

Institut für Technische Chemie / Abteilung Elektronenmikroskopie
Der Technischen Universität München

**Elektronenmikroskopische Untersuchungen zu Struktur und
Konformationsänderungen der SecA Translokations-ATPase mittels
Negativkontrastierung und Einzelpartikelanalyse**

Matthias Stumpf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender Univ.- Prof. Dr. Walter Nitsch

Prüfer der Dissertation

1. Univ.- Prof. Dr. Sevil Weinkauff
2. Univ.- Prof. Dr. Johannes Buchner
3. apl.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister

Die Dissertation wurde am 7.11.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.12.2000 angenommen.

Institut für Technische Chemie / Abteilung Elektronenmikroskopie
Der Technischen Universität München

**Elektronenmikroskopische Untersuchungen zu Struktur und
Konformationsänderungen der SecA Translokations-ATPase mittels
Negativkontrastierung und Einzelpartikelanalyse**

Matthias Stumpf

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender Univ.- Prof. Dr. Walter Nitsch

Prüfer der Dissertation

1. Univ.- Prof. Dr. Sevil Weinkauff
2. Univ.- Prof. Dr. Johannes Buchner
3. apl.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister

Die Dissertation wurde am 7.11.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12.12.2000 angenommen.

Inhaltsverzeichnis.....	I-II
-------------------------	------

Zusammenfassung.....	1
----------------------	---

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Elektronenmikroskopische Methoden der Strukturanalyse.....	4
1.2 Bakteriellies Preprotein-Translokationssystem	6
1.3 Zielsetzung	14

Kapitel 2

Untersuchungen zur Struktur und zu nukleotid-induzierten Konformationsänderungen der SecA Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis*

2.1 Methoden	16
2.1.1 Proteinreinigung	16
2.1.2 Präparation für die Elektronenmikroskopie	17
2.1.3 Elektronenmikroskopie	19
2.1.4 Bildverarbeitung – Einzelpartikelanalyse	28
2.2 Ergebnisse	48
2.2.1 SecA Protein aus <i>Escherichia coli</i>	48
2.2.2 Konformationsänderungen von SecA in Gegenwart von Nukleotiden	55
2.2.3 SecA Protein aus <i>B. subtilis</i>	87
2.3 Zusammenfassung und Diskussion	92

Kapitel 3

Versuche zur zwei-dimensionalen Kristallisation von SecA Proteinen an Phasengrenzflächen

3.1 Kristallisation von löslichen Proteinen an Lipid-Monoschichten.....	100
3.2 SecA auf Lipid-Monoschichten	104
3.3. SecA an Wasser/Luft-Phasengrenzfläche	115
3.4 SecA an flüssig/fest-Phasengrenzfläche	118
3.5 Zusammenfassung und Diskussion.....	120

Kapitel 4

Kooperationen zur Strukturuntersuchung von großen, oligomeren Proteinkomplexen mittels Negativkontrastierung und Kryoelektronenmikroskopie

4.1	Enoatreduktase aus <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	124
4.1.1	Stand der Forschung	124
4.1.2	Motivation für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.....	125
4.1.3	Ergebnisse	125
4.1.4	Diskussion.....	142
4.2	GroE-Chaperon-System aus <i>E. coli</i>	145
4.2.1	Stand der Forschung, Fragestellung.....	145
4.2.2	Ergebnisse	147
4.2.3	Diskussion.....	162
	Literaturverzeichnis	166

Zusammenfassung

Der Transport von membranständigen und periplasmatischen Proteinen in und durch die bakterielle Innermembran wird durch das „Sec-System“ assistiert, in dessen Kern die komplexe molekulare Maschine „Preprotein-Translokase“ steht. Dieser oligomere Enzymkomplex besteht aus dem löslichen bzw. membranassoziierten, essentiellen Motorprotein SecA ATPase, der integralen Struktureinheit SecYEG und dem heterotrimeren Membrankomplex SecDFYajC. Die Modellvorstellungen über den Mechanismus der Translokation sind - trotz zahlreicher Arbeiten - noch immer teilweise spekulativ und widersprüchlich; für ein besseres Verständnis des Prozesses sind Informationen über die Struktur und Konformationsänderungen der biologisch aktiven Translokase bzw. seiner Konformationsänderungen notwendig. Die Komponenten der Translokase sind genetisch und biochemisch gut charakterisiert. Auch sind die Voraussetzungen für Strukturarbeiten gegeben: SecA, SecYEG und SecDFYajC Proteine können rekombinant gewonnen werden und stehen für die Strukturanalyse in geeigneten Mengen zur Verfügung. Dennoch ist die derzeit verfügbare Strukturinformation an der Translokase bzw. seinen Komponenten noch recht gering, z. T. bedingt durch die Heterogenität und Komplexität des Systems, die Kristallisation bzw. hochauflösende Röntgenstrukturanalyse seiner Komponenten erschweren.

Die vorliegende Arbeit ist ein elektronenmikroskopischer Beitrag zur Charakterisierung der Struktur und Konformationsänderungen der SecA ATPase, die die Translokationsreaktion initiiert und das Preprotein in mehreren Reaktionszyklen gekoppelt mit seinen eigenen nukleotid-abhängigen Konformationsänderungen durch die Membran hindurch transportiert. Im Rahmen der Arbeit wurden die SecA Proteine aus *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* mittels Negativkontrastierung elektronenmikroskopisch abgebildet. Durch Multivariate Statistische Analyse (MSA) der Einzelpartikel und anschließender drei-dimensionaler Rekonstruktion (angular reconstitution) wurden Molekülmodelle bei geringer Auflösung berechnet. Ein Schwerpunkt dabei war der Einsatz von verschiedenen Vorgehensweisen während der Bildverarbeitung, um zu vermeiden, daß durch die Bildanalyse Motive induziert

werden, die nicht ohnehin in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu finden sind (Kapitel 2).

Das 3D-Modell von löslichem SecA aus *E. coli* zeigt ein offenes, von globulärer Gestalt nur geringfügig abweichendes Gebilde (Durchmesser ca. 11 nm), während das SecA Protein aus *B. subtilis* kleiner (Durchmesser ca. 9 nm) und wesentlich kompakter erscheint. Die Struktur des *B. subtilis* SecA konnte kürzlich durch Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 2,7 Å gelöst werden. Das aus Einzelpartikelanalyse gewonnene EM-Modell zeigt - auf der Ebene der erreichten Auflösung - bemerkenswerte Übereinstimmung mit der Kristallstruktur (Kapitel 2).

Für die Untersuchung der Konformationsänderungen der löslichen *E. coli* und *B. subtilis* SecA Proteine wurden negativkontrastierte Einzelpartikel-Datensätze in Ggw. von Nukleotiden (ADP, ATP) bzw. nicht-hydrolyzierbaren Nukleotidanalogen (AMP-PNP), aber auch in Ggw. von Azid (Inhibitor der SecA Translokase ATPase) bzw. Azid+ATP gesammelt. Nach MSA und 3D-Rekonstruktion erhaltene Modelle deuten auf - v. a. im Fall des *E. coli* SecA Proteins - auf detektierbare Konformationsänderungen: während SecA in Ggw. von ADP in einer kompakteren Form vorliegt, resultiert die Zugabe von ATP bzw. AMP-PNP in einer offeneren Konformation. Diese Befunde stehen mit spektroskopischen Messungen aus der Literatur im Einklang (Kapitel 2).

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Center of Nanotechnology (Univ. of Washington, Seattle, USA) wurden Experimente zur zwei-dimensionalen Kristallisation von SecA aus *E. coli* und *B. subtilis* an Lipid-Monoschichten durchgeführt. Dabei wurde das Adsorptions- bzw. Kristallisationsverhalten von SecA an Monoschichten aus negativ geladenen Lipiden (DOPG) bzw. Cu-Chelatorlipiden (DOGS-NTA/Cu) mittels Oberflächenspannungsmessungen und Brewster Winkel Mikroskopie (BAM) verfolgt; die resultierenden Schichten wurden nach Übertragung auf feste Substrate mittels Negativkontrastierung elektronenmikroskopisch untersucht. Während das SecA Protein aus *B. subtilis* an DOGS-NTA/Cu-Monoschichten dicht gepackte Strukturen bildete, konnten in bisherigen Experimenten noch keine 2D-kristalline Bereiche erhalten werden (Kapitel 3).

Im Rahmen weiterer Kooperationen wurden die Techniken der Negativkontrastierung und Kryoelektronenmikroskopie in Kombination mit Bildverarbeitung zur Strukturuntersuchung von großen, oligomeren Enzymkomplexen eingesetzt (Kapitel 4). So wurde der oligomere Enzymkomplex Enoatreduktase aus *Clostridium tyrobutyricum* in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Strukturforschung am Max Planck Institut für Biochemie (Martinsried) elektronenmikroskopisch untersucht. Das aus Einzelpartikeln mittels Multivariater Statistischer Analyse und angular reconstitution gewonnene 3D-Molekülmodell konnte als „molecular envelope“ zur Phasierung der Röntgenbeugungsdaten eingesetzt werden, so daß die Ermittlung der Struktur bei 3,1 Å Auflösung möglich wurde. Diese Vorgehensweise zeugt von der nützlichen Interaktion zwischen Elektronenmikroskopie und Röntgenkristallographie zur Strukturuntersuchung von großen, oligomeren Proteinkomplexen, die bisher nur an wenigen Beispielen demonstriert wurde.

Die strukturellen Veränderungen des *E. coli* GroE-Chaperon-Systems, das aus GroEL- und GroES-Einheiten besteht, nach Bindung des denaturierten Substratproteins Citratsynthase wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Buchner (Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München) elektronenmikroskopisch untersucht. Das aus Einzelpartikeln erstellte 3D-Modell zeigt sehr gute Übereinstimmung mit dem Röntgenmodell und deutet auf die Bindung des Substratproteins im Bereich der äquatorialen Domäne des freien GroEL-Rings.

Kapitel 1 **Einleitung**

1.1 Elektronenmikroskopische Methoden der Strukturanalyse

Die Kenntnis der Struktur eines biologischen Objektes liefert einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis seiner Funktion und Wirkungsweise im Organismus. So sind detaillierte Aussagen über den molekularen Ablauf einer enzymatisch katalysierten Reaktion nur bei bekannter räumlicher Struktur des Enzyms möglich. Zur Aufklärung von Biomakromolekülstrukturen werden verschiedene Techniken eingesetzt, die auf unterschiedlichen physikalischen Wirkungsweisen basieren.

Die Röntgenkristallographie, die älteste und noch immer dominante Methode, nutzt zur Gewinnung von Strukturinformation die Beugungsphänomene an geordneten Ensembles von Proteinmolekülen (Biomakromolekülen) in Kristallverbänden aus und ermöglicht die Strukturanalyse bei atomarer Auflösung. Durch die Anwendung von mehrdimensionalen Techniken ist man auch in der NMR-Spektroskopie inzwischen in der Lage, größere Proteinstrukturen aufzuklären. Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) ist eine Methode, die im Abbildungsmodus bei hoher Vergrößerung und hoher Auflösung eine zwei-dimensionale (Dichte-) Projektion dreidimensionaler Objekte liefert. Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse enthalten TEM-Aufnahmen im Hellfeldbetrieb sowohl Amplituden- als auch Phaseninformation.

Durch die methodischen Entwicklungen der letzten 15 - 20 Jahre gewinnt die Elektronenmikroskopie in der biomolekularen Strukturforschung sowohl im molekularen ($\leq 3,0$ nm), als auch im nahezu atomaren Bereich ($\leq 0,4$ nm) immer mehr an Bedeutung. Die Technik bietet im Vergleich zu klassischen Strukturanalysemethoden wie Röntgenstrukturanalyse und NMR einige Vorteile wie die geringen benötigten Probenmengen (μg statt mg), die besondere Eignung für die Analyse von großen Proteinkomplexen und die Möglichkeit der Strukturanalyse von Membranproteinen in einer quasi-natürlichen Umgebung, eingebettet in Lipid-Bilayer. Ein prinzipielles Problem der Elektronenmikroskopie biologischer Objekte ist die Dehydratisierung beim Einbringen in das Vakuum, das zum Betrieb des Elektronenmikroskopes nötig ist. Ebenso muß dem geringen intrinsischen Kontrast und der ausgeprägten Strahlungsempfindlichkeit biologischer Objekte durch die Probenpräparation und speziellen Abbildungstechniken Rechnung getragen werden.

Durch die genannten Faktoren wird die Auflösung der elektronenmikroskopischen Methoden an biologischen Objekten verringert: obwohl ein modernes TEM eine atomare Auflösung ermöglicht, die z. B. in der Materialforschung voll ausgenutzt wird, führen die gängigen Präparationsmethoden an biologischen Präparaten, wie z. B. Direktabbildung nach Negativkontrastierung, zur Auflösung von strukturellen Details nur in Bereichen oberhalb von 1,0 nm - 1,5 nm. Jedoch ermöglichen in jüngerer Vergangenheit entwickelte Präparations- und Beobachtungsmethoden, die eine bessere Strukturhaltung und eine Verringerung der Strahlenschäden gewährleisten (z. B. die Kryoelektronenmikroskopie unter Low-Dose Bedingungen) höhere, nahezu atomare Auflösungen an organischen Präparaten (siehe dazu z. B. Frank, 1996). Dabei spielt der Routineeinsatz von verschiedenen Bildverarbeitungstechniken, die zur Extraktion der Strukturinformation aus relativ verrauschten TEM-Aufnahmen dienen, ebenfalls eine große Rolle.

Prinzipiell lassen sich die TEM-Methoden zur morphologischen Untersuchung biologischer Objekte in zwei Kategorien einteilen: die Analyse von Einzelpartikeln und die Analyse zwei-dimensional geordneter (kristalliner) Strukturen.

Durch die Elektronen-Tomographie lassen sich Informationen über die drei-dimensionale Struktur eines Objektes (Einzelpartikel oder kristalline Objekte) gewinnen, indem TEM-Aufnahmen eines Präparates bei unterschiedlichen ‚Orientierungen‘ gemacht werden. Durch die verschiedenen Projektionen des Objektes läßt sich daraus unter Anwendung von Bildverarbeitungsmethoden das drei-dimensionale Objekt rekonstruieren.

Durch TEM an Einzelpartikeln sind z. B. Proteine bei ausreichender Masse als Einzelmoleküle identifizierbar, auch wenn es sich um nicht optimal reines Probenmaterial handelt. Da normalerweise mehrere Einzelpartikel auf einer elektronenmikroskopischen Aufnahme unter verschiedenen ‚Blickrichtungen‘ zu sehen sind, kann daraus auf die drei-dimensionale Struktur geschlossen werden.

Falls Objekte nur in einer ‚Orientierung‘ auf dem TEM-Objektträger adsorbieren, wird das Präparat üblicherweise um eine Achse rotiert, wobei dessen Kippwinkel möglichst einen Bereich von +/- 90° abdeckt; TEM-Aufnahmen werden, abhängig vom Präparat und von der gewünschten Auflösung der 3D-Rekonstruktion ca. alle 2° gemacht. Als biologische Objekte eignen sich für sog. Kippserien sowohl Einzelpartikel, aber auch zwei-dimensional geordnete Strukturen (z. B. Proteinkris-

talle) bis hin zu ganzen Zellen. Anwendungen dazu finden sich z. B. in Rath et al., 1997 und Nicastro et al., 2000.

Gegenüber der Einzelpartikelanalyse bieten zwei-dimensionale Kristalle Vorteile. Da in einem zwei-dimensionalen Kristall mehrere Kopien identischer Einheiten vorhanden sind, kann durch eine geeignete Mittelungsprozedur das Signal/Rausch-Verhältnis und die Auflösung gegenüber einer Einzelpartikelanalyse gesteigert werden.

Mit Hilfe der Elektronen-Kristallographie an zwei-dimensionalen Kristallen lassen sich zusätzlich die Amplituden der Beugungsreflexe für eine drei-dimensionale Rekonstruktion wesentlich genauer bestimmen als nach der Prozessierung von Hellfeldaufnahmen. Die Ursachen dafür liegen in den nicht optimalen Abbildungseigenschaften des Mikroskopes und in der nicht optimalen Aufzeichnung der Bildinformation. Mit zwei-dimensional geordneten, biologischen Präparaten läßt sich dessen drei-dimensionale Struktur mit nahezu atomarer Auflösung bestimmen, wie erstmals Henderson et al. (1990) durch Bestimmung der drei-dimensionalen Struktur von Bacteriorhodopsin bei einer Auflösung von 3,5 Å demonstrierte. Weitere Beispiele zur Strukturaufklärung durch Elektronen-Kristallographie finden sich z. B. bei Kühlbrandt et al., 1994 (Lichtsammelkomplex bei 3,4 Å), Mitsuoka et al., 1999 bzw. Ringler et al., 1999 (Aquaporin bei 4,5 Å bzw. 8 Å) und Nogales et al., 1995 (Tubulin bei 6,5 Å).

1.2 Bakteriellies Preprotein-Translokationssystem

Biologische Membranen grenzen eine Zelle nicht nur gegenüber ihrer Umgebung ab; sie definieren bei Eukaryonten auch innerhalb der Zelle Bereiche, in denen autonome biochemische Reaktionen stattfinden können, die durch spezifische Proteine katalysiert werden.

Bestehend aus Lipid-Doppelschichten haben biologische Membranen einen ausgesprochen hydrophoben Charakter: sie stellen eine undurchlässige Barriere für die meisten polaren Moleküle, aber auch für größere Makromoleküle dar. Für die Gewährleistung lebenswichtiger Funktionen einer Zelle ist jedoch ein Austausch von verschiedenen Molekülklassen, z. B. von Ionen bis hin zu Proteinen, notwendig. Daher sind biologische Membranen mit verschiedenen Membranproteinen

ausgestattet, die den Transport zwischen verschiedenen Zellorganellen bzw. zwischen der Zelle und seiner Umgebung bewerkstelligen.

Eine Unterteilung einer Zelle in mehrere Bereiche durch Membranen lässt sich auch bei Prokaryonten finden. Beispielsweise wird in *Escherichia coli* das Cytosol durch die cytoplasmatische Membran (Innermembran) vom Periplasma getrennt, das wiederum durch die äußere Membran von seiner Umgebung abgegrenzt wird. Proteine, die in diesen verschiedenen Bereichen ihre Funktionen ausüben, werden in Form ihrer Vorläufer (Preproteine) im Cytosol synthetisiert und müssen in die beiden Membranen eingebaut bzw. durch diese transportiert werden.

Für den Preproteintransport in und durch die prokaryotische Innermembran gibt es verschiedene Mechanismen (Fekkes & Driessen, 1999), wobei grundsätzlich zwischen co- und post-translationalen Transport unterschieden wird. Bei co-translationalem Transport sind Preproteinsynthese und Membrantranslokation gekoppelte Prozesse, während bei post-translationalen Transport das Preprotein vor der Membrantranslokation im Cytosol vollständig synthetisiert wird.

In Bakterien wird der post-translationalen, aktive Preproteintransport durch das ‚Sec-System‘ (secretory system) assistiert, in dessen Kern die komplexe molekulare Maschine ‚Preprotein-Translokase‘ steht.

Das *E. coli* Sec-System besteht aus löslichen und membranassoziierten bzw. membranintegrierten Proteinkomponenten und bewerkstelligt in einer Kaskade von Erkennungs- und Bindungsreaktionen den Transport von membranständigen und periplasmatischen Proteinen in und durch die Innermembran. Den Kern des Systems bildet der oligomere Enzymkomplex ‚Preprotein Translokase‘ (Driessen, 1994; den Blaauwen & Driessen, 1996; Fekkes & Driessen, 1999), die aus der löslichen bzw. membranassoziierten ATPase **SecA** (Homodimer, $MW_M = 102$ kDa) (Driessen, 1993), der integralen, heterotrimeren Struktureinheit **SecYEG** ($MW = 74$ kDa) (Hartl et al., 1990; Douville et al., 1995) und dem heterotrimeren Membrankomplex **SecDFYajC** ($MW = 100$ kDa) (Duong & Wickner, 1997a; Duong & Wickner, 1997b) besteht. Als weitere Komponente der Translokase wurde kürzlich ein 60 kDa Membranprotein, **YidC**, identifiziert, das vermutlich an der Insertion von hydrophoben Aminosäuresequenzen in die Lipidschicht beteiligt ist (Scotti et al., 2000).

Abb. 1 zeigt einen Überblick über bisher bekannte Komponenten des Preprotein-Translokationssystems von *E. coli*.

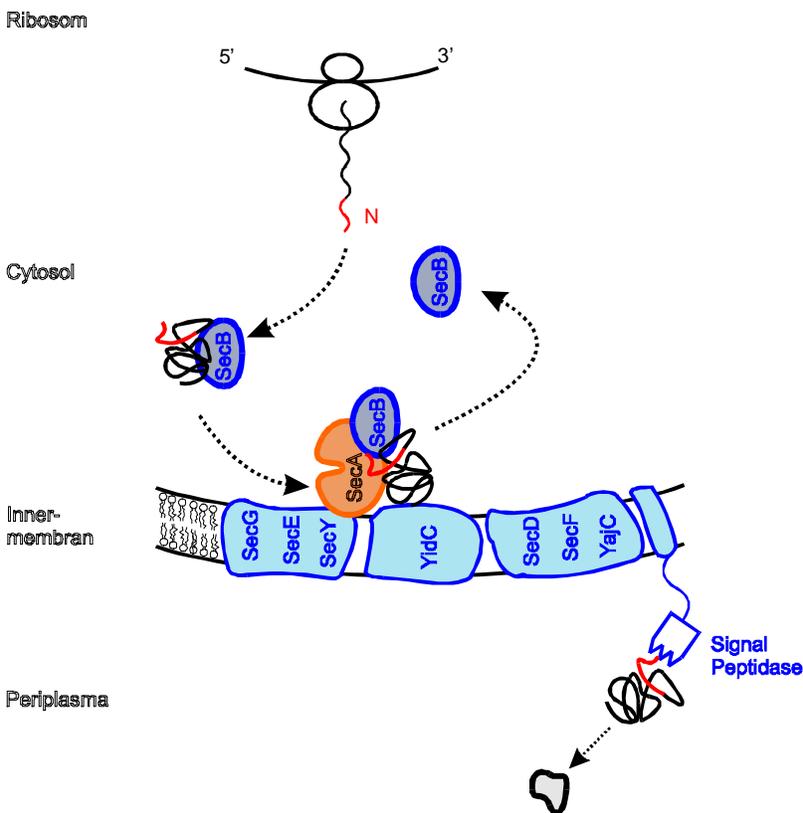


Abb. 1: *E. coli* Preprotein-Translokationssystem

Die Komponenten des *E. coli* Translokationssystems sind genetisch und biochemisch charakterisiert; auch existieren aufgrund biochemischer Studien Modellvorstellungen über einzelne Schritte der Translokation, die in Abb. 2 schematisch dargestellt sind: nach ribosomaler Synthese des Preproteins mit einer 15 - 20 Aminosäuren langen hydrophoben Signalsequenz bindet das Exportchaperon **SecB** (Homotetramer, MW = 69 kDa) hochselektiv an das Preprotein (Kumamoto & Beckwith, 1985; Randall & Hardy, 1995). Durch die Wechselwirkung mit SecB werden Preproteine vor unspezifischer Aggregation im Cytosol geschützt, in einem translokationskompetenten Zustand gehalten (entfaltet oder partiell gefaltet) und zu membranassoziertem SecA dirigiert. Die Affinität von SecB zu membrangebundenem SecA ist gegenüber löslichem SecA etwa zehn mal höher (den Blaauwen et al., 1997). Die korrekte Assoziation des SecA mit der Innermembran wird durch seine Wechselwirkung mit den anionischen Phospholipiden (Breukink et al., 1992; Kusters et al., 1994, Breukink et al., 1995) und der SecY Untereinheit des SecYEG kontrolliert (Snyders et al., 1997). Durch die Bindung des SecB/Preprotein-Komplexes an SecA wird das Preprotein auf SecA

übertragen und SecA für die ATP Bindung aktiviert; dabei wird das SecB freigegeben (Fekkes et al., 1997) [1]. Die Bindung des ATP an SecA induziert eine massive Konformationsänderung des SecA und die Insertion einer C-terminalen 30 kDa Domäne in die Membran (Economou & Wickner, 1994; Economou et al., 1995; van der Does et al., 1996; Eichler & Wickner, 1997; Eichler et al., 1997), wobei Teile dieser Domäne dem periplasmatischen Raum ausgesetzt vorliegt (Ramamurthy & Oliver, 1997). Vermutlich bildet SecA gemeinsam mit SecYE(G) eine Proteinpore, durch die zunächst ein Abschnitt von 20 - 25 Aminosäuren des Preproteins transportiert wird (Joly & Wickner, 1993; van der Wolk et al., 1997) [2]. Die Hydrolyse des gebundenen ATP und die Bindung und die Hydrolyse eines weiteren ATP führen zu der Dissoziation des Preproteins von SecA und zu der Deinsertion der C-terminalen 30 kDa Domäne, wobei anschließend das deinsertierte SecA mit dem cytosolischen SecA austauscht (Economou & Wickner, 1994) [3]. Aufgrund der protonmotorischen Kraft $\Delta\mu_H$ findet der Transport eines weiteren Preproteinsegments durch die Membran statt (Driessen, 1992; Driessen et al., 1995) [4]. Nach mehreren Zyklen der Translokation durch SecA/ATP einerseits und protonmotorische Kraft andererseits wird das gesamte Preprotein durch die Membran transportiert [1', 2', ...], wobei je ATP – bzw. Membranpotentialzyklus jeweils ein ca. 2,5 kDa Segment des Preproteins durch die Membran transportiert wird (van der Wolk et al., 1997). Insgesamt können durch die Preprotein Translokase bis zu 1000 Aminosäuren pro Sekunde vom Cytosol in das Periplasma gelangen (Driessen, 1994).

An der Translokation ist außerdem der heterotrimere Membrankomplex SecDFYajC beteiligt, das die membraninsertierte Form des SecA zu stabilisieren scheint (Duong & Wickner, 1997a). Obwohl der Komplex für die Translokation nicht essentiell ist, zeigen Untersuchungen, daß er für das Aufrechterhalten des Membranpotentials (Arkowitz & Wickner, 1994) und für das Nicht-Zurückgleiten des Preproteins vom Periplasma in die Membran verantwortlich ist (Duong & Wickner, 1997b).

Nach erfolgter Translokation des Preproteins durch die innere Membran in das Periplasma trennt die Signal Peptidase das Signalpeptid vom Protein, wonach das Preprotein falten kann (die SecA/Signalpeptid-Wechselwirkung wird z. B. in Wang et al., 2000 beschrieben).

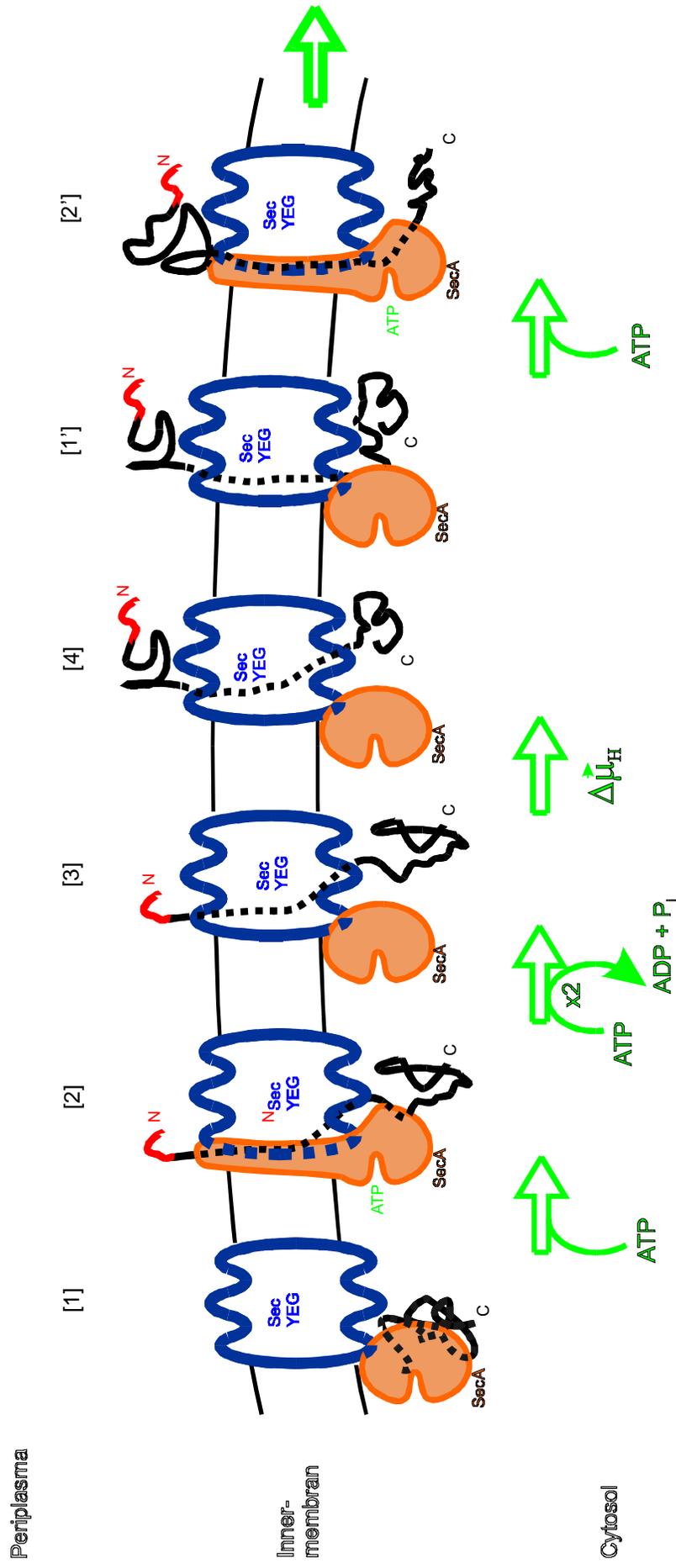


Abb. 2: Modell zum Mechanismus der Preprotein-Translokation

Motor der Proteintranslokation: SecA Protein:

Das SecA Protein ist die periphär membranassoziierte Komponente der *E. coli* Preprotein-Translokase und spielt im Translokationsprozeß als einzige ATPase, und damit als einzige energieliefernde Proteinkomponente des Sec-Systems eine zentrale Rolle. Es ist der molekulare Motor, der den stufenweisen Transport von Preproteinen in und durch die Innermembran durch Reaktionszyklen von ATP-gekoppelten Konformationsänderungen und Membraninsertionen/-deinsertionen assistiert.

Das SecA Protein aus *E. coli* besteht aus 901 Aminosäuren (Schmidt et al., 1988). Etwa die Hälfte des gesamten Proteins ist im Cytosol lokalisiert, der restliche Teil liegt membranassoziiert oder membranintegriert vor (Cabelli et al., 1991). SecA übt seine Funktion als Dimeres aus (Driessen et al., 1993). Jedes SecA Monomer hat ein Molekulargewicht von 102 kDa und besitzt zwei Nukleotid-Bindungsstellen (Mitchell & Oliver, 1993) mit Sequenzhomologie zu F1/RecA ATPase (Yoshida & Amano, 1995). Für das SecA Protein wurde aufgrund biochemischer Untersuchungen eine zwei-Domänenstruktur postuliert (den Blaauwen et al., 1996; Price et al., 1996): eine N-terminale ATPase Domäne (65 kDa), in der die Hochaffinitäts-Nukleotid-Bindungsstelle (NBS I), Preprotein- (Kimura et al., 1991) und Membranbindungsstellen lokalisiert sind, und eine ca. 30 kDa C-terminale Domäne, die in der Membraninsertion involviert ist und bei der Dimerisierung (Hirano et al., 1996), bei der Interaktion mit SecY (Snyders et al., 1997) und bei der Bindung von SecB (Fekkes et al., 1997) und Lipid (Breukink et al., 1995; Keller et al., 1995) eine Rolle spielt. SecA enthält am äußersten C-terminus an der postulierten SecB Bindungsstelle eine Zn-Atom, durch das die Bindung des SecB stabilisiert wird (Fekkes et al., 1999). Untersuchungen zeigen, daß die Membraninsertion des Proteins mit der C-terminalen Domäne durch die ATPase Domäne reguliert wird (Rajapandi & Oliver, 1996). Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der funktionellen Sequenzabschnitte des *E. coli* SecA Proteins.

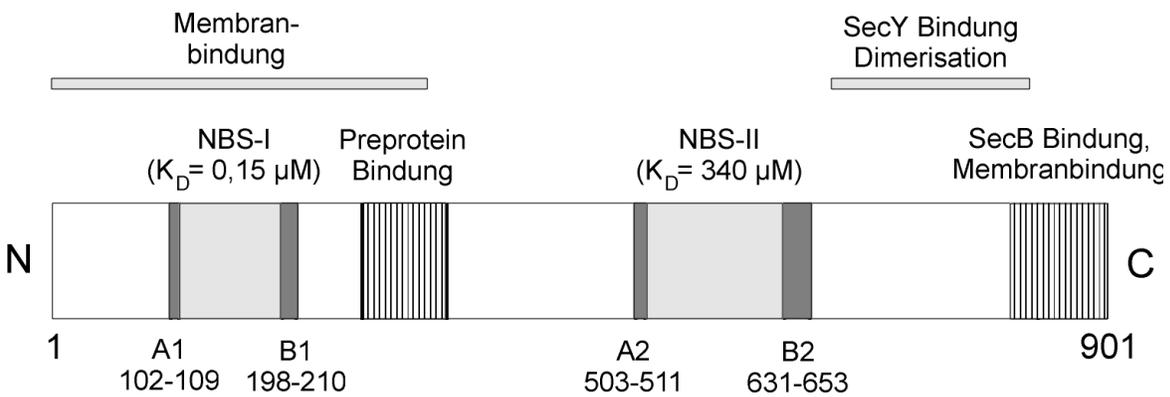


Abb. 3: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von *E. coli* SecA (A, B: Walker A und Walker B Motive).

Neben seiner Rolle als Motor der Translokation (einzige ATPase) wurde eine RNA-Helikase Aktivität von SecA nachgewiesen (Koonin & Gorbalenya, 1992); außerdem reguliert das cytosolische SecA seine eigene Synthese (Salavati & Oliver, 1997).

Nach spektroskopischen Befunden zeigt das SecA Protein je nach Interaktionspartner oder funktionellem Zustand eine große Konformationsflexibilität; in Gegenwart von ADP (NBS I und NBS II besetzt) liegt das Protein in einer kompakten, globulären Form vor, die möglicherweise der membrandeinsertierten Form entspricht, während die Zugabe von ATP oder AMP-PNP in einer mehr elongierten, offenen Form resultiert, die dem membraninsertierten Zustand ähnelt (den Blaauwen et al., 1996; den Blaauwen et al., 1999). Im nativen Protein scheint die N-terminale Domäne stabiler zu sein, während die C-terminale Domäne flexibler ist und durch ADP-Bindung stabilisiert wird. Die Assoziation mit dem Preprotein führt zu einer protease-sensitiven, weniger kompakten Konformation, die Wechselwirkung mit anionischen Phospholipiden zur teilweisen Insertion des Proteins in den Mono- bzw. Bilayer (Breukink et al., 1992; Keller et al., 1995).

Bisher liegen in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur Struktur und Dynamik (Konformationsänderungen) des *E. coli* SecA Proteins vor. Aus Röntgen-Kleinwinkelstreuungsexperimenten an löslichem *E. coli* SecA in nativer Form wurde für das Molekül eine elongierte Form (15 nm x 8 nm) abgeleitet; nukleotidinduzierte Konformationsänderungen in Gegenwart von ATP bzw. ADP wurden in dieser Studie nicht beobachtet (Shilton et al., 1998). Dieser Befund steht zu Ergebnissen aus spektroskopischen und thermodynamischen Untersuchungen in Widerspruch.

In einer früheren Studie wurden 3D-Kristalle des *E. coli* SecA mit Dünnschichtmethodik elektronenmikroskopisch untersucht (Weaver et al., 1992). In dieser Studie wurde zwar die Packung der Moleküle im 3D-Gitter aus den Projektionsdaten ermittelt, die dabei erreichte Auflösung von etwa 40 Å erlaubte jedoch nicht die Erkennung struktureller Details.

Die Röntgenstrukturanalyse am *E. coli* SecA Protein wird nach wie vor durch die ungenügende Qualität der bisher verfügbaren Kristalle limitiert. Dies gilt auch für Kristalle des Proteins in Gegenwart von verschiedenen Interaktionspartnern. Die schlechte Beugungsqualität wird vermutlich durch die exzessive Konformationsflexibilität und/oder durch eine strukturelle Heterogenität aufgrund der Proteolyse der amino- bzw. carboxy- Termini verursacht.

Gram-positive Bakterien haben eine *E. coli* Sec-System analoge Translokationsmaschinerie, die die Sekretion von extrazellulären Enzymen assistiert. In *B. subtilis* wurde ein zu *E. coli* secA-Gen homologes div⁺-Gen identifiziert, dessen Produkt inzwischen isoliert, gereinigt und charakterisiert wurde (Sadaie et al., 1991; Takamatsu et al., 1992). Das SecA Protein aus *B. subtilis*, auch Div genannt, (841 aa, 94 kDa, Homodimer) (Takamatsu et al., 1992) und das SecA Protein aus *E. coli* besitzen 50 % Sequenzhomologie, wobei die NH₂-terminalen Sequenzabschnitte beider Proteine sogar 71 % Identität zeigen (Sadaie et al., 1991). Das Subtilis-Protein besitzt allerdings mehr hydrophilen Charakter und scheint weniger protease-sensitiv zu sein. Auch das *B. subtilis* SecA liegt etwa zur Hälfte im Cytosol löslich vor, die andere Hälfte ist membranassoziiert bzw. membranintegriert. (McNicholas et al., 1995). Die SecA Proteine aus beiden Spezies sind für *in vivo* Protein-Sekretion essentiell (Oliver & Beckwith, 1981). Die strikte Konservierung des N-terminalen Sequenzabschnittes, der im *E. coli* Protein den funktionell wichtigen Teil darstellt, deutet auf eine ähnliche Funktion des *B. subtilis* SecA. So kann z. B. die N-terminale ATPase-Domäne von *B. subtilis* SecA in einem *in vitro* *E. coli* Translokationstest die korrespondierende Region von SecA aus *E. coli* substituieren. Aufgrund der Sequenzhomologie kann außerdem spekuliert werden, daß die SecA Proteine aus den genannten Spezies ähnliche Tertiärstrukturen besitzen. Das SecA Protein aus *B. subtilis* konnte in Gegenwart von Glycerin drei-dimensional kristallisiert werden (Weinkauf et al., 2000). Seine Struktur wurde durch Röntgenkristallographie bei einer Auflösung von 2,7 Å gelöst (Hunt et al., 2000).

1.3 Zielsetzung

Die zahlreichen Arbeiten zu Proteintranslokation in Bakterien und zur Translokase selbst, lassen sich wie folgt zusammenfassen: die Komponenten der Translokase sind genetisch und biochemisch charakterisiert; die essentiellen Komponenten (SecA, SecYEG) scheinen in allen Bakterien weitgehend konserviert zu sein. Die Modellvorstellungen über den Mechanismus der Translokation sind allerdings noch immer teilweise spekulativ. Die bisherigen biochemischen Befunde lassen auf eine sehr dynamische Natur des Prozesses und auf komplizierte Wechselwirkungen der Komponenten der Translokase, begleitet von erheblichen Konformationsänderungen schließen. Für das Verständnis dieser Wechselwirkungen und des Mechanismus der Translokation sind detaillierte Kenntnisse der Strukturen bzw. Konformationsänderungen der Translokasekomponenten und der gesamten aktiven Translokase notwendig.

Bei der Strukturanalyse der Membrankomponenten der Translokase hat bisher die Elektronenmikroskopie den größeren Beitrag geleistet: so konnte z. B. der SecYEG Komplex aus *E. coli* im solubilisierten Zustand dargestellt werden (Manting et al., 2000). Ebenso wurde der SecYE Komplex aus *B. subtilis* in solubilisierter bzw. rekonstituierter Form elektronenmikroskopisch untersucht (Meyer et al., 1999). Am Translokationssystem der ER-Membran konnten die vom Sec61p-Komplex gebildete Translokationspore (Hanein et al., 1996) und die Assoziation des Sec61- Komplexes mit Ribosomen (co-translationaler Transport) mittels Kryoelektronenmikroskopie bzw. 3D-Rekonstruktion aus Einzelpartikeln gezeigt werden (Beckmann et al., 1997).

Strukturuntersuchungen an löslichen Komponenten der Translokase stehen jedoch noch am Anfang: so konnte bisher nur die Struktur von *B. subtilis* SecA mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt werden. Bisherige biochemische Untersuchungen an SecA Proteinen aus *E. coli* und *B. subtilis* deuten auf eine ähnliche Tertiärstruktur beider Proteine; jedoch fehlen in der Literatur jegliche Strukturinformationen an *E. coli* SecA. Auch wird auf die hohe Konformationsflexibilität beider Proteine aus indirekten biochemischen und spektroskopischen Daten geschlossen; ein direkter Nachweis der Konformationsänderungen beider Proteine ist noch zu erbringen.

Da *E. coli* SecA für Strukturuntersuchungen, bzw. Untersuchungen zu Konformationsänderungen mittels Röntgenkristallographie und NMR nicht zugänglich ist, scheint der Weg über Elektronenmikroskopie (Tomographie), Einzelpartikelanalyse

und 3D-Rekonstruktion der einzig machbare, um es morphologisch zu charakterisieren bzw. die Konformationsänderungen sichtbar zu machen, was die primäre Zielsetzung der vorliegenden Arbeit wiedergibt.

Kapitel 2 Untersuchungen zur Struktur und zu nukleotid-induzierten Konformationsänderungen der SecA Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis*

2.1 Methoden

2.1.1 Proteinreinigung

Die für die Überexpression der SecA Proteine aus *E. coli* bzw. *B. subtilis* benötigten Stämme (der *Escherichia coli* Stamm NO 2947) bzw. Plasmide (pmlk13 (*E. coli* SecA) und pET15 (*B. subtilis* SecA)) wurden uns von Prof. Dr. Arnold J. M. Driessen, Department of Microbiology, Universität Groningen, Niederlande zur Verfügung gestellt. Die biochemischen Arbeiten zur Reinigung bzw. zur Aktivitätsbestimmung von SecA wurden in unserer Gruppe von Dr. Johannes Scheuring durchgeführt. Im folgenden sollen die Reinigungsprotokolle für beide SecA Proteine kurz beschrieben werden.

Zellanzucht:

SecA aus *Escherichia coli* wurde in NO2947 *E. coli* Zellen mit dem Vektor pmlk13 in Gegenwart von 50 g/ml Ampicilin überexpressiert. Die Überexpression wurde durch 1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. SecA aus *B. subtilis* wurde ebenfalls in NO2947 *E. coli* Zellen mit dem Vektor pET13 in Gegenwart von 50 g/ml Kanamycin und 1 mM IPTG überexpressiert.

Reinigung von *E. coli* SecA (Cabelli et al., 1988):

E. coli Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Rohextrakt auf eine Q-Sepharose Anionenaustauschersäule (Amersham-Pharmacia) aufgetragen. SecA Protein wurde durch einen Gradienten von 0 - 300 mM NaCl eluiert. Das Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von ca. 100 mM. Die Fraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese auf SecA getestet. SecA-haltige Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von CentriPrep-30 Konzentratoren (Amicon) aufkonzentriert.

Die weitere Reinigung erfolgte durch Gelchromatographie an einer Superdex-200 Säule (Amersham-Pharmacia).

Reinigung von *Bacillus subtilis* SecA (Weinkauf et al., 2000):

B. subtilis SecA überexprimierende *E. coli* Zellen wurden durch Ultraschall aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde an einer DEAE-Sepharose Säule (Amersham-Pharmacia) chromatographiert. SecA eluierte zwischen 50 und 200 mM NaCl. SecA-haltige Fraktionen wurden in CentriPrep-30 Konzentratoren aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde in 50 mM HEPES-Puffer, pH = 7.5 verdünnt und an einer SP-Sepharose Kationeraustauschersäule chromatographiert. SecA eluierte bei 100 mM NaCl. SecA haltige Fraktionen wurden vereinigt und mit festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf eine Endkonzentration von 600 mM eingestellt und auf eine Phenyl-Sepharose Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit einem Gradienten von 600 bis 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ entwickelt. SecA eluierte bei einer Salzkonzentration zwischen 100 und 200 mM.

Aktivitätsbestimmung von SecA (Lanzetta et al., 1979; Lill et al., 1990):

Die endogene ATPase Aktivität von SecA wurde durch Bestimmung des gebildeten Orthophosphates nach Zugabe von Ammoniummolybdat/Malachitgrünreagenz photometrisch getestet.

2.1.2 Präparation für die Elektronenmikroskopie

Ein sehr weites Betätigungsgebiet umfaßt die Probenpräparation von biologischen Makromolekülen zur Transmissions-Elektronenmikroskopie. Der hydratisierte Zustand, der geringe intrinsische Kontrast und die ausgeprägte Strahlungsempfindlichkeit biologischer Objekte stellen dabei fundamentale Probleme dar. Ziel aller Präparationsmethoden ist es, die Veränderungen des Objektes während der Präparation und Kontrastierung und die strahlbedingte Zerstörung während der Beobachtung zu verringern, um reproduzierbare, artefaktarme und hochauflösende morphologische Molekülinformationen zu erhalten.

Negativkontrastierung:

Eine gängige Methode zur Kontrasterhöhung biologischer Makromoleküle, adsorbiert auf festen, elektronentransparenten Substraten (z. B. Kohlefolie), ist die Einbettung in Schwermetallsalze. Dabei füllt die Schwermetallsalz-Lösung den nicht vom Objekt eingenommenen Raum aus und erhöht dadurch den Kontrast des Untergrundes gegenüber dem Objekt (Negativkontrastierung, z. B. bei Brenner & Horne, 1959; Bremer et al., 1992). Das Kontrastmittel dringt dabei zum Teil in die hydrophilen Bereiche des Objektes ein. Trotz der mit der Methode verbundenen Probleme (z. B. unvollständige Kontrastierung mancher Objektbereiche, Kristallisation des Kontrastmittels während der Trocknung und im Elektronenstrahl, konkurrierende „Positivkontrastierung“ und eventuelle artefaktive Veränderungen am Präparat schon bei geringen Elektronendosen) wurden mit der Negativkontrastierungsmethode beträchtliche Erfolge bei der Strukturanalyse von Biomakromolekülen erzielt (Bremer et al., 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die morphologische Untersuchung der SecA Proteine die Negativkontrastierungstechnik herangezogen. Als Schwermetallsalz wurde eine 1 - 2 %ige wässrige Lösung von Uranylacetat verwendet (pH-Wert ca. 3,5 - 4,5), da sich dieses Kontrastierungsmittel z. B. gegenüber Phosphorwolfram-Säure, Uranyl Formiat, Aurothioglukose, NanoVan (Hainfeld et al., 1994) geeigneter erwies. Das Trägernetzchen wurde mit seiner kohlebefilmten Seite (hydrophilisiert durch Glimmentladung) zunächst 1 Minute auf einen Tropfen Proteinlösung gelegt, dann mit Puffer bzw. destilliertem Wasser gewaschen und abschließend 1 Minute auf einen Tropfen Uranylacetat gelegt. Nach jedem dieser Schritte wurde der Flüssigkeitsüberstand mit Filterpapier abgezogen, wobei das Präparat nicht eintrocknen durfte.

Kryopräparation:

Biologische Makromoleküle können in ihrem hydratisierten Zustand physikalisch durch Kryofixation fixiert werden, wobei die Struktur bei sehr tiefen Temperaturen konserviert wird. Das Hauptproblem beim Einfrieren wasserhaltiger disperser Systeme ist die Bildung von Eiskristallen, die erhebliche Artefakte verursachen können. Untersuchungen haben gezeigt, daß Phasentrennungen durch Eiskristallbildung bei ausreichend hohen Abkühlgeschwindigkeiten ($< 10^5$ K/s) auf ein annehmbares Maß (10 - 30 nm) reduziert werden können. Bei noch größeren

Abkühlraten (vermutlich $< 10^6$ K/s) ist es sogar möglich, dünne Filme aus wässrigen Suspensionen biologischen Materials vitrifiziert, d. h. durch amorphes Erstarren des Wassers, einzufrieren (Kryopräparation, z. B. bei Dubochet et al., 1988; McDowell et al., 1983; Bachmann & Mayer, 1987).

Vitrifizierte Proben können direkt im TEM bei tiefen Temperaturen ($T < 100$ K) beobachtet werden (Kryoelektronenmikroskopie). Gegenüber anderen Methoden bietet die Kryo-EM einige Vorteile:

- Da beim Einfrieren keine Eiskristalle gebildet werden, werden Objektzerstörungen durch Phasenentmischungen des Puffers weitgehend vermieden.
- Die Objekte sind voll hydratisiert, d. h. der native Zustand bleibt weitgehend erhalten.
- Der Kontrast kann durch das biologische Objekt selbst gebildet werden. Zugaben von Kontrastierungsmitteln (Schwermetall-Lösungen) sind nicht nötig, teils aber von Vorteil (sog. „density matching“ bei Kühlbrandt, 1982; Adrian et al., 1998).
- Die biologischen Makromoleküle zeigen im vitrifizierten Wasser keine bevorzugten Projektionsrichtungen; sie sind statistisch verteilt (dies ist z. B. bei Negativkontrastierung auf einer Kohlefolie üblicherweise nicht gegeben). Zu einer drei-dimensionalen Rekonstruktion genügt u. U. ein einziges Negativ.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, SecA mittels Kryoelektronenmikroskopie abzubilden. Zum Einfrieren wurde eine einfache Fallguillotine benutzt. An einer Pinzette hängend, wurde der mit der Proteinsuspension befeuchtete Objektträger (Quantifoil Lochfolie; Ermantraut et al., 1988) in Ethan eingeschossen, wobei das Ethan mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Als Kryohalter wurde ein Gatan 626 Halter benutzt, der auf -180° C abgekühlt werden konnte.

2.1.3 Elektronenmikroskopie

Ein Großteil der elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu dieser Arbeit entstanden an einem Philips CM 120 Transmissions-Elektronenmikroskop mit einer LaB_6 -Kathode. Das Mikroskop wurde bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV operiert. In einer späteren Phase der Arbeit wurde ein JEOL 2010 Transmissions-

Elektronenmikroskop eingesetzt, das ebenfalls mit einer LaB₆-Kathode bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV betrieben wurde.

Beide Elektronenmikroskope waren zur Bildaquisition mit einer gekühlten CCD-Kamera (charged-coupled-device, TVIPS GmbH, 1 k x 1 k, Größe eines Bildpunktes 24 µm x 24 µm) ausgestattet, die gegenüber herkömmlichem Filmmaterial eine größere Lichtempfindlichkeit (insb. bei Verwendung von effektiven P20 Szintillatoren und Binning¹) zeigt und automatische Astigmatismuskorrektur, Fokuseinstellung, Driftkorrektur bei Aufnahmen von Kippserien, etc. erlaubt, so daß Aufnahmen unter nahezu optimalen Bedingungen gemacht werden können (Dierksen et al., 1992; Tietz, 1992; Koster & Ruijter, 1992).

Phasenkontrasttransferfunktion (PCTF) und Fokuseinstellung:

Der Kontrast im Transmissions-Elektronenmikroskop, d. h. der relative Intensitätsunterschied zwischen einem Bildpunkt und seiner Umgebung basiert auf Amplituden- und Phasenkontrast. Amplitudenkontrast wird durch den „Verlust interferenzfähiger Elektronen“ verursacht (z. B. durch inelastische Streuung der einfallenden Elektronen mit der Elektronenhülle des Objektes unter Energie- und Impulsübertragung oder durch Ausblenden durch eine Objektivblende). Phasenkontrast entsteht durch elastische Streuprozesse, d. h. durch Streuprozesse am Coulombfeld der Atomkerne des Objektes ohne Energie- und Impulsübertragung, wodurch eine Phasenverschiebung zum ungestreuten Elektronenstrahl induziert wird.

Abb. 4 zeigt den schematischen Zusammenhang eines zwei-dimensionalen Objektes und seiner zwei-dimensionalen Abbildung durch ein TEM. Der einfallende Elektronenstrahl wird dazu als Welle beschrieben (Welle-Teilchen Dualismus).

In der folg. Betrachtung wird angenommen, daß in der Objektebene für die Gesamtwelle $\Psi_{\text{tot}}(x, y) \approx 1 + \Psi_{\text{Ph}}(x, y)$ gilt, d. h. nur ein kleiner Teil des einfallenden Elektronenstrahls wechselwirkt elastisch mit der Probe. Terme höherer Ordnung, z.

B. $-\frac{1}{2}[\Psi_{\text{Ph}}(x, y)]^2$ werden vernachlässigt, ebenso inelastische Streuung.

¹ Binning: mehrere Bildpunkte (z. B. 2 x 2 oder 4 x 4) werden zu einem Bildpunkt zusammengefaßt.

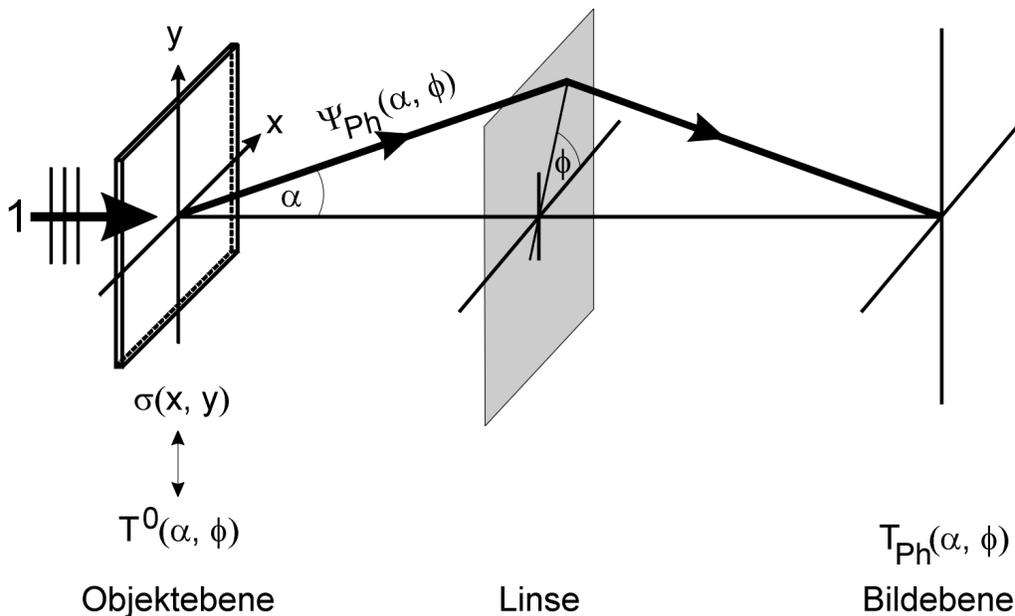


Abb. 4: Vereinfachter Zusammenhang zwischen zwei-dimensionalem Objekt und dessen elektronenmikroskopischer Abbildung. Eine ebene Welle trifft auf ein zwei-dimensionales Objekt in der x-y Ebene (charakterisiert durch die Dichtefunktion $\sigma(x, y)$ in Kartesischen Koordinaten bzw. $T^0(\alpha, \phi)$ in Kugelkoordinaten). Ein Teil der Welle wird elastisch um die Winkel α und ϕ gestreut ($\Psi_{Ph}(\alpha, \phi)$). Durch die (magnetische) Linse werden die ungestreute und die gestreute Welle in der Bildebene zur Interferenz gebracht (nach Erickson & Klug, 1971).

Unter diesen Voraussetzungen lässt sich folg. Zusammenhang ableiten (Erickson & Klug, 1971):

$$T_{Ph}(\alpha, \phi) = -T^0(\alpha, \phi) \cdot A(\alpha) \cdot f(\alpha) \cdot \sin(\chi(\alpha))$$

$$\text{mit } \chi(\alpha) = \frac{2\pi}{\lambda} \left[-c_s \frac{\alpha^4}{4} + \Delta f \frac{\alpha^2}{2} \right] \text{ und } T^0(\alpha, \phi) = \iint \sigma(x, y) e^{\frac{-2\pi i}{\lambda} [x\alpha \cos \phi + y\alpha \sin \phi]} dx dy$$

- $T^0(\alpha, \phi)$: Dichtefunktion der (perfekten) zwei-dimensionalen Projektion bzw. des zwei-dimensionalen Objektes in Kugelkoordinaten
- $\sigma(x, y)$: Dichtefunktion der (perfekten) zwei-dimensionalen Projektion bzw. des zwei-dimensionalen Objektes in kartesischen Koordinaten
- $T_{Ph}(\alpha, \phi)$: Dichtefunktion der zwei-dimensionalen elektronenmikroskopischen Abbildung in Kugelkoordinaten durch Phasenkontrast erster Ordnung (weak phase)
- $A(\alpha)$: Blendenfunktion (0 für $\alpha > \alpha_0$ bzw. 1 für $\alpha < \alpha_0$)
- $f(\alpha)$: Komplexe Streuamplitude eines Elektrons an einem Atom
- c_s : Sphärische Aberration der magnetischen Linse
- Δf : Defokus (positiv für Unterfokus, negativ für Überfokus)

Die Phasenkontrasttransferfunktion (PCTF) $-\sin(\chi(\alpha))$ gibt den wichtigsten Zusammenhang zwischen Objekt und dessen Abbildung wieder; bei $\text{PCTF} = \pm 1$ ist die Abbildung diesbezüglich perfekt. Abb. 5 zeigt die PCTF bei verschiedenen Defoki, u. a. beim sog. „Scherzer-Fokus“ $\sqrt{c_s \lambda}$, der eine sehr breite Frequenzübertragung gewährleistet. Die meisten TEM-Aufnahmen zu dieser Arbeit wurden nahe am Scherzer-Fokus gemacht.

