotation des Moleküls, so dass sich bei vorliegender Rotationssymmetrie nach einem bestimmten Winkel gleiche Ansichten bieten (bei der 3er Symmetrie des PeHc nach 120°). Bei einer optimalen Top-Ansicht, also $\beta = 0$, ist α undefiniert, γ tritt an dessen Stelle. (Gleiche) β und γ sollten von automatischen Klassifikationsprozeduren zusammengefasst werden können.

2.2.7. Projektions-Referenzierung (Projection-Matching)

Eine Alternative zur MSA-Klassifizierung und Common-Line-Winkelbindung zur Datenaufbereitung für die anschließende Rekonstruktion ist die unter dem Namen Projection-Matching (Harauz and Ottensmeyer, 1984; Harauz and van Heel, 1986a) bekannte Methode. Sie weist den Einzelpartikelbildern eine Winkelinformation entsprechend den Referenzbildern zu an denen sie ausgerichtet wurden. Man kann die Projektionen mit gleichen Winkeln poolen und erhält so Äquivalente zu den MSA-Klassensummen. Es wurden Referenzen benutzt, deren Winkel homogen über den interessierenden Winkelbereich verteilt waren (Abbildung 39).

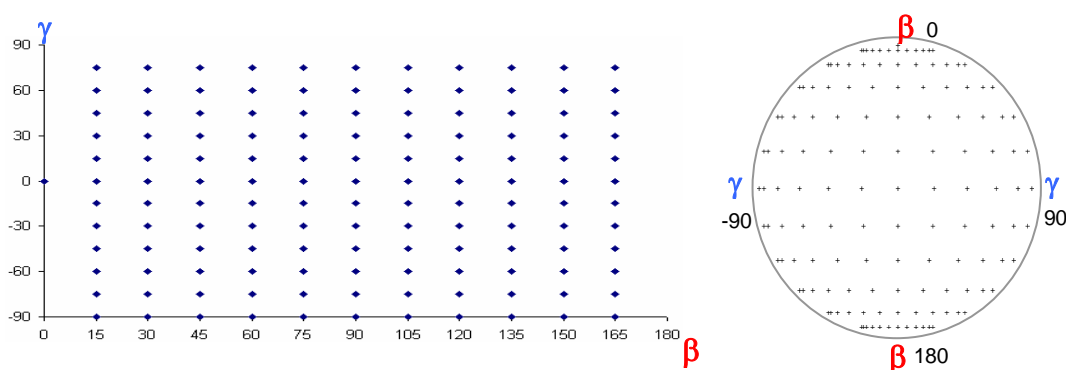


Abbildung 39. Beispielwinkel für Projektions-Referenzierung

Beispiel eines Klassen-Referenz-Winkel-Sets mit großem Inkrement von 15° für Beta- und Gammawinkel (links in kartesischen Koordinatensystem, rechts als Sphäre (Asymmetrisches Dreieck)). Die Verteilung wurde homogen (für alle Bereiche gleiche Inkremente) gewählt, um der Häufung von Ansichten im Bereich der Extrem gerecht zu werden (Abbildung 48). Für die Finale Rekonstruktion wurde bis auf ein Inkrement von $3,6^\circ$ verfeinert.

Leider war zum Zeitpunkt der Bearbeitung meines Objektes diese Methode in IMAGIC-5 so nicht implementiert. Deshalb erstellte ich für die Anwendung dieser Methode ein kleines

⁹ Zur Definition des γ -Winkels kann man eine ausgezeichnete aber frei wählbare Ausrichtung zu Null setzen, man muss nicht die Stellung einer der beiden anderen Achsen heranziehen.

Programm in der Programmiersprache C mit dem Namen `create-mra-plts` welches uns erlaubt im Rahmen eines Skriptes (`create-mra-classes`) IMAGIC-Textausgaben auszulesen und mit den enthaltenen Informationen die Zuordnung von Ausgerichteten Bildern zu den entsprechenden Referenzbildern herzustellen, um eine entsprechende Aufsummierung dieser Bilder zu Klassenbildern vorzunehmen und eine Selektion nach MRA-Verschiebungsparametern der Ausrichtung und MRA-Ausrichtungs-Korrelationswerten zu selektieren (Programm Quelltext von `create-mra-plts` im Anhang). Aus diesen mit Winkeln versehenen Projektions-Pools kann direkt, ohne Umweg über eine aufwendige Sinogrammkorrelation, eine 3D-Rekonstruktion berechnet werden.

Geplant ist nach dieser Arbeit das `creat-mra-plts`-Modul derart zu erweitern, dass eine winkelspezifische Verfeinerung durchgeführt werden kann. Das heißt, dass in Winkelbereichen, deren Klassen besonders populiert sind, der Projektions-Referenzierungs-Algorithmus mit mehr Referenzwinkeln neu angewandt wird (Iteration). Bisher wurde immer der ganze Symmetriewinkelbereich verfeinert, was viel unnötigen Rechenaufwand bedeutet.

2.2.8. 3D-Bild-Rekonstruktion

Alle Schritte vorher dienen im Prinzip nur, um die Einzelpartikelbilder mit Informationen zu ergänzen, eine Bildrekonstruktion, also die winkelrichtige Anordnung der Projektionsbilder im Raum zu ermöglichen und diese so zu manipulieren, dass ein vollständiges Modell des Objektes entsteht. Für den Gesamtprozess lassen sich zwei strukturelle Vorgehensansätze überlegen: man beginnt mit einer initialen Rekonstruktion aus wenigen Projektionen und verfeinert durch Hinzufügen von Projektionen oder umgekehrt, man beginnt mit einer Rekonstruktion aus allen verfügbaren Projektionen und verfeinert durch Reduktion der Datenmenge. Welches Vorgehen vorzuziehen sein mag, man muss immer einen Maximum an Genauigkeit der Einzelbilder und deren Winkelinformation und Menge an Information aus der Anzahl der Projektionen finden. Das heißt, man muss die Einzelprojektionen finden mit der besten Informationsqualität für die Gesamtrekonstruktion und davon so viele wie möglich (Quantität).

Mit der 3D-Rekonstruktion (Tomographie) versucht man, die dreidimensionale Struktur aus den (nun) bekannten Ansichtswinkeln (Eulerwinkel) als dreidimensionales Bild zu rekonstruieren. Aus der Intensitätsverteilung in den einzelnen Klassenmittelbildern (zu welchen die entsprechenden Ansichtswinkel zugeordnet wurden), lässt sich die Intensität des Objektsignals für jeden Raumpunkt berechnen. Üblicherweise werden die Objekte als pixeldicke parallele Schnittbilder dargestellt. Diese Sektionen werden in einer Serie nebeneinander in der so genannten 3D-Dichte-Karte (3D-Density-Map) dargestellt (Abbildung 40), so kann der Betrachter von oben nach unten schichtweise durch das Teilchen sehen. Aus der Dichtekarte lassen sich vom rekonstruierten Objekt Transmissionsaufnahmen (Rückprojektionen) simulieren (die einzelnen Sektionen dürfen nicht mit Projektionen verwechselt werden) und Oberflächenansichten berechnen.

Technisch gesehen geht man von einer überlagerungsbehafteten Darstellung, den 2D-Projektionsbildern, aus und rechnet diese in eine überlagerungsfreie Darstellung, dem 3D-rekonstruierten Objekt, um. Bei der Tomographie werden Serien von Schnittbildern erzeugt, in denen jeder Bildpunkt eindeutig einem Punkt im aufgenommenen Objekt entspricht. Dadurch

wird die räumliche Anordnung der Strukturen im Innern des Objektes wiedergegeben. Man spricht von einer überlagerungsfreien Darstellung. Im Gegensatz dazu wird bei Projektionsverfahren wie der Transmissionsmikroskopie oder der gewöhnlichen Röntgenuntersuchung ein Schattenbild aufgenommen, auf dem sich mehrere Strukturen überlagern, wenn sie im Strahlengang hintereinander liegen. Ein Tomographie-Bild hingegen ist nur so dick wie die Schicht (also eine vorgegebene oder gerätespezifische Größe), dies aber ohne Überlagerungen. Jeder Pixel in einem Schnittbild entspricht einem Volumenelement (Voxel) des gesamten dreidimensionalen Datensatzes. Die Höhe des Voxels entspricht dabei der Schichtdicke. In der Nachbearbeitung lassen sich aus den Voxels dreidimensionale Bilder des untersuchten Objekts (Volumenrendering) oder beliebig im Raum angeordnete Schichtbilder errechnen.

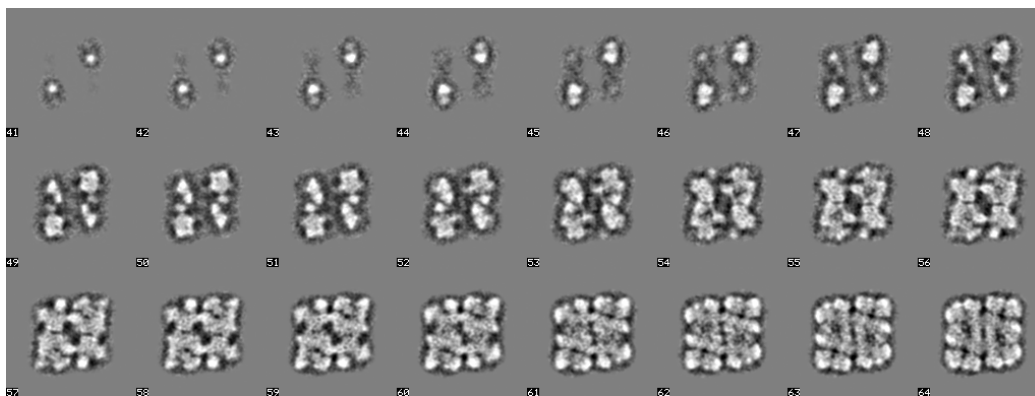
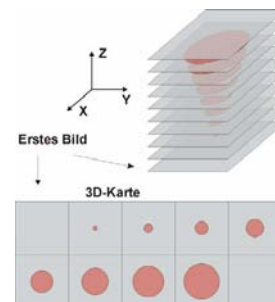


Abbildung 40. Beispiel eines Teils einer 3D-Dichte-Karte.

3D-Dichte-Karten oder Grauwertdichtevolumen enthalten so viele Sektionen wie die quadratischen Bilder Pixel in einer Kante. Bei Bildern mit z. B. 128 x 128 Pixel Kantenlänge entsteht ein Kubus von 128 Pixeln Kantenlänge und ca. 21^5 Voxel. In dieser Dichtekarte von EcHc sind nur 24 der 128 Schnittbilder mit 128 x 128 Pixel Kantenlänge aus dem unteren Teil (Legende bild) dieser 3D-Rekonstruktion nebeneinander dargestellt. Die Dichtekarte dieser Rekonstruktion mit allen Bildinformationen enthaltenden Schnittbildern ist in Abbildung 53 zu sehen.



Die EM-Bilder stellen eine 2D-Projektion eines 3D-Objektes dar, deren Bildpunkte die gemittelten Helligkeitswerte des Objektes der gesamten Durchstrahlungstrecke enthalten. Das zur Anwendung kommende Prinzip zur Berechnung der 3D-Karte ist das der „gefilterten Rückprojektion“¹⁰ (Ramachandran and Lakshminarayanan, 1971). Unter Rückprojektion muss man sich eine in umgedrehter Richtung ausgeführte Projektion vorstellen (Abbildung 41 b), also das „Dreidimensionalmachen“ eines 2D-Bildes. Dabei wird die gemittelte Helligkeit eines Bildpunktes des Projektionsbildes gleichmäßig auf die Länge des Raumes in Projektionsrichtung (Projektionswinkel des Bildes) verteilt. Die Summierung aller Rückprojektionen im Raum ergibt ein angenähertes 3D-Modell des Objektes. Die einzelnen Punkte werden dabei sternförmig mit dem ursprünglichen Punkt als Zentrum ausgezogen. Um eine verfeinerte Rekonstruktion zu erhalten, muss deshalb jede Projektion vor dem Aufsummieren mit einem Filter korrigiert werden (Harauz and van Heel, 1986) (Abbildung 41 c). Im Fourierraum kann diese Filterung einfacher realisiert werden, weil sich nach dem Projektionstheorem (Crowther et al., 1970) die Projektionsbilder dann auf zentrale Schnitte (Ebenen durch den Mittelpunkt) reduzieren. Bei Verwendung vieler Projektionsbilder wird der

¹⁰ Die an anderer Stelle angesprochene Rückprojektion ist eigentlich nur eine Projektion und sollte besser als Rekonstruktionsprojektion bezeichnet werden. Allerdings ist der Begriff Rückprojektion etabliert.

Fourierraum gleichsam mit zentralen Schnitten aufgefüllt. Bedingt durch die Lage der niedrigen Ortsfrequenzen im Zentrum des Fourierraums überlappen sich dies und sind gegenüber den hohen Ortsfrequenzen überrepräsentiert. Die Überlappungen werden berechnet und gehen als Gewichtung in den Filter ein. Nach Filterung wird invers dreidimensional fouriertransformiert und man erhält die Repräsentation des 3D-Objektes im Realraum. IMAGIC stellt mit `true-three-reconstruction` den vereinfacht beschriebenen Algorithmus in einem einzigen Programm zur Verfügung und hält die 3D-Information in als Grauwertdichtevolumen (3D-Dichte-Karte) vor.

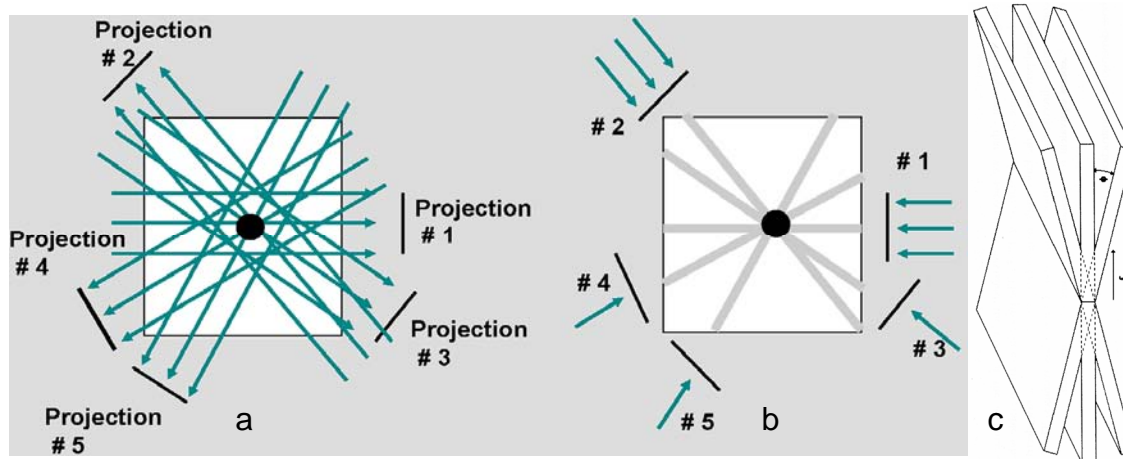


Abbildung 41. (Gefilterte) Rückprojektion.

a) Aufnahme von Projektionen im EM. b) Rückprojektion der gleichen Projektionen in gleicher räumlicher Orientierung. Die Grauwertinformation wird entlang der Durchstrahlungsstrecke ausgezogen und als 3D-Volumen gespeichert. c) Überlappungen müssen korrigiert (gefiltert) werden (van Heel et al., 2000).

2.2.8.1. Rekonstruktions-Projektion (Rückprojektionen)

Rekonstruktions-Projektionen sind quasi EM-Aufnahmen des rekonstruierten Teilchens. Eine Durchstrahlung des Teilchens wird dabei simuliert, so dass ein 2D-Projektionsbild von diesem entsteht wie es im EM entstehen würde, falls es ein konkretes Objekt wäre und man es in den Strahlengang einbringen könnte. Rückprojektionen sind geeignet, um sie als Referenzen in die Ausrichtung bzw. Winkelrekonstruktion einzubringen oder sie in modifizierter Form als Masken zu benutzen. Die rückprojizierten Objekte besitzen ein starkes Signal und der Hintergrund ist frei von Störinformation. Außerdem sind sie optimal in der Bildebene ausgerichtet und der Projektionswinkel ist bekannt.

Um aus Projektionen Masken zu erstellen, werden ihre Grauwerte auf Schwarz und Weiß reduziert (binarisiert), meist mit Filtern ihre Abmessungen erweitert und dann mit dem zu maskierenden Bildmaterial multipliziert, um bei diesen den Informationsteil unter der Maske zu entfernen.

2.2.8.2. Visualisierung: 2D/3D am Bildschirm und 3D-Druck (konkrete Modelle)

Aus der Schnittbildserie einer 3D-Dichte-Karte ist die wahre räumliche Struktur nicht gut vorstellbar. Photographien, also Oberflächenbilder, bieten hier eine bessere visuelle Zugänglichkeit. Aus der in der 3D-Map gespeicherten Helligkeitsinformation kann mit dem Kommando `three-surface-views` ein Oberflächenbild berechnet werden. Man wählt einen bestimmten Helligkeitswert, der die Oberfläche der 3D-Darstellung definieren soll. Die

Koordinaten dieser Oberfläche werden für die gewünschten Ansichten berechnet und gespeichert. Unterscheiden sich die Ansichtswinkel um ca. 10° , bilden immer zwei nebeneinander liegende Bilder ein Stereobild, das der Betrachter mit räumlichen Effekten analysieren kann. Mit einer simulierten Lichtquelle können für das Objekt Schatteneffekte berechnet werden, so wirkt das Bild wie eine Photographie. Das durch die Oberfläche begrenzte Volumen und daraus die zugehörige Proteinmasse in Kilo-Dalton (kDa) wird von IMAGIC berechnet und kann durch Anpassung des Trennwertes für die Helligkeit auf die Molekülmasse eingestellt werden, damit ein realitätsgetreues Volumen gezeigt wird.

Die Visualisierung mittels des IMAGIC Tools ist nicht besonders praktisch und liefert auch keine interpretierbar gerenderten Ergebnisse. Hier gibt es mit z. B. Mercury AMIRA oder dem frei verfügbaren UCSF CHIMERA intuitive und mächtige Programme, welche verschiedenste Darstellungsweisen, Vergleichsfunktionen mit Daten aus anderen Methoden und Manipulationsoptionen für publizierbare Darstellungen bereitstellen.

Seit 2004 steht uns im Hause eine weitere Visualisierungsmethode zur Verfügung, welche bisher nur in grober Form durch externe Fertigung genutzt werden konnte: Der konkrete Bau berechneter Strukturen mittels 3D-Drucker (Abbildung 42). Herr Prof. Dr. Ulrich Meissner bediente sich schon einige Jahre zuvor der Prototype-Technik, welche vornehmlich in der Autoindustrie zur Anwendung kommt, um rekonstruktionsechte Modelle unsere Moleküle extern herstellen zu lassen. Unser Arbeitsgruppenleiter Prof. Markl stellte 2004 mit dem Kauf eines solchen 3D-Prototyping-Druckers wieder seine zukunftsorientiert Innovation unter Beweis: Der Drucker wird mittlerweile von Arbeitsgruppen diverser Fachbereiche zur Erstellung konkreter Modelle benutzt. Es wurden früher (quasi in der Prä-Prototyping-Zeit, Abbildung 43 c) zwar auch schon immer konkrete Modell von den untersuchten Objekten angefertigt, doch krankten dieser immer an ihrer abstrakten Unvollkommenheit, da sie auf, von Hand gefertigten, einfachen zusammengesetzten geometrischen Strukturen basierten. Ein 3D-Modell der tatsächlich berechneten Struktur (Abbildung 43) in den Händen zu halten, steht eine Möglichkeit zur Verfügung eine vorher nicht lösbares Problem als ein taktil im ‚Realraum‘ lösbares Problem zu „begreifen“. Damit können auch Strukturen (Tertiär- und im besten Falle Sekundärstrukturen), die man aus der Bildschirmdarstellung nicht leicht erkennt, besser erfasst werden. Eine winkel-graduierte kardanische Aufhängung (Abbildung 43) erlaubt es Modelle einzuspannen und so in gewünschter Raumorientierung für die Analyse zu fixieren.

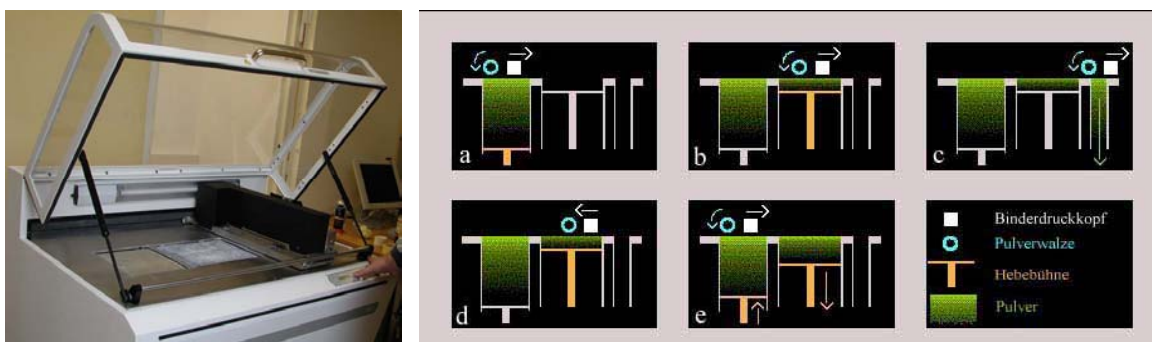


Abbildung 42. 3D-Drucker und 3D-Druckmethode.

Links: 3D-Drucker. Rechts: Rapid-Prototyping-Verfahren nach Z-Corp: (a) und (b) Service-Kopf (bestehend aus Pulverwalze und Druckkopf) verteilt Pulver aus der Vorratskammer (links) über der Baukammer (Mitte). (c) Überschüssiges Pulver fällt in

den Abfallschacht (rechts). (d) Mit dem Binder wird eine Schicht des 3D-Modells auf das Pulver in der Baukammer gedruckt. (e) Die Hebebühne in der Vorratskammer hebt sich, während sich die in der Baukammer um eine Schichtdicke senkt. Darauf wird erneut eine Pulverschicht in der Baukammer aufgetragen (b).

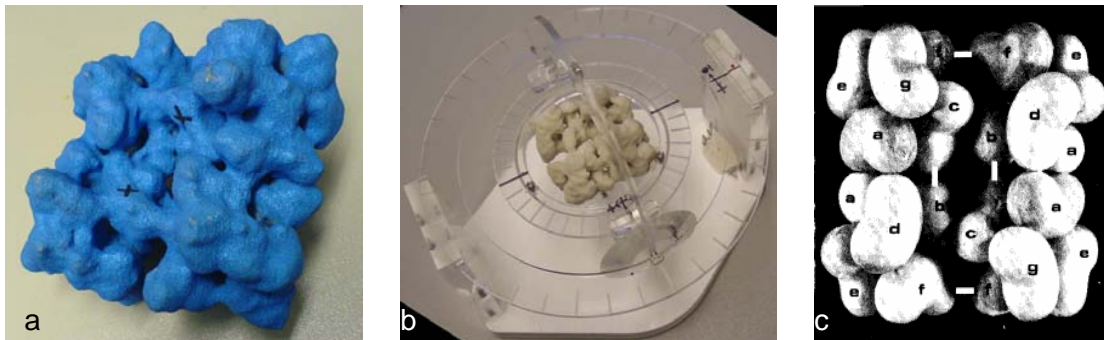


Abbildung 43. Konkretes 3D-Druck-Modell und älteres Modell.

a) 3D-Drucke von EcHc. b) Kleines 3D-Druck-Modell in winkel-graduierter kardanischer Aufhängung. c) Älteres von Hand gebautes Modell von EcHc vor Rapid-Prototyping (Markl et al., 1981c).

2.2.9. Iteration

Der ganze Bildbearbeitungsprozess besteht aus Iterationen. Es ist notwendig, den menschlichen Verstand an bestimmten Stellen des Prozesses intervenieren zu lassen, um neue (verbesserte) Eingaben für den nächsten Iterationsschritt zu tätigen (Abbildung 21, Abbildung 22). Es gehen nie Rückprojektionen (siehe oben) als Eingangsdaten in die Bearbeitung ein, die Rekonstruktionen werden immer nur aus den Originaldaten durchgeführt. Rückprojektionen dienen als Referenzen oder zu analytischen Zwecken. Klassensummen gehen als (neue) Referenzen in die Ausrichtung, Referenz-Rekonstruktions-Projektionen als neue Referenzen in die Winkelrekonstruktion ein. Anhand der Rückprojektionen, welche die gleichen Ansichten zeigen wie die Klassensummen, aus denen rekonstruiert wurde, lässt sich die Güte der Klassensummen und der Winkel, welche ihnen zugewiesen wurde, abschätzen. Die daraus gewonnenen Informationen gehen als Auswahlkriterien für die im nächsten Iterationsschritt zu benutzenden Klassenmittel ein.

2.3. Analyse

2.3.1. Auflösung

Um zu sehen, ob das iterative Vorgehen eine Verbesserung in der Rekonstruktion bringt, muss man deren Detailhaltigkeit bestimmen. Für eine quantitative Abschätzung der Auflösung wird wieder die Transformation in den Fourierraum bemüht. Es wird dabei die spezielle Darstellung in der Frequenzansicht ausgenutzt: Niedrige Ortsfrequenzen werden im Zentrum, hohe in der Peripherie dargestellt. Der Datensatz wird in zwei Teile aufgeteilt und deren 3D-Fourierbilder miteinander verglichen. Betrachtet man vom Zentrum nach außen gehend Ringintervalle im Fourierraum, so beschreiben die Ortsfrequenzen immer feinere Details des Bildes. Zwei Bilder lassen sich deshalb auf ihre Ähnlichkeit untersuchen, in dem diese Ringe im Fourierraum miteinander verglichen werden. Je weiter außen beide übereinstimmen, in desto feineren Details gleichen sich die Ausgangsbilder, und eine umso bessere Auflösung hat der gesamte Datensatz. In der Ebene führt dies zur Fourier-Ring-Korrelation (Saxton and Baumeister, 1982; van Heel et al., 1982). Die Generalisierung für den Raum führt dann zu der Fourier-Schalen-Korrelation (FSK) (Harauz and van Heel, 1986; van Heel et al.), die in dieser Arbeit benutzt wurde. Die FSK

wird in Abhängigkeit von $1/\text{Ortsfrequenz}$ dargestellt (Abbildung 49; C.1 Ergebnisse). Der erste Schnittpunkt der FSK-Kurve mit der korrigierten so genannten 3σ -Kurve, der dreifachen Standardabweichung, ist die Auflösung in $1/A^{11}$. Alles was innerhalb dieser Kurve liegt, beruht mit ca. 93,5 %-iger Wahrscheinlichkeit nicht auf Zufallsphänomenen. Die 3σ -Kurve muss mit einem Faktor korrigiert werden, der die Symmetrie des untersuchten Teilchens berücksichtigt. Im Falle von EcHc mit C2-Symmetrie sind nur $1/2$ Raumpixel (Voxel) unabhängig und die 3σ -Kurve muss um $\sqrt{2}$ höher liegen. Das IMAGIC-Kommando `fourier-shell-correlation` berechnet einen normalisierten Kreuz-Korrelations-Koeffizienten zwischen zwei 3D-Datensätzen als eine Funktion der Ortsfrequenz. van Heel (van Heel and Schatz, 2005) schlägt 2005 das stringenteres $1/2$ -bit-Kriterium vor, bei dem das Rauschsignal nicht mehr vernachlässigt wird.

2.3.2. Weitere Methoden

Für den Vergleich mit Oberflächen aus röntgenkristallographischen Daten lassen sich die Koordinaten aus dem Brookheaven Format mit `import-pdb-to-plt` in das IMAGIC-Koordinatenformat konvertieren und mit `threed-model-molecule` daraus ein Modell in Form eines Grauwertdichtevolumens generieren.

Vor dem Erstellen der Referenzen aus einer 3D-Dichte-Karte wurden diese 3D-maskiert, um periphere Objektartefakte möglichst zu eliminieren. Dafür wird ein durch Filterung aufgeblähtes 3D-Volumen binarisiert und mit dem weiter zu bearbeitenden Daten-Volumen multipliziert. Auch die Klassenbilder, welche in die Rekonstruktion eingehen, wurden iterativ mit aus Rekonstruktionsprojektionen gefertigten Masken bereinigt.

2.3.2.1. "Molecular Modelling" und "Fitting"

"Molecular Modelling". Ist von einem ähnlichen Molekül (Sequenz, Funktion, Herkunft) eine 3D-Struktur bekannt, lässt sich diese als Vorlage für eine Strukturvoraussage für die bekannte Sequenz des untersuchten Moleküls benutzen. Die Vorhersage von Proteinstrukturen erzielt gute Ergebnisse, wenn es bereits Proteine mit ähnlicher Sequenz und bekannter Struktur gibt. Dann kann man das so genannte "homology modelling" verwenden, wobei die neue Sequenz auf die alte abgebildet und damit in die Struktur eingepasst wird. Diese Technik ähnelt dem Sequenzalignment. 3D-Strukturen aus der Röntgenkristallographie im Brookhaven-Format (als PDB-Dateien im Proteindaten-Datenbank <http://www.pdb.org> zugänglich) (Bernstein et al., 1978) sind dafür geeignet, da diese im Rahmen der Genauigkeit der gemessenen Atomdichtekarte atomare Auflösung versprechen. Erhalten wird dann eine an die Faltungsmuster des Proteinrückgrats des Röntgenstrukturmodells angenäherte Proteinrückgrat der Aminosäuresequenz des untersuchten Moleküls. Unter Restriktion der Diederwinkel (Energiminimierung aufgrund sterischer Wechselwirkungen, Ramachandran-Plot) erhält man ein potentiell mögliches Ensemble von Raumkoordinaten der Atome des untersuchten Proteins. Eine positive Abhängigkeit von Ähnlichkeit bzw. Homologie der beteiligten Sequenzen und der Realitätstreue des gefunden Modells ist offensichtlich. Dem "Molecular Modelling" geht ein

¹¹ Die 3Sigma Umgebung definiert in der Statistik die Umgebung, innerhalb derer ein Zustand mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit beschrieben werden kann. Man wählt Fehlerbalken in einem Diagramm zur Darstellung von Messwerten so, dass mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit der Messwert in diesem Bereich liegt. Analog lässt sich die FSC-Kurve durch eine 3Sigma Kurve beschneiden, die eine bestimmte Wahrscheinlichkeit für die Auflösung angibt.

Primärsequenz-Alignment voraus bei dem die bestmögliche Longitudinalausrichtung verschiedener serieller Aminosäureketten unter Minimierung von Lücken, Verschiebeaufwand und Maximierung der Ähnlichkeit von Eigenschaften entsprechender Aminosäuren gesucht wird. Dies ist wichtig, damit Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften wieder an den vermeintlich gleichen Raumstellen erscheinen.

“Fitting” (Molecular-Density). Eine von einem ähnlichen Molekül bekannte oder aus molekularer Modellierung abgeleitete 3D-Struktur kann in eine 3D-Dichtekarte eingepasst werden. Die Programme, welche für diesen Zweck zum Einsatz kommen, bedienen sich einer vereinfachenden Idealisierung aus der Physik. Sie verschieben als starr angenommene Körper (“Rigid body movement”), um die Freiheitsgrade und damit die Berechnungszeit einzuschränken. Das hier benutze UCSF CHIMERA <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera> (Pettersen et al., 2004) repositioniert unter lokaler Maximierung der Summe der Dichtekartewerte der Atome eines von Hand vorpositioniertes Molekül iterativ. Das für ein Refinement benutze Programm COLACOR (Chacon and Wriggers, 2002) von SITUS (Wriggers et al., 1999) führt einen Kreuzkorrelations-basierten Algorithmus aus. Programme für ein flexibles “Fitting” (wie MMTSB NMFF, SITUS) sind noch als experimentell einzustufen, liefern aber für manche Kombinationen aus hoch- und niedrig-aufgelösten Molekülen in Teilbereichen schon sinnige Ergebnisse.

“Fitting” (Molecular-Molecular). Ähnlich können auch zwei molekulare Raum-Strukturen aneinander ausgerichtet werden, wobei eine als Referenz dient, an der die andere im Raum positioniert wird.

C. Ergebnisse

1. Primärdaten

Primärbilder (EM-Bilder) (Abbildung 44) von auf Kupfernetzchen, in einer eigens entworfenen Atmosphärenkammer (B.2.1.2.2 Seite 34), cryo-präparierten (Dubochet et al., 1988), EcHc-Molekülen, wurden in einem Tecnai F30 Elektronenmikroskop bei 200 kV, einer Belichtungszeit von einer Sekunde und einer biomolekülverträglichen Dosis von ca. $3000 \text{ e nm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ mit einer 59000-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die Mikroskop-Kamera ist mit Kodak So-163 Silberhalogenidkristall-Filmen ausgestattet worden, welche im Hellfeldmodus belichtet wurden und in Entwickler D-19 von Kodak zur geforderten optischen Dichte gebracht wurden (Überentwicklung nach Kodak; B.2.1.3 Seite 40).

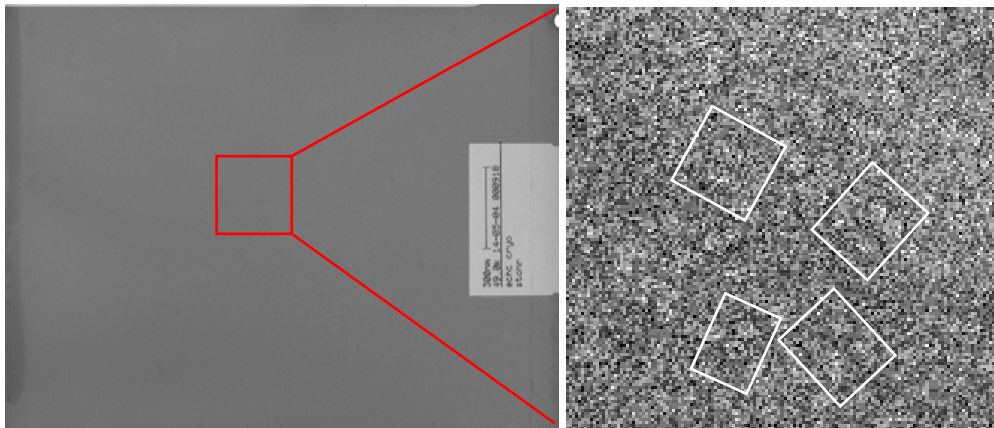


Abbildung 44. Primärdaten auf Kodak Elektron Image Silberhalogenid Film.

Links: entwickeltes und eingescanntes EM-Bild (Deoxypräparation). Rechts: Vergrößerter und kontrastverstärkter Bereich (rotes Rechteck) aus dem EM-Bild. Die Moleküle werden auf entwickelten Silberhalogenid-Filmen als weiße Objekte dargestellt (weiße Rechtecke).

Die so belichteten Bilder wurden mittels eines Trommelscanner der Firma Heidelberg Druckmaschinen mit einer Schrittweite von $9,1 \mu\text{m}$ digitalisiert, was eine Objektpixelgröße von $0,3082 \text{ nm/Pixel}$ für Bilder mit einer Kantenlänge von 128 Pixel entspricht. In die Rekonstruktionen gingen 28 von 32 EM-Bildern für die Deoxyform mit Defokuswerten von $1,0 \mu\text{m}$ bis $4,8 \mu\text{m}$ und 30 von 35 EM-Bildern für die Oxyform mit Defokiwerten von $1,0 \mu\text{m}$ bis $4,6 \mu\text{m}$ ein.

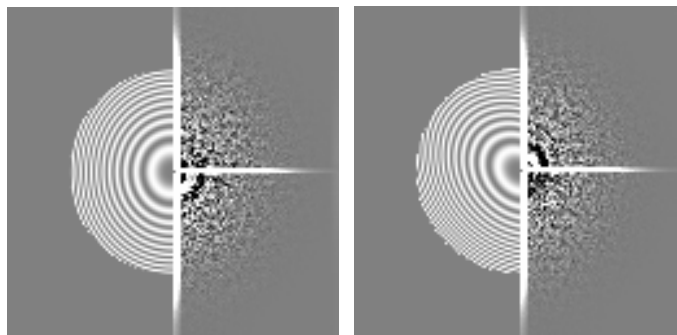


Abbildung 45. Primärdaten: Korrektur der CTF und Astigmatismuskontrolle.

Die Korrektur der CTF wurde mit dem Programm CTFIND3 von Niko Grigorieff vorbereitet. Dieses gibt neben dem numerischen Wert für den Aufnahmeundefokus für die EM-Bilder oben gezeigte Analysebilder aus, welche eine einfache Astigmatismuskontrolle anhand von ellipsoiden Verformungen der Tonringe erlauben. Links: Analyse eines in die Rekonstruktion eingegangenen EM-Bild. Rechts: ein verworfenes EM-Bild. Die potentielle Auflösung der EM-Bilder steigt mit der Ausdehnung der Kontrastringe (Thonringe).

Der Kontrast der EM-Bilder, definiert durch die Kontrasttransferfunktion (CTF), wurde mit dem Programm CTFFIND3 von Niko Grigorieff als Defokuswert erfasst (in Tabelle 7; sind beispielhaft jene EM-Bilder dargestellt, welche in die letzte Rekonstruktion von deoxy-EcHc eingingen) und mittels der Flipp-Methode des IMAGIC-5-Moduls transfer korrigiert (B.2.1.2.4, Seite 38). Anhand der Analysebilder von CTFFIND3 (Abbildung 45) und deren Ellipsoiddurchmesser war eine optische und nominelle Überprüfung der Primärbilder auf Astigmatismusfehler möglich. Es wurden nur aus solchen EM-Bilder die Einzelpartikelbilder für die Rekonstruktion mit dem Programm Boxer (Programmpaket EMAN) aus den EM-Bilder selektiert, welche einen tolerierbar kleinen ($< 0,3 \mu\text{m}$) Astigmatismusfehler aufwiesen (Tabelle 7 und Abbildung 46).

Tabelle 7. Defokuswerte der EM-Bilder (am Beispiel von deoxy-EcHc)

Spalten: 1. Anzahl der EM-Bilder aus denen die letzte Rekonstruktion entstand. 2. Anzahl der Partikel die aus den jeweiligen EM-Bildern zur letzten Rekonstruktion von deoxy-EcHc beitrugen; unten Gesamtanzahl. 3. Anzal-Wichtungsfaktor (AWF) aus 2; unten: Summe. 5. Am EM eingestellter Defokuswert. 6. mit CTFFIND3 berechneter Defokuswert. 7. Aus den von CTFFIND3 erhaltenen Ellipsoiddurchmessern berechneter Astigmatismuswert für die Partikel aus den jeweiligen EM-Bildern; unten: mittlerer Astigmatismus. 4. unten: Gewichteter, also auf die jeweiligen Defoci und die Anzahl der selektierten Partikel relativierten Gesamtdefokuswert.

EM-Bild	Partikel in Finale Rek.	A-Wichtungs- Faktor (AWF)	AWF*Defokus berechnet	Defokus Gerät	Defokus berechnet	Astig- matismus
				μm	μm	μm
1	106	0,0417	-0,1134	-2,00	-2,72	0,17
2	3	0,0012	-0,0022	-1,50	-1,86	0,22
3	145	0,0571	-0,1639	-2,20	-2,87	0,24
4	95	0,0374	-0,1250	-2,50	-3,34	0,28
5	180	0,0709	-0,2978	-2,00	-4,20	0,16
6	127	0,0500	-0,1678	-2,10	-3,36	0,19
7	200	0,0788	-0,2402	-1,90	-3,05	0,24
8	28	0,0110	-0,0315	-1,80	-2,86	0,26
9	231	0,0910	-0,2730	-1,70	-3,00	0,20
10	108	0,0425	-0,1399	-2,00	-3,29	0,25
11	30	0,0118	-0,0172	-2,00	-1,46	0,24
12	33	0,0130	-0,0248	-2,30	-1,91	0,23
13	66	0,0260	-0,0572	-2,50	-2,20	0,22
14	157	0,0618	-0,1433	-2,60	-2,32	0,23
15	147	0,0579	-0,1507	-2,80	-2,60	0,20
16	180	0,0709	-0,2345	-3,00	-3,31	0,22
17	273	0,1075	-0,3250	-2,00	-3,02	0,17
18	47	0,0185	-0,0334	-1,50	-1,81	0,24
19	149	0,0587	-0,1781	-2,30	-3,03	0,27
20	62	0,0244	-0,0453	-1,70	-1,86	0,24
21	5	0,0020	-0,0031	-1,10	-1,55	0,18
22	3	0,0012	-0,0017	-0,80	-1,43	0,18
23	53	0,0209	-0,0419	-1,20	-2,01	0,18
24	111	0,0437	-0,1313	-1,80	-3,00	0,21
	2539	1,0000	-2,9423	-1,97	-2,59	0,22

Die anzahlmäßig gewichtete Defocisumme aus allen zu der letzten Rekonstruktion beitragenden Partikelbildern (Spalte 4 in Tabelle 7) ist um etwa $0,33 \mu\text{m}$ höher als die der ungewichteten Defocisumme (Spalte 6). Also tragen unter Berücksichtigung der anzahlmäßigen Beteiligung der Partikeldefoci jene mit höherem Defokus mehr zur Rekonstruktion bei. Die verwendete Filterung nach Ausrichtungs-Korrelationswerten (B.2.2.7, Seite 53) selektiert also aus dieser Aufnahmeserie Projektionen höherer Defoci als für die Rekonstruktion wertvoll, betreffend des

verwertbaren Informationsgehalt (siehe Abbildung 47). Dies heißt nicht, dass diese die qualitativ bessere Information darstellt; die Information, welche aus fernerem Defokus resultiert, wird aber vom Rekonstruktionsalgorithmus bevorzugt verarbeitet. Hier müssen der Rekonstruktion also bewusst mehr Nahfokusbilder zugeführt werden. Der Mittelwert von fast $3 \mu\text{m}$ sollte für weitere Verbesserung bei der Erstellung von neuen Bildern erniedrigt werden, um an Realitätstreue zu gewinnen. Die Einstellung des Defokus am Elektronenmikroskop (Spalte 5; Mittelwert ca. $2 \mu\text{m}$) scheint bei den Bildern 944-949 mit einem systematischen Fehler zu höheren, bei fast allen andern Bildern zu niedrigeren Werten behaftet zu sein. Für die Bilder 936-944 sind die Abweichungen extrem. Dies weist auf eine Inhomogenität der Probenträger hin, welche verbessert werden sollte, um definierte Defociwerte in den Primärdaten realisieren zu können.

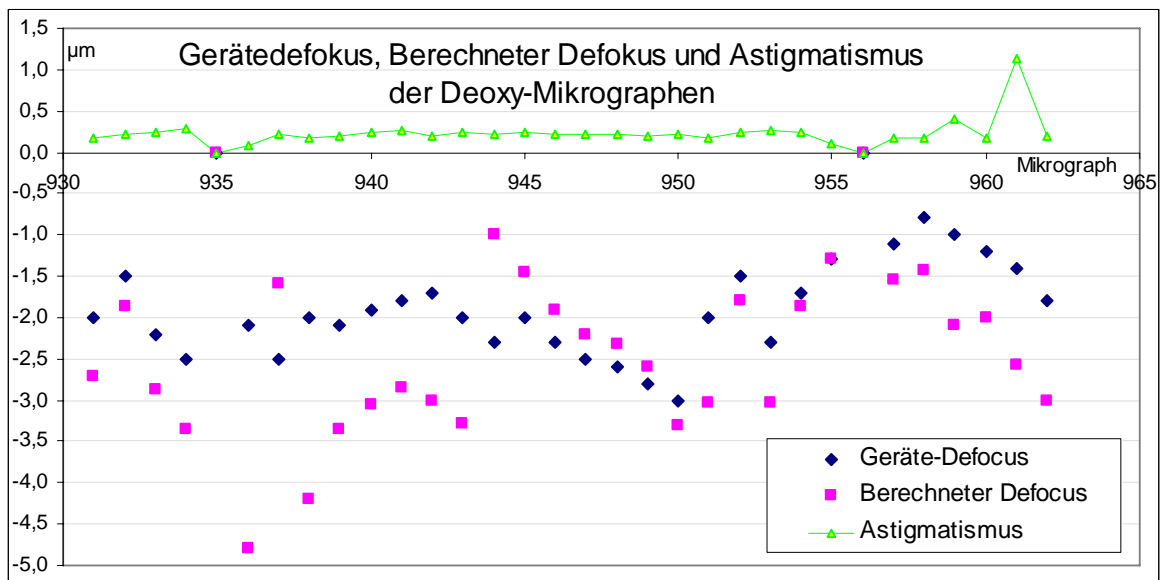


Abbildung 46. Gerätedefoci und berechnete Defoci (am Beispiel von deoxy-EcHc).

Die am EM eingestellten Defoci weisen für die EM-Bilder (außer die Serie 944-949) systematisch niedrigere Werte auf als die berechneten (unten im Diagramm). EM-Bilder mit zu hohem Astigmatismus ($< 0,3 \mu\text{m}$) gingen nicht in die Rekonstruktionen ein (oben im Diagramm).

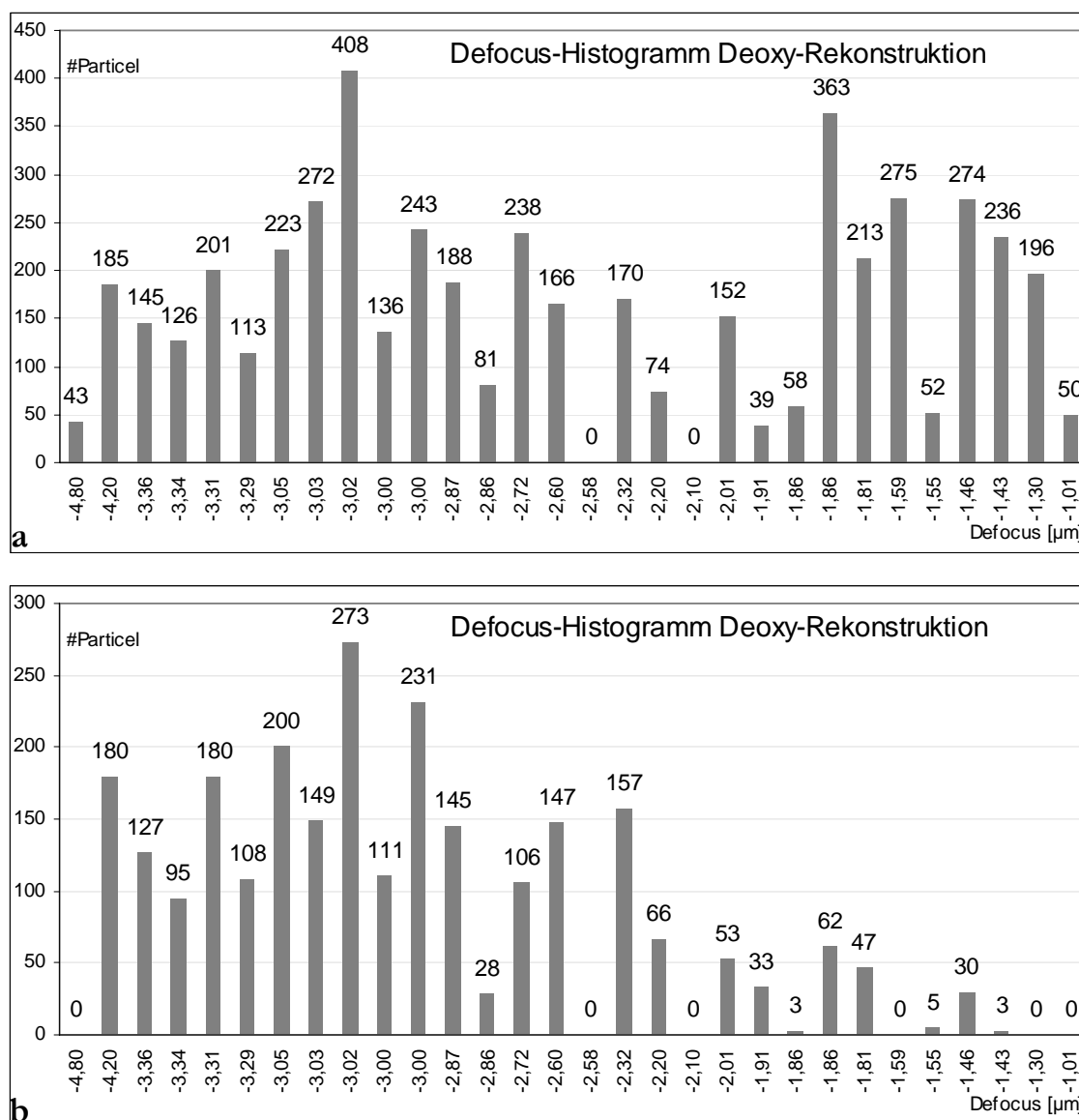


Abbildung 47. Defokushistogramm (am Beispiel von deoxy-EcHc).

