

Analyse der Molekularstruktur von Arthropoden- Hämocyaninen (2x6-mer, 4x6-mer, 8x6-mer) mit 3D-Elektronenmikroskopie

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Dr. rer. nat.“

an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Martin Haugwitz

Geb. am 27. März 1985 in Koblenz

Mainz, 02. November 2016

Dekan: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag der Prüfung: 08.12.2016

"Eine wirklich gute Idee erkennt man daran,
dass ihre Verwirklichung von vornherein
ausgeschlossen erscheint"

Albert Einstein (1879-1955)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XIII

A. Einleitung.....	1
1. Respiratorische Proteine	1
2. Die Untereinheit des Arthropoden-Hämocyanins.....	2
3. Die Quartärstruktur des Arthropoden-Hämocyanins.....	3
3.1 Das universelle Hexamer (1x6-mer)	3
3.2 Oligo-Hexamere (nx6-mer).....	3
4. Kooperatives Verhalten beim Arthropoden-Hämocyanin.....	5
5. Das 8x6-Hämocyanin des Pfeilschwanzes <i>Limulus polyphemus</i>	5
6. Das 4x6-Hämocyanin des Maulwurfkrebses <i>Callinassa truncata</i>	9
7. Das 2x6-Hämocyanin der Meeresassel <i>Ligia oceanica</i>	12
8. 3D-Elektronenmikroskopie von Proteinen	13
9. Fragestellungen.....	14

B. Material & Methoden.....	16
1. Tiere	16
1.1 Der Pfeilschwanzkrebs <i>Limulus polyphemus</i>	16
1.2 Der Maulwurfskrebs <i>Callinassa truncata</i>	17
1.3 Die Meeresassel <i>Ligia oceanica</i>	18
2. Biochemische Methoden	19
2.1 Entnahme der Hämolymphe & Aufreinigung des Hämocyanins	19
2.2 Probenpräparation der EM-Grids.....	20
3. Transmissionselektronenmikroskopie.....	23
3.1 Grundlagen.....	23
3.2 Verwendete Elektronenmikroskope	25
3.3 Direkte Elektronendetektion	27
4. HPCs/Cluster/Computer	29
4.1 Hardware.....	29
5. Software.....	31
5.1 RELION (Version 1.3).....	32
5.2 ctffind3	32
5.3 EMAN (Version 1.9)	32

5.4 EMAN2 (Version 2.0.6)	33
5.5 Resmap (Version 1.1.4)	33
5.6 DireX (Version 0.61)	33
5.7 GROMACS (Version 5.0.5)	33
5.8 IMAGIC-5	34
5.9 Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.2).....	34
5.10 UCSF CHIMERA (Version 1.10.2).....	34
5.11 EM-Menu.....	34
6 Digitale Bildverarbeitung/Einzelpartikelanalyse	35
6.1 Überprüfung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen	35
6.2 Bestimmung der Defokus-Werte.....	38
6.3 Selektion der Einzelpartikel	39
6.4 Extraktion der Einzelpartikel.....	41
6.5 Bildverarbeitende Methoden	41
7. Einpassen atomarer Modelle	51
7.1 Starres Einpassen atomarer Modelle in die 3D-Rekonstruktion (rigid body fitting) .	51
7.2 Flexibles Einpassen der atomaren Modelle in die 3D-Rekonstruktion (flexible fitting)	51
8. Molekulardynamische Simulationen mit GROMACS.....	52
9. Funktionsweise von RELION	54

C. Ergebnisse	56
1. 3D-EM des Hämocyanins von <i>L. polyphemus</i>	56
1.1 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers von <i>L. polyphemus</i> mit RELION.....	56
1.2 Einpassen der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten in die 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers	62
1.3 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers von <i>L. polyphemus</i> mit RELION.....	64
1.4 Einpassen der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten in die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers	68
1.5 Vergleich der Inter-Hexamer-Interfaces des oxy- und deoxy-8x6mers.....	69
1.6 Molekulardynamische Simulationen von Kontaktstellen zwischen Hexameren mit GROMACS.....	69
2. 3D-EM des Hämocyanins von <i>C. truncata</i>	74
2.1 3D-Rekonstruktion des 4x6-meren Hämocyanins von <i>C. truncata</i>	74
2.2 3D-Rekonstruktion des Halbmoleküls (2x6-mer) des Hämocyanins von <i>C. truncata</i>	78
2.3 Einpassen (<i>fitting</i>) der pseudoatomaren Modelle in die 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers von <i>C. truncata</i>	79
2.4 Die Interfaces zwischen den einzelnen Hexameren des 4x6-mers von <i>C. truncata</i>	80
3. 3D-EM des Hämocyanins von <i>L. oceanica</i>	102
3.1 3D-Rekonstruktion des 2x6-meren Hämocyanins von <i>L. oceanica</i>	102

D. Diskussion	106
1. Diskussion zu den erreichten Auflösungen.....	106
2. Vergleich des oxy- und deoxy-8x6-mers von <i>L. polyphemus</i>	109
2.1 Vergleich der 7,3 Å-deoxy-Struktur und der 7,9 Å-oxy-Struktur des 8x6-mers	109
2.2 Vergleich des 4x6-mers von <i>L. polyphemus</i> mit dem 4x6-mer des Kaiserskorpions <i>P. imperator</i>	114
2.3 Vergleich des oxy- und deoxy-8x6-mers mit der 12 Å-Rekonstruktion von Martin et al. (2007).....	118
2.4 Vergleich eines extrahierten Hexamers im oxy- und deoxy-Zustand	121
2.5 Vergleich der extrahierten Hexamere (1 und 2) aus dem oxy- und deoxy-8x6-mer mit dem kristallografischen Hexamer (1HCY) der Languste <i>P. interruptus</i>	126
2.6 Vergleich auf der Ebene einer Untereinheit (Typ II)	128
3. Vergleichende Analyse der Interfaces zwischen den Hexameren	136
3.1 Interfaces zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers	137
3.2 Interfaces zwischen den beiden 2x6-meren des 4x6-mers	147
3.3 Interfaces zwischen den 4x6-meren des 8x6-mers	158
3.4 Zusammenfassung zum Vergleich der Interfaces	169
3.5 Zusammenfassung zu den MD-Simulationen	173
4. Analyse der 4,9 Å-Struktur des 4x6-mers von <i>C. truncata</i>	175
4.1 Analyse des solitären 2x6-mers als mögliches Halbmolekül des 4x6-mers	175
4.2 Vergleich des Halbmoleküls (2x6-mer) von <i>C. truncata</i> mit dem 2x6-mer von <i>C. maenas</i>	177
4.3 Vergleich eines aus dem 4x6-mer extrahierten Hexamers mit dem kristallografischen Hexamer (1HCY) der Languste <i>P. interruptus</i>	179
4.4 Vergleich der pseudoatomaren Modelle von Untereinheit CtH-1 und CtH-2 aus der 4,9 Å-Rekonstruktion mit einer Untereinheit aus dem kristallografischen Hexamer (1HCY).....	181
5. Analyse der 8,6 Å-Struktur des 2x6-mers von <i>L. oceanica</i>	184
5.1 Vergleich des 2x6-mers von <i>L. oceanica</i> mit einem extrahierten 2x6-mer von <i>C. truncata</i>	184
5.2 Analyse der Kontaktstellen des 2x6-mers von <i>L. oceanica</i>	186
<hr/>	
E. Zusammenfassung	191
<hr/>	
F. Anhang	193
1. Abbildungen zu den MD-Simulationen der Interfaces von <i>C. truncata</i>	193
1.1 MD-Simulationen der Inter-Hexamer-Interfaces des Hämocyanins von <i>C. truncata</i> mit unprotonierten und protonierten Histidinen.....	193
2. Vergleich der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten I, IIIA, IIIB, IV und VI von LpH im oxy- und deoxyenzierten Zustand.	202

Literaturverzeichnis	209
Danksagung	223
Erklärung und Copyright	225
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
bash	Bourne-again shell
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CMOS	complementary metal oxide semiconductor
CP3	Cryoplunger™3
CTF	Kontrast-Transfer-Funktion (contrast transfer function)
CtH	<i>Callianassa truncata</i> Hämocyanin
d.h.	das heißt
DEDD (DDD)	direct electron detection device
DIN	Deutsche Industrie für Normung
DPI	dots per inch
DQE	detective quantum efficiency
EM	Elektronenmikroskopie
3D-EM	3D-Elektronenmikroskopie

etc.	et cetera
FFT	Schnelle Fourier Transformation (fast fourier transform)
GB	Gigabyte
GUI	graphical user interface
Hb	Hämoglobin
Hc	Hämocyanin
JGU	Johannes Gutenberg-Universität
kV	Kilo Volt
LoH	<i>Ligia oceanica</i> Hämocyanin
LpH	<i>Limulus polyphemus</i> Hämocyanin
MB	Megabyte
MD	Molekulardynamik (molecular dyanmics)
Mg²⁺	Magnesiumion
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mM	(milli) Molar
MPI	Max-Planck-Institut
MSA	Multivariate statistische Analyse
Na⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
PC	Personal Computer
PiH	<i>Pandinus imperator</i> Hämocyanin
SAXS	Kleinwinkelstreuung (small-angle X-ray scattering)
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TB	Terabyte
TIFF	Tagged image file format
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren mit verwendetem Farbcode

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

Einheiten

Einheit	Abkürzung	Einheit	Abkürzung
Meter	m	Microgramm	µg
Centimeter	cm	Nanogramm	ng
Millimeter	mm	Kilodalton	kDa
Micrometer	µm	Megadalton	mDa
Nanometer	nm	Minuten	min
Ångstrom	Å	Sekunden	s
Picometer	pm	Microsekunden	ms
Gramm	g	Nanosekunden	ns
Milligramm	mg	Picosekunden	ps

Abbildungsverzeichnis

Abb. A.1: Das aktive Zentrum des Hämocyanins	1
Abb. A.2: Die Untereinheit des Arthropoden-Hämocyanins	2
Abb. A.3: Aufsicht und Seitenansicht der Kristallstruktur des 1x6-mers von <i>P. interruptus</i>	3
Abb. A.4: Darstellung der Quartärstrukturen von verschiedenen Oligomeren	4
Abb. A.5: Ansicht auf das 8x6-mer, 4x6-mer und 2x6mer von LpH.....	6
Abb. A.6: Ansicht auf die Frontseite und Rückseite des 4x6-mers	
mit der bekannten Topologie der Untereinheiten des 8x6mers.....	7
Abb. A.7: Die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6mers von <i>L. polyphemus</i> nach Martin et al., 2007 (EMDB-1304) und Dejung, Dissertation 2014	8
Abb. A.8: Ansicht auf das 4x6-mer von <i>C. truncata</i> (Kühne und Markl, unpubliziert) und das Halbmolekül (4x6-mer) von <i>L. polyphemus</i> (Martin et al., 2007).....	9
Abb. A.9: Mögliche Konstellationen von 2x6-meren, aus denen sich das native Hämocyanin (4x6-mer) von <i>C. truncata</i> aufbauen kann	10
Abb. A.10: A: Eine simulierte 3D-Dichtekarte des 2x6mers, aus dem sich eventuell das 4x6mer von <i>Callinassa truncata</i> zusammensetzt	12
Abb. B.1: Der atlantische Pfeilschwanzkrebs <i>Limulus polyphemus</i>	16
Abb. B.2: Der Maulwurfskrebs <i>Callinassa truncata</i>	17
Abb. B.3: Die Meeresassel <i>Ligia oceanica</i>	18
Abb. B.4: A: Cryoplunger3 mit Atmosphärenkammer	22
Abb. B.5: Tecnai F12 Kryo-TEM, Universität Mainz	24
Abb. B.6: Der Aufbau herkömmlicher CCD-Kameras im Vergleich zum Aufbau der neuartigen Direct-Detector-Kameras.....	28
Abb. B.7: A: EM-Aufnahme mit der DDD Falcon 2	29
Abb. B.8: A: EM-Aufnahme des Hämocyanins von <i>C. truncata</i>	35
Abb. B.9: Kontrast-Transfer-Funktion (CTF).....	37
Abb. B.10: A: Elektronenmikroskop-Parameter zur Bestimmung der CTF	38
Abb. B.11: A: GUI des Moduls e2boxer.py.....	40
Abb. B.12: CTF-Berechnung mit Hilfe der Exceltabelle "CTF-Simulation"	42

Abb. B.13: Aufsummierung von zufällig verrauschten Bildern mit demselben Objekt (<i>Limulus polyphemus</i>).....	43
Abb. B.14: Beispiel einer Auswahl von 2D-Klassen des Hämocyanin-Datensatzes von <i>C. truncata</i>	44
Abb. B.15: Definition der Eulerwinkel in einem Koordinatensystem.....	45
Abb. B.16: A) Die Common Line (rot) der beiden 2D-Projektionen	47
Abb. B.17: Workflow der Vorbereitung des MD-Systems und Durchführung einer MD-Simulation mit GROMACS	53
Abb. C.1: Cryo-EM-Aufnahme des deoxy-8x6mers.....	56
Abb. C.2: Auflösungsbestimmung mit Hilfe der Fourier-Schalen-Korrelation (FSC) der finalen 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers.	58
Abb. C.3: 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6mers von <i>L. polyphemus</i> mit einer Auflösung von 7,3 Å	58
Abb. C.4: Ansicht auf das (A) 8x6-mer, (B) 1x6-mer und (C) 2x6-mer.....	59
Abb. C.5: Ansicht auf die Flop-Seite des 4x6-mers und entlang der x-Achse.....	60
Abb. C.6: Ansicht auf das 8x6mer, das sich aus zwei 4x6meren zusammensetzt	61
Abb. C.7: Beispiel für das starre Einpassen (rigid body fitting) der Homologiemodelle dreier Untereinheiten in ein Hexamer (1x6-mer) des deoxy-8x6-mers	62
Abb. C.8: Starres und flexibles Einpassen des Homologiemodells.....	63
Abb. C.9: Auflösungsbestimmung mit Hilfe der Fourier-Schalen-Korrelation (FSC) der finalen 3D-Rekonstruktion vom selektierten Datensatz des oxy-8x6mers mit dem Auflösungs Wert 2 Å/pix	64
Abb. C.10: 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6mers von <i>L. polyphemus</i> mit einer Auflösung von 7,9 Å	65
Abb. C.11: Ansicht auf das (A) 1x6-mer, (B) 2x6-mer und (C/D) das 4x6-mer der 7,9Å-Struktur des oxy-8x6-mers	66
Abb. C.12: Ansicht auf die 7,9Å-Struktur des oxy-8x6-mers von <i>L. polyphemus</i>	67
Abb. C.13: Anpassung verschiedener Parameter für die finale MD-Simulation	71
Abb. C.14: Selektion der Atome der verschiedenen Aminosäuren	zur Distanzmessung
	73
Abb. C.15: A: Python-Terminal IDLE von Chimera	73
Abb. C.16: Auflösungsbestimmung mit Hilfe der Fourier-Schalen-Korrelation (FSC) der finalen 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers	75
Abb. C.17: Die 4,9Å-Struktur des 4x6-mers von <i>C. truncata</i>	76

Abb. C.18: Verschiedene Ansichten auf das 4x6mer von <i>C. truncata</i>	77
Abb. C.19: A: 2D-Klassen des 2x6mers, die im Datensatz von CtH gefunden wurden + (B) 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers	78
Abb. C.20: Ladungszustände der Aminosäure Histidin.....	81
Abb. C.21: Das Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2 / C_2 \leftrightarrow D_2$)	82
Abb. C.22: Auswertung der Abstände verschiedener Aminosäurepaare	84
Abb. C.23: MD-Auswertung von Interface I (mit protoniertem Histidin)	85
Abb. C.24: Das Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2 / B_2 \leftrightarrow D_2$)	87
Abb. C.25: MD-Auswertung von Interface II (mit unprotoniertem Histidin)	88
Abb. C.26: MD-Auswertung von Interface II (mit protoniertem Histidin)	89
Abb. C.27: Das Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2 / B_2 \leftrightarrow C_2$).....	91
Abb. C.28: Auswertung der MD-Simulationsdaten von Interface III.....	92
Abb. C.29: MD-Simulation von Interface III	93
Abb. C.30: MD-Simulation von Interface III	94
Abb. C.31 Das Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2 / B_2 \leftrightarrow C_1$)	95
Abb. C.32: Auswertung der MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen von Interface IV	96
Abb. C.33: Auswertung der MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen von Interface IV	97
Abb. C.34: Auswertung der MD-Simulation mit protonierten Histidinen von Interface IV	98
Abb. C.35: Das potentielle Interface V ($A_1 \leftrightarrow C_1 / B_1 \leftrightarrow D_1$)	100
Abb. C.36: Detailansicht von Interface V nach der Neumodellierung des flexiblen Loops	101
Abb. C.37: 3D-Rekonstruktionen von LoH nach der achten 3D-Klassifizierung	103
Abb. C.38: Ergebnisse der 3D-EM von LoH	104
Abb. D.1: Vergleich des 2x6mers aus den 3D-Rekonstruktionen des oxy-8x6-mers	109
Abb. D.2: Ansicht der Flop-Seite des 4x6-mers im oxygenierten (blau) und deoxygenierten (hellgrau/transparent) Zustand	111
Abb. D.3: Strukturunterschied des oxy- und deoxy 8x6mers insgesamt und am Beispiel des Interfaces IIIA-III A	112

Abb. D.4: Vergleich der Kontaktstelle zwischen den Untereinheiten des Typs V von <i>L. polyphemus</i> und der Brücke IV zwischen Untereinheit C1 und C1' von <i>P. imperator</i>	117
Abb. D.5: Vergleich der 3D-Rekonstruktionen des LpH	118
Abb. D.6: Vergleich der Überlagerung zwischen den 2x6-meren und dem einzelnen Hexamer der 3D-Rekonstruktionen	120
Abb. D.7: Übereinanderlagerung der pseudoatomaren Modelle des oxy (blau)- und deoxy (grau)-2x6-mers	121
Abb. D.8: Vergleich der pseudoatomaren Modelle von (A) Hexamer 1 und (B) Hexamer 2 im oxy- und deoxy-Zustand	122
Abb. D.9: Vergleich der simulierten 3D-Dichtekarten von (A) Hexamer 1 und (B) Hexamer 2 im oxy- und deoxy-Zustand	123
Abb. D.10: Vergleich eines Dimers im (A) oxy- und (B) deoxy-Zustand	124
Abb. D.11: Veränderung der Quartärstruktur des einzelnen Hexamers beim Wechsel zwischen (A/C) oxy- und (B/D) deoxy-Zustand	125
Abb. D.12: Vergleich der simulierten 3D-Dichtekarten des (A) oxy-Hexamer 1 (blau), (B) deoxy-Hexamer 1 (grau), (C) oxy-Hexamer 2 (hellblau), (D) deoxy-Hexamer 2 (hellgrau) mit der simulierten Dichtekarte des kristallografischen Hexamers 1HCY (rot/transparent).....	127
Abb. D.13: Struktureller Vergleich von Domäne #1 zwischen (A) den pseudo-atomaren Modellen der oxy (blau)- und deoxy (hellgrau)-Untereinheit II und (B) dem pseudoatomaren Modell der oxy-Untereinheit II (blau) und der oxy-Kristallstruktur (lila) von Untereinheit II (1NOL).....	130
Abb. D.14: Struktureller Vergleich des aktiven Zentrums zwischen (A) den pseudoatomaren Modellen der oxy (blau)- und deoxy (hellgrau)-Untereinheit II und (B) dem pseudoatomaren Modell der oxy-Untereinheit II (blau) und der oxy-Kristallstruktur (lila) von Untereinheit II (1NOL).....	131
Abb. D.15: Unterschiedliche Konformationen des aktiven Zentrums der Untereinheit II von LpH	133
Abb. D.16: Ansicht auf das aktive Zentrum einer (A) Untereinheit des kristallografischen Hexamers 1HCY der Languste <i>P.interruptus</i> und die (B) simulierte Dichtekarte der Untereinheit.....	134
Abb. D.17: Positionen der fünf Interfaces und der beteiligten Untereinheitentypen beim 2x6-mer.....	137
Abb. D.18: Seitliche Ansicht auf Interface II-II, das sich zwischen den zwei Hexameren des 2x6-mers ausbildet	139

Abb. D.19: Ansicht auf das II-IV-Interface	140
Abb. D.20: Das IV-VI-Interface.....	141
Abb. D.21: Seitenansicht auf Bereich 1 des V-VI-Interfaces	143
Abb. D.22: Ansicht des II-IV/VI-Interfaces im (A) oxy-2x6-mer und (B) deoxy-2x6-mer	145
Abb. D.23: Positionen der drei Interfaces und den beteiligten Untereinheitentypen im 4x6-mer	147
Abb. D.24: Das V-VI-Interface zwischen den 2x6meren des 4x6mers.....	149
Abb. D.25: Die Position des V-V-Interfaces im (A) oxy-4x6-mer und (B) deoxy-4x6-mer	151
Abb. D.26: Der obere Bereich des VI-III B/IV/V-Interfaces im (A) oxy und (B) deoxy-Zustand.....	152
Abb. D.27: Unterer Bereich des VI-III B/IV/V-Interfaces im (A) oxy- und (B) deoxy-Zustand.....	153
Abb. D.28: MD-Auswertung von Interface VI-III B/IV/V	155
Abb. D.29: MD-Auswertung von Interface VI-III B/IV/V	156
Abb. D.30: MD-Auswertung von Interface VI-III B/IV/V	157
Abb. D.31: Das 8x6-mer von <i>L. polyphemus</i>	158
Abb. D.32: Das IIIA-III A-Interface im (A) oxy- und (B) deoxy-8x6-mer	159
Abb. D.33: Das IIIA-III B-interface im (A) oxy- und (B) deoxy-8x6-mer	161
Abb. D.34: Das Interface II-IV im (A) oxy- und (B) deoxy-8x6-mer	162
Abb. D.35: Strukturelle Unterschiede zwischen dem oxy-IV-IV-Interface (A, C, E) und dem deoxy-IV-IV-Interface (B, D, F).....	164
Abb. D.36: MD-Auswertung von Interface IV-IV	166
Abb. D.37: MD-Auswertung von Interface IV-IV	167
Abb. D.38: MD-Auswertung von Interface IV-IV	168
Abb. D.39: Direkter Vergleich der 3D-Rekonstruktion des solitären 2x6-mers (hellblau/Gitternetz) und des aus der 4,9 Å-Struktur des CtH extrahierten 2x6-mers (orange)	176
Abb. D.40: Vergleich der (A) 3D-Rekonstruktion des solitären 2x6-mers von <i>C. truncata</i> und der (B) 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers der Strandkrabbe <i>C. maenas</i> (Arnold, 2012).....	178

Abb. D.41: Vergleich des (A/C) kristallografischen Hexamers 1HCY von <i>P. interruptus</i> (rot) (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) und des (A/C) pseudoatomaren Modells eines extrahierten Hexamers (hellblau)	180
Abb. D.42: Vergleich der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten (A) CtH-1 und (B) CtH-2 mit einer Untereinheit aus dem kristallografischen Hexamer 1HCY (rot)	182
Abb. D.43: Vergleich der 8,6Å-Struktur des 2x6-mers von <i>L. oceanica</i> mit einem der möglichen Halbmoleküle (2x6-mer) des 4x6-mers von <i>C. truncata</i>	185
Abb. D.44: Mögliche Topologie der beiden Untereinheitentypen LoH-1 (grün) und LoH-1' (orange)	189
Abb. D.45: Hypothetische Entwicklung der 2x6-mer vom (D) Isopoden-Typ und (E) Decapoden-Typ aus einem ursprünglichen 4x6-mer	187
Abb. F.1: Das Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2/C_2 \leftrightarrow D_2$)	194
Abb. F.2: Das Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2/C_2 \leftrightarrow D_2$)	195
Abb. F.3: Das Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$)	196
Abb. F.4: Das Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$)	197
Abb. F.5: Das Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_2$)	198
Abb. F.6: Das Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_2$)	199
Abb. F.7: Das Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$)	200
Abb. F.8: Das Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$)	201
Abb. F.9: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit I im (A/B) deoxygenierten Zustand und (C/D) oxygenierten Zustand	202
Abb. F.10: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit IIIA im (A/B) deoxygenierten Zustand und (C/D) oxygenierten Zustand	203
Abb. F.11: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit IIIB im (A/B) deoxygenierten Zustand und (C/D) oxygenierten Zustand	204
Abb. F.12: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit IV im (A/B) deoxygenierten Zustand und (C/D) oxygenierten Zustand	205
Abb. F.13: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit V im (A/B) deoxygenierten Zustand und (C/D) oxygenierten Zustand	206
Abb. F.14: Blick auf das aktive Zentrum der Untereinheit VI im (A/B) deoxygenierten Zustand und (C/D) oxygenierten Zustand	207

Tabellenverzeichnis

Tab. B.1: Zeitersparnis bei der 3D-Rekonstruktion durch die Benutzung des HPC-Clusters Mogon	30
Tab. B.2: Massiver Geschwindigkeitsvorteil bei der Berechnung der MDs mit dem HPC Cluster MOGON	30
Tab. B.3: Die verwendeten Softwarepakete	31
Tab. C.1: Vergleich der Messwerte der 7,3 Å-Struktur des deoxy-8x6-mers und der 7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers	68
Tab. C.2: Vergleich der auftretenden Wechselwirkungen ausgewählter Aminosäurenpaare die am Interface I beteiligt sind	86
Tab. C.3: Vergleich der auftretenden Wechselwirkungen ausgewählter Aminosäurenpaare die am Interface II beteiligt sind	90
Tab. C.4: Vergleich der möglichen Kontakte zwischen den beteiligten Aminosäuren und Ca ²⁺ -Ionen die am Aufbau von Interface III beteiligt sind	94
Tab. C.5: Vergleich der möglichen Kontakte zwischen den beteiligten Aminosäuren und Ca ²⁺ -Ionen die am Aufbau von Interface IV beteiligt sind	99
Tab. D.1: Fitting der mit 1NOL-Hexameren simulierten 4x6-meren	115
Tab. D.2: Abmessungen der in dieser Arbeit berechneten 3D-Rekonstruktionen des deoxy- und oxy-8x6-mers und der 12 Å-Struktur von Martin et al., (2007)	119
Tab. D.3: Vermessung des deoxy-8x6-mers, oxy-8x6-mers und dem 8x6-mer von Martin et al., (2007)	119
Tab. D.4: Vergleich der Gesamtmaße der pseudoatomaren Modelle der Hexamere 1 und 2 aus der 7,3 Å-deoxy-Struktur und 7,9 Å -oxy-Struktur mit denen des kristallografischen Hexamers 1HCY	126
Tab. D.5: Vergleich der Interfaces innerhalb des 2x6-mer, 4x6-mer und 8x6-mers zwischen dem oxy-8x6-mer, dem deoxy-8x6-mer und den Ergebnissen von Martin et al., 2007	136
Tab. D.6: Auflistung der verschiedenen Interfacetypen und der Anzahl der zugehörigen molekularen Brücken innerhalb des deoxy-8x6-mers, oxy-8x6-mers und oxy-8x6-mers nach Martin et al., (2007)	171

A. Einleitung

1. Respiratorische Proteine

Die meisten Organismen sind aerob und benötigen für ihren Energiestoffwechsel eine ständige Zufuhr an molekularem Sauerstoff (O_2), der in der Atmungskette als finaler Elektronenakzeptor dient (Lindahl, 2008). Bei vielen Tieren wird der Sauerstoff von den respiratorischen Oberflächen Kieme, Lunge oder Haut über ein Kreislaufsystem zu den einzelnen Körpergeweben transportiert. Da sich in Wasser physikalisch vergleichsweise wenig Sauerstoff löst, wird die Sauerstofftransportkapazität des Blutes bzw. der Hämolymphe bei vielen Tieren durch ein respiratorisches Protein ("Sauerstofftransportprotein") signifikant erhöht. Im Verlauf der Evolution haben sich drei grundlegend verschiedene respiratorische Proteine entwickelt: das Eisen-Porphyrin-haltige Hämoglobin, das eisenhaltige Hämerythrin und das kupferhaltige Hämocyanin (Vinogradov, 1985). Hämocyanin geht stammesgeschichtlich auf das O_2 -bindende Enzym Tyrosinase zurück und kommt bei Arthropoden und Mollusken vor (van Holde & Miller 1995; Markl, 2013). Das aktive Zentrum ist bei beiden gleich: zwei Kupferionen werden von sechs Histidinen komplex gebunden (Abb. A.1).

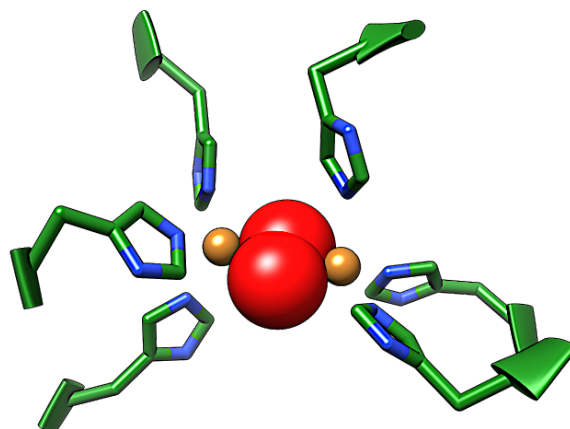


Abb. A.1: Das aktive Zentrum des Hämocyanins. Die beiden Kupferionen (orange) werden von sechs Histidinresten (grün) koordiniert. Die Bindung des Sauerstoffs (rot) erfolgt zwischen den beiden Kupferionen in "side on" Koordination (Magnus et al., 1994; Cuff et al., 1998).

Zudem sind Mollusken- und Arthropodenhämocyanine extrazelluläre Proteine, die jeweils sehr groß und aus vielen Untereinheiten zusammengesetzt sind. Doch in den meisten Strukturdetails unterscheiden sich beide so stark, dass sie wahrscheinlich konvergent aus Tyrosinasen entstanden sind (Markl & Decker, 1992; van Holde & Miller, 2001; Markl, 2013).

In dieser Arbeit habe ich mich ausschließlich mit dem Arthropodenhämocyanin beschäftigt.

2. Die Untereinheit des Arthropoden-Hämocyanins

Das Hämocyanin der Arthropoden basiert auf einer Untereinheit mit einer Molekülmasse von 75 kDa (ca. 650 Aminosäuren) und besteht aus drei strukturellen Domänen (Abb. A.2): die N-terminale Domäne #1 besteht aus ca. 160-185 Aminosäuren und enthält einen hohen Anteil von α -Helices. Domäne #2 besitzt eine hochkonservierte Sequenz mit knapp 230 Aminosäuren und bildet das aktive Zentrum mit der Sauerstoffbindungsstelle. Die C-terminale Domäne #3 besteht aus knapp 260 Aminosäuren, die sieben antiparallele β -Stränge aufbauen (Volbeda & Hol, 1989, Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994). Die Domänen #1 und #3 umgeben Domäne #2 und scheinen so das aktive Zentrum zu stabilisieren.

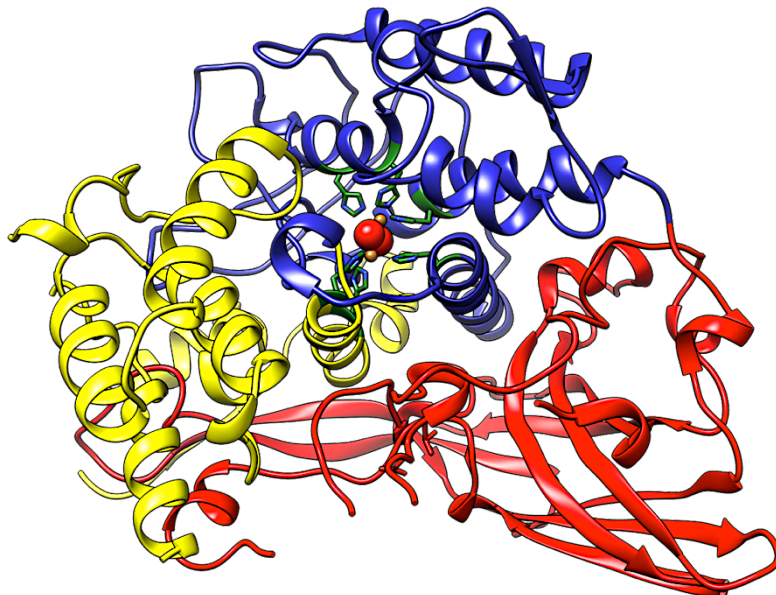


Abb. A.2: Die drei strukturellen Domänen der Untereinheit des Arthropoden-Hämocyanins (pdb: 1NOL) (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994). Domäne #1 (gelb) und Domäne #3 (rot) liegen um das aktive Zentrum (Histidine grün eingefärbt, Sauerstoff rot, Kupferionen orange) zur Sauerstoffbindung von Domäne #2 (blau) und stabilisieren es.

Es sind mittlerweile zahlreiche Sequenzen verfügbar, die zeigen, dass viele Strukturelemente des Hämocyanins bei den verschiedenen Arthropodengruppen hoch konserviert sind (Burmester, 2001 und 2002; Scherbaum et al., 2010; Marxen et al., 2013)

3. Die Quartärstruktur des Arthropoden-Hämocyanins

3.1 Das universelle Hexamer (1x6-mer)

Das Hexamer (1x6-mer) besitzt eine D₃-Symmetrie und setzt sich aus zwei Trimeren zusammen, die übereinander liegen und aufgrund der Symmetrie um 60° gegeneinander verdreht sind (Abb. A.3 A/B) (Volbeda & Hol; 1989).

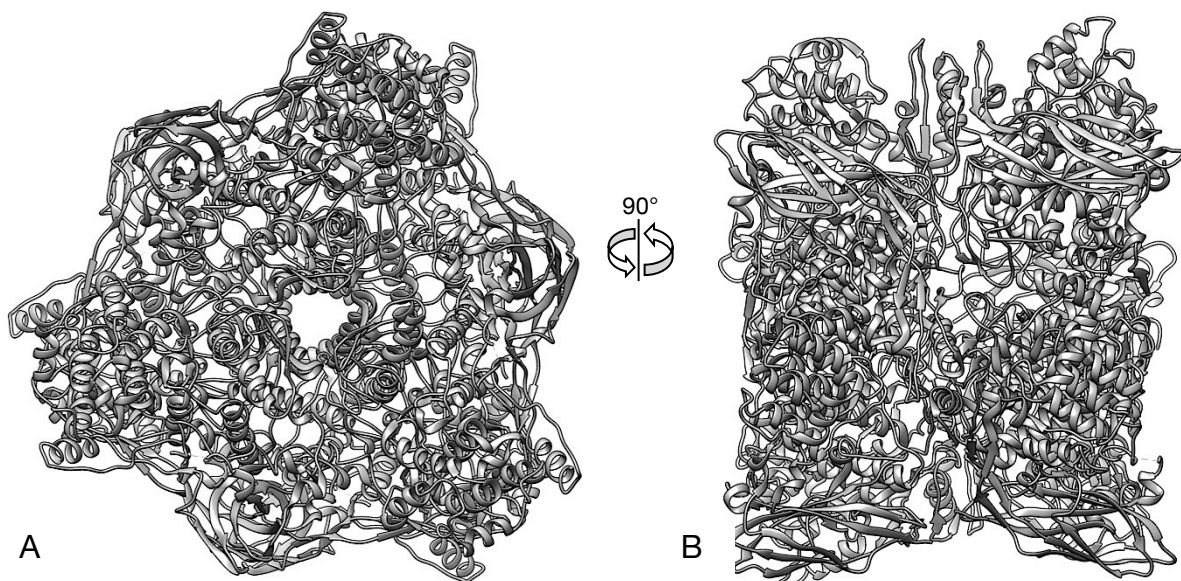


Abb. A.3: (A) Aufsicht und (B) Seitenansicht der Kristallstruktur des 1x6-mers von *P. interruptus* (pdb: 1HCY; Volbeda & Hol., 1989).

3.2 Oligo-Hexamere (nx6-mer)

Bei einigen Arten liegt das Hexamer (1x6-mer) vereinzelt in der Hämolymphe vor, wie zum Beispiel die Languste *P. interruptus* (Abb. A.3 und A.4) (Volbeda & Hol 1989). Bei anderen Arten allerdings treten zwei Hexamere in Kontakt und bilden so ein 2x6-mer aus, wie es die Jagdspinne *C. salei* besitzt (Abb. A.4 C) (Markl, 1980). Das 4x6-mer der Vogelspinne *E. californicum* setzt sich aus zwei antiparallel

angeordneten 2x6-meren zusammen (Abb. A.4 E) (Markl et al., 1981; Markl et al., 1982; Markl & Decker, 1992). Das 8x6-mer von *L. polyphemus* (Abb. A.4 G) wiederum setzt sich aus zwei identischen 4x6-meren zusammen, die gegeneinander verdreht sind (Martin et al., 2007).

Einen besonderen Einfluss auf den Aufbau der Oligohexamere haben die unterschiedlichen Untereinheiten-Typen. Je nachdem welche Untereinheitentypen eine Spezies besitzt, können sich strukturell unterschiedliche Oligohexamere bilden (Markl, 1986; Markl & Decker, 1992). Es ist bekannt, dass bei den Crustaceen hauptsächlich 1x6-mer und 2x6-mer auftreten, während bei den Cheliceraten meist größere Oligohexamere auftreten (2x6-, 4x6-, 6x6-, 8x6-mer) (Markl, 1986; Markl & Decker 1992).

Abbildung A.4 zeigt verschiedene Quartärstrukturen von Oligohexameren.

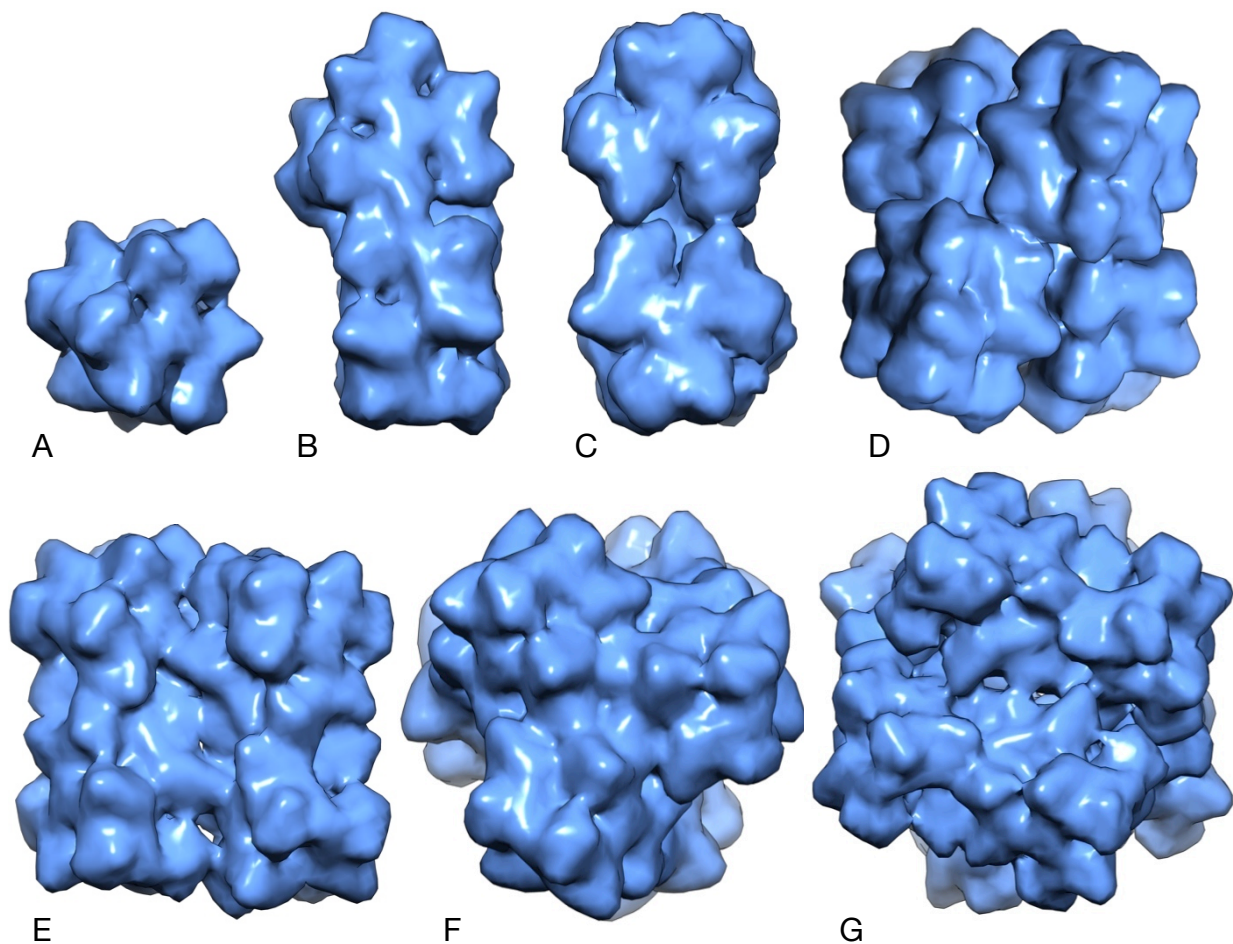


Abb. A.4: Darstellung der Quartärstrukturen von verschiedenen Oligomeren. **A:** Das 1x6-mer das in einigen Crustaceen vorkommt (z.B. *P. interruptus* (Volbeda et al., 1989)). **B:** Das 2x6-Hämocyanin vieler dekapoden Crustaceen (z.B. *C. maenas* (Arnold, 2012)). **C:** Das 2x6-Hämocyanin einiger Arachniden (z.B. *C. salei* (Markl, 1980)). **D:** Das 4x6-Hämocyanin besitzen einige Garnelen (z.B. *C. californiensis* (van Bruggen, 1983; Cavellec et al., 1990)). **E:** Das 4x6-Hämocyanin, das bei Cheliceraten auftritt (z.B. *E. californicum* (Markl et al., 1981; Markl et al., 1982)). **F:** Das 6x6-Hämocyanin der Myriapoden (z.B. *S. coleoprata* (Markl et al., 2009)). **G:** Das 8x6-Hämocyanin der Xiphosuren (z.B. *L. polyphemus* (Taveau et al., 1997; Martin et al., 2007)).

4. Kooperatives Verhalten beim Arthropoden-Hämocyanin

Die Arthropodenhämocyanine zeigen ein komplexes allosterisches Verhalten während der Sauerstoffbindung. Sie besitzen eine relativ niedrige O₂-Affinität, weisen dafür aber eine sehr hohe Kooperativität auf (Loewe, 1978, Decker & Sterner 1990; van Holde & Miller 1995). Im Vergleich dazu weist eine einzelne Untereinheit genau gegensätzliche Eigenschaften auf. Sie ist nicht kooperativ und hat eine hohe O₂-Affinität. Dies zeigt, dass Oligohexamere als Gesamtsystem zusammenarbeiten und so andere Eigenschaften aufweisen als die einzelnen Untereinheiten (Decker et al., 1979; Markl et al., 1981b; Markl, 1986). Die Kooperativität steigt mit der Komplexität des Oligomers (Savel-Niemann et al., 1988).

Dieser Sauerstoffbindungsprozess lässt sich durch eine Erweiterung des klassischen "MWC"-Modells (Monod et al., 1965), dem "nested-MWC"-Modell (Decker et al., 1986, 1988; Molon et al., 2000).

Man geht davon aus, dass die O₂-Bindungseigenschaften von oligomeren Hämocyaninen durch strukturelle Änderungen zwischen den verschiedenen Untereinheiten erreicht werden (Markl & Decker, 1992).

5. Das 8x6-Hämocyanin des Pfeilschwanzes *Limulus polyphemus*

Das Hämocyanin des zu den Cheliceraten gehörenden Pfeilschwanzes *Limulus polyphemus* (LpH) bildet sich aus zwei identischen 4x6-meren, die strukturell dem Hämocyanin der Arachniden sehr ähnlich sind (Abb. A.5 A) (Markl & Decker, 1992). Das 4x6-mer setzt sich wiederum aus zwei identischen 2x6-meren zusammen, die antiparallel und leicht verdreht beieinander liegen (Abb. A.5 B). Das 2x6mer besteht aus leicht verschiedenen 1x6-meren (Abb. A.5 C). Aufgrund der D₂-Symmetrie ist das sich viermal wiederholende 2x6-mer die Grundeinheit der Quartärstruktur von *L. polyphemus* (Bijholt et al., 1979; Lamy et al., 1982; Lamy et al., 1983; van Heel et al., 1994; Taveau et al., 1997; Martin et al., 2007). Insgesamt sind acht 1x6-mere im 8x6-mer von *L. polyphemus* vorhanden, die über 11 verschiedene Kontaktstellen (Interfaces) miteinander verbunden sind (Martin et al., 2007). Die einzelnen Hexamere werden aus sieben verschiedenen Untereinheitentypen gebildet und traditionell mit I, II, IIIA, IIIB, IV, V, VI bezeichnet (Brenowitz et al., 1981; Lamy et al., 1983). Jede dieser Untereinheiten spielt eine spezifische Rolle bei der Assemblierung des Gesamtproteins (Lamy et al., 1983; Markl et al., 1982). Die Stöchiometrie und Topologie der Untereinheiten (Abb. A.6 A/B) innerhalb des 8x6-mers sind bekannt (Lamy et al., 1983). Allerdings ist bei Untereinheit V und VI

nicht klar, wer welche der beiden verfügbaren Positionen besetzt. Von Untereinheit I existiert noch eine als IIA bezeichnete Variante, die aber hier vernachlässigt wird, da die Untereinheit I bzw. IIA beim Kontakt zwischen den acht Hexameren keine Rolle spielt.

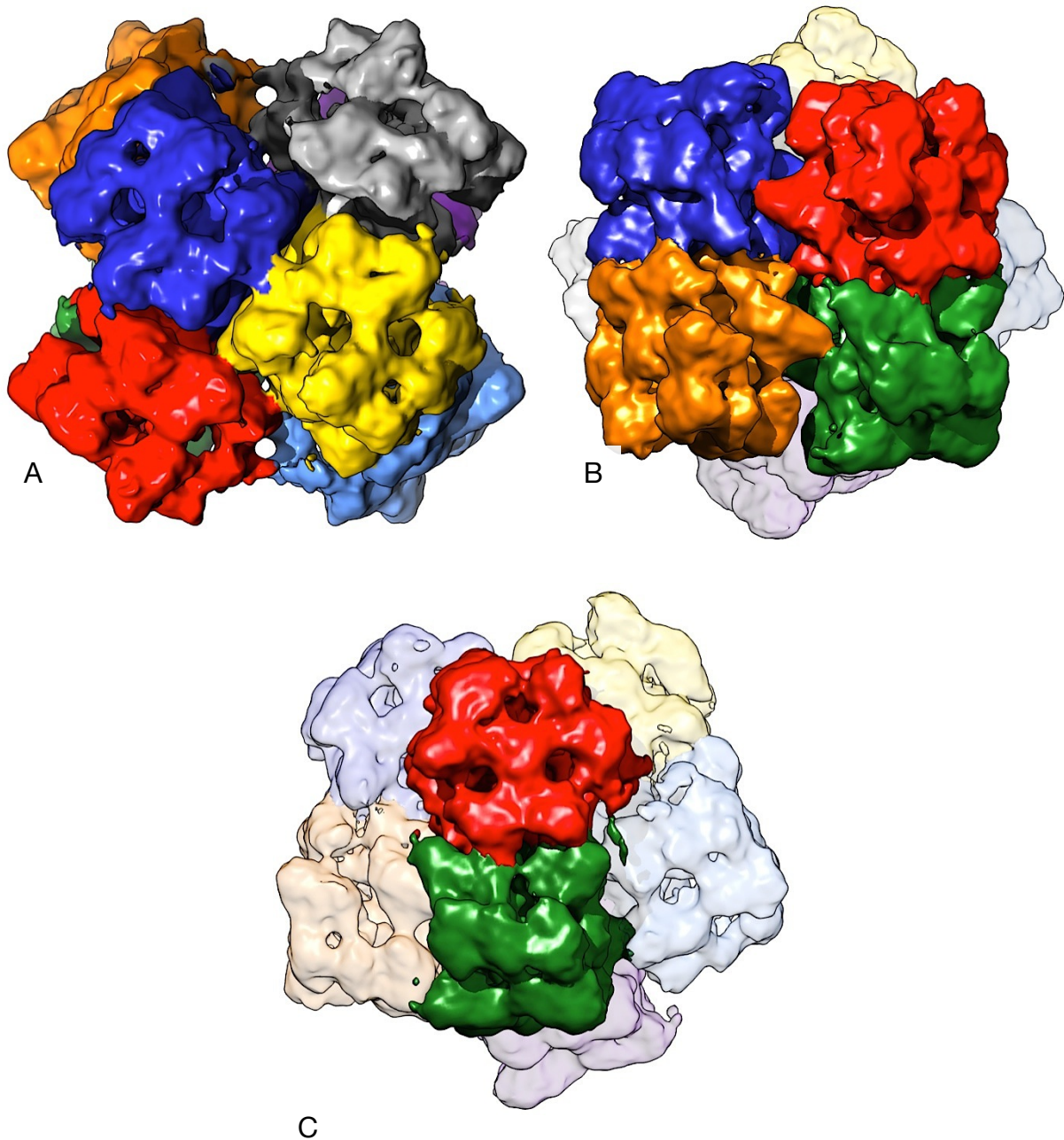


Abb. A.5: Ansicht auf das **(A)** 8x6-mer, **(B)** 4x6-mer und **(C)** 2x6-mer von LpH (Martin et al., 2007). Die acht Hexamere sind unterschiedlich eingefärbt. **A:** Das 8x6-mer setzt sich aus zwei identischen 4x6-meren zusammen. **B:** Ansicht auf das 4x6-mer. Es besteht aus zwei identischen 2x6-meren die antiparallel aneinander liegen. **C:** Das 2x6-mer setzt sich aus zwei leicht unterschiedlich aufgebauten Hexameren (rot/grün) zusammen

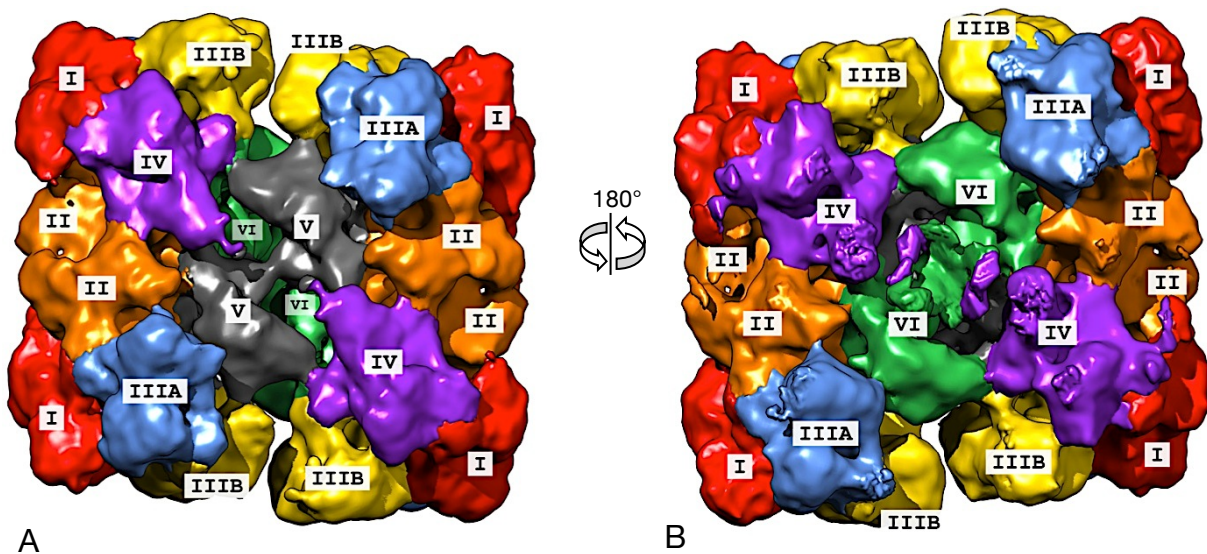


Abb. A.6: Ansicht auf die **(A)** Frontseite und **(B)** Rückseite des 4x6-mers mit der bekannten Topologie der Untereinheiten des 8x6-mers (Markl et al., 1981; Brenowitz et al., 1981; Lamy et al., 1981; Lamy et al., 1983; Martin et al., 2007). Die Untereinheiten sind unterschiedlich eingefärbt und gekennzeichnet. Rot: Typ I; Orange: Typ II; Hellblau: Typ IIIA; Gelb: Typ IIIB; Lila: Typ IV; Grau: Typ V; Grün: Typ VI.

Charakteristisch für das LpH ist das komplexe allosterische Verhalten bei der Sauerstoffbindung, das sich durch eine hohe Kooperativität (Hill-Koeffizient von 9) und eine niedrige O₂-Affinität auszeichnet. Die hohe Kooperativität ergibt sich aus den Interaktionen, die zwischen den Hexameren stattfinden (Markl et al., 1981; Markl, 1986; Savell-Niemann et al., 1988; Markl & Decker, 1992).

Unsere Arbeitsgruppe publizierte 2007 eine 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers, die nach heutigen Standards eine Auflösung von 12 Å hatte (Abb. A.7 A/B). Dabei wurden 11 verschiedene Kontaktstellen beschrieben, die eine molekulare Verbindung zwischen den einzelnen Hexameren des 8x6-mers bewerkstelligen (Martin et al., 2007). Um genauere Aussagen über diese Kontaktstellen treffen zu können, sollte eine neue hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion des LpHs erstellt werden. Hierzu wurden neue EM-Aufnahmen des LpHs von [REDACTED] und Frank Depoix am MPI für Biophysik in Frankfurt a.M., in der Arbeitsgruppe von [REDACTED], erstellt.

Die daraus berechnete 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers wies eine Auflösung von 10 Å auf.

Mario Dejung berechnete mit Hilfe einer anderen Software (Sparx) aus diesem Datensatz in seiner Doktorarbeit eine neue 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers, die eine nominelle Auflösung von 7,1 Å erreichte (Abb. A.8 A/B) (Dejung, 2014). Diese weist deutlich mehr Details in der Quartärstruktur des LpHs auf.

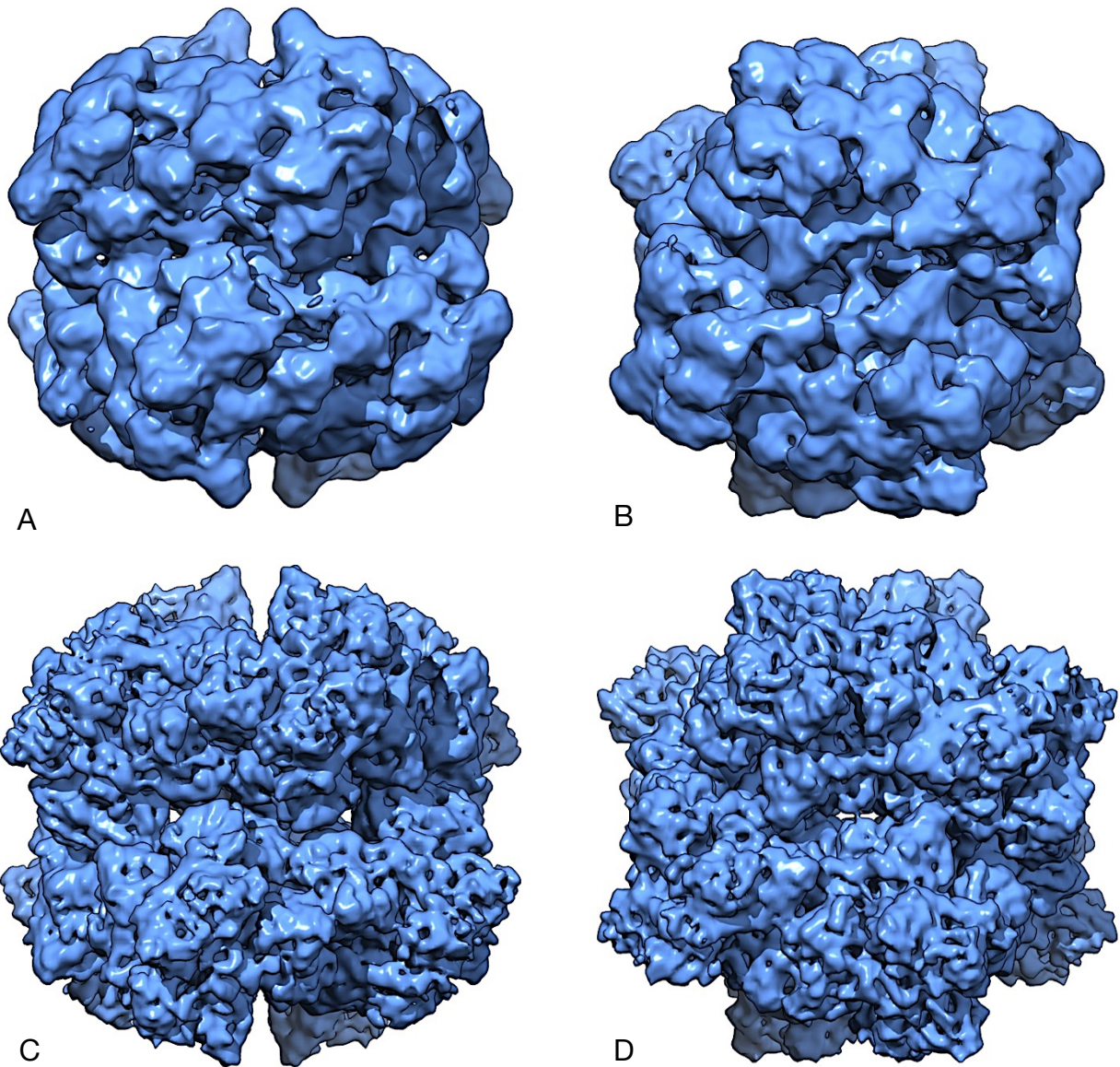


Abb. A.7: Die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers von *L. polyphemus* nach **(A/B)** Martin et al., 2007 (EMDB-1304) und **(C/D)** Dejung, 2014. Ansicht auf das oxy-8x6-mer entlang der **(A/C)** x-Achse und der **(B/D)** z-Achse.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit sollte ich nun eine 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers mit einer vergleichbaren Auflösung erstellen, um anschließend die beiden Strukturen auf pseudoatomarer Ebene miteinander zu vergleichen.

6. Das 4x6-Hämocyanin des Maulwurfkrebses *Callinassa truncata*

Im Gegensatz zu den meisten Crustaceen ist das Hämocyanin der Thalassinidea als 4x6-mer aufgebaut (Miller et al., 1977; van Holde & Miller, 1995; Taylor et al., 2000). Der Aufbau des 4x6-meren Hämocyanins unterscheidet sich grundlegend von der Struktur des 4x6-mers, das bei den Cheliceraten zu finden ist. Das Hämocyanin der Thallasinidea besteht aus vier Hexameren, die zusammen als Tetraeder assoziiert sind (Abb. A.8 A) (Cavellec et al., 1990; Markl and Decker, 1992). Im Vergleich dazu besteht das Halbmolekül von *Limulus polyphemus* bzw. das 4x6-mer der Cheliceraten aus zwei 2x6-meren, die antiparallel zueinander liegen und so eine planar-quadratische Struktur ausbilden (Lamy et al., 1981; Taveau et al., 1997, Martin et al., 2007) (Abb. A.8 B).

Weiterhin gibt es einen großen Unterschied in der Anzahl der beteiligten Untereinheitentypen. Das 4x6-mer der Cheliceraten setzt sich aus 7-8 Untereinheitentypen zusammen, während für das Hämocyanin von *Callinassa truncata* nur zwei unterschiedliche Untereinheitentypen bekannt sind (Markl, nicht publiziert). Hierbei scheint der Untereinheit-Typ 2 eine essentielle Rolle bei der Assemblierung der Hexamere zum funktionellen 4x6-mer zu spielen.

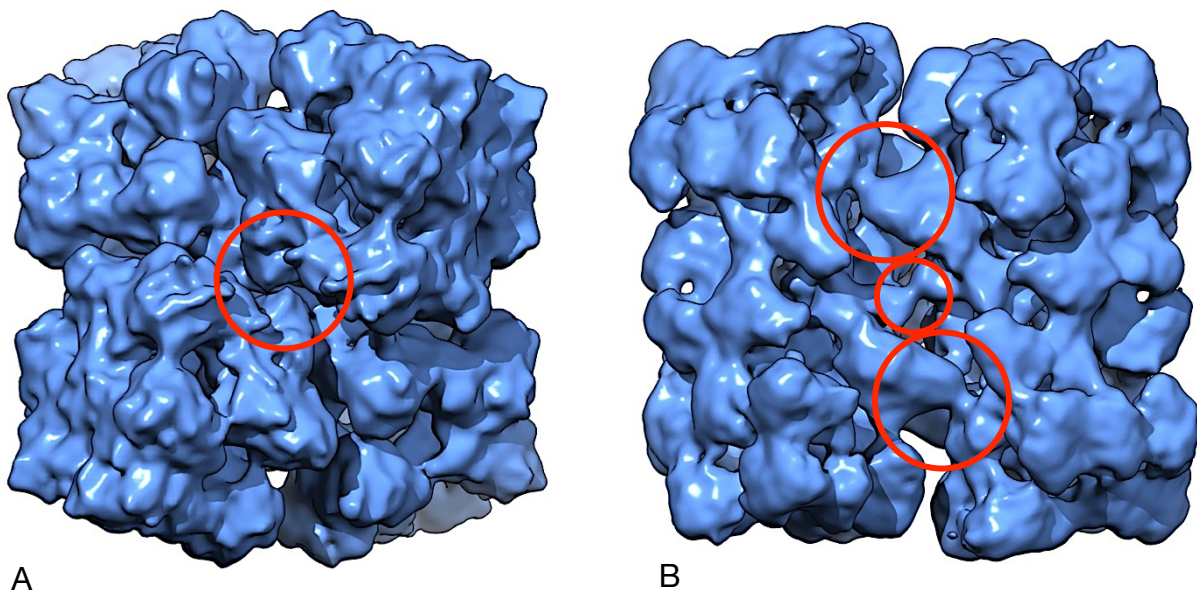


Abb. A.8: Ansicht auf das 4x6-mer von **(A)** *C. truncata* (Kühne und Markl, unpubliziert) und **(B)** das Halbmolekül (4x6-mer) von *L. polyphemus* (Martin et al., 2007). **A:** Im Zentrum des Proteins treten die vier Hexamere in Kontakt (roter Kreis). **B:** Das 4x6-mer von *L. polyphemus* wird von zwei 2x6-meren gebildet, die antiparallel zueinander liegen. Es sind drei Kontaktstellen (rote Kreise) vorhanden, von denen zwei identisch sind.

Mit Hilfe der Kleinwinkel-Röntgenstreuung wurden für das 4x6-mer des Maulwurfskrebsses *Upogebia pusilla* mögliche Quartärstrukturen beschrieben. Die dort favorisierte Quartärstruktur für das 4x6-mer weist eine D2-Symmetrie auf (Micetic et al., 2010). Eine in unserer Arbeitsgruppe von [REDACTED] berechnete 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers von *C. truncata* bestätigt die D2-Symmetrie (Abb. A.8 A). Die erstellte 3D-Rekonstruktion entsprach jedoch einem Modell für das 4x6-mer, das für die Quartärstruktur von *U. pusilla* als unwahrscheinlich angenommen wurde.

Die 3D-Rekonstruktion zeigt, dass die vier Hexamere im Zentrum des Proteins miteinander in Kontakt treten, und so die Quartärstruktur des nativen Hämocyanins von *C. truncata* ausbilden.

Es ist bisher nicht sicher, ob sich das 4x6-mer direkt aus vier Hexameren zusammensetzt (Micetic et al., 2010) oder ob es sich aus zwei Halbmolekülen (zweimal 2x6-meren) aufbaut (Cavellec et al., 1990; Taylor et al., 2000; Paoli et al., 2007).

Aus welchen Halbmolekülen sich das 4x6-mer von *C. truncata* möglicherweise zusammensetzt, ist unbekannt. Hier ergeben sich drei mögliche Konformationen von 2x6-meren, die miteinander agieren könnten (Abb. A.9 A-C).

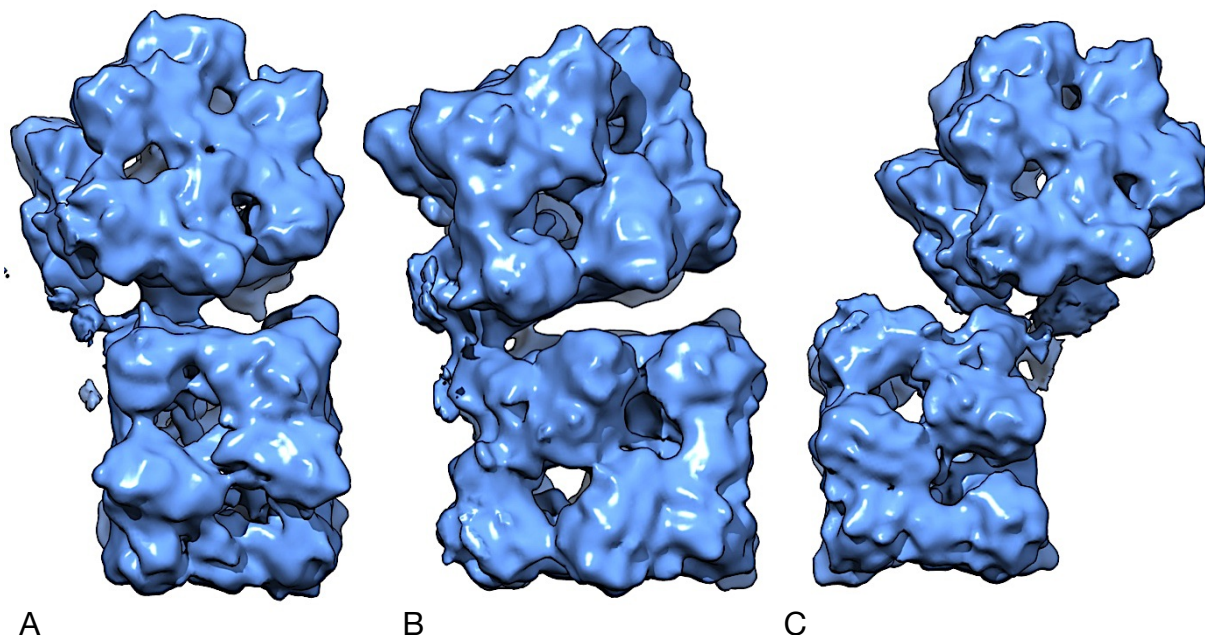


Abb. A.9: Mögliche Konstellationen von 2x6-meren, aus denen sich das native Hämocyanin (4x6-mer) von *C. truncata* aufbauen kann. **A:** Das obere Hexamer sitzt verdreht auf dem unteren Hexamer. Beide sind über eine Kontaktstelle miteinander verbunden. Diese Konformation ähnelt stark dem 2x6-mer von *C. maenas* **B:** Die beiden Hexamere liegen übereinander, wobei das obere Hexamer um ca. 20° nach oben gekippt ist. Eine ähnliche Konformation weist auch das 2x6-mer von *L. oceanica* auf. **C:** Das obere Hexamer liegt verdreht und verschoben auf dem unteren Hexamer auf.

Meine Aufgabe war nun, eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion des 4x6-Hämocyanins von *Callinassa truncata* zu berechnen. Mit dieser sollte es möglich sein, eine präzise Aussage über die genaue Konformation der Quartärstruktur des Hämocyanins zu treffen. Weiterhin sollten bei einer entsprechend hohen Auflösung der 3D-Rekonstruktion die verschiedenen intermolekularen Kontaktstellen zwischen den vier Hexameren auf pseudoatomarer Ebene genauer beschrieben und analysiert werden.

7. Das 2x6-Hämocyanin der Meeresassel *Ligia oceanica*

Ligia oceanica gehört zu den Asseln (Isopoda). Eine erste 3D-Rekonstruktion des Hämocyanins mit einer sehr niedrigen Auflösung sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen lassen darauf schließen, dass dieses 2x6-mer eine komplett andere Grundarchitektur aufweist, als man sie vom 2x6-mer diverser Decapoden kennt (Bijlholt & van Bruggen, 1986; Markl und Decker, 1992; Scherbaum et al., 2010). Die Struktur dieses 2x6-mers ähnelt stark einem der drei Halbmoleküle (2x6-mer), in die man das 4x6-mer von *Callinassa truncata* zerlegen kann (Abb. A.9 B, A. 10).

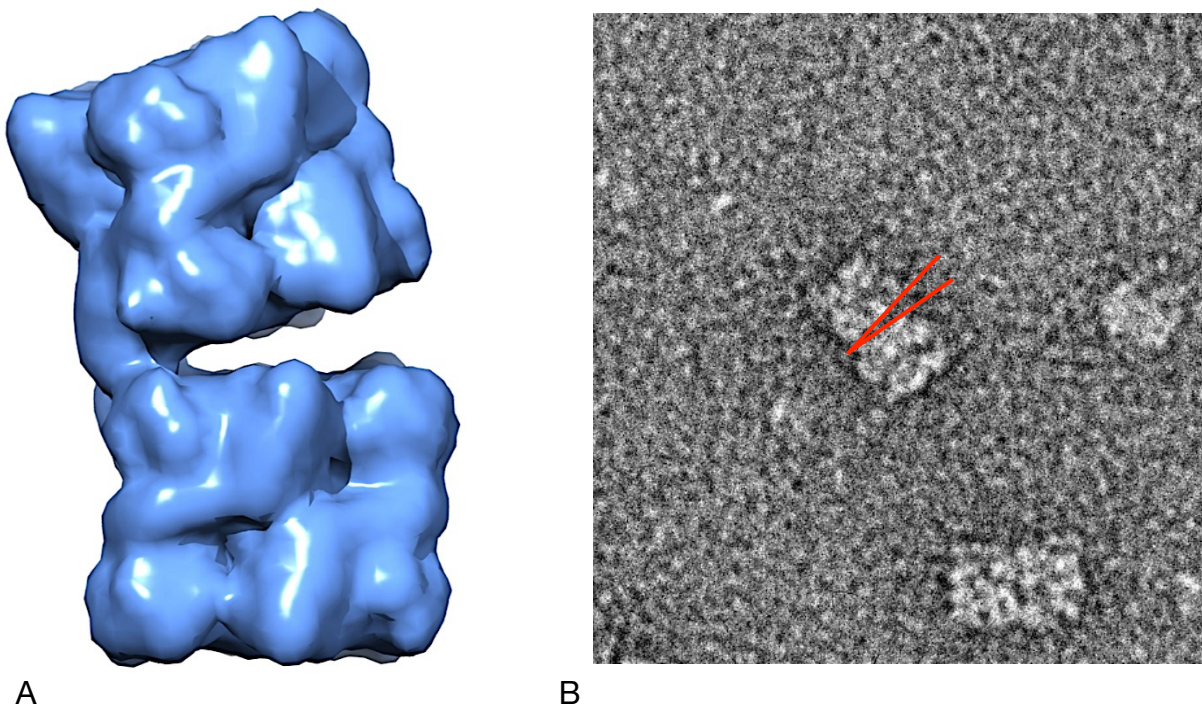


Abb. A.10: **A:** Eine simulierte 3D-Dichtekarte des 2x6-mers, aus dem sich eventuell das 4x6-mer von *Callinassa truncata* zusammensetzt. **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des 2x6-mers von *Ligia oceanica*. Bei diversen 2x6-meren konnte man einen Spalt (rote Linien) zwischen den 2x6-meren erkennen, der große Ähnlichkeit zu dem Spalt der simulierten 3D-Rekonstruktion aufwies.

Es soll daher im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion des 2x6-Hämocyanins von *Ligia oceanica* zu erstellen, um zu prüfen, ob hier tatsächlich die gleiche Struktur vorliegt. Zusätzlich sollen mögliche intermolekulare Kontaktstellen zwischen den zwei beteiligten Hexameren identifiziert und analysiert werden.

8. 3D-Elektronenmikroskopie von Proteinen

Die 3D-Elektronenmikroskopie von Proteinen konnte sich im letzten Jahrzehnt in der Proteinstrukturforschung als Methode fest etablieren. Mit der 3D-Elektronenmikroskopie ist es möglich, aus einer Vielzahl von Einzelpartikeln (2D-Projektionen) und mit Hilfe bioinformatischer Methoden die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu rekonstruieren (van Heel et al., 1996; Tang et al., 2007; Ludtke et al., 1999; Hohn et al., 2007; Scheres, 2012, 2013). Sie besitzt gegenüber der Röntgenkristallographie und der Kernresonanzspektroskopie verschiedene Vor- und Nachteile. Bei der Präparation der Proben wird darauf geachtet, dass das entsprechende Protein in einer möglichst strukturerhaltenden Umgebung bleibt. Je stabiler, unflexibler, größer und symmetrischer das zu untersuchende Protein ist, desto höher ist die erreichte Auflösung. Die momentan angewendete Methode zur Erstellung von hochaufgelösten Proteinstrukturen ist die Kryo-Transmissions-elektronenmikroskopie (Kryo-EM) (Dubochet et al., 1988; Adrian et al., 1984). Hierbei wird das Protein in flüssigem Ethan (-170°C) schockgefroren. Somit ist es möglich, das Protein in seiner nativen Konformation zu untersuchen, da es sich in seiner eigenen wässrigen Umgebung befindet. Das heißt, es liegt chemisch unverändert vor. Das Einfrieren des Proteins muss dabei sehr schnell erfolgen, so dass das Wasser in der Probenlösung nicht kristallisiert. Es liegt somit in glasartigem Eis vor, wobei das Protein in verschiedenen Orientierungen fixiert ist. Die Proben sollen möglichst in dünnen Schichten eingefroren werden, da Elektronen dickere Schichten nicht ohne Mehrfach-Streuung durchdringen können. Die Probe wird dann in einem Kryo-EM analysiert. Hierbei muss beachtet werden, dass die meisten Proteine sehr strahlungsempfindlich sind. Die Probe wird daher bei sehr niedrigen Strahlungsdosen untersucht („low-dose“-Verfahren) (Dubochet et al., 1988; Penczek et al., 1992).

Diese elektronenmikroskopischen Bilder waren bis vor wenigen Jahren sehr kontrastarm, da zum einen keine Schweratome in der Probe vorhanden sind, die den Kontrast verstärken würden, zum anderen waren die Kameras noch nicht in der Lage, solche Bilder besser darzustellen. Dies hat sich jedoch mit der Entwicklung und dem Einsatz von DEDD-Kameras (*Direct Electron Detection Device*) in neuartigen speziell ausgerüsteten Kryo-Transmissionsmikroskopen drastisch verbessert (McMullan et al., 2009; Bammes et al., 2012).

Die genauen Bilddaten werden anschließend mit der Einzelpartikelanalyse (*single particle analysis*) ausgewertet (Penczek, 1992; Frank, 2002). Dies ist möglich, da das untersuchte Protein in einer hohen Anzahl gleicher Kopien vorliegt, die unterschiedliche Orientierungen aufweisen. Die Einzelpartikel gleicher Orientierung

werden aufsummiert, wodurch sich das Signal-Rausch-Verhältnis stark verbessert. Um hochauflösende Informationen zu erhalten, ist eine sehr hohe Anzahl von solchen gleichen Partikeln notwendig. Mit Hilfe verschiedener Software-Pakete (RELION, SPARX, EMAN2, IMAGIC) und leistungsstarker Hardware kann man dann aus aufgenommenen Einzelpartikeln eine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur rekonstruieren.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Kryo-TEM, gerade durch die Entwicklung der letzten Jahre, als effektive Methode zur Vorhersage und Untersuchung von Proteinstrukturen bestens eignet.

9. Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit sind die folgenden Punkte:

1) Das 8x6-Hämocyanin des Pfeilschwanzes *L. polyphemus*

Nach der Analyse der bekannten 3D-Rekonstruktionen des 8x6-mers von *L. polyphemus* im oxygeniertem Zustand (Martin et al., 2007, Dejung, 2014) stellte sich die Frage, inwieweit sich die Quartärstruktur des Proteins verändert, wenn es im deoxygenierten Zustand vorliegt. Zusätzlich von Interesse sind die Interaktionen, die zwischen den einzelnen Hexameren auftreten, und inwiefern sich diese von den Interaktionen im oxygenierten Zustand unterscheiden.

Meine Aufgabe war eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion des Hämocyanins von *L. polyphemus* im deoxygenierten Zustand zu erstellen. Diese sollte anschließend mit einer 3D-Rekonstruktion, die im oxygenierten Zustand vorliegt, verglichen werden. Weiterhin sollten die Kontaktstellen zwischen den Hexameren auf pseudoatomarer Ebene genauer untersucht werden.

2) Das 4x6-Hämocyanin des Maulwurfkrebses *C. truncata*

Der Aufbau des 4x6-mers der Crustaceen unterscheidet sich erheblich vom 4x6-mer der Cheliceraten. Es gibt Modelle, die das 4x6-mer von verschiedenen Thalassinidea darstellen (Cavellec et al., 1990, Markl und Decker 1992, Micetic et al., 2010). Diese weisen jedoch keine hohe Auflösung auf. Ebenso konnten die Kontaktstellen zwischen den Hexameren bisher nicht beschrieben werden.

Eine weitere Frage war, ob sich das 4x6-mer direkt aus vier Hexameren zusammensetzt oder ob zwei Halbmoleküle (2x6-mer) miteinander in Kontakt treten und so das native 4x6-mer ausbilden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion des Hämocyanins von *C. truncata* erstellt werden. Die Sequenzen der zwei Untereinheitentypen von *C. truncata* wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestimmt. Mit Hilfe von erzeugten Homologiemodellen sollten anschließend auf pseudoatomarer Ebene, die Kontaktstellen zwischen den Hexameren analysiert werden.

3) Das 2x6-Hämocyanin der Meeresassel *L. oceanica*

Eine erste niedrig aufgelöste 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers, die in unserer Arbeitsgruppe erstellt wurde, zeigte, dass diese eine hohe Ähnlichkeit mit einem der möglichen Halbmoleküle (2x6-mer) hat, in die das 4x6-mer von *C. truncata* möglicherweise zerfallen könnte.

Um dies zu überprüfen, sollte ich eine 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers von *L. oceanica* erstellen und anschließend mit dem Halbmolekül aus der hochaufgelösten 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers von *C. truncata* vergleichen.

B. Material & Methoden

1. Tiere

1.1 Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*

Der atlantische Pfeilschwanz *Limulus polyphemus* (Abb. B.1) wird häufig als lebendes Fossil bezeichnet. Seine Blütezeit war zwischen den Zeitaltern Silur und Jura. Das heutige Verbreitungsgebiet der Art erstreckt sich vom südlichen Kanada über Maine im Norden der USA bis nach Yucatan. *L. polyphemus* bewohnt dabei meist die dort vorhandenen Sandküsten bis in Tiefen von 10-50 Metern. Ausgewachsene Tiere können eine Körperlänge von 60-80 cm erreichen. Die Weibchen sind dabei wesentlich größer als ihre männlichen Artgenossen. Ihre Nahrung besteht hauptsächlich aus Muscheln, Schnecken und Aas. Zur Paarungszeit begeben sie sich an Land. Pfeilschwanzkrebse (Xiphosuren) gehören zum Unterstamm der Cheliceraten und sind damit Verwandte der Spinnentiere (Arachniden).

Für diese Arbeit wurden drei Tiere mit einer Länge von ca. 20-30 cm bei Carolina Biological Supply (USA) erworben und im Institut für Zoologie in einem 400 Liter Meerwasseraquarium gehalten. Sie wurden 1-2 mal pro Woche mit Krabbenfutter gefüttert. Alle zwei Wochen stand ein Wechsel von einem Drittel des Meerwassers an.



Abb. B.1: Der atlantische Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (© Christoph Markl).

1.2 Der Maulwurfskrebs *Callianassa truncata*

Der Maulwurfskrebs *Callianassa truncata* (Abb. B.2) kommt verbreitet im Flachwasser des Mittelmeerraumes vor. Er erreicht eine Körpergröße von ca. 3-4 cm. Mit seinen verbreiterten Scherenfüßen gräbt er verzweigte Tunnelsysteme im Sandboden. Charakteristisch sind dabei die am Höhlenausgang entstehenden Sandhäufchen, die in ihrer Mitte ein Loch besitzen. Er ernährt sich meist von organischem Material, das er im Sand findet, sowie von Polychaeten und Aas. *C. truncata* gehört zu den Thalassiniden und diese wiederum zum Subtaxon Anomura des Taxons Decapoda (Zehnfußkrebse).

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden an der Küste der italienischen Mittelmeerinsel Giglio gefangen. In unserem Institut wurden sie in einem, mit dem Originalsand ausgestatteten, Meerwasseraquarium gehalten und einmal die Woche mit Krebsfutter gefüttert.



Abb. B.2: Der Maulwurfskrebs *Callianassa truncata* (© Christoph Markl)

1.3 Die Meeresassel *Ligia oceanica*

Die Meeresassel *L. oceanica* (Abb. B.3) findet man häufig an felsigen Küstenabschnitten der Atlantik- und Nordseeküsten von Westeuropa. Sie ist aber auch an diversen Sandstränden anzutreffen, wo sie sich meist unter Steinen versteckt. Sie hält sich an Land wie auch im Wasser auf und kann unter Wasser mehrere Tage überleben. *L. oceanica* besitzt einen sehr flachen Körper, der eiförmig erscheint, und kann eine Körperlänge von knapp 3 cm erreichen. Die Tiere sind nachtaktiv und wandern während der Ebbe in die trockengefallenen Gebiete, um sich dort von Algen sowie anderem pflanzlichen und tierischen Material zu ernähren. *L. oceanica* gehört zur Familie der Klippenasseln (Ligiidae), welche Vertreter des Taxons Isopoda (Asseln) sind.

Für diese Arbeit erhielten wir zehn Tiere vom meeresbiologischen Forschungsinstitut Roscoff in Frankreich. Die Tiere wurden in einem 50 Liter Meerwasseraquarium, das mit Sand und diversen Steinen ausgestattet war, gehalten. Die Meeresasseln wurden einmal pro Woche mit Fischfutter gefüttert.



Abb. B.3: Die Meeresassel *Ligia oceanica* (© orangeaurochs/UK).

2. Biochemische Methoden

2.1 Entnahme der Hämolymphe & Aufreinigung des Hämocyanins

2.1.1 *Limulus polyphemus*

Die Probenentnahme wurde von Dr. Wolfgang Gebauer und mir durchgeführt. Dazu wurde eine kleine Kanüle an der dorsalen Gelenkhaut zwischen Schwanz und Carapax eingeführt und ca. 1 ml Hämolymphe entnommen. Die Hämolymphe wurde anschließend für 10 Minuten bei 13.000 g in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert, um die Blutzellen zu entfernen. Danach wurde die Probe mit einem 1 MDa-Filter (Vivaspin 500 / 1 MDa / Sartorius) aufgetrennt. Der Überstand mit dem Hämocyanin wurde auf Eis gestellt und der Durchfluss erneut mit einem 5 kDa-Filter (Vivaspin 500 / 5KDa / Sartorius) aufgetrennt, um die restlichen Proteine zu entfernen. Mit dieser zell- und proteinfreien Hämolymphe wurde daraufhin das Hämocyanin, welches im ersten Auftrennungsschritt gewonnen wurde, auf ca. 1 mg/ml verdünnt.

2.1.2 *Callinassa truncata*

Die Entnahme der Hämolymphe bei *Callinassa truncata* wurde von Dr. Wolfgang Gebauer ausgeführt. Dazu wurde das Tier auf Eis narkotisiert, mit einer Pinzette fixiert und mit Hilfe einer kleinen Pipette die Hämolymphe aufgenommen. Da die Tiere sehr klein waren, wurden für eine ausreichende Probenmenge vier Tiere genommen, so dass sich ein Gesamtvolumen von ca. 350 µl ergab. Die Hämolymphe wurde mit 13.000 g 10 Minuten lang zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico), um die Blutzellen zu entfernen. Der Überstand wurde mit einem 1 MDa-Filter (Vivaspin 500 / 1MDa / Sartorius) filtriert. Das sich im Überstand befindliche aufkonzentrierte Hämocyanin wurde anschließend mit einem Tris / HCL-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 (100mM TRIS, 100mM NaCl, 20mM CaCl₂) auf eine Konzentration von ca. 1 mg/ml verdünnt.

2.1.3 *Ligia oceanica*

Die Entnahme der Hämolymphe wurde von Dr. Wolfgang Gebauer durchgeführt. Die Tiere wurden in einer Petrischale für 30 Minuten im Kühlraum ruhig gestellt. Anschließend wurden sie mit einer Pinzette fixiert. Die Hämolymphe wurde mit einer kleinen Pipette aufgenommen. Insgesamt wurde die Hämolymphe von sechs Tieren genommen, so dass sich ein Gesamtvolumen von ca. 400 µl ergab. Um die Blutzellen aus der Hämolymphe zu entfernen, wurde diese für 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wurde dann mit einem 500 kDa-Filter (Vivaspin 500 / 500 KDa / Sartorius) gefiltert. Das aufkonzentrierte Hämocyanin wurde anschließend in einem Tris/HCL-Puffer (100mM TRIS, 100mM NaCl, 10mM CaCl₂, 10mM MgCl₂) mit einem pH-Wert von 7,5 auf ca. 1 mg/ml verdünnt.

2.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration des Hämocyanins wurde photometrisch bestimmt (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences). Proteine lassen sich photometrisch nachweisen, da die aromatischen Aminosäurereste (Tryptophan und Tyrosin) eine π - π^* Absorption bei 280 nm zeigen und die Peptidbindung bei 205 nm absorbiert. Es wurde hier eine Extinktion von 1,0 bei 280 nm mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml gleichgesetzt.

2.2 Probenpräparation der EM-Grids

Im Rahmen meiner Promotion setzte ich die Negativkontrastierung und die Kryofixierung von Proteinen ein. Das Ziel beider Methoden war, die Proteine möglichst zahlreich auf dem Objektträger zu erkennen, ohne dabei aneinander zu stoßen, um die nachfolgenden strukturellen Berechnungen nicht zu beeinträchtigen. Die Negativkontrastierung diente dabei der schnellen Kontrolle von Testproben und die Kryofixierung der 3D-Rekonstruktion.

2.2.1 Negativkontrastierung der Hämocyanin-Proben

Zur Kontrolle der beiden Hämocyanin-Proben wurden diese mit Hilfe der Negativkontrastierung an einem Tecnai F12 LaB₆(T12) cryoTEM (120 kV) untersucht. Diese Methode eignet sich sehr gut, um die Struktur eines Proteins zweidimensional abzubilden (Brenner & Horne, 1959; Harris & Agutter, 1970; Harris & Horne 1994). Hierbei wird eine Schwermetalllösung auf die Proteinprobe gegeben, welche die Eigenschaft hat, die Elektronen im Elektronenmikroskop stärker abzulenken. Dadurch erhöht sich der Amplitudenkontrast und die Proteine sind leichter zu identifizieren. Die Schwermetalllösung legt sich dabei wie ein Mantel um die Proteine, was sich somit negativ auf die Struktur des entsprechenden Proteins auswirkt. Feine Strukturen wie α -Helices oder β -Faltblätter sind so nicht mehr zu erkennen (Harris & Horne, 1994). Ebenfalls kann bei einigen Proteinen durch die Austrocknung eine Abflachung der Struktur auftreten (*flattening-effect*) (Talmon, 1983). Die allgemeine Vorgehensweise sieht wie folgt aus (Je nach Probe unterscheiden sich einige Zeitangaben):

Als Objektträger für die Probe wird ein kleines Kupfernetz (Grid) mit einem aufgeschwämmtem amorphen Kohlefilm genutzt. Diese Grids wurden zuerst für 30 Sekunden ionisiert (*glow-discharged*). Anschließend wurden 3 μ l der Proteinprobe (0,1 mg/ml) auf das Grid gegeben. Der Puffer wurde vom Grid mit 3 x 10 μ l Wasser fortgespült. Direkt danach wurden auf die Grids 5 μ l eines Kontrastierungsmittels (2% Uranylacetat; Herstellung s. Anhang) gegeben. Das überschüssige Uranylacetat wurde nach 30 Sekunden mit Hilfe eines Filterpapiers vom Grid abgezogen und dieses für 15-20 Minuten an der Luft getrocknet. Diese Tropfen-Methode ist bei Harris und Agutter (1970) und Harris und Horne (1994) genauer beschrieben. Das Grid konnte dann sofort im Elektronenmikroskop untersucht oder auch für einen längeren Zeitraum (bis zu 6 Monaten) bei Raumtemperatur und niedriger Luftfeuchtigkeit gelagert werden.

2.2.2 Kryo-Fixierung der Hämocyanin-Proben

Die Kryo-Fixierung von Proteinproben hat hinsichtlich einer 3D-Rekonstruktion diverse Vorteile gegenüber der Negativkontrastierung (Dubochet et al., 1988). Da bei diesem Verfahren die Behandlung der Probe mit einer Schwermetalllösung entfällt, können hochaufgelöste Strukturen errechnet werden. Ebenso wird durch den schockartigen Einfrierungsprozess das Protein in seinem nativen Zustand fixiert (Dubochet et al., 1988). Von Nachteil ist, dass das Protein im vitrifizierten Zustand im Vergleich zu seinem Medium nur eine geringfügig höhere Dichte besitzt und so im

Elektronenmikroskop einen geringeren Kontrast aufweist. Für den Einsatz der Kryofixierung werden auch spezifische Grids verwendet (holey carbons). Diese besitzen einen Kohlefilm, der mit vielen kleinen Löchern versehen ist. In diesen liegen die Proteine in einer dünnen vitrifizierten Pufferschicht vor, was von Vorteil ist, da der Kohlefilm als Hintergrund wegfällt. Die Grids werden vor der Präparation 24 h in Chloroform gewaschen und können dann genutzt werden. In unserem Labor besitzen wir einen Cryoplunger™3 (CP3) der Firma Gatan (Pleasanton, Kalifornien, USA) (Abb. B.4 A), der für die Kryo-Präparation verwendet wird. Dieser besitzt zusätzlich eine Atmosphärenkammer (entwickelt von Dr. Frank Depoix in unserer Arbeitsgruppe, Universität Mainz), die es uns erlaubt, sauerstoffbindende Proteine bei unterschiedlichen Gaskonzentrationen zu inkubieren und einzufrieren. Das Hämocyanin wurde mit einer Stickstoffkonzentration von 100 % inkubiert. Das gewaschene und ionisierte (glow discharged) Grid wurde mit einer Pinzette fixiert und in den Cryoplunger™3 eingehangen. Das Grid befand sich dabei in der oben beschriebenen Atmosphärenkammer. Auf das Grid wurde dann ein kleiner Tropfen (3,5 µl) der Hämocyaninprobe aufgetragen (Abb. B.4 B). Anschließend wurde die überschüssige Probe mit zwei Filterpapieren, die sich im Plunger befinden, abgesaugt. Hierbei spielt die Länge des Absaugens eine sehr wichtige Rolle. Je kürzer man absaugt, desto dicker ist das Eis und die Proteinprobe ist aufgrund der dicken Eisschicht kaum erkennbar. Wenn die Absaugzeit zu lang ist, wird die Eisschicht zu dünn, was bedeuten kann, dass die vitrifizierte Proteinprobe unter dem Elektronenstrahl sofort zerstört wird. Es erfordert also sehr viele Testläufe, um eine optimale Zeitkonfiguration zu finden. Hierbei spielen auch Form und Eigenschaften der zu untersuchenden Proteine eine Rolle. Für das Hämocyanin von *Limulus polyphemus* wurde eine Blotzeit von 3,4 Sekunden genommen. Nach dem Absaugen wurde das Grid in flüssiges Ethan (-170 °C) geschossen.

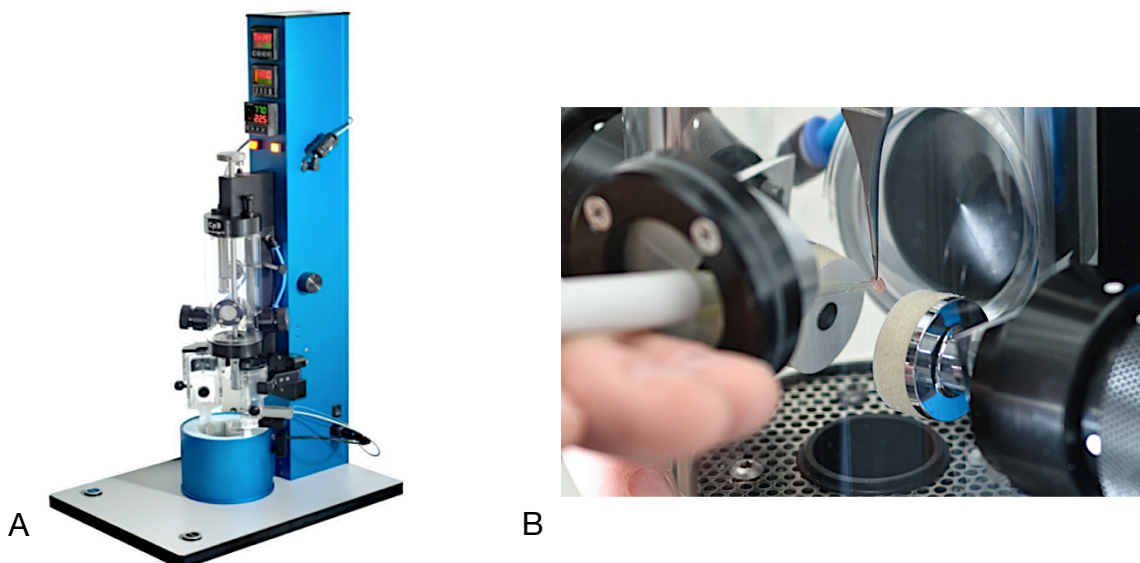


Abb. B.4: **A:** Cryoplunger3 mit Atmosphärenkammer. **B:** Auftragen der Proteinprobe auf ein EM-Grid

Dieser Einfrierungsprozess erfolgt so schnell, dass das Wasser in der Probenlösung nicht kristallisiert (Adrian et al., 1984). Das Hämocyanin liegt somit glasartig (vitrifiziert) in der Lösung vor (amorphes Eis), wobei das Protein in verschiedenen Orientierungen fixiert ist. Somit ist es möglich, das Hämocyanin in seiner nativen Konformation zu untersuchen, da es sich in seiner eigenen wässrigen Umgebung befindet. Das heißt, es liegt chemisch unverändert vor. Die vitrifizierten Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert, um ein Auftauen und die Bildung von Eiskristallen zu verhindern.

3. Transmissionselektronenmikroskopie

3.1 Grundlagen

Mit Hilfe von Mikroskopen ist es möglich verschiedene Objekte vergrößert darzustellen. Dabei werden durch das verwendete Linsensystem Photonen bzw. Elektronen in einem neuen Winkel abgelenkt, wodurch sich der Sehwinkel vergrößert, der Betrachtungsabstand jedoch gleich bleibt. Daraus ergibt sich ein bestimmter Vergrößerungswert V :

$$V = \frac{\tan \varepsilon}{\tan \varepsilon_0}$$

Dabei ist ε der Sehwinkel, unter dem der Gegenstand mit Hilfe des optischen Instruments sichtbar ist, und ε_0 der Winkel, unter dem man das Objekt ohne ein optisches Hilfsmittel sieht. Je größer der Sehwinkel ε , desto größer sieht das Auge das Objekt.

Bei einem Elektronenmikroskop lässt sich mit Hilfe der verwendeten elektromagnetischen Linsensysteme, die eine variable Brennweite besitzen, der Sehwinkel beliebig verändern. Dadurch sind Vergrößerungen im Bereich von 90.000-160.000 erreichbar.

Die Beschleunigungsspannungen von TEMs liegen zwischen 80 kV und 350 kV und haben direkten Einfluss auf die Wellenlänge der Elektronen. Die für diese Arbeit genutzten Elektronenmikroskope Tecnai 30 Polara am MPI für Biophysik in Frankfurt sowie das Titan Krios am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen arbeiten mit einer Beschleunigungsspanne von 300 kV.

Die damit erreichte Wellenlänge kann man mit folgender Formel errechnen:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{e \cdot U_B \left(2 \cdot m_0 + \frac{e \cdot U_B}{c^2} \right)}}$$

h = Plank'sche Konstante

λ = Wellenlänge

e = Elementarladung

U_B = Beschleunigungsspannung

m_0 = Ruhemasse

c = Lichtgeschwindigkeit im Vakuum

Für eine Beschleunigungsspannung von 300 kV ergibt sich eine Wellenlänge von 1,97 pm und somit eine theoretische Auflösungsgrenze von 0,016 Å.

Dieser Wert lässt sich in der Praxis jedoch nicht erreichen. Dies liegt zum einen an sphärischen Aberrationen, die beim Einsatz der in Elektronenmikroskopen vorkommenden magnetischen Linsensysteme, entstehen. Mit Hilfe diverser magnetischer Multipolelemente, die zusätzlich in den Strahlengang gebracht werden, können solche Aberrationen teilweise korrigiert werden (C_s -Korrektor). Ein weiterer Faktor ist die enorme Empfindlichkeit der biologischen Proben gegenüber dem eingesetzten Elektronenstrahl. Diese können sehr leicht beschädigt oder sogar zerstört werden. Man nutzt daher alternative Verfahren, um solche Schäden an den Proben zu vermeiden (*low-dose* Verfahren), jedoch auf Kosten der Auflösung. Die aktuelle Auflösungsgrenze für Proteine bzw. Viren liegt zwischen 2-3 Å (Zhang et al., 2008; Baker et al., 2013; Banjeree et al., 2016).

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie ist es also möglich, biologische Proben (Proteine) mit Hilfe von Elektronenstrahlen abzubilden. Für Untersuchungen von biologischen Molekülen werden meist Spannungen um die 200-300 kV genutzt. Um einen besonders kleinen Beleuchtungsbereich höchster Stromdichte zu erreichen, kommen vielfach LaB6- oder Feldemissionskathoden zum Einsatz. Im Strahlengang herrscht ein Vakuum, da die Elektronen nicht mit anderen Atomen als mit denen der Probe interagieren und nicht von Luftmolekülen abgelenkt werden sollen. Die Elektronen werden vom Kondensor-Linsensystem so abgelenkt, dass sie in etwa parallel auf das Molekül treffen und es gleichmäßig ausleuchten. Die beschleunigten Elektronen durchstrahlen das Molekül und produzieren von diesem ein Transmissionsbild. Dieses Bild (auch als Realbild bezeichnet) wird zur Bildbearbeitung in ein Fourierbild transformiert, da im Fourierraum die Berechnung der Bilddaten um ein Vielfaches schneller abläuft (Williams & Carter, 2009).

3.2 Verwendete Elektronenmikroskope

Für die diversen Aufnahmen der Proteinproben wurden drei verschiedene Elektronenmikroskope verwendet, die nachfolgend kurz beschrieben werden:

Sämtliche negativ-kontrastierten Aufnahmen wurden von mir mit einem Tecnai F12 LaB₆ (T12) cryoTEM (120 kV) (FEI, Eindhoven) (Abb. B.5) aufgenommen, das mit einem LaB₆-Filament ausgestattet ist. Dieses TEM verfügt über eine 4k-Kamera (F116, TVIPS, München, Deutschland). Die Kontrollaufnahmen wurden alle mit einer 49.000-fachen Vergrößerung aufgenommen, was einer Auflösung von 4,36 Å/pix entspricht. Die Beschleunigungsspannung betrug 120 kV und die Linsenapertur des Mikroskops lag bei 1,2 mm. Die Farbtiefe der Aufnahmen betrug 8 bit, was bedeutet, dass einem Pixel 256 Grauwerte zur Verfügung stehen, die er annehmen kann. Die Bilder wurden alle im tiff-Format abgespeichert. Die Kamera wurde für die Aufnahmen 2-fach gruppiert (gebintt). Das heißt es werden immer 2x2 Pixel zusammengefasst, um den Kontrast zu erhöhen. Die Aufnahmen an diesem TEM dienten der Kontrolle der entsprechenden Proteinprobe und des Puffers.