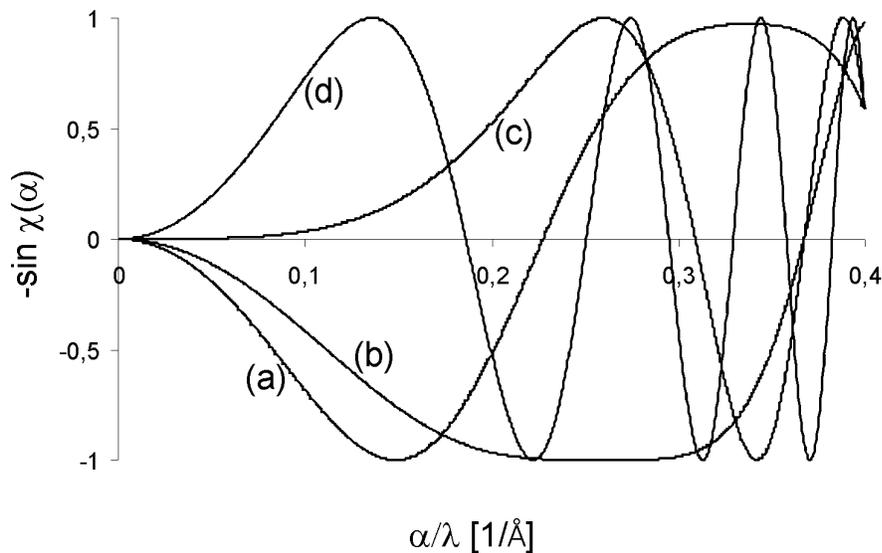


Abb. 5: Phasenkontrasttransferfunktion PCTF bei verschiedenen Defoki. (a) $\Delta f = 100$ nm, (b) Scherzer Fokus $\Delta f = 59$ nm, (c) $\Delta f = 0$ nm, (d) $\Delta f = -100$ nm, jeweils bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV ($\lambda = 0,0025$ nm) und sphärischer Aberration $c_s = 1,4$ mm (JEOL 2010). Positives Vorzeichen entspricht Unterfokus, negatives Vorzeichen Überfokus. Der Kontrast (hell-dunkel bzw. dunkel-hell) in elektronenmikroskopischen Abbildungen richtet sich nach dem Vorzeichen der PCTF.

Wird bei der Übertragungsfunktion in erster Näherung auch der Amplitudenkontrast berücksichtigt, so ergibt sich (Erickson & Klug, 1971):

$$T_{Ph+Ampl}(\alpha, \phi) = -T^0(\alpha, \phi) \cdot A(\alpha) \cdot f(\alpha) \cdot [\sin(\chi(\alpha)) + Q(\alpha) \cos(\chi(\alpha))]$$

$Q(\alpha)$: Verhältnis der maximalen Übertragung durch Amplitudenkontrast zu maximaler Übertragung durch Phasenkontrast

$T_{\text{Ph+Ampl}}(\alpha, \phi)$: Dichtefunktion der zwei-dimensionalen elektronenmikroskopischen Abbildung in Kugelkoordinaten durch Phasenkontrast und Amplitudenkontrast, jeweils erster Ordnung (weak phase, weak amplitude)

Abb. 6 zeigt den Einfluß des zusätzlichen Amplitudenkontrasts auf die Übertragungsfunktion.

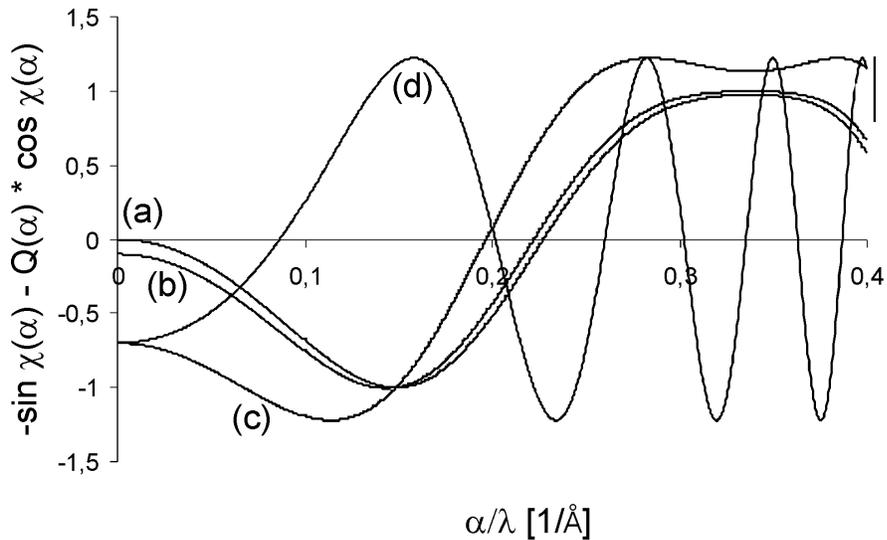


Abb. 6: Kontrasttransferfunktion bei verschiedenen Defoki und verschiedenen Anteilen an Amplitudenkontrast. (a) $\Delta f = 100$ nm und $Q(\alpha) = 0,0$, (b) $\Delta f = 100$ nm und $Q(\alpha) = 0,1$, (c) $\Delta f = 100$ nm und $Q(\alpha) = 0,7$, (d) $\Delta f = -100$ nm und $Q(\alpha) = 0,7$, jeweils bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV ($\lambda = 0,0025$ nm) und sphärischer Aberration $c_s = 1,4$ mm (JEOL 2010). Positives Vorzeichen entspricht Unterfokus, negatives Vorzeichen Überfokus.

Korrektur der Phasenkontrasttransferfunktion:

Einflüsse auf die Kontrasttransferfunktion ergeben sich z. B. durch die Nicht-Parallelität des Elektronenstrahles (Forderung nach ebener Welle nicht erfüllt), endliche Probendicke (Fokus nicht eindeutig) und chromatischer Aberration c_c der Objektivlinse, die bei Schwankungen des Objektivstroms und der Beschleunigungsspannung zu Fokusfluktuationen führt (Wade, 1992). In diesem Fall wird die Kontrasttransferfunktion mit einer Einhüllenden, die exponentiell abklingt multipliziert (Abb. 7).

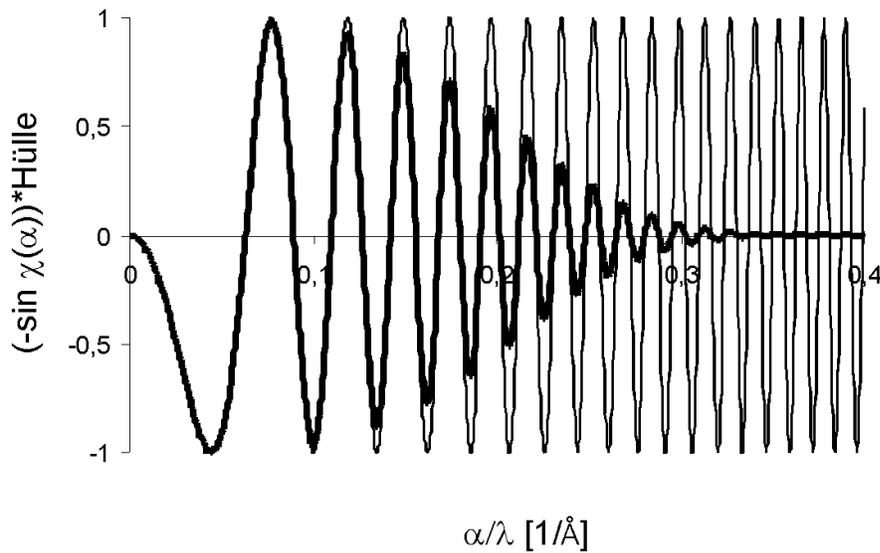


Abb. 7: PCTF bei chromatischer Aberration $c_c \neq 0$. Die dicke Linie zeigt die Übertragungsfunktion bei $c_c = 1,8 \text{ mm}$ (JEOL 2010), wobei für Spannungsschwankungen dU/U und Stromschwankungen dI/I je $3 \cdot 10^{-6}$ angenommen wurde. Zur Korrektur von $-\sin \chi(\alpha)$ wird diese mit einer Funktion „Hülle“ multipliziert, wobei gilt:

$$\text{Hülle} \propto \exp\left[-c_c \left(\frac{dU}{U} + 2\frac{dI}{I}\right)\right].$$

Die dünne Linie zeigt die unkorrigierte Übertragungsfunktion. Beide Kurven bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV ($\lambda = 0,0025 \text{ nm}$), sphärischer Aberration $c_s = 1,4 \text{ mm}$ (JEOL 2010) und $\Delta f = 1000 \text{ nm}$. Positives Vorzeichen entspricht Unterfokus, negatives Vorzeichen Überfokus.

Abb. 8 zeigt den Effekt eines sphärischen bzw. chromatischen Abbildungsfehlers einer (magnetischen) Linse auf eine einfallende ebene Welle.

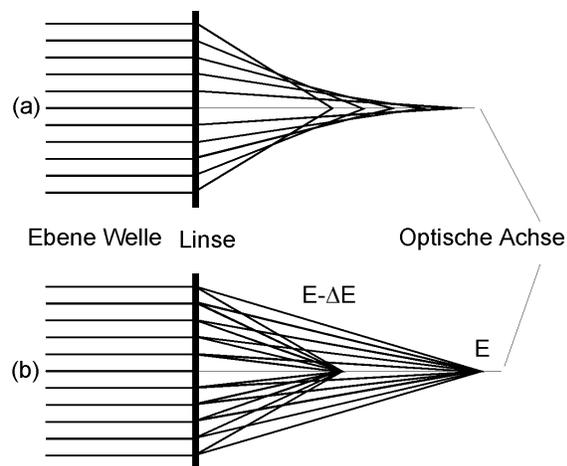


Abb. 8: Abbildungsfehler von (magnetischen) Linsen. (a) sphärische Aberration $c_s \neq 0$, d. h. je größer der Strahlabstand zur optischen Achse, desto kleiner die Brennweite (Kompensation durch Verwendung von Multipollinsen möglich), (b) chromatische Aberration $c_c \neq 0$, d. h. der Brennpunkt hängt von der Energie E des einfallenden Strahles ab (Kompensation durch Verwendung von Wien Filter möglich).

Durch Analyse des Beugungsbildes ist eine Korrektur der Übertragungsfunktion möglich, d. h. die Übertragungsfunktion wird bezüglich des Vorzeichens, eventuell zusätzlich bezüglich des Absolutwertes korrigiert.

Da die schwarzen Ringe des (optischen oder berechneten) Beugungsbildes den Nullstellen der Übertragungsfunktion entsprechen (vgl. Abb. 10), kann ein berechnetes Modell-Beugungsbild mit Variablen c_s , Δf , c_c , λ , usw. dem realen Beugungsbild der elektronenmikroskopischen Aufnahme angepaßt werden. Mithilfe des Modell-Beugungsbildes können anschließend Korrekturfunktionen angegeben werden. Die Korrektur geschieht durch Multiplikation der Fouriertransformation der elektronenmikroskopischen Aufnahme mit diesen (reellen) Funktionen (Abb. 9). Prinzipiell ist für alle Frequenzen eine Korrektur möglich, jedoch nicht bei den Nullstellen der Übertragungsfunktion, d. h. bei $\sin\chi(\alpha) = 0$.

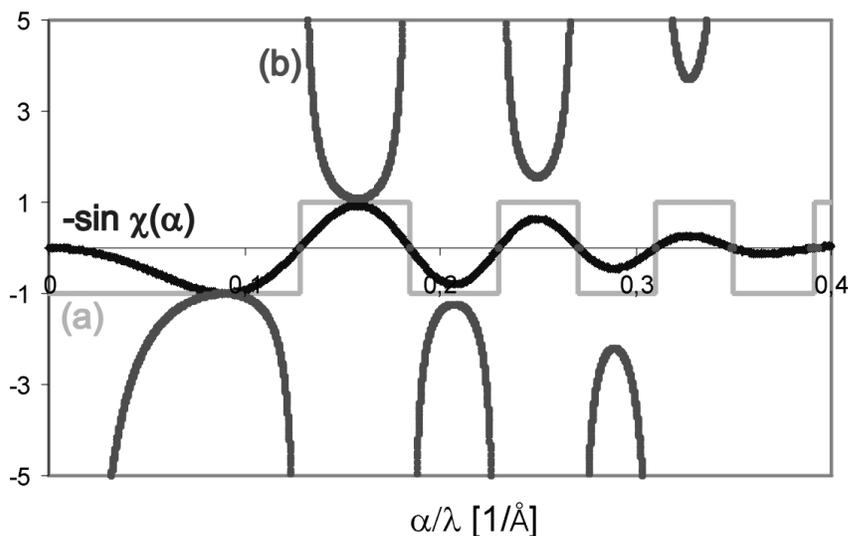


Abb. 9: Korrektur der Übertragungsfunktion. Um eine korrekte Übertragung zu gewährleisten, wird aus der Modell-Übertragungsfunktion $-\sin\chi(\alpha)$ eine Rampenfunktion (a) zur Vorzeichenkorrektur, bzw. eine Funktion (b) zur Vorzeichen- und Absolutwertkorrektur der Fouriertransformation der elektronenmikroskopischen Aufnahme bestimmt ($\Delta f = 250 \text{ nm}$, $c_c = 1,8 \text{ mm}$, $c_s = 1,4 \text{ mm}$, $\frac{dU}{U} = \frac{dI}{I} = \frac{5}{3} \cdot 10^{-6}$).

Insbesondere bei TEM Aufnahmen von Kryopräparaten ist die Korrektur häufig notwendig, da oft bei großem Unterfokus (mehrere μm) Aufnahmen gemacht werden (z. B. Zhu et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Korrektur für TEM-Aufnahmen von negativkontrastierten Objekten nicht angewandt, da die Aufnahmen

nahe am Scherzer-Fokus gemacht wurden, wodurch die Oszillation der Übertragungsfunktionen in einem breiten Frequenzband unterdrückt wird (siehe Abb. 5(b)). Für Kryo-EM Aufnahmen von Enoatreduktase wurde eine Korrektur des Vorzeichens und des Absolutwertes durchgeführt (Kapitel 4, Abschnitt 4.1.3).

Weitere Qualitätskriterien für EM-Aufnahmen:

Für Arbeiten im Mittel- und Hochauflösungsbereich ist eine genaue Kontrolle der EM-Justage unerlässlich. Daher wurde das EM vor jedem Mikroskopieren auf seine Justierung hin überprüft und, soweit erforderlich, neu eingestellt. Während dem Mikroskopieren wurde die euzentrische Präparatlage eingestellt, der Astigmatismus vor jeder Aufnahme korrigiert und die Linsenströme laufend kontrolliert.

Bei Arbeiten mit der CCD-Kamera wurde zur Beurteilung bzgl. Fokus, Drift und Astigmatismus das berechnete Beugungsbild herangezogen. Abb. 10 zeigt berechnete Beugungsbilder einer Kohlefolie bei Vorhandensein von Astigmatismus und Drift.

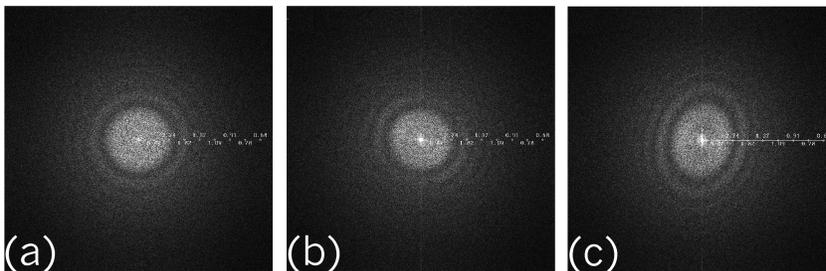


Abb. 10: Berechnete Beugungsbilder von TEM Aufnahmen einer Kohlefolie. Fokus, Drift und Astigmatismus lassen sich anhand Thon'scher Ringe beurteilen (Thon, 1966). (a) 1500 nm Unterfokus, (b) Drift, (c) Astigmatismus.

Bei Negativaufnahmen wurde die Qualität zusätzlich durch lichtoptische Diffraktometrie bestimmt.

Vergrößerungseichung des Elektronenmikroskops:

Eine absolute Vergrößerungseichung des EM ist für die quantitative Auswertung der TEM-Aufnahmen die Voraussetzung. Daher wurden häufige Kontrollen mithilfe Katalasekristallen (PLANO, W. Plannet GmbH), deren Gitterabstände 8,75 nm und 6,85 nm betragen (Wrigley, 1968), durchgeführt.

Elektronendosis:

Biologische Makromoleküle sind sehr strahlungsempfindliche Objekte; durch Elektronenbeschuß können Beschädigungen des Objektes induziert werden. Die kritische Elektronendosis ist dabei im wesentlichen durch das Objekt selber, der Temperatur und der erwünschten Auflösung gegeben, wodurch eine *a priori* Angabe dieser Dosis unmöglich wird. Die Angabe der kritischen Elektronendosis würde die Kenntnis der Objektstruktur, bzw. deren Veränderung bei verschiedenen Dosen benötigen.

Ziel einer „klugen“ Elektronenmikroskopie ist es daher, die Strahlungsempfindlichkeit der Objekte präventiv soweit zu minimieren (z. B. durch spezielle Präparation und Temperatursenkung während der Beobachtung), daß eine Aufnahme mit ausreichender Schwärzung des Negatives bzw. ausreichender Sättigung der CCD-Kamera stattfinden kann. Die Elektronendosis, die für die Fokussierung benötigt wird, kann komplett eingespart werden, wenn auf eine benachbarte, vergleichbare Stelle fokussiert wird. Da die Suche nach einem geeigneten Objekt bei rel. geringer Vergrößerung geschehen kann (verglichen mit der Vergrößerung bei der Aufnahme nur etwa 10 %), bleibt fast nur die, für die Aufnahme benötigte Dosis (Low-Dose Technik, Dierksen et al., 1992). Im folg. sind weitere Methoden aufgeführt, um das Problem der Strahlungsempfindlichkeit biologischer Objekte abzuschwächen.

- Gekühlte slow-scan CCD-Kameras zeigen gegenüber herkömmlichen Filmmaterial eine größere Lichtempfindlichkeit (insb. bei Verwendung von effektiven P20 Szintillatoren und Binning)
- Feldemissionskathoden führen durch eine bessere Elektronenstrahlkohärenz gegenüber LaB₆- und Wolframkathoden zu einem höheren Signal/Rausch-Verhältnis.
- Erhöhung der Beschleunigungsspannung (Zhou & Chiu, 1993).
- Verwendung der Spot-scan Technik (Downing, 1991).
- Kühlung der Probe mit flüssigem Helium (Zemlin et al., 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Kryoelektronenmikroskopie die Low-Dose Technik verwendet, während für die negativkontrastierten Objekte keine gesonderte Technik angewandt wurde.

Entwicklung von Negativen:

Die meisten Datensätze der vorliegenden Arbeit wurden bei einer nominellen Vergrößerung von 60000 auf KODAK SO163 Negativen aufgenommen, und mit Kodak-D19 Entwickler für 12 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt. Anschließend wurden die Negative für 1 Minute in 5 % Essigsäure gewaschen, 10 Minuten in 200 g/l Natriumthiosulfat und 2 g/l Kaliumdisulfat fixiert und abschließend für 30 Minuten in Wasser gewaschen. Die verwendeten KODAK SO163 Negative zeigen gegenüber anderen Negativen teils eine deutlich höhere Lichtempfindlichkeit (z. B. gegenüber KODAK 4489 und AGFA Scientia 23D56). Darüber hinaus wurden auch CCD-Bilder aufgenommen; allerdings ist hierbei die Anzahl der Graustufen (2^{12} bzw. 2^{14}) gegenüber Negativen deutlich geringer, wodurch ein gleichmäßiger Hintergrund in den Aufnahmen unerlässlich wird, um eine ausreichende Anzahl an Graustufen zu erhalten, durch die die Objekte beschrieben werden.

2.1.4 Bildverarbeitung – Einzelpartikelanalyse

Wie im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, müssen die biologischen Objekte wegen ihrer Strahlungsempfindlichkeit bei möglichst geringen Elektronendosen - vor allem im Bereich der molekularen EM - abgebildet werden, was zu verrauschten Bildern mit geringem Signal/Rausch-Verhältnis führt. Hinzu kommen der geringe Kontrast biologischer Objekte und weitere Rauschquellen wie Elektronenrauschen, Vibrationen, etc.. Daher müssen elektronenmikroskopische Abbildungen biologischer Objekte oft digital nachbearbeitet werden, um hochauflösende Strukturinformationen zu gewinnen, bzw. um das Signal/Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Erst die Kombination präparativer und gerätetechnischer Entwicklungen mit Bildverarbeitungstechniken hat in der letzten Dekade zu detaillierten Erkenntnissen über die Strukturen biologischer Objekte im molekularen Auflösungsbereich geführt.

Digitalisierung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen:

Für eine computergestützte Auswertung müssen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen mittels eines Densitometers digitalisiert werden, d. h. jedem Bildpunkt wird ein Grauwert zugeordnet.

Die Größe (Länge bzw. Breite) eines Bildpunktes (Pixelgröße) bestimmt die maximal erreichbare Auflösung r_{lim} nach der Formel:

$$r_{\text{lim}} = 2 \cdot \text{Pixelgröße} / \text{Vergrößerung}$$

Damit beträgt z. B. bei einer Vergrößerung von 60000 und einer gewünschten Auflösung von 10 Å auf der Objektebene die maximale Pixelgröße auf der Bildebene 30 µm, wobei üblicherweise eine kleinere Pixelgröße auf der Bildebene gewählt wird um nicht durch diesen Wert in der Auflösung limitiert zu werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die ausgewählten Bildbereiche der elektronenmikroskopischen Aufnahmen mittels eines EIKONIX oder LEAFSCAN Densitometers als 16 bit Graustufenbild digitalisiert, eine Tonwertkorrektur durchgeführt und als 8 bit gespeichert. Bei einer nominellen Vergrößerung von 60000 und einer Pixelgröße auf der Bildebene von 20,4 µm betrug die Größe eines Bildpunktes auf der Objektebene 3,4 Å x 3,4 Å, wobei die digitalisierten Bereiche je nach Bedarf bis zu 4096 x 4096 Bildpunkte groß waren.

Die Bearbeitung der Bilddaten erfolgte v. a. mit Hilfe der Bildbearbeitungsprogramme SEMPER (Saxton et al., 1979) und IMAGIC-5 (van Heel & Keegstra, 1981; van Heel et al., 1996) an einer Silicon Graphics Workstation (unter Irix 5.3).

Bildmittelung:

Für den Erhalt hochaufgelöster Strukturdaten, d. h. zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnis werden viele gleichartige Projektionen eines Objektes gemittelt, d. h. die Bilder werden Bildpunkt für Bildpunkt aufsummiert („Summenbild“) und jeder Bildpunkt des Summenbildes durch die Anzahl der Bilder dividiert („Mittelungsbild“). Optisch ist zwischen einem Summen- und Mittelungsbild normalerweise nicht zu unterscheiden, da die üblichen Grafikprogramme die Darstellung entsprechend der Grauwertbereiche der einzelnen Bilder skalieren. Abb. 11 verdeutlicht den Einfluß der Anzahl verrauschter Bilder auf das Summen- bzw. Mittelungsbild.

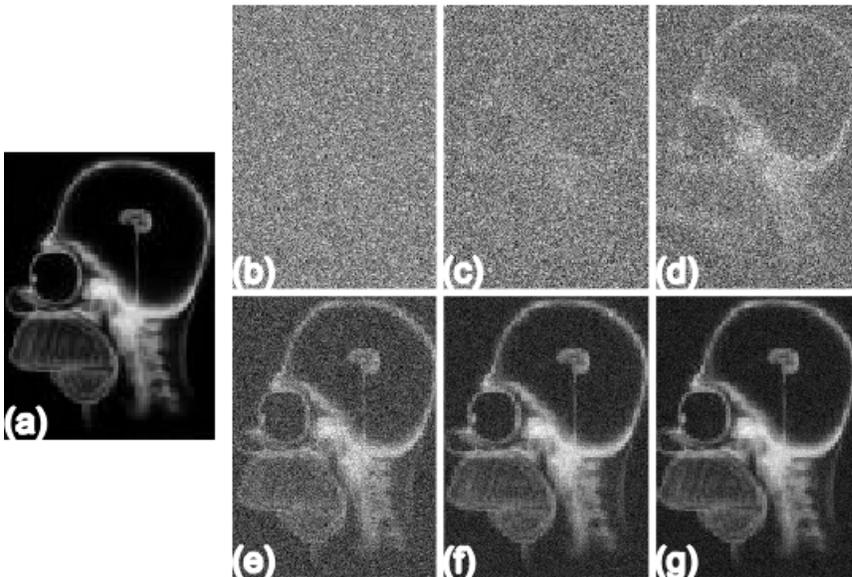


Abb. 11: Effekt der Anzahl der verrauschten Bilder auf das Summen- bzw. Mittelungsbild. Unverraushtes Ausgangsbild (a), 1 verrauschtes Bild (b), Summe über 10 verrauschte Bilder (c), Summe über 100 verrauschte Bilder (d), Summe über 1000 verrauschte Bilder (e), Summe über 5000 verrauschte Bilder (f), Summe über 10000 verrauschte Bilder (g). Das Signal/Rausch-Verhältnis steigt proportional zur Wurzel der Anzahl der gemittelten Bilder (Frank & Al-Ali, 1975). Das unverrauschte Bild (a) hat eine Grauwertverteilung von 0 (schwarz) bis 255 (weiß), das Gauß'sche Rauschen einen mittleren Wert 127,5 und eine Standardabweichung von 1000.

Das Mitteln über verrauschte Bilder ist nur erlaubt, wenn die zu mittelnde Information in allen Bildern identisch ist, d. h. die Bilder dürfen sich nur durch statistisches Rauschen unterscheiden. Bezüglich biologischer Makromoleküle ergeben sich dadurch einige Probleme.

- Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen sollten möglichst wenige verschiedene Teilchensorten zeigen. Im optimalen Fall sorgt eine gute biochemische Präparation für das Vorhandensein genau einer Teilchensorte.
- Selbst bei genau einer Teilchensorte eines biologischen Makromoleküls zeigt sich in bestimmten Regionen teilweise eine sehr flexible Struktur.
- Teilchen können viele unterschiedliche Projektionen zeigen. Dies kann z. B. durch unspezifische Adsorption auf einer Kohlefolie (Negativkontrastierung) oder durch völlig regellose Verteilung in Eis (Kryopräparation) geschehen.

- Selbst wenn Projektionen den gleichen Informationsgehalt besitzen (abgesehen vom Signal/Rausch-Verhältnis), können diese gegeneinander verschoben und/oder rotiert sein.

Falls die Natur des untersuchten Objektes das Vorhandensein einer Teilchensorte nicht erlaubt (z. B. durch gleichzeitiges Vorhandensein verschiedener Proteinkonformationen), so müssen die Einzelbilder vor einer Bildmittelung in identische Populationen (bzgl. Konformationen und Projektionen) sortiert werden (siehe MSA).

Korrelationsfunktionen:

Ein fundamentales Instrument der Bildverarbeitung stellt die Korrelation dar. Mit einer sog. Korrelationsfunktion kann ein Wert für die Ähnlichkeit zweier Bilder f und g angegeben werden. Eine spezielle Form der Korrelationsfunktion, die Kreuzkorrelationsfunktion CCF (cross-correlation function), ist definiert durch (Saxton & Frank, 1977):

$$CCF(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N f(\vec{r}_i)g(\vec{r}_i + \vec{r})$$

$f(\vec{r}_i)$: Grauwert des Bildes f im Bildpunkt i (insgesamt N Bildpunkte)

$g(\vec{r}_i)$: Grauwert des Bildes g im Bildpunkt i (insgesamt N Bildpunkte)

\vec{r} : Verschiebungsvektor

Die Korrelation eines Bildes mit sich selber wird als Autokorrelation bezeichnet, wobei das Korrelationsbild ein scharfes Maximum in der Bildmitte enthält (Abb. 12(d)). Enthalten beide Bilder ähnliche Motive, die gegeneinander verschoben sind, so erscheint im Korrelationsbild ein scharfes Maximum, das um den Verschiebungsvektor \vec{r}_k von der Mitte des Korrelationsbildes verschoben ist (Abb. 12(e)).

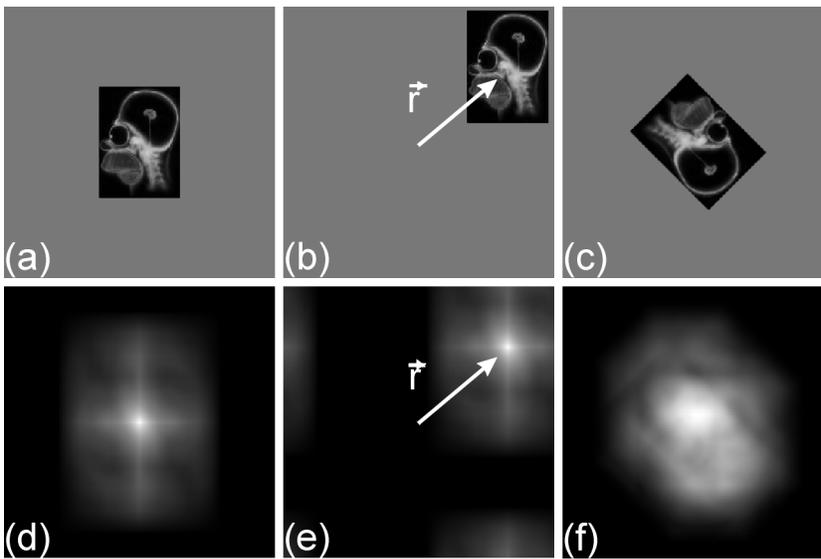


Abb. 12: Korrelationsbilder anhand CCF. Autokorrelation von (a) mit sich selbst ergibt (d) mit Maximumwert MAX1 in der Mitte, Korrelation von (a) mit (b) ergibt (e), mit Maximumwert MAX1 um \vec{r} verschoben, Korrelation von (a) mit (c) ergibt (f), mit Maximumwert MAX2.

Ein Maß für die Güte der Korrelation ist der Maximumwert der Korrelationsfunktion. Üblicherweise wird der Korrelationskoeffizient normiert (van Heel et al., 1992).

$$CCF_{NORM}(\vec{r}_k) = \frac{\sum_{i=1}^N f(\vec{r}_i)g(\vec{r}_i + \vec{r}_k)}{\left[\sum_{i=1}^N f^2(\vec{r}_i) \sum_{i=1}^N g^2(\vec{r}_i) \right]^{1/2}}$$

Bei einem normierten Korrelationskoeffizienten von ± 1 sind die korrelierten Bilder identisch.

Eine andere Korrelationsfunktion, die MCF (mutual-correlation function) ist definiert durch (van Heel et al., 1992):

$$MCF_{NORM}(\vec{r}_k) = \frac{\sum_{i=1}^N \phi(\vec{r}_i)\tau(\vec{r}_i + \vec{r}_k)}{\left[\sum_{i=1}^N \phi^2(\vec{r}_i) \sum_{i=1}^N \tau^2(\vec{r}_i) \right]^{1/2}}$$

mit

$$\phi(\vec{r}) = FT^{-1} \left\{ \sqrt{|A_1(\vec{R})|} \cdot \exp(i\Theta_1(\vec{R})) \right\} \text{ mit } f(\vec{r}) = FT^{-1} \left\{ A_1(\vec{R}) \cdot \exp(i\Theta_1(\vec{R})) \right\}$$

$$\tau(\vec{r}) = FT^{-1} \left\{ \sqrt{|A_2(\vec{R})|} \cdot \exp(i\Theta_2(\vec{R})) \right\} \text{ mit } g(\vec{r}) = FT^{-1} \left\{ A_2(\vec{R}) \cdot \exp(i\Theta_2(\vec{R})) \right\}$$

FT^{-1} : Inverse Fouriertransformation

$|A_{1/2}(\vec{R})|$: Betrag bzw. Amplitudenspektrum

$\Theta_{1/2}(\vec{R})$: Phasenwinkel

Die Wirkung der MCF wird durch Abb. 13 verdeutlicht: gegenüber der CCF zeigt sich bei der MCF im Korrelationsbild teilweise ein deutlicheres Korrelationsmaximum.

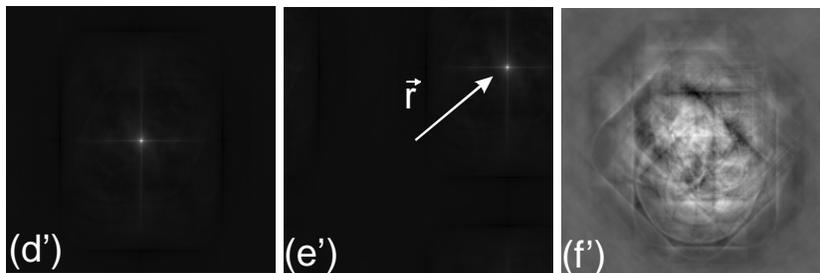


Abb. 13: Korrelationsbilder anhand MCF. Autokorrelation von Abb. 12(a) ergibt (d') mit Maximumwert MAX1' in der Mitte, Korrelation von Abb. 12(a) mit Abb. 12(b) ergibt (e'), mit Maximumwert MAX1' um \vec{r} verschoben, Korrelation von Abb. 12(a) mit Abb. 12(c) ergibt (f'), mit Maximumwert MAX2'. Während die Maxima in (d') und (e') gegenüber Abb. 12(d) und Abb. 12(e) deutlicher ausgeprägt sind, ist bei Abb. 13(f') gegenüber Abb. 12(f) das Maximum nicht signifikant deutlicher.

Für sämtliche Korrelationen während dieser Arbeit wurde die CCF verwendet.

Extrahieren von Einzelbildern:

Die Korrelationsfunktion dient u. a. zum Finden und Ausschneiden von elektronenmikroskopischen Partikelprojektionen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst je Datensatz ein digitalisiertes Negativ am Computermonitor dargestellt. Danach wurden 10 beliebige Molekülprojektionen interaktiv mit einem Cursor ausgewählt und

in 64 x 64 Bildpunkte (Pixel) große Einzelbilder extrahiert. Diese wurden gemittelt und 20-fach rotationssymmetrisiert, wodurch sich eine quasi runde Projektion ergibt; diese diente als Referenz zur Teilchensuche für den jeweiligen Datensatz.

Die Einzelbilder wurden durch CCF zwischen der Referenz und dem digitalisierten Negativ ausgeschnitten. Obwohl sowohl der gewünschte Korrelationswert zwischen Referenz und Negativbild, als auch der minimale Abstand zwischen Korrelationsmaxima eingestellt wurde, konnte die Partikelextraktion nicht vollständig automatisiert werden. Nach der CCF gestützten Auswahl mußten per Auge alle ausgeschnittenen Partikel gesichtet werden; dabei wurden pro Datensatz etwa 50% der Partikel entfernt. Die ausgeschnittenen Einzelpartikelbilder wurden innerhalb einer einzigen Datei als Bildsequenz (Galerie) abgespeichert. Die Anzahl der SecA Einzelbilder lag bei der vorliegenden Arbeit pro Datensatz zwischen ca. 2800 und 7500 Teilchen.

Normierung und Filterung der Einzelbilder.

Die ausgeschnittenen Einzelpartikelbilder können Helligkeitsvariationen zeigen, da sie von verschiedenen Stellen einer Aufnahme oder von verschiedenen Aufnahmen stammen können. Auch können unterschiedliche Kontrastmittelschichtdicken zu Helligkeitsvariationen führen, die für die weitere Bildverarbeitung störend sind. Daher werden die Einzelpartikelbilder normiert. Dazu werden sie mit einer Kreismaske umgeben, wobei außerhalb der Maske der Helligkeitswert auf Null gesetzt wird. Innerhalb der Maske wird die Varianz der Grauwerte auf einen gemeinsamen Wert normiert, der sich aus der mittleren Varianz des gesamten Datensatzes ergibt. Die Normierung dient der besseren Vergleichbarkeit der Projektionen.

Wird ein Bild $f(\vec{r})$ fouriertransformiert (FT), so erhält man seine Darstellung in Abhängigkeit der Ortsfrequenzen, wobei das Bild und die Fouriertransformierte die gleiche Information enthalten. Die Fouriertransformierte einer reellen Funktion ist komplex und läßt sich als Addition von Real- und Imaginärteilen oder in Polarkoordinaten mit Betrag und Phase schreiben.

$$FTf(\vec{r}) = A(\vec{R}) = \left| A(\vec{R}) \right| \cdot \exp(i\Theta(\vec{R}))$$

Niedrige Ortsfrequenzen beschreiben im wesentlichen den Hintergrund. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen entspricht dies z. B. einer ungleichmäßigen Objektbeleuchtung oder einer weitreichenden, d. h. ungleichmäßigen Verteilung des

Kontrastmittels bei Negativkontrastierung. Sehr hohe Frequenzen entsprechen hingegen dem Rauschen. Bilder können verbessert werden, indem im Fourierraum die störenden Frequenzen unterdrückt werden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Makromolekülen wurde ein Gauß'scher Bandpassfilter benutzt, d. h. eine Kombination aus Gauß'schen Hoch- und Gauß'schen Tiefpass. Der Hochpass ist mit einem Abschnitt der niedrigen Frequenzen verbunden, der Tiefpass mit einem Abschnitt der hohen Frequenzen. Die Angaben für Hoch- und Tiefpassfilterung beziehen sich auf den Wert, bei dem die Frequenzen auf $1/e$ ihres ursprünglichen Wertes abgefallen sind.

Die Werte für Hoch- und Tiefpass richten sich nach der Größe der untersuchten Makromoleküle und nach der zu erwartenden Auflösung der Mittelungsbilder. Abb. 14 zeigt die Wirkung der Fourierfilterung.

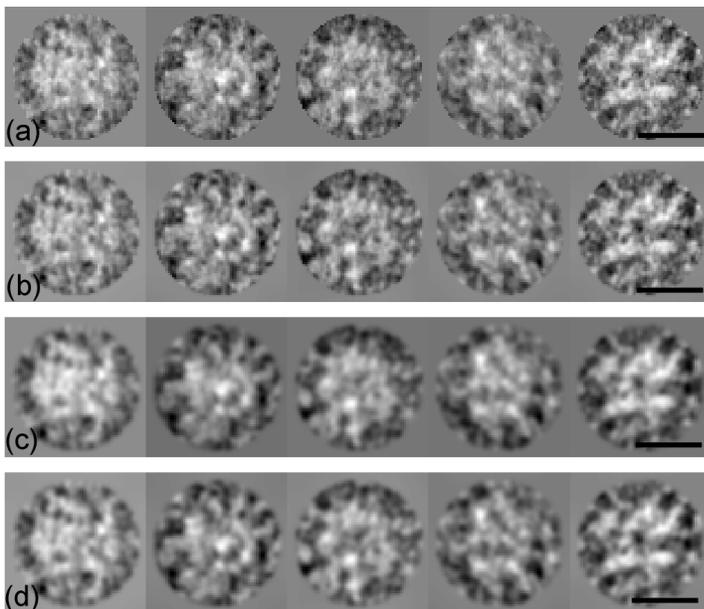


Abb. 14: Bandpass Fourierfilterung negativ kontrastierter SecA aus *Escherichia coli*. Originalpartikel (a), Hochpassfilter bei 15 nm (b), Tiefpassfilter bei 1,5 nm (c), Bandpassfilter ausserhalb 1,5 nm und 15 nm (d). Balken 10 nm.

Alignierung der Einzelpartikel:

Wenn elektronenmikroskopische Einzelpartikelbilder der gleichen Molekülprojektion entsprechen, d. h. alle den gleichen Informationsgehalt besitzen, jedoch gegeneinander verschoben bzw. rotiert sind, wird mit Hilfe der Korrelationsfunktion eine Translations- bzw. Rotationsausrichtung (Alignierung) vorgenommen, wodurch eine Mittelung möglich wird. Hierzu werden die Einzelpartikelbilder mit einer Referenz, die eine „typische“ Ansicht des Moleküls wiedergibt, korreliert, um $(-\vec{r})$ verschoben (Translationsalignierung mit Hilfe der Kreuzkorrelationsfunktion CCF), und so lange

um den Mittelpunkt rotiert (Rotationsalignierung mit Hilfe der Drehkorrelationsfunktion RCF, d. h. Bilder und Referenz werden in Kreiskoordinatenbilder umgewandelt, in Richtung der Winkelcoordinate fouriertransformiert und analog zur CCF miteinander multipliziert), bis der Wert der Korrelationsfunktion (Korrelationskoeffizient) maximal ist. Die Translations- und Rotationsalignierung wird iterativ wiederholt, um eine optimale Alignierung zu gewährleisten.

Bei Einzelpartiklbildern, die nicht den selben Informationsgehalt besitzen, z. B. verschiedenen Molekülprojektionen entsprechen, sollte mehr als eine Referenz zur Alignierung verwendet werden, da der maximale Korrelationswert u. U. relativ klein ist, und damit kein scharfes Maximum ergibt. Bei der Multireferenz-Alignierung (van Heel & Stoeffler-Meilicke, 1985) werden mehrere Referenzen ausgewählt und jede Teilchenprojektion mit jeder Referenz aligniert und korreliert, wobei der maximale Korrelationskoeffizient dafür ausschlaggebend ist, zu welcher Referenz letztendlich aligniert wird.

Bei der Bildverarbeitung spielt eine sorgfältige Auswahl der Referenz(en) für die Alignierung die entscheidende Rolle. So kann z. B. das Mittelungsbild von genügend Rauschbildern, die kein deutliches Motiv besitzen, aber zu einer Referenz aligniert werden, deutlich das Motiv der benutzten Referenz zeigen. Dies ist in Abb. 15 gezeigt.

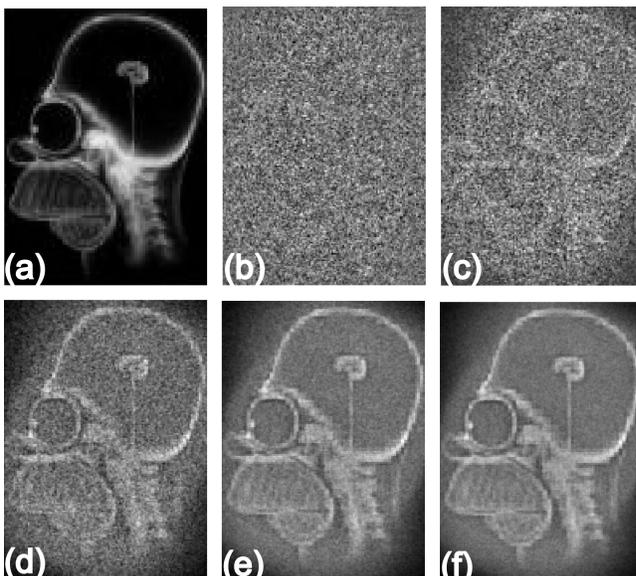


Abb. 15: Alignierung von Gauß'schen Rauschbildern auf eine (maskierte) Referenz. Auf die Referenz (a) wurde eine verschiedene Anzahl Rauschbilder aligniert und das jeweilige Mittelungsbild berechnet. Gezeigt ist die Referenz (a) und die Mittelungsbilder von 10 Rauschbildern (b), 100 Rauschbildern (c), 1000 Rauschbildern (d), 5000 Rauschbildern (e) und 10000 Rauschbildern (f).

Die Alignierung funktioniert nur unter der Voraussetzung, daß das Signal/Rausch-Verhältnis der verrauschten Bilder nicht zu niedrig ist. Bei zu niedrigem Signal/Rausch-Verhältnis wird das Motiv der Referenz im Mittelungsbild dominierend. Abb. 16 zeigt den Effekt einer Referenz, die nichts (bzw. wenig) mit den verrauschten Bildern, bzw. den zu erwartenden Mittelungsbildern zu tun hat.

Wegen der erwähnten Schwierigkeiten mußten in der vorliegenden Arbeit für die Alignierung der Einzelpartikelbilder Referenzen gefunden werden, die folgende Forderungen erfüllen:

- Es durften durch die Referenzen keine Motive induziert werden, die nicht ohnehin im Datensatz zu finden sind.
- Die Referenzen sollten möglichst gut mit den wahren (unverrauschten) Projektionen übereinstimmen, damit die Korrelationsbilder möglichst scharfe Maxima zeigen, wodurch die Alignierung verbessert wird.

Beide Forderungen erscheinen zunächst unrealistisch, da sie die Kenntnis der wahren Struktur vorwegnehmen.

Zur Zentrierung der elektronenmikroskopischen SecA Molekülprojektionen wurde eine Multireferenz-Translationsalignierung durch zehn Kreisreferenzen verwendet, da die betrachteten Projektionen annähernd rund waren. Zur Evaluierung der Rotationsreferenz(en) wurde eine Eigenwertanalyse eingesetzt, bei der die nativen Partikel eines Datensatzes der Multivariaten Statistischen Analyse (MSA) unterzogen wurden und unter exklusiver Berücksichtigung jeder der ersten 6 Eigenvektoren in jeweils 8 Klassen eingeteilt wurden. Die insgesamt 48 Klassenmittelungen spiegelten die wesentlichen Projektionen wieder, die in dem Datensatz vorhanden sind. Zur Rotationsalignierung wurde eine Klassenmittelung ausgesucht, die keine Rotations-symmetrie haben durfte (andernfalls wäre sie für eine Rotationsalignierung ungeeignet).

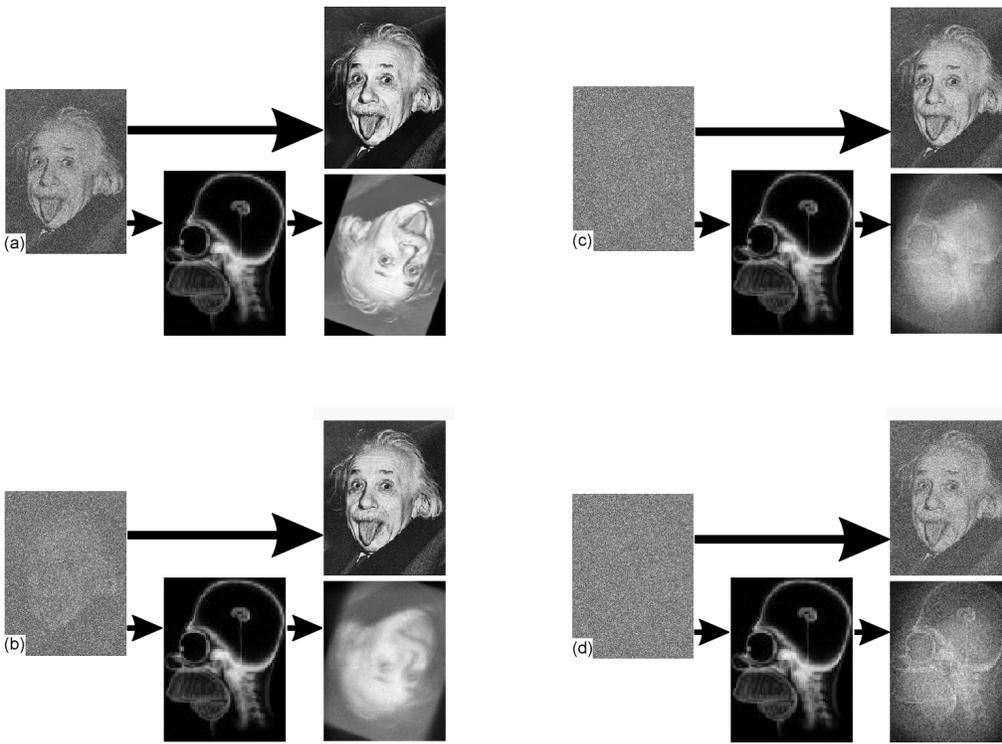


Abb. 16: Aligierung mit einer Referenz, die nichts (bzw. wenig) mit den verrauschten Bilder, bzw. den zu erwartenden Mittelungsbildern zu tun hat. (a) - (d) zeigt verrauschte Bilder mit sinkendem Signal/Rausch-Verhältnis. Werden jeweils 1000 verrauschte Bilder optimal aligniert, ergibt sich das (echte) Mittelungsbild (rechts oben). Werden die verrauschten Bilder auf eine ungeeignete Referenz aligniert, funktioniert dies nur für verrauschte Bilder mit relativ hohem Signal/Rausch-Verhältnis, wie an den Mittelungsbildern (rechts unten) zu sehen ist, die bei zu niedrigem Signal/Rausch-Verhältnis das Motiv der Referenz zeigen.

Abb. 17 zeigt die Referenzen, die für die Translationsalignierung aller untersuchten Datensätze verwendet wurden. Die Translationsreferenzen wurden auf den Minimal- und Maximalgrauwert des betrachteten Datensatzes normiert.

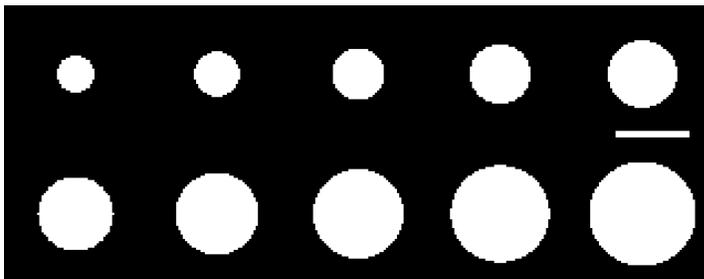


Abb. 17: Referenzen zur Multireferenz-Translationsalignierung aller untersuchten SecA Datensätze. Durchmesser 5 nm - 14 nm. Balken 10 nm.

Multivariate Statistische Analyse (MSA):

In einer gegebenen Population treten die zu untersuchenden Teilchen in der Regel in mehr als einer Projektion auf. Bevor Bilder dieser Projektionen addiert bzw. gemittelt werden können, muß ein Klassifizierungsschema gefunden werden, das in der Lage ist, charakteristische Ansichten zu finden und zu trennen. Darüber hinaus ist zuvor eine Datenreduktion notwendig, da z. B. bei 5000 Teilchen mit jeweils 64x64 Bildpunkten ca. $2 \cdot 10^7$ Bildpunkte miteinander verglichen werden müssten, was trotz moderner Rechnerleistungen unrealistisch ist. Derartigen Anforderungen genügt die „Multivariate Statistische Analyse (MSA)“ (van Heel & Frank, 1981).

Betrachtet wird ein Datensatz mit n Bildern und $p \times p$ Bildpunkten. In einem $p \times p$ dimensionalen Raum kann dann jedes Bild als ein Punkt dargestellt werden, wenn jede Achse den Helligkeitswert in einem der Bildpunkte beschreibt („MSA-Hyper-raum“). Werden alle Bilder des Datensatzes in diesen Raum eingefügt, so liegen ähnliche Bilder nahe beieinander, unterschiedliche Bilder jedoch weit auseinander. Gibt es in einem Datensatz nur ganz bestimmte charakteristische Projektionen, so bilden die dazugehörigen Punkte Cluster bzw. Wolken.

Die Multivariate Statistik bestimmt nun ein neues, rotiertes Koordinatensystem K' , in welchem die erste Achse in Richtung der größten Varianz innerhalb des Datensatzes verläuft. Diese Achse beschreibt den Hauptunterschied zwischen allen Bildern. Die zweite Achse (orthogonal zur ersten) soll in Richtung der noch verbleibenden größten Varianz verlaufen, die dritte Achse (zur ersten und zweiten orthogonal) beschreibt die größte verbliebene Varianz, usw. Die neuen Achsen beschreiben damit mit abnehmender Wichtigkeit die Unterschiede innerhalb des Datensatzes.

Aus dem neuen Koordinatensystem K' lassen sich nun Eigenvektoren, Eigenwerte und Eigenbilder bestimmen. Bei der Korrespondenzanalyse (ein Spezialfall der MSA) weist der zweite Eigenvektor mit einer bestimmten Länge (zweiter Eigenwert) entlang der ersten Achse in K' auf die größte Varianz und erzeugt dadurch das zweite Eigenbild.

Der dritte Eigenvektor weist mit einer bestimmten Länge (dritter Eigenwert) entlang der zweiten Achse in K' auf die größte verbliebene Varianz und erzeugt dadurch das dritte Eigenbild. Der vierte Eigenvektor weist mit einer bestimmten Länge (vierter Eigenwert) entlang der dritten Achse in K' auf die größte verbliebene Varianz und erzeugt dadurch das vierte Eigenbild, usw. Die zu den Eigenvektoren gehörenden Eigenwerte sind ein direktes Maß für die Varianzmenge, die von dem entsprechen-

den Eigenbild beschrieben wird. Das erste Eigenbild liegt in K' im Zentrum der gesamten Datenwolke.

Aufeinanderfolgende Eigenbilder beschreiben also abnehmende Varianzen innerhalb des gesamten Datensatzes, wobei höhere Eigenbilder v. a. als Beschreibung der Unterschiede im Rauschen interpretiert und somit vernachlässigt werden. In der Praxis zeigt sich, daß zur Untersuchung elektronenmikroskopischer Aufnahmen meist 6 Eigenbilder genügen.

Jedes Bild des Datensatzes kann nun als Linearkombination der Eigenbilder beschrieben werden, wobei dies einer enormen Datenreduktion entspricht. Bei 5000 Bildern mit je 64×64 Bildpunkten ergeben sich statt ca. $2 \cdot 10^7$ Bildpunkte nur ca. $5 \cdot 10^4$ Bildpunkte mit $6 \cdot 10^4$ Eigenwerten (falls 12 Eigenbilder genügen).

Nach der Datenreduktion durch MSA kann der Datensatz nun im MSA-Hyperraum in charakteristische Ansichten klassifiziert werden. Ziel der Klassifizierung ist es, Bilder zu Klassen zusammenzufassen, wobei Bilder in einer Klasse unter sich homogen sind, während sich die Bilder zweier Klassen deutlich voneinander unterscheiden. Im MSA-Hyperraum bedeutet dies, daß der Inter-Klassen-Abstand (zwischen den Klassen) maximal ist und gleichzeitig der Intra-Klassen-Abstand (innerhalb der Klasse) minimal ist (Abb. 18). Ist eines der beiden Kriterien erfüllt, so ist gleichzeitig auch das andere Kriterium erfüllt, da die Gesamtvarianz des gesamten Datensatzes konstant ist .

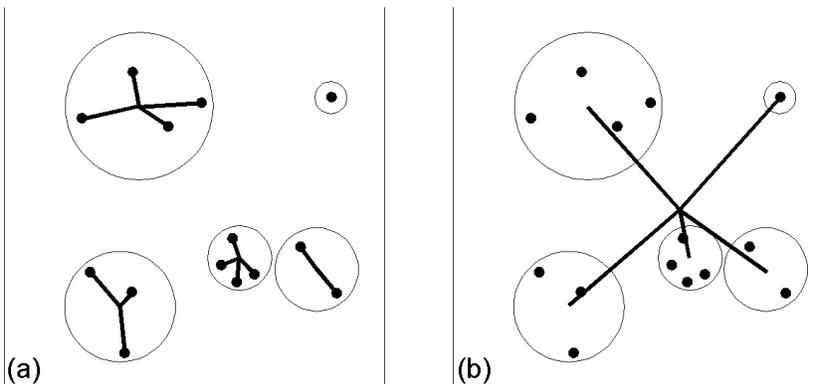


Abb. 18: Optimale Einteilung eines Datensatzes in eine vorgegebene Anzahl von fünf Klassen. Der Intra-Klassen-Abstand (innerhalb den Klassen) ist minimal (a), der Inter-Klassen-Abstand (zwischen den Klassen) ist maximal (b).

Bei den Klassifizierungsmethoden unterscheidet man innerhalb den hierarchischen Algorithmen (hierachical classification algorithm „HAC“) im wesentlichen zwei Gruppen: aufsteigende Methoden, in denen jedes Bild zunächst eine eigene Klasse bildet und absteigende Methoden, in denen alle Bilder zunächst in einer Klasse liegen. Bei den aufsteigenden Methoden werden die Klassen allmählich zusammengefaßt bis nur eine einzige Klasse übrigbleibt, in dem der gesamte Datensatz liegt (Abb. 19). In den absteigenden Methoden unterteilt sich die anfängliche Klasse bis jedes Bild eine eigene Klasse bildet.

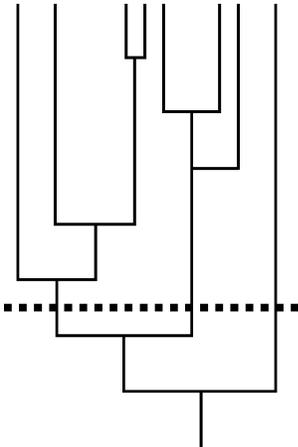


Abb. 19: Beispiel für hierarchischen (aufsteigenden) Klassifizierungsbaum. Bei einer ganz bestimmten Klassifizierungsstufe (gestrichelte Linie) wird der Datensatz in eine zuvor gewünschte Anzahl von Klassen eingeteilt.

In dieser Arbeit wurden alle Klassifizierungen mit der Imagic-5 Software durchgeführt, die eine aufsteigende Methode benutzt. Danach wurden zwei Klassen nach dem Ward-Kriterium genau dann zu einer neuen größeren zusammengefaßt, wenn die Intra-Klassen-Varianz des gesamten Datensatzes minimal war (van Heel, 1984). Anschließend wurde ein Klassenmittelungsbild erzeugt, indem die Klassenmitglieder aufsummiert, und durch die Anzahl der Mitglieder dividiert wurden.

Bestimmung der Auflösung:

Zur Abschätzung der Auflösung von Klassensummen wurde das sog. S-Bild verwendet (Sass et al., 1989). Dazu werden die Bilder, die zu einer Klassenmittelung beitragen, fouriertransformiert und Bildpunkt für Bildpunkt aufsummiert, wodurch sich das S-Bild (im Frequenzraum) bildet. Wenn die Bilder identisch, und die Fourierkoeffizienten in Phase sind, so erhält man eine große Summe.

$$S(\text{Bildpunkt}) = \frac{\left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n A_i(\text{Bildpunkt}) \right|^2}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |A_i(\text{Bildpunkt})|^2} = \frac{\left| \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left\{ A_i(\vec{R}_i) \cdot \exp(i\Theta_i(\vec{R}_i)) \right\} \right|^2}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |A_i(\vec{R}_i)|^2}$$

n : Anzahl der Bilder, die zu der Klassensumme beitragen.

Im Falle vom statistischen Rauschen ($\sum_{i=1}^n \exp(i\Theta_i(\vec{R}_i)) = \exp(0) = 1$) ergibt sich:

$$S(\text{Bildpunkt}) = (1/n)$$

Beim „modifizierten S-Bild“ wird der Erwartungswert für statistisches Rauschen (1/n) vom S-Bild abgezogen, wodurch sich die Auflösung durch $S(v_{\text{Auflösung}}) = 0$ ergibt.