Selektierte Partikel (Ordinate) für die finale Rekonstruktion von deoxy-EcHc (b) in Relation zum Aufnahmedefokus und 4 Iterationen vorher (a). Auf der Abszisse sind die berechneten Aufnahmedefoci der in die Rekonstruktion eingegangenen EM-Bilder aufgetragen. Scheinbar sind die Bilder aus EM-Bildern mit einem Defokus von ca. 3 besonders verwertbar für die Rekonstruktion.

2. Prozessierte Daten

Die beiden unabhängigen (kein Austausch von Referenzen) Rekonstruktionen von EcHc dieser Arbeit starteten mit einem Datensatz von 8652 Bildern für die Deoxyform bzw. 10214 Bildern für die Oxyform der Kantenlänge 128 x 128 Pixel. In die hier vorgestellten Rekonstruktionen gingen nach Selektion der Partikel-Bilder mit sinnvollen Verschiebungswerten und den höchsten Korrelationswerten (siehe B.2.2.4 und B.2.2.7) noch Partikel aus 24 EM-Bildern (Tabelle 7; Abbildung 47) mit insgesamt 2539 Partikel-Bildern in 1354 Klassen in die Deoxyrekonstruktion bzw. noch 4626 Bilder in 1960 Klassen in die Oxyrekonstruktion ein (Abbildung 48). Damit wurden durch Auflösungsbestimmung mittels des ersten Schnittpunktes der Fourier-Schalen-Korrelation-Kurve (FSK) mit der $\frac{1}{2}$ -Bit-Kurve (van Heel and Schatz, 2005) **1,6 nm** für die N₂-präparierte und **2,1 nm** für die O₂-präparierten EcHc-Rekonstruktion ermittelt (Abbildung 49).

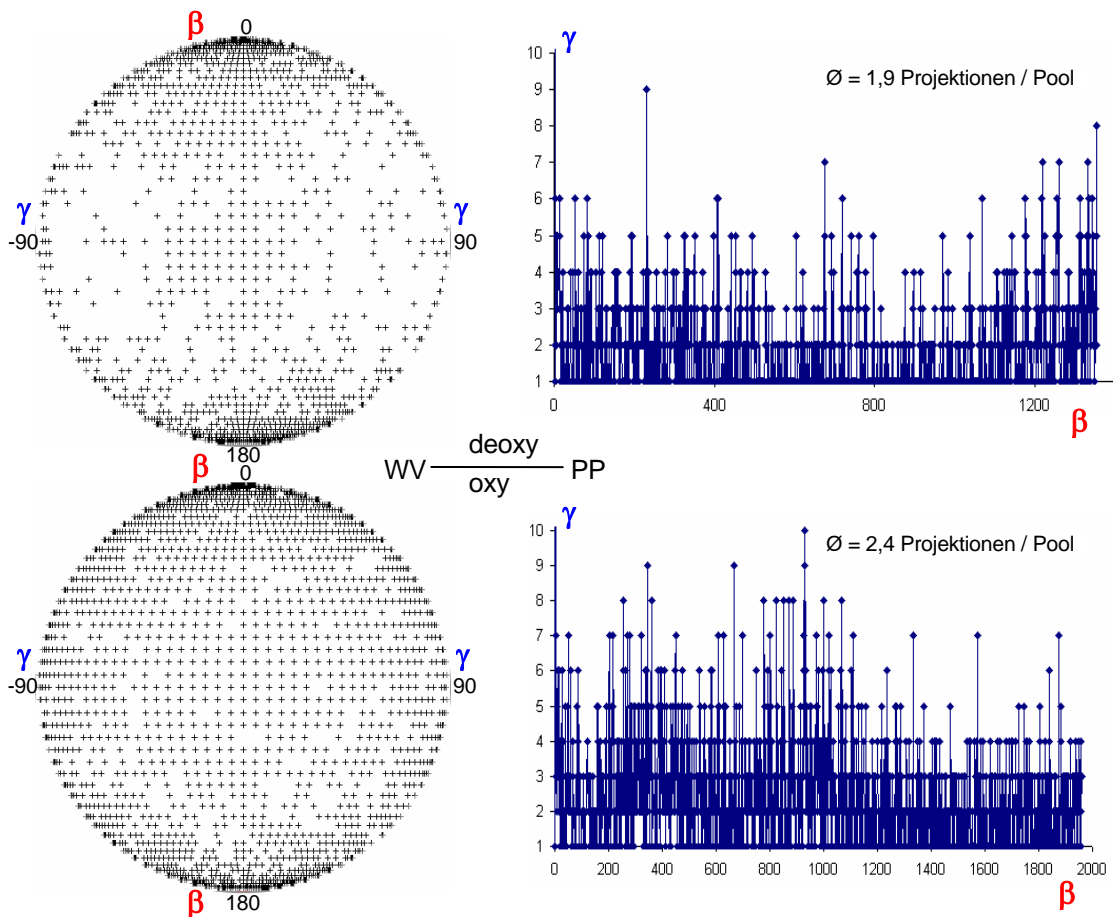


Abbildung 48. Winkelverteilung (WV) und Projektionen-Pools (PP).

Links: Winkelverteilung als Sphäre der in die finale Rekonstruktionen eingegangenen Referenzwinkel (oben deoxy, unten oxy). Rechts: Die quantitative Verteilung der Projektionen auf die Pools entsprechend der durch ‚Projection-Matching‘ referierten Ausrichtungsvorlagen (Alignment-Referenzen). Ordinate: Anzahl der Bilder in den Klassen, welche auf der Abszisse von links nach rechts (Nummern der Referenzklassen) als Ansichtswinkel aus über den Symmetriebereich homogen verteilten Beta/Gamma-Winkelpaare dargestellt sind.

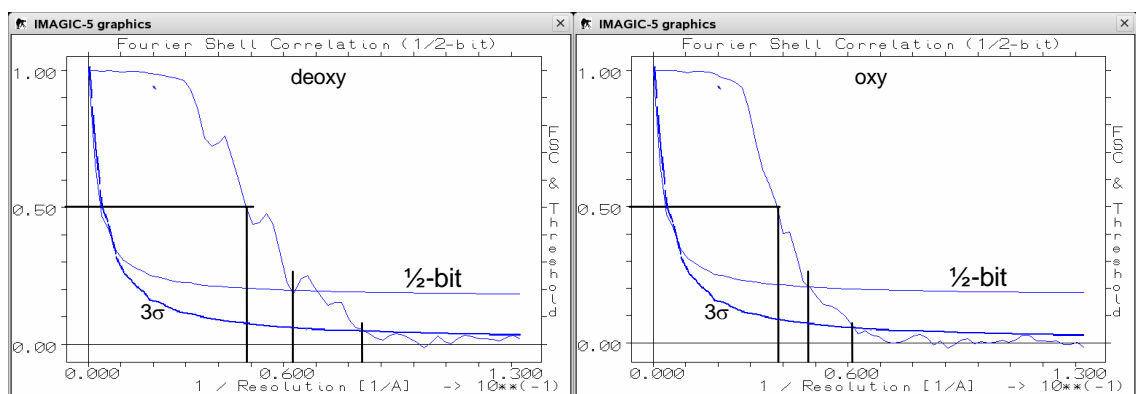


Abbildung 49. Auflösung.

Die Auflösungsbestimmung wurde mittels des ersten Schnittpunktes der Fourier-Schalen-Korrelationskurve (FSK) mit der 1/2-Bit-Kurve gefunden (van Heel and Schatz, 2005). Links: Rekonstruktion des in N₂ präparierten EcHc, die FSK-Kurve schneidet die 1/2-Bit-Kurve bei 1/0,0625 Å, das entspricht 16 Å = **1,6 nm** (nach 0.5-Kriterium 2,1 nm und 3σ-Kriterium 1,2 nm). Rechts: Rekonstruktion des in O₂ präparierten EcHc, der Schnittpunkt liegt bei 1/0,048 Å, das entspricht 21 Å = **2,1 nm** (nach 0.5-Kriterium 2,6 nm und 3σ-Kriterium 1,6 nm).

Im Folgenden sind die Zwischenergebnisse (Abbildung 50 - Abbildung 52) beispielhaft anhand der Rekonstruktion von deoxy-EcHc bis zu den Endergebnissen (Abbildung 53) beider Rekonstruktionen (deoxy und oxy) dargestellt (Abbildungen in B.2.2 ab Seite 41). Abbildung 50 a zeigt EcHc-Bilder nach der Kontrast-Korrektur (eine gänzlich unbehandelte Bilddatenbank ist

in Abbildung 31 Seite 42 am Beispiel von PeHc-Bildern zu sehen). In Abbildung 50 b sind die gleichen EcHc-Moleküle ausgerichtet dargestellt. Als Referenzen für diese Ausrichtung dienten die in Abbildung 50 c abgebildeten Referenzen aus dem vorherigen Iterationsschritt.

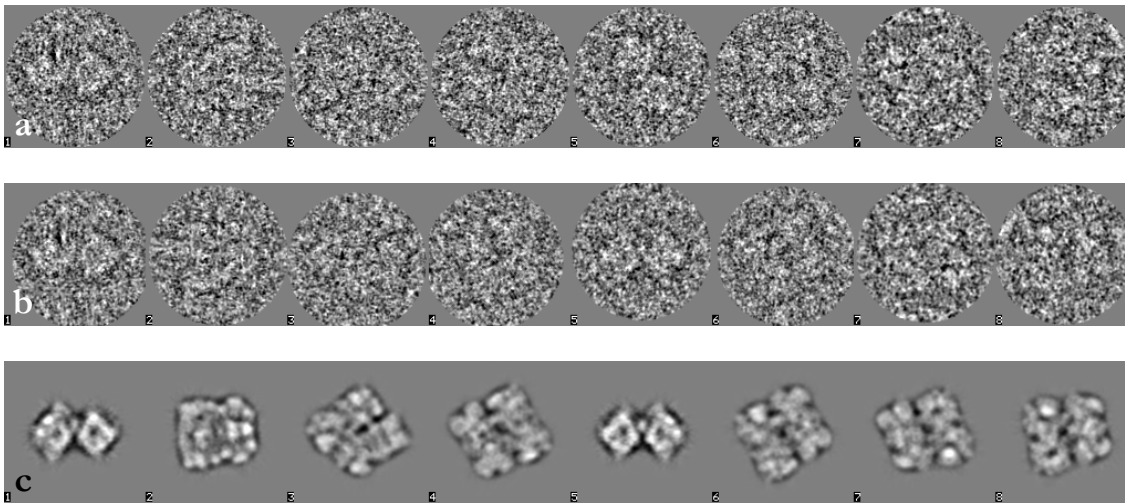


Abbildung 50. Originalbilder (am Beispiel von deoxy-EcHc).

Die Originalbilder stellen Projektions- oder Transmissionsbilder dar. In Projektionsbildern ist die Händigkeit nicht festzustellen, weil zwischen vorn und hinten nicht zu unterscheiden ist. a) Einige kontrastkorrigierte und vereinzelte Molekülbilder vom deoxy-EcHc (unbearbeitet), wie sie in die Rekonstruktion (nach Filterung) eingehen. b) Dieselben Bilder mittels MRA ausgerichtet anhand in c) gezeigten Referenzen (siehe Abbildung 52) der vorletzten Iteration.

Nach Klassenfindung (MSA oder Projektions-Referenzierung; B.2.2.5 Seite 48 und B.2.2.7 Seite 53) können die Mitglieder jeder Klasse aufsummiert werden (Abbildung 51 a) und mit einer individuellen Maske versehen werden (Abbildung 51 b), welche die Nichtmolekülanteile ausblendet. Nach gelungener Rekonstruktion kann aus dieser, so genannte Rückprojektionen - präziser Rekonstruktionprojektionen - in gewünschten Ansichtswinkel erstellt werden (B.2.2.4 bis B.2.2.7 ab Seite 47). Für die Erstellung von Referenzen und Masken (B.2.2.8.1 Seite 56) für weitere Iterationen können die Ansichtswinkel sinnvoll frei gewählt werden. Für die Erstellung von Masken werden z. B. die Winkel der Originalbilder (Abbildung 50 c) und für Analysezwecke die Ansichtswinkel der Klassen (Abbildung 52) benutzt. Die 3D-Dichtekarte der Rekonstruktion von deoxy-EcHc ist in Abbildung 53 oben, die der Rekonstruktion von oxy-EcHc in Abbildung 53 unten wiedergegeben. Wie in den Auflösungsbestimmungen (Abbildung 49) zu sehen, ist die Deoxyrekonstruktion 0,6 nm besser aufgelöst, was auch in der Dichtekarte durch bessere Detailhaltigkeit zu sehen ist. Man erkennt definiertere Massenunterschiede, respektive Helligkeitsunterschiede. Abbildung 48 zeigt die anzahlmäßige Verteilung der Partikelbilder auf die Klassen der finalen Rekonstruktionen für die angewandte Projektions-Referenzierungs-Methode. Die auf der Abszisse aufgetragenen Klassennummern repräsentieren gleichsam die Klassen- bzw. Rekonstruktionswinkel (und die Winkel der Ausrichtungsreferenzen) welche sich in Beta/Gamma-Winkelpaaren homogen auf den Symmetriewinkelbereich verteilen (Abbildung 39 in B.2.2.7 Seite 53). Gezeigt sind die Verteilungen für die jeweils letzte Rekonstruktionsiteration: Oben für die Rekonstruktion aus N₂-präparierten EcHc mit 2539 Bildern in 1354 Klassen und unten für die O₂-präparierten EcHc-Rekonstruktion mit 4626 Bildern in 1969 Klassen.

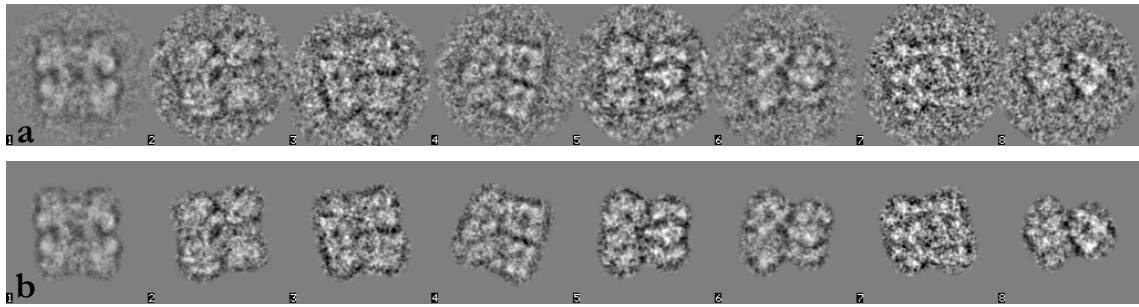


Abbildung 51. Klassen-Bilder nach Projection-Matching (am Beispiel von deoxy-EcHc).

a) Einige der Klassensummenbilder, aus denen die Rekonstruktion berechnet wurde. Im Durchschnitt wurde ein Klassenbild aus ca. 3 Einzelbildern gebildet. b) dieselben Bilder mit einer individuellen Maske (abgeleitet aus Rekonstruktionsprojektionen aus Abbildung 52).

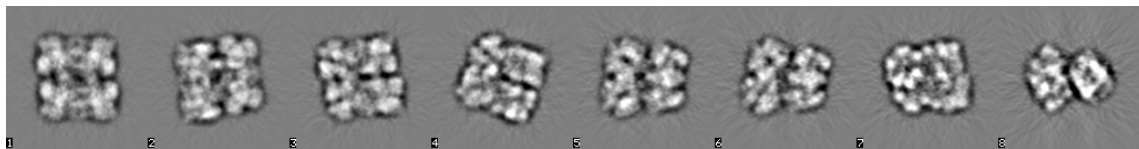


Abbildung 52. Rekonstruktionsprojektionen (am Beispiel von deoxy-EcHc).

Rekonstruktionsprojektionen, meist Rückprojektionen genannt. Erstellt aus der Rekonstruktion in den selben Winkeln wie die Klassenbilder in Abbildung 51.

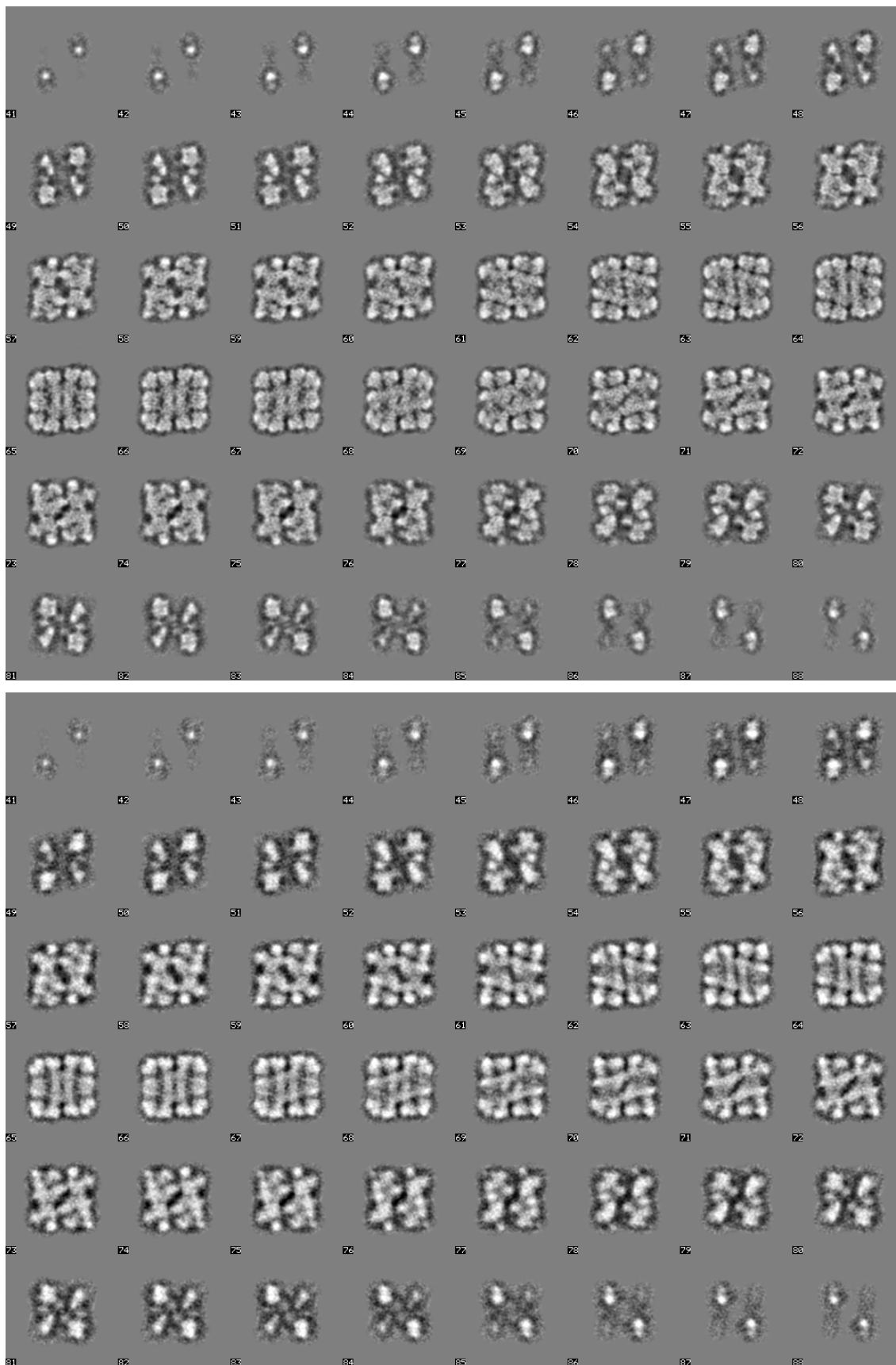


Abbildung 53. 3D-Dichte-Karten der Rekonstruktionen (Flip-Ausrichtung*).

Oben: Rekonstruktion des deoxygenierten EcHc. Unten: Rekonstruktion des oxygenierten EcHc. Es sind nur die Schnittbilder des kompletten Rekonstruktionskubus dargestellt, die Molekülinformation enthalten (Anfang und Ende beschnitten). (* für Flip-Flop siehe A.6.4 Seite 21 und ab Abbildung 59 (C.6)).

3. Vergleich von Rekonstruktionen von deoxy- und oxy-EcHc

Ein Ziel dieser Arbeit war, mögliche Konformationsunterschiede zwischen den O₂-Beladungszuständen des Moleküls festzustellen. In der Überlagerung der Gesamtgeometrie der Rekonstruktionen von deoxygenierten und oxygenierten EcHc (Abbildung 54) sind keine signifikanten, auflösungsunabhängigen Strukturunterschiede zu erkennen. Genauere, interpretierbare Details, wie Sekundärstrukturen werden erst bei sub-1-nm-Auflösungen möglich (siehe Diskussion).

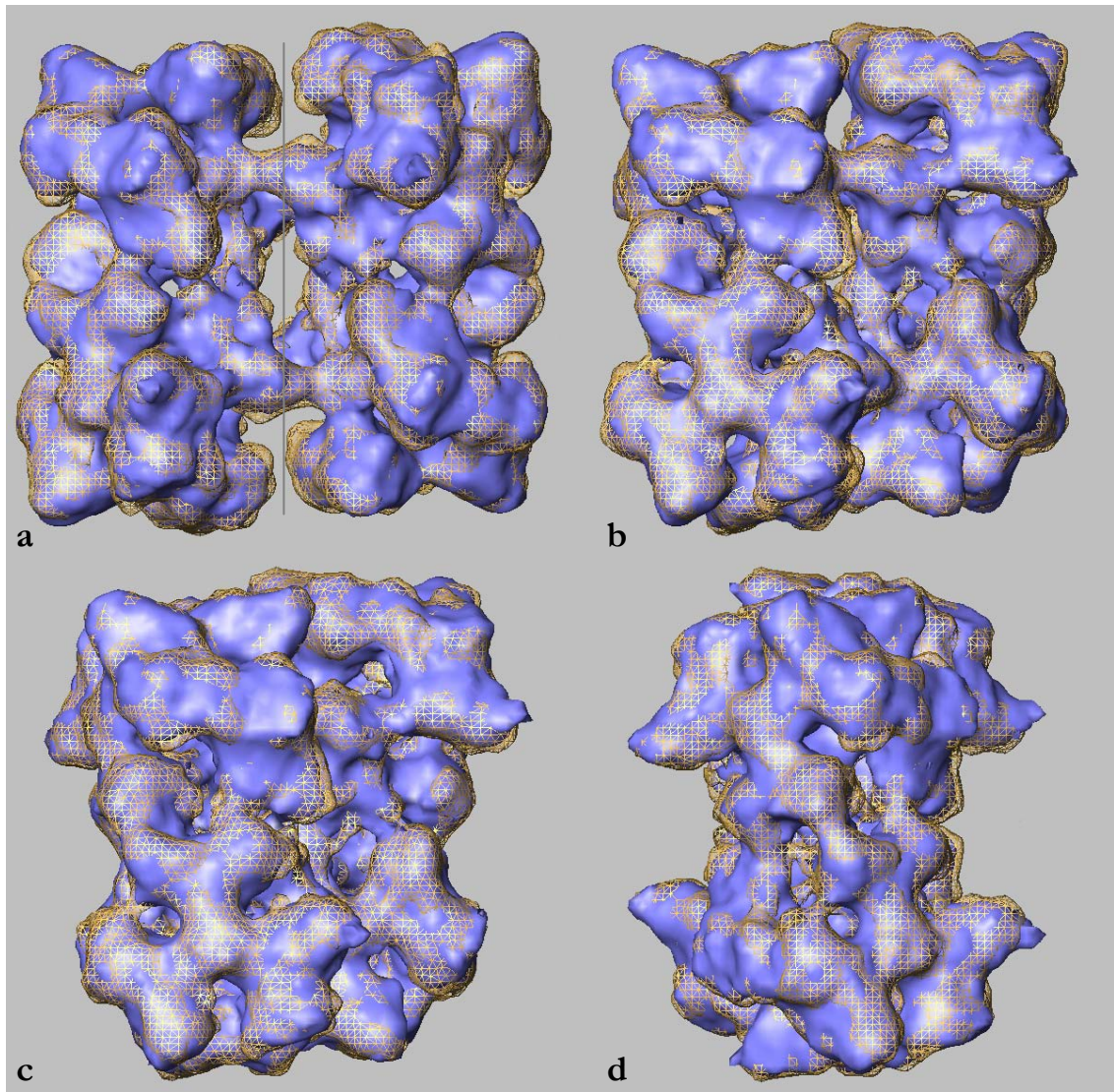


Abbildung 54. Vergleich der 3D-Rekonstruktion von deoxy- und oxy-EcHc.

Die 3D-Rekonstruktionen der Oxyform (blau) und Deoxyform (gold liniert) zeigen beide gleich starke Verschiebungen der Halbmoleküle um 0,8 nm. Der von Decker et al. (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001) postulierte große Unterschied der Verschiebung von 1,4 nm entlang der Furche zwischen den beiden Halbmolekülen (graue Linie in a)) zwischen dem Deoxyzustand (0,4 nm) und dem Oxyzustand (1,8 nm) wurde hier nicht festgestellt (siehe Diskussionsteil). a) Flip-Aufsichten (0°), b) 38°-Ansicht, c) 52°-Ansicht, d) 90°-Ansicht; siehe unten.

4. Visualisierung

Die mit IMAGIC-5 erhaltenen 3D-Daten lassen sich mit diversen Visualisierungsprogrammen darstellen. Hier wurde AMIRA 4, ein Produkt der Firma Mercury (ehemals TGS) und UCSF CHIMERA benutzt. Abbildung 57 bis Abbildung 62 geben in den Bildlegenden eine deskriptive Visualisierung der Quartärstruktur der Rekonstruktion von deoxy-EcHc wieder. Da, wie im vorherigen Abschnitt C.3 und Abbildung 54 zu sehen, die Rekonstruktion von deoxy-EcHc bei den erzielten Auflösungen in der Quartärstruktur nicht erkennbar von der Rekonstruktion von oxy-EcHc abweicht und nominell die bessere Auflösung besitzt, also mehr Strukturdetails zeigen sollte, wird im folgenden Ergebnisteil nur noch diese vorgestellt. Abbildung 55 gibt den in dieser Arbeit verwendeten Nomenklaturcode für die Molekülstrukturen an. Gezeigt wird dies an der Flip-Aufsicht, welche sich, wie in Abbildung 19, Abbildung 64 und Abbildung 65 erklärt, durch die dem 4x6-Molekül eigene Halbmolekülverschiebung, von der Flop-Ansicht unterscheidet.

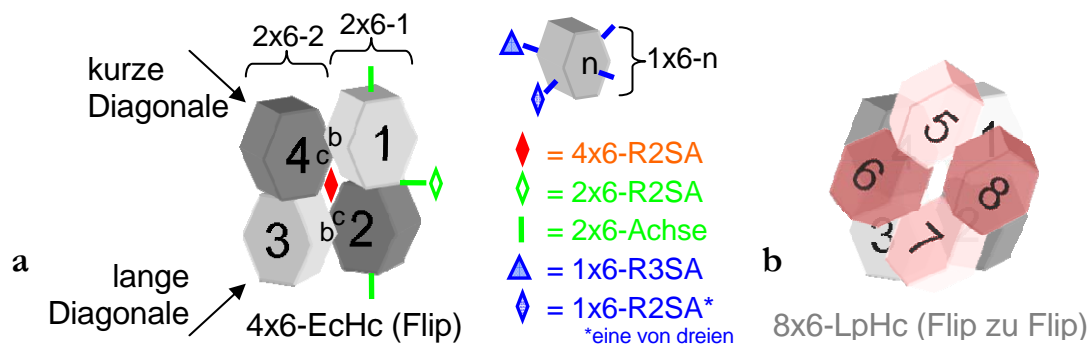


Abbildung 55. Nomenklatur der Molekülstrukturen.

a) Die in Abbildung 19 und in den Folgeabbildungen ersichtliche, für das 4x6-Molekül spezifische relative Stellung der Hexamere (1x6, Sechsecke) zueinander, ergeben eine kurze und eine lange Diagonale für das 4x6-Molekül. Für dieses ergibt sich durch diese Konstellation eine zweifache \diamond Rotationssymmetrieachse (4x6-R2SA, rote Raute), welche hier senkrecht auf der Bildebene steht, also in Blickrichtung weist. Drehung des Moleküls um diese Achse um 180° ergibt eine deckungsgleiche Ansicht. Rotation um eine senkrecht stehende (y-)Achse führt zur Flop-Ansicht (wie in dem rot kolorierten, für den Betrachter oben liegenden, 4x6-Teilmolekül in b)). Die Nomenklatur für Symmetrien der weiteren Strukturhierarchien ergeben sich entsprechend mit Farbcode (24-mer rot, Dodekamer grün, Hexamer blau), wie in der Legende in Bildmitte zu sehen (Δ = R3SA = dreifach-Rotationssymmetrieachse). Die Hexamere, hier als nummerierte Sechsecke repräsentiert, des 4x6-EcHc-Moleküls, werden in dieser Arbeit in der Flip-Aufsicht von rechts oben beginnend im Uhrzeigersinn gezählt (in der Flop-Aufsicht gegen den Uhrzeigersinn). So besteht ein Dodekamer (2x6) aus Hexameren mit Folgenummern und die korrespondierenden Hexamere (hell- bzw. dunkel-grau) der Dodekamere, welche sich durch die inneren ringbildenden Untereinheiten b und c unterscheiden (Abbildung 18 a), haben jeweils gerade oder ungerade Nummern. In der hier abgebildeten Flip-Aufsicht steht das rechte Dodekamer (2x6-1) höher als das linke (2x6-2). Dodekamere besitzen nach van Heel (van Heel and Dube, 1994) eine zweifache Rotationssymmetrieachse (2x6-R2SA, grüne Raute). Diese wird rein für die Beschreibung im Ergebnisteil als Idealisierung benutzt (wie auch die 1x6-R3SA). Weiterhin wurde eine 2x6-Achse (2x6-Molekülachse) definiert, welche senkrecht auf der 2x6-R2SA steht und nicht mit dieser verwechselt werden darf. Die 2x6-Achse schneidet die beiden 1x6-R3SA und dient als Längsachse für das Dodekamer. Später wird gezeigt, dass die Hexamere und die Dodekamer nicht ideal symmetrisch sind. Beispiele für verschiedene Strukturhierarchien: Hexamer 1 = 1x6-1; Dodekamer 1 = 2x6-1 = 1x6-1 + 1x6-2. Wo nötig, kann die Benennung der Untereinheiten (Abbildung 18 a) und Domänen von Untereinheiten (Abbildung 15 Seite 18 und A.6.3 ab Seite 14) mit der Nummer des Hexamers ergänzt werden, z. B.: Domäne 2 von Untereinheit g aus Hexamer 3: 3g2. b) Vorschlag für das 8x6-Hämocyaninmodell (LpHc). Die beiden 4x6 zeigen mit den Flip-Seiten zum Zentrum. Das vom Betrachter gesehene obere 4x6 (rot koloriert) ist um 180° um die y-Achse und um 42° um die z-Achse gedreht (Taveau et al., 1997). Die Zählung der Hexamere bleibt also von der Flip-Seite aus gleich. Vergleiche auch Legendentext in Abbildung 59.

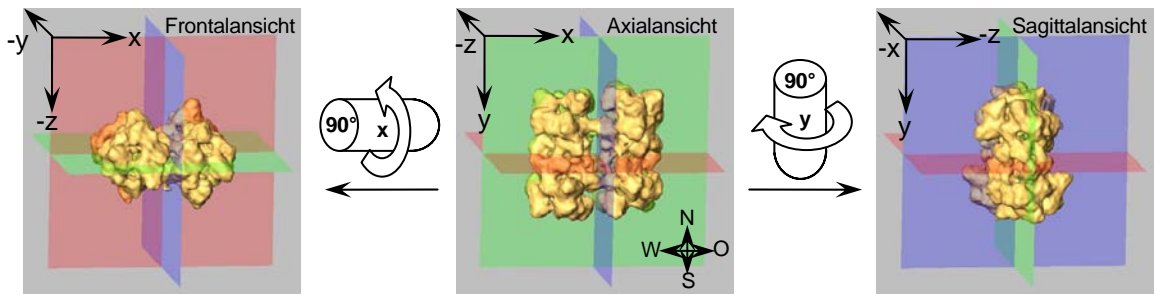


Abbildung 56. Lage-, Ebenen- bzw. Ansichtsbeziehungen im 4x6-Molekül.

Grün: xy- oder Axialschnitt. Rot: xz- oder Frontalschnitt. Blau: yz- oder Sagittalschnitt. Jede parallele Ebene dazu wird als entsprechende Ansicht definiert: Mitte: xy- oder Axialansicht (im Folgenden meist Flip- bzw. Flop-Aufsicht genannt; hier gezeigt: Flip). Links: xz- oder Frontalansicht. Rechts: yz- oder Sagittalansicht.

Die Projektionsbilder in Abbildung 57 und die Oberflächenbilder in Abbildung 58 sollen einen Eindruck vermitteln, wie sich die Ansicht des Moleküls bei Drehung und Kippung ändert. Ähnlich wie die Projektionen in Abbildung 57 könnte es, wenn man sich diese Idealisierung erlaubt, für den Mikroskopiker aussehen, falls er das Molekül im Mikroskop tatsächlich drehen könnte. Diese Bilder stellen aus der Rekonstruktion berechnete Projektionen dar und sind dadurch nicht verrauscht wie tatsächliche Mikroskopbilder des konkreten Moleküls. In Abbildung 58 sind die gleichen Ansichten als Oberflächenbilder zu sehen.

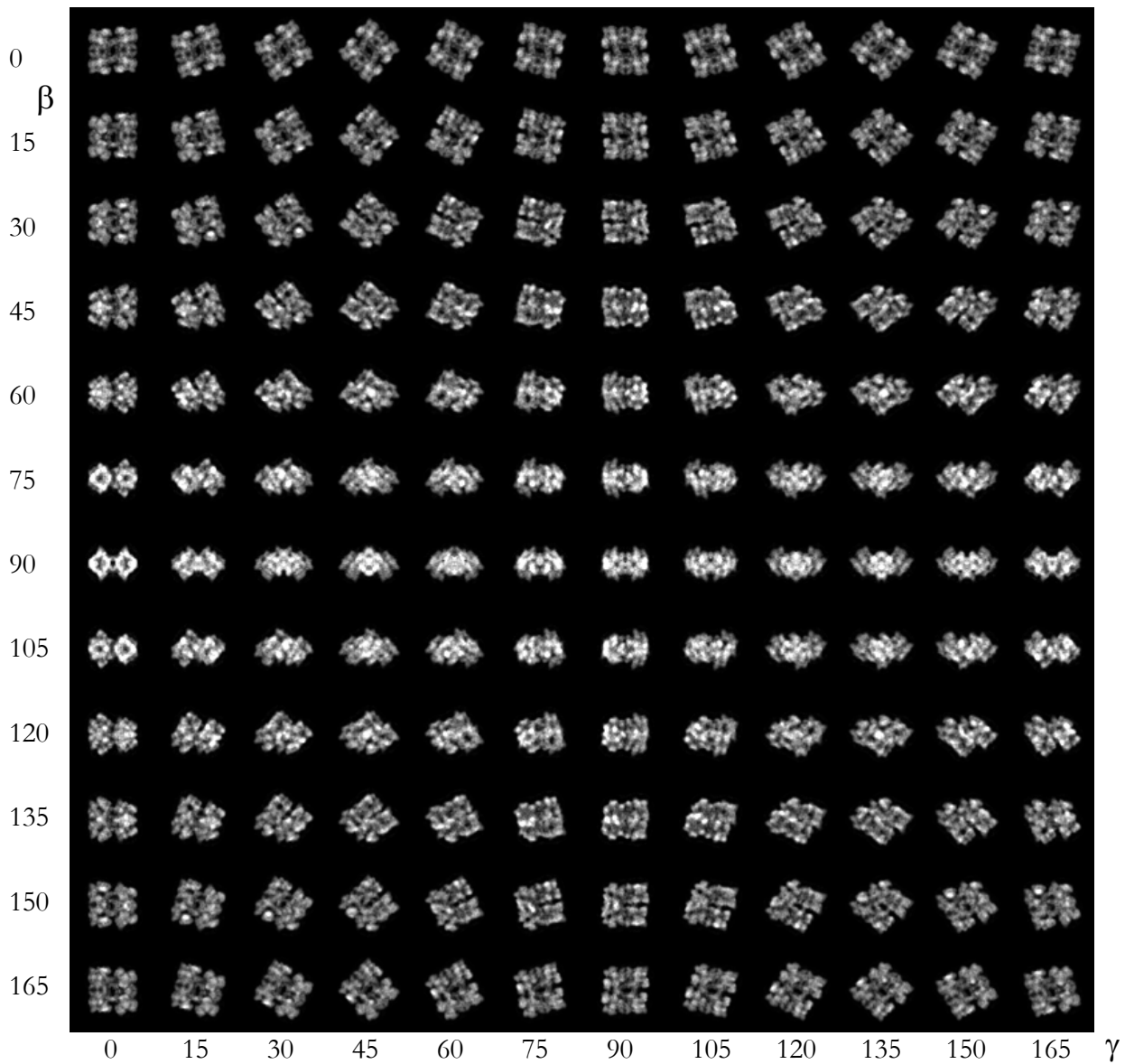


Abbildung 57. Projektionsbilder des deoxygenierten EcHc.

Projektionsbilder-Übersicht über den halben Betawinkelbereich und den Rotationssymmetriewinkelbereich von EcHc. Eine horizontale Spiegelung würde die entsprechenden Projektionsbilder für den fehlenden Bereich zeigen. Die zweizählige Rotationssymmetrieachse steht in den Bildern der oberen Zeile senkrecht auf der Bildebene, weist also zum Betrachter (wie in Abbildung 59). Vertikal verfolgt man eine Kippserie, horizontal eine Drehserie mit jeweils einem 15°-Inkrement.

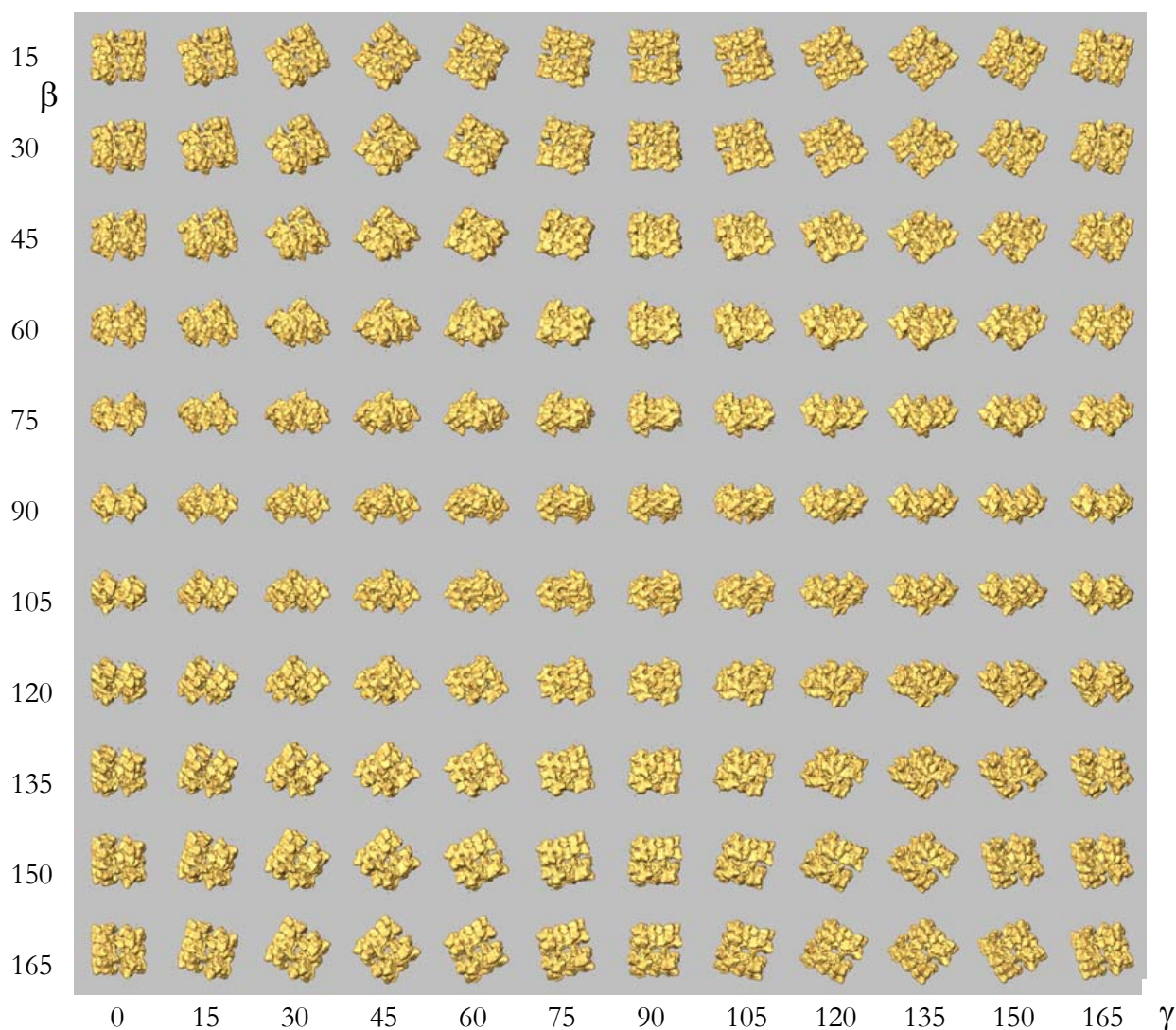


Abbildung 58. Oberflächenansichten des deoxygenierten EcHc.



Oberflächenbilder-Übersicht über den halben Betawinkelbereich und den Rotationssymmetriewinkelbereich von EcHc. Vertikal verfolgt man eine Kippserie, horizontal eine Drehserie mit jeweils einem 15° -Inkrement. Links: Perfekte Flip-Aufsicht - Die zweizählige Rotationssymmetrieachse steht hier senkrecht auf der Bildebene, weist also zum Betrachter (wie in Abbildung 59).

Abbildung 59 bis Abbildung 61 vermitteln die drei Raumgrundansichten in Bezug auf die beiden unterschiedlichen Aufsichten, wie sie sich, unter weiteren Ansichten, reproduzierbar in den Rohdaten präsentieren; für den Mikroskopiker natürlich nur als Projektionen. Die Aufsichten stellen gewissermaßen die, für den initialen natürlichen Symmetrieindruck des Betrachters nativen, Ansichten dar. Als Bearbeiter handelt man folgerichtig und für die weitere Interpretation der Rekonstruktion zum Nutzen, wenn man diesem Prinzip folgend, die zweifache Hauptrotationssymmetrieachse des Moleküls als Normale auf die XY-Bildebene der Abbildung 59 definiert. Die beiden Orthogonalansichten in Abbildung 60 und Abbildung 61 leiten sich durch horizontale bzw. vertikale Kippung um 90° aus der nativen Ansicht in Abbildung 59 ab.

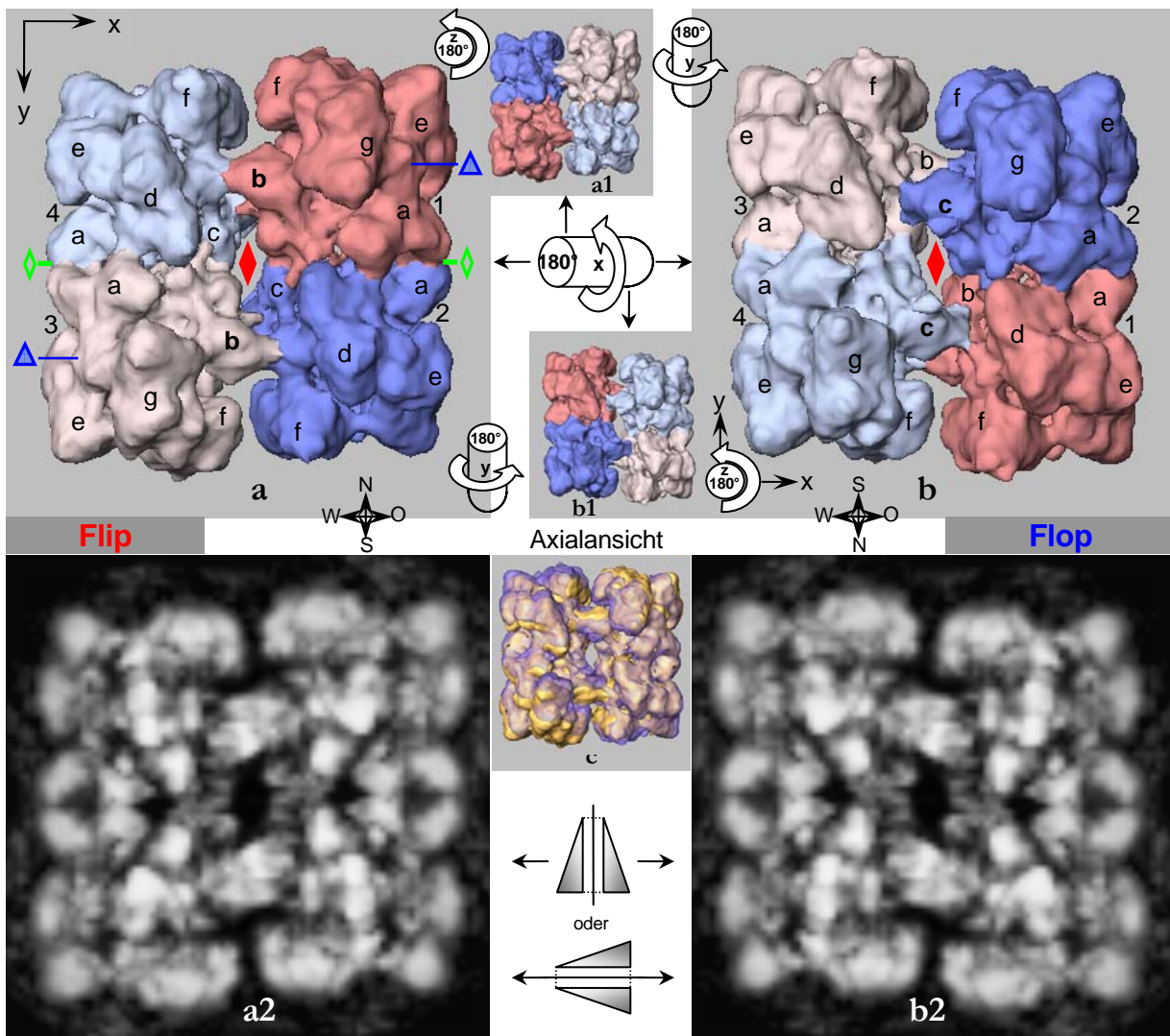


Abbildung 59. Native Ansicht der EChc-Rekonstruktion (Aufsicht (XY)).

Native, also sich aus der Rekonstruktionssymmetrie-Kalibrierung ergebende (siehe Text), Ausrichtung (hier mit Dodekamertrennfurche senkrecht) im Raum der unter Deoxybedingungen erstellten 4x6-Rekonstruktion. a) Flip-Aufsicht. a1) Flip-Aufsicht, 180°-Rotationssymmetrieansicht (∅) von a). a) und a1) sind in einer nicht eingefärbten Rekonstruktion bzw. in den Projektionen (a2) nicht zu unterscheiden. Diese sehen für den Betrachter identisch aus und bieten keine weitere Information. Entsprechendes gilt für die Flop-Aufsicht in b) und deren Rotationssymmetrieansicht in b1), gedreht um die in der z-Achse liegende 2fach-Rotations-Symmetrieachse des 4x6 (RSA-4x6) und b2) (vergleiche Abbildung 18 a, Seite 22). Diese Aufsichten, welche ideale 0°-Aufsichten darstellen, dürfen nicht mit den Kippansichten aus Abbildung 65 verwechselt werden, welche gekippt auf einer Ebenen aufliegen. c) stellt eine Überlagerung der Ansichten a) und b) da, um die Dodekamerverschiebung zu verdeutlichen. Die zweidimensionalen Projektionsbilder in a2) und b2) lassen sich durch Spiegelung zur Deckung bringen, stellen also Enantiomere da. Dreh- bzw. Spiegelindikatoren geben die jeweilige relative Überführung zwischen zwei Ansichten an. Aufsichten zeichnen sich auch durch folgende Punkte aus: Alle Hexamere (1x6) sind sichtbar, keines ist verdeckt. Achsen der Dodekamere (grün; vergleiche Abbildung 72) in West-Ost-Ausrichtung liegend, Blick auf die große, hier in Nord-Süd-Ausrichtung liegende, Dodekamerfurche. Nummerierung der Hexamere der Flip-Ansicht (wie in Abbildung 55) im Uhrzeigersinn von rechts oben mit Nummer 1 (rot) bis 4 (hellblau) (ungerade rot, gerade blau, dunkel Dodekamer 1, hell Dodekamer 2). Die Untereinheitstypen kenntlich gemacht. In der Flop-Ansicht ist der Blick auf die Hexamerzentren von 2 und 4 frei. Damit kann für die Flip-Ansicht eine weites Inter-Dodekamer-Kontaktpaar, für die Flop-Ansicht ein enges Kontaktpaar zwischen den Hexameren 1 und 4 und den Hexameren 2 und 3, definiert werden. Die Bildebene und die RSA der Hexamere schließen einen Winkel von 38° ein (vergleiche Abbildung 71 b und c), die Projektion derselben auf der Bildebene liegen horizontal und alle parallel.