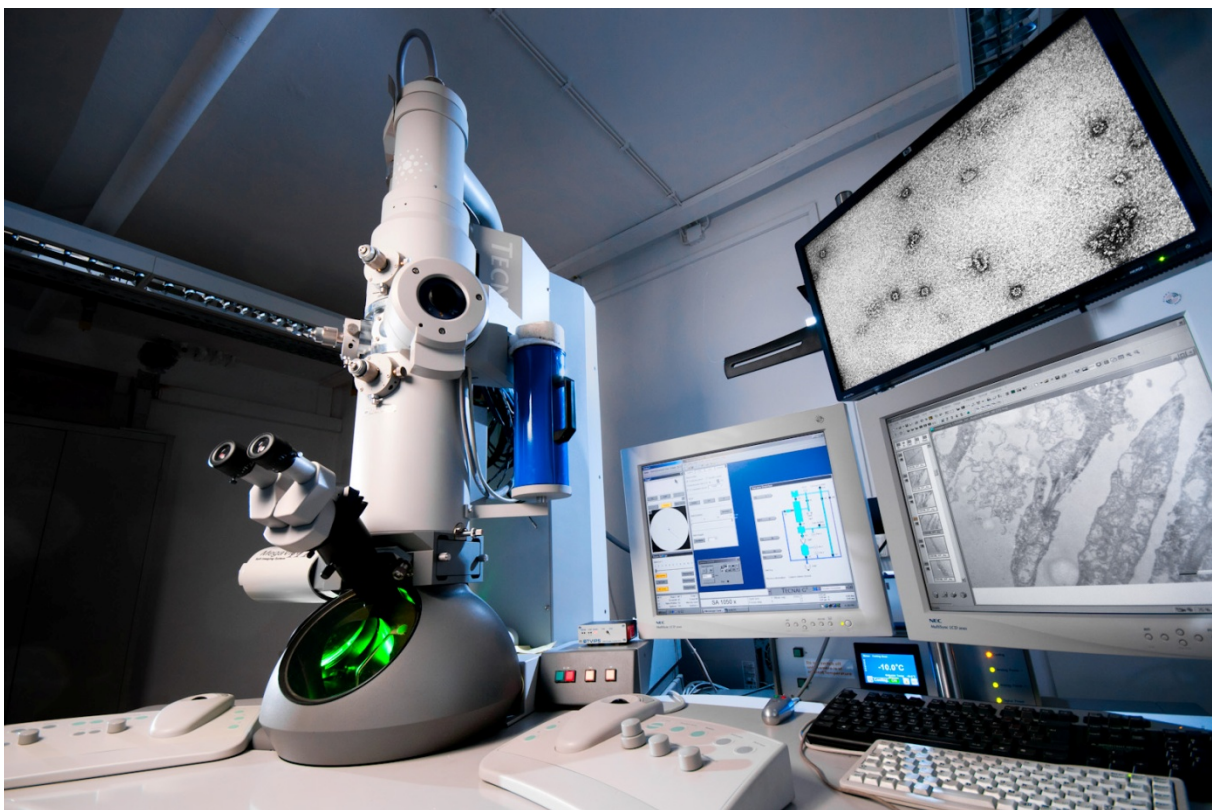


Abb. B.5: Tecnai F12 Kryo-TEM, Universität Mainz (© Christoph Kühne).

Die Bilder vom *L. polyphemus* Hämocyanin wurden von Dr. Frank Depoix [REDACTED] und mir in Frankfurt a. M. am MPI für Biophysik in der AG von Prof. Kühlbrandt aufgenommen. Das dort benutzte TEM ist ein 300 kV FEI Tecnai G2

Polara, welches mit einer FEI Falcon II (Direct Electron Detector) ausgestattet ist (siehe B 3.3 direkte Elektronendetektion). Dieses modifizierte Mikroskop ist für die Untersuchung biologischer Proben besonders geeignet. Der Cs-Wert des Mikroskops liegt bei 2,2. Insgesamt wurden innerhalb einer Woche 833 Aufnahmen manuell aufgenommen. Die Auflösung lag bei 1,77 Å/pix. Die Pixelgröße des Detektors liegt bei 14 µm, was einer 79.096-fachen Vergrößerung entspricht. Für sämtliche Aufnahmen wurde das Low-Dose-Verfahren angewandt. Aufgrund einer speziellen Software für den Direct Detector war es möglich, die Bilder als Movie-Frames aufzuzeichnen (Video-Mode). Innerhalb der Belichtungszeit von 1,5 Sekunden einer Aufnahme (ca. 84 e⁻/Å²) wurden 24 Movie-Frames (Einzelbilder) erstellt. Für die Aufnahme eines Frames wurde die zuvor eingestellte Elektronendosis von 3,5e⁻/Å² genutzt. Die Defokuswerte lagen zwischen 0,8 und 5 µm. Anschließend wurden die 24 Einzelbilder jeder Aufnahme mit einer Frame-Alignment Software (Li et al., 2013) zueinander ausgerichtet. Dies hatte den immensen Vorteil, dass die Partikelbewegung, die durch den Elektronenstrahl induziert wird, sowie der Drift der Probe zu einem großen Teil korrigiert werden kann. Ebenfalls wurden Gesamtbilder aus den Einzelaufnahmen berechnet, welche der Selektion und Extraktion der Partikel sowie einer ersten 3D-Rekonstruktion dienen. Die alignierten Movie-Frames wurden später im finalen Refinement (siehe Relion) nochmals mit einbezogen und konnten die Auflösung der 3D-Rekonstruktion deutlich verbessern.

Die Aufnahmen des oxy-8x6-mers von *L. polyphemus* wurden von [REDACTED] Frank Depoix [REDACTED] ebenfalls in Frankfurt a.M. am MPI für Biophysik in der AG von [REDACTED] erstellt. Die Bilder wurden am Tecnai G2 Polara auf Negativfilmen (Kodak SO-163) aufgenommen und anschließend in einem speziellen Trommelscanner (Primescan D7100) digitalisiert. Der Datensatz enthielt 38.032 Einzelpartikel, die alle in die damals erstellten 3D-Rekonstruktionen einfließen. Es stellte sich später heraus, dass beim Einscannen der EM-Aufnahmen ein falscher Vergrößerungswert verwendet wurde. Dies hatte zur Folge, dass für die Berechnung der ersten 3D-Rekonstruktion eine fehlerhafte CTF-Korrektur durchgeführt wurde. Es wurde versucht diesen Fehler in einer zweiten 3D-Rekonstruktion zu korrigieren, indem die Pixelgröße angepasst wurde (Dejung, 2014). Es stellte sich jedoch heraus, dass durch ein Anpassen der Pixelgröße die finale 3D-Rekonstruktion leicht schrumpfte. Hinzu kommt, dass die zweite 3D-Rekonstruktion mit einem anderen Programm (SPARX) erstellt wurde.

Um nun die 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers besser mit dem oxy-8x6-mer vergleichen zu können, sollte der oxy-Datensatz mit den ursprünglichen Werten erneut mit dem Programm RELION berechnet werden. Dafür wurde der mit dem Programm SPARX erstellte Datensatz von mir in das RELION-Format konvertiert.

Anschließend konnte dieser sofort mit dem Programm RELION berechnet werden (Scheres, 2013).

Die Aufnahmen des Hämocyanins von *C. truncata* und *L. oceanica* wurden von [REDACTED] am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen erstellt. Das Institut besitzt ein 300 kV FEI Titan Krios Kryo-Elektronenmikroskop. Dieses Mikroskop wurde speziell nur für den Einsatz zur Untersuchung von biologischen Makromolekülen entwickelt. Zusätzlich besitzt es ein spezielles Linsensystem der Firma CEOS (Heidelberg), das als Korrekturlinse die sphärische Aberration des Elektronenmikroskops vollständig aufhebt. Der Cs-Wert des Mikroskops liegt somit bei 0. Ebenfalls besitzt das FEI Titan Krios eine FEI Falcon 2 Kamera (Direct Electron Detector). Die Auflösung betrug 1,27 Å/pix. Die Pixelgröße des Detektors beträgt 14 µm, was einer 112.000-fachen Vergrößerung entspricht. Aufgrund einer anderen Softwareversion war es jedoch nicht möglich, die Kamera im Video-Mode zu betreiben. Der Hämocyanin-Datensatz von *C. truncata* umfasste 2.562 EM-Bilder. Vom *L. oceanica* Hämocyanin wurden 4.133 EM-Bilder aufgenommen.

3.3 Direkte Elektronendetektion

Mit dem Einsatz bisheriger CCD-Kameras (oder dem konventionellen Film) in Elektronenmikroskopen war es möglich, die Strukturen von großen Proteinkomplexen sowie Viren mit hoher Symmetrie mit einer Auflösung von 3-4 Å zu rekonstruieren (Grigorieff & Harrison, 2011). Bei kleineren Proteinstrukturen (um die 500-1000 KDa), die keine hohe Symmetrie aufweisen, war so eine 3D-Rekonstruktionen mit einer Auflösung von ca. 6-7 Å möglich (Ludtke et al., 2004; Armache et al., 2010; Gipson et al., 2010). Ein limitierender Faktor ist vor allem die Strahlungsempfindlichkeit der biologischen Proben. Um ein Protein nicht zu zerstören, müssen sehr geringe Elektronendosen eingesetzt werden (*low-dose-Verfahren*) (Dubochet et al., 1988; Penczek et al., 1992). Dies hat jedoch zur Folge, dass die EM-Aufnahmen ein sehr niedriges Signal/Rausch-Verhältnis aufweisen. Um dies auszugleichen und genügend Strukturinformationen von asymmetrischen Proteinen zu erhalten, benötigte man für eine hochauflösende 3D-Rekonstruktion fast eine Million Einzelpartikel.

Die Entwicklung der Direct-Detector-Kameras hebt diese Limitierung nun zu einem Großteil auf. Bisherige CCD-Kameras besitzen einen Szintillator. Dieser wandelt die Anregungsenergie des Elektronenstrahls als Photonen um, welche dann vom CCD-Sensor aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu ist der Direct Detector in der

Lage, bilderzeugende Elektronen ohne die Abschwächung des Signals durch einen Szintillator direkt zu erfassen (Abb. B.6).

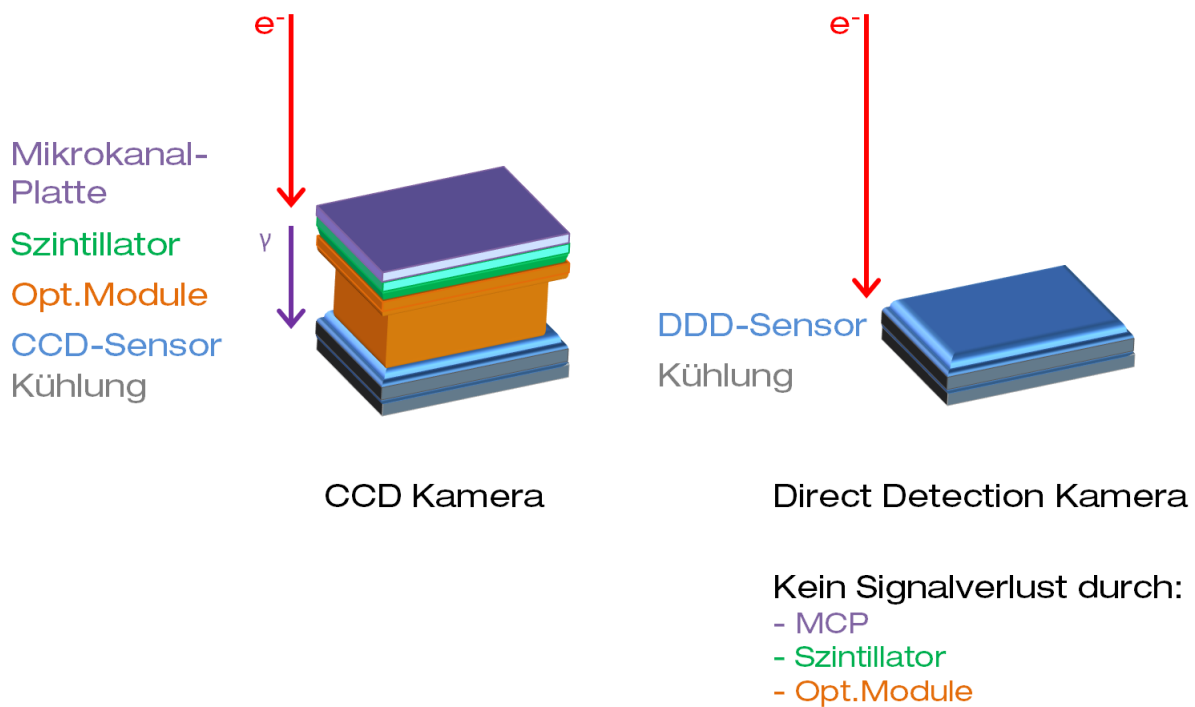


Abb. B.6: Der Aufbau herkömmlicher CCD-Kameras im Vergleich zum Aufbau der neuartigen Direct-Detector-Kameras

Das Besondere an einer DDD-Kamera ist die sehr dünne Sensorschicht. Der einfallende Elektronenstrahl passiert die Sensorschicht und hinterlässt dabei eine Ionisierungsspur, die integriert und als Pixel berechnet werden kann. Durch den dünnen Sensor wird zusätzlich die Ladungsverteilung beim Auftreffen des Strahls minimiert, was die Auflösung im Vergleich zu anderen Kameras nochmals erhöht. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Bildrate, die die Kamera in sehr kurzer Zeit aufnehmen kann. Diese hohe Bildrate ermöglicht eine genaue Einstellung der genutzten Elektronendosis während der Aufnahme der Bilder. Dieser Umstand kann genutzt werden, um die Bewegung des Partikels während der Aufnahme nachträglich herauszurechnen oder andere Bildverarbeitungsmethoden anzuwenden, die eine Verbesserung der Aufnahme nach sich ziehen. Die Detective Quantum Efficiency (DQE; ein Maß für das Signal-Rauschverhältnis des Detektors) ist bei den Direct Detector Kameras viel höher, was zur Folge hat, dass das Signal-Rauschverhältnis (SNR) der Bilder sich stark erhöht und zwar bei gleich bleibenden (oder sogar niedrigeren) Elektronendosen (McMullan et al., 2009). Der Einsatz dieser speziellen Kameras hat die Qualität der Aufnahmen von biologischen Makromolekülen auf ein viel höheres Niveau gebracht (Abb. B.7 A/B). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zwei Elektronenmikroskope nutzen, die mit einer solchen Kamera (FEI Falcon 2 Direct Detector) ausgestattet waren.

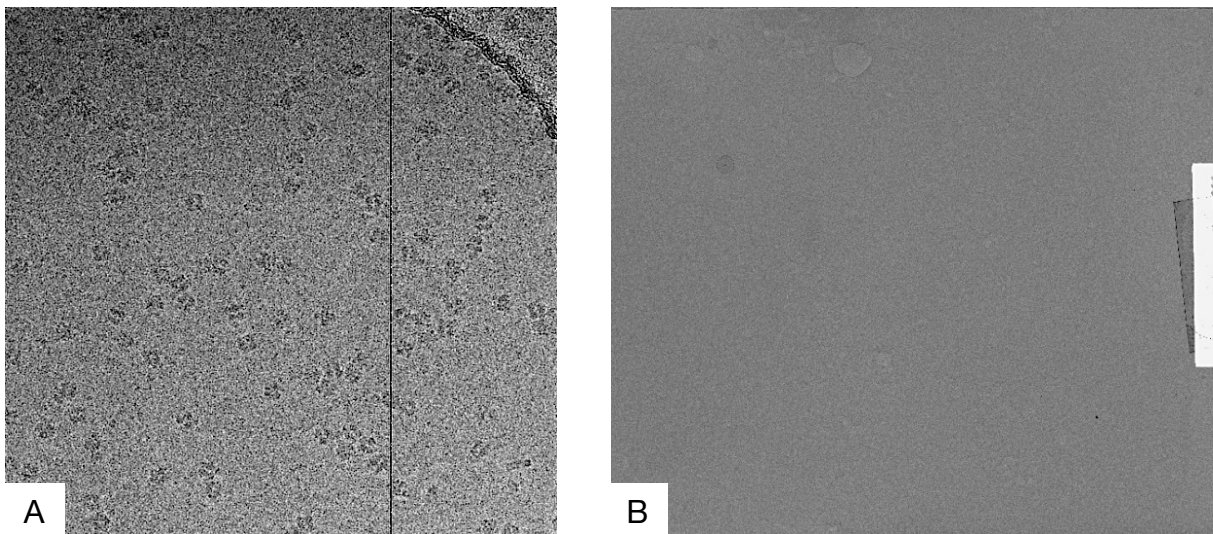


Abb. B.7: **A:** EM-Aufnahme mit der DDD Falcon 2. Die Partikel des Hämocyanins sind gut sichtbar. **B:** EM-Aufnahme des Hämocyanins auf einem Negativ-Film (Kodak eif, SO-163). Einzelne Partikel sind aufgrund des sehr niedrigen Signal-Rauschverhältnisses (SNR) nur sehr schwer zu erkennen.

4. HPCs/Cluster/Computer

4.1 Hardware

4.1.1 HPC Cluster MOGON

Die finalen Rekonstruktionen und molekulardynamischen Simulationen wurden auf dem HPC-Cluster MOGON der Johannes-Gutenberg Universität berechnet. Das System besteht aus 535 einzelnen Knoten (Nodes), die jeweils vier CPUs besitzen. Jede dieser CPUs besitzt 16 Kerne (Prozessoren), was eine Gesamtzahl von 34.240 Kernen ergibt. Ein Prozessor hat einen CPU-Takt von 2,1 GHz. 424 Knoten verfügen über 128 GB RAM (2 GB/Kern), 96 Knoten besitzen jeweils 256 GB RAM (4 GB/Kern) und 15 Knoten arbeiten mit 512 GB RAM (8 GB/Kern). Aufgrund der hohen Speicherauslastung nutzte ich für die 3D-Rekonstruktionen 2-8 Knoten (128-512 Prozessoren), die über eine Speicheranbindung von 8 GB/Kern verfügten. Sämtliche Nachbearbeitungen nach dem 3D-Refinement wurden auf einem Knoten (64 Prozessoren) mit 2 GB/Kern berechnet. Tabelle B.1 zeigt die Zeitersparnis bei der 3D-Rekonstruktion.

Die molekulardynamischen Simulationen der verschiedenen Protein-Interfaces benötigten im Vergleich zu den 3D-Berechnungen nur einen eher geringen Speicherbedarf, dafür jedoch einen enorm hohen Rechenbedarf. Die finalen Simulationen wurden von bis zu 8 Knoten (512 Kerne) mit je 2 GB/Kern berechnet.

	Dual-Core CPU mit 2 Prozessoren	Mogon/2 Knoten mit 128 Prozessoren
Partikelextraktion (50000 Partikel)	~ 2 Tage	~ 5 Minuten
2D-Klassifizierung	~ 10-14 Tage	~ 24-36 Stunden
3D-Refinement	~ 7-10 Tage	~ 2-5 Stunden

Tab. B.1: Zeitersparnis bei der 3D-Rekonstruktion durch die Benutzung des HPC-Clusters MOGON.

Der Geschwindigkeitsvorteil machte sich vor allem bei den MDs bemerkbar. Auf unserem internen Cluster der Arbeitsgruppe dauert eine MD (100 ns) mit vier Untereinheiten des Limulus Hämocyanins ca. 35 Tage. Auf MOGON konnte, aufgrund der parallelisierten Berechnung, die MD mit 4 Knoten (256 Prozessoren) innerhalb von 72 Stunden abgeschlossen werden (Tab. B.2).

	Beo-Cluster/1Knoten, 32 Prozessoren	Mogon/4 Knoten, 256 Prozessoren
MD mit 2 Untereinheiten	~ 20 Tage	~ 30 Stunden
MD mit 4 Untereinheiten	~ 32-35 Tage	~ 70-72 Stunden
MD mit 6 Untereinheiten	~ 45-52 Tage	~ 96 Stunden

Tab. B.2: Massiver Geschwindigkeitsvorteil bei der Berechnung der MDs mit dem HPC Cluster MOGON.

4.1.2 „Beowulf“-Cluster der Arbeitsgruppe Markl

Sämtliche vorbereitende Berechnungen für die 3D-Rekonstruktion sowie für die MDs wurden auf unserem internen „Beowulf“-Cluster durchgeführt. Dieser besitzt insgesamt 27 Knoten mit einer unterschiedlichen Anzahl an Prozessoren. Zusammen befinden sich 36 AMD Octa-Cores, 32 AMD Opteron Dual-Cores und zwei Intel Xeon Quad-Core Prozessoren auf dem Cluster, was eine Gesamtzahl von 360 Prozessoren ergibt. Jeder Kern verfügt hierbei über 2 GB Arbeitsspeicher (RAM). Die Datensicherung wurde über einen Netzwerkspeicher (NAS-System)

sichergestellt, der über eine Speicherkapazität von 30 Terabyte (TB) verfügt. Das Betriebssystem war Ubuntu Linux.

4.1.3 Desktop-PC/Macbook Pro

Die Auswertungen, Verarbeitungen, Programmierarbeiten und weiteren Visualisierungen wurden an einem Desktop-PC mit einem Intel i7-920 Quad-Core Prozessor (@4,00 GHz), 12 GB RAM Arbeitsspeicher und einer AMD Radeon HD 7950 (3 GB GDDR5 RAM) sowie einem MacBook Pro (Mid 2012) mit Intel i7 Quad-Core (2,3 GHz), 16 GB RAM Arbeitsspeicher und einer NVIDIA GeForce GT 650M durchgeführt.

5. Software

Für die vielen unterschiedlichen Berechnungen wurden diverse Softwarepakete verwendet (Tab. B.3), die im Folgenden kurz erläutert sind.

Software	Version	AG/Institut	Literatur
RELION	1.3	Scheres/ MRC-LMB	(Scheres., 2012)
ctffind3		Grigorieff/HHMI	(Mindell&Grigorieff., 2003)
EMAN	1.9	NCMI/BCM	(Ludtke et al., 1999)
EMAN2	2.1	NCMI/BCM	(Tang et al., 2007)
ResMap	1.1.4	Kucukelbir	(Kucukelbir et al., 2014)
DireX	0.6.2	Schröder/ICS-6	(Wang & Schröder., 2012)
GROMACS	5.0.5	Diverse	(van der Spoel et al., 2005)
IMAGIC-5	110325	Image Science	(van Heel et al., 1996)
EM-Menu	4.0.9.23	TVIPS	(Daberkow et al., 1996)
VMD	1.9.2	TCB/Beckman	(Humphrey et al., 1996)
CHIMERA	1.10.2	RBVI/UCSF	(Pettersen et al., 2004)

Tab. B.3: Die verwendeten Softwarepakete

5.1 RELION (Version 1.3)

Die frei erhältliche Software RELION (Scheres, 2012 (B)) gehört zu den neuesten Programmen, die zur Berechnung von 3D-Dichtekarten verschiedener Proteinstrukturen eingesetzt werden. Das Programm nutzt eine grafische Benutzeroberfläche (GUI), die eine sehr einfache Bedienung des Programms ermöglicht. Im Gegensatz zu den meisten anderen Software-Programmen nutzt Relion einen Rechenalgorithmus auf Basis der Bayes-Statistik. Der Algorithmus des Programmes wird im Abschnitt B.9 nochmals genauer beschrieben. Das Programm kann man unter:

http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/relion/index.php/Main_Page herunterladen.

5.2 ctffind3

Das Programm ist als Freeware verfügbar. Es dient dazu, die Defokus-Werte und den Astigmatismus der Bilder zu bestimmen. Diese Werte sind wichtig, um die erhaltenen Daten für die Kontrast-Transfer-Funktion (CTF) des Elektronenmikroskops zu korrigieren. Das Programm ist unter <http://emlab.rose2.brandeis.edu/ctf> (Mindell and Grigorieff, 2003) erhältlich.

5.3 EMAN (Version 1.9)

Diese Bildanalyse-Software umfasst verschiedene Funktionen, wie z.B.: Selektion der Partikel (manuell oder automatisch), Fourier-Transformationen, verschiedene Filter-Applikationen, Alignments, 3D-Rekonstruktionen etc.). Für die vorliegende Arbeit wurden vor allem die Filterapplikationen sowie die Module zur Maskierung von 3D-Dichtekarten genutzt. Bei diesem Programm handelt es sich um ein Open-Source-Project, das man unter <http://blake.bcm.edu/emanwiki/EMAN1> herunterladen kann (Ludtke et al., 1999).

5.4 EMAN2 (Version 2.0.6)

EMAN2 ist die Weiterentwicklung von EMAN1 (Tang et al., 2007). Das Programm besitzt eine grafische Benutzeroberfläche, um eine einfache Benutzerinteraktion zu gewährleisten. Insgesamt besteht es aus vielen verschiedenen Modulen, mit denen eine komplette 3D-Rekonstruktion durchgeführt werden kann. Aus diesem Programm wurde das Modul „EMAN2-Boxer“ genutzt, um die Einzelpartikel des Hämocyanins von *L. polyphemus* halbautomatisch zu selektieren.

5.5 Resmap (Version 1.1.4)

ResMap berechnet die lokalen Auflösungen einer 3D-Dichtekarte (Kucukelbir et al., 2014). Die Angaben können über eine grafische Benutzeroberfläche sowie über die Kommandozeile eines Terminals eingegeben werden. Erhältlich ist die Software unter <http://resmap.sourceforge.net/>.

5.6 DireX (Version 0.61)

DireX ermöglicht atomare Strukturen in eine 3D-Dichtekarte flexibel einzupassen (Schröder et al., 2007, Wang & Schröder, 2012). Dazu werden verschiedene Programmmodule aufgerufen. Die Eingabe der Parameter erfolgt über die Kommandozeile eines Terminals. Die Software ist unter <http://www.schroderlab.org/software/direx/> erhältlich.

5.7 GROMACS (Version 5.0.5)

GROMACS (van der Spoel et al., 2005; Hess et al., 2008; Pronk et al., 2013; Páll et al., 2015) besteht aus vielen verschiedenen Software-Modulen, mit denen es möglich ist, komplexe molekulardynamische Simulationen (MDs) von Proteinen, Lipiden und anderen Polymeren zu berechnen und auszuwerten. Den Download gibt es unter <http://www.gromacs.org/>.

5.8 IMAGIC-5

Dies ist ein modulares Bildanalyse-Softwarepaket, welches vorwiegend zur Analyse und Rekonstruktion von Einzelpartikeln dient. Zu den Funktionen dieser Software gehört die Fourier-Transformation, 2D- und 3D-Alignments, MSA, Winkelberechnungen sowie die 3D-Rekonstruktion aus zweidimensionalen Bildern. Das Paket wurde von Image Science Software (www.imagescience.de, Berlin, Germany) (van Heel and Keegstra, 1981; van Heel et al., 1996) erworben.

5.9 Visual Molecular Dynamics (VMD 1.9.2)

VMD ist eine 3D-Visualisierungssoftware, die vor allem für molekulardynamische Simulationen ausgelegt ist (Humphrey et al., 1996). Mit Hilfe dieses Programms können Trajektorien von MDs einfach und schnell analysiert und ausgewertet werden. Eine Trajektorie besitzt dabei die genauen Koordinaten von jedem Atom eines Moleküls über eine definierte zeitliche Abfolge im dreidimensionalen Raum.

5.10 UCSF CHIMERA (Version 1.10.2)

UCSF Chimera ist ein spezialisiertes Programm zur Bearbeitung und Visualisierung von 3D-Rekonstruktionen, Kristallstrukturen etc. Es bietet eine Fülle an Funktionen. Das Programm enthält sowohl eine graphische Oberfläche als auch eine Kommandozeile, in der jegliche Befehle und Operationen durchgeführt werden können. UCSF Chimera ist frei verfügbar und kann unter <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html> heruntergeladen werden (Pettersen et al., 2004; Goddard et al., 2007).

5.11 EM-Menu

Diese Software wurde zur Erstellung elektronenmikroskopischer Bilder am Tecnai F12 LaB₆-TEM eingesetzt.

6 Digitale Bildverarbeitung/Einzelpartikelanalyse

Im folgenden Abschnitt ist die grundlegende Vorgehensweise beschrieben, wie im Rahmen dieser Arbeit aus verrauschten EM-Aufnahmen Einzelpartikel extrahiert und mit diesen eine 3D-Rekonstruktion des entsprechenden Proteins berechnet wurde.

6.1 Überprüfung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Beim ersten Datensatz mit den Aufnahmen des Hämocyanins von *L. polyphemus* wurden alle Aufnahmen mit dem Modul „e2display.py“ des Programms EMAN2 auf mögliche Bildfehler untersucht. Das Modul berechnet dazu eine FFT (schnelle Fouriertransformation), die es ermöglicht, eine eventuelle Bewegungsunschärfe im EM-Bild zu erkennen. Solche Bildfehler können Detailinformationen auf den Aufnahmen verschwinden lassen oder die Bildinformation verfälschen. Aufgrund dessen bot die Nutzung der Video-Funktion der DDD-Kamera Falcon 2 einen immensen Vorteil. Es wurden 24 Einzelbilder/Aufnahme in 1,5 Sekunden aufgenommen und anschließend aneinander ausgerichtet. Dadurch konnte die Bewegungsunschärfe fast vollständig eliminiert werden (Li et al., 2013).

Für den zweiten Datensatz mit den Aufnahmen des Hämocyanins (Abb. B.8 A/B) von *C. truncata* und dem dritten Datensatz mit den Aufnahmen des Hämocyanins von *L. oceanica* wurde am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen ebenfalls die DDD-Kamera Falcon 2 benutzt, jedoch ohne die Video-Funktion. Außerdem erfolgten alle Aufnahmen automatisch.

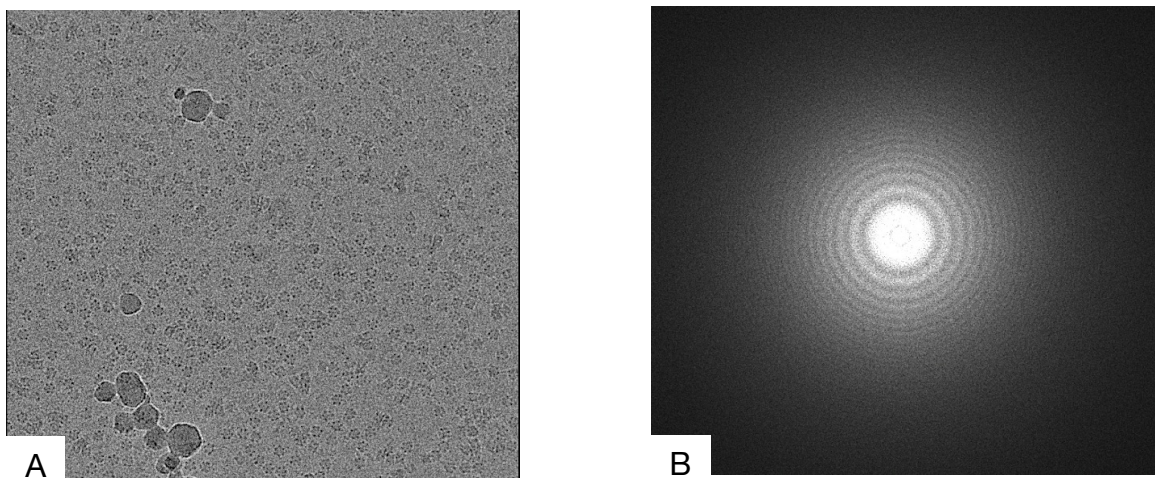


Abb. B.8: **A:** EM-Aufnahme des Hämocyanins von *C. truncata*. **B:** das dazugehörige FFT-Bild ohne Bewegungsunschärfe.

Somit war es nicht möglich, die Bewegungsunschärfe aus den Aufnahmen zu entfernen. Von den 2.562 Aufnahmen des Datensatzes von *C. truncata* konnten daher letztendlich nur 1.376 für die nachstehende CTF-Bestimmung und Partikelselektion genutzt werden.

Beim Datensatz von *L. oceanica* wurden ebenfalls EM-Bilder aussortiert, nachdem sie auf ihre Qualität hin überprüft wurden. Von den 4.133 EM-Aufnahmen wurden 3.161 für die nachfolgenden Berechnungen genutzt.

6.2 Kontrast-Transfer-Funktion (CTF)

Der Kontrast einer Aufnahme am TEM ergibt sich aus einer Kombination des Amplitudenkontrasts und des Phasenkontrasts. Durch den Verlust von Elektronen bei nichtelastischer Streuung und/oder durch großwinklige elastische Streuung, die bewirkt, dass Elektronen außerhalb der EM-Linse auftreffen, entsteht der Amplitudenkontrast. Der Phasenkontrast entsteht durch Interferenzen zwischen den elastisch gestreuten Wellen, die die Objektivblende passieren, und den nicht gestreuten empfangenen Wellen. Er enthält auch die meiste Information der Struktur des entsprechenden Moleküls. Der Anteil des Amplitudenkontrasts ist im Vergleich dazu sehr gering. Biologische Moleküle (die nicht markiert sind) sind Objekte, die grundsätzlich nur einen sehr schwachen Phasenkontrast aufweisen. Die EM-Aufnahmen werden im Defokus-Bereich (0,1-5 μm) aufgenommen, um einen hohen Phasenkontrast bei niedrigen räumlichen Frequenzen zu generieren (Unterfokus). Dies ist notwendig, um die Strukturen auf der Aufnahme sichtbar zu machen (Punkt-Verbreitungs-Funktion). Es führt aber zu einer Fehlinformation der Bildkontraste (oszillierende Vorzeichen (Nulldurchgänge)) in der CTF, die korrigiert werden müssen (Abb. B.9 a/b). Eine entscheidende Rolle bei der Korrektur der Bilder spielt die Fourier-Transformation. Wenn ein Bild in den Fourierraum transformiert wird, dann erhält man eine Darstellung in Abhängigkeit von den Raumfrequenzen des Bildes (Schatz, 1992). Wichtig: Dieses Bild enthält weiterhin alle Informationen des Ursprungsbildes. Der Vorteil der Fourier-Transformation besteht darin, dass Berechnungen dort viel schneller ausgeführt werden können. Außerdem ist es möglich, störende Faktoren bestimmten Raumfrequenzen zuzuordnen und diese zu eliminieren. Schaut man sich ein fouriertransformiertes Bild (Abb. B.8B) an, erkennt man vom Zentrum ausgehend helle Ringe (Thon-Ringe) (Thon, 1966). Diese begrenzen die Nullstellen der CTF, während die schwarzen Ringe die Nullstellen der Funktion repräsentieren. Mit der CTF lassen sich die Frequenzintervalle, in denen die negativen Werte liegen, genau ermitteln und ins Positive invertieren. Somit erhält man die gesamte Bildinformation einer EM-Aufnahme.

Die Form der CTF hängt vom Defokuswert (z), der Wellenlänge (λ) der Elektronen, der Ortsfrequenz (k) und dem sphärischen Aberrationskoeffizienten (C_s) ab (Wade, 1992).

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

Bei der Phasenverschiebung handelt es sich um eine zeitliche Größe. Sie ist auf einem statischen EM-Bild nicht erkennbar und das Objekt unsichtbar. Man erkennt aber daraus die resultierende Amplitudenmodulation. Ein sichtbarer Kontrast ist immer dann zu erkennen, wenn sich die Amplituden unterscheiden. Eine maximale Realitätstreue ist bei einem Gangunterschied von $\pi/2$ gegeben (Scherzer-Fokus). Dies lässt sich leider nicht für alle Beugungswinkelbereiche gleichzeitig realisieren, was in der CTF (Abb. B.9 a/b) ausgedrückt wird. Sie stellt den Verlauf des Kontrasts (Maximalwert = 1; schwarz-weiß) als Funktion der Ortsfrequenz $1/m$ (also im Fourier-Raum) dar.

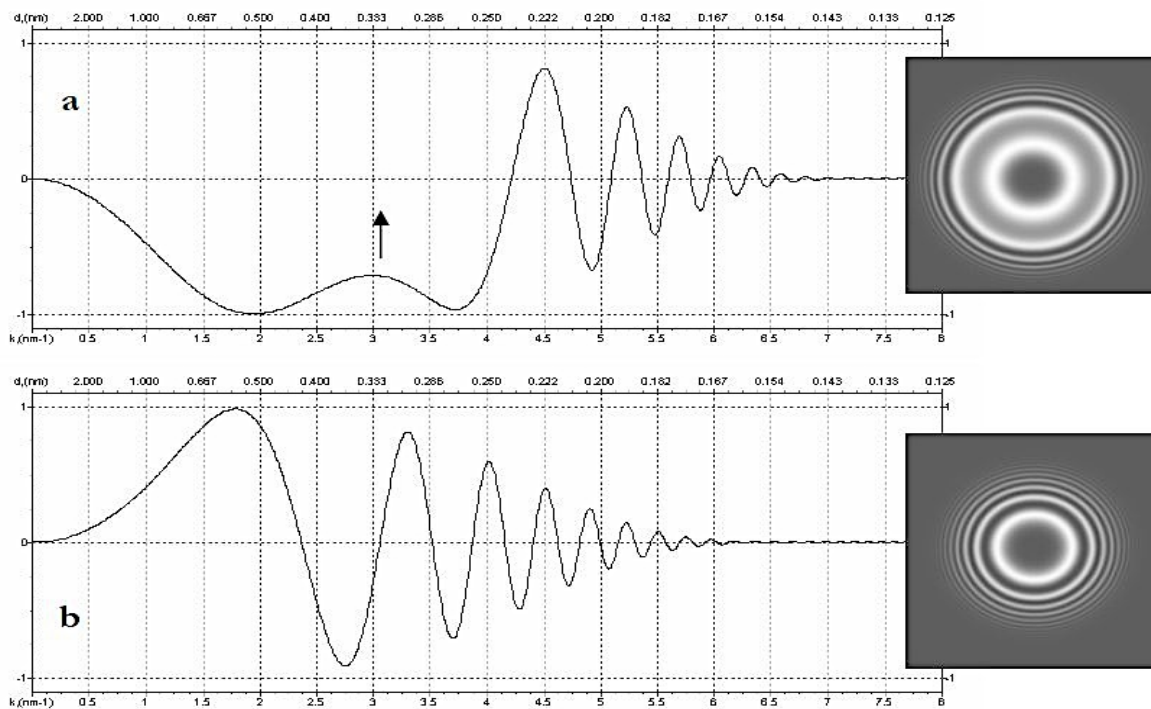
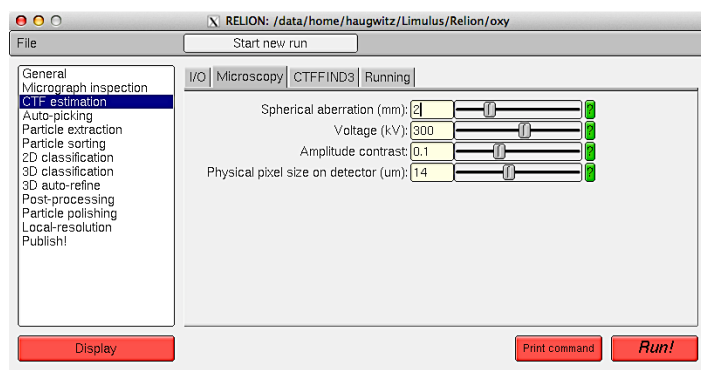


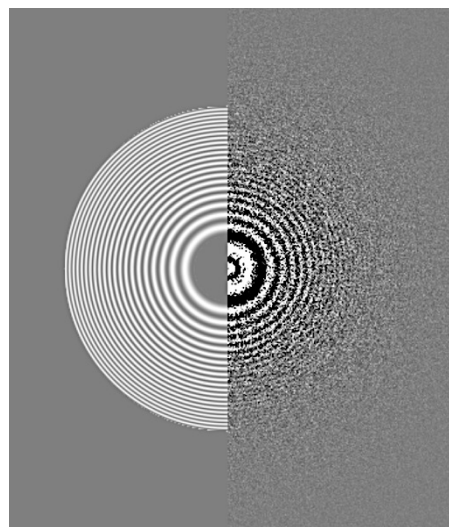
Abb. B.9: Kontrast-Transfer-Funktion (CTF) Linke Seite: CTF in 1D; Rechte Seite: in 2D-Darstellung; **a)** im Scherzer-Fokus: Unterfokus mit einer Phasenverschiebung über einen weiten Beugungswinkelbereich von ca. $\pi/2$. Die Kurve beginnt im negativen Kontrastbereich und bleibt auch über einen großen Ortsfrequenzbereich 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.

6.2 Bestimmung der Defokus-Werte

Biologische Proben sind im TEM aufgrund ihres niedrigen Kontrastes und im fokussierten Bereich nicht zu identifizieren. Die Aufnahmen der Probe werden daher im Defokus erstellt, um die Einzelpartikel sehen zu können. Zur Behebung der Bildfehler der Defokussierung, benötigt man jedoch den genauen Defokus-Wert jeder einzelnen Aufnahme. Zusammen mit den verschiedenen Parametern des Elektronenmikroskops (Cs-Wert, Vergrößerung, Auflösung) ist es möglich, den Defokus-Wert jeder Aufnahme zu bestimmen. Genutzt wurde dafür das Programm ctffind3 (Mindell & Grigorieff., 2003), das im Programm RELION verlinkt ist (Abb. B.10 A). Das Programm ctffind3 erstellt dabei für jede Aufnahme ein Diagnosebild, das überprüft werden muss. Auf der rechten Seite des Bildes wird die FFT der Aufnahme dargestellt. Die linke Seite zeigt die FFT mit dem von ctffind3 berechneten Defokuswert (Abb. B.10 B). Stimmen die beiden Seiten überein, dann hat die Defokus-Berechnung funktioniert. Gibt es jedoch Unterschiede zwischen beiden Seiten, muss die CTF-Berechnung der Aufnahme wiederholt oder aus dem Datensatz ausgeschlossen werden, da diese die nachfolgenden Berechnungen negativ beeinflussen würde.



A



B

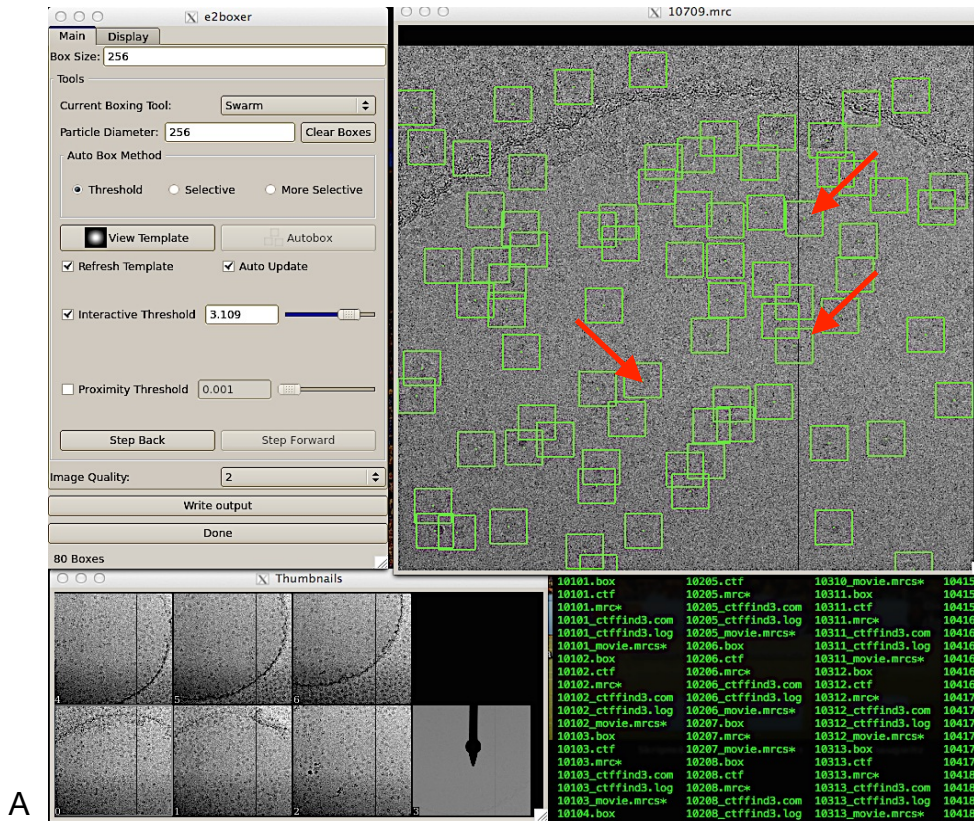
Abb. B.10: **A:** Elektronenmikroskop-Parameter zur Bestimmung der CTF. **B:** Erfolgreiche Simulation des Defokus-Wertes einer EM-Aufnahme

6.3 Selektion der Einzelpartikel

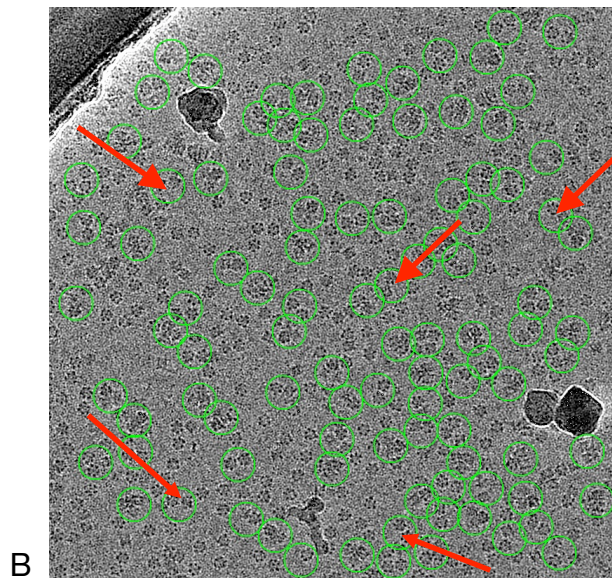
Die Selektion der Einzelpartikel des Datensatzes von *L. polyphemus* Hämocyanin wurde mit dem EMAN2-Modul „e2-Boxer.py“ durchgeführt (Tang et al., 2007; Ludtke, 2012). Das Modul besitzt einen automatischen Suchalgorithmus, der mit Hilfe von Referenzbildern ähnliche Partikel auf der Aufnahme auswählen und selektieren kann. Aufgrund eines Kamerafehlers des Direct Detectors Falcon 2 waren jedoch auf jeder Aufnahme ein sehr schwacher horizontaler sowie vertikaler Streifen zu erkennen (Abb. B.11). Jegliche Partikel, die von einem dieser Streifen berührt bzw. beeinflusst wurden, mussten daher manuell deselektiert werden (Abb. B.11). Die ausgewählten Partikel auf den entsprechenden Aufnahmen wurden im box-Format gespeichert. Dieser Datei-Typ enthält die genauen Koordinaten jedes einzelnen Partikels. Die Boxgröße betrug 256 x 256 Pixel. Die Auflösung der Aufnahmen lag bei 1,77 Å/pix. Insgesamt wurden aus diesem Datensatz 31.489 Partikel selektiert.

Der Datensatz mit den Einzelpartikeln des Hämocyanins von *C. truncata* wurde mit dem Selektions-Modul von RELION erstellt. Dazu wurden zuerst ca. 700 Partikel aus den ersten 100 Aufnahmen manuell selektiert. Anschließend wurde mit Hilfe dieser Partikel eine 2D-Klassifizierung durchgeführt, bei der am Ende 10 Klassensummen erstellt wurden. Die drei besten Klassensummen wurden für das nachfolgende automatische Selektieren aller Aufnahmen als Referenz verwendet. Die automatische Selektion der Partikel ist im Vergleich zur manuellen Partikel-Selektion um ein Vielfaches schneller, jedoch ist die Genauigkeit der Auswahl etwas schlechter. Der Algorithmus erkennt manchmal Fragmente bzw. Verunreinigungen auf dem Grid als „richtige“ Partikel und fügt diese dem Datensatz hinzu (Abb. B13). Diese wurden jedoch bei anschließenden Überprüfungen und 2D-Klassifizierungen aus dem Datensatz entfernt, so dass sie keinen negativen Einfluss auf die folgenden Berechnungen der 3D-Rekonstruktion haben. Insgesamt wurden 97.067 Einzelpartikel aus den 1376 Aufnahmen selektiert. Die Boxgröße betrug 256 x 256 Pixel. Die Auflösung der Aufnahmen lag bei 1,27 Å/pix.

Die Selektion der Einzelpartikel für den Datensatz von *L. oceanica* wurde ebenfalls mit RELION durchgeführt. Aus 180 EM-Bildern wurden manuell 2131 Einzelpartikel gepickt, mit denen anschließend die 2D-Klassifizierung zur Referenzerstellung durchgeführt wurde. Insgesamt wurden 15 Klassensummen erstellt. Die besten sechs Klassensummen wurden als Referenz für das nachfolgende automatische Selektionsverfahren verwendet. Der Datensatz enthielt nach der automatischen Selektion 109.845 Einzelpartikel.



A



B

Abb. B.11: A: GUI des Moduls e2boxer.py / Die grünen Kästen zeigen die automatische Selektion der Einzelpartikel. Partikel, die von der schwarzen/grauen Linie berührt wurden (roter Pfeil), wurden anschließend deselektiert. **B:** automatische Selektion der Einzelpartikel mit RELION.

6.4 Extraktion der Einzelpartikel

Nachdem die Koordinaten der Partikel erfasst und gespeichert wurden, konnte die Partikelextraktion beginnen. Dabei werden die Koordinaten aller Partikel in einer Datei zusammengefasst. Das Programm RELION nutzt dafür das „.star“-Format (particles.star). Der Vorteil dieses Formats ist, dass die Datei nicht aus vielen Bilddateien besteht, sondern nur die Koordinaten der Partikel zusammenfasst. Somit weist sie nur ein sehr geringes Datenvolumen auf, was für anschließende Berechnungen von Vorteil ist.

6.5 Bildverarbeitende Methoden

RELION kombiniert bei all seinen Refinements viele Einzelschritte, die in anderen 3D-Softwareprogrammen separat und nacheinander durchgeführt werden müssen. Diese Eigenschaft beschleunigt und vereinfacht die Benutzung von RELION sehr. Ich gehe im Folgenden auf die einzelnen Schritte genauer ein.

6.5.1 Normierung/Invertierung der Einzelpartikel

Der Kontrast der Partikel des Datensatzes wird zunächst invertiert. Das bedeutet, dass die Partikel nun auf einem dunklen Hintergrund weiß erscheinen. Weiterhin wird eine Normierung der Partikel durchgeführt, ohne die eine weitere Berechnung nicht möglich ist. Der präparierte Einzelpartikel-Datensatz kann nun für die weiteren Verbesserungsrunden (Refinements) genutzt werden.

6.5.2 Bildkorrektur der Partikel

Wie bereits in Abschnitt 6.2 beschrieben, wurden die elektronenmikroskopischen Bilder im Defokus aufgenommen. Aufgrund dessen ergab sich in der Kontrast-Transfer-Funktion (CTF) der Aufnahmen eine Intensitätsänderung, die abhängig von den Raumfrequenzen der zugehörigen Aufnahme ist (Abb. B.10 A/B Abschnitt 6.2, Abb. B.12 A). Der CTF-Wert der Aufnahmen wurde wie in Abschnitt 6.2.1 beschrieben ermittelt. Die Korrektur der CTF erfolgte innerhalb der Refinements von RELION. Die Partikel wurden dabei im Fourierraum mit der entsprechenden CTF

multipliziert, so dass die negativen Werte in den positiven Bereich gebracht und die Information der Partikel genutzt werden konnte (Abb. B.12 B) (Zhu et al., 1997). Die Aufnahmen wurden in einem Defokus-Bereich von 0,5-5 μm angefertigt. Durch die anschließende Mittelung der Werte wurde ein Großteil der Frequenzbereiche abgedeckt, die nun Kontrast zeigten (Abb. B.12 C). Ein Vorteil von RELION ist, dass es Partikel mit ähnlichen Defokus-Werten zu Gruppen zusammenfasst, und für diese Gruppen gleichzeitig die Korrektur berechnet. Diese Korrekturmethode beugt bei stark verrauschten Einzelbildern Rechenfehlern vor (Zhu et al. 1997).

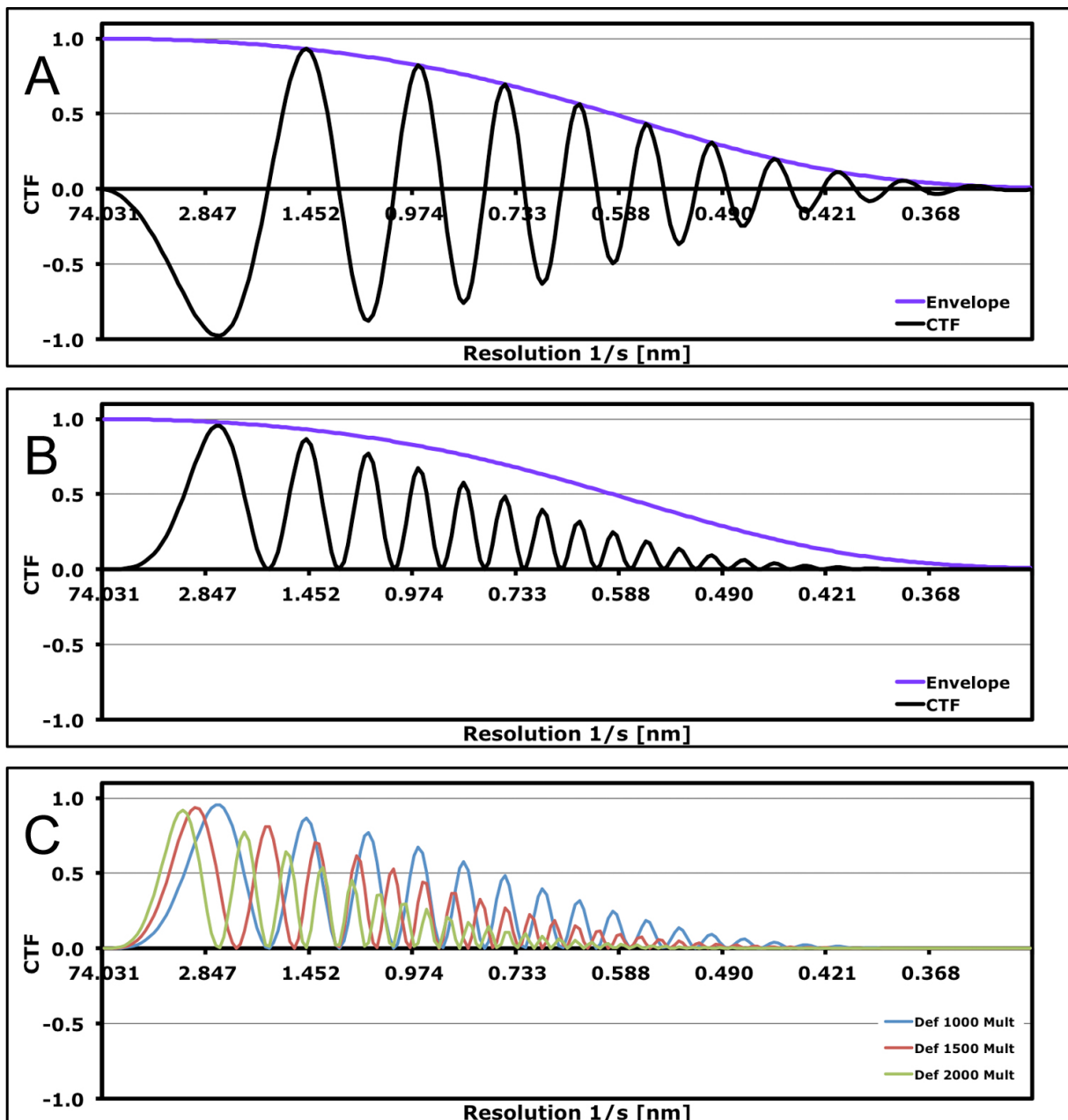


Abb. B.12: CTF-Berechnung mit Hilfe der Exceltabelle "CTF-Simulation" (Henning Stahlberg, Uni Basel). **A:** Simuliert wurde die CTF für das Tecnai G2 12 BioTwin bei einem Defokus von 1,0 μm . **B:** CTF-Korrektur. **C:** Mehrere Aufnahmen mit unterschiedlichen Defokus-Einstellungen heben die Nullstellen auf. So erhalten fast sämtliche Frequenzbereiche Kontrast.

6.5.3 Referenzfreie 2D-Klassifizierung.

Bei diesem Verfahren wurden die Einzelpartikel zu einem Gesamtbild aufaddiert. Dieses Bild diente anschließend als Referenz für die Zentrierung und Ausrichtung der Einzelpartikel. Es handelt sich hierbei um einen iterativen Prozess, wodurch sich die Positionierung und Orientierung der Partikel immer weiter verbessert. Gleichzeitig wurden in diesem Prozess auch Klassensummen von Partikeln mit gleicher Orientierung gebildet. Die Bildinformation des Partikels addierte sich dabei schneller auf als die des Rauschens (Schatz, 1992). Somit wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) verbessert und der Informationsgehalt des Bildes erhöht (Abb. B.13 A-D).

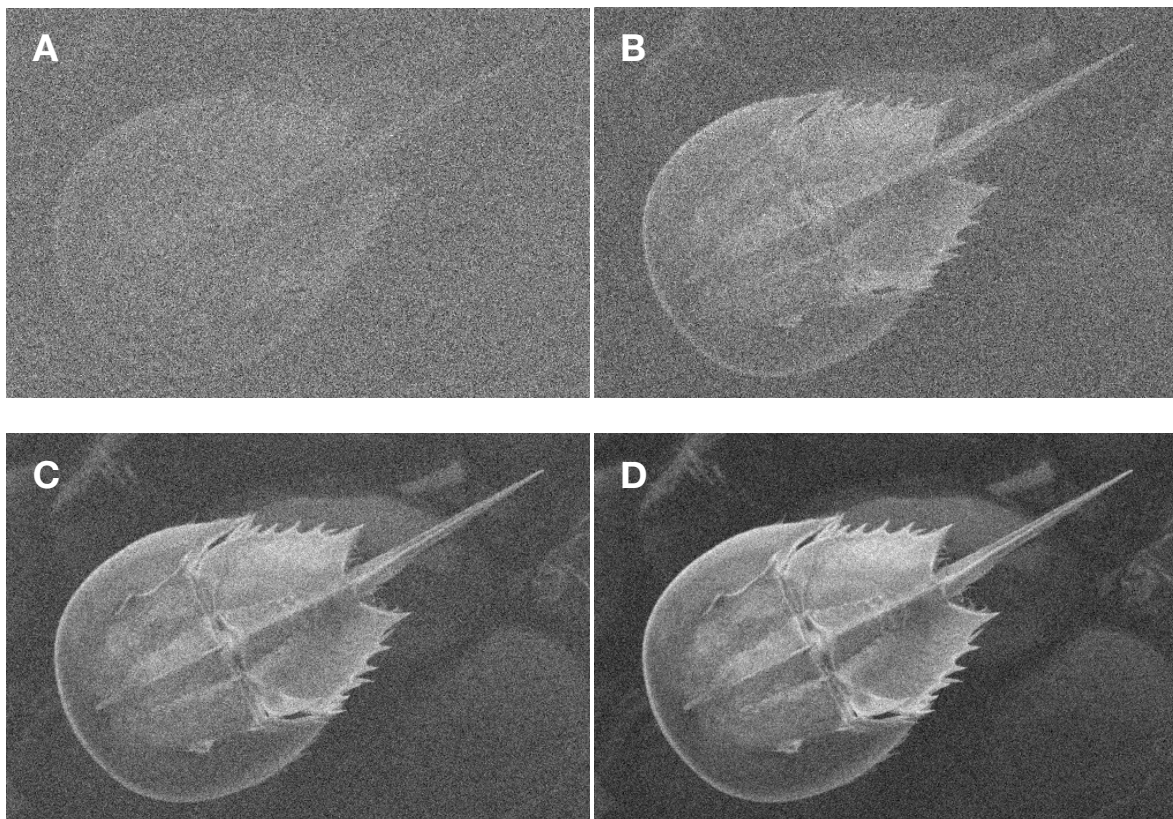


Abb. B.13: Aufsummierung von zufällig verrauschten Bildern mit demselben Objekt (*Limulus polyphemus*). **A:** Summation von 10 Bildern. **B:** Summation von 100 Bildern. **C:** Summation von 600 Bildern. **D:** Summation von 1200 Bildern. Man erkennt, dass sich mit zunehmender Bilderzahl das Rauschen stark reduziert und der Informationsgehalt ansteigt.

Insgesamt wurden zwischen 500-1000 Klassen gebildet. Partikel, die keiner Klasse zuzuordnen waren, wurden in kleinere Klassen mit ähnlichen Partikeln gesammelt. Die Summenbilder dieser Klassen zeigten, dass sie nichts mit dem zu untersuchenden Hämocyanin zu tun hatten, und wurden daher aussortiert. Die 2D-

Klassifizierung ist eine gute Lösung, um weitere „falsche“ oder teilweise zerstörte Partikel aus dem Datensatz zu entfernen.

Für die weitere Berechnung wurden nur die besten Klassen ausgewählt (Abb. B.14). Mit den darin enthaltenen Einzelpartikeln wurde ein neuer Partikelstapel erstellt, der dann im nachfolgenden 3D-Refinement berechnet wurde.

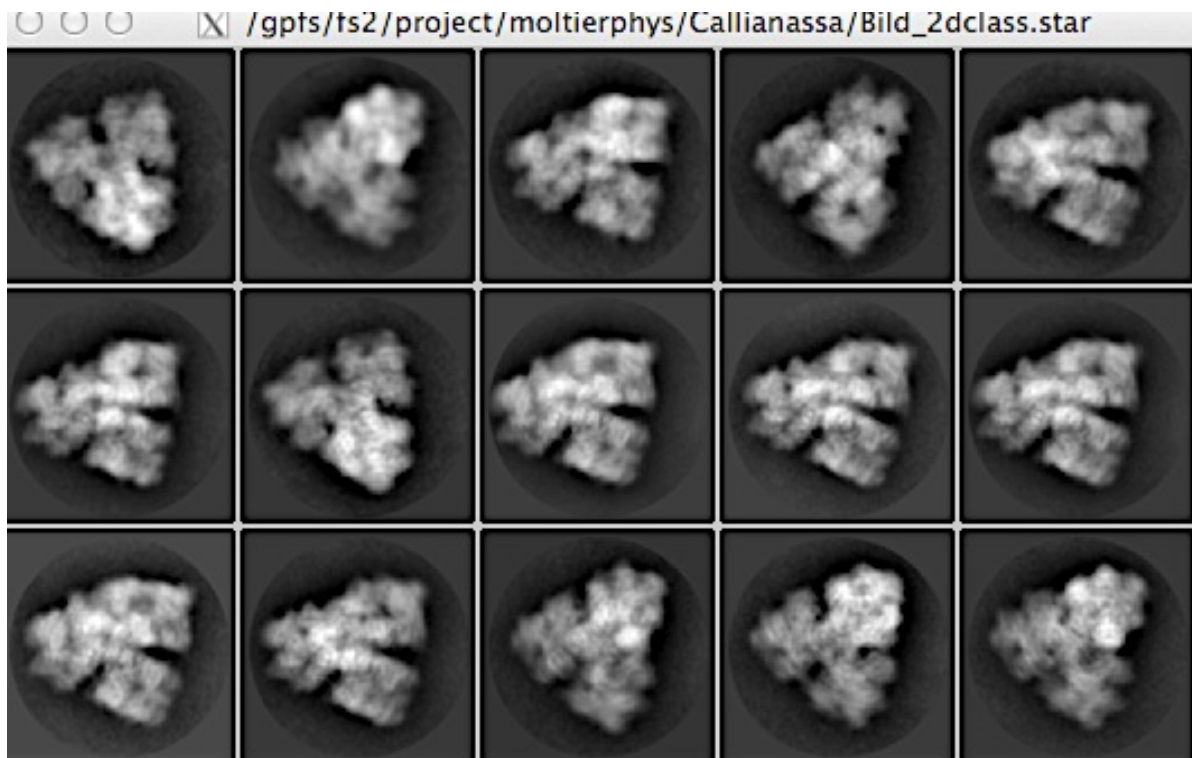


Abb. B.14: Beispiel einer Auswahl von 2D-Klassen des Hämocyanin-Datensatzes von *C. truncata*. Anhand der Klassensummen sind die Positionen der einzelnen Hexamere bereits gut zu erkennen.

6.5.4 Eulerwinkel/Winkelbestimmung

Eulerwinkel

Die aufgereinigten Datensätze des Hämocyanins von *L. polyphemus*, *C. truncata* und *L. oceanica* wurden nun mit dem 3D-Refinement-Modul von RELION berechnet. Der finale Datensatz des deoxy-8x6mers von *L. polyphemus* enthielt 10.290 Partikel des Hämocyanins. Der Datensatz des oxy-8x6-mers von *L. polyphemus* bestand aus 29.125 Einzelpartikeln. Der Datensatz von *C. truncata* enthielt 45.852 Partikel und der Datensatz von *L. oceanica* bestand aus 68.971 Einzelpartikeln.

Um nun eine 3D-Rekonstruktion des entsprechenden Proteins zu berechnen, müssen die Winkel der 2D-Projektionen im dreidimensionalen Raum bestimmt werden. Die Winkelbestimmung ist einer der zeitaufwändigsten Prozesse während der 3D-Rekonstruktion.

Die EM-Projektionsbilder haben 6 Freiheitsgrade:

- die Positions- bzw. Translations-Freiheitsgrade x , y und z
- die Winkel- bzw. Rotations-Freiheitsgrade α , β und γ (Eulerwinkel)

Der Winkel α beschreibt die Drehung des Moleküls in der von x und y aufgespannten Ebene, während β die Drehung in der von y und z gebildeten Ebene zeigt, und γ die der Ebene von z und x . (Die z -Achse, x -Achse und y -Achse sind die jeweiligen Normalvektoren zu den entsprechenden Ebenen). Die Molekülachse mit der höchsten Symmetrie wird als Molekülvektor definiert (geht durch den Ursprung des Koordinatensystems). An diesem werden die Eulerwinkel relativ zum Bild-Koordinatensystem abgemessen. Man würde so die Projektion dieser gedachten Molekülachse auf der Bildebene sehen.

Man nimmt an, dass die z -Position des Moleküls einen festen Wert hat, da alle Moleküle in der gleichen planaren Bildebene liegen (von x und y aufgespannte Ebene). Damit bleiben 5 Freiheitsgrade übrig, die für eine 3D-Rekonstruktion ausgerichtet bzw. klassifiziert werden müssen (Abb. B.15):

- x , y und α , die in der Bildebene liegen (In-Bildebene-Freiheitsgrade)
- β und γ , die nicht in der Bildebene liegen (Nicht-Bildebene-Freiheitsgrade)

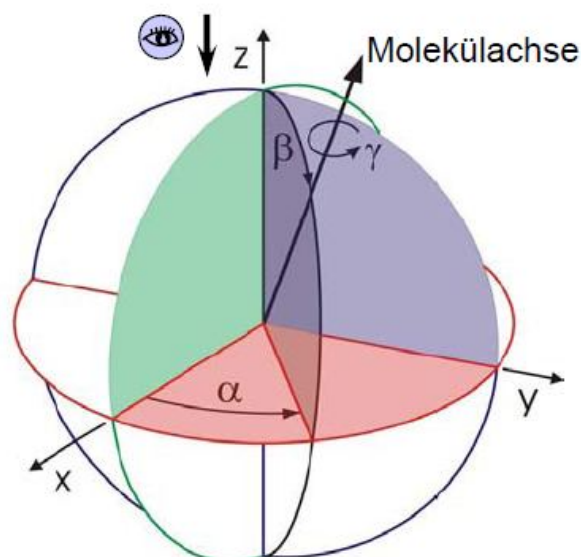


Abb. B.15: Definition der Eulerwinkel in einem Koordinatensystem. Die Lage und Orientierung des Moleküls werden durch die drei Eulerwinkel α , β und γ eindeutig festgelegt (nach Stohr 2002).

Bei den „In-Bildebene-Freiheitsgraden“ geben die x- und y-Koordinaten die Lage innerhalb der Bildebene wieder. Der Winkel α beschreibt die Drehung der Projektion der Molekülachse in der Bildebene. Diese Freiheitsgrade können nach einem rotationalen Alignment entfernt werden.

Somit bleiben die unbekanntes „Nicht-Bildebene-Freiheitsgrade“ übrig. β ist hierbei der Kippwinkel zwischen der Molekülachse und der z-Achse des Koordinatensystems. Eine Seitenansicht hat einen β -Winkel von 90° , eine Top-Ansicht einen β -Winkel von 0° . Der Winkel γ beschreibt dabei den Drehwinkel des Moleküls um seine eigene Symmetrieachse (Molekülachse) (Abb. B.16).

Die Hämocyanine von *L. polyphemus* und *C. truncata* besitzen beide eine 2-fach-Symmetrie (D₂), d.h. nach einer Drehung von 180° um die Molekülachse kehrt die identische Ansicht wieder. Wenn die Molekülachse auf die z-Achse des Koordinatensystems fällt, dann drehen sich der Winkel α und γ in derselben Ebene (Heymann et al. 2005a). Das Hämocyanin von *L. oceanica* weist eine C₂-Symmetrie auf.

Die „Nicht-Bildebene-Freiheitsgrade“ β und γ von verschiedenen Molekülen enthalten die dreidimensionale Information. Ihre Werte müssen also bekannt sein, um eine 3D-Rekonstruktion zu erstellen.

Winkelbestimmung/Projektionstheorem

Die Grundlage zur genauen Winkelbestimmung der verschiedenen Ansichten im dreidimensionalen Raum ist das Projektionstheorem (Crowther et al. 1970). Es sagt aus, dass die 2D-Projektionsbilder eines Moleküls im Fourierraum einen zentralen Schnitt durch die 3D-fouriertransformierte Form des Moleküls darstellen. Das bedeutet, dass man bei zwei verschiedenen Molekülansichten eine gemeinsame Schnittlinie (Common Line) zwischen beiden 2D-Fourierschnitten ermitteln kann. Die Schnittlinie (Common Line) beschreibt dabei die räumliche Zuordnung im Bildraum. Man benötigt jedoch noch zwei weitere Schnittlinien, um die Orientierung des Moleküls exakt zu bestimmen. Diese zwei zusätzlichen Common Lines erhält man, wenn eine weitere 2D-Projektion zu den beiden anderen hinzugefügt wird. Die drei Common Lines legen zusammen die genaue dreidimensionale Anordnung eines Moleküls im Fourierraum fest (Abb. B.16 B).

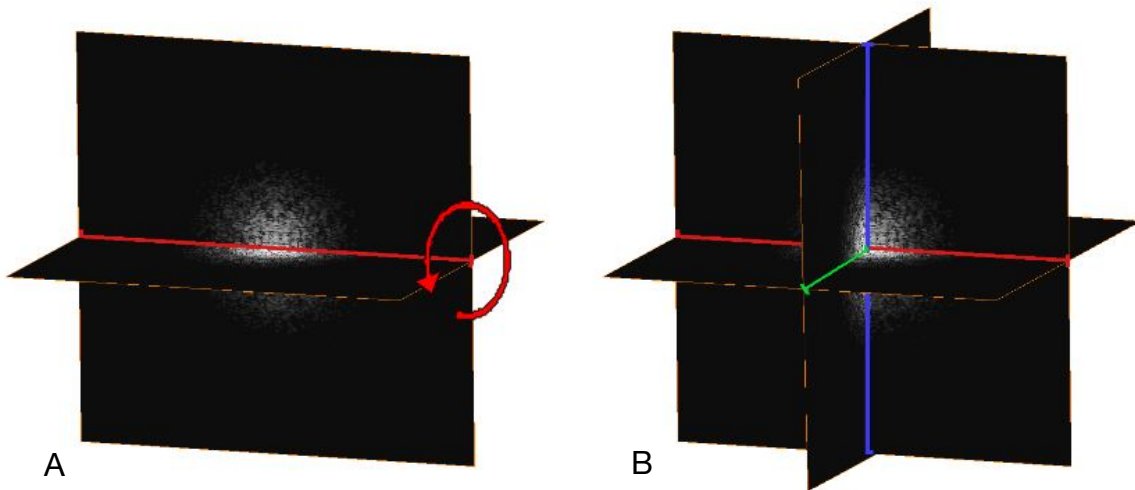


Abb. B.16: **A:** Die Common Line (rot) der beiden 2D-Projektionen kann die räumliche Anordnung des Moleküls nicht vollständig fixieren, da eine Rotation um die mittleren Bereiche weiter möglich ist. **B:** Durch eine weitere 2D-Projektion kommen zwei weitere Common Lines (grün und blau hinzu); die räumliche Orientierung der drei mittleren Bereiche ist somit fixiert (nach Gatsogiannis, 2009).

Um Common Lines zu finden, erstellt man eindimensionale Projektionen (Sinogramme) einer 2D-Projektion, welche hintereinander aufgereiht sind. Der Winkelabstand dieser Projektionen beträgt dabei jeweils 1° . Mit der Sinogramm-Korrelationsfunktion (van Heel, 1987; Schatz, 1992) werden die Sinogramme zweier 2D-Projektionen linienweise verglichen. Dazu werden zwischen allen Zeilen der Sinogramme die Kreuz-Korrelations-Koeffizienten bestimmt und als Helligkeitswerte untereinander in ein Sinogramm-Korrelationsbild geschrieben. Das Maximum in diesem Bild liefert die Information über die Common Line der beiden Bilder. Die Auswertung mehrerer Sinogramm-Korrelationsbilder liefert die relative räumliche Zuordnung des Moleküls. Bei Molekülen ohne Symmetrie wird beim Sinogramm nur ein Maximum angezeigt. Bei Molekülen, die eine Symmetrie aufweisen, ergeben sich zahlreiche symmetriebedingte Funktionsmaxima. (Bsp: Bei einem Molekül mit D2-Symmetrie haben zwei verschiedene 2D-Projektionen vier Common Lines gemeinsam).

RELION verwendet zu Beginn der Berechnung ein Startmodell, das als Referenz dient. Somit wird für jeden Partikel mit Hilfe eines iterativen Optimierungsalgorithmus, die Position sowie der zugehörige Projektionswinkel mit der höchsten Wahrscheinlichkeit berechnet. Das oben beschriebene Verfahren, das die Sinogramm-Korrelationsfunktion nutzt, wurde inzwischen weitestgehend durch ein neueres Verfahren ersetzt, das auf einem „expectation maximization“-Algorithmus beruht (Sigworth et al., 2010). Dabei werden zunächst von der Referenz Projektionen erstellt. Anschließend können durch die Maximum-Likelihood-Funktion, die der Algorithmus mit einbezieht, die Einzelpartikel der ähnlichsten Projektion zugeordnet

werden. Für jeden Partikel werden so die Eulerwinkel (α , β , γ) und die Translationskoordinaten (x , y) festgelegt (Winkelzuordnung, *expectation step*).

6.5.5 3D-Rekonstruktion

Die meisten der hierfür verwendeten Rekonstruktionsalgorithmen beruhen dabei auf dem bereits erwähnten Projektions-Theorem (DeRosier & Klug., 1968; Crowther et al., 1970). Dabei werden die unterschiedlich orientierten Projektionen im Fourierraum aufsummiert und anschließend invers dreidimensional fouriertransformiert. Man erhält so die 3D-Rekonstruktion des zu untersuchenden Proteins im Realbildraum.

Nachdem die räumlichen Koordinaten der verschiedenen Ansichten bekannt sind, werden diese mit Hilfe eines 3D-Rekonstruktionsalgorithmus zu einer 3D-Struktur zusammengeführt (Refinement, *maximization step*). Die errechnete 3D-Rekonstruktion geht dann wiederum für eine weitere Verfeinerung der Winkelbestimmung als neue Referenz in den Rechenprozess ein. Dieser iterative Prozess wiederholt sich solange, bis das System konvergiert (Frank et al., 2006; Sigworth et al., 2010; Scheres et al., 2012 (B)).

6.5.6 Prozessierung der Einzelbilder (*Frames*) / *movie-processing*

Wie bereits in Abschnitt 3.2 erwähnt, wurde der Datensatz mit den Aufnahmen des *L. polyphemus Hämocyanins* mit Hilfe des Video-Modes der Falcon 2 Kamera aufgenommen. Die 24 Movie-Frames einer Aufnahme wurden zunächst mit einer Frame-Alignment-Software bearbeitet (Li et al.; 2013). Hierbei werden alle Frames zueinander aligniert. Im Laufe der weiteren Prozessierung wurde nicht nur ein normaler Einzelpartikel-Stack der zusammengefassten Einzelbilder (Frames) erstellt sondern auch ein Einzelpartikel-Movie-Stack, in dem jeder Partikel mit seinen zugehörigen Einzelbildern vorliegt. Die erste 3D-Rekonstruktion wurde mit den zusammengefassten Aufnahmen durchgeführt (Eine Aufnahme setzt sich aus 24 Frames zusammen). Hierbei wurden die einzelnen Movie-Frames noch nicht in die iterative Verfeinerung mit einbezogen. In RELION 1.3 ist ein zusätzlicher *movie-processing*-Algorithmus implementiert, der speziell für das Alignment der einzelnen Frames der Einzelpartikel entwickelt wurde (Bai et al., 2013). Der Algorithmus erkennt dabei in den Einzelbildern die minimale Bewegung des Partikels, die während der Aufnahme durch den Elektronenstrahl auftritt (*beam induced motion*). Durch diese Bewegung ergibt sich eine Unschärfe im zusammengefassten Bild des

Einzelpartikels. Diese Bewegung kann durch den Algorithmus ermittelt werden, indem die Einzelbilder eines jeden Partikels zusammengefasst und erneut aligniert werden. Mit den nun alignierten Einzelbildern der jeweiligen Partikel wird ein erneutes 3D-Refinement durchgeführt. Dies trägt in den meisten Fällen zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung in der finalen 3D-Rekonstruktion des Proteins bei.

6.5.7 Nachbearbeitung der 3D-Rekonstruktion / Postprocessing

Im Anschluss des 3D-Refinements wurde die erstellte 3D-Rekonstruktion mit dem Programm „*relion_postprocess*“ nachbearbeitet. Hierbei wurden verschiedene Schritte der Nachbearbeitung in einem Modul zusammengefasst. Zur Vermeidung einer potentiellen Überinterpretation (Overfitting) der 3D-Rekonstruktion wurden aus allen 3D-Refinements unmaskierte 3D-Rekonstruktionen berechnet. Die nominelle Auflösung dieser 3D-Rekonstruktionen ist meist etwas schlechter, als sie real vorliegt. Um dies zu korrigieren, wurden die im Folgenden beschriebenen Berechnungen durchgeführt.

Automatische/Manulle Maskierung

Mit der Option der Automaskierung wurde für die drei unmaskierten 3D-Rekonstruktionen eine Maske erstellt, mit der jegliches Rauschen, das um die 3D-Dichtekarte auftrat, wegmaskiert wurde. Wichtig ist hierbei, dass die Maske keine scharfen Kanten besitzt, da diese zu Fehlern im Fourierraum führen können.

MTF-Korrektur (*modulation transfer function*)

Die MTF misst den Kontrast (Amplitudengang) über alle räumlichen Frequenzen bis zur Nyquist-Frequenz (die theoretische Auflösungsgrenze). Bei Elektronenmikroskopen wird die MTF bestimmt, indem man ein Bild an einer geraden Kante aufnimmt und mit Hilfe einer Software die ESF (*edge spread function*) berechnet, welche den Grad der Unschärfe des Bildes beschreibt. Die Fourier-Transformation der Ableitung der ESF ergibt die MTF. Ist dieser Wert für einen Detektor bekannt, kann dieser im Nachbearbeitungsprozess korrigiert werden (McMullan et al., 2009). Für die verwendete Falcon 2-Kamera wurde die MTF-Kurve benutzt, die man unter http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/relion/index.php/Analyse_results herunterladen konnte.

Schärfen/Sharpening

Bei Auflösungen im Bereich von 3-7 Å (bei denen Sekundärstrukturen erkennbar sind) besitzen hohe und niedrige Raumfrequenzen nicht mehr dieselbe Intensität (aufgrund des niedrigen SNR). Diese Intensitätsunterschiede müssen angepasst werden, um Details wie α -Helices und β -Faltblätter aufzulösen (Glaeser und Downing, 1992; Conway und Steven, 1999; Rosenthal und Henderson, 2003). Hierzu wird die Methode des "*b-factor sharpening*" angewandt. Für das Schärfen der 3D-Rekonstruktion des deoxy-Hämocyanins von *L. polyphemus*, wurde ein *B-Factor* von -447 \AA^2 automatisch berechnet und verwendet (Rosenthal and Henderson, 2003). Zur Schärfung der oxy-8x6-mer 3D-Rekonstruktion wurde ein *B-Factor* von -650 \AA^2 genutzt. Bei der 3D-Rekonstruktion des Hämocyanins von *C. truncata* ergab sich ein *B-Factor* von -227 \AA^2 , der zum Schärfen der Dichtekarte genutzt wurde. Für das Schärfen der 3D-Rekonstruktion von *L. oceanica* wurde der *B-Factor-Wert* von -500 \AA^2 übernommen.

6.5.8 Auflösungsbestimmung

Um eine Aussage über die Güte der errechneten 3D-Rekonstruktion zu treffen, muss deren Auflösung bestimmt werden. Hierbei gibt es diverse Ansätze, denen meistens die allgemeine Gleichung der Fourier-Shell-Korrelation zugrunde liegt:

$$FSC_{12}(q_i) = \frac{\sum_{q \in q_i} F_1(q) \cdot F_2(q)^*}{\sqrt{\sum_{q \in q_i} F_1^2(q) \cdot \sum_{q \in q_i} F_2^2(q)}}$$

Bei F_1 und F_2 handelt es sich um zwei dreidimensionale Dichten, die über Schalen (shells) q_i im Fourierraum als Funktion der Frequenz q miteinander verglichen werden (Harauz & van Heel, 1986; van Heel & Schatz, 2005).

In dieser Arbeit wurden alle errechneten Auflösungen mit der „*Gold-Standard*“-Methode bestimmt. Hierbei werden zu Beginn der Berechnung der 3D-Rekonstruktion die Partikel in zwei Datensätze aufgeteilt und unabhängig voneinander berechnet. Aufgrund dieser aufgeteilten Prozessierung spielt aligniertes Rauschen während der Berechnung kaum noch eine Rolle. Eine mögliche Überinterpretation (Overfitting) der 3D-Dichtekarte ist dadurch stark eingeschränkt.

Die Auflösung der 3D-Rekonstruktionen kann über den FSC-Wert: 0.143 ermittelt werden.

Eine alternative Auflösungsbestimmung bietet das 0.5-Kriterium (Beckmann, 1997 ; Böttcher et al., 1997; Conway et al.,1997; van Heel and Schatz, 2005). Hierbei wird der Datensatz am Ende des 3D-Refinements in zwei zufällige Hälften aufgeteilt, aus denen jeweils eine Dichtekarte berechnet wird. Beide werden anschließend miteinander korreliert.

7. Einpassen atomarer Modelle

7.1 Starres Einpassen atomarer Modelle in die 3D-Rekonstruktion (rigid body fitting)

Um genauere Aussagen über die Struktur und Funktion des betreffenden Proteins zu treffen, können atomare Modelle (die z.B. mit Hilfe der Röntgenkristallographie ermittelt wurden) in die 3D-Dichtekarte des entsprechenden Proteins eingepasst werden. Die Tertiärstruktur des atomaren Modells wird dabei nicht verändert (*rigid body fitting*). Das Einpassen wurde mit dem Programm UCSF CHIMERA durchgeführt. Hierbei wird mit dem Modul „fit in map“ das atomare Modell rotational und translational in die Dichtekarte hineingepasst, bis die Korrelation zwischen beiden am größten ist.

7.2 Flexibles Einpassen der atomaren Modelle in die 3D-Rekonstruktion (flexible fitting)

Nachdem man die atomaren Modelle mit der Methode des „*rigid body fitting*“ eingepasst hat, kann die Korrelation der Struktur mit der Dichtekarte nochmals erhöht werden, indem man die atomare Struktur flexibel in die Dichtekarte einpasst. Hierbei können sich die Sekundär- und Tertiärstrukturen des atomaren Modells in einem vorher festgelegten Rahmen bewegen. Dies wurde mit der Software DireX (Schröder et al., 2007, Wang & Schröder, 2012) durchgeführt. Das Programm berechnet schrittweise Dichtekarten der atomaren Struktur und vergleicht diese mit der errechneten 3D-EM-Rekonstruktion. Atome die sich in einer geringeren Dichte befinden, werden in die Richtung der höheren Elektronendichte verschoben und

anschließend wird eine neue Dichtekarte simuliert (Wang and Schröder, 2012). Ist die Korrelation nun höher, wird mit der neuen Struktur weitergerechnet. Um die Veränderungen der atomaren Struktur zu bestimmen, nutzt das Programm spezielle genetische Algorithmen. Wichtig sind hierbei verschiedene Kontrollparameter, die anzeigen, ob die flexible Einpassung des atomaren Modells in die 3D-Dichtekarte plausibel ist (de Groot et al., 1997; Schröder et al., 2007; Wang and Schröder 2012).

8. Molekulardynamische Simulationen mit GROMACS

Mit MD-Simulationen ist es möglich, sehr genaue Ergebnisse in Bezug auf die Interaktion von Proteinstrukturen zu erhalten (Sutmann, 2002).

Mit dem Programm GROMACS ist es möglich, das Verhalten von Proteinstrukturen in einer vorgegebenen Umgebung (Puffer, pH-Wert, Temperatur, Druck) *in silico* näher zu beschreiben und anschließend zu analysieren. Zu Beginn nimmt man das flexible eingepasste atomare Modell und betrachtet dann z.B. eine bestimmte Kontaktstelle zwischen zwei oder drei Untereinheiten. Diese Untereinheiten werden separat in ihrer Position abgespeichert und dann mit GROMACS für die bevorstehende Simulation vorbereitet. Zunächst wird ein angemessenes Kraftfeld ausgewählt, das mit den Besonderheiten einer Proteinstruktur umgehen kann. In den hier vorliegenden Simulationen wurde das AMBER99SB-ILDN Kraftfeld verwendet, das sich für Simulationen mit Proteinen sehr gut eignet (Hornak et. al., 2006; DePaul, Thompson, Patel, Haldeman, & Sorin 2010). Ebenso werden die Boxgröße für die Simulation, das Wassermolekülmodell (TIP3P) (Mahoney & Jorgensen, 2000) sowie die atomare Struktur angepasst. Anschließend wird für das erstellte System eine Energieminimierung durchgeführt (Hess et al., 2013). Dadurch kann thermisches Rauschen, das zu Beginn einer MD-Simulation auftritt, minimiert werden. Falls die Ausgangskonfiguration des Systems nicht im energetischen Gleichgewicht ist, können bei der MD-Simulation Fehler auftreten, die die gesamte Simulation abbrechen. Nach der Energieminimierung wird die Pufferzusammensetzung des Systems angepasst. Um das System weiter zu optimieren, werden die Temperatur und der Druck mit kurzen Simulationen angepasst. Anschließend kann mit der eigentlichen MD-Simulation begonnen werden. Die atomaren Modelle der Untereinheiten sind nun in einem Simulationsraum mit periodischen Randbedingungen integriert. Die Struktur sowie auch die einwirkenden Kräfte können durch die Ränder auf der gegenüberliegenden Seite wieder eintreten. Am Ende einer Simulation erhält man eine Trajektorie, die alle Atomkoordinaten für das simulierte System enthält. Die Bewegung der beteiligten Atome kann somit über die vorher bestimmte Simulationszeit genau verfolgt werden.

Alle durchgeführten Simulationen in der vorliegenden Arbeit hatten eine Länge von 100 Nanosekunden (ns). Abbildung B. 17 zeigt die Arbeitsschritte (Workflow) zur Vorbereitung einer MD-Simulation.

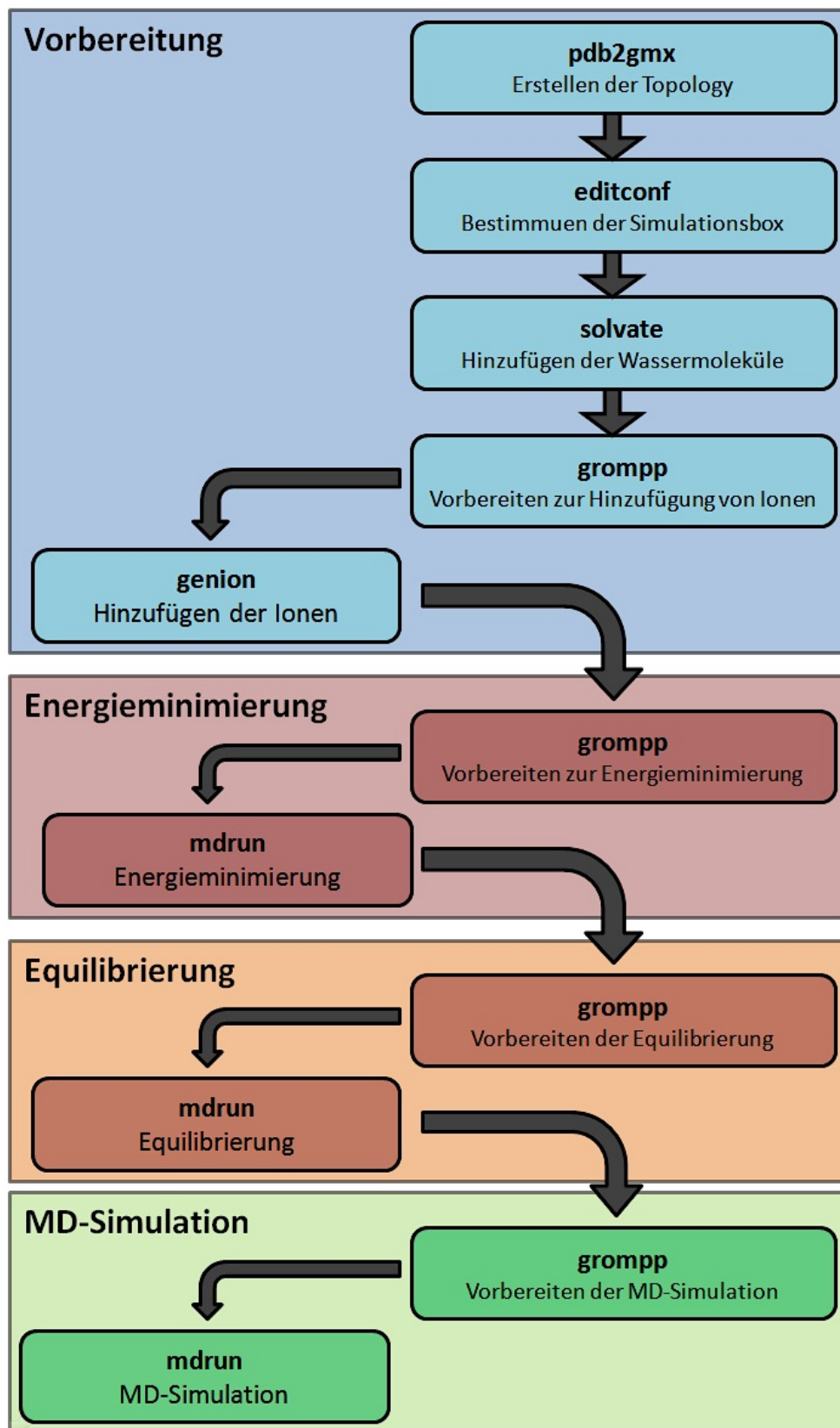


Abb. B.17: Workflow der Vorbereitung des MD-Systems und Durchführung einer MD-Simulation mit GROMACS

9. Funktionsweise von RELION

Die frei erhältliche Software RELION gehört zu den neuesten Programmen, die zur Berechnung von 3D-Dichtekarten verschiedener Proteinstrukturen eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden sämtliche finale Strukturen mit dieser Software berechnet. Im Vergleich zu anderen Software-Paketen, die für die Berechnung solcher 3D-Strukturen ausgelegt sind, beinhaltet RELION einige neue Algorithmen, die eine andere Herangehensweise zur Berechnung von Kryo-EM Daten erlauben. Dabei spielen vor allem zwei wichtige Implementierungen eine Rolle: ein spezielles statistisches System, das bei den Refinements angewandt wird, sowie die Berechnung der Goldstandard-FSC (*fourier shell correlation*). Im Vergleich zu anderen Programmen, bei denen die ursprünglichen Berechnungsschritte zu einer 3D-Dichtekarte separat ausgeführt werden, berechnet RELION nur eine einzige Wahrscheinlichkeitsfunktion, was einen viel geringeren Arbeitsaufwand für den Benutzer bedeutet (Scheres., 2012 (B)). Dieser neu entwickelte Algorithmus folgt der Bayesschen Statistik, die verschiedene Wahrscheinlichkeitsverteilungen einbezieht. Im Satz von Bayes werden Daten einer bereits bekannten Berechnung über die zu untersuchende Variable (a priori-Verteilung) mit den Daten neuerer Berechnungen kombiniert (Likelihood-Methode), woraus sich dann neue verbesserte Daten ergeben (a posteriori-Wahrscheinlichkeitsverteilung). Diese Verteilung kann wiederum für erneute Berechnungen genutzt werden, wenn wieder neuere Daten zur Verfügung stehen. Man benötigt also für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit eines neuen 3D-Modells ein schon vorhandenes Modell (Kucukelbir et al., 2012). RELION nutzt dafür die Gauss-Verteilung der Fourier-Komponenten des eingesetzten Referenz-Modells. Dieses Referenz-Modell ist in der Regel meist geglättet, was durch einen hohen Filterwert erreicht werden kann (60-80Å) (Scheres, 2012 (A)). Aufgrund der Verwendung des gefilterten Referenzmodells ist der Algorithmus sehr unempfindlich gegenüber einer möglichen Überinterpretation (Over-Refinement) des Modells. Im Gegensatz zu anderen 3D-Refinement Algorithmen werden den Partikeln keine diskreten Orientierungen zugeordnet, nachdem sie an der Referenz ausgerichtet wurden, sondern es werden gewichtete Wahrscheinlichkeitsintegrale für alle möglichen Orientierungen berechnet. In die 3-D Rekonstruktion fließen also Partikelprojektionen ein, die viele verschiedene Orientierungen nach der Gauss-Verteilung aufweisen. Welche Auflösung (Schärfe) die 3D-Rekonstruktion hat, hängt davon ab, wie stark die EM-Aufnahmen verrauscht sind. Sind die EM-Aufnahmen stark verrauscht, ergibt sich eine hohe Verteilung der verschiedenen Orientierungen einer Projektion, was zur Folge hat, dass die finale Rekonstruktion schwächer aufgelöst ist. Wenn die Aufnahmen kaum verrauscht sind, gilt genau das Gegenteil.

Der zweite wichtige Bestandteil des Programms RELION ist die Berechnung der Gold-Standard-FSC. Hierbei wird der Datensatz in zwei Hälften aufgeteilt, die dann separat berechnet werden (Henderson et al., 2012). Dadurch wird eine Korrelation des Bildrauschens, die bei der Berechnung des gesamten Datensatzes vorkommen kann, gänzlich vermieden. Die Auflösungsbestimmung durch die Berechnung der FSC wird damit genauer (Grigorieff, 2000). Das Signal/Rausch-Verhältnis zwischen beiden Rekonstruktionen wird dabei für jede Iteration neu berechnet und für den oben erwähnten Filterwert genutzt, der folgendermaßen definiert ist.

$$SNR^{MAP}(v) = \frac{FSC(v)}{1 - FSC(v)}$$

Der Terminus v steht hierbei für die Raumfrequenz (Scheres, 2012 (B)). In diese Berechnung fließen vor allem die Erkenntnisse von Frank & Al-ali (1975) ein, die die Möglichkeit zur Berechnung des Signal/Rausch-Verhältnisses bestätigten, indem sie die Kreuz-Korrelation zwischen zwei Bildern eines Datensatzes verwendeten.

$$SNR = \frac{CC}{1 - CC}$$

Für die finale 3D-Rekonstruktion werden am Ende des Refinements die zwei separaten Datensätze wieder zusammengefasst. So erhält die 3D-Rekonstruktion eine bessere Auflösung. Die Gefahr, dass man aufgrund des Refinements zweier separater Datensätze, im Vergleich zum Refinement des kompletten Datensatzes, eine schlechtere Auflösung der 3D-Rekonstruktion erhält, wurde von Scheres & Chen (2012) mit verschiedenen Versuchen widerlegt.

Aufgrund dieser Tatsache sowie des oben beschriebenen neuen Refinement-Algorithmus erhalten die mit RELION erstellten 3D-Rekonstruktionen so gut wie keine Artefakte (simulierte Strukturen), die durch ein Over-Refinement entstehen können.

Weitere Informationen und Details zu dem Algorithmus und dem Programm RELION sind in den Publikationen von Scheres (2012 (A) und (B)) zu finden.

C. Ergebnisse

1. 3D-EM des Hämocyanins von *L. polyphemus*

1.1 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers von *L. polyphemus* mit RELION

Eine besondere Herausforderung stellte bei diesem Projekt die Probenpräparation dar. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das Protein im deoxygenierten Zustand mit der Cryo-EM-Methode in verschiedenen Puffersystemen größere Cluster bildete (Abb. C.1 A). Eine erfolgreiche Einzelpartikelanalyse war unter diesen Umständen nicht durchzuführen. Die Lösung dieses Problems war, das Hämocyanin mit proteinfreier Hämolymphe zu verdünnen. Das Protein lag dann in seinem natürlichen Medium vor. Die zellfreie Hämolymphe wurde dazu mit einem 5 kDa-Filter proteinfrei gemacht und der Durchfluss zur Probenverdünnung des aufgereinigten Hämocyanins verwendet. So konnte eine Clusterbildung des Hämocyanins weitestgehend verhindert werden (Abb. C.1 B). Die Hämocyaninprobe wurde zunächst in den deoxy-Zustand („deoxy-8x6-mer“) überführt. Von dieser Probe wurden Cryo-EM-Grids für die Cryo-Elektronenmikroskopie erstellt.