Viele andere Verfahren zur Auflösungsbestimmung von Klassenmittelungen teilen die Bilder in zwei unabhängige Klassen ein und vergleichen diese. Bei dem „phase residual“ Kriterium (z. B. Frank et al., 1981) werden die Phasenunterschiede $\delta\Theta$ zwischen zwei unabhängigen, fouriertransformierten Klassenmittelungen miteinander verglichen; je ähnlicher die zwei Klassenmittelungen, desto kleiner $\delta\Theta$. Die Auflösungsgrenze entspricht derjenigen Frequenz, bei der $\delta\Theta = 45^\circ$ ist. Bei der „fourier ring correlation, FRC“ (Saxton & Baumeister, 1982) wird die Korrelation der unabhängigen, fouriertransformierten Klassenmittelungen $A_{1/2}$ für Ringe mit Abstand r vom Mittelpunkt des Fourierbildes berechnet:

$$FRC(r) = \frac{\sum A_1 A_2^*}{\sqrt{\sum |A_1|^2 \cdot \sum |A_2|^2}}$$

A_1^* : Komplex konjugierte zu A_1

Für den Grenzwert der FRC (und damit die Auflösungsgrenze) wird normalerweise $2/\sqrt{n}$ bzw. $3/\sqrt{n}$ angegeben, wobei n die Anzahl der Bildpunkte im entsprechenden Fourerring ist. Analog zur FRC kann die Auflösung einer drei-dimensionalen Rekonstruktion durch die „fourier shell correlation“ FSC angegeben werden (Harauz & van Heel, 1986).

Drei-dimensionale Rekonstruktion:

Im Gegensatz zur Fotografie, die die Oberfläche eines Objektes abbildet, enthalten Aufnahmen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie Informationen über die innere Struktur des abgebildeten Objektes, da jeder Bildpunkt der TEM Aufnahme eine Projektion der Dichte entlang der Projektionsachse darstellt. Prinzipiell lässt sich daher aus mehreren TEM Abbildungen die drei-dimensionale (3D) Struktur eines Objektes rekonstruieren. Zur Rekonstruktion sind Projektionen aus verschiedenen Richtungen notwendig (z. B. durch Kippserien), wobei die Anzahl der Projektionen z. B. von Symmetrieeigenschaften des Objektes, Projektionsrichtungen und angestrebter Auflösung abhängt (Crowther et al., 1970). Die erste 3D-Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde von Objekten mit helikaler Symmetrie berechnet (DeRosier & Klug, 1968).

Zur allgemeinen Lösung des Rekonstruktionsproblems sei zunächst die Rückprojektion im Realraum erwähnt. Dabei wird die Helligkeit in jedem Punkt des Projektionsbildes im drei-dimensionalen Raum entlang der Projektionsrichtung gleichmäßig zurückprojiziert. Die Aufsummation ergibt dann ein (fehlerhaftes) 3D-Modell des ursprünglichen Objektes (Abb. 20).

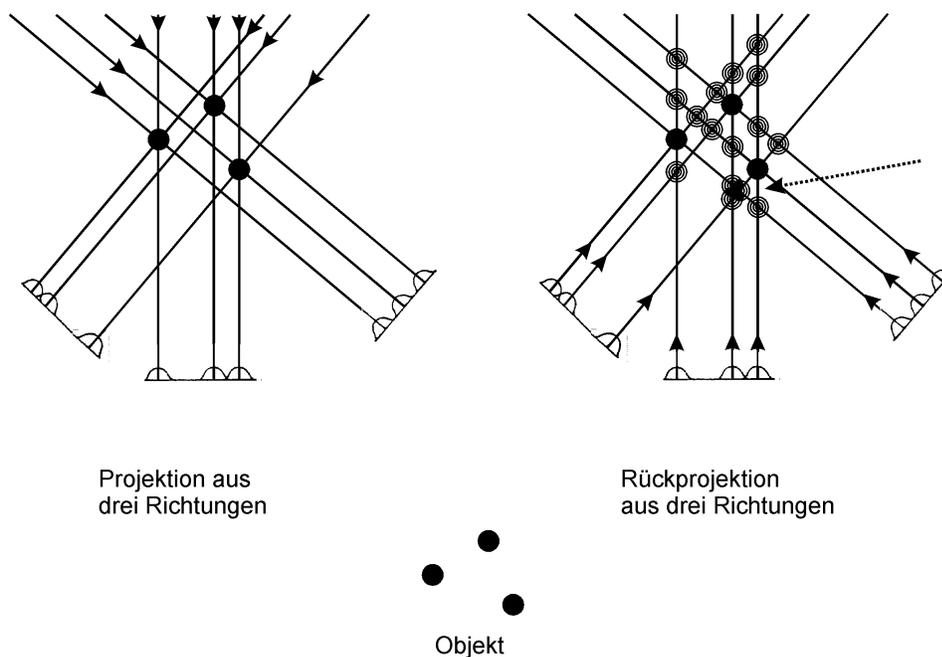


Abb. 20: Zwei-dimensionale Illustration zur 3D-Rekonstruktion durch Rückprojektion im Realraum. Ein Objekt wird auf durch drei Projektionen auf Ebenen projiziert (links), das Objekt wird durch drei reale Rückprojektionen rekonstruiert (rechts). Trotz des relativ einfachen Objektes wird dieses nicht optimal rekonstruiert (siehe gestrichelter Pfeil).

Die in dieser Arbeit benutzte Rekonstruktionsmethode „angular reconstitution“ (van Heel, 1987) richtete sich nach der elektronenmikroskopischen Präparationsmethode der Negativkontrastierung bzw. Kryopräparation, wodurch bereits auf einem Negativ unterschiedliche Projektionen zu sehen sein sollten. Die „angular reconstitution“ ist in der Lage, die relative Orientierung der einzelnen Projektionen, wie im Falle einer Kippung (vgl. Abb. 21) zueinander zu bestimmen.

Wie andere Rekonstruktionsmethoden (z. B. „conical tilt“ (Radermacher et al., 1987)) basiert auch die „angular reconstruction“ auf dem Projektionstheorem („central section theorem“, Crowther et al., 1970). Danach ist die zwei-dimensionale Fouriertransformation einer beliebigen zwei-dimensionalen Projektion einer drei-dimensionalen Dichteverteilung ein zentraler Schnitt durch die drei-dimensionale Fouriertransformation der drei-dimensionalen Dichteverteilung. Ein zentraler Schnitt bezeichnet in diesem Zusammenhang einen Schnitt, der durch den Mittelpunkt des Fourierraumes geht. Liegen zwei unterschiedliche Projektionen des gleichen 3D- Objektes vor, so liegen auch zwei verschiedene zentrale Schnitte im Fourierraum vor (Abb. 22). Die realen Projektionsrichtungen sind dabei orthogonal zu den entsprechenden zentralen Schnitten im Fourierraum.

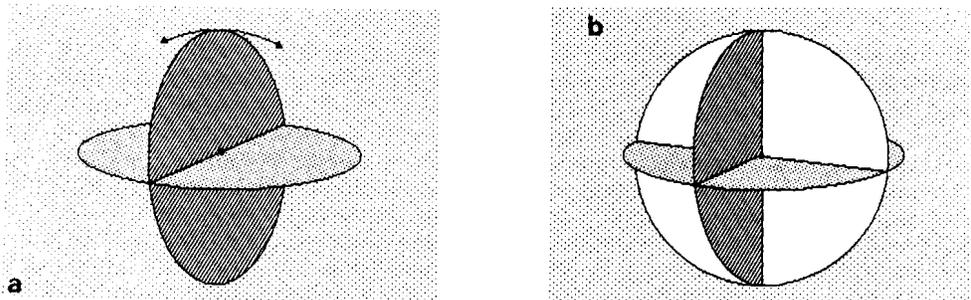


Abb. 22: zwei-dimensionale Projektionen eines 3D-Objektes im Fourierraum. Bei zwei Projektionen (a) gibt es 2 zentrale Schnitte mit einer gemeinsamen Linie („common line“). Die räumliche Zuordnung ist aber nicht völlig fixiert. Bei drei Projektionen (b) ist die räumliche Zuordnung (durch insgesamt drei „common lines“) bis auf die Händigkeit eindeutig (van Heel, 1987). Für asymmetrische Objekte sind daher Abbildungen aus mind. drei Projektionsrichtungen für eine 3D-Rekonstruktion nötig, wobei diese Abbildungen nicht auf einer einzigen Kippachse liegen dürfen.

Eine Folgerung aus dem Projektionstheorem (durch Umkehrung und eine Dimension tiefer) ist, daß zwei Projektionsbilder des gleichen 3D-Objektes nicht nur eine „common line“ im Fourierraum gemeinsam haben, sondern im Realraum auch eine

gemeinsame ein-dimensionale Projektion der zwei-dimensionalen Projektionsbilder („Sinogramm“) zu finden ist. Somit ist also durch Sinogramm-Korrelation eine Aussage darüber möglich, ob Dichteprojektionen von dem gleichen 3D-Objekt stammen können, oder nicht. Abb. 23 zeigt die praktische Anwendung dieser Sinogramm-Eigenschaft.

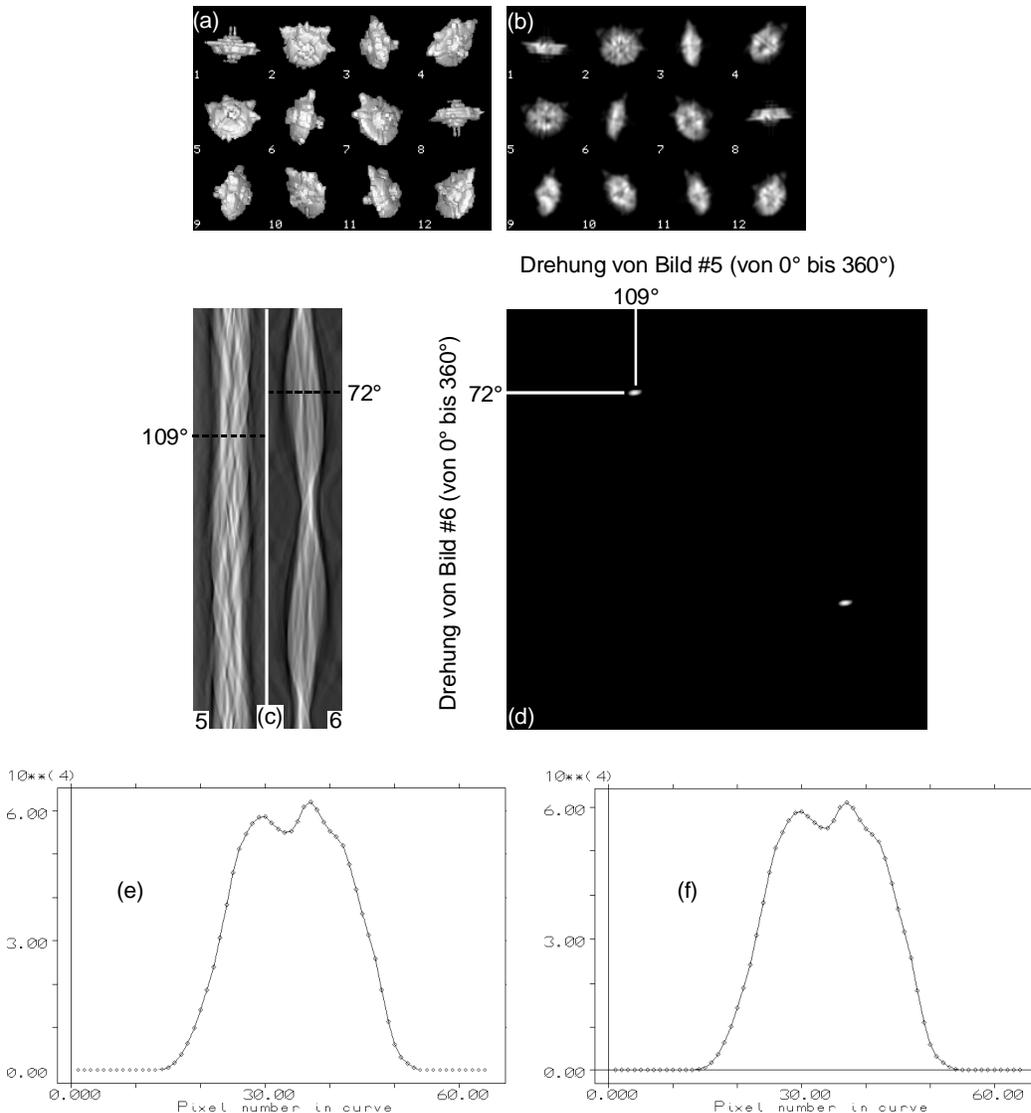


Abb. 23: Wirkungsweise der Sinogramm-Eigenschaft zweier Projektionen eines beliebigen 3D-Objektes. (a) zeigt drei-dimensionale Darstellungen der Oberfläche des 3D-Objektes, (b) zeigt dessen zwei-dimensionalen (Dichte-) Projektionen, (c) zeigt die ein-dimensionalen Projektionen von Bild #5 und Bild #6 aus (b) bei einem Drehwinkel von 0° bis 360°, (d) zeigt die (Sinogramm-) Korrelation der Sinogramme aus (c), wobei das Korrelationsmaximum bei 109° Drehung von #5 und 72° Drehung von Bild #6 liegt (bzw. 288° Drehung von #5 und 251° Drehung von #6), (e) zeigt das Sinogrammprofil von #5 bei 109° Drehung, (f) zeigt das Sinogrammprofil von #6 bei 72° Drehung, wobei (e) und (f) identisch sind, da beide vom selben (rauschfreien) 3D-Objekt abgeleitet wurden und die Sinogramm-Korrelation bei diesen Winkeln maximal, d. h. 1 ist (Bemerkung: Drehungen jeweils im Uhrzeigersinn).

Durch Sinogramm-Korrelationen ist es möglich die gegenseitige Lage, bzw. Winkel (sog. „Eulerwinkel“) beliebiger Projektion zu bestimmen.

Flußdiagramm der verwendeten Prozedur zur Einzelpartikelanalyse von SecA Protein:

Abb. 24 faßt die im einzelnen beschriebenen Schritte zur Einzelpartikelanalyse in einem Flußdiagramm zusammen, wie es in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von SecA Protein eingesetzt wurde.

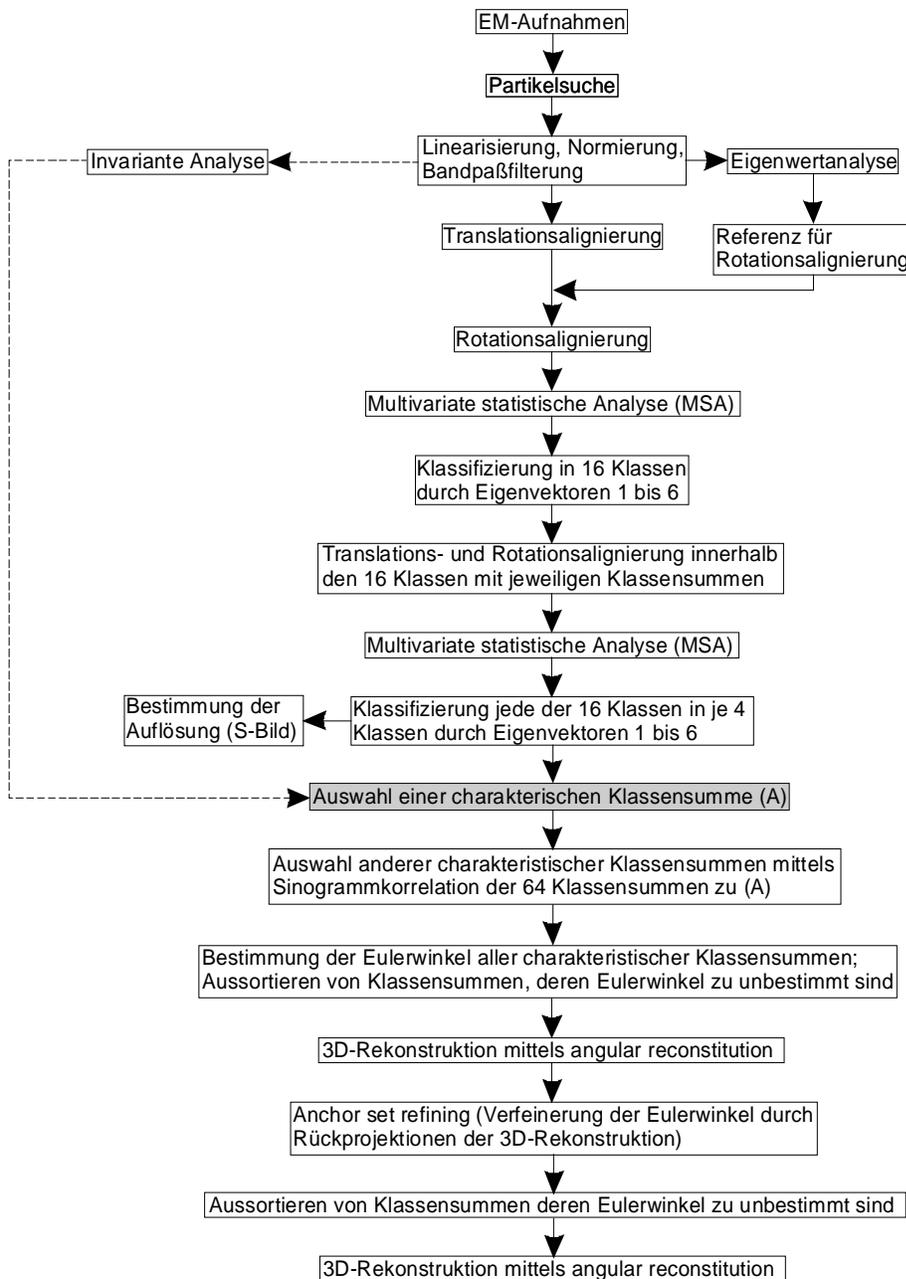


Abb. 24: Flußdiagramm der verwendeten Einzelpartikelanalyse.

Invariante Klassifizierung:

Neben der referenzbasierten Mittelung wurde mittels Invarianter Klassifizierung (Schatz & van Heel, 1992) eine Mittelungstechnik verwendet, die nicht auf subjektiv bestimmte Alignierungsreferenzen zurückgreift. Stattdessen werden aus den Bildern eines Datensatzes translations-, rotations- und spiegelinvariante Funktionen berechnet, wodurch sich zunächst eine Alignierung erübrigt. Invariante Sekundärbilder können aus den „double auto-correlation functions DACF“ bzw. „double self-correlation functions DSCF“ eines Bildes berechnet werden. Ausgehend von einem Bild $f(\vec{r})$ ergibt sich dessen zentrierte SCF(\vec{r}) (self-correlation function):

$$SCF(\vec{r}) = FT^{-1}\{A(\vec{R})\} \text{ mit } f(\vec{r}) = FT^{-1}\{A(\vec{R}) \cdot \exp(i\Theta(\vec{R}))\}$$

Die Invarianz bzgl. Drehung wird erreicht, indem SCF(\vec{r}) in Kreiskoordinaten umgewandelt wird und mit der Winkelkoordinate als Variable eine weitere Selbstkorrelation berechnet wird. Die resultierende Funktion wird „double SCF“ bzw. „DSCF“ genannt, da die Eingangsfunktion bereits eine Selbstkorrelationsfunktion ist. Wegen vierfacher Symmetrie der DSCFs sind sie darüber hinaus spiegelinvariant. Der Nachteil der Invarianten Klassifizierung ist der Verlust der Phaseninformation Θ bei der Umwandlung von $f(\vec{r})$ in SCF(\vec{r}), d. h. die Klassifikation findet im wesentlichen mit dem Informationsgehalt eines Beugungsbildes statt. Der Ablauf der Invarianten Klassifizierung ist in Abb. 25 dargestellt.

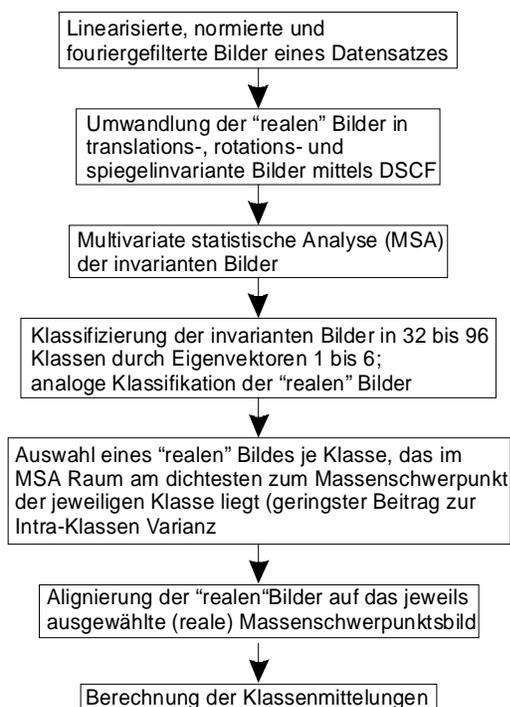


Abb. 25: Flußdiagramm zur Invarianten Analyse.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 SecA Protein aus *Escherichia coli*

Das SecA Protein aus *E. coli* wurde zuerst ohne Liganden für die morphologische Charakterisierung mit Uranylacetat negativ kontrastiert und elektronenmikroskopisch abgebildet (Abb. 26). Im Weiteren wird das SecA ohne Liganden als „natives“ SecA bezeichnet.

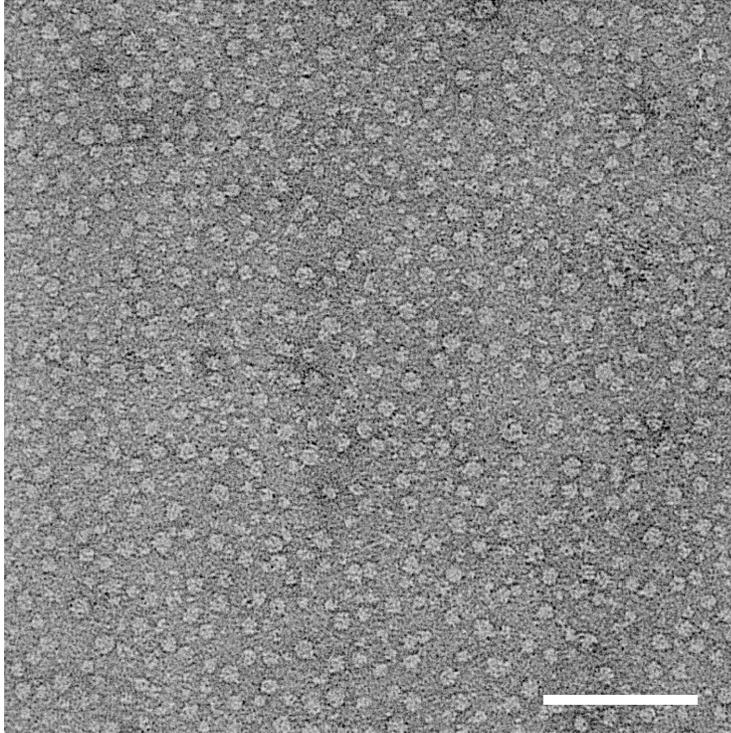


Abb. 26: SecA aus *E. coli*, negativ kontrastiert mit Uranylacetat (Proteinkonzentration 15 µg/ml in 10 mM Tris/HCL, pH = 7,6). Balken 100 nm.

Bei visueller Betrachtung fällt eine erhebliche Heterogenität der Partikel bezüglich der Größe und Form auf. Diese Heterogenität läßt vermuten, daß der Datensatz neben verschiedenen Projektionen des nativen SecA auch Ansichten von Molekülen, die anderen SecA Konformationen entsprechen, enthält.

Abb. 27 zeigt eine Galerie von Einzelpartikeln bei hoher Vergrößerung, die aus dem in Abb. 26 gezeigten Negativ extrahiert wurden.

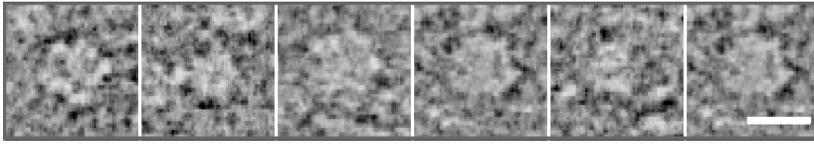


Abb. 27: Galerie von SecA, *E. coli* (nativ) Einzelpartikeln. Balken 10 nm.

Wegen der starken Größenheterogenität wurden die extrahierten Einzelbilder nach Normierung und Bandpassfilterung einer Multireferenz-Translationsalignierung unterworfen. Dazu wurden 10 Kreisreferenzen mit Durchmessern von 5 nm bis 14 nm verwendet (siehe 2.2.4, Abb. 17), wobei die zwei Graustufen der Referenzen auf die maximale bzw. minimale Graustufe des *E. coli* Datensatzes gesetzt wurde. Abb. 28 zeigt das Ergebnis der Translationsalignierung für den Datensatz des nativen SecA Proteins.

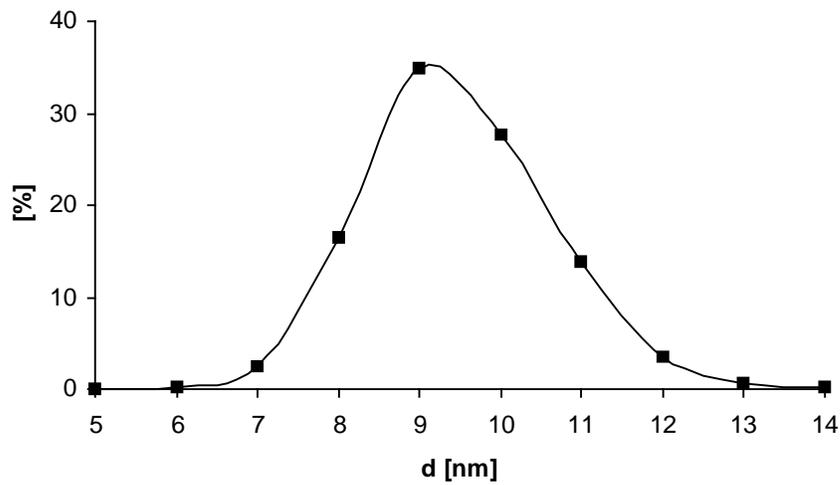


Abb. 28: Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung von *E. coli* SecA, nativer Datensatz. Die Abszisse gibt den Durchmesser der Kreisreferenzen wieder, die Ordinate den prozentualen Anteil der Partikel im Datensatz, der auf die jeweilige Referenz aligniert wurden.

Es ist anhand Abb. 28 nicht möglich, direkt auf die absolute Größe der Partikelprojektionen zu schließen, da die Projektionen, im Gegensatz zu den Referenzen, nicht exakt rund sind. Tendenziell ist es jedoch erkennbar, daß die meisten Partikelprojektionen Abmessungen von ca. 8 nm - 11 nm haben.

Zur Erzeugung einer Rotationsreferenz wurden alle Einzelpartikel des nativen Datensatzes nach Normierung und Filterung (siehe Flußdiagramm, Abb. 24) einer Eigenwertanalyse unterzogen. Abb. 29 zeigt das Ergebnis der Eigenwertanalyse.

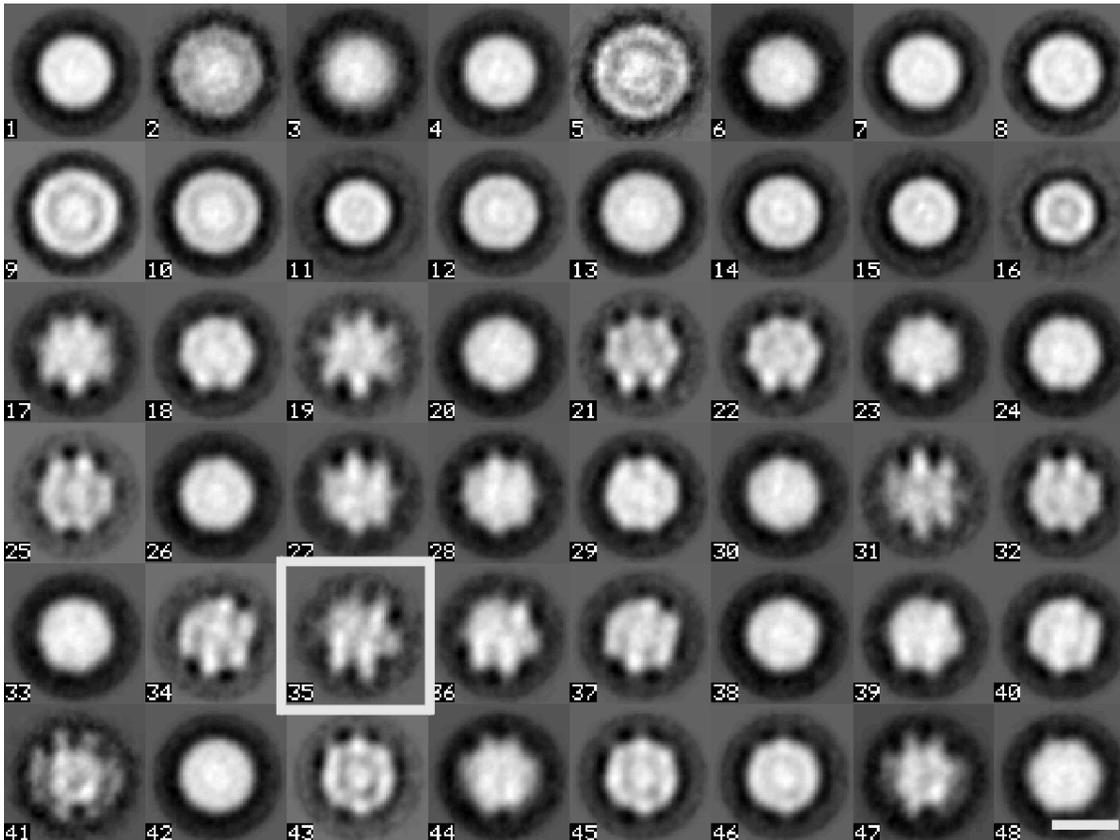


Abb. 29: Ergebnis der Eigenwertanalyse von *E. coli* SecA, nativ. Die erste Reihe zeigt die 8 Klassensummen bei Verwendung des ersten Eigenvektors, die zweite Reihe die 8 Klassensummen bei Verwendung des zweiten Eigenvektors, usw. Als Rotationsreferenz wurde die dritte Klassensumme bei Verwendung des fünften Eigenvektors ausgewählt (#35), da diese vergleichsweise geringe Rotationssymmetrie besitzt. Balken 10 nm.

Nach Rotationsalignierung und Multivariater Statistischer Analyse (MSA) wurde der Datensatz in 16 Klassen klassifiziert und Klassensummen berechnet (Abb. 30(a)). Anschließend wurden die Mitglieder jeder Klasse mit der jeweiligen, maskierten Klassensumme einer erneuten Rotations- und Translationsalignierung unterzogen. In einer weiteren MSA wurden alle 16 Klassen jeweils in weitere 4 Klassen eingeteilt, so daß der gesamte Datensatz in 64 Klassen zusammengefaßt wurde (Abb. 30(b)).

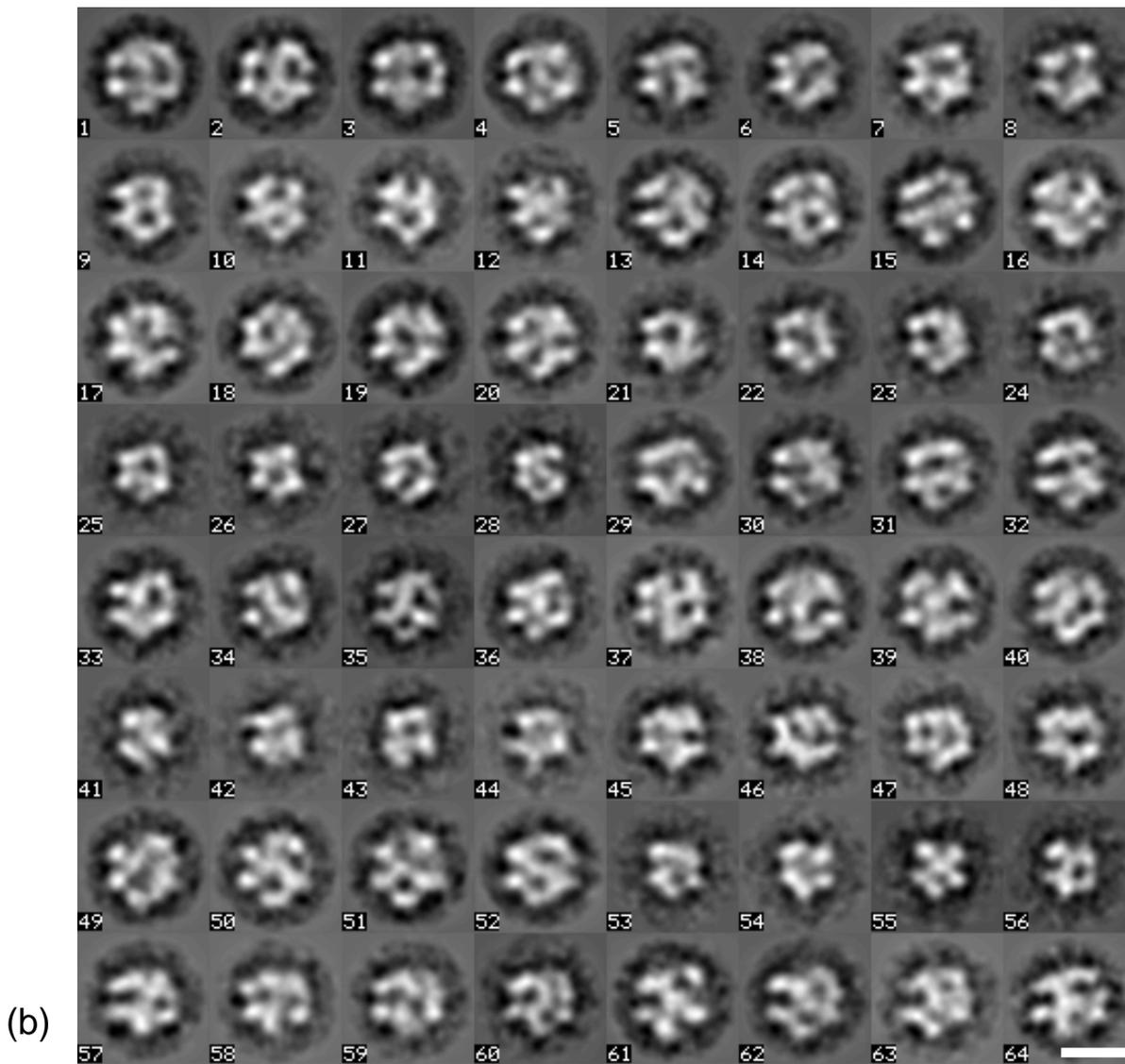
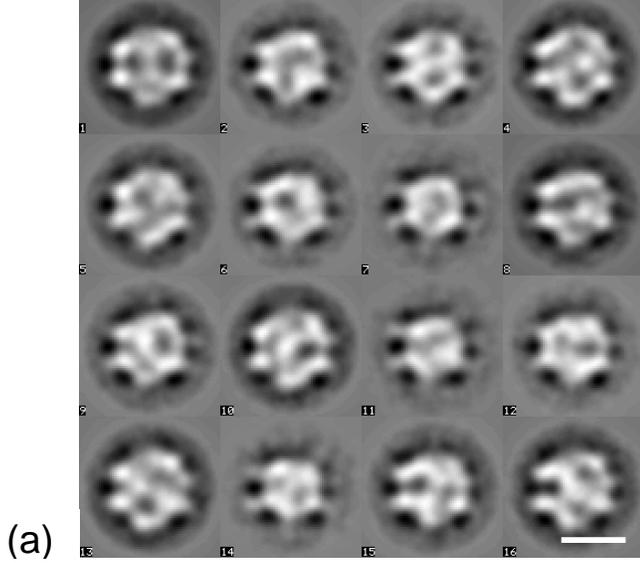


Abb. 30: Klassifizierung des *E. coli* SecA (nativ) Datensatzes in 16 Klassen (a), in 64 Klassen (b). Balken 10 nm (Anzahl der ausgewerteten Partikel: 6245).

Für die Auflösung einer Klassensumme ergibt sich nach dem S-Bild Kriterium etwa 2,8 nm (Abb. 31), wobei die Auflösung um $\pm 0,5$ nm je Klassensumme variiert.

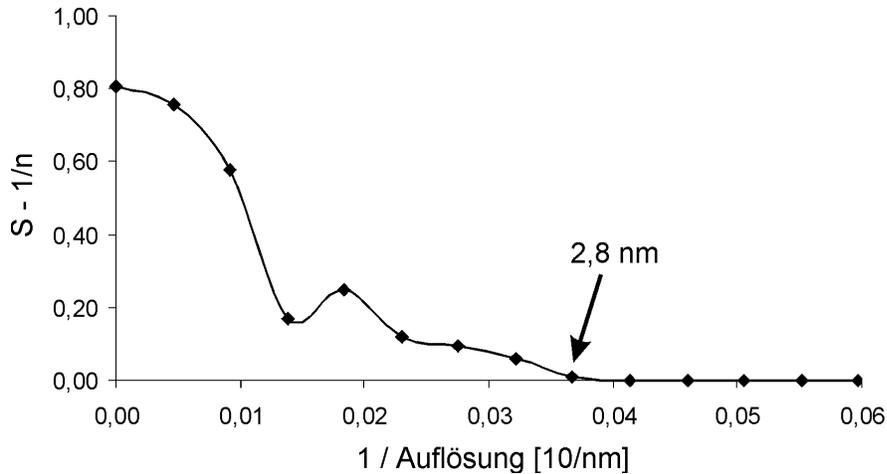


Abb. 31: Auflösungsbestimmung einer Klassenmittelung von *E. coli* SecA (nativ) nach dem S-Bild Kriterium. Die betrachtete Klasse ist Klassenmittelung #25 des nativen Datensatzes (vgl. Abb. 30(b)) mit 73 Bildern, die zur Mittelung beitragen. Die Ordinate gibt das „modifizierte S-Bild“ wieder, d. h. der Erwartungswert für statistisches Rauschen ($1/n$) ist vom S-Bild subtrahiert; n: Anzahl der Bilder, die zur Mittelung beitragen.

Die 16 Klassen in Abb. 30(a) reflektieren die Unterschiede in den Projektionen bzw. Subpopulationen des nativen Datensatzes. Die 64 dagegen (Abb. 30(b)) verdeutlichen die geringfügigen Unterschiede zwischen den Mitgliedern einer Klasse, wie z. B. leicht unterschiedliche Orientierungen des Moleküls und/oder geringe Variationen in Stainverteilung innerhalb des Moleküls (vgl. dazu z. B. Klasse #1 in Abb. 30(a) mit den Klassen #1 - #4 in Abb. 30(b)).

Abb. 32 zeigt die Verteilung der analysierten Einzelpartikel des nativen Datensatzes zwischen 16 Klassen. Dargestellt wurde die Abweichung von der durchschnittlichen Besetzungshäufigkeit (6,25 % bei statistischer Verteilung der Partikel zwischen 16 Klassen). Zusätzlich sind die Abmessungen der jeweiligen Projektionen (Klassenmittelungen) angegeben.

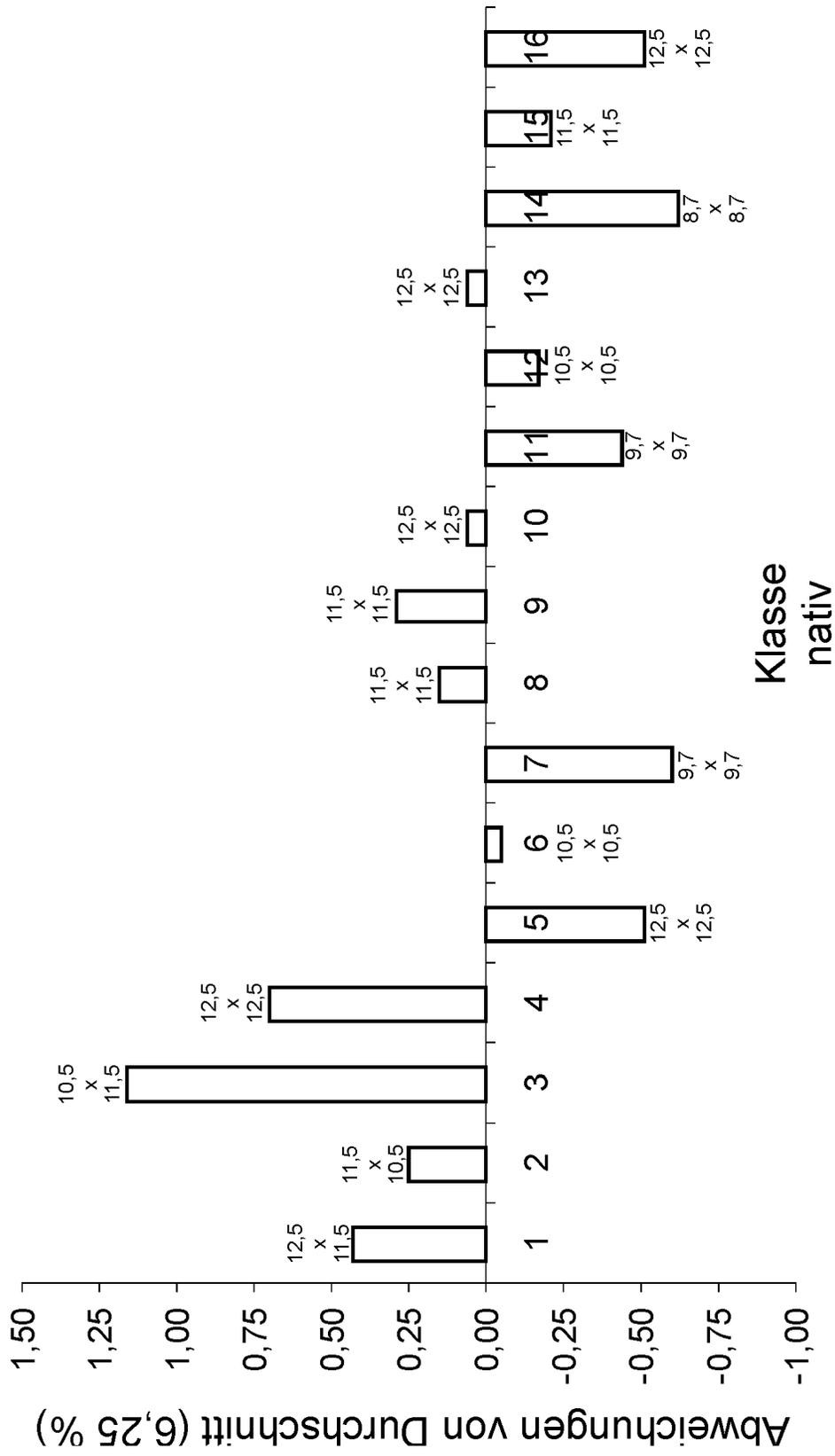


Abb. 32: Verteilung der analysierten 5328 Partikel zwischen 16 Klassen; *E. coli*/SecA (nativer Datensatz). Die Abmessungen der Projektionen (Breite x Höhe) sind in nm angegeben.

Wie Abbildungen 30 und 32 zeigen, weichen nur ein geringer Teil der SecA Molekülprojektionen von runder, symmetrischer Gestalt ab (Klassen #1, #2 und #3 in Abb. 30(a) und Abb. 32). Die Breite und Höhe (bzw. die Abmessungen) variieren meist zwischen 10,5 nm und 12,5 nm (z. B. Klassen #1, #2, #3, #4 und #9 in Abb. 30(a) und Abb. 32). In diesen Projektionen zeigt das Molekül staingefüllte Bereiche mit niedriger Proteindichte; in einigen wenigen Fällen sind Anzeichen von einer zweifach Symmetrie enthalten (z. B. Klassen #1 und #13 in Abb. 30(a)). Etwa 83 % der Projektionen des nativen Datensatzes haben Dimensionen größer als 10,5 nm x 10,5 nm (Maximum: 12,5 nm x 12,5 nm), während 17 % der Partikel kleinere Abmessungen haben (Minimum: 8,7 nm x 8,7 nm). Die kleineren Projektionen (Klassen #7, #11 und #14 in Abb. 30(a) und Abb. 32) erscheinen kompakt und zeigen keine strukturellen Details.

Die Klassenmittelungen zeigen, daß SecA eine offene, lockere Struktur hat, die leicht von Stain durchdrungen wird. Die Projektionen geben einen Hinweis auf eine leicht asymmetrische Gestalt des Moleküls. Allerdings ist die Heterogenität der Klassenmittelungen mit der Schlußfolgerung, daß diese verschiedene Projektionen einer einzigen Molekülsorte (d. h. einer SecA-Konformation) darstellen, nur schwer zu vereinbaren. Angesichts der hohen Konformationsflexibilität des SecA scheint es eher wahrscheinlich, daß der Datensatz verschiedene Molekülpopulationen, d. h. Moleküle in unterschiedlichen Konformationen enthält. Daher ist eine *a priori* Zuordnung von einzelnen Klassen zu einer bestimmten Molekülkonformation und eine anschließende 3D-Rekonstruktion zu einem Modell nicht möglich.

Um dieses Problem zu lösen, wurde folgenderweise vorgegangen: es wurden Datensätze in Gegenwart von verschiedenen Substraten gesammelt, die - wie aus bio-chemischen Studien bekannt - zu Konformationsänderungen des Moleküls führen. Dies sollte wiederum in einzelnen Datensätzen Verschiebungen in Häufigkeiten von Populationen verursachen, d. h. die eine oder andere Klasse, die für eine bestimmte Konformation, z. B. ADP-gebundenes SecA (ADP•SecA)¹, charakteristisch ist, sollte im entsprechenden Datensatz häufiger auftreten. Damit sollte es möglich sein, durch Vergleich verschiedener Datensätze verschiedene Molekülkonformationen zu identifizieren und entsprechende 3D-Modelle zu berechnen. Natürlich ist die Gangbarkeit dieses Weges davon abhängig, daß die

¹ Fortan wird in dieser Arbeit als Notation für substratbindendes SecA (Substrat•SecA) verwendet.

Konformationsänderungen in Größenordnungen liegen, die elektronenmikroskopisch detektierbar sind.

Im folgenden Abschnitt wird die Analyse von SecA in Gegenwart von verschiedenen Liganden dargestellt.

2.2.2 Konformationsänderungen von SecA in Gegenwart von Nukleotiden

Für die Untersuchung der Konformationsänderungen des *E. coli* SecA Proteins wurden negativ kontrastierte Einzelpartikeldatensätze in Gegenwart von Nukleotiden (ATP, ADP) bzw. nicht hydrolysierbaren Nukleotidanalogen (AMP-PNP), aber auch in Gegenwart von Azid (Inhibitor der SecA-Translokations-ATPase) bzw. Azid+ATP gesammelt. Dazu wurde das SecA Protein bei 4°C 10 Minuten mit den Substraten bei geeigneter Konzentration inkubiert und danach unverzüglich auf die kohlebepfunden Kupfergrids aufgebracht und mit Uranylacetat negativ kontrastiert.

Die Datensätze wurden entsprechend dem Flußdiagramm (Abb. 24) der Einzelpartikelanalyse unterzogen. Die extrahierten Partikelbilder wurden mit den Referenzen, die beim nativen Datensatz für die Translationsalignierung eingesetzt wurden, einer Multireferenz-Translationsalignierung unterzogen, wobei die Translationsreferenzen auf den Minimal- und Maximalgrauwert des betrachteten Datensatzes normiert wurden. Auch wurde für die Rotationsalignierung aller Datensätze die Referenz herangezogen, die für den nativen Datensatz verwendet wurde, da dadurch Unterschiede in Klassensummen zwischen den Datensätzen auf die Datensätze selbst zurückzuführen waren, und nicht auf unterschiedliche Rotationsreferenzen (bei der Rotationsreferenz fand keine Normierung der Grauwerte auf einen bestimmten Datensatz statt).

Abb. 33 zeigt das Ergebnis der Translationsalignierung für alle *E. coli* SecA Datensätze.

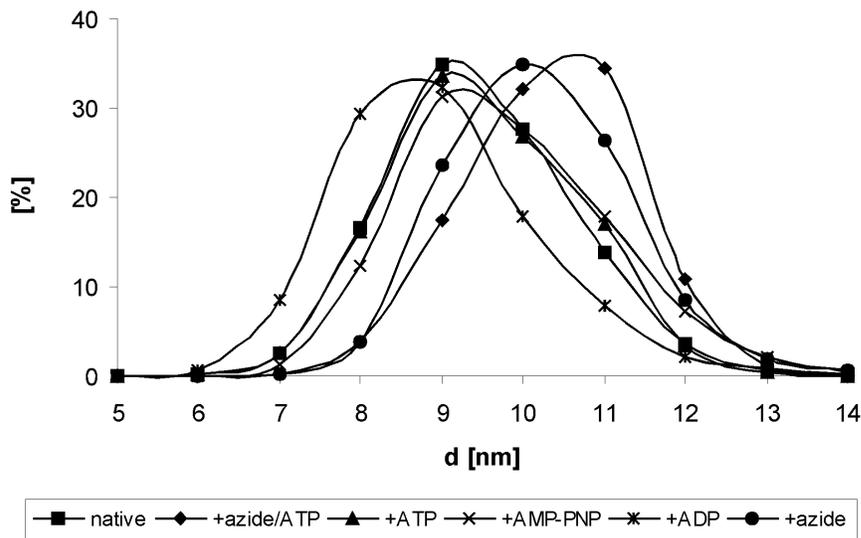


Abb. 33: Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung von sechs *E. coli* SecA Datensätzen. Die Abszisse gibt den Durchmesser der Kreisreferenzen wieder, die Ordinate den prozentualen Anteil der Partikel je Datensatz, die auf die jeweilige Referenz aligniert wurden.

Zwar ist es auch hier nicht möglich, auf die absoluten Größen der Partikelpopulationen zu schließen; Aussagen über Größenverschiebungen (durch Angabe des mittleren Wertes der Größenverteilung) bzw. Größenheterogenität (durch Angabe der Varianz der Größenverteilung) sind dennoch zulässig. Demnach sind z. B. Projektionen von ADP•SecA gegenüber nativem SecA im Mittel deutlich kleiner, während die Heterogenitäten vergleichbar sind. Die Projektionen von Azide•SecA und Azide/ATP•SecA erscheinen größer.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Klassifizierungen für alle Datensätze und die jeweiligen Klassenbesetzungen dargestellt.

ADP•SecA

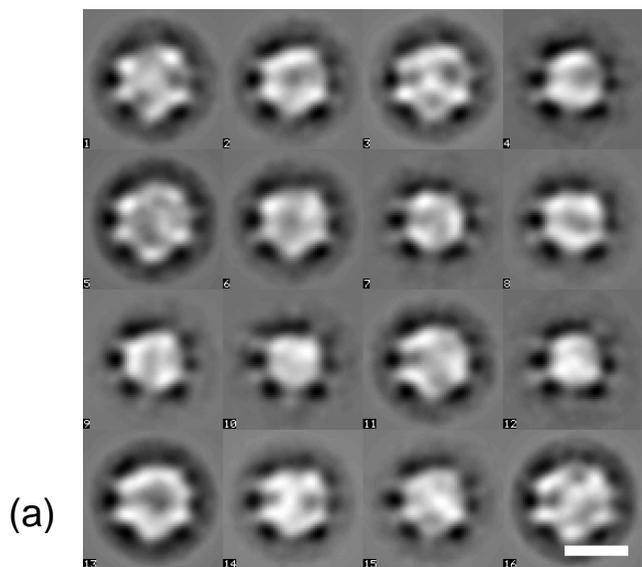
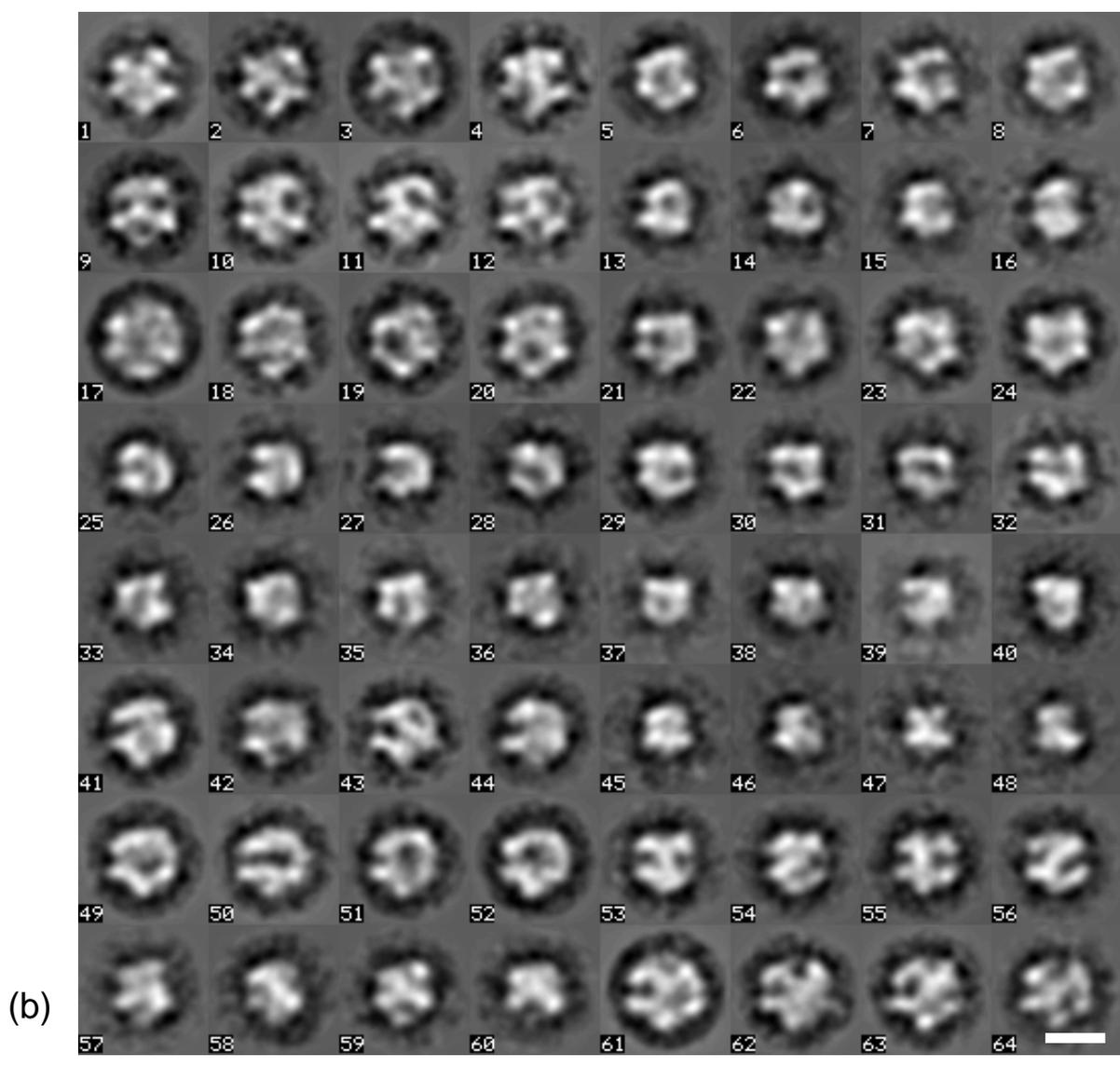


Abb. 34: 16 (a) bzw. 64 (b) Klassen von ADP•SecA-Datensatz. Balken 10 nm.



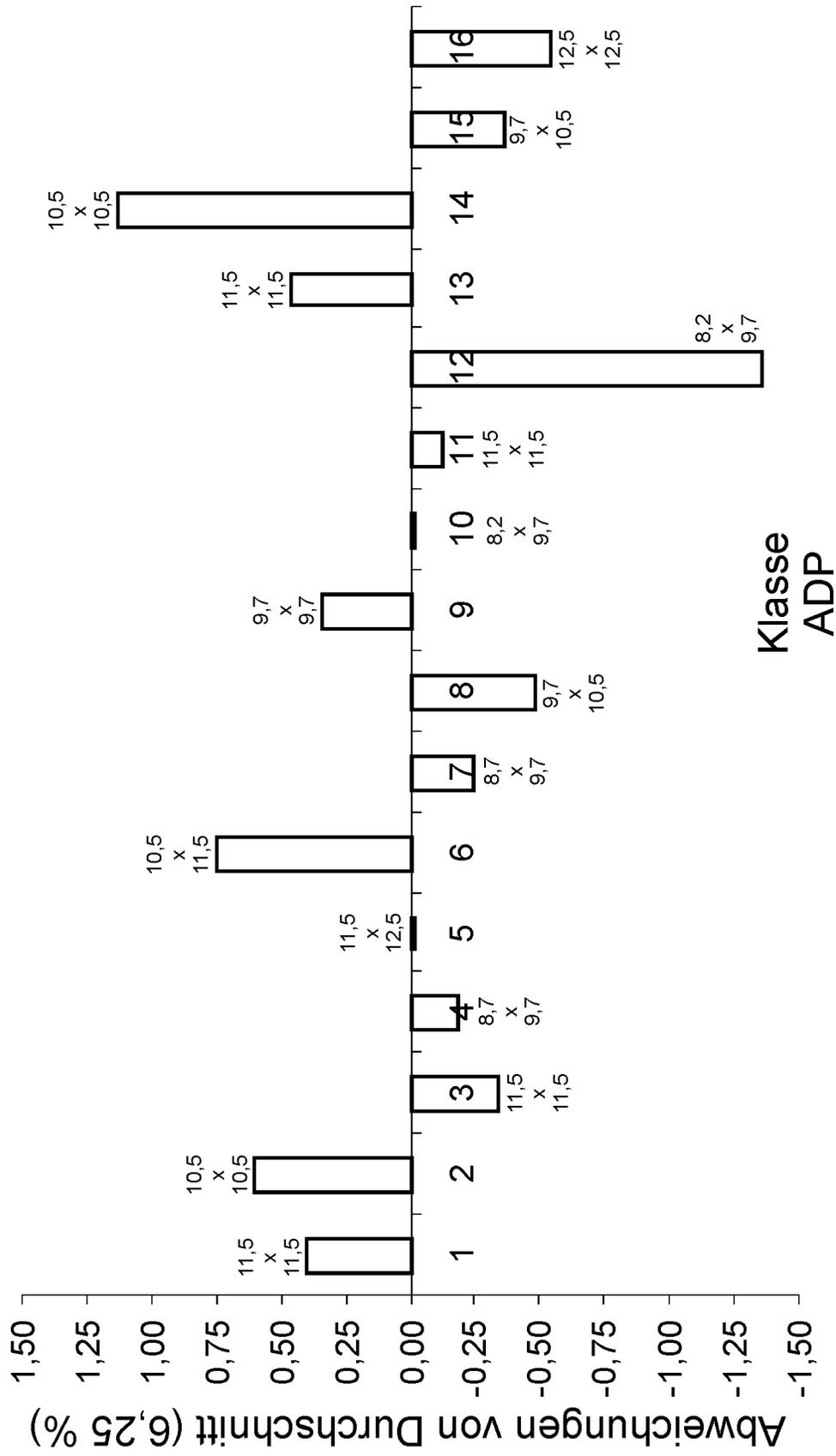


Abb. 35: Verteilung der analysierten 4878 Partikel zwischen 16 Klassen; *E. coli* ADP-SeqA. Die Abmessungen der Projektionen (Breite x Höhe) sind in nm angegeben.