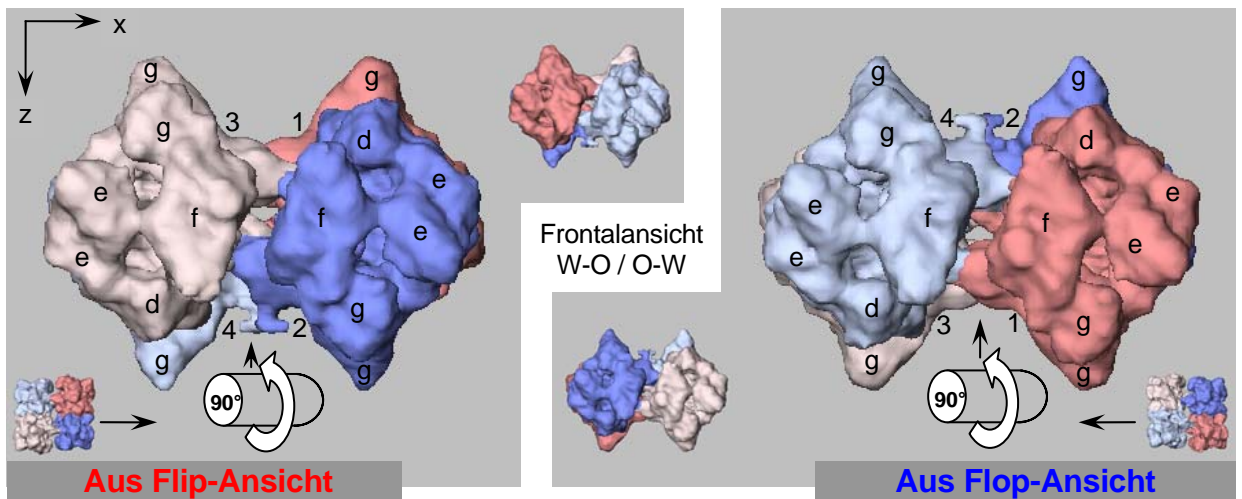
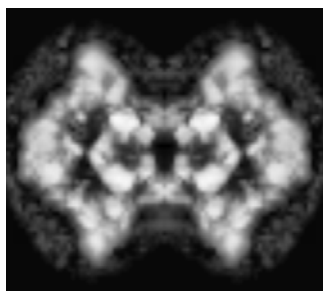


Abbildung 60. Seitenansicht 1: Native Ansicht 90° horizontal gekippt (XZ).

Die Hexamere der Dodekamere (1-2; 3-4) stehen für den Betrachter hintereinander, er schaut entlang der Dodekamerachsen



(vergleiche Abbildung 72). Die RSA benachbarter Hexamere aus verschiedenen Dodekamern (1+4, 2+3) liegen parallel (vergleiche Abbildung 71). Die kleinen Bilder in der Mitte zeigen jeweils die entsprechende Rotationssymmetrieansicht. Legendenbilder: Links: Projektion der Seitensicht aus der Flip-Ansicht. Drehung oder Spiegelung überführt sie zur Projektion der Flop-Ansicht. Rechts: Flip- und Flop-Ansicht als Überlagerung.

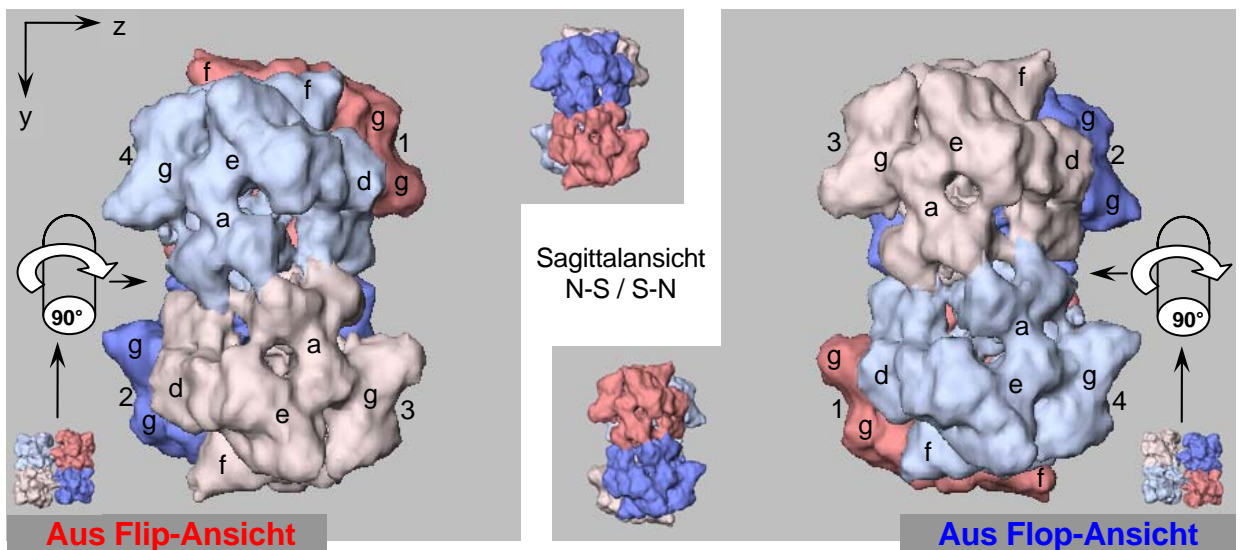
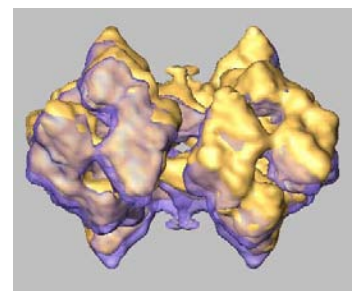
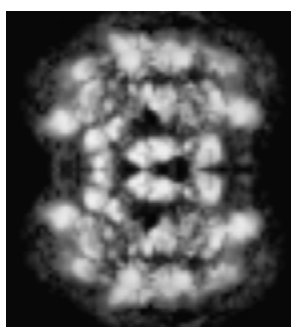
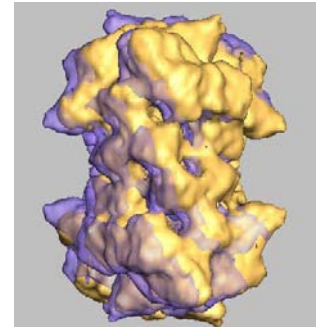


Abbildung 61. Seitenansicht 2: Native Ansicht 90° vertikal gekippte (YZ).



Die Dodekamere stehen hintereinander und deren Achsen senkrecht für den Betrachter, er sieht die größte Ausdehnung eines Dodekamers. Die RSA aller Hexamere liegen für den Betrachter parallel. Die kleinen Bilder in der Mitte zeigen jeweils die entsprechende Rotationssymmetrieansicht. Legendenbilder: Links: Projektion der Seitensicht aus der Flip-Ansicht. Drehung oder Spiegelung überführt sie zur Projektion der Flop-Ansicht. Rechts: Flip- und Flop-Ansicht als Überlagerung.



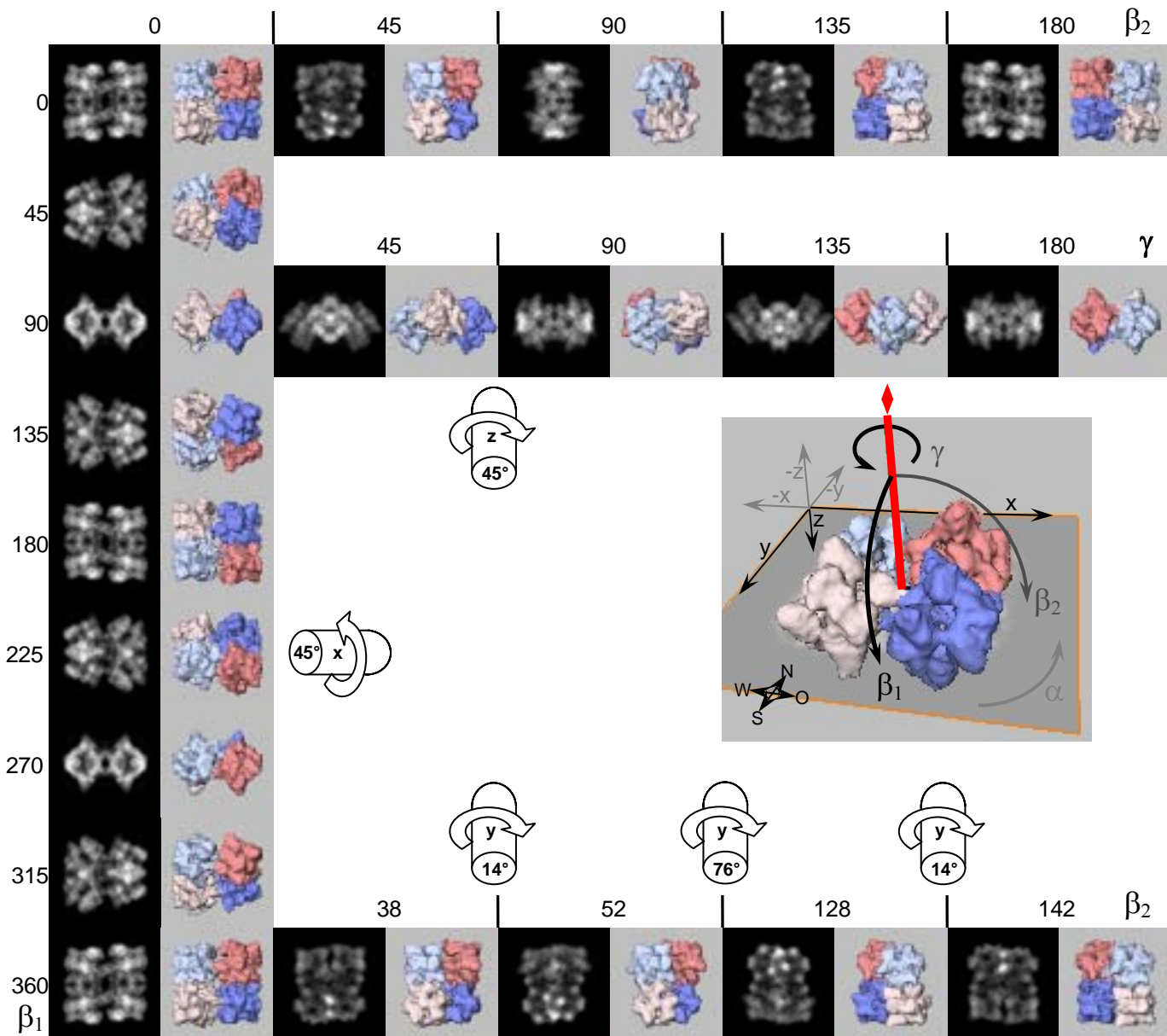


Abbildung 62. Ausgewählte Ansichten der 3D-Rekonstruktion deoxy-EcHc.

Projektions- (links) und Oberflächenansichten (rechts) in Paaren mit gleicher Raumausrichtung. Die einzelnen Bildpaare zeigen ausgezeichnete Ansichten und sind in räumlichem Bezug angeordnet. Nach der Nomenklatur von Abbildung 55: dunkelrot: Hexamer 1 (1x6-1); dunkelblau: Hexamer 2 (1x6-2); hellrot: Hexamer 3 (1x6-3); hellblau: Hexamer 4 (1x6-4). Die horizontalen Reihen sind aus Platzgründen nicht vollständig in Bezug auf die Symmetrie, doch sind diese leicht gedanklich und entsprechend zu vervollständigen mit in der Projektion gleichen und in der Oberflächenansicht ähnlichen Form aber mit weiterrotierten Hexamerpositionen. Bis auf die untere horizontale Reihe betragen die Winkelinkremente 45° . Die untere horizontale Reihe stellt die Kippung der RSA der Hexamere zur EcHc-Hauptsymmetrieachse (vergleiche Abbildung 71 c) von 52° bzw. zur EcHc-Aufsichtsebene von 38° dar (siehe Abbildung 63). Die perspektivische Übersicht in der Mitte erklärt die Zuordnung der kartesischen Raumwinkel zu den Rotationen nach Euler der, hier rot dargestellten, zweifachen EcHc-Rotationssymmetrieachse. Der Ursprung des kartesischen Koordinatensystems ist hier der Übersichtlichkeit wegen außerhalb vom Molekülzentrum eingezeichnet worden. Der Darstellbarkeit halber wird hier zwischen β_1 und β_2 Winkel unterschieden, was so normalerweise nicht gemacht wird. β_2 stellt eine Kombination von β -Kippung, Drehung um $\gamma = 90^\circ$ und Rückdrehung um $\alpha = 90^\circ$ dar. β_1 entspricht in einem kartesischen Koordinatensystem einer Drehung um die x-Achse und β_2 um die y-Achse.

Weitere interessante Ansichten als Ergänzung zu den drei vorab gezeigten Grundansichten sind in den ausgewählten Kipp- und Drehansichten in Abbildung 62 zu sehen. Besonders Ansichten, ähnlich jenen in der oberen und unteren Reihe (" β_2 "; $n * 90^\circ \pm 52^\circ$ - bzw. $n * 90^\circ \pm 38^\circ$ -Kippungen mit $n = 0, 1, 2, 3$; Abbildung 63) sind ebenfalls oft und leicht in den elektronenmikroskopischen Molekülbildern wieder erkennbar. In diesen Lagen nehmen die

Symmetrieachsen der Hexamere fast parallele bzw. senkrechte Ausrichtung zur Bildebene ein und machen damit, im Vergleich zu anderen Lagen, viele Kontaktpunkte zur Oberfläche des Lösungsmittels möglich. Auch Bilder wie in der “ $\beta 1$ ” Serie mit ungeraden Vielfachen von 45° ($n * 45^\circ$ mit $n = 1,3,5,\dots$) sind so oder ähnlich zu finden, das heißt mit Winkeln, die von dem hier dargestellten idealen Winkel etwas abweichen können und in Projektionsbildern kaum zu unterscheiden sind.

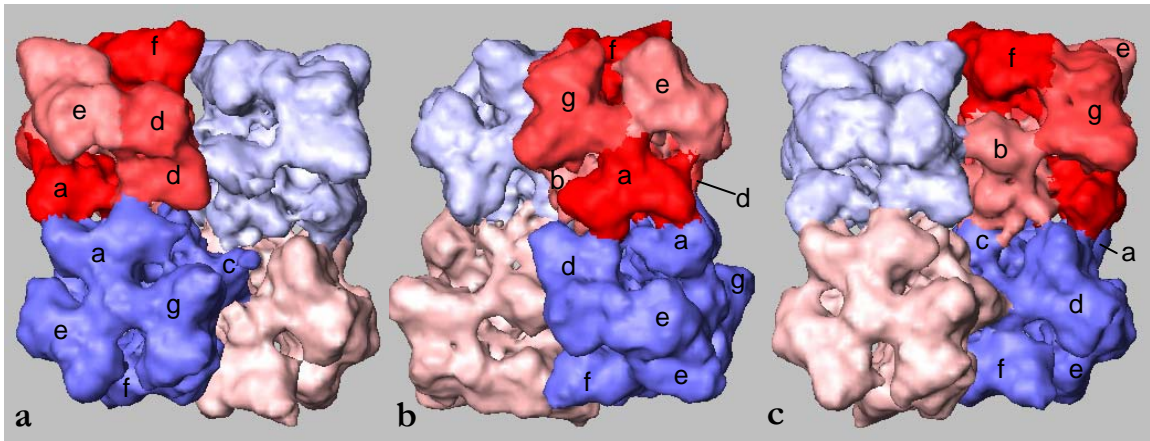


Abbildung 63. -142° -, -52° - und 38° -Vertikalkippansichten.

Beispielhaft drei der “Beta 2”-Vertikalkippansichten aus Abbildung 62 vergrößert dargestellt. a) -142° , b) -52° , c) 38° aus Flip-Aufsicht um die y-Achse gekippt. In Hexamer 1 (rot) sind die Untereinheiten unterschiedlich eingefärbt.

Diese Betrachtung muss mit dem weiter oben erwähnten (Abbildung 19, Seite 23) Kippverhalten des Moleküls abgerundet werden. Die gezeigten idealen Flip- bzw. Flop-Aufsichten sind bei einem konkreten Modell des Moleküls (siehe 3D-Druck Abbildung 43, Seite 58), welches man auf eine Ebene legen kann nicht stabil. Sie stehen in diesem Falle nur auf zwei diagonal angeordneten Punkten und werden nach einer der beiden möglichen Seiten kippen, bis sie mit einem dritten Punkt auf der Ebene aufliegen. Dieses von van Heel (van Heel and Dube, 1994) als “Rocking” bezeichnete Phänomen ist in Abbildung 64 und Abbildung 65 beschrieben. Außerdem besitzt das 4×6 -Molekül eine weitere stabile Lage (Abbildung 66) die es auf einer Ebene einnehmen kann. Dabei ist es frontalseitig zur Ebene gerichtet und bildet mit diesen vier Kontakte aus. Von den drei Grundansichten aus betrachtet, sieht man fast ideale Axial-, Frontal- bzw. Sagittalansichten. Es wäre denkbar, dass die beschriebenen Mehrfachkontakte sich auch mit Oberflächen von Lösungsmitteln oder Trägerfilmen ausbilden könnten und so bevorzugt vorkommen würden. Doch wäre dies für den Bearbeiter in den Primärbildern kaum von idealen Ansichtsprojektionen zu unterscheiden.

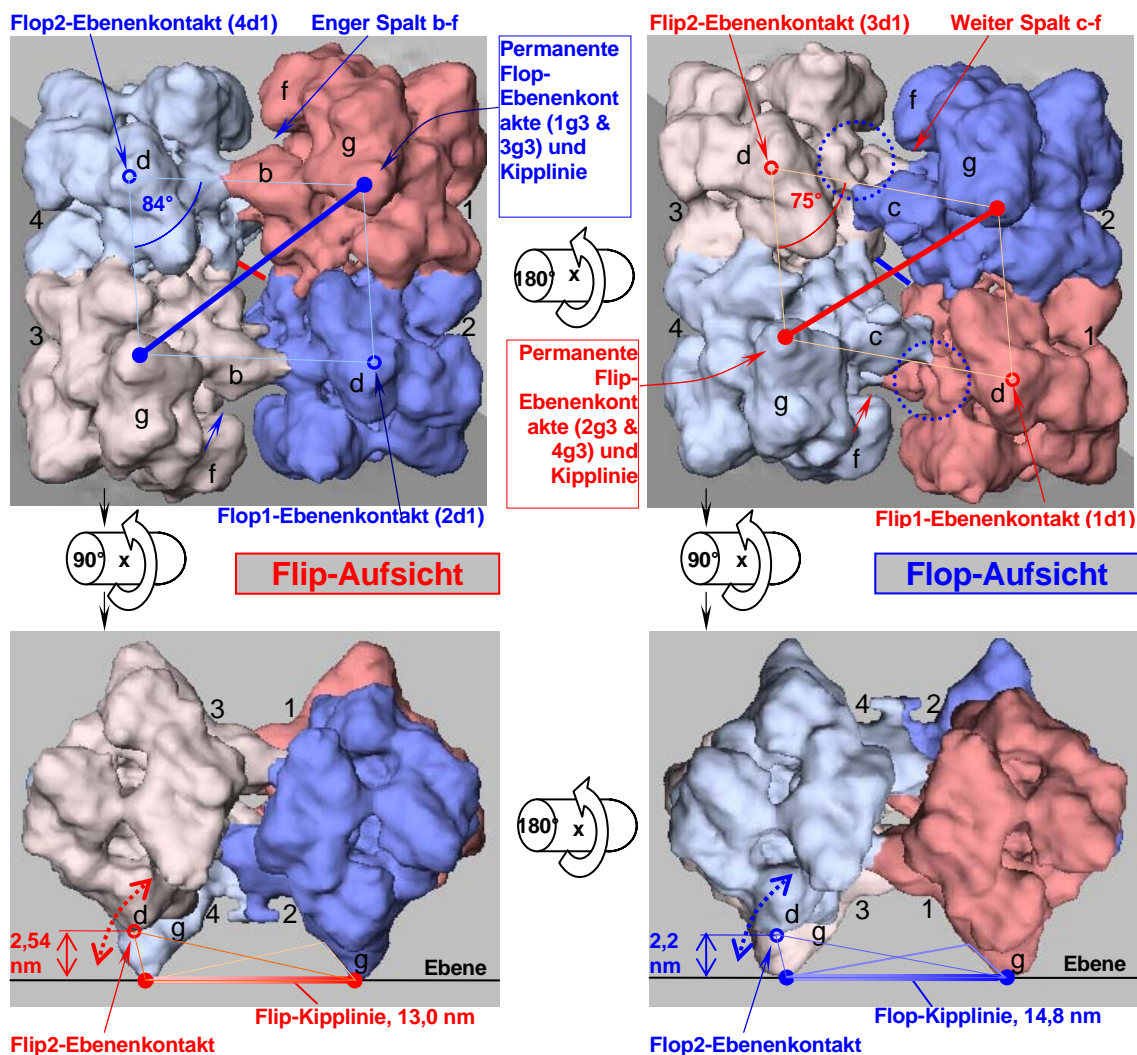


Abbildung 64. Zwei labile Aufsichtenlagen des 4x6-EcHc.

Die oberen beiden Bilder zeigen zwei verschiedenen Aufsichten des Moleküls wie in Abbildung 59, welche durch 180°-Drehung um die x-Achse (hier gezeigt) oder y-Achse ineinander überführt werden können. Die zweifache EcHc-Rotationssymmetrieachse (4x6-R2SA) zeigt in Richtung des Betrachters, steht also senkrecht auf der Bildebene. Die Dodekamertrennfurche (Abbildung 18 a) weist Nord-Süd-Ausrichtung auf. Das auf (nicht in) einer Ebene labil und waagrecht auf den exponierten Teilen der Domäne 3 der zur Ebene weisenden g-Untereinheiten (1g3&3g3 bzw. 2g3&4g3) stehende Molekül würde für den Betrachter diese optimale Aufsicht bieten. Diese Punkte sind durch die ausgefüllten Kreise am Ende der Kipplinien dargestellt, welche in der unteren Bildreihe von links nach rechts gesehen von hinten (hell) nach vorn (dunkel) verlaufen. Wie in Abbildung 65 gezeigt, würde das so gelagerte Molekül natürlich nicht stehen bleiben und nach einer der beiden Seiten in eine stabile Lage kippen, bis es mit einem dritten Punkt die Ebene berührt, wie in 1. und 2. Reihe in Abbildung 65 dargestellt. Dieser exponierte Punkt (Kreis gleicher Farbe) wird jeweils von der Domäne 1 der d-Untereinheit (2d1&4d1 bzw. 1d1&3d1) der anderen Hexamere gestellt. Die drei Punkte spannen die in der Abbildung als mit dünnen Linien angedeuteten Flächen auf. Für die jeweils der Auflageebene zugewandte Aufsichtsseite des Moleküls verläuft die Kipplinie, für den Betrachter vom Molekül verdeckt, immer diagonal von links oben nach rechts unten – im Hintergrund durch die Schnittlinie der hellgrauen Fl*p1-Kontaktenebene mit der dunkelgrauen Fl*p2-Kontaktenebenen (im Falle: Flip -> x-Drehung -> Flop) extrapoliert. Die Länge dieser Linie ist durch die Dodekamerverschiebungen der 24-meren Struktur unterschiedlich für die beiden Aufsichten. Die Kipplinie für die dem Betrachter zugewandte Seite liegt auf der vom Betrachter abgewandten, also vom Molekül verdeckten, Seite. Das Kippverhalten resultiert aus der nicht planaren Anordnung der Hexamere im Molekül und der Beteiligung unterschiedlicher Domänen an den Kontakten zur Auflageebene – es wird von van Heel (van Heel and Dube, 1994) als “Rocking” bezeichnet (Abbildung 19, Seite 23). Unterscheidung der beiden möglichen Aufsichten nach van Heel (van Heel and Dube, 1994): Links: Flip-Aufsicht (rot). Rechts: Flop-Aufsicht (blau). In gezeigter Flip-Aufsicht überragt das rechte Dodekamer das linke und ist die Kipplinie kürzer als in der Flop-Aufsicht. In der Flip-Aufsicht sind zudem die inneren Hexamerzentren (gepunktete blaue Kreise) zu sehen, sind also nicht von den Spitzen der c-Untereinheiten verdeckt, wie in der Flip-Ansicht durch die b-Untereinheiten. Die c-Untereinheiten (Hexamere 2 und 4) stehen dichter zusammen als die b-Untereinheiten (Hexamere 1 und 3), was im Gegenzug mit einem größeren Spalt zwischen den c- und f-Untereinheiten der Hexamere 2 und 4 im Vergleich zu dem engeren Spalt zwischen den b- und f-Untereinheiten der Hexamere 1 und 3 einhergeht. Mittels der eingezeichneten Abstände (Flip: 2,54 nm; Flop: 2,20 nm) zwischen Kipplinie (Kipplinielängen: Flip: 13,0 nm; Flop: 14,9 nm) und einer gedachten Linie zwischen den beiden temporären Kontaktpunkten (Abstände der Kontaktpunkte: Flip: 17,0 nm; Flop: 16,2 nm) (rechts im mittleren Bild) kann der Kippwinkel zwischen den beiden stabilen Lagen berechnet werden: Flip-Kipp-Winkel: $2 \times 16,6^\circ$; Flop-Kipp-Winkel: $2 \times 15,2^\circ$, was mit den gemessenen Winkeln (Abbildung 65) gut übereinstimmt. Roter bzw. blauer gepunkteter gebogener Doppelpfeile: Bewegungsrichtung der

Ebenenauflagepunkte bei der Kippung; das Molekül befindet sich im Moment der Aufnahme genau in der Mittellage zwischen den beiden stabilen Endkipplagen, in denen jeweils einer der markierten Ebenenkontaktpunkte die Ebene berührt.

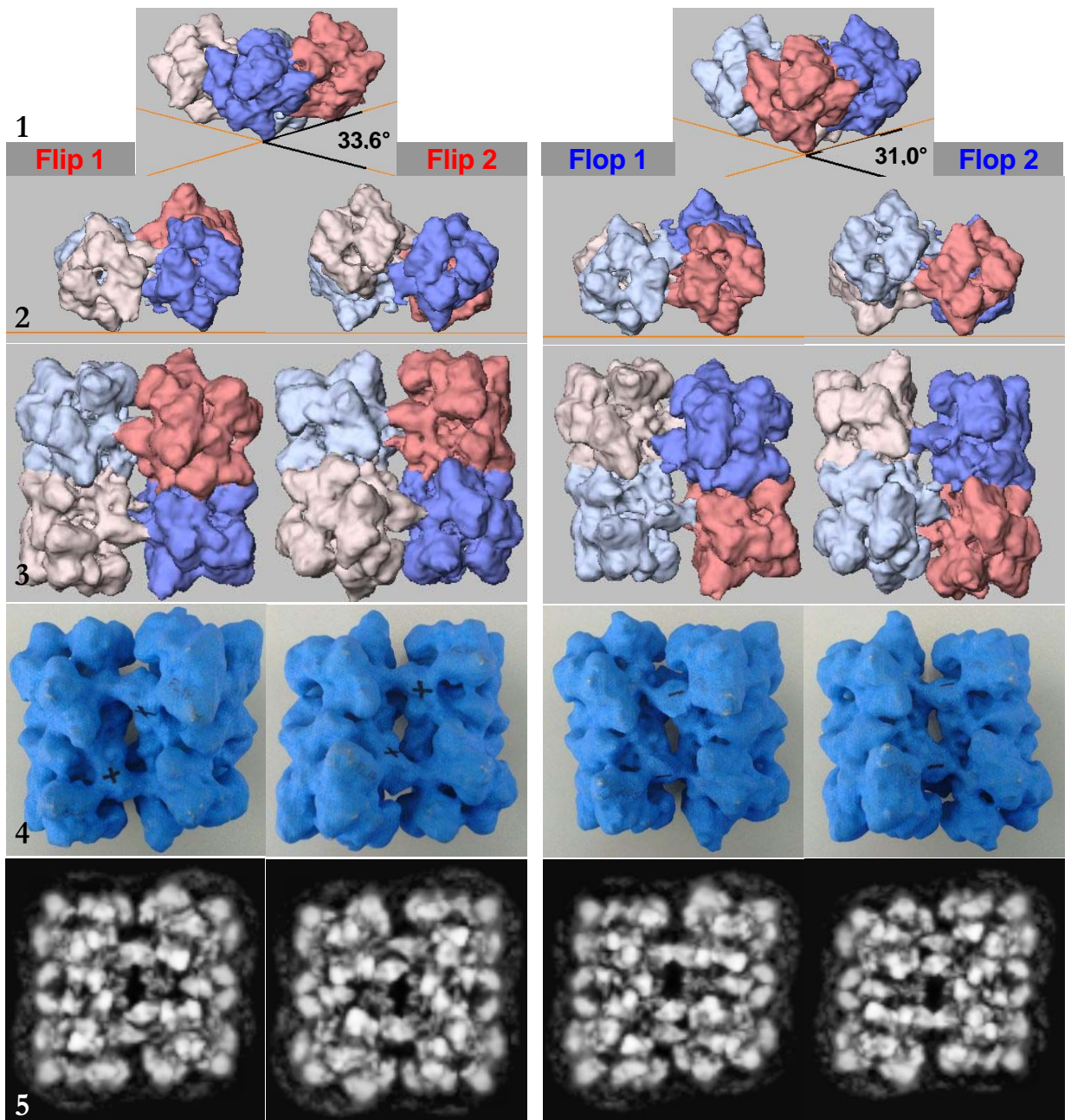


Abbildung 65. Bistabile Kipplagen im 4x6-EcHc für beide Aufsichten.

Wie in Abbildung 64 schon erwähnt, gibt es für die zwei Aufsichten je zwei stabile Kipplagen auf einer Ebene – von van Heel (van Heel and Dube, 1994) als "Rocking" bezeichnet (Abbildung 19; hier gezeigt am deoxygenierten EcHc). Bei Ausführung der Kippung können Kippwinkel von ca. $33,6^\circ$ für Flip (links) und 31° für Flop (rechts) gemessen werden, was mit den berechneten Werten in Abbildung 64 gut übereinstimmt. In der 1. Reihe sind die Auflageebenen in Seitenansichten eingezeichnet. Der Betrachter schaut entlang der Kipplinien, welche in den Schnittlinien der Ebenen liegen. In der 2. Reihe sind die Kippungen auf waagerechten Ebenen (orange) von der Seite (β_1 bzw. x-Drehung) betrachtet ausgeführt. In der 3. Reihe werden die Fastaufsichten von oben betrachtet. In der 4. Reihe sind die entsprechenden Aufsichten als Photographien der 3D-Ausdrucke (Abbildung 43, Seite 58) zu sehen. In der 5. Reihe sind die entsprechenden Projektionsansichten gezeigt.

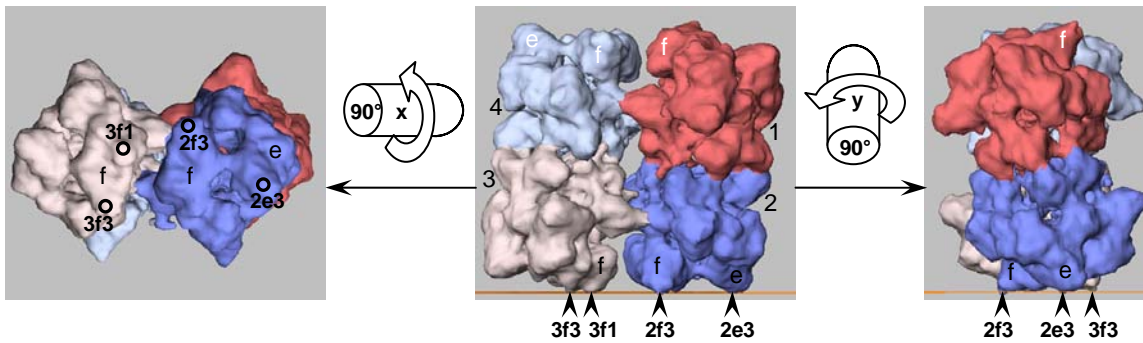


Abbildung 66. Stabile Frontallage (XZ-Lage) des 4x6-EcHc.

In dieser Lage bildet das Molekül frontalseitig 4 Kontakte (offene Kreise bzw. Pfeilspitzen) mit der Ebene, 2 mit den Domänen 1 und 3 der f-Untereinheit (3f1 und 3f3) des unteren Hexamers des in Flip-Aufsicht (wie Abbildung 59 a) linken und tiefer stehenden Dodekamers und je eine mit der Domäne 3 der f-Untereinheit (2f3) und der e-Untereinheit (2e3) des rechten unteren Hexamers. Das gilt für beide Rotationssymmetrieansichten, angedeutet mit schwarzen bzw. weißen Bezeichnungen der Untereinheiten. Um diese Lage einzunehmen ist das Molekül in der Axialansicht (Mitte) über die 3f- bzw. 1f-Untereinheit leicht auf das höher stehende Dodekamer gekippt. Die Sagittalansicht ist auch leicht gekippt. Die Frontalansicht (links), man schaut durch die Ebene hindurch, ist keine optimale wie in Abbildung 60.

Zuletzt müssen noch die Kontakte (Tabelle 8) innerhalb des Moleküls (Abbildung 67, Abbildung 68), soweit sie aus der Rekonstruktion zu differenzieren sind, gezeigt werden. Das heißt, dass hier rein deskriptiv die in der Rekonstruktion als massebehafteten Verbindung zu erkennenden Bereiche dargestellt werden. Eine Aussage, ob diese wirklich Verbindungen im Sinne von Atomwechselwirkungen (Kovalente Bindung, Ionische WW, ...) darstellen, kann hier nicht gemacht werden. Die beiden identischen 2x6-Strukturen des 4x6-EcHc werden durch sechs Kontakte (zwei in Flip-, vier in Flop-Aufsicht, Abbildung 68 4x6 Axial) zusammengehalten. In der Flip-Aufsicht liegen die Interdodekamerkontakte der b-Untereinheiten so weit auseinander wie die Intradodekamer-Hexamereabstände. In der Flop-Aufsicht weisen die Kontakte der c-Untereinheiten einen geringeren Abstand auf. Zusätzlich sind in der Flip-Aufsicht noch zwei Kontakte (b3~d3) vorhanden die in der Flop-Aufsicht nicht zu sehen sind. Die beiden, sich durch die zentralen Linkeruntereinheiten b und c unterscheidenden Hexamere in einem Dodekamer (Abbildung 68 2x6 Sagittal und mittig in 4x6 Axial) werden durch vier Kontakte verbunden. Der Kontakt a3~a3 teilt sich in einen massiven äußeren und einen filigranen inneren Teil auf. Die Kontakte in einem symmetrischen (Abbildung 16, Seite 19) Crustaceenhämocyanin, ein 1x6-Molekül, wurden früher schon beschrieben (Gaykema et al., 1984; Markl and Decker, 1992)(Abbildung 15). Die Kontakte im nicht symmetrischen Hexamer als Teilstruktur des 4x6-EcHc werden in Abbildung 68 1x6 unten gezeigt und deren Symmetrien in Abbildung 72 g. Das Hexamer setzt sich aus drei Dimeren mit ihren massereichen Kontakten (2x1; a~b/c, d~e, f~g) zusammen, welche in der Hexameraufsicht als scheinbare Trimere (3x1) über die zentrale, als Speichen wirkende, Domänen 2 verbunden sind. Jeweils einem Dimerkontakt liegt auf der anderen Seite eines Hexamers, also bei Drehung um 180°, ein Kontakt gegenüber, welcher sich massearm zwischen den Domänen 3 zweier benachbarter Untereinheiten erstreckt; sie werden hier als Nicht-Dimerkontakte (!2x1) bezeichnet. Im Crustaceenhämocyanin sind in der Hexameraufsicht peripher noch Kontakte zwischen den Untereinheiten vorhanden, welche im EcHc an folgenden Stellen vorkommen: 1a3~1e1, 2a1~2g3, 3a3~3e1, 4a1~4g3. Die einzige dabei festzustellende Regelmäßigkeit ist, dass diese Kontakte alle auf der Flop-Aufsichtsseite liegen.

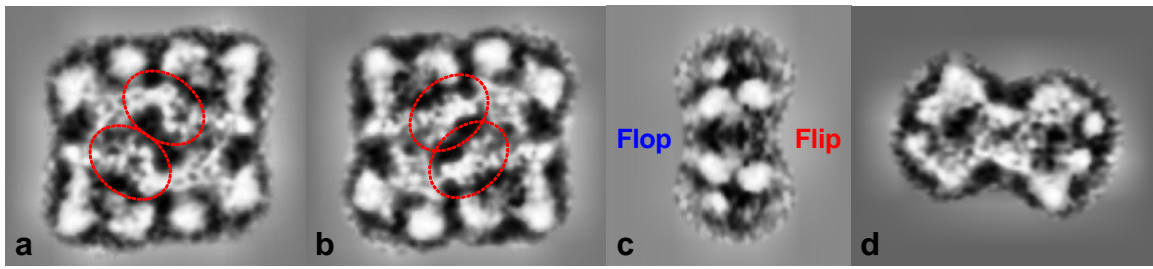


Abbildung 67. Schnittbilder der Interdodekamerkontakte.

a) und b) gesehen von der Flip-Ausrichtung. a) Kontakt 1b-4cdf und 3b-2cdf (roter Kreise). Diese Kontakte sind an den Zentren der gegenüberliegenden Hexamere lokalisiert. Der Abstand zwischen diesen beiden Flipseiten-Kontakten ist größer als der, zwischen den beiden Flopseiten-Kontakten in Bild b) 4c-1bd und 2c-3bd. Diese Kontaktstellen liegen zum Zentrum des (4x6)-Moleküls hin verschoben. c) Sagittalan-sicht. d) Frontalan-sicht.

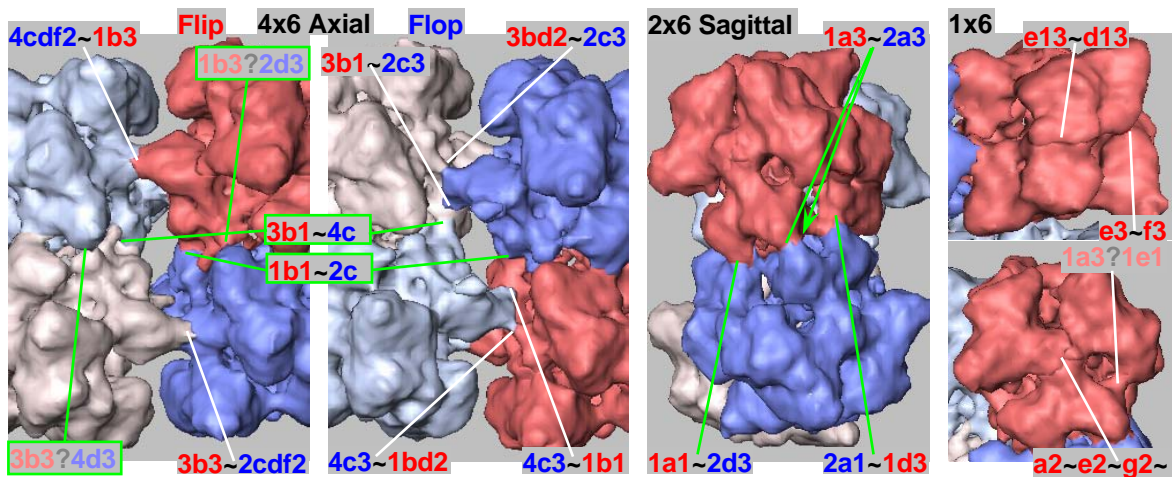


Abbildung 68. Kontakte im deoxygenierten 4x6-EcHc-Molekül.

Auf Ebene des Gesamt-moleküls (4x6 Axial) lassen sich die Kontakte entlang der Dodekamertrennfurche und auf Ebene der Dodekamere (2x6 Sagittal und mittig in 4x6 Axial mit grünem Rand und Linien) die Kontakte zwischen den beiden Hexameren eines Dodekamers definieren. Innerhalb eines Hexamers kann man drei Dimere mit Dimerkontakten (1x6 oben, Lateralkontakt) oder zwei Trimere mit Trimerkontakten (1x6 unten, Zentralkontakt) definieren. Außerdem treten lateral noch drei weitere Kontakte zwischen den Untereinheiten auf, welche kein Dimer bilden. Sie werden hier Nicht-Dimerkontakte (2x1) genannt. Für eine Auflistung sämtlicher Kontakte und der verwendeten Nomenklatur siehe Tabelle 8. Rot ist b-Untereinheit und eng, blau ist c-Untereinheit und weit.

Tabelle 8. Kontakte im deoxygenierten 4x6-EcHc-Molekül.

Tabelle Links: Die sechs Kontakte zwischen den beiden Dodekamern (2x6) (Abbildung 68 4x6 Axial). Mitte: Die vier Kontakte innerhalb eines Dodekamers (Abbildung 68 2x6 Sagittal). Rechts: Die drei Dimere (2x1), die zwei Trimere (3x1) und die drei Nicht-Dimerkontakte (!2x1) in einem Hexamer (Abbildung 68 1x6, Abbildung 15). "-" Abtrennung der laufenden Nummer einer Struktur; 1x6-2 = Hexamer Nummer 2. "~" = Kontakt; a~b = Kontakt zwischen a und b. a~e~g~ = g auch Kontakt zu a. "≈" = Kontakte. 4cdf2 = Domäne 2 der Untereinheit c, d und f des Hexamer 4. d13 = Domäne 1 und 3 der Untereinheit d (aller Strukturen der Ebene, hier aller Hexamere). "/" = ausschließendes oder; b/c = b oder c je nach Hexamer.

in 4x6			in 2x6		In allen 1x6	
Aufs.	2x6-1≈2x6-2	Kontakte			2x1	!2x1
Flip	1b3~4cdf2	weit	1x6-1≈1x6-2.		a13~b/c13	e3~f3
	3b3~2cdf2		1x6-3≈1x6-4		d13~e13	b/c3~g3
	4c3~1bd2	Zentrum von 1x6-1 frei	1a3~2a3, 3a3~4a3	f13~g13	a3~d3	
Flop	4c3~1b1	eng	1a1~2d3, 3a1~4d3	3x1		
	2c3~3bd2		2a1~1d3, 4a1~3d3	a2~e2~g2~		
	2c3~3b1		1b1~2c1, 3b1~4c1	b/c2~d2~f2~		

5. Rekonstruktionssymmetrie des 4x6-EcHc-Moleküls

Für die Rekonstruktion von EcHc wurden mit der Projektions-Referenzierung (B.2.2.7) mit der Literatur übereinstimmende (Boisset et al., 1995; de Haas and Vanbruggen, 1994; Decker et al., 1996; Leidescher and Decker, 1990; Linzen et al., 1985; Markl, 1986a; Markl, 1995; Markl and Decker, 1992; Markl et al., 1981c; Taveau et al., 1997; van Heel and Dube, 1994; Voit et al., 2000) und mit röntgenkristallographischen Daten vergleichbare (ab Abbildung 83) (Gaykema et al., 1984; Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994) Ergebnisse erzielt (Abbildung 53, ab Abbildung 59). Diese werden in dieser Arbeit vorgestellt. Mit der "MSA-Classification" und "Common Line"-basierten "Angular Reconstruction" wurde, bei gleicher zugrunde liegender Symmetrie, eine Auflösungen von ca. 3 nm und eine weniger sinnvolle Geometrie gefunden (Abbildung 69).

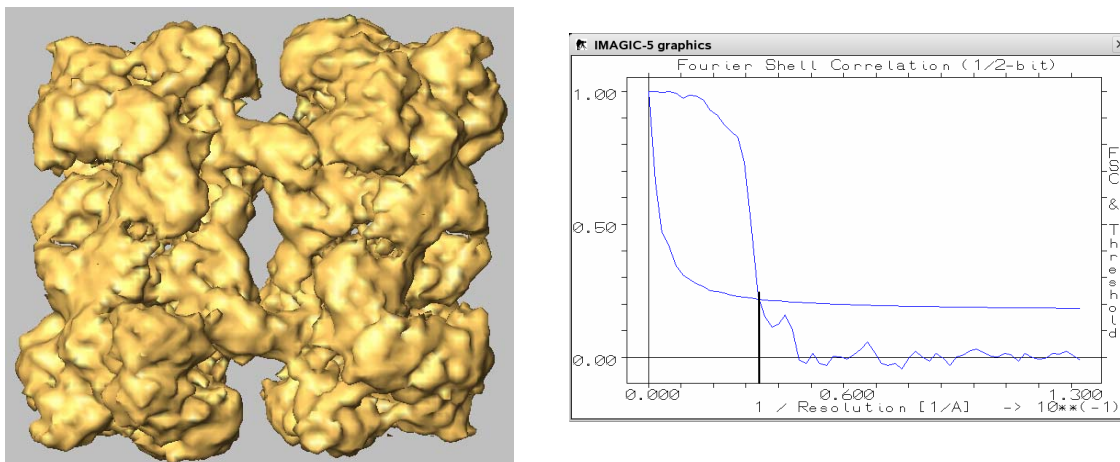


Abbildung 69. Rekonstruktion mit MSA- und Winkelfindung.

Die Rekonstruktion (links) unter Anwendung der C2-Symmetrie mit der MSA-Klassifikation und Common-Line-Winkelfindung ergab eine Auflösung von ca. 3 nm (FSC rechts nach 1/2-bit-Kriterium).

Die Symmetrie für 4x6-Hc-Strukturen wurde mit C2 beschrieben (Boisset et al., 1995; de Haas and Vanbruggen, 1994; van Heel and Dube, 1994) und kann mit in dieser Arbeit gezeigter Rekonstruktion bestätigt werden. Versuche ohne Symmetrie (C1; Abbildung 70 oben) ergaben eine prinzipiell korrekte Geometrie wie mit C2 aber mit geringerer Auflösung (Tabelle 9); hier gibt es zwar keine Restriktionen seitens der Symmetrie (C1 = keine Symmetrie) aber es geht nur die halbe Anzahl an Bildern in die Rekonstruktion ein. Mit angewandter D2-Symmetrie (Abbildung 70 unten) wird die Dodekamerverschiebung wie mit C2 und C1 natürlich unterdrückt, da eine Zweier-Rotationssymmetrie seitens der Betakippung hinzukommt; demzufolge gehen doppelt so viele Bilder in die Rekonstruktion ein, was sich in einer etwas besseren Auflösung ausdrückt, zwingt aber eine falsche Geometrie auf. Also wurde für diese Rekonstruktion des EcHc ebenfalls die C2-Symmetrie zugrunde gelegt. Für einen Vergleich zeigt Tabelle 9 die Auflösungen für die verschiedenen Methoden- und Symmetrieansätze.

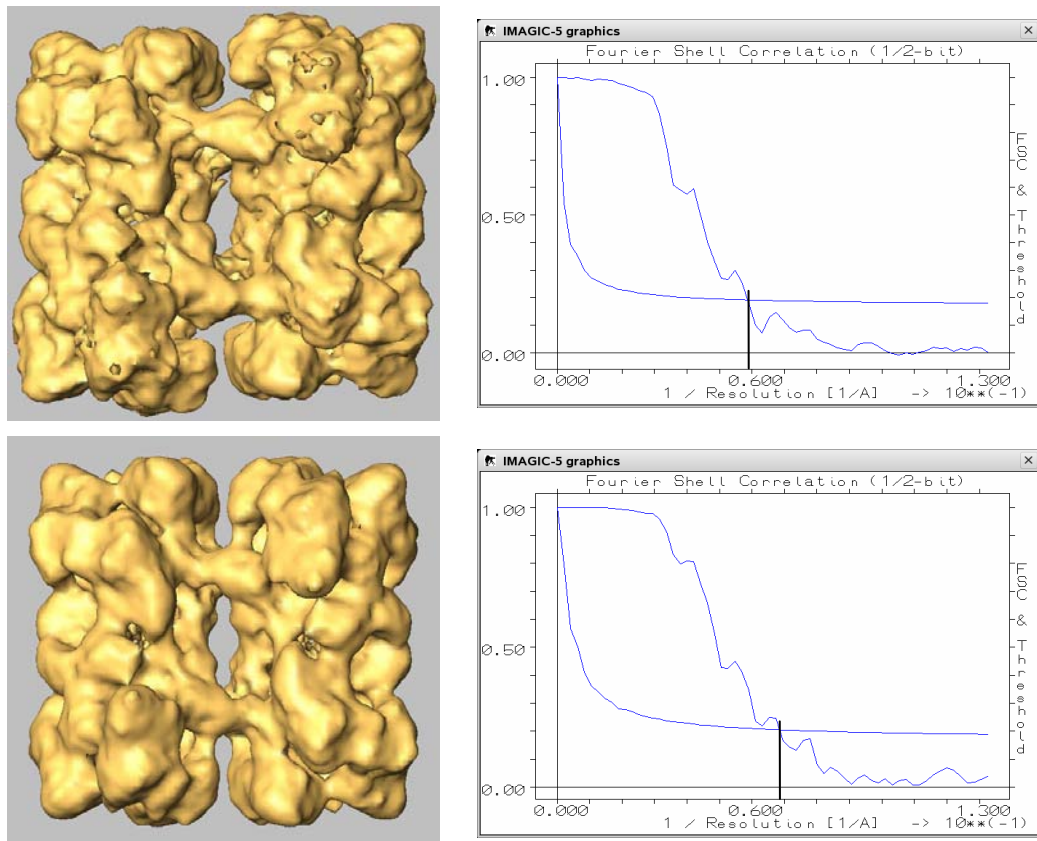


Abbildung 70. Rekonstruktionen mit C1- und D2-Symmetrie.