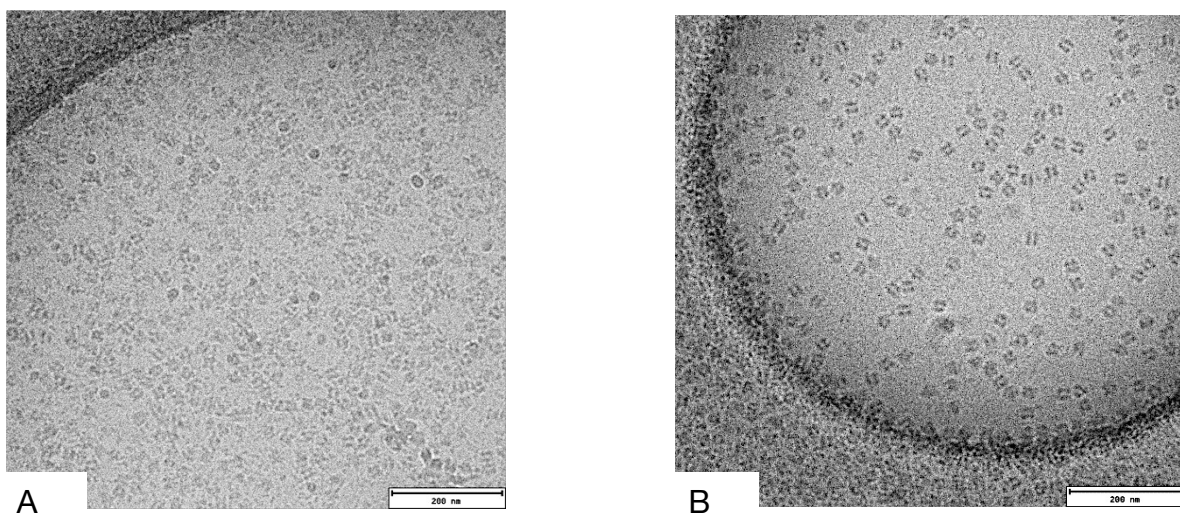


Abb. C.1: Cryo-EM-Aufnahme des deoxy-8x6-mers. **A:** In einem Standardpuffer (Tris/HCL-Puffer mit 20mM CaCl_2 und 20mM MgCl_2 , pH-Wert: 7,5). Das Hämocyanin bildete diverse Cluster aus, die eine Einzelpartikelanalyse unmöglich machten. **B:** Das 8x6mer in proteinfreier Hämolymphe. Es ist eine gute Verteilung der einzelnen Partikel zu erkennen, so dass eine anschließende Einzelpartikelanalyse möglich war.

Der Datensatz des deoxy-8x6-mers wurde am MPI für Biophysik in Frankfurt aufgenommen. Ein großer Vorteil war, dass die EM-Bilder alle mit einer neuen Kamera, der Falcon 2 (Direct Electron Detection Device), aufgenommen werden konnten. Diese neue Technik versprach qualitativ hochwertigere Bilder mit einem stark verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis, im Vergleich zu Aufnahmen die mit gewöhnlichen CCD-Kameras oder auf Film erstellt wurden. Die Auflösung der Aufnahmen lag bei 1,77 Å/pix. Aus den insgesamt 833 Aufnahmen wurden halbautomatisch mit dem Modul e2boxer.py 31.489 Partikel extrahiert. Mit diesen wurden mit dem Programm RELION die ersten referenzfreien 2D-Klassifizierungen durchgeführt. Hierbei konnten falsch ausgewählte Partikel (*false-positive*) bzw. Partikel minderer Qualität herausgefiltert werden, die in den nachfolgenden Berechnungen nicht mehr mit einbezogen wurden, um die Qualität der finalen 3D-Rekonstruktion zu verbessern. Nach dem Säubern des Datensatzes konnten 10.290 Einzelpartikel für das anschließende 3D-Refinement verwendet werden. Hierbei wurde das Goldstandard-FSC-Verfahren angewendet (Rosenthal and Henderson, 2003). Dabei wird der gesamte Datensatz in RELION automatisch in zwei Hälften aufgetrennt und unabhängig voneinander berechnet. Eine mögliche Überinterpretation der errechneten 3D-Rekonstruktion ("*collection of noise*") ist damit sehr unwahrscheinlich.

Als Referenz für das Refinement wurde eine auf 60 Å gefilterte 3D-Rekonstruktion des 8x6-mers von *L. polyphemus* verwendet. Nach insgesamt 24 Iterationen wurde eine 3D-Rekonstruktion des Hämocyanins mit einer Auflösung von 8,2 Å (nach Gold-Standard) errechnet. Diese 3D-Rekonstruktion diente nun als Vorlage für das finale 3D-Refinement, das zusätzlich eine Movie-Prozessierung mit einbezog (siehe Material & Methode B.3.3). Durch dieses zusätzliche Alignment der Einzelbilder der jeweiligen Partikel konnten jegliche Effekte, die eine Unschärfe des Partikels (durch leichte Partikelbewegungen im Eis) zur Folge hatten, korrigiert werden. Nach 17 Iterationen war das 3D-Refinement inklusive Movie-Prozessierung abgeschlossen. Die Auflösung der finalen 3D-Rekonstruktion betrug 7,3 Å nach Gold-Standard (Abb. C.2).

Die genauen Abmessungen der verschiedenen nx6-mere sowie die Distanzen zwischen den Hexameren wurden mit dem Programm Chimera bestimmt.

Die bereits bekannte D2-Symmetrie des 8x6-mers (Lamy et al., 1982; van Heel et al., 1994; Martin et al., 2007; Dejung, 2014) wurde mit der 7,3 Å-Struktur des deoxy-8x6-mers bestätigt. Die Abmessungen der 3D-Rekonstruktion betragen 275 Å (x-Achse) x 280 Å (y-Achse) x 270 Å (z-Achse) (Abb. C.3 A+B).

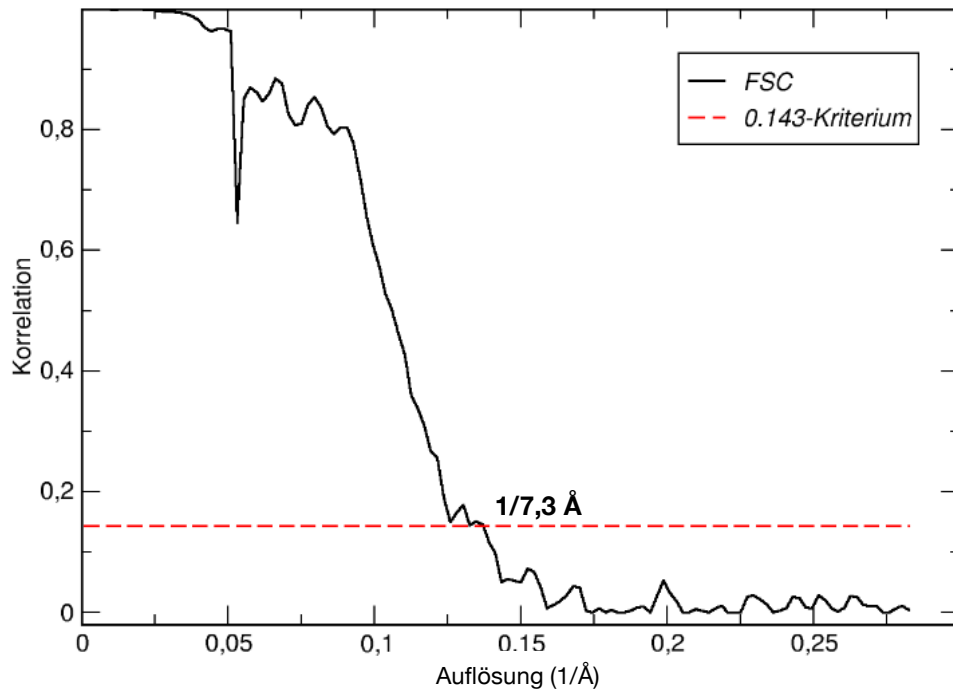


Abb. C.2: Auflösungsbestimmung mit Hilfe der Fourier-Schalen-Korrelation (FSC) der finalen 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers. Die Auflösung wird hier durch das 0,143-Kriterium festgelegt (Gold-Standard-Verfahren). Es handelt sich dabei um den reziproken Wert der Raumfrequenz am Schnittpunkt der FSC-Kurve mit dem y-Wert 0,143. Daraus ergibt sich für die 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6mers eine Auflösung von 7,3 Å.

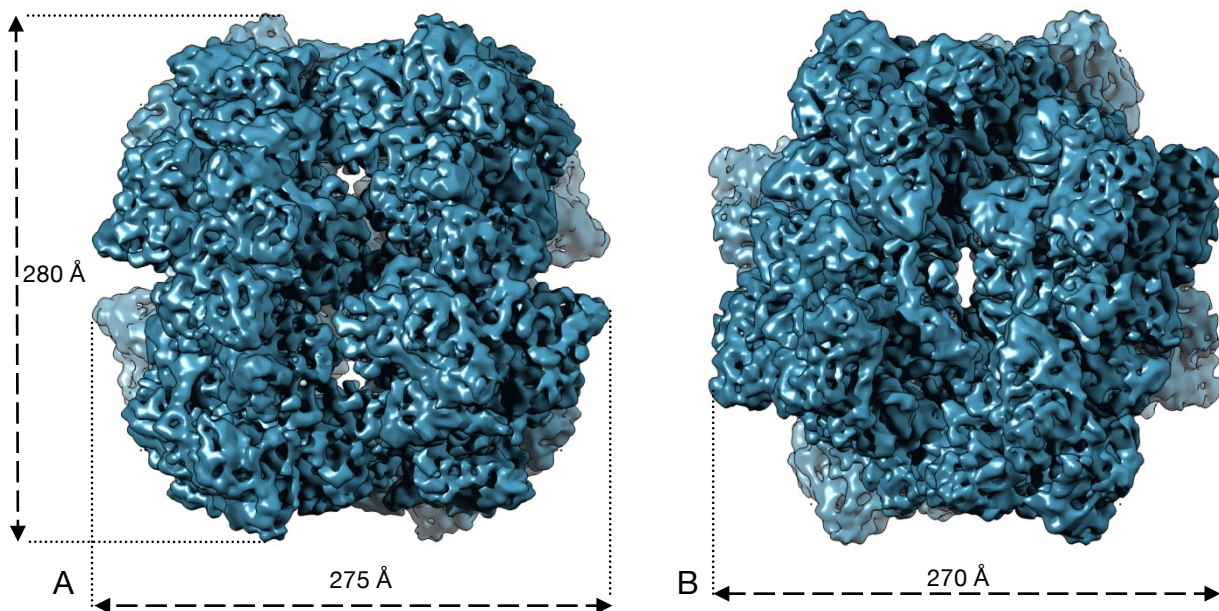


Abb. C.3: 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers von *L. polyphemus* mit einer Auflösung von 7,3 Å.
A: Ansicht entlang der z-Achse mit den Maßen der x-Achse (280 Å) und der y-Achse (275 Å)
B: Ansicht entlang der y-Achse mit der Abmessung der z-Achse (270 Å).

Die acht Hexamere der Quartärstruktur sind in der 3D-Rekonstruktion leicht zu identifizieren (Abb. C.4 A). Die Maße für das 1x6-mer betragen ca. 130 Å (x-Achse) x 115 Å (y-Achse) x 100 Å (z-Achse) (Abb. C.4 B). Das asymmetrische 2x6-mer bildet die Grundeinheit des 8x6-mers und besitzt eine Höhe von 215 Å. Der Abstand zwischen den beiden Hexameren (1x6-mer) des 2x6-mers beträgt in der vorliegenden 3D-Rekonstruktion 105 Å. Das obere Hexamer (rot) des 2x6-mers ist um 113° gegenüber dem unteren Hexamer (grün) verdreht (Abb. C.4 C).

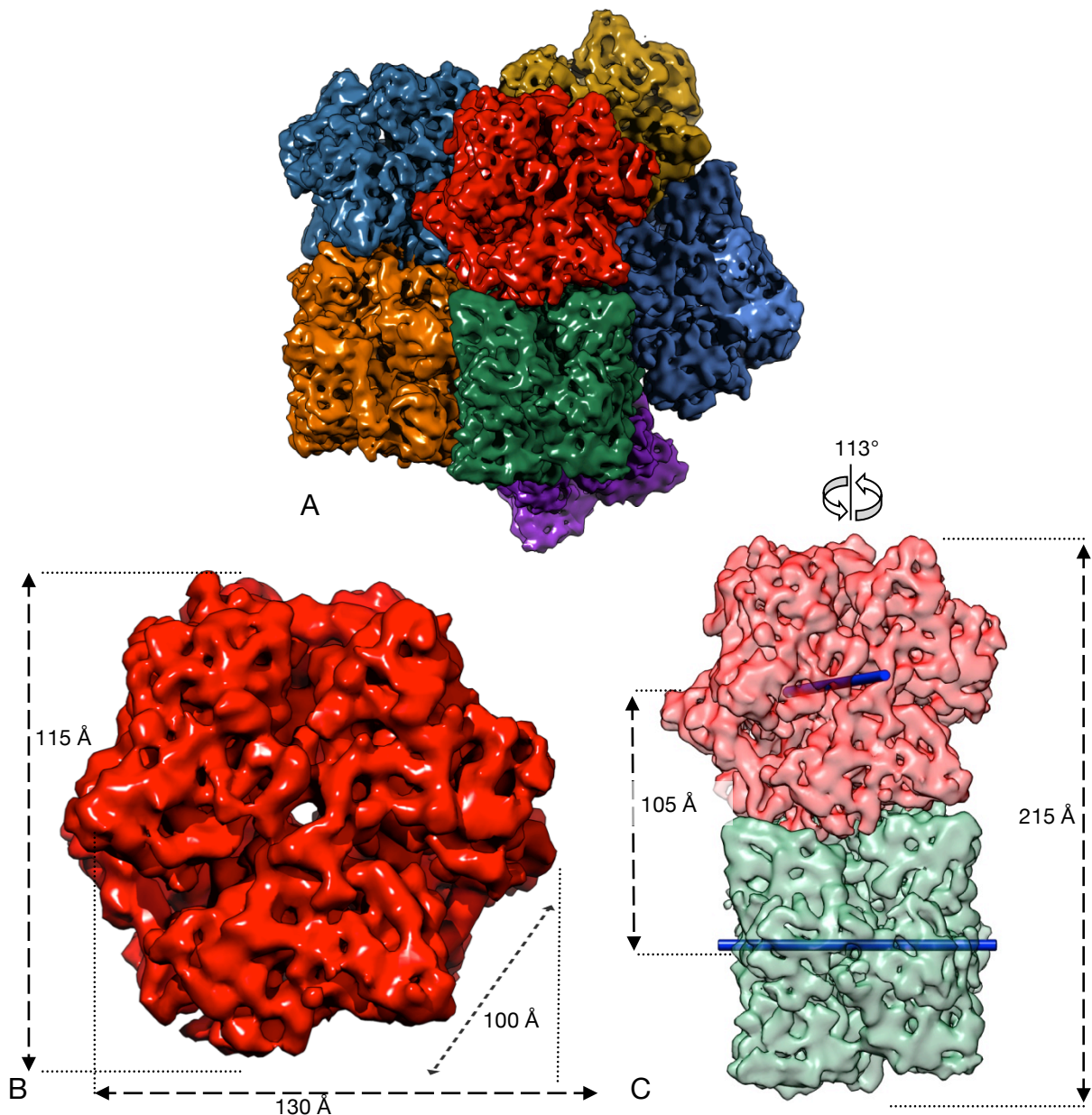


Abb. C.4: Ansicht auf das **(A)** 8x6-mer, **(B)** 1x6-mer und **(C)** 2x6-mer. **A:** Die acht Hexamere des deoxy-LpH sind unterschiedlich eingefärbt. **B:** Das 1x6-mer mit den Maßen 130 Å (x-Achse) x 115 Å (y-Achse) x 100 Å (z-Achse) **C:** Das asymmetrische 2x6-mer mit dem gemessenen Abstand zwischen den beiden Hexameren (105 Å), der Gesamtlänge (215 Å) und der Verdrehung des oberen Hexamers entlang der Längsachse des 2x6-mers (113° gegen den Uhrzeigersinn).

Insgesamt gibt es vier 2x6-mere, von denen je zwei ein 4x6-mer bilden. Die beiden 2x6-mere des 4x6-mers weisen eine antiparallele Orientierung auf und sind relativ zueinander um 12 Å verschoben. Diese Verschiebung führt dazu, dass das 4x6-mer nicht planar ist. Als Konsequenz daraus ergeben sich für das 4x6-mer zwei unterschiedliche Aufsichten, die als Flip- und Flopaufsicht bezeichnet werden (van Heel und Frank, 1981; van Heel und Dube, 1994; Martin et al., 2007). Betrachtet man die Flop-Seite des 4x6-mers überragt das linke 2x6-mer das rechte 2x6-mer (Abb. C.5 A).

Betrachtet man die Längsachsen der beiden 2x6-mere, kann man erkennen, dass diese um einen sogenannten Kippwinkel ("rocking angle") gegeneinander verdreht sind. Dieser Winkel beträgt in der 7,3 Å-Struktur 12° (Abb. C.5 B).

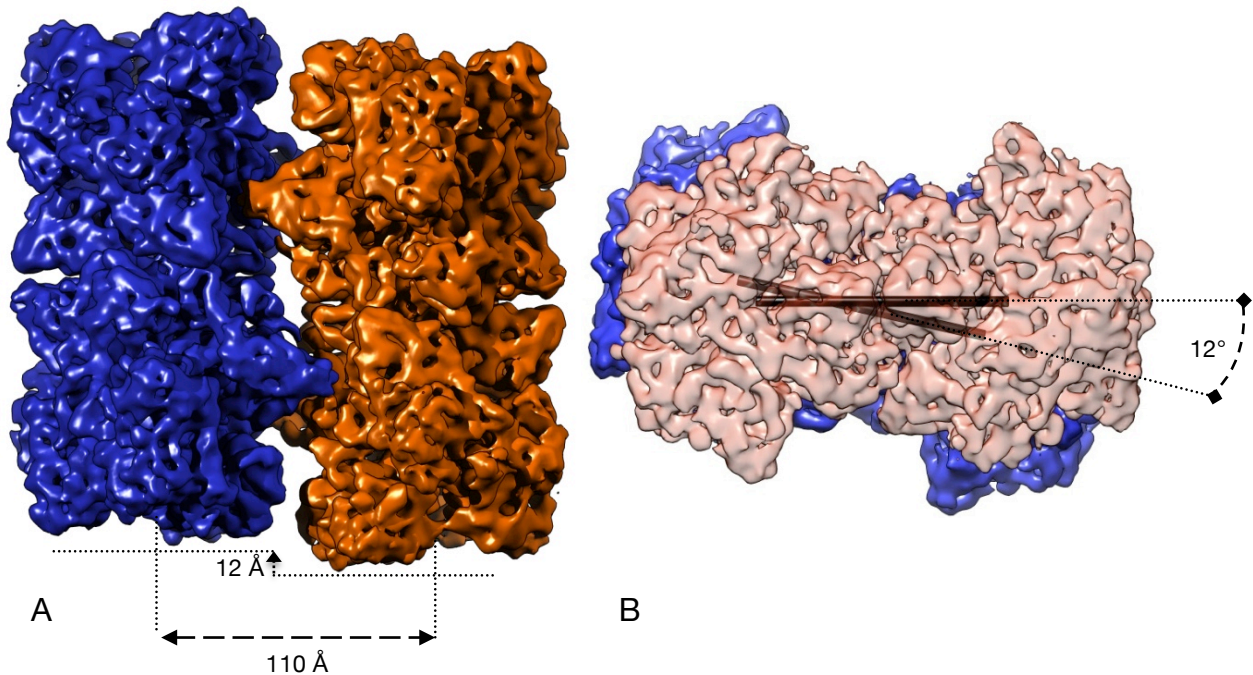


Abb. C.5: Ansicht auf die **(A)** Flop-Seite des 4x6-mers und **(B)** entlang der x-Achse. Die beiden 2x6-mere, die das 4x6-mer bilden, sind unterschiedlich eingefärbt (blau und orange) **A:** Der Abstand der Massenschwerpunkte der beiden 2x6-mere beträgt 110 Å. Die Verschiebung zwischen den beiden 2x6-meren liegt bei 12 Å. **B:** Der Kippwinkel (*rocking angle*) zwischen den Längsachsen der beiden 2x6-mere beträgt 12°.

Wenn beide 4x6-mere sich zum 8x6-mer verbinden, treten die beiden Flip-Seiten der 4x6-mere in Kontakt (van Heel and Dube, 1994; Taveau et al., 1997; Martin et al., 2007). Dies konnte mit der vorliegenden hochaufgelösten 3D-Rekonstruktion nochmals bestätigt werden. Man betrachtet somit beim 8x6-mer von außen die Flop-Seite der 4x6-mere (Abb. C.6 A/B). Die Rotation zwischen den beiden 4x6-meren beträgt in der vorliegenden 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers 40° (Abb. C.6 A). Die beiden Masseschwerpunkte der 4x6-mere sind 110 \AA voneinander entfernt (Abb. C.6 B). Die gemessenen Werte für die $7,3 \text{ \AA}$ -Struktur des deoxy-8x6mers sind in Tab. 1 zusammengefasst.

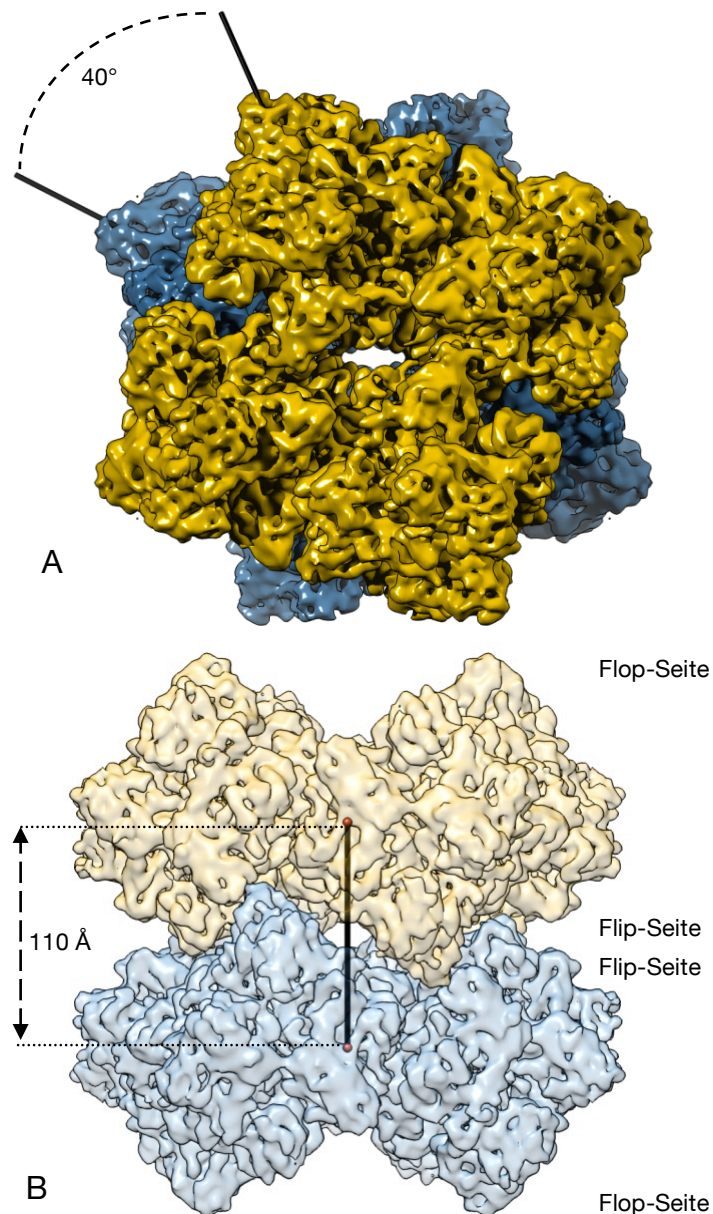


Abb. C.6: Ansicht auf das 8x6-mer, das sich aus zwei 4x6-meren zusammensetzt (gelb und blau). **A:** Ansicht auf das 8x6-mer entlang der z-Achse. Die beiden 4x6-mere sind gegeneinander um 40° verdreht. **B:** Aufsicht auf die beiden 4x6-mere. Die Flip-Seiten sind zueinander gewandt. Die Flop-Seiten der 4x6-mere werden nach außen hin präsentiert. Der Abstand der Masseschwerpunkte der beiden 4x6-mere beträgt 110 \AA .

1.2 Einpassen der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten in die 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers

1.2.1 Starres Einpassen (*rigid-body fitting*) mit Chimera

Um nun eine genauere Analyse der intermolekularen Brücken (Interfaces) zwischen den Hexameren durchzuführen, wurden anhand publizierter Kristallstrukturen von Untereinheit II (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994) und Sequenzen Homologiemodelle der sieben Untereinheiten erstellt und in die 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers eingepasst.

Das Hämocyanin von *L. polyphemus* besitzt acht unterschiedliche Untereinheiten-Typen. Die Topologie dieser Untereinheiten-Typen ist bekannt (Markl et al., 1981; Lamy et al., 1983; Kempster et al., 1985; Boisset et al., 1988). Von den Untereinheiten Typ II, IIIA, IIIB, IV und VI liegt die Sequenz vor. Die Sequenzen der Untereinheiten I und V wurden von dem asiatischen Pfeilschwanzkrebs *Carcinoscorpius rotundicauda* genommen (Jiang et al., 2005). Die Sequenz der Untereinheit IIA, die auch die Position von Untereinheit I besetzen kann, ist nicht bekannt (Lamy et al., 1983). Da jedoch Typ IIA, genauso wie Typ I, an keiner Brücke zwischen den Hexameren beteiligt ist (siehe Einleitung Abb. A.6 A/B), kann dieser Punkt in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt werden. Anstelle von Typ IIA wurde im Modell Typ I verwendet. Die 48 Untereinheiten wurden ihrer Position entsprechend (Lamy et al., 1983; Kempster et al., 1985; Boisset et al., 1988; Martin et al., 2007) in Chimera einzeln in die 7,3 Å-Rekonstruktion eingepasst (Abb. C.7).

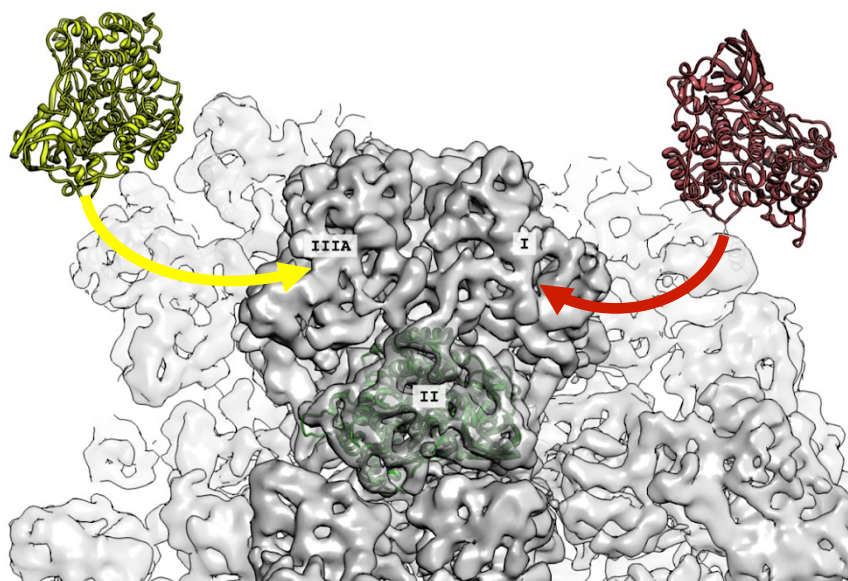


Abb. C.7: Beispiel für das starre Einpassen (*rigid body fitting*) der Homologiemodelle dreier Untereinheiten in ein Hexamer (1x6-mer) des deoxy-8x6-mers. Die molekularen Modelle wurden gemäß ihrer Topologie (Martin et al., 2007) manuell in das Hexamer eingeschoben und anschließend mit dem Chimera-Tool „Fit in Map“ genau eingepasst.

1.2.2 Flexibles Einpassen (*flexible fitting*) mit DireX

Nach dem starren Docken der Homologiemodelle in die 7,3 Å-Struktur des deoxy-8x6-mers wurden diese mit dem Programm DireX flexibel noch genauer eingepasst. Zunächst wurden alle 48 Untereinheitenmodelle zu einem Modell zusammengefasst. So entstand ein pseudoatomares Modell des kompletten deoxy-8x6-mers. Anschließend wurde mit diesem Homologiemodell eine Datei berechnet, welche die Wasserstoffbrückenbindungen des deoxy-8x6-mers enthielt. Das Einbeziehen der Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert das Homologiemodell beim flexiblen Einpassen in die 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers. So wurde verhindert, dass es zu einer übertrieben flexiblen Einpassung kam. Je nach Einstellung der verwendeten Parameter kann es dazu kommen, dass das Homologiemodell zu flexibel in die 3D-Rekonstruktion eingepasst wird. Dabei kann es passieren, dass sich bestimmte Sekundärstrukturmerkmale, wie z.B. α -Helices, auflösen. Um dies festzustellen, wurde ein Validierungswert zur Hilfe genommen, den DireX zu Beginn der Berechnung automatisch erstellt. Dieser Wert blieb während der kompletten Berechnung konstant, was bedeutete, dass es beim flexiblen Einpassen keine Probleme gab. Die Korrelation zwischen dem Homologiemodell des deoxy-8x6-mers und der 7,3 Å-Struktur stieg im Verlauf von 150 Iterationen um 11% von 0.834 auf 0.943 an. Das flexible Einpassen war damit erfolgreich. Die Abb. C.8 zeigt die Verbesserung zwischen starrer und flexibler Einpassung.

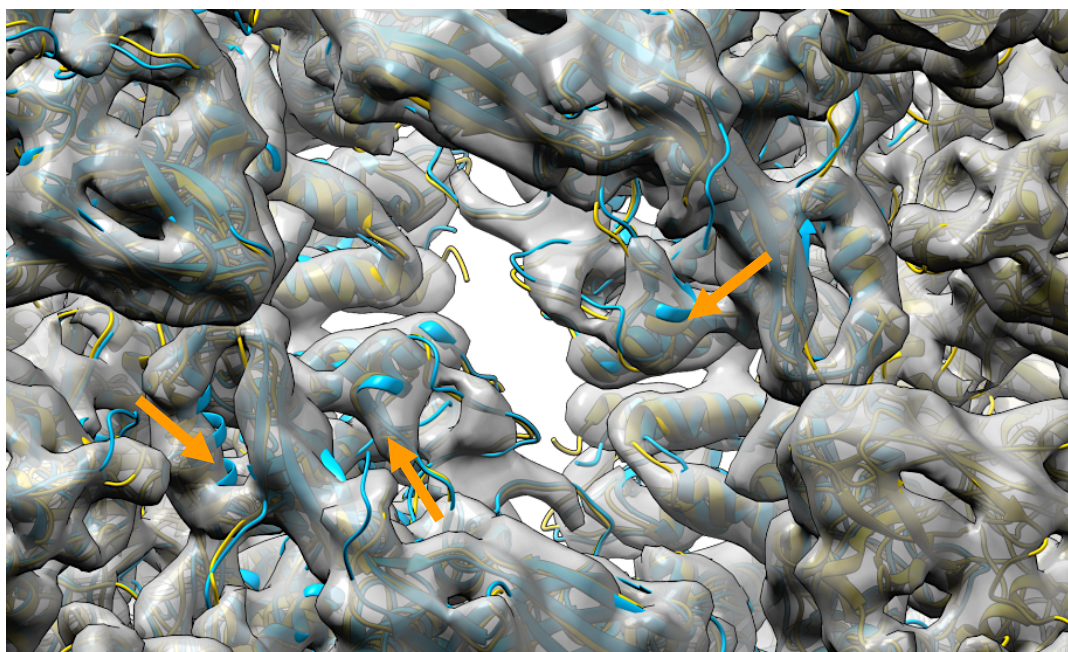


Abb. C.8: Starres und flexibles Einpassen des Homologiemodells. Die verbesserte Passform des Homologiemodells mit Hilfe des flexiblen Einpassens (gelb) im Vergleich zum starren Einpassen (cyan) ist deutlich sichtbar. Die orangefarbenen Pfeile zeigen Strukturbereiche an, bei denen der Effekt besonders gut zu erkennen ist, weil hier nur noch die cyane Struktur aus der Elektronendichtekarte ragt.

1.3 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers von *L. polyphemus* mit RELION

Vom oxy-8x6-mer lag mir eine 7,1 Å-Struktur vor, die [REDACTED] mit von [REDACTED] aufgenommenen Cryo-EM-Bildern erstellt hatte, allerdings mit den Programmpaketen EMAN 1 und SPARX. Da nicht auszuschließen war, dass verschiedene Programme hier leicht unterschiedliche 3D-Rekonstruktionen liefern, und insbesondere weil ich auch hier den Gold-Standard anwenden wollte, habe ich das oxy-8x6-mer mit Hilfe der EM-Bilder von [REDACTED] mit dem Programm RELION erneut rekonstruiert.

Insgesamt enthielt der Datensatz 38.032 Einzelpartikel. Durch die 2D-Klassifizierung von RELION wurden neue Klassensummen des Datensatzes erstellt und schlechte Klassen/Partikel aus dem Datensatz entfernt. Nach der Selektion enthielt der Datensatz noch 29.125 Partikel. Mit diesen wurde das finale 3D-Refinement durchgeführt. Nach 23 Iterationen ergab sich eine Auflösung der 3D-Rekonstruktion von 8,6 Å. Diese konnte mit der Nachprozessierung/Sharpening letztlich auf 7,9 Å gemäß Gold-Standard verbessert werden (Abb. C.9).

Für die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers wurde im Gegensatz zur 7,1 Å-Struktur von [REDACTED] (Dejung, 2014) die ursprünglich genutzte Pixelgröße von 2 Å/pix verwendet.

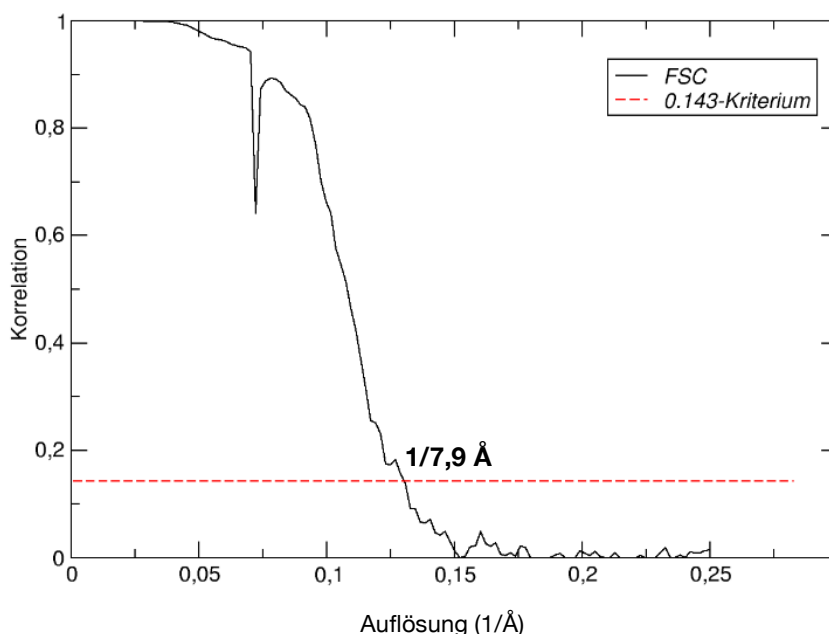


Abb. C.9: Auflösungsbestimmung mit Hilfe der Fourier-Schalen-Korrelation (FSC) der finalen 3D-Rekonstruktion vom selektierten Datensatz des oxy-8x6-mers mit dem Auflösungswert 2 Å/pix. Die Auflösung wird durch das 0,143-Kriterium festgelegt (rote Linie) (Gold-Standard-Verfahren). Es handelt sich dabei um den reziproken Wert der Raumfrequenz am Schnittpunkt der FSC-Kurve (schwarze Kurve) mit dem y-Wert 0,143 (rote Linie). Die Auflösung der 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers beträgt 7,9 Å.

Die Vermessung der 7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers ergab eine Länge von ca. 275 Å (y-Achse), eine Breite von ca. 270 Å (x-Achse) (Abb. C.10 A) und eine Tiefe von 265 Å (z-Achse) (Abb. C.10 B).

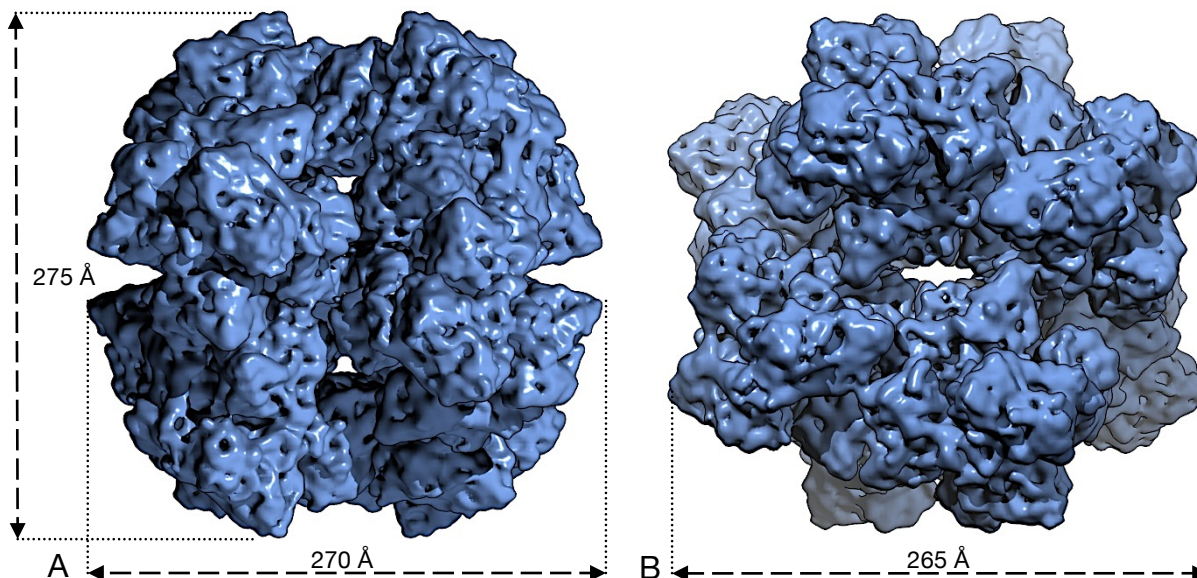


Abb. C.10: 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers von *L. polyphemus* mit einer Auflösung von 7,9 Å.
A: Ansicht entlang der z-Achse mit den Maßen der x-Achse (270 Å) und der y-Achse (275 Å)
B: Ansicht entlang der y-Achse mit dem Messwert der z-Achse (265 Å).

Das 1x6-mer besitzt die Maße 128 Å (x-Achse) x 115 Å (y-Achse) x 100 Å (z-Achse) (Abb. C.11 A). Die gemessenen Distanzen zwischen den einzelnen Hexameren wurden mit Hilfe des Masseschwerpunkts ermittelt, der mit dem Programm Chimera bestimmt wurde. Der Abstand der beiden Hexamere die das asymmetrische 2x6-mer bilden, beträgt 105 Å. Das obere Hexamer (rot) ist hierbei um 105° gegenüber dem unteren Hexamer (grün) verdreht (Abb. C.11 B). Zwei der 2x6-mere bilden eines der beiden 4x6-mere. Der Abstand der zwei 2x6-mere innerhalb des 4x6-mers beträgt 110 Å und die Verschiebung (*Flip-Flop-Shift*) liegt bei ca. 12 Å (Abb. C.11 C). Hieraus ergeben sich die zwei bereits beschriebenen Ansichten (Flip-Ansicht, Flop-Ansicht). Der gemessene Kippwinkel (*rocking angle*) zwischen den beiden 2x6-meren beträgt 17° (Abb. C.11 D).

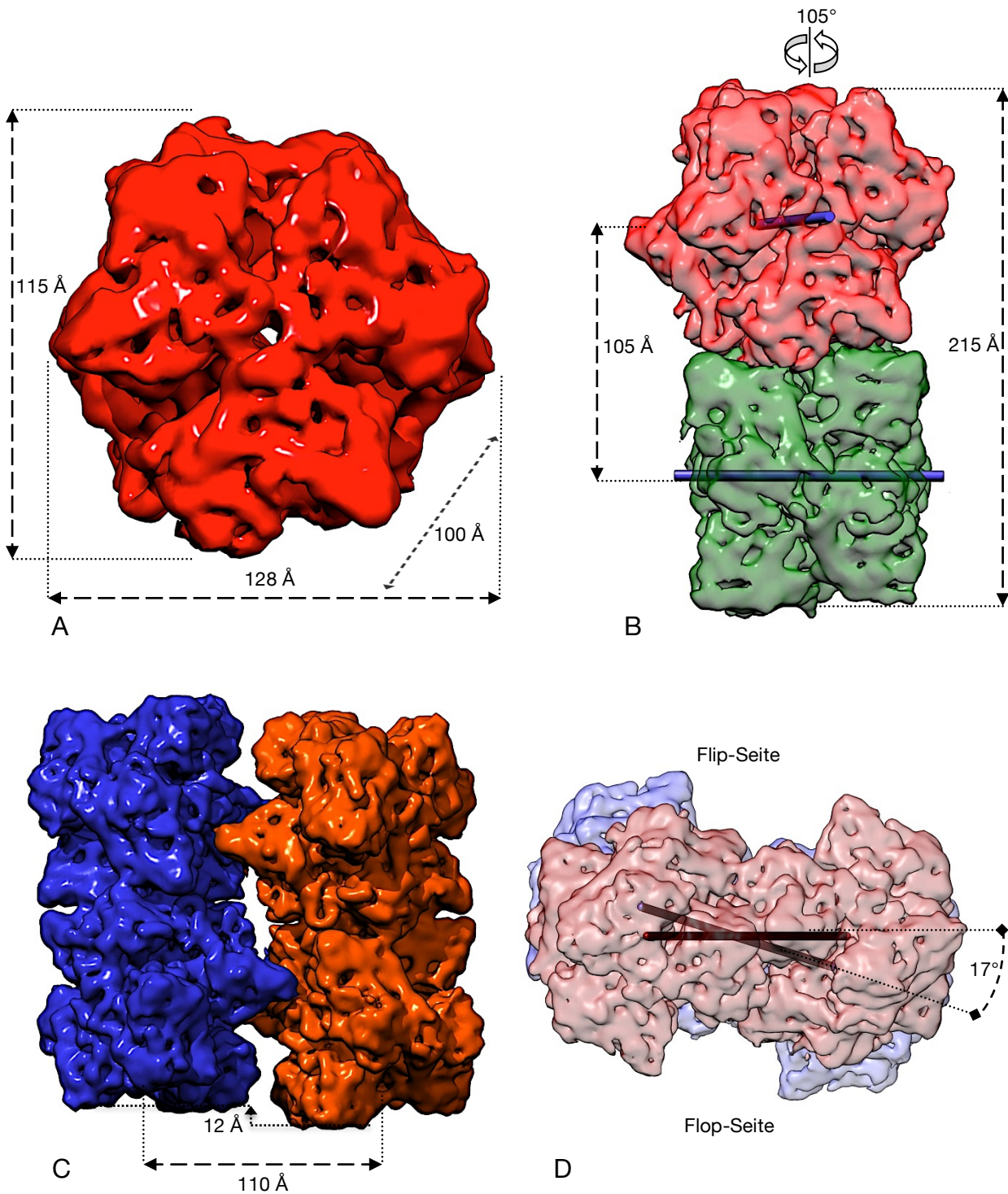


Abb. C.11: Ansicht auf das **(A)** 1x6-mer, **(B)** 2x6-mer und **(C/D)** das 4x6-mer der 7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers. **A:** Das 1x6-mer besitzt die Maße 128 Å (x-Achse) x 115 Å (y-Achse) x 110 Å (z-Achse). **B:** Das 2x6-mer mit dem gemessenen Abstand zwischen den beiden Hexameren (105 Å), der Gesamtlänge (215 Å) und der Verdrehung des oberen Hexamers entlang der Längsachse des 2x6-mers (105° gegen den Uhrzeigersinn). **C:** Aufsicht auf die Flop-Seite des 4x6-mers mit dem Abstand der Masseschwerpunkte der beiden 2x6-mere (110 Å) sowie der Verschiebung (*flip-flop-shift*) zwischen den zwei Dihexameren (12 Å). **D:** Ansicht auf das 4x6-mer entlang der x-Achse mit dem Kippwinkel (*rocking angle*) zwischen den beiden Längsachsen der beiden 2x6-mere (17°).

Zwei dieser 4x6-meren treten über ihre Flip-Seiten miteinander in Kontakt und bilden so das native 8x6-mer des Hämocyanins von *L. polyphemus* aus. Die Flop-Seiten der 4x6-meren zeigen dabei nach außen. Die beiden Masseschwerpunkte der beiden 4x6-meren sind ca. 105 Å voneinander entfernt (Abb. C.12 B) und die Rotation zwischen den beiden beträgt 40° (Abb. C.12 A). In Tabelle C.1 sind die gemessenen Werte zusammengefasst.

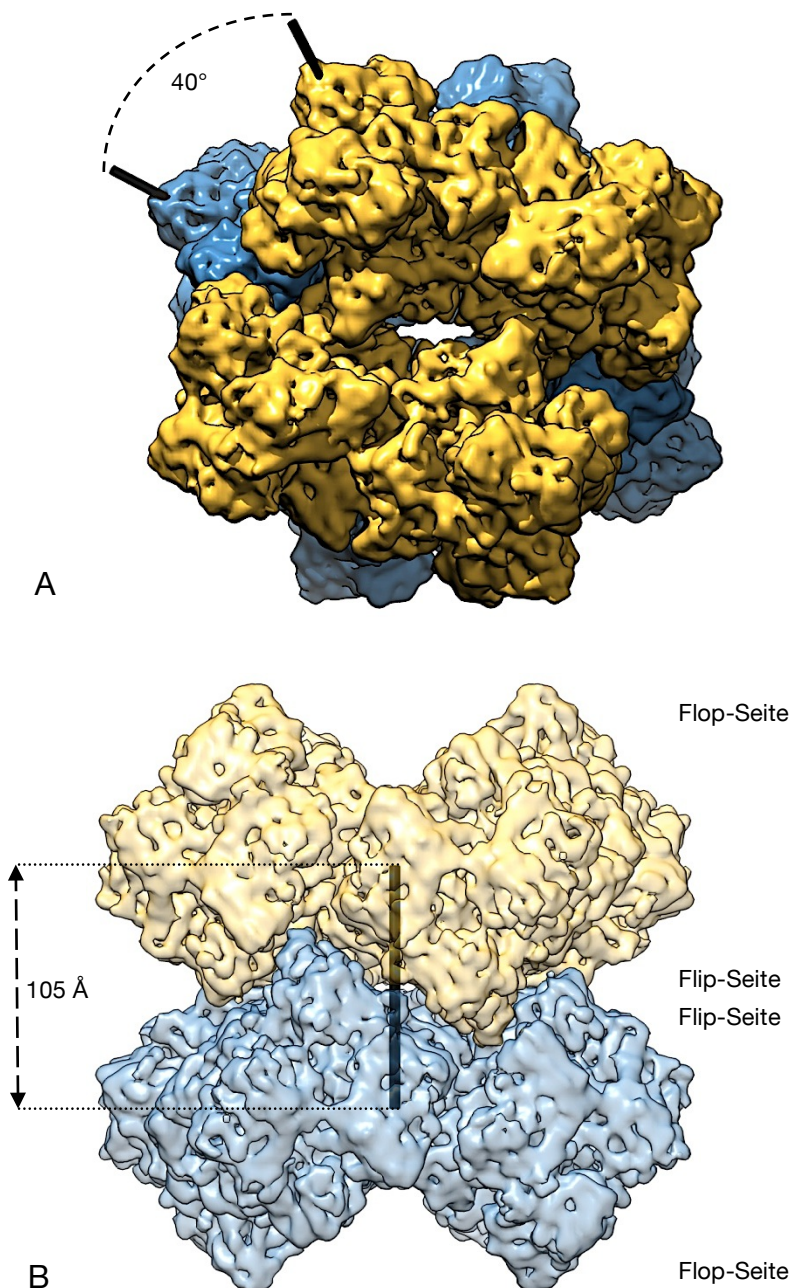


Abb. C.12: Ansicht auf die 7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers von *L. polyphemus*, das sich aus zwei 4x6-meren zusammensetzt (gelb und blau). **A:** Ansicht auf das 8x6-mer entlang der z-Achse. Die beiden 4x6-meren sind gegeneinander um 40° verdreht. **B:** Aufsicht auf die beiden 4x6-meren. Die Flip-Seiten der beiden 4x6-meren sind zueinander gewandt. Die Flop-Seiten der 4x6-meren werden nach außen hin präsentiert. Der Abstand der Masseschwerpunkte zwischen den beiden 4x6-meren beträgt 105 Å.

Messwerte der 7,3 Å-Struktur des deoxy-8x6-mers und der 7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers		7,3 Å-Struktur des deoxy-8x6-mers	7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers
Gesamtmaße des 8x6-mers	x-Achse (Å)	275 ± 2	270 ± 2
	y-Achse (Å)	280 ± 2	275 ± 2
	z-Achse (Å)	270 ± 2	260 ± 2
Maße des 1x6-mers	x-Achse (Å)	130 ± 2	128 ± 2
	y-Achse (Å)	115 ± 2	115 ± 2
	z-Achse (Å)	100 ± 2	100 ± 2
Messwerte der 1x6-mere im 2x6-mer	Distanz (Å)	105 ± 2	105 ± 2
	Rotation (°)	115 ± 1	105 ± 1
Messwerte der 2x6-mere im 4x6-mer	Distanz (Å)	110 ± 2	110 ± 2
	Dodekamerverschiebung (<i>Flip-Flop-Shift</i>) (Å)	12 ± 1	12 ± 1
	Kippwinkel (<i>rocking angle</i>) (°)	12 ± 1	17 ± 1
Messwerte der 4x6-mere im 8x6-mer	Distanz (Å)	110 ± 2	105 ± 2
	Staffelungswinkel (°)	40 ± 2	40 ± 2

Tab. C.1: Vergleich der Messwerte der 7,3 Å-Struktur des deoxy-8x6-mers und der 7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers. Die Hauptunterschiede zwischen den beiden 3D-Rekonstruktionen sind die unterschiedlichen Rotationswinkel der beiden Hexamere im 2x6-mer, der Kippwinkel (*rocking angle*) zwischen den beiden 2x6-meren des 4x6-mers und der Abstand zwischen den beiden 4x6-meren des 8x6-mers.

1.4 Einpassen der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten in die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers

Abschließend wurden, wie in C.1.2 beschrieben, die pseudoatomaren Homologiemodelle der verschiedenen Untereinheiten in die 7,9 Å-Struktur des oxy-8x6-mers eingepasst. Zunächst wurde die starre Einpassungsmethode mit dem Programm Chimera verwendet. Anschließend wurde mit dem Programm DireX die flexible Einpassung der Modelle in die 3D-Dichtekarte durchgeführt. Wie in Abschnitt C.1.2.1 beschrieben, wurden alle 48 Untereinheiten zu einem Modell zusammengefasst. Dieses stellte das pseudoatomare Modell des 8x6-mers dar. Bei der Berechnung handelte es sich um einen iterativen Prozess, bei dem sich die Korrelation zwischen dem pseudoatomaren Modell des 8x6-mers und der 7,9 Å-Struktur langsam erhöhte. Nach 100 Recheniterationen stieg die Korrelation um knapp 8% von 0.828 auf 0.903. Das flexible Einpassen war damit auch hier erfolgreich.

1.5 Vergleich der Inter-Hexamer-Interfaces des oxy- und deoxy-8x6mers

Die Kontakte zwischen den acht Hexameren des oxy-8x6-mers von *L. polyphemus* wurden bereits von Martin et al., (2007) mit Hilfe einer 3D-Rekonstruktion, die nach heutigem Standard eine Auflösung von ca. 12 Å besitzt, genauer beschrieben. Aufgrund der nun verbesserten Auflösung des oxy-8x6-mers war es möglich, diese molekularen Kontaktstellen genauer zu analysieren. Auch waren nun Sequenzdaten des Hämocyanins vom asiatischen Pfeilschwanzkrebs *Carcinusscorpis rotundicauda* verfügbar, so dass es möglich war, von den Untereinheiten I und V realistischere Homologiemodelle zu erstellen. Diese ersetzen dort die von Martin et al. (2007) verwendeten ungenaueren Sequenzen. Zudem war nun ein direkter Vergleich zwischen den oxy- und deoxy-Interfaces des 8x6-mers möglich.

Die Beschreibung, der Vergleich und die Analyse der Interfaces in den beiden Oxygenierungszuständen werden im Abschnitt D.3 ausführlich dargelegt.

1.6 Molekulardynamische Simulationen von Kontaktstellen zwischen Hexameren mit GROMACS

Mit dem Programm GROMACS ist es möglich, die Bewegung und Interaktion von Aminosäuren in einem MD-System zu simulieren. In dieser Arbeit wurde das IV-IIIB/IV/V-Interface, das im 4x6-mer zwischen den beiden 2x6-meren auftritt, sowie das IV-IV-Interface, das sich im 8x6-mer zwischen den beiden 4x6-meren befindet, für molekulardynamische Simulationen herangezogen. Eine Simulation aller 11 Interfaces war mir aufgrund der dafür erforderlichen Rechenzeiten und Rechenkapazitäten nicht möglich.

Die beiden untersuchten Interfaces sind wegen ihrer Komplexität und ihres Aufbaus mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit für den Transfer von allosterischen Signalen zwischen den Hexameren verantwortlich (siehe Diskussion D.3.2 und D.3.3). Um die Interaktion und Funktionsweise der am Interface beteiligten Aminosäuren besser zu verstehen, wurden diese mit Hilfe des MD-Programms GROMACS simuliert.

Zur Simulation in GROMACS wurden die betreffenden Untereinheiten aus dem pseudoatomaren Modell des 8x6-mers separiert, abgespeichert und anschließend mit den einzelnen GROMACS-Modulen bearbeitet. Nach Abschluss der Erstellung des MD-Systems, konnte die finale MD-Simulation stattfinden. Alle berechneten Simulationen weisen eine Gesamtsimulationsdauer von 100 ns auf. Das bedeutet,

dass sich diese nicht aus mehreren kleinen Simulationen zusammensetzen. Zudem wurden außerhalb der Kontaktstellen der Hexamere nur sehr wenige Aminosäuren bzw. Atome räumlich fixiert. Somit gab es bei den MD-Simulationen keine Bewegungseinschränkungen für die Aminosäuren/Atome der Untereinheiten, die an den jeweiligen Interfaces beteiligt sind.

1.6.1 Vorbereitung der beiden Interfaces zur MD-Simulation

Zunächst wurden die entsprechenden Untereinheiten aus dem molekularen Gesamtmodell ausgeschnitten und einzeln abgespeichert. Mit dem Gromacs-Tool „pdb2gmx“ wurden Untereinheiten in ein neues Format konvertiert, so dass sämtliche nachfolgende Schritte mit Gromacs durchgeführt werden konnten. Als Kraftfeld für die Simulation wurde AMBER99SB-ILDN verwendet, das sich für die Simulation von Proteinkomplexen bewährt hat (Lindorff-Larsen et al. 2012; Beauchamp et al., 2012). Für die Wassermoleküle wurde das Standard-TIP3P-Modell verwendet (Jorgensen et al., 1983 und 1998). Dieses besitzt drei Ladungen: jeweils zwei positive für die Wasserstoffmoleküle sowie eine negative Ladung für den Sauerstoff, wodurch die positiven Ladungen des Wasserstoffs neutralisiert werden. Die jeweiligen Interfaces wurden anschließend in eine Simulationsbox überführt, die mit Wassermolekülen gefüllt wurde. Nachfolgend wurde ein Puffersystem eingefügt. Der verwendete Puffer bestand aus 100mM NaCl, 10mM MgCl₂ und 10mM CaCl₂. Die beiden Systeme selbst wurden dabei im neutralen Zustand gehalten.

Vor der finalen MD-Simulation wurden beide Systeme einer Energieminimierung unterzogen (Abb. C.13 A). Anschließend wurden beide MD-Systeme mit der entsprechenden Temperatur von 27° (300 K) und dem Normaldruck von 1,013 bar equilibriert (Abb. C.13 B+C). Bei der Anpassung des Drucks kommt es zu starken Abweichungen zwischen den einzelnen Simulationsschritten kommt. Dies ist jedoch ein normales Phänomen, das bei der Equilibrierung des Drucks in molekulardynamischen Systemen auftritt. Nach der Equilibrierung der Systeme wurden die MD-Simulationen für beide Interfaces gestartet. Aufgrund der enormen Anzahl an Atomen wurden alle MD-Simulationen auf dem High-Performance-Cluster MOGON der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

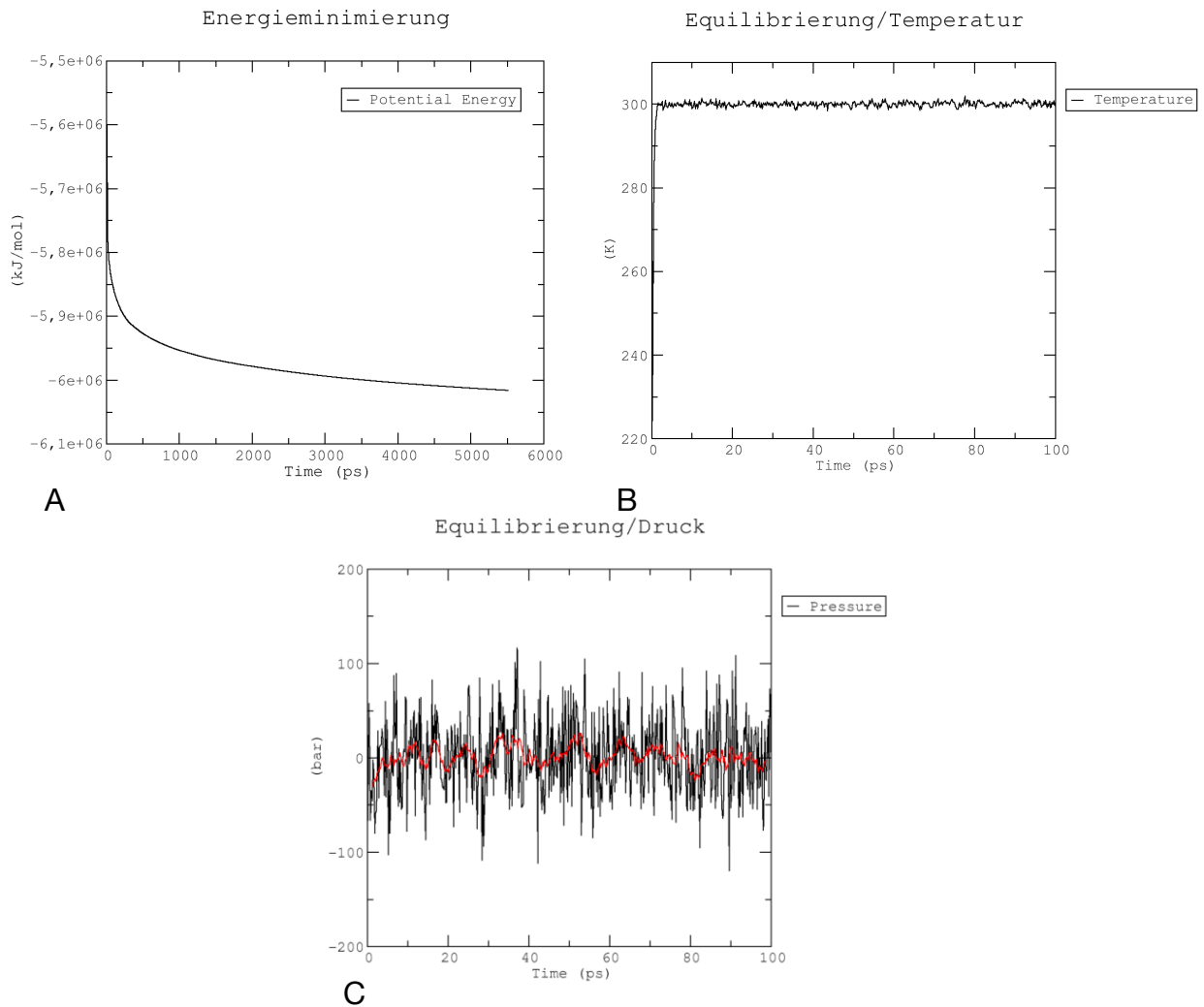


Abb. C.13: Anpassung verschiedener Parameter für die finale MD-Simulation. Bei der Equilibrierung wurden die Untereinheiten fixiert, um ein Kollabieren des Systems zu verhindern. **A:** Die Energieminimierung des MD-Systems war erfolgreich. Man sieht gut, dass E_{pot} gleichmäßig konvergiert. **B:** Einstellung der Temperaturbedingungen auf 300 K für die MD-Simulation. **C:** Anpassung des Drucks für die finale MD-Simulation der Untereinheiten.

1.6.2 Auswertung der MD-Simulationen der beiden Interfaces

Während der MD-Simulation wird eine sogenannte Trajektorie erstellt. Diese enthält die Positionsänderungen aller Atome, die während der MD-Simulation auftreten. Da die Dateigröße der Trajektorie sehr groß ist (zwischen 100-200 GB), wurde diese zunächst minimiert, so dass sie von den Programmen Chimera und VMD eingelesen werden konnte. Dabei wurden überflüssige Bestandteile (z.B. Wassermoleküle) des Systems aus der Datei entfernt. Auch wurde nur jeder zehnte Frame herausgeschrieben, um die Dateigröße stark zu verkleinern. Diese „verkleinerte“ Trajektorie diente dabei nur der Identifizierung der Aminosäuren, die potentiell an der Bildung der Interfaces beteiligt sind. Die Selektion der Aminosäuren erfolgte in Chimera. Für die Distanzmessung wurden nur die äußeren Atome der Seitenketten ausgewählt, die eine Bindung eingehen können (zB. COO^- bei Glutamin- bzw. Asparaginsäure; NH_3 bei Lysin bzw Arginin (Abb. C.14). Durch das Aufrufen des internen Python-Terminals IDLE konnte ein von Mario Dejung entwickeltes Skript verwendet werden (Dejung, 2014), das die genauen Atomnummern der Aminosäuren herausschrieb (Abb. C.15 A). Diese wurden dann in eine Index-Datei (.ndx-Format) eingetragen (Abb. C.15 B). Die Distanzen zwischen den einzelnen Aminosäuren, die nach den Ergebnissen der MD-Simulation eine potentielle Bindung eingehen könnten, wurden anschließend mit dem Gromacs-Tool „distances/select“ gemessen. Diese Messung erfolgte an der unbearbeiteten Trajektorie mit allen Abschnitten der 100 ns MD-Simulation. Die Visualisierung der Messergebnisse erfolgte mit drei kleinen Programmen (gromacsgraph.py, gromacshist.py, gromacsdisc.py), die Mario Dejung entwickelt hat (Dejung, 2014). Das Tool gromacsgraph.py trägt die Distanzen zwischen den ausgewählten Aminosäuren gegenüber der Simulationszeit auf. Gromacshist.py zeigt ein Balkendiagramm, wobei die Höhe der Balken der prozentualen Simulationszeit entspricht, die ein gewisser Abstand zwischen zwei Aminosäuren einnimmt. Mit gromacsdisc.py kann man mehrere Abstände direkt miteinander vergleichen. Die Balken werden hier als Scheiben dargestellt, wobei die Fläche der Scheiben dem Prozentwert des Balkens entspricht. Werte von unter 10% werden dabei nicht angezeigt.

Auf die Auswertung und Analyse der MD-Simulationen der beiden Interfaces wird im Abschnitt D.3.2 und D.3.3 eingegangen (sowie in den Abschnitten C.2.4.2 bis 2.4.5 MD-Simulationen der Kontaktstellen zwischen den Hexameren des 4x6-mers von *C. truncata*).

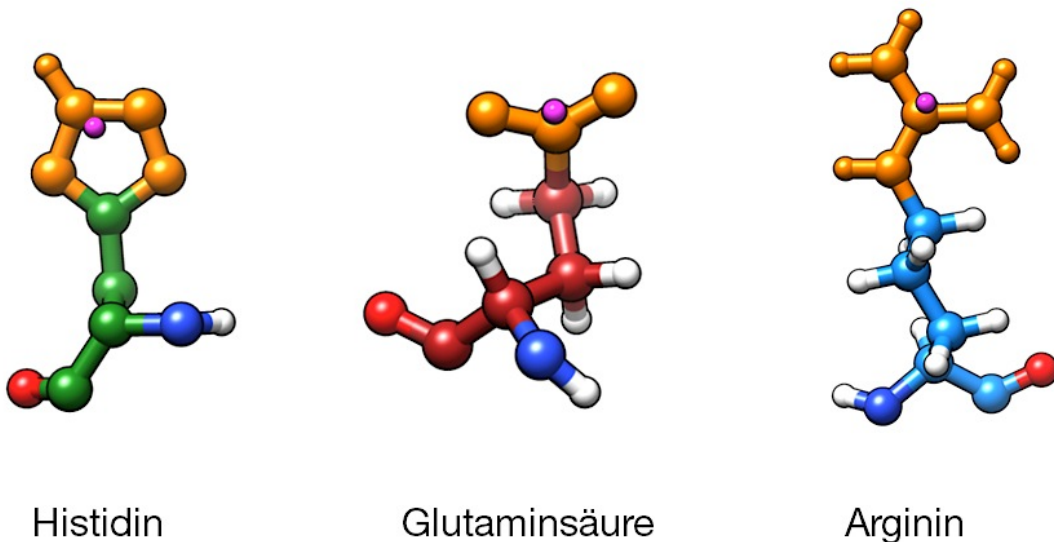


Abb. C.14: Selektion der Atome der verschiedenen Aminosäuren zur Distanzmessung. Beispiel von drei Aminosäuren, die zur Messung der Abstände herangezogen wurden. Dabei wurden mehrere Atome selektiert (orange) und mit diesen der Masseschwerpunkt (magenta) ermittelt, der dann zur Abstandsmessung genutzt wurde.

A

```

Python 2.7.8 Shell
Python 2.7.8 (default, Jul 23 2015, 18:51:29)
[GCC 4.2.1 Compatible Apple LLVM 6.0 (clang-600.0.54)] on darwin
Type "copyright", "credits" or "license()" for more information.
==== No Subprocess ====
>>>
>>> import chimera
>>> oneletter = {'ALA':'A','ARG':'R','ASN':'N','ASP':'D','CYS':'C','GLN':'Q','GLU':'E','GLY':'G','HIS':'H','ILE':'I','LEU':'L','LYS':'K','MET':'M','PHE':'F','PRO':'P','SER':'S','THR':'T','TRP':'W','TYR':'Y','VAL':'V'}

>>> for i in chimera.selection.currentResidues():
>>>     print "[%s%s_%s]" % (oneletter.get(i.type,i.type),
>>>                           i.id.position,
>>>                           i.id.chainId)
>>> for j in chimera.selection.currentAtoms():
>>>     if j.residue == i:
>>>         print j.serialNumber,
>>>     print ""

[D563_A]
8975 8976 8977
[K456_A]
7311 7312 7313 7310
>>>

```

B

```

[mhaugwit@login02 VI_IIIB]$
[mhaugwit@login02 VI_IIIB]$ tail Index_AS.ndx
[ H288_B ]
14807 14808 14809 14810 14811 14812 14813 14814
[ F389_A ]
6222 6223 6224 6225 6226 6227 6228 6229 6230 6231 6232
[ H290_B ]
14831 14832 14833 14834 14835 14836 14837 14838
[ D563_A ]
8975 8976 8977
[ K456_A ]
7310 7311 7312 7313
[mhaugwit@login02 VI_IIIB]$

```

Abb. C.15: **A:** Python-Terminal IDLE von Chimera mit dem ausgeführten Skript zum Herausschreiben der selektierten Atome (in dem Fall von D563 und K456 der Untereinheit VI) **B:** Die Index-Datei, die von Gromacs eingelesen wird. Durch die angegebenen Atome errechnet Gromacs automatisch den jeweiligen Masseschwerpunkt und misst anschließend die Abstände zwischen diesen aus.

2. 3D-EM des Hämocyanins von *C. truncata*

Das Hämocyanin von *Callinassa truncata* setzt sich aus vier Hexameren zu einem 4x6-mer zusammen. Der Aufbau des 4x6-mers unterscheidet sich dabei stark vom Aufbau des 4x6-mers, das bei *L. polyphemus* zu beobachten war. In einer Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit der AG Decker wurden für das Hämocyanin von *C. truncata* zwei unterschiedliche Typen von Untereinheiten (CtH-1 und CtH-2) identifiziert. Mit Hilfe massenspektrometrischer und densitometrischer Daten wurde zwischen den beiden Untereinheitentypen ein Mengenverhältnis von 5:1 bestimmt. Das heißt, jedes der vier Hexamere besteht aus fünf Untereinheiten des Typs CtH-1 und aus einer Untereinheit des Typs CtH-2. CtH-2 spielt dabei wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Bildung der zentral gelegenen Interfaces zwischen den vier Hexameren.

2.1 3D-Rekonstruktion des 4x6-meren Hämocyanins von *C. truncata*

Da das Volumen der Hämocyanin-Probe von *C. truncata* sehr gering war, konnte in diesem Fall nicht die gefilterte Hämolymphe als „Puffer“-Medium herangezogen werden. Die Probe wurde, nachdem sie über einen AMICON 1 MDa-Filter aufgereinigt worden ist, in einen angesetzten Puffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 20mM CaCl₂) überführt und entsprechend zur nachfolgenden Kryo-Präparation verdünnt (ca. 1 mg/ml).

Am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen wurden von dieser aufgereinigten Hämocyanin-Probe von [REDACTED] 2.562 Aufnahmen erstellt. Die Bildakquisition erfolgte mithilfe eines TITAN KRIOS Elektronenmikroskops, das mit einem Falcon 2 Direct Electron Detector ausgestattet ist. Im Gegensatz zu dem Falcon 2 Direct Electron Detector am Polara-Elektronenmikroskop am MPI für Biophysik in Frankfurt, konnten hier aufgrund einer anderen Software keine „Movie-Frames“ aufgenommen werden. Die Auflösung der getätigten Aufnahmen lag bei 1,27 Å/pix. Die 2.562 Aufnahmen wurden mit dem Programm RELION überprüft. Von diesen konnten 1.356 Aufnahmen für die anschließende CTF-Berechnung und Partikelextraktion übernommen werden. Die Partikelselektion/-extraktion erfolgte mit dem in RELION implementierten halbautomatischen Selektionsmodul. Zunächst wurden ca. 700 Partikel manuell "gepickt". Aus diesen wurden mit Hilfe einer kurzen 2D-Klassifizierung Referenzen für die automatische Selektion berechnet. Der automatische Suchalgorithmus konnte 97.067 Einzelpartikel extrahieren.

Anschließend wurden mit diesen die ersten referenzfreien 2D-Klassifizierungen durchgeführt. Hierbei konnten falsch ausgewählte Partikel (*false-positive*) bzw. Partikel minderer Qualität herausgefiltert werden, die in den nachfolgenden Berechnungen nicht mehr mit einbezogen wurden, um die Qualität der finalen 3D-Rekonstruktion nicht negativ zu beeinflussen. Das finale 3D-Refinement wurde mit 45.852 Einzelpartikeln durchgeführt. Auch hier wurde das Gold-Standard-FSC-Verfahren angewendet (Rosenthal & Henderson, 2003). Der Datensatz wurde in RELION automatisch in zwei Hälften aufgetrennt und unabhängig voneinander berechnet. Damit ist eine mögliche Überinterpretation der errechneten 3D-Rekonstruktion so gut wie ausgeschlossen. Als Referenz für das 3D-Refinement wurde eine ältere 3D-Rekonstruktion von *C. truncata* verwendet, die von [REDACTED] erstellt wurde. Die 3D-Rekonstruktion passte ich mit den entsprechenden Werten an und filterte sie auf 60 Å, um eine zu starke Einflussnahme des initialen Modells auf das folgende 3D-Refinement zu verhindern. Nach 25 Iterationen konnte eine 3D-Rekonstruktion des Hämocyanins von *Callinassa truncata* mit einer Auflösung von 5,6 Å berechnet werden. Bei der anschließenden Nachprozessierung inkl. Sharpening der 3D-Rekonstruktion verbesserte sich die Auflösung auf 4,9 Å nach Gold-Standard (Abb. C.16).

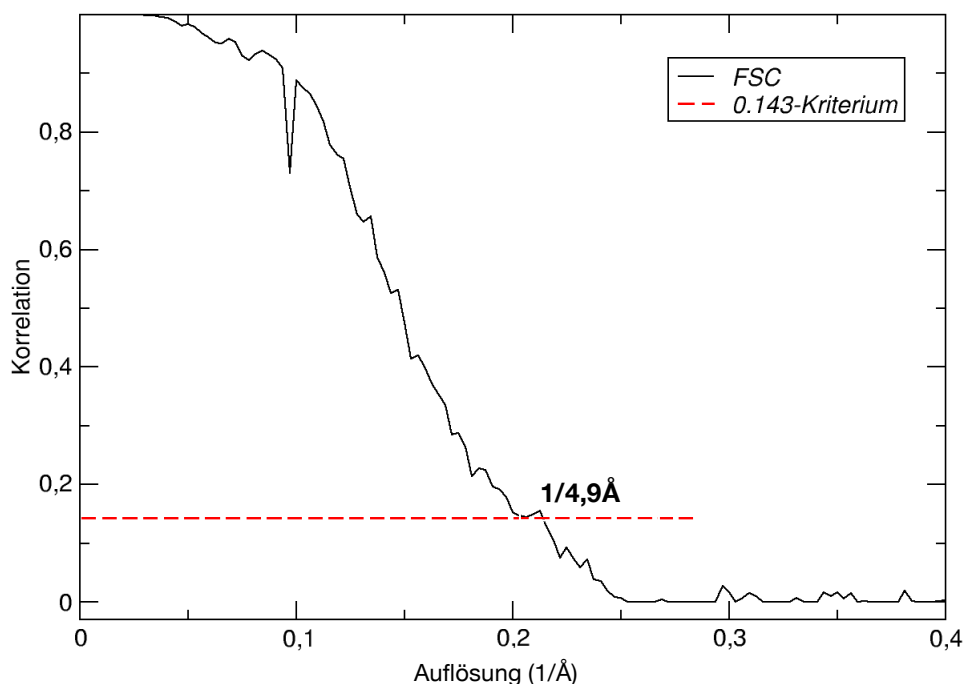


Abb. C.16: Auflösungsbestimmung mit Hilfe der Fourier-Schalen-Korrelation (FSC) der finalen 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers mit dem Auflösungswert 1,27 Å/pix. Die Auflösung wird durch das 0,143-Kriterium festgelegt (rote Linie) (Gold-Standard-Verfahren). Es handelt sich dabei um den reziproken Wert der Raumfrequenz am Schnittpunkt der FSC-Kurve (schwarze Kurve) mit dem y-Wert 0,143 (rote Linie). Die Auflösung der 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers beträgt 4,9 Å.

Die Vermessung der 4,9 Å-Struktur des CtH ergab folgende Maße: 200 Å (x-Achse) x 215 Å (y-Achse) x 220 Å (z-Achse) (Abb. C.17). Die bereits bekannte D2-Symmetrie konnte mit dieser 3D-Rekonstruktion erneut bestätigt werden.

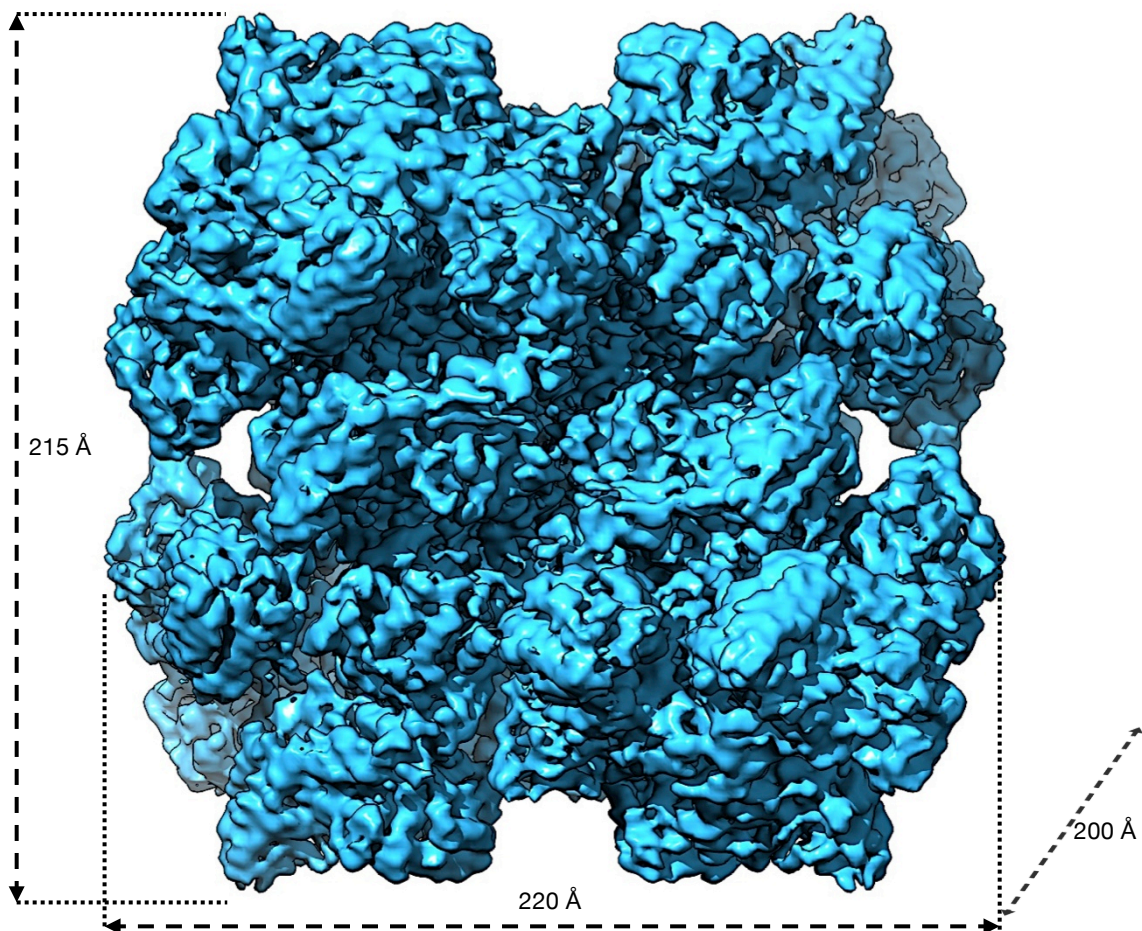


Abb. C.17: Die 4,9 Å-Struktur des 4x6-mers von *C. truncata*. Ansicht entlang der x-Achse mit den Maßen der 3D-Rekonstruktion 200 Å (x-Achse) x 215 Å (y-Achse) x 220 Å (z-Achse)

Jeweils zwei der vier Hexamere des 4x6-mers (Abb. C.18 A) bilden ein 2x6-mer, das sich mit dem zweiten 2x6-mer zum 4x6-mer zusammensetzt. Beim Aufbau des 2x6-mers sind drei verschiedene Varianten möglich. Die erste Variante ähnelt stark dem Aufbau des 2x6-mers der Strandkrabbe *Carcinus maenas*. Das obere Hexamer ist gegenüber dem unteren um 70° verdreht. Gleichzeitig gibt es zwischen den beiden Hexameren einen Kippwinkel von 17° (Abb. C.18 B). Die zweite mögliche Konstellation des 2x6-mers ähnelt stark dem Aufbau des Hämocyanins der Meeresassel *Ligia oceanica* (Abb. C.18 C). Der gemessene Kippwinkel zwischen diesen beiden Hexameren beträgt 21°. Bei der dritten Variante ist das obere Hexamer gegenüber dem unteren stark verschoben und verdreht (Abb. C.18 D). Bisher ist nicht bekannt, aus welcher Form des 2x6-mers sich das 4x6-mer des CtH zusammensetzt. Nach einer erneuten Überprüfung des Datensatzes von CtH waren

neben dem 4x6-mer auch vereinzelte 2x6-mere sichtbar, die stark dem Aufbau in Abb. C.18 B ähnelten. Um dies zu überprüfen, wurde aus diesen Partikeln eine 3D-Rekonstruktion erstellt.

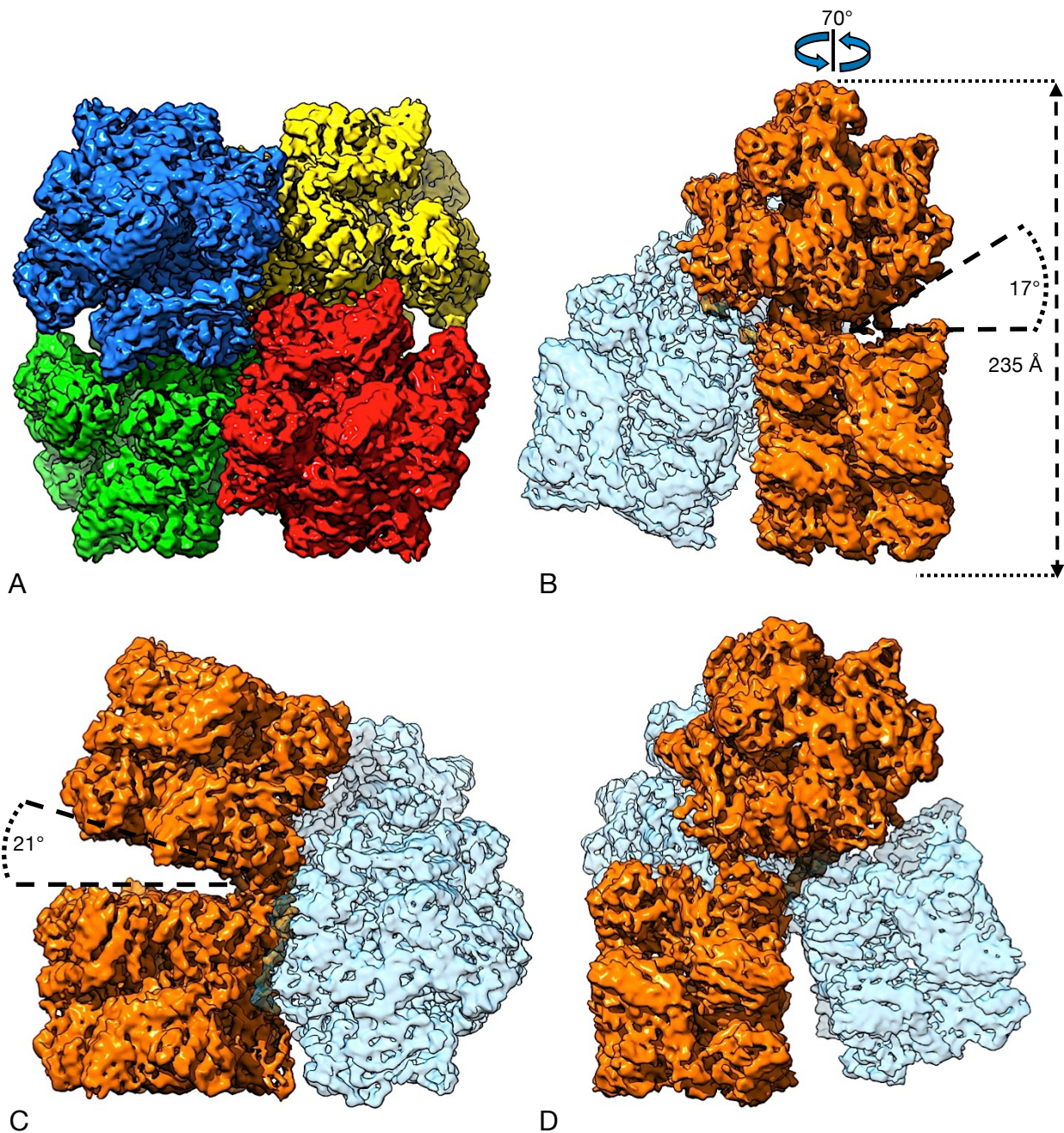


Abb. C.18: Verschiedene Ansichten auf das 4x6-mer von *C. truncata*. **A:** Das 4x6-mer setzt sich aus vier einzelnen Hexameren (rot, grün, blau, gelb) zusammen. **B:** Die erste Variante eines 2x6-mers, aus dem sich das 4x6-mer zusammensetzen kann. Das obere Hexamer ist dabei gegenüber dem unteren Hexamer um 70° gegen den Uhrzeigersinn verdreht. Der Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren beträgt 17°. **C:** Zweite mögliche Variante eines 2x6-mers, aus dem sich das CtH zusammensetzen kann. Der Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren beträgt in diesem Fall 21°. **D:** Die dritte mögliche Variante eines 2x6-mers. Das obere Hexamer ist gegenüber dem unteren Hexamer stark verschoben und verdreht

2.2 3D-Rekonstruktion des Halb moleküls (2x6-mer) des Hämocyanins von *C. truncata*.

Bei der Überprüfung der EM-Aufnahmen des Hämocyanins von *C. truncata* fiel auf, dass sich zwischen den 4x6-meren auch vereinzelt 2x6-mer befanden. Diese wurden separat selektiert und berechnet. Insgesamt konnten aus den EM-Bildern 9.892 Einzelpartikel extrahiert werden, die das 2x6-mer darstellten. Mit Hilfe der 2D-Klassifizierung wurden Einzelpartikel, die eine schlechte Qualität aufwiesen, aus dem Datensatz entfernt. Die 2D-Klassen des 2x6-mers zeigten bereits deutlich die Anordnung der beiden Hexamere im 2x6-mer (Abb. C.19 A). Zur finalen Berechnung wurden 6.751 Einzelpartikel verwendet. Die 3D-Rekonstruktion des Halb moleküls (2x6-mer) des Hämocyanins von *C. truncata* erreichte eine Auflösung von 10 Å (Abb. C.16 B). Die Länge des Moleküls betrug 235 Å. Das obere Hexamer ist gegenüber dem unteren um 75° gegen den Uhrzeigersinn verdreht. Der Kippwinkel zwischen beiden Hexameren beträgt 18°. Dieses 2x6-mer entspricht mit einem Korrelationswert von 90% einer der drei Möglichkeiten, das 4x6-mer zu teilen (siehe Abb. C.18 B). Damit steht sehr wahrscheinlich fest, über welche Zwischenstufe das 4x6-mer dissoziiert bzw. reassoziert. Diese Variante des 2x6-mers dürfte also die stabilste der drei Möglichkeiten sein (siehe Abb. C.18 B).

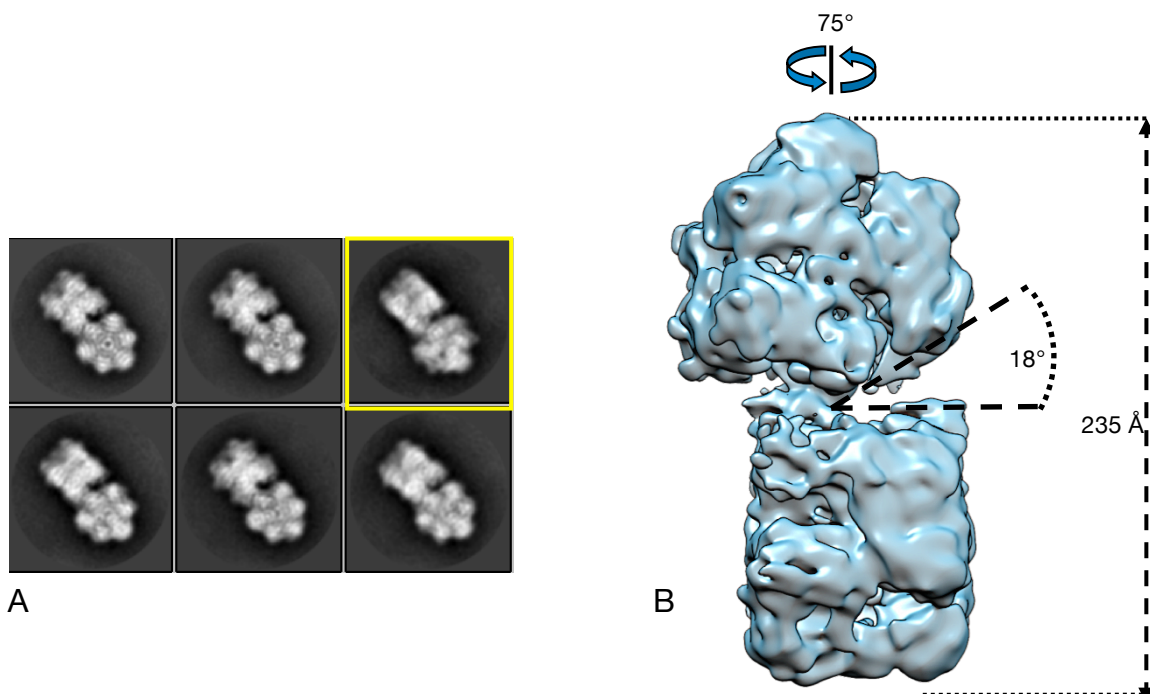


Abb. C.19: **A:** 2D-Klassen des 2x6-mers, das im Datensatz von CtH gefunden wurde. Die Anordnung der beiden Hexamere lässt sich deutlich erkennen. Schlechte Klassen (gelb) wurden bei der finalen Berechnung der 3D-Rekonstruktion ausgeschlossen. **B:** Die 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers mit einer Auflösung von 10 Å. Es besitzt eine Höhe von 235 Å. Die beiden Hexamere sind gegeneinander um 75° verdreht und weisen zusätzlich einen Kippwinkel von 18° auf.

2.3 Einpassen (*fitting*) der pseudoatomaren Modelle in die 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers von *C. truncata*

2.3.1 Starres Einpassen mit Chimera

Mit Hilfe der Sequenzdaten der zwei Untereinheiten-Typen CtH-1 und CtH-2 wurden zunächst Homologiemodelle mit dem in Chimera integrierten Tool „Modeller“ erstellt. Als Referenz diente dabei die Untereinheit des kristallografischen Hexamers 1HCY (1x6-mer der Languste *Panulirus interruptus*). Mit Hilfe massenspektrometrischer Daten konnte man Rückschlüsse auf das Mengenverhältnis der beiden Untereinheiten-Typen ziehen. Dieses Verhältnis betrug 5 (CtH-1) zu 1 (CtH-2). Die Untereinheit CtH-1 tritt demnach 20-mal im 4x6-mer von *Callinassa truncata* auf, während der Untereinheiten-Typ CtH-2 viermal vorkommt. Durch die Identifizierung des Halbmerks (2x6-mer) des 4x6-mers von *C. truncata* konnten zusätzlich Rückschlüsse auf die mögliche Topologie der Untereinheiten im 4x6-mer gezogen werden. Die Kontaktstelle zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers zeigt den klassischen Aufbau, den Markl und Decker (1992) beschrieben haben. Die beiden Hexamere treten über zwei Untereinheiten, sogenannte Hexamer-Linker, in Kontakt und bilden so das 2x6-mer aus. Die restlichen Untereinheiten fungieren als sogenannte Hexamer-Former und stabilisieren die Quartärstruktur des Hexamers. Aufgrund der Stöchiometrie kann man davon ausgehen, dass Untereinheit CtH-2 als Hexamer-Linker fungiert, und sich in den jeweiligen Hexameren an der Position befindet, mit der die Hexamere miteinander in Kontakt treten (Markl und Decker, 1992). Die übrigen Positionen werden von Untereinheit CtH-1 besetzt. Die Homologiemodelle der beiden Untereinheitentypen wurden dementsprechend in die rekonstruierte 4,9 Å-Struktur des CtH mit Chimera und dem zugehörigen Modul „Fit in map“ starr eingepasst.

2.3.2 Flexibles Einpassen mit dem Programm DireX

Nach dem starren Einpassen wurden die Homologiemodelle flexibel mit DireX eingepasst. Innerhalb von 150 Iterationen stieg die Korrelation des Homologiemodells des 4x6-mers und der 4,9 Å-Struktur des CtH um knapp 7% von 0.855 auf 0.923. Das flexible Einpassen war damit erfolgreich.

2.4 Die Interfaces zwischen den einzelnen Hexameren des 4x6-mers von *C. truncata*

Bei der Analyse der 4,9 Å-Struktur und des eingepassten pseudoatomaren Modells lassen sich beim massekorrelierten Schwellenwert fünf potentielle Interfaces zwischen den Hexameren feststellen. Diese teilen sich wie folgt auf:

Das Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2 / C_2 \leftrightarrow D_2$) wird zwischen der Untereinheit CtH-2 des Hexamers A und der Untereinheit CtH-2 des Hexamers B ausgebildet. Die beteiligten Aminosäuren liegen sich dabei parallel gegenüber, so dass sich bei diesem Interface zwei Kontaktbereiche zwischen den Untereinheiten aufspannen. Aufgrund der vorhandenen D2-Symmetrie tritt dieses Interface zwischen Hexamer C und D in identischer Weise auf.

Das Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2 / B_2 \leftrightarrow D_2$) befindet sich zwischen den Untereinheiten CtH-2 von Hexamer A und C sowie zwischen den Hexameren B und C.

Das Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2 / B_2 \leftrightarrow C_2$) bildet sich zwischen den Untereinheiten CtH-2 von Hexamer A und D sowie zwischen den Hexameren B und C aus.

Das Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2 / B_2 \leftrightarrow C_1$) tritt einmal zwischen der Untereinheit CtH-1 von Hexamer A und der Untereinheit CtH-2 von Hexamer D auf sowie zwischen der Untereinheit CtH-2 von Hexamer B und der Untereinheit CtH-1 von Hexamer C auf.

Zwischen den Untereinheiten CtH-1 von Hexamer A und C sowie zwischen den Untereinheiten CtH-1 von Hexamer B und D ist möglicherweise ein fünftes Interface vorhanden. In diesem Bereich sind in der 3D-Rekonstruktion klare Massen zu erkennen. Die Aminosäuren der eingepassten molekularen Modelle sind in diesem Bereich jedoch zu weit voneinander entfernt, um mögliche molekulare Brücken zwischen den Hexameren auszubilden. Aufgrund der großen räumlichen Distanz wurden für dieses mögliche Interface keine MD-Simulationen durchgeführt.

Um einen genaueren Einblick in die möglichen molekularen Kontakte zwischen den Aminosäuren der jeweiligen Interfaces zu erhalten, wurden für die Interfaces I bis IV je zwei MD-Simulationen durchgeführt. Die erste MD-Simulation wurde mit der Aminosäure Histidin im ungeladenen Zustand (neutral) berechnet. In der zweiten MD-Simulation lag die Aminosäure Histidin im geladenen Zustand vor.

2.4.1 Einstellung und Berechnung der MD-Simulationen

Wie bereits erwähnt, sind an allen Interfacetypen Histidine beteiligt (Martin et al., 2007). Das Programm GROMACS setzt in seinen Standardeinstellungen alle Histidine in den ungeladenen Zustand (Abb. C.20 B).

Da Histidin jedoch die einzige Aminosäure ist, die bei neutralen pH-Werten sowohl als Protonendonator als auch als Protonenakzeptor fungieren kann, und oft bei kleinen Veränderungen des pH-Wertes seinen Ladungszustand ändert, wollte ich sehen, wie sich die MD-Simulationen mit Histidin im protonierten Zustand entwickeln (Abb. C.20 A).

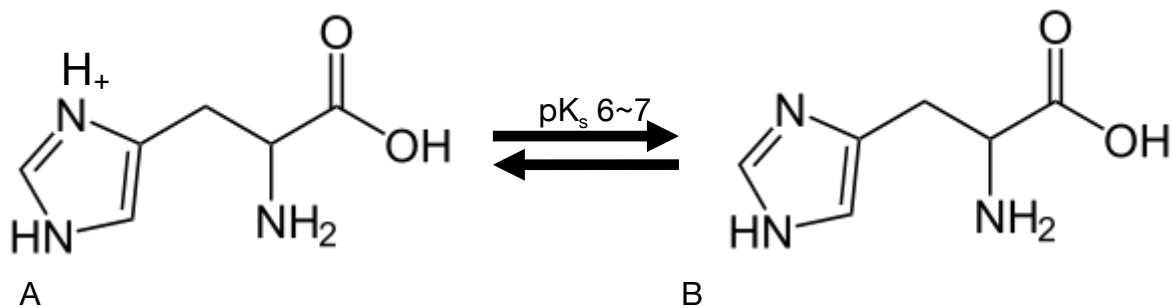


Abb. C.20: Ladungszustände der Aminosäure Histidin. **A:** Die geladene (protonierte Form) des Histidins. **B:** Die ungeladene (neutrale) Form des Histidins. Bei einem pH-Wert von ca. 6 liegen die beiden Formen in einem Verhältnis von 1:1 vor.

Die erste MD-Simulation wurde mit den Standardeinstellungen durchgeführt. Das Histidin lag somit im ungeladenen Zustand vor. Für die zweite MD-Simulation wurde der Protonierungszustand aller Histidine so abgeändert, dass diese im protonierten Zustand vorlagen. Die restlichen Einstellungen des MD-Systems entsprachen den bereits beschriebenen Einstellungen (siehe Abschnitt B.8). Die Analyse der Daten wurde wie in Abschnitt C.1.6.2 durchgeführt.

Die nachfolgenden Ergebnisse der beiden MD-Simulationen für die Interfaces I bis IV zeigen, dass die Aminosäure Histidin im protonierten Zustand andere Bindungen eingehen kann als im unprotonierten. Ebenso änderten sich auch die Interaktionen zwischen benachbarten Aminosäuren, die zuvor durch das neutrale Histidin scheinbar nicht beeinflusst wurden.

Nachfolgend werden die Interfaces I bis IV des 4x6-mers von *C. truncata* beschrieben und mit Hilfe der beiden MD-Simulationen genauer analysiert.

2.4.2 Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2/C_2 \leftrightarrow D_2$)

Interface I stabilisiert das in Abb. C.19 gezeigte tatsächliche Halbmolekül und sollte daher besonders stabil sein (Abb. C.21 A).