ATP•SecA

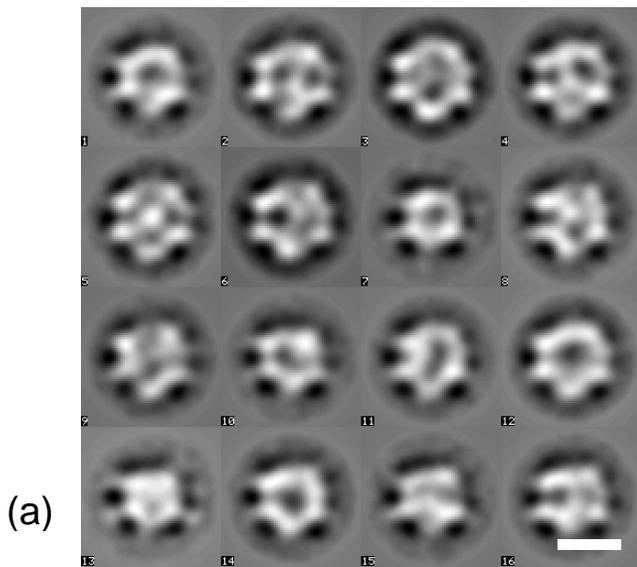
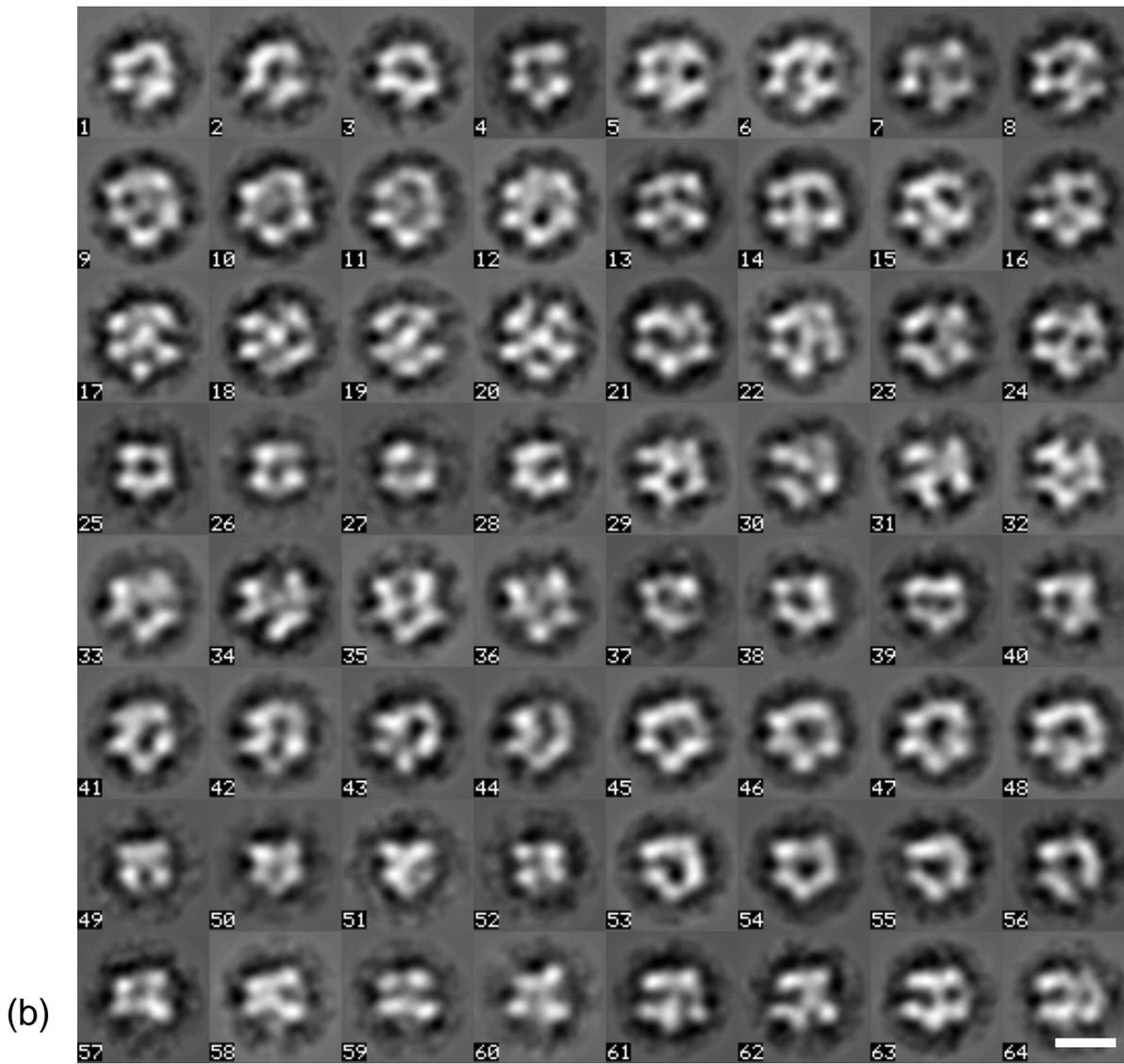


Abb. 36: 16 (a) bzw. 64 (b) Klassen von ATP•SecA-Datensatz.
Balken 10 nm.



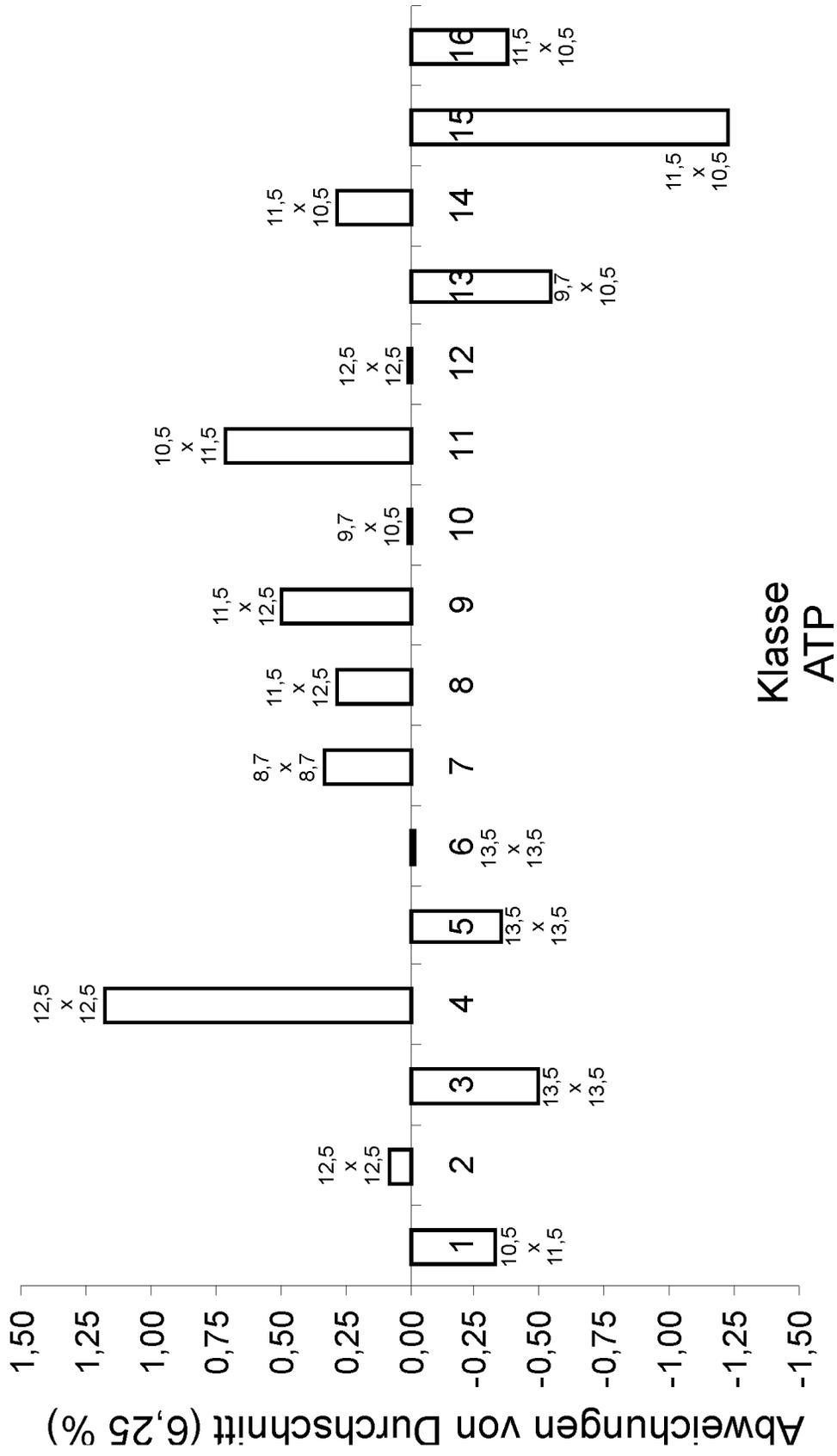


Abb. 37: Verteilung der analysierten 5880 Partikel zwischen 16 Klassen; *E. coli* ATP-SecA. Die Abmessungen der Projektionen (Breite x Höhe) sind in nm angegeben.

AMP-PNP•SecA

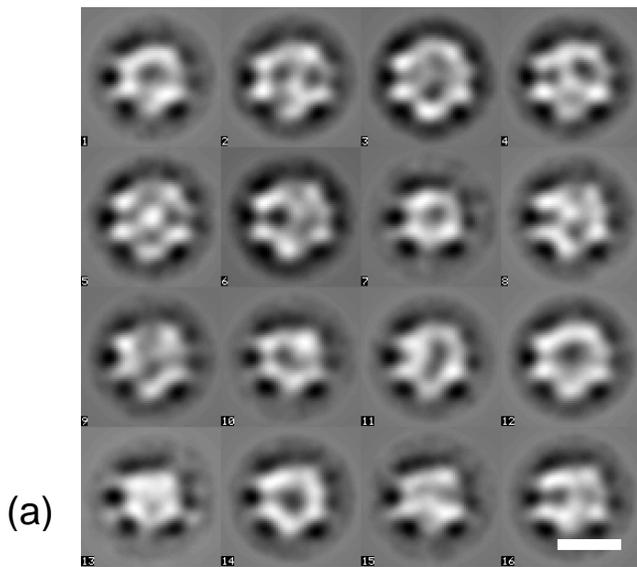
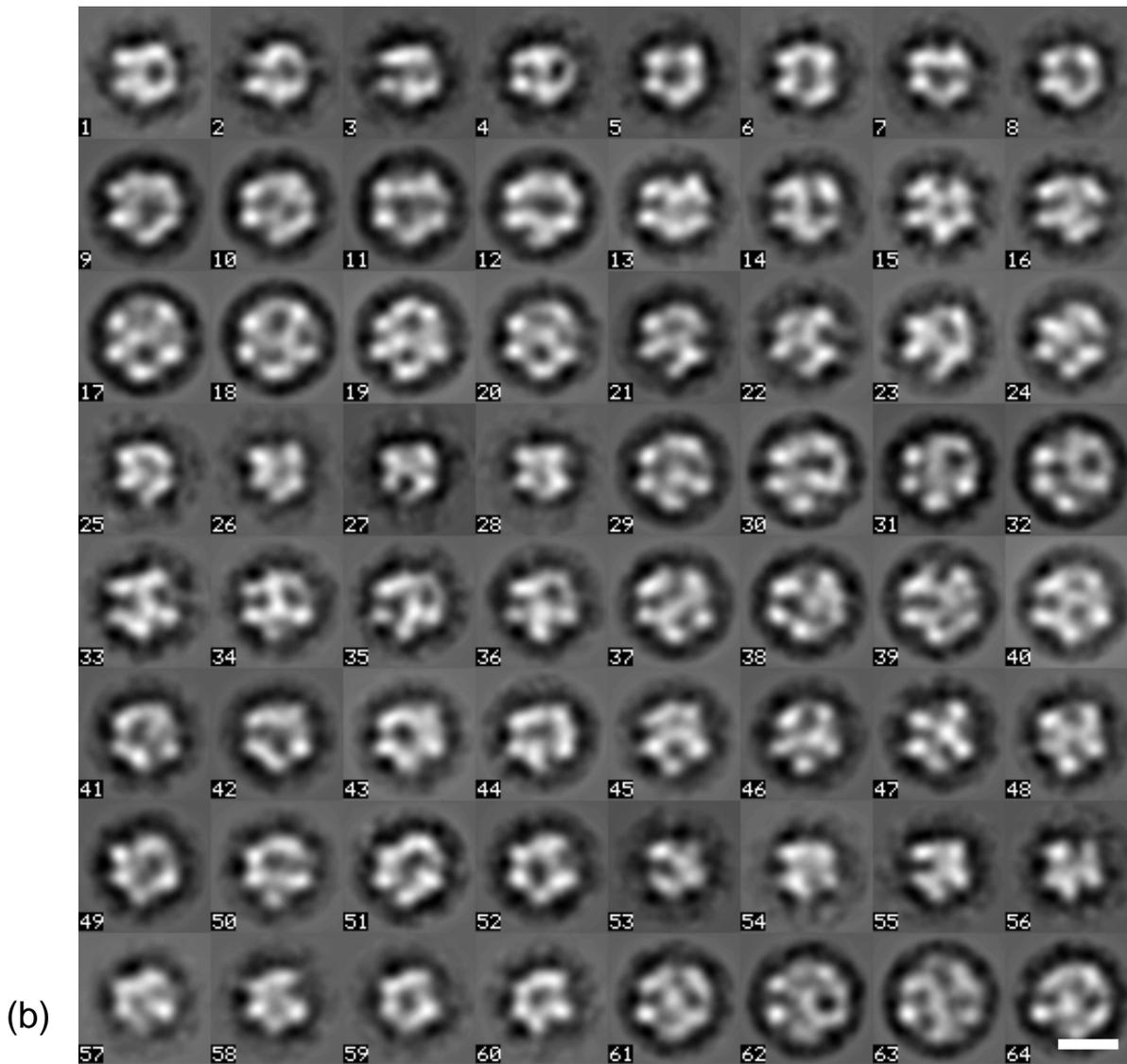


Abb. 38: 16 (a) bzw. 64 (b) Klassen von AMP-PNP•SecA-Datensatz.
Balken 10 nm.



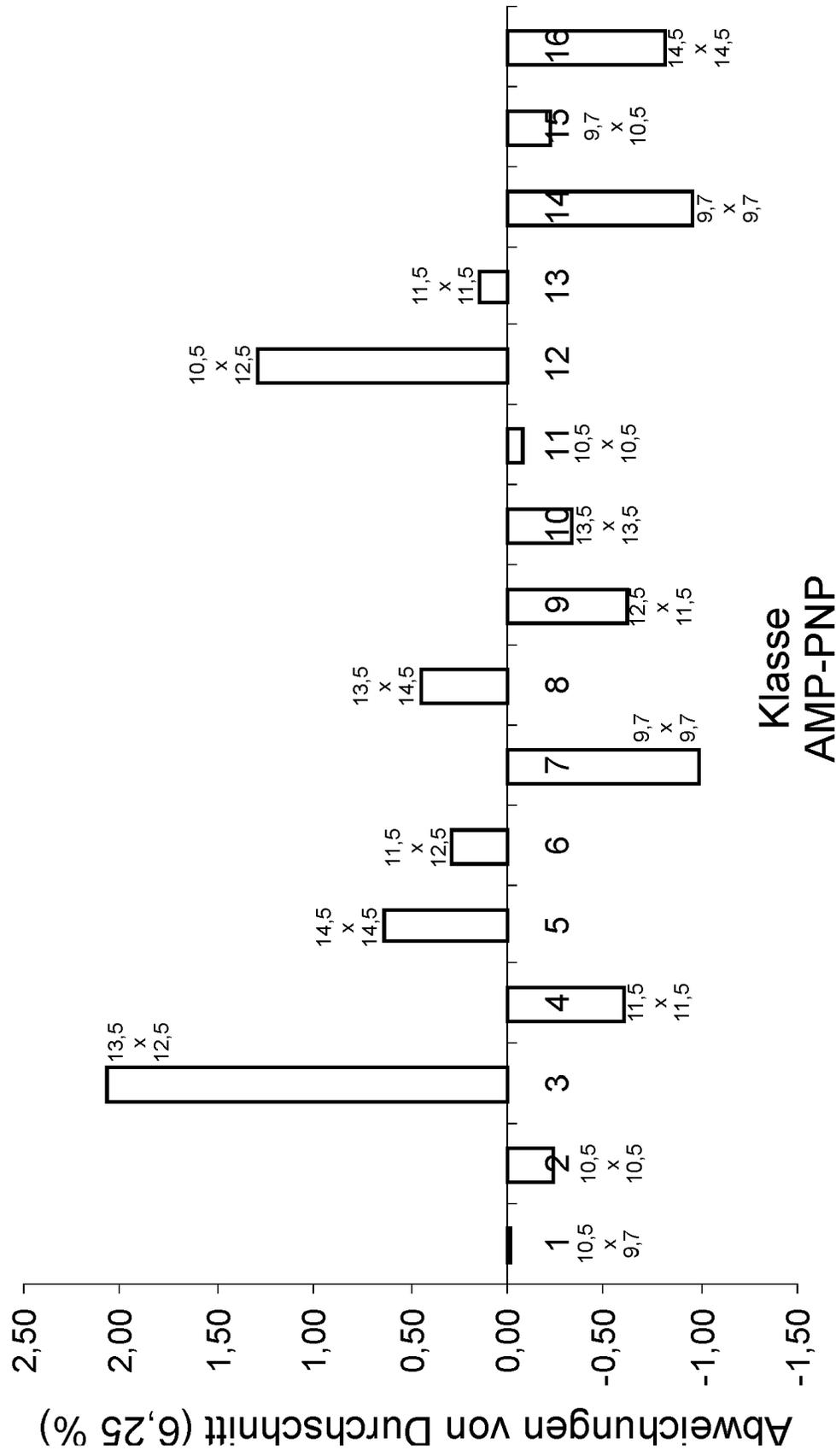


Abb. 39: Verteilung der analysierten 6229 Partikel zwischen 16 Klassen; *E. coli*/AMP-PNP-SecA. Die Abmessungen der Projektionen (Breite x Höhe) sind in nm angegeben.

Azid•SecA

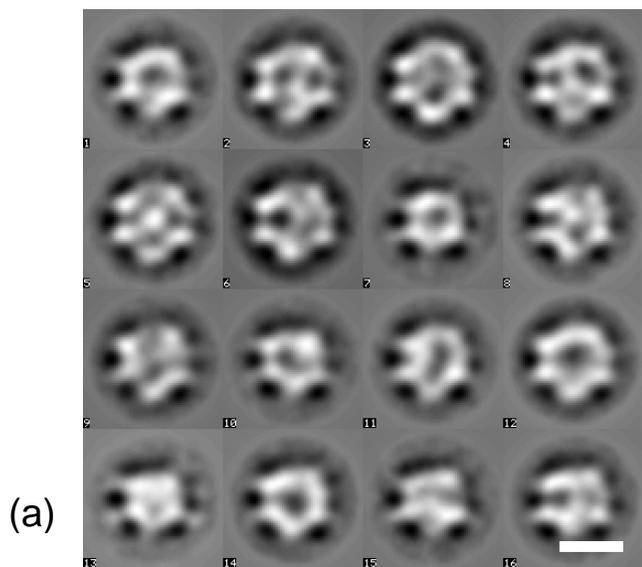
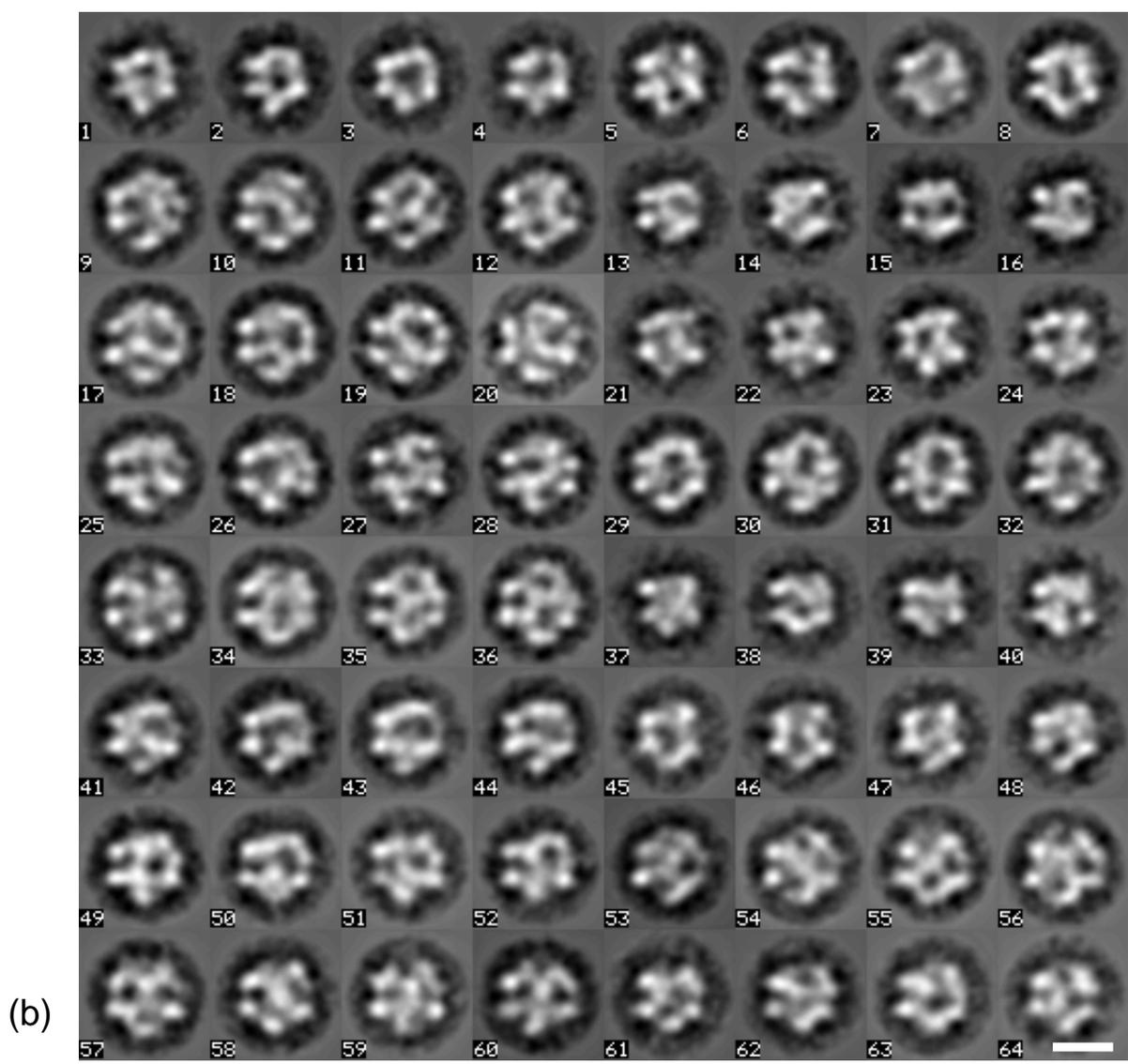


Abb. 40: 16 (a) bzw. 64 (b) Klassen von Azid•SecA-Datensatz.
Balken 10 nm.



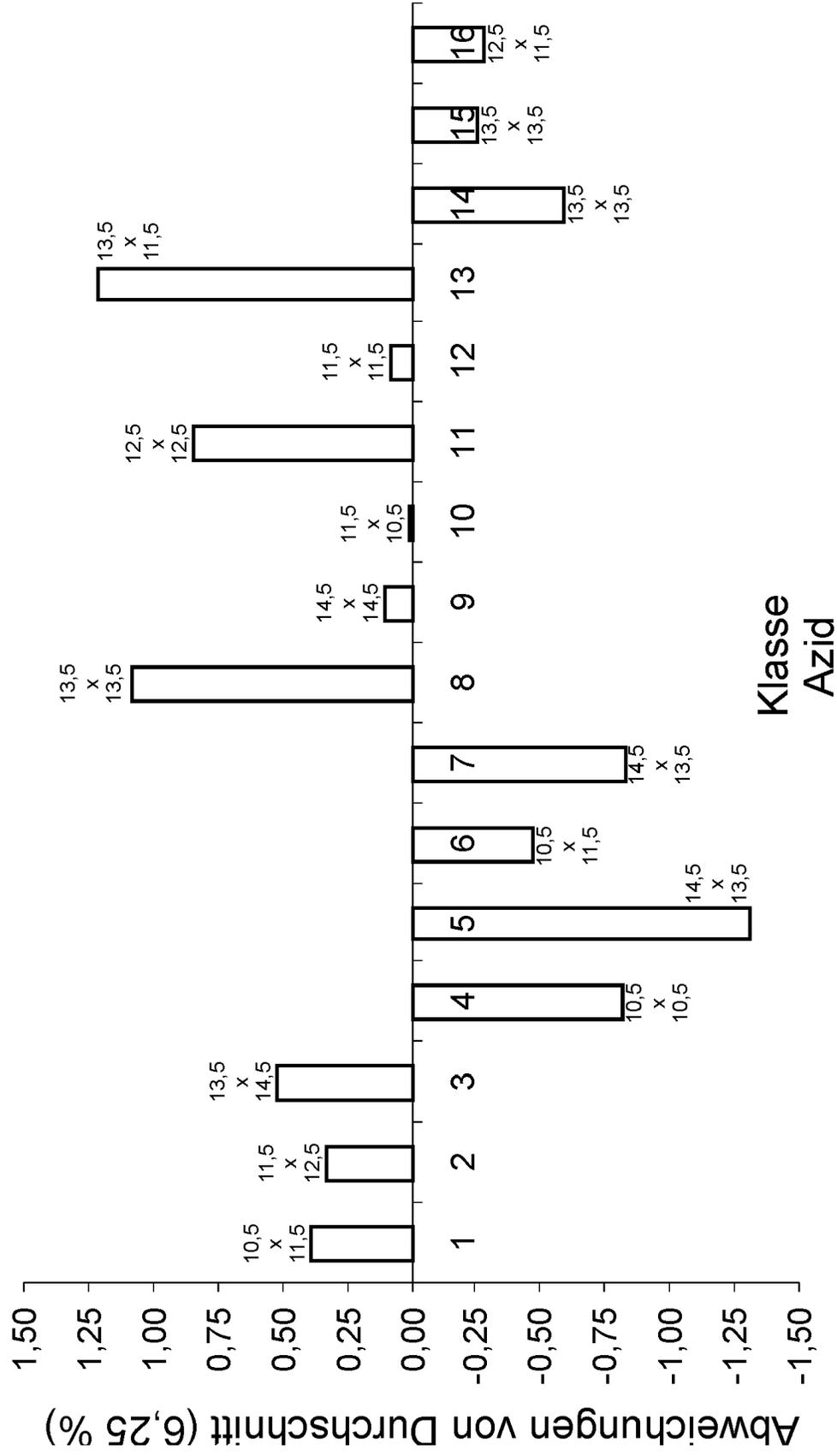


Abb. 41: Verteilung der analysierten 7465 Partikel zwischen 16 Klassen; *E. coli* Azid-SecA. Die Abmessungen der Projektionen (Breite x Höhe) sind in nm angegeben.

Azid/ATP•SecA

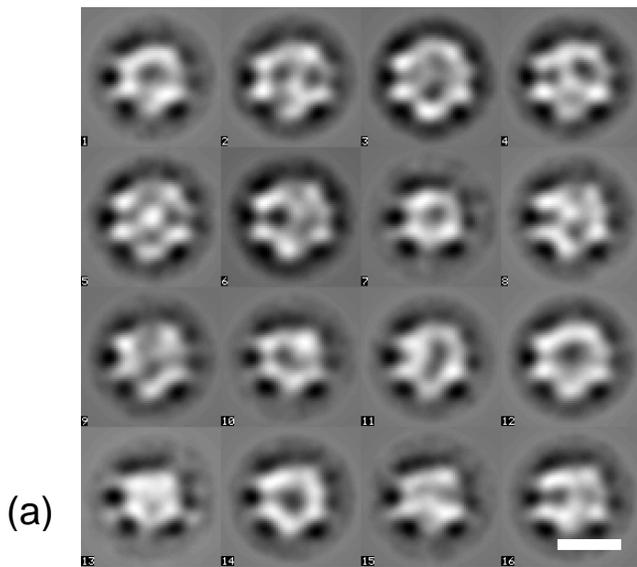
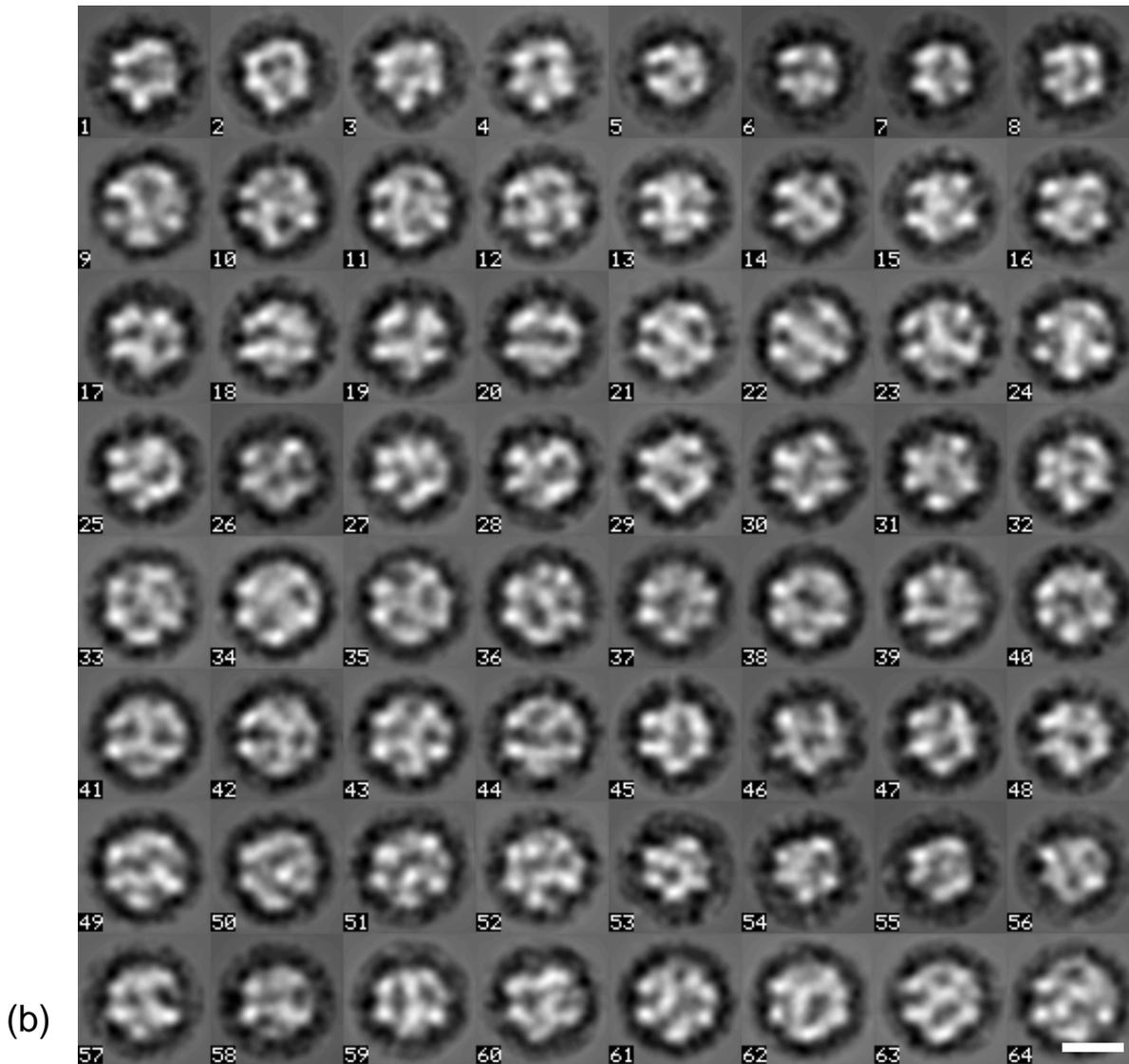


Abb. 42: 16 (a) bzw. 64 (b) Klassen von Azid/ATP•SecA-Datensatz. Balken 10 nm.



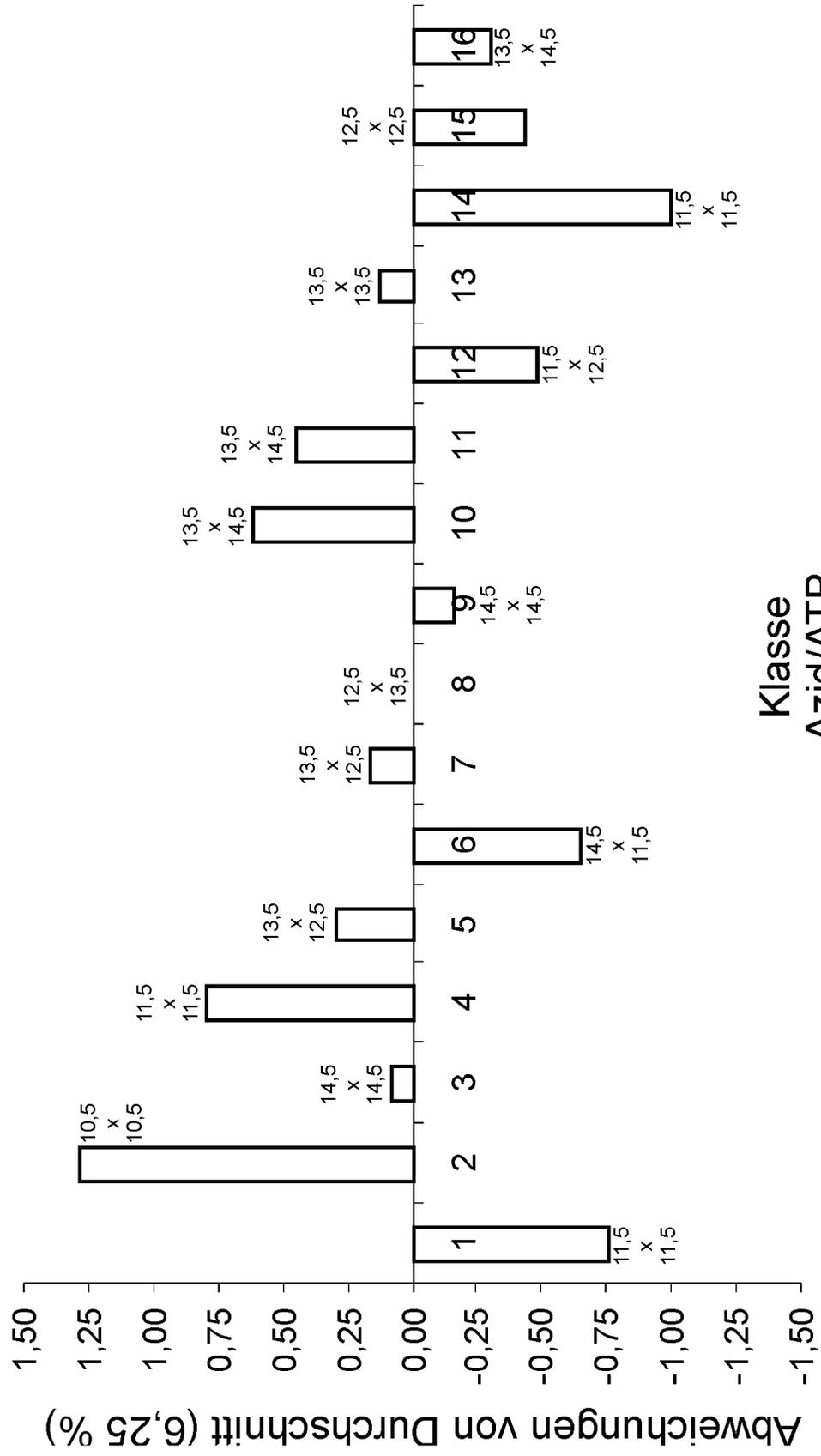


Abb. 43: Verteilung der analysierten 5328 Partikel zwischen 16 Klassen; *E. coli*/ATP-SecA. Die Abmessungen der Projektionen (Breite x Höhe) sind in nm angegeben.

Klasse
Azid/ATP



Abb. 44: Klassifizierung der *E. coli* SecA Datensätze in 16 Klassen. In Klammern ist jeweils die Anzahl der ausgewerteten Partikel angegeben.

(a) SecA, nativ (6245), (b) ADP•SecA (+ 2 mM ADP) (4878), (c) ATP•SecA (+ 2 mM ATP) (5880), (d) AMP-PNP•SecA (+ 2 mM AMP-PNP) (6229), (e) Azid•SecA (+ 20 mM Azid) (7465), (f) Azid/ATP•SecA (+ 20 mM Azid + 2 mM ATP) (5328). Balken 10 nm.

Analog zum nativen Datensatz zeigen auch die Datensätze in Gegenwart von verschiedenen Liganden erhebliche Heterogenität bezüglich der Form und Größe der beobachteten Partikel (Abb. 44). Eine erste Betrachtung der 6 x 16 Klassenmittlungen zeigt deutliche Größenunterschiede der Projektionen in den untersuchten Datensätzen, die bereits aufgrund der Multireferenz-Translationsalignierung vermutet wurde. In Tab. 1 sind die Minima und Maxima, der an Klassenmittlungen gemessenen Partikeldimensionen (Länge x Breite) und der prozentuale Anteil der Partikel in bestimmten Größenklassen angegeben.

	Minimum	Maximum	< 10,5 nm x 10,5 nm	10,5 nm x 10,5 nm ≤ ≤ 12,5 nm x 12,5 nm	> 12,5 nm x 12,5 nm
<i>E. coli</i>, SecA nativ	8,7 nm x 8,7 nm	12,5 nm x 12,5 nm	17 %	83 %	0 %
ADP•SecA	8,2 nm x 9,7 nm	12,5 nm x 12,5 nm	41 %	59 %	0 %
ATP•SecA	8,7 nm x 8,7 nm	13,5 nm x 13,5 nm	19 %	56 %	25 %
AMP-PNP•SecA	9,7 nm x 9,7 nm	14,5 nm x 14,5 nm	23 %	44 %	33 %
Azid•SecA	10,5 nm x 10,5 nm	14,5 nm x 14,5 nm	0 %	49 %	51 %
Azid/ATP•SecA	10,5 nm x 10,5 nm	14,5 nm x 14,5 nm	0 %	37 %	63 %

Tab. 1: Größenvergleich der *E. coli* SecA Datensätze.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, ist nach Zugabe von ADP eine deutliche Erhöhung des Anteils der Partikel mit Dimensionen < (10,5 nm x 10,5 nm) zu beobachten (41 % im ADP•SecA-Datensatz im Vergleich zu 17 % im nativen Datensatz). Während in den SecA- und ADP•SecA-Datensätzen die maximale Teilchengröße bei (12,5 nm x 12,5

nm) liegt, tauchen in den weiteren Datensätzen größere Partikel auf. In den Azid•SecA- und Azid/ATP•SecA-Datensätzen sind Partikel mit Dimensionen kleiner als (10,5 nm x 10,5 nm) nicht mehr vorhanden.

Der visuelle Vergleich der 6 x 16 bzw. 6 x 64 Klassenbilder zeigt das Vorhandensein von ähnlichen bzw. nahezu identischen Klassen in verschiedenen Datensätzen, jedoch mit verschiedenen Besetzungen. Dies bestätigt die Vermutung, daß in den meisten Datensätzen unterschiedliche Populationen (Molekülkonformationen) nebeneinander existieren, was die Interpretation erschwert. Um diese verschiedenen Populationen zu finden und zu trennen, muß zunächst eine „charakteristische“ Projektion je Population gefunden werden, mit deren Hilfe andere Projektionen der Population durch Sinogrammkorrelation zu identifizieren sind.

Invariante Klassifizierung und Bestimmung der „charakteristischen“ Projektionen:

Für die Bestimmung der „charakteristischen“ Projektionen für jeden Datensatz wurde die Invariante Klassifizierung herangezogen. Dazu wurden alle sechs *E. coli* SecA Datensätze zusammengefaßt und in 96 Klassen klassifiziert. Abb. 45 zeigt die 96 Klassensummen.

Es lassen sich aus den 96 Klassenmittlungen Mittlungen finden, die in bestimmten Datensätzen dominant sind und subjektiven „Wiedererkennungswert“ besitzen. Abb. 46 zeigt sechs derartige Klassenmittlungen aus der Invarianten Klassifizierung, Tab. 2 die Häufigkeit der Partikel, die diesen Mittlungen entsprechen bzw. ähnlich sind. Analog lassen sich in den 6 x 64 (konventionellen) Klassenmittlungen je eine Mittlung finden, die diesen invarianten Klassensummen (subjektiv) ähnlich sind (Abb. 47).

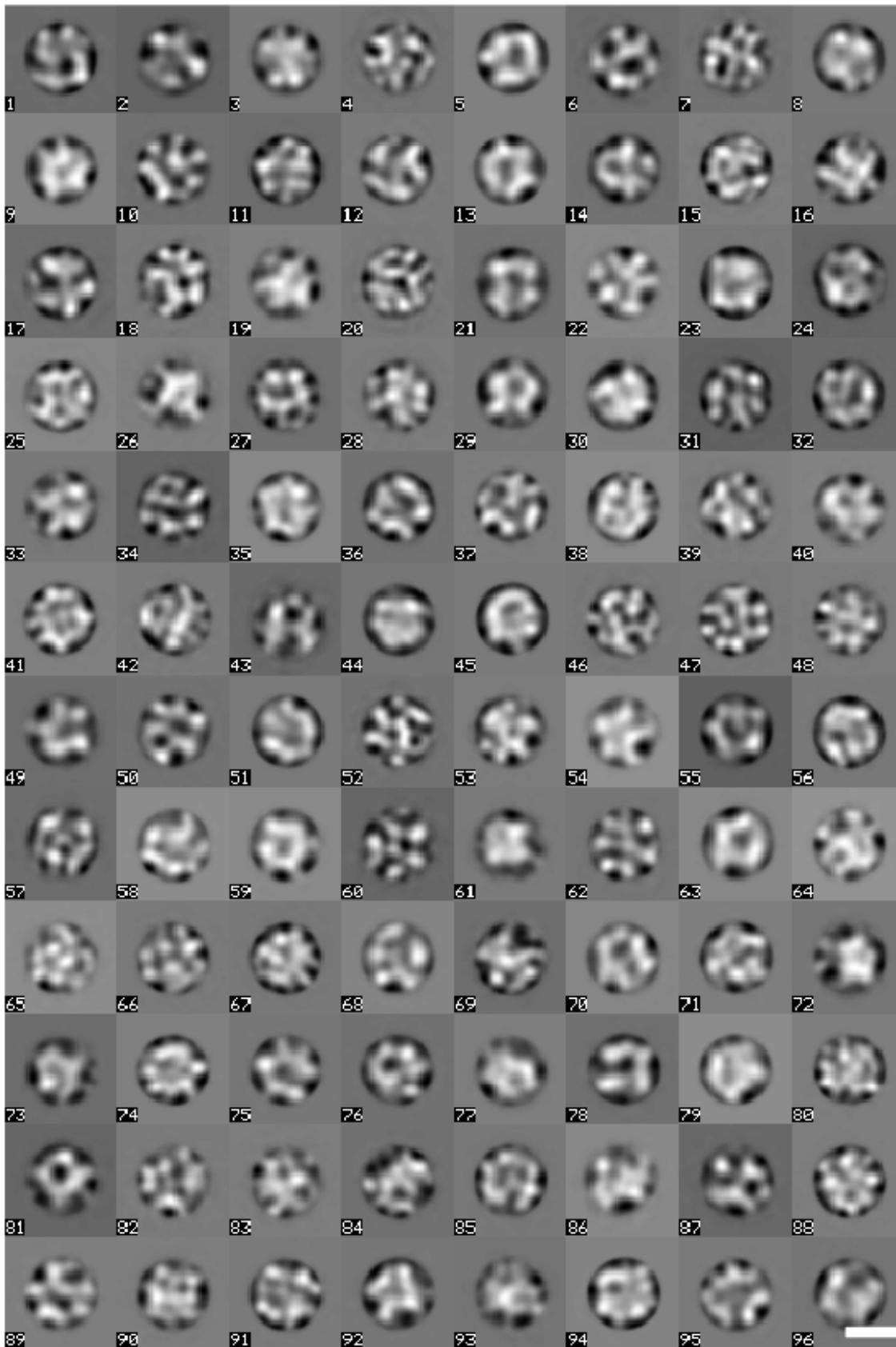


Abb. 45: 96 Klassensummen bei Invarianter Klassifizierung der *E. coli* SecA Datensätze. Balken 10 nm.

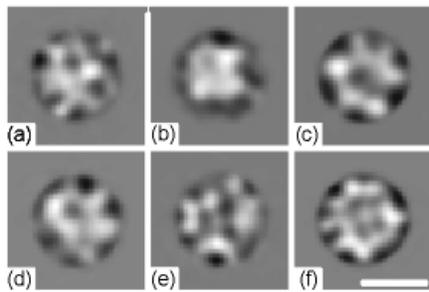


Abb. 46: Sechs ausgewählte Mittelungen aus Invarianter Klassifizierung. (a) #83, (b) #61, (c) #75, (d) #40, (e) #82 und (f) #41. Balken 10 nm.

Klassensumme bei Invarianter Klassifizierung	NATIVER Datensatz [%]	ADP Datensatz [%]	ATP Datensatz [%]	AMP-PNP Datensatz [%]	Azid Datensatz [%]	Azid/ATP Datensatz [%]
83 (a)	33,48	26,40	5,34	9,05	11,37	14,35
61 (b)	4,64	59,50	11,32	17,02	3,24	4,27
75 (c)	2,52	6,45	57,17	21,81	6,07	5,97
40 (d)	5,81	16,74	42,88	25,48	7,57	1,53
82 (e)	18,92	7,00	15,93	12,49	30,09	15,57
41 (f)	21,43	11,21	2,31	3,90	25,34	35,81

Tab. 2: Bei Invarianter Klassifizierung dominierende Datensätze für sechs Mittelungen. Aus dieser Tabelle läßt sich z. B. ablesen, daß 59,50 % aller Partikel, die zu Klasse #61 (Abb. 46(b)) beitragen, aus dem ADP-Datensatz stammen. Klasse #61 scheint also eine „charakteristische“ Projektion eines ADP•SecA Moleküls zu sein.

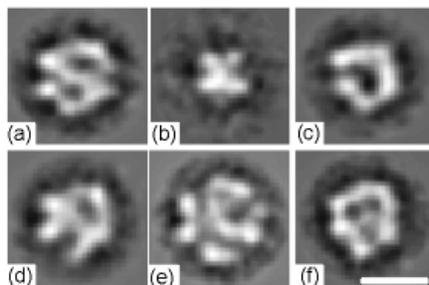


Abb. 47: Sechs Mittelungen aus 6 x 64 Klassifizierung. (a) Nativ-Klasse 52, (b) ADP-Klasse 47, (c) ATP-Klasse 53, (d) AMP-PNP-Klasse 23, (e) Azid-Klasse 20, (f) Azid/ATP-Klasse 2. Balken 10 nm.

Für die Überprüfung, ob die ausgesuchten Mittelungsbilder in Abb. 47 tatsächlich auch charakteristisch für den jeweiligen Datensatz sind, wie die Invariante Klassifizierung vermuten läßt, wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt. Bei einer mehr subjektiven Vorgehensweise wurde für jede ausgewählte „charakteristische“ Projektion deren Häufigkeit in den sechs Datensätzen verglichen. Mit anderen Worten, in den jeweiligen Datensätzen wurde visuell ausgesucht, wie viele Klassenmittelungen bzw. Partikel, die zu den 6 x 64 Klassenmittelungen beitragen, den ausgesuchten Klassenmittelungen aus Abb. 47 ähnlich sind. Das Ergebnis ist in Abb. 48 dargestellt.

Abb. 48 zeigt, daß jede der sechs ausgewählten Klassensummen in jeweils genau einem Datensatz den größten prozentualen Anteil aufweist, d. h. der Forderung nach „charakteristischer Projektion für den jeweiligen Datensatz“ genügt, falls subjektive Ähnlichkeit als Kriterium angegeben wird. Dies ist v. a. für ADP-, ATP- und AMP-PNP•SecA-Datensätze auffällig. Nach der Analyse ist es also gerechtfertigt, z. B. die Klassensumme ADP47 als eine charakteristische Projektion des ADP gebundenen SecA Moleküls zu bezeichnen.

Anhand der sechs subjektiv ausgewählten „charakteristischen“ Projektionen wurden alle Datensätze auf ihre Heterogenität überprüft, d. h. in jedem Datensatz wurde der prozentuale Anteil der Partikel bestimmt, die den ausgewählten Klassensummen ähnlich sind (Abb. 49).

Es zeigt sich, daß in allen Datensätzen neben der jeweils zu erwartenden Projektion auch ein hoher Anteil an der „charakteristischen“ Azid-Projektion vorhanden ist, v. a. in den nativen und Azid/ATP•SecA-Datensätzen. Die Analyse deutet außerdem darauf hin, daß die ADP•SecA- und Azid•SecA-Datensätze im Vergleich zu anderen Datensätzen homogener sind.

Abbildungen 48 und 49 zeigen die Ergebnisse aus der subjektiven Analyse, bei der als Kriterium die visuelle Ähnlichkeit der ausgesuchten „charakteristischen“ Projektionen mit den Klassenmittlungen der jeweiligen Datensätze verwendet wurde. Bei der zweiten Vorgehensweise wurden für eine objektivere Beurteilung alle ausgesuchten „charakteristischen“ Projektionen mit den 64 Klassenmittlungen der Datensätze der Sinogrammkorrelation unterzogen. Dies diente zur Beurteilung welche Klassenmittlungen von einem drei-dimensionalen Objekt stammen können, das eine der ausgesuchten „charakteristischen“ Projektionen besitzt (Abb. 50).

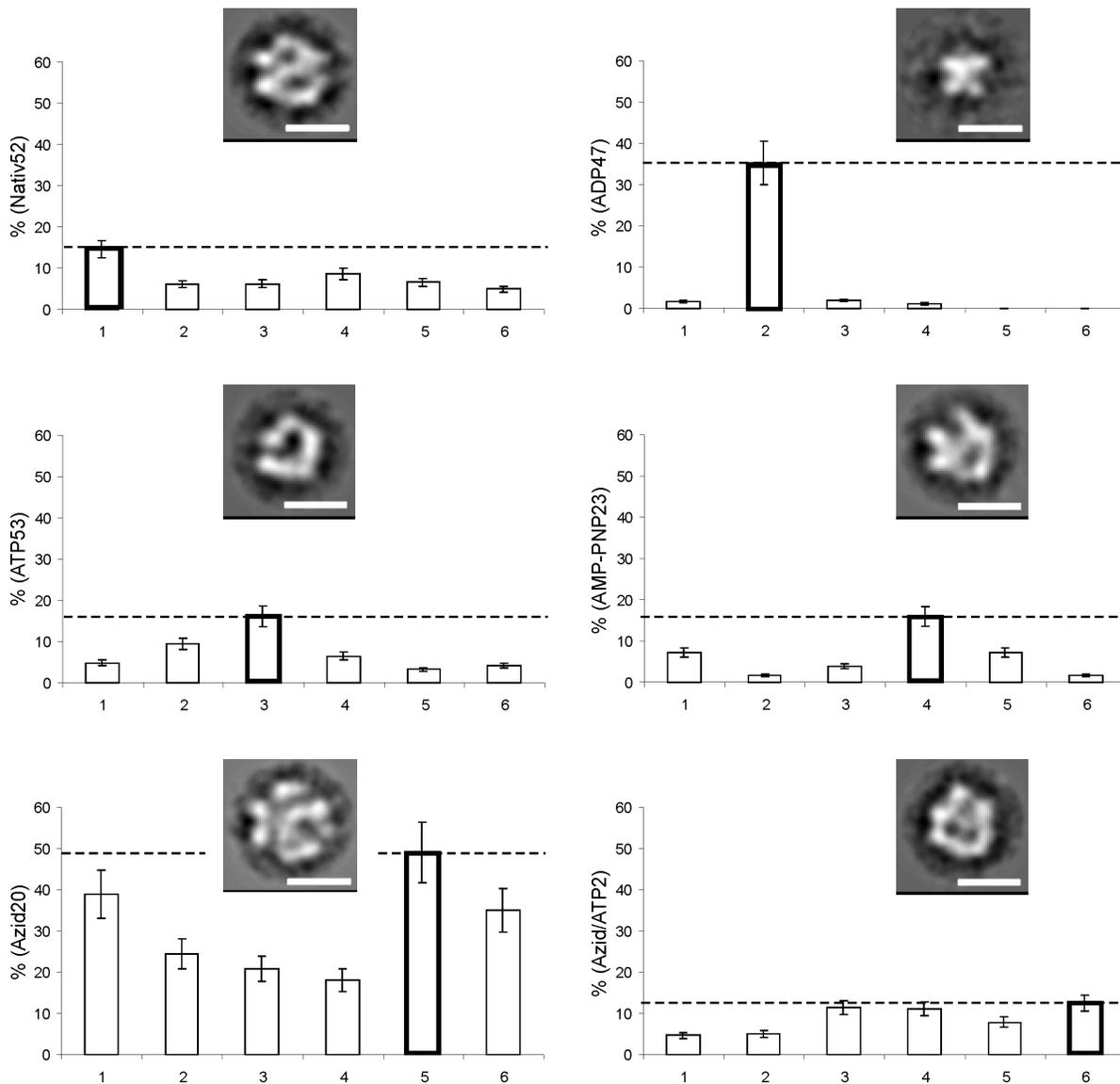


Abb. 48: Häufigkeiten der sechs ausgesuchten Projektionen in verschiedenen *E. coli* SecA Datensätzen. Die Abszisse gibt den Datensatz wieder: (1) nativ, (2) + ADP, (3) + ATP, (4) + AMP-PNP, (5) + Azid und (6) + Azid/ATP. Die Ordinate gibt den prozentualen Anteil an Partikeln pro Datensatz wieder, die der ausgesuchten (und dargestellten) Klassensumme visuell ähnlich sind (subjektive Vorgehensweise). Beispielsweise sind ca. 35 % aller Partikel aus dem ADP•SecA Datensatz der ausgesuchten Klassensumme ADP47 ähnlich, und damit weit mehr als Partikel aus anderen Datensätzen. Balken 10 nm.

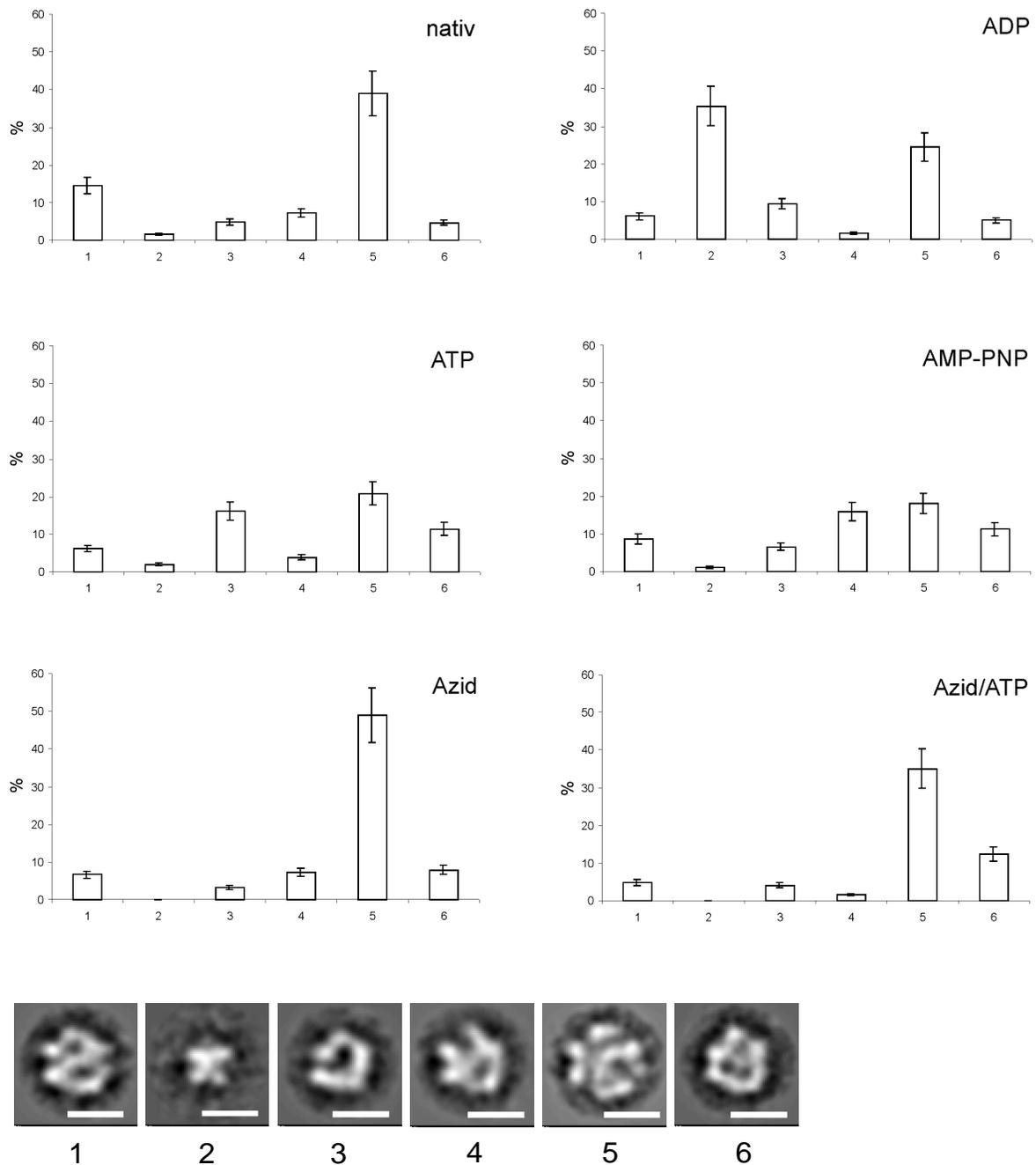


Abb. 49: Heterogenität der *E. coli* SecA Datensätze. Die Abszisse gibt die charakteristische Klassensumme wieder: (1) nativ52, (2) ADP47, (3) ATP53, (4) AMP-PNP23, (5) Azid20 und (6) Azid/ATP2. Die Ordinate gibt den prozentualen Anteil der den Klassensummen 1 - 6 ähnlichen Partikeln im jeweiligen Datensatz wieder. Balken 10 nm.