Der Rekonstruktionsansatz mit C1-Symmetrie (oben) liefert korrekte Geometrie aber geringere Auflösung von ca. 1,7 nm (Tabelle 9), jener mit D2-Symmetrie (unten) unterdrückt die Dodekamerverschiebung bei etwas besserer Auflösung von ca. 1,5 nm. Links jeweils die Rekonstruktion, rechts die FSC-Auflösungskurve nach 1/2-bit-Kriterium.

Tabelle 9. Übersicht der Auflösungen.

Die Auflösungen der verschiedenen Symmetrie- und Methodenansätze.

	Symmetrie	1/2-bit-Schnittpunkt 1/A	Auflösung A
N2-präpariert und Projektions-Referenzierung	C1	0,580	17,2
	C2	0,625	16,0
	D2	0,680	14,7
N2-präpariert und MSA / Winkelfindung	C2	0,340	29,4
O2-präpariert und Projektions-Referenzierung	C2	0,480	20,8

6. Dimensionen, Winkel und Symmetrien der 4x6-, 2x6- und 1x6-Strukturen

Die Dimensionen der Rekonstruktion des deoxygenierten EcHc-Moleküls wurden mit Mercury AMIRA 4 bestimmt. Da die Überlagerung mit der Rekonstruktion von oxy-EcHc (Abbildung 54, C.3) im Rahmen der Auflösung keine Unterschiede erkennen lässt, sind innerhalb der Messgenauigkeit keine Abweichungen zwischen den beiden Formen zu erwarten. Die Trennwerte (siehe Threshold B.2.2.8.1 ab Seite 56) für die dargestellten Graustufen wurden mit IMAGIC-5 bei einem Multiplikator von $0,844 \text{ Dalton}/\text{\AA}^3$ so gewählt, dass sie der aus den Aminosäuresequenzen berechneten Molekularmasse von ca. 1800 kDa entsprechen (Voit et al., 2000) und für die Einstellung in AMIRA 4 übernommen – die Pixelgröße betrug $0,3082 \text{ nm}$ (siehe oben).

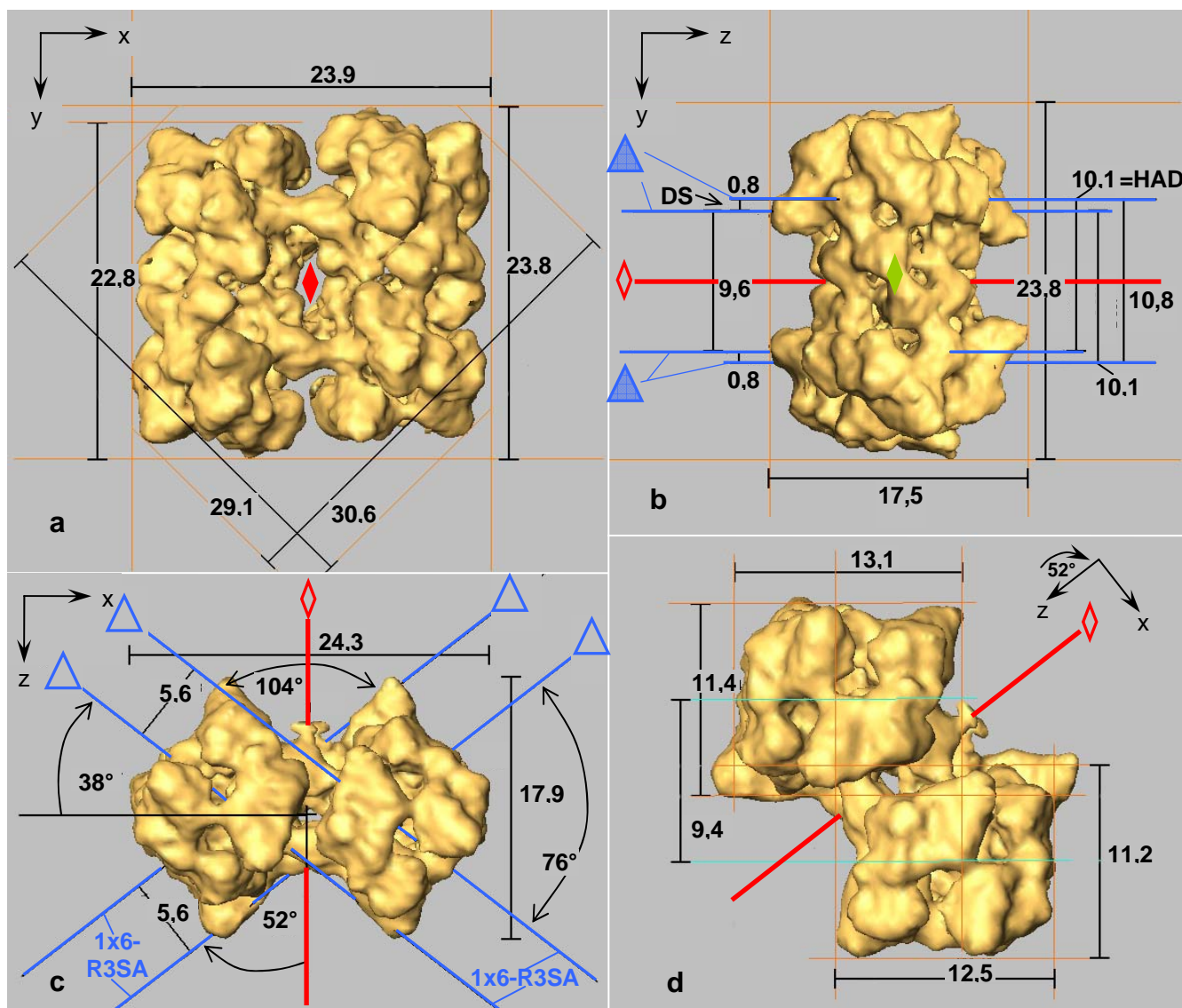


Abbildung 71. Dimensionen und Winkel des deoxygenierten 4x6-EcHc.

Die Bemaßungen wurden mit AMIRA 4 erstellt, bei einer Pixelgröße von 0,3082 nm / Pixel. Die Bemaßungseinheit der Bilder ist Nanometer (nm). a) Flip-Aufsicht mit Blick auf die 4x6-R2SA (◇, Abbildung 59). b) Dodekameransicht (Abbildung 61). c) Hexamere beider Dodekamere von der Seite (Abbildung 60). d) wie c) nur um 52° um y gedreht. Türkise Linien stellen die Mitte zwischen den Trimeren dar. Die Werte sind in Tabelle 10 mit kurzer Beschreibung zusammengefasst. Orange Linien sind Hilfslinien für die Bemaßung. Die schrägen Linien (blau) in c stellen die vier dreifachen Δ Rotationssymmetrieachsen der Hexamere (1x6-R3SA) in der xz-Ebene dar, diese sind auch in b) als waagerechte und parallele Linien in der yz-Ebene zu sehen, nehmen also bemerkenswerter weise, innerhalb der Messgenauigkeit keinen Winkel mit dieser Ebene ein. Oben links sind jeweils die Koordinatenachsen der jeweiligen Bildebene angegeben. DS = Dodekammershift = Interdodekamer-Hexamerabstand = HAYz von Ebene yz aus gesehen, HAD = Hexamerabstand in einem Dodekamer, HAXz = Interdodekamer-Hexamerabstand von Ebene xz aus gesehen. Zur Messgenauigkeit und Fehlerabschätzung siehe Legende zu Tabelle 10.

Das rekonstruierte EcHc-Molekül, das oxygenierte als auch das deoxygenierte, weisen in der Aufsicht (Abbildung 71 a) eine Verschiebung der durch die Hauptfurche getrennten Hälften (der Dodekamere) auf. Diese werden von je zwei (hier senkrecht) in Reihe angeordneten Hexameren gebildet. Die Ausrichtung ist dabei so gewählt, dass die Furche senkrecht steht. Im Falle das rechte Dodekamer relativ zum linken höher steht, entspricht das nach van Heel der Flip-Aufsicht, umgedreht der Flop-Aufsicht – van Heel (van Heel and Dube, 1994) beschreibt dies als Flip-Flop-Shift (A.6.3 ab Seite 14). In dieser Orientierung wurde eine Breite (x-Ausdehnung) von 23,9 nm, eine Gesamthöhe (y) von 23,8 nm und eine Tiefe (z) von 17,5 nm gemessen. An den Außenlinien in Abbildung 71 a kann eine Differenz von 1,1 nm für die

relative Verschiebung der Dodekamere gemessen werden, welche aufgrund von fehlenden lokalen Symmetrien an den Messstellen keinen verlässlichen Wert darstellt. Sinnvoll kann die Dodekamerverschiebung anhand der Abstände der Rotationssymmetrieachsen der Hexamere 1x6-RSA (Abbildung 71 a) zu 0,8 nm bestimmt werden. Aufgrund dieser Verschiebung hat das Molekül eine lange und eine kurze Diagonale die einen Unterschied von $30,6 \text{ nm} - 29,1 \text{ nm} = 1,5 \text{ nm}$ aufweisen. Die Achsen der Hexamere des in Aufsicht (Abbildung 71 a) betrachteten 4x6-Moleküls sind um 52° relativ zur 4x6-R2SA angestellt (Abbildung 71 c). Die jeweils gleich ausgerichteten Achsen der nebeneinander liegenden und aus den beiden verschiedenen Dodekameran stammenden Hexamere liegen, je nach Ansichtsebene, 5,6 nm (xz-Ebene, Abbildung 71 c) bzw. 0,8 nm (yz-Ebene, Abbildung 71 b) auseinander. Die beiden Achsen der Hexamere eines Dodekamers liegen 10,1 nm auseinander (Abbildung 71 b, Abbildung 72 d). Ein Dodekamer hat eine Länge von 22,3 nm (Abbildung 72 f), Breite und Höhe von 12,9 nm bzw. 12,5 nm (Abbildung 72 e). Die beiden Dodekamerachsen liegen 10,8 nm auseinander (Abbildung 72 d) und weisen einen Höhenversatz von 9,4 nm wie in Abbildung 71 d zu sehen auf. Hier wurde auch die Höhe eines Hexamers zu 11,2 nm bestimmt. Die Durchmesser der Hexamer wurden entlang der 1x6-R2SA definiert und betragen 12,2 nm, 12,0 nm bzw. 12,5 nm (Abbildung 73 a). Die in einem Dodekamer hintereinander liegenden Hexamere (genauer deren senkrecht auf der Dodekamerachse stehenden RSA) weisen einen Winkel von 104° , respektive 76° auf (Abbildung 71 c, Abbildung 72 g). Die Dodekamerachsen weisen, wieder hintereinander liegend betrachtet einen Winkel von 17° relativ zueinander auf (Abbildung 72 a). Ein Hexamer des 4x6-EcHc-Moleküls (Abbildung 73) zeigt, abweichend von einer nativen hexameren Struktur wie z. B. beim Langustenhämocyanin (Abbildung 16, Seite 19), keine ideale Rotationssymmetrie. Die 1x6-R2SA um die Dodekamerachse (2x6-RSA) weisen einen größeren Öffnungswinkel ($32^\circ + 30^\circ = 62^\circ$) auf, als die angrenzenden (59°). Die Größe von linkem (32°) zu rechtem (30°) Öffnungswinkel ist ebenfalls asymmetrisch. Streng genommen muss man die Hexamer aus dem 4x6-EcHc als asymmetrisch ansehen und man kann keine Symmetrieachsen definieren. Vereinfachend für die weitere Besprechung werden diese aber, aufgrund der geringen Abweichung von ca. 3,5%, für die Visualisierung idealisiert als symmetrisch angenommen und die definierten Achsen als Symmetrieachsen definiert. Alle Bemaßungen und Winkel sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

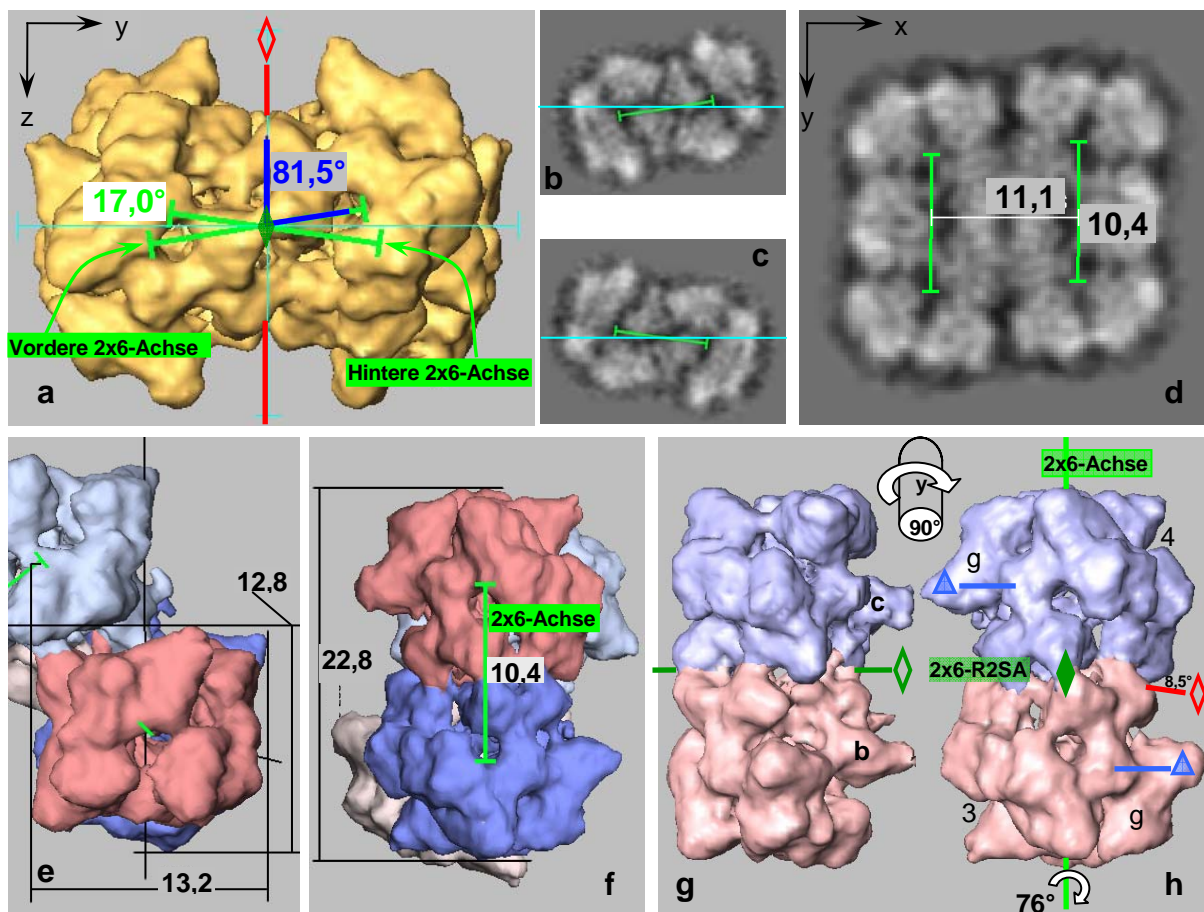


Abbildung 72. Dodekamere (2x6) im deoxygenierten 4x6-EcHc.

a) Von der vertikal gekippten yz -Seitenansicht (Sagittalansicht, hier um 90° um die Blickrichtung gedreht) gesehen nehmen die, in dieser Ansicht hintereinander liegenden Dodekamereachsen (2x6-Achse; hier, um diese sichtbar zu machen vor das Molekül gelegt) einen Winkel von $81,5^\circ$ zur Rotationssymmetrieachse (senkrechte türkise Linie in a) von EcHc ein. Sie sind also sagittalseitig leicht ($8,5^\circ$) gegen die Bildebene der Aufsichten (türkise wagrechte Linie in a-c) und damit 17° relativ zueinander gekippt. Dies führt zum Phänomen des "Rocking" (zwei stabile Kipplagen auf einer Ebene; Abbildung 64 und Abbildung 65). b) + c) Sagittalschnitte Durch die Dodekamere. b) In dieser Ansicht vorderes Dodekamer, c) hinteres Dodekamer, jeweils mit seiner Achse. d) Die beiden Dodekamerachsen liegen $10,8$ nm voneinander entfernt. Die Längen der Dodekamerachsen betragen $10,1$ nm und geben den Mittelpunktsabstand der Hexamere in einem Dodekamer an. Man sieht hier die Projektionen der Achsen auf die Ebene, angegeben ist aber die tatsächliche Länge der nicht parallel zur Bildebene liegenden Achsen. e) Sicht entlang der Dodekamerachse des unteren Dodekamers. Es sind die beiden Hauptsymmetrieachsen der beiden hintereinander liegenden Hexamere zu sehen. f) Die Länge eines Dodekamers ist mit $22,3$ nm etwas mehr als doppelt so groß wie der Abstand seiner Hexamere, was bedeutet das diese etwas überlappen müssen. Das Molekül ist hier um den halben "Rocking"-Winkel ($8,5^\circ$) gekippt, um die Dodekamerachse senkrecht zu stellen. g + h) Die Dodekamere weisen eine zweifache \diamond (Pseudo-)Rotationssymmetrieachse (2x6-R2SA, dunkelgrün) auf welche senkrecht auf der Dodekamerachse (2x6-Achse, hellgrün) und der 4x6-R2SA (rot) steht. Die Heterogenität der Untereinheiten b und c wird von der Rekonstruktion nicht aufgelöst und kann daher für die Geometriebetrachtung von einer idealisierten Homogenität abweichen. Die exponierten Teile der Domäne 3 der Untereinheiten g werden sind in dieser Rekonstruktion nicht gleich ausgebildet. Damit die Dodekamerachse parallel zur Bildebene steht wurde das Dodekamer hier um $8,5^\circ$ um die x -Achse aus der Flip-Aufsicht gekippt (g) und um 90° um die y -Achse gedreht (h). In g) liegt die 2x6-R2SA in der Bildebene und horizontal, in h) schaut man entlang der 2x6-R2SA. Die R3SA (Δ , blau) des einen Hexamers ist gegen jene des anderen Hexamer um 76° um die Dodekamerachse gedreht (siehe auch Abbildung 71). Zur Messgenauigkeit und Fehlerabschätzung siehe Legende zu Tabelle 10.

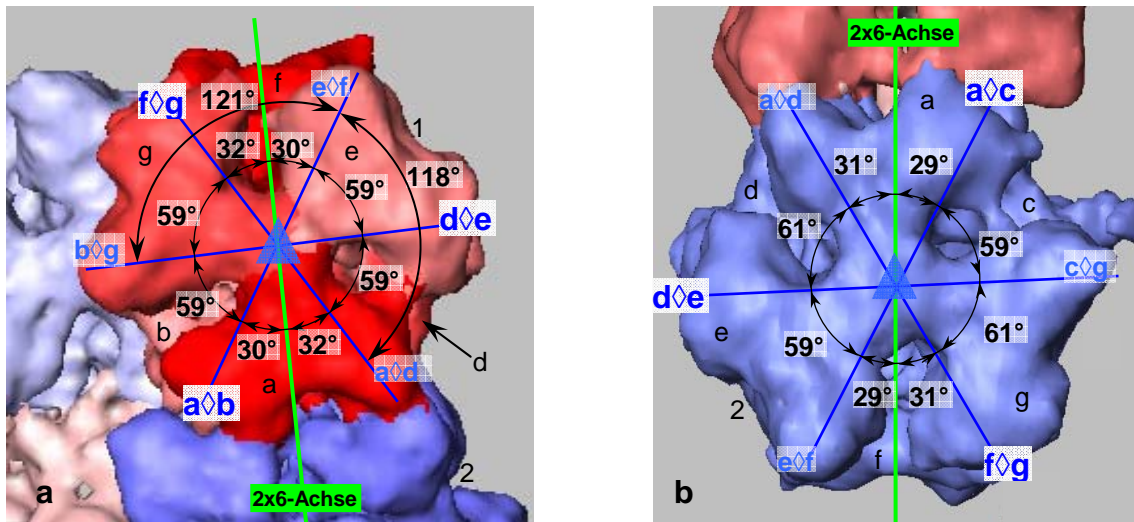


Abbildung 73. Hexamer (1x6) im deoxygenierten 4x6-EcHc.

Die Stellung des Hexamere im Dodekamer relativ zur Dodekamerachse (2x6-Achse). a) Hexamer 1 in Hexameraufsicht (entlang der R3SA). b) Hexamer 2 in Hexameraufsicht. Wie in Abbildung 16 (Seite 19) beschrieben weist ein symmetrisches Hexamer eine dreifache Δ Rotationssymmetrieachse (R3SA) durch sein Zentrum auf. Auf dieser stehen orthogonal drei symmetrisch verteilte zweifache \diamond Rotationssymmetrieachsen (R2SA). Wie die Winkel im EcHc zeigen ist das Hexamer im 4x6-Molekül nicht ideal symmetrisch. Die Nomenklatur der 1x6-R2SA und somit auch der Zwischenwinkel erfolgt über die beteiligten Untereinheiten. Eine 1x6-R2SA wird vom Dimerkontakt ($a\sim b/c$, $d\sim e$, $f\sim g$) aus gesehen definiert. Sie schneidet die 1x6-R3SA und tritt am Nicht-Dimerkontakt ($e\sim f$, $b/c\sim g$, $a\sim d$) aus dem Hexamer aus. Die drei 1x6-R2SA werden also mit $a\sim b/c$, $d\sim e$ und $f\sim g$ benannt. Wird auf die gegenüber liegende Hälfte Bezug genommen so werden die Bezeichnungen $e\sim f$, $b/c\sim g$ und $a\sim d$ benutzt. Nach dieser Messung nimmt im Hexamer 1 (3) des EcHc die 1x6-R2SAfg mit der 2x6-Achse einen Winkel von 32° und die 1x6-R2SAab einen Winkel von 30° ein ($32^\circ + 30^\circ + 59^\circ = 121^\circ$). Die beiden Winkel um die $b/c\sim g$ bzw. $d\sim e$ fallen dementsprechend mit 59° kleiner aus als der ideale halbe Symmetriewinkel von $\frac{1}{2} 120^\circ$ ($59^\circ + 59^\circ = 118^\circ$). b) Für das Hexamer 2 (4) des EcHc gilt entsprechendes. Anhand der R2SA wurden drei Durchmesser für die EcHc-Hexamere bestimmen, siehe Tabelle 10. Es muss an dieser Stelle allerdings dazu gesagt werden, dass diese Werte nicht als absolut gesehen werden dürfen, da die Ebenen anhand deren die Achsen bestimmt wurden, zwar mit Sorgfalt, aber per Augenmaß eingepasst wurden.

Tabelle 10. Dimensionen und Winkel des deoxygenierten 4x6-EcHc.

nx6-EcHc = Teilstrukturen von EcHc mit n Hexameren. nx6-R(m)SA = (m-fache) Rotationssymmetrieachse eines nx6-mers. nx6(-m)-(EcHc) = Teilstruktur Nummer m (z. B.: 1x6-2-EcHc = 2. Hexamer vom EcHc). ¹ prinzipiell die gleiche Größe gemessen aber einmal an der Außenseite und einmal als Achsenabstand. Für die Arbeit entscheidend ist der Achsenabstand von 0,8 nm, da die Messung an der Außenseite durch äußere Strukturen verfälscht wird. ² Das doppelte 90°-Komplement hiervon wurde von van Heel (van Heel and Dube, 1994) als "Rocking angle" definiert. \perp = orthogonal zu. \parallel = parallel zu. Eine statistische Fehlerabschätzung ist mit der direkten Messmethode kaum möglich. Doppel- bzw. Vierfachmessung, wo möglich, ergeben eine maximale Abweichung von 0,5 nm für die Längenangaben und 1,5° für die Winkel. Statistische Fehler ergaben sich vor allem bei programmbedingten Ungenauigkeiten des Anlegens der Maßhilfslinien. Eine generelle Unsicherheit muss auch für die Wahl des für die dargestellte Molekülmasse (Trennwert für die Grauwerte) und durch den Grad der Realitätstreue bei erreichter Auflösung erwähnt werden. Hier könnten gerade die exponierten Teile des Moleküls, welche die Maßhilfslinien in der Regel tangieren, bei einer verfeinerten Rekonstruktion einer Modifikation unterliegen.

Dimensionen	[nm]	Abbildung
Breite des 4x6-EcHc, x-Ausdehnung	23,9	Abbildung 71 a
Höhe des 4x6-EcHc, y-Ausdehnung	23,8	Abbildung 71 a
Tiefe des 4x6-EcHc z-Ausdehnung	17,5	Abbildung 71 b
lange Diagonale des 4x6-EcHc	30,6	Abbildung 71 a
kurze Diagonale des 4x6-EcHc	29,1	Abbildung 71 a
Breite eines EcHc-Dodekamers 2x6-EcHc, x-Ausdehnung	12,5	Abbildung 72 e
Höhe eines EcHc-Dodekamers 2x6-EcHc, y-Ausdehnung	12,9	Abbildung 72 e
Tiefe eines EcHc-Dodekamers 2x6-EcHc, z-Ausdehnung	22,3	Abbildung 72 f
Höhe eines EcHc-Hexamers 1x6-EcHc in Richtung 1x6-R3SA	11,2	Abbildung 71 d
Durchmesser eines Hexamers 1x6-1-EcHc \perp 1x6-R3SA	12,5	Abbildung 71 d
Durchmesser eines Hexamers 1x6-4-EcHc \perp 1x6-R3SA	13,1	Abbildung 71 d
Durchmesser 1x6-EcHc \perp 1x6-R3SA und \parallel 1x6-R2SA-a δ b	12,0	Abbildung 73 a
Durchmesser 1x6-EcHc \perp 1x6-R3SA und \parallel 1x6-R2SA-d δ e	12,2	Abbildung 73 a
Durchmesser 1x6-EcHc \perp 1x6-R3SA und \parallel 1x6-R2SA-f δ g	12,5	Abbildung 73 a
Interdodekamer-Hexamerabstand \parallel xz-Ebene und \parallel 1x6-R3SA	9,4	Abbildung 71 d
Interdodekamer-Hexamerabstand \parallel xz-Ebene und \perp 1x6-R3SA	5,6	Abbildung 71 c
Interdodekamer-Hexamerabstand \parallel yz-Ebene und \perp 1x6-R3SA ²	0,8	Abbildung 71 b
Dodekamerverschiebung, (2x6-1)-(2x6-2)-y-Verschiebung (außen) ¹	1,1	Abbildung 71 a
Interdodekamer-Abstand, x-Abstand der beiden Dodekamerachsen	10,8	Abbildung 72 d
Intradodekamer-Hexamerabstand (1x6-RSA-Abstand eines 2x6)	10,1	Abbildung 72 d
Winkel	[°]	
Frontseitiger Winkel zwischen 1x6-RSA und 4x6-RSA	52,0	Abbildung 71 c
Sagittalseitiger Winkel zwischen 2x6-RSA und 4x6-RSA ²	81,5	Abbildung 72 a
Winkel zwischen 1x6-1-R2SAfg und 2x6-1-RSA	32,0	Abbildung 73 a
Winkel zwischen 1x6-1-R2SAef und 2x6-1-RSA	30,0	Abbildung 73 a
Intrahexamer-Winkel zwischen 1x6-1-R2SAbg 1x6-1-R2SAfg/ab	59,0	Abbildung 73 a
Winkel zwischen 1x6-2-R2SAfg und 2x6-1-RSA	31,0	Abbildung 73 b
Winkel zwischen 1x6-2-R2SAef und 2x6-1-RSA	29,0	Abbildung 73 b
Intrahexamer-Winkel zwischen 1x6-2-R2SAcg 1x6-2-R2SAac	59,0	Abbildung 73 b
Intrahexamer-Winkel zwischen 1x6-2-R2SAcg 1x6-2-R2SAfg	61,0	Abbildung 73 b
Kippung des EcHc über die exponierten Ecken der Flip-Aufsicht	33,2	Abbildung 65
Kippung des EcHc über die exponierten Ecken der Flop-Aufsicht	30,4	Abbildung 65

D. Diskussion

1. Allgemeines

Dieser Arbeit ging der Vergleich des, aus transmissionselektronenmikroskopischen Daten rekonstruierten, 1x6-Hämocyanin der Languste *Palinurus elephas* (PeHc; Abbildung 16) mit der Röntgenkristallstruktur¹² der Languste *Panulirus interruptus* (PiHc) (Gaykema et al., 1984) voraus (Meissner et al., 2003; Stohr, 2001). Die gute Übereinstimmung dieser Daten motivierte das Vorhaben, auch die höheren Aggregationsformen zu untersuchen, wie in dieser Arbeit das 4x6-EcHc. Der implizit höhere Anspruch, der sich aus der komplexeren Struktur ergibt, war eingeplant, wurde aber unterschätzt, da sich damit präparative Probleme einstellten, welche so nicht vorauszusehen waren und sich die Rekonstruktion aufgrund einer niedrigeren Symmetrie schwieriger gestaltete. Die Vorbereitung der Cryo-Präparate für die hochauflösende Transmissions-Messung im EM und die Cryo-Elektronenmikroskopie selbst zeigten, dass die Methoden in diversen Aspekten und Nuancen noch zahlreicher Entwicklungsarbeit bedurften, welche im Rahmen diese Arbeit geleistet wurden. Hierbei konnten wir im Laufe der Arbeit in langwierigen Versuchsreihen die Methode so verfeinern, dass es uns letztendlich gelang, die Proteine in adäquater Weise auf EM-Bilder dazustellen. Dies meint, die Objekte konnten rein in der kristallfrei kälteerstarten Lösung (oft amorphes 'Eis' genannt), ohne Kohlefilmträger (also in "holey carbon" Filmen) und mit geringer Elektronenstrahlbelastung aufgenommen werden. Bei dem komplexen Aggregationsgrad des EcHc stellte sich dies als schwierig heraus und eine 3D-Rekonstruktion eines 4x6-Moleküls wurde vorher von anderen Arbeitsgruppen in dieser Auflösung nicht veröffentlicht. Möglicherweise verhinderten hier Adhäsionen an der Trägerfilmoberfläche der Lochränder und Inter-Epitop-Wechselwirkungen lange Zeit eine gleichmäßige Verteilung der Proteine in der präkälteerstarten Lösung. Diese präparativen Probleme führten dazu, dass sich das eigentliche Ziel der Arbeit, die computergestützte Rekonstruktion des EcHc, von der zunehmenden Aufmerksamkeit auf die Herstellung der Primärdaten überlagert wurde und so stark verzögerte. Mittlerweile haben die methodischen Verbesserungen jedoch zu mehreren 3D-Rekonstruktionen im 10-Ångström-Bereich aus der Arbeitsgruppe geführt (Martin et al., 2007; Meissner et al., 2007). Sich aus dem methodischen Lernprozess herauskristallisierende Methoden zur qualitative Bewertung der Primärdaten stehen nun am Anfang einer Rekonstruktion und entscheiden hier schon über die Richtigkeit der Rekonstruktion und zeigen den Erfolg oder Misserfolg der vorangegangenen Präparation und EM-Aufnahmen. So war die Information auf den EM-Bilder oft von Störfaktoren wie thermischer Drift (über die zeitliche Integration von einer Sekunde) und Vibrationen des Probenhalters, die aus apparativen Gegebenheiten des EM herrührten, überlagert und somit unbrauchbar. Aber auch die Rekonstruktion eines wenig symmetrischen und so großen Objektes wie dem EcHc (C2-Symmetrie, Molekulargewicht 1,8 MDa) stellte sich als relativ kompliziert heraus. Ein initiales Modell wie bei der Rekonstruktion von PeHc fehlte. Das SAXS-Modell (Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001) und Strukturarbeiten über oligohexamere Arthropodenhämocyanine (de Haas et al., 1997b; Lamy et al., 1993; Lamy et al., 2000; Meissner, 2000; Meissner et al., 2000; Orlova, 2000; Orlova et al., 1999; Orlova et al.,

¹² Eine Reaggregation mit 2 der 3 nativen Untereinheitstypen.

2000; van Heel and Dube, 1994) erlaubten allerdings erste, für die Rekonstruktion hilfreiche, Einsichten in die Geometrie des Moleküls.

2. Geometrie

Für eine detaillierte Beschreibung des bekannten Aufbaus der Arthropodenhäemocyanine siehe A.6.3 ab Seite 14 und des EcHc im Speziellen siehe A.6.4 ab Seite 21. Die folgende Diskussion setzt das dort Gesagte voraus und bezieht sich auf die Ergebnisse, welche die in dieser Arbeit gefunden geometrischen Daten von EcHc ab Abschnitt C.2 ab Seite 64 dokumentieren - Tabelle 10 auf Seite 88 mit ihren Abbildungsverweisen kann als Sprungreferenz zu den interessierenden Punkten genutzt werden. Wie bereits beschrieben, besteht dieses Spinnenhämocyanin aus einem hierarchischen Aufbau aus 4 Hexameren, von denen sich je 2 zu identischen Halb molekülen des 4x6-EcHc zusammensetzen (Abbildung 55 Seite 70 und Abbildung 18 Seite 22). Die Achsen der beiden Halb moleküle weisen einen Winkel relativ zueinander auf, den "Rocking"-Winkel, die beiden von axial gesehenen Aufsichten unterscheiden sich im nun besprochenen Details, den Flip- und Flop-Aufsichten (Abbildung 64 Seite 78). In der Literatur wurden dazu bisher vor allem die Parameter diskutiert, die in Abbildung 74 dargestellt und in Tabelle 12, Seite 100 den hier gemessenen Parametern der Rekonstruktion von EcHc gegenübergestellt werden. Nur mit diesen alleine ist die komplexe Struktur des 4x6-EcHc nicht vollständig zu erklären.

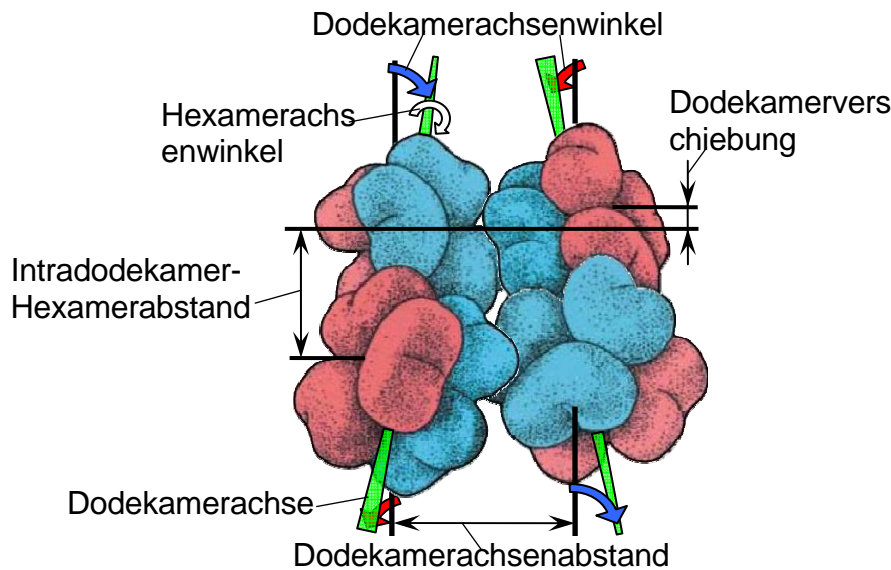


Abbildung 74. In der Literatur angegebene Parameter.

Darstellung der in der Literatur angegebener Parameter, welche in Tabelle 13 angegeben werden. Für den Dodekamerachsenwinkel ist in der Tabelle der Komplementärwinkel zwischen der Dodekamerachse und der Rotationssymmetrieachse des 4x6-EcHc angegeben. Der Hexamerachsenwinkel ist in der Tabelle der Winkel der dreifachen Hexamerrotationssymmetrieachsen bezogen auf die Rotationssymmetrieachse des 4x6-EcHc, also die Hälfte der in der Literatur angegebenen Winkel. Diese Winkel werden bei Angaben in dieser Arbeit entsprechend angepasst angegeben, um sie zu vergleichen. Blaue Pfeile: Kippung hinter die Bildebene. Rote Pfeile: Kippung vor die Bildebene zum Betrachter hin. Abbildungsgrundlage aus (Hartmann and Decker, 2002).

Für das Verständnis des Aufbaus des EcHc ist die Geometrie der größten sich wiederholenden Einheit, der Dodekamere (2x6), interessant und wie sich diese aus den Hexameren aufbaut. Dabei ist die Morphologie der Hexamere innerhalb der Dodekamere gegenüber allein stehenden Hexameren (wie z. B. PiHc) verändert. Nach van Heel (van Heel and Dube, 1994) wäre das 2x6-Halb molekül 2-fach rotationssymmetrisch. Das wäre denkbar, wenn die beiden verschiedenen

Aufsichten mit den engen und weiten Dodekamerkontakten (Abbildung 68 Seite 81) nur durch reine Parallelverschiebung der beiden Dodekamere zustande kämen. Primär stimmt das auch, eine Verschiebung in eine Richtung bringt zwei zentrale Untereinheit näher zusammen und entfernt die beiden anderen voneinander und umgekehrt für eine Verschiebung in die andere Richtung. Tatsächlich realisiert ist der Fall, dass die c-Untereinheiten zusammen geschoben werden.

Man sieht aber am peripheren Spalt zwischen den Untereinheit b/c und f, der größer ist als der zwischen anderen Untereinheiten (siehe dazu Aufsichten in Abbildung 64 Seite 78), dass dem nicht so ist. Der Spalt zwischen c und f der Hexamere 2 und 4 (Flop) ist größer als der zwischen b und f der Hexamere 1 und 3 (Flip), was mit dem engen Dodekamerkontakt der Flop-Aufsicht konform geht. Wenn die Dodekamere (rotations-) symmetrisch wären, dürfte es diesen Unterschied nicht geben. Eine 180°-Rotation eines Dodekamers um seine angenommene zweifache Rotationssymmetrieachse (grüne Routen in Abbildung 76) verändert die Lage der Untereinheit b von Hexamer 1/3 (rot), die den weiten Kontakt mit Hexamer 4/2 (blau) bildet, und bringt sie in eine Position, welche die Untereinheit c von Hexamer 2/4 in engen Kontakt mit Hexamer 3/1 bringt und umgekehrt. Der Unterschied liegt also in Lagen von b und c und lässt sich nur mit der Beschreibung der Dodekamerverschiebung nicht finden. Wie kommt diese unterschiedliche Lage zustande? Hierzu müssten sich entweder diese zentralen Untereinheiten b/c relativ zur idealen Symmetrielage eines idealsymmetrischen Hexamers drehen oder die beiden Hexamer als ganzes müssten relativ zur Dodekamerachse verschiedene Lagen einnehmen. Im EcHc scheint vor allem ersteres realisiert zu sein, wie an den zentralen Trimeren der Hexamere in Abbildung 75 zu sehen ist. Die Untereinheit c der Hexamere 2/4 sind demnach weiter zur Dodekamerachse orientiert als die Untereinheit b der Hexamere 1/3, was die engere Stellung der Interdodekamerkontakte der Flop-Aufsicht erklärt. Da dies nur eine relativ ungenaue Messung darstellt, kann man nicht ausschließen, dass auch der zweitgenante Effekt ebenfalls eine Rolle spielen könnte; Abbildung 73 weist für die dort definierten zweifachen Rotationssymmetrieachsen der Hexamere Asymmetrien auf, die dafür sprechen könnten. Van Heel (van Heel and Dube, 1994) gibt für die Winkel der äußeren 1x6-R2SA (zweifach-Rotationssymmetrieachse) mit der 2x6-Achse 36° und 24° an. Dies stimmt nicht mit den hier gemessenen Winkeln von 30°/32° bzw. 29°/31° (Abbildung 73) überein und resultiert wahrscheinlich daraus, dass die Hexamere als ideal symmetrisch angesehen wurden und der Winkel zwischen den 1x6-R3SA (dreifach-Rotationssymmetrieachse) mit 90° nicht korrekt angenommen wurde.

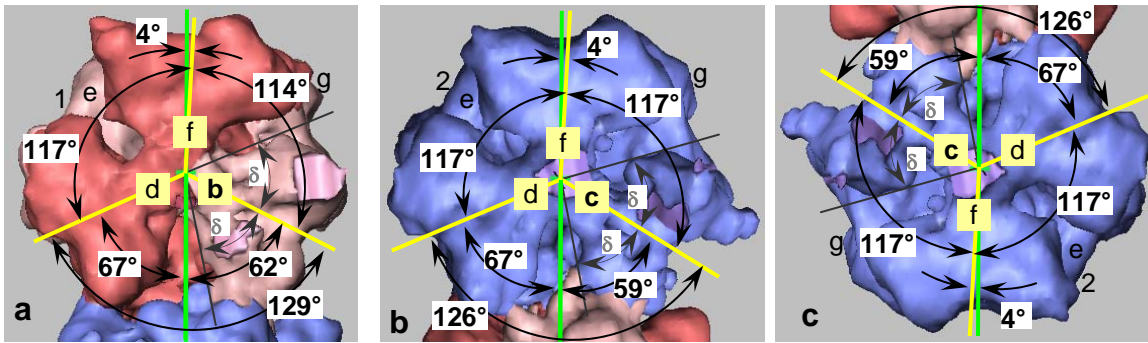


Abbildung 75. Relative Stellung der Untereinheit b und c im Dodekamer.

Aufsicht auf die zentralen Trimere der Hexamere im EcHc. Die Kontakte zwischen den Dodekameran werden durch die Untereinheiten b bzw. c gebildet. Hier wurde versucht, deren Ausrichtung relativ zur Dodekamerachse (grün) zu ermitteln. Dazu wurde eine Halbierende (gelb, δ) in den winkelüberspannenden (graue Linien in b bzw. c beispielhaft) Bereich der Untereinheiten gelegt und deren Winkel zwischen mit der Dodekamerachse gemessen. Dies stellt nur eine erste Annäherung an die Fragestellung dar und sollte nicht als absolut angesehen werden, da es schwierig ist in einem komplex geformten Molekül feste Bezugspunkte zu definieren. a) Für das 1x6-1(3) ergab sich so eine 1x6-1b-2x6-1-Winkel von 62° und b) für das 1x6-2(4) ergab sich so eine 1x6-2c-2x6-1-Winkel von 59° , was mit den engeren Dodekamerkontakten der Flop-Aufsicht gegenüber den Dodekamerkontakten der Flip-Aufsicht konform geht. c) wie b, nur in Originalausrichtung. In b) wurde c) um 180° gedreht, um den Vergleich mit a) zu vereinfachen.

Als weiterer Faktor tritt der Winkel der beiden Dodekamerachsen relativ zueinander (“Rocking”) hinzu (siehe Abbildung 72 a), der die Kontaktstellen näher zum Massenschwerpunkt des EcHc bringt; in Abbildung 76 werden diese Kontaktstellen offen gelegt dargestellt. Damit die im 4x6-Molekül parallel liegenden Hexamere (aus den verschiedenen Dodekameran) überhaupt aneinander vorbei reichen können, müssen sich die beiden Hexamere aus einem Dodekamer in einem von 90° verschieden Winkel rotiert anordnen (Abbildung 71 c). Und selbst dann ist eine Parallelstellung nur dann zu erreichen, wenn sich die Hexamere eines Dodekamers noch aus ihrer Dodekamerachse abkippen würden. Da dass nicht der Fall zu sein scheint, vermutete ich, dass die b/c Untereinheiten nicht nur der beschriebenen Auswärtsdrehung unterliegen, sondern gleichsam durch diese noch eine Abkipfung zur 1x6-R3SA möglich wird, welche die sonst unweigerlich auftretende sterischer Hinderung in dieser komplizierten geometrischen Konstruktion verhindern würde. Dies lässt sich durch Vergleich mit eingepassten Hexameren nachweisen wie in Abbildung 77 gezeigt. Demnach stellt die komplexe geometrische Flexibilität der aufbauenden Einheiten an dieser Stelle des EcHc eine konzertierte morphologische Abstimmung aus all den genannten Punkten dar, welche sich in so feinen Bereichen abspielt, dass sie sich nur durch eine Einpassung von molekularen Daten erschließt.

Es muss hier darauf hingewiesen werden, dass die hier getroffenen Aussagen noch bestätigt werden müssen, da sie aus Messungen resultieren die auf von Hand im EcHc-Molekül definierten Marken basieren und dementsprechend mit entsprechender Ungenauigkeit behaftet sind; sie stellen nur eine erste Annäherung an die Fragestellung dar, da es schwierig ist in einem komplex geformten Molekül feste Bezugspunkte zu definieren.

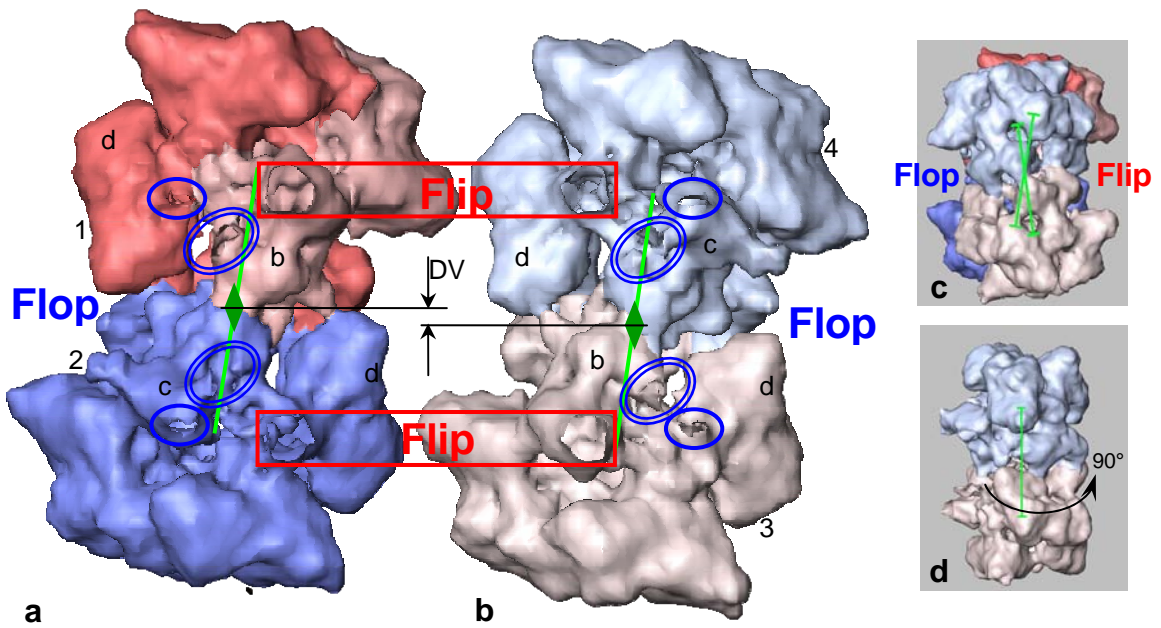


Abbildung 76. "Rocking"-Winkel bringt Dodekamerkontakte enger zusammen.

Die zwei sagittalseitig hintereinander liegenden Dodekamere (wie in c), a) 2x6-1, und b) 2x6-2, getrennt und 2x6-2 um 180° gedreht (um y-Achse wie in d) gezeigt), um den Blick auf die Dodekamerkontakte vom Zentrum aus gesehen freizulegen. Dodekamerachsen sind jeweils um 8,5° aus der Senkrechten gekippt (c), sodass sie nach der Drehung von 2x6-2 gleiche Ausrichtung aufweisen. Man blickt entlang der vermeintlichen 2x6-R2SA (grüne Route), die Dodekamerverschiebung (DV) ist erhalten. Ohne den Winkel zwischen den Dodekamerachsen würden die Kontaktstellen der Untereinheit b (in der Flip-Aufsicht zu sehen, rote Rechtecke) nicht zu den Zentren der Hexamere 2 bzw. 4 reichen und die Kontaktstellen der Untereinheit c (in der Flop-Aufsicht zu sehen, blaue Ellipsen) nicht die Nähe der Zentren der Hexamere 1 bzw. 3 erreichen.