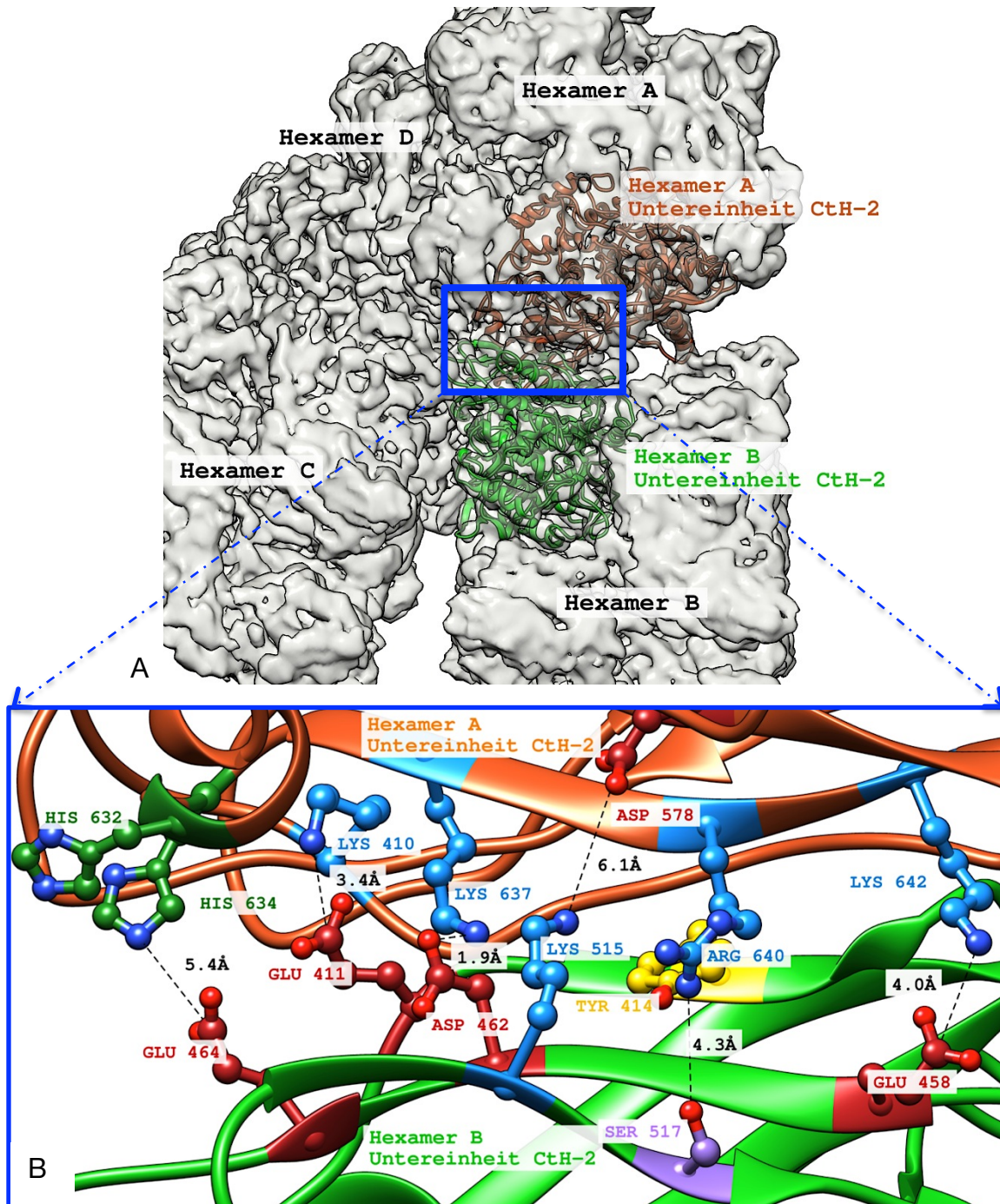


Abb. C.21: Das Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2/C_2 \leftrightarrow D_2$). **A:** Position des Interfaces I innerhalb des tatsächlichen Halbmoleküls (blauer Kasten). **B:** Detailansicht des Interface I. Dargestellt sind die Aminosäuren der beiden Untereinheiten, die potentielle Bindungen zwischen den beiden Hexameren eingehen können. H632 \leftrightarrow E464, K410 \leftrightarrow E411, K637 \leftrightarrow D462, D578 \leftrightarrow K515, R640 \leftrightarrow S517 und K642 \leftrightarrow E458. Der Aufbau des Interfaces ähnelt dem eines „Reißverschlusses“. Aus Übersichtsgründen wird das Interface I nur zwischen den Untereinheiten CtH-2 von Hexamer A und B gezeigt.

Es wird im Bereich der Domäne #3 der beiden Untereinheiten ausgebildet. Hier liegen sich die β -Faltblätter 3, 6, 8 und 10 beider Untereinheiten parallel gegenüber und treten miteinander in Kontakt. Die beiden β -Faltblätter 3 liegen dabei in direkter räumlicher Nähe und können miteinander interagieren (⁴¹⁰KENFYIS⁴¹⁶). Weiterhin befindet sich β -Faltblatt 6, das viele negativ geladene Aminosäuren trägt (⁴⁵⁸EFHKDVEN⁴⁶⁵), in direkter Nähe zu β -Faltblatt 10 (⁶³²HLHNFKHIRVK⁶⁴²). Die sich dort befindlichen positiv geladenen Aminosäuren K637, R640 und K642 könnten Salzbrücken zu den Aminosäuren E458, D462 und E464 ausbilden (Abb. C.21 B).

MD-Simulation des Interfaces I mit unprotonierten Histidinen

Dies konnte zum Teil durch die MD-Simulation bestätigt werden: zu Beginn der Simulation scheint das Interface durch die Interaktionen der Aminosäurepaare K637/A₂↔D462/B₂, K642/A₂↔E458/B₂, K637/A₂↔E411/B₂, K410/A₂↔E464/B₂ und K410/A₂↔E411/B₂ stabilisiert zu werden. Die Distanz zwischen K637/A₂ zu D462/B₂ und E411/B₂ bleibt über die gesamte Dauer der MD-Simulation konstant bei 3-5 Å (Abb. C.22 A). Hier scheinen die beiden sauren Aminosäuren abwechselnd mit dem Lysin eine Bindung einzugehen, wobei in knapp 73% der Simulationszeit die Distanz zwischen K637/A₂ und E411/B₂ bei 3 Å liegt und somit im Vergleich zur möglichen Bindung von K637/A₂ mit D462/B₂ stabiler erscheint (Abb. C.22 B). Ebenfalls sehr stabil ist die Salzbrücke zwischen K642/A₂ und E458/B₂. Die Distanz zwischen den beiden Resten liegt zu knapp 75% der Zeit im Bereich von 3-5 Å (Abb. C.22 B).

Die mögliche Bindung zwischen K410/A₂ und E464/B₂ sowie E411/B₂ löste sich im Verlauf der MD-Simulation auf (Abb. C.22 A / s. Anhang: Abb. F.1 t0-t2). Nach 60 ns nahm die Distanz zwischen K410/A₂↔E464/B₂ zu und pendelte sich im Bereich von 7-10 Å ein (Abb. C.22 A).

Eine mögliche Interaktion von H632/A₂ mit E464/B₂ ist aufgrund der vorliegenden MD-Ergebnisse unwahrscheinlich, ebenso ein möglicher Kontakt von H634/A₂ zu E464/B₂ bzw. E411/B₂. Der Loop bzw. der Beginn der α -Helix, auf dem sich diese beiden Histidine befinden, drehte sich im Laufe der MD-Simulation von der Kontaktstelle weg (s. Anhang: Abb. F.1 t0-t2).

Von β -Faltblatt 8 (⁵¹⁴NKISRK⁵¹⁹) ragen zwei Aminosäuren, K515/B₂ und S517/B₂, ebenfalls in den Bereich des Interfaces hinein und könnten mit den Aminosäuren D578/A₂ bzw. R640/A₂ der gegenüberliegenden Untereinheit in Kontakt treten (Abb. C.21 B). In der MD-Simulation gingen R640/A₂ und K515/B₂ jedoch keine Wechselwirkungen mit D578/A₂ und S517/B₂ ein, sondern bildeten innerhalb ihrer Untereinheit Brücken zu benachbarten Aminosäuren aus und stabilisierten so die Struktur.

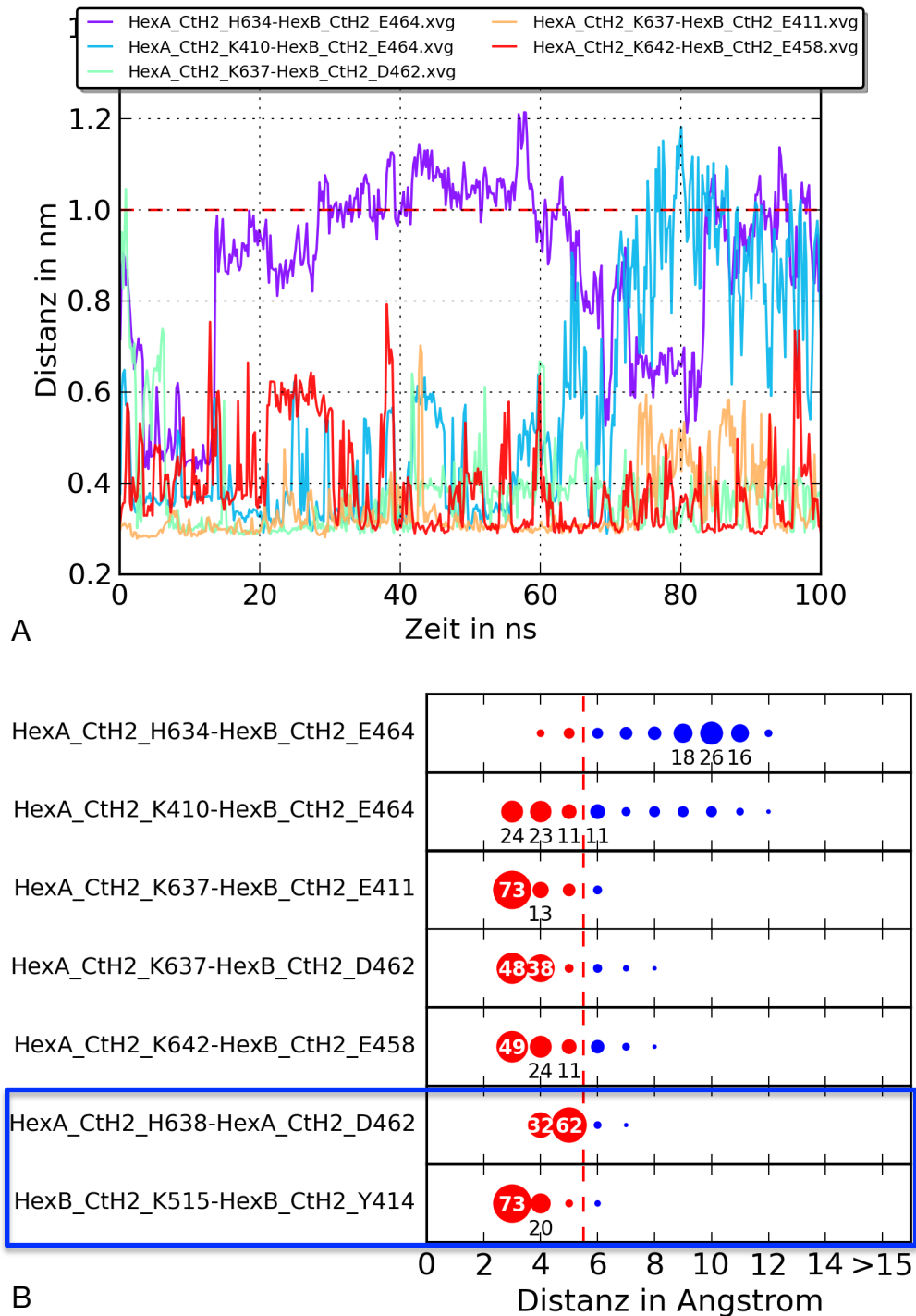


Abb. C.22: Auswertung der Abstände verschiedener Aminosäurepaare. **A:** Zeitlicher Verlauf der Distanz zwischen fünf möglichen Bindungen. Eine mögliche Bindung zwischen H634/A₂↔E464/B₂ (lila) kann weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Distanz zwischen beiden Aminosäuren liegt zu ca. 80 % der Simulationszeit bei 6-10 Å (siehe **B**). Die Distanz zwischen dem Kontakt K410/A₂↔E464/B₂ (hellblau) nimmt ab 60 ns zu, so dass keine Bindung mehr zwischen den beiden Aminosäuren möglich ist. Die Kontakte zwischen K637/A₂↔E411/B₂ (türkis), K637/A₂↔D462/B₂ (orange) und K642/A₂↔E458/B₂ (rot) sind sehr stabil. Die Distanzen bewegen sich hier im Bereich von 3-6 Å. Knapp 85 % der gesamten Simulationszeit liegen die Distanzen bei diesen drei Kontakten zwischen 3-5 Å (siehe **B**). Zusätzlich sind in **B** die internen Brücken (blaues Rechteck) zwischen H638/A₂↔D462/A₂ und K515/B₂↔Y414/B₂ angegeben. Hier lässt sich sehr gut sehen, dass zu über 90 % der Zeit die Distanz zwischen den Aminosäuren zwischen 3-5 Å liegt. Diese Bindungen sind also sehr stark und tragen zur Stabilität des Interfaces bei.

Im Laufe der MD-Simulation drehte sich R640/A₂ zu D462/A₂ und E489/A₂ und kam mit diesen beiden Aminosäuren in Kontakt. Der Abstand zwischen dem Arginin und den beiden sauren Aminosäuren lag nach ca. 20 ns bei 2-4 Å und blieb bis zum Ende der MD-Simulation konstant (Abb. C.22 A/B). Gleichzeitig interagierte K515/B₂ mit Y414/B₂. Das Lysin drehte sich kurz nach dem Start der MD in Richtung der Hydroxylgruppe des Tyrosins (s. Anhang. F.1 t0-t1). Die Distanz verkürzte sich dabei von knapp 6 Å auf 3-4 Å, welche dann zu 93 % der Simulationszeit konstant blieb (Abb. C.22 B).

MD-Simulation des Interfaces I mit protonierten Histidinen

Im Vergleich zur MD-Simulation des Interfaces I mit ungeladenen Histidinen ließen sich für einige molekulare Brücken neue bzw. veränderte Bindungspartner feststellen.

H634/A₂ bildete in dieser MD-Simulation mit E464/B₂ eine Ionenbindung aus. Diese war im Laufe der MD sehr stabil (Abb. C.23). Durch diese Bindung verschob sich der Loop, auf dem die Histidine H632 und H643 liegen, nicht in Richtung von Hexamer A₂, sondern blieb in direkter Nähe zu Hexamer B₂ (s. Anhang: Abb. F.2 t0-t2). Aufgrund dieser Stabilisierung kam E631/A₂ in Kontakt mit K515/B₂ (Abb.C.23 / s. Anhang: Abb. F2 t0-t2).

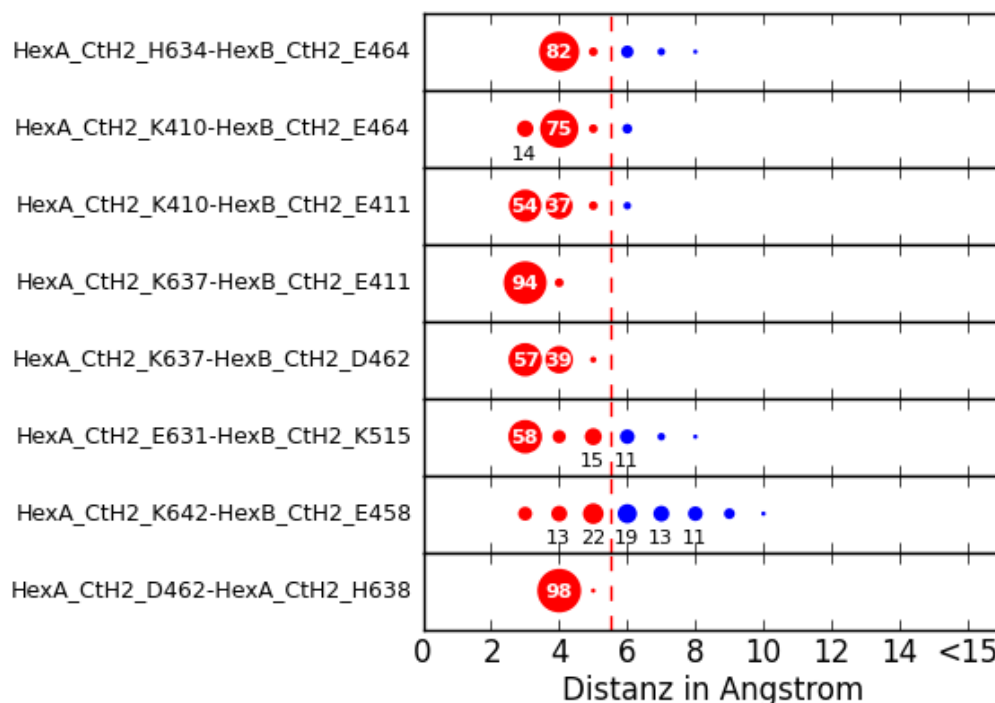


Abb. C.23: MD-Auswertung: Die prozentuale Verteilung der Abstände einiger Aminosäurepaare während der MD-Simulation mit protoniertem Histidin. Die Bindung zwischen H634/A₂ ↔ E464/B₂ war neu und sehr stabil (oberste Zeile), ebenso die Bindung zwischen E631/A₂ ↔ K515/B₂ (drittletzte Zeile). Diese bildete sich erst nach ca. 20-30 ns aus und blieb während der restlichen MD sehr stabil. Die Brücke zwischen K642/A₂ ↔ E458/B₂ löste sich nach ca. 40-50 ns auf (vorletzte Zeile). Die Brücke zwischen D462/A₂ ↔ H638/A₂ war während der kompletten MD-Simulation vorhanden. Diese Brücke hatte sich wahrscheinlich bereits bei der Equilibrierung des MD-Systems gebildet.

Diese Ionenbindung war in der vorherigen MD-Simulation mit unprotoniertem Histidin nicht aufgetreten. Durch die Bindung zwischen E631/A₂ und K515/B₂ konnte sich keine interne Brücke zwischen K515/B₂ und Y414/B₂ mehr ausbilden. Gegenüberliegend in Hexamer A war ähnliches zu erkennen.

Die Brücke zwischen D462/A₂ und R640/A₂ war nicht mehr so stark ausgeprägt wie in der vorherigen MD-Simulation. D462/A₂ stand während der MD-Simulation die meiste Zeit in direktem Kontakt mit H638/A₂ und interagierte mit diesem (Abb. C.23).

Die Ionenbindung zwischen K642/A₂ und E458/B₂, die in der vorherigen MD-Simulation noch sehr stabil war, löste sich im Laufe dieser MD-Simulation auf (Abb. C.23).

Die Brücken zwischen den basischen Aminosäuren K410/A₂ + K637/A₂ und den sauren Aminosäuren D462/B₂, E411/B₂ und E464/B₂ waren in dieser MD-Simulation ebenfalls vorhanden und sehr stabil (Abb. C.23).

Die Häufigkeit der Wechselwirkungen der Aminosäurenpaare, die am Interface I während der beiden MD-Simulationen beteiligt sind, sind in Tabelle C.2 aufgelistet.

Wechselwirkungen zwischen	MD-Simulation <u>ohne</u> protoniertem Histidin	MD-Simulation <u>mit</u> protoniertem Histidin
H634/A ₂ ↔ E464/B ₂	-	+
K410/A ₂ ↔ E464/B ₂	(+)	+
K410/A ₂ ↔ E411/B ₂	(+)	+
K637/A ₂ ↔ E411/B ₂	+	+
K637/A ₂ ↔ D462/B ₂	+	+
E631/A ₂ ↔ K515/B ₂	-	(+)
K642/A ₂ ↔ E458/B ₂	+	(+)
D462/A ₂ ↔ H638/A ₂	(+)	+
K515/B ₂ ↔ Y414/B ₂	+	-
+ = 3-4Å > 80% der Simulationszeit (+) = 3-5Å < 80% der Simulationszeit - = 3-5Å < 10% der Simulationszeit		

Tab. C.2: Vergleich der auftretenden Wechselwirkungen ausgewählter Aminosäurenpaare, die am Interface I beteiligt sind. Die Aminosäurenpaare H634/A₂ ↔ E464/B₂ und E631/A₂ ↔ K515/B₂ traten bei der MD-Simulation ohne protoniertem Histidin, im Gegensatz zur MD-Simulation mit protoniertem Histidin, nicht auf. Die Aminosäurenpaare traten in der zweiten MD-Simulation mit protoniertem Histidin grundsätzlich häufiger auf und wiesen zusätzlich einen kürzeren Abstand zueinander auf. Die kürzere Distanz zwischen den Aminosäureresten deutet auf eine stärkere Bindung hin. Betrachtet man das gesamte Interface I, so liegt es im MD-System mit protoniertem Histidin kompakter und stabiler vor.

2.4.3 Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$).

Das Interface II schien im Vorfeld eine besondere Rolle zu spielen, da es die beiden „natürlichen“ 2x6-mere (Halbmoleküle) (A/B + C/D) miteinander in Kontakt bringen und so maßgeblich zur Ausbildung des 4x6-mers beitragen könnte. Die $\beta_6 \rightarrow \beta_7$ -Loops der beiden Untereinheiten CtH-2 liegen sich parallel gegenüber. Die dort befindlichen Aminosäuren $^{466}\text{KEHH}^{469}$ sollten in der Lage sein, miteinander wechselseitig in Kontakt zu treten. Ebenso schienen die Aminosäuren D406 und E511, die sich auf benachbarten Loops befinden, Einfluss auf die Stabilität des Interfaces zu haben (Abb. C.24).

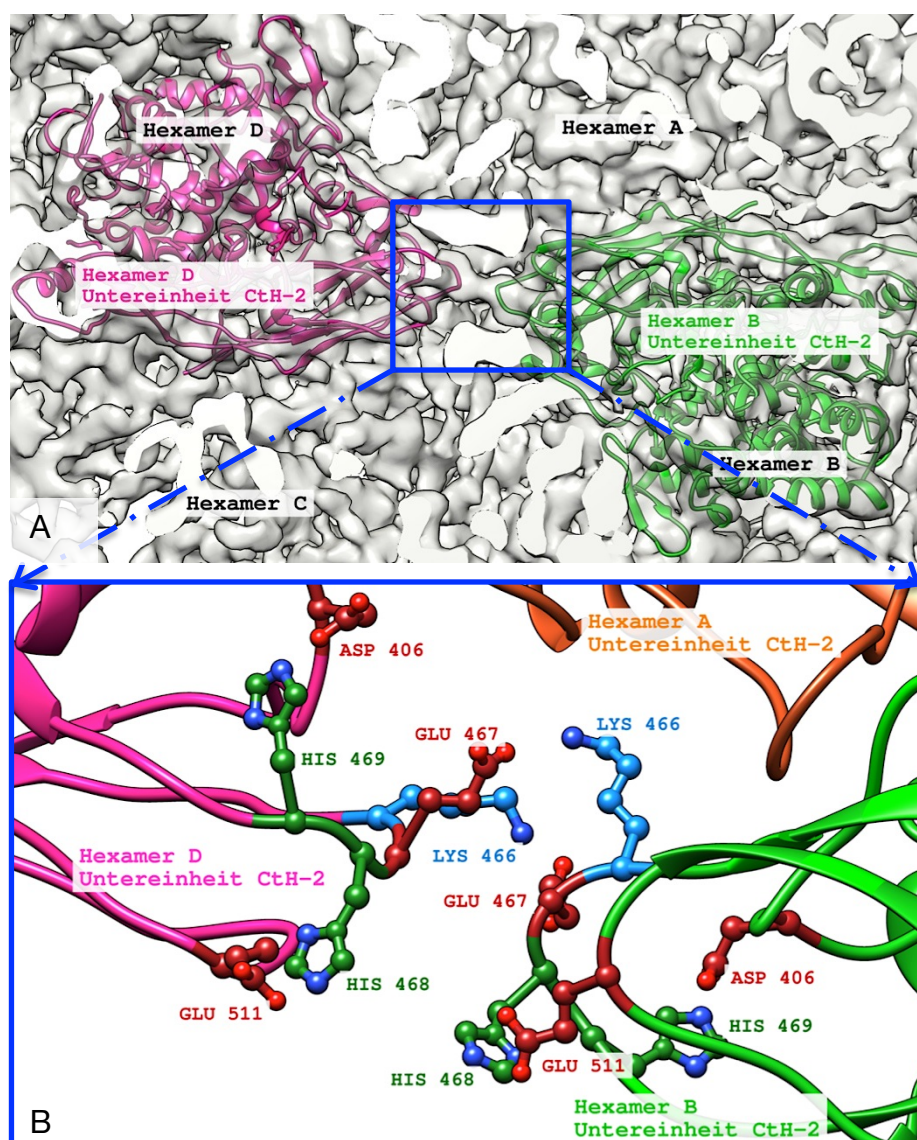


Abb. C.24: Das Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$) **A:** Position des Interface II im 4x6-mer. Die Brücke zwischen den beiden Untereinheiten CtH-2 ist deutlich zu erkennen (blauer Kasten). **B:** Detailansicht des Interfaces II. Die Aminosäuren $^{466}\text{KEHH}^{469}$ der beiden $\beta_6 \rightarrow \beta_7$ -Loops liegen sich parallel gegenüber. Die Aminosäuren D406 und E511 aus der Nachbarschaft scheinen den zentralen Bereich zu stabilisieren, indem sie mit den Histidinen 468 und 469 in Kontakt treten.

MD-Simulation des Interfaces II mit unprotoniertem Histidin

Die MD-Simulation zeigte jedoch, dass sich die beiden Loops sehr leicht voneinander wegbewegen und es so zu keinem Kontakt zwischen ihnen kommen kann. Die Histidine 468/D₂ und 469/D₂ drehten sich vom Interface weg und bewegten sich in Richtung der Asparaginsäure 406/D₂ (s. Anhang: Abb. F.3 t0-t2). Eine ähnliche Drehung vollzog auch H468/B₂ und H469/B₂. Einzig E511/D₂ und K466/B₂ waren zu Beginn der MD-Simulation noch nah genug zusammen, um über eine Ionenbindung in Kontakt zu treten (Abb. C.25 / s. Anhang: Abb. F.3 t1). Der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren schwankte jedoch im Laufe der MD-Simulation sehr stark (zwischen 3-12 Å). Man kann davon ausgehen, dass die Bindung zwischen E511/D₂ und K466/B₂ nicht sehr stabil ist (s. Anhang: Abb. F.3 t2). Dieses Ergebnis ist seltsam, da die 4,9 Å-Struktur des CtHs eine gut sichtbare Brücke zwischen den beiden Untereinheiten aufweist (Abb. C.24 A). Möglicherweise ist die Position der Loops im pseudoatomaren Modell ungünstig und führt dazu, dass die beteiligten Aminosäuren sich wegdrehen.

Ab der 20 ns ging E511/B₂ eine Bindung mit einem Ca²⁺-Ion ein, die bis zum Ende der MD-Simulation bestehen blieb (Abb. C.25 / lila Kurve)

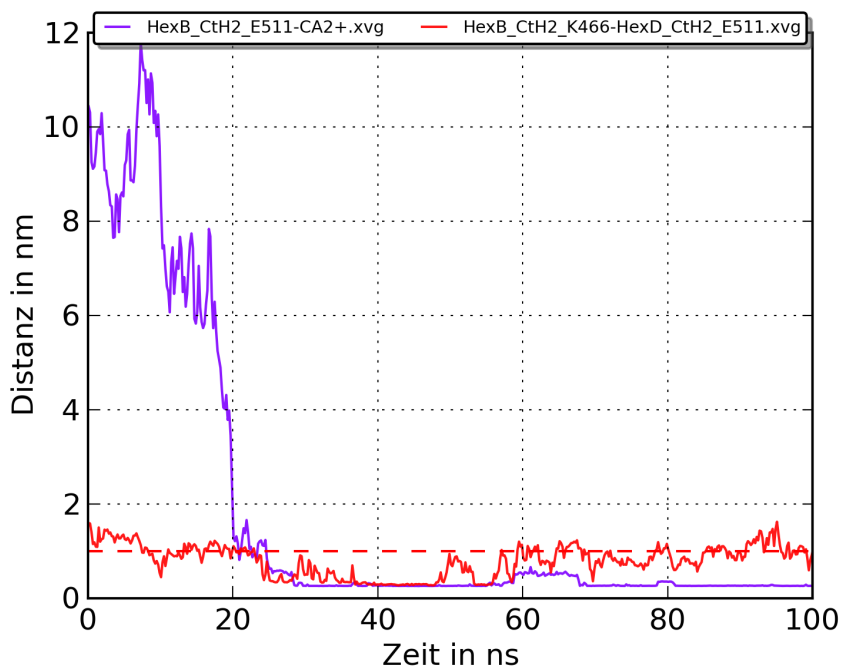


Abb. C.25: MD-Auswertung von Interface II: Zeitliche Veränderung der Distanz der molekularen Brücke K466/B₂↔E511/D₂ (rot) und E511/B₂↔Ca²⁺ (lila). Nach ca. 10-15 ns bewegte sich das Calcium-Ion sehr schnell in den Bereich von E511/B₂. Nachdem beide in Kontakt traten, war die Bindung bis zum Ende der MD sehr stabil. Die Distanz der molekularen Brücke K466/B₂↔E511/D₂ schwankte zwischen 3-10 Å. Zwischen 25 und 45 ns lag die Distanz bei 3-5 Å, was eine Bindung zwischen den Aminosäuren erlauben würde. Die Distanz steigt ab der 45 ns wieder an und schwankt im Bereich von 3-12 Å. Die Bindung zwischen den beiden Aminosäuren ist also nicht stabil.

MD-Simulation des Interfaces II mit protoniertem Histidin

In dieser MD-Simulation drehten sich die $\beta_6 \rightarrow \beta_7$ -Loops nicht voneinander weg. Die zu Beginn der MD-Simulation beobachteten Bindungen zwischen E467/B₂ ↔ K466/D₂ und E467/D₂ ↔ K466/B₂ lösten sich sehr schnell auf. Die möglichen internen Brücken innerhalb der beiden Untereinheiten (CtH-2) zwischen H469 ↔ D406 waren sehr instabil. In CtH-2/Hexamer D etablierte sich während der MD-Simulation eine potentiell interne Bindung zwischen E467 und H469. Während 82 % der gesamten Simulationszeit lag der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren bei ca. 4 Å. In CtH-2/Hexamer B lagen die beiden Aminosäuren in knapp 30 % der Simulationszeit in einem Bereich, in dem sie miteinander interagieren konnten (zwischen 4-5 Å) (Abb. C.26). Weitere interne Brücken ließen sich zwischen E511 und H468 beobachten. Hier war der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren bei CtH-2/Hexamer B und CtH-2/Hexamer D nahezu identisch (Abb. C.26). Weiterhin gab es mögliche Kontakte zwischen E511/B₂ und H468/D₂ bzw. E511/D₂ und H468/B₂. In der MD-Simulation schien dabei E511/B₂ ↔ H468/D₂ etwas stabiler zu sein (Abb. C.26). Zum Ende der MD-Simulation gab es eine leichte Verschiebung der Tertiärstruktur zwischen beiden Untereinheiten (s. Anhang: Abb. F.4 t0-t2). Aufgrund dessen lösten sich die möglichen Bindungen auf.

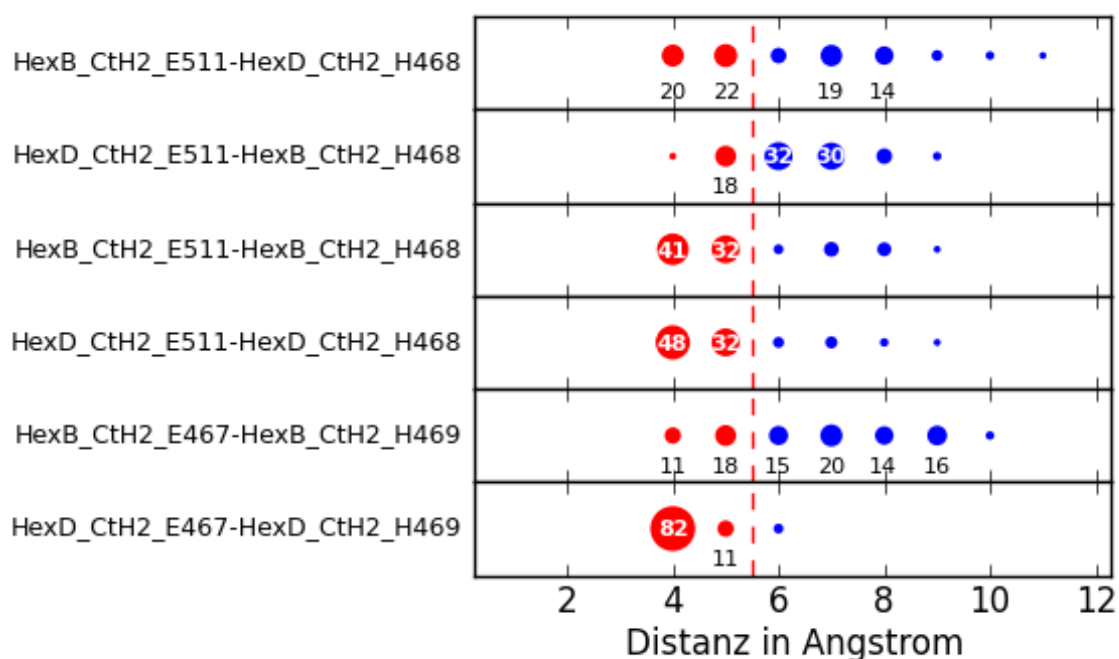


Abb. C.26: MD-Auswertung von Interface II: Prozentuale Verteilung der Abstände zwischen den Aminosäuren während der MD-Simulation von 100 ns. Eine mögliche Ionenbindung zwischen E511/B₂ ↔ H468/D₂ (bzw. E511/D₂ ↔ H468/B₂) war zwischen 20-40 % der Simulationszeit möglich. Viel stabiler waren die Bindungen zwischen E511 ↔ H468 innerhalb der jeweiligen Untereinheiten von Hexamer B und D. Die interne Bindung zwischen E467 ↔ H469 trat bei Untereinheit CtH-2/Hexamer D viel häufiger auf (ca. 90 %) als bei CtH-2/Hexamer B (ca. 30 %).

Auch in der zweiten MD-Simulation konnte keine Salzbrücke zwischen den basischen Aminosäuren K466/B₂(D₂) und den sauren Aminosäuren E467/D₂(B₂) beobachtet werden. Dies bekräftigt die Vermutung, dass die $\beta_6 \rightarrow \beta_7$ -Loops im pseudoatomaren Modell der Untereinheit CtH-2 nicht gut modelliert sind, und so die beteiligten Aminosäuren energetisch ungünstige Positionen einnehmen. Diese energetisch ungünstige Positionierung kann dazu führen, dass die Aminosäuren gar nicht in der Lage sind, miteinander in Kontakt zu treten.

Tabelle C.3 fasst die möglichen Kontakte zwischen den beiden Untereinheiten zusammen.

Wechselwirkungen zwischen	MD-Simulation ohne protoniertem Histidin	MD-Simulation mit protoniertem Histidin
K466/B ₂ ↔ E511/D ₂	(+)	-
E511/B ₂ ↔ H468/D ₂	-	(+)
E511/D ₂ ↔ H468/B ₂	-	(+)
E511/B ₂ ↔ H468/B ₂	-	(+)
E511/D ₂ ↔ H468/D ₂	-	+
E467/B ₂ ↔ H469/B ₂	-	(+)
E467/D ₂ ↔ H469/B ₂	-	+

+ = 3-4 Å > 80 % der Simulationszeit
 (+) = 3-5 Å < 80 % der Simulationszeit
 - = 3-5 Å < 10 % der Simulationszeit

Tab. C.3: Vergleich der auftretenden Wechselwirkungen ausgewählter Aminosäurenpaare die am Interface II beteiligt sind. Das Interface II war bei der MD-Simulation mit protoniertem Histidin deutlich stabiler. Die vermuteten Salzbrücken zwischen K466/B₂ ↔ E467/D₂ (bzw. K466/D₂ ↔ E467/B₂) konnten jedoch bei beiden MD-Simulationen nicht beobachtet werden.

2.4.4 Interface III (A₂ ↔ D₂/B₂ ↔ C₂)

Das Interface III liegt etwas weiter vom Zentrum des Proteins entfernt und bildet sich zwischen den beiden Untereinheiten CtH-2 der Hexamere B und C (bzw. A und D) aus (Abb. C.27 A). Hier liegen sich die Sequenzen ⁴⁰⁰EADTE⁴⁰⁴ gegenüber. Der Abstand zwischen den beiden Alaninresten beträgt knapp 4 Å. Mögliche Partner für die sauren Aminosäuren E400, D402 und E404, um mit der benachbarten Untereinheit eine chemische Bindung herzustellen, sind jedoch nicht vorhanden (Abb. C.27 B). In der Nähe befinden sich die Histidine H632 und H634, die möglicherweise innerhalb der Untereinheit mit E400 bzw. E404 interagieren können. Bei der Einstellung des massekorrelierten Schwellenwerts der 4,9 Å-Struktur des CtH zeigte sich in diesem Bereich jedoch eine klare Verbindung zwischen den beiden Untereinheiten.

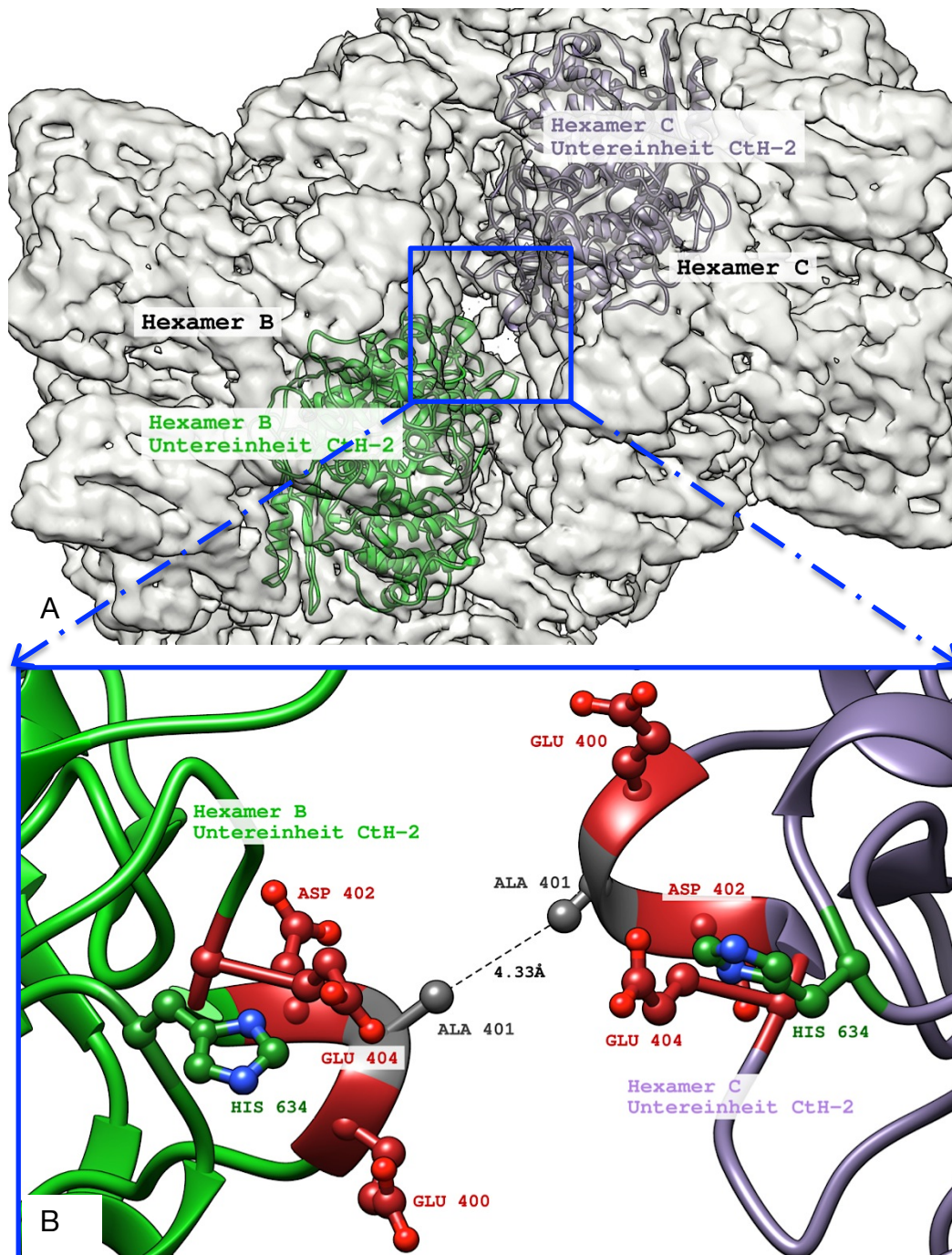


Abb. C.27: Das Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_2$) **A:** Position des Interface III im 4x6-mer. Die Brücke zwischen den beiden Untereinheiten CtH-2 ist deutlich zu erkennen (blauer Kasten). **B:** Detailsicht des Interfaces III. Die Aminosäureabschnitte $^{400}\text{EDTE}^{404}$ liegen sich gegenüber. Direkte Kontaktpartner für die sauren Aminosäuren konnten nicht identifiziert werden. Die Histidine könnten durch intramolekulare Brücken zu den Glutaminsäuren diesen Abschnitt stabilisieren.

MD-Simulation des Interfaces III mit unprotoniertem Histidin

Mit Hilfe der MD-Simulation war es möglich, diese Brücke zu erklären. Nach 10-20 ns lagerten sich 2-3 Calciumionen in den Bereich des Interfaces ein. Dabei interagierte ein Ca^{2+} -Ion mit den Glutaminsäuren E404 beider Hexamere als Bindeglied. Das zweite Ca^{2+} -Ion vermittelte eine Brücke zwischen E400/B₂ und D406/C₂ (Abb. C.28 / s. Anhang: Abb. F.5 t0-t2). Nachdem sich diese Bindungen etabliert hatten, waren sie bis zum Ende der MD-Simulation sehr stabil (Abb. C.28). Die Distanz zwischen den beiden Alaninresten A401 bewegt sich im Laufe der MD zwischen 3-6 Å. Eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen den beiden Aminosäuren erscheint daher hier möglich (s. Anhang: Abb. F.5 t0-t2).

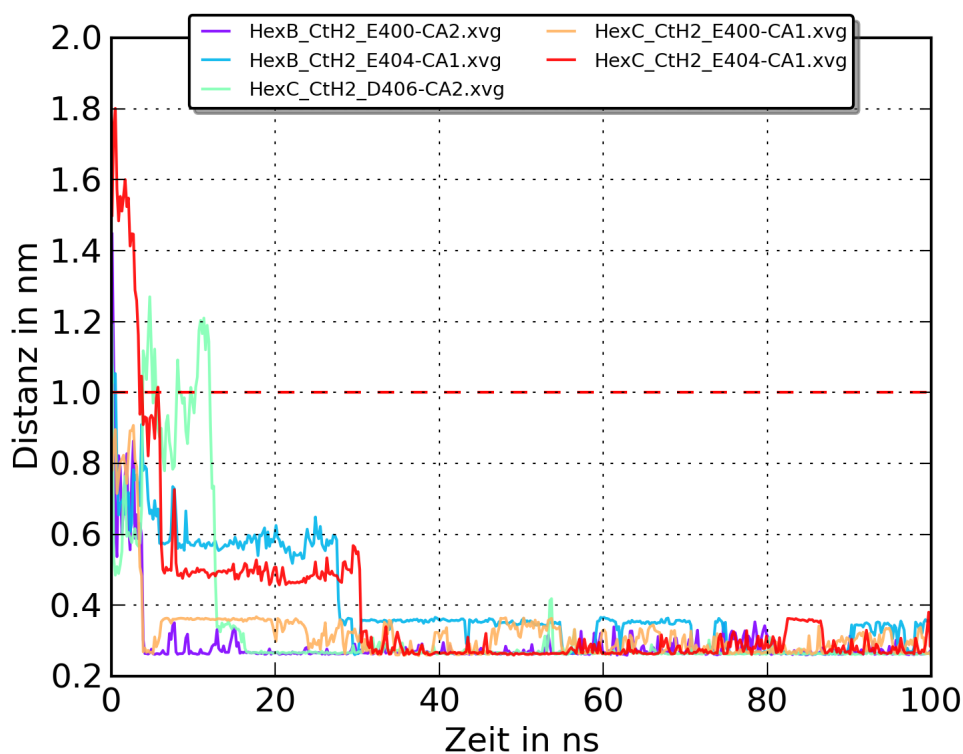


Abb. C.28: Auswertung der MD-Simulationsdaten von Interface III. Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der Distanz der beiden Calciumionen zu den entsprechenden Aminosäuren, mit denen sie interagierten. Nach 30 ns schwankte der Abstand zwischen den Ionen und den Aminosäureresten zwischen 2-4 Å und blieb bis zum Ende der MD konstant in diesem Wertebereich. Die Daten zeigen, wie essentiell die Calcium-Ionen für die Bildung dieser molekularen Brücke sind.

MD-Simulation des Interfaces III mit protoniertem Histidin

Die Auswertung der zweiten MD-Simulation zeigte, dass die benachbarten Histidine H634 und H469 einen viel größeren Einfluss auf das Interface III hatten. Hierbei traten in jeweils beiden Untereinheiten (A₂ und D₂ bzw. B₂ und C₂) die Aminosäuren E404 mit H634 in Kontakt (Abb. C.29 / s. Anhang: Abb. F.6 t2). Zum Ende der

MD-Simulation war innerhalb der Untereinheit CtH-2 von Hexamer C eine Bindung zwischen D406 und H469 zu beobachten (Abb. C.29 / s. Anhang: Abb. F.6 t2).

Eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen den beiden Alaninen A401 war während der zweiten MD-Simulation die meiste Zeit ausgeschlossen. Erst zum Ende der Simulation verringerte sich der Abstand zwischen den beiden Alaninen. Eine Interaktion zwischen den beiden Aminosäuren war so wieder möglich (Abb. C.29/30 / s.Anhang: Abb. F.6 t0-t2).

Die Ca^{2+} -Ionen nahmen auf das Interface III während der zweiten MD-Simulation im Gegensatz zur ersten MD-Simulation keinen Einfluss. Zwei Ca^{2+} -Ionen befanden sich während der MD-Simulation in der Nähe des Interfaces. Ein Ion schien kurzzeitig eine Bindung mit den beiden Asparaginsäuren D402 einzugehen, welche sich aber ab 50 ns der MD-Simulation wieder auflöste (Abb. C.30 / s.Anhang: Abb. F.6 t1).

Tabelle C.4 fasst die möglichen Kontakte zwischen den beteiligten Aminosäuren des Interfaces III während der beiden MD-Simulationen zusammen.

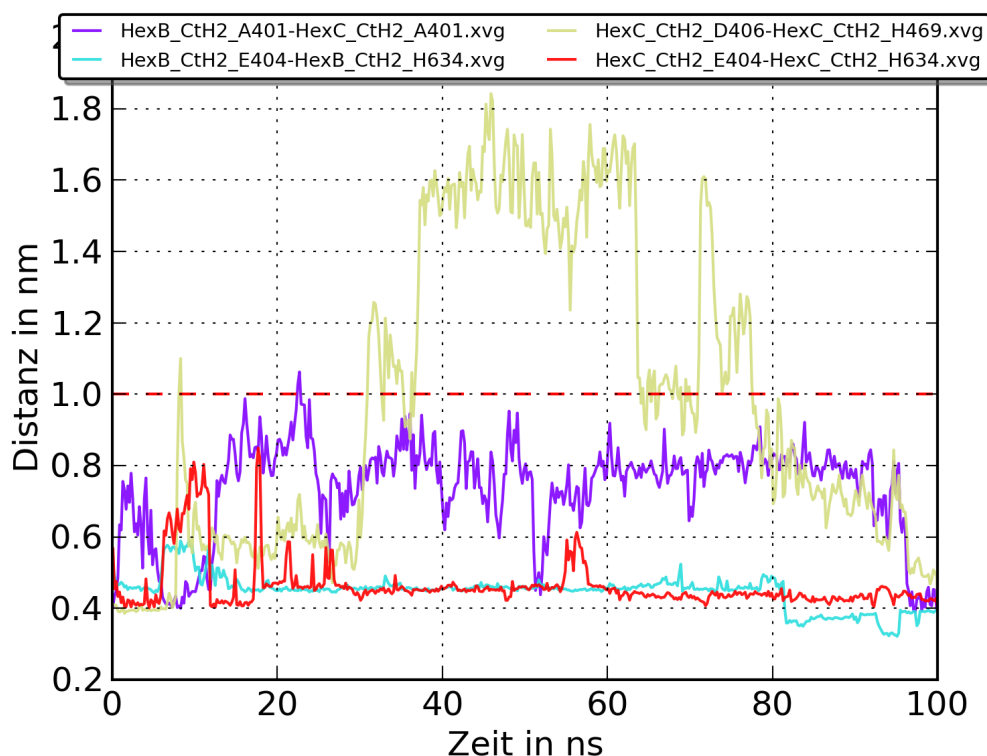


Abb. C.29: MD-Simulation von Interface III: Dargestellt ist die zeitliche Änderung der Abstände zwischen den ausgewählten Aminosäuren während der MD-Simulation von 100 ns. Der Abstand zwischen A401/B₂ ↔ A401/C₂ (lila) stieg zu Beginn der Simulation auf ca. 8-10 Å an und schwankte anschließend zwischen 6-8 Å. Erst zum Ende der MD-Simulation näherten sich die beiden Alanine wieder an (4 Å). Eine Brücke war zwischen D406/C₂ ↔ H469/C₂ (gelb) ebenfalls erst am Ende der MD-Simulation möglich. Die Abstände der beiden möglichen Bindungen E404/B₂(C₂) ↔ H634/B₂(C₂) (hellblau/rot) waren sehr stabil und lagen bei 4-5 Å.

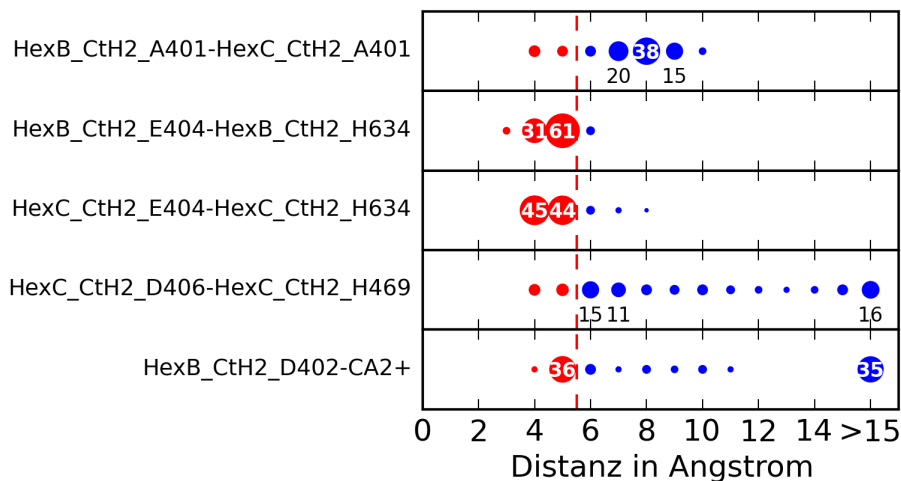


Abb. C.30: MD-Simulation von Interface III: Gezeigt wird die prozentuale Verteilung der Abstände zwischen den ausgewählten Aminosäuren des Interfaces III während der MD-Simulation von 100 ns. Eine mögliche Bindung zwischen A401/B₂ ↔ A401/C₂ war nur zu knapp 10 % der Gesamtsimulationszeit möglich. Die zwei potentiellen Kontakte zwischen E404/B₂(C₂) ↔ H634/B₂(C₂) wiesen zu jeweils 90 % der Gesamtsimulationszeit einen Abstand von 4-5 Å auf, was auf eine stabile Bindung zwischen den beiden Aminosäuren deutete. Der Abstand zwischen D406/C₂ ↔ H469/C₂ war während der meisten Zeit der MD-Simulation zu groß, so dass keine Bindung zwischen den beiden Aminosäuren möglich war. Der Abstand des Ca²⁺-Ion zu D402/B₂ lag zu ca. 40 % der Simulationszeit bei 4-5 Å. Diese Abstände bezogen sich jedoch auf die ersten 40-50 ns der MD-Simulation. Danach vergrößerte sich der Abstand zwischen dem Ca²⁺-Ion und der Asparaginsäure wieder.

Wechselwirkungen zwischen	MD-Simulation ohne protonierte Histidine	MD-Simulation mit protonierten Histidinen
E400/B ₂ ↔ Ca ²⁺ /2	+	-
E404/B ₂ ↔ Ca ²⁺ /1	+	-
E400/C ₂ ↔ Ca ²⁺ /1	+	-
E404/C ₂ ↔ Ca ²⁺ /1	+	-
D406/C ₂ ↔ Ca ²⁺ /2	+	-
D402/B ₂ ↔ Ca ²⁺ /2	-	(+)
A401/B ₂ ↔ A401/C ₂	+	-
E404/B ₂ ↔ H634/B ₂	-	+
E404/C ₂ ↔ H634/C ₂	-	+
D406/C ₂ ↔ H469/C ₂	-	(+)

+ = 3-4Å > 80 % der Simulationszeit
 (+) = 3-5Å < 80 % der Simulationszeit
 - = 3-5Å < 10 % der Simulationszeit

Tab. C.4: Vergleich der möglichen Kontakte zwischen den beteiligten Aminosäuren und Ca²⁺-Ionen, die am Aufbau von Interface III beteiligt sind. Während der MD-Simulation des Interfaces III ohne protonierte Histidine fungierten zwei Calcium-Ionen als Bindeglied zwischen E400, E404 und D406 und bildeten so die Brücke zwischen den beiden Untereinheiten CtH-2 von Hexamer B und C. Während der zweiten MD-Simulation spielten die Ca²⁺-Ionen keine Rolle beim Aufbau des Interfaces. Innerhalb der jeweiligen Untereinheiten bildeten die protonierten Histidine Brücken zu den sauren Aminosäuren aus und stabilisierten so die Tertiärstruktur. Eine Brücke zwischen den beiden Untereinheiten CtH-2 der beiden Hexamere konnte sich jedoch nicht ausbilden.

2.4.5 Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$)

Das Interface IV bildet sich zwischen Domäne #1 der Untereinheit CtH-1 von Hexamer A (Hexamer C) und Domäne #3 der Untereinheit CtH-2 von Hexamer D (Hexamer B) aus. Das Interface IV wird nachfolgend zwischen Hexamer B₂ und Hexamer C₁ genauer beschrieben. In der 4,9 Å-Struktur des CtH befinden sich im Bereich dieses Interfaces zwei größere Brücken (Abb. C.31 A). Vermutlich handelt es sich hierbei um zwei Salzbrücken. Die erste befindet sich wahrscheinlich zwischen K51/C₁ und E508/B₂, während K102/C₁ und D594/B₂ vermutlich die zweite Salzbrücke ausbilden (Abb. C.31 B).

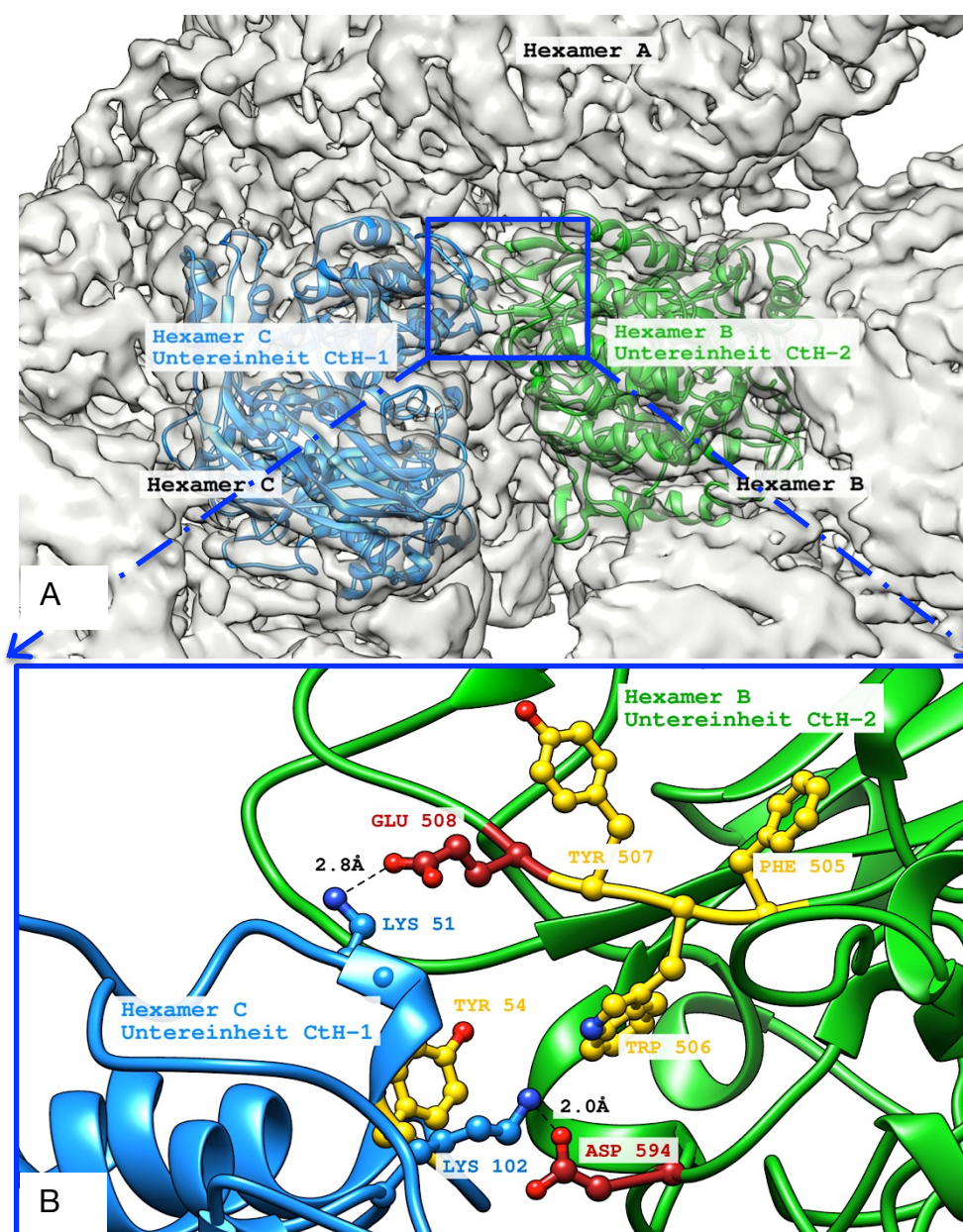


Abb. C.31: Das Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$). **A:** Das Interface IV bildet sich zwischen der Untereinheit CtH-1 des Hexamers C und der Untereinheit CtH-2 des Hexamers B aus (blauer Kasten). **B:** Detailsansicht auf das Interface IV. K51/C₁ liegt E508/B₂ genau gegenüber. Ebenso ist dies bei K102/C₁ und D594/B₂ der Fall. Aufgrund dieser räumlichen Nähe ist die Ausbildung zweier Salzbrücken sehr wahrscheinlich.

MD-Simulation des Interfaces IV mit unprotonierten Histidinen

Das Vorhandensein dieser zwei Salzbrücken wurde mit Hilfe der ersten MD-Simulation bestätigt. Zu ca. 80 % der Simulationszeit von 100 ns lagen die Distanzen zwischen den Resten der genannten Aminosäuren zwischen 3-5 Å (Abb. C.32/33). Eine chemische Bindung zwischen den obengenannten Aminosäuren ist damit sehr wahrscheinlich.

Auffällig war, dass sich während der MD-Simulation im Bereich der Salzbrücke K102/C₁↔D594/B₂ zwei weitere Asparaginsäuren D55/C₁ und D56/C₁ auf dem benachbarten Loop von Untereinheit C₁ in Richtung K102/C₁ bewegten, und mit diesem ebenfalls in Kontakt traten. Die drei sauren Aminosäuren interagierten scheinbar abwechselnd mit dem Lysin K102/C₁. Die Abstände zwischen den Aminosäuren D55/C₁↔K102/C₁ und D56/C₁↔K102/C₁ betragen knapp 80 % der MD-Simulationszeit ca. 3 Å (Abb. C.32/33 / siehe Anhang: Abb. F.7 t0-t2).

Nach 50 ns näherte sich ein Ca²⁺-Ion den Aminosäuren D66/C₁ und E467/B₂ (s. Anhang: Abb. F.7 t2). Das Ca²⁺-Ion ging im weiteren Verlauf der MD-Simulation mit D66/C₁ eine Bindung ein und stabilisierte so diesen Strukturbereich. Die Glutaminsäure E467/B₂ entfernte sich im Laufe der MD-Simulation vom Ca²⁺-Ion und gelangte in keine direkte räumliche Nähe, um mit diesem zu interagieren (Abb. C.32 / s. Anhang: Abb. F.7 t0-t2).

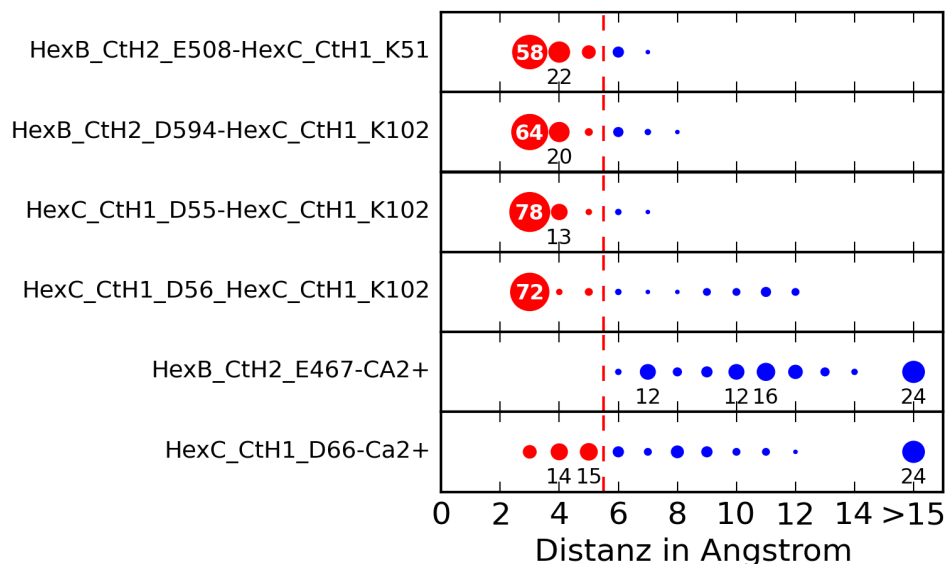


Abb. C.32: Auswertung der MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen von Interface IV. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Distanzen zwischen den Aminosäuren während der MD-Simulation von 100 ns. Die Abstände zwischen E508/B₂↔K51/C₁ sowie D594/B₂↔K102/C₁ lagen zu ca. 80 % der MD-Simulationszeit im Bereich von 3-4 Å. Die Abstände zwischen D55/C₁↔K102/C₁ und D56/C₁↔K102/C₁ lagen zu über 70 % der Simulationszeit bei 3 Å. Die drei Asparaginsäuren interagierten scheinbar abwechselnd mit K102/C₁. Die beiden unteren Reihen zeigen die mögliche Interaktion der Aminosäuren mit dem Ca²⁺-Ion. Zwischen E467 und dem Ca²⁺-Ion war während der MD-Simulation keine Bindung möglich. Zu 30 % der MD-Simulationszeit stand D66/C₁ mit dem Ca²⁺-Ion in Kontakt. Dieser Kontakt etablierte sich vor allem in den letzten 40 ns der MD-Simulation.

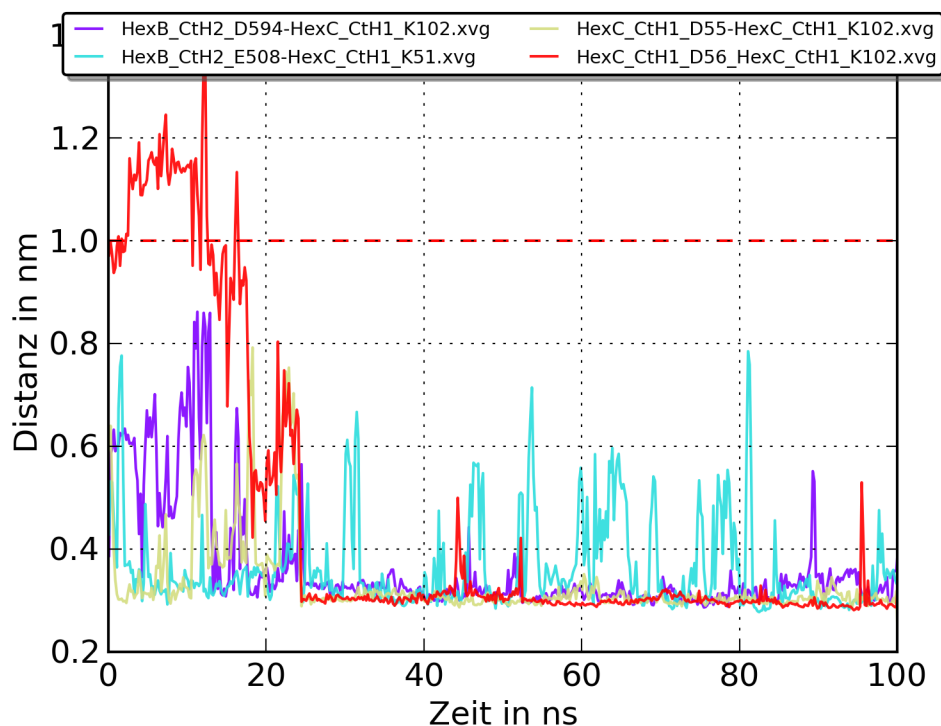


Abb. C.33: Auswertung der MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen von Interface IV. Gezeigt wird der zeitliche Verlauf der Abstände zwischen den aufgeführten Aminosäurepaaren während der MD-Simulation. Nach ca. 22 ns stabilisierten sich die Abstände. Die Änderung des Abstands zwischen D594/B₂↔K102C₁ (lila) (3-4 Å) zeigte dabei geringere Fluktuationen im Vergleich zu E508/B₂↔K51/C₁ (hellblau) (3-6 Å). Die Abstände innerhalb der Untereinheit C₁ zwischen den Aminosäuren D55/C₁↔K102/C₁ (gelb) und D56/C₁↔K102/C₁ (rot) waren ab der 22 ns sehr stabil und lagen bei 3 Å. Die Verringerung des Abstandes zwischen D56/C₁↔K102/C₁ (rot) während der ersten 20 ns kann man sehr gut erkennen.

MD-Simulation des Interfaces IV mit protoniertem Histidin

Auch beim Interface IV wurden nach der zweiten MD-Simulation mit protonierten Histidinen neue chemische Bindungen beobachtet. Die Salzbrücke zwischen D594/B₂ und K102/C₁ löste sich im Laufe der MD-Simulation auf (Abb. C.34 A; s. Anhang: Abb. F.8 t0-t2). Ebenso war die Bindung zwischen E508/B₂ und K51/C₁ viel schwächer ausgeprägt als in der vorherigen MD-Simulation (Abb. C.32/34 A). Neben E508/B₂ trat K51/C₁ auch mit den benachbarten Glutaminsäuren 510/B₂ und 511/B₂ in Kontakt (Abb. C.34 A / s. Anhang: Abb. F.8 t0-t2).

Eine neue chemische Bindung ergab sich durch die Interaktion zwischen den Histidinen H468/B₂ und H469/B₂ mit D66/C₁. Beide Histidine schienen sich dabei immer wieder bei der Bindung zur Asparaginsäure D66/C₁ abzuwechseln (Abb. C.34 A/B). Neben den beiden Histidinen trat hin und wieder ein Ca²⁺-Ion mit D66/C₁ in Kontakt. Das Ca²⁺-Ion näherte sich nach ca. 10 ns an die Asparaginsäure an und blieb im Laufe der MD-Simulation in unmittelbarer Nähe (4-6 Å) (Abb. C.34 A/B).

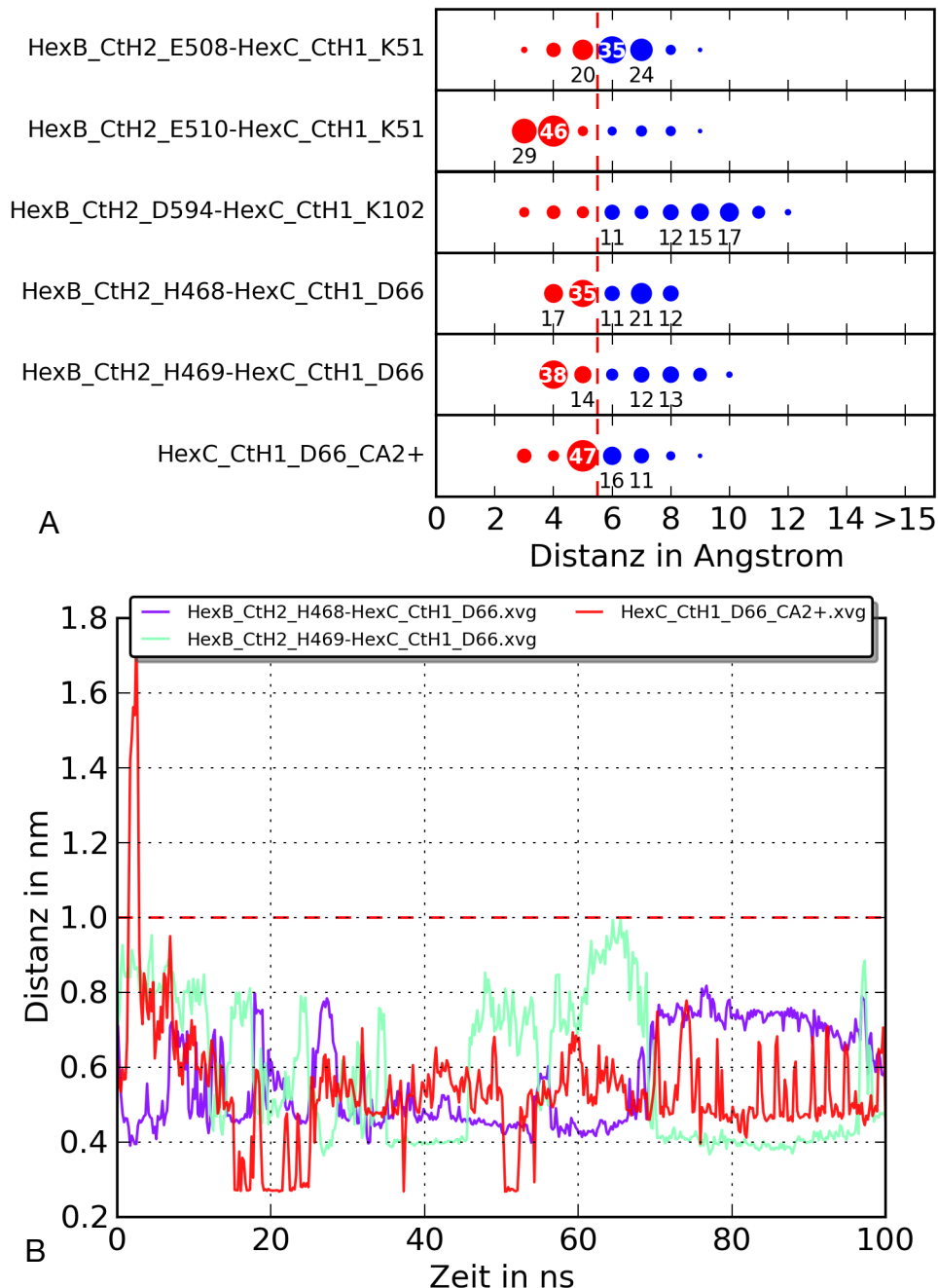


Abb. C.34: Auswertung der MD-Simulation mit protonierten Histidinen von Interface IV. Dargestellt ist die **(A)** prozentuale Verteilung und **(B)** zeitliche Veränderung der Abstände zwischen den aufgeführten Aminosäurepaaren von Interface IV. **A:** Die mögliche Bindung zwischen E508/B₂↔K51/C₁ war viel schwächer als in der vorherigen MD-Simulation (Abb. C.32.). Der Abstand zwischen E510/B₂↔K51/C₁ lag zu knapp 80 % der Simulationszeit im Bereich von 3-4 Å, was auf eine stabile Salzbrücke zwischen den beiden Aminosäuren hindeutet. Die zweite vermutete Salzbrücke zwischen D594/B₂↔K102/C₁ löste sich im Laufe der Simulation auf. **B:** Zeitliche Veränderung der Abstände zwischen H469/B₂↔D66/C₁, H468/B₂↔D66/C₁ sowie dem Ca²⁺-Ion und D66/C₁. Die beiden Histidine H468/B₂ und H469/B₂ wechselten sich mit der Bindung zu D66/C₁ scheinbar ab. Zwischen 45-70 ns der MD-Simulation lag der Abstand zwischen H468/B₂↔D66/C₁ bei ca. 4 Å (lila), während der Abstand zwischen H469/B₂↔D66/C₁ (türkis) zwischen 6-10 Å variierte. Ab 70 ns wechselte diese Konstellation. Das Ca²⁺-Ion näherte sich nach 15 ns der Asparaginsäure D66/C₁ an. Der Abstand zwischen dem Ca²⁺-Ion und der Asparaginsäure bewegte sich bis zum Ende der MD-Simulation zwischen 3-7 Å (rot).

Tabelle C.5 fasst die Ergebnisse der beiden MD-Simulationen von Interface IV zusammen.

Wechselwirkungen zwischen	MD-Simulation ohne protonierte Histidine	MD-Simulation mit protonierten Histidinen
E508/B ₂ ↔ K51/C ₁	+	(+)
E510/B ₂ ↔ K51/C ₁	-	+
D594/B ₂ ↔ K102/C ₁	+	-
H468/B ₂ ↔ D66/C ₁	-	(+)
H469/B ₂ ↔ D66/C ₁	-	(+)
D66/C ₁ ↔ Ca ²⁺ /1	(+)	(+)
E467/B ₂ ↔ Ca ²⁺ /1	-	-
D55/C ₁ ↔ K102/C ₁	+	-
D56/C ₁ ↔ K102/C ₁	+	-
+ = 3-4Å > 80 % der Simulationszeit (+) = 3-5Å < 80 % der Simulationszeit - = 3-5Å < 10 % der Simulationszeit		

Tab. C.5: Vergleich der möglichen Kontakte zwischen den beteiligten Aminosäuren und Ca²⁺-Ionen, die am Aufbau von Interface IV beteiligt sind. Die erste MD-Simulation von Interface IV bestätigte die vermuteten Salzbrücken zwischen E508/B₂↔K51/C₁ und D594/B₂↔K102/C₁. Auffällig war, dass K102/C₁ auch mit den benachbarten Asparaginsäuren D55/C₁ und D56/C₁ in Kontakt trat. Die zweite MD-Simulation mit protonierten Histidinen wies neue chemische Bindungen zwischen Aminosäuren auf, die in der ersten MD-Simulation nicht auftraten. Die Bindung zwischen D594/B₂↔K102/C₂ löste sich im Laufe der MD-Simulation auf. K51/C₁ interagiert nicht nur mit E508/B₂, sondern vor allem mit dem benachbarten E510/B₂. Weitere mögliche Bindungen wurden zwischen den beiden Histidinen H468/B₂, H469/B₂ und der Asparaginsäure D66/C₁ beobachtet. Innerhalb der Untereinheit CtH-1 von Hexamer C traten zwischen D55/C₁↔K102/C₁ und D56/C₁↔K102/C₁ keine potentiellen Bindungen auf (rechte Spalte).

2.4.6 Potentielles Interface V (A₁↔C₁/B₁↔D₁)

Im Bereich dieses potentiellen Interfaces lässt sich in der 4,9 Å-Struktur eine vorhandene Masse erkennen, die bereits bei einem niedrigeren Schwellenwert sichtbar ist (Abb. C.35 A). Nach dem Einpassen der Untereinheiten lässt sich jedoch beobachten, dass die Untereinheiten anscheinend zu weit voneinander entfernt liegen, um in Kontakt zu treten. Interessant ist, dass sich die identischen Aminosäuren, die das Interface ausbilden könnten, in diesem Bereich genau antiparallel gegenüber liegen (Abb. C.35 B). Es handelt sich hierbei um A43, ³⁰DH³¹ und ³⁶SD³⁷. Der Abstand zwischen A43/A₁ und A43/C₁ beträgt nur 4 Å. Eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen den beiden Aminosäuren ist sehr wahrscheinlich. Diese Vermutung wird auch durch die 4,9 Å-Struktur des CtH unterstützt. An der Position der beiden Alanine ist in der 3D-Rekonstruktion eine klare Brücke zu sehen, die bereits bei einem niedrigen Masseschwellenwert sichtbar ist.

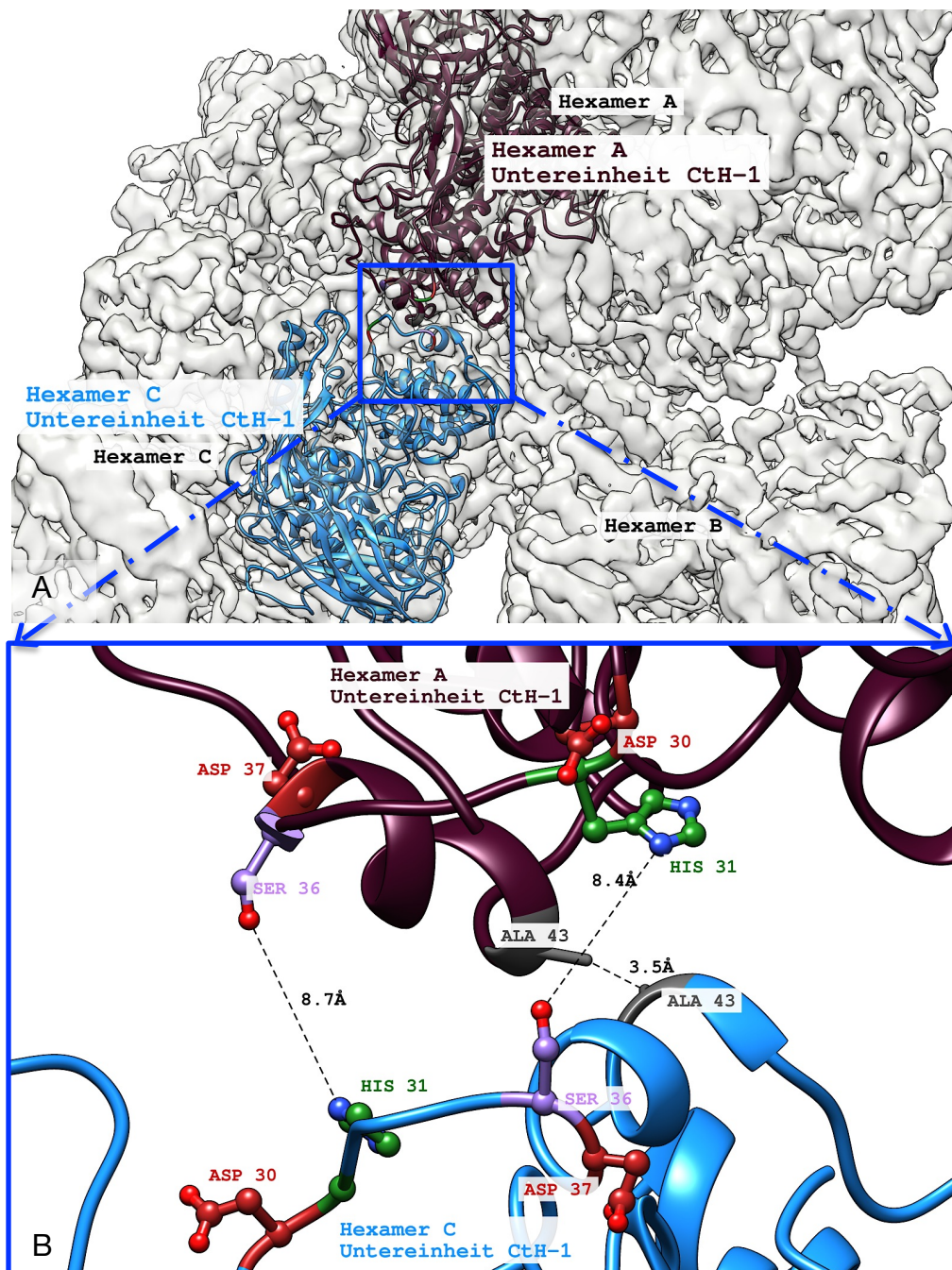


Abb. C.35: Das potentielle Interface V ($A_1 \leftrightarrow C_1/B_1 \leftrightarrow D_1$). **A:** Das Interface V befindet sich zwischen den Untereinheiten CtH-1 der Hexamere A und C bzw. B und D (blauer Kasten). **B:** Detailansicht von Interface V. Zwischen $A43/A_1 \leftrightarrow A43/C_1$ beträgt der Abstand 3-4 Å. Eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen den beiden Alaninen ist daher sehr wahrscheinlich. Die beiden Histidine $H31/A_1$ und $H31/C_1$ könnten mit den gegenüberliegenden Aminosäuren $^{36}SD^{37}$ in Kontakt treten und so das Interface V ausbilden. Der Abstand zwischen den Aminosäuren ist jedoch zu groß um, eine Bindung auszubilden.

Die Abstände zwischen $S36/A_1$ und $H31/C_1$ (bzw. $S36/C_1$ und $H32/A_1$) betragen ca. 8,5 Å, was für eine mögliche Bindung zu groß ist (Abb. C.35). Die Aminosäuren

$^{30}\text{DH}^{31}$ liegen jedoch auf einem flexiblen Loop. Eine Neumodellierung dieses Sekundärstrukturbereichs zeigte, dass sich die Loops auch in direkter Nachbarschaft zu $^{36}\text{SD}^{37}$ befinden können (Abb. C.36). Der Abstand zwischen den genannten Aminosäuren verringerte sich auf ca. 3 Å. Aufgrund des geringen Abstands ist eine chemische Bindung zwischen $\text{S36/A}_1(\text{C}_1) \leftrightarrow \text{H31/C}_1(\text{A}_1)$ sehr wahrscheinlich.

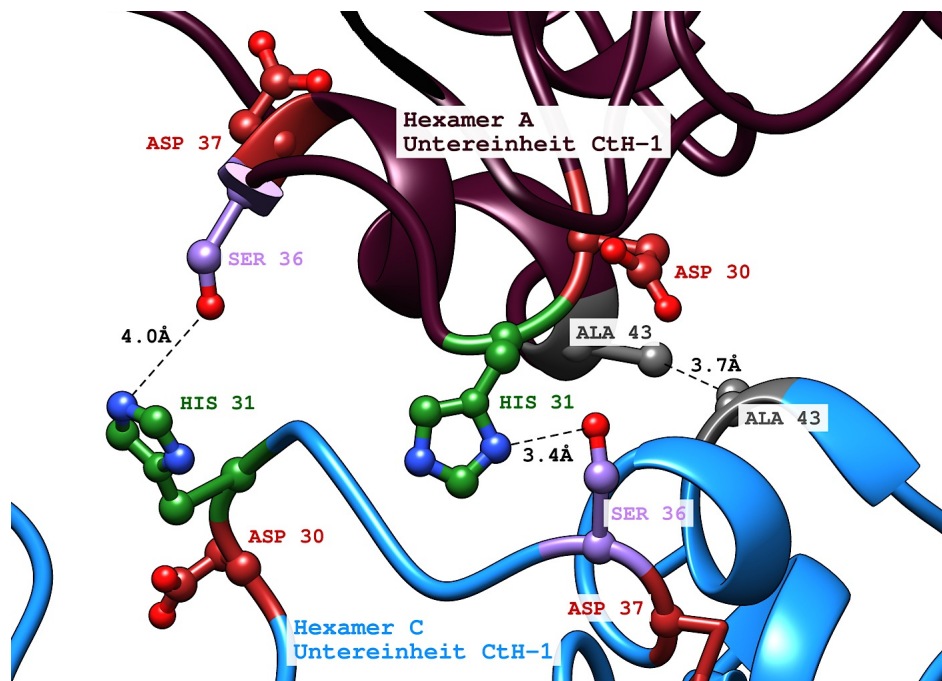


Abb. C.36: Detailansicht von Interface V nach der Neumodellierung des flexiblen Loops auf dem sich die Aminosäuren $^{30}\text{DH}^{31}$ befinden. Der Abstand zwischen $\text{A43/A}_1 \leftrightarrow \text{A43/C}_1$ liegt bei knapp 4 Å. Eine Bindung zwischen den beiden Alaninen ist weiterhin möglich. Zwischen $\text{S36/A}_1 \leftrightarrow \text{H31/C}_1$ und $\text{S36/C}_1 \leftrightarrow \text{H31/C}_1$ verkürzt sich der Abstand auf 4 Å bzw. 3,4 Å. Dieser geringe Abstand zwischen den Aminosäuren erlaubt es ihnen, miteinander in Kontakt zu treten und eine chemische Bindung auszubilden. Die so entstehenden Brücken würden die sichtbaren Massen zwischen den beiden Hexameren A und C (B und D) in der 4,9 Å-Struktur erklären.

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass das potentielle Interface V vom Aufbau eine große Ähnlichkeit zu Interface III ($\text{A}_2 \leftrightarrow \text{D}_2/\text{B}_2 \leftrightarrow \text{C}_2$) aufweist. Möglicherweise spielen auch hier Ca^{2+} -Ionen als Bindeglieder zwischen den sauren Aminosäuren der beiden Untereinheiten Cth-1 eine wichtige Rolle.

3. 3D-EM des Hämocyanins von *L. oceanica*

3.1 3D-Rekonstruktion des 2x6-meren Hämocyanins von *L. oceanica*

Nach der Entnahme wurde die Hämocyaninprobe über einen AMICON 1 MDa-Filter aufgereinigt, in einen angesetzten Puffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 10mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, pH-Wert: 7,6) überführt und entsprechend zur nachfolgenden Kryo-Präparation verdünnt (ca. 1,4 mg/ml).

Von der aufgereinigten Hämocyaninprobe wurden am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen von [REDACTED] 4.133 Aufnahmen erstellt. Die Bildakquisition erfolgte mit Hilfe eines TITAN KRIOS Elektronenmikroskops, das mit einem Falcon 2 Direct Electron Detector ausgestattet ist. Die Auflösung der getätigten Aufnahmen lag bei 1,27 Å/pix. Die 4.133 Aufnahmen wurden mit dem Programm RELION überprüft. Von diesen konnten 3.161 Aufnahmen für die anschließende CTF-Berechnung und Partikelextraktion übernommen werden. Die Partikelselektion/-extraktion erfolgte mit dem in RELION implementierten halbautomatischen Selektionsmodul. Es wurden zunächst ca. 1.000 Partikel manuell "gepickt". Aus diesen wurden mit Hilfe einer kurzen 2D-Klassifizierung Referenzen für die automatische Selektion berechnet. Der automatische Suchalgorithmus konnte 109.845 Einzelpartikel extrahieren. Anschließend wurden mit diesen die ersten referenzfreien 2D-Klassifizierungen durchgeführt. Hierbei konnten falsch ausgewählte Partikel (*false-positive*) bzw. Partikel minderer Qualität herausgefiltert werden, die in den nachfolgenden Berechnungen nicht mehr mit einbezogen wurden, um die Qualität der finalen 3D-Rekonstruktion nicht negativ zu beeinflussen. Nach der 2D-Klassifizierung wurden 68.971 Partikel für das 3D-Refinement genutzt. Mit Hilfe des Negativkontrastierungsverfahrens wurde vor einiger Zeit in unserer Arbeitsgruppe von LoH bereits eine 3D-Rekonstruktion mit einer Auflösung von ca. 20-25 Å erstellt. Diese passte ich mit den entsprechenden Werten an und filterte sie auf 40 Å, um eine zu starke Einflussnahme des initialen Modells auf das folgende 3D-Refinement zu verhindern. Nach 22 Iterationen brach das 3D-Refinement ab. Es stellte sich heraus, dass bei der Alignierung der einzelnen Partikel Fehler auftraten, die eine korrekte Berechnung einer 3D-Rekonstruktion unmöglich machten. Dies war gleichzeitig ein Hinweis darauf, dass es sich um einen heterogenen Datensatz des LoHs handeln könnte. Daraufhin wurde der Datensatz über eine multiple 3D-Klassifizierung nochmals berechnet und aufgetrennt. Nach jeder abgeschlossenen Klassifizierung wurden nur die besten 3D-Klassen für eine erneute

3D-Klassifizierung übernommen. Dieser Schritt wurde achtmal wiederholt. Die letzten fünf 3D-Klassen ließen deutlich zwei unterschiedliche Konformationen erkennen (Abb. C.37 A/B/C).

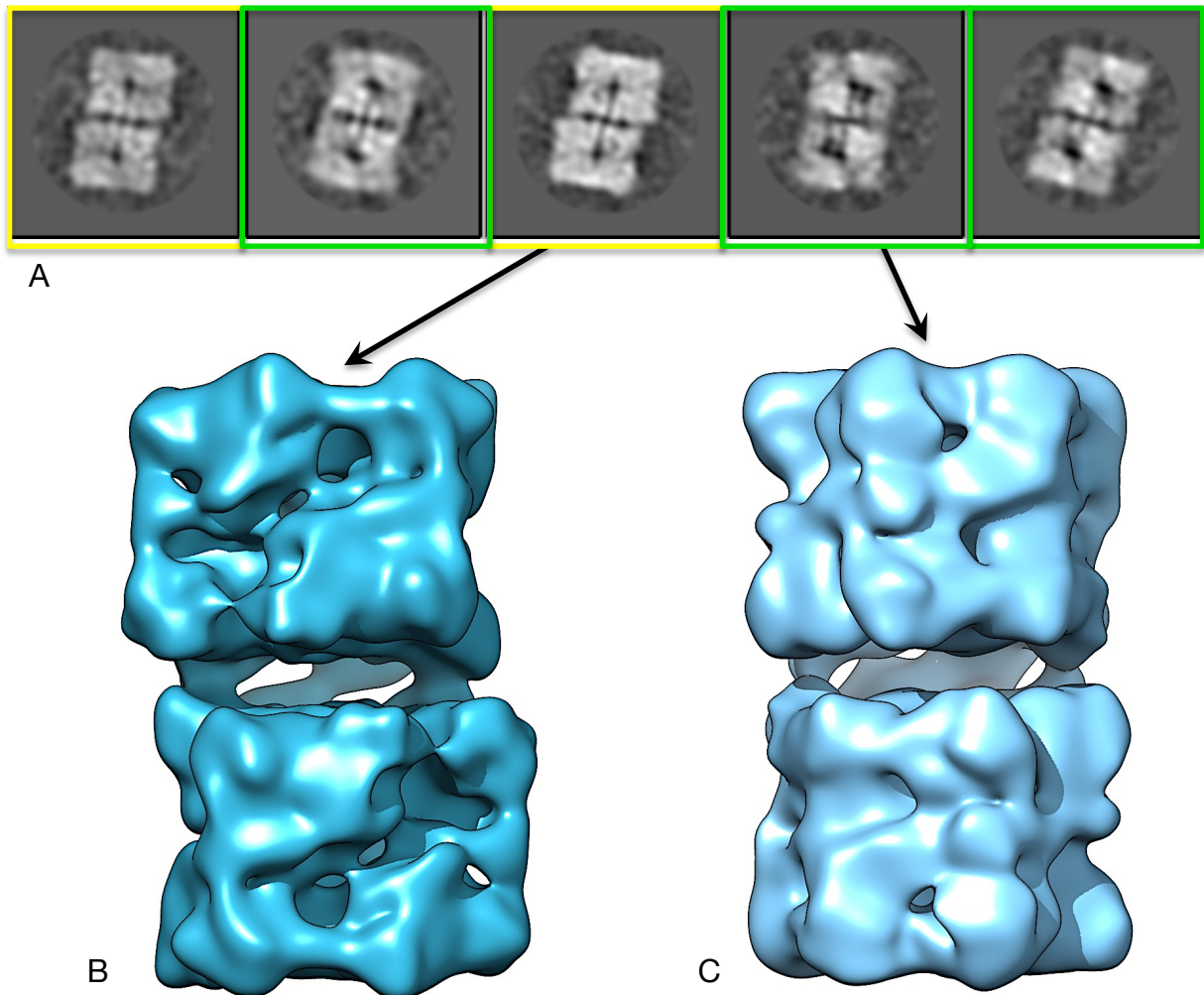


Abb. C.37: 3D-Rekonstruktionen von LoH nach der achten 3D-Klassifizierung. **A:** Die fünf finalen 3D-Klassen. Hier konnten zwei unterschiedliche Konformationen festgestellt werden (gelb/grün). **B:** 3D-Rekonstruktion von LoH (Klasse 3) mit Konformation 1 (gelb). Das obere Hexamer ist gegenüber dem unteren Hexamer leicht verschoben. **C:** 3D-Rekonstruktion von LoH (Klasse 4) mit Konformation 2 (grün). Die beiden Hexamere liegen genau übereinander.

Für die beiden Konformationszustände wurden die Datensätze der jeweiligen Klassen zusammengefasst und ein erneutes 3D-Refinement durchgeführt. Der Datensatz, der Konformation 1 des LoHs darstellt, umfasste 8522 Einzelpartikel.

Nach 18 Iterationen ergab sich für die 3D-Rekonstruktion des LoHs eine Auflösung von 9,5 Å. Bei der anschließenden Nach-Prozessierung inkl. Sharpening der 3D-Rekonstruktion verbesserte sich die Auflösung auf 8,6 Å (Abb. C.38 A). Diese 3D-Rekonstruktion wurde ohne Symmetrievorgabe berechnet.

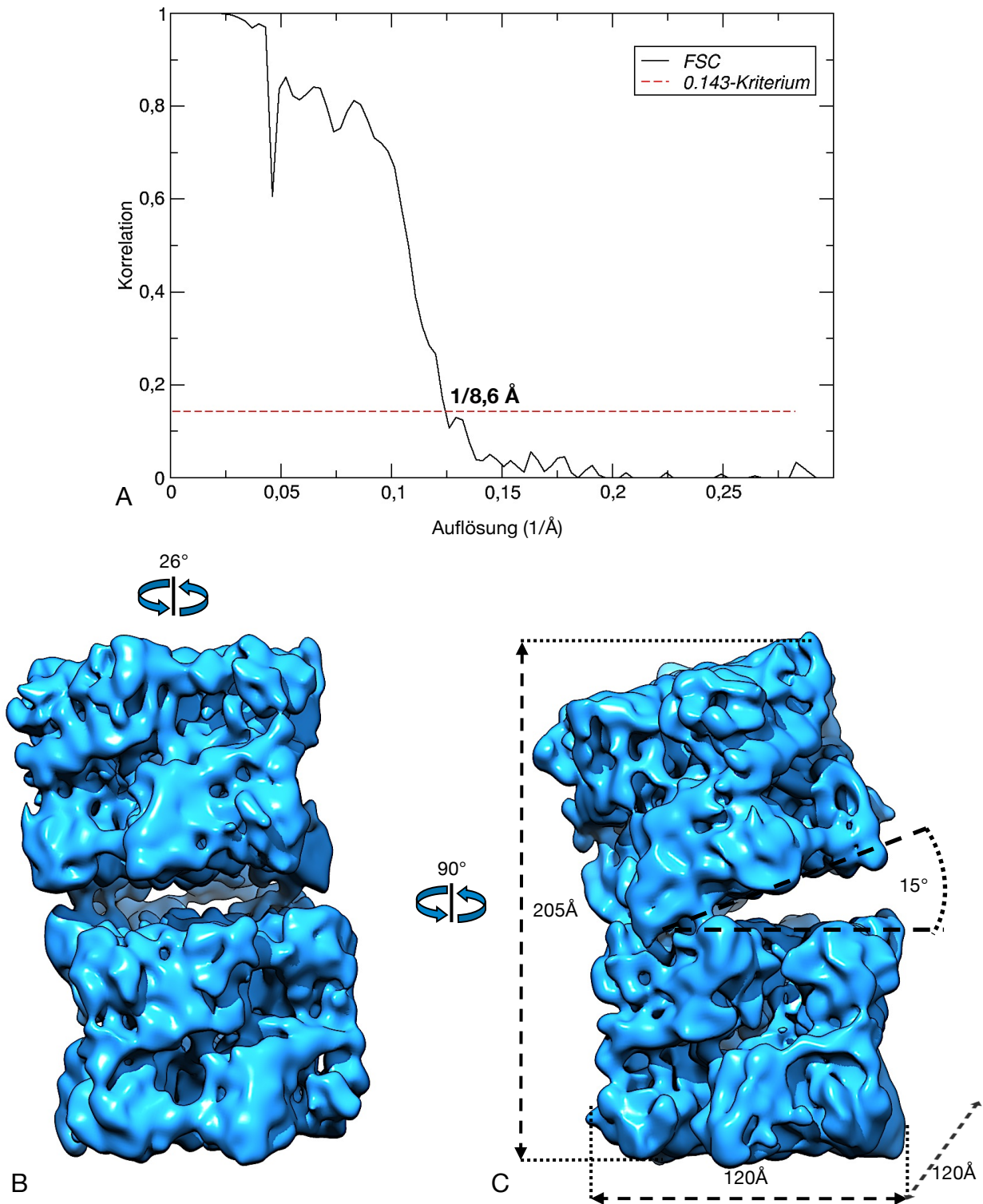


Abb. C.38: Ergebnisse der 3D-EM von LoH. **A:** Auflösungsbestimmung der finalen 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers mit dem Auflösungswert 1,27 Å/pix mit Hilfe der Fourier-Schalen-Korrelation (FSC). Es handelt sich dabei um den reziproken Wert der Raumfrequenz am Schnittpunkt der FSC-Kurve (schwarze Kurve) mit dem y-Wert 0,143 (rote Linie). Die Auflösung der 3D-Rekonstruktion des LoH beträgt 8,6 Å. **B:** Frontansicht der 8,6 Å-Struktur. Das obere Hexamer ist gegenüber dem unteren Hexamer um 26° verdreht. **C:** Frontansicht um 90° gedreht. Die Maße der 3D-Rekonstruktion betragen 120Å (x-Achse) x 205Å (y-Achse) x 120Å (z-Achse). Der Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren beträgt 15°.

Die Maße der 8,6 Å-Struktur sind 120 Å (x-Achse) x 205 Å (y-Achse) x 120 Å (z-Achse). Der Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren beträgt 15° (Abb. C.38 B/C).

Das finale 3D-Refinement für den zweiten Datensatz des LoHs, der Konformation 2 darstellt (Abb. C.37 C), konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Hier traten erneut Fehler beim Alignment der Einzelpartikel auf. Auf die möglichen Gründe wird im Diskussionsabschnitt D.1 eingegangen.

D. Diskussion

1. Diskussion zu den erreichten Auflösungen

Die Berechnung von 3D-Strukturen verschiedener Proteine mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie hat in den letzten Jahren massiv an Bedeutung gewonnen. Die Weiterentwicklung spezieller Elektronenmikroskope und der Einsatz von hochempfindlichen Kamerasystemen (s. Abschnitt B.3.3) ermöglichen inzwischen die Berechnung von 3D-Strukturen kleinerer Proteine, die zuvor nur mit Hilfe der Röntgenkristallographie aufgelöst hätten werden können.

Die nun gewonnenen Bilddaten weisen eine so hohe Bildqualität auf, dass es möglich ist, 3D-Rekonstruktionen von Proteinen zu berechnen, die in Auflösungsbereichen von 3-4 Ångstrom liegen. Diese Auflösungen konnten bis vor drei bis vier Jahren nur mit Viruspartikeln erreicht werden, die sehr groß sind, und eine sehr hohe Symmetrie besitzen (Yu et al., 2008).

Inzwischen gibt es diverse 3D-Rekonstruktionen, die eine Auflösung von 2-3 Ångstrom aufweisen (Grant & Grigorieff, 2015; Bartesaghi et al., 2015).

Es gibt mehrere Gründe, wieso für die in dieser Arbeit erstellten 3D-Rekonstruktionen eine noch höhere Auflösung nicht erreicht werden konnte. Eine entscheidende Rolle spielt die Probenpräparation. Es ist kaum möglich mehrere Objektträger (Grids) in gleich guter Qualität nacheinander zu erstellen. Dadurch kann es vorkommen, dass einige Bereiche des Objektträgers nach der Präparation eine zu dicke Eisschicht aufweisen und so die Aufnahme von guten Bildern erschweren bzw. verhindern. Ebenso können bei der Untersuchung des Objektträgers im Elektronenmikroskop leichte Bewegungen im Eis stattfinden und so zu einer unscharfen EM-Aufnahme führen. In einem gewissen Toleranzbereich können Faktoren, die zu einer fehlerhaften Bildakquise führen, inzwischen mit Hilfe diverser Algorithmen teilweise korrigiert werden. Eine komplette Korrektur ist jedoch bisher nicht möglich.