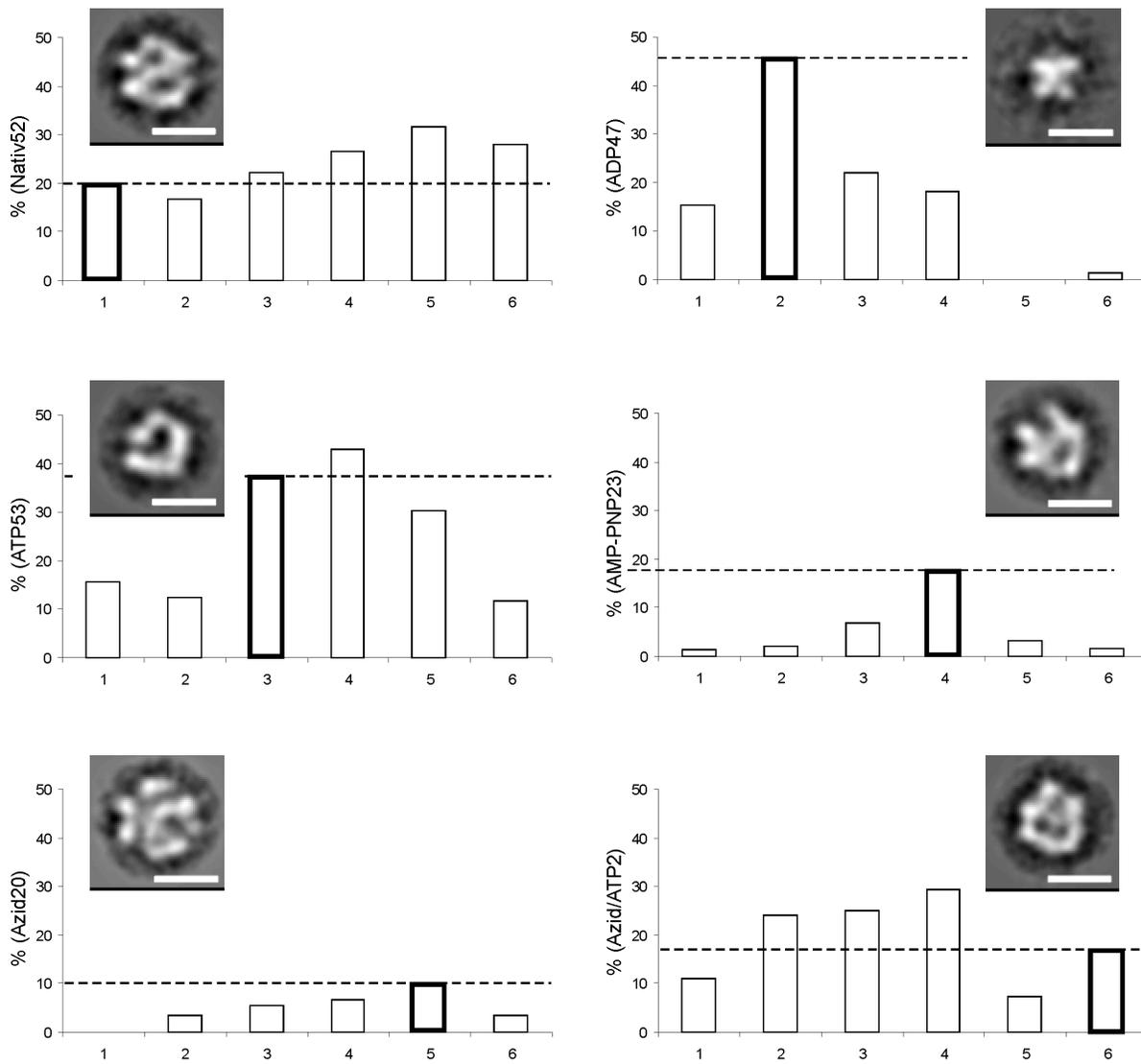


Abb. 50: Sinogrammkorrelation zwischen ausgesuchten Klassenmittlungen und allen anderen Klassenmittlungen. Die Abszisse gibt den Datensatz wieder: (1) nativ, (2) + ADP, (3) + ATP, (4) + AMP-PNP, (5) + Azid und (6) + Azid/ATP. Die Ordinate gibt den prozentualen Anteil an Partikeln pro Datensatz wieder, die einen Sinogramm-Korrelationskoeffizienten besitzen, der höher als ein bestimmter Grenzwert ist, der für alle Datensätze gleich war. Beispielsweise können ca. 45 % aller Partikelprojektionen aus dem ADP Datensatz von einem Objekt stammen, das die Projektion ADP47 besitzt, während nur ca. 2 % der Projektionen aus dem Azid/ATP Datensatz dieser Forderung genügen. Balken 10 nm.

Bei der objektiven Betrachtung der Datensätze durch Sinogrammkorrelation verändert sich das Gesamtbild etwas (Abb. 50). Auf dem ersten Blick scheinen nur noch die charakteristischen Projektionen für die Datensätze ADP•SecA, AMP-PNP•SecA und Azid•SecA richtig gewählt zu sein. Das Vorkommen von nativer Projektion in allen Datensätzen ist jedoch nicht überraschend. Auch ist die ähnliche Häufigkeit der ATP•SecA-Projektion (charakteristische Projektion) in ATP- und AMP-PNP-Datensätzen plausibel. Damit scheint nur noch die charakteristische Projektion für den Azid/ATP•SecA-Datensatz nicht richtig gewählt zu sein. Da für diesen Fall keine geeignetere Projektion gewählt werden konnte, wurde in der folgenden Analyse die bereits gewählte Klassenmittelung weiterhin benutzt.

Berechnung der 3D-Molekülmodelle mittels „angular reconstitution“:

Nach der Selektion einer „charakteristischen“ Projektion für den jeweiligen Datensatz wurden weitere signifikante Projektionen durch Sinogrammkorrelation aller 64 Klassen des Datensatzes mit der „charakteristischen“ Projektion ausgewählt. Für die drei-dimensionale Rekonstruktion durch „angular reconstitution“ wurden diesen Projektionen Eulerwinkel zugewiesen, durch die deren Lage im Raum vollständig bestimmt ist. Nach einer ersten drei-dimensionalen Rekonstruktion wurden die Klassensummen, deren Eulerwinkel zu unbestimmt sind, aussortiert. Mittels einer zweiten drei-dimensionalen Rekonstruktion wurden 40 Rückprojektionen berechnet, mit deren Hilfe den Klassenmittelungen neue Eulerwinkel zugewiesen wurden (das sog. „anchor set refining“ hat den Vorteil, daß bzgl. des drei-dimensionalen Objektes zentrierte Projektionen benutzt werden). Nach erneuten Aussortieren von Klassensummen, deren Eulerwinkel zu unbestimmt sind, wurde eine dritte (finale) drei-dimensionale Rekonstruktion berechnet.

In den Abb. 51 und 52 sind die Klassenmittelungen für alle Datensätze, die zu der jeweiligen drei-dimensionalen Rekonstruktion beigetragen haben, dargestellt.

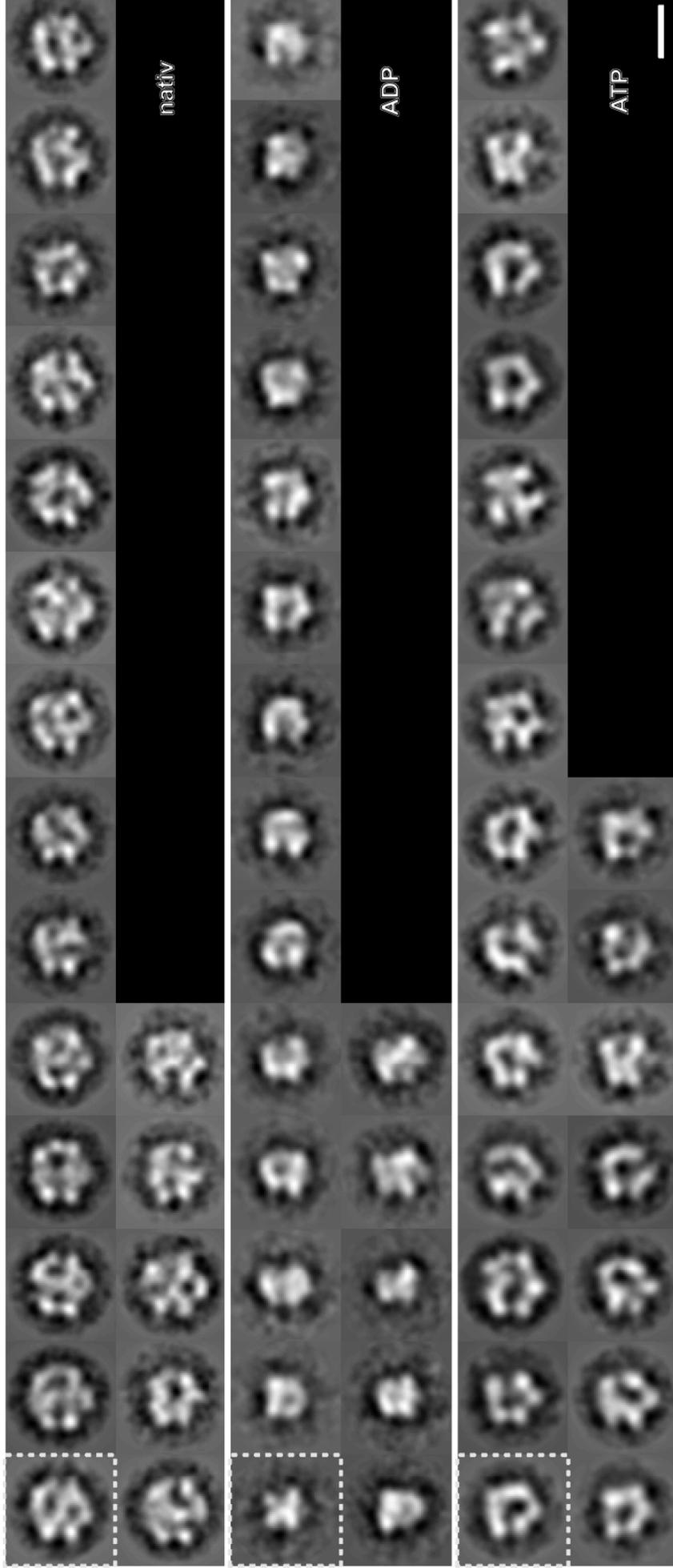


Abb. 51: Projektionen, die zur 3-dimensionalen Rekonstruktion von *E. coli* SecA beitragen (nativ, ADP, ATP). Balken 10 nm.

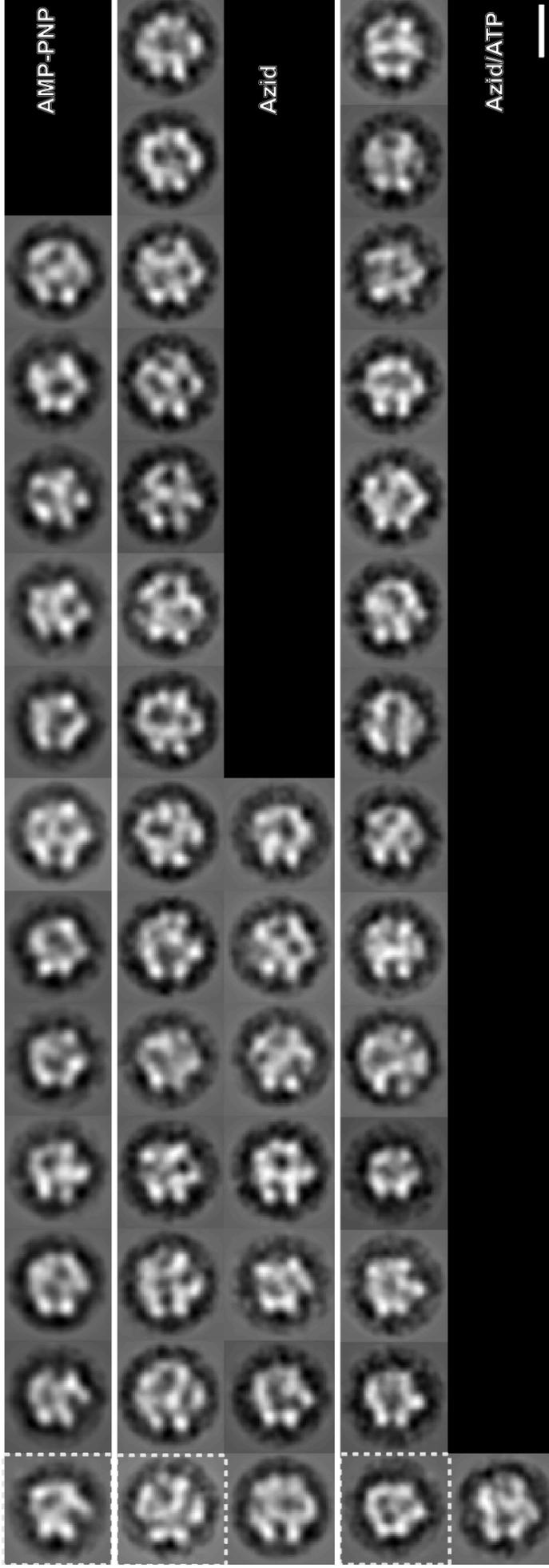


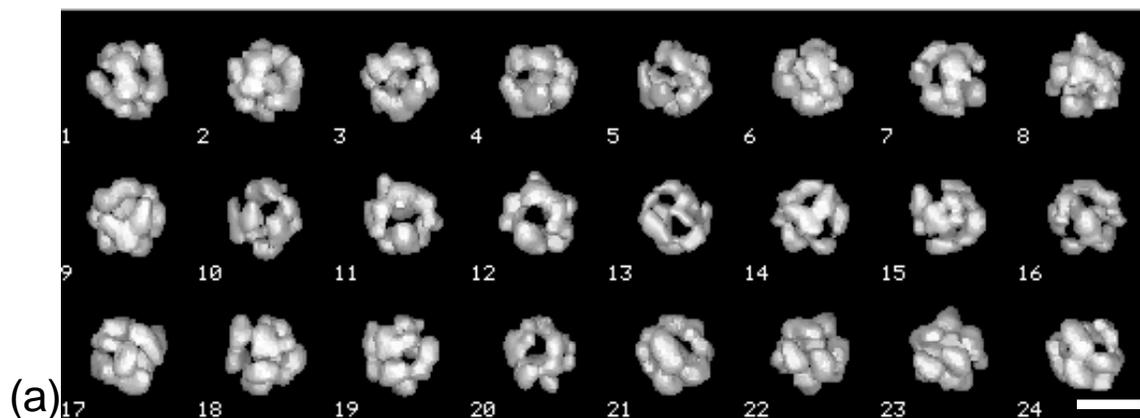
Abb. 52: Projektionen, die zur 3-dimensionalen Rekonstruktion von *E. coli* SecA beitragen (AMP-PNP, Azid, Azid/ATP). Balken 10 nm.

Die charakteristischen Klassensummen für verschiedene Datensätze zeigen mehr oder minder ausgeprägte Unterschiede. Auffällig und deutlich sichtbar ist die Konformationsänderung von *E. coli* SecA in Gegenwart von ADP: während das native SecA (Abb. 51 oben) in nahezu allen Projektionen eine offene Struktur mit vielen Einbuchtungen und stain-gefüllten Bereichen zeigt, erscheinen alle charakteristischen Klassensummen von ADP•SecA (Abb. 51 mitte) wesentlich geschlossener, kompakter und kleiner.

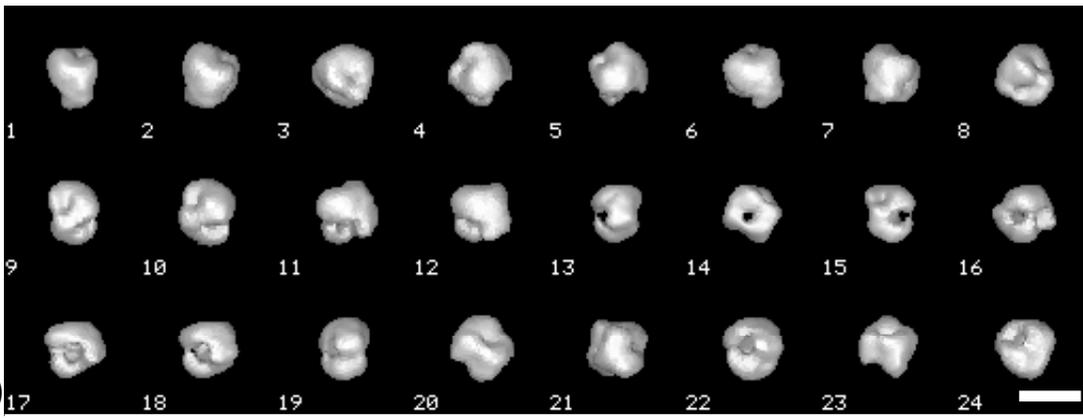
Die Klassensummen in Gegenwart von ATP (Abb. 51 unten) und AMP-PNP (Abb. 52 oben) sind sich relativ ähnlich. In beiden Fällen sind manche Molekülprojektionen durch einen wesentlich erweiterten stain-gefüllten Zwischenraum zwischen den beiden „Molekülhälften“ gekennzeichnet.

Nach Zugabe von Azid (Inhibitor der SecA ATPase Funktion) erhaltene Projektionsbilder (Abb. 52 mitte) zeigen mehr Ähnlichkeit zu den Molekülprojektionen aus dem nativen Datensatz, obwohl die Azid•SecA Partikel wesentlich größer sind (siehe Tabelle 2); auch variieren die Details innerhalb des Moleküls (Stainverteilung) wesentlich stärker.

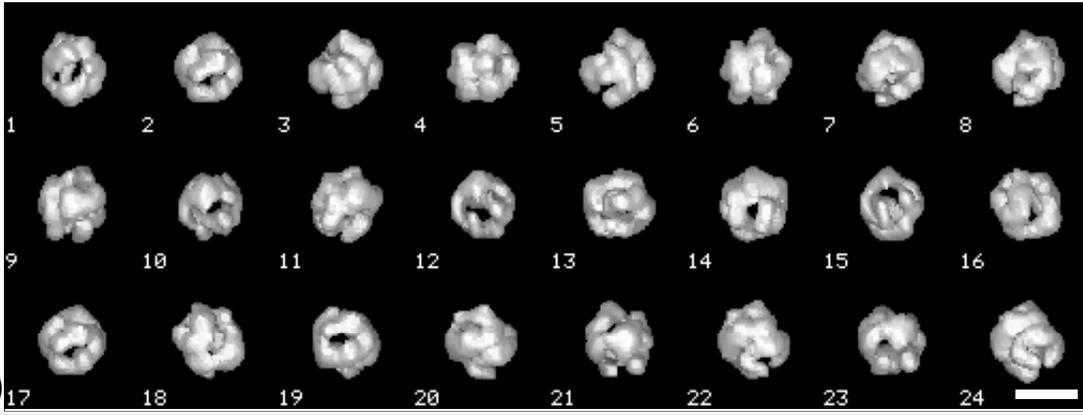
Abb. 53 zeigt verschiedene Ansichten der berechneten 3D-Modelle von *E. coli* SecA (nativ) und in Gegenwart von verschiedenen Liganden. Die Modelle geben die Tendenzen, die in den Projektionen erkennbar sind, weitgehend wieder.



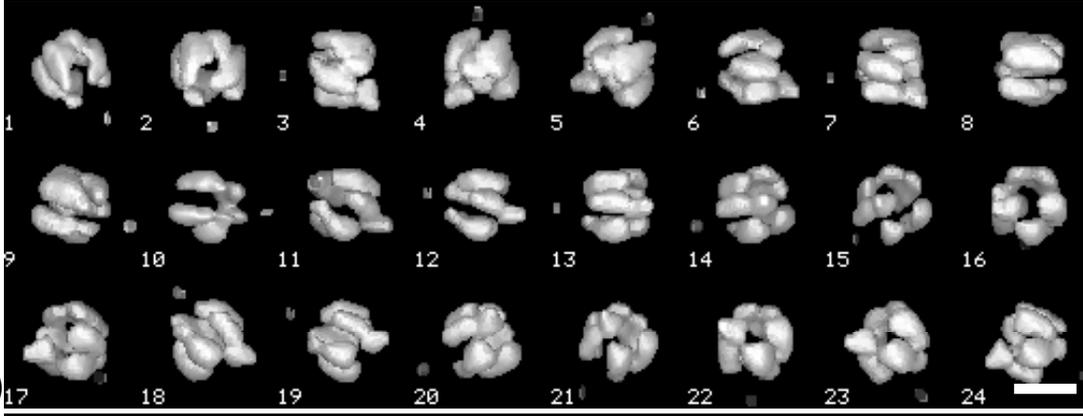
(b)



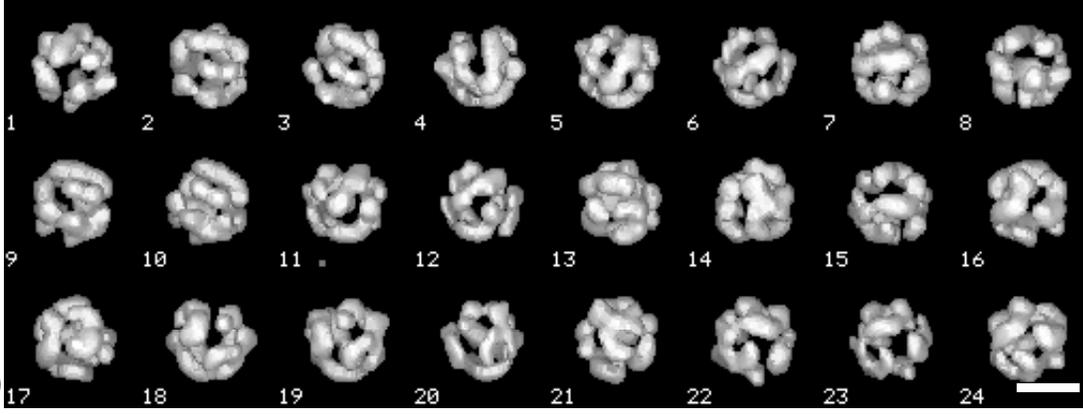
(c)



(d)



(e)



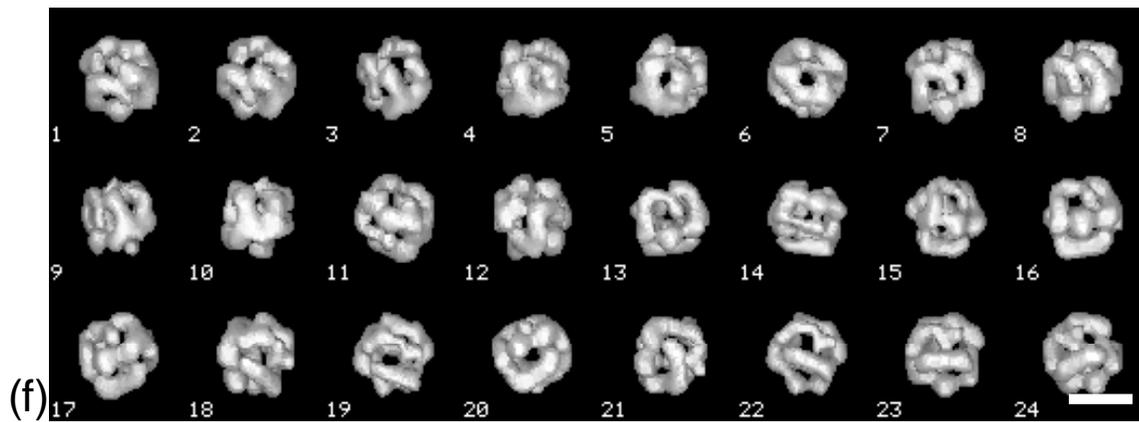


Abb. 53: Drei-dimensionale Rekonstruktion von *E. coli* SecA. (a) nativ, (b) ADP•SecA, (c) ATP•SecA, (d) AMP-PNP•SecA, (b) Azid•SecA, (b) Azid/ATP•SecA. Balken 10 nm.

Die räumliche Lage der Eulerwinkel der in die Rekonstruktion eingegangenen Projektionen wird durch Abb. 54 verdeutlicht (exemplarisch ist dies für *E. coli* SecA nativ dargestellt). Im Gegensatz zu einer statistischen Verteilung sind bei sämtlichen drei-dimensionalen Rekonstruktionen die Ansichten annähernd auf einer Kreisoberfläche um das Molekül verteilt (bei einer statistischen Verteilung wären sie gleichmäßig auf einer Kugeloberfläche verteilt). Ein analoges Verhalten zeigen die Eulerwinkel bei den anderen fünf *E. coli* SecA Rekonstruktionen.

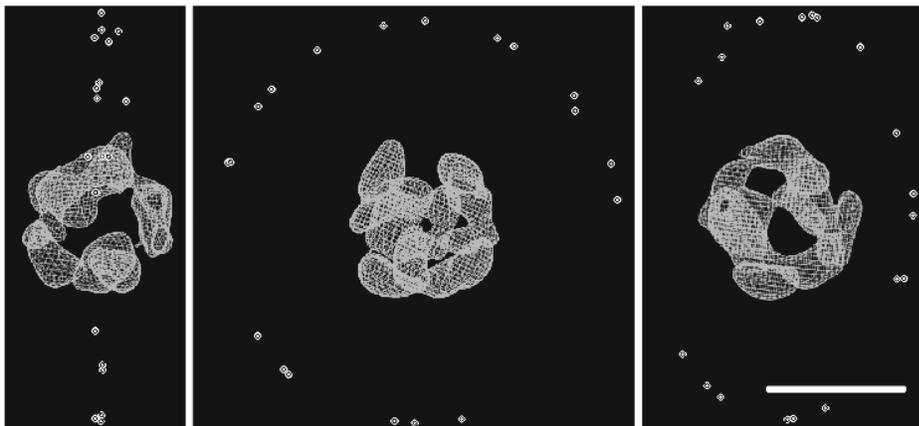


Abb. 54: Verteilung der Eulerwinkel der drei-dimensionalen Rekonstruktion von nativem *E. coli* SecA. Jeder Eulerwinkel wird durch einen Punkt repräsentiert, wobei die Lage der Punkte bezüglich der Rekonstruktion die Projektionsrichtungen widerspiegelt. Es ist deutlich zu sehen, daß die Ansichten annähernd auf einer Kreisoberfläche um das Molekül liegen. Balken 10 nm.

Für die Auflösung der drei-dimensionalen Rekonstruktion kann nach dem FSC Kriterium ein Wert von ca. 8 nm angegeben werden (Abb. 55).

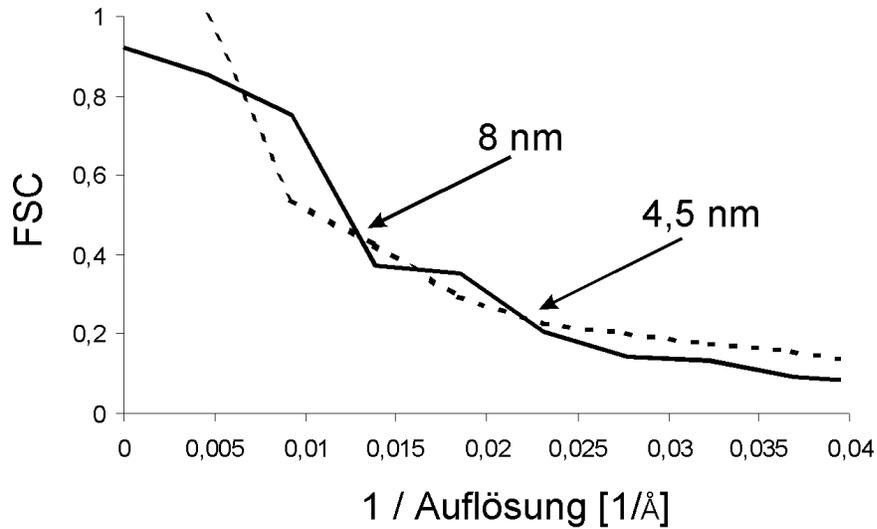
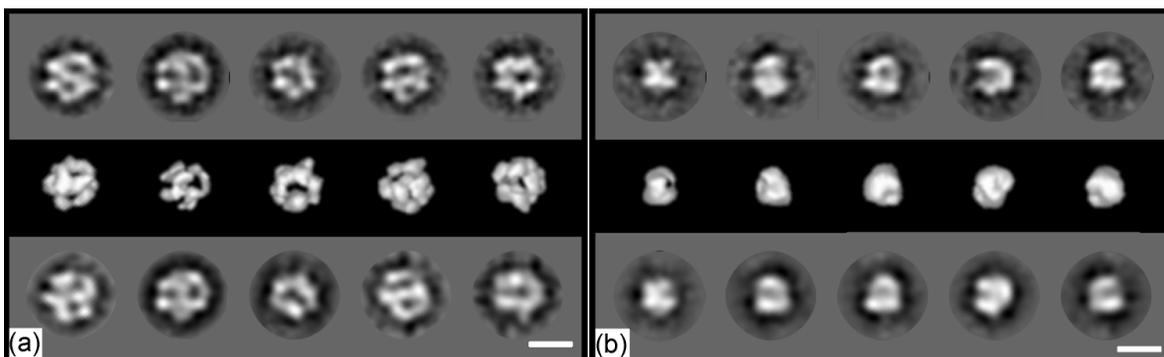


Abb. 55: Fourier shell correlation FSC der drei-dimensionalen Rekonstruktion von nativem *E. coli* SecA. Hierzu werden zwei unabhängige Rekonstruktionen im Fourier-raum verglichen (Grenzwert (gestrichelte Linie) 3σ mit $\sigma \propto 1/\sqrt{n}$, wobei n die Anzahl der Bildpunkte in der Fourierschale ist).

Abb. 56 zeigt jeweils für 5 repräsentative Klassen das 3D-Modell in der gleichen Orientierung und die entsprechenden Rückprojektionen. Die gute Übereinstimmung zeigt, daß die Klassenmittelungen im 3D-Modell - trotz der geringen Auflösung - gut wiedergegeben sind.



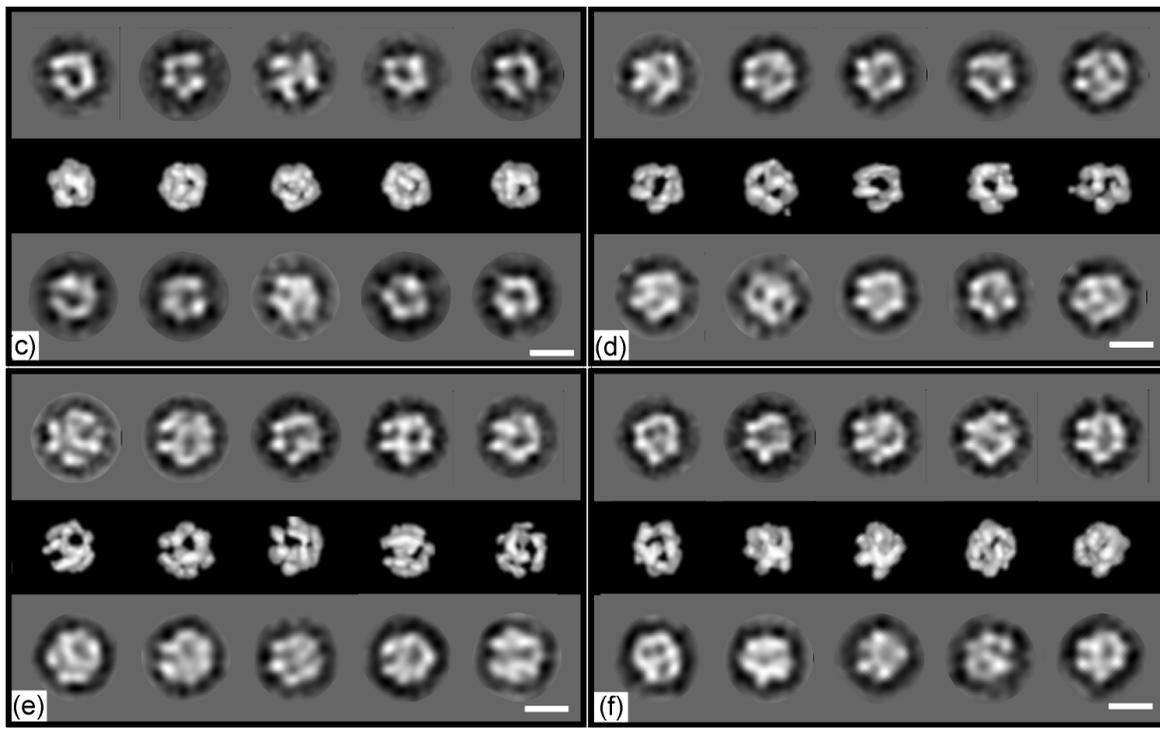


Abb. 56: 5 repräsentative Klassen, das 3D-Modell in der gleichen Orientierung und die entsprechenden Rückprojektionen von *E. coli* SecA. (a) nativ, (b) ADP•SecA, (c) ATP•SecA, (d) AMP-PNP•SecA, (e) Azid•SecA, (f) Azid/ATP•SecA. Balken 10 nm.

Als Alternative zu der Bildverarbeitungsprozedur, die bisher beschrieben wurde (Klassifizierung in 6 x 16, bzw. 6 x 64 Klassen mit anschließenden Ähnlichkeits- und Sinogrammtests) wurde für den nativen Datensatz von *E. coli* SecA eine iterative Methode angewandt, die sich von der „alignment by classification“-Methode von Dube et al., 1993 ableitet und, wie die Invariante Klassifizierung ohne eine (letztendlich subjektiv) gewählte Rotationsreferenz auskommt, ohne Informationsgehalt zu verlieren. Das Flußdiagramm zur alternativen Prozedur ist in Abb. 57 gezeigt, das Ergebnis in Abb. 58. Zur drei-dimensionalen Rekonstruktion vom nativen *E. coli* SecA wurde ebenfalls eine gegenüber der zuvor verwendeten veränderte Prozedur verwendet (Abb. 59). Das Ergebnis der modifizierten Rekonstruktionsmethode ist in Abb. 60 gezeigt.

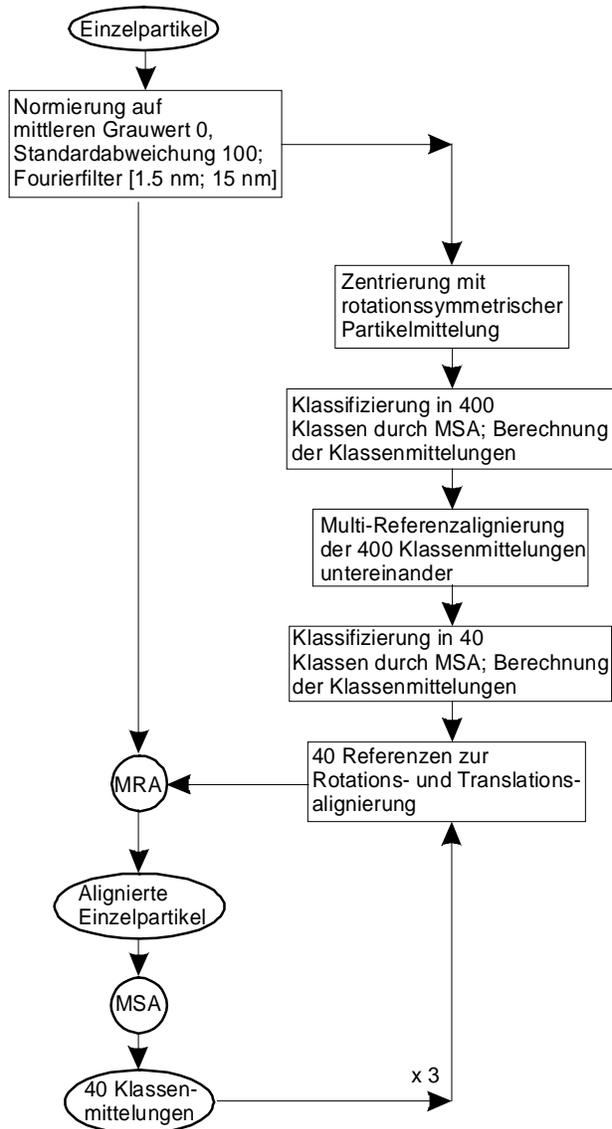


Abb. 57: Alternative Bildverarbeitungsprozedur zur Partikelmittlung.

Bei einem Vergleich der Klassenmittelungen aus Abb. 58 und Abb. 30 zeigen sich keine prinzipiellen Unterschiede bezüglich absoluter Größe, Heterogenität und Dichteverteilung. Insbesondere die Klassenmittlung #52 aus Abb. 30(b), die als charakteristische Projektion eines nativen *E.coli* SecA Moleküls gewählt wurde, lässt sich bei der alternativen Bildverarbeitungsprozedur wiederfinden; Klassenmittlung #24 aus Abb. 58 zeigt eine zu Klassenmittlung #52 aus Abb. 30(b) ähnliche Molekülprojektion.

Durch die alternative Prozedur wird somit die vorgestellte Einzelpartikelanalyse bis zur Klassifikation in 64 Klassen, insbesondere die Eigenwertanalyse zur Erzeugung einer Rotationsreferenz bestätigt.

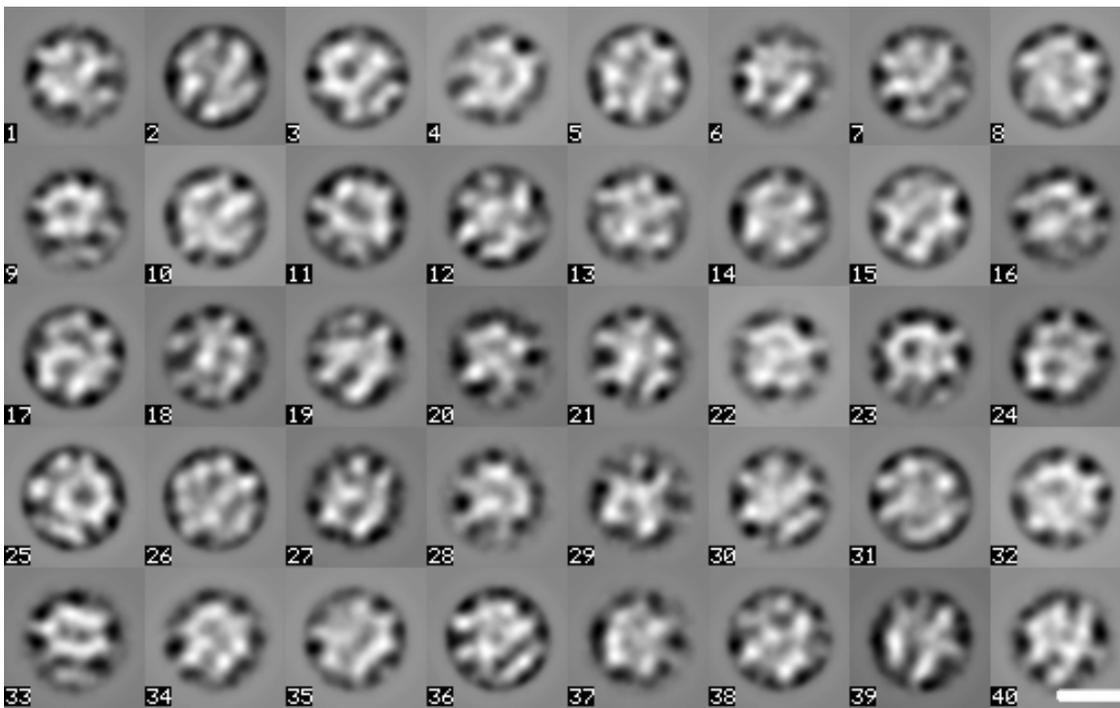


Abb. 58: 40 finale Klassenmittelungen aus der alternativen Bildverarbeitungsprozedur zur Partikelmittelung. Balken 10 nm.

Neben einigen Gemeinsamkeiten zur drei-dimensionalen Einzelpartikelanalyse (z. B. Auswahl mehrerer Klassensummen mittels Sinogrammkorrelation zu einer subjektiv gewählten Klassensumme (#24), anchor set refinement), wird bei der alternativen drei-dimensionalen Rekonstruktionsprozedur eine Multireferenz-Alignierung der (etwa 350) Rückprojektionen eines vorläufigen 3D-Modells auf den gesamten Datensatz angewandt; dadurch wird eine gute Alignierung der Molekülprojektionen gewährleistet.

Da das finale 3D-Modell der alternativen Prozedur (Abb. 60) mit Abb. 53 gut übereinstimmt, wird auch die gezeigte Form der angular reconstitution bestätigt.

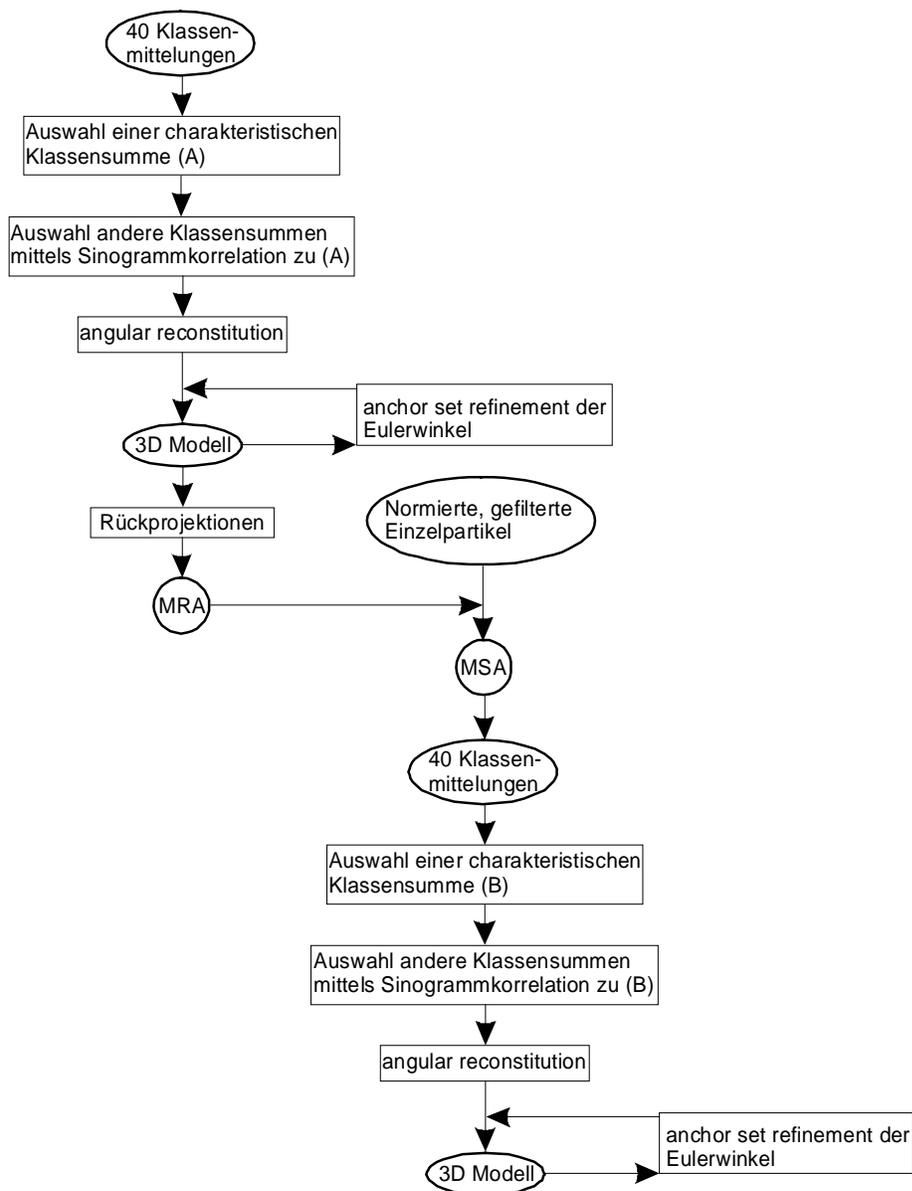


Abb. 59: Alternative Bildverarbeitungsprozedur zur drei-dimensionalen Rekonstruktion.

Neben einigen Gemeinsamkeiten zur drei-dimensionalen Einzelpartikelanalyse (z. B. Auswahl mehrerer Klassensummen mittels Sinogrammkorrelation zu einer subjektiv gewählten Klassensumme (#24), anchor set refinement), wird bei der alternativen drei-dimensionalen Rekonstruktionsprozedur eine Multireferenz-Alignierung der (etwa 350) Rückprojektionen eines vorläufigen 3D-Modells auf den gesamten Datensatz angewandt; dadurch wird eine gute Alignierung der Molekülprojektionen gewährleistet.

Da das finale 3D-Modell der alternativen Prozedur (Abb. 60) mit Abb. 53 gut übereinstimmt, wird auch die gezeigte Form der angular reconstitution bestätigt.

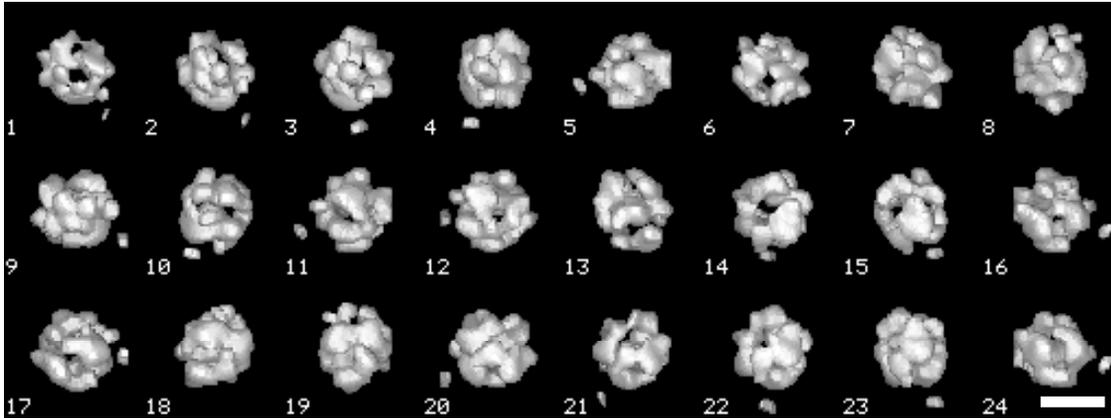


Abb. 60: Finale drei-dimensionale Rekonstruktion nach der alternativen Methode. Balken 10 nm.

2.2.3 SecA Protein aus *B. subtilis*

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung des löslichen SecA Proteins aus *B. subtilis* wurde in der gleichen Weise wie bei der Untersuchung des löslichen SecA Proteins aus *E. coli* vorgegangen. Das Protein wurde ohne Zusätze (nativ) und in Gegenwart von Nukleotiden (ADP, ATP) bzw. nicht hydrolysierbaren Nukleotid-analogen (AMP-PNP), aber auch in Gegenwart von Azid und Azid/ATP mit Uranylacetat negativ kontrastiert (Proteinkonzentration 15 µg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH = 7,6; Nukleotidkonzentration 2 mM, Azidkonzentration 20 mM). Alle Datensätze wurden der gleichen Bildverarbeitungsprozedur, die bei *E. coli* SecA ausführlich beschrieben wurde, unterzogen.

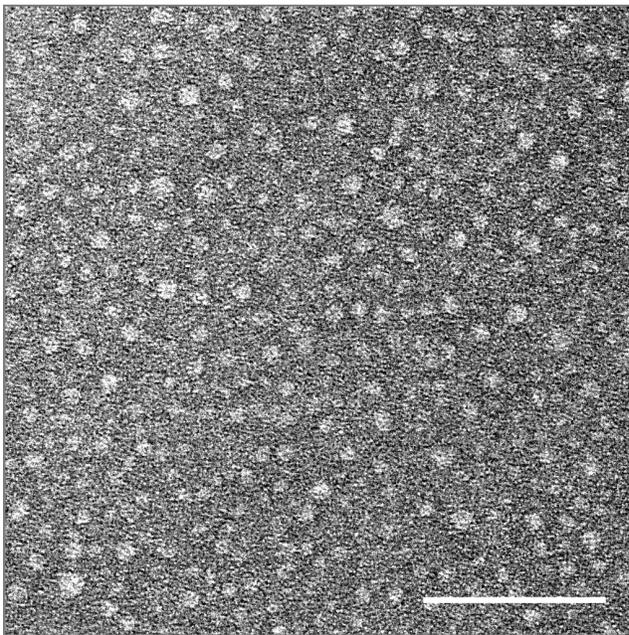


Abb. 61: SecA aus *B. subtilis* (nativ), negativ kontrastiert mit Uranylacetat. Balken 100 nm.

Auch das *B. subtilis* SecA zeigt in allen Datensätzen eine erhebliche Heterogenität der Partikel bezüglich der Größe und Form. Das Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung von allen *B. subtilis* Datensätzen ist in Abb. 62 dargestellt.

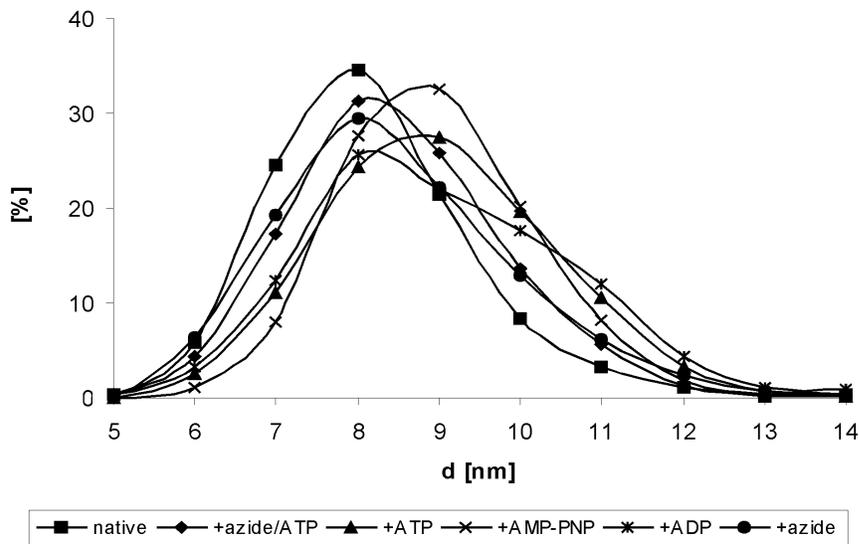
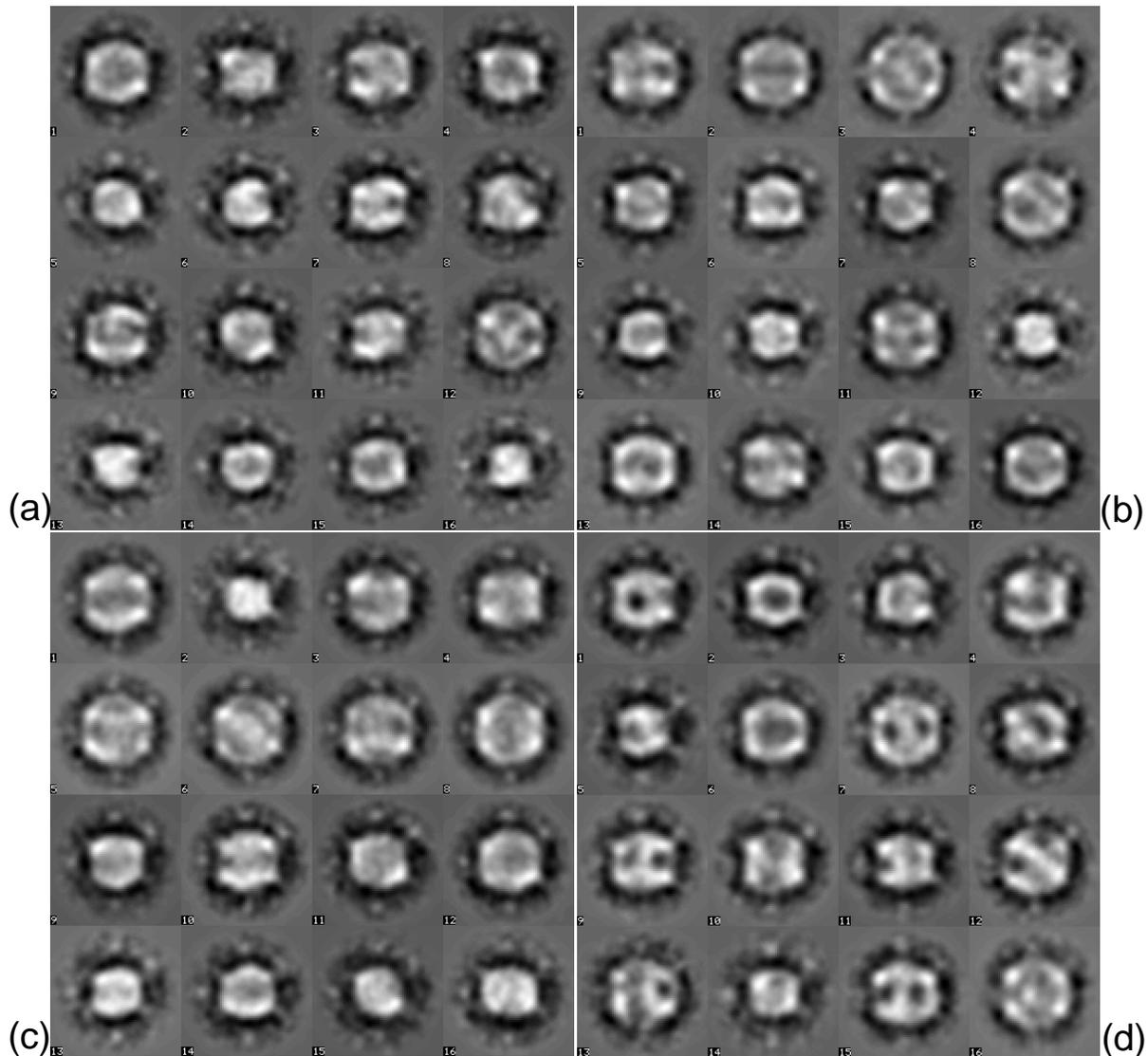


Abb. 62: Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung von sechs *B. subtilis* SecA Datensätzen. Die Abszisse gibt den Durchmesser der Kreisreferenzen wieder, die Ordinate den prozentualen Anteil der Partikel je Datensatz, die auf die jeweilige Referenz aligniert wurden.

Wie aus Abb. 62 ersichtlich, sind beim *B. subtilis* SecA die Größenverschiebungen in Anwesenheit verschiedener Liganden im Vergleich zu *E. coli* SecA weniger ausgeprägt; die Größenheterogenität verschiedener Datensätze ist mit *E. coli* SecA Datensätzen vergleichbar. Auffällig ist jedoch die Verschiebung der Partikelgröße zu höheren Werten in Gegenwart von ADP; diese Beobachtung steht im Kontrast zu den Beobachtungen mit dem *E. coli* Protein.

Die 16 Klassen für alle Datensätze sind in Abb. 63 dargestellt.



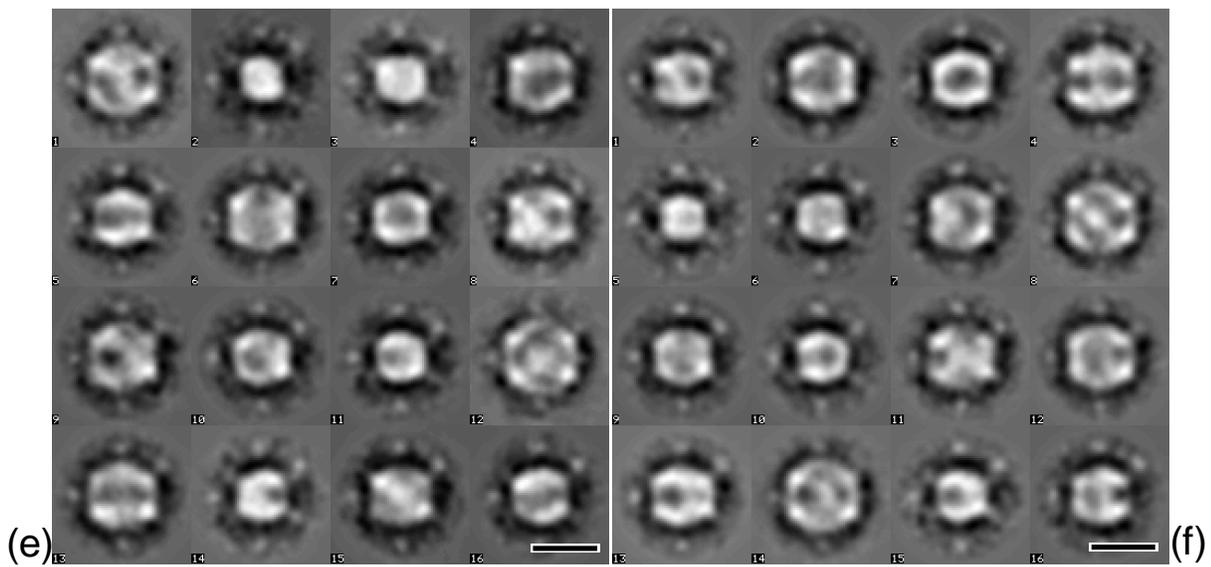


Abb. 63: Klassifizierung der SecA, *B. subtilis* Datensätze in 16 Klassen. In Klammern sind die Anzahl der ausgewerteten Partikel angegeben. (a) nativ (4250), (b) + ADP (3595), (c) +ATP (2807), (d) + AMP-PNP (3883), (e) + Azid (3214) und (f) + Azid/ATP (3230). Balken 10 nm.