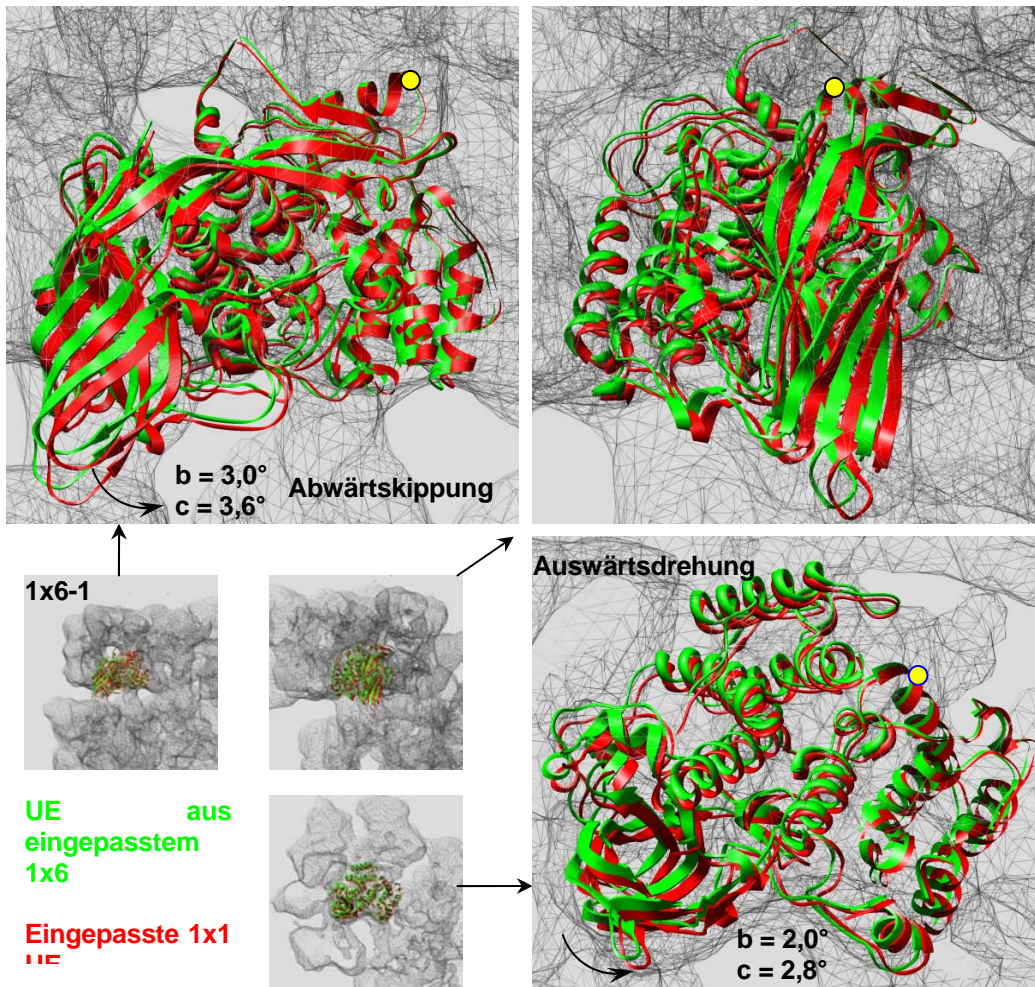


Abbildung 77. Lage der Untereinheiten b und c im Vergleich mit idealer Symmetrie.

Die Untereinheit b und c sind im Vergleich zu Untereinheit in einem idealsymmetrischen Hexamer relativ zur 1x6-R3SA und den anderen Untereinheiten auswärts gedreht und zur SA hin (abwärts) gekippt. Gelber Punkt: Lage der Rotationsachse. Die Auswärtsdrehung und Abwärtskipfung müsste ja eigentlich das SAXS-Modell unterstützen, aber die Änderungen fallen geringer aus als im SAXS-Modell und beschränken sich plusminus auf die hexamere Strukturebene. Hier soll nicht behauptet werden, es gäbe keine Superquartärstrukturänderung, aber sie scheint zu gering zu sein, als dass sie in einer 20-Å-Rekonstruktion detektierbar wäre.

3. Geometrievergleich mit Strukturmodellen

Tabelle 11. Übersicht der durchgeführten Oberflächen-Vergleiche.

Tabellarische Darstellung der durchgeführten Vergleiche mit Oberflächen aus Strukturmodellen verschiedener (Röntgenkristallographie, EM) Herkunft, welche im Folgenden besprochen werden. *Modellierung an LpHc-II-Untereinheiten; ** sehr wahrscheinlich oxy. BinSta = Bindungsstatus, UE = Untereinheit.

QS	Hc	UE abgeleitet	UE in Modell	Autor UE	BinSta.	Mo. abgel. aus	Autor Modell	Abbildung
1x6	PeHc	---	a, b (Crustacea)	---	oxy**	EM	Meissner 2003	Abbildung 78
1x6	PiHc	x-ray diffraction	a, b (Crustacea)	Gaykema 1984	deoxy	x-ray diffraction	Gaykema 1984	Abbildung 79
4x6	LpHc	x-ray diffraction	II (Chelicerata)	Hazes 1993	deoxy	SAXS	Hartmann 2002	Abbildung 80
4x6	LpHc	x-ray diffraction	II (Chelicerata)	Hazes 1993	oxy	SAXS	Hartmann 2002	Abbildung 81
4x6	EcHc	x-ray diffraction *	a-g (Chelicerata)	Voit 2000	---	EM/SAXS	Voit 2000	Abbildung 81

3.1. Vergleich mit 1x6-Crustaceen-Strukturen (Verifikation)

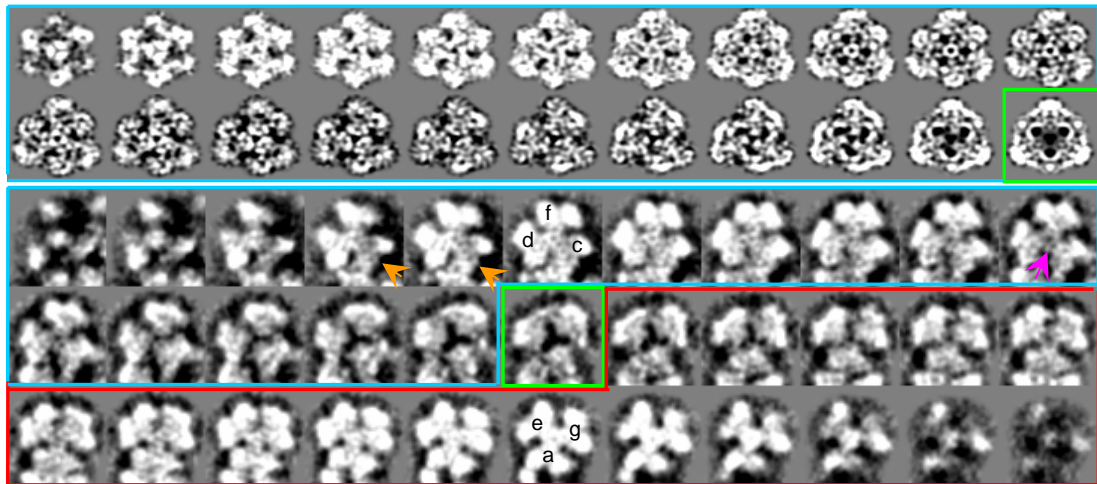


Abbildung 78. Vergleich EcHc- mit 1x6-PeHc-Dichtekarte.

Vergleich der Primäresultate von PeHc und EcHc. Dazu wurde die EcHc-Rekonstruktion (unten) 52° vertikal gedreht und Hexamer 4 (in dieser Ansicht hinter 1x6-1 liegend) ausgeschnitten. Von PeHc (oben) ist nur ein Trimer dargestellt, da das andere symmetrisch dazu ist. EcHc hat relativ zu PeHc nur die halbe Auflösungsqualität. Beim Vergleich ist die 2/3-Relation der Schnittbildanzahl in den beiden Rekonstruktionen zu beachten: Ein PeHc-Hexamer wird von 50 Schnitten ein EcHc-Hexamer von 34 Schnitten dargestellt. Das mittlere Schnittbild der Hexamere ist jeweils mit einem grünen Quadrat gekennzeichnet. Das im EcHc zentral liegende Trimer ist blau umrandet, das exponiert Angeordnete rot umrandet (vergleiche Abbildung 74). An der EcHc-Rekonstruktion ist ein relativer Unterschied in der Rekonstruktionsqualität in zentralen Bereichen zu exponierten Bereichen zu erkennen (Pfeilspitzen): Zum einen global im Gesamtmolekül (orange) und lokal im Hexamer (pink). Die PeHc-Rekonstruktion dagegen ist qualitativ sehr homogen.

In einer Arbeit von 2003 (Meissner et al., 2003) zeigten wir die EM-rekonstruierte Struktur des Hämocyanins von *Palinurus elephas* (PeHc-1x6) bei 0,85 nm Auflösung, welches aufgrund seines hexameren Aufbaus als Modellhämocyanin angesehen werden kann. PeHc wurde mit der von Gaykema (Gaykema et al., 1984) gefundenen 0,32 nm Röntgenkristallstruktur für *Panulirus interruptus* (1x6-PiHc) verglichen. Den 24-merigen Aufbau kann man sich modellhaft aus 4 dieser Crustaceen-Referenzhexamere vorstellen. Der Vergleich der Grauwertdichtekarten der hexameren Strukturen (Abbildung 78) und die Einpassung der PeHc bzw. PiHc in EcHc verifiziert die Rekonstruktion von EcHc (Abbildung 79 und Abbildung 80). Methodischen betrachtet, kann man die EM-Struktur von PeHc als direkte Referenz und die Röntgenkristallstruktur von PiHc als indirekte Referenz bezeichnen.

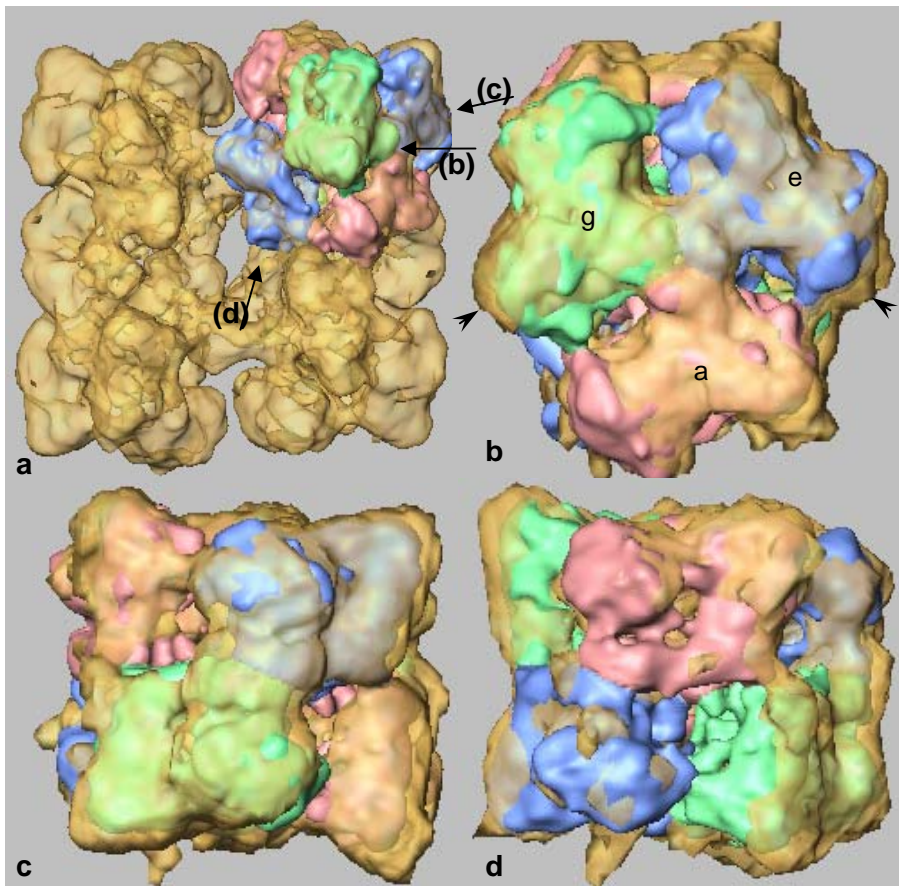


Abbildung 79. Vergleich EcHc mit 1x6-PeHc-Rekonstruktion.

Meissner et al. (2003) stellte die 3D-Rekonstruktion des Crustaceenhämocyanin der Europäischen Languste *Palinurus elephas* (1x6-PeHc) vor. Der Vergleich der Rekonstruktion (gelbe Hülle) des cheliceraten EcHc mit der PeHc-Rekonstruktion (rot, grün, blau) verifiziert die EcHc-Rekonstruktion. a) PeHc wurde in das erste Hexamer (1x6-1) von EcHc eingepasst. b) Aufsicht (Pfeil (b)) von außen auf das 1x6-1 mit Blick auf die EcHc-Untereinheiten g (PeHc-Untereinheit grün), e (PeHc-Untereinheit blau), a (PeHc-Untereinheiten rot). c) Seitenansicht (Pfeil (c)) von außen auf das 1x6-1 mit Blick auf das EcHc-Untereinheitendimer d-e: die Hülle ist fast vollständig um PeHc geschlossen. d) Seitenansicht von innen (Pfeil (d)) auf das 1x6-1, also vom EcHc-Zentrum aus gesehen, mit Blick auf die Linker-Untereinheit b (blau) (Hexamertyp 1) und deren Dimerpartner a (rot); hier weist die Rekonstruktion massenmäßige, artifizielle Fehlstellen auf – hier stimmt die Rekonstruktion von EcHc nicht so gut mit der von PeHc überein wie im peripheren Bereich von EcHc. Ein vergleichbares Bild ergibt sich für 1x6-2 an der Linkerstelle der Untereinheit c (Hexamertyp 2). Die Stellung der Untereinheiten (Speichenzwischenwinkel) sind scheinbar nicht symmetrisch wie im PiHc-Hexamere; die Pfeilspitzen markieren wo die EcHc-Rekonstruktion übersteht – in Abbildung 90 sind die vermessenen Zwischenwinkel zu sehen. Die EcHc-Rekonstruktion ist im Zentrum mit relativ zu wenig Masse artefaktisch (Pfeile in a) und b)). Man erkennt, dass die Crustaceenhämocyanine (Abbildung 80) durch die längeren Ketten Massen besitzt, welche nicht mit im Inneren der EcHc-Rekonstruktion Platz finden.

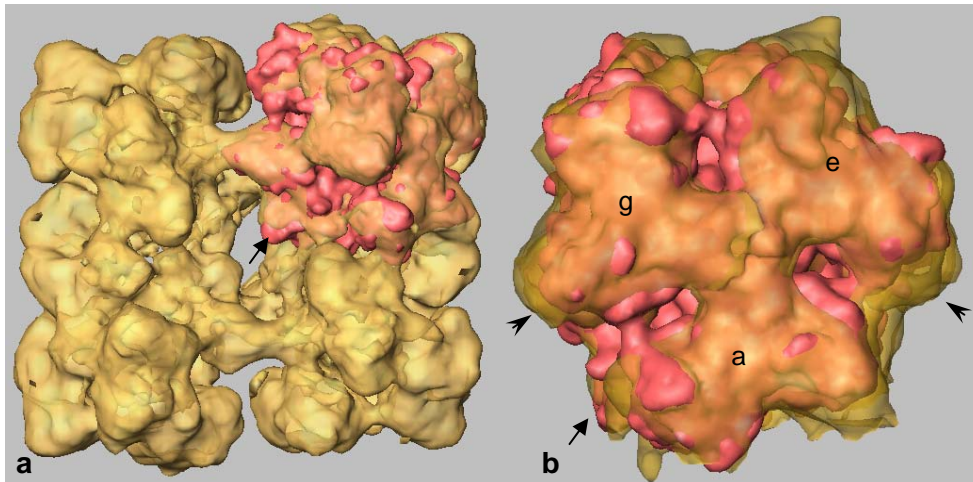


Abbildung 80. Vergleich EcHc mit 1x6-PiHc-Oberfläche aus Röntgenstruktur.

a) Die aus dem Röntgenkristallographiemodell von PiHc generierte Oberfläche (Dichtekarte) wurde in ein Hexamer des EcHc eingepasst. b) vergrößerte Aufsicht auf das Hexamer. Der Vergleich mit Abbildung 79 zeigt, wie durch die hohe Übereinstimmung der beiden Langustenmodelle (Meissner et al., 2003) zu erwarten, den gleichen Sachverhalt und kann von Abbildung 79 sinngemäß übernommen werden.

3.2. Vergleich mit 4x6-Strukturen

Leidescher und Decker (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001; Leidescher and Decker, 1990) postulierten einen Unterschied der Quartärstruktur von oxygenierten zu deoxygenierten 4x6-EcHc. Das äußert sich bei ihren Modellen am offensichtlichsten in einem starken Unterschied in der relativen Verschiebung der beiden 2x6-Molekülhälften. Im Oxymodell ist diese mit ca. 1,8 nm gegenüber einer nur schwachen Verschiebung von ca. 0,4 nm im Deoxymodell weit ausgeprägter. Die Frage, welche wir uns stellten, war, ob diese Modellvorstellung in den Rekonstruktionen dieser Arbeit wieder zu finden sein würde. Die hier vorgestellten 3D-Rekonstruktionen der unter Oxy- und Deoxybedingungen präparierten EcHc-Lösungen weisen beide eine Dodekamerverschiebung von ca. 0,8 nm auf, zeigen diesen Unterschied somit nicht.

Die Überlagerung der Deoxy- mit der Oxyrekonstruktion von EcHc (Abbildung 54) konnte also die in den berechneten Modellen postulierte Quartärstrukturänderung nicht nachzeichnen, jedoch auch nicht widerlegen. Es ist nicht auszuschließen, dass trotz sorgfältiger Präparation in beiden Fällen doch nur der eine oder andere Zustand präpariert wurde, da eine unabhängige Kontrollmöglichkeit des Oxygenierungsstatus fehlt, obwohl die Proben aus N_2 - bzw. aus 25 %-iger O_2 -Atmosphäre schockgefroren wurden. Die Schlussrichtung von Unterschieden in den Rekonstruktionen auf den Beladungszustand zu schließen ist leider nur notwendig aber nicht hinreichend; nur bei positivem Ergebnis, im Sinne einer Bestätigung des Sachverhaltes, wäre eine zweifelsfreie Schlussfolgerung möglich. Hier sollte noch eine Gegenprobe zu gemacht werden, in der Form, dass der Beladungszustand auf den Cryo-Präparaten unmittelbar vor der Einschleusung in das EM gemessen werden müsste, was technisch allerdings ein Problem darstellt; hier könnte eventuell eine Fluoreszenzmessung weiterhelfen.

Ob deoxy-oxy-Unterschiede in sub-24-meren Strukturen, also Hexamere, Untereinheiten oder Sekundärstrukturen signifikanten in einer Rekonstruktion nachzuweisen sind, wird sich wohl erst bei sub-1-nm-Auflösungen herausstellen. Durch Einpassungen von externen Daten, wie Röntgenstrukturen von Monomeren ähnlicher oder gleicher Molekülen (im Idealfall ebenfalls

von deoxy- und oxy-Bindungszuständen), wird dieser Strukturbereich gleichsam simuliert und soll weitergehende Interpretation ermöglichen. Relative Veränderungen der Sekundärstrukturen in Untereinheiten wären dabei nur durch flexibles “Fitting” nachweisbar, wofür die Auflösungen für plausible Ergebnisse dieser Art bei vorliegenden Rekonstruktionen noch nicht ausreichen, da noch keine Sekundärstrukturen in den Rekonstruktionen zu sehen sind welche durch diese Methode räumlich verschoben werden könnten.

Die geometrischen Parameter dieser Rekonstruktion wurden mit, in der Literatur verfügbaren, Parametern für 4x6-Strukturen verglichen und in Tabelle 12 einander gegenüber gestellt. Die Autoren (Boisset et al., 1995; de Haas and Vanbruggen, 1994; Hartmann and Decker, 2002; van Heel and Dube, 1994; Voit et al., 2000) analysierten Hämocyanine (bzw. Teilstrukturen davon) von verschiedenen verwandten Spezies mit unterschiedlichen Methoden. Die rechte Spalte der Tabelle 12 zeigt die Parameter, welche von dieser Rekonstruktion abgeleitet wurden (in schwarz). Einige der Parameter aus der Literatur wurden größenordnungsmäßig wieder gefunden (blau), andere konnten nicht bestätigt werden (rot). Die grau unterlegten Zeilen stellen die vorwiegend in der Literatur diskutierten Parameter dar, welche jenen in Abbildung 74 beschriebenen entsprechen. Die Daten, welche auf Analyse von 2D-Projektionen beruhen, können doch sehr abweichen. Ansonsten fällt vor allem der von Hartmann (Hartmann and Decker, 2002) mittels SAXS-Analyse vorausgesagte Unterschied der tangentialen Verschiebung der beiden Dodekamere von der deoxygenierten Form zur oxygenierten Form auf. Dieser blieb bei der Rekonstruktion fast gänzlich aus, wie der Vergleich dieser Modelle in Abbildung 81, welche die drei tatsächlich verfügbaren 3D-Strukturdaten von 3 Modellen der Rekonstruktion gegenüberstellt, verbildlicht. Die relative Dodekamerverschiebung (a_1 , b_1) und der relative Dodekamerachsenwinkel (a_2 , b_2) der Rekonstruktionen (deoxy als auch oxy) liegt zwischen den durch die SAXS-Modelle vorhergesagten Extremen. Für weitere Details siehe auch Legendentexte in Abbildung 81 und Tabelle 12. Das bisherige, von Markl und Mitarbeitern (Markl et al., 1981c) erstellte und von Voit und Mitarbeitern (Voit et al., 2000) verfeinerte Topographie-Modell weißt nur eine geringe Dodekamerverschiebung auf und kann deshalb schon nicht mit der Rekonstruktion dieser Arbeit in Deckung gebracht werden. Die Abstände zwischen den von der Seite betrachteten Hexameren der beiden Dodekamere scheinen im Modell zu gering gewählt zu sein.

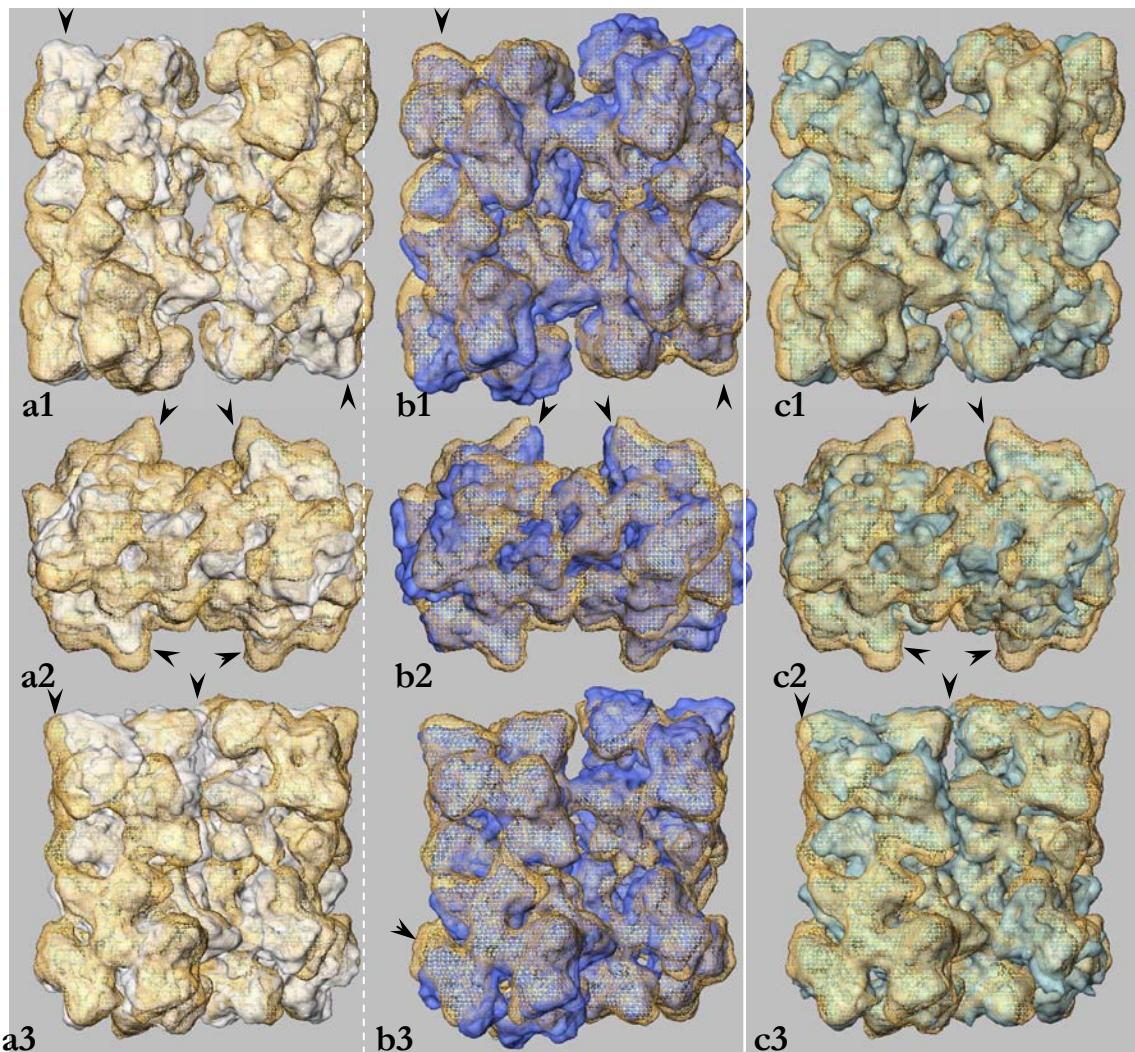


Abbildung 81. Vergleich EeHc mit SAXS-Modellen und Markl-Voit-Modell.

Für diese Abbildung wurden aus den 3, als 3D-Daten verfügbaren, auf den LpHc-II-Untereinheiten-Struktur (Hazes et al., 1993) basierenden molekularen Modellen für das 4x6-Molekül Dichtekarten berechnet, als Oberflächen dargestellt und diese in die EeHc-Deoxyrekonstruktion (goldenes Liniennetz) eingepasst - für das Markl-Voit-Modell entsprechend aus den modellierten EeHc-Untereinheiten. a1)-c1) Flip-Aufsicht. a2)-c2) Frontalansicht. a3)-c3) 38°-Ansicht. Die beiden SAXS-Modelle von Decker und Mitarbeiter (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001): a1)-a3) SAXS-Deoxymodell (weiß). b1)-b3) SAXS-Oxymodell (blau). c1)-c3) Und das von Voit (Voit et al., 2000) vorgeschlagene Modell (hellblau, im Folgenden Markl-Voit-Modell genannt). Abweichungen sind mit Pfeilspitzen markiert. Für die Parameter siehe Tabelle 12. a) Die relative Dodekamerverschiebung (a1) und der relative Dodekamerachsenwinkel sind kleiner als in der Rekonstruktion. Das Deoxymodell weist im Vergleich zur Rekonstruktion eine zu planare Anordnung der Hexamere auf, die Hexamere sind weniger exponiert (a2) als in der Rekonstruktion. Die in der 38°-Ansicht parallel angeordneten Hexamere stehen zu dicht (a3). Im Oxymodell hingegen sind die Dodekamere weiter tangential gegeneinander verschoben (b1) und stärker gegeneinander verdreht (b2, auch in b3 zu sehen) als in der Rekonstruktion. Der Interdodekamer-Hexamerabstand stimmt mit der Rekonstruktion fast überein. Die relative Dodekamerverschiebung des Markl-Voit-Modell liegt in etwa der der Rekonstruktion (c1, Differenz ca. 0,4 nm). Doch sind die Hexamere hier noch mehr in einer Ebene angeordnet (c2) und der Interdodekamer-Hexamerabstand (c3) ist auch hier etwas zu gering.

Für diese Betrachtung sei hier nochmals angemerkt, dass für die Absicherung der Richtigkeit der hier gezeigten Rekonstruktion in Bezug auf den Oxygenierungszustand während der Präparation noch eine geeignete Überprüfungsmethode fehlt, so dass es nicht völlig auszuschließen ist, dass es sich auch bei der Deoxyrekonstruktion um eine (teilweise) oxygenierte Probe handelte und somit auch nicht auszuschließen ist, dass das Fehlen der Dodekamerverschiebung ein Artefakt darstellen könnte.

Wie auch im Ergebnisteil schon erwähnt, ist ein Unterschied zwischen der Rekonstruktion des deoxy-EcHc und des oxy-EcHc nicht in der Super-Quartärstruktur aus vier Hexameren zu erkennen und ist dementsprechend auch nicht in Tabelle 12 aufgeführt. Im nächsten Abschnitt wird dieser Fragestellung mittels der Einpassung molekularer Daten, also auf (sub)hexamerer Ebene, nachgegangen.

Tabelle 12. Bekannte geometrische Parameter.

Diese Tabelle trägt die in der Literatur vorhandenen geometrischen Parameter von relevanten Vergleichsmolekülen zusammen und stellt sie den in dieser Arbeit gemessenen Größen (C.6 Dimensionen, Winkel ab Seite 83) gegenüber. van Heel (van Heel and Dube, 1994) bespricht die Geometrie des 8x6-LpHc und seiner Substrukturen anhand von Projektionsbildern. De Haas (de Haas and Vanbruggen, 1994) leitet aus methodischen Simulationen die Kontakt im EcHc ab. Boisset (Boisset et al., 1995) stellt eine 3,7 nm 3D-Rekonstruktion von *Androctonus australis* vor. Voit (Voit et al., 2000) leitete ein Modell mit den von ihr und Mitarbeitern vervollständigten EcHc-Sequenzen ab. Hartmann (Hartmann and Decker, 2002) leitete mit der SAXS-Methode Modelle für Oxy- und Deoxy-EcHc ab. Taveau (Taveau et al., 1997) präsentiert eine 4,0 nm Cryo-Conical-Tilt-Rekonstruktion für LpHc. ¹ oxy wie deoxy. ² Der Autor gibt hier noch einen Trimerabstandsunterschied von 0,2 nm an, was hier angesichts Gleichheit der beiden Formen nicht gemessen werden konnte. {} selbst vermessen da vom Autor keine Angaben gemacht wurden. nx6-EcHc = Teilstrukturen von EcHc mit n Hexameren. nx6-R(m)SA = (m-fache) Rotationssymmetrieachse eines nx6-Mers. nx6-(m)-(EcHc) = Teilstruktur Nummer m (z. B.: 1x6-2-EcHc = 2. Hexamer vom EcHc). ⊥ = orthogonal zu. || = parallel zu. Abbildung 74 erklärt die in der Literatur (vorwiegend) angegebenen Parameter (grau unterlegt). Die rechte Spalte der Tabelle 12 zeigt die Parameter, welche von dieser Rekonstruktion abgeleitet wurden (in schwarz). Einige der Parameter aus der Literatur wurden größenordnungsmäßig wieder gefunden (blau), andere konnten nicht bestätigt werden (rot).

Autor:	van Heel 1994	de Haas 1994	Bois-set 1995	Tav-eau 1997	Markl 1981, Voit 2000	Hart-mann ¹ 2002	Hart-mann 2002	Stohr 2007
Modell für:	4x6 LpHc	EcHc	AaHc	LpHc	EcHc	EcHc oxy	EcHc deoxy	EcHc ²
Modelldaten erhalten durch:	2D- Proj.	2D- Proj.	3D- Rek.	3D- Rek.	MM	SAXS	SAXS ¹	3D- Rek.
Bezeichnung	Dimensionen [nm]							
Breite des 4x6-EcHc, x-Ausdehnung								23,9
Höhe des 4x6-EcHc, y-Ausdehnung								23,8
Tiefe des 4x6-EcHc, z-Ausdehnung								17,5
lange Diagonale des 4x6-EcHc								30,6
kurze Diagonale des 4x6-EcHc								29,1
Breite eines EcHc-Dodekamers 2x6-EcHc, x-Ausdehnung								12,5
Höhe eines EcHc-Dodekamers 2x6-EcHc, y-Ausdehnung								12,9
Tiefe eines EcHc-Dodekamers 2x6-EcHc, z-Ausdehnung								22,3
Höhe eines EcHc-Hexamers 1x6-EcHc in Richtung 1x6-R3SA								11,2
Durchmesser 1x6-4-EcHc ⊥ 1x6-R3SA (Hexamer 4)								13,1
Durchmesser 1x6-1-EcHc ⊥ 1x6-R3SA (Hexamer 1)								12,5
Durchmesser 1x6-EcHc ⊥ 1x6-R3SA und 1x6-R2SA-a0b								12,0
Durchmesser 1x6-EcHc ⊥ 1x6-R3SA und 1x6-R2SA-d0e								12,2
Durchmesser 1x6-EcHc ⊥ 1x6-R3SA und 1x6-R2SA-f0g								12,5
Inter-Dodekamer-Hexamerabstand xz-Ebene und 1x6-R3SA								9,4
Inter-Dodekamer-Hexamerabstand ⊥ xz-Ebene und ⊥ 1x6-R3SA								5,6
Inter-Dodekamer-Hexamerabstand yz-Ebene und ⊥ 1x6-R3SA	1,7	0,5		1,3	{0,6}	1,8	0,4	0,8
Dodekamerverschiebung, (2x6-1)-(2x6-2)-y-Verschiebung außen			1,1					1,1
Inter-Dodekamer-Abstand, x-Abstand der beiden Dodekamerachsen					{10,7}	10,44	10,35	10,8
Intra-Dodekamer-Hexamerabstand (HRSA-(1x6)-Abstand eines 2x6)					{10,3}	10,51	10,45	10,1
	Winkel [°]							
Frontalseitiger Winkel zwischen 1x6-RSA und 4x6-RSA	45,0	60,0	52,0	51,5	{52}	52,5	65,5	52,0
Sagittalseitiger Winkel zwischen 2x6-RSA und 4x6-RSA	84,0	87,5	83,0	83,7	{86}	80,5	87,0	81,5
Winkel zwischen 1x6-1-R2SAfg und 2x6-1-RSA	36,0							32,0
Winkel zwischen 1x6-1-R2SAef und 2x6-1-RSA	24,0							30,0
Intrahexamer-Winkel zwischen 1x6-1-R2SAfg 1x6-1-R2SAfg/ab								59,0
Winkel zwischen 1x6-2-R2SAfg und 2x6-1-RSA								31,0
Winkel zwischen 1x6-2-R2SAef und 2x6-1-RSA								29,0
Intrahexamer-Winkel zwischen 1x6-2-R2SAcg 1x6-2-R2SAac								59,0
Kippung des EcHc über die exponierten Spitzen der Flip-Aufsicht								33,2
Kippung des EcHc über die exponierten Spitzen der Flop-Aufsicht								30,4

4. Einpassung von hochaufgelösten molekularen Strukturen

Um Beziehungen der Rekonstruktion zu molekularen Strukturen herzustellen kann man diese mit röntgenkristallographischen Strukturen vergleichen (B.2.3.2.1 Seite 59). Molekulare Modellierung für Eurypelma-Hämocyanin wurde schon von Voit (Voit et al., 2000) durchgeführt. Voit und Burmester (Voit et al., 2000) konnten die Primärsequenzen von EcHc für die bis dahin noch lückenhaften Untereinheiten b, c, f, g (a, d, e: (Schartau et al., 1983; Schartau et al., 1990; Schneider et al., 1983; Voit and Feldmaier-Fuchs, 1990; Voit and Schneider, 1986)) ergänzen. Voit modellierte Homologie-Modelle der Untereinheiten auf der Basis der von Hazes und Magnus gefundenen Röntgenstruktur der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* (Hazes et al., 1993) die als Vorlage diente. Er führte diese modellierten Untereinheiten probeweise zu einer Untereinheiten-Topographie (Quartärstrukturmodell) für die Deoxyform (Abbildung 18 a Seite 22 und Abbildung 83) zusammen. Er stützte sich dabei auf Modelle, welche Decker und Mitarbeiter basierend auf SAXS-Daten erstellten (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001). Die SAXS-Modelle (Abbildung 81) von Decker sind aus LpHc II Untereinheiten aufgebaut. Decker und Hartmann Decker gibt für die Deoxyform eine kleine (0,4 nm), für die Oxyform eine starke (1,8 nm) Dodekamerverschiebung an. Die in der Rekonstruktion dieser Arbeit für beide Formen gefundene Verschiebung liegt mit ca. 0,8 nm dazwischen.

Für diese Arbeit wurde ein "Fitting" mit dem "Molecular Modelling" System CHIMERA der University of California, San Francisco (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (Pettersen et al., 2004) und dem Modelling Programm Package SITUS (<http://situs.biomachina.org>) durchgeführt (Abbildung 85). Mehrere Varianten mit den für EcHc (Abbildung 4, Abbildung 7, Abbildung 16, Abbildung 17) in Frage kommenden zur Verfügung stehenden molekularen Strukturen wurden getestet und hier kurz abstrakt (in Ribbon-Darstellung) aufgeführt und, wo angezeigt, molekular bzw. atomar besprochen.

Tabelle 13. Übersicht der Vergleiche mit molekularen Strukturen.

Tabellarische Darstellung der durchgeführten Vergleiche mit molekularen Strukturmodellen verschiedener strukturhierarchischer Ebenen, welche im Folgenden besprochen werden. *Modellierung an LpHc-II-Untereinheiten. BinSta = Bindungsstatus. „1993/6“: Röntgenstrukturen von Hazes (Hazes et al., 1993; Hazes et al., 1996). „...“ = und andere, siehe (Legende) Tabelle 3 Seite 21. UE = Untereinheit.

QS	Hc	UE abgeleitet	UE in Modell	Autor UE	BinSta.	Mo. abgel. aus	Autor Modell	Abbildung
1x6	PiHc	x-ray diffraction	a, b (Crustacea)	Gaykema 1984	deoxy	x-ray diffraction	Gaykema 1984	Abbildung 82
2x6	LpHc	x-ray diffraction	II (Chelicerata)	Hazes 1993	deoxy	SAXS	Hartmann 2002	Abbildung 83
1x6	LpHc	x-ray diffraction	II (Chelicerata)	Hazes 1993	deoxy	SAXS	Hartmann 2002	Abbildung 83
2x6	LpHc	x-ray diffraction	II (Chelicerata)	Hazes 1993	oxy	SAXS	Hartmann 2002	Abbildung 83
1x6	LpHc	x-ray diffraction	II (Chelicerata)	Hazes 1993	oxy	SAXS	Hartmann 2002	Abbildung 83
1x1	LpHc	x-ray diffraction	II (Chelicerata)	Hazes 1993	deoxy	---	---	folgende
1x1	EcHc	x-ray diffraction*	a-g (Chelicerata)	Voit 2000 & ...	---	---	---	folgende

4.1. Vergleich mit dem 1x6-PiHc von Gaykema

Das solitär hexamere Hämocyanin der Crustaceen ist geeignet, um andere Arthropodenhämocyanine in ihrer grundsätzlichen Geometrie zu bestätigen. Für weitere feinstrukturelle Aussagen im subhexameren Bereich sind sie nur bedingt geeignet. Sie weisen z. B. gegenüber den Cheliceratenhämocyaninen eine längere Kettenlänge der Untereinheiten auf, welche sich nicht vollständig in deren Raumstruktur einpassen lässt, wie in Abbildung 82 zu sehen.

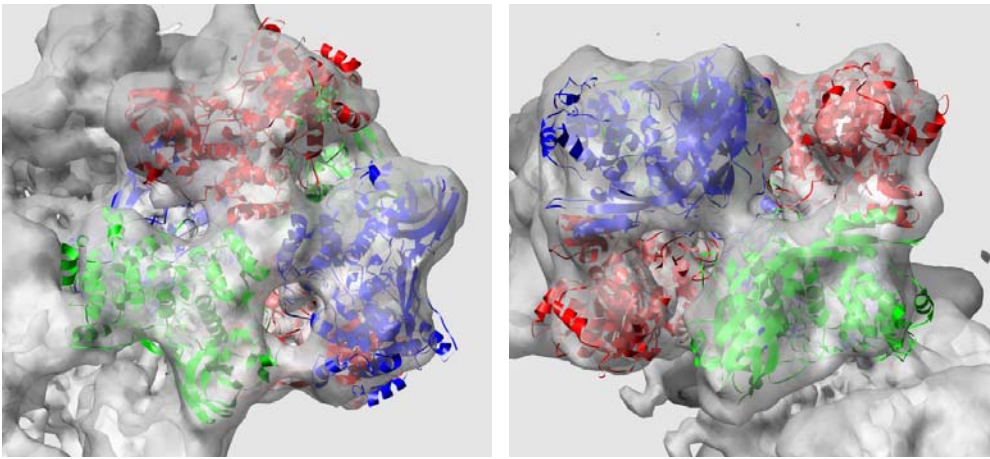


Abbildung 82. Einpassung der 1x6-PiHc in die Rekonstruktion.

Die Einpassung des Crustaceen-Hämocyanin-Hexamers von *Panulirus interruptus* (Gaykema et al., 1984; Volbeda and Hol, 1989)¹³. Die zum EcHc um etwa 35 Aminosäuren längeren Proteinketten ragen teilweise über die Rekonstruktion heraus.

Nativ vorkommende 1x6-Hämocyanine (wie P*Hc) weisen mit höherer Wahrscheinlichkeit ideale 32-Punktgruppen-Symmetrie (Abbildung 16 Seite 19) auf, als solche Hexamere, welche Teile von Hämocyaninen komplexerer Bauart sind (wie EcHc oder LpHc). Letztere unterliegen nahe liegender weise einer spezifischen Verformung, um interhexamere Kontakte herstellen zu können. Originäre 1x6-Hc sind daher nur zu Feinstruktur-Vergleichen im subhexameren Strukturbereich mit ihresgleichen geeignet.

4.2. Vergleich mit Teilstrukturen molekularer Quartärstruktur-Modelle

Der Vergleich der Rekonstruktion mit den drei in der Literatur verfügbaren 4x6-Modellen wurde schon in Abbildung 81 mit der aus den molekularen Daten erstellten Dichtekarten durchgeführt und bringt keine neue Erkenntnis, wenn man es mit den Koordinaten (PDB-Datei) selbst ausführt; die Modelle lassen sich mit der Rekonstruktion schon in der Grobgeometrie nicht zur Deckung bringen. Interessant ist allerdings die Frage welche Teilstrukturen davon sich in die Rekonstruktion einpassen lassen. Wie der Vergleich in Abbildung 83 und mit Abbildung 81 zeigt, steigt die Einpassungsqualität in der Folge 4x6 – 2x6 – 1x6, was den Sachverhalt widerspiegelt, dass Hartmann (Hartmann and Decker, 2002) in seiner Arbeit das Arrangement von vier Homohexamere mit der SAXS-Methode ermittelte. Das gleiche gilt auch für das Markl-Voit-Modell, das letztlich auf den SAXS-Modelle basiert (hier nicht gezeigt).

¹³ In der PiHc-Röntgenstruktur sind die Residuen 1-4, 171-174, 551-552, 597-605, 654-657 nicht vorhanden und ASN 167, ASN 548 besitzen keine Seitenketten.

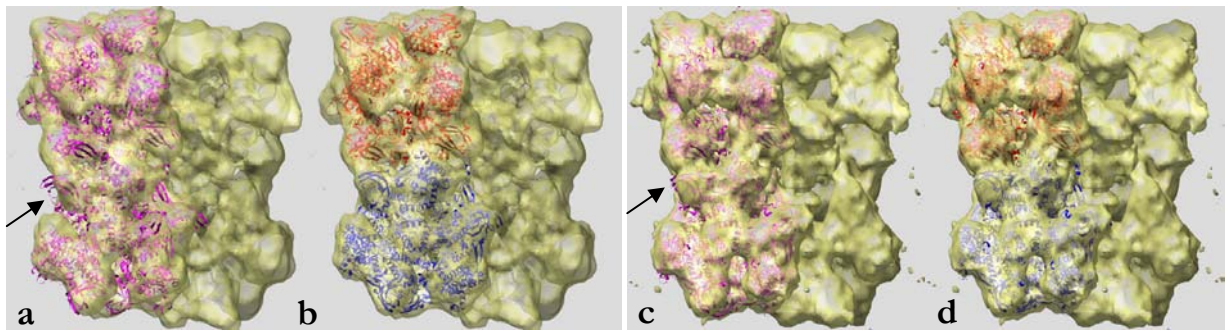


Abbildung 83. Vergleich mit Teil-Quartärstruktur-Modellen.

Die SAXS-Modelle von Hartmann (Hartmann and Decker, 2002) sind als Ganzes nicht mit der Rekonstruktion in Deckung zu bringen, wie in Abbildung 81 anhand der aus ihnen generierten Oberflächenansichten gezeigt. Einpassung von dodekameren a) + c) und hexameren b) + d) Teilstrukturen dieser Modelle in die deoxy- a) + b) bzw. oxy- c) + d) Form der Rekonstruktion soll klären, ob die mangelnde Übereinstimmung nur aus der Geometrie der hohen Strukturhierarchie, der Anordnung der Dodekamere und der Hexamere im Dodekamer resultieren. Dazu wurden die Hexamere aus diesen Modellen isoliert und für sich in die Rekonstruktion eingepasst. Das eingepasste Dodekamer passt weniger gut (Pfeil) in die Rekonstruktion als die vereinzelt Hexamere. Pink = Dodekamer, rot = 1x6-1, blau = 1x6-2.

Isolierung der Dodekamere bzw. Hexamer aus diesen Modellen und einzelne Einpassung dieser in die Rekonstruktion simulieren für diese die von vorliegender Rekonstruktion geforderte Dodekamerverschiebung. Auch das isolierte Dodekamer passt nicht in die Rekonstruktion, Teile der Struktur liegen nicht im Inneren der Rekonstruktion (Abbildung 83). Die Winkel, in denen die Hexameren eines Dodekamers zueinander stehen, sind im Modell andere als in der Rekonstruktion. Bei den isolierten Hexamere ragen kaum Strukturen aus der Rekonstruktion, doch zeigt Abbildung 84 exemplarisch am Markl-Voit-Modell auch hier noch einen Unterschied, wenn die Untereinheiten selbst eingepasst werden. Folglich ist auch die Stellungen der Untereinheiten in einem Hexamer in der Rekonstruktion eine andere, die Untereinheiten drehen sich in der Hexameraufsicht, relativ von einer zur anderen Einpassung gesehen, einzeln um einen kleinen Winkel um eine Achse, welche annähernd durch das aktive Zentrum verläuft und kippen in der Hexamerseitenansicht leicht nach außen.

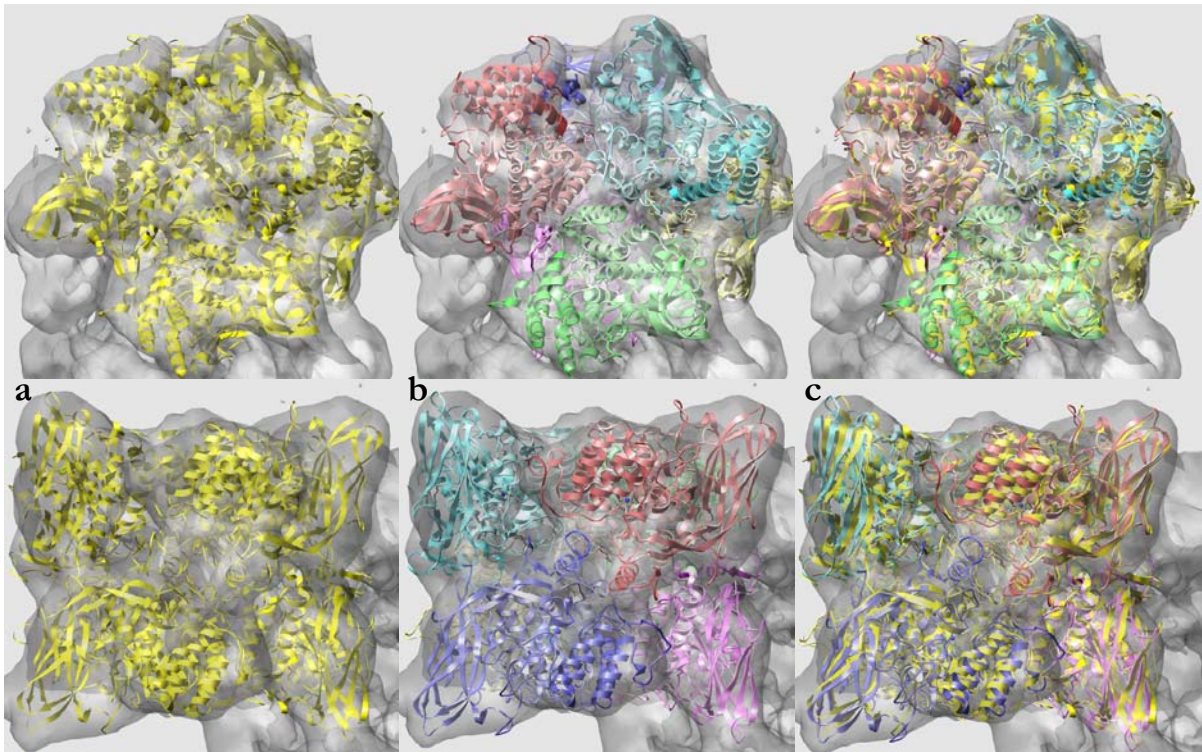


Abbildung 84. Vergleich von Hexamer- mit Untereinheiten-Einpassung.

b) Einzelne Einpassung der modellierten Untereinheiten aus dem EcHc-Quartärstrukturmodell von Voit (Voit et al., 2000) von EcHc in die die elektronenmikroskopische Rekonstruktion. a) zum Vergleich die Einpassung eines Hexamers aus dem Modell. c) die Überlagerung aus beidem 1x6- und 1x1-”Fittings”. Oben, Aufsicht auf ein Hexamer, unten, Seitenansicht eines Hexamers. Das Hexamer aus einzeln eingepassten Untereinheiten zeigt eine Abweichung von idealer Hexamersymmetrie eines originär hexameren Hc.