Eine weitere wichtige Rolle spielen die selektierten Einzelpartikel aus den EM-Aufnahmen. Die Auflösung einer 3D-Rekonstruktion wird durch die Anzahl der verwendeten Einzelpartikel limitiert. Je mehr qualitativ gute Einzelpartikel in die Berechnung einer 3D-Rekonstruktion einfließen, umso besser wird die Auflösung. Wichtig ist vor allem, dass Einzelpartikel schlechter Qualität aus dem Datensatz entfernt werden. Mit Hilfe der 2D- und 3D-Klassifizierung können viele Partikel minderer Qualität extrahiert und verworfen werden. Trotz dieser Sortiermethode

bleiben meist einige Partikel mit niedriger Qualität im Datensatz erhalten und beeinflussen die nachfolgenden 3D-Berechnungen.

Die in dieser Arbeit erstellten 3D-Rekonstruktionen setzen sich aus einer relativ niedrigen Anzahl von Einzelpartikeln zusammen. Für bessere Auflösungsergebnisse hätten weit mehr EM-Aufnahmen von den entsprechenden Proteinen aufgenommen werden müssen, so dass sich die Anzahl qualitativ guter Einzelpartikel drastisch erhöht. Dies war uns allerdings auf Basis unserer technischen Ausrüstung nicht möglich.

Ein weiterer Nachteil ist die offenbar etwas flexible Struktur des Hämocyanins. Die selektierten Einzelpartikel weisen daher mit hoher Wahrscheinlichkeit minimale Strukturunterschiede auf. Die angewandte 2D- und 3D-Klassifizierung der Einzelpartikel (Scheres et al., 2007; Lyumkis et al., 2013) ist in der Lage, größere Strukturunterschiede innerhalb der Einzelpartikel zu identifizieren und zu separieren. Jedoch ist es möglich, dass kleinere Veränderungen der Struktur nicht erfasst werden. Es kommt so zu minimalen Unschärfen, die einzelne Klassensummen von Einzelpartikeln besitzen, und so die finale Auflösung der entsprechenden 3D-Rekonstruktion negativ beeinflussen.

Eine weitere wichtige Rolle spielt die Symmetrie der 3D-Struktur des jeweiligen Proteins. Die hier vorgestellten 3D-Rekonstruktionen weisen im Vergleich zu manch anderen Proteinen (oder Viruspartikeln) eine niedrige Symmetrie auf, was für die Erstellung hochaufgelöster 3D-Rekonstruktionen von Nachteil ist.

Bei der Berechnung des Datensatzes des 2x6-mers von *L. oceanica* erschwerte die zuvor angesprochene strukturelle Flexibilität die finale Erstellung der 3D-Rekonstruktion enorm. Die Klassifizierungen zeigten mehrere mögliche Strukturkonformationen an, die teilweise nicht realistisch waren. Hier hatte der Algorithmus Probleme mit der Zuordnung diverser Einzelpartikel. Die Verwendung eines alternativen Software-Programms (SPARX) erbrachte keine Verbesserung. Letztendlich half nur das konsequente Säubern des Datensatzes mit Hilfe vieler 2D- und 3D-Klassifizierungsberechnungen. Dadurch sank allerdings die Anzahl der Einzelpartikel, die für eine 3D-Rekonstruktion infrage kamen, enorm. Aus den zuvor selektierten 60.000 Einzelpartikeln wurden nur noch knapp 8.000 für die finale 3D-Rekonstruktion genutzt. Für die festgestellte Konformation 2 des 2x6-mers (s. Abschnitt 3.1 Abb. C.37C) war es trotz alledem nicht möglich, eine finale 3D-Rekonstruktion zu erstellen. Möglicherweise kommen die Algorithmen der verwendeten Programme nicht mit dem speziellen Aufbau dieses 2x6-mers zurecht. In einigen Tutorials wird darauf hingewiesen, dass bei der Berechnung von 3D-Strukturen länglicher Proteine Probleme auftreten können. Es könnte sein, dass

aufgrund der länglichen Struktur und der speziellen Assemblierung der beiden Hexamere des 2x6-mers verschiedene Einzelpartikel nicht richtig aligniert werden können, und sie so die Auflösung der 3D-Rekonstruktion verschlechtern bzw. die erfolgreiche Berechnung einer 3D-Rekonstruktion unmöglich machen.

2. Vergleich des oxy- und deoxy-8x6-mers von *L. polyphemus*.

2.1 Vergleich der 7,3 Å-deoxy-Struktur und der 7,9 Å-oxy-Struktur des 8x6-mers

Der generelle Aufbau beider 3D-Rekonstruktionen des 8x6-mers ist sehr ähnlich und entspricht dem in früheren Publikationen (Lamy et al., 1982; Lamy et al., 1983; van Heel & Dube, 1994, Martin et al., 2007).

Es gibt jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen dem oxy- und dem deoxy-8x6-mer, der eine große Auswirkung auf die Gesamtstruktur des Hämocyanins von *L. polyphemus* hat. Die beiden Hexamere des 2x6-mers, das aufgrund der D2-Symmetrie als Grundbaustein des 8x6mers fungiert, zeigen eine unterschiedliche Rotation zueinander.

Beim oxy-8x6-mer sind es 105° gegen den Uhrzeigersinn, beim deoxy-8x6-mer dagegen 113° (Abb. D.1).

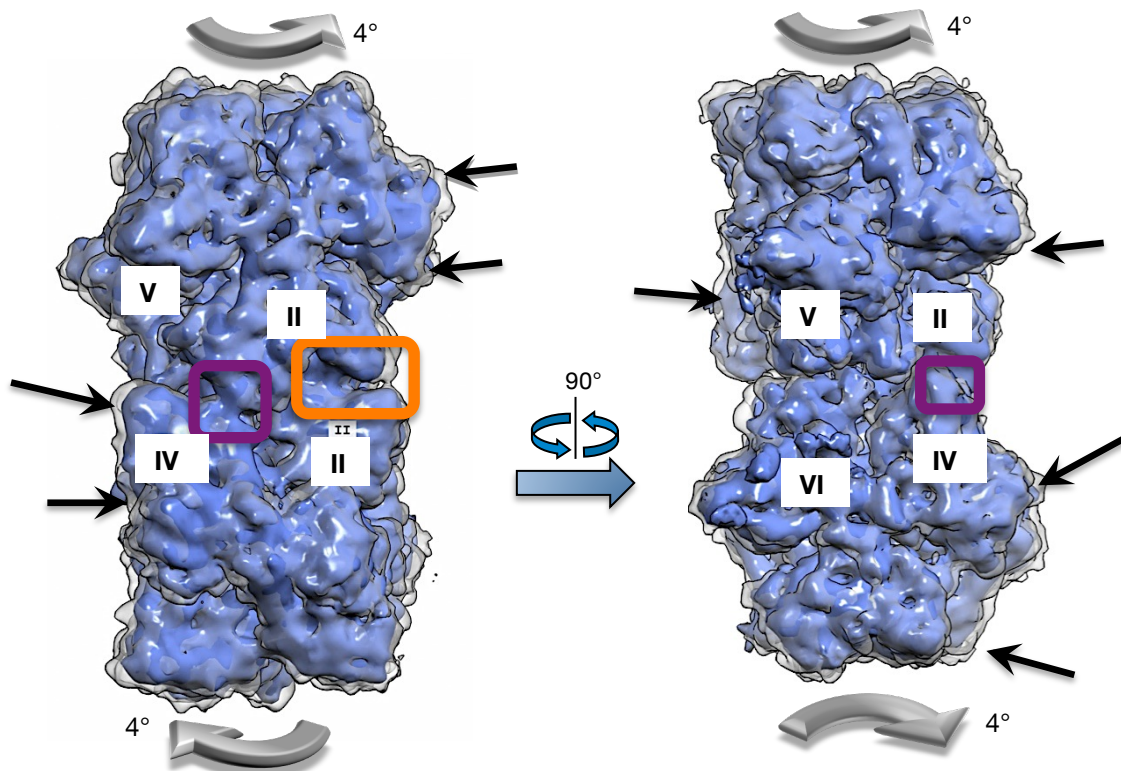


Abb. D.1: Vergleich des 2x6-mers aus den 3D-Rekonstruktionen des oxy-8x6-mers (blau)- und des deoxy-8x6-mers (grau/transparent). Die beiden Hexamere sind beim deoxy-2x6-mer um jeweils 4° nach rechts (oberes Hexamer) bzw. nach links (unteres Hexamer) verdreht. Die zusätzliche Rotation um insgesamt 8° lässt sich an den überstehenden Massen des deoxy-2x6-mers gegenüber des oxy-2x6-mers erkennen (schwarze Pfeile). Sichtbar sind hier molekulare Brücken des Interfaces II-II (orange) und II-IV (lila).

Dass im deoxygenierten Zustand ein größerer Rotationswinkel zwischen den Hexameren des 2x6-mers besteht, wurde an einem 4x6-mer mit Hilfe einer Röntgenkleinwinkelstreuung vermutet, die allerdings einen 20° Unterschied gegenüber den hier berechneten 8° ergab, was an der niedrigen Auflösung dieser Methode liegen mag (Hartmann et al. 2002). Da diese Rotation bei allen vier 2x6-meren auftritt, ist die strukturelle Veränderung des gesamten 8x6-mers beim Übergang vom oxy- in den deoxy-Zustand erheblich. Betrachtet man die Flop-Seite des

4x6-mers, erkennt man, dass sich im deoxygenierten Zustand die beiden im Bild unteren Hexamere nach links verschieben, während sich die beiden oberen Hexamere nach rechts verlagern (Abb. D.2 A). Aufgrund dessen vergrößert sich der Abstand der diagonal gegenüberliegenden Hexamere 2 und 3 (Abb. D.2 C). Die Hexamere 1 und 4 nähern sich hierbei an, bilden aber zusammen keine molekularen Brücken aus.

Beim oxy-4x6-mer liegen die Untereinheiten des Typs V der Hexamere 2 und 3 nah genug beieinander und bilden die Brücke des Interfaces V-V aus (Abb. D.2 B). Im deoxy-4x6-mer führt der vergrößerte Rotationswinkel zwischen den Hexameren des 2x6-mers im deoxy-4x6-mer dazu, dass sich aufgrund der Verschiebung von Hexamer 2 und 3 das V-V-Interface auflöst (Abb. D.2 C).

Diese Verschiebung der Hexamere tritt aufgrund der D₂-Symmetrie bei beiden 4x6-meren identisch auf. Das hat zur Folge, dass es auch zu einer Verlagerung zwischen den beiden 4x6-meren des 8x6-mers kommt, und so weitere strukturelle Unterschiede zwischen den beiden 3D-Rekonstruktionen auftreten.

Diese Verdrehung zwischen den beiden 4x6-meren lässt sich bei Betrachtung des 8x6-mers entlang der y-Achse sehr gut zeigen. Beim deoxy-8x6-mer drehen sich die Hexamere 1 & 3 (vom ersten 4x6-mer) und die Hexamere 2 & 4 (vom zweiten 4x6-mer) um jeweils 4° voneinander weg (parallel dazu drehen sich natürlich auch die Hexamere 2 & 4 vom ersten 4x6-mer und die Hexamere 1 & 3 vom zweiten 4x6-mer um 4° voneinander weg) (Abb. D.3 A). Am Beispiel des Interfaces IIIA-III A, das im oxygenierten Zustand zwischen den beiden 4x6-meren auftritt, sind die strukturellen Folgen der Verdrehung besonders deutlich zu sehen. Im oxy-8x6-mer beträgt der Abstand der Abschnitte zwischen Domäne #1 und #3 der Hexamere 1 (vom ersten 4x6-mer) und 4 (vom zweiten 4x6-mer) ca. 4 Å. Die Hexamere treten in diesem Bereich in Kontakt und bilden das Interface IIIA-III A (Martin et al., 2007). Beim deoxy-8x6-mer drehen sich die beiden Hexamere 1 und 4 voneinander weg. Dadurch erhöht sich der Abstand zwischen den beiden Hexameren auf knapp 12 Å und die Brücke des Interfaces IIIA-III A fehlt (Abb. D.3 C).

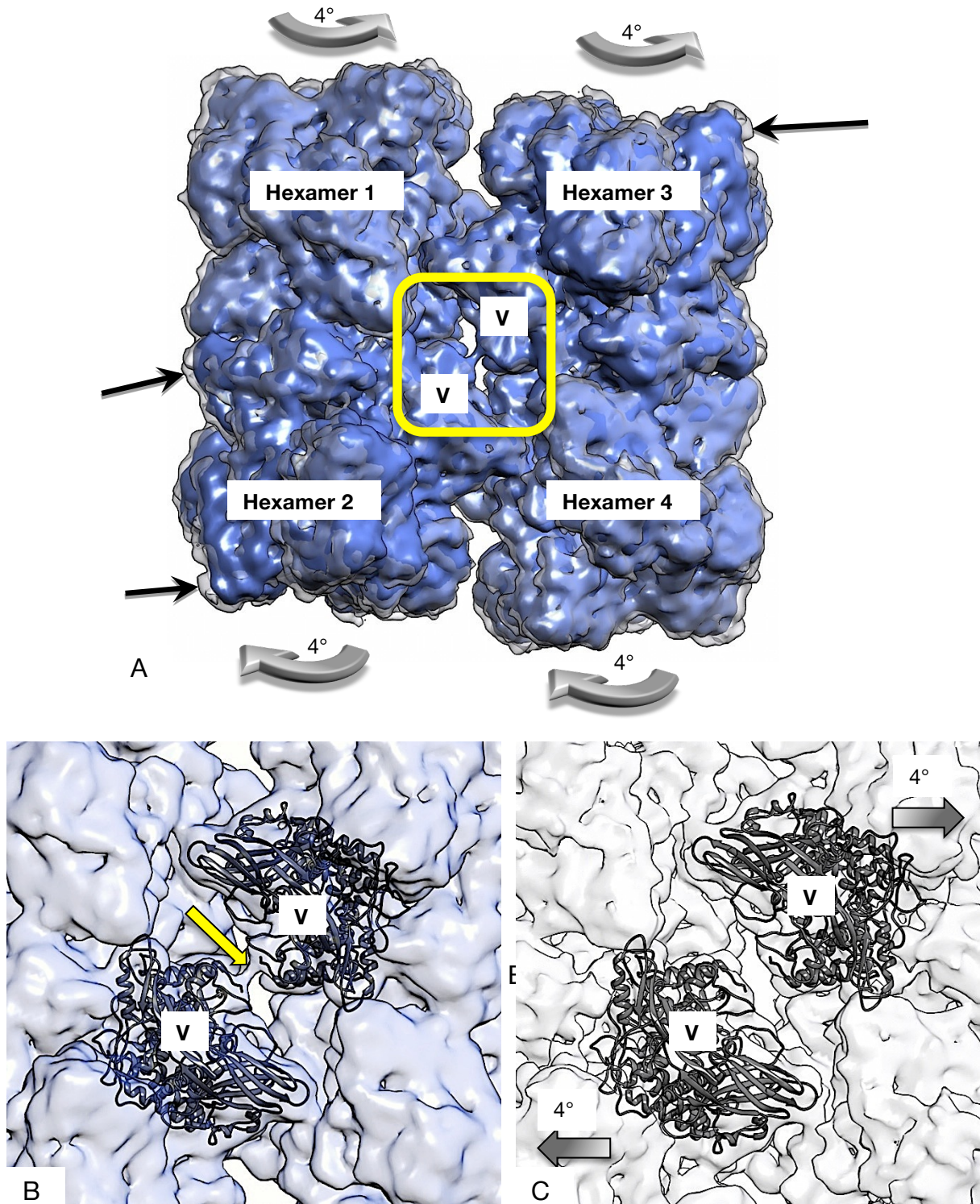


Abb. D.2: Ansicht der Flop-Seite des 4x6-mers im oxygenierten (blau) und deoxygenierten (hellgrau/transparent) Zustand (**A**) und Vergleich der strukturellen Unterschiede zwischen oxy- und deoxy-4x6mer am Beispiel des Interfaces V-V (**B+C**). **A:** Im deoxygenierten Zustand verdrehen sich die Hexamere 1 und 3 um jeweils 4° gegen den Uhrzeigersinn. Die Hexamere 2 und 4 drehen sich gleichzeitig jeweils um 4° in Richtung des Uhrzeigersinns. Die Verdrehung lässt sich an den überstehenden Massen des deoxy-4x6-mers erkennen (schwarze Pfeile). **B:** Im oxygenierten Zustand liegen die beiden Untereinheiten des Typs V der beiden sich gegenüberliegenden Hexamere 2 und 3 nah genug zusammen um eine molekulare Brücke auszubilden (Interface V-V) (gelber Pfeil). **C:** Im deoxygenierten Zustand drehen sich die beiden Hexamere 2 und 3 um jeweils 4° voneinander weg. Dadurch nimmt der Abstand zwischen den beiden Untereinheiten des Typs V zu und die molekulare Brücke des Interfaces V-V fehlt.

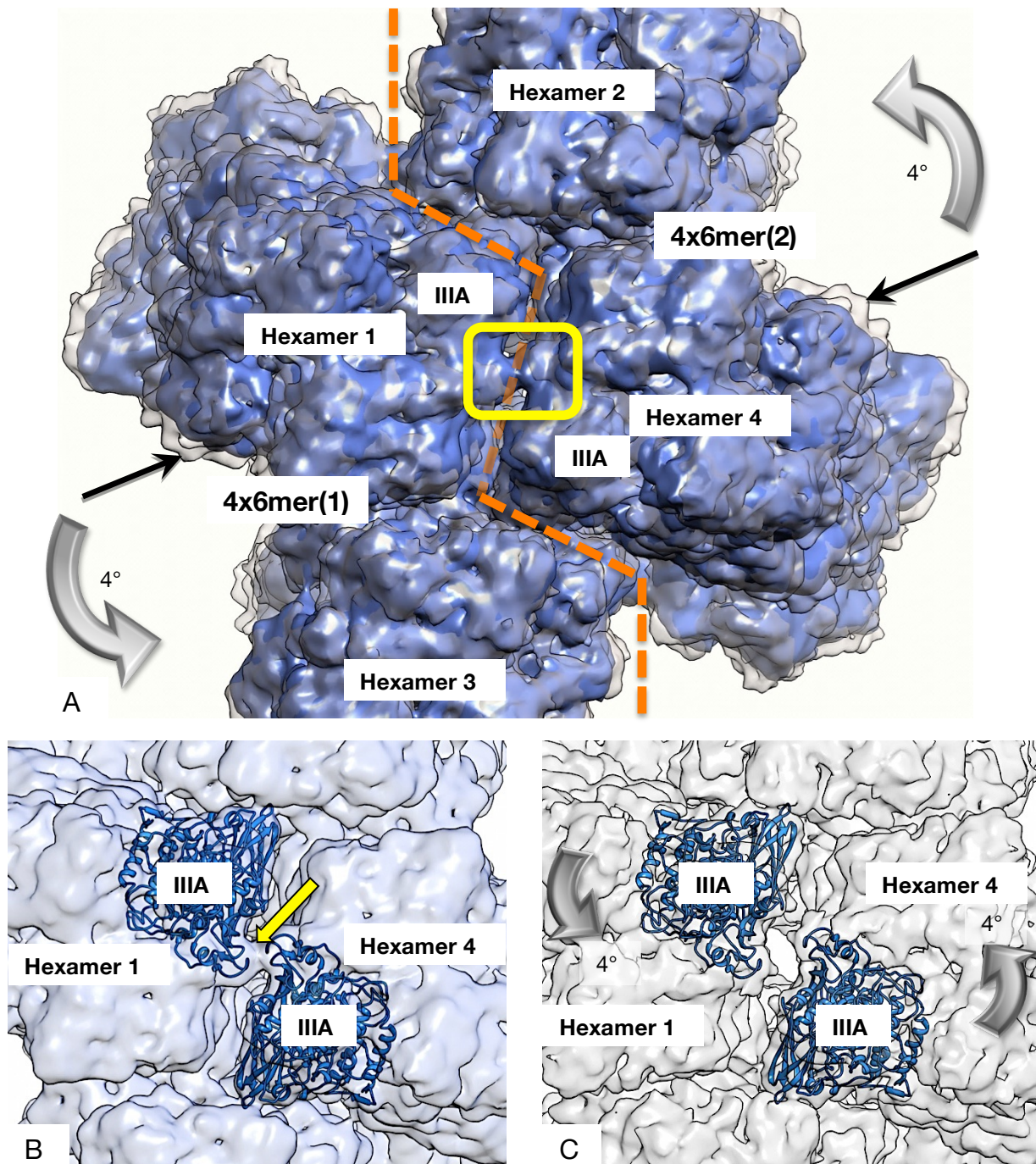


Abb. D.3: Strukturunterschied des oxy- und deoxy-8x6-mers insgesamt und am Beispiel des Interfaces IIIA-IIIa. **A:** Verdrehung des deoxy-8x6-mers (hellgrau/transparent) gegenüber dem oxy-8x6-mer (blau). Die orangefarbene Linie grenzt die beiden 4x6-mere ab. Hexamer 1 & 3 vom 4x6-mer(1) sowie Hexamer 2 & 4 vom 4x6-mer(2) drehen sich jeweils um 4° gegen den Uhrzeigersinn. Diese Rotation führt zu einer leichten Verdrehung der beiden 4x6-mere. Die schwarzen Pfeile zeigen die überstehende Masse des deoxy-8x6-mers nach der Rotation um 4° . **B:** Das oxy-8x6-mer. Die Abschnitte zwischen Domäne #1 & #3 von Untereinheit IIIA der beiden Hexamere 1 und 4 liegen sich sehr nah gegenüber (Abstand 4 \AA) und bilden eine molekulare Brücke aus; das Interface IIIA-IIIa (gelber Pfeil). **C:** Beim deoxy-8x6-mer drehen sich durch die Rotation die Hexamere 1 und 4 leicht voneinander weg. Der Abstand zwischen den beiden Untereinheiten erhöht sich auf 12 \AA , so dass diese in keinem direkten Kontakt mehr stehen. Das Interface IIIA-IIIa wird somit nicht ausgebildet.

Wie diese Vergleiche zeigen, ist das oxy-8x6-mer kompakter gebaut, da die einzelnen Hexamere näher beieinander liegen.

Vermessungen des oxy- und deoxy-8x6-mers bestätigten dies: in allen drei Dimensionen (xyz-Achse) ist das oxy-8x6-mer ca. 5 Å kleiner als das deoxy-8x6-mer (s. Abb. C.3 und Abb. C.10). Der Grund hierfür liegt in der unterschiedlichen Rotation der Hexamere im 2x6-mer, die sich auf das gesamte 8x6-mer auswirkt. So ergeben sich auch Unterschiede bei der Assoziation der beiden 4x6-mere zum 8x6-mer. Der Abstand zwischen den Masseschwerpunkte beider 4x6-mere erhöht sich um ca. 5 Å (von 105 Å im oxy-8x6-mer auf 110 Å im deoxy-8x6-mer) (s. Abb. C.5 und Abb. C.11 C). Der vergrößerte Abstand zwischen den beiden assoziierten 4x6-meren zum 8x6-mer lässt sich mit der veränderten Assoziation der 2x6-mere zu einem 4x6-mer erklären. Der Kippwinkel zwischen den 2x6-meren eines 4x6-mers beträgt im oxygenierten Zustand 17° und im deoxygenierten Zustand 12° (s. Abb. C.5 B und Abb. C.11 D). Aufgrund des größeren Kippwinkels zwischen den jeweiligen 2x6-meren liegen die beiden 4x6-mere im oxy-8x6-mer näher zusammen. Beim deoxy-8x6-mer verändert sich aufgrund der zusätzlichen Rotation der einzelnen Hexamere auch der Kippwinkel zwischen den beiden 2x6-meren des 4x6-mers. Da dieser kleiner ist, greifen die beiden 4x6-mere nicht so eng ineinander, wodurch sich der Abstand zwischen den 4x6-meren leicht vergrößert. Das deoxy-8x6-mer wirkt dadurch etwas größer und weniger kompakt als das oxy-8x6-mer. Der Rotationswinkel zwischen den beiden 4x6-meren ist im oxy- und deoxy-8x6-mer identisch und beträgt 40°.

Rein mechanisch betrachtet ist diese strukturelle Änderung möglicherweise sinnvoll. Um Sauerstoff aufzunehmen könnte es von Vorteil sein, wenn das Hämocyanin eine lockerere Konformation besitzt. Sobald Sauerstoff als Ligand an das aktive Zentrum einer Untereinheit bindet, geht diese durch *induced fit* in eine kompaktere Konformation über. Entsprechend dem Nesting-MWC-Modell der Allosterie des Arthropoden-Hämocyanins (Decker et al. 1986, 1988; Decker and Sterner 1990) würde diese Konformationsänderung in ineinander verschachtelten Stufen erfolgen: 1x6-mere → 2x6-mere → 4x6-mere → 8x6-mer

Das passt sehr gut zum vorliegenden Strukturvergleich.

2.2 Vergleich des 4x6-mers von *L. polyphemus* mit dem 4x6-mer des Kaiserskorpions *P. imperator*

Die 4x6-meren Hämocyanine von Spinnen und Skorpionen weisen eine große Strukturähnlichkeit mit dem 4x6-meren Halbmerkül des Hämocyanins von *L. polyphemus* auf (Markl und Decker, 1992). Ihre nahe Strukturverwandschaft wurde bereits 1981 durch Hybrid-Reassembly-Versuche (van Bruggen et al., 1980) und später immunochemisch und durch Sequenzanalysen belegt (Lamy et al., 1983; Kempster et al., 1985; Rehm et al., 2012). Vom 4x6-mer des Kaiserskorpions *Pandinus imperator* liegen 3D-Rekonstruktionen und pseudoatomare Modelle in zwei Konformationszuständen vor (Cong et al., 2009): „Resting-Form“ (Oxygenierungszustand nicht definiert; EMD-5100 und pdb-3IXV) und „Activated-Form“ (wobei durch Behandlung mit SDS eine Phenoloxidaseaktivität induziert wurde; EMD-5101 und pdb-3IXW). Ein direkter Vergleich mit den hier vorgestellten 3D-Rekonstruktionen und pseudoatomaren Modellen des 4x6-meren Halbmerküls von *L. polyphemus* ergab folgendes Bild:

Die beiden 3D-Rekonstruktionen des 4x6-mers von *P. imperator* sind beim massenkorrelierten Schwellenwert etwas kleiner als bei *L. polyphemus* ($x/y/z$ 5-15 Å). Das wirkt sich aber bei den pseudoatomaren Modellen nicht aus, denn diese haben praktisch dieselben Dimensionen (Länge und Breite jeweils ca. 220 Å, Dicke ca. 140 Å; Diagonale ca. 280 Å). Dies bestätigt, dass die beiden Hämocyanine genau gleich groß sind, und dass die verwendeten Elektronenmikroskope korrekt kalibriert waren.

Die beiden 3D-Rekonstruktionen von *P. imperator*-Hämocyanin wiesen in Chimera (Modul „Fit in map“) eine Korrelation von über 99 % auf, gegenüber nur 92 % beim oxy- und deoxy-4x6-mer von *L. polyphemus*-Hämocyanin. Die beiden 3D-Rekonstruktionen des 4x6-mers von *P. imperator* sind also bis auf den geringen Auflösungsunterschied nahezu identisch, während die beiden 3D-Rekonstruktionen des 4x6-mers von *L. polyphemus* signifikante Unterschiede zeigen.

Versuche, die Korrelationen mit derselben Methode kreuzweise zu bestimmen, führten zunächst zu unklaren Ergebnissen. Die erhaltenen Werte hingen deutlich davon ab, welche von zwei Strukturen beim Fitten beweglich gehalten wurde und welche unbeweglich. Das galt ebenso für Dichtekarten, die ich anhand der vier pseudoatomaren Modelle in Chimera künstlich simulierte. Aus diesen Messungen ließ sich nicht klar schließen, in welcher Beziehung die beiden Konformationen des *P. imperator*-Hämocyanins zu denen des *L. polyphemus*-Hämocyanins stehen. Der Grund ist offenbar, dass Unterschiede im Rotationswinkel zwischen den Hexameren im 2x6-mer (siehe weiter unten) sowie Unterschiede in den Inter-Hexamer-Brücken

(Abb. D.4) die Gesamt-Korrelation viel weniger beeinflussen als Massenunterschiede in der Peripherie der 4x6-mere. Letztere hängen bei den 3D-Rekonstruktionen jedoch sehr stark von den verwendeten Filterverfahren ab und bei simulierten Dichtekarten von den lokalen Aminosäure-Seitenketten, die sich zwischen den beiden Hämocyaninen deutlich unterscheiden.

Um diese Verfälschungen zu umgehen, habe ich in die vier 3D-Rekonstruktionen jeweils vier Kopien eines „Standard-Hexamers“ gedockt, nämlich die nur aus der Untereinheit II von *L. polyphemus* bestehende Kristallstruktur mit dem pdb-Code 1NOL. Aus den vier so erhaltenen pseudoatomaren 4x6-meren habe ich anschließend Dichtekarten mit einer Auflösung von 5 Å simuliert und dann deren Korrelationen bestimmt (Tab. D.1). Die niedrigsten Werte ergaben sich, wenn auf die deoxy-Form von *L. polyphemus* gefittet wurde. Auch hier waren sich die beiden Konformationen von *P. imperator* signifikant ähnlicher (97 %) als die von *L. polyphemus* (86 %).

	LpH deoxy	LpH oxy	PiH activated	PiH resting
LpH deoxy	100	86	89	91
LpH oxy	86	100	90	89
PiH activated	85	89	100	97
PiH resting	85	89	97	100

Tab. D.1: Fitting der mit 1NOL-Hexameren simulierten 4x6-meren Dichtekarten (5 Å). Die Strukturen in der linken Säule wurden auf die Strukturen in der oberen Reihe gefittet. (Angaben in %; LpH: *Limulus polyphemus* Hämocyanin; PiH: *Pandinus imperator* Hämocyanin)

Der sogenannte Rocking-Winkel des 4x6-mers ist derjenige Winkel, um den das eine 2x6-mer gegen das andere gekippt ist. In der 3D-Rekonstruktion der deoxy-Form von *L. polyphemus* beträgt er 12° (siehe Abb. C.5 B), bei der oxy-Form sind es dagegen 17° (siehe Abb. C.11 C). Beide 3D-Rekonstruktionen des Hämocyanins von *P. imperator* weisen nach meinen Messungen einen Rocking-Winkel von 14° auf, was ihre große Ähnlichkeit weiter betont. Dieser mittlere Winkel könnte einerseits auf eine Konformation des 4x6-mers hindeuten, die funktionell zwischen der oxy- und der deoxy-Form liegt. Andererseits könnte gerade der Rocking-Winkel bei *L. polyphemus* durch die „Gesicht-an-Gesicht“-Assoziation der beiden 4x6-mere zum 8x6-mer besonders stark beeinflusst werden und dadurch etwas anders sein als bei einem solitären 4x6-mer wie dem von *P. imperator*. Aufgrund des mittelgroßen Rocking-Winkels beim 4x6-mer von *P. imperator* ließ sich letzteres durch Korellationsmessungen auch nicht eindeutig der oxy-Form oder der deoxy-Form von *L. polyphemus* zuordnen (siehe Tab. D.1).

Cong et al. (2009) stellten zwischen ihren beiden Konformationen einen Rotationswinkel-Unterschied der Hexamere im 2x6-mer fest, und zwar von 7° (Activated-Form 94° versus Resting-Form 101°). Das ähnelt auf den ersten Blick

dem von mir beim *Limulus*-Hämocyanin gemessenen Unterschied von 8° (oxy-Form 105° versus deoxy-Form 113°). Ich habe die beiden Konformationen von *P. imperator* mit dem schon bei *L. polyphemus* von mir verwendeten Verfahren nachgemessen (Tool „Define Axis“ in Chimera) und kam zu einem anderen Ergebnis: Der Rotationswinkel war in beiden 3D-Strukturen von *P. imperator* praktisch gleich und betrug 106° (Resting-Form) bzw. 105° (Activated-Form), also beide Male praktisch der gleiche Winkel wie bei der oxy-Form von *L. polyphemus*. Das passt zu den Korrelationswerten in Tab. D.1.

Für die Diskrepanz meiner Winkel-Messwerte zu den Messungen von Cong et al. (2009) an denselben Strukturen habe ich keine Erklärung. Es zeigt sich jedoch, dass die publizierten 3D-Rekonstruktionen von *P. imperator* eher zur oxy-Form von *L. polyphemus* passen. Die Aktivierung mit SDS, wie sie beim Hämocyanin von *P. imperator* erfolgte, stabilisierte offenbar die oxy-Form dieses Hämocyanins.

In der 3D-Struktur der oxy-Form des Hämocyanins von *L. polyphemus* existiert beim massenkorelierten Schwellenwert zwischen den beiden Kopien der Untereinheit V eine deutliche Brücke (Abb. D.4 A), die in der deoxy-Form fehlt (Abb. D.4 B). In ähnlicher Weise zeigt die Activated-Form zwischen den Untereinheiten C1 und C1' eine Brücke (Abb. D.4 C), die bei der Resting-Form fehlt (Abb. D.4 D). Inwieweit dieses Strukturdetail bei den vorliegenden Auflösungen allerdings eine funktionelle Rolle spielt, sei dahingestellt.

Wie Sequenzen und Kristallstrukturen belegen, gibt es in der beweglichen Domäne #1 des Arthropoden-Hämocyanins ein strikt konserviertes Phenylalanin, das den Zugang zum aktiven Zentrum steuert (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994, Decker et al., 2007). Die sauerstofffreie Kristallstruktur des 1x6-meren Hämocyanins der Languste *Panulirus interruptus* zeigt ein offenes aktives Zentrum (pdb-Code 1HCY), wie es hier beim deoxy-Hämocyanin von *L. polyphemus* vorliegt. Hinsichtlich der Position dieses in der Nähe des aktiven Zentrums gelegenen Phenylalanins gibt es Unterschiede zwischen den beiden pseudoatomaren Modellen des Hämocyanins von *P. imperator*, da hier die Activated-Form besser zur deoxy-Form von *L. polyphemus* passt (mit dem Phenylalanin weiter vom aktiven Zentrum entfernt) und die Resting-Form besser zur oxy-Form von *L. polyphemus* (mit geschlossenerem aktiven Zentrum). Letzteres stimmt mit den Korrelations- und Winkelmessungen überein und auch mit der in Abb. D.4 C sichtbaren Brücke: Die Resting-Form des 4x6-mers von *P. imperator* entspricht offensichtlich der oxy-Form von *L. polyphemus*. Die deoxy-Form von *L. polyphemus* ist dagegen anders, mit einem offenen aktiven Zentrum und keiner zentralen Brücke sowie mit größerem Rotationswinkel zwischen den Hexameren. Demgegenüber herrscht beim SDS-aktivierten 4x6-mer von *P. imperator* eine Mischsituation: Offenbar führt die Behandlung mit SDS zur deoxy-Konformation der Hexamere (mit offenem aktiven Zentrum), ohne dass sich dies kooperativ auf das 4x6-mer überträgt

(gleichbleibender Rotationswinkel), wie das gemäß dem Nesting-Modell der allosterischen Interaktion der Hämocyanine (Decker et al. 1986, 1988; Decker and Sterner 1990) beim 4x6-mer eigentlich erfolgen sollte.

Allerdings ist bei der vorliegenden Auflösung der Strukturen Vorsicht geboten, was die funktionelle Interpretation von Details der pseudoatomaren Modelle betrifft. Eine fundierte Bewertung erfordert 3D-Rekonstruktionen mit noch höherer Auflösung.

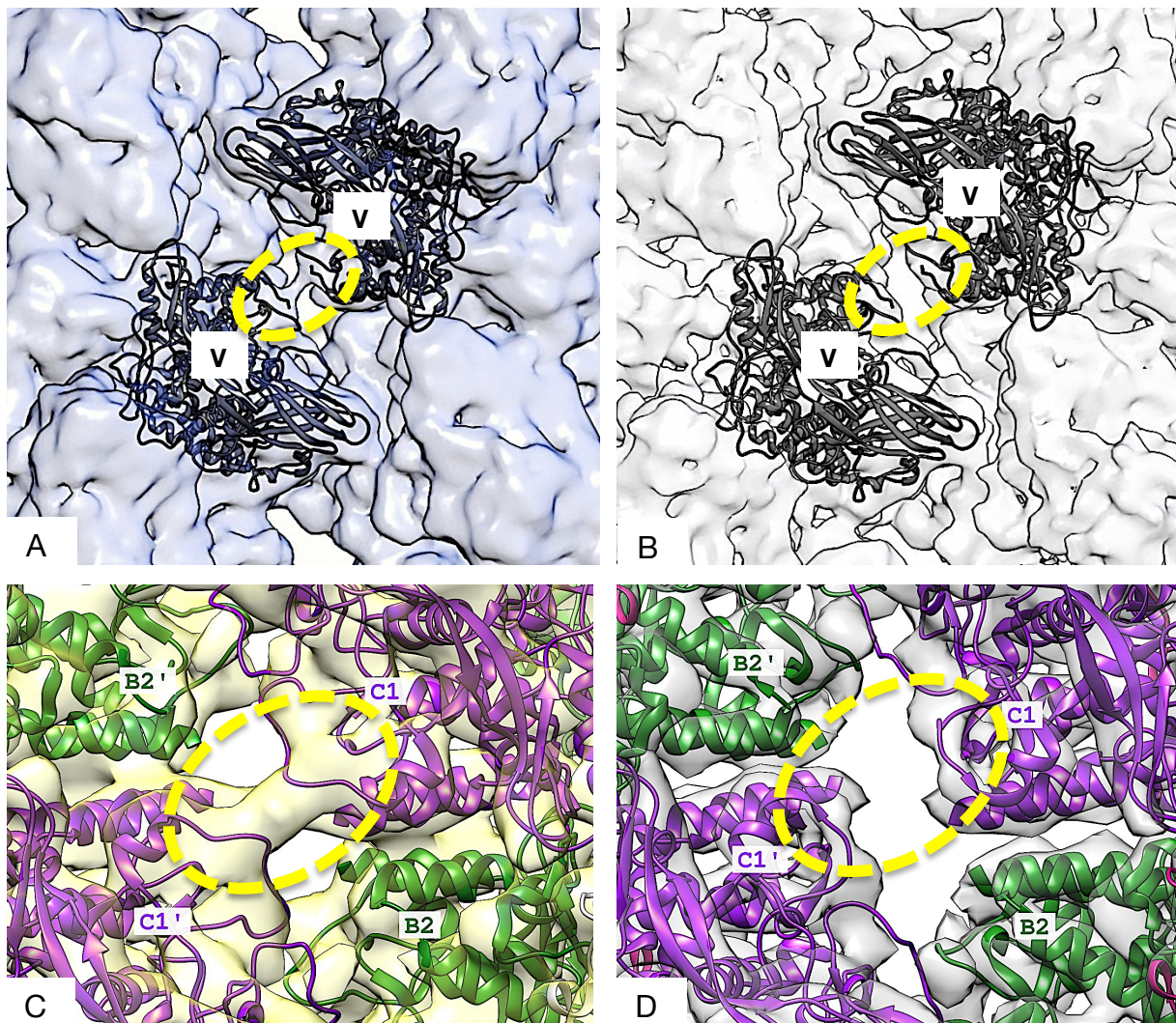


Abb. D.4: Vergleich der Kontaktstelle zwischen den Untereinheiten des Typs V von *L. polyphemus* und der Brücke IV zwischen Untereinheit C1 und C1' von *P. imperator*. Die Abbildungen **C** und **D** basieren auf den Abbildungen aus Cong et al (2009) **A:** In der 7,9 Å-oxy-Struktur des 8x6-mers ist zwischen den beiden Untereinheiten V eine Brücke sichtbar (gelber Kreis). **B:** In der 7,3 Å-deoxy-Struktur des 8x6-mers fehlt die Brücke zwischen den beiden Untereinheiten des Typs V. **C:** In der 3D-Rekonstruktion der Activated-Form (mit SDS) des 4x6-mers von *P. imperator* ist eine entsprechende Verbindung (Brücke IV) zwischen den Untereinheiten C1 und C1' sichtbar. **D:** In der 3D-Rekonstruktion der Resting-Form (ohne SDS) des 4x6-mers ist diese Brücke nicht vorhanden.

2.3 Vergleich des oxy- und deoxy-8x6-mers mit der 12 Å-Rekonstruktion von Martin et al. (2007)

Durch Überlagerung der neu erstellten 7,9 Å-oxy- und 7,3 Å-deoxy-Struktur sowie der 12 Å-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers (Martin et al., 2007) konnten die drei 3D-Rekonstruktionen miteinander verglichen werden.

Die 7,1 Å-Struktur des oxy-8x6-mers von Dejung (2014) wurde mit den aktuellen 3D-Rekonstruktionen nicht im Detail verglichen, da ihr ein Fehler bei der Pixelgröße zugrunde lag (s. Ergebnisteil C.1.3). In der vorliegenden Arbeit wurde dies korrigiert und die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers wurde hier aus demselben Datensatz mit RELION neu berechnet. Die Überlagerung der 3D-Rekonstruktionen des oxy- und deoxy-8x6-mers mit der 12 Å-Rekonstruktion des 8x6-mers von Martin et al., (2007) zeigt, dass diese fast deckungsgleich aufeinander liegen und es kaum einen Größenunterschied gibt. Die hier bestimmten Maße des oxy- und deoxy-8x6-mers weichen jedoch von den publizierten Werten des 8x6-mers von Martin et al., (2007) deutlich ab. Diese Unterschiede lassen sich mit der schlechteren Auflösung von 12 Å erklären sowie mit einem anderen Messverfahren, das damals angewendet wurde. Eine erneute Vermessung der 3D-Rekonstruktion des 8x6-mers von Martin et al. (2007) mit dem hier verwendeten Verfahren ergab für die x-Achse eine Länge von 278Å, für die y-Achse 278Å und entlang der z-Achse 270Å (Abb. D.5; Tab. D2/3).

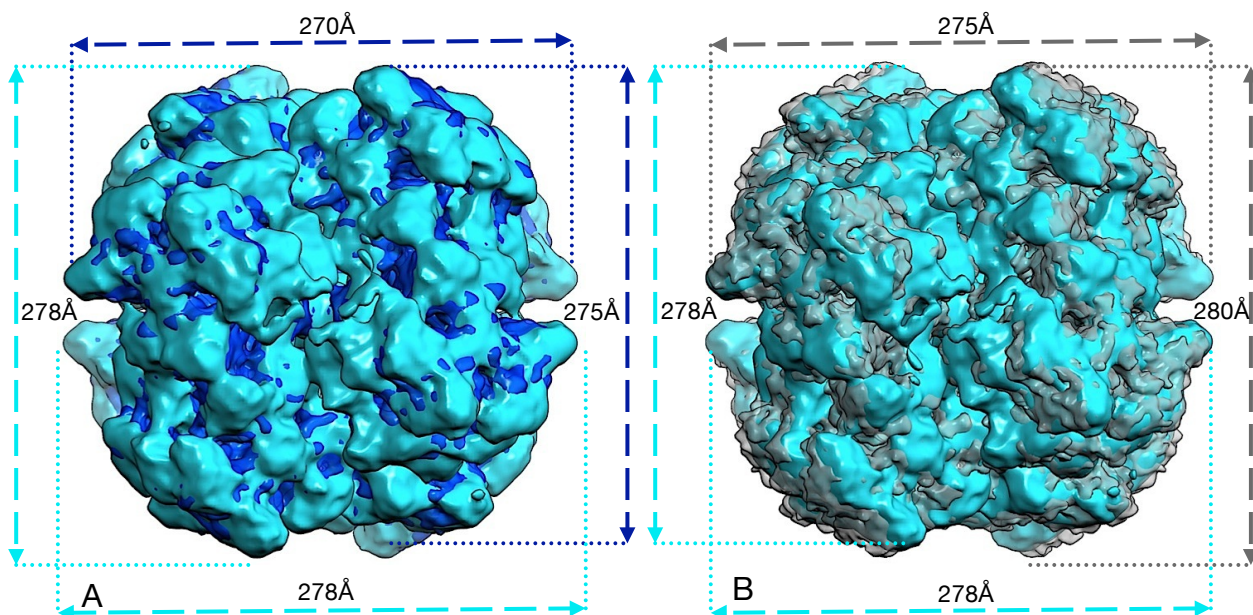


Abb. D.5: Vergleich der 3D-Rekonstruktionen des LpH zwischen **(A)** der 12 Å-Rekonstruktion des 8x6-mers (hellblau) von Martin et al., (2007) und der hier berechneten 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers (blau/transparent) und **(B)** der 12 Å-Rekonstruktion des 8x6-mers (hellblau) von Martin et al., (2007) und der 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers (grau/transparent) bei gleichem Masseschwellenwert. **A:** Die 12 Å-Rekonstruktion des 8x6-mers ist im Vergleich zur hier berechneten 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers minimal größer. **B:** Beide 3D-Rekonstruktionen unterscheiden sich in den Maßen nur geringfügig.

Der Korrelationswert zwischen der 3D-Rekonstruktion des 8x6-mers von Martin et al. (2007) und der hier berechneten 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers lag bei 85 %, zum deoxy-8x6-mer waren es 78 %.

Zusammengefasst sind zwischen dem hier vorgestellten oxy-8x6-mer und dem 8x6-mer von Martin et al. (2007) hinsichtlich des generellen Aufbaus der Quartärstruktur keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. D.6 A). Die Maße beider 3D-Rekonstruktionen sind sehr ähnlich, ebenso die Abstände zwischen den Hexameren beim 2x6-mer, 4x6-mer und 8x6-mer. Die Rotation zwischen beiden Hexameren beim 2x6-mer ist identisch. Der Kippwinkel zwischen den beiden 2x6-meren des 4x6-mers unterscheidet sich um lediglich 1° und der Staffelungswinkel zwischen den zwei 4x6-meren des 8x6-mers um nur 2°.

Die 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers weist dagegen ähnliche strukturelle Unterschiede zum 8x6-mer von Martin et al. (2007) auf (Abb. D.6 B), wie sie bereits in Abschnitt D.1.1 beschrieben wurden.

Die Messwerte zu den drei 3D-Rekonstruktionen sind in Tabelle D.2 und D.3 aufgeführt

1x6-mere im 2x6-mer		2x6-mere im 4x6-mer			4x6-mere im 8x6-mer		Referenz
Distanz (Å)	Rotation (°)	Distanz (Å)	Verschiebung (Å)	Kippwinkel (°)	Distanz (Å)	Staffelungswinkel (°)	
105 ± 2	115 ± 1	110 ± 2	12 ± 1	12 ± 2	110 ± 2	40 ± 2	deoxy-8x6-mer (diese Arbeit)
105 ± 2	105 ± 1	110 ± 2	12 ± 1	17 ± 2	105 ± 2	40 ± 2	oxy-8x6-mer (diese Arbeit)
100 ± 3	105 ± 5	102 ± 3	14 ± 1	16 ± 2,5	106 ± 3	42 ± 2	8x6-mer (Martin et al., 2007)

Tab. D.2: Abmessungen der in dieser Arbeit berechneten 3D-Rekonstruktionen des deoxy- und oxy-8x6-mers und der 12 Å-Struktur von Martin et al., (2007). Die Werte für die 12 Å-Rekonstruktion von Martin et al., (2007) wurden aus der entsprechenden Publikation übernommen.

	deoxy-8x6mer	oxy-8x6-mer	8x6-mer (Martin et al., 2007) neu gemessen
x-Achse	275Å	270Å	278Å
y-Achse	280Å	275Å	278Å
z-Achse	270Å	260Å	270Å

Tab. D.3: Vermessung des deoxy-8x6-mers, oxy-8x6-mers und dem 8x6-mer von Martin et al., (2007).

Diese Resultate bestätigen die Annahme von Martin et al., (2007), dass es sich bei der 12 Å-Rekonstruktion um die oxy-Form des 8x6-mers handelte.

Die beschriebenen strukturellen Unterschiede zwischen dem oxy-8x6-mer und dem deoxy-8x6-mer von *L. polypheumus* haben natürlich Auswirkungen auf die diversen molekularen Kontaktstellen (Interfaces) zwischen den acht Hexameren.

Die im oxy-8x6-mer auftretenden Interfaces wurden von Martin et al., (2007) erstmals beschrieben. Im Abschnitt D.3 werden alle auftretenden Interfaces im oxy- sowie deoxy-8x6-mer genauer analysiert und verglichen.

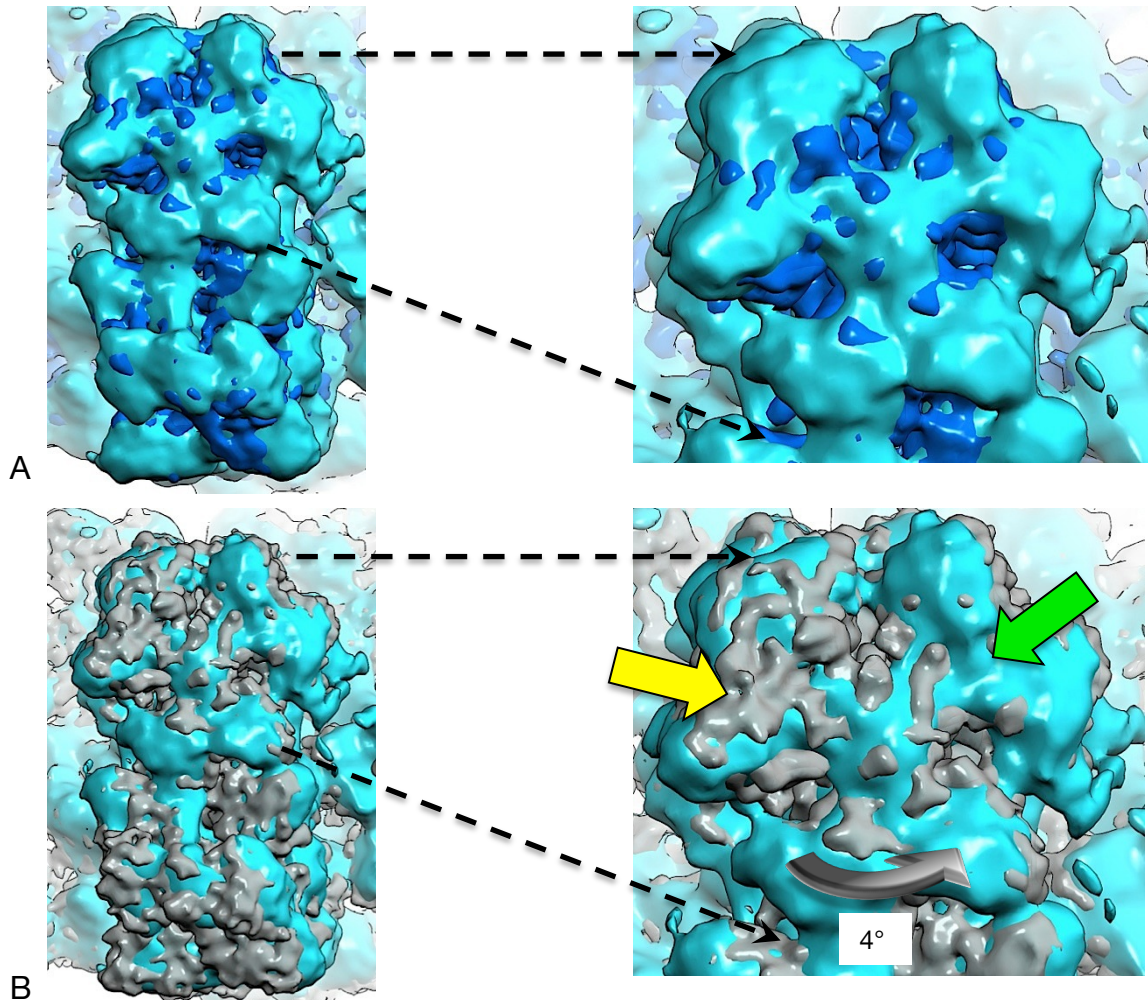


Abb. D.6: Vergleich der Überlagerung zwischen den 2x6-meren und dem einzelnen Hexamer des **(A)** aktuellen oxy-8x6-mers (dunkelblau) und des oxy-8x6-mers von Martin et al., (2007) (hellblau) und **(B)** deoxy-8x6-mers (grau) und des oxy-8x6-mers von Martin et al., (2007). **A:** Beide oxy-Strukturen liegen gleichmäßig übereinander. Das 2x6-mer von Martin et al., (2007) erscheint beim massekorrelierten Schwellenwert der beiden 3D-Rekonstruktionen ein wenig voluminöser. Dies hängt mit der etwas schlechteren Auflösung zusammen. Die gute Korrelation zwischen den beiden 3D-Rekonstruktionen zeigt auch die Detailansicht auf das einzelne Hexamer. Hier sind keine Rotationen oder Verschiebungen zwischen den beiden Strukturen erkennbar. **B:** Die Überlagerung des deoxy-Dodekamers und des oxy-2x6-mers von Martin et al., (2007) weist ähnliche strukturelle Unterschiede auf, wie sie bereits zwischen dem deoxy-2x6-mer und dem oxy-2x6-mer der aktuellen 3D-Rekonstruktionen aufgetreten sind (siehe D.1.1 / Abb. D.1). Auch hier sind beide Hexamere beim deoxy-2x6-mer im Vergleich zum oxy-2x6-mer von Martin et al. (2007) um zusätzliche 8° gegeneinander verdreht. In der Detailansicht der Hexamere ist diese Rotation des deoxy-1x6-mers gut zu erkennen. Auf der linken Seite des Hexamers liegt die Masse des deoxy-1x6-mers deutlich über der des oxy-1x6-mers (gelber Pfeil), während es auf der rechten Seite von der Masse des oxy-1x6-mer überdeckt wird (grüner Pfeil). Das deoxy-1x6-mer ist um zusätzliche 4° gegen den Uhrzeigersinn verdreht (grauer Pfeil).

2.4 Vergleich eines extrahierten Hexamers im oxy- und deoxy-Zustand

Aufgrund der Verschiebungen, die zwischen den Hexameren des 8x6-mers im oxygeniertem und deoxygeniertem Zustand auftreten, stellt sich die Frage, inwieweit auch die Grundstruktur des 1x6-mers von Veränderungen betroffen ist. Dazu wurden die pseudoatomaren Modelle eines einzelnen Hexamers der beiden 3D-Rekonstruktionen verglichen.

Da sich das 2x6-mer des 8x6-mers aus zwei unterschiedlich aufgebauten Hexameren zusammensetzt, wurden beide Hexamervarianten verglichen (Abb. D.7).

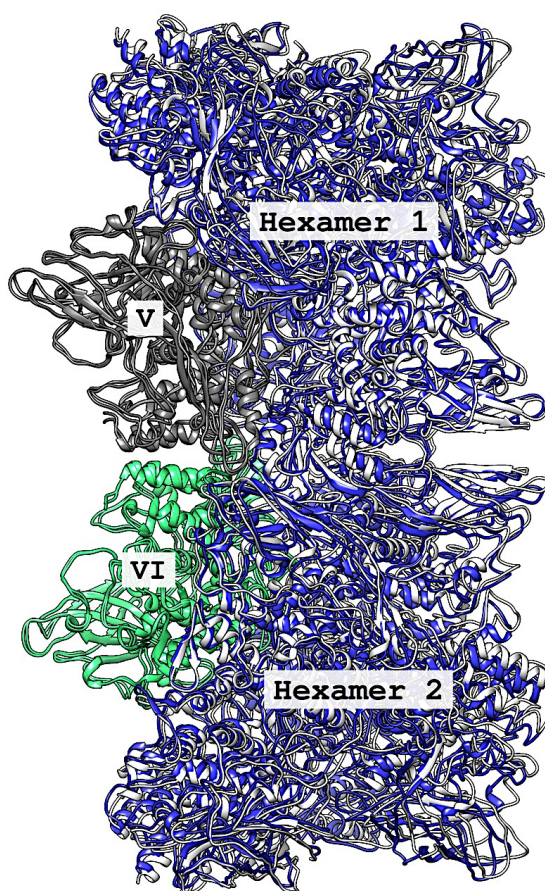


Abb. D.7: Übereinanderlagerung der pseudoatomaren Modelle des oxy-(blau) und deoxy-2x6-mers (grau). Das 2x6-mer besteht aus zwei Hexameren, die sich durch die Zusammensetzung der Untereinheiten voneinander unterscheiden. Hexamer 1 besitzt die Untereinheit V (dunkelgrau), während bei Hexamer 2 an dieser Stelle im Hexamer Untereinheit VI positioniert ist (hellgrün). Bisher ist aber unklar, welche der beiden Positionen mit Untereinheit VI korrespondiert. Die Position der Untereinheit V und VI kann daher auch vertauscht vorliegen.

Beim Vergleich von Hexamer 1 (oxy/deoxy) fällt auf, dass einige Sekundärstrukturen der Untereinheiten des oxy-Modells sich in Richtung Zentrum des 1x6-mers bewegen, bzw. sich im deoxy-Modell die Sekundärstrukturen vom Zentrum leicht entfernen (Abb. D.8 A). Diese Verschiebungen der Sekundärstrukturen lassen sich auch beim Vergleich von Hexamer 2 feststellen (Abb. D.8 B).

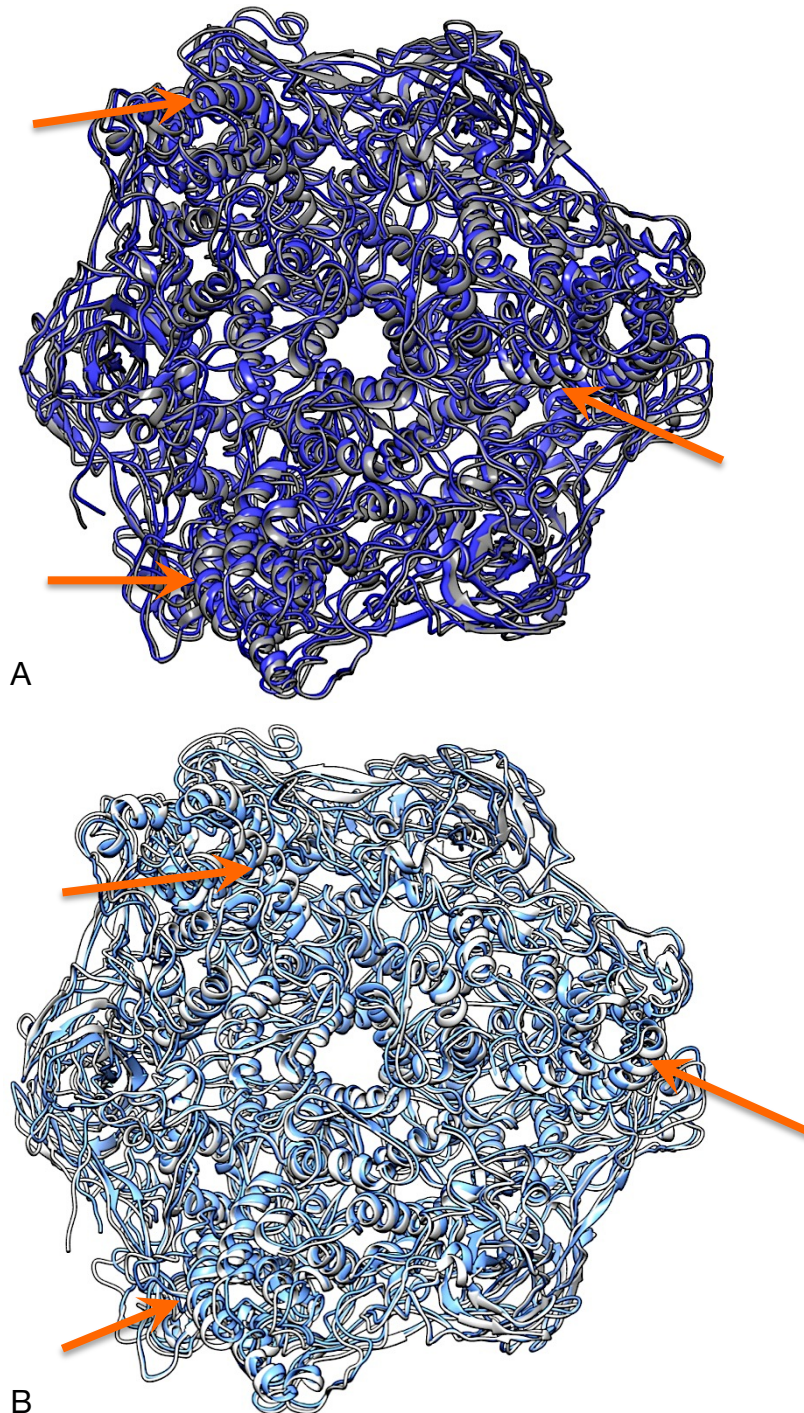


Abb. D.8: Vergleich der pseudoatomaren Modelle von **(A)** Hexamer 1 und **(B)** Hexamer 2 im oxy- und deoxy-Zustand. **A/B:** In beiden Hexameren sind leichte Verschiebungen zwischen Sekundärstrukturelementen des oxy- und deoxy-Modells sichtbar. Am deutlichsten lassen sich diese Verschiebungen innerhalb der jeweiligen Untereinheiten an den α -Helices in Domäne #1 erkennen (orangefarbene Pfeile).

Die Verschiebungen der Sekundärstrukturen lassen sich bei allen Untereinheiten am deutlichsten im Bereich von Domäne #1 feststellen. Es sind jedoch auch leichte Verschiebungen in den Domänen #2 und #3 sichtbar.

Um die Strukturänderung nochmals zu verdeutlichen, wurden für die pseudoatomaren Modelle von Hexamer 1 und 2 im oxy- und deoxy Zustand 3D-Dichtekarten mit einer Auflösung von 5 Å simuliert. Beim direkten Vergleich der simulierten Dichtekarten lassen sich zwischen den Untereinheiten im oxy- und deoxy-Zustand leichte Verschiebungen erkennen. Aufgrund dieser Strukturveränderungen sind die 3D-Dichtekarten der deoxy-Modelle von Hexamer 1 als auch von Hexamer 2 im Vergleich zu den Dichtekarten der oxy-Modelle in allen drei Dimensionen (x/y/z-Achse) um ca. 3-4 Å größer (Abb. D.9 A/B).

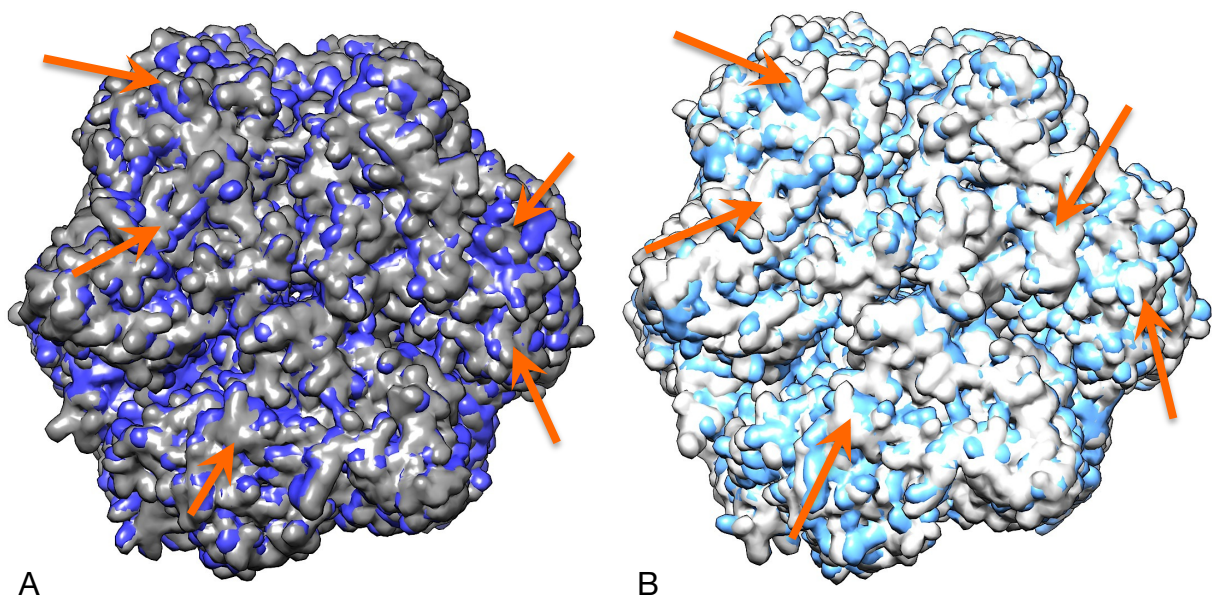


Abb. D.9: Vergleich der simulierten 3D-Dichtekarten von **(A)** Hexamer 1 und **(B)** Hexamer 2 im oxy- und deoxy-Zustand. **A:** Zwischen der deoxy-Dichtekarte (grau) und der oxy-Dichtekarte (blau) ist eine leichte Verschiebung zwischen den Untereinheiten zu erkennen. In der deoxy-Dichtekarte scheinen sich die einzelnen Untereinheiten vom Zentrum des 1x6-mers leicht zu entfernen (orangefarbene Pfeile). Dieses minimale Auseinanderdriften der Untereinheiten erklärt die etwas größeren Maße des deoxy-1x6-mers gegenüber dem oxy-1x6-mer. **B:** Bei Hexamer 2 sind zwischen der deoxy-Dichtekarte (weiß/hellgrau) und der oxy-Dichtekarte (hellblau) ähnliche Verschiebungen wie in **(A)** erkennbar (orangefarbene Pfeile).

Beim Betrachten der sechs Untereinheiten der Kristallstruktur 1HCY fiel schon früh auf, dass sich die Hexamere eher aus drei Dimeren zusammensetzen als aus zwei Trimeren (Linzen et al., 1985b). An den jeweiligen Dimeren lässt sich jetzt auch die Verschiebung der beteiligten Untereinheiten zwischen dem oxy- und deoxy-Zustand nachvollziehen. Im deoxy-Zustand erfahren die beiden Untereinheiten eines Dimers gegenüber dem oxy-Zustand eine leichte Kippbewegung zueinander hin. Die

Kippbewegung ist am deutlichsten im Bereich von Domäne #1 sichtbar (Abb. D.10). Das "Verhalten" beschreibt den Wechsel zwischen den beiden Zuständen.

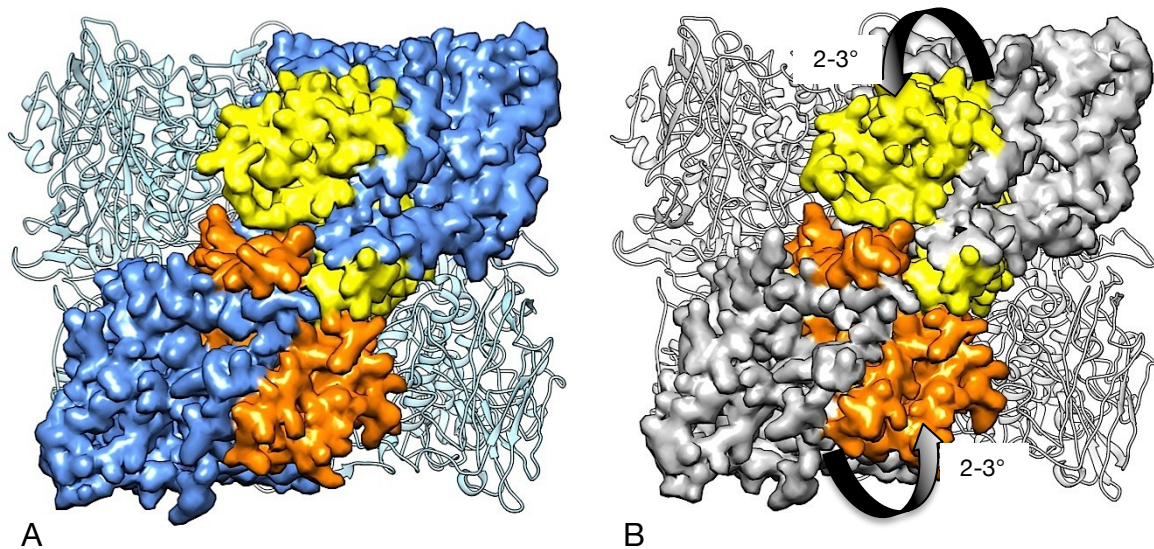


Abb. D.10: Vergleich eines Dimers im **(A)** oxy- und **(B)** deoxy-Zustand. Die Dichtekarte des Dimers wurde mit einer Auflösung von 5 Å simuliert und setzt sich hier aus den Untereinheiten II und VI zusammen. Die Domäne #1 von Untereinheit II (gelb) und VI (orange) ist jeweils farblich hervorgehoben. **A:** Im oxy-Zustand sind die beiden Untereinheiten nicht zueinander gekippt. **B:** Im deoxy-Zustand sind beide Untereinheiten 2-3° zueinander gekippt (schwarze Pfeile). Diese Kippbewegung lässt sich auch bei den beiden anderen Dimeren des Hexamers feststellen.

Diese Kippbewegung der beiden Untereinheiten innerhalb der Dimere verdreht die beiden Trimere leicht gegeneinander (4-5°). Im deoxy-Zustand scheint das Hexamer so in einen "geöffneten" Zustand überzugehen, während es im oxygenierten Zustand in einer "geschlossenen" Konformation vorliegt (Abb. D.11 A-D). Diesen möglichen Mechanismus beschreiben Markl und Decker (1992) mit ihrer "turning wheel"-Hypothese. Hier fällt die Rotation der beiden Trimere jedoch mit 4-5° etwas geringer aus.

Die Kippbewegung von 2-3° zwischen den Untereinheiten eines Dimers, beim Wechsel vom oxygenierten Zustand in den deoxygenierten Zustand könnte mit der Weiterleitung allosterischer Signale zusammenhängen. Dies wurde bereits von Magnus et al., (1994) vermutet. Bei genauerer Untersuchung der möglichen Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten eines Dimers fällt auf, dass es vermutlich nicht nur durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren stabilisiert wird. Im Bereich der Kontakte fallen auch mehrere saure und basische Aminosäuren (Asparaginsäuren, Histidine) auf, die durch leichte Kippbewegungen in der Lage wären miteinander in Verbindung zu treten.

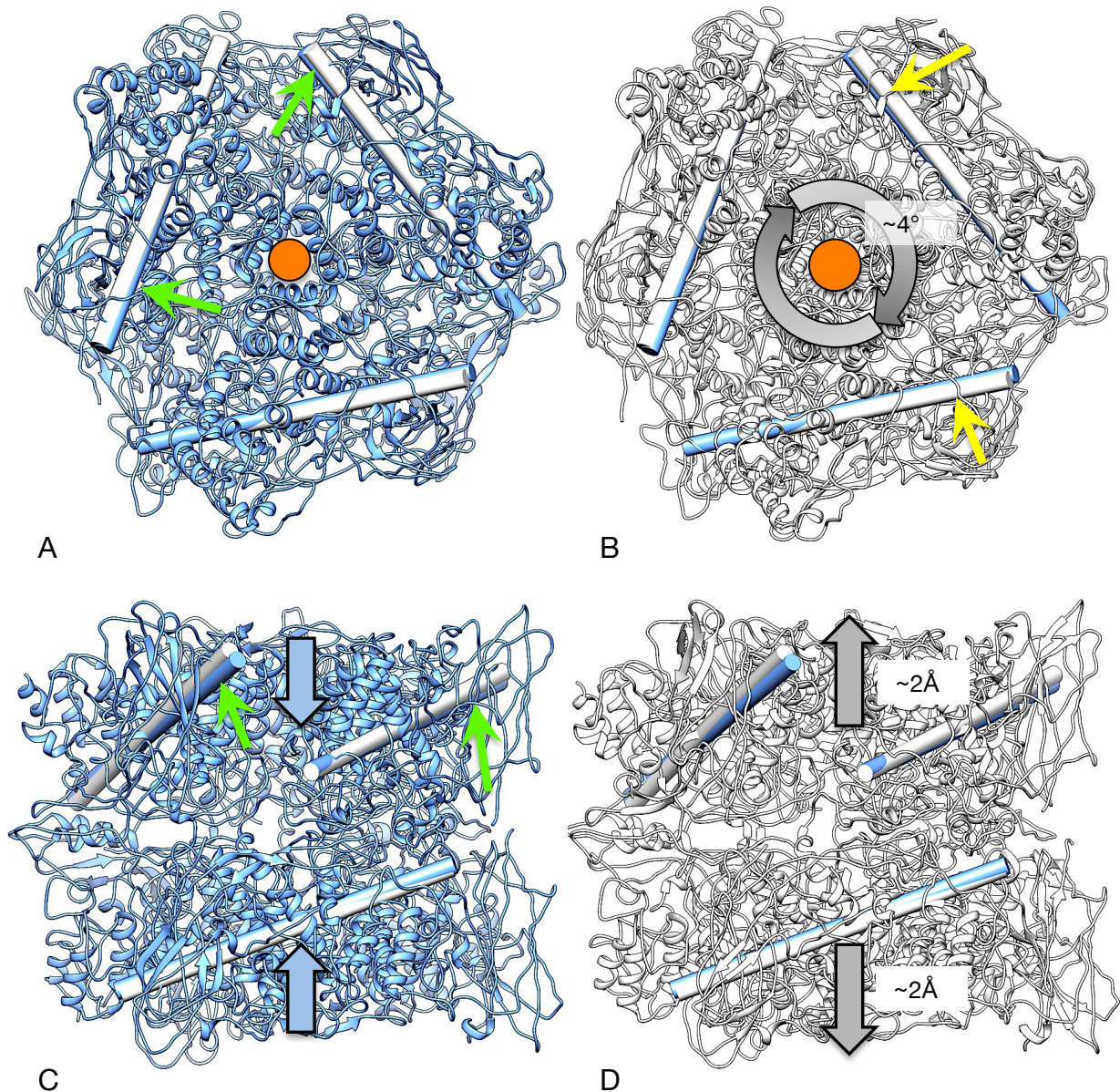


Abb. D.11: Veränderung der Quartärstruktur des einzelnen Hexamers beim Wechsel zwischen (A/C) oxy- und (B/D) deoxy-Zustand (als Beispiel dient hier Hexamer 2). **A:** Topansicht vom pseudoatomaren Modell des oxy-Hexamers. Die Untereinheiten der beiden Trimere liegen etwas kompakter zusammen. Das zentrale Loch in der Mitte der beiden Trimere (Kreis: orange) ist dadurch etwas kleiner. Die etwas kompaktere Konformation wird durch die Lage der Masseachsen (hellblau = oxy; weißgrau = deoxy) der einzelnen Untereinheiten besser sichtbar (grüne Pfeile).

B: Topansicht vom pseudoatomaren Modell des deoxy-Hexamers. Die Masseachsen der Untereinheiten des deoxy-Hexamers (weißgraue Balken) weisen eine leichte Verdrehung (gelbe Pfeile) im Vergleich zu den Masseachsen der Untereinheiten des oxy-Hexamers (hellblaue Balken) auf. Dies führt zu einer gegensätzlichen Rotationsbewegung der beiden Trimere um ca. 4° , wodurch sich die kompakte Konformation der beiden Trimere lockert. Aufgrund dessen vergrößert sich das zentrale Loch in der Mitte beider Trimere (Kreis: orange). **C:** Seitenansicht vom pseudoatomaren Modell des oxy-Hexamers. Die Massenachsen der Untereinheiten beim oxy-Hexamer zeigen, dass diese kompakter zusammenliegen (grüne Pfeile). Dies hat zur Folge, dass die beiden Trimere näher beieinander liegen (blaue Pfeile). **D:** Seitenansicht vom pseudoatomaren Modell des deoxy-Hexamers. Die Auflockerung der Konformation führt dazu, dass sich die beiden Trimere leicht voneinander entfernen ($\sim 4 \text{ \AA}$). Das deoxy-Hexamer liegt somit scheinbar in einer "offenen"-Konformation vor.

2.5 Vergleich der extrahierten Hexamere (1 und 2) aus dem oxy- und deoxy-8x6-mer mit dem kristallografischen Hexamer (1HCY) der Languste *P. interruptus*

Neben der vergleichenden Analyse der pseudoatomaren Modelle von Hexamer 1 und 2 im oxy- und deoxy-Zustand ist ein Vergleich mit dem kristallografischen Hexamer (pdb ID: 1HCY) der Languste *P. interruptus* von Interesse (Gaykema et al., 1985; Volbeda et al., 1989). Die pseudoatomaren Modelle der Hexamere wurden dabei über die Kristallstruktur des Hexamers gelegt. Um die Unterschiede zwischen den Hexameren besser darzustellen, wurden von allen Modellen 3D-Dichtekarten mit einer Auflösung von 5 Å simuliert und anschließend verglichen.

Dabei lassen sich zwischen der simulierten 3D-Dichtekarte der Kristallstruktur und den Dichtekarten der beiden Hexamere im oxy- und deoxy-Zustand deutliche strukturelle Unterschiede erkennen. Die Dichtekarten zeigen, dass die Kristallstruktur im Bereich der Domäne #1 der Untereinheiten eine Kippbewegung von ca. 7° gegenüber den pseudoatomaren Modellen der Hexamere 1 und 2 sowohl im oxy- als auch im deoxy-Zustand aufweist (Abb. D.12 A-D). Diese Kippbewegung ist bereits bekannt (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994) und wird im nachfolgenden Abschnitt genauer analysiert. Ebenso fällt ein zusätzlicher Masseanteil im Bereich von Domäne #1 auf (Abb. D.12 A-D). Dafür verantwortlich sind die Helices α_2 und α_3 die beim Crustaceen-Hämocyanin vorhanden sind, im Cheliceraten-Hämocyanin aber aufgrund einer Deletion im Bereich des N-Terminus fehlen (Linzen et al., 1985b; Soeter et al., 1987).

Obwohl es sich hier um Hämocyanine von zwei unterschiedlichen Spezies handelt, die sich in der Aminosäuresequenz deutlich voneinander unterscheiden, ist die Grundstruktur des Hexamers sehr ähnlich. Die Abmessungen der Kristallstruktur und der pseudoatomaren Modelle von Hexamer 1 und 2 sind nahezu identisch (Tab. D.4).

	Hexamer 1 aus der 7,3Å-deoxy-Struktur [Å]	Hexamer 2 aus der 7,3Å-deoxy-Struktur [Å]	Hexamer 1 aus der 7,9Å-oxy-Struktur [Å]	Hexamer 2 aus der 7,9Å-oxy-Struktur [Å]	Kristallstruktur (1HCY) des Hexamers [Å]
x-Achse	128±2	129±2	126±2	126±2	130±2
y-Achse	114±2	115±2	111±2	112±2	116±2
z-Achse	100±2	100±2	98±2	99±2	102±2

Tab. D.4: Vergleich der Gesamtmaße der pseudoatomaren Modelle der Hexamere 1 und 2 aus der 7,3 Å-deoxy-Struktur und 7,9 Å-oxy-Struktur mit denen des kristallografischen Hexamers 1HCY (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989).

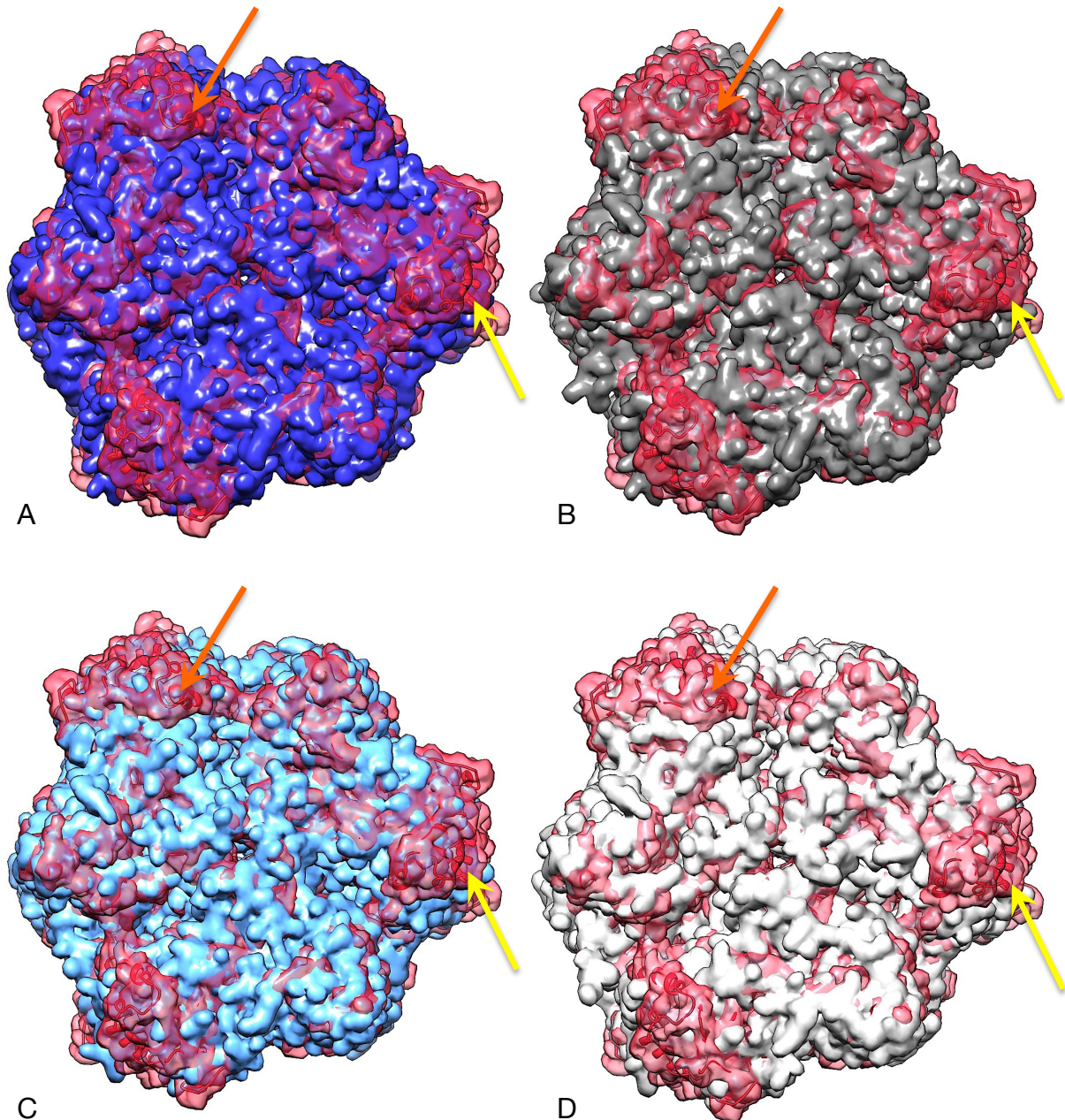


Abb. D.12: Vergleich der simulierten 3D-Dichtekarten des **(A)** oxy-Hexamer 1 (blau), **(B)** deoxy-Hexamer 1 (grau), **(C)** oxy-Hexamer 2 (hellblau), **(D)** deoxy-Hexamer 2 (hellgrau) mit der simulierten Dichtekarte des kristallografischen Hexamers 1HCY (rot/transparent). Die Untereinheiten der Kristallstruktur 1HCY weisen im Vergleich zu den Untereinheiten der pseudoatomaren Modelle eine Kippbewegung im Bereich von Domäne #1 auf. Diese lässt sich besonders gut an den simulierten Dichtekarten zeigen (orangefarbene Pfeile). Zusätzlich besitzen die Untereinheiten von 1HCY im Bereich von Domäne #1 zusätzliche Massenanteile. Verantwortlich für diese Massen sind die Helices α_2 und α_3 die im Crustaceen-Hämocyanin vorhanden sind (gelbe Pfeile) (Hazes et al., 1993). Im Cheliceraten-Hämocyanin fehlen diese beiden Helices aufgrund einer Deletion im vorderen Bereich des N-Terminus (Linzen et al., 1985; Soeter et al., 1987)

2.6 Vergleich auf der Ebene einer Untereinheit (Typ II)

Strukturelle Veränderungen, die sich in der Quartärstruktur zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Zustand ergeben, wurden zunächst auf der Ebene einer Untereinheit genauer untersucht. Hierzu bot sich die Untereinheit des Typs II an. Ihre Sequenz ist schon lange bekannt (Linzen et al., 1985). Ebenso ist für diesen Untereinheitentyp eine Kristallstruktur im oxygenierten (pdbID: 1NOL) und deoxygenierten (pdbID: 1LLA) Zustand verfügbar (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994). Beim molekularen Modellieren von LpH dienten mir die Kristallstrukturen als Vorlage (*Template*). Im Vergleich der beiden Kristallstrukturen von Untereinheit II zeigte sich jedoch, dass sie die exakt gleiche Tertiärstruktur aufwiesen. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Strukturen war der unterschiedliche Abstand der beiden Cu^{2+} -Atome im aktiven Zentrum zueinander. Magnus et al. (1994) vermuteten, dass sowohl die oxy- als auch die deoxy-Kristallstruktur von Untereinheit II in der sogenannten T-State-Konformation vorlagen. Der Grund hierfür könnten diverse Faktoren beim Kristallisationsvorgang sein und/oder eine hohe Chlorid-Konzentration im damals verwendeten Puffer (Magnus et al., 1994). Es ist bekannt, dass die Bindung von Chlorid-Ionen die Sauerstoffaffinität der Untereinheit II erheblich reduziert (Brenowitz et al., 1984a). Es wurde angenommen, dass die Bindung von Chlorid im Bereich des aktiven Zentrums die T-State-Konformation stabilisiert, und dies der Grund dafür sein könnte, weshalb sich die oxy-(1NOL) sowie die deoxy-Kristallstruktur (1LLA) in ihrer Tertiärstruktur nicht unterscheiden (Magnus et al., 1994). Bezüglich des kristallografischen deoxy-Hexamers 1HCY der Languste *P. interruptus* (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) ging man davon aus, dass es aufgrund der Kristallisationsbedingungen (pH-Wert = 3,8; niedrige Chlorid-konzentration) die R-State-Konformation besitzt (Magnus et al., 1994). Die Kristallstrukturen zeigen also zwei Konformationszustände der Untereinheiten, die jedoch unabhängig davon sind, ob Sauerstoff im aktiven Zentrum gebunden ist oder nicht. Die Untereinheiten eines Hexamers wären also in der Lage, sowohl im oxygenierten als auch im deoxygenierten Zustand jeweils in der T-State bzw. R-State-Konformation vorzuliegen.

Da die beiden Kristallstrukturen der Untereinheit II (Magnus et al., 1994) sich in ihrer Tertiärstruktur nicht unterscheiden, wurde zur weiteren Analyse nur die Kristallstruktur der oxygenierten Untereinheit II (1NOL) herangezogen. Zudem wurde für den Vergleich eine Untereinheit aus dem kristallografischen Hexamer 1HCY von *P. interruptus* extrahiert (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989). Beide wurden bereits früher im Detail verglichen (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994). Hierbei fiel auf, dass in 1HCY im Vergleich zu 1NOL die Domäne #1 eine Kippung von ca.

7,5° relativ zu Domäne #2 und #3 erfährt. Markl et al., (2009) konnten anhand einer 10 Å-oxy-Rekonstruktion des 6x6-mers des Hundertfüßers *Scutigera coleoptrata* ein zentrales Inter-Hexamer-Interface (*core interface 1↔2*) identifizieren, an dem spezifische Aminosäuren der Domäne #1 von sechs Untereinheiten beteiligt sind. Dieses komplexe Interface könnte aufgrund seines Aufbaus die Kippbewegung der Domäne #1 integriert haben. Dies ermöglicht eine direkte Weitergabe von allosterischen Signalen zwischen den sechs Untereinheiten, die zu drei verschiedenen Hexameren gehören (Markl et al., 2009).

Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Kippbewegung von Domäne #1 möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Kooperativität und der Regulation der Sauerstoffaffinität bei Arthropodenhämocyaninen spielt (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994; Markl et al., 2009).

Von besonderer Bedeutung ist dabei das hochkonservierte Phenylalanin an Position 49 (bei Cheliceraten) bzw. Position 75 (bei Crustaceen), das durch eine Positionsverschiebung vermutlich die Kippbewegung von Domäne #1 auslöst (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994).

Dieser Bereich der Typ-II-Untereinheit stand im Fokus bei meinem Vergleich der pseudoatomaren Typ-II-Modelle der deoxy- und oxy-Rekonstruktion. Beide pseudoatomaren Modelle wurden mit Hilfe des Programms DireX flexibel in die jeweilige 3D-Rekonstruktion eingepasst und anschließend verglichen. An einigen Sekundärstrukturelementen, wie den α -Helices in Domäne #1, lassen sich Verschiebungen von wenigen Ångstrom zwischen dem deoxy- und dem oxy-Modell der Untereinheit II erkennen (Abb. D.13 A). Diese könnten Einfluss auf die Aufnahme bzw. Abgabe von Sauerstoff haben. Beim Vergleich meines oxy-Modells mit der oxy-Kristallstruktur von Untereinheit II (1NOL) (dementsprechend auch zur deoxy-Kristallstruktur 1LLA) wurden keine Verschiebungen zwischen den Sekundärstrukturen festgestellt (Abb. D.13 B).

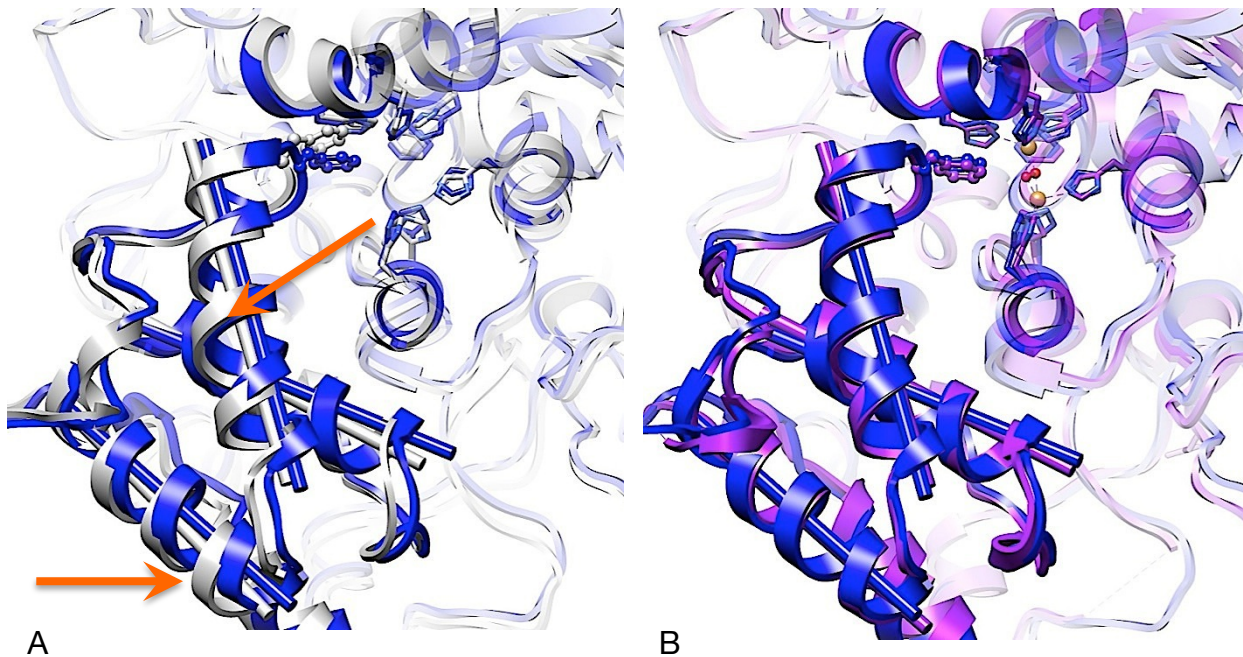


Abb. D.13: Struktureller Vergleich von Domäne #1 zwischen **(A)** den pseudoatomaren Modellen der oxy- (blau) und deoxy-Untereinheit II (hellgrau) und **(B)** dem pseudoatomaren Modell der oxy-Untereinheit II (blau) und der oxy-Kristallstruktur (lila) von Untereinheit II (1NOL). **A:** Die α -Helices in Domäne #1 des deoxy-Modells zeigen eine leichte Verschiebung (orangefarbene Pfeile) gegenüber den α -Helices des oxy-Modells. **B:** Die Helices beider Strukturen liegen fast deckungsgleich aufeinander.

Das Phenylalanin an Position 49 ist beim deoxy-Modell der Untereinheit II leicht nach oben geklappt, während es beim oxy-Modell fast exakt auf der Position des Phenylalanins der oxy-Kristallstruktur der Untereinheit II liegt (Abb. D.14 A/B).

Eine so starke Verschiebung des konservierten Phenylalanins, wie sie bei der Untereinheit des kristallografischen Hexamers 1HCY auftritt, ist jedoch bei meinem deoxy-Modell nicht zu erkennen (Abb. D.14 C). Hier beträgt die Kippbewegung zwischen Domäne #1 und den Domänen #2 + #3 nur ca. 2° anstatt 8° in der Kristallstruktur 1HCY (Abb. D.14 C).

Das Hochklappen von F49 könnte direkte Auswirkungen auf das benachbarte H328 haben, das an der Koordination des Kupfer B beteiligt ist. Der Imidazolring dieses Histidins verschiebt sich um ca. 2 \AA , wodurch die Distanz zum Kupferion leicht zunimmt. Dies wiederum könnte direkte Auswirkungen auf den Abstand der beiden Kupferionen haben, die für die Sauerstoffbindung zuständig sind. Hier wurde bereits vermutet, dass sich durch eine Reorientierung der Kupferliganden der Abstand der Kupferionen zueinander ändert und dies die "offene" bzw. "geschlossene" Konformation des Proteins verursacht (Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994).

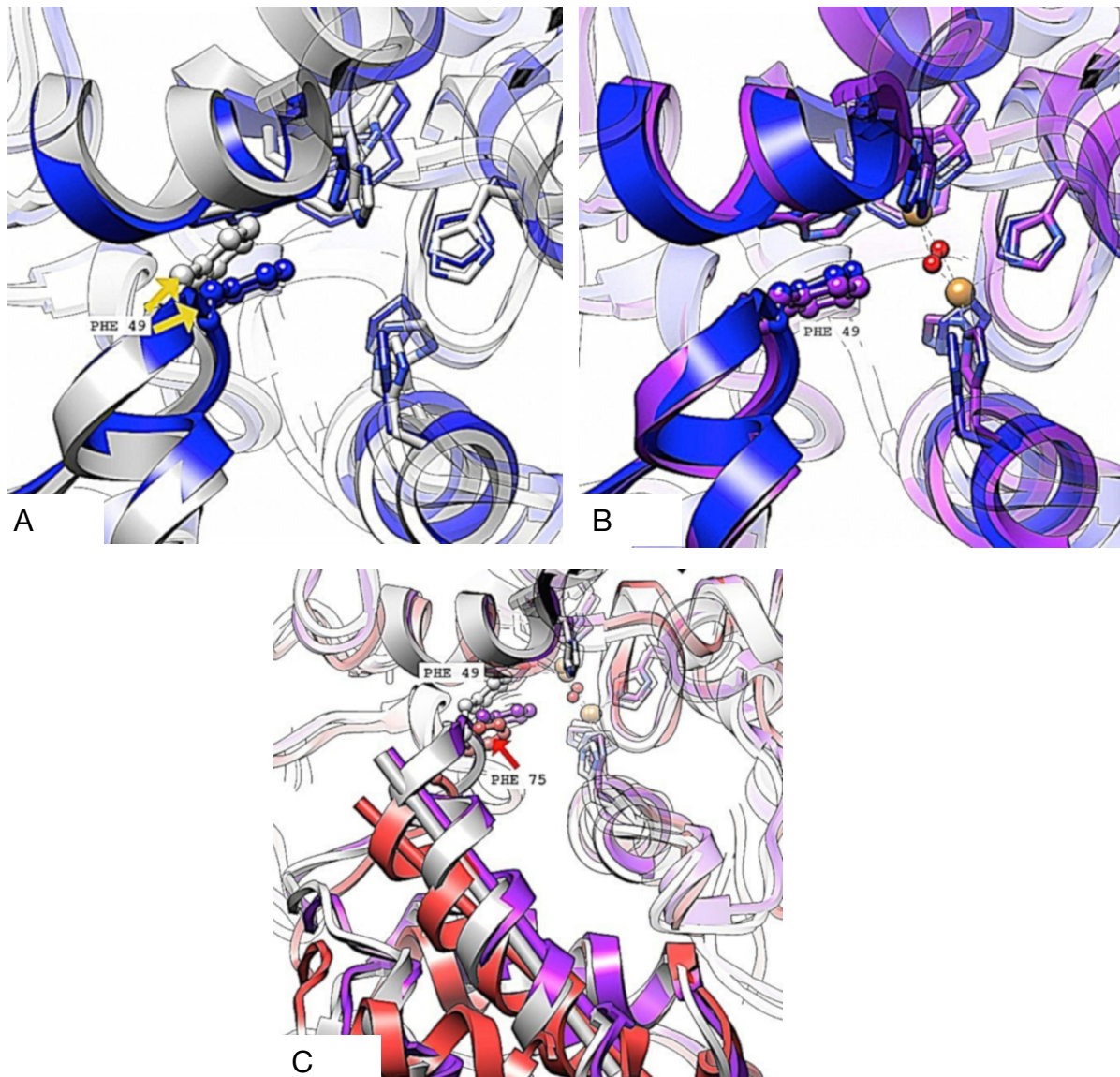


Abb. D.14: Struktureller Vergleich des aktiven Zentrums zwischen **(A)** den pseudoatomaren Modellen der oxy- (blau) und deoxy- (hellgrau)-Untereinheit II und **(B)** dem pseudoatomaren Modell der oxy-Untereinheit II (blau) und der oxy-Kristallstruktur (lila) von Untereinheit II (1NOL). **A:** F49 klappt durch eine leichte Verdrehung des Loops im deoxy-Modell nach oben (gelbe Pfeile). Einige Positionsänderungen sind auch bei den Histidinen, die am aktiven Zentrum beteiligt sind, zu beobachten (grüne Pfeile). **B:** Die beiden Phenylalanine der beiden Strukturen liegen auf derselben Position. Ebenso sind fast keine Positionsveränderungen der Histidine im aktiven Zentrum zu erkennen. **C:** Im Gegensatz zur Untereinheit des kristallografischen Hexamers (rot) (1HCY) weist das pseudoatomare Modell der deoxy-Untereinheit II (hellgrau) gegenüber der oxy-Kristallstruktur von Untereinheit II (lila) keine Rotation zwischen Domäne #1 und Domäne #2 + #3 auf. Das konservierte Phenylalanin klappt beim deoxy-Modell nach oben, während es sich bei 1HCY (rot) stark verschiebt.

Um die Auswirkungen der leichten Verschiebungen der Sekundärstrukturen im Bereich des aktiven Zentrums besser zu verdeutlichen, wurden für die beiden pseudoatomaren Modelle der Untereinheit II, der oxy-Kristallstruktur 1NOL von Untereinheit II sowie der Untereinheit aus dem kristallografischen Hexamer 1HCY in Chimera simulierte Dichtekarten mit einer Auflösung von 4 Å erstellt.

Die Position des hochkonservierten Phenylalanins an Position 49 (beim Crustaceen-

Hämocyanin (1HCY) an Position 75) wurde farblich hervorgehoben, um strukturelle Veränderungen zwischen den simulierten Dichtekarten besser zu erfassen.

Die folgenden Abbildungen des aktiven Zentrums der vier Dichtekarten wurden aus demselben Blickwinkel und der gleichen Distanz aufgenommen.