Die SecA Proteine aus *B. subtilis* und *E. coli* zeigen ähnliche Projektionen. So zeigt z. B. das native *B. subtilis* Protein in einer Vielzahl von Projektionen stängelförmige Bereiche mit niedriger Proteindichte; im Vergleich zu *E. coli* Protein erscheint es jedoch etwas kompakter und geschlossener. In Abb. 64 sind jeweils drei Klassensummen aus nativen Datensätzen beider Proteine gegenüber gestellt.

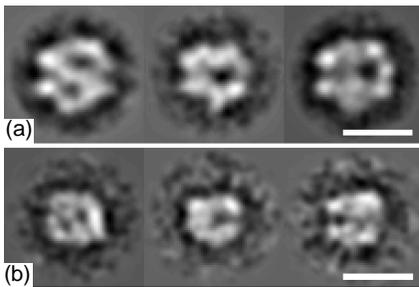


Abb. 64: Charakteristische Klassensummen der (nativen) SecA Proteine aus *E. coli* (a) und *B. subtilis* (b). Balken 10 nm.

In Tabelle 3 sind die Minima und Maxima der an Klassenmittlungen gemessenen Partikeldimensionen (Länge x Breite) und der prozentuale Anteil der Partikel in bestimmten Größenklassen angegeben.

	Minimum	Maximum	< 9,7 nm x 9,7 nm	9,7 nm x 9,7 nm ≤ ≤ 11,6 nm x 12,6 nm	> 11,6 nm x 12,6 nm
<i>B. subtilis</i>, SecA nativ	7,7 nm x 7,7 nm	11,6 nm x 12,6 nm	37 %	63 %	0 %
ADP•SecA	7,7 nm x 7,7 nm	12,6 nm x 12,6 nm	22 %	72 %	6 %
ATP•SecA	8,7 nm x 8,7 nm	12,6 nm x 12,6 nm	24 %	60 %	16 %
AMP-PNP•SecA	9,7 nm x 9,7 nm	12,6 nm x 12,6 nm	18%	78 %	4 %
Azid•SecA	7,7 nm x 7,7 nm	12,6 nm x 12,6 nm	32 %	56 %	12 %
Azid/ATP•SecA	7,7 nm x 7,7 nm	12,6 nm x 12,6 nm	24 %	70 %	6 %

Tabelle 3: Größenvergleich der *B. subtilis* SecA Datensätze.

Wie Tab. 3 zeigt, sind beim *B. subtilis* SecA die minimalen und maximalen Partikeldimensionen für alle Datensätze annähernd gleich; auch lassen sich bei den 6 Datensätzen Tendenzen in Verschiebungen von Partikeldimensionen in bestimmten Größenklassen nach Ligandenbindung nicht deutlich erkennen.

Alle sechs Datensätze ergeben ähnliche Klassenmittlungen, d. h. anhand der Klassenmittlungen lassen sich gegenüber *E. coli* SecA innerhalb der gegebenen Auflösung Unterschiede bei Nukleotidbindung schwerer bzw. gar nicht verifizieren. Daher wurden auch keine Untersuchungen bzgl. Ähnlichkeit zu einzelnen Klassensummen durchgeführt. Für die drei-dimensionale Rekonstruktion wurden die für einen Datensatz charakteristischen Projektionen vergleichsweise willkürlich gewählt; in diesem Fall waren die Anzahl der Projektionen, die zu einer Klasse beitragen und die Intra-Klassen Varianz einer Klassenmittelung die wichtigsten Auswahlkriterien.

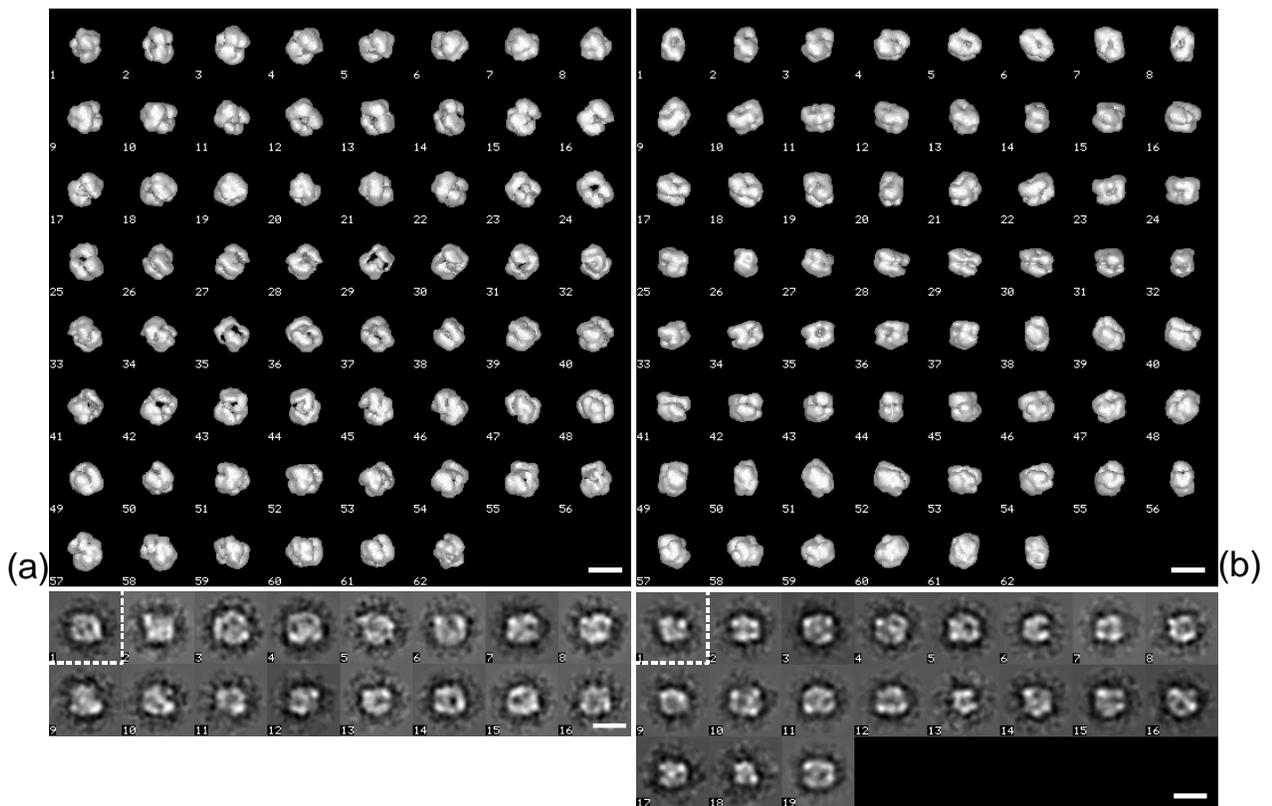


Abb. 65: Drei-dimensionale Rekonstruktion von *B. subtilis* SecA, (a) nativ, (b) + ADP. Darunter sind jeweils die Mittelungsbilder gezeigt, die für die Rekonstruktionen verwendet wurden. Links oben ist jeweils (in gestrichelten Rahmen) die Projektion gezeigt, die aus 64 Klassenmittlungen als charakteristisch ausgewählt wurde (Nativ59 und ADP40). Balken 10 nm.

2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Interpretierbarkeit der Ergebnisse:

Wie bereits angesprochen, erfordert die Interpretation von elektronenmikroskopischen Untersuchungen an biologischen Makromolekülen mittels Negativkontrastierung besondere Vorsicht. So können bei empfindlichen Objekten artefaktive Veränderungen auftreten, z. B. eine Abflachung bzw. Umlagerung bei der Adsorption auf dem festen Träger oder Abflachung bzw. Deformation während der Trocknung wegen Oberflächen- bzw. Grenzflächenspannungen. Hinzu kommen die Probleme während der Kontrastierung, wie z. B. unvollständige Kontrastierung und Positivkontrastierung. Während der Beobachtung kommen die strahlbedingte Zerstörung des Objektes oder Veränderung bzw. Kristallisation des Kontrastmittels im Strahl hinzu.

Neben all diesen Faktoren ist es auch besonders erschwerend, daß die SecA Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis* relativ klein (204 bzw. 192 kDa) und für elektronenmikroskopische Untersuchungen eher schwer zugänglich sind. Obwohl bei allen Schritten der Präparation und Beobachtung beider Proteine Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung bzw. Verringerung möglicher Objektveränderungen getroffen wurden, kann es bei einer realistischen Betrachtung nicht ausgeschlossen werden, daß manche der beobachteten Details Artefakte darstellen können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf der Multivariaten Statistischen Analyse (MSA) der negativ kontrastierten SecA Einzelpartikel. Bei dieser Methode werden ähnliche Projektionen auf einer EM-Aufnahme (oder mehreren Aufnahmen) zu Klassen zusammengefaßt; die Mittelung ähnlicher Projektionen zu Klassensummen reflektiert dann die gemeinsamen Eigenschaften aller Klassenmitglieder. Für eine Mittelung zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses ist jedoch eine vorhergehende Translations- und Rotationsalignierung aller Partikel notwendig. Wie im Abschnitt 2.2.4 besprochen, ist daher die Wahl der Referenz der kritische und entscheidende Schritt; so kann z. B. die subjektive Wahl der Referenz zu strukturell gut definierten Mittelungsbildern führen, auch wenn die analysierten Einzelpartikel diese Information nicht aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Rotationsalignierung aller Datensätze eine Referenz ohne Rotationssymmetrie herangezogen, die sich aus der Eigenwertanalyse des nativen Datensatzes ergab. Damit konnte u. a. gewährleistet werden, daß die Vorinformation, die mit der Referenz in die Analyse eingegangen war, bei allen Datensätzen gleich blieb und daß die Unterschiede in Klassensummen auf die Datensätze selbst zurückzuführen waren und nicht auf unterschiedliche Rotationsreferenzen.

Inwieweit die erhaltenen Klassensummen die Eigenschaften der gewählten Referenz reflektieren, wurde durch Anwendung alternativer Methoden auf den nativen Datensatz getestet. So wurde eine iterative „Multireferenz-Alignierung“ eingesetzt, bei der zunächst 3 x 40 Referenzen, in einem zweiten Schritt ca. 350 Rückprojektionen eines vorläufigen 3D-Modells zur Ausrichtung der Partikel verwendet wurden. Die erhaltenen Klassensummen ähneln in Bezug auf Größe, Heterogenität, Stain- und Dichteverteilung den Klassenmittlungen aus der herkömmlichen Prozedur. Im weiteren wurden alle Datensätze gemeinsam der „Invarianten Klassifizierung“ unterzogen, die auf „subjektiv“ gewählte Referenzen verzichtet und bei der die

Reihenfolge von Ausrichtung und Klassifizierung vertauscht wird; hier werden nach der Klassifizierung die (realen) Mitglieder einer Klasse bezüglich der (realen) Referenz aligniert, die möglichst dicht am Mittelpunkt der Projektionswolke der jeweiligen Klasse im MSA-Hyperraum liegt (vgl. Kap. 2.2.4). Die nach dieser Methode erhaltenen 96 Klassensummen ließen sich in den Klassenmittlungen verschiedener Datensätze aus der herkömmlichen Methode wiederfinden.

Die Konstanz der Ergebnisse nach Anwendung verschiedener Kriterien bei der Referenzwahl und verschiedenen Vorgehensweisen bestätigt, daß durch die Bildverarbeitung weitgehend keine Motive induziert werden, die nicht ohnehin in den Datensätzen zu finden sind. Angesichts der dabei erreichten Auflösung der Mittelungsbilder von etwa 2,5 nm (nach dem konservativen S-Bild Kriterium) und auch wegen den oben angeschnittenen Problemen bei der Probenpräparation und -beobachtung scheint es jedoch gerechtfertigt, im folgenden nur die Tendenzen, die sich aus der gesamten Analyse ergeben, zu diskutieren und auf eine „spekulative“ Interpretation mancher struktureller Details zu verzichten.

Morphologie des löslichen SecA Proteins aus E. coli:

Im Negativ Stain zeigt SecA die Charakteristika einer offenen, lockeren Struktur, die vom Kontrastierungsmittel leicht durchdrungen wird; so haben die meisten Klassenmittlungen viele staingefüllte Bereiche niedriger Proteindichte. Wie die 3D-Rekonstruktion zeigt, weicht das Molekül mit den Dimensionen von ca. 11 nm x 12 nm leicht von symmetrischer Gestalt ab.

Die Stabilität und Solvent-Zugänglichkeit des SecA Proteins aus *E. coli* wurde mittels Circular Dichroismus (CD) und Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht (Jong & Kim, 1997). Aus dieser Studie wurde geschlossen, daß SecA eine offene, teilweise lockere Tertiärstruktur mit unterschiedlich stabilen Domänen hat, und sogar partiell die Eigenschaften eines ungefalteten Proteins zeigt, was für Proteine mit Membraninsertionseigenschaften häufig ist. Die elektronenmikroskopischen Beobachtungen stehen mit dieser Studie in Übereinstimmung.

Shilten et al. (1998) schloß aus Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimenten (SAXS) an löslichem SecA auf ein stark elongiertes Molekül mit 15 nm Länge und 8 nm Breite. Abb. 66 zeigt das Modell aus dieser Studie.

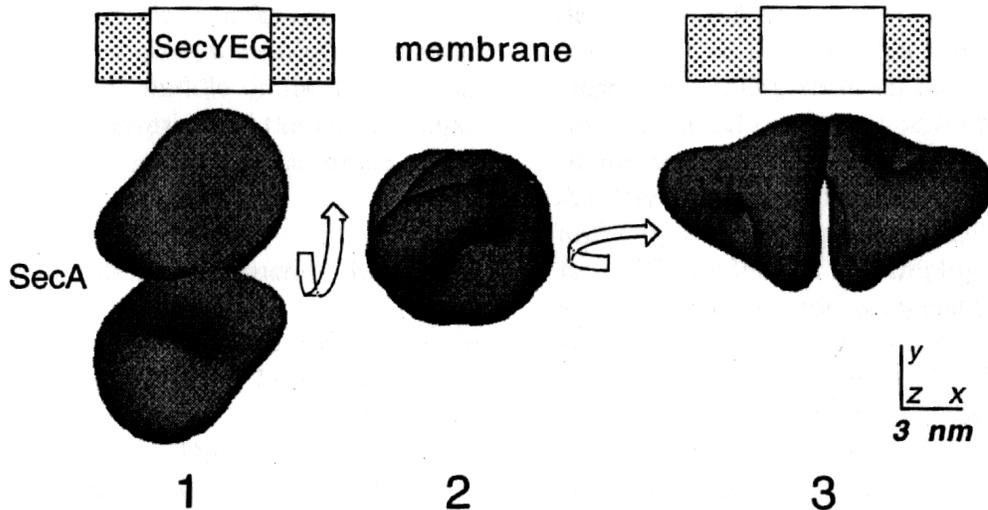


Abb. 66: Modell des löslichen SecA Proteins aus Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimenten (aus Shilton et al., 1998). (1) Blickrichtung senkrecht zur zwei-zähligen Achse; (2) nach Rotation von (1) um x-Achse um 90°; nach Rotation von (2) um y-Achse um 90°. Die Orientierung des SecA bezüglich der Membranebene und SecYEG ist hypothetisch.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte elektronenmikroskopische Analyse widerlegt deutlich das obige Modell. Die Diskrepanz zwischen EM und SAXS könnte vielerlei Gründe haben: die SAXS-Untersuchungen wurden bei sehr hohen Proteinkonzentrationen (5 mg/ml - 15 mg/ml) und in Gegenwart von 5 mM MgCl₂ durchgeführt. Negativ Stain Experimente unter analogen Bedingungen zeigten deutlich das Vorhandensein von (teilweise linearen) Aggregaten, die die Interpretation der Streudaten aus SAXS, aber auch aus anderen integrierenden Verfahren verfälschen können.

Konformationsänderungen von löslichem SecA in Gegenwart von Nukleotiden:

Die Domäneninteraktionen von SecA und seine nukleotid-induzierten Konformationsänderungen wurden mittels biophysikalischer Methoden (Fluoreszenzspektroskopie, Dynamische Lichtstreuung, Differential Scanning Calorimetry (DSC)) untersucht (den Blaauwen et al., 1996). Nach dieser Studie zeigt das lösliche SecA in Gegenwart von verschiedenen Nukleotiden detektierbare Änderungen in seiner Form und/oder Domänenflexibilität. So liegt das Protein in Ggw. von ADP (beide Nukleotidbindungsstellen besetzt) aufgrund einer verstärkten Domänenwechselwirkung in einer

kompakten Konformation vor, das der membran-de-insertierten Form entspricht. In Gegenwart von ATP oder AMP-PNP wird eine offene, eventuell elongierte Form des Moleküls postuliert, die mehr der membran-insertierten Konformation entspricht. Die SAXS-Experimente (Shilton et al., 1998) stehen jedoch im Widerspruch zu den obigen spektroskopischen und thermodynamischen Messungen: hier konnten die Konformationsänderungen des löslichen SecA in Ggw. von Nukleotiden nicht beobachtet werden.

Im Negativ Stain zeigt das lösliche SecA ohne Nukleotidzusätze Projektionen mit unterschiedlichen Dimensionen: etwa 83 % der Partikel im „nativen Datensatz“ haben Dimensionen größer als 10,5 nm x 10,5 nm (Maximum: 12,5 nm x 12,5 nm), während 17 % der Partikel kleinere Abmessungen haben (Minimum: 8,7 nm x 8,7 nm) (Abb. 32). Die kleinen Projektionen erscheinen kompakt und zeigen keine bzw. wesentlich weniger ausgeprägte stain-gefüllte Bereiche niedriger Proteindichte (Abb. 30). Nach Zugabe von ADP erhöht sich der Anteil der kleinen Partikel auf ca. 40 %; die kompakten Partikel werden dominanter. Diese Beobachtung unterstützt die spektroskopischen Befunde: das lösliche SecA scheint in Ggw. von ADP in einer kompakteren Konformation zu existieren, was auch in der 3D-Rekonstruktion zum Vorschein kommt.

Es wird vermutet, daß ein Großteil des cytosolischen SecA in der ADP-gebundenen, kompakten Konformation vorliegt. Im nativen Datensatz sind die kompakten Partikel jedoch nur zu 17 % vertreten. Dieser geringe Anteil kann eventuell darauf zurückgeführt werden, daß während der Reinigungsprozedur nukleotid-freie Puffer benutzt werden, was zu der Dissoziation des gebundenen ADP führen kann. Die 3D-Rekonstruktion zeigt bei nativem SecA (vermutlich nukleotid-frei) ein Molekül mit ca. 11 nm Durchmesser, für ADP•SecA ein Molekül mit ca. 9 nm Durchmesser. Neben dem Größenunterschied (18 % kleinerer Durchmesser bzw. 45 % geringeres Volumen, ausgehend von einem kugelförmigen Molekül) zeigt die 3D-Rekonstruktion von nativem SecA gegenüber ADP•SecA staingefüllte Bereiche, d. h. natives SecA kann gegenüber ADP•SecA leichter von Stain durchdrungen werden. Die 3D-Rekonstruktion von ADP•SecA ist deutlich kompakter und die „beiden Molekülhälften“ liegen enger zusammen.

Die ATP•SecA und AMP-PNP•SecA Datensätze zeichnen sich durch das Vorhandensein von Partikeln mit Dimensionen größer als 12,5 nm x 12,5 nm aus, die im nativen und ADP Datensatz nicht vorkommen (Tab. 1). Die charakteristischen

Klassensummen beider Datensätze sind sich jedoch relativ ähnlich (Abb. 51, 52). Charakteristisch ist in beiden Fällen der, v. a. im Vergleich zum ADP•SecA erweiterte, stain-gefüllte Zwischenraum zwischen den „beiden Molekülhälften“; dieser Effekt ist beim AMP-PNP•SecA gegenüber „nativem SecA“ und ATP•SecA ausgeprägter. Die größeren Dimensionen der Klassenmittelungen, aber auch die 3D-Rekonstruktionen deuten - v. a. in Ggw. von AMP-PNP - auf eine offenere Konformation des löslichen SecA Moleküls hin.

Aufgrund spektroskopischer und thermodynamischer Untersuchungen (den Blaauwen et al., 1996) wird vermutet, daß die Bindung von ATP die Domänen von SecA, die in der Membraninsertion involviert sind, freilegt und somit die Präsentation des gebundenen Preproteins ermöglicht. Die elektronenmikroskopisch beobachtete offene Struktur des SecA steht damit in Einklang.

AMP-PNP Bindung an SecA resultiert nach spektroskopischen Messungen nicht in einer merklichen Änderung der Domänenwechselwirkung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese rel. „schwache“ Assoziation dazu führt, daß das SecA während der elektronenmikroskopischen Präparation anfälliger für artefaktive Veränderungen wie z. B. Abflachung wird.

Die ATP•SecA und AMP-PNP•SecA Datensätze enthalten kompakte Partikel - ähnlich wie im nativen Datensatz - zu 19 % bzw. 23 %, die vermutlich den ADP•SecA Partikeln entsprechen. Die geringe Häufigkeit im ATP Datensatz ist zunächst überraschend: nach der Hydrolyse des gebundenen ATP sollte ein Großteil der Population in einer Konformation vorliegen, die dem ADP gebundenen SecA entspricht. Während der Negativkontrastierung von SecA in Gegenwart von Nukleotiden wurde auf die Zugabe von Mg-Salzen verzichtet, da dies zur teilweisen Aggregation des Proteins führte. Außerdem wurden die Experimente bei 4° durchgeführt und die Inkubationszeit von SecA mit ATP betrug nur 10 Minuten. Unter diesen experimentellen Bedingungen ist zu erwarten, daß die Hydrolyse des gebundenen ATP mit einer vernachlässigbaren Geschwindigkeit abläuft, was die geringe Häufigkeit der ADP•SecA Partikel im ATP-Datensatz erklärt.

Morphologie des löslichen SecA Proteins aus *B. subtilis*:

Im Negativ Stain zeigt das lösliche *B. subtilis* SecA in einer Vielzahl von Projektionen stängelfüllte Bereiche mit niedriger Proteindichte; dies ist jedoch nicht so ausgeprägt wie beim *E. coli* SecA. Auch erscheint das *B. subtilis* Protein (Dimension: 10,8 nm x 9,7 nm) (Abb. 67(a)) - im Vergleich zu *E. coli* SecA (Dimension: 13,0 nm x 11,5 nm) (Abb. 67(b)) - kompakter, geschlossener und etwas kleiner. Zum Vergleich wurden in Abb. 67 die Ergebnisse der Multireferenz-Translationsalignierung für 3 verschiedene SecA-Datensätze (*B. subtilis* SecA / *E. coli* SecA / *E. coli* ADP•SecA) gegenüber gestellt. Der Vergleich der Rekonstruktionen zeigt außerdem deutlich, daß die beiden (nativen) SecA Proteine ähnliche Tertiärstrukturen (Morphologien) zeigen (Abb. 67), was aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu erwarten ist.

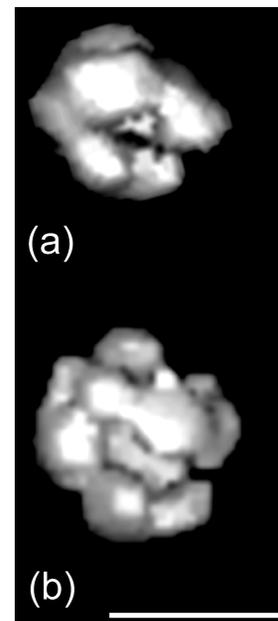
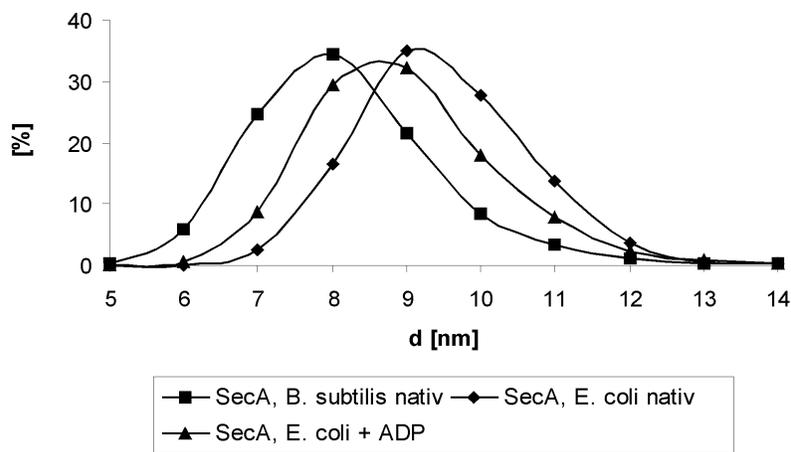


Abb. 67: Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung von drei SecA Datensätzen. Die Abszisse gibt den Durchmesser der Kreisreferenzen wieder, die Ordinate den prozentualen Anteil der Partikel je Datensatz, die auf die jeweilige Referenz aligniert wurden. Es zeigt sich für SecA aus *E. coli* bei ADP Bindung eine Verschiebung zu kleineren Projektionen. Gegenüber nativem SecA aus *E. coli* ist natives SecA aus *B. subtilis* kompakter und kleiner; ähnliche Ansichten des Modells für natives SecA aus *B. subtilis* (a) und SecA aus *E. coli* (b) sind dargestellt. Balken 10 nm.

Wie bereits erwähnt, wurde die Struktur des SecA Proteins aus *B. subtilis* kürzlich bei einer Auflösung von 2,7 Å gelöst (Hunt et al., 2000), so daß das EM-Modell mit dem Röntgenstrukturmodell verglichen werden konnte. Wie Abb. 68 zeigt, steht das EM-

Modell in einigen (bzgl. der erreichten Auflösung interpretierbaren) Details mit dem Röntgenstrukturmodell in überraschend guten Einklang: die Modelle zeigen ähnliche Umrisse und Längen-Breiten-Verhältnisse (1,10 : 1 bzw. 1,11 : 1), jeweils einen Kanal geringerer Proteindichte entlang der Längsachse und eine ähnliche Anzahl an Massezentren (5 bzw. 4).

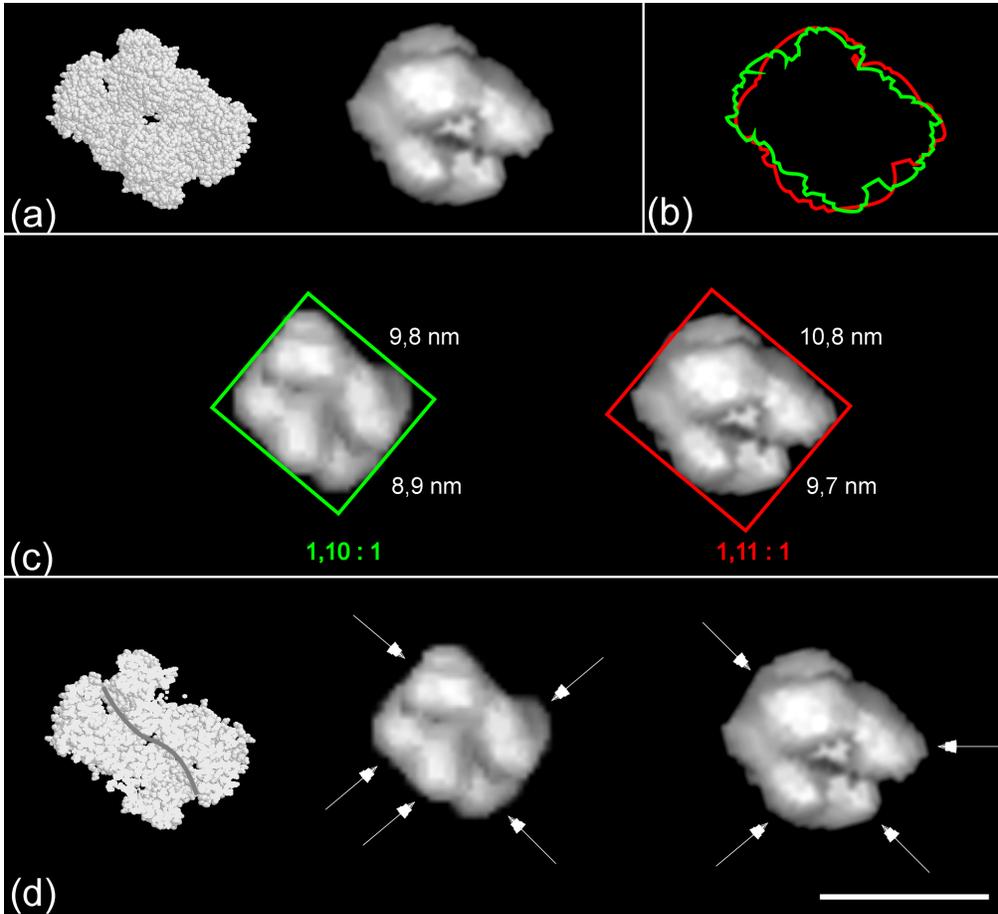


Abb. 68: Vergleich des Röntgenstrukturmodells von nativem SecA aus *B. subtilis* mit dessen drei-dimensionalem EM-Modell mittels Negativkontrastierung und angular reconstitution. (a) Darstellungen des Röntgenstrukturmodells (links) und des EM-Modells (rechts), (b) Umrisse der beiden Modelle (grün: Röntgenstrukturmodell; rot: EM-Modell), (c) Längen-Breiten-Verhältnis des Röntgenstruktur- (links) bzw. EM-Modells (rechts), (d) durch den zentralen Schnitt des Röntgenstrukturmodells in raumfüllender Darstellung (links) bzw. fouriergefilterten Röntgenstrukturmodells (mitte) zeigt sich wie im EM-Modell (rechts) ein Kanal; beim fouriergefilterten Röntgenstrukturmodell (mitte) zeigen sich 5 Massezentren, beim EM-Modell (rechts) 4 Massezentren (Pfeile).

Die Fourierfilterung der 2,7 Å Röntgenstruktur auf etwa 2 nm wurde mit der SPIDER (Frank et al., 1996) Software durchgeführt, wobei in der Röntgenstruktur die Aminosäuren 1-799 gezeigt sind. Balken 10 nm.

Kapitel 3 Versuche zur zwei-dimensionalen Kristallisation von SecA Proteinen an Phasengrenzflächen

3.1 Kristallisation von löslichen Proteinen an Lipid-Monoschichten

Zwei-dimensionale Kristallisation löslicher Proteine an Lipid-Monoschichten an der Luft-Wasser Grenzfläche und anschließende Elektronenkristallographie ist eine etablierte Methode zur Strukturaufklärung (Brisson et al., 1999; Frey et al., 1998; Jap et al., 1992; Vénien-Bryan et al., 1997; Zhuang et al., 1999). Die Methode basiert auf der Anreicherung des zu kristallisierenden Proteins an der Lipid-Monoschicht durch spezifische (hochaffine Bindung an „funktionalisierte“ Lipid-Schichten) oder unspezifische (elektrostatische) Wechselwirkungen und der Ausrichtung des Moleküls in einer spezifischen Orientierung. Wird durch die geeignete Wahl der Parameter wie z. B. Kettenlänge des Lipids, Temperatur und Filmdruck eine ausreichende Mobilität der Lipid-Moleküle in der Monoschicht gewährleistet, so können sich Proteinmoleküle lateral umorganisieren und einen zwei-dimensionalen Kristall bilden.

Für die elektronenkristallographische Untersuchung werden die 2D-Proteinkristalle von der Wasser-Luft-Grenzfläche auf elektronenmikroskopische Träger (z. B. kohlebeschichtete Netzchen) übertragen, wobei eine intakte Übertragung des jeweiligen Lipid-Protein- bzw. Protein-Films eine entscheidende Rolle spielt. Strukturuntersuchungen (Brisson et al., 1999) zeigen, daß die Güte des Transfers von mehreren Faktoren abhängt (z. B. Art des Proteins, Bedeckung des EM-Netzchens mit kontinuierlicher Kohlefolie bzw. Lochfolie). Darüber hinaus sollte die Kohlefolie auf dem EM-Netzchen hydrophobisiert werden, da die hydrophoben Seitenketten des Lipids mit der Kohlefolie attraktiv wechselwirken sollen. Das Prinzip der Methode ist in Abb. 69 schematisch dargestellt.

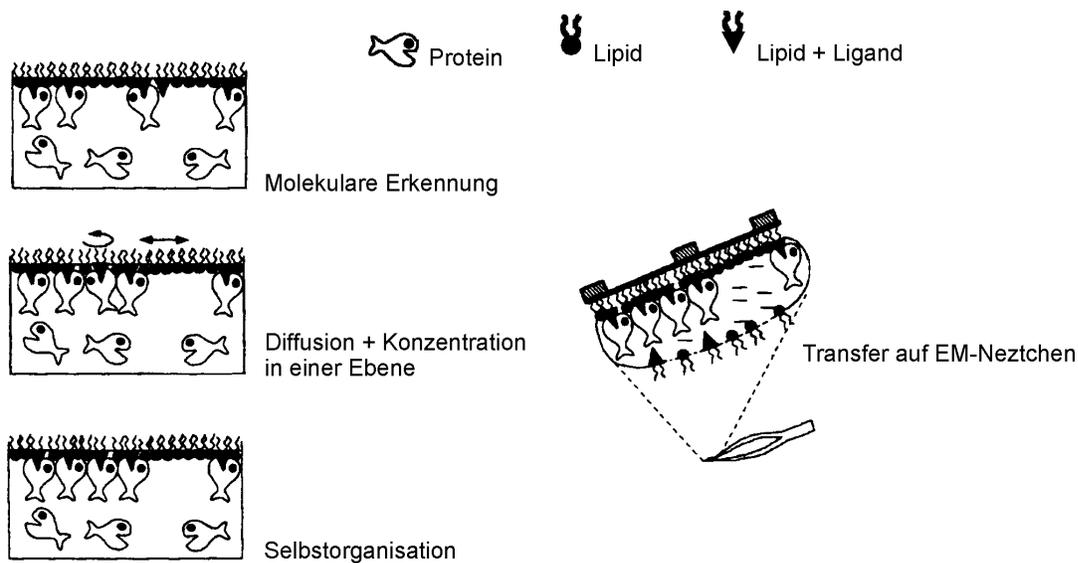


Abb. 69: Schema zur zwei-dimensionalen Kristallisation von löslichen Proteinen (🐟) an einer Lipid-Monoschicht an der Luft-Wasser Grenzfläche (nach Brisson et al., 1999). Im Allgemeinen besteht die aufgebraachte Lipid-Monoschicht aus dem Lipid selbst (🔴), teils aber auch aus Liganden, die an das Lipid binden (🔴➡️). Proteine in der Subphase binden an die Monoschicht und bilden Protein-Lipid Komplexe (Molekulare Erkennung). Protein-Lipid Komplexe diffundieren und konzentrieren sich in Ebene der Monoschicht (Diffusion und Konzentration in einer Ebene). Die Komplexe wechselwirken und ordnen sich zu zwei-dimensionalen Kristallen (Selbstorganisation). Der zwei-dimensionale Protein-Lipid Film wird auf ein elektronenmikroskopisches(EM)-Netzchen transferiert, welches mit Kohle beschichtet ist (Transfer auf EM-Netzchen).

Ein neuerer Ansatz zur Immobilisierung/Orientierung bzw. Kristallisation von Proteinen an funktionalisierten Lipid-Monoschichten nutzt die hohe Affinität von Histidinen gegenüber Metallchelate-Komplexen (Dietrich et al., 1995; Dietrich et al., 1996; Schmitt et al., 1995). Bei dieser Methode werden funktionalisierte Chelatlipide verwendet, die die hydrophile Chelatkopfgruppe N-Nitrilotriessigsäure (NTA) tragen, die über einen flexiblen Spacer an die hydrophobe Lipidkette gekoppelt ist (Abb. 70(a)). Nach Komplexbildung in Gegenwart von Metallionen (Ni^{2+} , Cu^{2+}) kann die Lipidkopfgruppe spezifisch mit histidinreichen Proteinsequenzen wechselwirken (Abb. 70(b)). Der Vorgang ist reversibel, da die Metallionen z. B. durch EDTA oder Imidazol entfernt werden können.

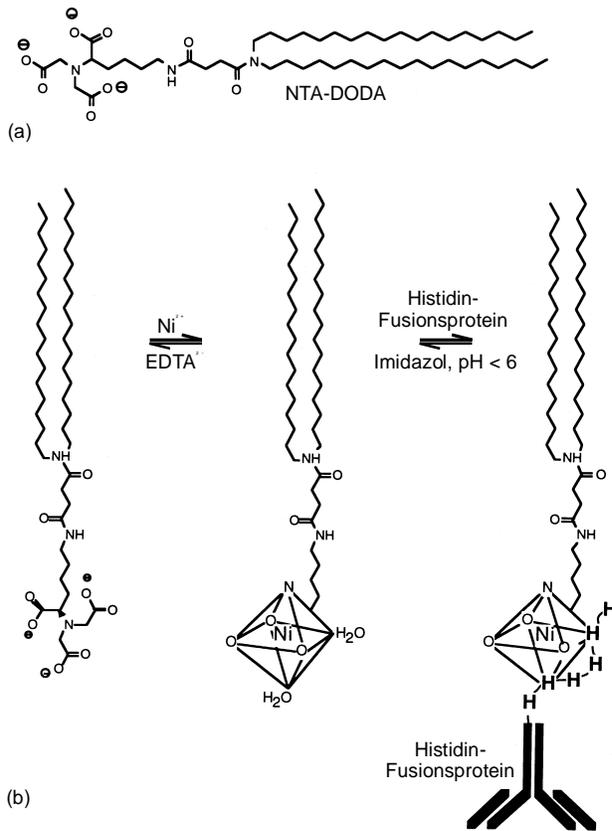
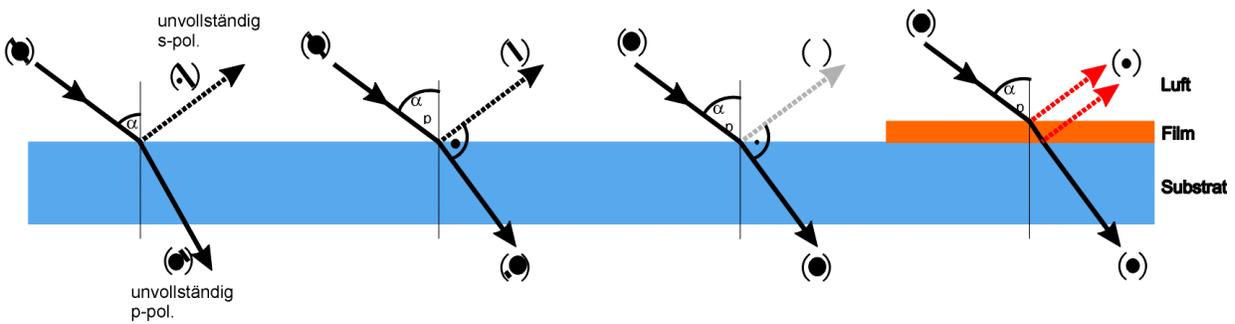


Abb. 70: (a) Chelatorlipid NTA-DODA, (N-Nitrilotriessigsäure-Dioctadecylamin) (b) Komplexierung des Chelatorlipids und Bindung eines Histidin-Fusionsproteins; der oktaedrische Ni-NTA Komplex ist schematisch gezeigt.

In einer Variante der oben genannten Methode werden auf der Proteinoberfläche natürlich vorkommende Histidinreste für die Bindung an den Chelatorlipid Cu-IDA (Imidoessigsäure) ausgenutzt (Frey et al., 1996a; Frey et al., 1996b; Vogel et al., 1997; Frey et al., 1998)

Eine Möglichkeit, molekulare Monoschichten während der Wachstumsphase zu visualisieren, bietet die Brewster Winkel Mikroskopie (BAM) (Vogel et al., 1997; Kuchling, 1989). Das Prinzip des BAM beruht darauf, daß Licht, welches unter dem Brewster Winkel α_p reflektiert wird, keine p-polarisierte Komponente besitzt (p-Polarisation: \vec{E} in Einfallsebene, wobei die Einfallsebene durch die Ein- und Ausfallsrichtung des Lichtes aufgespannt wird). Abb. 71 verdeutlicht die physikalische Funktionsweise des BAM.



Brewsterwinkel α_p

BAM

$$\tan \alpha_p = n_{\text{Substrat}} / n_{\text{Luft}}$$

==>
vollständige s-Polarisierung
des reflektierten Strahles

p-polarisiert:
E in Einfallsebene ●

s-polarisiert:
E senkrecht Einfallsebene \

$$n_{\text{Luft}} = 1$$

$$n_{\text{Wasser}} = 1,333$$

==>

$$\alpha_p = \arctan 1,333 = 53,1^\circ$$

Abb. 71: Fällt zirkular polarisiertes Licht unter dem Winkel α auf ein Substrat, ist der reflektierte bzw. transmittierte Strahl unvollständig s-polarisiert bzw. p-polarisiert. Fällt zirkular polarisiertes Licht unter dem Brewsterwinkel $\alpha_p = n_{\text{Substrat}} / n_{\text{Luft}}$ (n_x Brechungsindex des Mediums x) auf ein Substrat, so ist der reflektierte Strahl vollständig s-polarisiert, der transmittierte unvollständig p-polarisiert. Beim BAM wird der einfallende Lichtstrahl vollständig p-polarisiert, so daß bei einem Einfall unter α_p die Intensität des reflektierten Strahles Null ist. Befindet sich ein Film, z. B. ein zwei-dimensionaler Proteinkristall auf der Substratoberfläche, so ist die Brewster Winkel Bedingung α_p für die Grenzfläche(n) Luft-Proteinkristall-Substrat nicht mehr erfüllt, so daß die Intensität des (p-polarisierten) Lichtstrahls größer Null ist.

Die BAM-Technik bietet gegenüber der üblichen Fluoreszenzfilmwaage den Vorteil, daß die Grauwertverteilung (Intensität) der BAM-Bilder die optische Schichtdicke wiedergibt und eine Fluoreszenzmarkierung des Objektes nicht erforderlich ist. BAM liefert quantitative Information über die Oberflächendicke des Proteinfilms z. B. als Funktion der Zeit. Auch kann die Bildung von Proteinaggregaten oder eventuellen Kristallen direkt verfolgt werden. BAM stellt eine ideale Technik für Optimierung der Versuchsbedingungen für die zwei-dimensionale Kristallisation von löslichen Proteinen an (funktionalisierten) Lipid-Monoschichten dar.

Für die Charakterisierung des Schichtzustandes über die Messung der Oberflächenspannung wird üblicherweise die Wilhelmy-Methode verwendet, bei der die Kraft F gemessen wird, die durch Kapillarität auf ein Plättchen wirkt, welches in eine Flüssigkeit eintaucht (Abb. 72).

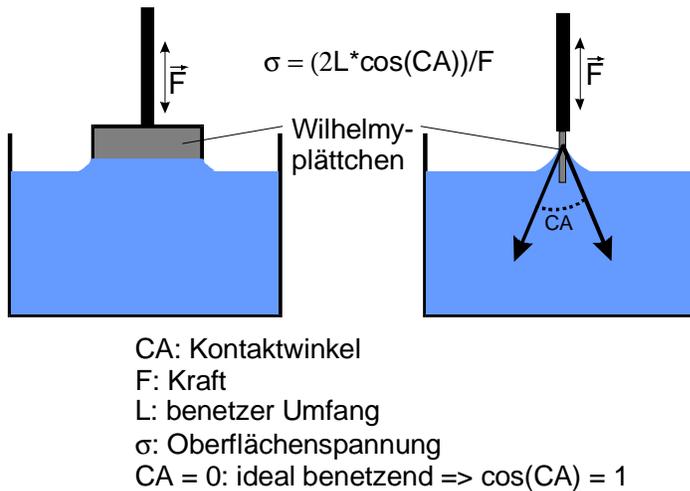


Abb. 72: Messung der Oberflächenspannung nach Wilhelmy. Wegen $\sigma \propto F$ lässt sich bei bekanntem Proportionalitätsfaktor ($2L \cdot \cos(CA)$) aus der Kraft F die Oberflächenspannung σ berechnen.

3.2 SecA auf Lipid-Monoschichten

Motivation:

Die durch MSA und angular reconstitution an negativ kontrastierten Einzelpartikeln erhaltene Molekülmodelle für SecA Proteine aus *E. coli* und *B. subtilis* lassen eine detaillierte Interpretation in Bezug auf Domänenorganisation nicht zu, v. a. wegen der geringen Güte der Rekonstruktion. Dies ist z. T. bedingt durch die geringe Anzahl von Molekülprojektionen, da SecA auf dem Trägerfilm in bevorzugten Orientierungen adsorbiert. Daher erscheint eine 3D-Rekonstruktion des Moleküls aus Kippserien an 2D-Kristallen vorteilhafter. Die Lipid-Monolayer-Technik bietet in diesem Fall eine interessante Möglichkeit, da SecA die Eigenschaft zeigt, spontan in Lipid-Monolayer, v. a. in solche aus negativ geladenen, sauren Phospholipiden einzudringen (Breukink et al., 1992; Kusters et al., 1994; Breukink et al., 1995). In Gegenwart von „non-bilayer“ Lipiden, wie DOPE und Cardiolipin und von divalenten Kationen wie Mg^{2+} ,

Ca²⁺ wird sogar eine erhöhte Translokationseffizienz beobachtet, die u. a. auf eine erhöhte Tendenz der SecA-Insertion zurückgeführt wird (Rietveld et al., 1995; van der Does et al., 2000). Die Interaktion von SecA mit anionischen Phospholipiden, bzw. seine Insertion in Phospholipidmono- bzw. bilayer ist mit einer erheblichen Konformationsänderung des Moleküls gekoppelt (Breukink et al., 1992; Ulbrandt et al., 1992).

Strategie:

Aufgrund der Röntgenstruktur des *B. subtilis* SecA Moleküls erscheinen folgende Vorgehensweisen für die 2D-Kristallisationsversuche an Lipid-Monoschichten geeignet:

- Das SecA Protein aus *B. subtilis* zeigt eine ausgeprägte Ladungspolarität (Abb. 73(a)), die eine starke Wechselwirkung mit negativ geladenen Phospholipid-Monoschichten vermuten lässt (Breukink et al., 1992).
- Auf der Oberfläche des Proteins sind einige Histidinreste lokalisiert (Abb. 73(b)), die vermutlich für eine Wechselwirkung mit Lipid-Monoschichten mit Chelatorkopfgruppen frei zugänglich sind (Frey et al., 1998).

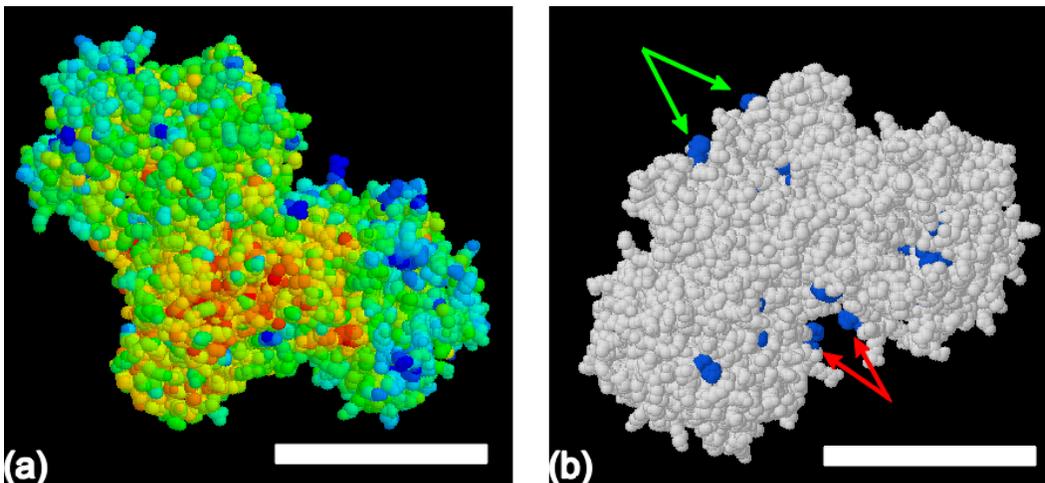


Abb. 73: Röntgenstruktur von *B. subtilis* SecA. (a) Ladungsverteilung: (negativ) rot, (positiv) blau, (b) Histidine (blau) auf der Moleküloberfläche, wobei manche für eine Wechselwirkung mit einer Lipid-Monoschicht verborgen (rote Pfeile), manche aber zugänglich sind (grüne Pfeile). Balken 5 nm.

Für beide Ansatzpunkte gilt:

Unter eine geeignete (komprimierte) Lipid-Monoschicht eingebracht, sollte sich eine zwei-dimensionale kristalline oder zumindest dicht gepackte, z. T. orientierte Proteinanordnung von SecA erreichen lassen.

Ausgehend von obigen Überlegungen wurden für die 2D-Kristallisationsexperimente an SecA einerseits DOPG¹ Monoschichten verwendet, um die Ladungspolarität des Moleküls auszunutzen. Andererseits wurden Monoschichten aus DOGS-NTA²/Cu eingesetzt, die für eine attraktive Wechselwirkung mit Histidinresten auf der Proteinoberfläche geeignet erscheinen.

Die Versuche zur zwei-dimensionalen Kristallisation an Lipid-Monoschichten wurden durch die Alexander-von-Humboldt Stiftung und die National Academy of Science, USA, im Rahmen eines GARN (German American Research Network) Projektes gefördert und überwiegend an der Universität Washington (UW) in Seattle/USA am Center for Nanotechnology in der Arbeitsgruppe von Prof. V. Vogel durchgeführt.

Experimenteller Aufbau:

Für die zwei-dimensionalen Kristallisationsexperimente wurde SecA in die Subphase einer komprimierten Monoschicht von DOPG bzw. von DOGS-NTA/Cu injiziert (Trogdimension [B, L, T]: 10 cm x 20 cm x 0,5 cm). Zur Erzeugung der Monoschicht wurde Lipidlösung (c = 1 mg/ml, gelöst in Chloroform, gespreitetes Volumen ≈ 10 µl) mithilfe einer Glaspipette auf die Mitte des (gefüllten) Troges getropft. Die Adsorption von SecA an die jeweilige Monoschicht wurde über die Messung der Oberflächenspannung mittels Wilhelmy-Methode bzw. Brewster Angle Microscopy (BAM) verfolgt. Neben BAM wurde zur Visualisierung entstehender zwei-dimensionaler Proteinaggregate bzw. -kristalle die Lichtstreuungsmikroskopie eingesetzt, indem senkrecht zur Substratoberfläche ein Lichtmikroskop auf die Oberfläche fokussiert wurde. Dadurch ist es möglich, Reflexionen von Objekten (insb. von deren Rändern) an der Oberfläche zu detektieren. Den schematischen Aufbau der Kristallisationsexperimente in Seattle/USA zeigt Abb. 74(a); eine Fotografie des realen Aufbaus ist in Abb. 74(b) gezeigt.

¹ 1,2-Diacyl-sn-Glycero-3-[Phospho-*rac*-(1-Glycerol)], (Avanti Polar Lipids)

² 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl], (Avanti Polar Lipids)

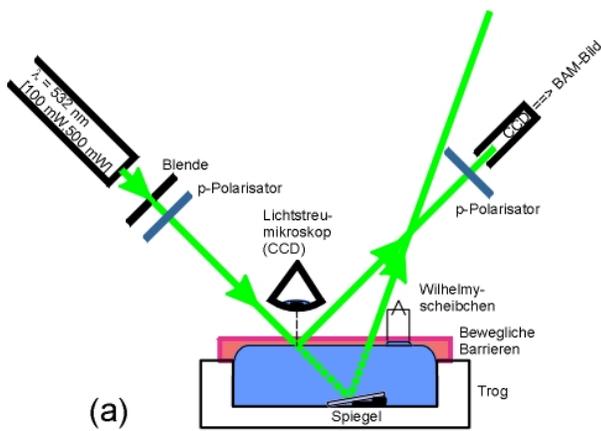


Abb. 74: Schematischer (a) und realer (b) Aufbau zur zwei-dimensionalen Kristallisation von SecA unter Lipid-Monoschichten (in UW). Ein grüner Laser ($\lambda = 532$ nm) emittiert Licht, welches nach einer Blende p-polarisiert wird und unter dem Brewster Winkel α_p auf eine Substratoberfläche fällt. Die Intensität des reflektierten Strahls wird durch eine CCD-Kamera detektiert und erzeugt das BAM Bild. Der transmittierte Strahl wird über einen Spiegel umgeleitet um eine Erwärmung des Teflontroges und eine Verfälschung des BAM- Bildes zu vermeiden. Ein Lichtmikroskop mit CCD-Kamera zeigt das Streubild; die Wilhelmy Methode wurde zur Oberflächenspannungsmessung eingesetzt. Zwei bewegliche, computergesteuerte Barrieren wurden zur Erzeugung einer geeigneten, komprimierten Lipid Monoschicht benutzt. Ein piezogesteuerter Schwingungstisch dämpfte Vibrationen aus der Umgebung.

Für die Ermittlung des Kalibrierungsfaktors ($2L \cdot \cos(CA)$) zur Bestimmung der Oberflächenspannung nach der Wilhelmy-Methode wurde Arachidinsäure verwendet. Abb. 75 zeigt die Isotherme σ - bedeckte Fläche bzw. σ - Barrierenstellung von Arachidinsäure.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden SecA-Adsorbatschichten auf EM-Netzchen übertragen, die mit kontinuierlicher Kohlefolie bedeckt waren, wobei die Folien auf den Netzchen mind. 5 Tage vor dem Kristallisationsexperiment der Luftatmosphäre ausgesetzt wurden, um sie zu hydrophobisieren. Für den Transfer der Adsorbatschichten wurden die Netzchen mit einer Pinzette auf die Lipid-Monoschicht gelegt, 1 Minute adsorbiert, mit einer Pinzette abgehoben, geblottet und mit 1% Uranylacetat negativ kontrastiert. Für die Charakterisierung der Schichten mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) bzw. mittels Energiedispersiver Röntgen-

analyse (EDX)) wurden hydrophobe Glasobjektträger auf die Lipid-Monoschicht gelegt und nach ca. 1 Minute abgehoben.

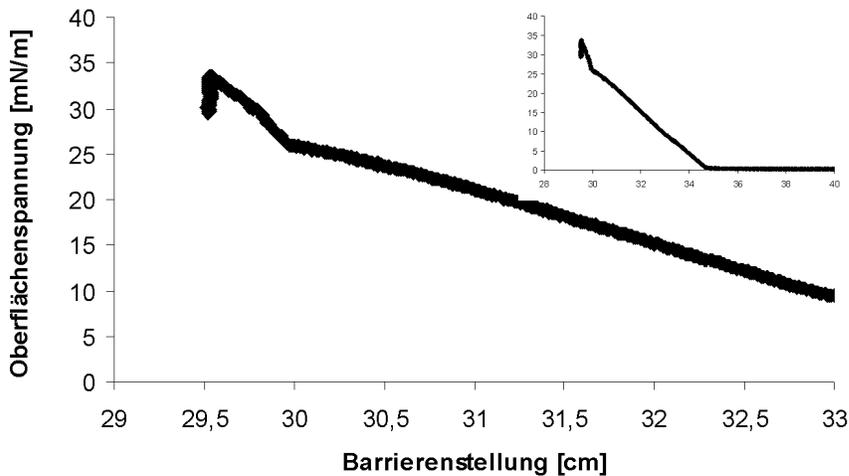


Abb. 75: Oberflächenspannung σ - Barrierenstellung von Arachidinsäure. Dieses Diagramm diente durch den Knick im Verlauf der Oberflächenspannung bei ca. 25 mN/m zur Bestimmung des Kalibrierungsfaktors ($2L \cdot \cos(CA)$) bei der Wilhelmy Methode.

Ergebnisse:

1. SecA/DOPG-Monoschichten:

Nach Spreitung und computergesteuerter Komprimierung der DOPG Monoschicht auf eine Oberflächenspannung von 7 mN/m innerhalb etwa 1 Stunde wurde 2,5 mg SecA in 110 ml Subphase (10 mM Tris/HCl, pH = 7,5, gereinigt mit Chloroform und Ethanol) injiziert. 2,5 mg SecA entspricht einer minimalen zwei-dimensionalen Bedeckungsfläche von ca. 7500 cm² bei einer -löslichen- Moleküldimension von (10 nm x 10 nm x 10 nm) und einem Molekulargewicht von 200 kDa. Dies verursachte innerhalb von 4 Stunden einen Anstieg der Oberflächenspannung von 10 mN/m (*B. subtilis*) bzw. 7 mN/m (*E. coli*) (Abb. 76).

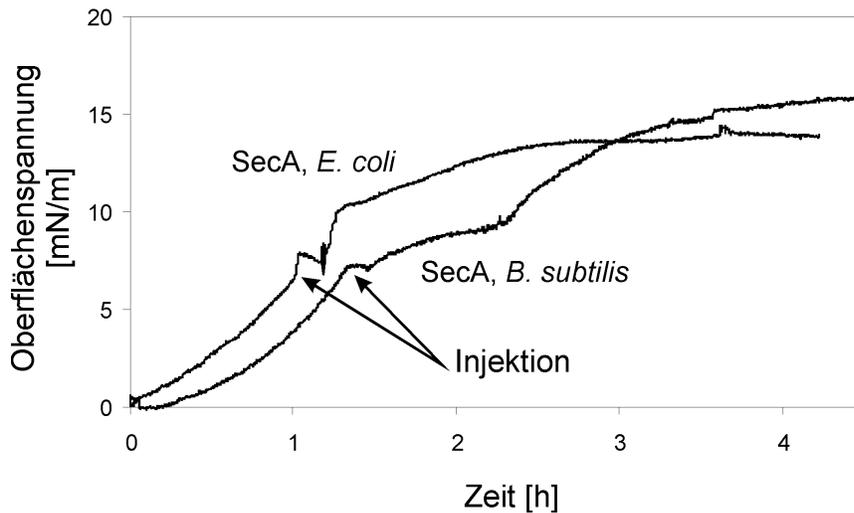


Abb. 76: Oberflächenspannung von DOPG vor und nach Injizierung von SecA (*E. coli* bzw. *B. subtilis*) in die Subphase. Der Kompressionsvorgang dauerte etwa 1 Stunde.

Abb. 77 zeigt zu den DOPG-Monoschicht Experimenten Aufnahmen des Lichtstreuemikroskops und Brewster Winkel Mikroskops. Helle Punkte des Lichtstreuemikroskops stammen von streuenden Objekten an der Pufferoberfläche (insb. deren Rändern). Helle Punkte des Brewster Winkel Mikroskops stammen von Objekten an der Pufferoberfläche mit Brechungsindices größer 1.