4.3. Qualität der Einpassungen

Einpassung der von Voit 2000 modellierten einzelnen Untereinheiten in die Rekonstruktion ist in Abbildung 84 zu sehen, die von LpHc-II-Untereinheiten in Abbildung 85. Die einzelnen Untereinheiten dieser beiden Einpassungen in die Rekonstruktion (kein Molekular-Molekular-”Fitting”) zeigen in der Überlagerung Ausrichtungsunterschiede (Abbildung 86). Um eine Modell mit einer real verfügbaren molekularen Struktur erstellen zu können – die EcHc-3D-Strukturen sind leider nur abgeleitete Modelle – wurde die verfügbare chelicerate Röntgenstruktur der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* (1x1-LpHc) 24mal in die EcHc-Rekonstruktion dieser Arbeit eingepasst. Dies ermöglicht einer der Rekonstruktion entsprechender räumliche Ausrichtung der einzelnen LpHc-Untereinheiten. Das heißt, es ist somit möglich, im Rahmen der Realitätstreue der Rekonstruktion, die Quartärstruktur von EcHc molekular anhand der Tertiärstruktur der Hämocyaninuntereinheit von *Limulus polyphemus* abzuleiten welcher außer eines zusätzlichen Untereinheitstyps von g korrespondierende Untereinheitstypen zu *Eurypelma californicum* besitzt (Kempter et al., 1985; Lamy et al., 1983; Markl et al., 1984). Dieses Modell krankt natürlich daran, dass es nur aus einem Einheitentyp aufgebaut ist. Das so nun ebenfalls verfügbare 24-merige Modell aus eingepassten modellierten EcHc-Untereinheiten wäre aus diesem Grunde vorzuziehen, ist aber aufgrund der Modellierung der Untereinheiten als spekulativer einzustufen als ein Realstrukturmodell, wie auch die Abweichungen in Abbildung 86 zeigen. Die Dichtekartenwerte für die 5200 gefitteten Atome dieser beiden Einpassungen sind in Tabelle 14 zu sehen. Die Qualität der Einpassung der LpHc-Untereinheiten (0,179) scheint leicht besser zu sein als die der modellierten EcHc-Untereinheiten (0,175). Interessanter ist aber die an den Einzelwerten der beiden Einpassungen

zu erkennende Tendenz, dass exponiert liegende Untereinheiten(-Typen) besser (größere Werte) eingepasst werden können als zentral angeordnete.

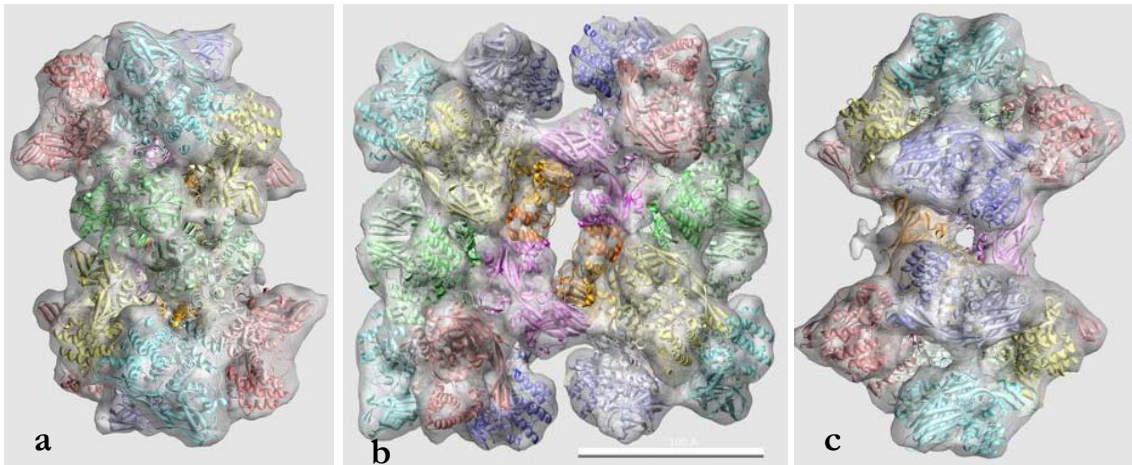


Abbildung 85. Einpassung der Untereinheit II von LpHc.

Einpassung der Röntgenstruktur der Untereinheit II von *Limulus polyphemus* (Hazes et al., 1993)¹⁴ mit UCSF CHIMERA (B.2.2.8.2 ab Seite 56). Die Röntgenstruktur ist der Übersichtlichkeit wegen als abstrakte Sekundärstrukturdarstellung des Proteinrückgrats wiedergegeben. a) Sagittalansicht parallel zur Dodekamerfurche b) Flip-Aufsicht, c) Frontalansicht entlang der Dodekamerfurche.

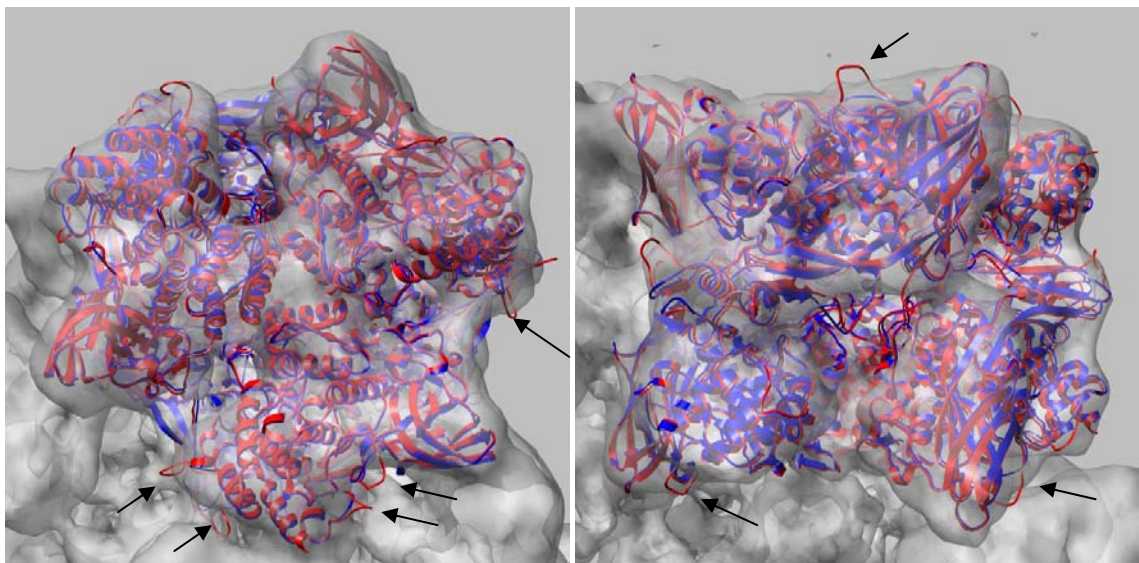


Abbildung 86. Überlagerung des Fits von LpHc-II-Untereinheiten und EcHc-Untereinheiten.

Überlagerung von in die Rekonstruktion gefitteten LpHc-Untereinheiten mit gefitteten EcHc-Untereinheiten LpHc blau, EcHc rot. Insgesamt ist große Übereinstimmung zu sehen, doch gibt es Stellen erheblicher Abweichung, an denen vermutlich das molekulare Modellierung von EcHc unzureichend ist und Teilstrukturen nicht von der Rekonstruktion eingehüllt sind.

Tabelle 14. Qualität der Einpassung.

Die Dichtekartenwerte von CHIMERA und die Korrelationswerte von SITUS für das "Fitting" von molekularen Strukturen in Dichtekarten zeigen die gleiche Tendenz. Damit lässt sich die Qualität der Einpassung für die einzelnen Untereinheiten quantitativ angeben. Exponierte (e; grün) und zentral liegende (b, c; orange) Untereinheitstypen zeigen hohe bzw. niedrige Werte. Der Mittelwert (MW) für die Einpassung der LpHc-Untereinheiten liegt mit 0,179 leicht höher als der für die Einpassung der EcHc-Untereinheiten- mit 0,175. UE = Untereinheit(en).

¹⁴ An folgenden Positionen konnte die Struktur von LpHc-II von Hazes aufgrund nicht interpretierbarer Dichten nicht aufgelöst werden: 1, 21-29, 132-139, 148-149, 527-530, 569-572 den folgenden Residuen fehlen die Seitenketten: THR 20, GLU 75, GLU 140, SER 141, PRO 142, ASP 146, VAL 147, ASN 152, LYS 187, GLU 412, ARG 427, LEU 505, LYS 550, SER 573, HIS 627, GLU 628. Bis auf Lys 187 liegen diese alle in Domäne 1 bzw. 2.

UE Typ	deoxy	deoxy	deoxy	deoxy	oxy	oxy	oxy	oxy
	LpHc	LpHc	EcHc	EcHc	LpHc	LpHc	EcHc	EcHc
	CHIMERA	SITUS	CHIMERA	SITUS	CHIMERA	SITUS	CHIMERA	SITUS
1g	0,21510	0,06225591	0,21350	0,06640673	0,13190	0,03898888	0,12900	0,04068915
1e	0,21260	0,05694006	0,20910	0,05708642	0,14070	0,03960458	0,13630	0,03935931
1a	0,16010	0,03997219	0,15580	0,04101009	0,10470	0,02731587	0,10070	0,02598317
1d	0,18330	0,04782919	0,17960	0,05000919	0,12020	0,03246685	0,11580	0,03201805
1b	0,13450	0,02884505	0,13180	0,03190514	0,08214	0,01468868	0,08054	0,01918866
1f	0,21250	0,05911324	0,20820	0,06171447	0,13380	0,03964287	0,12790	0,03938767
2a	0,15850	0,03744828	0,15360	0,03969710	0,10070	0,02397606	0,09621	0,02344104
2g	0,20900	0,05826775	0,20660	0,06249728	0,13340	0,03599802	0,12980	0,03577859
2e	0,22570	0,06406605	0,22320	0,06805795	0,14320	0,04840340	0,13850	0,04676282
2f	0,21040	0,05595129	0,20560	0,05619557	0,13110	0,03743493	0,12570	0,03564535
2d	0,19380	0,05707561	0,18940	0,05865937	0,12000	0,03127524	0,11530	0,03180782
2c	0,12980	0,02978561	0,12620	0,03187030	0,08094	0,01640631	0,07772	0,01708877
3g	0,21510	0,06225532	0,21350	0,06640478	0,13190	0,03898553	0,12900	0,04068943
3e	0,21260	0,05693891	0,20910	0,05708774	0,14070	0,03960475	0,13630	0,03935833
3a	0,16010	0,03996700	0,15580	0,04101190	0,10470	0,02731624	0,10070	0,02598627
3d	0,18330	0,04782895	0,17960	0,05001657	0,12020	0,03246720	0,11580	0,03201118
3b	0,13450	0,02884581	0,13180	0,03189910	0,08214	0,01472079	0,08054	0,01919726
3f	0,21250	0,05911971	0,20820	0,06172909	0,13380	0,03964397	0,12790	0,03938942
4a	0,15850	0,03744834	0,15360	0,03969762	0,10070	0,02392138	0,09621	0,02308310
4g	0,20900	0,05826608	0,20660	0,06250012	0,13340	0,03599957	0,12980	0,03578027
4e	0,22570	0,06406779	0,22320	0,06805318	0,14320	0,04840734	0,13850	0,04675468
4f	0,21040	0,05593760	0,20560	0,05617614	0,13110	0,03743629	0,12570	0,03564383
4d	0,19380	0,05707967	0,18940	0,05865420	0,12000	0,03127893	0,11530	0,03180764
4c	0,12980	0,02972365	0,12620	0,03186576	0,08094	0,01640717	0,07772	0,01708816
MW	0,18711	0,04979288	0,18355	0,05209191	0,11857	0,03218295	0,11446	0,03224750

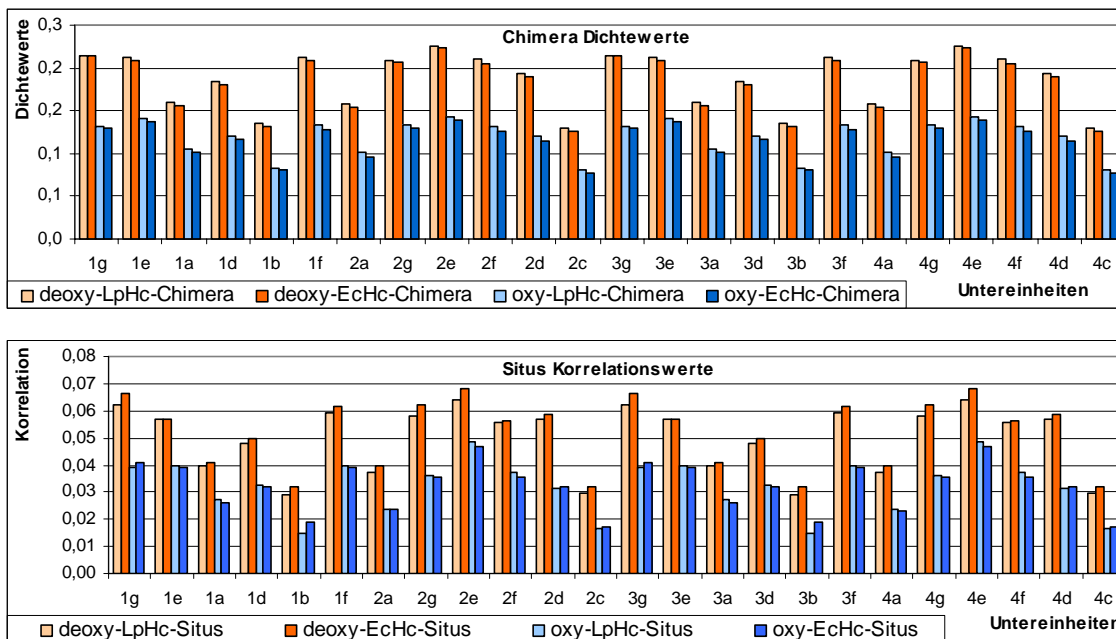


Abbildung 87. Qualität der Einpassung.

Die Werte aus Tabelle 14 graphisch. Tendenziell scheint die Passgenauigkeit der Untereinheitstypen mit der exponierten Lage zu korrelieren ($e \approx g > f > d > a > b \approx c$). Rot: deoxy. Blau: oxy. Hell: "Fitting" mit der LpHc-Untereinheit II. Dunkel: "Fitting" mit den von Voit (Voit, 2000) modellierten Untereinheiten von EcHc.

Hier (Tabelle 14, Abbildung 87) wird zahlenmäßig der visuelle Eindruck beim Betrachten der Rekonstruktion bestätigt, dass diese im Zentrum relativ zu den peripheren Bereichen an Qualität abnimmt, ein Phänomän das als Rekonstruktionsartefakt zu werten ist. Man kann sich die Hexamere aus Trimeren (a-e-g, b/c-d-f) oder Dimeren (a-b/c, f-g, d-e) aufgebaut vorstellen (Abbildung 18 a, Abbildung 59 bis Abbildung 61) – Trimere werden von der zentralen Narbe wie Speichen verbunden, Dimere haben peripher einen innigen Kontakt über Domäne-3-Sheets und weniger innigen Kontakt zu den anderen Dimeren. Man kann nun im EcHc-Molekül eine nach innen und einen nach außen gerichtet Trimerseite mit ihrer Narbe definieren. Untereinheitstypen g, e und a liegen immer exponiert (exponiertes Trimer), b/c, d, f immer zentral. Es sind die exponierten Untereinheitstypen e und g (Abbildung 88) mit den höchsten Dichtekartewerten (Tabelle 14, Abbildung 87). F-Typen liegen zwar auf dem inneren Trimer aber dennoch frei bzw. exponiert zu den a-Typen auf den äußeren Trimeren, deshalb haben f-Typen einen höheren Dichtekartewert als a-Typen. D-Typen liegen wie a auch an der inneren Narbe aber freier als a-Typen (auf der äußeren Narbe), die am Hexamer-Hexamer-Kontakt der Dodekamere beteiligt sind, was mit dem höheren Dichtekartenwert für die d-Typen korreliert. Einzusehen, dass die b/c-Typen, welche an allen Kontakten beteiligt sind und maximal zentral liegen die niedrigsten Dichtekartenwerte besitzen. Hier ist die Rekonstruktion in der Qualität am schlechtesten und damit auch die Einpassung. Insgesamt gibt das Verhältnis $\text{Korrelation}(\text{deoxy})/\text{Korrelation}(\text{oxy})$ von ca. 1,6 tendenziell das Verhältnis von $\text{Auflösung}(\text{deoxy})/\text{Auflösung}(\text{oxy})$ von 1,3 wieder.

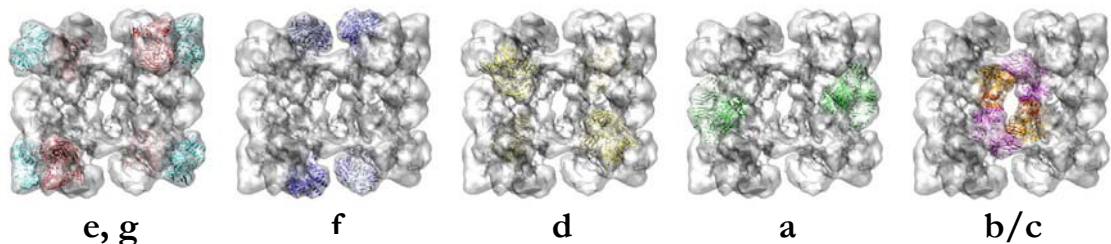


Abbildung 88. Topographische Lage der Untereinheiten.

Unterscheidung zwischen Untereinheiten die exponiert und zentral liegen, hier in Abbildung 87 aufgeführten Reihe der Dichtekartewerte der Einpassung (\approx Exponiertheit).

4.4. Darstellung von Dissoziationsformen

Da das Hexamer als Aufbaueinheit für die Arthropodenhämocyanine angesehen wird, kann man sich die Aggregation von EcHc in zwei Hierarchieebenen eingeteilt denken: 1. vom Monomer zum Hexamer (Abbildung 89 a-d) und 2. vom Hexamer (1x6) zum 4x6 (Abbildung 89 e-h). Heptamere und 19-mere kommen scheinbar dann vor, falls stabile Dimere b/c-Untereinheitstypen vorhanden sind, welche als Brücken zwischen den Hexameren dienen (Markl et al., 1981b). Die Bindung zwischen b und c innerhalb eines Dodekamers (parallel zur Dodekamer-Trennfurche, Abbildung 18) scheint stärker zu sein als die Interdodekamer-bc-Bindung, da Dodekamere durch Einwirken von 2-Mercaptoethanol herstellbar sind (Markl et al., 1981d). Dies lässt vermuten, dass zusammen mit dem Vorkommen von Heptameren, zwei Hexamere aus verschiedenen Dodekamern nicht als Zwischenstufen der Aggregation auftreten.

Tabelle 15. Theoretisch mögliche Aggregationsformen der Untereinheitstyp von EcHc

Zusammenstellung der denkbaren Aggregationsmöglichkeiten der Untereinheitstypen abgeleitet aus den Dissoziationsversuchen von für EcHc (Markl et al., 1981b; Savel-Niemann et al., 1988). Welche der Kombinationstypen davon wirklich beim Aufbau der Hämocyanine verwirklicht werden, ist bislang noch nicht geklärt. Wahrscheinlich kommen 3-fach rotationssymmetrische Trimere (grau) nicht vor, dafür aber Dimere (Linzen et al., 1985). Spalten 4-10: die 7 Untereinheitstypen von EcHc. Hexamer-Typ 1 = Hexamer mit Untereinheit b (siehe Abbildung 18 a, Hexamer rechts oben). Hexamer-Typ 2 = Hexamer mit Untereinheit c. #UE = Anzahl beteiligter Untereinheiten. (#) Kombi-Typ(en) = Nummerierung / Anzahl der möglichen Kombinationsmöglichkeiten.

Aggregation		#UE	(#) Kombi-Typ(en)	a	b	c	d	e	f	g
multihexamer	4x6	24	1	4	2	2	4	4	4	4
	3x6+1	19	1	3	2	1+1	3	3	3	3
	3x6+1	19	2	3	1+1	2	3	3	3	3
	2x6	12	1	2	1	1	2	2	2	2
	1x6+1	7	1	1	1	+1	1	1	1	1
	1x6+1	7	2	1	+1	1	1	1	1	1
	1x6	6	1	1	1	-----	1	1	1	1
1x6	6	2	1	-----	1	1	1	1	1	
subhexamer	1x3	3	1	1	0	0	0	1	0	1
	1x3	3	2	0	1	-----	1	0	1	0
	1x3	3	3	0	-----	1	1	0	1	0
	1x2	2	1	0	0	0	0	0	1	1
	1x2	2	2	0	0	0	1	1	0	0
	1x2	2	3	1	1	-----	0	0	0	0
	1x2	2	4	1	-----	1	0	0	0	0

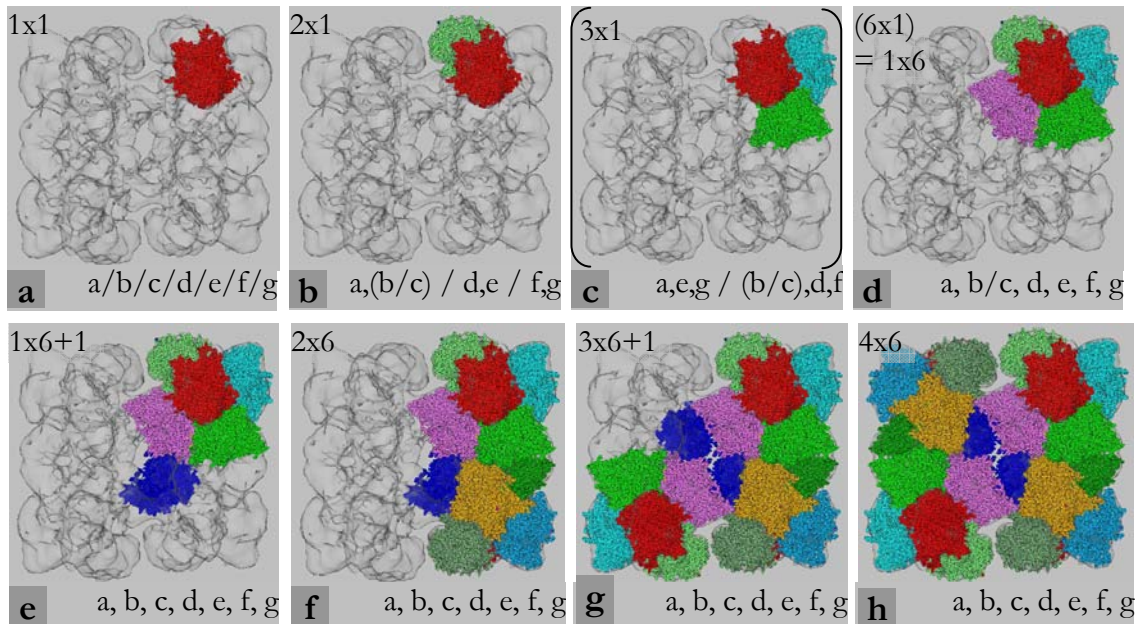


Abbildung 89. Dissoziations- bzw. Aggregationsformen von EcHc.

Darstellung der Dissoziations- bzw. Aggregationsformen von EcHc mittels eingepasster Röntgenstrukturen in transparenter 3D-Rekonstruktion. a-d) Subhexamere Aggregation, e-f) Hexameraggregation. Stellvertretende Beispiele der jeweiligen denkbaren Möglichkeiten gezeigt. a) Monomer (1x1), b) Dimer (2x1), hier stellt sich die Frage, welche Kombination wirklich oder zuerst auftritt? c) Trimer (3x1), aufgrund der stärkeren Bindung zwischen den Dimeren (Linzen et al., 1985) sind diese wahrscheinlicher. d) Hexamer 1x6 (= 6x1). Unter den Bildern stehen jeweils die potentiell beteiligten Untereinheitstypen. Stellvertretende Beispiele der jeweiligen denkbaren Möglichkeiten sind gezeigt. e) Heptamer 1x6+1, f) Dodekamer 2x6, g) 19-mer 3x6+1-mer, h) 24-mer 4x6, hier sind jeweils potentiell alle Untereinheitstypen beteiligt.

4.5. Lokalisierung der Untereinheiten b bzw. c?

In der Literatur kann scheinbar bisher keine definitive Aussage zur relativen Lage, bezogen auf den Dodekamershift, der Untereinheiten b und c im 4x6-Molekül gemacht werden. Diese Arbeit kann es auch nicht, es wurde hier aber die b-Untereinheit dem ersten und dritten Hexamer und die c-Untereinheit dem zweiten und vierten Hexamer, wie in der Nomenklatur in Abbildung 55 (Flip-Aufsicht) beschrieben, zugeordnet. Dies geht mit dem SAXS-Modell von Decker und Hartmann (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001) konform. Markl (Markl et al., 1981c) und Voit (Voit et al., 2000) stellt auch ein Modell Zuordnung der Untereinheiten dar, konnten aber keine Aussage zur Lage von b und c ableiten. Für die Annahme in dieser Arbeit wurden aber die modellierten Untereinheiten b und c von Voit herangezogen. Diese wurden, wie in Abbildung 84 gezeigt, auch einzeln in die Rekonstruktion eingepasst. Tabelle 16 zeigt die Einpassungswerte, welche CHIMERA ausgibt, für die Einpassung von Untereinheit b bzw. c an jeder möglichen Position für b bzw. c im 4x6-EcHc-Molekül. Für die zentralen Untereinheitenpositionen der verschiedenen Hexamere sowie für die unterschiedlichen Untereinheiten b und c ergeben sich unterschiedliche aber reproduzierbare Werte. Untereinheit b in Hexamer 1 und 3 hat höhere Absolutwerte als Untereinheit c (Absolutwertvergleich (AWV) Zeile 3). Untereinheit c wiederum hat in Hexamer 2 und 4 höhere Absolutwerte als Untereinheit b (AWV Zeile 4). Beide Untereinheiten für sich jedoch haben in den Hexameren 1 und 3 jeweils höhere Werte als in den Hexameren 2 und 4 (AWV Zeile 1 und 2), doch ist die Differenz für Untereinheit b doppelt so groß (DWV Zeile 1). Die höheren Werte für c in den Hexameren 1 und 3 sprechen als einzige gegen die gewählte Zuordnung. Aufgrund dieser gefundenen Werte wird die Zuordnung in dieser Arbeit wie folgt getroffen: Untereinheit b wird in den exponierten Hexameren (bezogen auf den Dodekamershift) lokalisiert, also in der Flip-Aufsicht rechts oben und links unten. Die Differenz des Wertes für beide Untereinheiten an gleicher Position (DWV Zeile 2) muss man neutral werten, da diese schon an den zugeordneten Untereinheiten den jeweils höheren Wert aufweisen.

Tabelle 16. Einpassungsqualität von Untereinheit b und c in das 4x6-EcHc.

Untereinheiten b und c wurden an den möglichen Positionen zyklisch eingepasst, um die besten Einpassungswerte, ermittelt mit CHIMERA, zu finden. Für die getroffene Zuordnung sprechende Vergleiche sind grün, gegen sie sprechende rot unterlegt. UE = Untereinheit, Δ = Differenz.

1x6	LpHc UE II	Δ	EcHc UE b	Δ	EcHc UE c	Δ	Absolutwert- vergleich	Differenzwert- vergleich
1	0,1276	0,0047	0,1250	0,0062	0,1224	0,0031	b(H1) > b(H2) c(H1) > c(H2)	b(H1)-b(H2) > c(H1)-c(H2)
2	0,1229		0,1188		0,1193		b(H1) > c(H1) b(H2) < c(H2)	b(H1)-c(H1) > b(H2)-c(H2)
3	0,1276		0,1250	0,0026	0,1224		b(H1) > c(H1)	(Alle Angaben für Hexamer (H) 3 und 4 entsprechen denen für Hexamer 1 und 2)
4	0,1229		0,1188	0,0005	0,1193		b(H2) < c(H2)	

Dieses Vorgehen wird hier nur angewandt, um eine Wahl zwischen den beiden Möglichkeiten zu treffen, es wird keinesfalls als absolut angesehen. Es stellt nur die logische Topographie für die und aufgrund der hier veröffentlichten Daten da. Man muss bedenken, dass die Aussage anhand modellierter (also artifizierlicher) Untereinheiten getroffen wurde; die Einpassungswerte für die konkrete Röntgenkristallstruktur von LpHc-II sind jeweils höher, was für einen eingeschränkte Realitätstreue der modellierten Strukturen spricht.

4.6. Symmetrie des deoxy-EcHc-Hexamers

Mittels der Einpassung von identischen Kopien der molekularen Strukturen von LpHc-II-Untereinheiten soll hier die anhand der Rekonstruktion von deoxy-EcHc gefunden, im Ergebnisteil in der Abbildung 73 auf Seite 87 und im Diskussionsteil in Abbildung 75 auf Seite 92 dargestellte Deformation der Hexamersymmetrie im 4x6-Verband des EcHc bestätigt werden. Dazu wurden anhand der Kupfer-Ionen in den eingepassten Untereinheiten die relativen Zwischenwinkel und deren Winkel relativ zur Dodekamerachse ermittelt. Die Werte dieser Messungen sind in Tabelle 17 gelistet und in Abbildung 90 für das periphere Trimer in Hexamer 1 dargestellt. Die Abweichungen weisen auch hier, wie in der Vermessung der Rekonstruktion selbst, auf eine Deformation in den Hexameren im Verband hin. In der Röntgenstruktur von PiHc sowie bei der Einpassung der LpHc-Untereinheiten in die Rekonstruktion von PeHc ergibt eine maximale Distanzabweichung von 0,02 nm und eine Winkelabweichung von 0,14° für entsprechende, in Tabelle 17 angegebenen Messungen – die Langustenhexamere sind also praktisch ideal symmetrisch in Bezug auf ihre 32-Symmetrie, die Cheliceratenhexamere erfahren bei Aggregation zu ihren (Super-)Quartärstrukturen scheinbar eine Verformung. Auch hier weisen die exponierten Untereinheiten einen vergrößerten Öffnungswinkel auf.

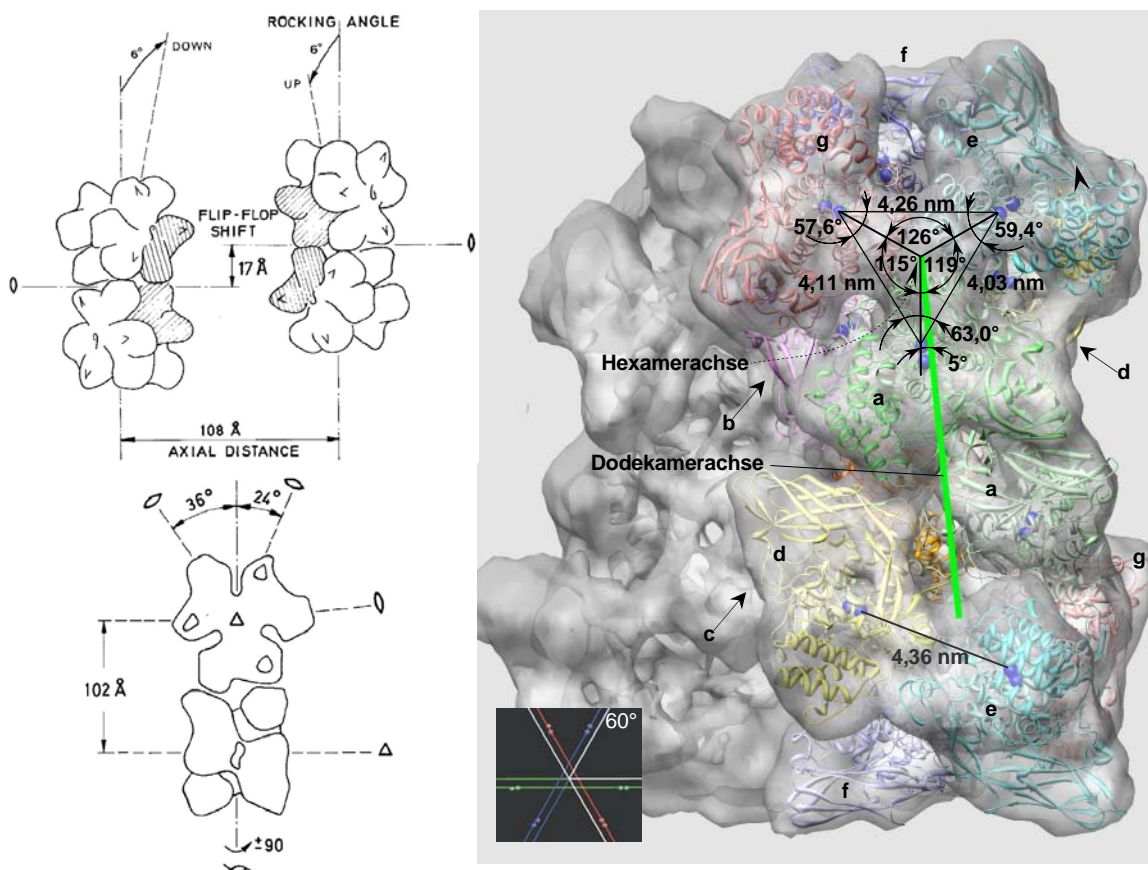


Abbildung 90. Stellung des Hexamers im Dodekamer.

Links: Abbildungen aus (van Heel and Dube, 1994). Er beschreibt das EcHc.-Molekül als nicht planar (sich auch Abbildung 19, Abbildung 64 und Abbildung 65). Rechts: Die relative Stellung der eingepassten Röntgenstrukturen von LpHc II relativ zur Dodekamerachse (grüne Linie) und zur hier senkrecht stehenden Hexamerrotationsachse (Zentrum des Winkelkreises; das 4x6-EcHc wurde um 52° um die y-Achse gedreht) wurde anhand der, hier der Sichtbarkeit wegen übertrieben groß dargestellten, Kupferatome ermittelt. Die Hexamere scheinen diesem Verband des 4x6-Molekül eine Deformation zu erfahren: Die äußeren beiden Untereinheiten (e, g) weisen einen vergrößerten Zwischenwinkel von 126° auf. Dies bestätigt die Asymmetrie in der Winkelmessung des Rekonstruktionsvolumen in Abbildung 73. Im symmetrischen PiHc stehen alle Untereinheiten rotationssymmetrisch 120° zueinander (kleines Bild unten Mitte). Im unteren Hexamer ist beispielhaft der Abstand von 4,36 nm zwischen den beiden inneren Kupferatomen des Dimers d-e eingezeichnet. Für alle

ermittelten Werte siehe Tabelle 17. Die Verbindungslinie von den Kupferatomen der Untereinheit a zum Hexamerzentrum und die Dodekamerachse bilden einen Winkel von ca. 5°. Diese Abbildung / Messung sagt nichts über die der Drehung der Untereinheit selbst aus; siehe dazu Abbildung 75.

Tabelle 17. Abstände und Winkel der eingepassten Untereinheiten.

Relative Abstände und Winkel der in die Rekonstruktion eingepasster identischer Kopien der Untereinheiten II von LpHc ermittelt anhand der inneren Kupferatome. Die Untereinheiten der Hexamere im EchHc-Molekül sind nicht rotationssymmetrisch angeordnet. Für die räumliche Zuordnung siehe Abbildung 90.

Hexamer 1				Hexamer 2			
Abstände im Trimer		Winkel im Trimer		Abstände im Trimer		Winkel im Trimer	
e-g	5,17128	e-a-g	62,9958	e-g	5,20500	e-a-g	63,2861
a-e	4,90247	a-g-e	57,6355	a-e	4,92222	a-g-e	57,6434
a-g	4,99420	g-e-a	59,3688	a-g	4,99837	g-e-a	59,0706
b-d	5,17553	d-b-f	60,7647	d-f	5,14637	d-c-f	60,4936
b-f	5,04220	b-f-d	60,8927	c-d	5,13846	c-f-d	60,3385
d-f	5,16908	f-d-b	58,3426	c-f	5,07761	f-d-c	59,1679
Dimerabstände		Nicht-Dimerabstände		Dimerabstände		Nicht-Dimerabstände	
a-b	5,16008	a+d	5,92900	a-c	5,09208	a+d	5,92566
d-e	5,02626	b+g	5,64780	d-e	5,09144	c+g	5,66034
f-g	5,07747	e+f	5,68301	f-g	5,06613	e+f	5,68065

4.7. Vergleich der Rekonstruktion von deoxy- und oxy-EchHc mittels Einpassung molekularer Modelle.

In der aktuellen Arbeit wurde angestrebt das Objekt auch in seinen beiden extremen Oxygenierungszuständen zu untersuchen, also ohne gebundenes O₂-Molekül (Deoxyform) bzw. im Stadium in dem alle Bindungsstellen, je eine pro Untereinheit, mit Sauerstoff besetzt sind (Oxyform). Das möglichen Spektrums der Belegungszustände, abhängig von der realisierten Charakteristik der Kooperativität, die sich bei einer komplexen Tertiär- und Quartärstruktur mit vielen Bindungsstellen ergibt, wird von Decker und Mitarbeitern mit einer hierarchische Erweiterung des Konzertierten MWC Modells, das Nesting-Modell, diskutiert (Decker and Sterner, 1990). Hazes (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994) vermutet anhand der konkreten Modelle, dass die Röntgenstruktur von LpHc-II, auf Grund der um 7,5° unterschiedlichen Stellung der Domäne 1 (‘closed’ und ‘open’, Abbildung 15 Seite 18), den niedrig-affinen T-Zustand (closed) und die Röntgenstruktur von PiHc (Volbeda and Hol, 1989) den hoch-affinen R-Zustand (open) repräsentieren.

Die beiden Oxygenierungszustände wurden hier unter gleichen Pufferbedingungen, also beide mit pH-Wert von 7,8 in der Atmosphärenpräparationskammer hergestellt. Es müsste noch ein neuer Ansatz mit Deoxybedingungen bei pH=7,1 und Oxybedingungen bei pH=8,3 untersucht werden. Diese würde dann die eher unphysiologischen¹⁵ Bedingungen wie bei Decker und Hartmann darstellen, welche damit einen signifikanten Unterschied in der Strukturen der SAXS-Daten fanden (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001; Leidescher and Decker, 1990) und eine starken Quartärstrukturänderung zwischen ihren Modellen für diese beiden Oxygenierungsbedingungen postulierten (der durch den pH-Wert-Unterschied verstärkt ausgeprägt sein könnte). Bei der SAXS-Methode wird die Probe mit Röntgenstrahlen beschossen. Aus den an der Probe gestreuten Strahlen wird eine Streuwinkel-

¹⁵ Es ist aus physiologische Sicht anzunehmen, dass die Tiere als Osmoregulierer ihren pH-Wert in engen Grenzen puffern.

und Abstandsabhängige eindimensionale Kurve abgeleitet, die durch Vergleich mit bekannten Kurven einfacher geometrischer Körper auf die mögliche Raumstruktur hin interpretiert werden.

Hier sei auch ein parallel angelegtes Projekt der Arbeitsgruppe erwähnt, das selbiges für die Molluskenhämocyanine vorsieht, die ja schon in ihrer Tertiärstruktur 7 bis 8 Bindungsstellen für O₂ besitzen. Hier sind schon diverse EM-Strukturen bekannt (Harris et al., 2004; Meissner, 1998; Meissner et al., 2000; Meissner et al., 2004) jedoch nicht in definierten Oxygenierungszuständen. Auch steht noch eine Übertragung der Fragestellung der Bindungszustände auf das EM-rekonstruierte Hämocyanin von *Palinurus elephas* bzw. *Panulirus interruptus* aus, um die mögliche Bewegung im Hexamer isoliert untersuchen zu können. De Haas untersuchte dies anhand von rauschreduzierten EM-Bildern doch nicht anhand von 3D-Rekonstruktionen (de Haas et al., 1993).

Wie im Ergebnisteil dargestellt konnte ein signifikanter Unterschied der Quartärstrukturen zwischen den Rekonstruktionen für deoxy- und oxy-EcHc nicht gefunden werden, was konträr zu den SAXS-Daten von Hartmann und Decker steht. Die Einpassung der molekularen Struktur von LpHc-II in die Rekonstruktion zeigt aber, dass es sehr wohl Unterschiede geben könnte, diese sich aber scheinbar nicht, oder viel geringer, auf die Superquartärstruktur auswirken, sondern auf den hexameren Strukturbereich lokalisiert sind.

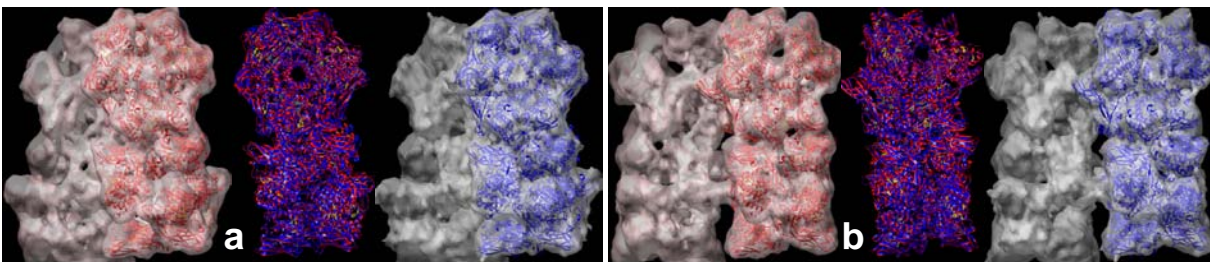


Abbildung 91. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (1).

LpHc-II Untereinheiten wurden in die Rekonstruktion des deoxy-EcHc (rot) und oxy-EcHc (blau) eingepasst. a) Aufsicht auf Hexamer 1 oben und b) Seitenansicht des Hexamer 2 unten. Jeweils in der Mitte, ist die Überlagerung aus den beiden Einpassungen zu sehen. In den nächsten Abbildungen wird auf die Interfaces fokussiert und der Übersichtlichkeit wegen, werden dort meist nur die eingepassten Untereinheiten ohne die Rekonstruktion selbst gezeigt.

Dies konnte aus der Superposition der LpHc-II-Einpassung in Rekonstruktion von deoxy- und oxy-EcHc, wie in Abbildung 91 in einer Übersicht und Abbildung 92 bis Abbildung 96 auf die Hexamere bzw. Untereinheiten fokussiert, dargestellt, gezeigt werden. Die molekularen Strukturen selbst sind natürlich hoch aufgelöst, aber deren Einpassung in Quartärstrukturen von nicht signifikant unterschiedlichen Rekonstruktionen ist mit Vorbehalt zu interpretieren. Die gefundenen Unterschiede könnten bei einer Einpassung in eine verfeinerte Rekonstruktion anders ausfallen.

Die Bezeichnung „Vergleich auf molekularer Ebene“ muss an dieser Stelle eingeschränkt werden: Da es sich bei all dem nur um die Einpassung der starren unflexiblen Strukturen eines Modells handelt, ist die Aussagekraft eingeschränkt weil immer nur die Bewegung der Untereinheit als ganzes detektiert werden kann, weswegen hier auch die abstrakte Darstellung der Untereinheiten als Bänder ausreicht. Die tatsächlich reale Bewegung während der

Oxygenierung wird sicherlich auch ein Intrauntereinheiten-Bewegungen selbst beinhalten, welche aus der Bindung des Substrates hervorgerufen wird und sich bis zu den Kontaktstellen fortpflanzt, um wieder benachbarte Bindungsstellen zu beeinflussen (Kooperativität). Hier kann also immer nur eine Verschiebung oder Drehung von ganzen Untereinheiten und somit eine relative Positionsänderung von Epitopen zweier Untereinheiten mit ihren unveränderlichen Residuenmustern beobachtet werden, nie aber eine Wirkliche Konformationsänderung durch sich drehende Bindungen oder zumindest sich relative in einer Untereinheit sich verschiebende Sekundärstrukturen (Flexibles “Fitting”).

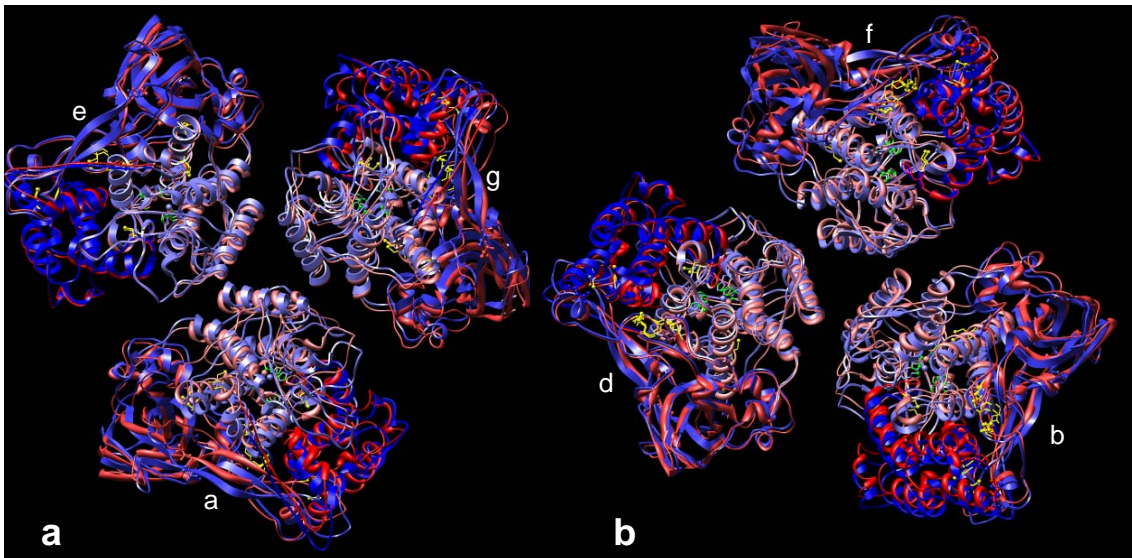


Abbildung 92. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (2).

Die Überlagerung der eingepassten LpHc-II Untereinheiten in die Rekonstruktion des deoxy-EcHc (rot) und oxy-EcHc (blau). a) Aufsicht der Untereinheiten a, e, g (das distale Trimer) des Hexamer 1 und b) und Aufsicht der Untereinheiten b, d, f (das proximale Trimer).

Für den Vergleich oxy mit deoxy wurde nur die deoxygenierte Röntgenkristallstruktur von LpHc-II verwendet. Zum einen zeigen die beiden Strukturen, deoxy (Hazes et al., 1993) oxy (Hazes et al., 1996; Magnus et al., 1994) nur geringe Unterschiede und die modellierten EcHc-Sequenzen zeigen stark abweichende Teile, welche aus der Rekonstruktion ragen. Zum Andern sollten hier die eventuell gefundenen Unterschiede nur aus der Einpassung in die verschiedenen Rekonstruktionen herrühren und nicht durch Unterschiede in der Röntgenkristallstruktur überlagert werden; an der oxygenierten Röntgenkristallstruktur ist ein Nitrat in der Clorid-Bindungsstelle zwischen Domäne 1 und 2 gebunden.

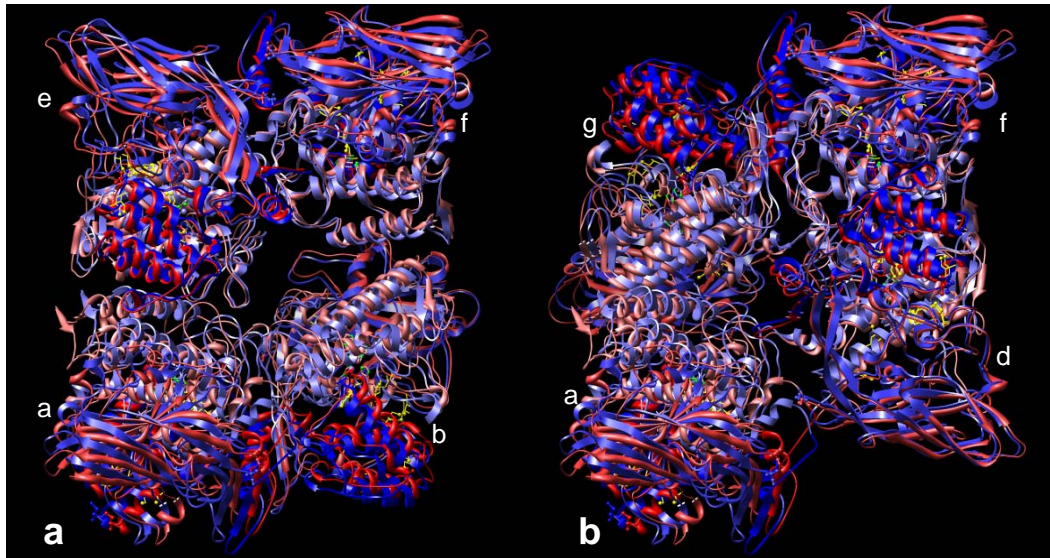


Abbildung 93. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (3).