Die simulierte Dichtekarte meines pseudoatomaren Modells der deoxy-Untereinheit II von LpH zeigt eine recht große Öffnung im Bereich des aktiven Zentrums. Das Phenylalanin 49 (gelbe Masse) liegt aufgrund der leichten Kippbewegung nicht im Bereich dieser Öffnung (Abb. D.15 A/B). Auffällig ist, dass sich durch die kleinen Verschiebungen der α -Helices meines deoxy-Modells gegenüber meinem oxy-Modell im Bereich des aktiven Zentrums die Helices $\alpha 4$ und $\alpha 10$ von Domäne #1 sowie Helix $\alpha 15$ von Domäne #2 leicht voneinander weg bewegen, und so die Öffnung zum aktiven Zentrum vergrößern. In der simulierten Dichtekarte meines oxy-Modells von Untereinheit II liegen die genannten α -Helices etwas näher beieinander und verengen so die Öffnung zum aktiven Zentrum. F49 liegt bei meinem oxy-Modell in der Öffnung zum aktiven Zentrum und scheint diese zu versperren (Abb. D.15 C/D). Die simulierte Dichtekarte der oxy-Kristallstruktur 1NOL von Untereinheit II ähnelt der Dichtekarte meines oxy-Modells. Bei 1NOL positioniert sich F49 jedoch etwas weiter in Richtung des aktiven Zentrums und scheint hauptsächlich für das Schließen der Öffnung verantwortlich zu sein (Abb. D.15 E/F). In meinem oxy-Modell verschließt nicht nur F49 die Öffnung zum aktiven Zentrum, sondern auch benachbarte Aminosäuren verengen den Eingang. Das betrifft die konservierten Aminosäuren N325, E309 und L54 sowie die benachbarten Aminosäuren Y312, S182 und T183. Diese befinden sich in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum. In der Dichtekarte meines deoxy-Modells nehmen diese Aminosäuren eine andere Konformation ein und erweitern so den Eingangsbereich zum aktiven Zentrum.

Die simulierte Dichtekarte des kristallografischen Hexamers 1HCY zeigte deutliche strukturelle Unterschiede zu den oben beschriebenen Dichtekarten der beiden pseudoatomaren Modelle und der oxy-Kristallstruktur 1NOL. Durch die größere Kippbewegung der Domäne #1 ist das hochkonservierte Phenylalanin 75 viel weiter vom Eingangsbereich des aktiven Zentrums entfernt (Abb. D.16 A/B). N345 und E329 befinden sich an denselben Positionen wie N325 bzw. E309/E310 beim Cheliceraten-Hämocyanin und spielen bei der Konformationsänderung des aktiven Zentrums wahrscheinlich eine wichtige Rolle (Hazes et al., 1993). Auffällig ist die Position von F209, das ebenfalls in den Eingangsbereich des aktiven Zentrums hineinragt (Abb. D.16 A). F209 gehört zu den drei hochkonservierten Phenylalaninen (F49/F200/F360 beim Cheliceraten-Hämocyanin), die durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken die Seitenketten der am aktiven Zentrum beteiligten Histidine maßgeblich stabilisieren. Bei den sieben Untereinheitentypen des LpH ragt F200 jedoch nicht in den Eingangsbereich des aktiven Zentrums hinein.

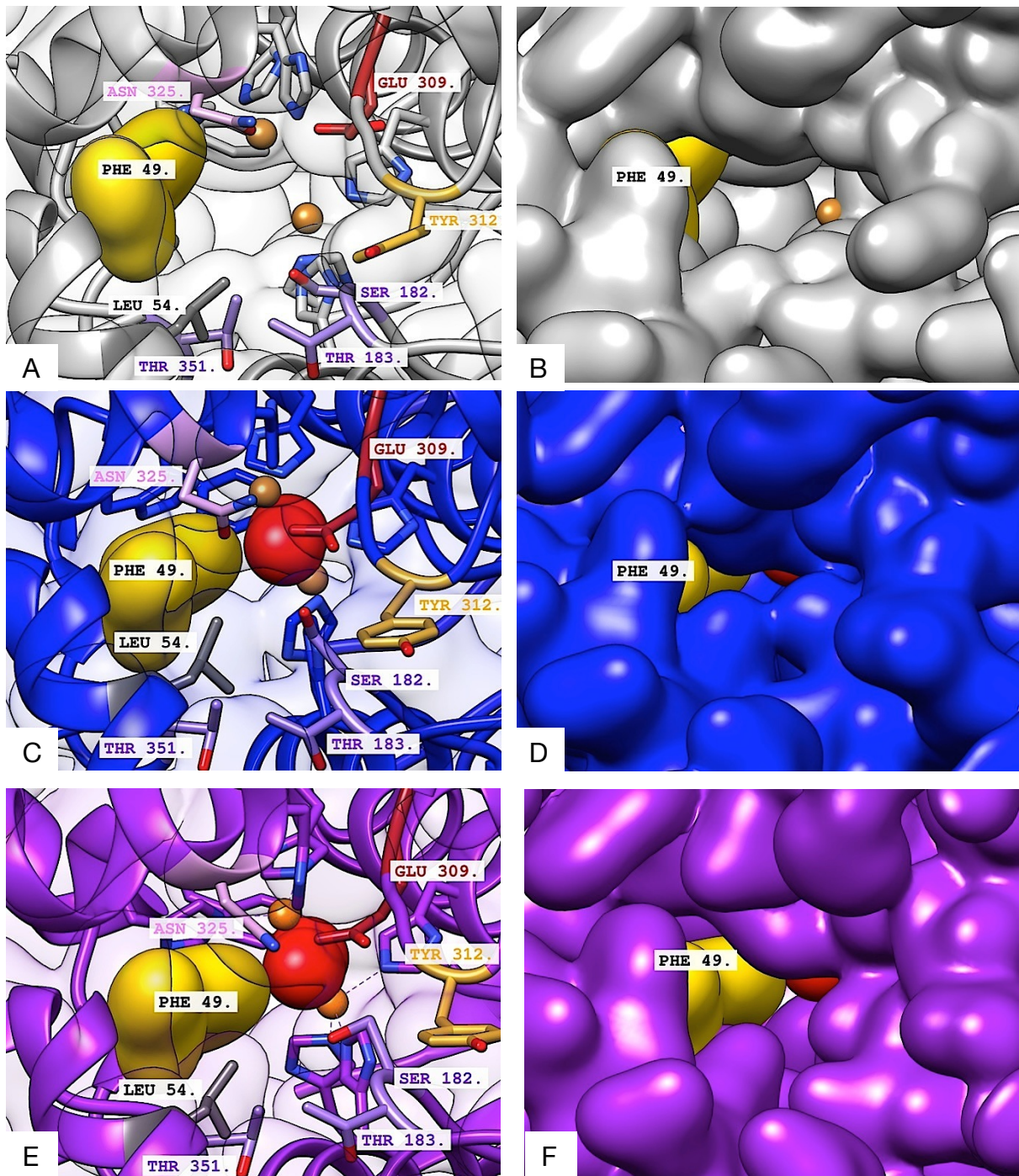


Abb. D.15: Unterschiedliche Konformationen des aktiven Zentrums der Untereinheit II von LpH mit **(A)** meinem pseudoatomaren Modell im deoxy-Zustand und der **(B)** dazugehörigen simulierten Dichtekarte. F49 (gelb) ist nach links gekippt und liegt nicht in der Öffnung, welche zum aktiven Zentrum führt. Die Kupferatome sind orange dargestellt. **(C)** Mein oxy-Modell (Sauerstoff rot) mit der **(D)** dazugehörigen simulierten Dichtekarte. F49 liegt in der Öffnung zum aktiven Zentrum. Zusätzlich verkleinern die konservierten Aminosäuren N325, S182 und L54 diese Öffnung indem sie sich leicht annähern. Im Vergleich zu meinem deoxy-Modell scheint das oxygenierte Protein in einem geschlossenen Zustand vorzuliegen. **(E)** Die oxy-Kristallstruktur der Untereinheit II 1NOL und **(F)** die entsprechende simulierte Dichtekarte. F49 liegt hier vergleichbar mit dem oxy-Modell im Bereich der Öffnung zum aktiven Zentrum. Die Aminosäuren N325, S182 und L54 liegen jedoch nicht so nah beieinander und verengen den Eingang nicht so stark wie in meinem oxy-Modell. Der Eingang wird hauptsächlich durch das konservierte Phenylalanin versperrt. **A/C/E:** Die Aminosäuren S182, T183, Y314 ragen ebenfalls in Richtung des Eingangskanals und könnten bei der Konformationsänderung des aktiven Zentrums eine Rolle spielen.

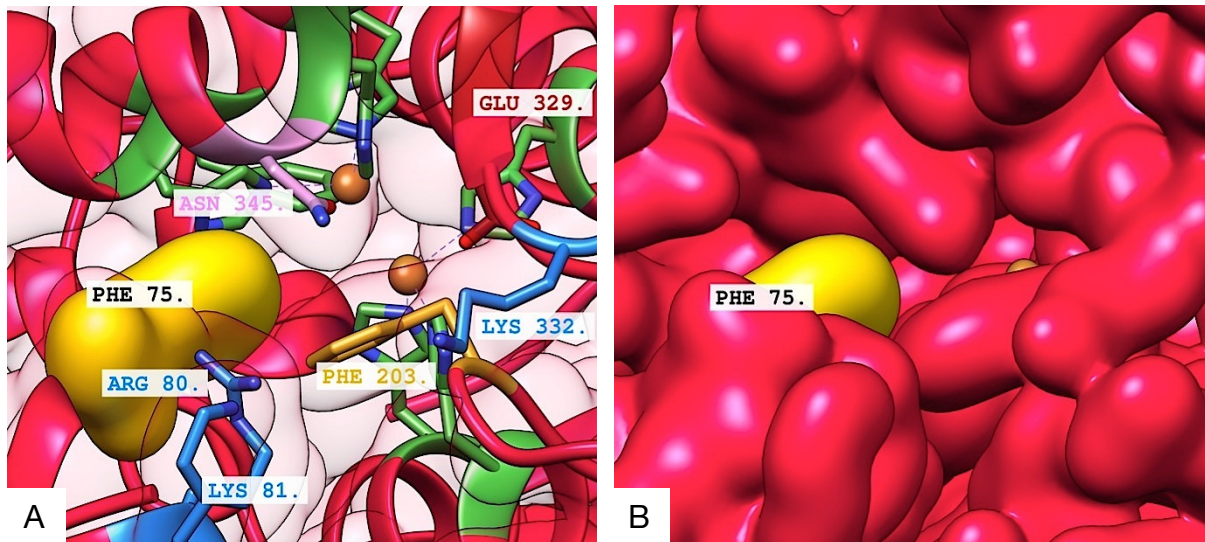


Abb. D.16: Ansicht auf das aktive Zentrum einer **(A)** Untereinheit des kristallografischen Hexamers 1HCY der Languste *P. interruptus* und die **(B)** simulierte Dichtekarte der Untereinheit. Das Phenylalanin 75 kippt nach links weg und befindet sich so nicht mehr in der Öffnung zum aktiven Zentrum. Durch diese Kippbewegung erfährt Domäne #1 relativ zu Domäne #2 und #3 eine Rotation von $7,5^\circ$. Diese ausgeprägte Kippbewegung ist bei allen pseudoatomaren Modellen der LpH-Untereinheiten im deoxy-Zustand nicht zu erkennen. Weiterhin könnten beim Crustaceen-Hämocyanin das konservierte F203 sowie die benachbarten basischen Aminosäuren R90, K81, K332 eine Rolle bei der Konformationsänderung spielen.

Für die pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten I, IIIA, IIIB, IV und VI aus den jeweiligen extrahierten Hexameren der oxy- und deoxy-Rekonstruktion wurden ebenfalls simulierte Dichtekarten mit einer Auflösung von 4 \AA erstellt (s. Anhang: F.2. Abb. F.9-14). Der Vergleich dieser Dichtekarten verstärkt den Eindruck, dass die deoxy-Dichtekarten eher eine "offene" Konformation des aktiven Zentrums darstellen, während bei den oxy-Dichtekarten das aktive Zentrum eher in einer "geschlossenen" Form vorliegt. Die Darstellung von Untereinheit VI zeigt jedoch auch, dass möglicherweise beide Zustände, der oxygenierte als auch der deoxygenierte, in einer "geöffneten" Konformation auftreten könnten.

Der Vergleich der Untereinheiten in beiden Zuständen zeigt, dass es sehr wahrscheinlich unterschiedliche "Öffnungszustände" des aktiven Zentrums gibt. Hierbei ist die Verlagerung/Verschiebung des konservierten Phenylalanins sehr wahrscheinlich nicht die einzige Ursache für die Strukturänderung der Untereinheit, wenn diese vom oxygenierten in den deoxygenierten Zustand übergeht (bzw. umgekehrt). Eher ist es ein Zusammenspiel mit den benachbarten Aminosäuren N325, E309, S182 und L54, die sich um das aktive Zentrum befinden. Bei diesen handelt es sich um konservierte Aminosäuren, die bei jeder Untereinheit exakt an derselben Stelle des entsprechenden pseudoatomaren Modells zu finden sind. Diese gemeinsame Interaktion der Aminosäuren scheint beim LpH den Zugang zum aktiven Zentrum und damit dessen Fähigkeit zur reversiblen Sauerstoffbindung stark zu beeinflussen.

Der Vergleich der deoxy-Dichtekarten aus den pseudoatomaren Modellen der einzelnen Untereinheiten deutet zudem an, dass bei LpH keine starke Kippbewegung zwischen Domäne #1 relativ zu Domäne #2 und #3 auftritt, wie es die publizierten Kristallstrukturen suggeriert hatten (Abb. D.16 A/B) (Hazes et al., 1993). Hier ist zu bedenken, dass es sich bei dem kristallografischen Hexamer um das Hämocyanin eines Crustaceen handelt. Dem Hämocyanin der Cheliceraten fehlt in Domäne #1 ein Sequenzabschnitt, der ca. 21 Aminosäuren umfasst (Linzen et al., 1985; Soeter et al., 1987). Diese Deletion hat zur Folge, dass die vom Crustaceen-Hämocyanin bekannten Helices $\alpha 2$ und $\alpha 3$ beim Cheliceraten-Hämocyanin fehlen (Hazes et al., 1993). Deshalb diente uns die oxy-Kristallstruktur der Untereinheit II als Vorlage für die Modellierung aller pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten von LpH. Diese Kristallstruktur wurde verwendet, da sie vom selben Organismus stammt und zusätzlich eine höhere Auflösung (2,2 Å) gegenüber dem kristallografischen Hexamer von *P. interruptus* (3.2 Å) aufweist (Volbeda et al., 1989; Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994).

Bei der Betrachtung der konservierten Aminosäuren F75, N345 und E329 von 1HCY fällt auf, dass diese dieselben Positionen in der Kristallstruktur besetzen, wie sie auch bei den pseudoatomaren Modellen zu finden sind, jedoch gibt es erhebliche Unterschiede in einigen Sequenz- und Strukturbereichen der jeweiligen Untereinheiten. Zusammengefasst könnten diese Unterschiede dafür verantwortlich sein, dass bei Crustaceen-Hämocyaninen die Domäne #1 in allen Zuständen etwas anders gekippt ist als beim Cheliceraten-Hämocyanin.

Die Kippung von Domäne #1 bei der reversiblen O₂-Bindung induziert die Kippbewegung des Untereinheiten-Dimers und dies wiederum führt zur beobachteten Konformationsänderung im 1x6-mer. Diese Änderung pflanzt sich bis zum 8x6-mer fort. Auf diese Weise führt die O₂-Bindung an eine der Untereinheiten zu einer Beeinflussung des betreffenden 1x6-mers und so fort. Dies passt sehr gut zum mathematischen Nesting Modell der allosterischen Interaktion beim Arthropoden-Hämocyanin (Decker et al., 1986, 1988, 2007; Decker & Sterner 1990).

3. Vergleichende Analyse der Interfaces zwischen den Hexameren

Die Kontaktstellen zwischen den Hexameren stabilisieren nicht nur das 8x6-mer, sondern ermöglichen auch die chemomechanische Weiterleitung von Konformationsänderungen. Tabelle D.5 zeigt die 12 verschiedenen, in dieser Arbeit diskutierten Interfaces. Elf davon wurden bereits von Martin et al. (2007) für das oxy-8x6-mer beschrieben.

Die Unterschiede in Anzahl und Ausprägung der Interfaces haben mit der zuvor beschriebenen unterschiedlichen Rotation der beiden Hexamere des 2x6-mers im oxygenierten und deoxygenierten Zustand zu tun (s. Abschnitt: D.1.1). Diese strukturelle Änderung hat direkte Auswirkungen auf die Anzahl, Position und mögliche Funktion der Interfaces im gesamten 8x6-mer.

Zur Identifizierung aller Interfaces wurden die berechneten 3D-Rekonstruktionen des oxy- und deoxy-8x6-mers auf ihren massekorrelierten Schwellenwert gesetzt. Dieser kann über das Molekulargewicht des Proteins und die mittlere Dichte von Proteinen ermittelt werden.

Kontakt im	Interface	Martin et al., 2007	oxy-8x6-mer	deoxy-8x6-mer
2x6mer	II-II	+	+	+
	II-IV	+	+	+
	V-VI	+	+	+
	IV-VI	+	+	+
	II-IV/VI	-	+	+
4x6mer	V-V	(+)	+	-
	V-VI	+	+	+
	VI-III B/IV/V	+	+	+
8x6mer	III A-III A	+	+	-
	III A-III B	(+)	(+)	+
	II-IV	(+)	+	+
	IV-IV	+	+	+

+ deutlich erkennbar

(+) schwach erkennbar

- nicht vorhanden

Tab. D.5: Vergleich der Interfaces innerhalb des 2x6-mer, 4x6-mer und 8x6-mers zwischen dem oxy-8x6-mer, dem deoxy-8x6-mer und den Ergebnissen von Martin et al., 2007. Beim 2x6-mer ist das II-IV/VI Interface neu und bei der 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers gut zu erkennen. Bei der 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers ist dieses Interface nur schwach ausgebildet. Das mögliche V-V Interface, das sich mittig zwischen den beiden 2x6-meren des 4x6-mers befindet, ist nur bei der 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers und der Referenz sichtbar, nachdem man den massekorrelierten Schwellenwert der 3D-Dichtekarte leicht anhebt. Neben dem V-V-Interface fehlt der 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers auch das IIIA-III A-Interface. Dafür ist das IIIA-III B-Interface im Vergleich zum oxy-8x6-mer und der Referenz viel stärker ausgeprägt.

3.1 Interfaces zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers

Das 2x6-mer besitzt zwischen den beiden Hexameren fünf unterschiedliche Interface-Typen (siehe Tab. D5) (Abb. D.17 A/B.). Diese werden im Folgenden nacheinander beschrieben.

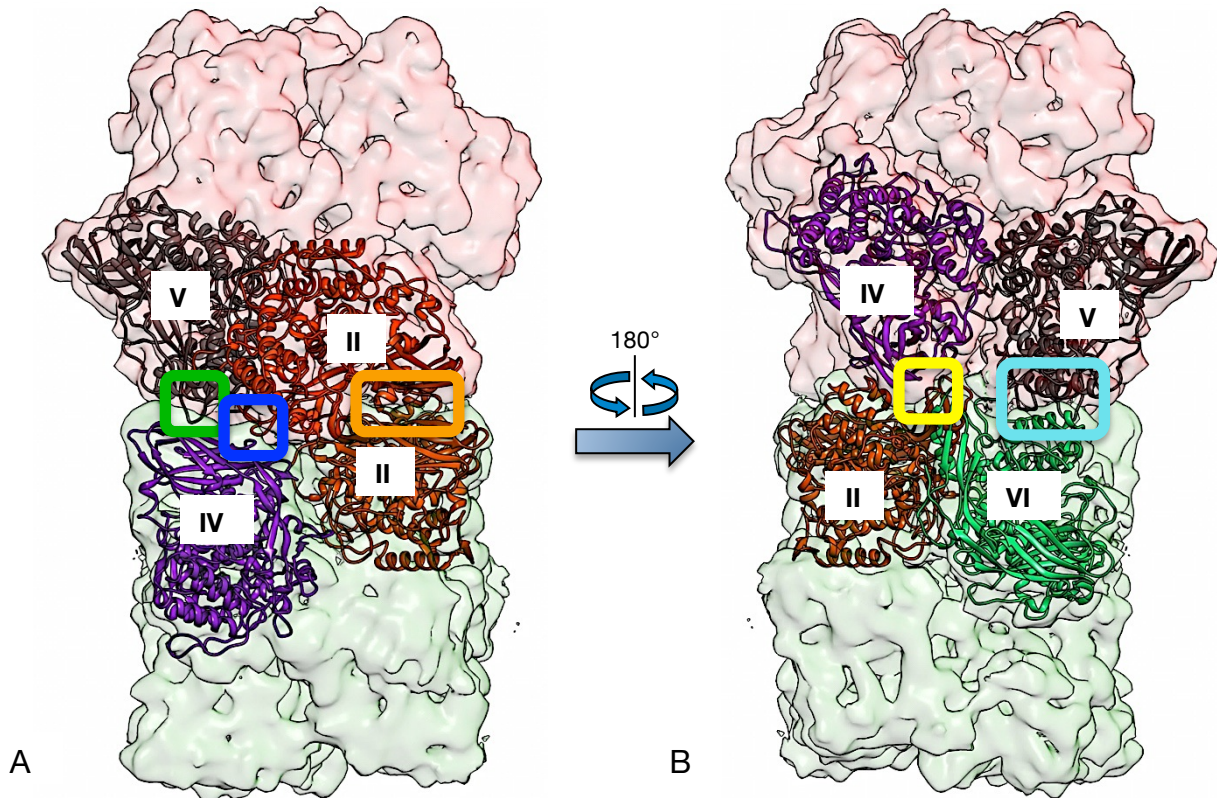


Abb. D.17: Positionen der fünf Interfaces und der beteiligten Untereinheitentypen beim 2x6-mer. **A:** Frontansicht des 2x6-mers mit den Positionen von Interface II-II (orange), II-IV (blau) und II-IV/VI (grün), das etwas zentraler im 2x6-mer liegt. **B:** Rückansicht des 2x6-mers mit den Positionen von Interface IV-VI (gelb) und V-VI (cyan)

Das II-II-Interface

Dieses Interface wird von den beiden benachbarten Untereinheiten des Typs II ausgebildet. Dabei treten die komplementär zueinander liegenden Domänen #3 beider Untereinheiten in direkten Kontakt. In der 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers lassen sich zwei Typen von Massebrücken identifizieren, die jeweils doppelt auftreten (also vier Brücken insgesamt). Das Interface selbst lässt sich als eine Art Kammer beschreiben, die im unteren Bereich von den Aminosäuren ⁴⁰⁷HTFMRE⁴¹² und ⁴³³YYHLDH⁴³⁸ der beiden Untereinheiten II abgeschlossen wird (Martin et al., 2007).

Im oberen Bereich der Kammer befinden sich die bereits erwähnten Brücken. Die erste Massebrücke wird sehr wahrscheinlich von den Aminosäuren ⁵¹²SH⁵¹³ und ⁵²⁷NEHKSEY⁵³³ des einen Hexamers sowie von den Aminosäuren ³⁹⁹HARVDN⁴⁰⁴ des

benachbarten Hexamers ausgebildet. Die zweite Massebrücke ist etwas breiter. Die Aminosäuren D506 und H503 des einen Hexamers könnten mit den Aminosäuren H399 und D403 des benachbarten Hexamers in Kontakt treten und so diese Brücke ausbilden. Ebenso liegt in direkter Nähe zu H503 das gegenüberliegende S442. Diese beiden Aminosäuren könnten ebenfalls miteinander interagieren und zum Aufbau dieser breiten Kontaktstelle beitragen (Abb. D.18 A).

In der 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers lassen sich im Bereich des Interfaces II-II insgesamt fünf Brückentypen identifizieren, von denen vier je zweimal auftreten (insgesamt also neun Brücken). Die zusätzlichen Massebrücken könnten an der etwas besseren Auflösung der deoxy-3D-Rekonstruktion und/oder an dem größeren Rotationswinkel zwischen den beiden Hexameren liegen.

Im Bereich der ersten Brücke sind E518, D519, H522 und gegenüberliegend H627 und E628 lokalisiert. Die Asparagin- bzw. Glutaminsäuren sind in der Lage, mit den beiden Histidinen Salzbrücken zu bilden. Eine Interaktion zwischen E528 und H627 ist weniger wahrscheinlich, da sie im pseudoatomaren Modell 12 Å voneinander entfernt sind. Die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers weist in diesem Bereich des Interfaces keine Massen auf.

Brücke 2 liegt im Bereich des Brückentyps 1, der im oxy-8x6-mer auftritt. Hierbei ragt R401 in die Brücke hinein und tritt eventuell mit S512 in Kontakt. Der Abstand zwischen den Seitenketten der beiden Aminosäuren beträgt ca. 3Å.

Die Brücken 3 und 4 liegen im Bereich des zuvor beschriebenen Brückentyps 2 des oxy-8x6-mers. Im deoxy-8x6-mer sind hier zwei Brücken klar definiert. Die Aminosäuren D506 und H399 liegen im Bereich von Brücke 3 und könnten für diese verantwortlich sein. Brücke 4 wird möglicherweise von den sich gegenüberliegenden Aminosäuren H503 und S442 ausgebildet.

Die Brücke 5 ist wie Brücke 1 nur beim deoxy-8x6mer zu erkennen. In der Nähe liegen die Aminosäuren K497 und ⁴⁵¹SASDK⁴⁵⁵, die sich auf dem Loop zwischen den β-Faltblättern 4 und 5 befinden. Ein möglicher Kontakt kann entstehen, wenn das Ende von β-Faltblatt 4 und der Anfang des Loops nach oben klappen (Abb. D.18 B roter Pfeil). So kämen K497 und S451 in unmittelbare Nähe und wären in der Lage, in Kontakt zu treten.

Das Interface II-II ist sehr komplex aufgebaut. Die früher beschriebene "Kammer" (Martin et al., 2007) scheint im oxygenierten Zustand geschlossen zu sein, während sie im deoxygenierten Zustand offen ist. Ebenfalls auffällig ist die hohe Anzahl an Histidinen in der Nähe der Brücken. Aufgrund des speziellen Aufbaus, der hohen Anzahl von Histidinen und der zahlreichen Brücken, könnte dieses Interface eine wichtige Rolle bei der Allosterie des 8x6-mers spielen.

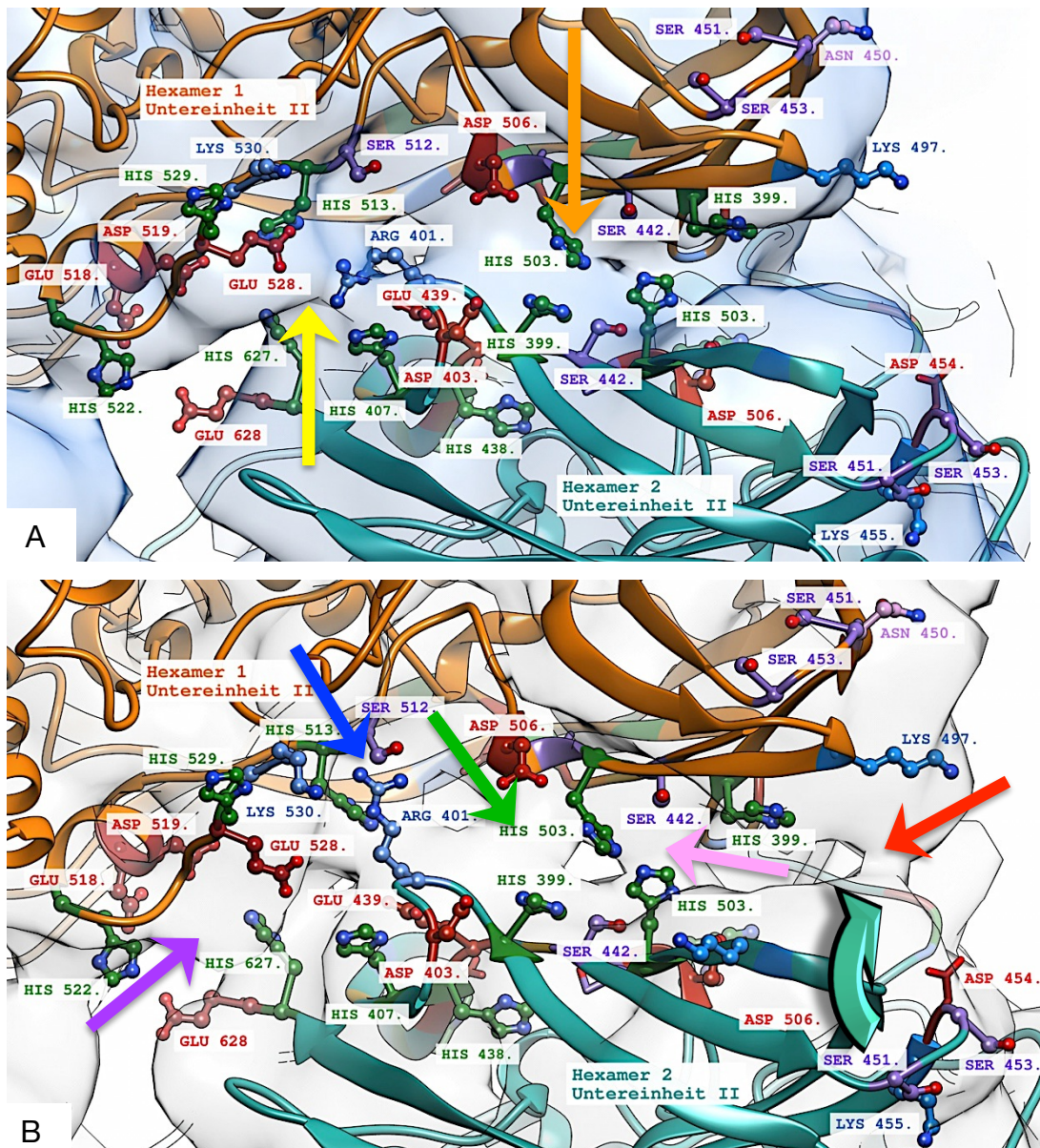


Abb. D.18: Seitliche Ansicht auf Interface II-II, das sich zwischen den zwei Hexameren des 2x6-mers ausbildet. **A:** Das Interface II-II im oxy-2x6-mer. Im Bereich von Brückentyp 1 (gelber Pfeil) liegen die Aminosäuren ⁵¹²SH⁵¹³ und ⁵²⁸EHK⁵³⁰ von Hexamer 1 den Aminosäuren ³⁹⁹HARVD⁴⁰³ von Hexamer 2 gegenüber. Eine Interaktion zwischen den basischen und sauren Aminosäuren ist hier möglich. Ebenfalls können die benachbarten Histidine Einfluss auf die Brücke nehmen. Die zweite Brücke (orangefarbener Pfeil) liegt gleich zweimal direkt nebeneinander. Die Brücke setzt sich wahrscheinlich zum größten Teil aus der Verbindung der Aminosäuren D506 und H503 von Hexamer 1 mit den benachbarten Aminosäuren H399 und S442 zusammen. Hier liegen allerdings noch weitere Aminosäuren in unmittelbarer Nähe, die Einfluss auf die Bildung der Brücke haben können. **B:** Das Interface II-II im deoxy-2x6-mer. Brücke 1 (lilafarbener Pfeil) wird möglicherweise von den Aminosäuren E518, D519 und H522 von Hexamer 1 und den gegenüberliegenden Aminosäuren H627 und E628 gebildet. Bei Brücke 2 (blauer Pfeil) ragt R401 von Hexamer 2 in Richtung S512 von Hexamer 1. Eine mögliche Bindung zwischen D506 und H399 kann für Brücke 3 (grauer Pfeil) verantwortlich sein. Brücke 4 (rosafarbener Pfeil) entsteht wahrscheinlich durch den Kontakt zwischen S442 und H503. Brücke 5 (roter Pfeil) kann durch eine mögliche Interaktion zwischen K497 von Hexamer 1 und den Aminosäuren ⁴⁵¹SASDK⁴⁵⁵ von Hexamer 2 entstehen. Hierbei müssten sich jedoch das Ende von β -Faltblatt 4 und der vordere Bereich des nachfolgenden Loops, auf dem sich ⁴⁵¹SAS⁴⁵³ befinden, nach oben klappen (türkiser Pfeil). Eine Bindung zwischen S451 und K497 wäre so möglich.

Das II-IV-Interface

Sowohl beim oxy-8x6-mer als auch beim deoxy-8x6-mer besteht das Interface II-IV aus zwei Massebrücken. Diese werden zwischen Domäne #1 der Untereinheit II sowie Domäne #3 der Untereinheit IV ausgebildet. Massebrücke 1 entsteht wahrscheinlich durch hydrostatische Wechselwirkungen zwischen D4 der Untereinheit II und K398 der Untereinheit IV (Martin et al. 2007) (Abb. D.19 A/B). Die zweite Massebrücke unterscheidet sich von der bisher beschriebenen Massebrücke 2 beim Interface II-IV. Die Aminosäuren D519 und H522 von Untereinheit II und die Aminosäuren E544 und K545 von Untereinheit IV befinden sich in unmittelbarer Nähe (Abb. D.19 A/B). Hierbei ist eine Interaktion zwischen H522 und E544 möglich. Ebenso könnten D519 und K545 in Wirklichkeit näher beieinander liegen und ebenfalls zur Ausbildung der Massebrücke beitragen. Auffällig ist, dass beide Massebrücken von mehreren Histidinen flankiert werden. Das lässt die Vermutung zu, dass diese Einfluss auf die allosterischen Interaktionen zwischen den Hexameren nehmen könnten.

Im direkten Vergleich sind die Unterschiede zwischen den beiden Zuständen (oxy-deoxy) minimal.

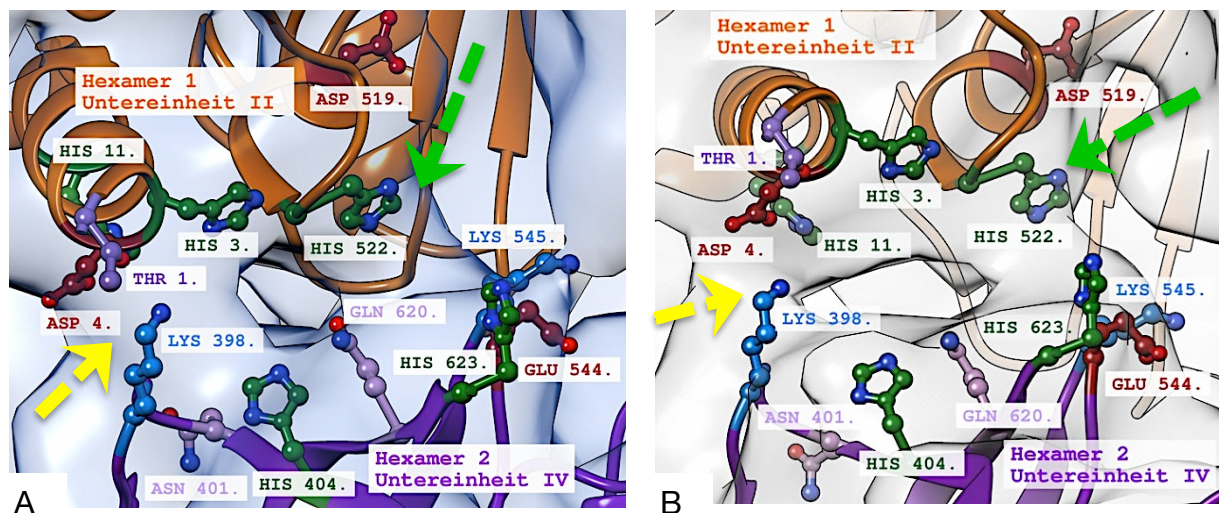


Abb. D.19: Ansicht auf das II-IV-Interface. **A:** Das II-IV-Interface im oxy-2x6-mer. Brücke 1 (gelber Pfeil) wird möglicherweise durch eine ionische Bindung zwischen T1/D4 und K398 gebildet (Martin et al., 2007). An der Entstehung von Brücke 2 (grüner Pfeil) sind vermutlich H522 und E544 bzw. D519 und K545 beteiligt. **B:** Das II-IV-Interface im deoxy-2x6-mer. Die beiden Brücken sind vom Masseanteil etwas schmaler als die Brücken im oxy-2x6-mer. Die Positionen der Aminosäuren sind jedoch weitestgehend gleich. Man beachte die Histidine, die beide Brücken flankieren.

Das IV-V und das IV-VI-Interface

Die beiden Interfaces bestehen aus jeweils einer einzelnen Massebrücke. Hierbei ist anzumerken, dass beide Massebrücken sich sehr schnell auflösen, wenn der massenkorrelierte Schwellenwert der 3D-Rekonstruktion nur geringfügig verkleinert

wird. Dies tritt sowohl beim oxy-2x6-mer, als auch beim deoxy-2x6-mer auf. Im direkten Vergleich ist die Massebrücke des IV-V-Interface schwächer ausgebildet, als die Massebrücke des IV-VI-Interface. Die beteiligten Aminosäuren von Untereinheit IV sind bei beiden Interfaces $^{391}\text{SH}^{392}$. Zudem könnten die Aminosäuren $^{445}\text{HS}^{446}$ Einfluss auf die Ausbildung der Brücke nehmen (Martin et al., 2007). Die Aminosäuren $^{139}\text{HKEE}^{142}$ der Untereinheit VI bzw. $^{140}\text{DKEK}^{143}$ von Untereinheit V befinden sich in einem Loop, der zwischen α -Helix 7 und β -Faltblatt 1 von Domäne #1 liegt. Sie wären in der Lage, mit $^{391}\text{SH}^{392}$ von Untereinheit IV in Kontakt zu treten (Abb. D.20 A/B). Dies wäre jedoch nur möglich, wenn der Loop in Richtung der molekularen Brücke gekippt wäre, so dass die Aminosäuren überhaupt in Kontakt treten könnten. Es ist davon auszugehen, dass sich der Loop im pseudoatomaren Modell an der falschen Position befindet. Aufgrund der zu niedrigen Auflösung in diesem Strukturbereich war eine verbesserte Positionierung des Loops im Zuge des flexiblen Einpassens des pseudoatomaren Modells in die 3D-Rekonstruktion des oxy- bzw. deoxy-8x6-mers nicht möglich.

Vergleicht man die Position der Massebrücke im oxy- und deoxy-2x6-mer, fällt auf, dass sich der Kontaktpunkt zu Untereinheit IV im oxy-2x6-mer etwas weiter vorne befindet, und in die Richtung der Aminosäuren $^{445}\text{HS}^{446}$ zeigt (Abb. D.20 A). Im deoxy-2x6-mer befindet sich der Kontaktpunkt zur Untereinheit IV etwas zentraler und weist in Richtung der Aminosäuren $^{391}\text{SH}^{392}$ (Abb. D.20 B). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Brücke im oxy-2x6-mer über die Aminosäuren $^{445}\text{HS}^{446}$ von Untereinheit IV aufgebaut wird und im deoxy-2x6-mer über die Aminosäuren $^{391}\text{SH}^{392}$.

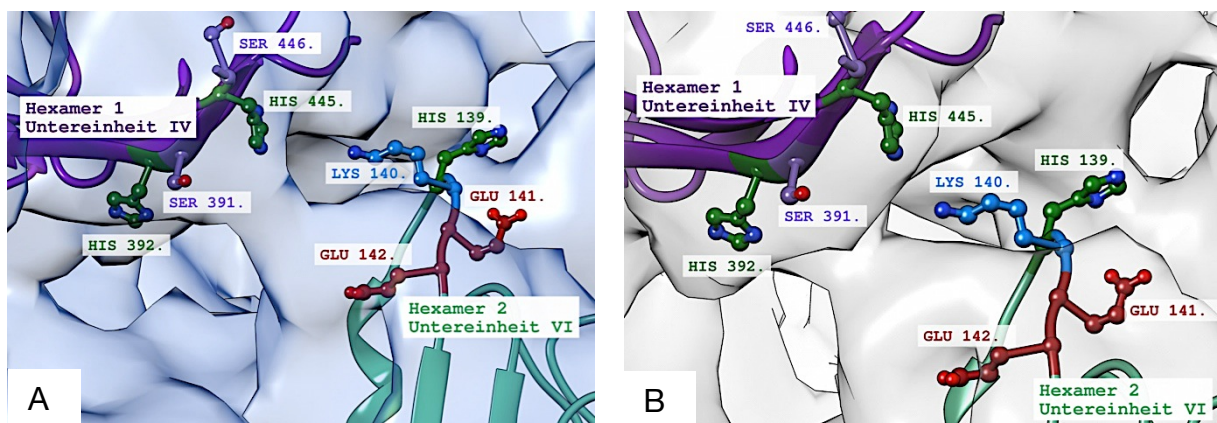


Abb. D.20: Das IV-VI-Interface. **A:** Das IV-VI-Interface im oxy-2x6-mer. Der Kontaktpunkt der Brücke zu Untereinheit IV liegt im äußeren Bereich und weist in Richtung $^{445}\text{HS}^{446}$. Die Aminosäuren $^{139}\text{HKEE}^{142}$ liegen auf dem Loop zwischen α -Helix 7 und β -Faltblatt 1 von Domäne #1. Damit K140 mit S391 bzw. S446 in Kontakt treten kann, muss der Loop in Richtung der Brücke kippen (schwarzer Pfeil). **B:** Das IV-VI-Interface im deoxy-2x6-mer. Der Kontaktpunkt der Brücke zu Untereinheit IV befindet sich weiter im Inneren von Hexamer 1 und zeigt in Richtung $^{391}\text{SH}^{392}$. Auch hier müsste der Loop in Richtung Brücke kippen, damit eine Interaktion zwischen K140 und vermutlich S391 überhaupt möglich wäre.

Das V-VI-Interface

Dieses Interface im 2x6-mer ist ähnlich wie das II-II-Interface sehr komplex aufgebaut. Es besteht aus zwei Bereichen. Der erste befindet sich im äußeren Abschnitt des 2x6-mers. Hier ist zu beachten, dass in der bisher bekannten 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6mers (Martin et al., 2007) für Bereich 1 zwei Massebrücken beschrieben wurden. Die in dieser Arbeit neu berechnete 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers weist hier nur eine Brücke auf. Im Vergleich dazu lässt die in dieser Arbeit berechnete 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers in Bereich 1 die beiden bereits bekannten Massebrücken erkennen.

Der zweite Bereich des V-VI-Interfaces besteht aus zwei Massebrücken und ist im Inneren des 2x6-mers lokalisiert.

Für die Ausbildung der Massebrücken in Bereich 1 spielen offenbar die α -Helices 1 und 3 der beiden Untereinheiten, welche fast parallel zueinander liegen, eine wichtige Rolle (Martin et al., 2007). Die erste Brücke, die sowohl im oxy- als auch im deoxy-2x6-mer vorhanden ist, wird sehr wahrscheinlich von den Aminosäuren D78/H81 (Helix α 3) der Untereinheit V und D77/H80 (Helix α 3) von Untereinheit VI gebildet (Abb. D.21 A/B). Der Abstand der Carboxylgruppen der Asparaginsäuren D78/D77 und der Aminogruppen der Histidine H80/H81 beträgt je nach Orientierung weniger als 2 Å.

Die zweite Massenbrücke ist nur im deoxy-2x6-mer zu beobachten (Abb. D.21 B). Die Aminosäuren ⁸KQLR¹¹ (Helix α 1) und ⁷³FEEF⁷⁶ (Helix α 3) von Untereinheit V sowie ⁷KQLR¹⁰ (Helix α 1) und ⁷²FEEF⁷⁵ (Helix α 3) von Untereinheit VI befinden sich nahe dieser Massenbrücke. Das Arginin R11 (Helix α 1) von Untereinheit V kann mit einer der beiden Glutaminsäuren E73/E74 (Helix α 3) von Untereinheit VI eine ionische Bindung eingehen. Dies gilt auch für das Arginin R10 (Helix α 1) von Untereinheit VI, das mit einer der beiden Glutaminsäuren E74/E75 (Helix α 3) von Untereinheit V eine Ionenbindung eingehen kann (Abb. D.21 B). Auffällig ist, dass diese Massenbrücke von je zwei Phenylalaninen F73/F76 (Helix α 3) der Untereinheit V sowie F72/F75 (Helix α 3) von Untereinheit VI flankiert wird.

Beim oxy-2x6-mer zeigte sich auch bei einer leichten Erhöhung des massekorrelierten Schwellenwerts in diesem Bereich keine zweite Massebrücke. Die Positionen der an dem Interface beteiligten Aminosäuren des pseudoatomaren Modells zeigen in diesem Bereich der 3D-Rekonstruktion, dass die flexible Einpassung der Struktur nicht optimal verlaufen ist. Die Aminosäuren ragen teilweise zu stark aus der berechneten Masse der 3D-Rekonstruktion heraus und müssten aufgrund der räumlichen Nähe in Kontakt treten und eine Massebrücke ausbilden. Diese ist jedoch in der 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers nicht vorhanden.

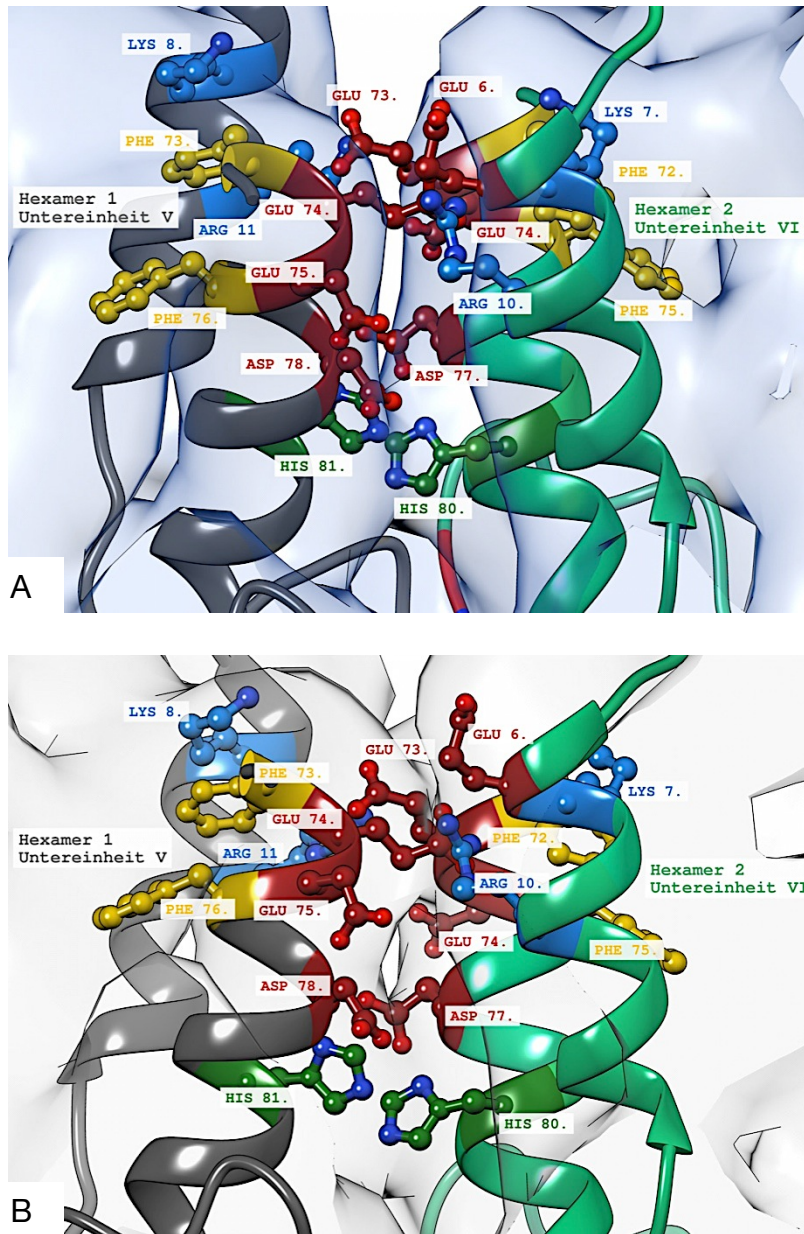


Abb. D.21: Seitenansicht auf Bereich 1 des V-VI-Interfaces. **A:** Bereich 1 des V-VI-Interfaces im oxy-2x6-mer. Es ist nur eine Massebrücke zwischen den Untereinheiten V und VI zu erkennen. Diese wird, wie auch beim deoxy-2x6mer (**B**) wahrscheinlich von den Aminosäuren D78/H81 der Untereinheit V und den gegenüberliegenden Aminosäuren D77/H80 gebildet. Im oberen Teil von Bereich 1 ist keine Massebrücke erkennbar. Gut zu erkennen sind die aus der Masse der 3D-Rekonstruktion herausragenden Aminosäuren. Diese weisen teilweise eine zu geringe Distanz zueinander auf, was auf ein nicht optimales flexibles Einpassen der pseudoatomaren Struktur in die 3D-Rekonstruktion des 8x6-mers hinweist. **B:** Bereich 1 des V-VI-Interfaces im deoxy-2x6-mer. Eine zweite Massebrücke ist klar zu erkennen. Hier könnten die Aminosäuren ⁸KQLR¹¹ (Helix α 1) und ⁷³FEEF⁷⁶ (Helix α 3) von Untereinheit V und ⁷KQLR¹⁰ (Helix α 1) und ⁷²FEEF⁷⁵ (Helix α 3) von Untereinheit VI untereinander in Kontakt treten und so die Massebrücke zwischen den beiden Hexameren ausbilden.

Der zweite Bereich des V-VI-Interfaces liegt etwas weiter im Inneren des 2x6-mers und ist sowohl im oxy-, als auch im deoxy-2x6-mer sehr ähnlich aufgebaut. Die zwei langen Loops, die sich zwischen Helix $\alpha 1$ und Helix $\alpha 2$ von Untereinheit V und VI befinden, liegen sich antiparallel gegenüber und bilden zwei identische Brücken aus (Martin et al., 2007). Bei diesen beiden Brücken treten die Aminosäuren $^{33}\text{RDH}^{35}$ von Untereinheit V in direkten Kontakt mit den Aminosäuren $^{23}\text{KEKF}^{26}$ von Untereinheit VI (bzw. $^{31}\text{HRD}^{33}$ von Untereinheit VI mit den Aminosäuren $^{24}\text{KEKF}^{27}$ von Untereinheit V). Die beiden Massebrücken werden auch hier von je einem Phenylalanin F26/F27 sowie von je einem Histidin H31/H35 flankiert. Hierbei sollte angemerkt werden, dass auch im zweiten Bereich die räumliche Nähe der beschriebenen Aminosäuren der pseudoatomaren Modelle von Untereinheit V und VI, sowohl im oxy-2x6-mer als auch im deoxy-2x6-mer, teilweise zu gering ist. Dies hängt mit der Flexibilität des Loops und der zu geringen Auflösung der 3D-Rekonstruktion in diesem Strukturbereich zusammen. Ein sehr genaues flexibles Einpassen der pseudoatomaren Struktur in diesen Bereich wäre nur möglich, wenn die Auflösung der 3D-Rekonstruktion höher wäre.

Der hier gezeigte, sehr komplexe Aufbau des V-VI-Interfaces bestärkt die Überlegungen von Martin et al. (2007), dass dieses Interface am Transfer von allosterischen Signalen zwischen den beiden Hexameren beteiligt ist.

Das II-IV/VI-Interface

Das II-IV/VI-Interface ist zum Teil neu und konnte, sowohl im oxy-2x6-mer als auch im deoxy-2x6-mer, identifiziert werden. Es setzt sich aus zwei Massebrücken zusammen. Die erste Brücke befindet sich zwischen Untereinheit II und Untereinheit IV und wurde als zweite Kontaktstelle des II-IV-Interfaces beschrieben (Martin et al., 2007). Die zweite Brücke zwischen Untereinheit II und Untereinheit VI liegt direkt daneben (Abb. D.22 A/B). Die Aminosäuren $^{133}\text{HVRPEFDES}^{141}$ der Untereinheit II liegen zu beiden Brücken in direkter Nähe. Dabei befinden sich die Aminosäuren $^{139}\text{DES}^{141}$ in der Nähe zur II-IV-Brücke und könnten mit den Aminosäuren $^{602}\text{RTPSQ}^{606}$ von Untereinheit IV in Kontakt treten. R468 der Untereinheit IV ragt ebenfalls in die Massebrücke hinein und könnte mit E140 von Untereinheit II eine Salzbrücke ausbilden.

Beim deoxy-2x6-mer fällt auf, dass in der Nähe von R602 (Untereinheit IV) eine Massebrücke zwischen Untereinheit IV und Untereinheit VI existiert. Diese könnte aufgrund einer Bindung zwischen diesem Arginin und dem Glutamin Q37 von Untereinheit VI entstehen (Abb. D.22 B).

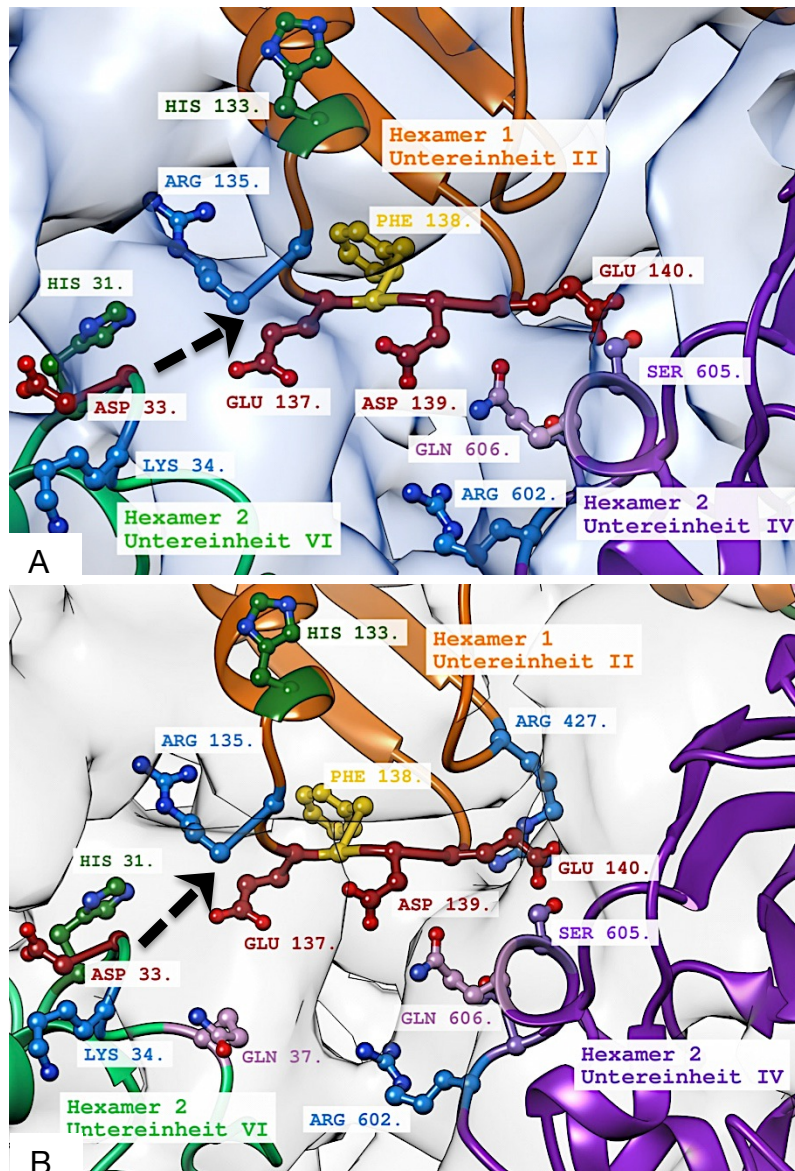


Abb. D.22: Ansicht des II-IV/VI-Interfaces im **(A)** oxy-2x6-mer und **(B)** deoxy-2x6-mer. **A:** Die Massebrücke zwischen Untereinheit II und VI könnte durch zwei Salzbrücken zwischen R135 \leftrightarrow D33 und E137 \leftrightarrow K34 gebildet werden. Dafür müsste jedoch der Loop, in dem sich $^{33}DK^{34}$ befinden, in Richtung II-VI-Brücke kippen (schwarzer Pfeil). Aufgrund der Flexibilität des Loops ist eine genauere Beschreibung dieser Brücke nicht möglich. In der Nähe der Massebrücke II-IV liegen die Aminosäuren $^{139}DE^{140}$ von Untereinheit II und R602 sowie $^{605}SQ^{606}$. R602 könnte eine Salzbrücke mit D139 oder E140 bilden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich Kationen zwischen die polaren Aminosäuren anlagern, und so die beiden Untereinheiten miteinander verbinden. **B:** Im Bereich von R602 lässt sich im deoxy-2x6-mer eine zusätzliche Massebrücke erkennen, die zwischen Untereinheit IV und VI liegt. Diese könnte durch eine Wasserstoffbrücke zwischen R602 und Q37

Die Aminosäuren ¹³³HVRPEF¹³⁸ von Untereinheit II scheinen eher an der Massebrücke zur Untereinheit VI beteiligt zu sein. Die dortigen Aminosäuren ³¹HRDPKLQ³⁷ befinden sich in einem flexiblen Loop. Durch ein Kippen des Loops in Richtung der Brücke kämen die Aminosäuren D33 und K35 in die Region der II-VI-Brücke (Abb. D.22 A/B). Dort könnten sie mit den Aminosäuren R135 und E137 zwei Salzbrücken zwischen den Hexameren ausbilden. Eine genauere Aussage zu dieser Brücke ist schwierig, da der Loop zwischen Helix α 1 und Helix α 2 von Untereinheit IV 37 Aminosäuren umfasst und sehr flexibel sein dürfte.

3.2 Interfaces zwischen den beiden 2x6-meren des 4x6-mers

In der 3D-Rekonstruktion sind innerhalb des 4x6-mers beim massekorrelierten Schwellenwert zwischen den beiden 2x6-meren drei Interface-Typen zu erkennen: zwei äquivalente V-VI-Interfaces mit drei Massebrücken (bzw. vier Massebrücken im deoxy-4x6-mer) auf der Flopseite des 4x6-mers, zwei gleiche VI-III B/IV/V-Interfaces mit drei Massebrücken auf der Flip-Seite des Moleküls und zwei V-V-Interfaces mit einer Massebrücke, die nur im oxy-4x6-mer auftreten. Das deoxy-4x6-mer zeigt keine Verbindung zwischen den beiden Untereinheiten des Typs V. Alle drei Interfaces wurden bereits beschrieben (Martin et al., 2007). Aufgrund der besseren Auflösung der aktuellen 3D-Rekonstruktionen sind bei jedem der Interfaces einige neue Details zu sehen. Abbildung D.23 A/B zeigt die Positionen der Untereinheiten, die an den jeweiligen Interfaces beteiligt sind.

Die einzelnen Interfaces werden im Folgenden nacheinander beschrieben und verglichen. Für das VI-III B/IV/V-Interface wurde zusätzlich eine MD-Simulation durchgeführt, um mögliche Kontaktstellen und Interaktionen zwischen den Untereinheiten zu identifizieren.

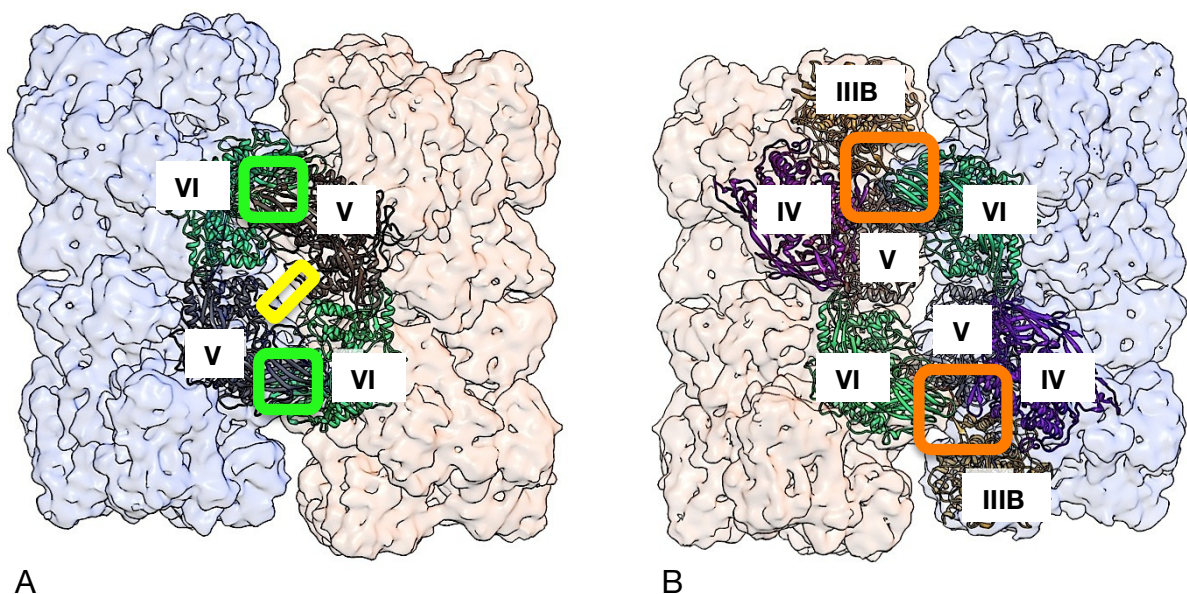


Abb. D.23: Positionen der drei Interfaces und den beteiligten Untereinheitentypen im 4x6-mer. **A:** Ansicht auf die Flopseite des 4x6-mers mit den Interfaces V-VI (grünes Viereck) und V-V (gelbes Rechteck). Das V-V-Interface tritt nur im oxy-4x6-mer auf. **B:** Ansicht auf die Flipseite des 4x6-mers mit dem Interface VI-III B/IV/V (orange farbenes Viereck).

Das V-VI-Interface

Strukturell gibt es beim V-VI-Interface zwischen dem oxy- und deoxy-4x6-mer einige Unterschiede. In direkter Nähe zu Brücke 1 liegt ein Loop, der sich zwischen β -Faltblatt 2 und 3 von Untereinheit VI befindet. In diesem liegen die Aminosäuren ²⁸⁸DENGSH²⁹³. Diese sind in der Lage mit den Aminosäuren ⁴⁵²HSN⁴⁵⁴, die in dem benachbarten Loop zwischen β -Faltblatt 7 und 8 von Untereinheit V liegen, in Kontakt zu treten, und so diese Brücke zu bilden. Mögliche Interaktionspartner könnten bei dieser Brücke sowohl S453 von Untereinheit V und N290 von Untereinheit VI sein als auch S453 und H293 von Untereinheit VI (Abb. D.24 A/B). Die Lage des Loops könnte allerdings auch ein wenig verschoben sein, so dass eine Salzbrücke zwischen R455 (Untereinheit V) mit einer der beiden sauren Aminosäuren D288/E289 (Untereinheit VI) möglich scheint. Im oxy-4x6-mer erscheint die Massebrücke 1 etwas voluminöser als im deoxy-4x6-mer (Abb. D.24 C/D).

Die zweite Massebrücke befindet sich direkt unter Massebrücke 1. In diesem Bereich könnten die Aminosäuren ³¹³YE³¹⁴ und ¹⁸⁶RPE¹⁸⁸ von Untereinheit VI mit den gegenüberliegenden Aminosäuren ⁴⁵⁵RTK⁴⁵⁷ von Untereinheit V in Kontakt treten. Sowohl Y313 als auch E314 (Untereinheit VI) sind in der Lage, mit R455 (Untereinheit V) eine Bindung einzugehen. Ebenso könnten R186 mit T456 sowie E188 mit K457 bzw. H496 interagieren und so Anteil an der Ausbildung von Brücke 2 haben (Abb. D.24 A/B). Die zweite Massebrücke des V-VI-Interfaces ist sowohl im oxy- als auch im deoxy-4x6-mer sehr voluminös und komplex aufgebaut. Es ist gut möglich, dass dies eine feste Verbindungsstelle der beiden 2x6-mer ist, die eine Grundstabilität in das 4x6-mer des 8x6-mers bringt (Abb. D.24 C/D).

Unterhalb von Massebrücke 2 befindet sich Massebrücke 3, die sich zwischen oxy- und deoxy-4x6-mer stark unterscheidet. Im oxy-4x6-mer ist sie ziemlich breit und sehr gut zu erkennen. Die sich in der Nähe befindlichen Aminosäuren ¹⁹¹GKVE¹⁹⁵ (im Loop zwischen Helix α 12 und α 13) von Untereinheit VI könnten mit den Aminosäuren ⁵⁶⁷HD⁵⁶⁸ in Verbindung treten (Abb. D.24 A). Im deoxy-4x6-mer erscheint Massebrücke 3 viel schmaler und etwas weiter im Inneren des 4x6-mers zu liegen. Zusätzlich lässt sich eine vierte Massebrücke zwischen den Untereinheiten V und VI entdecken, die im oxy-4x6-mer nicht erkennbar ist (Abb. D.24 C/D). Vermutlich wird die schmalere Massebrücke 3 im deoxy-4x6-mer nur von E195 und H567 ausgebildet. Die Massebrücke 4 bildet sich aufgrund der zusätzlichen Rotation, die zwischen den beiden Hexameren im deoxy-Zustand auftritt. Dadurch verschieben sich der Loop zwischen Helix α 12 und α 13 von Untereinheit VI und der Loop zwischen Helix α 24 und α 25 von Untereinheit V zueinander und treten über eine schmale Massebrücke in Kontakt (Abb. D.24 D). Vermutlich wird diese Massebrücke von K192 (Untereinheit VI) und D572 (Untereinheit V) ausgebildet (Abb. D.24 B).

Sehr interessant ist die Beobachtung, dass sich um Brücke 1, 3 und 4 mehrere Histidine befinden (H285, H293, H452, H567, H573, H101), die möglicherweise Einfluss auf die Bildung der drei Brücken und somit vermutlich Auswirkungen auf die Weiterleitung allosterischer Signale zwischen den Hexameren haben (Abb. D.24 A/B).

Das V-V-Interface

Im Zentrum der Flop-Seite des oxy-4x6-mers erkennt man eine schmale Massebrücke zwischen den beiden 2x6-meren. Sie wird von den beiden Untereinheiten des Typs V ausgebildet und wurde bereits beschrieben (Martin et al., 2007). Im oxy-8x6-mer lässt sich nach dem flexiblen Einpassen der pseudoatomaren Modelle eine alternative Konstellation der Aminosäuren erkennen, die für die Bildung der Brücke verantwortlich sein könnte (Abb. D.25 A). Die N-terminalen Bereiche beider Untereinheiten mit den Aminosäuren ²VLSV⁵ liegen auf den ersten Blick sehr nahe beieinander. Allerdings befinden sich beide nicht im Massebereich der Brücke, sondern etwas weiter darunter (Abb. D.25 A).

In der Nähe des Massebereiches der Brücke liegt allerdings ein Loop, der sich zwischen Helix α 22 und β -Faltblatt 11 befindet. Da dieser Loop sehr flexibel ist, konnte er wahrscheinlich nicht richtig modelliert bzw. beim flexiblen Einpassen nicht in die richtige Position innerhalb der 7,9 Å-oxy-Struktur gelegt werden. Es ist jedoch denkbar, dass sich der Loopabschnitt, in dem sich die Aminosäuren ⁵²⁹NEH⁵³¹ befinden, in Richtung Brücke verlagert (Abb. D.25 A). Die sich so gegenüberliegenden Aminosäuren E530 und H531 könnten dann untereinander Wasserstoffbrücken ausbilden und so für das V-V-Interface verantwortlich sein.

Im deoxy-4x6-mer ist das V-V-Interface nicht vorhanden (Abb. D.25 B). Dies lässt sich durch die zusätzliche Rotation der Hexamere erklären. Beide Hexamere im deoxy-4x6-mer, in denen sich Untereinheit V befindet, drehen sich um knapp 8° voneinander weg. Somit erhöht sich der Abstand zwischen den beiden Untereinheiten um ca. 6-10 Å, so dass es für die oben beschriebenen Aminosäuren keine Möglichkeit mehr gibt, miteinander in Kontakt zu treten.

Man muss bei diesem Interface beachten, dass der Loop sehr flexibel ist und so eine Aussage zu den Positionen der Aminosäure erschwert. Ebenso sollte erwähnt werden, dass die Positionen der Untereinheit V und VI im Hexamer austauschbar sind. Bisher ist nicht bekannt, welche der beiden Positionen von der Sequenz von Untereinheit VI eingenommen wird.

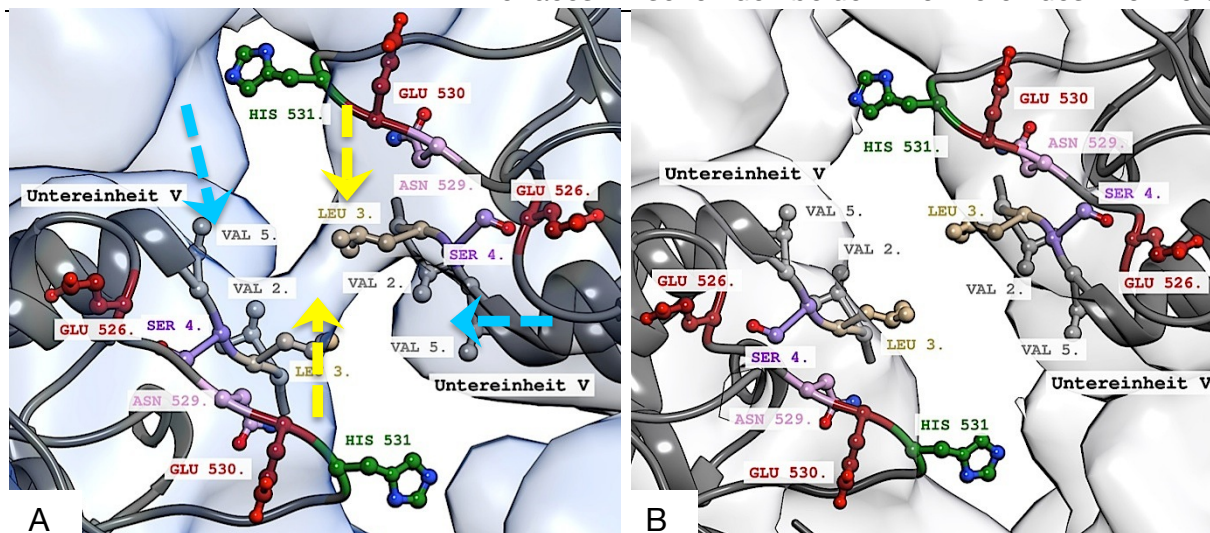


Abb. D.25: Die Position des V-V-Interfaces im **(A)** oxy-4x6-mer und **(B)** deoxy-4x6-mer. **A:** Die Aminosäuren ²VLSV⁵ liegen nicht in der Nähe des Massebereichs der Brücke, sondern etwas weiter entfernt (hellblaue Pfeile). Durch Verlagerung des Loopbereichs ⁵²⁹NEH⁵³¹ in Richtung Massebrücke (gelbe Pfeile) könnten E530 und H531 in Kontakt treten, indem sie Wasserstoffbrücken zueinander ausbilden und so das V-V-Interface bilden. **B:** Im deoxy-4x6-mer drehen sich die beiden beteiligten Hexamere um insgesamt 10° voneinander weg. Dadurch erhöht sich der Abstand zwischen den beiden Untereinheiten und das V-V-Interface löst sich auf.

Das VI-III B/IV/V-Interface

Das VI-III B/IV/V-Interface lässt sich in zwei Bereiche aufteilen. Im oberen Bereich interagiert Untereinheit VI mit den Untereinheiten III B und IV, während im unteren Bereich des Interfaces Untereinheit VI mit Untereinheit V in Kontakt tritt.

Beim Vergleich zwischen oxy- und deoxy-4x6-mer lassen sich an diesem Interface deutliche Unterschiede erkennen. Während beim oxy-4x6-mer zwischen der Untereinheit VI und Untereinheit III B drei Massebrücken zu erkennen sind, gibt es beim deoxy-4x6-mer zwischen diesen beiden Untereinheiten nur zwei Massebrücken (Abb. D.26 A/B). Beim deoxy-4x6-mer lassen sich jedoch zwei Massebrücken zwischen Untereinheit VI und IV identifizieren, die beim oxy-4x6-mer nicht auftreten (Abb. D.26 B).

Die Massebrücke zwischen Untereinheit VI und V im unteren Bereich des Interfaces ist sowohl beim oxy- als auch beim deoxy-4x6-mer zu erkennen (Abb. D.26 A/B).

Massebrücke 1 und 2 zwischen den Untereinheiten VI und III B sind im oxy- und deoxy-4x6-mer ähnlich aufgebaut. In der Nähe von Massebrücke 1 befinden sich H566 (Untereinheit VI) und E287 (Untereinheit III B), die zusammen eine Salzbrücke bilden können.

In Massebrücke 2 ragen die Histidine H288/H290 von Untereinheit III B weit hinein. Ihnen gegenüber befinden sich ³⁹⁸FPGI⁴⁰² und D563 von Untereinheit VI. Möglicherweise treten die Aminosäuren hier durch elektrostatische Wechselwirkungen miteinander in Kontakt (Abb. D.26 A/B).

Die Aminosäuren $^{451}\text{HTSKT}^{455}$ von Untereinheit VI könnten beim oxy-4x6-mer mit $^{290}\text{HEH}^{292}$ der Untereinheit IIIB in Verbindung treten und so Massebrücke 3 (oxy) ausbilden (Abb. D.26 A). Im deoxy-4x6-mer interagieren diese fünf Aminosäuren mit $^{286}\text{HGKE}^{289}$ von Untereinheit IV und bilden zwei Massebrücken aus, die beim oxy-4x6-mer nicht vorhanden sind.

Massebrücke 3 (deoxy) entsteht möglicherweise durch einen Kontakt zwischen T452/S453 (Untereinheit VI) zu K288 (Untereinheit IV). Massebrücke 4 (deoxy) könnte durch eine Salzbrücke zwischen K454 (Untereinheit VI) und E289 (Untereinheit IV) gebildet werden (Abb. D.26 B).

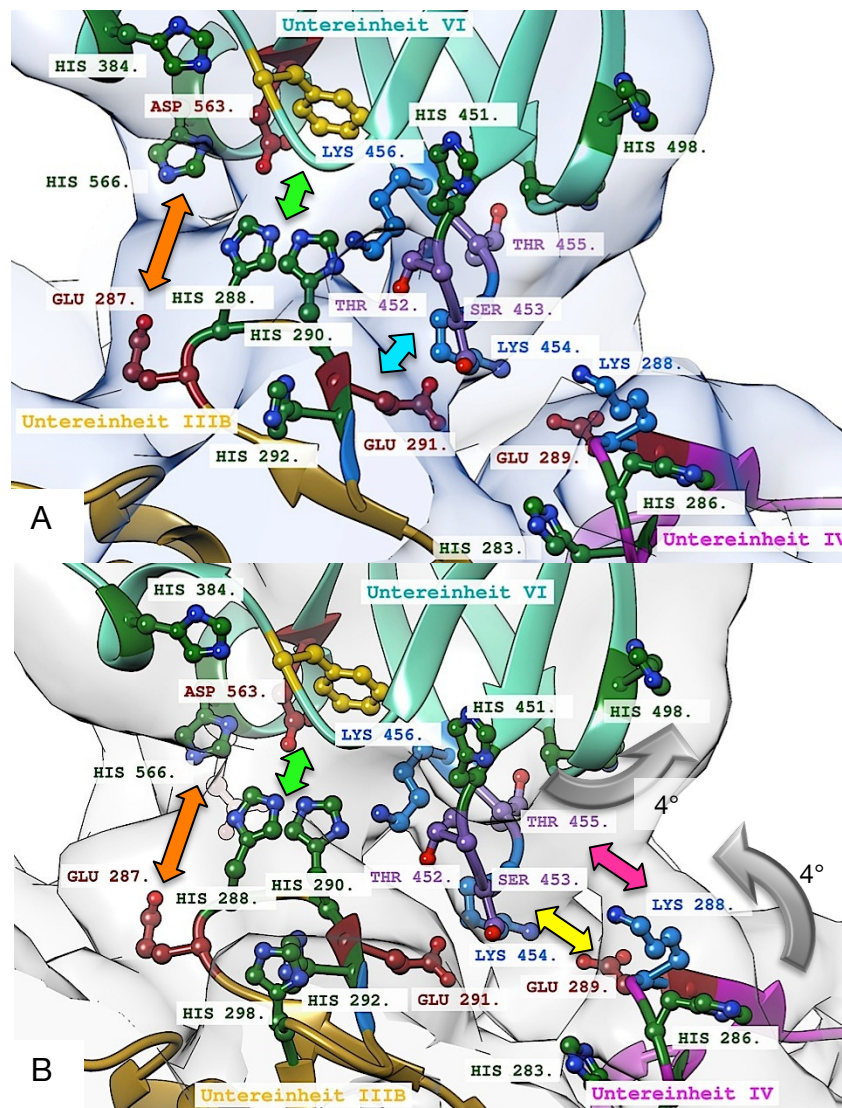


Abb. D.26: Der obere Bereich des VI-IIIB/IV/V-Interfaces im (A) oxy und (B) deoxy-Zustand. A/B: An Brücke 1 (orange) und Brücke 2 (grün) sind die Aminosäuren H566/F389/D563 von Untereinheit VI und $^{287}\text{EHGH}^{290}$ von Untereinheit IIIB beteiligt. A: Brücke 3 (oxy/hellblau) könnte eine Salzbrücke sein, die zwischen K454 (Untereinheit VI) und E291 (Untereinheit V) entsteht. B: Brücke 3 (deoxy/gelb) ist vermutlich eine Salzbrücke, die sich zwischen K454 (Untereinheit VI) und E289 (Untereinheit IV) ausbildet. Brücke 4 (deoxy/magenta) könnte durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen T452 oder S453 (Untereinheit VI) zu K288 (Untereinheit VI) entstehen. Durch die Rotation (graue Pfeile) im deoxy-Zustand nähern sich die Untereinheiten VI und IV an und bilden diese beiden Brücken aus.

Im unteren Bereich des Interfaces stehen die Untereinheiten VI und V in Kontakt. Im Bereich der Massebrücke liegen die Aminosäuren $^{298}\text{DETH}^{301}$ von Untereinheit V sowie $^{571}\text{DH}^{572}$ von Untereinheit VI. Die beiden letzten liegen dabei auf einem langen flexiblen Loop, der sich zwischen Helix α 24 und α 25 befindet (Abb. D.27 A/B). Aufgrund dieser Flexibilität ist es auch möglich, dass die benachbarten Aminosäuren $^{574}\text{KT}^{575}$ ebenfalls an der Ausbildung der Massebrücke beteiligt sein könnten. Auf eine genauere Analyse der Massebrücke zwischen Untereinheit VI und V wird daher verzichtet.

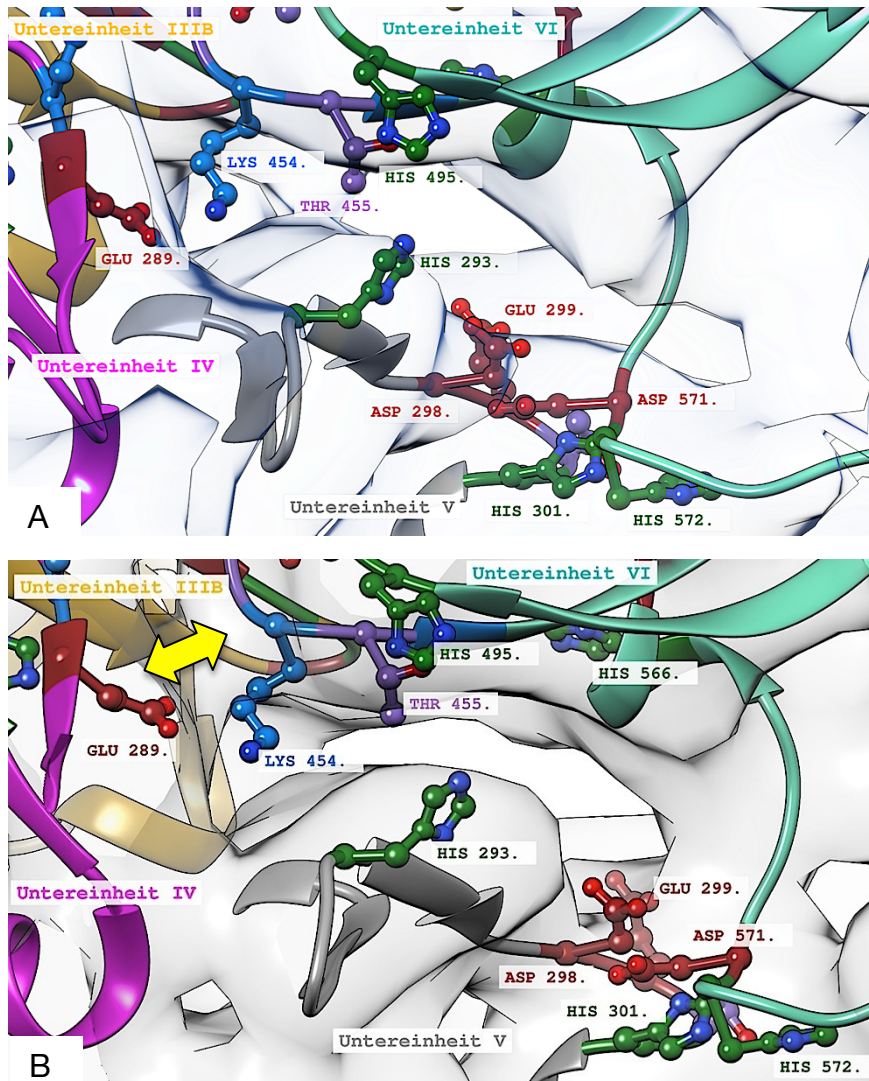


Abb. D.27: Unterer Bereich des VI-IIIB/IV/V-Interfaces im (A) oxy- und (B) deoxy-Zustand. **A/B:** Sowohl im oxy- als auch im deoxy-4x6-mer tritt die Brücke zwischen den Untereinheiten VI und V auf. Bei den sich in der Nähe der Brücke befindlichen Aminosäuren handelt es sich um $^{298}\text{DETH}^{301}$ von Untereinheit V sowie $^{571}\text{DH}^{572}$ von Untereinheit VI. Da der Loop, in dem sich $^{571}\text{DH}^{572}$ befinden sehr flexibel ist, könnten noch weitere Aminosäuren Einfluss auf die Bildung der Brücke haben. **B:** Oben links ist Brücke 3 (deoxy/gelber Pfeil) (siehe Abb. D.26 B) zu erkennen, die vermutlich eine Salzbrücke zwischen K454 und E289 darstellt.

MD-Simulation des VI-III B/IV/V-Interfaces im deoxy-4x6-mer.

Für dieses Interface wurde zusätzlich eine MD-Simulation durchgeführt, die einen Einblick in mögliche Kontaktstellen zwischen den beteiligten Untereinheiten bringen sollte.

Zwischen Untereinheit VI und III B konnten im deoxy-4x6-mer zwei Massebrücken identifiziert werden. Zu Massebrücke 1 konnte die MD-Simulation keine weiteren Aufschlüsse geben. Der vermutete Kontakt zwischen H566 (Untereinheit VI) und E287 (Untereinheit III B) konnte nicht bestätigt werden. Beide Aminosäuren kamen während der gesamten Simulationszeit in keine räumliche Nähe zueinander.

Die zweite Massebrücke, in deren Nähe sich die Aminosäuren ²⁸⁸HGH²⁹⁰ von Untereinheit III B sowie die Aminosäuren D563, H384 und F389 der Untereinheit VI befinden, zeigte während der MD-Simulation einige Kontaktmöglichkeiten auf. Die MD-Simulation ließ erkennen, dass das H288 (Untereinheit III B) nicht nur mit D563 (Untereinheit VI) eine Bindung eingehen könnte, sondern auch mit D386 (Untereinheit VI). Hierbei scheint das Histidin immer wieder zwischen den beiden Asparaginsäuren zu wechseln (Abb. D.28). Interessant ist ebenfalls, dass D563 (Untereinheit VI) häufig eine interne Brücke zu K456 (Untereinheit VI) ausbildet, wenn parallel dazu eine Bindung zwischen der Asparaginsäure D386 (Untereinheit VI) und H288 (Untereinheit III B) besteht.

Ebenso wurde überprüft, ob H288 (Untereinheit III B) mit F389 (Untereinheit VI) in Kontakt treten kann. Hier zeigte sich, dass der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren zu ca. 87 % der Simulationszeit größer als 5,5 Å war (Abb. D.28 B), so dass ein dauerhafter Kontakt zwischen diesen beiden höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin wurde eine mögliche Bindung zwischen H290 (Untereinheit III B) und dem F389 (Untereinheit VI) untersucht. Der Abstand zwischen diesen beiden hält sich sehr konstant zwischen 4-6 Å (Abb. D.28 B). Der Kontakt könnte durch ein "*π-π-stacking*" oder eine Wasserstoff-*π*-Interaktion zwischen beiden aromatischen Ringen entstehen.

Die Glutaminsäure E388 (Untereinheit VI) spielt bei der Ausbildung der molekularen Brücke zwischen den beiden Untereinheiten keine Rolle. Auffällig ist hier, dass die Glutaminsäure ca. ab der 35 ns der Simulation an ein Ca²⁺-Kation bindet, und diese Bindung nicht mehr löst.

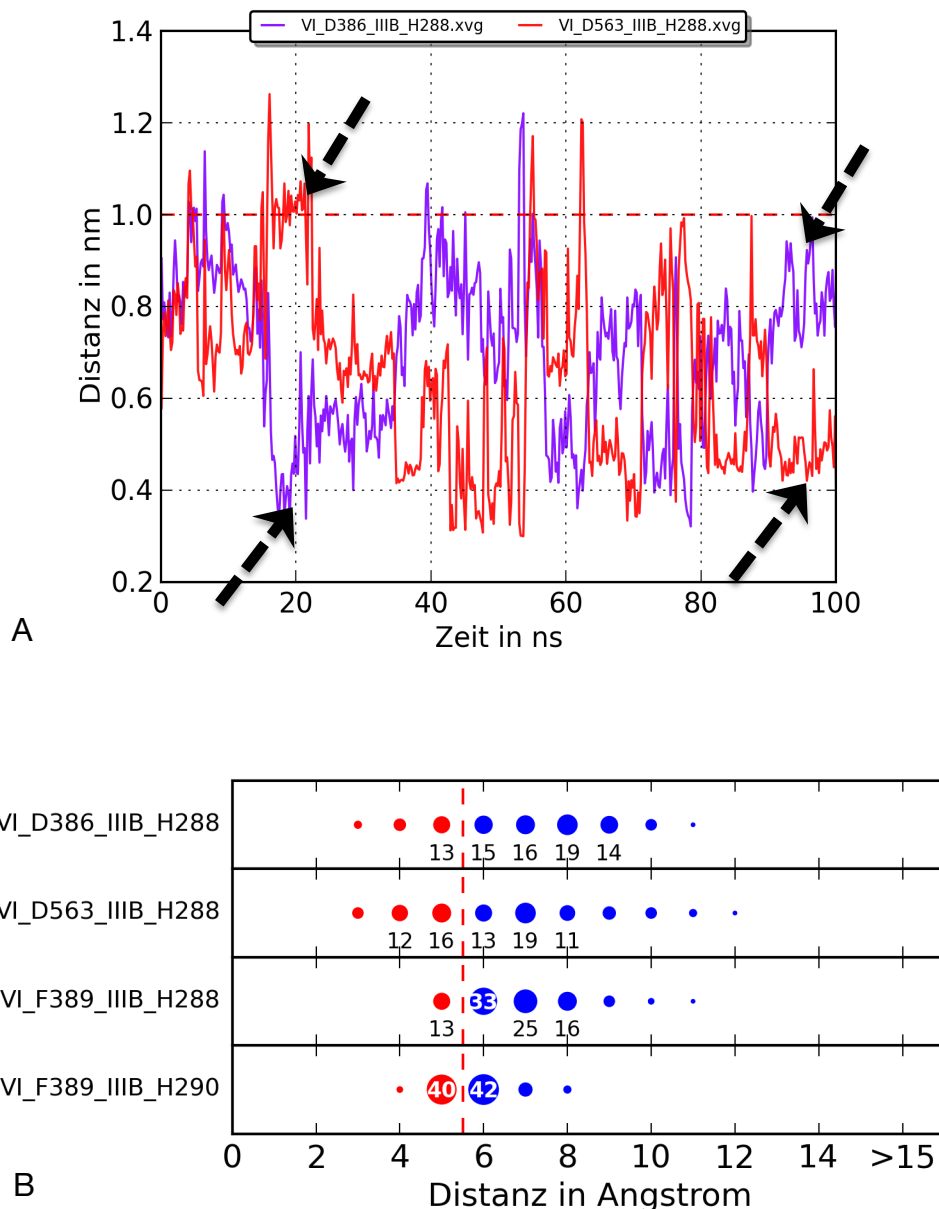


Abb. D.28: MD-Auswertung von Interface VI-IIIIB/IV/V. **A:** Zeitliche Änderung der Abstände zwischen den Aminosäuren D386 (Untereinheit VI) und H288 (Untereinheit IIIIB) sowie D563 (Untereinheit VI) und H288 (Untereinheit IIIIB). Die Bindung zwischen dem Histidin und einer der beiden Asparaginsäuren scheint sich während der MD-Simulation immer wieder abzuwechseln (schwarze Pfeile). Während der Abstand zwischen D563 und H288 bei ca. 20 ns bei ungefähr 10 bis 12 Å liegt, ist der Abstand von D386 zu H288 bei ungefähr 4-5 Å. Das genaue Gegenteil ist am Ende der Simulation zu erkennen. **B:** Das Histogramm zeigt die prozentualen Anteile der Abstände, die zwischen den Aminosäuren während der MD-Simulation gemessen wurden. Während sich die Bindung zwischen D386 und H288 sowie D563 und H288 scheinbar abwechselt, kommt eine Bindung zwischen F389 und H288 eher nicht zustande. Zu 87 % der Simulationszeit ist der Abstand größer als 5,5 Å. Zwischen F389 und H290 ist der Abstand zu 45 % der Simulationszeit in einem Bereich, der eine Bindung über π - π -stacking oder durch eine Wasserstoff- π -Interaktion möglich erscheinen lässt.

Für die dritte Massebrücke zwischen Untereinheit VI und IV wurde eine Interaktion zwischen K454 (Untereinheit VI) und E289 (Untereinheit IV) vermutet. Dies konnte mit der MD bestätigt werden. Jedoch scheint auch S453 (Untereinheit VI) Einfluss auf die Bildung der Brücke zu nehmen. Zu Beginn der Simulation (1 ns bis 40 ns) gibt es einen Kontakt zwischen dem Serin und der Glutaminsäure. Hier könnte eine Wasserstoffbrücke beide Aminosäuren miteinander verbinden. Im Laufe der Simulation nähert sich K454 (Untereinheit VI) der Glutaminsäure an, verdrängt zum Ende der Simulation das Serin und bildet eine Salzbrücke mit E289 (Untereinheit VI) (Abb. D.29).

Für Massebrücke 4 konnte in der MD-Simulation kein molekularer Kontakt zwischen den vermuteten Aminosäuren T452 (Untereinheit VI) und K288 (Untereinheit IV) festgestellt werden.

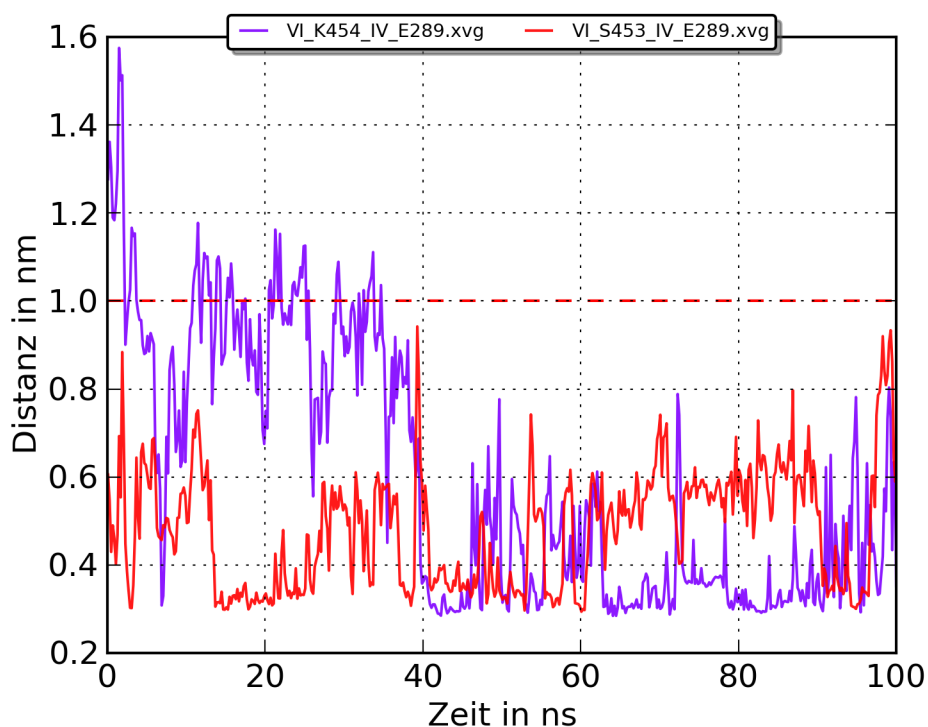


Abb. D.29: MD-Auswertung von Interface VI-IIIB/IV/V. Zeitliche Änderung der Abstände zwischen K454 (Untereinheit VI) und E289 (Untereinheit IV) sowie S453 (Untereinheit VI) und E289 (Untereinheit IV). Zu Beginn der MD-Simulation scheint es einen Kontakt zwischen dem Serin und der Glutaminsäure zu geben. Ab der 40 ns nähert sich K454 der Glutaminsäure E289 an und bildet schließlich eine Salzbrücke aus. Die Bindung zwischen Serin und Glutaminsäure löst sich auf, der Abstand zwischen beiden bleibt aber mit knapp 6 Å sehr gering.

Für Massebrücke 5, die sich im unteren Bereich des Interfaces zwischen Untereinheit VI und V befindet, zeigte die MD-Simulation, dass die in diesem Bereich identifizierten Aminosäuren nicht direkt miteinander agieren. Es gibt eine potenzielle Salzbrücke zwischen K574 (Untereinheit VI) und D298 (Untereinheit V). Nach 40 ns nimmt der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren jedoch zu und bleibt dann zwischen 5-6 Å konstant.

Bei der Auswertung der MD-Simulation fiel auf, dass diverse zweiwertige Kationen mit verschiedenen Glutaminsäuren eine teils sehr stabile Bindung eingingen, die sich meist bis zum Ende der Simulation nicht mehr löste (Abb. D.30). Diese Beobachtungen deuten eine wichtige Rolle dieser Kationen in der Hämolymphe, als auch im Puffer an. Durch ihre Interaktion mit diversen Aminosäuren erhöhen sie die Stabilität der Quartärstruktur des Proteins. Es konnte eine kurzzeitige Verbindung zwischen Untereinheit VI und V in der Nähe der beschriebenen Massebrücke 5 beobachtet werden, die durch ein Ca^{2+} -Ion vermittelt wurde (Abb. D.30 orangefarbener Kasten). Weiterhin wurde zwischen den Untereinheiten IIIB, IV und V eine komplexe molekulare Bindung entdeckt, welche durch ein Mg^{2+} -Ion vermittelt wurde. Diese Bindung ergab sich bereits nach 10 ns und blieb bis zum Ende der Simulation stabil. Hierbei spielten vor allem die Aminosäuren D277 (Untereinheit IIIB), E275 (Untereinheit IV) und D280 (Untereinheit V), die zusammen mit dem Mg^{2+} -Ion in Kontakt traten, eine Rolle. Die mittlere Distanz zwischen den drei Aminosäuren zum Mg^{2+} -Ion lag zwischen 4-5 Å (Abb. D.30 blauer Kasten).

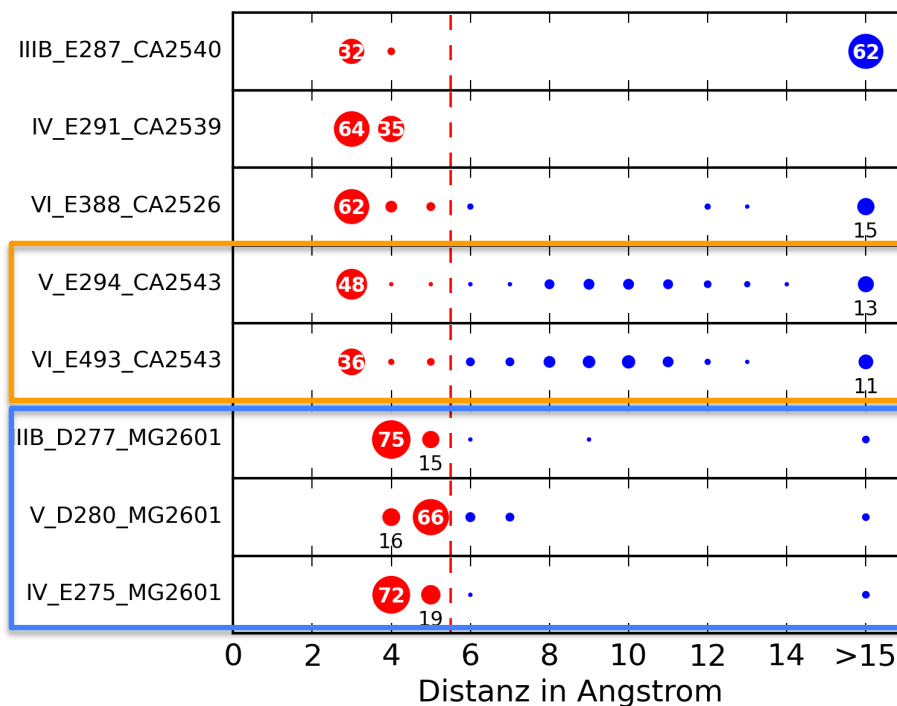


Abb. D.30: Dargestellt sind die prozentualen Anteile der Abstände zwischen ausgewählten Aminosäuren und einigen Kationen während der MD-Simulation. Die Bindungen zwischen den Aminosäuren und den Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Ionen sind sehr stabil gewesen. Knapp 40 % der Simulationszeit interagierten E294 und E493 mit demselben Ca^{2+} -Ion (Atomnummer 2543) und verbanden so die Untereinheiten VI und V (orangefarbener Kasten). Ähnliches ließ sich auch zwischen D277 (Untereinheit IIIB), D280 (Untereinheit V) und E275 (Untereinheit IV) beobachten, die abwechselnd mit dem gleichen Mg^{2+} -Ion (Atomnummer 2601) in Kontakt standen, und so die drei Untereinheiten miteinander verknüpften (blauer Kasten).

3.3 Interfaces zwischen den 4x6-meren des 8x6-mers

Die in dieser Arbeit berechneten 3D-Rekonstruktionen des Hämocyanins von *L. polyphemus* weisen zwischen den beiden 4x6-meren des oxy-8x6-mers vier verschiedene Interfaces und beim deoxy-8x6-mer drei Interfaces auf. Beide 3D-Rekonstruktionen zeigen das IIIA-IIIIB-Interface, das II-IV-Interface und das IV-IV-Interface. Das IIIA-IIIIA-Interface lässt sich dagegen nur in der 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers erkennen. Diese vier Interfaces wurden bereits beschrieben (Martin et al., 2007), jedoch lassen sich aufgrund der verbesserten Auflösung jetzt neue Details erkennen. Ebenso gibt es einige strukturelle Unterschiede zwischen den Interfaces des oxy- und des deoxy-8x6-mers. Einen Überblick der einzelnen Positionen der vier Interfaces zwischen den beiden 4x6-meren im 8x6-mer zeigt Abb. D.31.