Negativ kontrastierte Proben für das TEM (Abb. 78) wurden etwa 10 Stunden nach der Proteininjektion in die Subphase präpariert.

Auf den gezeigten Aufnahmen gibt es keine Anhaltspunkte für kristalline bzw. dichte Proteinpackungen, weder für SecA von *E. coli* noch von SecA von *B. subtilis*.

Experimente mit SecA, *E. coli* an DOPG bei geringerer Proteinkonzentration (0,2 mg) bzw. höherer anfänglicher Oberflächenspannung (15 mN/m) brachten keine wesentlich anderen Ergebnisse.

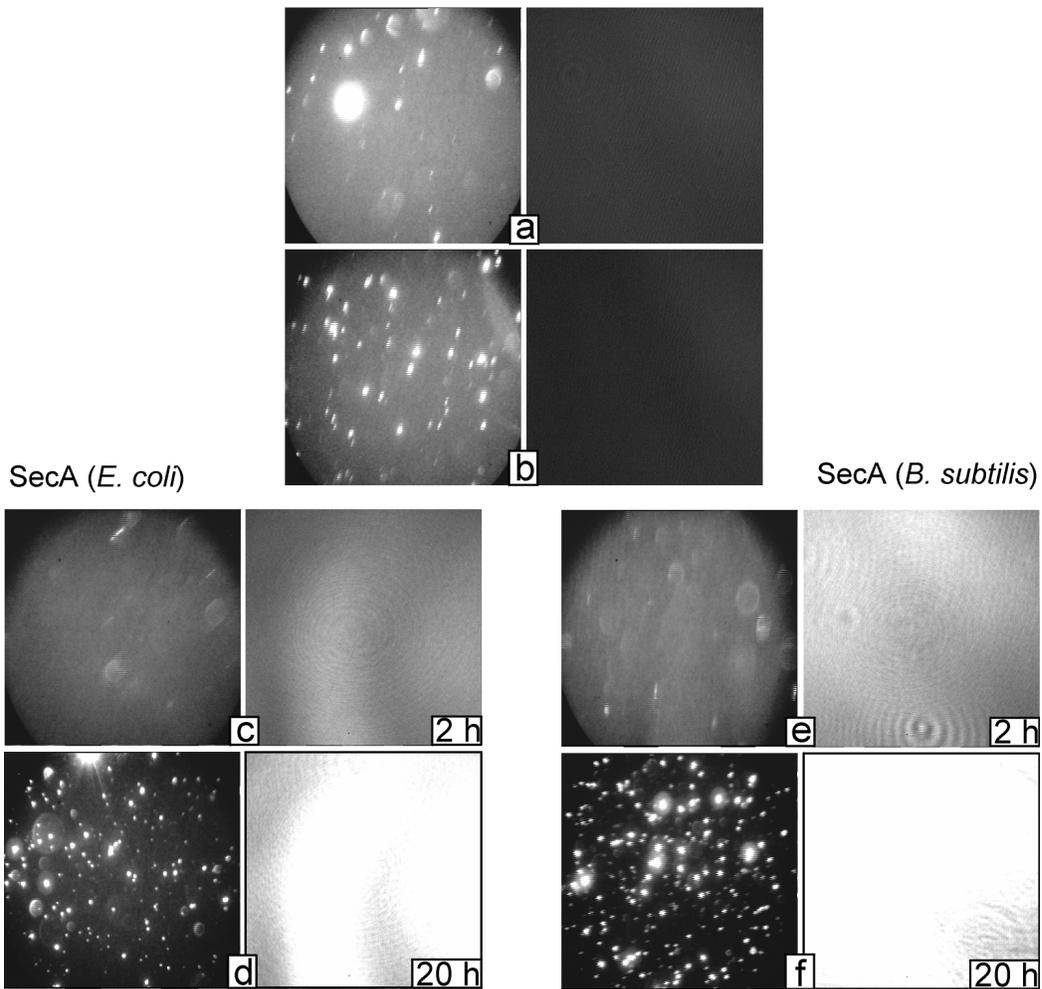


Abb. 77: Aufnahmen des Lichtstromikroskops (jeweils links) und Brewster Winkel Mikroskops (jeweils rechts) zu DOPG Monoschicht Experimenten. (a) unkomprimiertes DOPG, (b) auf 7 mN/m komprimiertes DOPG, (c) 2 Stunden nach Injektion von SecA, *E. coli* in die Subphase, (d) 20 Stunden nach Injektion von SecA, *E. coli* in die Subphase, (e) 2 Stunden nach Injektion von SecA, *B. subtilis* in die Subphase, (f) 20 Stunden nach Injektion von SecA, *B. subtilis* in die Subphase. Die Größe der Bilder ist je 70 μm x 70 μm .

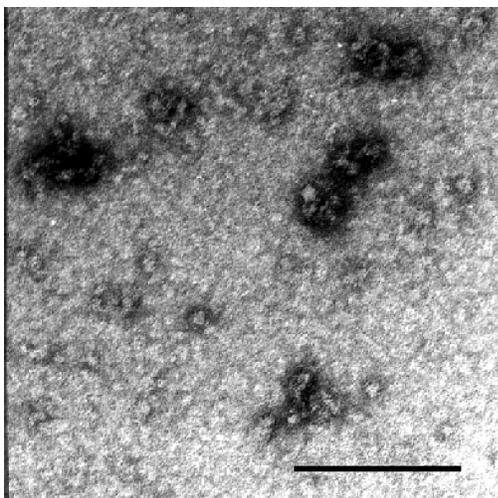


Abb. 78: TEM Abbildung von negativ kontrastierten *E. coli* SecA an DOPG. Balken 500 nm.

2. SecA/DOGS-NTA/Cu-Monoschichten:

Nach computergesteuerter Komprimierung der DOGS-NTA/Cu Monoschicht auf eine Oberflächenspannung von 15 mN/m innerhalb von etwa 1,5 Stunden wurde 2, 5 mg SecA in 110 ml Subphase (10 mM Tris/HCl, pH = 7,5, gereinigt mit Chloroform und Ethanol) injiziert. Dies verursachte innerhalb von 2 Stunden einen Anstieg der Oberflächenspannung von 10 mN/m (*E. coli*) bzw. ein Abfall von 3 mN/m (*B. subtilis*) (Abb. 79).

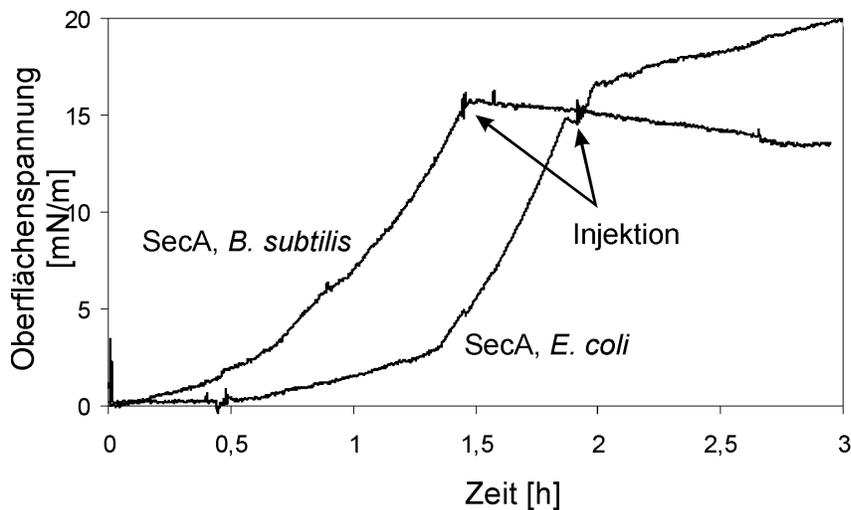


Abb. 79: Oberflächenspannung von DOGS-NTA/Cu vor und nach Injizierung von SecA (*E. coli* bzw. *B. subtilis*) in die Subphase. Der Kompressionsvorgang dauerte etwa 1 Stunde.

Abb. 80 zeigt zu den DOGS-NTA/Cu-Monoschicht Experimenten Aufnahmen des Lichtstreuemikroskops und Brewster Winkel Mikroskops. Aus Abb. 80 gibt es für SecA aus *E. coli* keine Anhaltspunkte für kristalline bzw. dichte Proteinpackungen. Bei SecA aus *B. subtilis* sind im Brewster Winkel Mikroskop jedoch Strukturen zu erkennen (Abb. 80(g) – (i)), die auf dicht gepackte Proteinstrukturen zurückgeführt werden könnten. Diese Strukturen konnten jedoch auf negativkontrastierten Präparaten im TEM nicht verifiziert werden.

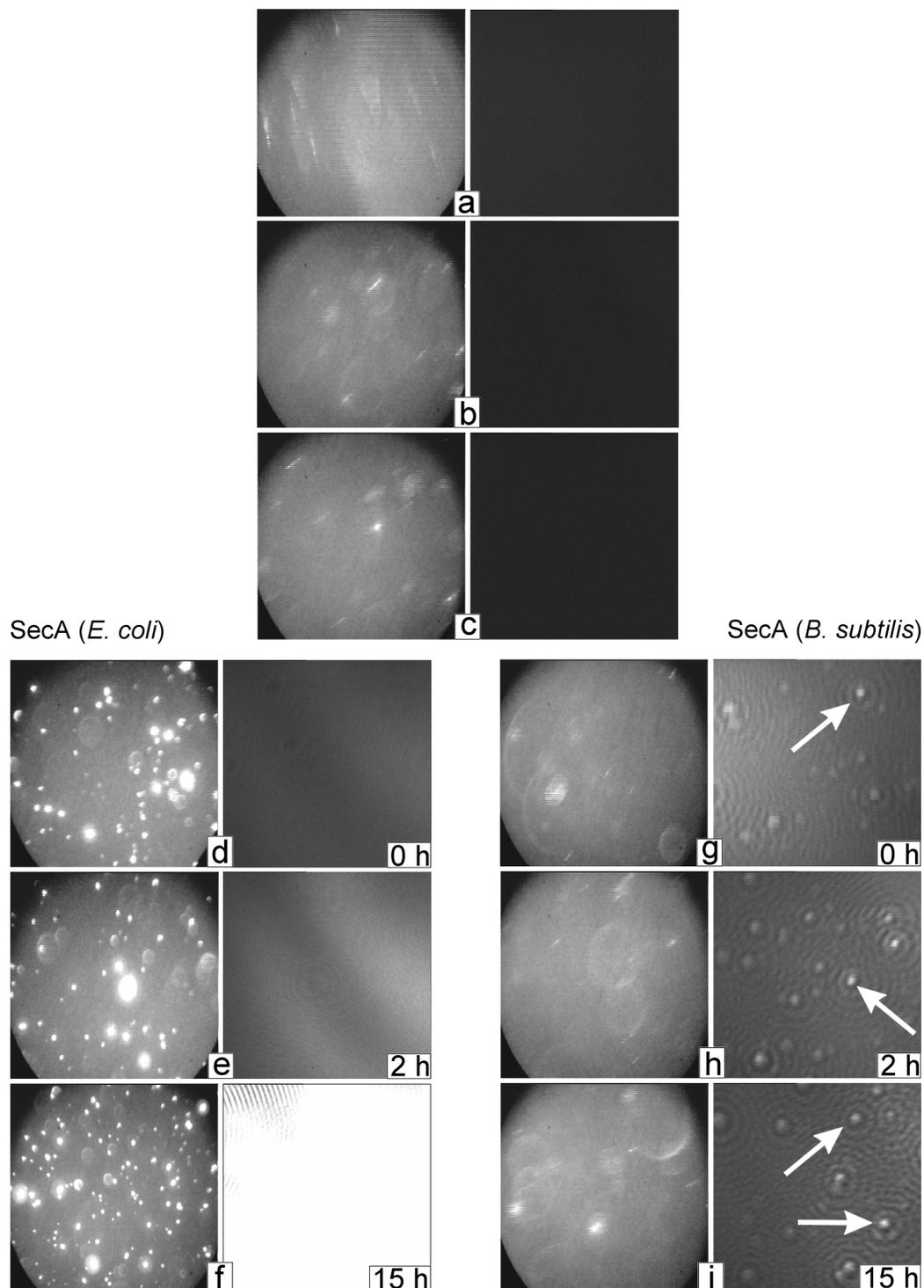


Abb. 80: Aufnahmen des Lichtstreuemikroskops (jeweils links) und Brewster Winkel Mikroskops (jeweils rechts) zu DOGS-NTA/Cu Monoschicht Experimenten. (a) mit Chloroform und Ethanol gereinigter Puffer, (b) unkomprimiertes DOGS-NTA/Cu, (c) auf 15 mN/m komprimiertes DOGS-NTA/Cu, (d) 0 Stunden nach Injektion von SecA, *E. coli* in die Subphase, (e) 2 Stunden nach Injektion von SecA, *E. coli* in die Subphase, (f) 15 Stunden nach Injektion von SecA, *E. coli* in die Subphase, (g) 0 Stunden nach Injektion von SecA, *B. subtilis* in die Subphase, (h) 2 Stunden nach Injektion von SecA, *B. subtilis* in die Subphase, (i) 15 Stunden nach Injektion von SecA, *B. subtilis* in die Subphase. Die Strukturen in (g) – (i) (teils mit Pfeilen gekennzeichnet) könnten auf dicht gepackte Proteinstrukturen zurückzuführen sein. Die Größe der Bilder ist je 70 μm x 70 μm .

Experimente mit *B. subtilis* SecA an DOGS-NTA/Cu-Monoschichten wurden an der TU München wiederholt. Die Adsorbatschichten wurden nach Transfer auf kohlebefilmte Netzchen mit TEM, bzw. nach Transfer auf hydrophobe Glasplättchen mittels Lichtmikroskopie (LM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) charakterisiert. Die TEM Präparate brachten keine Indizien für das Vorhandensein von zwei-dimensionalen Proteinarrays, während auf dem Glasscheibchen im REM und LM kristalline Strukturen sichtbar waren (Abb. 81(a), (b)). Kontrollexperimente führten zu dem Ergebnis, daß diese Strukturen weder durch das Protein, noch durch eine lokale Konzentrationserhöhung beim Eintrocknen des Puffers erzeugt werden (Abb. 81(c)), sondern durch DOGS-NTA/Cu zustande kommen (Abb. 81(d)).

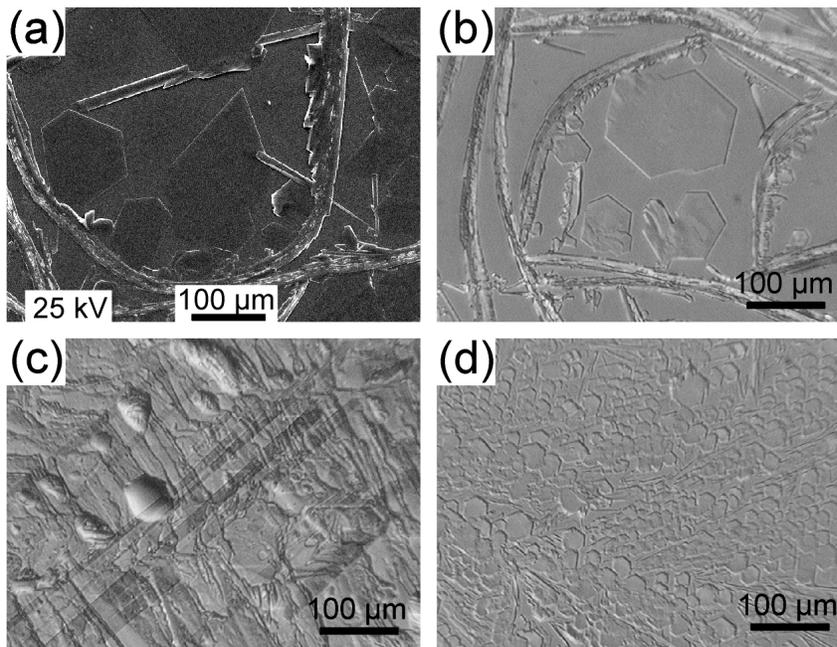


Abb. 81: Lichtmikroskopische (LM) und Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen einer DOGS-NTA/Cu-Monoschicht adsorbiert auf einem hydrophoben Glasscheibchen. (a) REM Aufnahme von DOGS-NTA/Cu mit *B. subtilis* SecA in Subphase: 10 mM Tris/HCl, pH = 7,5 (b) LM Aufnahme von DOGS-NTA/Cu mit *B. subtilis* SecA in Subphase, (c) LM Aufnahme von eingetrockneten 10 mM Tris/HCl, pH = 7,5 (ohne Protein), (d) LM Aufnahme von DOGS-NTA/Cu. Die REM Aufnahmen entstanden an einem JEOL 5900 LV bei 25 kV Beschleunigungsspannung.

EDX-Messungen zeigen darüber hinaus, daß sich die kristallinen Areale und strangartigen Strukturen in Abb. 81(a) und (b) bzw. Abb. 83 v. a. durch den Sauerstoff- und Chlorgehalt unterscheiden (Abb. 82), wobei die kristallinen Areale höhere Strahlungsempfindlichkeit zeigen (Abb. 83).

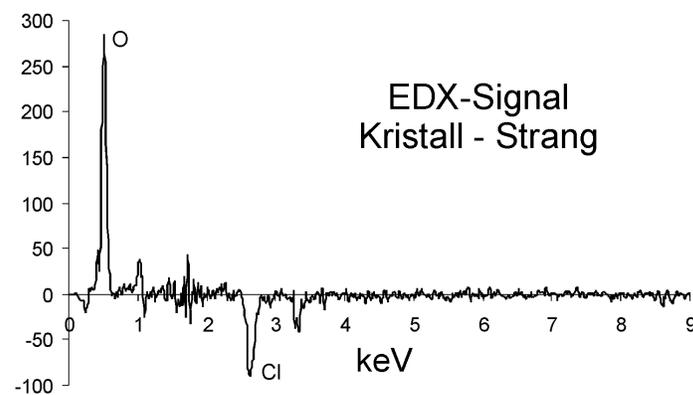
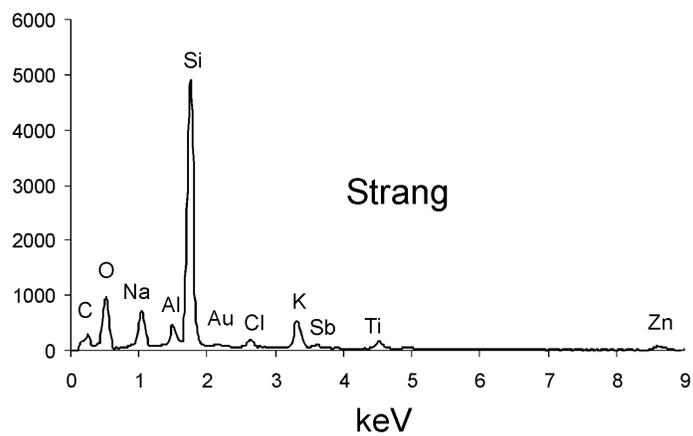
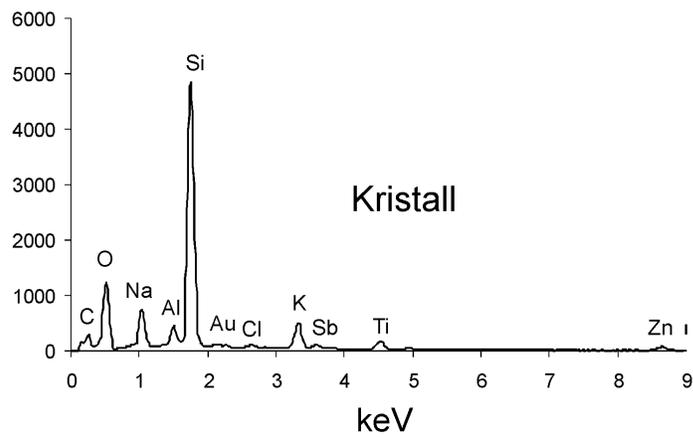


Abb. 82: Ergebnis der EDX-Messungen an kristallinen Arealen und strangartigen Strukturen von *B. subtilis* SecA, an DOGS-NTA/Cu (vgl. z. B. Abb. 83). Während die kristallinen Areale gegenüber den Strangstrukturen ein höheres Sauerstoffsignal liefern, ist es beim Chlorsignal umgekehrt.

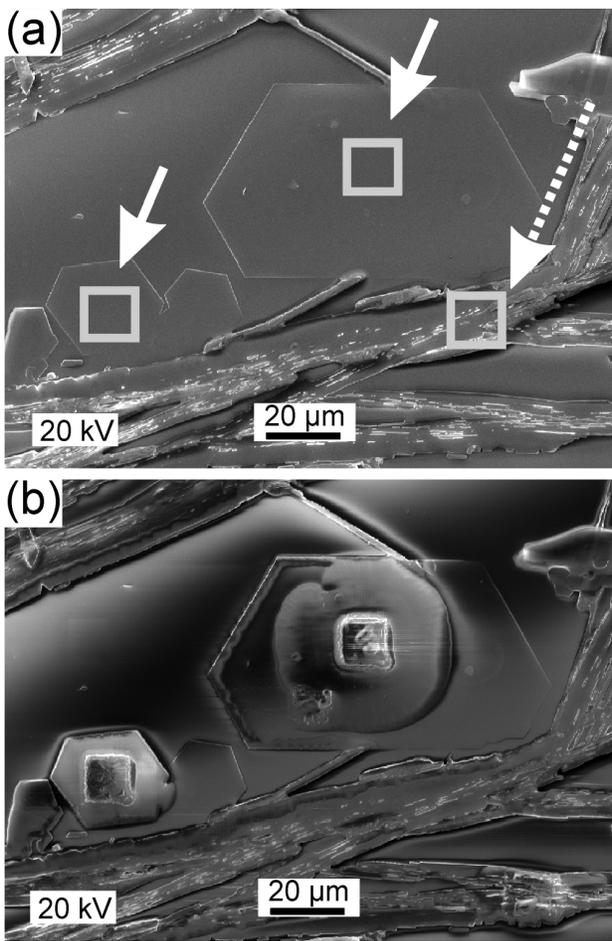


Abb. 83: EDX-Messungen an kristallinen Arealen (durchgezogene Pfeile) und strangartigen Strukturen (gestrichelte Pfeile) von *B. subtilis* SecA, an DOGS-NTA/Cu. Während die kristallinen Areale durch den Elektronenbeschuß starke Strahlenschäden zeigen, ist die Erscheinungsform der Strangstruktur nahezu unverändert.

3.3. SecA an Wasser/Luft-Phasengrenzfläche

Neben dem Ansatz, SecA an einer Lipid Monoschicht zu kristallisieren, wurde die Spreitungstechnik nach Trurnit (Trurnit, 1960) zur Erzeugung von SecA Monoschichten an der Wasser/Luft-Phasengrenze verwendet. Bei der Methode wird Proteinlösung über eine Glasnadel auf einer Wasser- bzw. Pufferoberfläche gespreitet, wobei sich ein dünner Film bildet (Abb. 84). Anwendung fand diese Spreitungsmethode z. B. bei der Erzeugung von Katalase Monoschichten (Maksymiw & Nitsch, 1991) und Lipase Monoschichten (Nitsch et al., 1991).

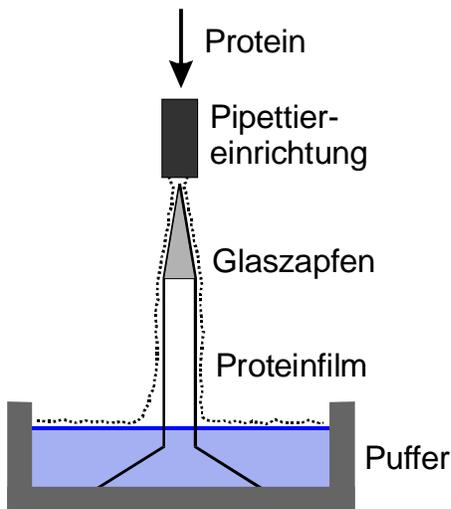


Abb. 84: Methode der Trurnitspreitung. Der ablaufende (Protein-) Flüssigkeitsfilm befindet sich in einem laminaren Strömungszustand, so daß während der Ablaufphase die Proteinmoleküle an die Pufferoberfläche adsorbieren können. Bei zu hohem Volumenstrom kann es zu Substanzverlusten in die Subphase kommen.

Abb. 85 zeigt TEM Aufnahmen von negativ kontrastierten *E. coli* SecA nach Trurnit Spreitung, wobei jeweils ca. 70 µg Protein auf eine Trogfläche von 300 cm² gespreitet wurde (Subphase: 10 mM Tris/HCl, pH = 7,5); 70 µg SecA entspricht einer minimalen zwei-dimensionalen Bedeckungsfläche von ca. 210 cm² bei einer löslichen- Moleküldimension von (10 nm x 10 nm x 10 nm) und einem Molekulargewicht von 200 kDa. Nach computergesteuerter Komprimierung, wurde die Probe für Abb. 85(a) bei einer Oberflächenspannung von 15 mN/m entnommen, die Probe für Abb. 85(b) bei einer Oberflächenspannung von 4 mN/m.

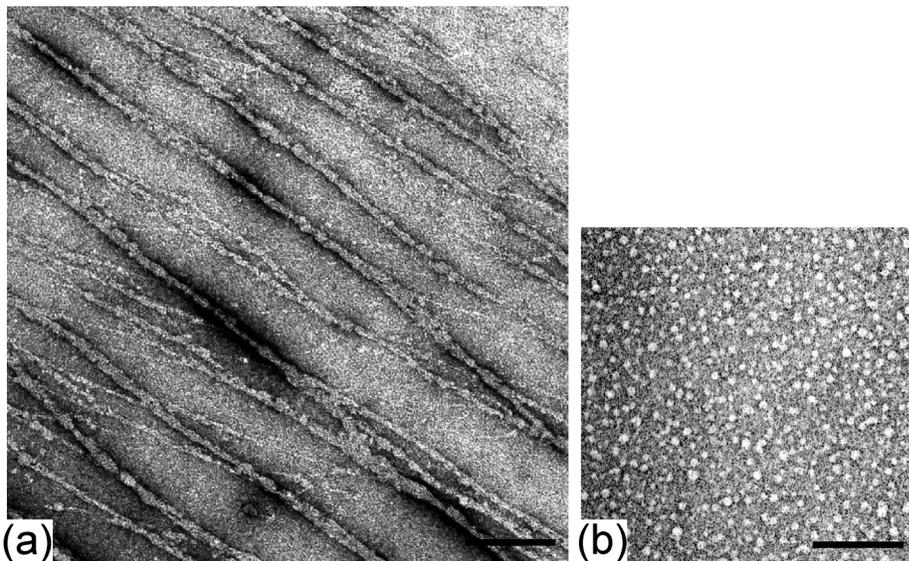


Abb. 85: TEM Aufnahmen von negativ kontrastierten *E. coli* SecA nach Trurnit Spreitung. Proteinentnahme bei einer Oberflächenspannung von 15 mN/m (a), bzw. 4 mN/m (b). Die Kohlenetzchen wurden zuvor durch Glimmentladung hydrophilisiert. Balken 200 nm.

Während bei höherer Oberflächenspannung (15 mN/m) v. a. fadenähnliche Strukturen auftreten, liefert die geringere Oberflächenspannung (4 mN/m) eine gleichmäßigere Verteilung von Einzelpartikeln. Bei dieser Probe wurden 4230 Einzelpartikeln in 16 x 4 Klassen klassifiziert und die Mittelungsbilder berechnet (Abb. 86).

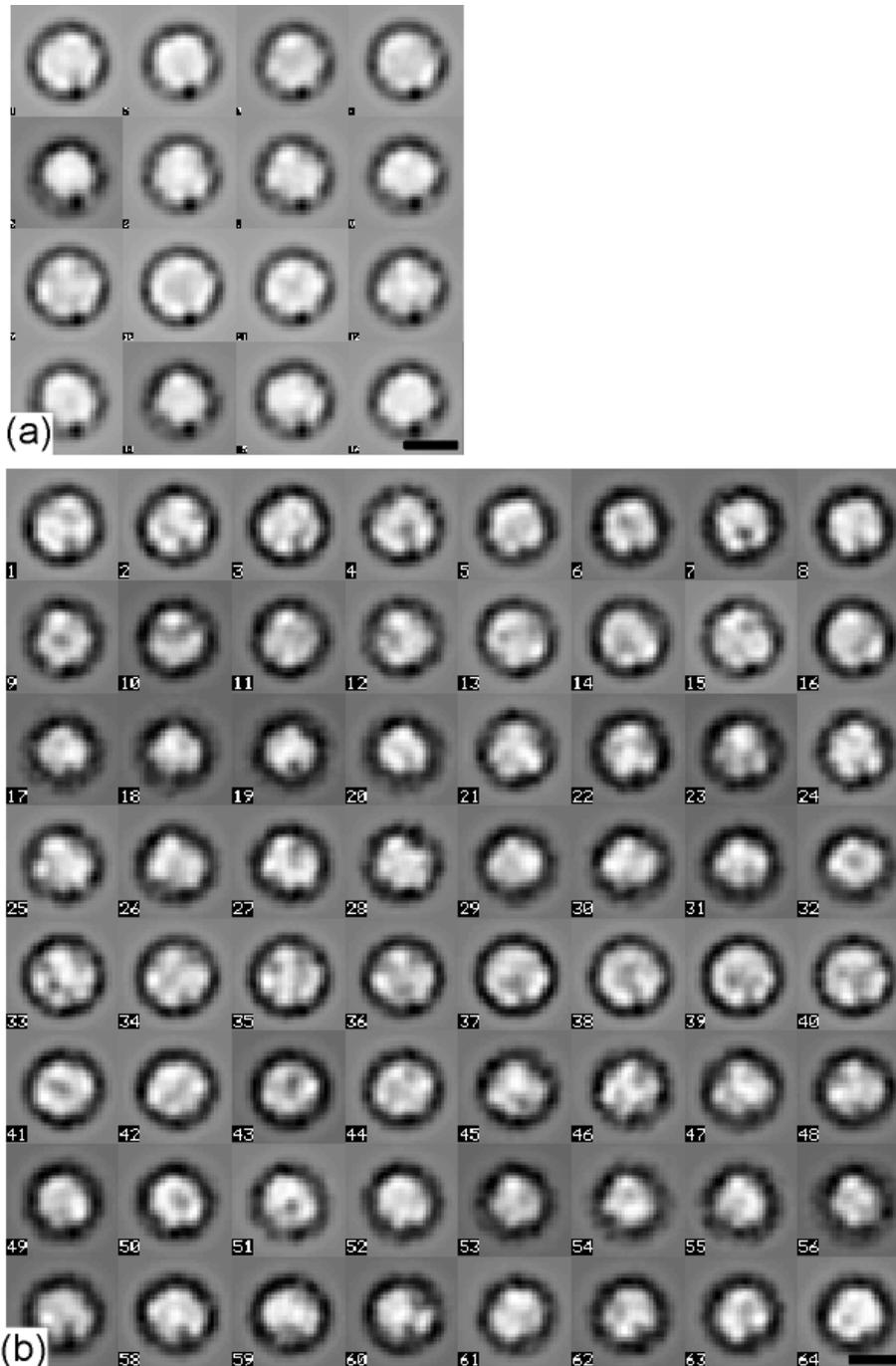


Abb. 86: Klassenmittlungen von negativ kontrastierten *E. coli* SecA nach Trurnit Spreitung und Komprimierung auf 4 mN/m. (a) 16 Klassen, (b) 64 Klassen. Balken 10 nm.

3.4 SecA an flüssig/fest-Phasengrenzfläche

Diese Methode basiert auf dem Wachstum von zwei-dimensionalen Proteinkristallen auf einer Kohlefolie unter Verwendung bekannter Bedingungen zur drei-dimensionalen Kristallisation (Auer et al., 1999); die Kristalle wachsen dabei zwei-dimensional direkt auf der Kohlefolie eines elektronenmikroskopischen Trägernetzchens. Der experimentelle Aufbau ist in Abb. 87 gezeigt.

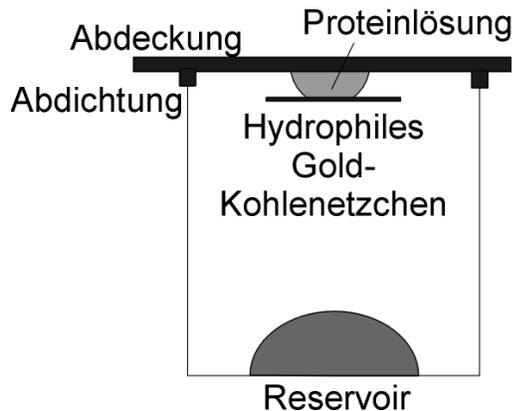


Abb. 87: Kristallisationsaufbau zur zwei-dimensionalen Proteinkristallisation unter drei-dimensionalen Kristallisationsbedingungen. In einem sog. Linbrotrog hängt ein kohlebefilmtes (hydrophiles) Netzchen an einem Tropfen (10 μ l - 15 μ l) Proteinlösung, wobei der Trog abgedichtet ist und ein Puffer-Reservoir (1ml - 1,5 ml) am Boden des Troges vorhanden ist.

Für die drei-dimensionale Kristallisation von *B. subtilis* SecA lauten die Bedingungen (Weinkauf et al., 2000):

- Proteinlösung: 15 - 20 mg/ml SecA, *B. sub.*
20 mM BES, pH = 7,0
300 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
1 mM DTT
- Reservoir: 48 - 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
28 - 32 % (v/v) Glycerin
20 mM BES, pH = 7,0
1 mM DTT

Zur drei-dimensionalen Kristallisation werden 5 μ l - 7 μ l der Proteinlösung mit 5 μ l - 7 μ l des Reservoirs vermischt; dies bildet den hängenden Tropfen im Limbrotrog. Nach 3 - 4 Wochen Kristallisationszeit zeigten 3D Kristalle von *B. subtilis* SecA, eine maximale Kantenlänge von 0,3 mm - 0,4 mm. Zur zwei-dimensionalen Kristallisation wurden als Parameter die Kristallisationszeit (15 - 270 Stunden), die Proteinkon-

zentration (25 µg/ml - 4000 µg/ml) und die Ammoniumsulfatkonzentration im Reservoir (47 % - 53 %) variiert. Nach Negativkontrastierung wurden die kohlebefilmten Goldnetzchen im TEM untersucht.

Bei mehr als 1 mg/ml Proteinkonzentration in der Proteinlösung zeigen sich bei 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Reservoir nach 75 Stunden Aggregate (Abb. 88(a)) und strukturierte Vernetzungsstrukturen (Abb. 88(b)). Während die Aggregate bei Kontrollexperimenten (d. h. ohne Protein) nicht zu sehen waren, waren die Vernetzungsstrukturen auch in den Kontrolleexperimenten zu erkennen, wobei sie aber trotz gleichen Fokus deutlich weniger konturiert waren (Abb. 88(c)) und weniger oft auftraten. Dazu zeigten sich bei 4 mg/ml Proteinkonzentration nach etwa 15 Stunden mehrere µm große H-förmige Strukturen (Abb. 3.20(d)). Derartige Strukturen treten z. B. bei der zwei-dimensionalen Kristallisation von Streptavidin an Biotin Lipiden auf (Frey et al., 1998). Bei *B. subtilis* SecA Kristallisationsexperimenten konnte jedoch keine Kristallinität nachgewiesen werden.

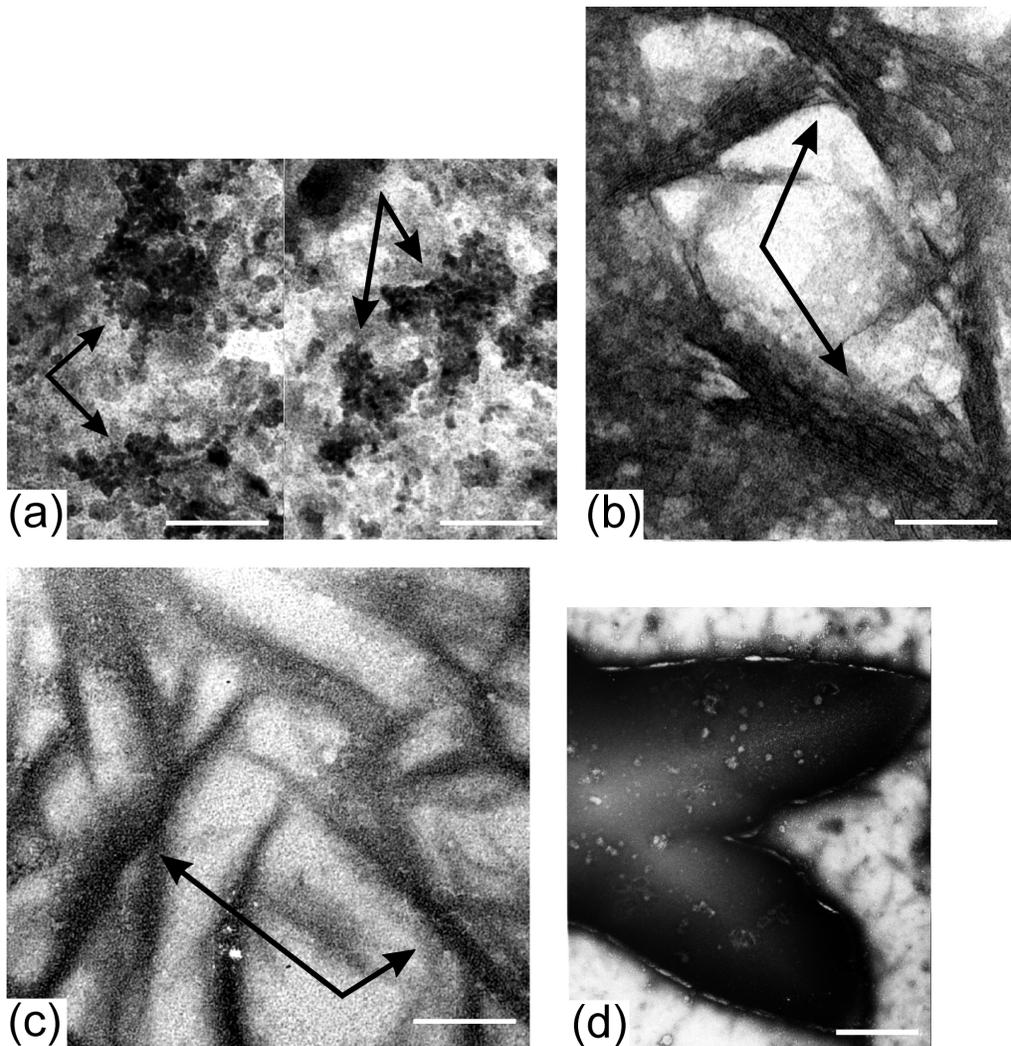


Abb. 88: Versuche zur zwei-dimensionalen Kristallisation von *B. subtilis* SecA unter drei-dimensionalen Kristallisationsbedingungen. Die TEM Abbildungen zeigen charakteristische Strukturen bei teils verschiedenen Versuchsbedingungen (siehe Text). (a) Aggregate (b) Vernetzungsstrukturen, (c) weniger strukturierte Vernetzungsstrukturen bei Kontrolleexperiment zu (b), d. h. ohne Protein, (d) H-förmige Gebilde. Balken (a) - (c) 100 nm, (d) 1 μ m.

3.5 Zusammenfassung und Diskussion

Die zwei-dimensionalen Kristallisationsversuche von löslichem *E. coli* bzw. *B. subtilis* SecA an Lipid-Monoschichten, an Wasser/Luft- bzw. flüssig/fest-Phasengrenzflächen führten zu keinem eindeutigen Hinweis auf kristalline bzw. dicht-gepackte Proteinanordnungen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente lieferten

jedoch einige Anhaltspunkte, die für die Planung weiterer Experimente von Bedeutung sind.

SecA auf Lipid-Monoschichten:

Das *E. coli* SecA Protein scheint oberflächenaktiv zu sein, wie es erstmals von Breukink et al. (1992) festgestellt wurde: nach Injektion des SecA in die Subphase eines Langmuir-Trogs ohne eine gespreitete Lipid-Monoschicht zeigt sich ein Anstieg der Oberflächenspannung (Abb. 89), was auf eine Adsorption des Proteins an der Phasengrenzfläche hindeutet. Auch in BAM-Aufnahmen (Abb. 90) findet sich nach Injektion von *E. coli* SecA in die Subphase ohne eine darüber liegende Lipid-Monoschicht ein Grauwertanstieg, was mit Oberflächenspannungsmessungen in Einklang steht.

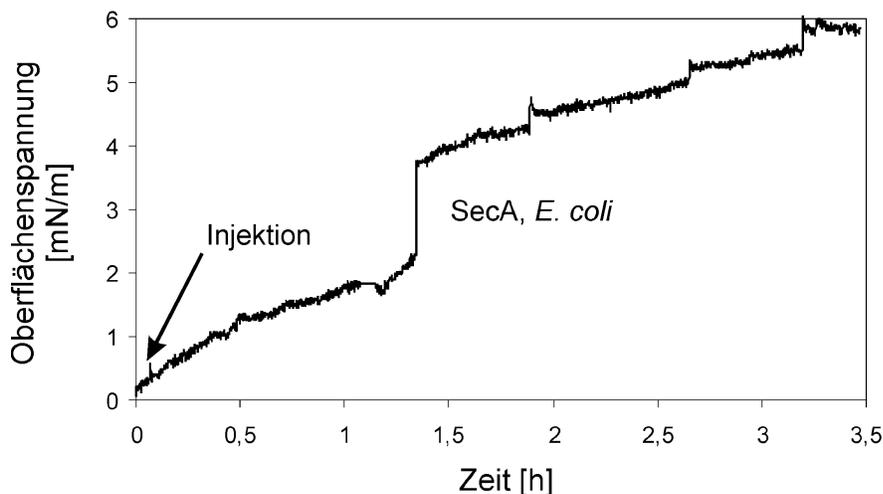


Abb. 89: Oberflächenspannung nach Injektion von *E. coli* SecA in die Subphase ohne eine darüberliegende Monoschicht. Proteininjektion bei $t = 0$. Der Sprung der Oberflächenspannung bei ca. 1,4 Stunden ist auf eine Vibration während der Messung zurückzuführen.

Bei Injektion von *B. subtilis* SecA in die Subphase ohne Lipid-Monoschicht zeigt sich im BAM-Bild ebenfalls ein Grauwertanstieg, wobei innerhalb 3 Stunden kein Anstieg der Oberflächenspannung registriert wurde. Dieser (scheinbare) Widerspruch läßt sich event. darauf zurückführen, daß ein Grauwertanstieg im BAM bereits durch die Adsorption des Proteins an der Lipid-Monoschicht hervorgerufen wird, während für einen Anstieg der Oberflächenspannung eine Insertion des Proteins in die Lipid-

Monoschicht notwendig ist. Abb. 90 zeigt BAM-Aufnahmen von SecA aus *E. coli* bzw. *B. subtilis* ohne Lipid-Monoschicht.

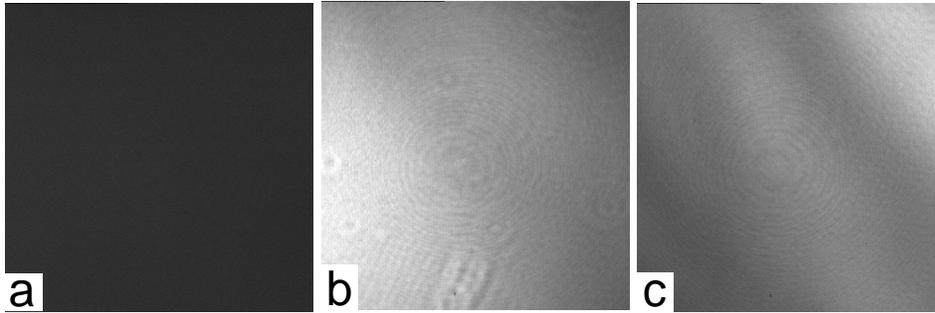


Abb. 90: BAM-Aufnahmen vor und nach Injektion von SecA in die Subphase ohne eine darüber liegende Lipid-Monoschicht. (a) Puffer, gereinigt mit Chloroform und Ethan bei $t = 0$, (b) SecA aus *B. subtilis* nach 15 Stunden. (c) SecA aus *E. coli* nach 24 Stunden. Die Größe der Bilder ist je $70 \mu\text{m} \times 70 \mu\text{m}$.

Eine event. geringere Oberflächenaktivität des *B. subtilis* SecA kann auf seinen im Vergleich zum *E. coli* SecA ausgeprägteren hydrophilen Charakter zurückzuführen sein.

Sowohl *E. coli* als auch *B. subtilis* SecA zeigen mit der negativ geladenen DOPG-Monoschicht attraktive Wechselwirkungen (Abb. 76, 77), wobei beim *B. subtilis* SecA Protein im Vergleich zu *E. coli* SecA ein stärkerer Anstieg der Oberflächenspannung zu beobachten ist, was auf eine stärkere Wechselwirkung des *B. subtilis* Proteins zu der Lipid-Monoschicht zurückgeführt werden kann.

Auch mit der DOGS-NTA/Cu-Monoschicht scheint *E. coli* SecA attraktiv zu wechselwirken; dagegen ist ein Abfall der Oberflächenspannung nach Injektion des *B. subtilis* SecA zu beobachten. Eine eindeutige Interpretation dieses Verhaltens ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich. Im letzteren Fall zeigen sich im BAM $3 \mu\text{m} - 5 \mu\text{m}$ große Strukturen, die für dicht-gepackte/kristalline Proteinanordnungen charakteristisch sind. Das Vorhandensein von geordneten Proteinanordnungen konnte jedoch mittels TEM nicht verifiziert werden; es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Strukturen bei einem „schlechten“ Transfer auf EM-Netzchen zerstört wurden, oder verloren gegangen sind. Nach großflächiger Übertragung von DOGS-NTA/Cu-Monoschichten mit SecA (*B. subtilis*) auf hydrophobe Glasobjektträger zeigen REM und LM Aufnahmen dünne, hexagonale Kristalle in der Größenordnung von $100 \mu\text{m} - 150 \mu\text{m}$; wie die Kontrollexperimente jedoch zeigen,

werden diese Kristalle vom Chelatorlipid DOGS-NTA/Cu erzeugt. Das die auf BAM-Aufnahmen beobachteten 3 μm - 5 μm großen Strukturen auf Lipid-Kristalle zurückzuführen sind, ist wegen dem starken lokalen Grauwertanstieg weniger wahrscheinlich.

Die bisherigen Experimente zeigen, daß sowohl negativ geladene DOPG- als auch funktionalisierte Chelatorlipid DOGS-NTA/Cu-Monoschichten für weitere Kristallisationsexperimente geeignet sind. Im letzten Fall scheinen die frei zugänglichen Histidinreste an der Proteinoberfläche für eine Bindung an die Metall-NTA Gruppe ausreichend. Weitere Experimente sollten v. a. unter Variation von Parametern wie pH, Ionenstärke, Temperatur und Nukleotidzusätze durchgeführt werden. Auch könnte die Einführung eines His₆-Restes an SecA zu einer attraktiven Wechselwirkung beitragen.

SecA an Wasser/Luft Phasengrenzfläche:

Durch die Trurnit Spreitung von *E. coli* SecA zeigt sich in den TEM Aufnahmen eine Abhängigkeit der Proteinanordnung von der Oberflächenspannung: während bei 15 mN/m v. a. fadenähnliche Strukturen zu erkennen sind, zeigen sich bei 4 mN/m überwiegend Einzelpartikel (Größe und Form der Einzelpartikel ist *E. coli* SecA aus Kapitel 1 vergleichbar). Die Einzelpartikelanalyse zeigt keine strukturellen Details des Proteins, was event. der schlechten Übertragung des Proteinfilms auf EM-Netzchen zuzuschreiben ist. Auch ist es wahrscheinlich daß das Protein an der Phasengrenzfläche eine partielle Denaturierung erfährt. Künftig bietet sich bei der Trurnit Spreitung die Verwendung eines sog. Durchflußtrog zur Komprimierung der Proteinmoleküle an, da sich hier die Moleküle in verschiedenen Kompressionszuständen befinden.

SecA an flüssig/fest Phasengrenzfläche:

Durch den Ansatz der zwei-dimensionalen Kristallisation von *B. subtilis* SecA auf einer Kohlefolie unter drei-dimensionalen Kristallisationsbedingungen zeigte sich in den TEM Aufnahmen die Abhängigkeit von den Parametern Zeit, Proteinkonzentration und Ammoniumsulfatkonzentration. Aufgrund Abb. 88(b), in der vernetzte Proteinstrukturen zu erkennen sind, könnte eine Variation dieser Parameter zu positiven Resultaten führen.

Kapitel 4 Kooperationen zur Strukturuntersuchung von großen, oligomeren Proteinkomplexen mittels Negativkontrastierung und Kryoelektronenmikroskopie

4.1 Enoatreduktase aus *Clostridium tyrobutyricum*

4.1.1 Stand der Forschung

Biochemisches Modell:

Enoatreduktasen (EC 1.3.1.31) aus *Clostridium tyrobutyricum* und *Clostridium kluyveri* katalysieren die NADH-abhängige Reduktion von C-C-Doppelbindungen von nicht aktivierten 2-Enoaten, sowie von ungesättigten Aldehyden, zyklischen Ketonen und Methylketonen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Stereospezifität, strikte Regioselektivität und eine außerordentlich breite Substratspezifität aus. Anstelle von NADH kann auch reduziertes Methylviologen als effektiver Elektronendonator dienen. Mit diesem künstlichen Elektronenüberträger können enzymatische Reduktionen auch in sogenannten elektrochemischen Zellen durchgeführt werden. Das Enzym aus *C. tyrobutyricum* ist z. B. ein nützliches Reagenz für die Herstellung von vielen chiralen Verbindungen, besonders von chiral Deuterium-substituierten Verbindungen. Enoatreduktasen wurden bisher aus zahlreichen *Clostridia*, auch aus einigen proteolytischen Vertretern dieser Gattung isoliert (Simon, 1991).

Struktur:

Aus Sedimentationsgleichgewichts-Untersuchungen ergibt sich für die molekulare Masse der Enoatreduktase aus *Clostridium tyrobutyricum* 940 ± 20 kDa. Aufgrund von Dodecylsulfat-Elektrophorese und partieller Sequenzbestimmung ist bekannt, daß das Enzym identische Untereinheiten enthält. Durch Sedimentationsgleichgewichtsanalyse in Guanidinhypochlorid und durch Dodecylsulfat-Elektrophorese wurde die Masse der Untereinheiten zu 73 kDa bestimmt (Kuno et al., 1985). Jede Untereinheit bindet ein Molekül FMN, FAD und einen Fe_4S_4 -Cluster.

Die Elektronenmikroskopie negativ kontrastierter Enoatreduktase deutet auf ein Protein hin, das ein Dodekamer (Tetramer aus Trimeren) mit Tetraedersymmetrie ist (Caldeira et al., 1996).

4.1.2 Motivation für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Untersuchungen zur Strukturaufklärung der Enoatreduktase mittels Röntgenkristallographie werden von Dr. S. Steinbacher am MPI für Biochemie, Abteilung für Strukturforschung, Martinsried durchgeführt.

Die Enoatreduktase kristallisiert u. a. in einer triklinen Modifikation mit der Raumgruppe P_1 mit Einheitszellendimensionen $a = 162 \text{ \AA}$, $b = 163 \text{ \AA}$, $c = 257 \text{ \AA}$, $\alpha = 71^\circ$, $\beta = 72^\circ$, $\gamma = 60^\circ$ (Steinbacher, persönliche Kommunikation). Zu Beginn dieser Arbeit standen native Datensätze bis zu einer Auflösung von $3,1 \text{ \AA}$ zur Verfügung. Jedoch lagen noch keine Schwermetallderivate vor, die für die Lokalisation des Proteins in der Elementarzelle nach der Methode des „Isomorphen Ersatzes“ (single/multiple isomorphous replacement SIR/MIR) geeignet waren. So konnte z. B. ein vorhandener Ta-Derivat wegen Nichtisomorphie bzw. wegen des Vorhandenseins von 29 Schweratomlagen in der Zelle zur Lösung des Phasenproblems nicht eingesetzt werden. Daher wurde folg. Vorgehensweise gewählt: es sollte mittels Negativkontrastierung und/oder Kryoelektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion ein Molekülmodell aufgestellt werden, das dann als Startmodell in Kombination mit der Raumgruppeninformation aus nativen Beugungsdaten und Symmetrieinformation aus der Pattersonanalyse für die Lokalisierung des Moleküls in der Zelle, bzw. für die Phasierung der Röntgendaten eingesetzt werden sollte.

4.1.3 Ergebnisse

Negativkontrastierung:

Abb. 91 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierter Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* ($\approx 50 \text{ \mu g/ml}$, kontrastiert mit 1 % - 2 % Uranylacetat). Die Einzelpartikel zeigen eine rel. homogene Größenverteilung (Durchmesser ca. $14 \text{ nm} - 16 \text{ nm}$), wobei viele Projektionen eine zwei- oder

dreizählige Rotationssymmetrie besitzen (siehe z. B. Pfeile in Abb. 91); teils treten Projektionen mit einem stauingefüllten zentralen Bereich auf (siehe z. B. schwarzer Pfeil in Abb. 91), teils aber auch ohne stauingefüllten zentralen Bereich (siehe z. B. weißer Pfeil in Abb. 91).

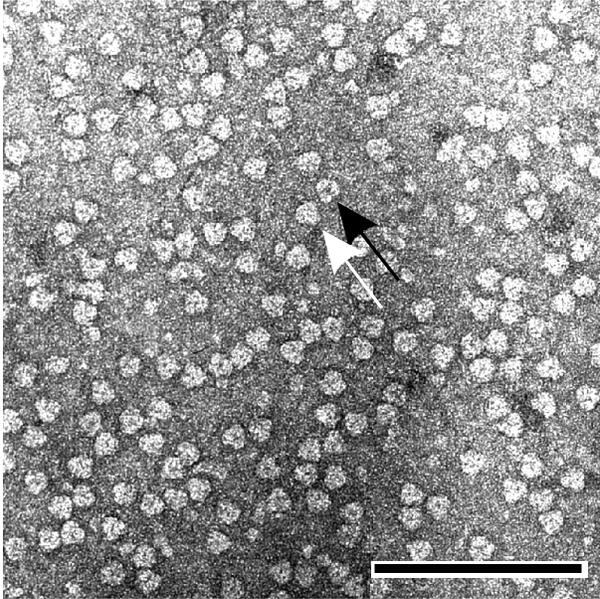


Abb. 91: Enoatreduktase, negativ kontrastiert. Balken 100 nm.

Alle Aufnahmen negativ kontrastierter Enoatreduktase wurden bei einer nominellen Vergrößerung von 50000 am ‚JEOL 2010‘ Transmissions-Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV durchgeführt. Nach Digitalisierung der Negative (Pixelgröße 20 μm , d. h. 3,7 Å auf der Objektebene, da mittels Katalasekristallen die wahre Vergrößerung als 54000 festgestellt wurde) und Partikelextraktion wurden 19726 Projektionen der Einzelpartikelanalyse unterzogen.

Nach Normierung und Bandpaßfilterung (außerhalb 1 nm und 21 nm) wurde zur Zentrierung der Projektionen eine Multireferenz-Translationsalignierung anhand 13 Kreisreferenzen mit Durchmessern von 9 nm bis 21 nm durchgeführt; die große Anzahl an Kreisreferenzen wurde gewählt, um den (rel. subjektiven) Eindruck der homogenen Größenverteilung zu verifizieren.

Abb. 92 zeigt das Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung. Die rel. homogene Größenverteilung der Einzelpartikel spiegelt sich auch im Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung wieder, da lediglich auf 5 Kreisreferenzen zwischen 12 nm - 16 nm eine Alignierung stattfindet.

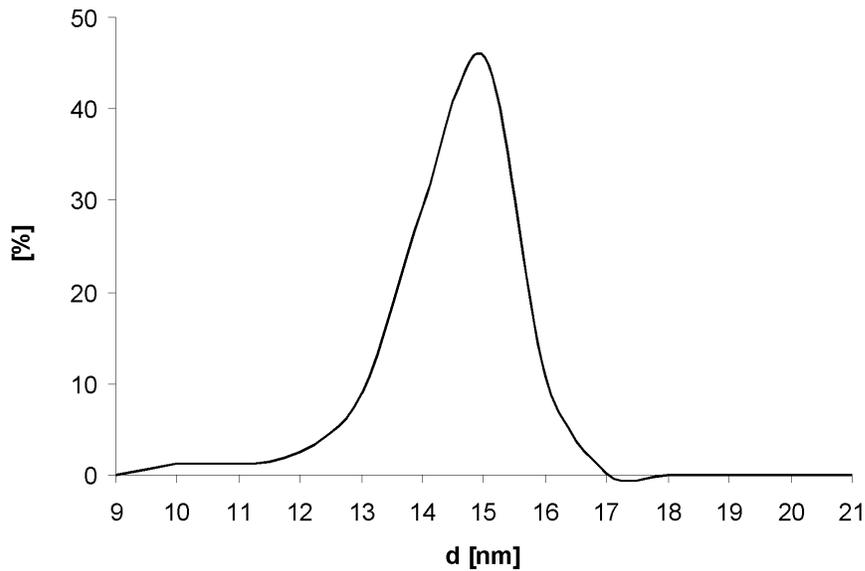


Abb. 92: Ergebnis der Multireferenz-Translationsalignierung von Enoatreduktase. Die Abszisse gibt den Durchmesser der Kreisreferenzen wieder, die Ordinate den prozentualen Anteil der Partikel, die auf die jeweilige Referenz aligniert wurden.

Nach einer ersten Multivariaten Statistischen Analyse der normierten, gefilterten und zentrierten Projektionen ergaben die Eigenbilder, daß eine dreizählige Rotations-symmetrie der Projektionen ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal darstellt (siehe Abb. 93, Eigenbilder #2 und #3); darüber hinaus zeigte sich durch die MSA die Signifikanz der maximal ersten 24 Eigenvektoren, weshalb anhand dieser Eigenvektoren klassifiziert wurde.