Die Überlagerung der eingepassten LpHc-II Untereinheiten in die Rekonstruktion des deoxy-EcHc (rot) und oxy-EcHc (blau). a) Seitenansicht der Untereinheiten a, b, e, f auf Hexamer 1 und b) Seitenansicht der Untereinheiten a, d, f, g.

Es scheint als wäre eine Dynamik welche aus dem Oxygenierungsvorgang resultiert auf den hexameren Strukturhierarchiebereich lokalisiert. Die in oxy-EcHc eingepassten Untereinheiten zeigen folgenden Bewegung im Vergleich zu jenen in deoxy-EcHc eingepassten (Abbildung 92 bis Abbildung 96): Die Untereinheit eines Hexamers translatieren teilweise näher an ihre R3SA (Abbildung 92) und die Trimere translatieren teilweise dichter zueinander (Abbildung 93). Durch die Oxygenierung scheinen die Untereinheiten daher näher zum Zentrum zu rücken. Eine Vergrößerung wie von Decker gemessen (de Haas et al., 1993; Decker et al., 1996; Markl and Decker, 1992) oder eine Drehung der Trimere eines Hexamers als starre Einheit relativ gegeneinander (Vergleich PiHc- mit LpHc-Quartärstrukturen) (Magnus et al., 1994) und das daraus in einer von einer Aspartate-Transcarbamoylase abgeleiteten Modellvorstellung (Kantrowitz and Lipscomb, 1990) beschrieben „Atmen“ der Hexamere konnte hier nicht festgestellt werden. Außerdem führen praktisch alle Untereinheiten unterschiedlich ausgeprägte komplexe Rotation aus Kombinationen aller drei Drehachsen aus wie der Leser bei genauer Studie der Abbildung 92 bis Abbildung 96 feststellen wird.

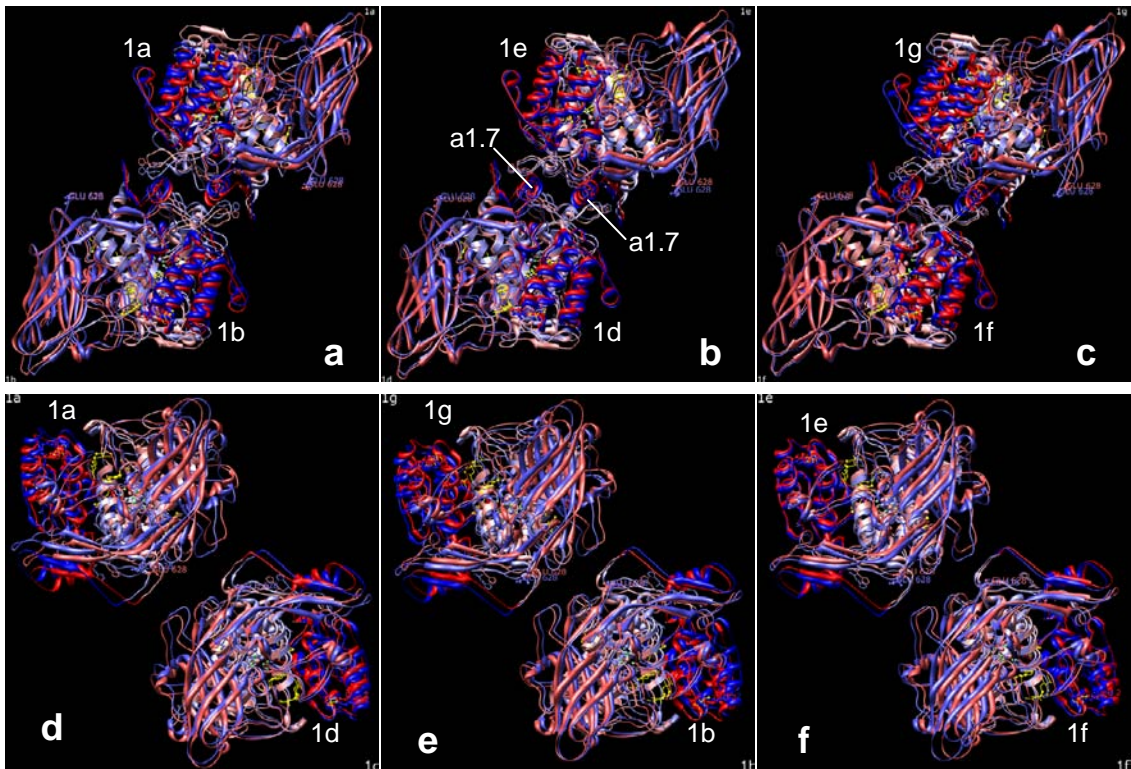


Abbildung 94. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (4).

Die Überlagerung der eingepassten LpHc-II Untereinheiten in die Rekonstruktion des deoxy-EcHc (rot) und oxy-EcHc (blau). a) – c) Die Untereinheiten starken Intrahexamer-Dimer-Interfaces a-b, d-e, f-g; d) - f) die schwachen Intrahexamer-Dimer-Interfaces a-d, b-g, e-f.

Im Hexamer können drei Typen von Interfaces zwischen Untereinheiten definiert werden. Ein orthogonal zur 1x6-R3SA liegende Trimer-Interface (a-e-g, b/c-d-f; Abbildung 92) und zwei mit den 1x6-R2SA korrelierenden Dimer-Interfaces (Abbildung 94), wobei sich die beiden letzteren durch die Innigkeit des Kontaktes unterscheiden: Ein starkes Dimer-Interface (a-b/c, d-e, f-g) in dem die Domänen 1 und 2 mit großer Kontaktfläche für eine feste Verbindung sorgen und ein schwaches Dimer-Interface (a-d, e-f, g-b/c) über Domäne 2 und 3. Das Trimer-Interface wird ebenfalls fast ausschließlich über die Domänen 2 und 3 vermittelt und verhält sich bei der Oxygenierung/Deoxygenierung starr (Hazes et al., 1993; Volbeda and Hol, 1989). Domäne 1 ist also nur im starken Dimer-Interface maßgeblich beteiligt und es ist die Rotation der Domäne 1 relativ zu 2 und 3 einer Untereinheit welche, induziert durch die Bewegung des Phenylalanins 49, bei Oxygenierung diese Information nach außen an die benachbarten Untereinheit weitergibt (Hazes et al., 1993). Somit kann das starke Dimer-Interface als primärer Kandidat für die kooperative Signaltransduktion ausgemacht werden; hier müssen, vermittelt über Domäne 1 die Stellkräfte wirken. Das orthogonal zur 1x6-R3SA stehende schwache Dimer-Interface erlaubt dagegen eine Rotation der Trimere um die 1x6-R3SA durch aneinander vorbei gleitende Domänen 2 und 3.

Somit müsste für ein schwaches Dimer diese Gleitphase in den gefitteten Untereinheiten zu sehen sein. Abbildung 94 d-f zeigt, dass zwei (d, e) dieser drei Interfaces die Tendenz aufweisen bei Oxygenierung tangential auseinander zu driften. Die ermöglicht wohl die Tendenz axial, entlang der 1x6-R3SA, zusammen zu rücken (Abbildung 94 a-c). Im starken Dimer müsste dann eine komplexere Bewegung in den eingepassten Untereinheiten zu sehen sein, da die hier wahrscheinlich real vorwiegend zu detektierende Bewegung eigentlich die Rotation von Domäne

1 sein sollte, nun aber durch die starren Untereinheiten in einer komplexen Rotation der gesamten Untereinheit subsumiert sein sollte. Es ist eine zumindest tangential einfache relativ unüberlagerte Shiftbewegung nur in der Untereinheit g zu erkennen (tatsächlich ist auch diese komplexer wie der Vergleich mit Abbildung 92 a zeigt). Bei allen anderen Untereinheiten scheint keine einfache einsichtige Bewegungstendenz abzuleiten zu sein. Hier wäre es interessant, die ja real existierende Beweglichkeit von Domäne 1 relativ zu den beiden andern Domänen simulieren zu können bzw. messen zu können und speziell der maßgeblich an diesem Kontakt beteiligte α -Helix 1.7, welche wahrscheinlich die Signal vermittelnde Sekundärstruktur darstellt.

Wie die Interaktionen der Intra- und Interdodekamerkontakte betroffen sind, ist aus Abbildung 95 und Abbildung 96 zu ersehen. Hartmann gibt aufgrund der SAXS-Analyse eine Vergrößerung der Dodekamerverschiebungen von 1,4 Å und eine Verkleinerung des Staffelwinkels (doppelter Winkel zwischen 4x6-R2SA und 1x6-R3SA in Tabelle 12) von 26° zwischen den beiden Hexameren eines Dodekamers bei Oxygenierung an. Allerdings ist zwischen Superquartärstrukturen der Rekonstruktionen kein Unterschied in diesen Größenordnungen erkennbar. Dass es keinen Bewegung und somit auch keinen Einfluss auf die Kooperativität gäbe, sei hier nicht gesagt, dies widerspräche der Feststellung das diese mit der Aggregationsgröße wächst (Savel-Niemann et al., 1988). Doch wird dieser Effekt scheinbar nicht durch so drastische Quartärstrukturveränderungen vermittelt, sondern durch Bewegungen, welche auf den Inter-Untereinheiten-Bereich beschränkt sind und (Abbildung 95 und Abbildung 96) nicht zu relativer Bewegungen ganzer Superstrukturen, eben den Dodekamern, führt.

Die Einpassung der unflexiblen molekularen Daten in das 1a-2a-Interface (Abbildung 95) stößt hier, aus oben genannten Gründen, an ihre Grenzen. Die beiden Untereinheiten würden demnach durch die Oxygenierung so nahe kommen, dass sich ihre Helices 1.5 (dieser Kontakt wird ausschließlich über Domäne 1 realisiert) überschneiden würden (Abbildung 95 b) – eine sinnvolle Interpretation ist an der Stelle also kaum möglich. Auch die mutmaßliche Flexibilität des Domänen-Interfaces von Domäne 1 zu Domäne 2 würde hier nichts nützen, da Domäne 1 sich nur in Richtung Interface bewegen könnte und so die Kollision noch verstärken würde. Hier wäre es interessant, ob flexibel eingepasste Untereinheiten durch Verformung ausweichen könnten und ob dieses dann gerade die Signaltransmission darstellen könnte – de Haas, dass dieses Interface durch "helical friction" eine Rotation des Trimeres eines Hexamers diese auf das Trimer des anderen Hexamers im Dodekamer weitergibt (de Haas and Vanbruggen, 1994). In dem 1a-2a-Interface kann in der Frontalansicht (bezogen auf das 4x6-Molekül) eine durch die Oxygenierung induzierte zentrale Auswärtsdrehung der a-Untereinheiten registriert werden (Abbildung 95 c). Dieses widerspricht aber gerade der von Hartmann gefundenen Reduzierung des Staffelungswinkels des Intradodekamer-Hexamer-Interfaces.

Man muss sich die Frage nach der Machbarkeit der von Hartman vorgeschlagenen Torsion um 26° stellen. Die beiden Interfaces 1b-2c und 1a-2a liegen ca. 50 Å auseinander. Im Falle man annimmt, dass die Torsionsachse mit der Dodekamerachse zusammenfällt, müssten, bei diesem Winkelbereich, die Bindungen einen Sprung von ca. 10 Å durchführen. Da ist die Dodekamerverschiebung von 1,4 Å schon eher vorstellbar, sie könnte möglicherweise durch Rotation der b- und c-Untereinheiten realisiert werden.

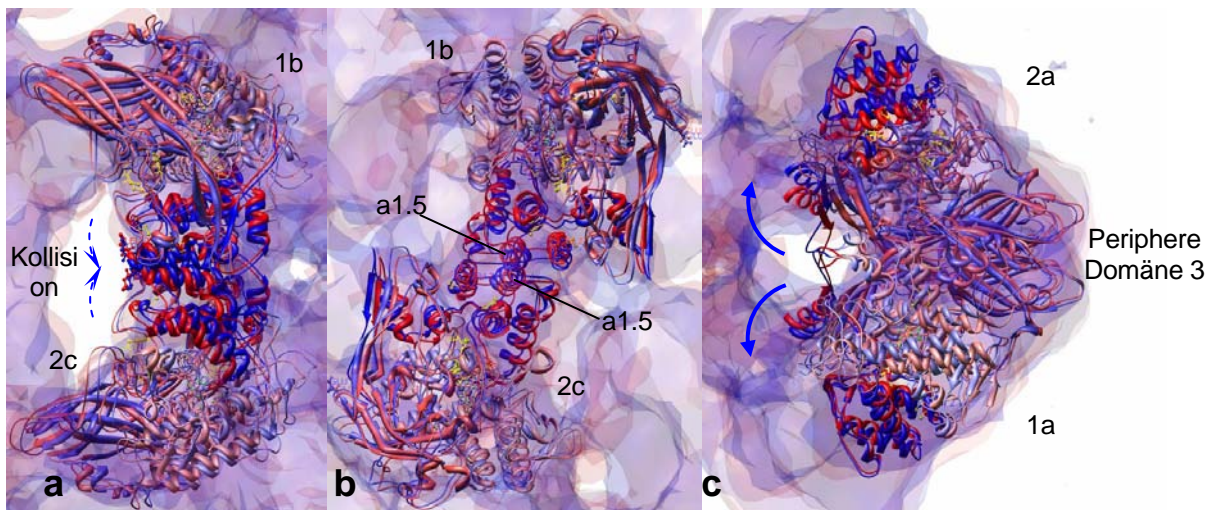


Abbildung 95. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (5).

Die Überlagerung der eingepassten LpHc-II Untereinheiten in die transparent dargestellten Rekonstruktion des deoxy-EcHc (rot) und oxy-EcHc (blau). a) – c) Die Untereinheiten der Intradodekamer-Hexamer-Interfaces: a) 1b-2c in Flip-Aufsicht, Pfeile: vermeintliche Kollision und mutmaßliche Oxydationsbewegung von Domäne 1; b) 1b-2c in Sagittalansicht c) 1a-2a in Frontalansicht, blaue Pfeile: Auswärtsdrehung.

Die Untereinheiten 1b, 2c, 3b und 4c bilden zentralen Ring welcher die Konvektivität für die Dodekamere bereitstellt (Abbildung 96 a). Das zentrale Auge darin wird bei Oxygenierung etwas geöffnet, wie die blaue transparent dargestellte Rekonstruktion der Oxyform zeigt. Die eingepassten Untereinheiten spiegeln dies durch eine leichte Auswärtsbewegung wieder. Der sich daraus tangential zur Dodekamerfurche ergebende Shift ist minimal und ist praktisch nicht als Quartärstrukturverschiebung der Molekülhälften erkennbar. In der Frontalansicht (Abbildung 96 b) ist nur eine geringe Drehbewegung erkennbar, welche kaum eine Rotation der ganzen Hexamere um $\frac{1}{2} * 26^\circ$ unterstützen dürfte.

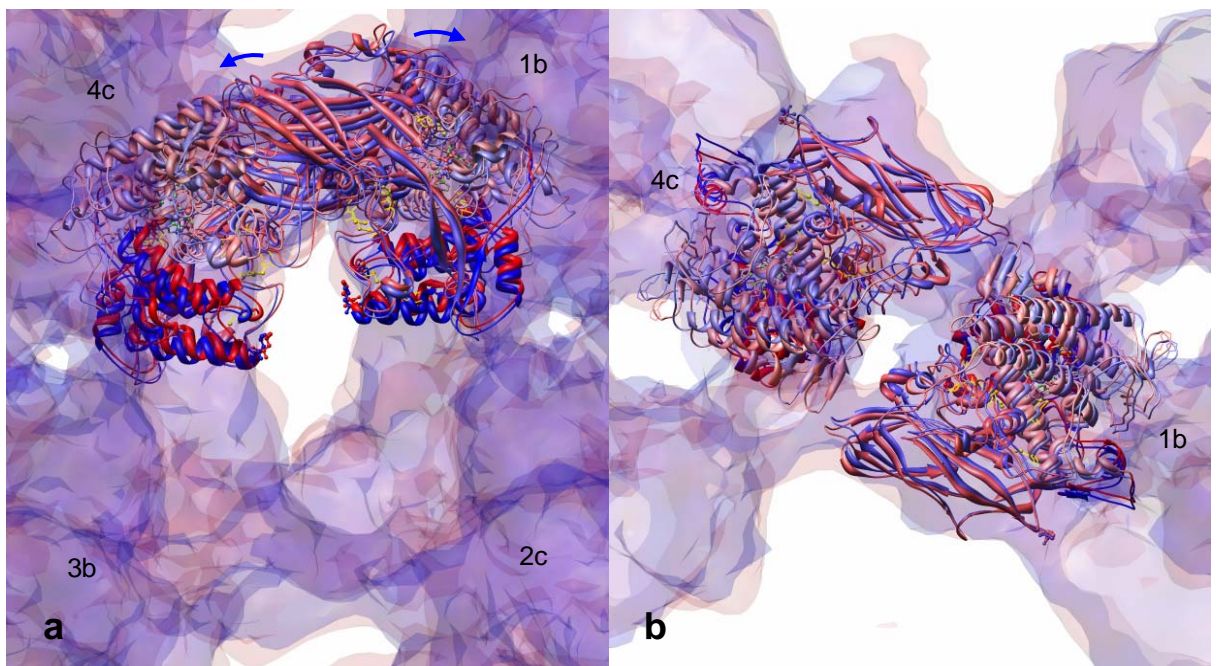


Abbildung 96. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (6).

Die Überlagerung der eingepassten LpHc-II Untereinheiten in die transparent dargestellten Rekonstruktion des deoxy-EcHc (rot) und oxy-EcHc (blau). a) Das Interdodekamer-Interfaces 1b-4c (das gegenüber liegende 3b-4c nicht gezeigt) in Flip-Aufsicht und b) in Frontalansicht.

4.8. Interfaces im 4x6-Molekül

4.8.1. 2x6-2x6-Interfaces (Interdodekamer-Interfaces)

Anhand der im Ergebnisteil beschriebenen Massenkontaktstellen zwischen den verschiedenen Strukturhierarchieebenen des 4x6-EcHc-Moleküls (Abbildung 68 und Tabelle 8 Seite 81) und den in die Rekonstruktion eingepassten, von Voit modellierten, Untereinheiten von EcHc werden im Folgenden mutmaßliche atomare Interfaces aufgezeigt. Mutmaßlich deshalb, weil es sich bei allen Modellen die zur Einpassung dienen könnten um keine realen EcHc-Raumstrukturen handelt. Einpassung von LpHc-II liefert ein reales Raumstrukturmodell mit einer anderen (immer identischen) Sequenz, Einpassung von modellierten EcHc-Untereinheiten liefert die richtige Sequenz aber in spekulativer Raumstruktur. Es wird daher erst dargestellt wie die Interfaces mit der realen Raumstruktur von LpHc-II Untereinheiten aussehen könnten, um eine Einschätzungsmöglichkeit für den Realitätsgehalt der spekulativen Raumstruktur der modellierten EcHc Untereinheiten zu bekommen.

Man kann Kontakte in der Rekonstruktion bzw. ihr Äquivalente auf molekularer Auflösungsebene, die Bindungen, für das EcHc zwischen den Halbmolekülen 2x6-2x6, zwischen den Hexameren eines Dodekamers (Intradodekamer-Hexamerkontakt) 1x6-1x6 und innerhalb eines Hexamers zwischen den Trimeren, den Dimeren und innerhalb dieser unterscheiden. Letztgenannte Intrahexamer-Kontakte sind schon von Hazes (Hazes et al., 1993) mittels eines aus der Röntgenkristallstruktur der LpHc-II Untereinheit synthetisierten Homohexamers, bzw. von Volbeda und Gaykema für PiHc (Gaykema et al., 1984; Volbeda and Hol, 1989) anhand der Röntgenkristallstruktur eines Hexamers beschrieben worden. Deswegen, an dieser Stelle, die Beschränkung auf die Kontakte der superhexameren Strukturen. Für die 4x6-Strukturen sind diese, aufgrund der Komplexität, bisher in Strukturarbeiten (Boisset et al., 1995; van Heel and Dube, 1994) nicht, oder, wie auch in dieser Arbeit, im besten Falle, nur quasi molekular mittels spekulativer Einpassungsmodelle besprochen werden konnte (de Haas and Vanbruggen, 1994; Taveau et al., 1997).

Das 1b-4c-Interface (und natürlich das gleich gestaltete 3b-2c-Interface) stellt die wichtigste Verbindung zwischen den beiden Dodekameren. Die beiden Untereinheiten sind mit einem Doppelkontakt verbunden (Abbildung 97 a), jede berührt mit ihrer exponierten Domäne 3 die trimerzentrale Domäne 2 des gegenüber wobei das flip-seitige Interface inniger ausfällt. Hier finden sich mehrere Atomabstände aus Residuen der beiden verschiedenen Untereinheiten die bei der LpHc Einpassung in die Rekonstruktion des deoxy-EcHc, Wechselwirkungen möglich erscheinen lassen und in Abbildung 97 und Tabelle 18 aufgeführt sind. In der darauf folgenden Abbildung 98 ist die Ableitung der Raumstruktur für die EcHc-Sequenzen, der an diesem Interface beteiligten Untereinheiten zu sehen. Die beteiligten Residuen unterscheiden sich erheblich. Die Aminosäuren, welche an potentiellen Kontakten beteiligt sein könnten, sind praktisch alle ausgetauscht. Bei der EcHc Einpassung sind mehr H-Brücken vorhanden aber es kommt zu weit mehr Kollisionen (nicht alle gezeigt). Abbildung 98 stellt eine Überlagerung aus beiden Einpassungen dar. Aufgrund der Kollisionen (welche im 1x6-1x6-Interface 1b-2c noch zahlreicher auftreten) und der offensichtlich noch mangelhaften Modellierung (der Loop in der Mitte, es müssen mehr Aminosäuren modelliert werden als das Modell selbst hat) erscheint mir das EcHc-Interfaces weit spekulativer als mit der bekannten Raumstruktur aus der Röntgenkristallographie für LpHc.

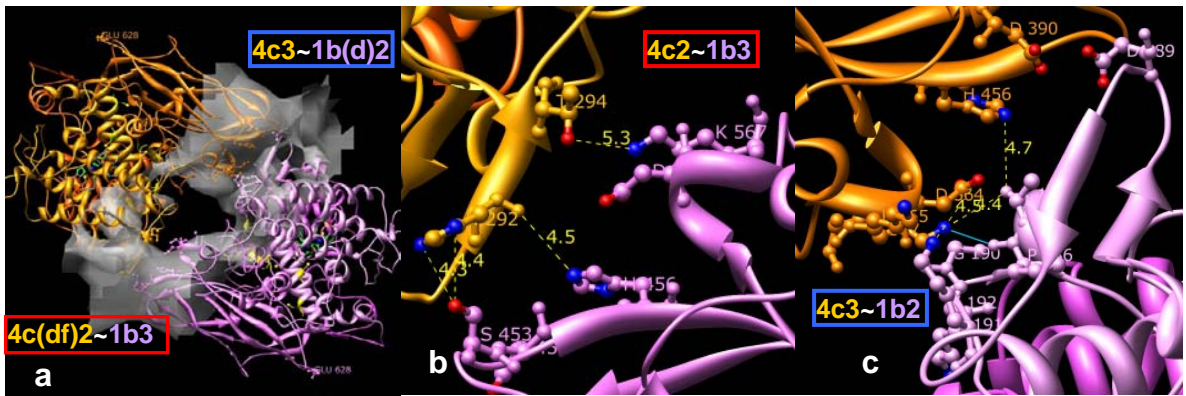
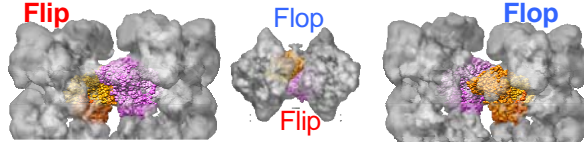


Abbildung 97. 2x6-2x6-Interfaces 1b3-4c2 und 4c3-1b2 der LpHc-II Einpassung.



a) Frontalansicht des Flip-Flop-Seiten-übergreifenden Interfaces wie in Legendenbild Mitte, mit reduzierter Rekonstruktionsoberfläche. Lage der beiden Untereinheiten, 1b (pink) und 4c (orange; Farben wie in Abbildung 85) und deren Kontaktstellen (rot: Flip 1b3-Kontakt im Zentrum von 1x6-4, blau: Flop Zentrum von

1x6-1 frei), und die Korrelation in der Oberfläche der Rekonstruktion (vergleiche Abbildung 68 Seite 81). b) 1b3-4c2-Interface. c) 4c3-1b2-Interface. a) – c) Die Proteinketten sind abstrakt als Bänder dargestellt und die potentiell an dem Interface beteiligten Residuen als ‚ball and stick‘, gezeigt sind potentiell beteiligten Seitenketten welche nicht weiter als 5 Å von einander entfernt liegen mit potentiell denkbaren Bindungen (gelb, mit Abständen in Angström). Die 3 Å-Bindung zwischen Pro186-O aus 1b2 und Lys467-Nζ aus 4c3 stellt eine H-Brücke. Von Lys293 fehlt in der Röntgenstruktur die Seitenkette. Für eine Auflistung der potentiellen Bindungen siehe Tabelle 18. Die jeweiligen Epitope stehen noch mit anderen Untereinheiten – in Klammern in a) – in Kontakt, werden aber getrennt in der nächsten Abbildung gezeigt.

Tabelle 18. Potentielle Bindungen im LpHc 2x6-2x6-Interface.

TeSt = Tertiärstruktur (Untereinheiten mit Domänenangabe), SeSt = Sekundärstruktur in der die Seitenkette lokalisiert ist, AS1, AS2 Aminosäuren aus verschiedenen Untereinheiten; A1, A2 = Atom aus verschiedenen Untereinheiten; blau = Wasserstoffbrücke.

TeSt	SeSt		AS1	A1	Dist [Å]	A2	AS2		SeSt	TeSt				
1b2	-	186	Pro	P	O	-	3,0	-	Nz	567	Lys	K	a3.5	4c3
1b2	-	187	Lys	K	O	-	4,4	-	Nz	567	Lys	K	a3.5	4c3
1b2	-	192	Lys	K	Nz	-	4,5	-	Od2	564	Asp	D	a3.5	4c3
1b2	-	187	Lys	K	O	-	4,7	-	Ne2	456	His	H	b3e	4c3
1b3	-	453	Ser	S	Og	-	4,3	-	Ne2	292	His	H	b2e	4c2
1b3	-	453	Ser	S	Og	-	4,4	-	Nd1	292	His	H	b2e	4c2
1b3	b3e	456	His	H	Ne2	-	4,5	-	O	292	His	H	b2e	4c2
1b3	a3.5	567	Lys	K	Nz	-	5,3	-	Og1	294	Thy	Y	b2e	4c2
1d2	-	379	Lys	K	Nz	-	9,8	-	O	495	Pro	P	b3h	4c3
1b3	-	452	Ala	A	O	-	5,0	-	Nd1	292	His	H	b2e	4d2
1b3	-	452	Ala	A	O	-	5,4	-	Nd2	292	His	H	b2e	4d2
1b3	-	452	Ser	S	Og	-	7,2	-	Nd1	292	His	H	b2e	4f2

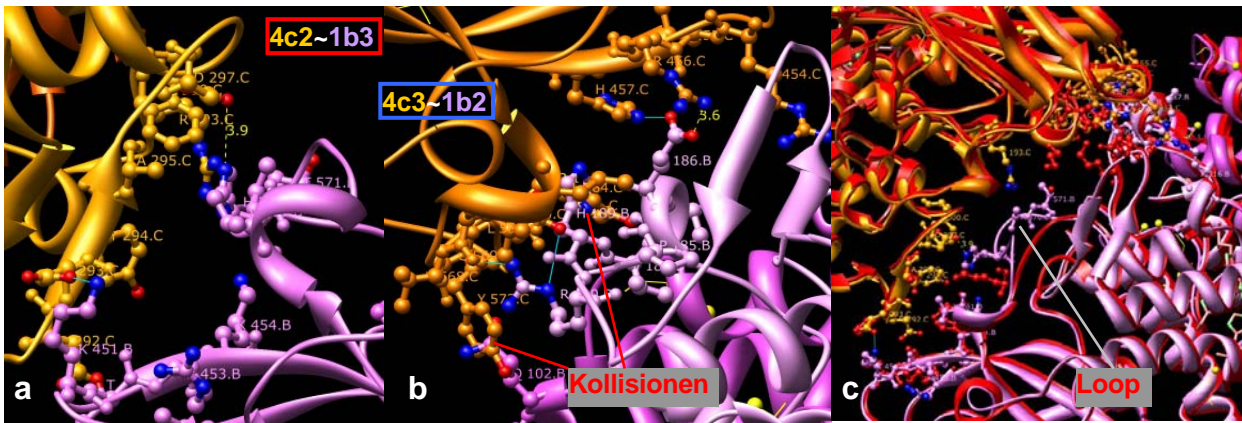


Abbildung 98. 2x6-2x6-Interfaces 1b3-4c2 und 4c3-1b2 der EcHc-Untereinheiten-Einpassung. Wie Abbildung 97 aber mit EcHc-Untereinheitstypen eingepasst. a) 4c2-1b3-Interface. b) Interface 4c3-1b2. Es wurden fünf die beiden Untereinheiten verbindenden H-Brücken (türkis) gefunden (Tabelle 19). Die eingepasste modellierte Raumstruktur der EcHc-Sequenzen zeigt an einigen Stellen Kollisionen der Van-der-Waals-Radien (hier nicht dargestellt) der Residuen. c) Überlagerung aus LpHc-II Einpassung (rot) und EhcHc Einpassung wie in a) und b). Es sind verschiedene Aminosäuren am Interface beteiligt. Der Loop (Mitte) der EcHc-Modellierung zeigt (wie hier und an anderen Stellen), dass die Modellierung problematisch ist (zu wenige Modell-Aminosäuren).

Tabelle 19. Potentielle Bindungen im EcHc 2x6-2x6-Interface.

TeSt = Tertiärstruktur (Untereinheiten mit Domänenangabe), SeSt = Sekundärstruktur in der die Seitenkette lokalisiert ist, AS1, AS2 Aminosäuren aus verschiedenen Untereinheiten; A1, A2 = Atom aus verschiedenen Untereinheiten; blau = Wasserstoffbrücke.

TeSt	SeSt		AS1	A1	Distanz [Å]	A2	AS2		SeSt	TeSt		
1b2	-	189	His	H	0,0	Ce2	571	Tyr	Y	-	4c3	
1b2	-	102	Gln	Q	0,0	Cd2	573	Tyr	Y	-	4c3	
1b2	-	190	Arg	R	3,5	-	Od2	570	Asp	D	-	4c3
1b2	-	190	Arg	R	Nh2	-	O	569	Gly	G	-	4c3
1b2	a	186	Glu	E	Oe1	-	Ne2	457	His	H	b	4c3
1b2	a	187	Val	V	O	-	Oh	571	Tyr	Y	-	4c3
1b3	-	451	Lys	K	Nz	-	Oe1	293	Glu	E	b	4c2
1b3	-	568	His	H	Ne2	-	Od2	297	Asp	D	-	bc2
1b2	a	186	Glu	E	Oe2	-	Nh2	456	Arg	R	a	4c3
1b2	-	189	His	H	Ne2	-	Od1	570	Asp	D	-	4c3

Für die drei anderen Interdodekamer-Interfaces finden sich bis auf das Interface 4d2-1b3 keine für potentielle Bindungen interessante Atomabstände (Abbildung 99).

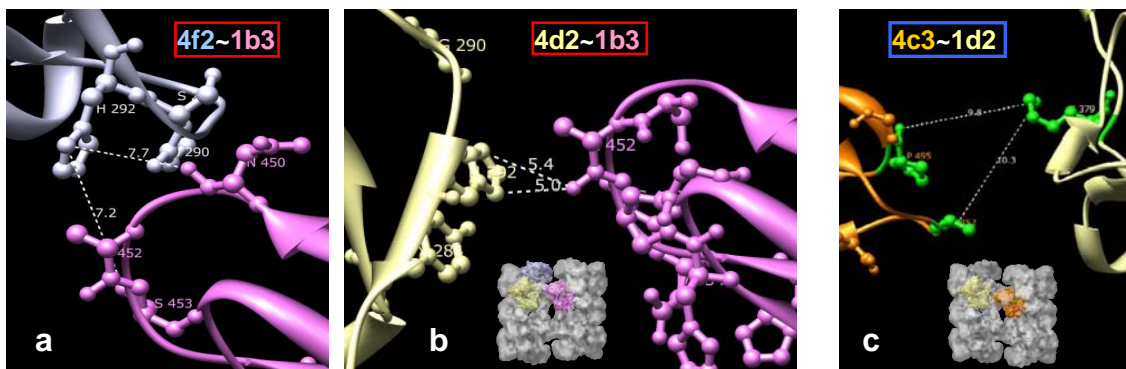


Abbildung 99. 2x6-2x6-Interfaces 1b3-4f2, 1b3-4d2 und 4c3-1d2 mit LpHc.

Nur Interface 4d2-1b3 in b) gezeigt zeigen eventuelle Bindungslängen im Bereich von ca. 5 Å. in den beiden anderen Interfaces liegen die Untereinheiten deutlich weiter auseinander, was Wechselwirkungen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Rot: Interface der Flip-Aufsicht, blau Interface der Flop-Aufsicht.

4.8.2. 1x6-1x6-Interfaces (Intradodekamer-Interfaces)

Auch am 1b-2c-Interface erweist sich das Rigid body “Fitting” als nicht ausreichend. Die beiden fast parallel liegenden 1.5-Helices aus den beiden Untereinheiten der LpHc-II-Untereinheiten kommen so dicht nebeneinander zu liegen, dass die Residuen stark sterisch interferieren (Abbildung 102). Die Untereinheit II von LpHc entspricht der Untereinheit a in EcHc (Abbildung 17 Seite 20), also einer peripher in der Kontaktstelle zwischen den beiden Hexameren lokalisierten Untereinheit. Die Einpassung in den zentralen Ring aus b und c Untereinheiten im EcHc (LpHc) der 4x6-Strukturen dürfte strukturelle Schwierigkeiten machen, weil davon auszugehen ist, dass sich die b/c-Untereinheiten für die Ringbildung morphologisch verändern müssten. Gerade für die am b/c-Kontakt quasi ausschließlich involvierte Domäne 1 hat Hazes eine Rotation von $7,5^\circ$ relativ zu den beiden anderen Domänen im Vergleich zur PiHc Untereinheit gefunden. Es wäre also interessant zu wissen, ob nur die LpHc-II-Untereinheit (=EcHc a) dieses Merkmal hat oder ob die originäre LpHc-V/VI (EcHc-a/b) hier die Helix 1.5 in Wirklichkeit anders orientieren würde und eine sinnvolles Interface generieren würde. Eine nähere Betrachtung dieser Schnittstelle ist unter diesen Vorraussetzung wenig sinnvoll. Hier könnte ein flexibles “Fitting” vielleicht, im besten Falle es auch schon eingefittete benachbarte Untereinheit mit in das Morphing einrechnen würde, ein besseres, ein die Domäne 1 anpassendes, Ergebnis liefern. Dies wird sobald die Auflösung in einem dafür sinnvollen Bereich liegt nachgeholt werden.

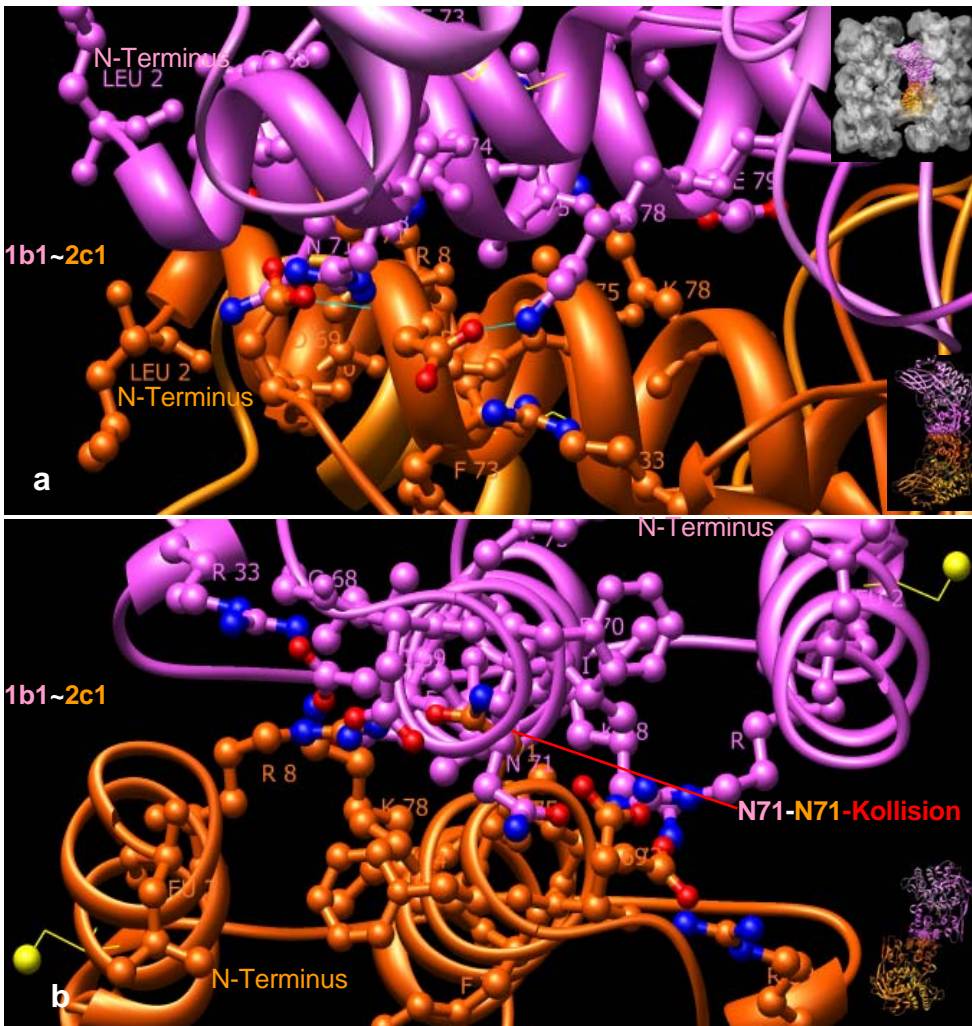


Abbildung 100. 1x6-1x6-Interface 1b1-2c1 mit LpHc.

a) Axialansicht von der Flop-Aufsicht aus gesehen und b) von sagittal. Das 1b1-2c1-Interface erweist sich als ebenfalls sterisch gehindert.

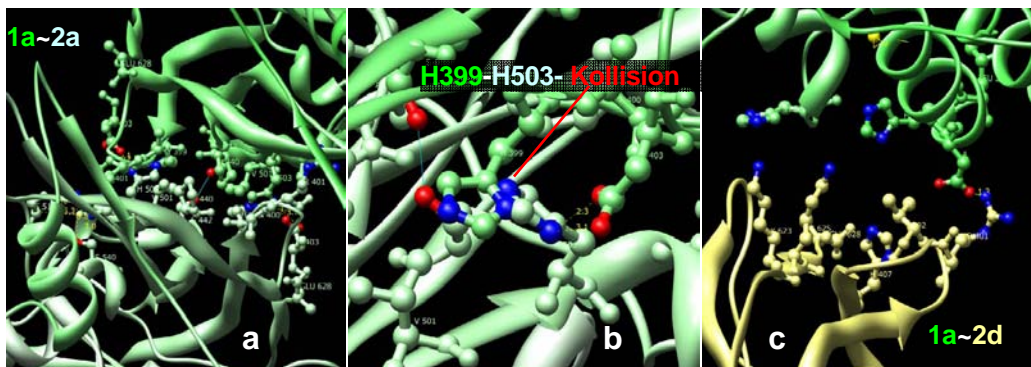


Abbildung 101. 1x6-1x6-Interface 1a-2a mit LpHc.

a) Das Interface 1a-2a besitzt Atomabstände im Bereich von 2 bis 4 Å wie in Tabelle 20 zu sehen ist, ist aber b) auch nicht frei von Kollisionen. c) die Residuen mit interessanten Atomabständen im Interface 1a-2d besitzen fast nur Stickstoffatome (blau). Die beiden einzigen Sauerstoffe im Asp4 könnten wohlhmöglich gleich zwei Verbindungen eingehen.

Tabelle 20. Potentielle Bindungen im EcHc 1x6-1x6-Interface.

TeSt = Tertiärstruktur (Untereinheiten mit Domänenangabe), SeSt = Sekundärstruktur in der die Seitenkette lokalisiert ist, AS1, AS2 Aminosäuren aus verschiedenen Untereinheiten; A1, A2 = Atom aus verschiedenen Untereinheiten; blau = Wasserstoffbrücke; rot = Kollision von Atomen oder Aminosäuren.

TeSt	SeSt		AS1	A1	Dist [Å]	A2	AS2	SeSt	TeSt					
1a3	b3a	399	His	H	Nd1	-	0,0	-	Ce1	503	His	H	b3h	2a3
1a3	b3d	442	Ser	S	Og	-	2,7	-	Og	442	Ser	S	b3d	2a3
1a3	b3h	503	His	H	Nd1	-	1,9	-	Od1	403	Asp	D	-	2a3
1a3	b3h	503	His	H	Nd1	-	3,7	-	Od2	403	Asp	D	-	2a3
1a3	-	403	Asp	D	Od1	-	2,3	-	Nd1	503	His	H	b3h	2a3
1a3	-	403	Asp	D	Od2	-	3,1	-	Nd1	503	His	H	b3h	2a3
1a3	-	401	Arg	R	Nh1	-	3,0	-	Og	540	Ser	S	a3.4	2a3
1a3	-	401	Arg	R	Nh2	-	3,8	-	Og	540	Ser	S	a3.4	2a3
1d3	-	401	Arg	R	Nh2	-	1,6	-	Od2	4	Asp	D	a1.1	2a1
1d3	b3b	407	His	H	Ne2	-	5,3	-	Od1	4	Asp	D	a1.1	2a1
1a1	a1.1	4	Asp	D	Od1	-	5,6	-	Ne2	407	His	H	b3b	2d3
1a1	a1.1	4	Asp	D	Od2	-	1,3	-	Nh2	401	Arg	R	-	2d3
1b1	a1.5	71	Asn	N	-	-	0,0	-	-	71	Asn	N	a1.5	2c1
...und weitere Kollisionen														
1b1	a1.5	78	Lys	K	Nz	-	1,8	-	Od1	72	Asp	D	a1.5	2c1
1b1	a1.5	71	Asn	N	Od1	-	3,4	-	N	72	Asp	D	a1.5	2c1

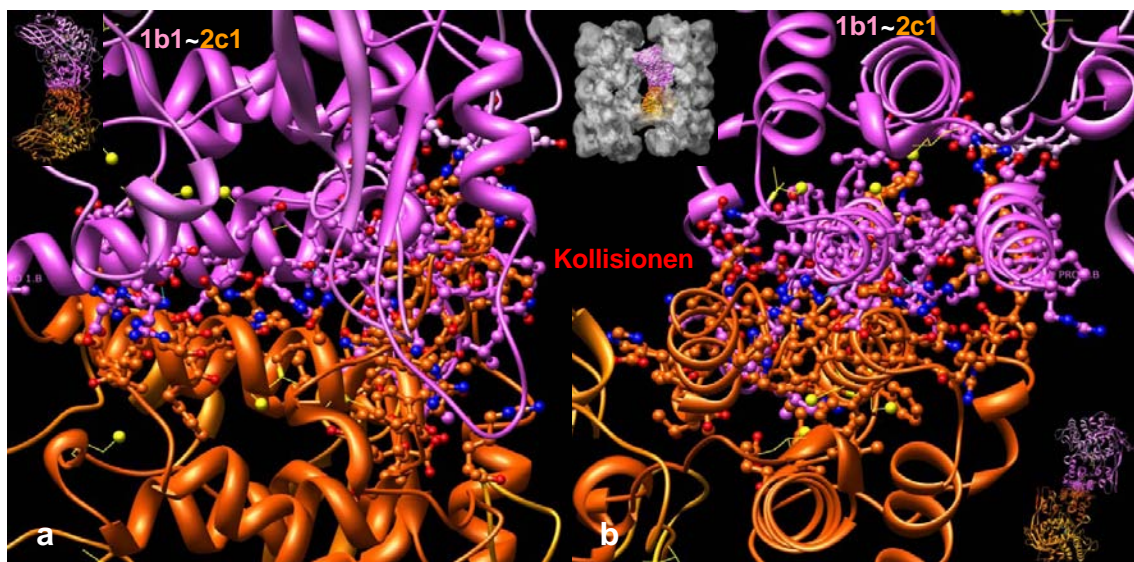


Abbildung 102. 1x6-1x6-Interface 1b-2c mit EcHc.

Wie Abbildung 100 nur mit EcHc Einpassung. a) Axial und b) Sagittal. Bei gleichem Messabstand wie in der LpHc Einpassung ergibt sich ein deutlich komplexeres Residuen-Interface. Eine nähere Betrachtung macht so keinen Sinn, da es sich fast allen Residuen im Zentrum zumindest um Van-der-Waals-Kollisionen handelt.

5. Konklusion

Viele der bis dato in der Literatur angegebenen geometrischen Parameter für das 4x6-Hämocyanin von *Eurypelma californicum*, sollten durch weitere, verfeinerte Arbeiten überprüft werden. Falls die hier vorgestellten Daten aus Rekonstruktionen der deoxygenierten und oxygenierten Form sich bestätigen, könne viele geometrischen Größen, wie die relativen Winkel der Hexamere zueinander, nicht gehalten werden. So fällt z. B. die Änderung der Quartärstruktur (Translation und Rotation) im 4x6-EcHc weit weniger raumgreifend aus als von Hartmann und Decker (Decker et al., 1996; Hartmann and Decker, 2002; Hartmann et al., 2001) angenommen. Die aktuellen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Dynamik der Oxygenierung vor allem auf Untereinheiten-Ebene abläuft und sich über die starken Dimer-Interfaces im Hexamer vermitteln ohne die Quartärstruktur maßgeblich zu verändern. Beteiligt ist hier

wahrscheinlich vor allem die Domäne 1, von welcher stark angenommen wird, dass sie im Zuge der Oxygenierung eine Rotation relativ zur Domäne 2 ausführt (Hazes et al., 1993; Gaykema et al., 1984; Hazes et al., 1996; Magnus et al., 1994; Volbeda et al., 1989). Diese ist demnach der Schlüssel zur intrahexameren Kooperativität der Arthropodenhämocyanine.

Die interhexamere Kooperativität wird über die Intra- und Interdodekamer-Interfaces vermittelt. Da in den beiden rekonstruktionsseitigen Quartärstrukturen kein signifikanter Unterschied in diesen Kontakten zu sehen war, wurden diese hier mit molekularen Teilstrukturen simuliert. Es konnten damit kaum Translationen von Untereinheiten bzw. Rotationen der Teilquartärstrukturen, den Trimeren, Dimeren, Hexameren und Dodekameren festgestellt werden. Die Bewegung war meist eine komplexe Überlagerung aus Rotation aller Raumrichtungen, ohne bzw. mit geringer Translation der Untereinheiten selbst. Dies bedeutet, soweit die Daten hier verlässlich sind, dass die Dynamik praktisch auf die Untereinheiten beschränkt bleibt. Diese Fragestellung sollte mit einer flexiblen Einpassung in verfeinerte 3D-Rekonstruktionen wieder aufgegriffen, um auch Oxygenierungs-Dynamik in Subtertiärstrukturen sichtbar zu machen.

Die Sinnhaftigkeit der kompletten Interpretation steht und fällt mit der Korrektheit der Präparation, im speziellen Fall der präparativen Trennung der Oxygenierungszustände welche zur Untersuchung stehen sollten. Die dafür von mir entwickelte Präparationskammer, in welcher definierte Gasbedingungen hergestellt werden können, um die beiden Zustände präparative zu konservieren, bedarf noch einer Methode die Beladungszustände der Proteine direkt auf den Cryo-Präparaten, unmittelbar vor der Einschleusung in das EM zu messen. Dies stellt ein technisches Problem bzw. Herausforderung dar und erlegt für diese Arbeit auf, die Funktionsweise der Präparationskammer im Umkehrschluss aus der erfolgreichen Manifestierung der vermuteten Unterschiede in den Rekonstruktionen zu verifizieren. Da diese Unterschiede nur auf molekularer Ebene festgestellt werden konnten, besteht Ungewissheit ob die Präparationskammer die geforderten Leistungen zu erfüllen in der Lage ist und muss in weiteren Versuchen geprüft werden. Wenn sich die Präparationskammer aber folgenden Projekten bewährt, und dies zeichnet sich mittlerweile an hoch aufgelösten Rekonstruktionen von Molluskenhämocyaninen in unserer Arbeitsgruppe ab, wäre es in Kombination mit einer lokalen MSA, welche in der Lage ist, Manifestationen von dynamisch auftretenden Strukturzuständen von Proteinen zu trennen, vielleicht auch möglich mit der Präparationsmethode außer den Extremzuständen auch Zwischenzustände zu konservieren, um die dabei auftretende Dynamik zu analysieren.