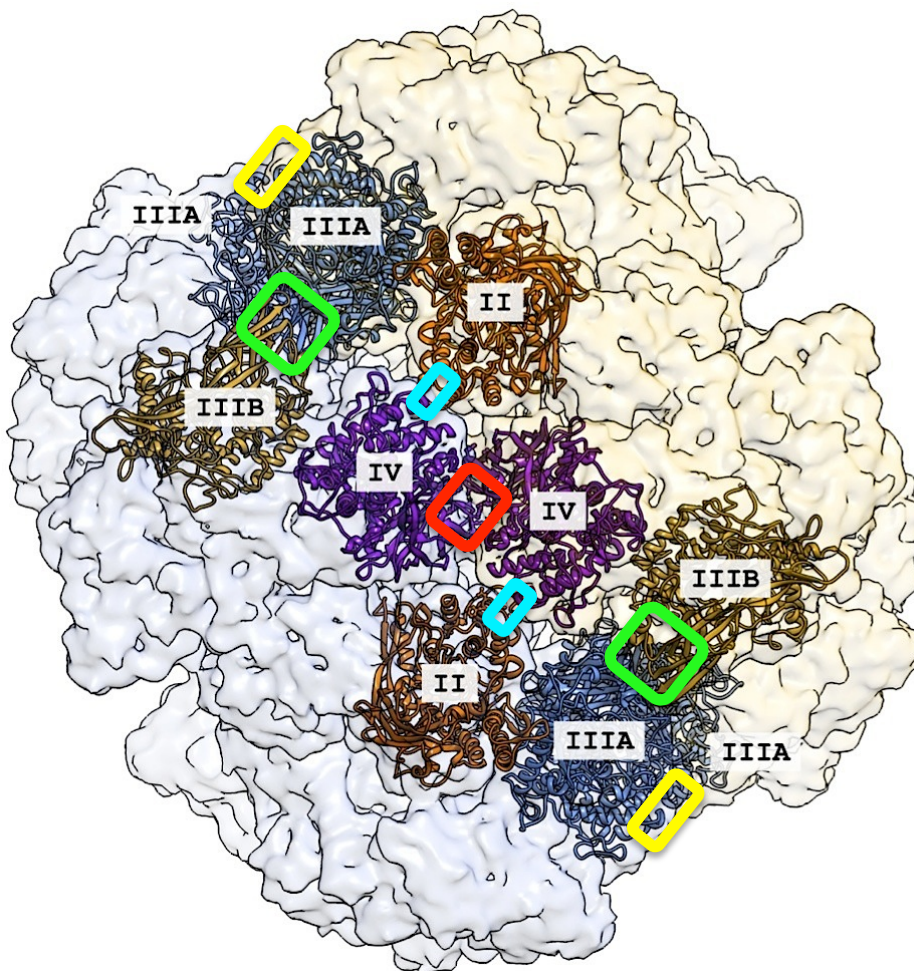


Abb. D.31: Das 8x6-mer von *L. polyphemus*, das sich aus den beiden 4x6-meren (transparent blau/gelb) zusammensetzt. Die Positionen der vier Interfaces sind farblich markiert. Gelb: Das IIIA-IIIIA-Interface (nur im oxy-8x6-mer); Grün: Das IIIA-IIIIB-Interface; Hellblau: Das II-IV-Interface; Rot: das IV-IV-Interface.

Das IIIA-III A-Interface

Das IIIA-III A-Interface wurde bereits ausführlich beschrieben (Martin et al., 2007, Dejung, 2014) und tritt in den aktuell berechneten 3D-Rekonstruktionen nur beim oxy-8x6-mer auf. Die Massebrücke wird zwischen den Domänen #1 und #3 der beiden Untereinheiten ausgebildet. Die sich gegenüberliegenden Aminosäuren ¹³⁶DKD¹³⁸ sind in der Lage, zwei Salzbrücken zwischen den Untereinheiten auszubilden. Diese mögliche Verbindung ist von vier Histidinen (2x H423, 2x H134) umgeben, die so das Interface zusätzlich beeinflussen könnten (Abb. D.32 A).

Im deoxy-8x6-mer sind die beiden Untereinheiten des Typs IIIA zu weit voneinander entfernt, um in Kontakt zu treten. Dieser größere Abstand hängt mit der zusätzlichen Rotation zusammen, die bei den vier 2x6-meren im deoxy-Zustand auftritt. Dadurch drehen sich beide Untereinheiten voneinander weg und das Interface löst sich auf (Abb. D.32 B).

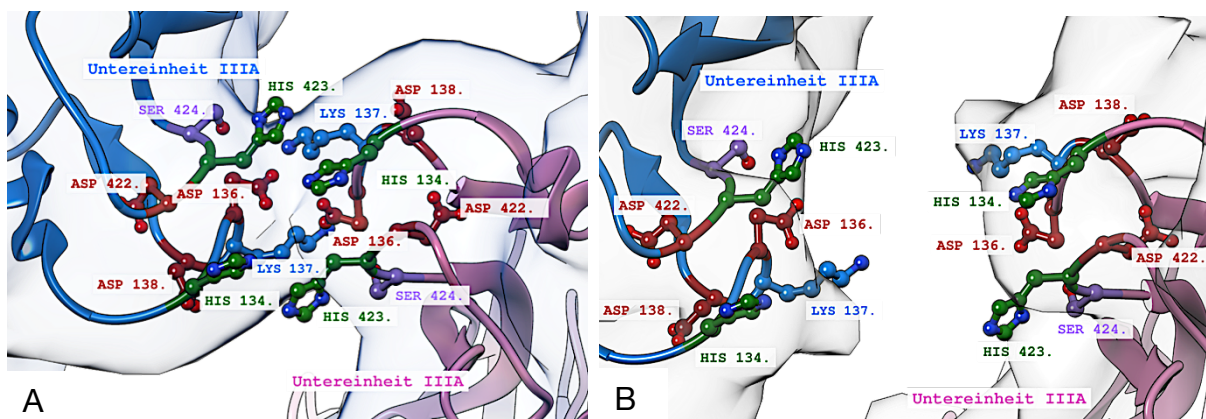


Abb. D.32: Das IIIA-III A-Interface im (A) oxy- und (B) deoxy-8x6-mer. **A:** Die sich gegenüberliegenden Aminosäuren D136 und K137 sind der Lage, zwei Salzbrücken zu bilden. Die Massebrücke selbst wird von vier weiteren Histidinen (2x H423, 2x H134) flankiert. **B:** Durch die Rotation der beiden Hexamere drehen sich beide Untereinheiten voneinander weg. Der Abstand erhöht sich auf ca. 12 Å und das Interface löst sich auf.

Aufgrund des ausschließlichen Auftretens des IIIA-III A-Interfaces beim oxy-8x6-mer ist es wahrscheinlich, dass es eine Rolle bei der Weiterleitung von allosterischen Signalen zwischen den beiden 4x6-meren spielt, indem es wie eine Art Schalter wirkt. Hinzu kommt, dass dieses Interface im oxy-8x6-mer die beiden 4x6-meren enger zusammenhält, und so das gesamte Protein in sich geschlossener wirkt.

Das IIIA-IIIB-Interface

Das IIIA-IIIB-Interface weist zwischen dem oxy- und deoxy-8x6-mer deutliche strukturelle Unterschiede auf. Im oxy-8x6-mer gibt es zwei Kontaktpunkte, an denen sich beide Untereinheiten näher kommen. Im Bereich der ersten Massebrücke liegen die Aminosäuren ⁴⁴⁶TSG⁴⁴⁸, die sich im Loop zwischen β -Faltblatt 7 und 8 von Untereinheit IIIA befinden, und die Aminosäuren ²⁹⁵EEPH²⁹⁸ von Untereinheit IIIB. Hier könnte H298 mit T446/S447 interagieren. In der Nähe der zweiten Brücke befinden sich ⁴⁵⁰TKH⁴⁵² von Untereinheit IIIA sowie ⁵⁵⁹DWEQD⁵⁶³ von Untereinheit IIIB. E561 könnte hierbei mit K451 eine Salzbrücke bilden. Auch ist eine mögliche Interaktion mit H452 möglich. T450 und Q562 könnten zusammen eine Wasserstoffbrücke ausbilden und so auch eine Verbindung zwischen den beiden Untereinheiten herstellen (Abb. D.33 A).

Im deoxy-8x6-mer ergibt sich ein völlig anderes Bild. Durch die Rotation der Hexamere im 2x6-mer drehen sich beide Untereinheiten IIIA und IIIB aufeinander zu. Das IIIA-IIIB-Interface wird so kompakter. Die zuvor beschriebene Massebrücke 1 löst sich komplett auf. Die Aminosäuren ⁴⁴⁶TSG⁴⁴⁸ von Untereinheit IIIA scheinen nun mit ³⁸²HHQ³⁸⁴ der Untereinheit IIIB in Kontakt zu treten. Direkt daneben ergibt sich eine zweite Brücke zwischen S449 und Q562. Diese beiden Aminosäuren liegen nur 3 Å voneinander entfernt. Zu beachten wären auch noch die beiden Lysine K591/592 von Untereinheit IIIB. Beide ragen in Richtung von Massebrücke 2, so dass es zu einem Kontakt zwischen dem Serin und einem der beiden Lysine kommen könnte. Die dritte Massebrücke befindet sich unterhalb der Massebrücke 2. Bei dieser könnte es sich um eine Salzbrücke handeln, die von E560 (Untereinheit IIIA) und K452 (Untereinheit IIIB) gebildet wird (Martin et al., 2007) (Abb. D.33 B).

Interessanterweise wird auch dieses Interface von einer großen Anzahl aromatischer Aminosäuren flankiert: Fünf Histidine (H452, H561 in Untereinheit IIIA; H382, H382 und H453 in Untereinheit IIIB), zwei Phenylalanine (F384 in Untereinheit IIIA und F387 in Untereinheit IIIB) und zwei Tryptophane (W559 in Untereinheit IIIA und W560 in Untereinheit IIIB).

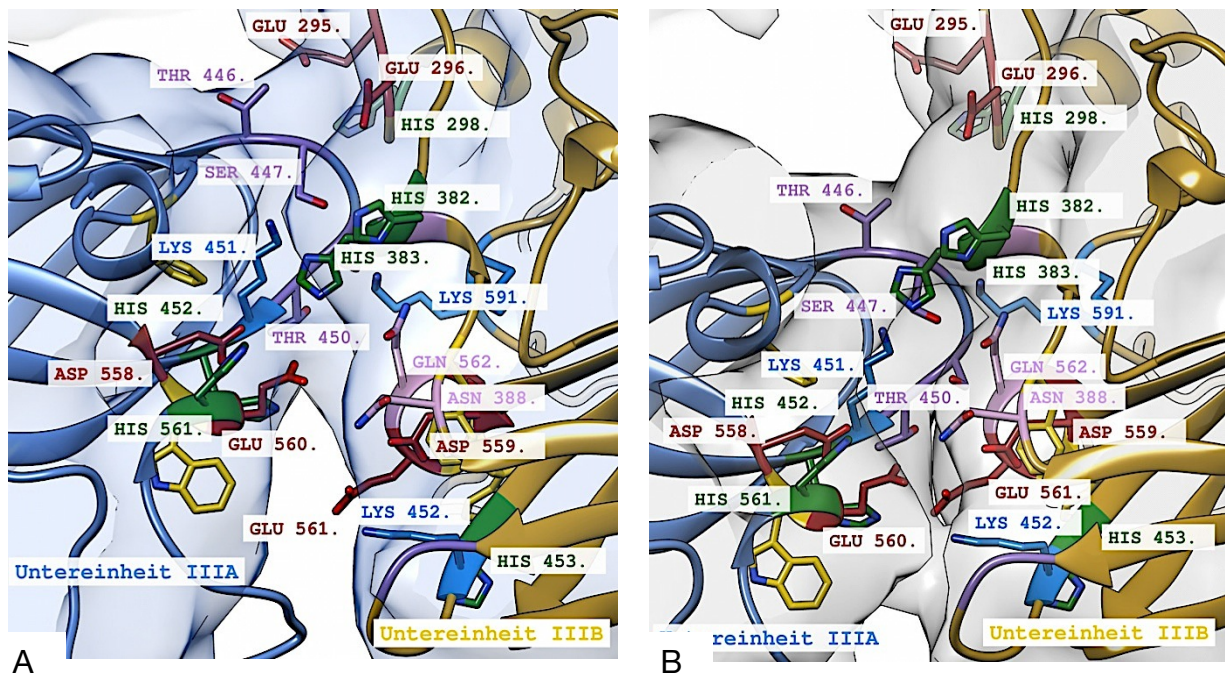


Abb. D.33: Das IIIA-IIIIB-interface im (A) oxy- und (B) deoxy-8x6-mer. **A:** Brücke 1 bildet sich sehr wahrscheinlich durch polare Wechselwirkungen zwischen $^{446}\text{TSG}^{448}$ von Untereinheit IIIA und $^{295}\text{EPPH}^{298}$ von Untereinheit IIIB. An der zweiten Brücke könnten die Aminosäuren $^{450}\text{TKH}^{452}$ von Untereinheit IIIA sowie $^{559}\text{DWEQD}^{563}$ von Untereinheit IIIB beteiligt sein. **B:** Im deoxy-8x6-mer drehen sich die beiden Untereinheiten aufeinander zu. Es kommt so zu einer Umbildung des IIIA-IIIIB-Interfaces. Die in (A) beschriebene Brücke 1 löst sich auf. Die Aminosäuren $^{446}\text{TSG}^{448}$ von Untereinheit IIIA treten im deoxy-8x6-mer wahrscheinlich mit $^{382}\text{HHQ}^{384}$ von Untereinheit IIIB in Kontakt. Massebrücke 2 könnte durch eine Wasserstoffbrücke entstehen, die sich zwischen S449 (Untereinheit IIIA) und Q562 (Untereinheit IIIB) möglicherweise ausbildet. Massebrücke 3 wurde bereits beschrieben (Martin et al., 2007). Hier handelt es sich wahrscheinlich um eine Salzbrücke, die zwischen E560 (Untereinheit IIIA) und K452 (Untereinheit IIIB) entsteht.

Das II-IV-Interface

Das II-IV-Interface besteht aus einer einzelnen Massebrücke und ist bereits bekannt (Martin et al., 2007). Es unterscheidet sich jedoch in der aktuellen 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers durch die Position der Aminosäuren. Die Glutaminsäure E66, die sich am Ende der Helix $\alpha 4$ von Untereinheit II befindet, bildet mit K67, welche im Loop zwischen Helix $\alpha 4$ und $\alpha 5$ von Untereinheit IV liegt, eine Salzbrücke aus (Abb. D.34 A).

Im deoxy-8x6-mer verlagert sich die Massebrücke ein wenig. Sie liegt hier zwischen den Aminosäuren $^{69}\text{DFND}^{72}$, die sich am Anfang der Helix $\alpha 5$ von Untereinheit II befinden, und den Aminosäuren $^{67}\text{KNFD}^{70}$, die am Ende des Loops zwischen Helix $\alpha 4$ und $\alpha 5$ bzw. am Anfang von Helix $\alpha 5$ liegen. Hier könnte eine Salzbrücke zwischen D72 und K67 entstehen. Ebenso sind polare Wechselwirkungen zwischen D69/N71 (Untereinheit II) und N68/D70 (Untereinheit IV) möglich (Abb. D.34 B).

Weiterhin wird das Interface von vier Phenylalaninen (F70/F73 beide auf Untereinheit II; F69, F71 beide auf Untereinheit IV) flankiert.

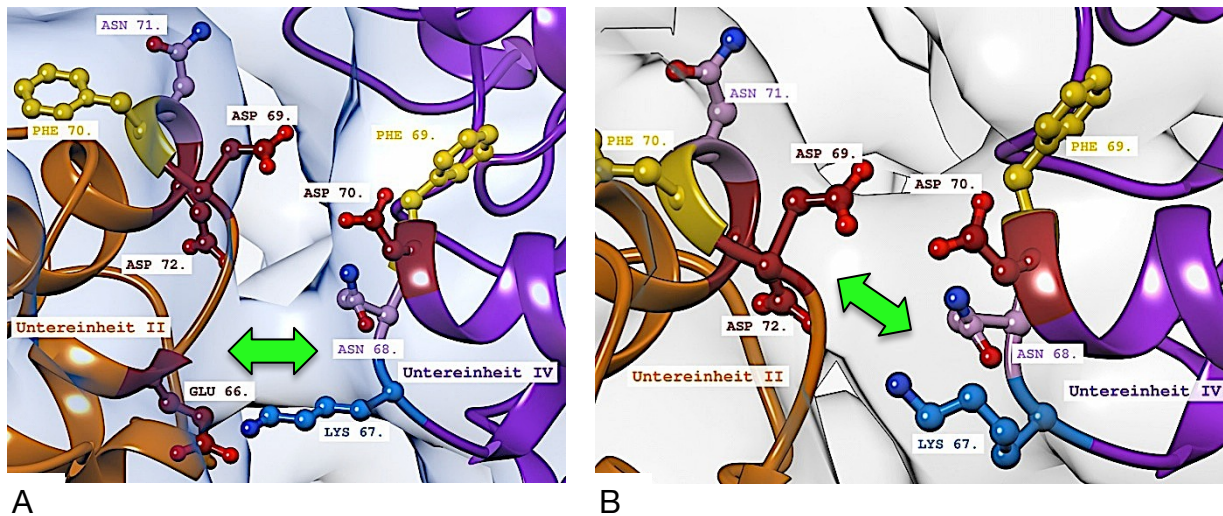


Abb. D.34: Das Interface II-IV im (A) oxy- und (B) deoxy-8x6-mer. **A:** Es handelt sich vermutlich um eine Salzbrücke (grüner Pfeil), die zwischen E66 (Untereinheit II) und K67 (Untereinheit IV) entsteht. **B:** Im deoxy-8x6-mer verlagert sich die Massebrücke des II-IV-Interfaces. Hier könnte D72 (Untereinheit II) mit K67 (Untereinheit IV) eine stabile Salzbrücke ausbilden. Ebenso sind polare Wechselwirkungen zwischen D69/N71 (Untereinheit II) und N68/D70 (Untereinheit IV) möglich und könnten zu dieser Massebrücke beitragen (grüner Pfeil).

Das IV-IV-Interface

Das IV-IV Interface bildet eine große zentrale Massebrücke zwischen den beiden 4x6-meren des 8x6-mers aus. Es ist sowohl in der oxy-, als auch in der deoxy-3D-Rekonstruktion des LpHs frühzeitig zu erkennen, weit bevor der massekorrelierte Schwellenwert erreicht ist. Das Interface konnte bereits in einer 40 Å-3D-Rekonstruktion identifiziert werden (Taveau et al., 1997) und wurde von Martin et al., (2007) genauer beschrieben. Mit Hilfe der aktuellen 3D-Rekonstruktionen ist eine detailliertere Beschreibung des Interfaces möglich. Zusätzlich lassen sich strukturelle Unterschiede zwischen dem oxy- und deoxy-IV-IV-Interface erkennen.

Die Bildung des Interfaces erfolgt über die Domäne #3 beider Untereinheiten. Im Bereich der Massebrücke liegen sich Abschnitte der β -Faltblätter 7, 8, 9, 10 und die Loops, die die β -Faltblätter 7-8 sowie 9-10 verbinden, antiparallel gegenüber. Beim oxy-8x6-mer lassen sich seitlich der zentralen Hauptbrücke noch zwei zusätzliche kleinere Massebrücken erkennen, die in der aktuellen 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers nicht auftreten. Diese beiden Massebrücken könnten durch eine Bindung zwischen E566, das sich im Loop zwischen den beiden kurzen Helices α 25 und α 26 befindetet, und H492, das am Anfang von β -Faltblatt 10 liegt, entstehen (Abb. D.35 A).

Im IV-IV-Interface des deoxy-8x6-mers sind die beiden seitlichen Massebrücken nicht vorhanden. Durch die zusätzliche 4° Rotation der beiden beteiligten Hexamere drehen sich beide Typ-IV-Untereinheiten leicht voneinander weg. Diese kleine Distanzänderung zwischen den beiden Untereinheiten hat auf die zentrale Massebrücke keinen großen Einfluss, aber die Distanz zwischen E566 und H492 ist nun so groß, dass sie nicht mehr miteinander in Kontakt treten können, wodurch sich die beiden Seitenbrücken auflösen (Abb. D.35 B). Die zentrale Massebrücke des IV-IV-Interfaces zeigt in der 3D-Rekonstruktion des oxy-, als auch des deoxy-8x6-mers einen fast identischen Aufbau. Die äußeren Bereiche dieser kompakten Massebrücke könnten durch zwei Salzbrücken gebildet werden, die sich zwischen K490 und E559 ausbilden (Abb. D.35 A/B). Direkt daneben befinden sich zwei identische Cluster, die sich aus je fünf aromatischen Aminosäuren zusammensetzen. Im Zentrum eines solchen Clusters befindet sich das Tryptophan W558. Es ist von vier Histidinen umgeben (H451, H485, H489, H562). Die Ringsysteme der aromatischen Aminosäuren können über π - π -stacking und Wasserstoff- π -Interaktionen in Kontakt treten und so die zentrale Massebrücke stabilisieren (Abb. D.35 C/D). Das Histidin H489 spielt bei diesem Cluster eine besondere Rolle, da es sich auf der gegenüberliegenden Untereinheit IV befindet und zu dem Tryptophan W558 einen sehr geringen Abstand von 2-3 Å aufweist. Es ist möglich, dass das Tryptophan W558 durch ein allosterisches Signal seine Position in Bezug auf das Histidin H489 verändert, und so eine Konformationsänderung des Proteinerückgrats hervorruft (Martin et al., 2007). Die Länge, Lage und Orientierung des Interfaces könnten sich dadurch maßgeblich verändern. Umgeben von den beiden aromatischen Clustern liegen sich im Zentrum der Massebrücke die Aminosäuren V449 mit einem Abstand von 2-3 Å gegenüber. Diese könnten über hydrophobe Wechselwirkungen in Kontakt treten (Abb. D.35 E/F). Ebenso könnte eine Wasserstoffbrücke die polare Aminosäure T448 mit dem gegenüberliegenden K450 verbinden.

Dieses Interface zeigt eindrucksvoll, welche wichtige Rolle die Aminosäure Histidin beim Aufbau der Interfaces spielen könnte. Alleine beim IV-IV-Interface sind 14 Histidine teilweise direkt am Aufbau bzw. an der Stabilisierung der zentralen Massebrücke und der beiden Seitenbrücken (im oxy-8x6-mer) beteiligt. Dieses Interface ist mit großer Wahrscheinlichkeit maßgeblich an der Weiterleitung von allosterischen Effekten zwischen den beiden 4x6-meren des 8x6-mers beteiligt.

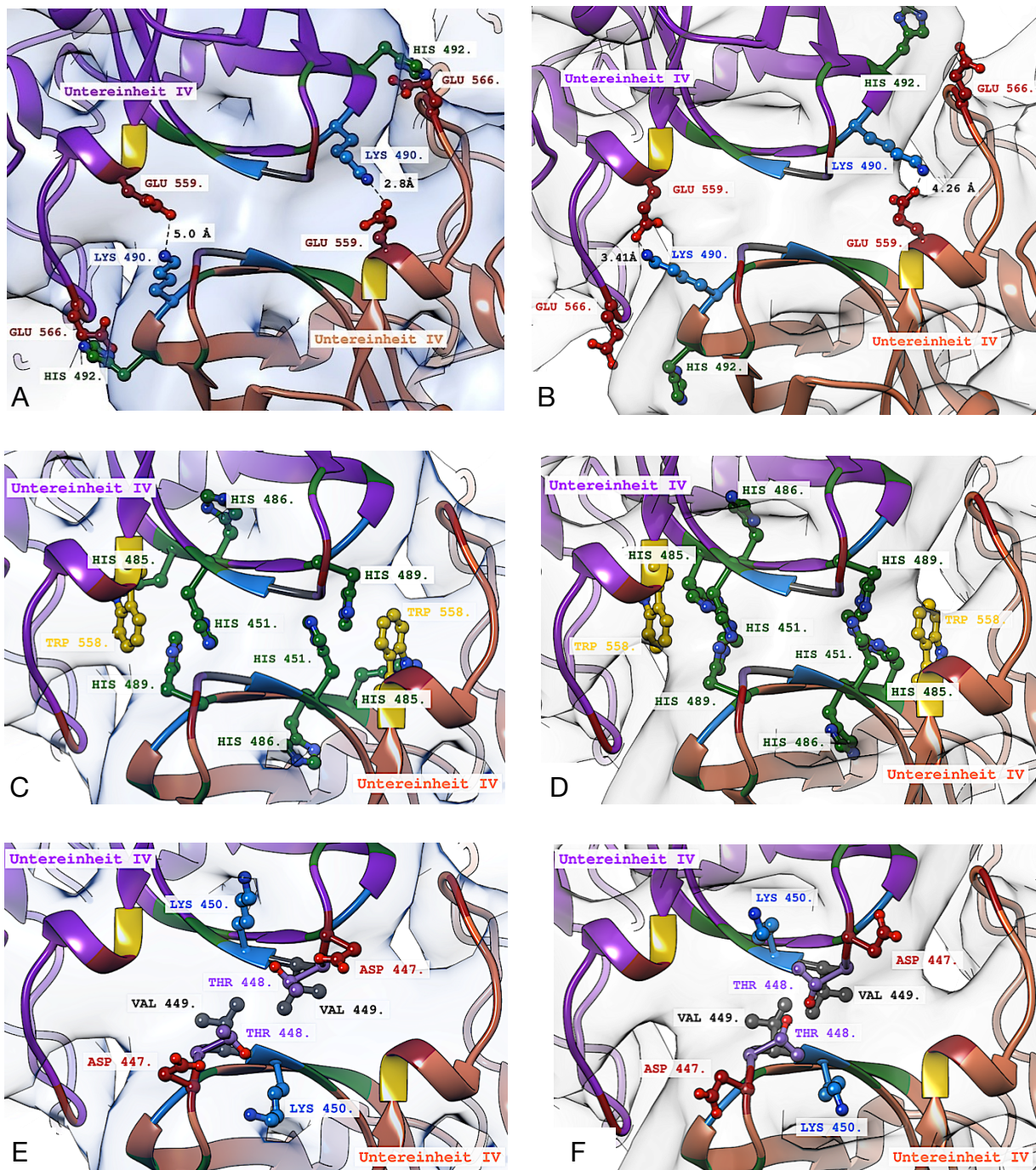


Abb. D.35: Strukturelle Unterschiede zwischen dem oxy-IV-IV-Interface (**A, C, E**) und dem deoxy-IV-IV-Interface (**B, D, F**). **A:** Die Aminosäuren E566 und H492 könnten miteinander interagieren und so die seitlichen Massebrücken ausbilden (gelber Pfeil). **B:** Durch die Rotation der Hexamere beim deoxy-8x6-mer verdrehen sich beide Untereinheiten. Der Abstand zwischen E566 und H492 vergrößert sich, wodurch sich die Massebrücke zwischen beiden Aminosäuren auflöst. **A/B:** Der äußere Bereich der zentralen Massebrücke könnte durch zwei Salzbrücken gebildet werden die zwischen E559 und K490 entstehen. **C/D:** Die beiden Cluster aus den insgesamt zehn aromatischen Aminosäuren befinden sich genau im Massebereich der Brücke. Die aromatischen Ringsysteme können sowohl über π - π -stacking als auch über Wasserstoff- π -Interaktionen in Kontakt treten und so die Untereinheiten miteinander verbinden. **E/F:** In der Mitte der zentralen Massebrücke liegen sich die Aminosäuren V449 gegenüber. Diese könnten über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander interagieren.

MD-Simulation des IV-IV-Interfaces im deoxy-8x6-mer

Wie bereits für das VI-III B/IV/V-Interface, das zwischen den beiden 2x6-meren des 4x6-mers lokalisiert ist, wurde auch für das IV-IV-Interface eine MD-Simulation durchgeführt. Dies sollte einen Einblick in mögliche Interaktionen der am Interface beteiligten Aminosäuren geben. Die MD-Simulation wurde im Standardmodus berechnet, so dass alle Histidine im neutralen Zustand vorlagen. Um die beiden Untereinheiten bei der Auswertung der MD-Simulation besser unterscheiden zu können, wurden sie als Typ IV A und Typ IV B bezeichnet.

Die Außenbereiche der Brücke könnten aus zwei Salzbrücken bestehen, die sich zwischen E559/A und K490/B bzw. E559/B und K490/A bilden. Ebenso war eine Bindung zwischen E559 A/B und H489 A/B möglich. Mit der MD-Simulation konnte gezeigt werden, dass zwischen E559 A/B und K490 A/B zu ca. 70 % der Gesamtsimulation eine potentielle Bindung bestand (Abb. D.36 A). Eine weitere mögliche Interaktion wurde auch zwischen E559/A und H489/B festgestellt. Allerdings lagen diese beiden Aminosäuren etwas weiter voneinander entfernt (ca. 5-6 Å) im Vergleich zu E559/A und K490/B (ca. 3-5 Å). Zwischen E559/B und H489/A war zu 95 % der Simulationszeit keine Bindung möglich, da der Abstand zwischen beiden zu groß war (ca. 6-8 Å) (Abb. D.36 A).

Direkt neben den beiden möglichen Salzbrücken befinden sich die beiden aromatischen Aminosäure-Cluster. Die Aminosäuren von Cluster 1, der sich aus Tryptophan W558/A und den Histidinen H451/A, H485/A, H562/A und H489/B zusammensetzt, wiesen untereinander während der MD-Simulation Abstände von 4-7 Å auf. Dabei schienen die Bindungen zwischen W558/A und H562/A sowie zwischen W558/A und H451/A über die 100 ns MD-Simulation am stabilsten zu sein. Die Abstände zwischen diesen lagen zu 80 % der Simulationszeit bei ca. 5 Å. Im Vergleich dazu schwankten die Abstände von H485/A und H489/B zu W558/A über die gesamte MD-Simulation zwischen 4-8 Å (Abb. D.36 B).

Der zweite Cluster auf der gegenüberliegenden Seite des Interfaces setzt sich aus dem Tryptophan W558/B und den vier Histidinen H451/B, H485/B, H562/B und H489/A zusammen. Im Vergleich zu Cluster 1 gab es hier keine stabilen Abstände zwischen den Histidinen zu dem Tryptophan. Die Abstände aller vier möglichen Bindungen schwankten im Bereich von 4-8 Å (Abb. D.36 C).

Aufgrund der häufig wechselnden Abstände zwischen den vier Histidinen zum Tryptophan ist eine genauere Aussage zum Cluster 2 nicht möglich (s. Abschnitt D.3.5. Zusammenfassung zu den MD-Simulationen).

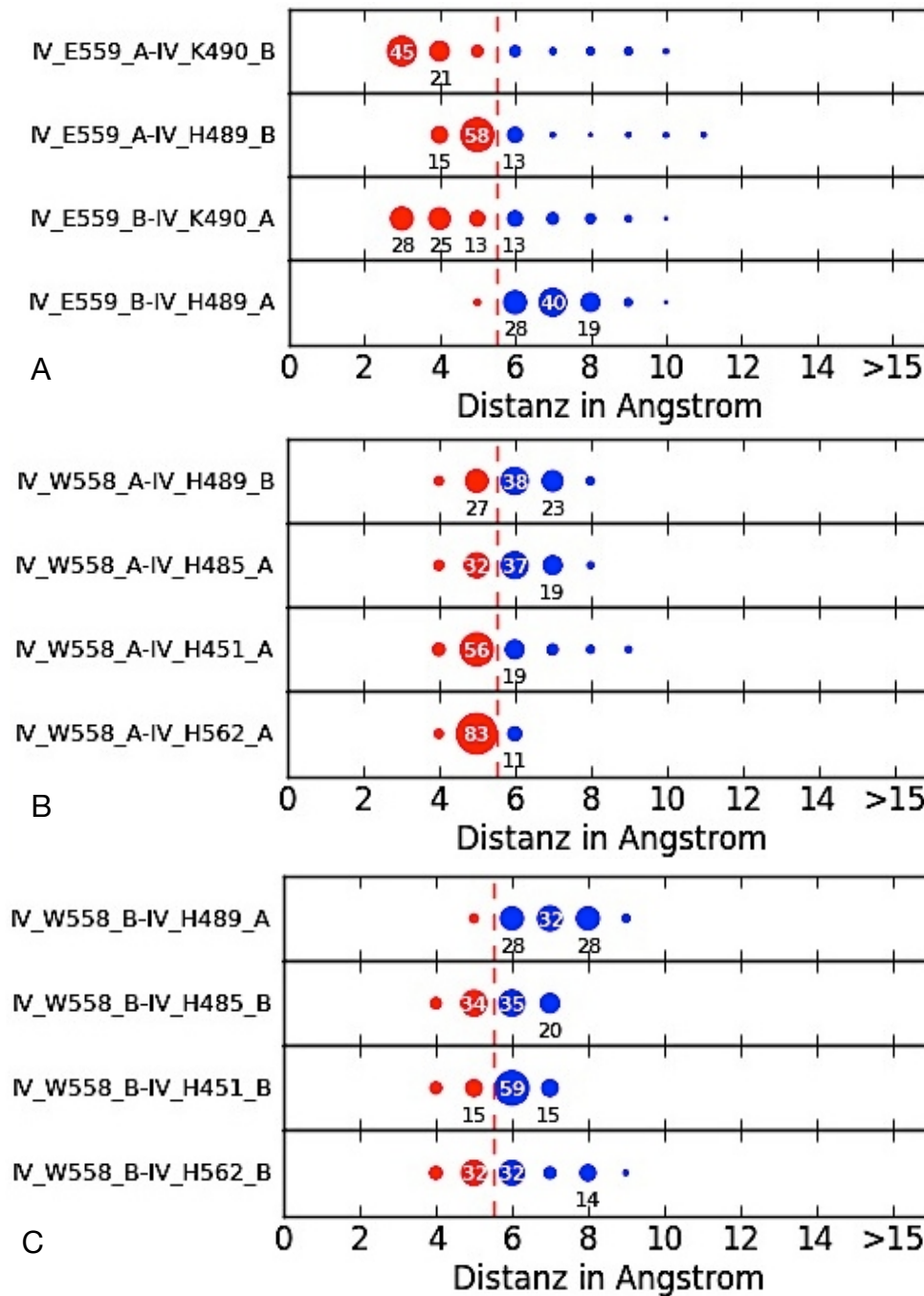


Abb. D.36: MD-Auswertung von Interface IV-IV. Prozentuale Verteilung der Abstände zwischen den Aminosäuren während der MD-Simulationszeit von 100 ns. **A:** Zwischen E559/A↔K490/B und E559/B↔K490/A ist zu ca. 70 % der Simulationszeit eine Bindung möglich. Eine weitere Bindung ist zwischen E559/A↔H489/B erkennbar. Der Abstand zwischen den beiden Aminosäuren ist im Vergleich zu E559/A↔K490/B jedoch etwas größer (4-6 Å). Eine Bindung zwischen E559/B↔H489/A kann ausgeschlossen werden. **B:** Die prozentuale Verteilung der Abstände der Aminosäuren innerhalb von Cluster 1. Zwischen W558/A↔H562/A scheint zu 82 % der Simulationszeit eine Bindung möglich zu sein. Bei W558/A↔H451/A liegt der Wert bei ca. 60 %. Die beiden anderen Verbindungen weisen jeweils nur eine mögliche Bindung von ca. 30 % der Simulationszeit auf. **C:** Die prozentuale Verteilung der Abstände der Aminosäuren innerhalb von Cluster 2. Die Abstände schwanken bei allen vier möglichen Verbindungen während der gesamten MD-Simulation zwischen 4-8 Å. Eine mögliche Interaktion zwischen W558/B↔H485/B sowie W558/B↔H562/B ist im Vergleich zu W558/B↔H489/A und W558/B↔H451/B etwas höher.

Im Zentrum der Brücke liegen sich die beiden Aminosäuren V449 A/B direkt gegenüber. Zu 65 % der gesamten Simulationszeit ist eine Interaktion zwischen den beiden Aminosäuren möglich (Abb. D.37, blauer Kasten). Durch hydrophobe Wechselwirkungen treten sie miteinander in Kontakt und verbinden die beiden Untereinheiten miteinander.

Neben den möglichen Interaktionen der Aminosäuren, die zwischen den Untereinheiten auftreten können, wurden auch zwei Verbindungen gefunden, die sich während der MD-Simulation innerhalb der einzelnen Untereinheiten gebildet haben. In beiden Untereinheiten traten während der MD-Simulation die Aminosäuren E387 mit K450 in Kontakt. Eine mögliche Bindung zwischen den beiden war zu knapp 50% der Simulationszeit möglich (Abb. D.37 gelber Kasten)

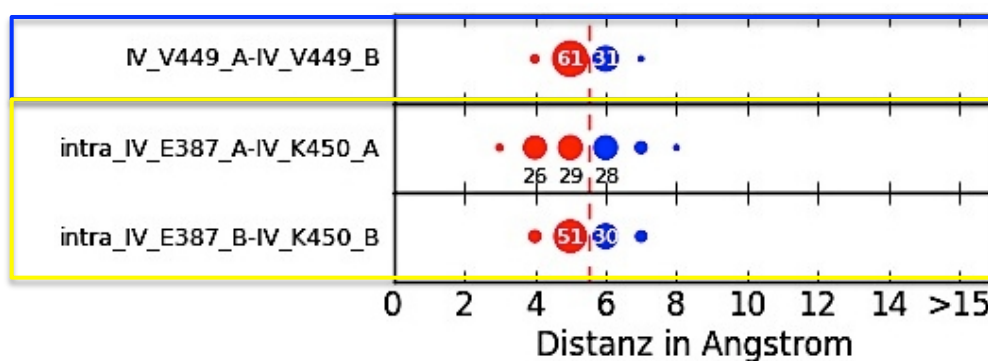


Abb. D.37: MD-Auswertung von Interface IV-IV. Prozentuale Verteilung der Abstände zwischen den Aminosäuren während der MD-Simulation. Während 65 % der Gesamtsimulationszeit ist eine Bindung zwischen den beiden Aminosäuren V449 A/B durch hydrophobe Wechselwirkungen möglich (blauer Kasten). Die internen Verbindungen zwischen E387/A↔K450/A sowie E387/B↔K450/B sind zu knapp 55 % der gesamten Simulationsdauer von 100 ns möglich (gelber Kasten).

Weiterhin ließen sich mehrere Bindungen zwischen Aminosäuren und einigen zweiwertigen Kationen finden. Diese Bindungen waren über die gesamte MD-Simulation meist sehr stabil (Abb. D.38 A/B). Die Ca^{2+} -Ionen binden dabei bevorzugt an Asparagin- und Glutaminsäuren. In einigen Bereichen der Untereinheiten scheinen Mg^{2+} -Ionen als Brückenelement zwischen zwei Aminosäuren zu dienen (Abb. D.38 B) und stabilisierten so möglicherweise die Tertiärstruktur der Untereinheit.

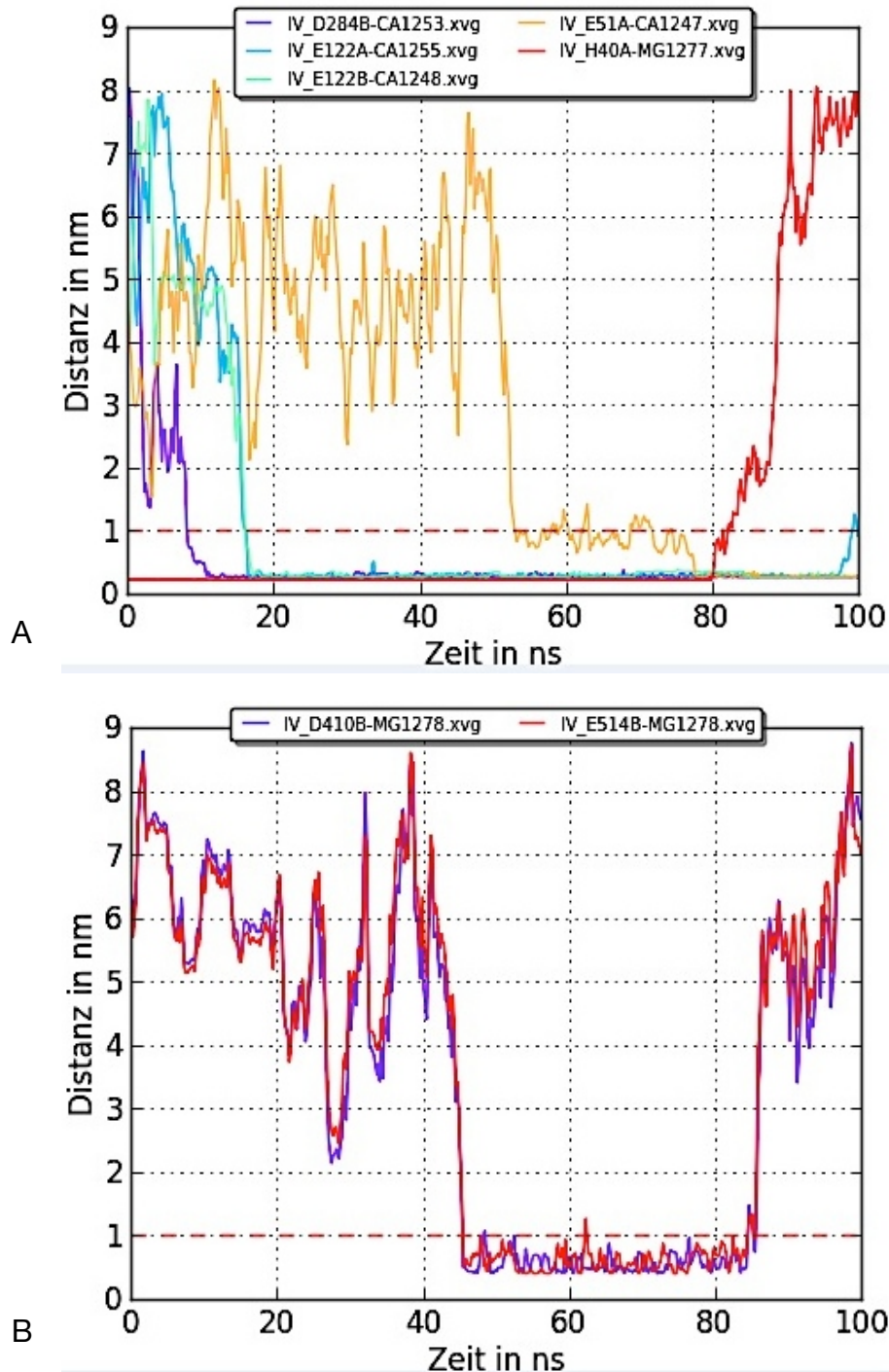


Abb. D.38: MD-Auswertung von Interface IV-IV. Zeitliche Veränderung der Abstände zwischen Aminosäuren und Kationen, die während der MD-Simulation in Kontakt treten. **A:** Die Bindung erfolgt in den meisten Fällen bereits in den ersten 10-20 ns der Simulation und bleibt dann sehr stabil (D284/B↔CA1253 (lila), E122/A↔CA1255 (cyan), E122/B↔CA1248 (türkis)). Eine Besonderheit lässt sich bei der Bindung H40/A↔MG1277 (rot) erkennen. Diese Bindung scheint sich bereits bei der Equilibrierung des Systems (also vor der eigentlichen MD-Simulation) ausgebildet zu haben. Ab der 80 ns scheint sich diese Bindung zu lösen, was durch die ansteigende Distanz zwischen H40/A und MG1277 bestätigt wird. **B:** Ein Mg^{2+} -Ion, das sich zwischen zwei saure Aminosäuren positioniert und diese indirekt miteinander verbindet. Die Bindung zur Asparaginsäure D410/B und der Glutaminsäure E514/B beginnt ungefähr ab der 45 ns und endet ca. bei 85 ns der Simulation.

3.4 Zusammenfassung zum Vergleich der Interfaces

Bisher waren 11 Interfacetypen zwischen den Hexameren des LpH bekannt. Diese wurden mit Hilfe einer 3D-Rekonstruktion, die eine Auflösung von ca. 12 Å besaß, erstmals beschrieben (Martin et al., 2007) und betrafen offensichtlich den oxy-Zustand des 8x6-mers.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit neu berechneten 3D-Rekonstruktionen des oxy- und deoxy-8x6-mers des Hämocyanins von *L. polyphemus* konnten aufgrund der verbesserten Auflösung die verschiedenen Kontaktstellen zwischen den einzelnen Hexameren detaillierter beschrieben werden. Das verbesserte starre und flexible Einpassen der Untereinheiten in die beiden 3D-Rekonstruktionen ermöglichte eine genauere Identifizierung der Aminosäuren, die an der Ausbildung der verschiedenen Interfaces zwischen den Hexameren beteiligt sein könnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die meisten Interfaces zwischen dem oxy- und deoxy-8x6-mer strukturell voneinander unterscheiden. Ausschlaggebend dafür ist die um ca. 8° unterschiedliche Verdrehung zwischen den Hexameren im 2x6-mer. Da diese Strukturveränderung aufgrund der D2-Symmetrie alle vier 2x6-mere im 8x6-mer betrifft, hat dies Einfluss auf alle vorhandenen Interfaces.

Die Rotation zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers wirkt sich auf die meisten Interfaces direkt aus. Gerade die Interfaces II-II und V-VI zeigen, dass es im oxy- und im deoxy-2x6-mer zu unterschiedlichen Kontakten zwischen den Hexameren kommt. Es deuten sich Massebrücken im deoxy-2x6mer an, die im oxy-2x6mer nicht vorhanden sind. Weiterhin sind Verlagerungen und Neupositionierungen von Massebrücken innerhalb der Interfaces zu erkennen, wie zum Beispiel beim Interface II-IV und II-IV/VI.

Die Interfaces V-VI und VI-III B/IV/V, die zwischen den beiden identischen 2x6-meren des 4x6-mers lokalisiert sind, zeigen im deoxy-4x6-mer einen leicht kompakteren Aufbau, der dazu führt, dass sich zusätzliche Massebrücken zwischen den beteiligten Untereinheiten ausbilden, die im oxy-4x6-mer nicht auftreten (Beispiel: Massebrücke 4 beim Interface V-VI, Massebrücke 3+4 beim Interface VI-III B/IV/V). Das Interface V-V ist im deoxy-4x6-mer nicht vorhanden, da sich die beiden Hexamere, in denen die Untereinheit des Typs V lokalisiert ist, voneinander wegdrehen. Bei den Interfaces III A-III B und II-IV, die sich zwischen den beiden 4x6-meren des 8x6-mers befinden, kommt es zwischen oxy- und deoxy-8x6-mer zu einer Verschiebung der jeweiligen Kontaktstelle. Diese Verschiebung hat zur Folge, dass sich zwischen den Untereinheiten neue Massebrücken ausbilden bzw. sich die Positionen der Massebrücken verschieben.

Das IIIA-III A-Interface ist im deoxy-8x6-mer nicht vorhanden, da sich beide Untereinheiten durch die zusätzliche Rotation der Hexamere zu weit voneinander entfernen. Das zentral gelegene IV-IV-Interface weist im oxy-8x6-mer seitlich zwei zusätzliche Massebrücken auf, die im deoxy-8x6-mer nicht auftreten. Der kompakten Brücke des IV-IV-Interfaces macht die zusätzliche Rotation der Hexamere im deoxy-8x6-mer nichts aus. In Position und Aufbau bleibt sie im oxy- und im deoxy-8x6-mer gleich. Die Stabilität dieser Brücke ist ein Hinweis darauf, welche wichtige Rolle die Untereinheit des Typs IV für die Aufrechterhaltung der Quartärstruktur des 8x6-mers spielt. Diese Annahme wird von Reassemblierungsexperimenten gestützt, die zeigten, dass Untereinheit IV für den Aufbau des nativen 8x6-mers zwingend erforderlich ist (Bijlholt et al., 1979; Brenowitz et al., 1983).

Zu den Interfaces, an denen die Untereinheiten V und VI beteiligt sind, muss erwähnt werden, dass beide an dieser Position auch vertauscht vorliegen könnten. Die Immunlokalisation, auf der diese Topologie beruht, konnte diesen Punkt nicht klären (Lamy et al., 1983). Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich an die Topologie der Untereinheiten gehalten, die in anderen Publikationen aufgeführt wurde (Lamy et al., 1981; Markl et al., 1981; Lamy et al., 1983; Martin et al., 2007). Zusätzlich tauschte ich bei allen Interfaces, an denen die Untereinheiten V und VI beteiligt sind, diese gegeneinander aus und überprüfte die Interfaces erneut. Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl Untereinheit V als auch Untereinheit VI in der Lage sind, die entsprechenden Brücken der jeweiligen Interfaces auszubilden. Die an den möglichen Brücken beteiligten Aminosäuren befinden sich in beiden Untereinheiten an den identischen Positionen. Eine genauere Festlegung der Position von Untereinheit V und VI innerhalb des 8x6-mers war somit nicht möglich.

Insgesamt konnten hier 12 verschiedene Interfacetypen identifiziert werden. Das oxy-8x6-mer weist alle 12 Interfaces auf, von denen 11 bereits von Martin et al. (2007) beschrieben wurden. Zusammengefasst bilden diese 102 Massebrücken zwischen den einzelnen Hexameren des oxy-8x6-mers aus. Das deoxy-8x6-mer besitzt 10 der 12 Interfacetypen. Obwohl das deoxy-8x6-mer zwei Interfaces weniger aufweist, konnten zwischen den einzelnen Hexameren des 8x6-mers 126 Massebrücken nachgewiesen werden. Die erhöhte Anzahl an Brücken im deoxy-8x6-mer lässt sich zum einen durch die strukturellen Unterschiede der Quartärstruktur erklären und zum zweiten lassen sich durch die etwas bessere Auflösung der 3D-Rekonstruktion des deoxy-8x6-mers im Vergleich zur 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers mehr Details erkennen. Aufgrund der aktuellen Auflösung beider 3D-Rekonstruktionen ist es nicht möglich gewesen, anhand einer Elektronendichtekarte eine C-alpha-Kettenermittlung durchzuführen, um die exakte Position der Aminosäuren innerhalb der 3D-Rekonstruktion zu ermitteln.

Das flexible Einpassen der pseudoatomaren Modelle in die 3D-Rekonstruktionen ermöglichte jedoch die starke Eingrenzung einiger Aminosäuren, die potentiell an der Bildung verschiedener molekularer Brücken im Bereich der beschriebenen Interfaces beteiligt sein könnten. Die genaue Aufteilung der Interfaces und Massebrücken im deoxy-8x6-mer sowie der Vergleich zum oxy-8x6-mer zeigt Tabelle D.6

A) deoxy-8x6-mer	Interfacetypen	Anzahl der Brücken zwischen den Untereinheiten
2x 1x6-mer → 2x6-mer	5	4 x 18 = 72 (innerhalb der vier 2x6-mere)
2x 2x6-mer → 4x6-mer	2	2 x 18 = 36 (innerhalb der beiden 4x6-mere)
2x 4x6-mer → 8x6-mer	3	1 x 18 = 18 (zwischen den zwei 4x6-meren)
Insgesamt	10	126
B) oxy-8x6-mer	Interfacetypen	Anzahl der Brücken zwischen den Untereinheiten
2x 1x6-mer → 2x6-mer	5	4 x 13 = 52 (innerhalb der vier 2x6-mere)
2x 2x6-mer → 4x6-mer	3	2 x 15 = 30 (innerhalb der beiden 4x6-mere)
2x 4x6-mer → 8x6-mer	4	1 x 20 = 20 (zwischen den zwei 4x6-meren)
Insgesamt	12	102
C) oxy-8x6-mer (Martin et al., 2007)	Interfacetypen	Anzahl der Brücken zwischen den Untereinheiten
2x 1x6-mer → 2x6-mer	4	4 x 6 = 24 (innerhalb der vier 2x6-mere)
2x 2x6-mer → 4x6-mer	3	2 x 5 = 10 (innerhalb der beiden 4x6-mere)
2x 4x6-mer → 8x6-mer	4	3 x 4 = 12 (zwischen den zwei 4x6-meren)
Insgesamt	11	46

Tab. D.6: Auflistung der verschiedenen Interfacetypen und der Anzahl der zugehörigen molekularen Brücken innerhalb des **(A)** deoxy-8x6-mers, **(B)** oxy-8x6-mers und **(C)** oxy-8x6-mers nach Martin et al., (2007). **A:** Das deoxy-8x6-mer besitzt 10 der 12 beschriebenen Interfacetypen, die zusammen 126 Massebrücken umfassen. Jeweils 18 Brücken befinden sich in den 5 Interfacetypen, die zwischen den beiden Hexameren des Dodekamers liegen (bei vier 2x6-meren: $18 \times 4 = 72$). Insgesamt 18 Brücken werden von den 2 Interfacetypen gebildet, die zwischen den beiden identischen 2x6-meren des 4x6-mers auftreten (bei zwei 4x6-meren: $18 \times 2 = 36$). Die 3 Interfacetypen zwischen den beiden 4x6-meren des deoxy-8x6-mers besitzen insgesamt 18 Brücken. **B:** Im Vergleich zu **(A)** ließen sich in der 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers 12 Interfacetypen identifizieren, die zusammen 102 Massebrücken aufweisen. Zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers sind ebenfalls 5 verschiedene Interfacetypen vorhanden, die zusammen 13 Brücken besitzen (bei vier 2x6-meren: $13 \times 4 = 52$). Das 4x6-mer wird von 3 Interfacetypen verbunden, die die zwei 2x6-mere über insgesamt 15 Brücken miteinander verbinden (bei zwei 4x6-meren: $15 \times 2 = 30$). 4 Interfacetypen verbinden die beiden 4x6-mere des oxy-8x6-mers. Hier sind insgesamt 20 Brücken beteiligt. **(C)** Die 3D-Rekonstruktion des oxy-8x6-mers vom LpH nach Martin et al., 2007 wies insgesamt 11 unterschiedliche Interfacetypen auf, die zusammen 46 Brücken ausbildeten. 4 Interfacetypen bildeten 6 Brücken zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers aus (bei vier 2x6-meren: $6 \times 4 = 24$). 3 Interfacetypen mit insgesamt 5 Brücken befinden sich zwischen den beiden 2x6-meren die ein 4x6-mer bilden (bei zwei 4x6-meren: $5 \times 2 = 10$). Die beiden 4x6-mere des oxy-8x6-mers sind über vier verschiedene Interfacetypen miteinander verbunden, die zusammen 12 Brücken ausbilden.

Außer beim II-IV-Interface, das zwischen den beiden 4x6-meren des 8x6-mers lokalisiert ist, ist an allen Interfaces die Aminosäure Histidin beteiligt, bzw. liegt sie in unmittelbarer Nähe zu diversen Massebrücken, die innerhalb der verschiedenen Interfaces auftreten. Durch ihre besondere Eigenschaft, dass sie als einzige Aminosäure unter physiologischen Bedingungen sowohl als Protonenakzeptor als auch Protonendonator fungieren kann, ist sie in vielen Proteinen an funktionellen Interaktionen beteiligt.

Ein Wechsel vom oxygenierten in den deoxgenierten Zustand (bzw. umgekehrt) des LpH kann möglicherweise einen veränderten Protonierungszustand des Histidins hervorrufen. Dies hätte zur Folge, dass innerhalb der verschiedenen Interfaces neue Brücken entstehen, oder auch verschwinden könnten. Solch eine Veränderung hätte eine direkte Auswirkung auf die Struktur und Funktion des gesamten 8x6-mers.

3.5 Zusammenfassung zu den MD-Simulationen

MD-Simulationen erlauben einen detaillierten Einblick in die verschiedenen Kontaktmöglichkeiten, die Aminosäuren miteinander eingehen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch aufgrund der enormen Rechenzeiten nur zwei Interfaces des deoxy-8x6-mers mit Hilfe einer MD-Simulation genauer untersucht. Hierbei handelte es sich um das VI-III B/IV/V-Interface (D.3.2, S.155) und das IV-IV-Interface (D.3.3, S.166). Beide wurden im Standardmodus simuliert (alle Histidine lagen im neutralen Zustand vor).

Die beiden Interfaces stellen für eine MD-Simulation sehr große und komplexe Gesamtsysteme dar, die einen hohen Rechenaufwand erfordern. Je größer solche MD-Systeme sind, umso vorsichtiger muss man mit der Interpretation der errechneten Ergebnisse sein. Folgende Aspekte wurden dabei beachtet:

Für die entsprechenden Interfaces wurden nur die beteiligten Untereinheiten in die Berechnung der MD-Simulation mit einbezogen. Das bedeutet, dass mögliche Interaktionen mit anderen benachbarten Untereinheiten außer Acht gelassen wurden. Somit befanden sich die Untereinheiten auch nicht in einer stabilen Umgebung, die sie normalerweise durch ihre Positionen im Hexamer besitzen. Um ein Auseinanderdriften der Untereinheiten zu verhindern, und das System allgemein zu stabilisieren, wurden an den äußersten Bereichen der Untereinheiten, die an den Interfaces beteiligt waren, einige Aminosäuren an ihrer Position "verankert", so dass diese sich während der MD-Simulation nicht fortbewegen konnten. Erst durch diese Art der Stabilisierung war es möglich, die Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten mittels MD zu untersuchen.

Aufgrund dieser Fixierung wurde als Hinweis auf eine potentielle Bindung zwischen zwei Aminosäureresten nur ihr räumlicher Abstand herangezogen. Die Bindungsstärken, die Salzbrücken, polare und hydrophobe Wechselwirkungen aufweisen, waren bei dieser Art der MD-Simulation vernachlässigbar.

Ebenso spielten bei der durchgeführten Simulation das ausgewählte Kraftfeld, das eingesetzte Puffermodell und die individuellen MD-Parameter eine Rolle, denn all diese Faktoren nehmen großen Einfluss auf ein MD-System. Generell kann man also nicht sagen, dass die MD-Simulation eines molekularen Systems die Realität 1:1 widerspiegelt. Für eine erste Untersuchung und Analyse einiger potenzieller Kontakte und Interaktionen, die in den Interfaces auftauchen können, erwies sich die MD-Simulation jedoch als ein sehr geeignetes Mittel.

Um die Interaktionen zwischen den Hexameren noch besser zu verstehen, wäre eine MD-Simulation mit dem kompletten molekularen Modell aller 48 Untereinheiten des

8x6-mers wünschenswert. Die dafür erforderliche Rechenleistung könnte jedoch von den aktuell weltweit verfügbaren Supercomputern nicht erbracht werden. Die Parallelberechnung einer 100 ns-MD-Simulation von vier Untereinheiten + Puffersystem + Wassermoleküle umfasst knapp 360.000 Atome und dauert fünf Tage. Mit jeder dazukommenden Untereinheit steigt der Rechenaufwand exponentiell an. Ein weiteres Problem stellt der Speicherbedarf dar. Die finale MD-Simulationsdatei des VI-III B/IV/VI-Interfaces besitzt ein Datenvolumen von 150 GB. Auch der Speicherbedarf wächst exponentiell mit jeder zusätzlichen Untereinheit. Die Gesamtheit dieser Faktoren setzt einer MD-Simulation des gesamten 8x6-mers heute noch deutliche Grenzen.

4. Analyse der 4,9 Å-Struktur des 4x6-mers von *C. truncata*

Die 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers des Maulwurfskrebs *C. truncata* bestätigte die Zusammensetzung der vier Hexamere als Tetraeder (Cavellec et al., 1990; Markl & Decker, 1992). Die hohe Auflösung der 3D-Dichtekarte des CtH erlaubte mir das flexible Einpassen der pseudoatomaren Modelle beider Untereinheitentypen. Mit Hilfe der Inter-Hexamer-Kontakte konnten die wahrscheinlichsten Positionen der beiden Untereinheitentypen innerhalb der 3D-Rekonstruktion ermittelt werden. Entscheidend ist dabei zum einen das Mengenverhältnis 1:5 der beiden Untereinheiten, das durch Quantifizierung der Banden im SDS-Gel ermittelt wurde (Markl, unpubliziert). Zum anderen war es wichtig, davon auszugehen, dass alle Hexamere gleich aufgebaut sind; dies hatten gelelektrophoretische Versuche ebenfalls ergeben (Markl, unpubliziert). Die hier verwendete topologische Anordnung der Untereinheiten mit CtH-2 als "Hexamer -Linker" ist mit Abstand die plausibelste. Im Bereich der Interfaces kommen Aminosäuren der entsprechenden Untereinheiten in unmittelbarem Kontakt und wären in der Lage miteinander zu interagieren (s. Abschnitt C. 2.4). Tauscht man die beiden Untereinheitentypen an diesen Positionen der 3D-Rekonstruktion gegeneinander aus, ergeben sich deutlich weniger Kontaktmöglichkeiten. Zusätzlich unterstützt die hier verwendete Topologie die bestätigte D2-Symmetrie des 4x6-mers. Der Untereinheitentyp CtH-2 fungiert also als "Hexamer-Linker" und ermöglicht so den Kontakt zwischen den benachbarten Hexameren (Lamy et al., 1977; Markl et al., 1979a; 1981a; van Bruggen et al., 1980; 1983; Stöcker et al., 1988). Diese Untereinheit ist entscheidend für den Aufbau des 4x6-mers. Der Untereinheitentyp CtH-1 kann als "Hexamer-Former" bezeichnet werden (van Bruggen et al., 1980; Markl & Decker 1992), indem er fünf Positionen im 1x6-mer aufbaut, und im Tier auch als Homo-Hexamer auftritt (Markl, unpubliziert).

4.1 Analyse des solitären 2x6-mers als mögliches Halbmolekül des 4x6-mers

Neben der Berechnung der 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers war es mir möglich, aus dem Datensatz des CtH eine 9,6 Å-Rekonstruktion des möglichen Halbmoleküls (2x6-mer) zu erstellen, das in der Hämolymphe in geringer Menge auftritt (Abb. C.19). Der Aufbau dieses 2x6-mers unterstützt zusätzlich die verwendete Topologie der Untereinheiten in der 3D-Rekonstruktion. Die beiden Hexamere des 2x6-mers werden durch eine breite Kontaktstelle zwischen zwei Untereinheiten zusammengehalten. Es ist davon auszugehen, dass hier die beiden Untereinheiten des Typs CtH-2 zusammentreffen und so die beiden Hexamere verbinden.

Beim aus der Dichtekarte des 4x6-mers extrahierten 2x6-mer und der 3D-Rekonstruktion des solitären 2x6-mers sind Größe und Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren fast identisch (s. Abb. C.18 B und C.19 B). Lediglich der Rotationswinkel des oberen Hexamers zum unteren ist beim solitären 2x6-mer um 5° größer (75° zu 70°). Die Veränderung des Rotationswinkels tritt wahrscheinlich bei der Assoziation zweier Halbmoleküle (2x6-mer) zum 4x6-mer auf, da hier vier Kopien von Interface I hinzukommen. Die Übereinanderlagerung der 3D-Rekonstruktion des solitären 2x6-mers und des extrahierten 2x6-mers aus der $4,9 \text{ \AA}$ -Struktur ergab einen Korrelationswert von 89 % (Abb. D.39). Hier sollte nochmals erwähnt werden, dass im Datensatz von CtH nur diese Form des 2x6-mers aufzufinden war. Die beiden alternativen Möglichkeiten (s. Abb. A.9B / A.9C), das 4x6-mer zu halbieren, waren in der Hämolymphe offenbar nicht vorhanden. Es ist also davon auszugehen, dass es sich hier tatsächlich um das Halbmolekül des 4x6-mers handelt. Dies würde die Vermutung bestärken, dass sich das 4x6-mer aus zwei 2x6-meren assembliert (Cavellec et al., 1990; Taylor et al., 2000; Paoli et al., 2007) und nicht direkt aus vier einzelnen Hexameren (Micetic 2010).

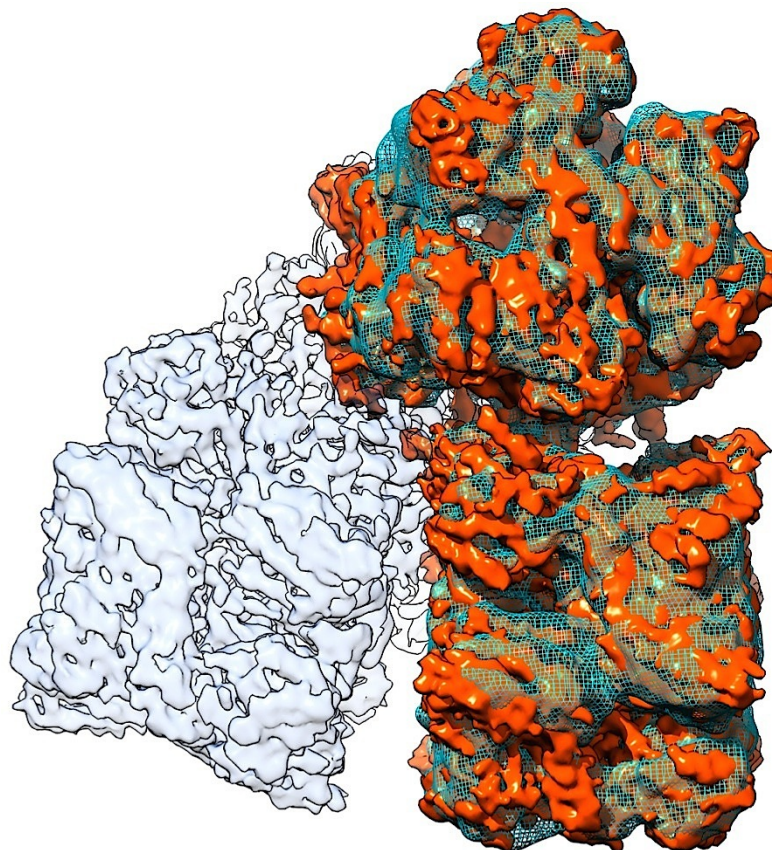


Abb. D.39: Direkter Vergleich der 3D-Rekonstruktion des solitären 2x6-mers (hellblau/Gitternetz) und des aus der $4,9 \text{ \AA}$ -Struktur des CtH extrahierten 2x6-mers (orange). In Größe und Form sind beide 2x6-mer fast identisch. Die Übereinanderlagerung beider 3D-Rekonstruktionen in Chimera ergab einen Korrelationswert von 89 %.

4.2 Vergleich des Halbmoleküls (2x6-mer) von *C. truncata* mit dem 2x6-mer von *C. maenas*

Die 3D-Struktur des Halbmoleküls von *C. truncata* sieht dem 2x6-meren Hämocyanin der Strandkrabbe *C. maenas* sehr ähnlich. Zum direkten Vergleich wurde eine 20 Å-Struktur des 2x6-mers von *C. maenas* herangezogen, die in unserer Arbeitsgruppe vor einigen Jahren erstellt wurde (Arnold, 2012). Die direkte Übereinanderlagerung beider 3D-Rekonstruktionen mit dem Programm Chimera ergibt einen Korrelationswert von ca. 90 %. Auffällig ist, dass der Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers von *C. maenas* kleiner ausfällt als beim 2x6-mer von *C. truncata*. Aus diesem Grund sind zusätzliche Massen zwischen den beiden Hexameren sichtbar (Abb. D.40 A/B). Diese könnten auf weitere Kontaktstellen zwischen den Untereinheiten der beiden Hexamere hindeuten und damit einen Unterschied zum Halbmolekül (2x6-mer) von *C. truncata* darstellen. Eine vor kurzem erstellte 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers von *C. maenas* mit einer Auflösung von 9 Å (Gatsogiannis, unpubliziert) bestätigte den kleineren Kippwinkel (13°) und die zusätzlichen Massebereiche zwischen den beiden Hexameren. Durch den kleineren Kippwinkel ergeben sich für die benachbarten Untereinheiten der beiden Hexamere zusätzliche Möglichkeiten miteinander in Kontakt zu treten. Der größere Kippwinkel (18°) beim 2x6-mer von *C. truncata* verhindert die Ausbildung weiterer Inter-Hexamer-Kontakte.

Zusätzlich unterscheiden sich beide 3D-Rekonstruktionen bei der Rotation des oberen Hexamers gegenüber dem unteren Hexamer. Die 3D-Struktur des 2x6-mers von *C. maenas* weist eine Rotation von 70° zwischen den beiden Hexameren auf und entspricht somit dem Rotationswinkel, der auch beim extrahierten 2x6-mer vom 4x6-mer des CtH (s. Abb. C.18 C) gemessen wurde. Bei der 3D-Rekonstruktion des Halbmoleküls (2x6-mer) von *C. truncata* ist das obere Hexamer gegenüber dem unteren um 75° verdreht (s. Abb. C.19 C). Die Übereinanderlagerung der 3D-Rekonstruktionen des 2x6-mers von *C. maenas* und der des Halbmoleküls (2x6-mer) von *C. truncata* ergab einen Korrelationswert von 85 %.

C. maenas besitzt drei verschiedene Untereinheiten-Typen (Markl & Kempfer 1981a, Markl 1986), die essentiell für die Assemblierung zum 2x6-mer sind. Die unterschiedliche Untereinheiten-Zusammensetzung könnte zu einer leicht veränderten Assemblierung des 2x6-mers von *C. maenas* führen, indem sie dort zusätzliche Brücken ermöglicht.

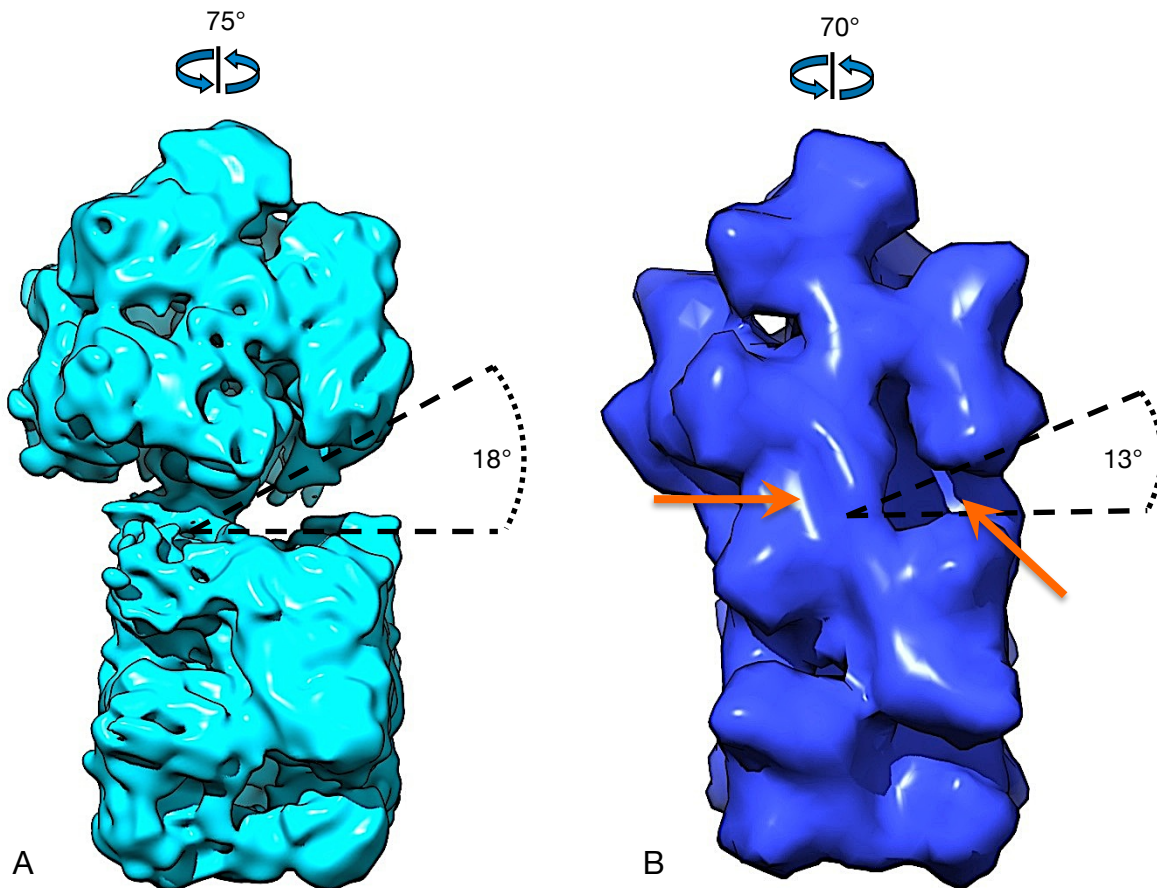


Abb. D.40: Vergleich der **(A)** 3D-Rekonstruktion des solitären 2x6-mers von *C. truncata* und der **(B)** 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers der Strandkrabbe *C. maenas* (Arnold, 2012). Beide 3D-Rekonstruktionen zeigen einen vergleichbaren Aufbau. Die **(B)** 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers von *C. maenas* weist zusätzliche Massen zwischen den beiden Hexameren auf (orangefarbene Pfeile). Diese zusätzlichen Massen konnten mit Hilfe der 9 Å-Rekonstruktion von Gatsogiannis (unpubliziert) bestätigt werden. Die Ursache hierfür ist ein verkleinerter Kippwinkel (13°), der zwischen den Hexameren auftritt. Dadurch verringert sich der Abstand zwischen den beiden benachbarten Hexameren und die sich dort befindlichen Untereinheiten sind in der Lage, zusätzliche Inter-Hexamer-Brücken auszubilden. Diese sind in der **(A)** 3D-Rekonstruktion des Halbmoleküls von *C. truncata* nicht vorhanden.

Vermutlich hat sich das 2x6-mer von *C. maenas* aus dem Halbmerkül (2x6-mer) eines 4x6-mers entwickelt. Der kleinere Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers von *C. maenas* kann sich etabliert haben, da so die Quartärstruktur des 2x6-mers an Stabilität gewinnt. Hier sollte nochmal erwähnt werden, dass es sich bei dem Halbmerkül (2x6-mer) von *C. truncata* um eine Zwischenstufe zum nativen 4x6-mer handelt. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim 2x6-mer von *C. maenas* bereits um das native Hämocyanin, das in der Hämolymphe hauptsächlich vorkommt.

4.3 Vergleich eines aus dem 4x6-mer extrahierten Hexamers mit dem kristallografischen Hexamer (1HCY) der Languste *P. interruptus*

Die beiden Untereinheitentypen des CtH (CtH-1/CtH-2) wurden an einer Untereinheit des kristallografischen Hexamers 1HCY von *P. interruptus* (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) modelliert. Daher weisen die pseudoatomaren Modelle von CtH-1 und CtH-2 zur Untereinheit der Kristallstruktur 1HCY eine sehr hohe Ähnlichkeit auf. Unterschiede zur Kristallstruktur 1HCY ergeben sich durch das flexible Einpassen der erstellten Homologiemodelle in die 4,9 Å-Struktur des CtH. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit sich die Grundstruktur eines einzelnen Hexamers nach dem flexiblen Einpassen in die 3D-Rekonstruktion von dem kristallografischen Hexamer unterscheidet. Hierzu wurde das pseudoatomare Modell eines Hexamers aus dem 4x6-mer des CtH extrahiert und mit der Kristallstruktur 1HCY verglichen.

Der Vergleich zeigt, dass die beiden Hexamere sich in Form und Größe sehr ähnlich sind. Allerdings sind kleine Verschiebungen zwischen den Sekundärstrukturen der jeweiligen Untereinheiten zu erkennen. Das Hexamer besteht aus zwei überlagerten Trimeren. Beim kristallografischen Hexamer ist eine leichte Verdrehung der beiden Trimeren gegenüber den Trimeren des pseudoatomaren Hexamers festzustellen (Abb. D.41 A/C). Um diese Verdrehung besser sichtbar zu machen, wurden für beide Hexamere Dichtekarten mit einer Auflösung von 4 Å simuliert und anschließend verglichen. Die leichte Verdrehung der beiden Trimere der Kristallstruktur 1HCY gegenüber den beiden Trimeren des pseudoatomaren Modells ist deutlich zu erkennen (Abb. D.41 B/D). Es ist möglich, dass die Kristallstruktur 1HCY und das pseudoatomare Modell des 1x6-mers zwei unterschiedliche Konformationen repräsentieren. Zu beachten ist, dass es sich beim 1x6-mer von *P. interruptus* bereits um das native Hämocyanin handelt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Assoziation der vier Hexamere zu den zwei Halbmolekülen (2x6-mer) bzw. zum nativen 4x6-mer Konformationsänderungen am einzelnen Hexamer auftreten und diese somit eine etwas veränderte Quartärstruktur aufweisen könnten.

Eine leichte Verdrehung der Trimere konnte auch zwischen der Kristallstruktur 1HCY (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) und den pseudoatomaren Modellen der extrahierten Hexamere aus dem oxy- und deoxy-LpH festgestellt werden (Abb. D.12). Dort spielte allerdings die Kippbewegung von Domäne #1 gegenüber Domäne #2 und #3 eine stärkere Rolle.

Hier jedoch diene eine Untereinheit der Kristallstruktur 1HCY bei der Homologiemodellierung der Untereinheit CtH-1 und CtH-2 als Referenz. Ein Unterschied bei der Kippbewegung von Domäne #1 ist daher kaum zu erkennen.

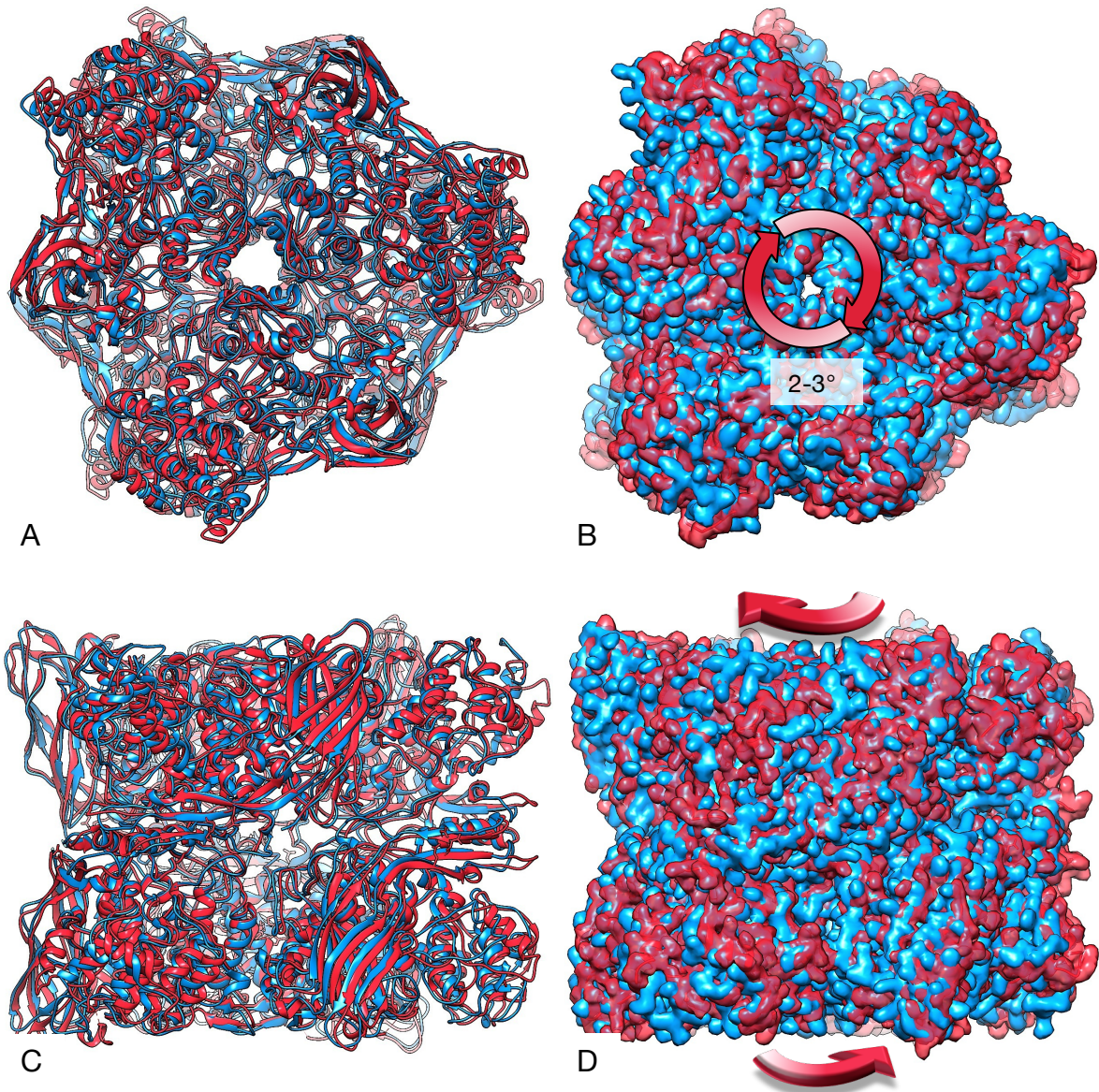


Abb. D.41: Vergleich des **(A/C)** kristallografischen Hexamers 1HCY von *P. interruptus* (rot) (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) und des **(A/C)** pseudoatomaren Modells eines extrahierten Hexamers (hellblau) aus dem 4x6-mer des CtH mit den dazu simulierten Dichtekarten **(B/D)**. **A:** Topansicht auf die beiden Hexamere. Es sind leichte Verschiebungen von einigen Sekundärstrukturelementen an den jeweiligen Untereinheiten des oberen Trimers zu erkennen. **B:** Die simulierten Dichtekarten des kristallografischen Hexamers 1HCY (rot) und des pseudoatomaren Modells (hellblau) liegen übereinander. Es ist eine leichte Verdrehung des oberen Trimers von 1HCY gegenüber dem oberen Trimer des pseudoatomaren Modells zu erkennen (rote Pfeile / 2-3°). **C:** Die Seitenansicht der Kristallstruktur des Hexamers 1HCY (rot) und des pseudoatomaren Modells (hellblau) sowie die dazugehörigen **(D)** simulierten Dichtekarten. Auch hier ist die leichte Verdrehung der beiden Trimere nachvollziehbar. Das obere Trimer von 1HCY dreht sich leicht nach links (2°), während sich das untere Trimer leicht nach rechts dreht (2°).

4.4 Vergleich der pseudoatomaren Modelle von Untereinheit CtH-1 und CtH-2 aus der 4,9 Å-Rekonstruktion mit einer Untereinheit aus dem kristallografischen Hexamer (1HCY)

Der Vergleich der Untereinheiten sollte Hinweise darauf geben, inwieweit eine mögliche Konformationsänderung der einzelnen Untereinheiten Einfluss auf die beobachtete Verdrehung der beiden Trimere im Hexamer nimmt.

Die Untereinheiten des kristallografischen Hexamers 1HCY (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) scheinen im Vergleich zu den Untereinheiten CtH-1 und CtH-2 eine leichte Verschiebung innerhalb der Tertiärstruktur zu erfahren. Besonders deutlich ist dies beim Vergleich mit CtH-1 zu erkennen (Abb. D.42 A). Die Gesamtheit dieser Verschiebungen innerhalb der einzelnen Untereinheiten resultiert letztendlich in der leichten Verdrehung der beiden Trimere im Hexamer, die im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde.

Es kann mehrere Gründe für die leichte Verschiebung geben. Die Assoziation der vier Hexamere zu den zwei Halbmolekülen (2x6-mer) und schließlich zum finalen 4x6-mer des CtH können Konformationsänderungen innerhalb der einzelnen Hexamere und ihren jeweiligen Untereinheiten hervorrufen. Zudem ist wahrscheinlich das flexible Einpassen der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten CtH-1 und CtH-2 in die 4,9 Å-Struktur des 4x6-mers in einigen Bereichen nicht optimal. Für eine C-alpha-Kettenermittlung innerhalb der erstellten 3D-Rekonstruktion des 4x6-mers reichte die erzielte Auflösung von 4,9 Å nicht aus.

Auffällig ist, dass kein Unterschied bei der Kippbewegung von Domäne #1 gegenüber Domäne #2 und #3 zu beobachten ist. Der Grund hierfür könnte sein, dass eine Untereinheit der Kristallstruktur 1HCY (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) beim Homologiemodellieren als Referenz diente. Interessant ist, dass nach dem flexiblen Einpassen der pseudoatomaren Modelle in die 4,9 Å-Struktur, die oben beschriebenen leichten Verschiebungen verschiedener Sekundärstrukturelemente zu beobachten sind. Ähnliche Verschiebungen konnten bereits bei den verschiedenen Untereinheiten des LpH im oxy- und deoxy-Zustand beobachtet werden (s. Abschnitt D.2.4).

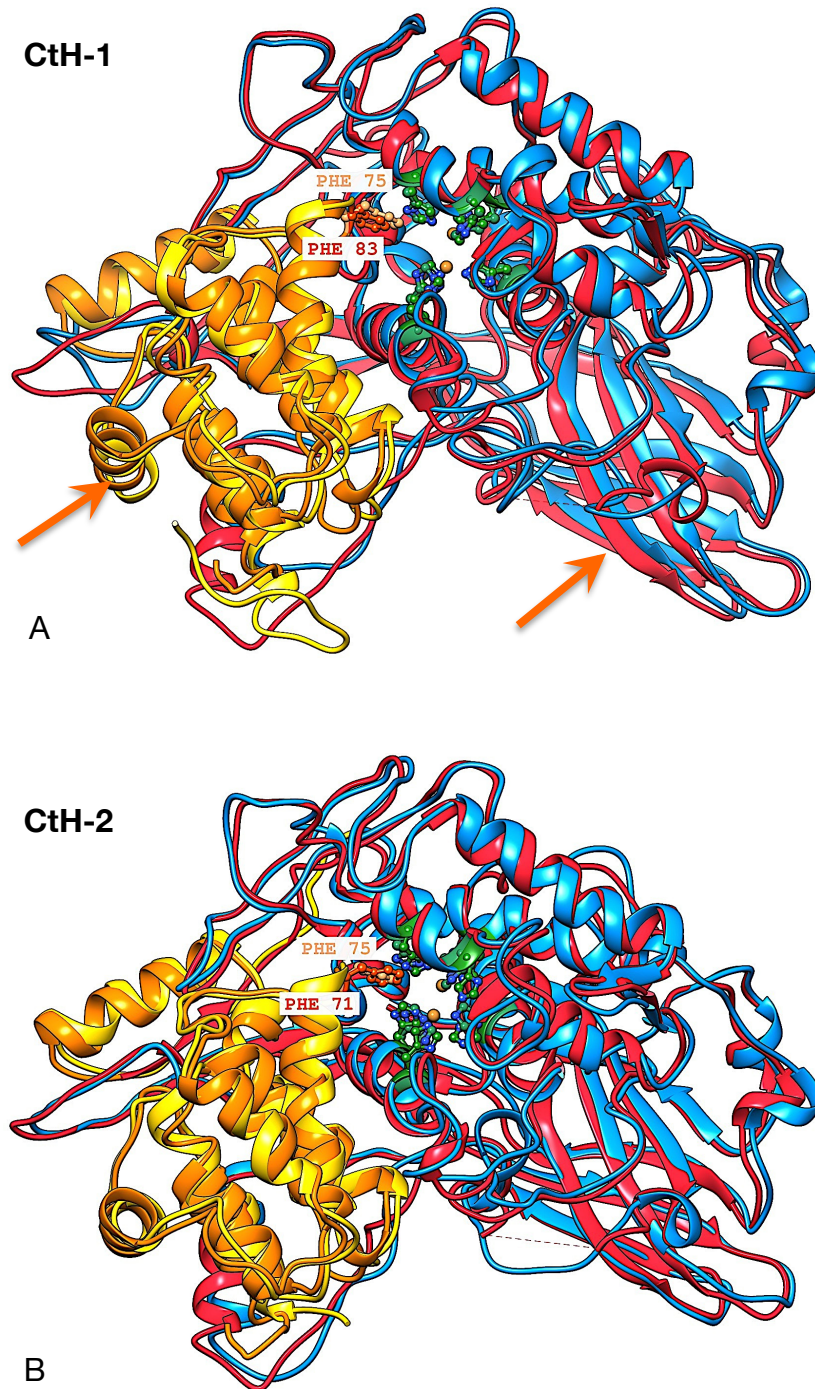


Abb. D.42: Vergleich der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten **(A)** CtH-1 und **(B)** CtH-2 mit einer Untereinheit aus dem kristallografischen Hexamer 1HCY (rot). Die Domäne #1 ist bei **(A)** CtH-1 und **(B)** CtH-2 gelb und bei 1HCY orange eingefärbt. Die Histidine (grün), die am aktiven Zentrum beteiligt sind, und das hochkonservierte Phenylalanin F75/83/71 sind gesondert dargestellt. **A:** Die Untereinheit von 1HCY (rot) ist gegenüber CtH-1 (hellblau) an einigen Sekundärstrukturbereichen leicht verschoben (orangefarbene Pfeile). **B:** Zwischen CtH-2 und der Untereinheit von 1HCY fällt die Verschiebung nicht so deutlich auf. Die Positionen der hochkonservierten Phenylalanine F71, F75 und F83 sind in allen drei Modellen fast identisch. Keines der aufgeführten Phenylalanine versperrt den Eingangsbereich zum aktiven Zentrum.

Die nicht beobachtete Kippbewegung bei den Untereinheiten des oxy- und deoxy-LpH lässt noch eine weitere Hypothese zu: eventuell zeigen die Untereinheiten der Kristallstruktur 1HCY (Gaykema et al., 1986; Volbeda et al., 1989) den allgemeinen strukturellen Zustand des aktiven Zentrums beim Crustaceen-Hämocyanin an, während die Kristallstruktur 1NOL / 1LLA der Untereinheit II von LpH die grundsätzliche Strukturkonformation des aktiven Zentrums beim Cheliceraten-Hämocyanin darstellt. Die beobachtete Kippbewegung der Domäne #1 gegenüber Domäne #2 und #3 von $7,5^\circ$ würde also nicht den Unterschied zwischen den beiden Oxygenierungszuständen aufzeigen, sondern einen grundsätzlichen strukturellen Unterschied, der sich zwischen Crustaceen- und Cheliceraten-Hämocyanin ergibt. Gestützt wird diese Hypothese durch den in dieser Arbeit durchgeführten Vergleich zwischen den oxy- und deoxy-Untereinheiten des LpH. Hier konnte gezeigt werden, dass zwischen den beiden Oxygenierungszuständen nur eine sehr kleine Kippbewegung zwischen Domäne #1 und den beiden Domänen #2 und #3 erkennbar ist.

Es sollte allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass viele weitere Faktoren (unterschiedliche Pufferzusammensetzung, pH-Wert etc.) an diesem Strukturunterschied beteiligt sein könnten. Um eine genauere Aussage darüber treffen zu können, ob es sich bei der Kippbewegung tatsächlich um eine Strukturveränderung handelt, die durch einen unterschiedlichen Oxygenierungszustand ausgelöst wird, müsste man vom Hämocyanin von *P. interruptus* eine hochaufgelöste 3D-Rekonstruktion im oxy- und deoxy-Zustand berechnen und diese anschließend vergleichen.

5. Analyse der 8,6 Å-Struktur des 2x6-mers von *L. oceanica*

5.1 Vergleich des 2x6-mers von *L. oceanica* mit einem extrahierten 2x6-mer von *C. truncata*

Auf den ersten Blick wies die 8,6 Å-Struktur des 2x6-mers von *L. oceanica* große Ähnlichkeiten mit einem der drei möglichen Halbmoleküle (2x6-mer) (Abb. A.9 B) des 4x6-mers von *C. truncata* auf. Diese Beobachtung von Arnold (2012) legte die Vermutung nahe, dass dieses 2x6-mer mit dem 4x6-mer nahe verwandt ist. Die direkte Übereinanderlagerung beider 2x6-mer zeigte einen Korrelationswert von 78 % (Abb. D.43 A). Dieser Wert ergibt sich zum einen aus der niedrigen Auflösung der 8,6 Å-Struktur und zum anderen sind einige strukturelle Unterschiede zwischen den 2x6-meren erkennbar. Der Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers ist bei *L. oceanica* mit 15° deutlich geringer, als die gemessenen 21° beim extrahierten 2x6-mer von *C. truncata* (Abb. D.43 B/C). Durch diesen kleineren Winkel erscheinen die seitlichen Kontaktstellen zwischen den beiden Hexameren kompakter. Zusätzlich liegt bei *L. oceanica* zwischen den beiden Hexameren eine Verdrehung um 26° vor, während es beim extrahierten 2x6-mer von *C. truncata* 20° sind (Abb. D.43 B/C). Durch diese unterschiedliche Verdrehung der beiden Hexamere ändern sich auch die Positionen der jeweiligen Kontaktstellen. Dies kann wiederum dazu führen, dass sich der Kippwinkel zwischen den Hexameren des 2x6-mers ändert.

Es ist interessant, dass ein verkleinerter Kippwinkel nicht nur zwischen den Hexameren des 2x6-mer von *L. oceanica* auftritt, sondern auch zwischen den Hexameren des 2x6-mers von *C. maenas* zu beobachten ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass diese strukturelle Veränderung tatsächlich die Stabilität der jeweiligen 2x6-mer verbessert. Strukturell gesehen ist es also durchaus möglich, dass sich aus einem ursprünglichen 4x6-mer einmal das für brachyure Krabben bekannte 2x6-mer entwickelt hat, während sich bei den Asseln die andere Form des 2x6-mers etabliert hat. Die strukturellen Ähnlichkeiten zu den Halbmolekülen des 4x6-mers von *C. truncata* könnten aber auch zufällig sein. Eine genaue molekulare Analyse der Kontaktstellen ist hier für eine Entscheidung erforderlich.

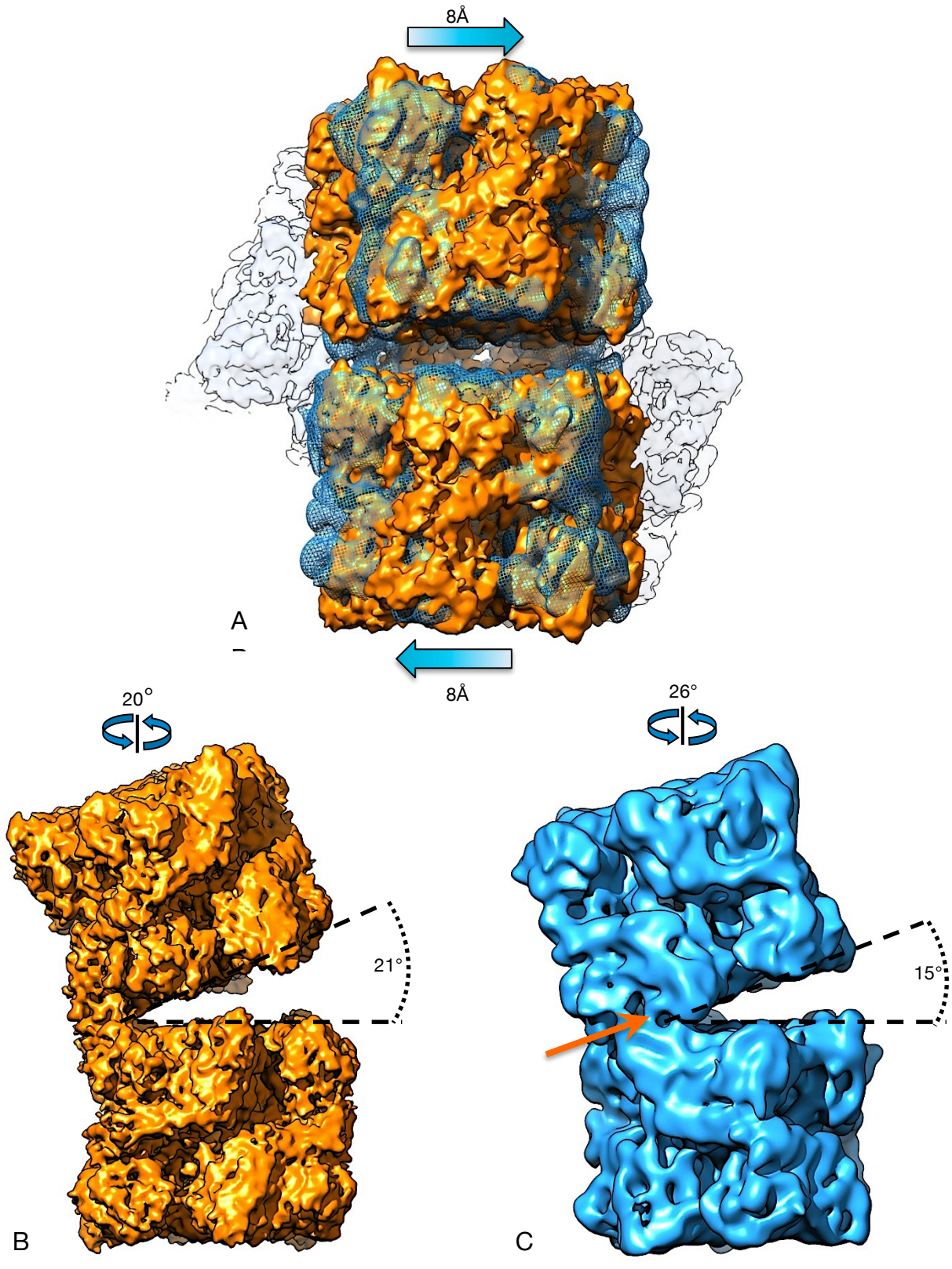


Abb. D.43: Vergleich der 8,6 Å-Struktur des 2x6-mers von *L. oceanica* mit einem der möglichen Halbmerkmale (2x6-mer) des 4x6-mers von *C. truncata*. **A:** Die Übereinanderlagerung beider Strukturen zeigt, dass die beiden Hexamere der 8,6 Å-Struktur (blau) um ca. 16 Å gegeneinander verschoben sind. Die Korrelation zwischen beiden Strukturen beträgt ca. 78 %. **B/C:** Der Kippwinkel zwischen den beiden Hexameren des Halbmerkmals (2x6-mer) (orange) beträgt 21° und ist damit um 6° größer als bei der 8,6 Å-Struktur von *L. oceanica*. Aufgrund des geringeren Kippwinkels ergeben sich zusätzliche Kontaktstellen zwischen den beiden Hexameren (orangefarbene Pfeile), die wahrscheinlich die Stabilität des 2x6-mers erhöhen.

5.2 Analyse der Kontaktstellen des 2x6-mers von *L. oceanica*

Betrachtet man bei *L. oceanica* die Kontaktstellen zwischen den beiden Hexameren des 2x6-mers, befindet sich zentral eine kleine Massebrücke und seitlich zwei größere Massebrücken. Es wurde bereits vermutet, dass an der Ausbildung der Kontaktstellen jeweils zwei Untereinheiten pro Hexamer beteiligt sind (Arnold, 2012). Dies konnte anhand der 8,6 Å-Struktur bestätigt werden (Abb. D.44 A/B). Es ist jedoch bisher nicht bekannt, wieviele Untereinheitentypen *L. oceanica* insgesamt besitzt. Bisher sind von *L. oceanica* zwei Hämocyanin-Sequenzen bekannt, von denen nur eine vollständig vorliegt (Meyer und Markl, unpubliziert). Es ist jedoch möglich, dass sich das Hämocyanin von *Ligia* noch aus weiteren Untereinheitentypen zusammensetzt.

Einen möglichen Hinweis auf die Zusammensetzung der Untereinheiten könnte die Untersuchung des Hämocyanins der pazifischen Meeresassel *Ligia pallasii* geben (Terwilliger, 1982). Für die Assemblierung des 2x6-mers von *L. pallasii* scheinen zwei unterschiedliche Untereinheiten verantwortlich zu sein. Die Untersuchung von isolierten 1x6-meren brachte nur einen Untereinheitentyp hervor. Weiterhin wurde vermutet, dass die beiden Untereinheiten in den jeweiligen Hexameren des 2x6-mers im Verhältnis von 5:1 auftreten (Terwilliger, 1982). Für das Hämocyanin der Seeassel *E. pulchra* wurden ebenfalls zwei verschiedene Untereinheitentypen festgestellt (Jaenicke et al., 2009). Die Wahrscheinlichkeit ist daher recht groß, dass sich auch das 2x6-mer von *L. oceanica* aus zwei Untereinheitentypen zusammensetzt.