E. Anhang

1. Zusammenfassung

3D Cryo-Elektronenmikroskopie des 4x6-Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* unter Oxy- und Deoxybedingungen

Arthropodenhämocyanine und Molluskenhämocyanine, die extrazellulären Atmungsproteine der Arthropoden und Mollusken, unterscheiden sich grundsätzlich im Aufbau, besitzen aber ähnliche aktive Zentren, welche in ihrer oxydierten Form für die Blaufärbung der Hämocyanine verantwortlich sind. Sauerstoff wird im Bindungszentrum zwischen zwei, von sechs Histidinen ligandierten, Kupfer(I)Ionen gebunden. Arthropodenhämocyanine bauen sich artspezifisch aus 1, 2, 4, 6, oder 8 Hexameren mit D3-Symmetrie auf. Die Untereinheiten von je ca. 75 kDa falten sich in drei Domänen unterschiedlicher Funktionen.

Der komplexe, hierarchische Zusammenbau der Arthropodenhämocyanine hängt von der Heterogenität der Untereinheiten ab. Die 7 verschiedenen Sequenzen des 4x6-Hämocyanins von *Eurypelma californicum* (EcHc) sind biochemisch in der Quartärstruktur lokalisiert. Bislang fehlte noch ein unabhängig erstelltes 3D-Modell der geometrischen Gesamtstruktur welche die hexamere und monomere Topographie eindeutig zeigt. Dessen Erstellung war Gegenstand dieser Arbeit, in Verbindung mit der Zielsetzung, die 3D-Rekonstruktion in den beiden extremen physiologischen Zuständen, mit und ohne gebundenen Sauerstoff, zu erzeugen. Dazu wurden in einer eigens entwickelten Atmosphären-Präparationskammer die Proteine in Lösung schockgefrorenen und mittels Cryo-3D-Elektronenmikroskopie gemessen. Aus den daraus gewonnen Projektionsbildern ließen sich mit der "Single Particle Analyse" die 3D-Informationen zurückberechnen. Die 3D-Rekonstruktionen wurden mit der publizierten Röntgenkristallstruktur des hexameren Referenz-Hämocyanins der Languste *Panulirus interruptus* verifiziert.

Die Rekonstruktionen erlaubten die eindeutige Messung diverser in der Literatur diskutierter Parameter der Architektur des 4x6-EcHc und darüber hinaus weiterer geometrischer Parameter, welche hier erstmals veröffentlicht werden.

SAXS-Daten sagen extreme Translationen und Rotationen von Teilquartärstrukturen zwischen oxy- und deoxy-EcHc voraus, was von den 3D-Rekonstruktionen der beiden Zustände nicht bestätigt werden konnte: Die 16 Å Rekonstruktion der Deoxyform weicht geometrisch nicht von der 21 Å Rekonstruktion der Oxyform ab.

Die Einpassung der publizierten Röntgenstruktur der Untereinheit II des Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* in die Rekonstruktionen unterstützt eine auf der hexameren Hierarchieebene lokalisierte Dynamik der Oxygenierung.

Mittels Einpassung modellierter molekularer Strukturen der EcHc-Sequenzen konnte eine erste Vermutung zur Lokalisation der beiden zentralen Linker-Untereinheiten b und c des 4x6-Moleküls gemacht werden: Demnach würde Untereinheit b in den exponierten Hexameren des Moleküls liegen.

Aussagen über die Quartärstrukturbindungen auf molekularer Ebene aufgrund der Einpassung modellierter molekularer Daten in die Rekonstruktionen sind als spekulativ einzustufen: a) Die Auflösung der Rekonstruktion ist verbesserungswürdig. b) Es gibt keine adäquate Vorlage für eine verlässliche Strukturmodellierung. c) Es wäre eine flexible Einpassung notwendig, um Ungenauigkeiten in den modellierten Strukturen durch Sekundärstrukturanpassung zu minimieren.

2. Publikationen

Thema Dissertation

Präparation, 3D Cryo-Elektronenmikroskopie und Methodik zur Strukturaufklärung komplexer Arthropoden-Atmungsproteine (Hämocyanine) unter Oxy- und Deoxybedingungen.

Publikationen

Martin AG, Depoix F, **Stohr M**, Meissner U, Hagner-Holler S, Hammouti K, Burmester T, Heyd J, Wriggers W, Markl J. **2007**. *Limulus polyphemus* Hemocyanin: 10 Å cryo-EM Structure, Sequence Analysis, Molecular Modelling and Rigid-body Fitting Reveal the Interfaces Between the Eight Hexamers. J Mol Biol 366:1332-1350.

Meissner U, Martin AG, Schwarz BO, **Stohr M**, Gebauer W, Harris JR, Markl J. **2004**. 3-D reconstruction of Hemocyanins and other invertebrate hemolymph proteins by cryo-TEM: an overview. Micron, MICRON 35(1-2):7-9.

Meissner U, **Stohr M**, Kusche K, Burmester T, Stark H, Harris JR, Orlova EV, Markl J. **2003**. Quaternary structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) 1 x 6-mer Hemocyanin from cryoEM and amino acid sequence data. J Mol Biol 325(1):99-109.

Diplomarbeit:

Thema: Verifikation der Struktur eines Basis-Atmungsproteins der Arthropoden

Titel: 3D-Rekonstruktion des Hämocyanin-Hexamers der Languste *Palinurus elephas* aus elektronenmikroskopischen Bildern.

3. .

F. Verzeichnisse

1. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Å	Angström (10^{-10} Meter)
AS	Aminosäure
@	Weblink in Fußnote
COP	Copper Oxygen binding Protein
C2	Polar mit 2-fach Rotationssymmetrie
D3	Dihedral mit 3-fach Rotationssymmetrie (32-Symmetrie)
D2	Dihedral mit 2-fach Rotationssymmetrie
Da	Dalton (in Biochemie übliche Bezeichnung für atomare Masseneinheit u)
EcHc	<i>Eurytelma californicum</i> Hämocyanin
EM	Elektronen-Mikroskop oder Elektronenmikroskopie
FR	Fourierraum
FSK (FSC)	Fourier Schalen Korrelation (Fourier Shell Correlation)
FT	Fourier-Transformation
Hc	Hämocyanin
Hg	Quecksilber
His	Histidin
hed	header: IMAGIC-Header-File
img	image: IMAGIC-Image-File
KKK (CCC)	Kreuz-Korrelations-Koeffizient (Cross-Correlation-Coefficient)
KTF (CTF)	Kontrast-Transfer-Funktion (Contrast-Transfer-Function)
LpHc	<i>Limulus polyphemus</i> Hämocyanin
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
MRA (MRA)	Multi-Referenz-Ausrichtung (Multi-Reference-Alignment)
MSA (MSA)	Multivariate Statistische Analyse (Multivariate-Statistical-Analysis)
mya	million years ago (before now)
nm	Nanometer (10^{-9} Meter)
nx6-m	N x hexamere Teilstruktur Nummer m
nx6-R(m)SA	(m-fache) Rotationssymmetrieachse eines nx6-mers
PeHc	<i>Palinurus elephas</i> Hämocyanin
PiHc	<i>Panulirus interruptus</i> Hämocyanin
pH	potentia Hydrogenii (logarithmische Protonenkonzentration in Lösung)
PR (PM)	Projektions-Referenzierung (Projection Matching)
Pixel	Picture element
PDB	Protein Daten Bank
RKK (RCC)	Rotations-Korrelations-Koeffizient (Rotational-Correlation-Coefficient)
RnSA	n-fache Rotationssymmetrieachse
SAXS	Small-angle X-ray scattering
SRV (SNR)	Signal-Rausch-Verhältnis (Signal-Noise-Ratio)
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
UE(T)	Untereinheit(styp) [eines Protein[multimers]]
tif(f)	tagged image (file) format
Voxel	Volume element

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Hämocyane der Arthropoden.	1
Abbildung 2. Frühes Elektronenmikroskop und sein Erfinder Ernst Ruska (1906-1988).	2
Abbildung 3. Spendertier Vogelspinne <i>Eurypelma californicum</i>	4
Abbildung 4. Systematik des Spendertiers <i>Eurypelma californicum</i>	5
Abbildung 5. In der Natur realisierte Atmungsproteine.	7
Abbildung 6. Arthropoden- und Molluskenhämocyanin.	9
Abbildung 7. Bindungszentrum von Mollusken- und Arthropoden-Hc.	10
Abbildung 8. Die O ₂ -Bindungsstelle im Arthropodenhämocyanin ist in Domäne 2 lokalisiert.	11
Abbildung 9. Bindungszentrum von Kupfer-Sauerstoff-Bindungs-Proteinen	11
Abbildung 10. Leistungsvergleich verschiedener Atmungsproteine.	13
Abbildung 11. Sauerstoffbindungskurve eines Hämocyanin-Moleküls.	13
Abbildung 12. Spekulationes Evolutionsschema für Typ 3 Kupferproteine	14
Abbildung 13. Quartärstrukturen der Arthropodenhämocyanine.	16
Abbildung 14. Prinzipieller Aufbau der Cheliceratenhämocyanine.	17
Abbildung 15. Lokalisationen im Hämocyanin-Hexamere.	18
Abbildung 16. Röntgenstruktur und 3D-Rekonstruktion der Langusten-Hc.	19
Abbildung 17. Untereinheitstypen.	20
Abbildung 18. Untereinheitstypen-Topologie von 4x6-EcHc.	22
Abbildung 19. EcHc ist nicht planar. "Rocking"-Verhalten.	23
Abbildung 20. Die benutzten Rechner.	24
Abbildung 21. Prinzip der Bildbearbeitungs-Methoden - prozessorientiert.	29
Abbildung 22. Prinzip der Bildbearbeitungs-Methode - bild- oder ergebnisorientiert.	30
Abbildung 23. Gewinnung der Spinnen-Hämolymphe.	30
Abbildung 24. Präparation und Elektronenmikroskopie.	31
Abbildung 25. Cryo-Plunger und Atmosphärenkammern.	34
Abbildung 26. Prinzip der Atmosphären-Strömungskammer.	35
Abbildung 27. Elektronenmikroskop und Cryo-EM-Vorbereitung.	38
Abbildung 28. Kontrast-Transfer-Funktion CTF.	39
Abbildung 29. Film-Entwicklungskammer.	40
Abbildung 30. Trommelscanner (Heidelberger Druckmaschinen).	41
Abbildung 31. Extrahierte Einzelmoleküle in einer Beispiel-Bildergalerie.	42
Abbildung 32. Band-Pass-Filter.	44
Abbildung 33. Maskierte und Band-Pass-gefilterte Beispiel-Einzelbilder.	44
Abbildung 34. Ausrichtung der Objektbilder (Alignment).	46
Abbildung 35. Vergleich von Summenbildern am Beispiel von PiHc.	47
Abbildung 36. Sinogrammerstellung.	50
Abbildung 37. Sinogrammkorrelation und Common line.	51
Abbildung 38. Koordinatensystem, Euler-Winkel, Molekülorientierung im Raum.	52
Abbildung 39. Beispielwinkel für Projektions-Referenzierung	53
Abbildung 40. Beispiel eines Teils einer 3D-Dichte-Karte.	55
Abbildung 41. (Gefilterte) Rückprojektion.	56
Abbildung 42. 3D-Drucker und 3D-Druckmethode.	57
Abbildung 43. Konkretes 3D-Druck-Modell und älteres Modell.	58
Abbildung 44. Primärdaten auf Kodak Elektron Image Silberhalogenid Film.	61
Abbildung 45. Primärdaten: Korrektur der CTF und Astigmatismuskontrolle.	61
Abbildung 46. Gerätedefoci und berechnete Defoci (am Beispiel von deoxy-EcHc).	63
Abbildung 47. Defokushistogramm (am Beispiel von deoxy-EcHc).	64
Abbildung 48. Winkelverteilung (WV) und Projektionen-Pools (PP).	65
Abbildung 49. Auflösung.	65
Abbildung 50. Originalbilder (am Beispiel von deoxy-EcHc).	66
Abbildung 51. Klassen-Bilder nach Projection-Matching (am Beispiel von deoxy-EcHc).	67
Abbildung 52. Rekonstruktionsprojektionen (am Beispiel von deoxy-EcHc).	67

Abbildung 53. 3D-Dichte-Karten der Rekonstruktionen (Flip-Ausrichtung*).	68
Abbildung 54. Vergleich der 3D-Rekonstruktion von deoxy- und oxy-EcHc.	69
Abbildung 55. Nomenklatur der Molekülstrukturen.	70
Abbildung 56. Lage-, Ebenen- bzw. Ansichtsbeziehungen im 4x6-Molekül.	71
Abbildung 57. Projektionsbilder des deoxygenierten EcHc.	72
Abbildung 58. Oberflächen-Ansichten des deoxygenierten EcHc.	73
Abbildung 59. Native Ansicht der EcHc-Rekonstruktion (Aufsicht (XY)).	74
Abbildung 60. Seitenansicht 1: Native Ansicht 90° horizontal gekippt (XZ).	75
Abbildung 61. Seitenansicht 2: Native Ansicht 90° vertikal gekippte (YZ).	75
Abbildung 62. Ausgewählte Ansichten der 3D-Rekonstruktion deoxy-EcHc.	76
Abbildung 63. -142°, -52°- und 38°-Vertikalkippansichten.	77
Abbildung 64. Zwei labile Aufsichtenlagen des 4x6-EcHc.	78
Abbildung 65. Bistabile Kipplagen im 4x6-EcHc für beide Aufsichten.	79
Abbildung 66. Stabile Frontallage (XZ-Lage) des 4x6-EcHc.	80
Abbildung 67. Schnittbilder der Interdodekamerkontakte.	81
Abbildung 68. Kontakte im deoxygenierten 4x6-EcHc-Molekül.	81
Abbildung 69. Rekonstruktion mit MSA- und Winkelfindung.	82
Abbildung 70. Rekonstruktionen mit C1- und D2-Symmetrie.	83
Abbildung 71. Dimensionen und Winkel des deoxygenierten 4x6-EcHc.	84
Abbildung 72. Dodekamere (2x6) im deoxygenierten 4x6-EcHc.	86
Abbildung 73. Hexamer (1x6) im deoxygenierten 4x6-EcHc.	87
Abbildung 74. In der Literatur angegebene Parameter.	90
Abbildung 75. Relative Stellung der Untereinheit b und c im Dodekamer.	92
Abbildung 76. "Rocking"-Winkel bringt Dodekamerkontakt enger zusammen.	93
Abbildung 77. Lage der Untereinheiten b und c im Vergleich mit idealer Symmetrie.	94
Abbildung 78. Vergleich EcHc- mit 1x6-PeHc-Dichtekarte.	95
Abbildung 79. Vergleich EcHc mit 1x6-PeHc-Rekonstruktion.	96
Abbildung 80. Vergleich EcHc mit 1x6-PiHc-Oberfläche aus Röntgenstruktur.	97
Abbildung 81. Vergleich EcHc mit SAXS-Modellen und Markl-Voit-Modell.	99
Abbildung 82. Einpassung der 1x6-PiHc in die Rekonstruktion.	102
Abbildung 83. Vergleich mit Teil-Quartärstruktur-Modellen.	103
Abbildung 84. Vergleich von Hexamer- mit Untereinheiten-Einpassung.	104
Abbildung 85. Einpassung der Untereinheit II von LpHc.	105
Abbildung 86. Überlagerung des Fit von LpHc-II-Untereinheiten und EcHc-Untereinheiten.	105
Abbildung 87. Qualität der Einpassung.	106
Abbildung 88. Topgraphische Lage der Untereinheiten.	107
Abbildung 89. Dissoziations- bzw. Aggregationsformen von EcHc.	108
Abbildung 90. Stellung des Hexamers im Dodekamer.	110
Abbildung 91. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (1).	112
Abbildung 92. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (2).	113
Abbildung 93. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (3).	114
Abbildung 94. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (4).	115
Abbildung 95. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (5).	117
Abbildung 96. Molekulare Unterschiede zwischen Deoxy- und Oxy-EcHc (6).	117
Abbildung 97. 2x6-2x6-Interfaces 1b3-4c2 und 4c3-1b2 der LpHc-II Einpassung.	119
Abbildung 98. 2x6-2x6-Interfaces 1b3-4c2 und 4c3-1b2 der EcHc-Untereinheiten-Einpassung.	120
Abbildung 99. 2x6-2x6-Interfaces 1b3-4f2, 1b3-4d2 und 4c3-1d2 mit LpHc.	120
Abbildung 100. 1x6-1x6-Interface 1b1-2c1 mit LpHc.	122
Abbildung 101. 1x6-1x6-Interface 1a-2a mit LpHc.	122
Abbildung 102. 1x6-1x6-Interface 1b-2c mit EcHc.	123

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Struktureigenschaften der Sauerstoff-Bindungscentren.....	10
Tabelle 2. Eigenschaften der Hämocyanine im Vergleich.	12
Tabelle 3. Sequenzeigenschaften von Arthropodenhämocyanin-Untereinheiten.	21
Tabelle 4. Verwendete Materialien und Chemikalien.....	25
Tabelle 5. Verwendete Apparaturen.....	26
Tabelle 6. Verwendete Programme und Datenbanken.....	27
Tabelle 7. Defokuswerte der EM-Bilder (am Beispiel von deoxy-EcHc).....	62
Tabelle 8. Kontakte im deoxygenierten 4x6-EcHc-Molekül.	81
Tabelle 9. Übersicht der Auflösungen.	83
Tabelle 10. Dimensionen und Winkel des deoxygenierten 4x6-EcHc.	88
Tabelle 11. Übersicht der durchgeführten Oberflächen-Vergleiche.	94
Tabelle 12. Bekannte geometrische Parameter.....	100
Tabelle 13. Übersicht der Vergleiche mit molekularen Strukturen.	101
Tabelle 14. Qualität der Einpassung.....	105
Tabelle 15. Theoretisch mögliche Aggregationsformen der Untereinheitstyp von EcHc.....	108
Tabelle 16. Einpassungsqualität von Untereinheit b und c in das 4x6-EcHc.	109
Tabelle 17. Abstände und Winkel der eingepassten Untereinheiten.....	111
Tabelle 18. Potentielle Bindungen im LpHc 2x6-2x6-Interface.	119
Tabelle 19. Potentielle Bindungen im EcHc 2x6-2x6-Interface.	120
Tabelle 20. Potentielle Bindungen im EcHc 1x6-1x6-Interface.	123

4. Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung.....	1
1.	Motivation und das Projekt	1
2.	Ziel der Arbeit	1
3.	Transmissionselektronenmikroskopie	2
4.	3D-Rekonstruktion.....	3
5.	Spendertier <i>Eurypelma californicum</i>	4
6.	Hämocyanine.....	6
6.1.	Hämocyanine als Atmungsproteine in der Hämolymphe	6
6.2.	Hämocyanine	8
6.3.	Arthropodenhämocyanine.....	14
6.4.	Hämocyanin von <i>Eurypelma californicum</i> (EcHc).....	21
B.	Material und Methoden	24
1.	Material	24
1.1.	Substanzen, Geräte und Software-Programme	24
1.1.1.	Stoffe, Materialien und Chemikalien.....	25
1.1.2.	Geräte / Apparaturen.....	26
1.1.3.	Programme und Datenbanken.....	27
2.	Methoden	29
2.1.	Rohdatenbeschaffung.....	30
2.1.1.	Proteinpräparierung	30
2.1.2.	Aufnahme der Cryo-transmissionselektronenmikroskopischen Bilder.....	31
2.1.2.1.	Präparation der Objekte für das EM.....	32
2.1.2.2.	Die Cryo-Grid-Präparation unter definierten Bedingungen.....	34
2.1.2.3.	Cryo-EM (Belichtung, Aufnahmeprinzipien).....	35
2.1.2.4.	Kontrast-Transfer-Funktion	38
2.1.3.	Prozessierung des konkreten Filmmaterials nach Kodak	40
2.1.4.	Digitalisieren der Bilder (Densitometrie)	41
2.2.	Bildbearbeitung.....	41
2.2.1.	Teilchensuche und Vereinzeln der Teilchen	42
2.2.2.	Filtern und Normieren	42
2.2.3.	Ausrichtung (Alignment).....	44
2.2.4.	Klassifizierung und Winkel-Findung versus Projektions-Referenzierung.....	47
2.2.5.	MSA, Klassifizierung	48
2.2.6.	Winkel-Findung für die Objektbilder mittels 1D-Projektionen-Korrelationen ..	49
2.2.6.1.	Winkeldefinition nach Euler	51
2.2.7.	Projektions-Referenzierung (Projection-Matching)	53
2.2.8.	3D-Bild-Rekonstruktion.....	54
2.2.8.1.	Rekonstruktions-Projektion (Rückprojektionen).....	56
2.2.8.2.	Visualisierung: 2D/3D am Bildschirm und 3D-Druck (konkrete Modelle) ..	56
2.2.9.	Iteration	58
2.3.	Analyse	58
2.3.1.	Auflösung.....	58
2.3.2.	Weitere Methoden.....	59
2.3.2.1.	“Molecular Modelling” und “Fitting”	59
C.	Ergebnisse.....	61
1.	Primärdaten.....	61
2.	Prozessierte Daten.....	64
3.	Vergleich von Rekonstruktionen von deoxy- und oxy-EcHc.....	69
4.	Visualisierung.....	70
5.	Rekonstruktionssymmetrie des 4x6-EcHc-Moleküls.....	82
6.	Dimensionen, Winkel und Symmetrien der 4x6-, 2x6- und 1x6-Strukturen.....	83
D.	Diskussion.....	89

1.	Allgemeines	89
2.	Geometrie.....	90
3.	Geometrievergleich mit Strukturmodellen.....	94
3.1.	Vergleich mit 1x6-Crustaceen-Strukturen (Verifikation)	95
3.2.	Vergleich mit 4x6-Strukturen.....	97
4.	Einpassung von hochaufgelösten molekularen Strukturen	101
4.1.	Vergleich mit dem 1x6-PiHc von Gaykema	101
4.2.	Vergleich mit Teilstrukturen molekularer Quartärstruktur-Modelle	102
4.3.	Qualität der Einpassungen	104
4.4.	Darstellung von Dissoziationsformen.....	107
4.5.	Lokalisierung der Untereinheiten b bzw. c?	109
4.6.	Symmetrie des deoxy-EcHc-Hexamers	110
4.7.	Vergleich der Rekonstruktion von deoxy- und oxy-EcHc mittels Einpassung molekularer Modelle.	111
4.8.	Interfaces im 4x6-Molekül.....	118
4.8.1.	2x6-2x6-Interfaces (Interdodekamer-Interfaces).....	118
4.8.2.	1x6-1x6-Interfaces (Intradodekamer-Interfaces).....	121
5.	Konklusion.....	123
E.	Anhang.....	125
1.	Zusammenfassung.....	125
2.	Publikationen	126
3.	127
F.	Verzeichnisse	130
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	130
2.	Abbildungsverzeichnis	131
3.	Tabellenverzeichnis	133
4.	Inhaltsverzeichnis	134
5.	Literaturverzeichnis	136

5. Literaturverzeichnis

- Adrian M, Dubochet J, Lepault J, McDowell AW. **1984**. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308(5954):32-36.
- Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJB. **1978**. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *Arch Biochem Biophys* 185(2):584-591.
- Bijlholt MM, van Heel MG, van Bruggen EF. **1982**. Comparison of 4 X 6-meric hemocyanins from three different arthropods using computer alignment and correspondence analysis. *J Mol Biol* 161(1):139-153.
- Boisset N, Penczek P, Taveau JC, Lamy J, Frank J. **1995**. Three-dimensional reconstruction of *Androctonus australis* Hemocyanin labeled with a monoclonal *Fab* fragment. *J Struct Biol* 115(1):16-29.
- Boisset N, Taveau JC, Lamy J, Wagenknecht T, Radermacher M, Frank J. **1990**. Three-dimensional reconstruction of native *Androctonus australis* Hemocyanin. *J Mol Biol* 216(3):743-760.
- Brenowitz M, Bonaventura C, Bonaventura J. **1984**. Self-association and oxygen-binding characteristics of the isolated subunits of *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Arch Biochem Biophys* 230(1):238-249.
- Brigham EO. **1995**. Schnelle Fourier-Transformation. R. Oldenbourg Verlag, Muenchen.
- Bronw JM, Powers L, Kincaid B, Larrabee JA, Spiro TG. **1980**. Structural studies of the Hemocyanin active site. I. Extended X-ray absorption fine-structure (EXAFS) analysis. *J Am Chem Soc* 102:4210-4216.
- Burmester T. **1999**. Evolution and function of the insect hexamerins. *Eur J Entomol* 96(3):213-225.
- Burmester T. **2001**. Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol Biol Evol* 18(2):184-195.
- Burmester T. **2002**. Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol [B]* 172:95-117.
- Burmester T, Massey HC, Zakharkin SO, Benes H. **1998**. The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects. *J Mol Evol* 47(1):93-108.
- Burmester T, Scheller K. **1996**. Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J Mol Evol* 42(6):713-728.
- Busselen P. **1970**. The electrophoretic heterogeneity of *Carcinus maenas* hemocyanin. *Arch Biochem Biophys* 137(2):415-420.
- Chacon P, Wriggers W. **2002**. Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J Mol Biol* 317(3):375-384.

- Crowther RA, DeRosier DJ, Klug A. **1970**. The reconstruction of a three dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. Proc Roy Soc A(317):319-340.
- Cuff ME, Miller KI, van Holde KE, Hendrickson WA. **1998**. Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. J Mol Biol 278(4):855-870.
- de Haas F, Bijlholt M, van Bruggen EF. **1991**. An electron microscopic study of two-hexameric hemocyanins from the crab *Cancer pagurus* and the tarantula *Eurypelma californicum*. Determination of their quaternary structure using image processing and simulation models based on X-ray diffraction data. J Struct Biol 107:86-94.
- de Haas F, Kuchumov A, Taveau JC, Boisset N, Vinogradov SN, Lamy JN. **1997a**. Three-dimensional reconstruction of native and reassembled Lumbricus terrestris extracellular hemoglobin. Localization of the monomeric globin chains. Biochemistry 36(24):7330-7338.
- de Haas F, Kuchumov A, Taveau JC, Boisset N, Vinogradov SN, Lamy JN. **1997b**. Three-dimensional reconstruction of native and reassembled Lumbricus terrestris extracellular hemoglobin. Localization of the monomeric globin chains. Biochemistry 36(24):7330-7338.
- de Haas F, van Breemen JF, Boekema EJ, Keegstra W, van Bruggen EF. **1993**. Comparative electron microscopy and image analysis of oxy- and deoxy-hemocyanin from the spiny lobster *Panulirus interruptus*. Ultramicroscopy, ULTRAMICROSCOPY 49(1-4):426-435.
- de Haas F, Vanbruggen EFJ. **1994**. The Interhexameric Contacts in the Four-Hexameric Hemocyanin from the Tarantula Eurypelma-californicum - a Tentative Mechanism for Cooperative Behavior. J Mol Biol 237(4):464-478.
- 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 H, Markl J, Loewe R, Linzen B. **1979**. Hemocyanins in spiders, VIII. Oxygen affinity of the individual subunits isolated from Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie 360(10):1505-1507.
- Decker H, Sterner R. **1990**. Hierarchy in the structure and function of oxygen-binding proteins. Naturwissenschaften 77(12):561-568.
- Decker H, Terwilliger N. **2000**. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. J Exp Biol 203(12):1777-1782.
- Depledge MN, Bjerregaard P. **1989**. Haemolymph protein composition and copper levels in decapod crustaceans. Helgoland Wiss Meeresunters 43:207-223.
- Dolashka-Angelova P, Dolashki A, Stevanovic S, Hristova R, Atanasov B, Nikolov P, Voelter W. **2005**. Structure and stability of arthropodan hemocyanin *Limulus polyphemus*. Spectrosc Acta Pt A-Molec Biomolec Spectr 61(6):1207-1217.

- Dubochet J, Adrian M, Chang J-J, Homo de J-C, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. **1988**. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Review of Biophysics* 21(2):129-228.
- Dubochet J, Chang JJ, Freeman R. **1982**. Frozen aqueous suspensions. *Ultramicroscopy, ULTRAMICROSCOPY* 10(1-2):55-62.
- Durstewitz G, Terwilliger NB. **1997**. cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean *Cancer magister* and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family. *Mol Biol Evol* 14(3):266-276.
- Eins S, Stiller KJ. **1995**. Automatische Bildanalyse. Robeneck H, editor.: CIT Verlage, Darmstadt.
- Erker W. **2001**. Zur Kooperativität des Vogelspinnen-Hämocyanins: Untersuchungen am Ensemble und an Einzel-Molekülen [Dissertation].
- Fahrenbach WH. **1970**. The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*. *J Cell Biol* 44:445-453.
- Freedman TB, Loehr JS, Loehr TM. **1976**. A resonance Raman study of the copper protein, hemocyanin. New evidence for the structure of the oxygen-binding site. *J Am Chem Soc*:2809-2815.
- Gaykema WP, Hol WG, Vereijken JM, Soeter NM, Bak HJ, Beintema JJ. **1984**. 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Nature* 309(3):23-29.
- Ghiretti F. **1968**. Physiology and Biochemistry of Hemocyanins. London and New York: Academic Press.
- Hagerman L. **1983**. Haemocyanin concentration of juvenile lobster (*Homarus gammarus*) in relation to moulting cycle and feeding condition. *Mar Biol* 77:11-19.
- Hagner-Holler S, Schoen A, Erker W, Marden JH, Rupprecht R, Decker H, Burmester T. **2004**. A respiratory hemocyanin from an insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(3):871-874.
- Harauz G, Ottensmeyer FP. **1984**. Direct three-dimensional reconstruction for macromolecular complexes from electron micrographs. *Ultramicroscopy, ULTRAMICROSCOPY* 12:309-319.
- Harauz G, van Heel M. **1986**. Exact filters for general geometry three-dimensional reconstruction. *Optik* 73:146-156.
- Harauz G, van Heel M. Direct 3D reconstruction from projections with initially unknown angles. In *Pattern Recognition in Practice II*. In: Publishing AN-H, editor; 1986a. p 279-288.
- Harris JR. **1997**. Negative staining and cryoelectron microscopy. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Harris JR, Adrian M. Preparation of Thin-Film Frozen-Hydrated/Vitrified Biological Specimens for Cryoelectron Microscopy. *Methods in Molecular Biology* 117.

- Harris JR, Meissner U, Gebauer W, Markl J. **2004**. 3D reconstruction of the hemocyanin subunit dimer from the chiton *Acanthochiton fascicularis*. *Micron, MICRON* 35(1-2):23-26.
- Hartmann H, Decker H. **2002**. All hierarchical levels are involved in conformational transitions of the 4 x 6-meric tarantula hemocyanin upon oxygenation. *Bba-Proteins Proteom* 1601(2):132-137.
- Hartmann H, Lohkamp B, Hellmann N, Decker H. **2001**. The allosteric effector L-lactate induces a conformational change of 2x6-meric lobster hemocyanin in the oxy state as revealed by small angle x-ray scattering. *J Biol Chem* 276(23):19954-19958.
- Hazes B. **1993**. X-ray crystallographic studies on structure and function of hemocyanins. [Doctoral Thesis]. Groningen, The Netherlands: University of Groningen.
- Hazes B, Magnus KA, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kalk KH, Hol WG. **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.
- Hazes B, Magnus KA, Kalk KH, Bonaventura C, Hol WGJ. **1996**. Nitrate binding to *Limulus polyphemus* subunit type II hemocyanin and its functional implications. *J Mol Biol* 262(4):532-542.
- Huber M, Lerch K. **1986**. Active-site and protein structure of tyrosinase: comparison to hemocyanin. In: Linzen B, editor. *Invertebrate Oxygen Carriers*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. p 265-276.
- Jaenicke E, Decker H. **2004**. Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. *Chembiochem* 5(2):163-169.
- Johansen K, Petersen JA. **1975**. In *Eco-physiology of Estuarine Organisms*. Vernberg FJ, editor.: University of South Carolina Press, Columbia. 129-145 p.
- Johnson BA, Bonaventura J, Bonaventura C. **1987**. Determination of L-lactate binding stoichiometry and differences in allosteric interactions of structurally distinct homohexamers from *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Biophys Biochem A* 916(3):376-380.
- Jolles J, Jolle's P, Lamy J, Lamy J. **1979**. Structural characterization of seven different subunits in *Androctonus australis* haemocyanin. *FEBS Lett* 106(2):289-291.
- Kantrowitz ER, Lipscomb WN. **1990**. *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: The molecular basis for a concerted allosteric transition. *Trends BiochemSci, TRENDS BIO-CHEM SCI* 15(2):53-59.
- Kempton B. **1983**. Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*. *Naturwissenschaften* 70:255-256.
- Kempton B, Markl J, Brenowitz M, Bonaventura C, Bonaventura J. **1985**. Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits. II. Xiphosuran (*Limulus*) and spider (*Eurypelma*, *Cupiennius*) hemocyanin. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 366(1):77-86.

-
- Kusche K, Burmester T. **2001**. Diplopod hemocyanin sequence and the phylogenetic position of the Myriapoda. *Mol Biol Evol* 18(8):1566-1573.
- Kusche K, Hembach A, Hagner-Holler S, Gebauer W, Burmester T. **2003**. Complete subunit sequences, structure and evolution of the 6 x 6-mer hemocyanin from the common house centipede, *Scutigera coleoptrata*. *Eur J Biochem* 270(13):2860-2868.
- Kusche K, Ruhberg H, Burmester T. **2002**. A hemocyanin from the Onychophora and the emergence of respiratory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16):10545-10548.
- Lamy J, Compin S, Lamy JN. **1983**. Immunological correlates between multiple isolated subunits of *Androctonus australis* and *Limulus polyphemus* hemocyanins: an evolutionary approach. *Arch Biochem Biophys* 223(2):584-603.
- Lamy J, Gielens C, Lambert O, Taveau JC, Motta G, Loncke P, De Geest N, Preaux G, Lamy J. **1993**. Further approaches to the quaternary structure of *Octopus* hemocyanin: a model based on immunoelectron microscopy and image processing. *Arch Biochem Biophys* 305:17-29.
- Lamy J, Kuchumov A, Taveau JC, Vinogradov SN, Lamy JN. **2000**. Reassembly of *Lumbricus terrestris* hemoglobin: A study by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and 3D reconstruction from frozen-hydrated specimens. *J Mol Biol* 298(4):633-647.
- Lamy J, Lamy J, Bonaventura J, Bonaventura C. **1980a**. Structure, function, and assembly in the hemocyanin system of the scorpion, *Androctonus australis*. *Biochemistry* 19(13):3033-3039.
- Lamy J, Lamy J, Leclerc M. **1980b**. Intramolecular location of the subunits of *Androctonus australis* hemocyanin. *FEBS Lett* 112(1):45-47.
- Lamy J, Lamy J, Weill J, Bonaventura J, Bonaventura C, Brenowitz M. **1979**. Immunological correlates between the multiple hemocyanin subunits of *Limulus polyphemus* and *Techypleus tridentatus*. *Arch Biochem Biophys* 196(2):324-339.
- Lamy J, Richard M, Goyffon M. **1970**. Modifications of polyacrylamide gel electrophoregrams of hemolymph proteins of scorpions *Androctonus australis* (L.) and *Androctonus mauretanicus* (Pocock) induced by freezing. Sur les modifications des e?lectrophore?grammes en gel de polyacrylamide des prote?ines de l'he?molymphe des Scorpions *Androctonus australis* (L) et *Androctonus mauretanicus* (Pocock), provoque?es par la conge?lation 270(12):1627-1630.
- Lamy J, Sizaret PY, Frank J, Verschoor A, Feldmann R, Bonaventura J. **1982**. Architecture of *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Biochemistry* 21(26):6825-6833.
- Lamy JN, Green BN, Toulmond A, Wall JS, Weber RE, Vinogradov SN. **1996**. Giant hexagonal bilayer hemoglobins. *Chem Rev* 96(8):3113-3124.
- Leidescher T, Decker H. **1990**. Conformational changes of tarantula (*Eurypelma californicum*) hemocyanin detected with a fluorescent probe, 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Eur J Biochem* 187(3):617-625.

- Linzen B, Soeter NM, Riggs AF, Schneider HJ, Schartau W, Moore MD, Yokota E, Behrens PQ, Nakashima H, Takagi T. **1985**. The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229(4713):519-524.
- Loewe R. **1978**. Hemocyanins in spiders, V. Fluorometric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. *J Comp Physiol B* 128:161-168.
- Magnus KA, Hazes B, Ton That H, Bonaventura C, Bonaventura J, Hol WG. **1994**. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins* 19(4):302-309.
- Makino N. **1988**. Subunits of *Panulirus japonicus* hemocyanin. 2. Cooperativity of the homogeneous hexamers. *Eur J Biochem* 173(2):431-435.
- Makino N, Kimura S. **1988**. Subunits of *Panulirus japonicus* hemocyanin. 1. Isolation and properties. *Eur J Biochem* 173(2):423-430.
- Mangum CP. **1985**. Oxygen transport in invertebrates. *The American journal of physiology* 248(5 Pt 2).
- Markl J. **1986a**. Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol Bull* 171:90-115.
- Markl J. **1986b**. Evolution and Function of Structurally diverse Subunits in the Respiratory Protein Hemocyanin from Arthropods. *Biol Bull* 171:90-115.
- Markl J. **1995** Blaues Blut - Struktur, Funktion und Evolution der Hämocyanine. *Forschungsmagazin Uni Mainz*.
- Markl J. **1996**. Blue blood - Structure, function and evolution of hemocyanines. *Chem Unserer Zeit* 30(1):6-18.
- Markl J, Bonaventura C, Bonaventura J. **1981a**. Hemocyanins in spiders, XIII. Kinetics of oxygen dissociation from individual subunits of *Eurypelma* and *Cupiennius* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 362(4):429-437.
- Markl J, Burmester T, Decker H, Savel Niemann A, Harris JR, Suling M, Naumann U, Scheller K. **1992**. Quaternary and subunit structure of *Calliphora arylphorin* as deduced from electron microscopy, electrophoresis, and sequence similarities with arthropod hemocyanin. *J Comp Physiol [B]* 162(8):665-680.
- Markl J, Decker H. **1992**. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In: Mangum CP, editor. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Berlin: Springer Verlag, p 325-376.
- Markl J, Decker H, Linzen B, Schutter WG, von Bruggen EF. **1982**. Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the assembly of *Eurypelma* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 363(1):73-87.
- Markl J, Decker H, Stocker W, Savel A, Linzen B, Schutter WG, van Bruggen EF. **1981b**. On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362(2):185-188.

- Markl J, Gebauer W, Runzler R, Avissar I. **1984**. Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits. I. Scorpion (*Leiurus*, *Androctonus*) and spider (*Eurypelma*, *Cupiennius*) hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 365(6):619-631.
- Markl J, Kempter B, Linzen B, Bijlholt MM, van Bruggen EF. **1981c**. Hemocyanins in spiders, XVI[1]. Subunit topography and a model of the quaternary structure of *Eurypelma* hemocyanin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 362(12):1631-1641.
- Markl J, Savel A, Linzen B. **1981d**. 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.
- Markl J, Stumpff S, Bosch FX, Voit R. **1990**. Hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Eurypelma californicum*, studied by in situ hybridization and immuno-electron microscopy. Preaux G, Lontie R, editors.: Leuven Univ Press, Leuven. 497-502 p.
- Martin AG, Depoix F, Stohr M, Meissner U, Hagner-Holler S, Hammouti K, Burmester T, Heyd J, Wriggers W, Markl J. **2007**. *Limulus polyphemus* Hemocyanin: 10 Å cryo-EM Structure, Sequence Analysis, Molecular Modelling and Rigid-body Fitting Reveal the Interfaces Between the Eight Hexamers. *J Mol Biol* 366:1332-1350.
- Meissner U. **1998**. Computergestützte 3D-Rekonstruktion (25 Å) der Quartärstruktur des Mollusken-Hämocyanins KLH2 aus EM-Bildern.
- Meissner U. **2000**. Kryoelektronenmikroskopie von Proteinen: 3D-Struktur (12 Å) des Hämocyanins der Schnecke *Haliothis*.
- Meissner U, Dube P, Harris JR, Stark H, Markl J. **2000**. Structure of a molluscan hemocyanin didecamer (HtH1 from *Haliothis tuberculata*) at 12 Å resolution by cryoelectron microscopy. *J Mol Biol* 298(1):21-34.
- Meissner U, Gatsogiannis C, Moeller A, Depoix F, Harris JR, Markl J. **2007**. Comparative 11 Å structure of two molluscan hemocyanins from 3D cryo-electron microscopy. *Micron, MICRON* in press.
- Meissner U, Martin AG, Schwarz BO, Stohr M, Gebauer W, Harris JR, Markl J. **2004**. 3-D reconstruction of hemocyanins and other invertebrate hemolymph proteins by cryo-TEM: an overview. *Micron, MICRON* 35(1-2):7-9.
- Meissner U, Stohr M, Kusche K, Burmester T, Stark H, Harris JR, Orlova EV, Markl J. **2003**. Quaternary structure of the European spiny lobster (*Palinurus elephas*) 1 x 6-mer hemocyanin from cryoEM and amino acid sequence data. *J Mol Biol* 325(1):99-109.
- Mousseron-Grall S, KejzlarovaLepesant J, Burmester T, Chihara C, Barray M, Delain E, Pictet R, Lepesant JA. **1997**. Sequence, structure and evolution of the ecdysone-inducible *Lsp-2* gene of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* 245(1):191-198.
- Murray AC, Jeffrey PD. **1974**. Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Subunit heterogeneity. *Biochemistry* 13(18):3667-3671.

- Orlova EV. **2000**. Structural analysis of non-crystalline macromolecules: the ribosome. *Acta Crystallogr D* 56(10):1253-1258.
- Orlova EV, Dube P, Beckmann E, Zemlin F, Lurz R, Trautner TA, Tavares P, van Heel M. **1999**. Structure of the 13-fold symmetric portal protein of bacteriophage SPP1. *Nat Struct Biol, NATURE STRUCT BIOLOGY* 6(9):842-846.
- Orlova EV, Dube P, Harris JR, 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.
- Orlova EV, Rahman MA, Gowen B, Volynski KE, Ashton AC, Manser C, van Heel M, Ushkaryov YA. **2000**. Structure of alpha-latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores. *Nat Struct Biol* 7(1):48-53.
- Perbandt M, Guthoßhrlein EW, Rypniewski W, Idakieva K, Stoeva S, Voelter W, Genov N, Betzel C. **2003**. The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 42(21):6341-6346.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. **2004**. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13):1605-1612.
- Ramachandran GN, Lakshminarayanan AV. **1971**. Three-dimensional reconstruction from radiographs and electron micrographs application of convolutions instead of Fourier transforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2236-2240.
- Saad A, Ludtke SJ, Jakana J, Rixon FJ, Tsuruta H, Chiu W. **2001**. Fourier amplitude decay of electron cryomicroscopic images of single particles and effects on structure determination. *J Struct Biol, J STRUCT BIOL* 133(1):32-42.
- Savel-Niemann A, Markl J, Linzen B. **1988**. Hemocyanins in spiders XXII. Range of allosteric interaction in a four-hexamer hemocyanin. Cooperativity and Bohr effect in dissociation intermediates. *J Mol Biol* 204(2):385-395.
- Schartau W, Eyerle F, Reisinger P, Geisert H, Storz H, Linzen B. **1983**. Hemocyanins in spiders, XIX. Complete amino-acid sequence of subunit d from *Eurypelma californicum* hemocyanin, and comparison to chain e. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 364(10):1383-1409.
- Schartau W, Metzger W, Sonner P, Geisert H, Storz H. **1990**. Hemocyanins in spiders, XXIII. Complete amino-acid sequence of subunit a of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 371(7):557-565.
- Schatz M. **1992**. Invariante Klassifizierung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von eiseingebetteten biologischen Makromolekülen. Egelsbach, Köln, New York: Verlag Hänsel-Hohenhauser. 9 - 37 p.
- Schneider HJ, Drexel R, Feldmaier G, Linzen B, Lottspeich F, Henschen A. **1983**. Hemocyanins in Spiders, XVIII. Complete amino-acid sequence of subunit e from *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364(10):1357-1381.

- Senozan NM, Briggs M. **1989**. Hemocyanin levels in the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*, from the coast of California. *Comp Biochem Physiol* 94 A:195-199.
- Soeter NM, Jekel PA, Beintema JJ, Volbeda A, Hol WG. **1987**. Primary and tertiary structures of the first domain of Panulirus interruptus hemocyanin and comparison of arthropod hemocyanins. *Eur J Biochem* 169(2):323-332.
- Sternier R, Decker H. **1994**. Inversion of the Bohr effect upon oxygen binding to 24-meric tarantula hemocyanin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11):4835-4839.
- Stöcker W, Raeder U, Bijlholt M, Wichertjes T, van Bruggen EF, Markl J. **1988**. The quarternary structure of four crustacean two-hexameric hemocyanins: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits. *J Comp Physiol B* 158:271-289.
- Stohr M. **2001**. 3D-Rekonstruktion des Hämocyanin-Hexamers der Languste *Palinurus elephas* aus elektronenmikroskopischen Bildern.
- Sullivan B, Bonaventura J, Bonaventura C. **1974**. Functional differences in the multiple hemocyanins of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71(6):2558-2562.
- Taveau JC, Boisset N, Lamy J, Lambert O, Lamy JN. **1997**. Three-dimensional reconstruction of *Limulus polyphemus* hemocyanin from cryoelectron microscopy. *J Mol Biol* 266(5):1002-1015.
- Taveau JC, Boisset N, Vinogradov SN, Lamy JN. **1999**. Three-dimensional reconstruction of Lumbricus terrestris hemoglobin at 22 angstrom resolution: Intramolecular localization of the globin and linker chains. *J Mol Biol* 289(5):1343-1359.
- Telfer WH, Kunkel JG. **1991**. The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 36:205-228.
- van Heel M. **1987**. Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D-reconstruction. *Ultramicroscopy, ULTRAMICROSCOPY* 21:111-124.
- van Heel M, Dube P. **1994**. Quaternary structure of multihexameric arthropod hemocyanins. *Micron, MICRON* 25(4):387-418.
- van Heel M, Frank J. **1981**. Use of Multivariate Statistics in Analysing the Images of Biological Macromolecules. *Ultramicroscopy, ULTRAMICROSCOPY* 6:187-194.
- van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova EV, Finn R, Pape T, Cohen D, Stark H, Schmidt R, Schatz M, Patwardhan A. **2000**. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Q Rev Biophys* 33(4):307-369.
- van Heel M, Orlova A, Harauz G, Stark H, Dube P, Zemlin F, Schatz M. Angular reconstruction in 3D electron microscopy: Historical and theoretical aspects.
- van Heel M, Schatz M. **2005**. Fourier shell correlation threshold criteria. *J Struct Biol, J STRUCT BIOL* 151(3):250-262.
- van Heel M, Schatz M, Orlova E. **1992a**. Correlation functions revisited. *Ultramicroscopy, ULTRAMICROSCOPY* 46(1-4):307-316.

- van Heel M, Winkler H, Orlova E, Schatz M. **1992b**. Structure analysis of ice-embedded single particles. *Scanning Microsc Suppl* 6:23-42.
- van Holde KE, Miller KI. **1995**. Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry*, Vol 47. San Diego: Academic Press Inc. p 1-81.
- van Holde KE, Miller KI, Decker H. **2001**. Hemocyanins and invertebrate evolution. *J Biol Chem* 276(19):15563-15566.
- van Holde KE, Miller KI. **1982**. Haemocyanins. *Q Rev Biophys* 15:1-129.
- Voit R, Feldmaier-Fuchs G. **1990**. Arthropod hemocyanins. Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding that tarantula hemocyanin subunits a and e. *J Biol Chem* 265(32):19447-19452.
- 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.
- Voit R, Schneider HJ. **1986**. Tarantula hemocyanin mRNA. In vitro translation, cDNA cloning and nucleotide sequence corresponding to subunit e. *Eur J Biochem* 159(1):23-29.
- Volbeda A, Feiters MC, Vincent MG, Bouwman E, Dobson B, Kalk KH, Reedijk J, Hol WG. **1989**. Spectroscopic investigations of *Panulirus interruptus* hemocyanin in the crystalline state. *Eur J Biochem* 181(3):669-673.
- Volbeda A, Hol WG. **1989**. Crystal structure of hexameric hemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J Mol Biol* 209(2):249-279.
- Voll W, Voit R. **1990**. Characterization of the gene encoding the hemocyanin subunit e from the tarantula *Eurypelma californicum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(14):5312-5316.
- Wriggers W, Milligan RA, McCammon JA. **1999**. Situs: A package for the docking of protein crystal structures to low-resolution maps from electron microscopy. *Biophys J* 76(1):A23-A23.