Um einen ersten Eindruck zur möglichen Anordnung der Untereinheiten im 2x6-mer zu erhalten, wurde mit Hilfe der vorliegenden Sequenz der Untereinheit LoH-1 ein Homologiemodell erstellt und versuchsweise in die 8,6 Å-Struktur starr eingepasst. Anschließend wurden im Bereich der Kontaktstellen die Aminosäuren betrachtet, die möglicherweise am Aufbau der jeweiligen Kontaktstellen beteiligt sein könnten (Abb. D.44 A-D). Zu beachten ist, dass alle Positionen im 2x6-mer mit dem Homologiemodell von LoH-1 besetzt wurden. Abbildung D.44 C/D zeigt die hypothetische Anordnung der Untereinheitentypen im 2x6-mer von *L. oceanica*.

Die kleine zentrale Kontaktstelle bildet sich möglicherweise durch hydrophobe Wechselwirkungen zweier konservierter Leucine (in LoH-1 L45). Dieses Leucin ist im Hämocyanin der Asseln weitestgehend konserviert. In direkter Umgebung befinden sich mehrere saure Aminosäuren, die mit Hilfe eines zweiwertigen Kations (Ca^{2+}) in der Lage wären, untereinander in Kontakt zu treten, und diese Kontaktstelle zusätzlich stabilisieren.

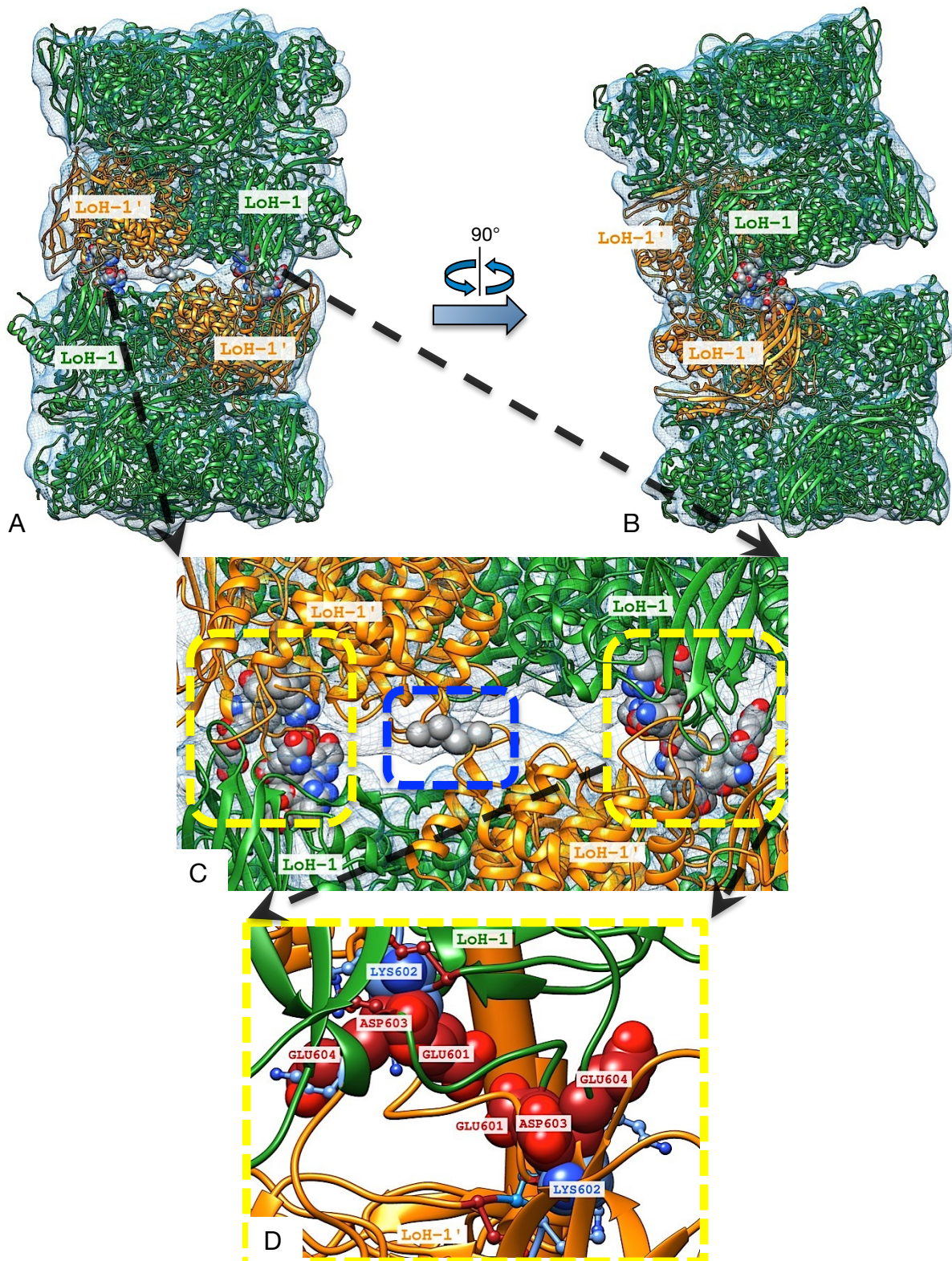


Abb. D.44: Mögliche Topologie der beiden Untereinzentypen LoH-1 (grün) und LoH-1'(orange). Diese Topologie der Untereinheiten (CtH-1 und CtH-2) lässt sich auch in dem vermuteten Halb molekül des 4x6-mers von *C. truncata* feststellen. **A/B:** Die Kontaktstellen zwischen den beiden Hexameren des 1x6-mers werden von jeweils zwei Untereinheiten ausgebildet. **C:** Möglicherweise wird dabei das Hauptinterface (gelbes Rechteck) zwischen den Untereinheiten LoH-1 und LoH-1' ausgebildet, während sich das kleine zentrale Interface (blaues Rechteck) zwischen den beiden Untereinheiten LoH-1' bildet. **D:** Für die Ausbildung elektrostatischer Inter-Hexamer-Brücken im Bereich des Hauptinterfaces ist die Aminosäuresequenz $^{601}\text{EKDE}^{604}$ (als Sphären dargestellt) zwingend erforderlich.

Am Hauptinterface, das zweimal vorhanden ist (seitliche Interfaces), scheinen vor allem drei Sequenzabschnitte beteiligt zu sein. ⁵⁹³KD⁵⁹⁴, der beim Asseln-Hämocyanin konserviert vorliegt, ⁶²¹DRR⁶²³, der bei allen Arthropoden-Hämocyaninen auftritt, und ⁶⁰¹EKDE⁶⁰⁴, der ausschließlich bei Assel-Hämocyaninen konserviert vorliegt. Der letzte Sequenzabschnitt ist dabei notwendig für die Ausbildung elektrostatischer Inter-Hexamer-Brücken. Da aber dieser Sequenzbereich bei allen Assel-Untereinheiten auftritt, würde dies bedeuten, dass sie alle als Inter-Hexamer-Linker fungieren könnten. Das lässt die Frage aufkommen, weshalb die Assemblierung beim 2x6-mer stoppt.

Weiterhin ist zu beachten, dass die Auflösung der 8,6 Å-Struktur nicht ausreicht, um ein genaueres Einpassen der Homologiemodelle zu bewerkstelligen. Ihr starres Einpassen liefert die grobe Position der jeweiligen Untereinheiten in der 3D-Rekonstruktion. Gerade im Bereich von Loops können jedoch diverse strukturelle Unterschiede auftreten. Möglicherweise sind gerade am Hauptinterface andere bzw. weitere Aminosäuresequenzen beteiligt, die mit der momentanen 8,6 Å-Struktur nicht identifiziert werden können. Für detailliertere Aussagen zu den Kontaktstellen des 2x6-mers wird eine 3D-Rekonstruktion mit einer höheren Auflösung benötigt. Ebenso sollte auch die Sequenz der zweiten Untereinheit vollständig vorliegen.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen dennoch folgende Hypothese zu: ausgehend von einem 4x6-mer mit zwei verschiedenen Untereinheiten hat sich, durch Wegfall des "Hexamer-Linkers", das 2x6-mer des Isopoden-Typs entwickelt und durch Entwicklung einer zusätzlichen stabilisierenden Untereinheit das 2x6-mer vom Decapoden-Typ.

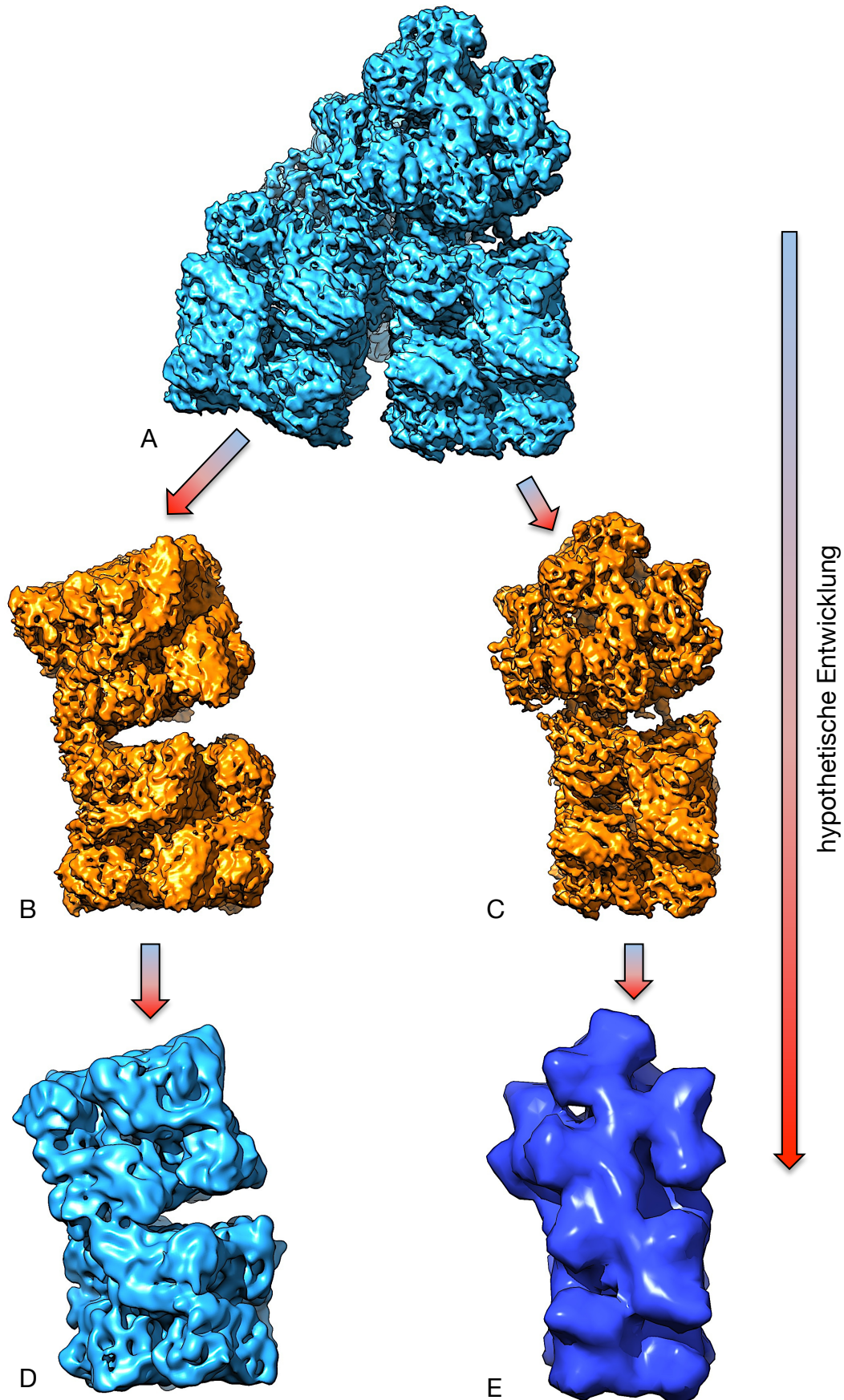


Abb. D.45: Hypothetische Entwicklung der 2x6-mere vom **(D)** Isopoden-Typ und **(E)** Decapoden-Typ aus einem ursprünglichen 4x6-mer. **A:** Das 4x6-mer von *C. truncata*. **B:** Ein extrahiertes 2x6-mer aus dem 4x6-mer. Aus diesem hat sich möglicherweise der **(D)** Isopoden-Typ entwickelt. **C:** Aus diesem Halbmolekül hat sich wahrscheinlich der **(E)** Decapoden-Typ entwickelt.

E. Zusammenfassung

Bei den kupferhaltigen Hämocyaninen der Arthropoden handelt es sich um große, extrazelluläre respiratorische Proteine, die sich aus mehreren Untereinheitentypen zusammensetzen, und Hexamere (1x6-mer) bzw. Oligohexamere (2x6-mer, 4x6-mer, 6x6-mer, 8x6-mer) bilden. Für detaillierte Aussagen über die Funktionsweise bei der reversiblen O₂-Bindung dieser Proteine benötigt man genaue Kenntnisse über deren dreidimensionale Struktur. Für die Aufklärung der Quartärstruktur eines solch großen Proteins ist die 3D-Elektronenmikroskopie hervorragend geeignet, da sie detaillierte 3D-Rekonstruktionen liefert. Damit wurden in dieser Arbeit die Quartärstrukturen von drei unterschiedlichen Arthropoden-Hämocyaninen erstellt und analysiert.

Für das 8x6-mer Hämocyanin des Pfeilschwanzes *Limulus polyphemus* wurden zwei 3D-Rekonstruktionen erstellt. Die erste 3D-Rekonstruktion besitzt eine Auflösung von 7,3 Å und stellt den deoxygenierten Zustand des respiratorischen Proteins dar. Die zweite 3D-Rekonstruktion des 8x6-mers zeigt den oxygenierten Zustand des Proteins und besitzt eine Auflösung von 7,9 Å. Die strukturellen Unterschiede zwischen beiden 3D-Rekonstruktionen wurden genauer untersucht und analysiert. Durch das flexible Einpassen von Homologiemodellen der verschiedenen Untereinheitentypen in die entsprechenden 3D-Rekonstruktionen konnten die Kontaktstellen, die zwischen den Hexameren des 8x6-mers auftreten, genauer als früher beschrieben und erstmalig Unterschiede beider Konformationszustände ermittelt werden. Für zwei Kontaktstellen wurden molekulardynamische Simulationen durchgeführt, um Näheres über die Interaktion der beteiligten Aminosäuren zu erfahren.

Für das 4x6-mer des Maulwurfskrebsses *Callinassa truncata* wurde eine 3D-Rekonstruktion mit einer Auflösung von 4,9 Å erstellt. Diese erlaubte es, die Kontaktstellen der vier Hexamere mit Hilfe von Homologiemodellen der beiden Untereinheitentypen genauer zu untersuchen. Die vier hier beschriebenen Kontaktstellen wurden zusätzlich mit Hilfe molekulardynamischer Simulationen analysiert.

Die 3D-Rekonstruktion des 2x6-mers der Meeresassel *Ligia oceanica* erreichte eine Auflösung von 8,6 Å und erbrachte neue Erkenntnisse über die ungewöhnliche Assemblierung der beiden Hexamere und über die strukturelle Verwandtschaft der verschiedenen Crustaceen-Hämocyanine.

F. Anhang

1. Abbildungen zu den MD-Simulationen der Interfaces von *C. truncata*

1.1 MD-Simulationen der Inter-Hexamer-Interfaces des Hämocyanins von *C. truncata* mit unprotonierten und protonierten Histidinen

Für die erste MD-Simulation wurden die Standardeinstellungen des Programms GROMACS übernommen. Das bedeutet, dass alle Histidine im MD-System unprotoniert vorlagen.

Für die zweite MD-Simulation wurden die Einstellungen des Programms GROMACS leicht modifiziert. Alle Histidine im MD-System wurden vollständig protoniert und so in den geladenen Zustand überführt.

Die folgenden Abbildungen stellen die vier Interfaces von *C. truncata* zu je drei verschiedenen Zeitpunkten während den jeweiligen MD-Simulationen dar (nach 0 ns / Start der MD ; nach 50 ns / Hälfte der MD ; nach 100 ns / Ende der MD).

- Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2 / C_2 \leftrightarrow D_2$) (siehe Abschnitt C.2.4.2 / S.82)
- Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2 / B_2 \leftrightarrow D_2$) (siehe Abschnitt C.2.4.3 / S.87)
- Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2 / B_2 \leftrightarrow C_2$) (siehe Abschnitt C.2.4.2 / S.90)
- Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2 / B_2 \leftrightarrow C_1$) (siehe Abschnitt C.2.4.2 / S.95)

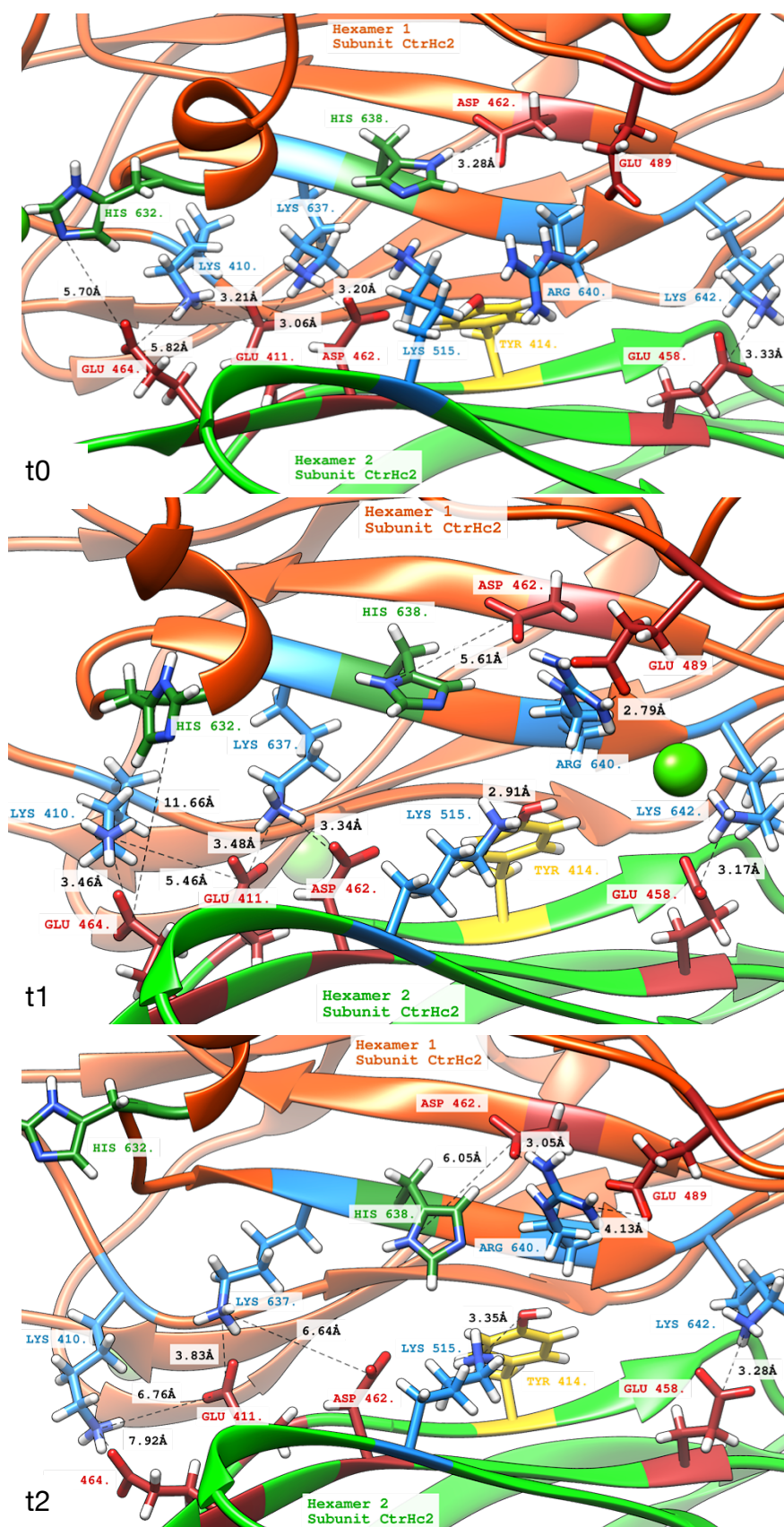
Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2/C_2 \leftrightarrow D_2$)

Abb. F.1: Das Interface I ($A_2 \leftrightarrow B_2/C_2 \leftrightarrow D_2$) zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen. t_0 =Start der MD; t_1 =MD nach 50ns; t_2 = MD nach 100 ns / Ende der MD. Genauere Erläuterungen siehe Abschnitt C.2.4.2 / S.83

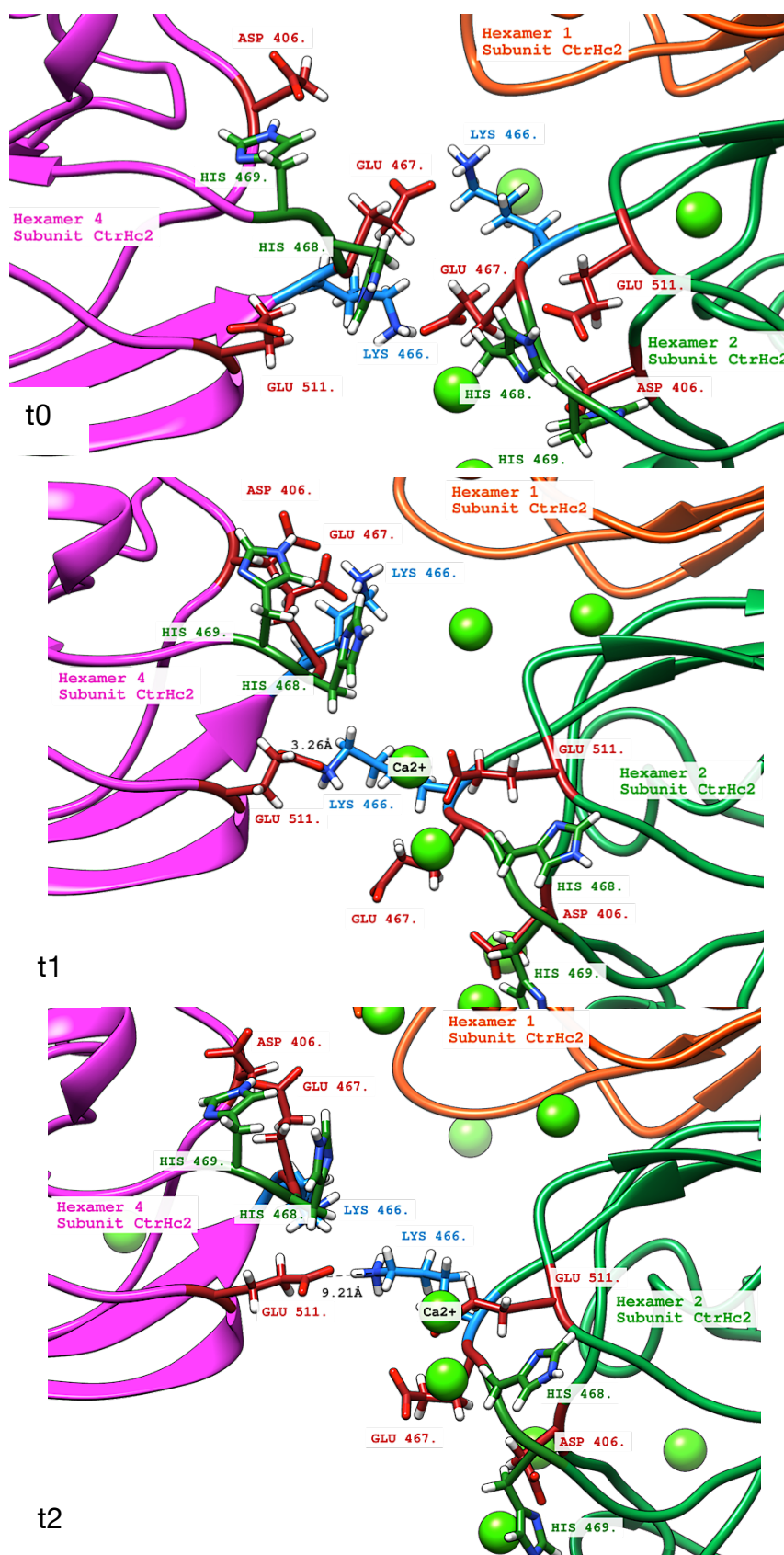
Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$)

Abb. F.3: Das Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$) zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der ersten MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen. **t0=Start; t1= nach 50ns; t2= nach 100ns / Ende der MD.** Erläuterungen siehe C.2.4.3/S.88.

Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$)

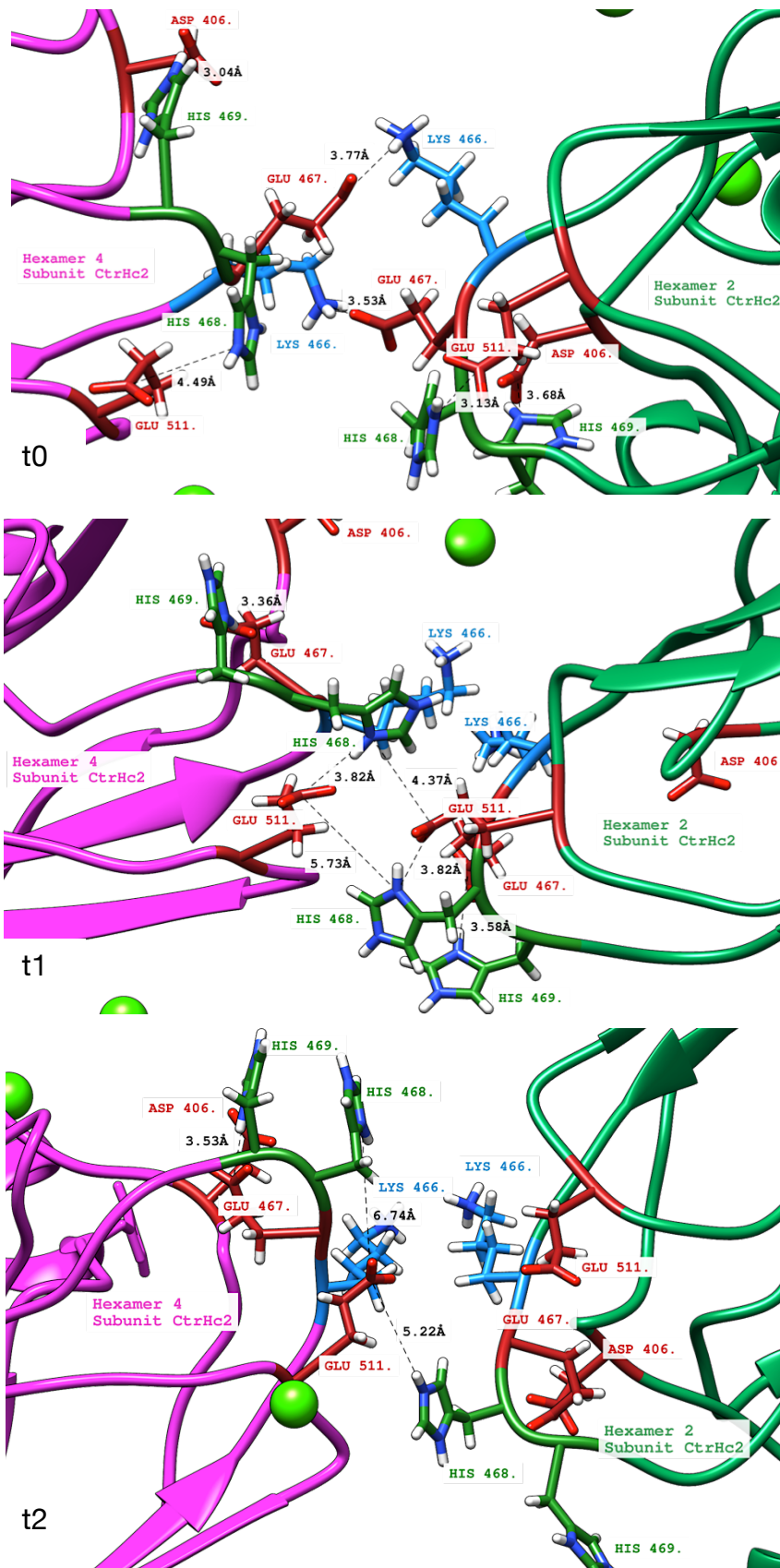


Abb. F.4: Das Interface II ($A_2 \leftrightarrow C_2/B_2 \leftrightarrow D_2$) zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der zweiten MD-Simulation mit protonierten Histidinen. **t0=Start; t1= nach 50ns; t2= nach 100ns / Ende der MD.** Erläuterungen siehe C.2.4.3/S.89.

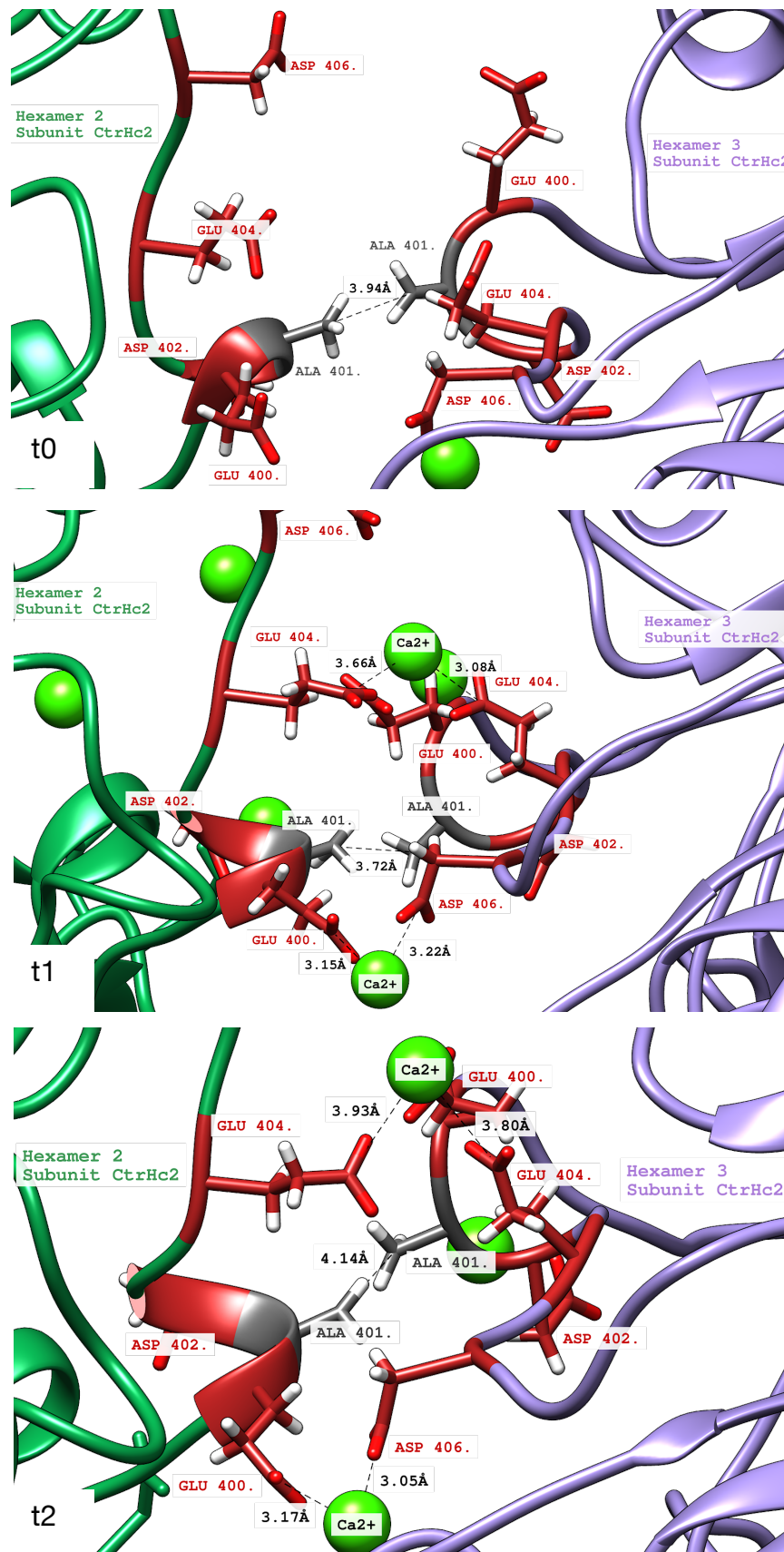
Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_2$)

Abb. F.5: Das Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_2$) zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der ersten MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen. **t0=Start; t1= nach 50ns; t2= nach 100ns / Ende der MD.** Erläuterungen siehe C.2.4.4/S.92.

Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_2$)

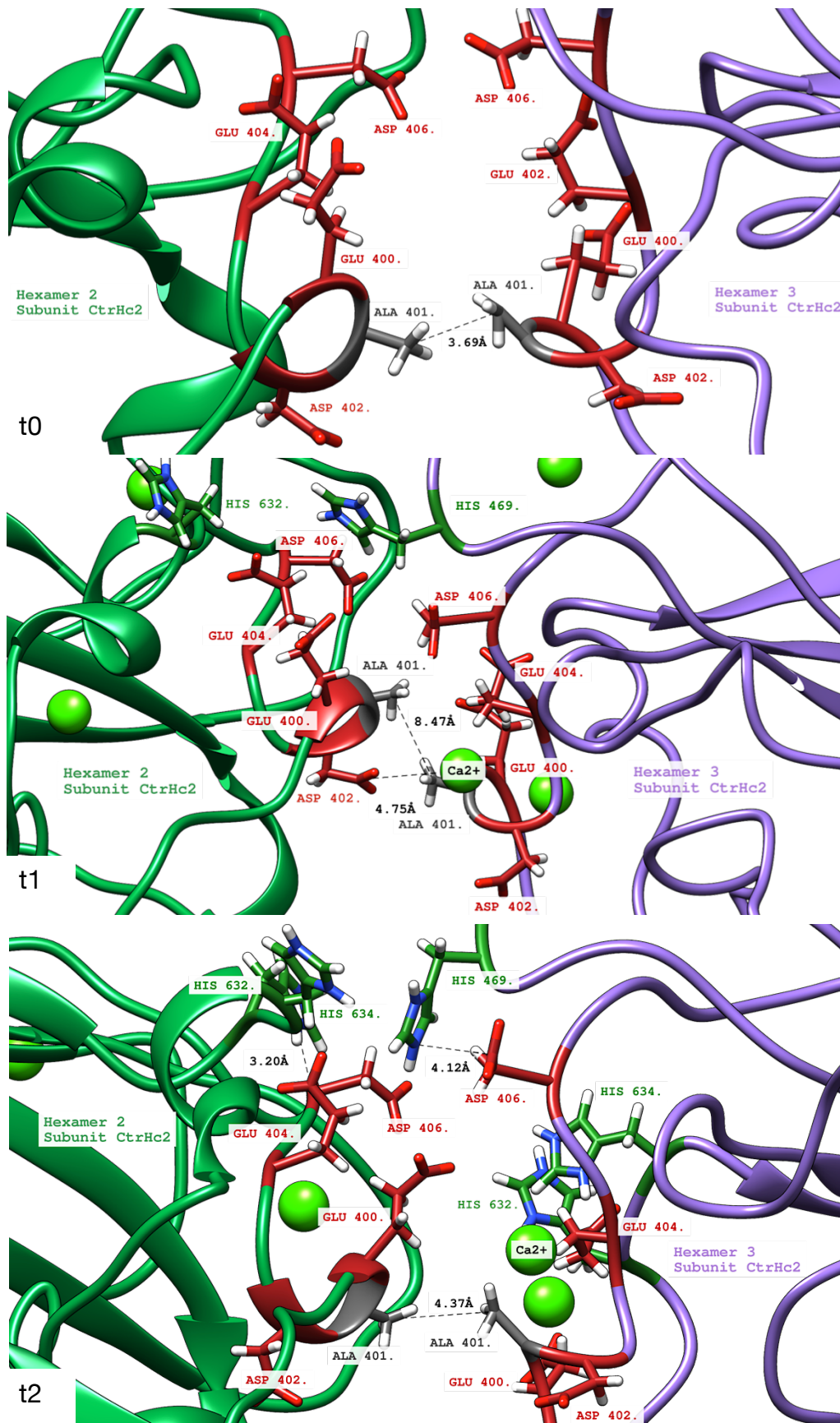


Abb. F.6: Das Interface III ($A_2 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_2$) zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der zweiten MD-Simulation mit protonierten Histidinen. **t0=Start; t1= nach 50ns; t2= nach 100ns / Ende der MD.** Erläuterungen siehe C.2.4.4/S.92.

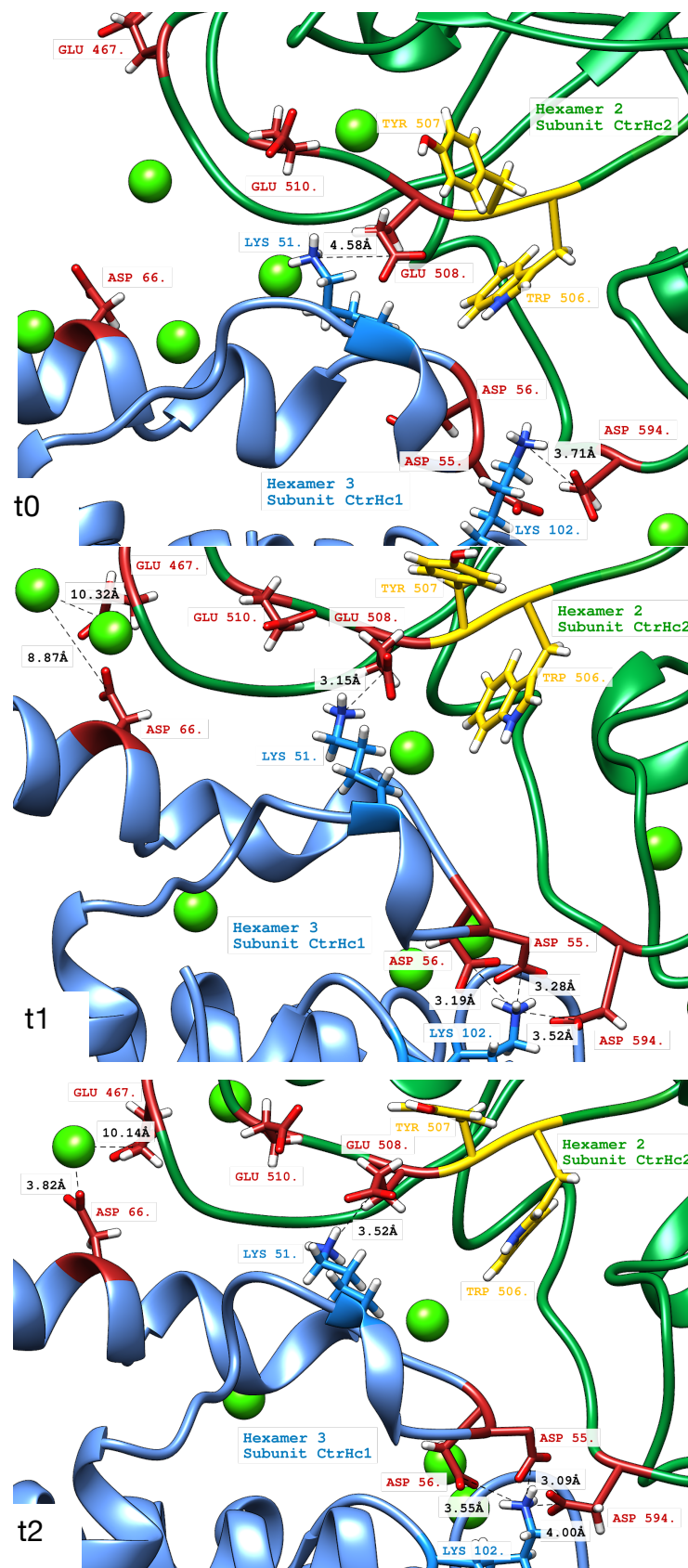
Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$)

Abb. F.7: Das Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$) zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der ersten MD-Simulation mit unprotonierten Histidinen. t_0 =Start; t_1 = nach 50ns; t_2 = nach 100ns / Ende der MD. Erläuterungen siehe C.2.4.5/S.96.

Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$)

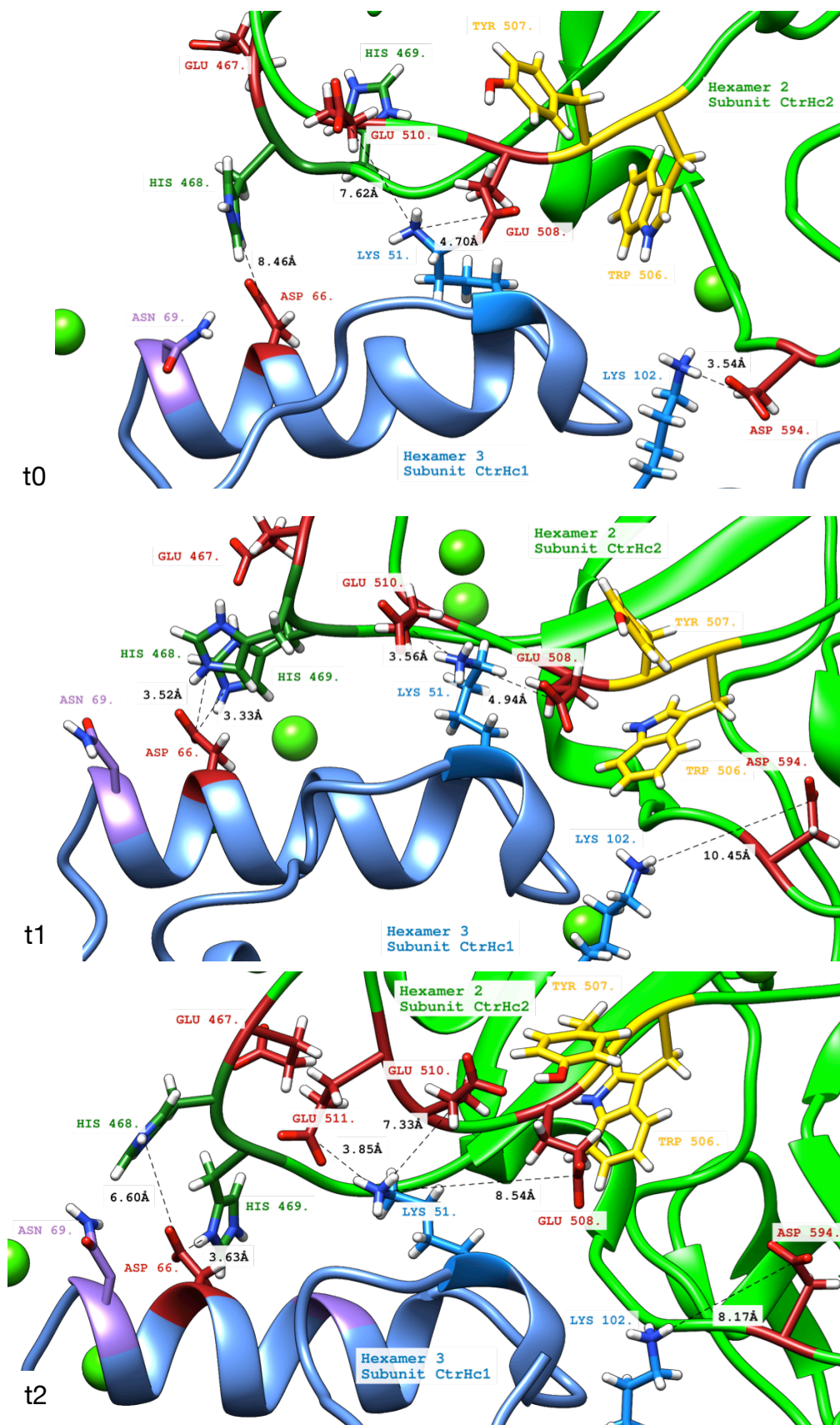


Abb. F.8: Das Interface IV ($A_1 \leftrightarrow D_2/B_2 \leftrightarrow C_1$) zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der zweiten MD-Simulation mit protonierten Histidinen. t_0 =Start; t_1 = nach 50ns; t_2 = nach 100ns / Ende der MD. Erläuterungen siehe C.2.4.5/S.97.

2. Vergleich der pseudoatomaren Modelle der Untereinheiten I, IIIA, IIIB, IV und VI von LpH im oxy- und deoxygenierten Zustand.

Alle pseudoatomaren Modelle sowie die dazugehörigen simulierten Dichtekarten, die den oxygenierten Zustand darstellen, sind farblich in blau/transparent, die im deoxygenierten Zustand in hellgrau/transparent gehalten.

Die Kupferatome sind orange dargestellt. In den Abbildungen der oxy-Zustände ist der Sauerstoff als rote Kugel dargestellt.

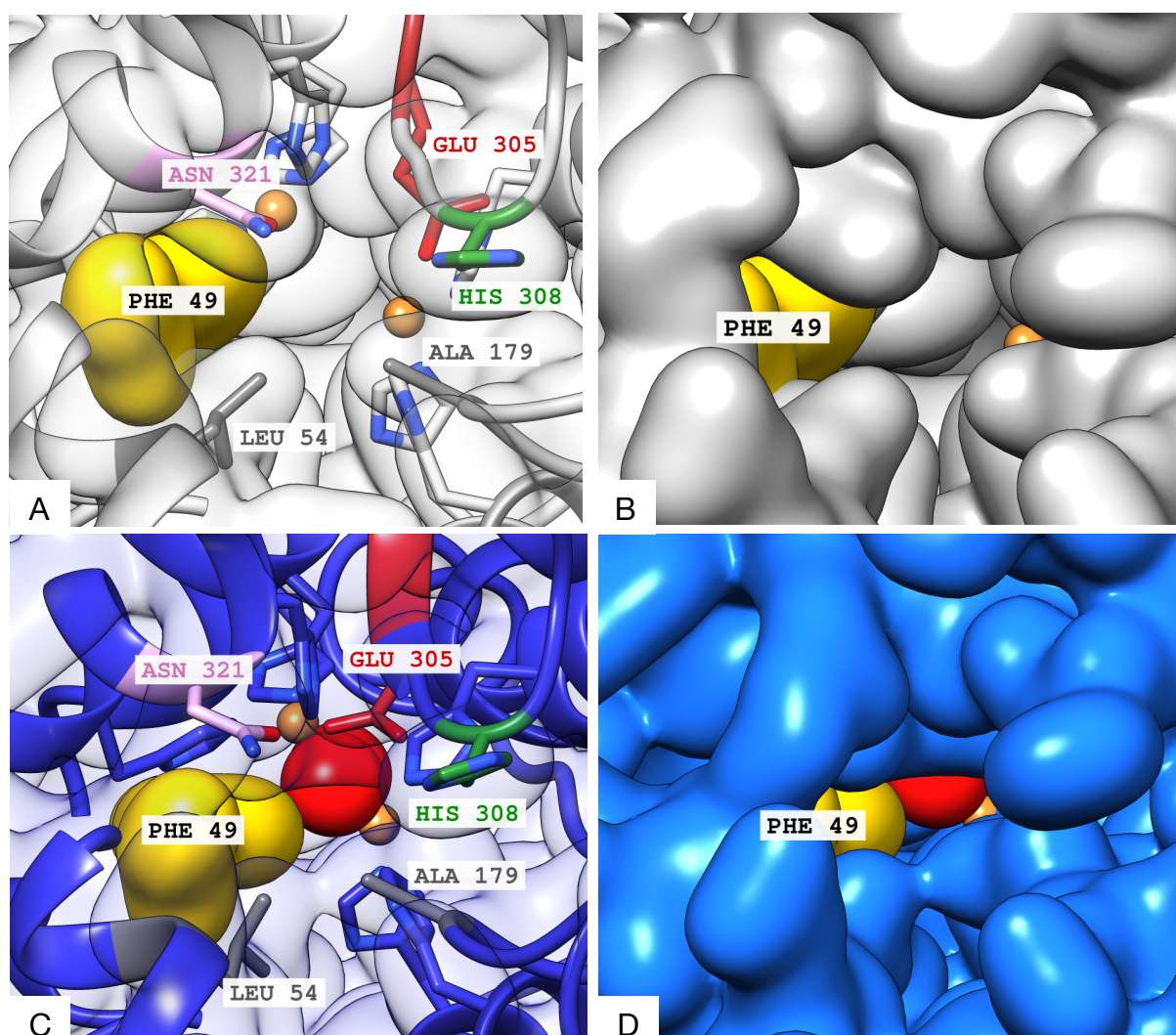


Abb. F.9: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit I im **(A/B)** deoxygenierten Zustand und **(C/D)** oxygenierten Zustand. **A/B:** Eine Verschiebung von F49 ist hier kaum erkennbar. Die Öffnung zum aktiven Zentrum ist jedoch etwas größer als **(C/D)** im oxygenierten Zustand. **C:** Die Aminosäuren E305 und N321 liegen nahe beieinander und sind vermutlich über ein Wasserstoffbrücke miteinander verbunden (Hazes et al., 1993). L54 und A179 interagieren vermutlich über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander und **(D)** verengen so den Eingang zum aktiven Zentrum der Untereinheit I.

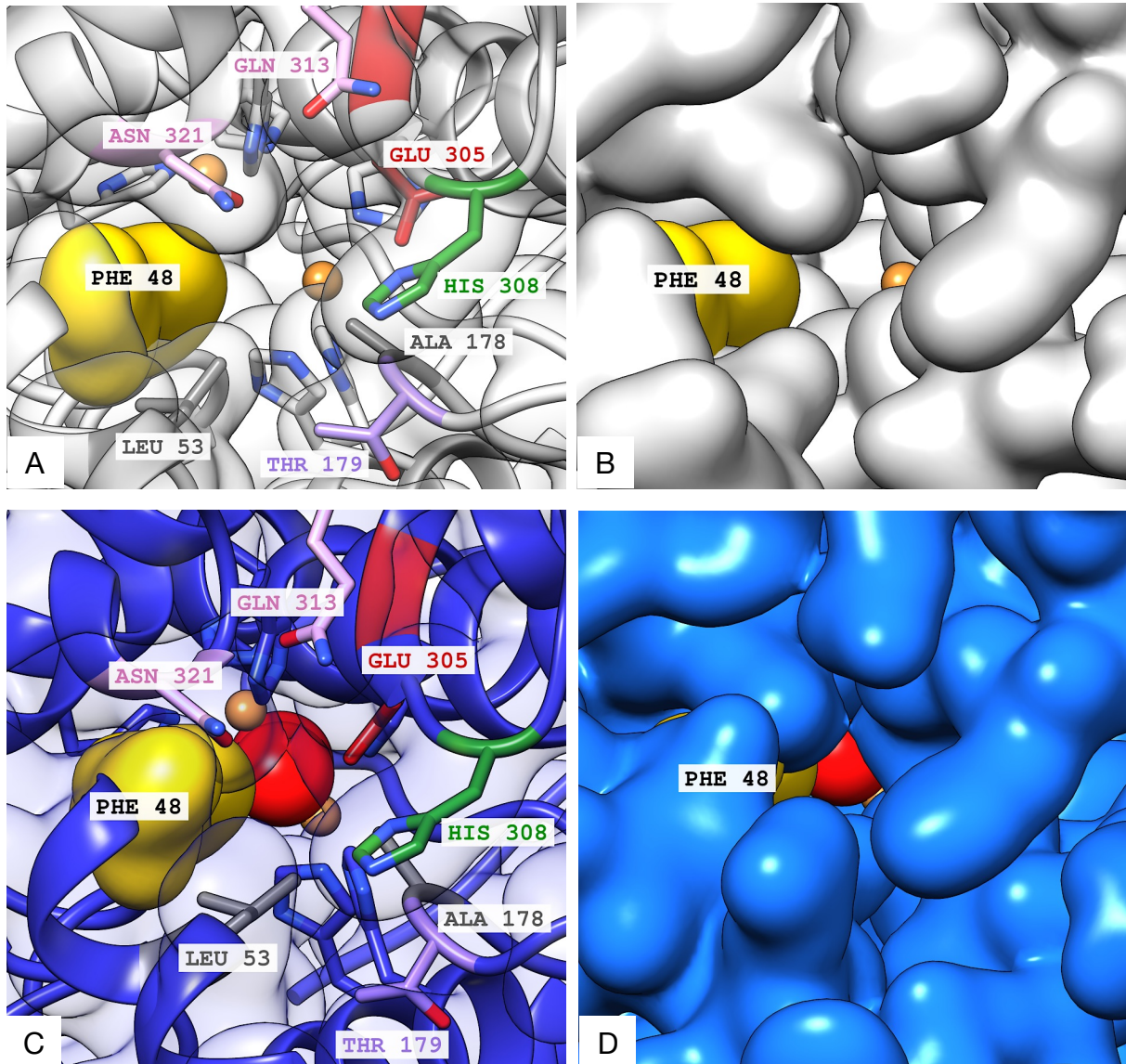


Abb. F.10: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit IIIA im **(A/B)** deoxygenierten Zustand und **(C/D)** oxygenierten Zustand. **A/B:** F48 ist leicht nach oben gekippt, liegt aber genau im Eingangsbereich des aktiven Zentrums. **C/D:** Das Phenylalanin 48 liegt im oxy-Modell leicht verdreht vor und befindet sich ebenfalls im Eingangsbereich des aktiven Zentrums. Die Lage der benachbarten Aminosäuren ist ebenfalls bei beiden Zuständen sehr ähnlich. Der Vergleich der beiden Untereinheiten lässt vermuten, dass die Untereinheit I sowohl im deoxy-Zustand als auch im oxy-Zustand eine "geschlossene" Form aufweist.

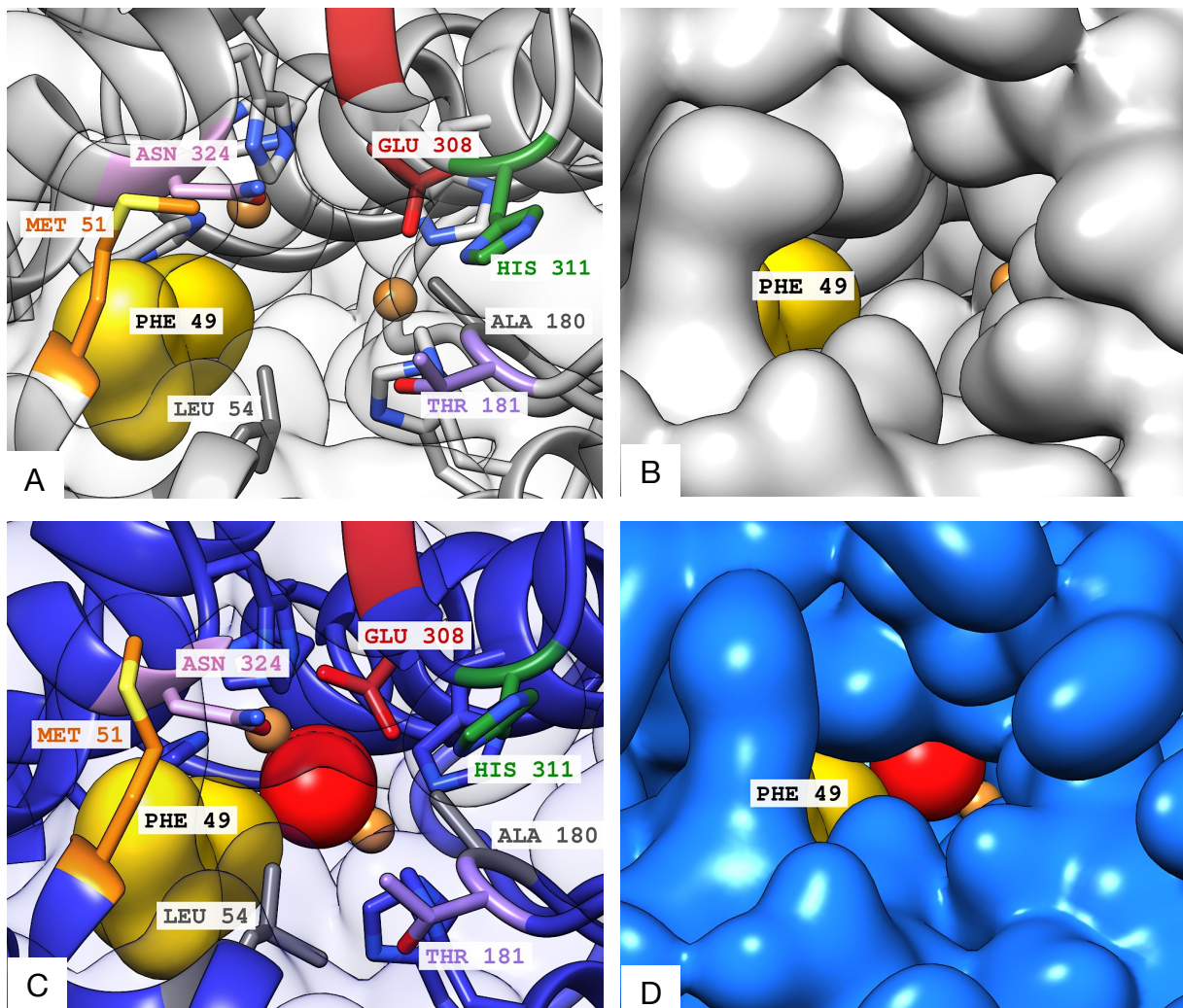


Abb. F.11: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit III B im **(A/B)** deoxygenierten Zustand und **(C/D)** oxygenierten Zustand. **A/B:** Das Hochklappen von F49 und die große Öffnung zum aktiven Zentrum ähnelt stark dem deoxy-Modell bzw. der Dichtekarte von Untereinheit II (Abb.D.10A/B). **C/D:** Im oxy-Modell befindet sich F49 genau in der Öffnung zum aktiven Zentrum und verschließt diese fast vollständig. Durch leichte Verschiebungen der umliegenden Aminosäuren M51, N324, H311 und E308 wird die Öffnung zusätzlich verengt.

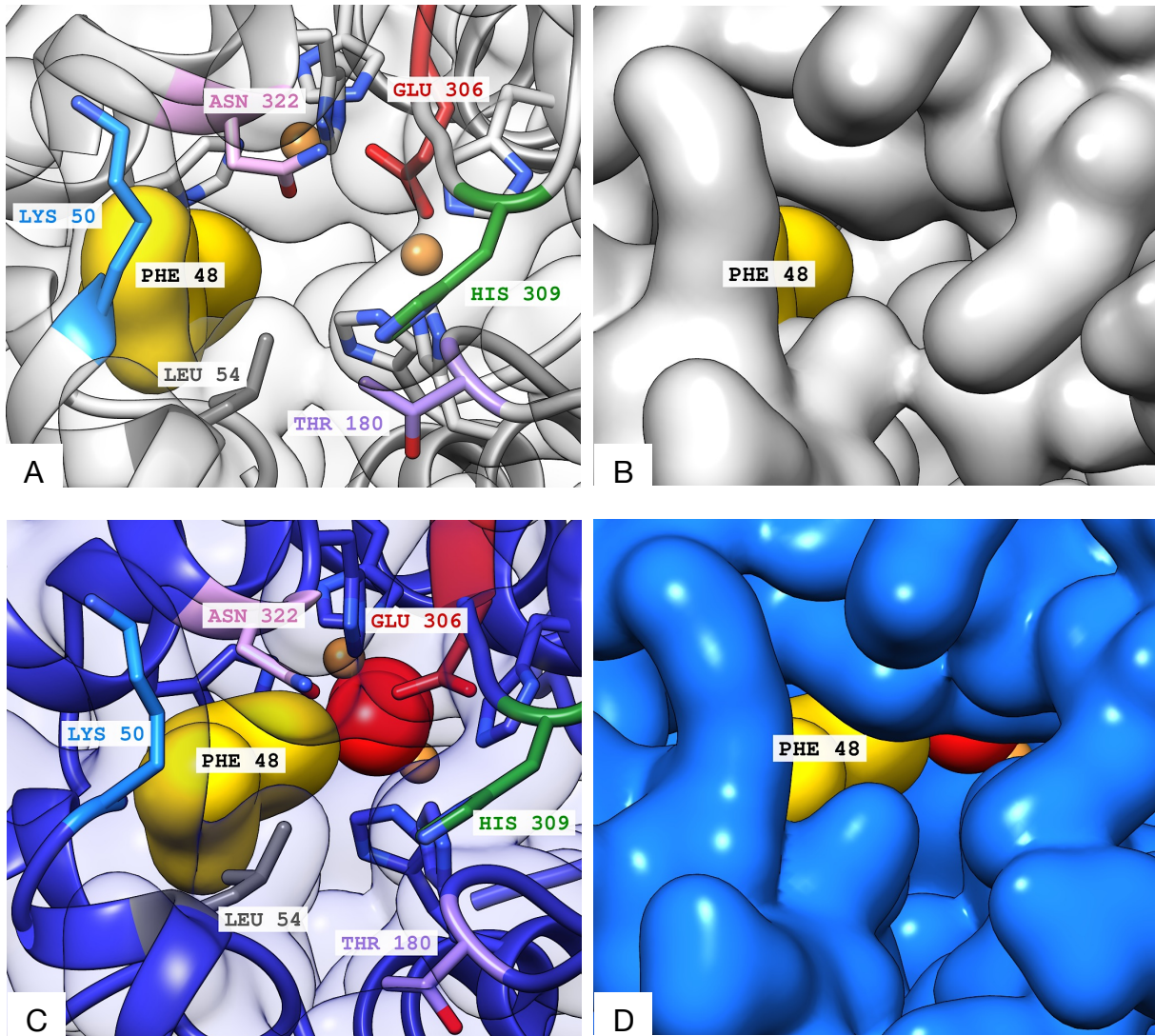


Abb. F.12: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit IV im **(A/B)** deoxygenierten Zustand und **(C/D)** oxygenierten Zustand. **A/B:** Das Phenylalanin 48 ist vom aktiven Zentrum leicht weggedreht. Die benachbarten Aminosäuren L54, T180, E306, N322 und H309 scheinen den Zugang zu verengen. Möglicherweise liegt die deoxygenierte Untereinheit IV in einem "geschlossenen Zustand" vor. **C/D:** F48 blockiert fast komplett den Zugangsbereich zum aktiven Zentrum.

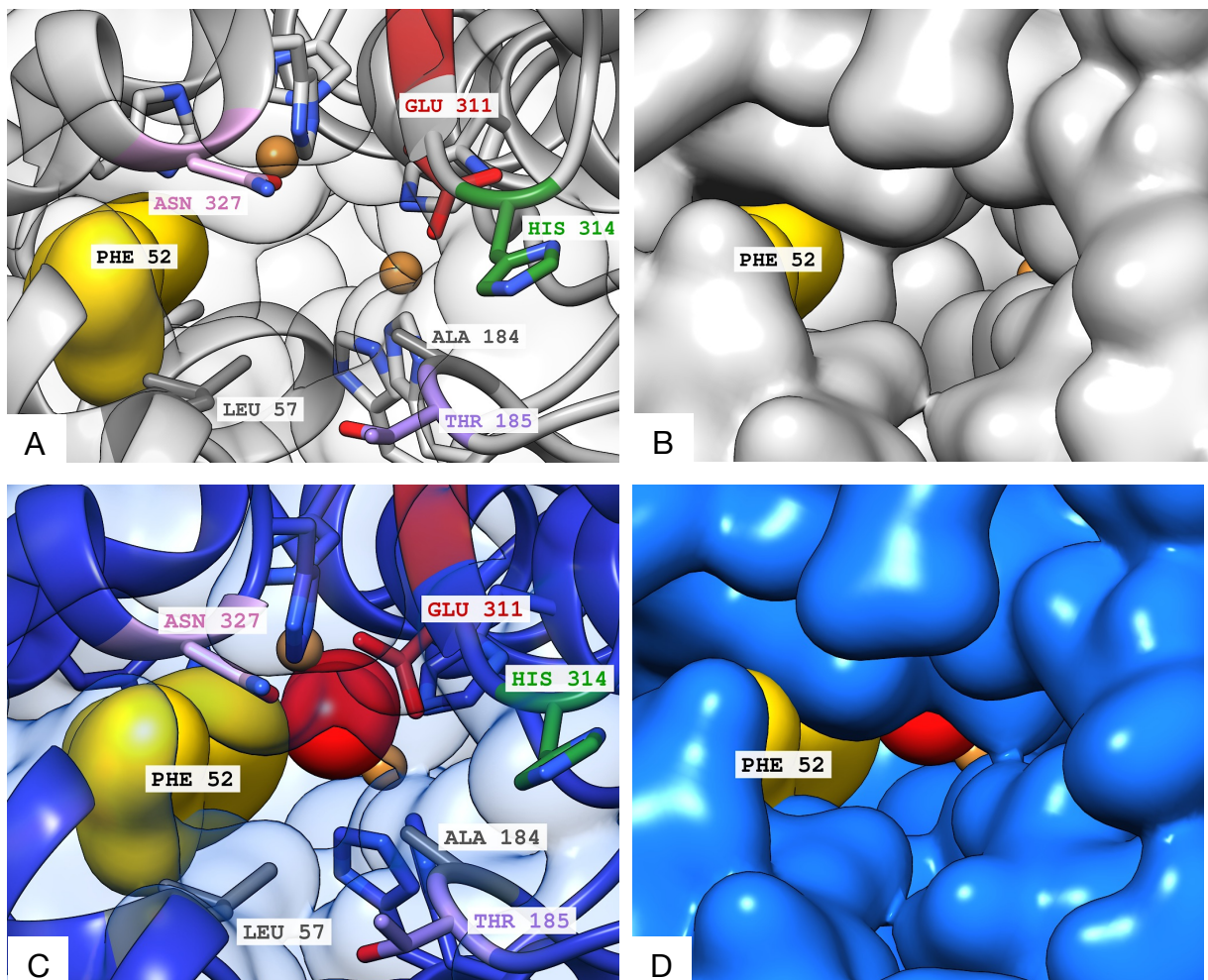


Abb. F.13: Ansicht auf das aktive Zentrum der Untereinheit V im **(A/B)** deoxygenierten Zustand und **(C/D)** oxygenierten Zustand. **A/B:** Es ist eine deutliche Kippbewegung von F52 weg vom aktiven Zentrum zu erkennen. Hier scheint die Untereinheit V im "geöffneten Zustand" vorzuliegen. **C/D:** F52 klappt in Richtung des aktiven Zentrums und verengt so den Eingangsbereich. F52 von Untereinheit V wies im Vergleich zu den anderen Untereinheiten die stärkste Verschiebung zwischen oxy- und deoxy-Zustand auf.

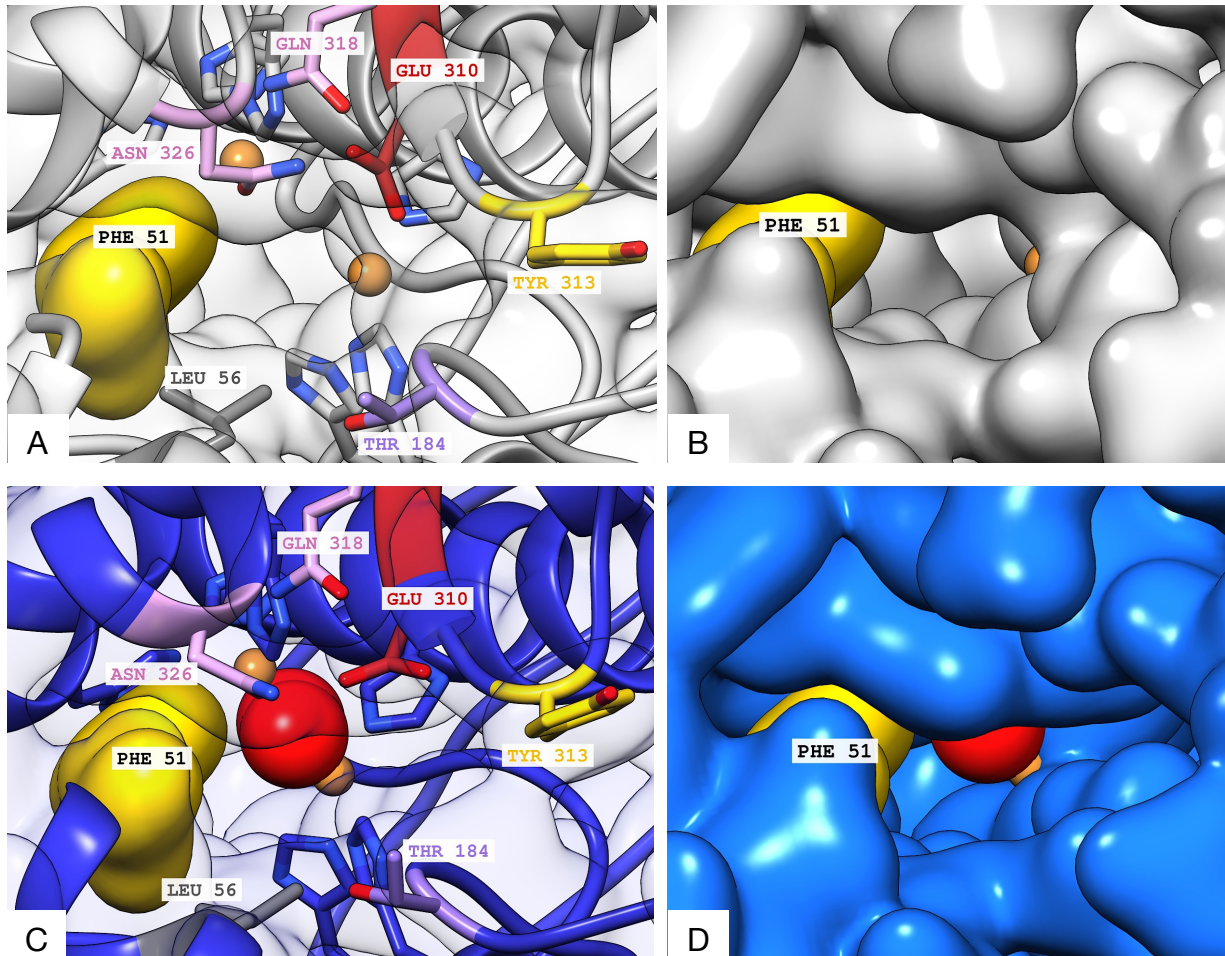


Abb. F.14: Blick auf das aktive Zentrum der Untereinheit VI im **(A/B)** deoxygenierten Zustand und **(C/D)** oxygenierten Zustand. **A/B:** Das Phenylalanin 51 dreht sich leicht vom aktiven Zentrum weg und vergrößert so die Öffnung, die zum aktiven Zentrum führt. **C/D:** N326 dreht sich leicht nach unten und verengt so die Öffnung zum aktiven Zentrum. F51 dreht sich leicht in die Richtung der Öffnung. Ob nun die oxy- bzw. deoxy-Untereinheit IV in einem geöffneten oder geschlossenen Zustand vorliegt, lässt sich nicht genau bestimmen.

Literaturverzeichnis

Adrian, M., Dubochet, J., and McDowell, A. (1984)

Cryo-electron microscopy of viruses.
Nature, 308.

Armache JP., et al., (2010)

Localization of eukaryote-specific ribosomal proteins in a 5.5-Å cryo-EM map of the 80S eukaryotic ribosome.
Proc Natl Acad Sci USA 107:19754–19759

Arnold P., Dissertation (2012)

3D-Electron Microscopy of Protein Complexes of Different Size and Symmetry

Bai, X.-C., Fernandez, I.S., McMullan, G. & Scheres, S.H. (2013)

Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles.
eLife, 2, p.e00461.

Baker, M. L., Hryc, C. F., Zhang, Q., Wu, W., Jakana, J., Haase-Pettingell, C., Afonine, P. V., Adams, P. D., King, J. a., Jiang, W., and Chiu, W. (2013)

Validated near-atomic resolution structure of bacteriophage epsilon15 derived from cryo-EM and modeling.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(30):12301–6.

Bammes, B. E., Rochat, R. H., Jakana, J., Chen, D.-H., and Chiu, W. (2012)

Direct electron detection yields cryo-EM reconstructions at resolutions beyond 3/4 Nyquist frequency.
Journal of structural biology, 177(3):589–601.

Banjeree, S et al., (2016)

2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition.
Science 351, 871–875

Bartesaghi, A. et al. (2015)

2.2 Å resolution cryo-EM structure of β-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor.
Science 348, 1147–1151

Beauchamp, K. a., Lin, Y.-S., Das, R., and Pande, V. S. (2012)

Are Protein Force Fields Getting Better? A Systematic Benchmark on 524 Diverse NMR Measurements.
Journal of chemical theory and computation, 8(4):1409–1414.

Beckmann, R. (1997)

Alignment of Conduits for the Nascent Polypeptide Chain in the Ribosome-Sec61 Complex.
Science, 278(5346):2123–2126.

Bijlholt, M. M. C., van Bruggen, E. F. J. & Bonaventura, J. (1979)

Dissociation and reassembly of *Limulus polyphemus* hemocyanin.
Eur. J. Biochem. 95, 399–405.

Bijlholt MMC, Van Bruggen EFI (1986)

A model of the architecture of the hemocyanin from the arthropod *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda).

Eur J Biochem 155:339-344

Boisset, N., Frank, J., Taveau, J.-C., Billiard, P., Motta, G., Lamy, J. et al. (1988)

Intramolecular localization of epitopes within an oligomeric protein by immunoelectron microscopy and image processing.

Proteins: Struct. Funct. Genet. 3, 161–183.

Böttcher, B., Wynne, S. A., and Crowther, R. A. (1997)

Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy.

Nature, 386(6620):88–91.

Brenner, S. and Horne, R. (1959)

A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.

Biochimica et Biophysica Acta, 34:103–110.

Brenowitz, M., Bonaventura, J., Bonaventura, C. & Gianazza, E. (1981)

Subunit composition of a high molecular weight oligomer: *Limulus polyphemus* hemocyanin.

Arch. Biochem. Biophys. 210, 748–761.

Brenowitz M, Bonaventura C, Bonaventura J (1983)

Assembly and calcium-induced cooperativity of *Limulus* IV hemocyanin: a model system for analysis of structure-function relationships in the absence of subunit heterogeneity.

Biochemistry 22: 4707-4713

Brenowitz M, Bonaventura C, Bonaventura J (1984a)

Self-association and oxygen-binding characteristics of the isolated subunits of *Limulus polyphemus* hemocyanin.

Arch Biochem Biophys 230: 238-249

Burmester, T. (2001)

Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily.

Mol. Biol. Evol. 18, 184–195.

Burmester, T. (2002)

Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins.

J. Comp. Physiol. B. 172, 95–117.

Cavellec, A., Boisset, N., Taveau, J.-C., Lamy, J.N., (1990)

Image processing of electron-microscopy views of *Callinassa californiensis* hemocyanin.

In: Preaux, G., Lontie, R. (Eds.), *Invertebrate Dioxygen Carriers*. Leuven Univ. Press, Leuven, pp. 271–274.

Cong Yao, Qinfen Zhang, David Woolford, Thorsten Schweikardt, Htet Khant, Matthew Dougherty, Steven J. Ludtke, Wah Chiu, and Heinz Decker (2009)

Structural Mechanism of SDS-Induced Enzyme Activity of Scorpion Hemocyanin Revealed by Electron Cryomicroscopy.

Structure 17, 749–758

Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., and Steven, A. C. (1997)
Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy.
Nature, 386(6620):91–4.

Conway, J.F. & Steven, A.C., (1999)

Methods for Reconstructing Density Maps of “Single” Particles from Cryoelectron Micrographs to Subnanometer Resolution.

Journal of Structural Biology, 118, pp.106–118.

Crowther, R., DeRosier, D. J., and Klug, A. (1970b)

The Reconstruction of a Three-Dimensional Structure from Projections and its Application to Electron Microscopy.

Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 317(1530):319–340.

Cuff M, Miller K, van Holde K, Hendrickson W. (1998)

Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin.

J Mol Biol:278:855-70

Daberkow, I., Herrmann, K.-H., Liu, L., Rau, W., and Tietz, H. (1996)

Development and performance of a fast fibre-plate coupled CCD camera at medium energy and image processing system for electron holography.

Ultramicroscopy, 64(1-4):35–48.

Decker H, Robert C, Gill S. (1986)

Nesting - An extension of the allosteric model and its application to tarantula hemocyanin.

In: Linzen B, editor. Invertebrate oxygen carriers. Berlin, Heidelberg, New York: Springer: p. 383-88.

Decker H, Connelly PR, Robert CH, Gill SJ. (1988)

Nested allosteric interaction in tarantula hemocyanin revealed through the binding of oxygen and carbon monoxide.

Biochemistry 27:6901-8.

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 Z Physiol Chem 360: 1505-1507

Decker H, Sterner R. (1990)

Nested allostery of arthropodan hemocyanin (Eurypelma californicum and Homarus americanus). The role of protons.

J Mol Biol 1990;211:281-93.

de Groot, B. L., van Aalten, D. M., Scheek, R. M., Amadei, a., Vriend, G., and Berendsen, H. J. (1997) Prediction of protein conformational freedom from distance constraints.

Proteins, 29(2):240–51

Dejung M., Dissertation (2014)

3D-Elektronenmikroskopie dreier respiratorischer Proteine unter Verbesserung der bioinformatischen Abläufe

DePaul Allison J., Thompson Erik J., Patel Sarav S., Haldeman Kristin, Sorin Eric J. (2010)
Equilibrium conformational dynamics in an RNA tetraloop from massively parallel molecular dynamics.

Nucleic Acids Research, Vol. 38, No. 14: 4856–4867

DeRosier, D. J. and Klug, A. (1968)

Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs.

Nature, 217(5124):130–4.

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, a. W., and Schultz, P. (1988)

Cryo-electron microscopy of vitrified specimens.

Quarterly Reviews of Biophysics, 21(2):129–228.

Frank J. (2002)

Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy.

Annual review of biophysics and biomolecular structure, 31:303–19.

Frank, J. (2006)

Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies.

Oxford University Press, New York, NY.

Gaykema WPJ, Volbeda A, Hoi WGJ (1985)

Structure determination of Panulirus interruptus haemocyanin at 3.2 Å resolution. Successful phase extension by sixfold density averaging.

J Mol Biol 187: 255-275

Gipson et al., (2010)

Direct structural insight into the substrate-shuttling mechanism of yeast fatty acid synthase by electron cryomicroscopy

PNAS | May 18, 2010 | vol. 107 | no. 20: 9164–9169 |

Glaeser R. M., Downing K. H. (1992)

Assessment of resolution in biological electron crystallography.

Ultramicroscopy, 47 (1), pp. 256–265

Grant, T. & Grigorieff, N. (2015)

Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6.

eLife 4, e06980 (2015).

Grigorieff, N. (2000)

Resolution measurement in structures derived from single particles.

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 56:1270-7

Grigorieff, N. , Harrison, S. (2011)

Near-atomic resolution reconstructions of icosahedral viruses from electron cryo-microscopy

Structural Biology 2011, 21:265–273

Goddard, T. D., Huang, C. C., and Ferrin, T. E. (2007)

Visualizing density maps with UCSF Chimera.

Journal of structural biology, 157(1):281–7.

Harauz, G. and van Heel, M. (1986)

Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction.
Optik, 78(4).

Harris, J. R. and Agutter, P. (1970)

A negative staining study of human erythro- cyte ghosts and rat liver nuclear membranes.
Journal of ultrastructure research, 33(3):219–32.

Harris, J. R. and Horne, R. W. (1994)

Negative staining: A brief assessment of current technical benefits, limitations and future possibilities.
Micron, 25(1):5– 13.

Hartmann, H. & Decker, H. (2002)

All hierarchical levels are involved in conformational transitions of the 4x6-meric tarantula hemocyanin upon oxygenation.
Biochim. Biophys. Acta, 1601, 132–137.

Hazes B, Magnus K, Bonaventura C, Bonaventura J, Dauter Z, Kalk K, Hol W. (1993)

Crystal structure of deoxygenated Limulus polyphemus subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation.
Protein Sci 1993;2:597-619.

Henderson, R., Sali, A., Baker, M.L., Carragher, B., Devkota, B., et al., (2012)

Outcome of the first electron microscopy validation task force meeting.
Structure (London, England: 1993) 20 (2), 205–214

Hess, B., Uppsala, S., and Lindahl, E. (2008)

GROMACS 4 : Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation.
Journal of chemical theory and computation, 4:435–447.

Hess, B., Van Der Spoel, D., and Lindahl, E. (2013)

Gromacs User Manual Ver. 4.6.3.

Heymann J. B., Chagoyen M., Belnap D.M. (2005a)

Common conventions for interchange and archiving of three dimensional electron microscopy information in structural biology.
J. Struct. Biol., 151 (2005), pp. 196–207

Hohn, M., Tang, G., Goodyear, G., Baldwin, P. R., Huang, Z., Penczek, P. A., Yang, C., Glaeser, R. M., Adams, P. D., and Ludtke, S. J. (2007)

SPARX, a new environment for Cryo-EM image processing.
Journal of structural biology, 157(1):47–55.

Hornak, V. ; Aberl, R. ; Okur, A. ; Strockbine, B. ; Roitberg, A. ; Simmerling, C. (2006)

Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters.
Proteins 65 (3): 712-725

Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996)

VMD: Visual molecular dynamics.
Journal of Molecular Graphics, 14(1):33–38.

Jaenicke E. et al., (2009)

Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice?
Developmental and Comparative Immunology 33 (2009) 1055–1063

Jiang,N., Tan,N.S., Ho,B. and Ding,J.L. (2005)

Carcinoscorpius rotundicauda hemocyanin subunit I-V
Submitted (09-JUN-2005) Biological Sciences, National University of Singapore

Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983)

Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. The Journal of Chemical Physics, 79(2):926.

Jorgensen, W. L., Jenson, C., and Haven, N. (1998)

Carlo Simulations : Seeking Temperatures of Maximum Density.
19(10):1179–1186.

Kempter, B., Markl, J., Brenowitz, M., Bonaventura, C. & Bonaventura, J. (1985)

Immunological correspondence between arthropod hemocyanin subunits. II. Xiphosuran (Limulus) and spider (Eurypelma, Cupiennius) hemocyanin.
Biol. Chem. Hoppe Seyler, 366, 77–86.

Kucukelbir A., Sigworth F.J., and Tagare H.D., (2014)

Quantifying the Local Resolution of Cryo-EM Density Maps,
Nature Methods. Volume 11, Issue 1, Pages 63-65

Kucukelbir A., Sigworth F.J and Tagare H.D., (2012)

A Bayesian Adaptive Basis Algorithm for Single Particle Reconstruction
Journal of Structural Biology, 179(1) 2012.

Lamy J, Lamy J, Baglin MC, Weill J (1977)

Scorpion hemocyanin subunits: properties,dissociation, association.
In: Bannister JV (ed) Structure and function of haemocyanin.Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 37-49

Lamy, J., Bijlholt, M. M. C., Sizaret, P.-Y., Lamy, J. & van Bruggen, E. F. J. (1981)

Quaternary structure of scorpion (Androctonus australis) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy.
Biochemistry, 20, 1849–1856.

Lamy, J., Sizaret, P.-Y., Frank, J., Verschoor, A., Feldmann, R. & Bonaventura, J. (1982)

Architecture of Limulus polyphemus hemocyanin.
Biochemistry, 21,6825–6833.

Lamy, J., Lamy, J., Sizaret, P.-Y., Billiald, P., Jolles, P., Feldmann, R. J. & Bonaventura, J. (1983)

Quaternary structure of Limulus polyphemus hemocyanin.
Biochemistry, 22, 5573–5583.

Lamy, J., Compin, S. & Lamy, J. N. (1983)

Immunological correlates between multiple isolated subunits of Androctonus australis and Limulus polyphemus hemocyanin: an evolutionary approach.
Arch. Biochem. Biophys. 223, 584–603.

Li, X. et al. (2013)

Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM.

Nature Methods **10**, 584–590.

Lindahl SG. (2008)

Oxygen and life on earth: an anesthesiologist's views on oxygen evolution, discovery, sensing, and utilization.

Anesthesiology. Jul;109(1):7-13.

Lindorff-Larsen, K., Maragakis, P., Piana, S., Eastwood, M. P., Dror, R. O., and Shaw, D. E. (2012)

Systematic validation of protein force fields against experimental data.

PloS one, 7(2):e32131.

Linzen B, Soeter MN, Riggs AF, Schneider H-J, Schartau W, Moore MD, Yokota E, Behrens PO, Nakashima H, Takagi T, Nemoto T, Vereijken JM, Bak HJ, Beirtema JJ, Volbeda A, Gaykema WPJ, Hoi WGJ (1985b)

The structure of arthropod hemocyanins.

Science 229: 519-524

Loewe R. (1978)

Hemocyanins in Spiders, V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin.

J Comp Physiol B. 128:161-8.

Ludtke, S. J., Baldwin, P. R., and Chiu, W. (1999)

EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions.

Journal of structural biology, 128(1):82–97.

Ludtke, S.J., Chen, D.H., Song, J.L., Chuang, D.T., and Chiu, W. (2004)

Seeing GroEL at 6 Å resolution by single particle electron cryomicroscopy.

Structure 12, 1129–1136

Ludtke, S. J. (2012)

EMAN2/BoxSize Website. <http://blake.bcm.edu/emanwiki/EMAN2/BoxSize>.

Lyumkis, D., Brilot, A. F., Theobald, D. L. & Grigorieff, N. (2013)

Likelihood-based classification of cryo-EM images using FREALIGN.

J. Struct. Biol. 183, 377–388 (2013).

Mahoney M. W., Jorgensen W. L. (2000)

A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions.

J. Chem. Phys. 112, 8910-8922

Magnus, K. A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J. & Hol, W. G. J. (1994)

Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences.

Proteins: Struct. Funct. Genet. 19, 302–309.

Markl J, Markl A, Schartau W, Linzen B (1979a)

Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. II. Crustacea.
J Comp Physiol B 130: 283-292

Markl, J. (1980)

Hemocyanin in spiders, XI. The quaternary structure of Cupiennius hemocyanin.
J.Comp. Physiol. 140, 199–207.

Markl, J., Kempfer, B., Linzen, B., Bijlholt, M. M. C. & van Bruggen, E. F. J. (1981)

Hemocyanin in spiders, XVI. Subunit topography and a model of the quaternary structure of Eurypelma hemocyanin.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 362, 1631–1641.

Markl J, Decker H, Stocker W, Linzen B, Schutter WG, van Bruggen EFJ (1981a)

On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins.
Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 362: 185-188

Markl J, Kempfer B (1981a)

Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immuno electrophoresis.
J Comp Physiol B 140: 495-50

Markl J, Kempfer B (1981b)

Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins.
In: Lamy J, Lamy J (eds) Invertebrate oxygen-binding proteins. Marcel Dekker, New York, pp 125-137

Markl, J., Decker, H. & Linzen, B. (1982)

Hemocyanin in spiders, XV. The role of individual subunits in the assembly of Eurypelma hemocyanin.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 363, 73–87.

Markl, J. (1986)

Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. Biol. Bull. (Woods Hole), 171, 90–115.

Markl, J. & Decker, H. (1992)

Molecular structure of the arthropod hemocyanins.
Advan. Comp. Environ. Physiol. 13, 325–376.

Markl J, Moeller A, Martin A, Rheinbay J, Gebauer W, et al. (2009)

10-A cryoEM structure and molecular model of the Myriapod (Scutigera) 6×6mer hemocyanin: understanding a giant oxygen transport protein.
J Mol Biol 392: 362–380.

Markl (2013)

Evolution of molluscan hemocyanin structures.
Biochim Biophys Acta. 2013 Sep;1834(9):1840-52.

Martin A, Depoix F, Stohr M, Meissner U, Hagner-Holler S, et al. (2007)

Limulus polyphemus hemocyanin: 10 A cryo-EM structure, sequence analysis, molecular modelling and rigid-body fitting reveal the interfaces between the eight hexamers.
J Mol Biol 366: 1332–1350

Marxen, J.C., Pick, C., Kwiatkowski, M. et al. (2013)

Molecular characterization and evolution of haemocyanin from the two freshwater shrimps *Caridina multidentata* (Stimpson, 1860) and *Atyopsis moluccensis* (De Haan, 1849)
J Comp Physiol B (2013) 183: 613. doi:10.1007/s00360-013-0740-9

McMullan, G., Chen, S., Henderson, R. & Faruqi A. R. (2009)

Detective quantum efficiency of electrons area detectors in electron microscopy.
Ultramicroscopy 109, 1126-1143

McMullan, G.; Faruqi, A. R.; Henderson, R.; Guerrini, N.; Turchetta, R.; Jacobs, A.; van Hoften, G. (2009)

Experimental observation of the improvement in MTF from backthinning a CMOS direct electron detector.
Ultramicroscopy Volume 109, Issue 9: p.1144-1147

McMullan, G., Faruqi, A. R., Clare, D. & Henderson, R. (2014)

Comparison of optimal performance at 300keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy.
Ultramicroscopy 147, 156–163

Mičetić I, Losasso C, Di Muro P, Tognon G, Benedetti P, Beltramini M (2010)

Solution structures of 2 x 6-meric and 4 x 6-meric hemocyanins of crustaceans *Carcinus aestuarii*, *Squilla mantis* and *Upogebia pusilla*.
J Struct Biol 171:1–10

Miller KJ, Eldred NW, Arisaka F, van Holde KE (1977)

Structure and function of hemocyanin from thalassinid shrimp.
J Comp Physiol B 115: 171-184

Mindell, JA, Grigorieff N. (2003)

Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy.
J Struct Biol. 142:334-47

Molon A, Di Muro P, Bubacco L, Vasilyev V, Shavlovski M, Salvato B, Beltramini M, Conze W, Hellmann N, Decker H. (2000)

Molecular heterogeneity of the hemocyanin isolated from the king crab *Paralithodes camtschaticae*.
Eur J Biochem. 267:7046-57.

Monod J, Wyman J, Changeux J-P (1965)

On the nature of allosteric transition: a plausible model.
J Mol Biol 12: 88-118

Paoli M., F. Giomi, N. Hellmann, E. Jaenicke, P. Di Muro, M. Beltramini (2007)

The molecular heterogeneity of hemocyanin: Structural and functional properties of the 4x6-meric protein of *Upogebia pusilla* (Crustacea)
Gene, 398 (2007), pp. 177–182

Penczek, P. A., Radermacher, M., and Frank, J. (1992)

Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice.
Ultramicroscopy, 40(1):33–53.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004)

UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis.
Journal of computational chemistry, 25(13):1605–12.

Pronk, S. et al. (2013)

Gromacs 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit.
Bioinformatics, 29, 845–854.

Peter Rehm, Christian Pick, Janus Borner, Jürgen Markl and Thorsten Burmester (2012)

The diversity and evolution of chelicerate hemocyanins.
BMC Evolutionary Biology, 2012, Volume 12, Number 1

Rosenthal, P. B. and Henderson, R. (2003)

Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy.
Journal of Molecular Biology, 333:721–745.

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: 385-395

Schatz, M. (1992)

Invariante Klassifizierung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von eiseingebetteten biologischen Makromolekülen.

Scherbaum S, Beyhan E, Gebauer W, Burmester T (2010)

Characterization of hemocyanin from the peacock mantis shrimp *Odontodactylus scyllarus* (Malacostraca: Hoplocarida).
J Comp Physiol B 180:1235–1245

Scheres, S. H. W. et al. (2007)

Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization.
Nature Methods 4, 27–29

Scheres, S.H.W., (2012(A))

A Bayesian view on cryo-EM structure determination.
Journal of molecular biology, 415(2), pp.406–418.

Scheres, S. H. W. (2012(B))

RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination.
Journal of structural biology, 180(3):519– 530.

Scheres, S.H.W. & Chen, S.S., (2012)

Prevention of overfitting in cryo-EM structure determination.
Nature Methods, 9(9), pp.853–854.

Scheres, S. H. W. (2013)

Single-particle processing in RELION.

Schröder, G. F., Brunger, A. T., and Levitt, M. (2007)

Combining efficient conformational sampling with a deformable elastic network model facilitates structure refinement at low resolution.

Structure (London, England : 1993), 15(12):1630–41.

Sigworth, F. J., Doerschuk, P. C., Carazo, J. & Scheres, S. H. (2010)

An introduction to maximum likelihood methods in cryo-EM.

Methods Enzymol. 482, 263–294.

Soeter NM, Jekel PA, Beintema JJ, Volbeda A, Hol WGJ (1987)

Primary and tertiary structures of the first domain of Panulirus interruptus hemocyanin and comparison of arthropod hemocyanins.

Eur J Biochem 169: 323–332

Stöcker W, Raeder U, Bijlholt MMC, Wichertjes T, Van Bruggen EFJ, Markl J (1988)

The quaternary structure of four crustacean 2 x 6 hemocyanins: immunocorrelation, stoichiometry, reassembly and topology of individual subunits.

J Comp Physiol 158B: 271–289

Sutmann, G. (2002)

Classical Molecular Dynamics, volume 10.

Talmon, Y. (1983)

Staining and drying-induced artifacts in electron microscopy of surfactant dispersions.

Journal of Colloid and Interface Science, 93(2):366– 382.

Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I., and Ludtke, S. J. (2007)

EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy.

Journal of structural biology, 157(1):38–46.

Taveau, J.-C., Boisset, N., Lamy, J., Lambert, O. & Lamy, J. N. (1997)

Three-dimensional reconstruction of Limulus polyphemus hemocyanin from cryoelectron microscopy.

J. Mol. Biol. 266, 1002–1015.

Taylor, A.C., Astall, C.M., Atkinson, R.J.A., (2000)

A comparative study of the oxygen transporting properties of the haemocyanin of five species of thalassinidean mud-shrimps.

J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 244, 265–283.

Terwilliger NB (1982)

Effect of subunit composition on the quaternary structure of isopod (*Ligia pallasii*) hemocyanin.

Biochemistry 21: 2579–2586

Thon, F. (1966)

Zur Defokussierungsabhängigkeit des Phasenkontrastes bei der elektronenmikroskopischen Abbildung.

Zeitschrift Naturforschung, 21a:476–478

van Bruggen, E. F. J., Bijlholt, M. M. C., Schutter, W. G., Wichertjes, T., Bonaventura, J., Bonaventura, C. et al. (1980)

The role of structurally diverse subunits in the assembly of three cheliceratan hemocyanins. FEBS Letters, 116, 207–210.

van Bruggen, E. F. J. (1983)

An electron microscopists view of the quaternary structure of arthropodan and molluscan hemocyanins.

Life Chem. Rep. Suppl. 1: 1-14

van Heel, M. and Keegstra, W. (1981)

IMAGIC: A fast, flexible and friendly image analysis software system.

Ultramicroscopy, 7:113–130

van Heel, M. & Frank, J. (1981)

Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules.

Ultramicroscopy, 6, 187–194

van Heel, M. (1987)

Angular Reconstruction: A Posteriori Assignment of Projection Directions for 3D Reconstruction.

Ultramicroscopy, 21:111–124.

van Heel, M. & Dube, P. (1994)

Quaternary structure of multimeric arthropod hemocyanins.

Micron, 25,387–418.

van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R., and Schatz, M. (1996)

A new generation of the IMAGIC image processing system.

Journal of structural biology, 116(1):17–24

van Heel, M. and Schatz, M. (2005)

Fourier shell correlation threshold criteria.

Journal of structural biology, 151(3):250–62.

van Holde KE, and Miller KI (1995)

Hemocyanins.

Adv Protein Chem 47:1-81

van Holde K & Miller K, Decker H. (2001)

Hemocyanins and invertebrate evolution.

J Biol Chem:276:15563-6

van der Spoel, et al. (2005)

GROMACS: Fast, flexible, and free.

J Comput. Chem. 26: 1701-1718

Vinogradov SN (1985)

The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythro- cruorins and chlorocruorins).

Comp Biochem Physiol B 82:1-15

Volbeda A & Hol W. Crystal (1989)

Structure of hexameric hemocyanin from Panulirus interruptus refined at 3.2 Å resolution.

J Mol Biol:209:249-79.

Wade R.H. (1992)

A brief look at imaging and contrast transfer.
Ultramicroscopy. 46:145–156.

Wang Z., Schröder G.F. (2012)

Real-space Refinement with DireX: From Global Fitting to Side-chain Improvements.
Biopolymers (2012), 97(9):687-697

Williams, D. B. and Carter, C. B. (2009)

Transmission Electron Microscope.

Yu, X., Jin, L. & Zhou, Z. H. (2008)

3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy.
Nature 453, 415-419

Zhang, X. et al (2008)

Near atomic resolution using electron cryomicroscopy and single particle reconstruction.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 105, 1867-1872

Zhu, J., Penczek, P. A., Schröder, R., and Frank, J. (1997)

Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy filtered cryoelectron micrographs: procedure and application to the 70S Escherichia coli ribosome.
Journal of structural biology, 118(3):197–219.

Danksagung

Ich danke herzlichst...

...Prof. Dr. Jürgen Markl für die Bereitstellung und Betreuung des Promotionsthemas, dass mir entgegen gebrachte Vertrauen, die Hilfe bei jeglichen Problemen sowie für die kritische Durchsicht und Kommentierung meines Manuskripts.

...Prof. Dr. Walter Stöcker für die bereitwillige Annahme als zweiter Berichterstatter meiner Arbeit.

...Dr. Frank Depoix für die Einarbeitung und Hilfe am Elektronenmikroskop, dem Cryo-Plunger und den EM-Aufnahmen des *Limulus polyphemus* Hämocyanins. Nicht zu vergessen, die vielen ergebnisreichen Diskussionen bei diversen Tassen Espresso.

...Dr. Wolfgang Gebauer für die sehr hilfreiche Unterstützung bei der Laborarbeit.

... [REDACTED] (MPI für Biophysik in Frankfurt) für die Hilfe bei den EM-Aufnahmen des Hämocyanin-Datensatzes von *Limulus polyphemus*.

... [REDACTED] (MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen) für das Aufnehmen der EM-Bilder der Hämocyanin-Datensätze von *Callianassa* und *Ligia*.

... [REDACTED] (Forschungszentrum Jülich) für die Einarbeitung in die Softwarepakete DireX und GROMACS.

...Dr. Christian Meesters und [REDACTED] (HPC-Team der JGU) für die schnelle und kompetente Hilfe bei diversen Problemen mit MOGON.

...Dr. Mario Dejung, [REDACTED] und [REDACTED] für tolle Einführung in die cryo-EM, den diversen Bash-/Python-Skripten, die vieles einfacher machten, und die tolle Arbeitsatmosphäre.

...der gesamten AG Markl, insbesondere den verbliebenen Doktoranden und Masterstudenten für die wirklich tolle Arbeitsatmosphäre und den Zusammenhalt.

... allen meinen Freunden für die seelische und moralische Unterstützung. Ganz besonders [REDACTED] für viele ergebnisreiche Diskussionen bzgl. meiner Arbeit und die vielen Aufmunterungen.

... [REDACTED]

... [REDACTED] die an mich geglaubt, unterstützt und immer wieder aufgebaut hat. Danke dir!!!

...meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die tatkräftige und nie nachlassende Unterstützung, ohne die ich diesen Weg nicht hätte einschlagen und vollenden können. Danke, Danke, Danke.

Erklärung und Copyright

Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Mainz, 02. November 2016

Ort/Datum

Martin Haugwitz

Copyright

Die Inhalte dieses Werkes sind urheberrechtliches Eigentum des Instituts für Zoologie im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.