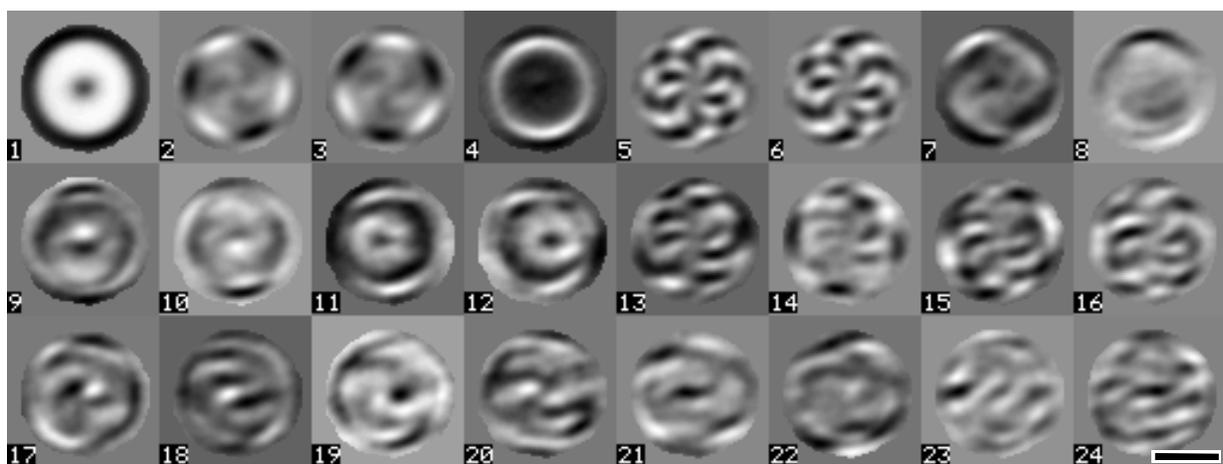


Abb. 93: Ergebnis der Multivariaten Statistischen Analyse des normierten, gefilterten und zentrierten Datensatzes von Enoatreduktase; gezeigt sind die ersten 24 Eigenbilder. Balken 10 nm.

Durch eine Eigenwertanalyse (d. h. Klassifizierung in je 12 Klassen anhand je einem der 24 Eigenvektoren und Berechnung der Mittelungsbilder) wurden 7 Mittelungsbilder ausgewählt (Abb. 94), die für eine Multireferenz-Rotationsalignierung verwendet wurden.

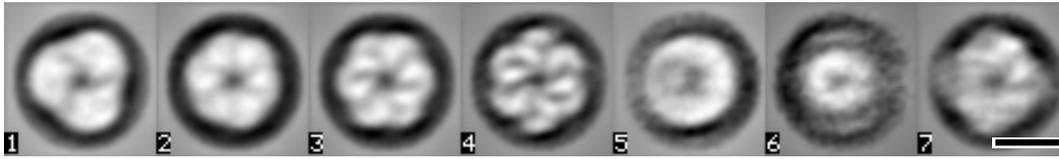


Abb. 94: Referenzen zur Multireferenz-Rotationsalignierung. Balken 10 nm.

Abb. 95 zeigt, daß bei der Multireferenz-Rotationsalignierung mehr als 50 % des gesamten Datensatzes auf die erste Rotationsreferenz aus Abb. 94, die eine ausgeprägte dreizählige Rotationssymmetrie besitzt, aligniert wurde.

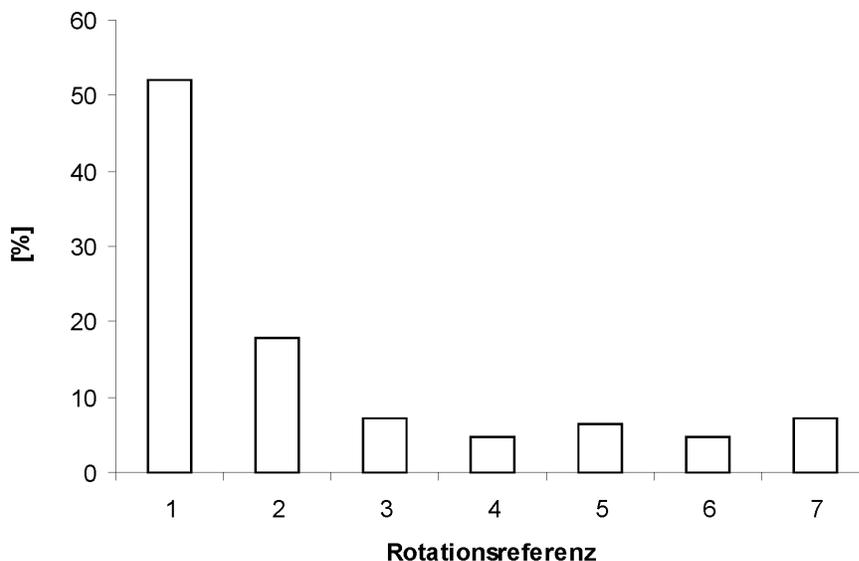


Abb. 95: Ergebnis der Multireferenz-Rotationsalignierung des Enoatreduktase Datensatzes anhand der sieben Referenzen aus Abb. 5.4. Mehr als 50 % aller Projektionen wurden auf die Rotationsreferenz #1 aligniert.

Nach Multivariater Statistischer Analyse (MSA) wurde jeder Datensatz in 12 Klassen anhand der ersten 24 Eigenvektoren klassifiziert und Klassensummen berechnet (Abb. 96). Eine anschließende (Rotations- und Translations-) Alignierung mit der

jeweiligen (maskierten) Klassensumme, MSA und Klassifizierung in je 3 Klassen ergab 36 Klassen(mittelungen) (Abb. 97).

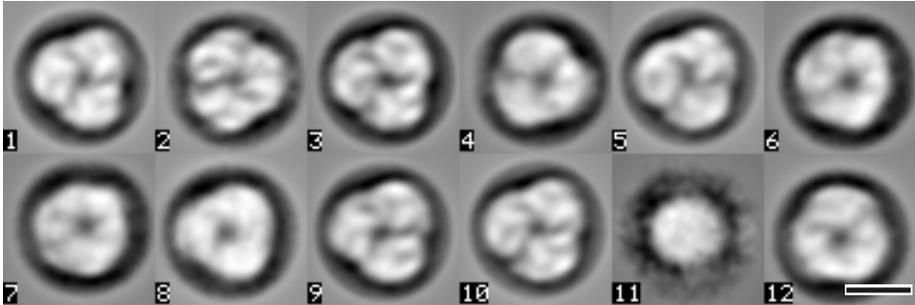


Abb. 96: Klassifizierung des Enoatreduktase Datensatzes in 12 Klassen. Balken 10 nm.

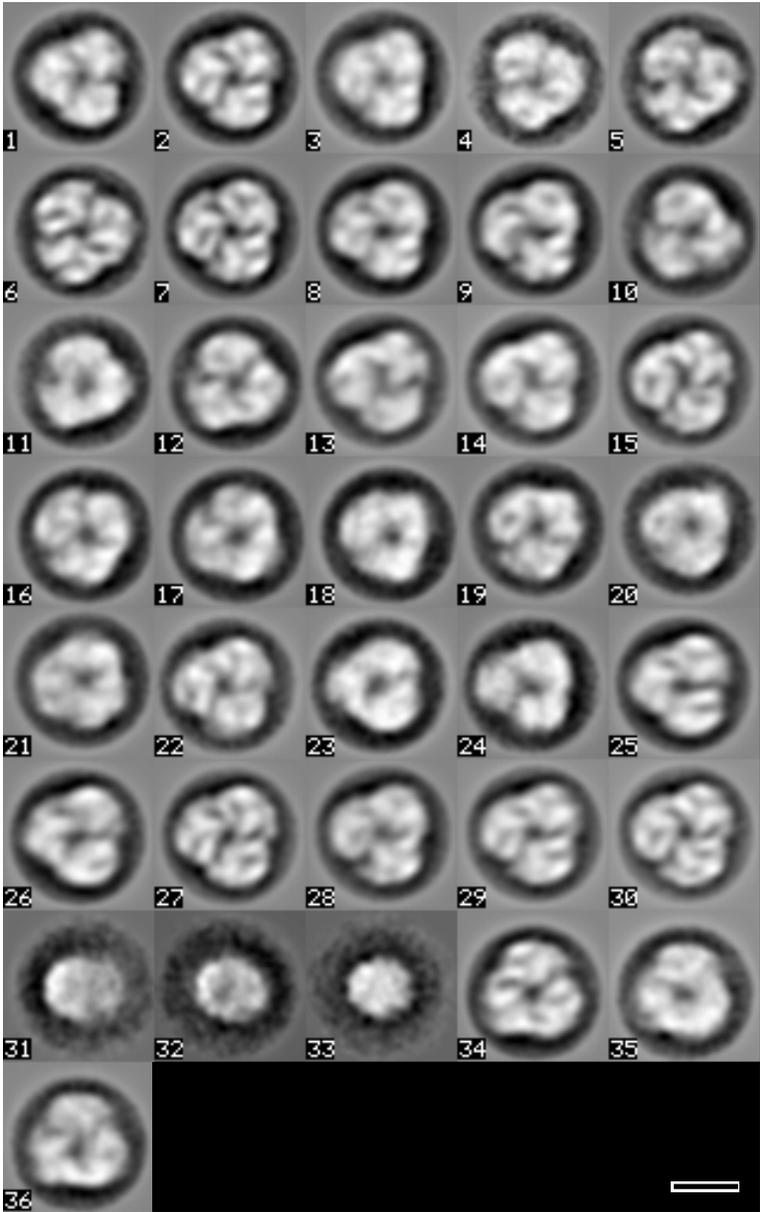


Abb. 97: Klassifizierung des Enoatreduktase Datensatzes in 36 Klassen. Balken 10 nm.

Die Klassenmittlungen in Abb. 97 zeigen eine Größe von ca. 16 nm (abgesehen von den Klassenmittlungen #31, #32 und #33, mit einer Größe von ca. 10 nm), teils mit einer deutlichen dreizähligen Rotationssymmetrie und Händigkeit (z. B. #6 und #7). Ausgehend von einem 3D-Objekt mit Tetraedersymmetrie, wie dies für Enoatreduktase vermutet wird (Caldeira et al., 1996), ergeben sich bei Molekülprojektionen u. U. zwei- und dreizählige Rotationssymmetrien, wie dies in Abb. 98(a), (b) anhand eines Tetraeders verdeutlicht ist. Abgesehen von den Klassenmittlungen #31, #32 und #33 haben alle Klassenmittlungen einen mehr oder weniger staingefüllten zentralen Bereich geringerer Proteindichte, wie dies in Abb. 98(c) anhand eines Tetraeders aus kugelförmigen Trimeren verdeutlicht ist.

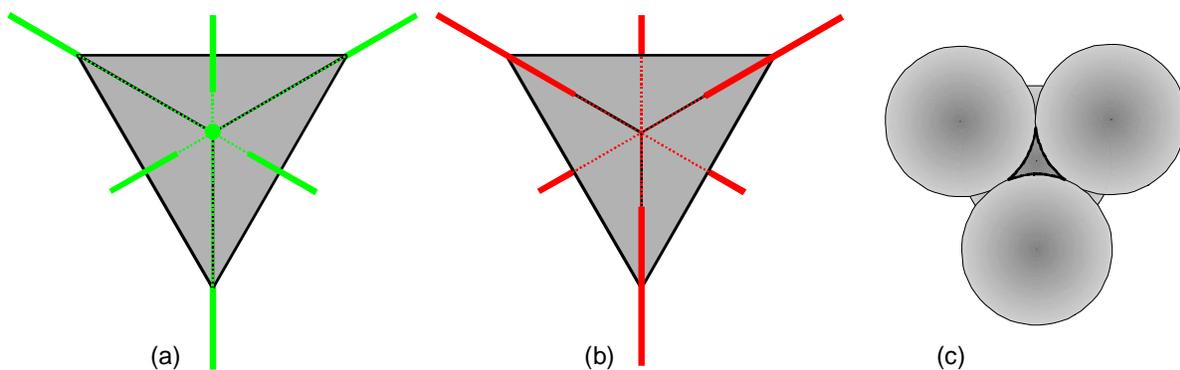


Abb. 98: Symmetrie eines Tetraeders. (a) vier - grüne - dreizählige Rotationsachsen (jeweils bestimmt durch eine Ecke und die Mitte der gegenüberliegenden Tetraederseite), (b) drei - rote - zweizählige Rotationsachsen (jeweils bestimmt durch die Mittelpunkte zweier gegenüberliegenden Kanten). Im Raum zwischen den (hier kugelförmigen) Trimeren des Tetraeders existiert ein Hohlraum, der durch das Kontrastierungsmittel aufgefüllt werden kann (c).

Zur Auflösungsbestimmung der Mittelungsbilder aus Abb. 97 wurde das S-Bild Kriterium verwendet, wonach sich z. B. für Klasse #7 eine Auflösung von ca. 2,5 nm ergibt (Abb. 99); die Auflösung variiert um $\pm 0,3$ nm je Klassensumme.

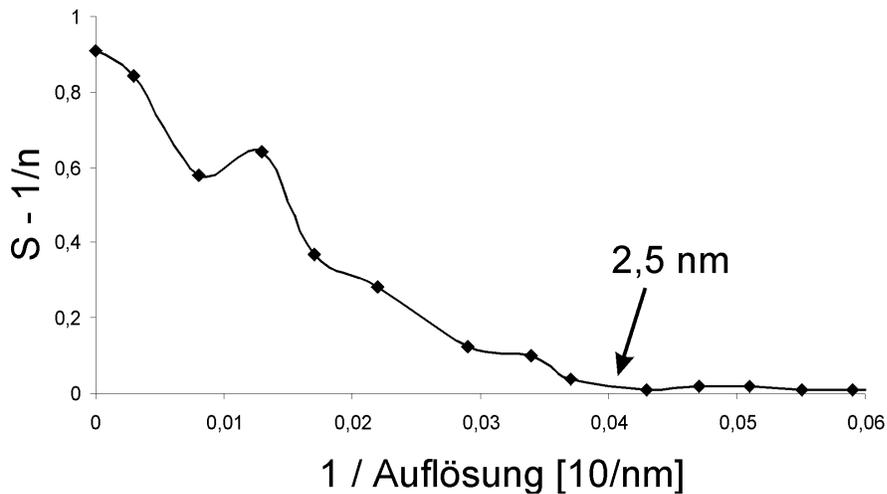


Abb. 99: Auflösungsbestimmung einer Klassenmittelung nach dem S-Bild Kriterium. Die betrachtete Klasse ist Klassenmittelung #7 (vgl. Abb. 97) mit 637 Bildern, die zur Mittelung beitragen. Die Ordinate gibt das „modifizierte S-Bild“ wieder, d. h. S-Bild abzüglich (1/Anzahl der Bilder, die zur Mittelung beitragen).

Als alternative Bildverarbeitungsmethode wurde auch hier die Invariante Klassifizierung verwendet; dabei wurden die normierten, gefilterten und zentrierten Projektionen in 48 Klassen klassifiziert und die Klassenmittelungen berechnet (Abb. 100). Es ergab sich bzgl. Größe, Symmetrie, Form und Händigkeit eine gute Übereinstimmung mit der eigenwertbasierten Bildanalyse (vgl. z. B. Klassenmittelung #7 aus Abb. 97 mit Klassenmittelung #15 aus Abb. 100).

Mithilfe der Methode der angular reconstitution wurde ein drei-dimensionales Modell der Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* berechnet, die auf den Mittelungsbildern aus Abb. 97 basiert (unter Vernachlässigung der Klassensummen #31, #32 und #33, u. a. da diese aus Gründen der Sinogrammkorrelation nicht vom selben 3D-Objekt stammen können). Abb. 101 zeigt Darstellungen der drei-dimensionalen Rekonstruktion unter Annahme einer tetrahedralen Symmetrie und einer Proteinmasse von ca. 950 kDa (Proteindichte = 844 Da/nm³); die Symmetrieminformation kommt erst bei der drei-dimensionalen Rekonstruktion zum tragen, nicht bei der Berechnung der Klassenmittelungen. Die Fourier shell correlation FSC ergab für die Auflösung der elektronenmikroskopischen Rekonstruktion ca. 3,5 nm.

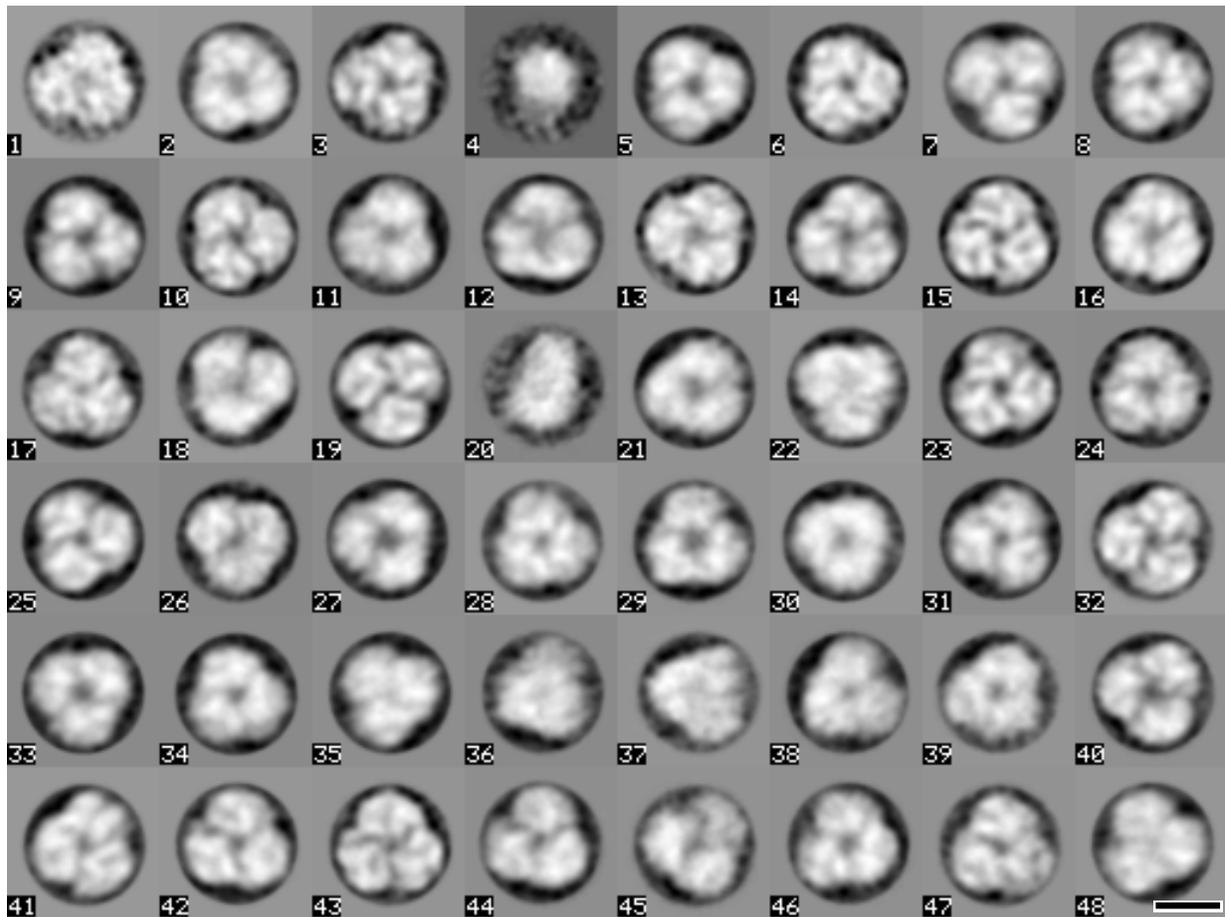


Abb. 100: Invariante Klassifizierung des Enoatreduktase Datensatzes in 48 Klassen.
Balken 10 nm.

Die dreizählige Rotationssymmetrie des Moleküls wird, neben den elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus der Selbstkorrelationsfunktion der (unrotierten und rotierten) Pattersonfunktionen gefolgert (Steinbacher, persönliche Kommunikation). Die Pattersonfunktion, die man direkt aus den gemessenen Röntgenbeugungsintensitäten (ohne Phasen) berechnen kann, gibt alle zwischenatomaren Vektoren inkl. Ihrer Symmetrieeigenschaften in Form einer Pseudoelektronendichtekarte wieder. Die Vektoren werden in Polarkoordinaten vom Ursprung aus abgetragen; die Werte der Pattersonfunktion sind durch das Produkt aus Formfaktoren der beteiligten Atome gegeben. Aus Rotationskorrelationsanalysen kann Aufschluß über lokale Symmetrien erhalten werden. Die Pattersonfunktion liefert grundsätzlich keine Information über Translationsparameter einzelner Atome. Dreht man für Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* eine Kopie der Pattersonfunktion mit dreizähliger Rotationssymmetrie um 120° , dann bekommt man eine hohe Korrelation zur

ursprünglichen Pattersonfunktion (Abb. 102); dies weist auf eine dreizählige bzw. tetrahedrale Symmetrie der Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* hin.

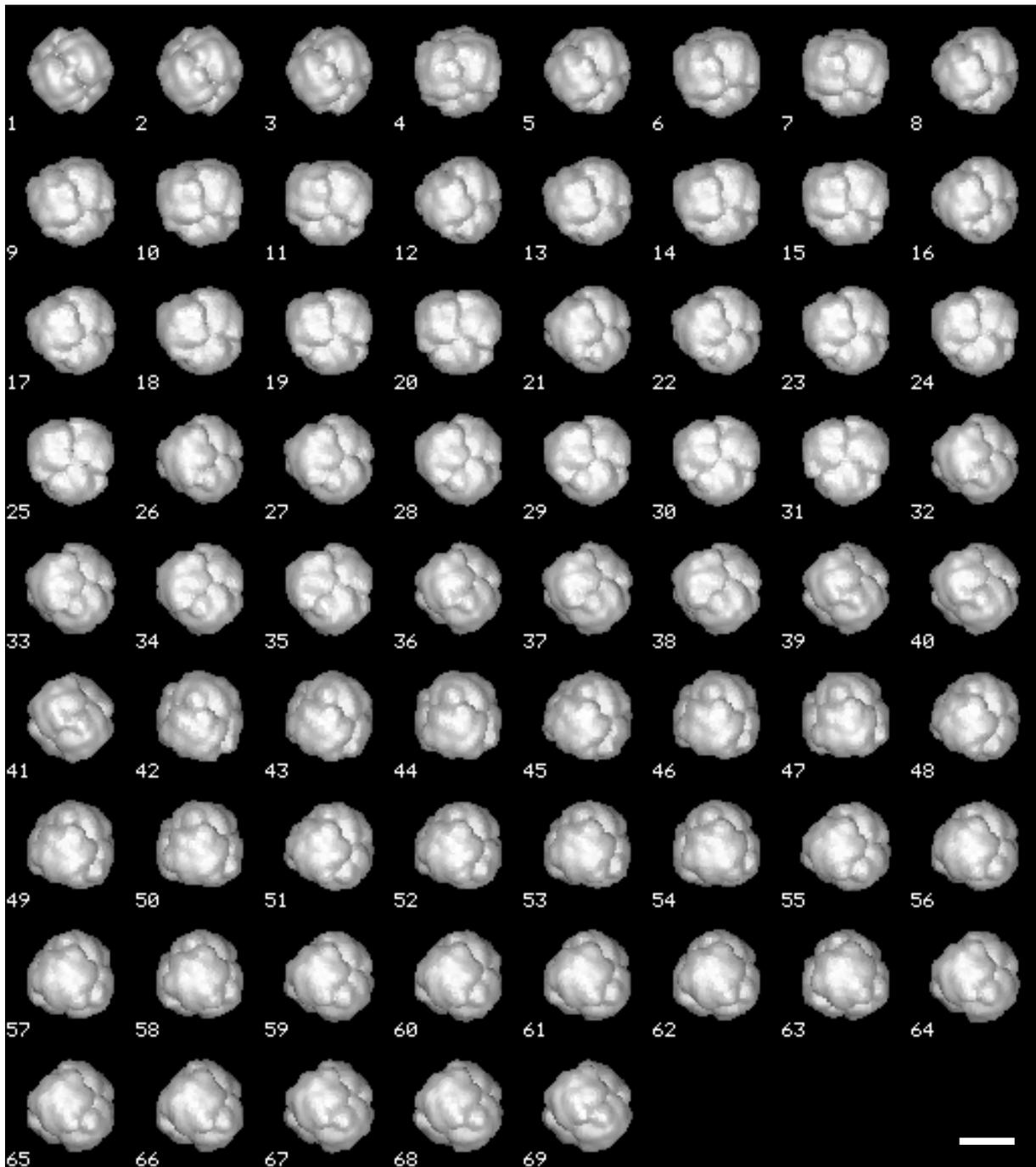
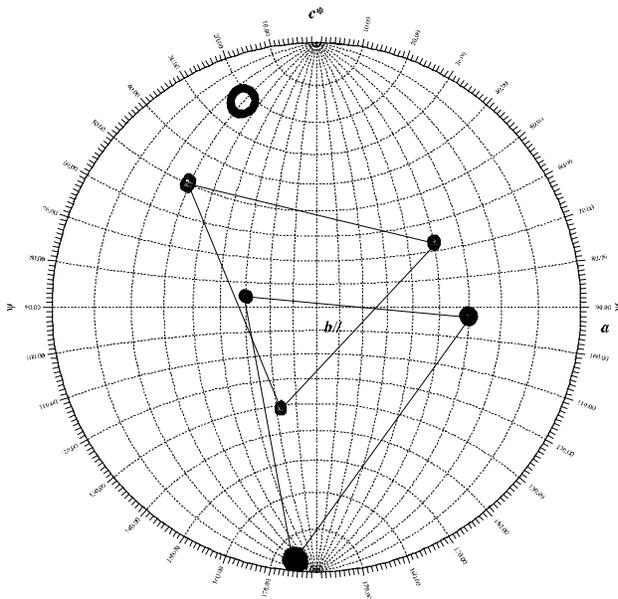


Abb. 101: Drei-dimensionale Rekonstruktion von Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum*, unter Annahme der tetrahedralen Symmetrie. Balken 10 nm.



$\kappa = 180.00$

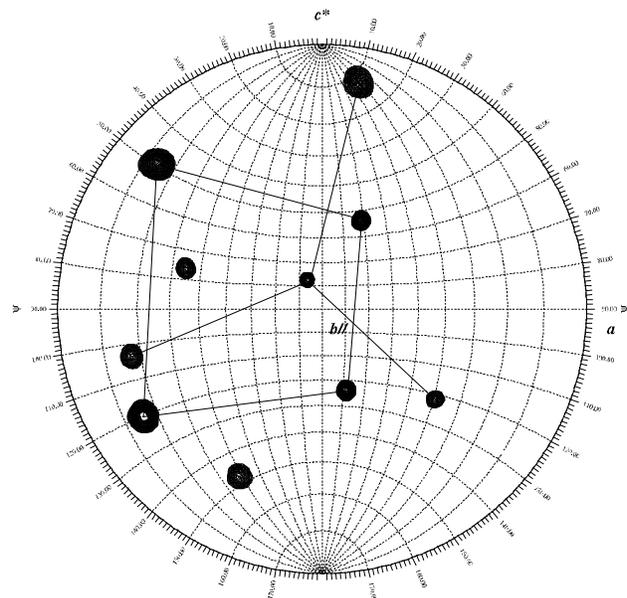
Search Information :

Search Angle: Polar, Conversion: NZK
 Search Limits:
 Angle 1 : 0.00 89.00 1.00000
 Angle 2 : 0.00 89.00 1.00000
 Angle 3 : 0.00 89.00 1.00000
 Max. Dev. : 0.00 0.00 0.00
 Radius : 54.00, RCFVAL : 2
 Resolution : 20.00 - 5.00A
 Optimization : AXABZ
 Origin is removed
 A OBS File : /sachs/strach/strachheader.ref

A Cell : 162.83 163.71 257.81 71.84 72.77 60.78
 A Cutoff : 0.05 0.05 0.00
 No. of Refl. : 0
 Self-Rotation Search
 Cutoff : 1.00
 No. of large terms : 0
 Reverse : -14.6 20.0
 Contour Levels:
 Contour 1 : 20.00 511.9 11.0 1

15-Aug-00 09:53:28

PROGRAM GLRF



$\kappa = 120.00$

Search Information :

Search Angle: Polar, Conversion: X/K
 Search Limits:
 Angle 1 : 0.00 80.00 1.0018
 Angle 2 : 0.00 80.00 1.0018
 Angle 3 : 120.00 70.00 1.0018
 Max. Dev. : 0.00 0.00 0.00
 Radius : 54.00, RCFVAL : 2
 Resolution : 20.00 - 5.00A
 Optimization : AXABZ
 Origin is removed
 A OBS File : /sachs/strach/strachheader.ref

A Cell : 162.83 163.71 257.81 71.84 72.77 60.78
 A Cutoff : 0.05 0.05 0.00
 No. of Refl. : 0
 Self-Rotation Search
 Cutoff : 1.00
 No. of large terms : 0
 Reverse : -14.6 20.0
 Contour Levels:
 Contour 1 : 342.0 571.7 19.2 1

Abb. 102: Selbstrotationsfunktionen für zweizählige (links oben) und dreizählige (rechts unten) Achsen. Bei einer Selbstrotationsfunktion werden die Pattersonfunktion und die rotierte Pattersonfunktion korreliert.

Das Modell der 3D-Rekonstruktion der Enoatreduktase zeigt ein nahezu globuläres Molekül mit Tetraedersymmetrie mit ca. 16 nm Durchmesser. Die räumliche Lage einiger Eulerwinkel wird durch Abb. 103 verdeutlicht; offensichtlich adsorbiert das Molekül auf die hydrophile Kohlefolie vorzugsweise (> 50 %) mit einer der imaginären Tetraederflächen parallel zur Trägeroberfläche, bzw. mit einer der dreizähligen

Rotationsachsen senkrecht zur Unterlage. Abb. 104 zeigt zentrale Schnitte durch die drei-dimensionale Rekonstruktion, in denen v. a. der staingefüllte zentrale Bereich zu erkennen ist (siehe z. B. #19 - #37).

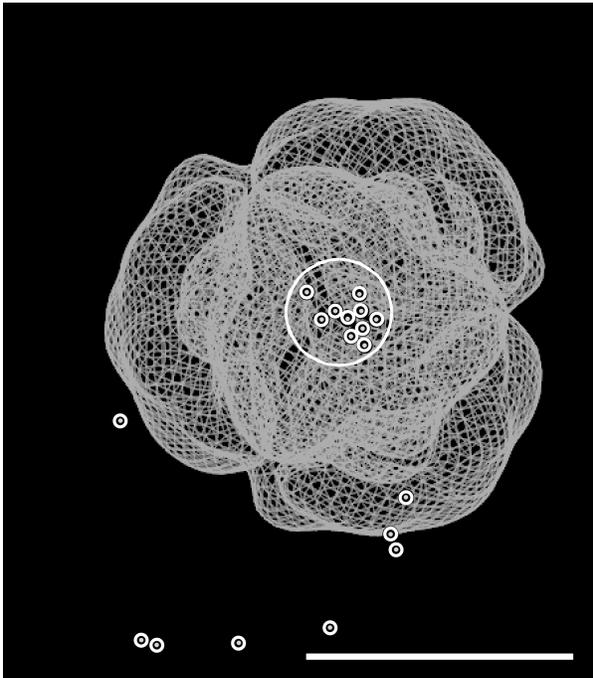


Abb. 103: Verteilung einiger Eulerwinkel der drei-dimensionalen Rekonstruktion von Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum*. Jede Klassenmittelung bzw. jeder Eulerwinkel wird durch einen Punkt repräsentiert, wobei die Lage der Punkte bezüglich der Rekonstruktion die Projektionsrichtungen widerspiegelt. Das Molekül adsorbiert auf die hydrophile Kohlefolie vorzugsweise mit einer der Tetraederflächen parallel zur Kohleoberfläche; dies gilt für sämtliche Klassenmittelungen, die innerhalb des weißen Kreises liegen. Balken 10 nm.

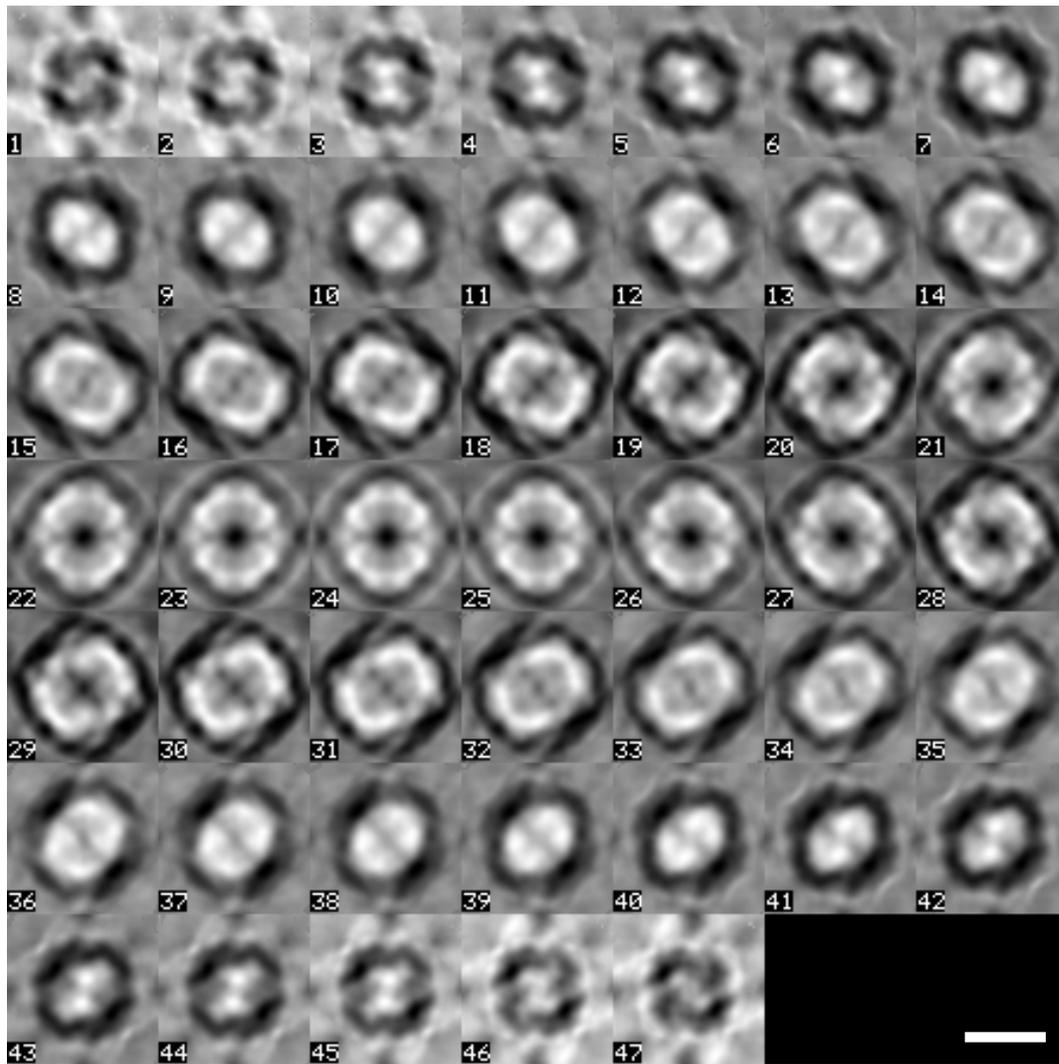


Abb. 104: Zentrale Schnitte durch die drei-dimensionalen Rekonstruktion von Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum*. Balken 10 nm.

Abb. 105(a) zeigt eine Ansicht des 3D-Modells, wobei eine der Tetraederflächen auf der Trägeroberfläche liegt. Die Rückprojektion dieser Ansicht ist in Abb. 105(b) gezeigt; die Rückprojektion stimmt bzgl. Größe, Symmetrie, Form und Händigkeit gut mit den Klassenmittelungen überein, die in die 3D-Rekonstruktion eingehen (z. B. Abb. 97, Klassenmittelung #7).

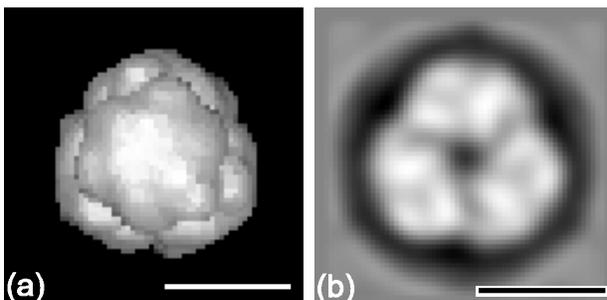


Abb. 105: Ansicht (a) des 3D-Modells der Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* und dessen Rückprojektion (b). Balken 10 nm.

Kryoelektronenmikroskopie:

Abb. 106 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von vitrifizierter Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* ($\approx 1000 \mu\text{g/ml}$). Zum Einfrieren wurde eine einfache Fallguillotine benutzt. An einer Pinzette hängend, wurde mit dem biologischen Objekt befeuchteter Objektträger (Quantifoil Lochfolie; Ermantraut et al., 1988) in Ethan eingeschossen, wobei das Ethan mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Als Kryohalter wurde ein Gatan 626 Halter benutzt, der auf -180°C abgekühlt werden konnte.

Die Vitrifizierung wurde anhand des Elektronenbeugungsbildes beurteilt. Die Aufnahme der Enoatreduktase wurde bei einer nominellen Vergrößerung von 40000 am ‚JEOL 2010‘ Transmissions-Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV unter Low-Dose Bedingungen durchgeführt. Nach Digitalisierung der Aufnahme (Pixelgröße $20 \mu\text{m}$, d. h. $4,7 \text{ \AA}$ auf der Objektebene da mittels Katalasekristallen die wahre Vergrößerung als 42000 festgestellt wurde) und interaktiver Partikelextraktion wurden 31 Partikelprojektionen der Bildverarbeitung unterzogen.

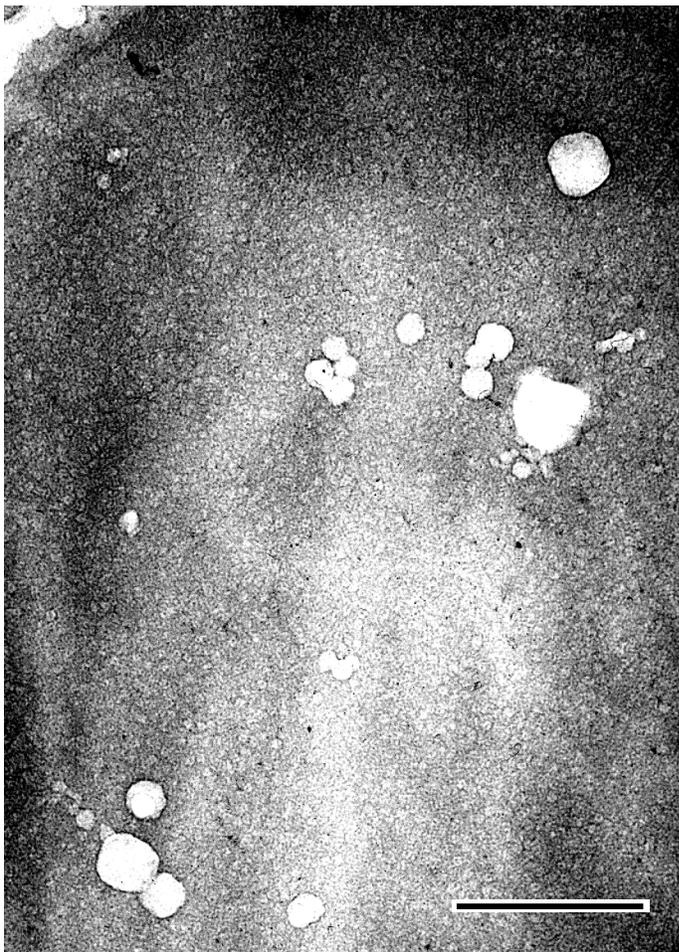


Abb. 106: Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum*, vitrifiziert eingefroren. Balken 300 nm.

Die ausgeschnittenen und normierten 31 Projektionen sind in Abb. 108(a) gezeigt. Eine Alignierung mit anschließender Multivariaten Statistischen Analyse (MSA) und Klassifizierung erübrigte sich, da es wegen der geringen Anzahl der Projektionen unwahrscheinlich erscheint, identische Ansichten des Moleküls in den 31 Projektionen zu finden. Im Gegensatz zur Adsorption auf einem Objektträger (z. B. Kohlefolie), bei der eine bevorzugte Orientierung des Moleküls auftreten kann, werden durch die Kryopräparation keine bevorzugten Orientierungen der Moleküle induziert. Damit beschränkt sich die Bildverarbeitungsprozedur in diesem Fall auf die Korrektur der Phasenkontrasttransferfunktion PCTF (siehe Kapitel 2.1.3) und anschließender drei-dimensionaler Rekonstruktion mittels angular reconstitution. Durch Vergleich der Summe der berechneten Beugungsbilder der 31 Projektionen mit einem berechneten Beugungsbild bzw. einer berechneten Übertragungsfunktion konnten mit SPIDER (Frank et al., 1981a; Frank et al., 1996) u. a. Werte für den Defokus und das Abklingverhalten der Übertragungsfunktion zu hohen Frequenzen gefunden werden. Abb. 107 zeigt die Summe der Beugungsbilder (a), das gefittete Beugungsbild (b) und die gefittete Übertragungsfunktion (c). Abb. 108(b) zeigt die Projektionen nach Korrektur des Vorzeichens der Übertragungsfunktion, Abb. 108(c) zeigt die Projektionen nach Korrektur des Vorzeichens und des Absolutbetrages der Übertragungsfunktion.

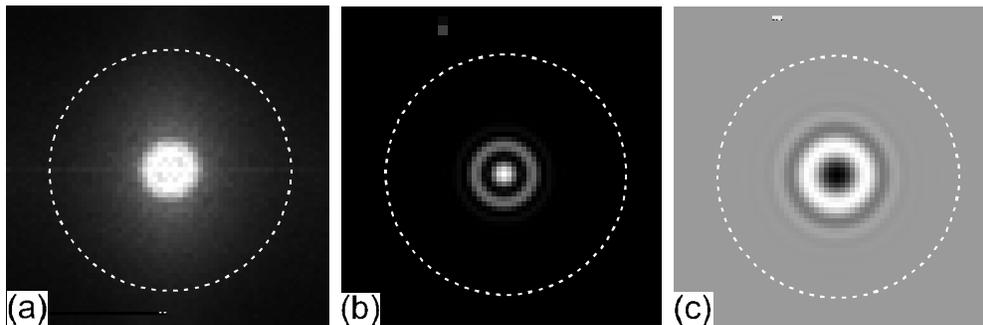


Abb. 107: Summe der 31 Beugungsbilder (a), das gefittete Beugungsbild (b) und die gefittete Übertragungsfunktion (c). Die gestrichelten Kreise markieren 1,25 nm.

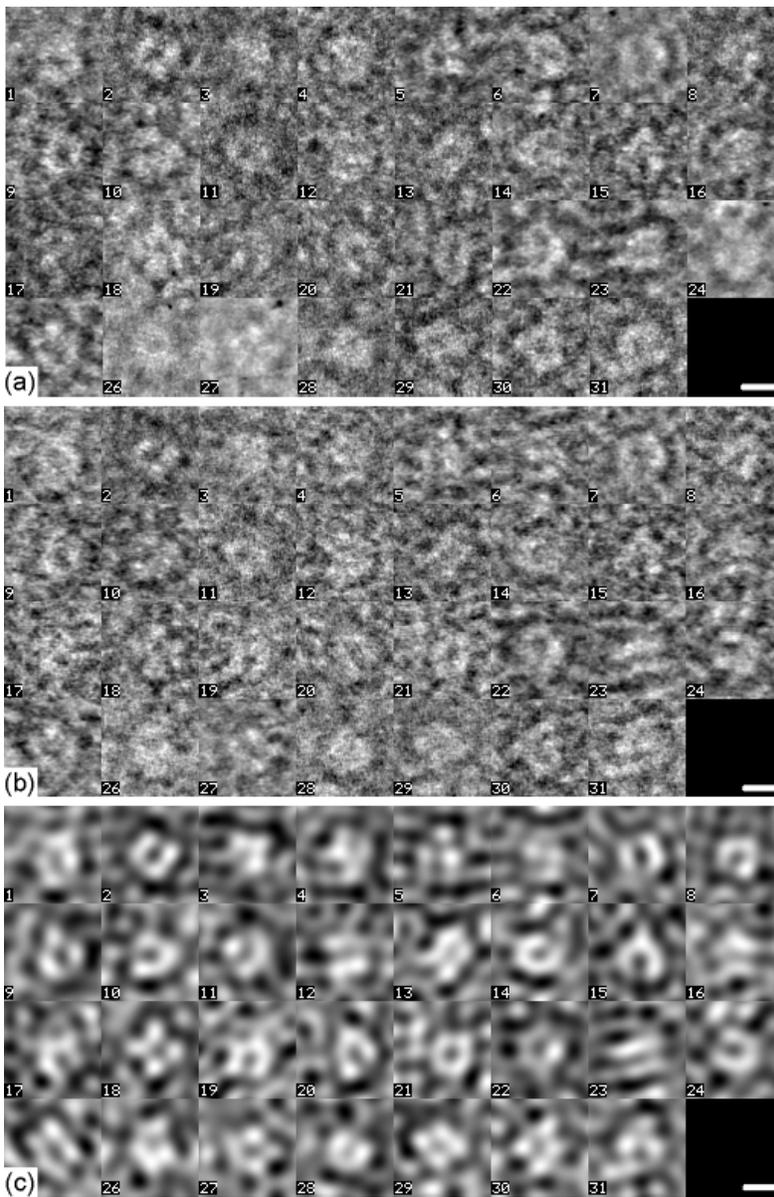


Abb. 108: Projektionen von vitrifiziert eingefrorenen Enoatreduktase Partikeln. Die ausgeschnittenen und normierten 31 Projektionen sind in (a) gezeigt; (b) zeigt die Projektionen nach Korrektur des Vorzeichens der Übertragungsfunktion; (c) zeigt die Projektionen nach Korrektur des Vorzeichens und des Absolutbetrages der Übertragungsfunktion. Balken 10 nm.

Während bei den unkorrigierten 31 Projektionen Partikelgrößen von ca. 13 nm - 17 nm auftreten, sind nahezu keine Aussagen über deren Form und Struktur möglich. Dies gilt auch nach Korrektur des Vorzeichens der Übertragungsfunktion. Erst nach Korrektur des Vorzeichens und des Absolutbetrages der Übertragungsfunktion sind nicht nur genauere Aussagen über deren Größe möglich (keine prinzipiellen Veränderungen gegenüber unkorrigierten Projektionen), sondern auch über deren

Form und Struktur: es zeigen sich v. a. Projektionen mit Spiegelsymmetrie („Hufeisenform“) und vergleichsweise geringer Masse im Molekülzentrum (z. B. #24 und #2 in Abb. 108(c)).

Durch angular reconstitution ergeben sich drei-dimensionale Rekonstruktionen der Projektionen aus Abb. 108(a) bzw. Abb. 108(c), d. h. ohne bzw. mit PCTF-Korrektur, jeweils unter Anwendung der tetrahedralen Symmetrie. Die Rekonstruktion ohne PCTF-Korrektur (Abb. 109) ist bezüglich der Auflösung und des Signal/Rausch-Verhältnisses gegenüber der Rekonstruktion mit PCTF-Korrektur (Abb. 110) deutlich schlechter. Darüber hinaus zeigen sich „Satelliten“, d. h. Massen außerhalb des Objektes.

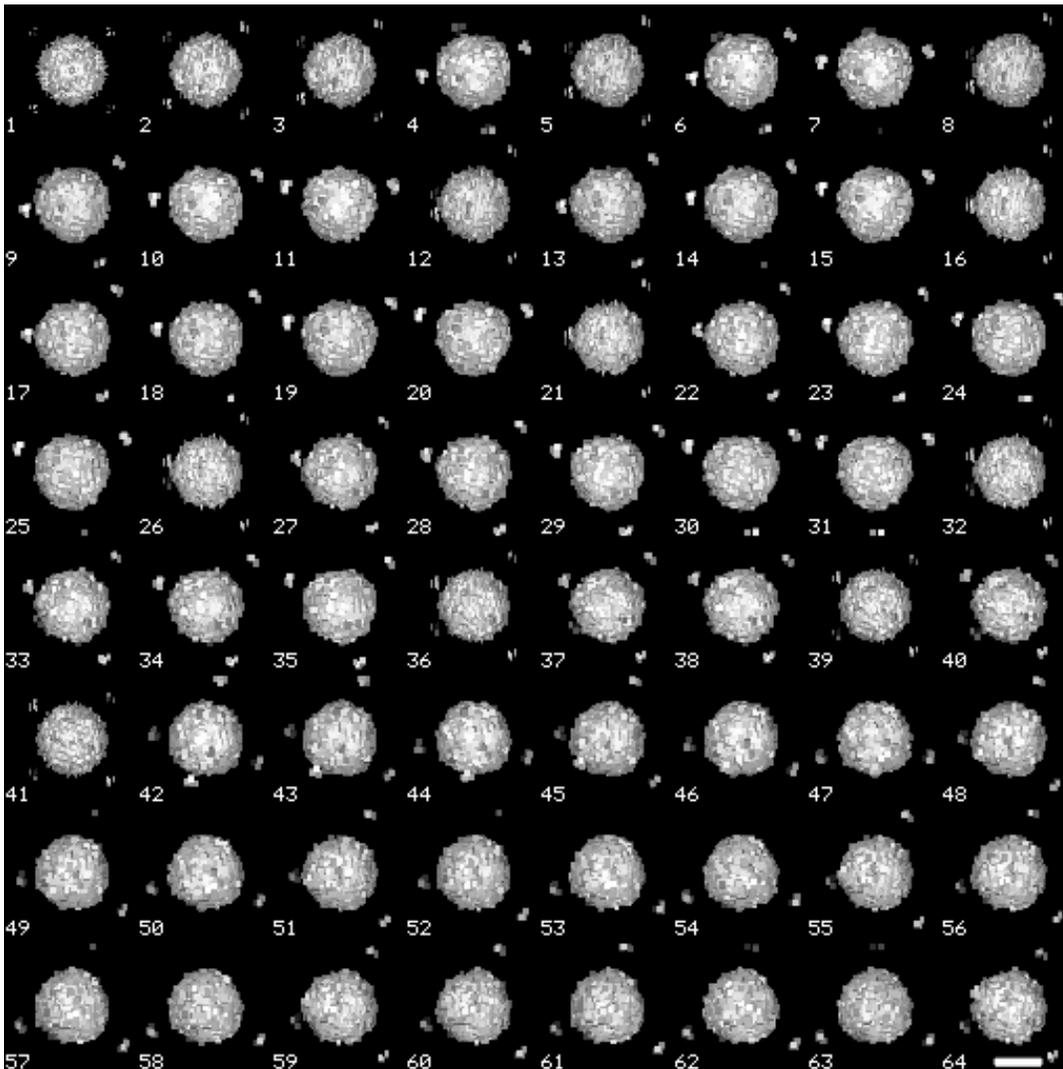


Abb. 109: Drei-dimensionale Rekonstruktion vitrifiziert eingefrorener Enoat reductase Partikeln aus *C. tyrobutyricum* mittels angular reconstitution, ohne Vorzeichen/Absolutwertkorrektur der Übertragungsfunktion, jedoch unter Anwendung der tetrahedralen Symmetrie. Balken 10 nm.

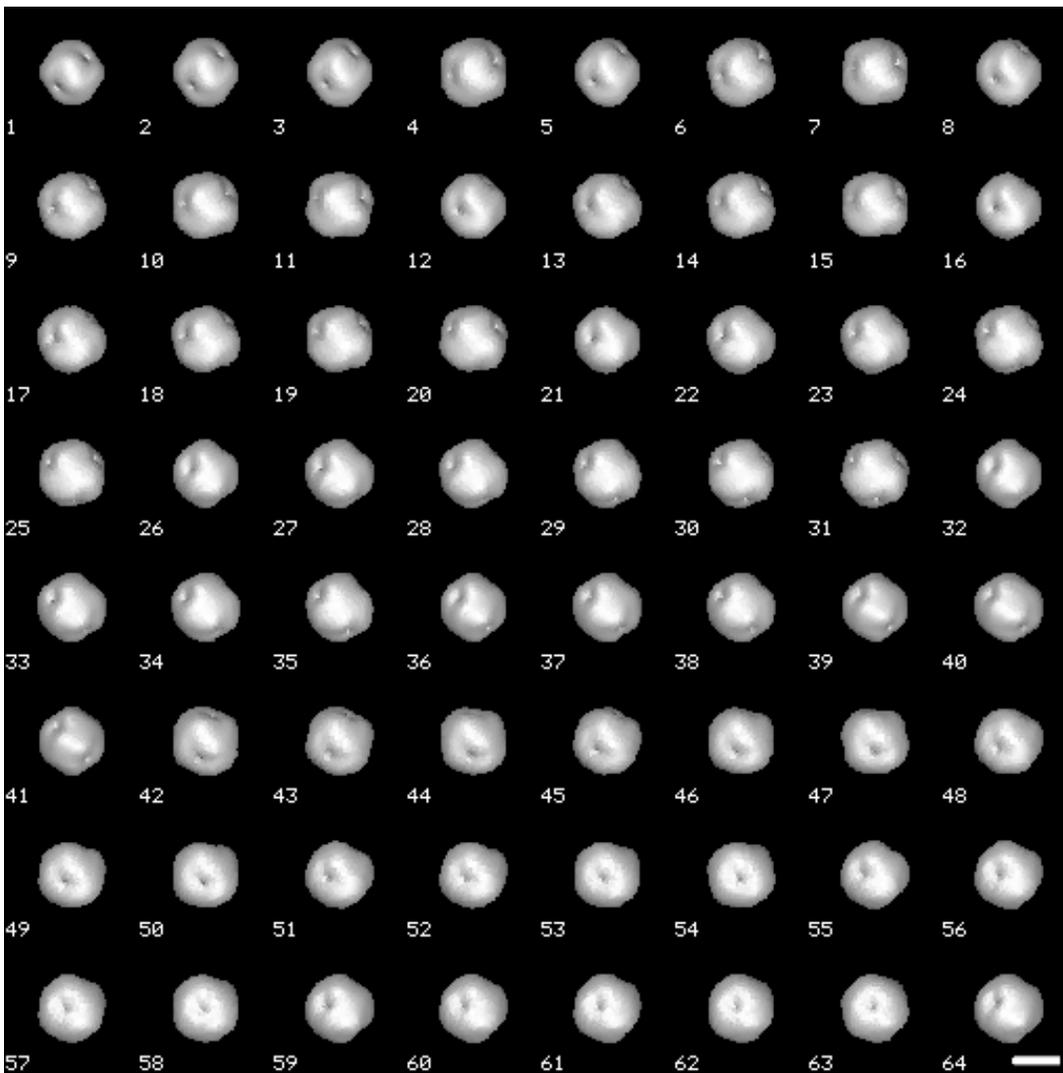


Abb. 110: Drei-dimensionale Rekonstruktion vitrifiziert eingefrorener Enoatreduktase Partikeln aus *C. tyrobutyricum* mittels angular reconstitution, mit Vorzeichen- und Absolutwertkorrektur der Übertragungsfunktion, ebenso unter Anwendung der tetrahedralen Symmetrie. Balken 10 nm.

Der Vergleich der Abb. 109 mit Abb. 110 macht deutlich, daß eine Korrektur der Phasenkontrasttransferfunktion kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen unerlässlich ist; dies wird durch das bessere Signal/Rausch-Verhältnis der 3D-Rekonstruktion deutlich, aber auch durch das Fehlen der sog. Satelliten und durch das Auftreten von Struktureigenschaften (z. B. „Einbuchtungen“), die in der „unkorrigierten“ 3D-Rekonstruktion gänzlich fehlen.

Die Problematik bei der Korrektur der Phasenkontrasttransferfunktion besteht jedoch in der Bestimmung bzw. im Fitten der Parameter für Defokus, Abklingverhalten, etc. aus der Summe der berechneten Beugungsbilder der Projektionen.

4.1.4 Diskussion

Das durch angular reconstitution an negativ kontrastierten Einzelmolekülen errechnete 3D-Modell zeigt Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* als ein globuläres Molekül mit Tetraedersymmetrie mit einem Durchmesser von ca. 16 nm (Abb. 111).

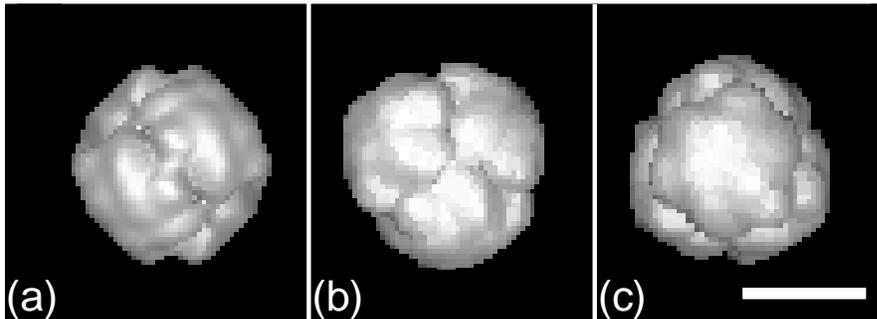


Abb. 111: Drei-dimensionale Rekonstruktion negativ kontrastierter Enoatreduktase Partikeln aus *C. tyrobutyricum* mittels angular reconstitution, mit PCTF-Korrektur und unter Anwendung der tetrahedralen Symmetrie. (a) Blickrichtung entlang einer zweizähligen Achse, (b) Blickrichtung entlang einer dreizähligen Achse auf eine Tetraederfläche, (c) Blickrichtung entlang einer dreizähligen Achse auf eine Tetraederspitze. Balken 10 nm.

In der triklinen Modifikation mit der Raumgruppe P_1 sind die Enoatreduktase Moleküle entsprechend einer „verzerrt hexagonalen Packung“ angeordnet, wobei - entsprechend der Pattersonanalyse - keine der lokalen Symmetrieachsen mit den kristallographischen Achsen zusammenfällt. Die asymmetrische Einheit (Einheitszelle) enthält zwei Enoatreduktase Moleküle.

Für die Bestimmung des Translationsvektors zwischen den zwei Molekülen in der Einheitszelle wurde das EM-Modell auf Position (0,0,0) der Elementarzelle gesetzt. Die korrekte Lage des zweiten Moleküls wurde in einem $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$ Volumen der Einheitszelle in zehn zyklischen Mittelungsschritten abgesucht. Diese Prozedur führte zur Phasierung eines niedrig-aufgelösten Datensatzes (bis $7,5 \text{ \AA}$) und zu einer

gut definierten Elektronendichtekarte , die dann als Modell für die Phasierung des 3,1 Å Datensatzes eingesetzt wurde.

Für die Durchführung der obigen Prozedur mußte die EM-Dichte invertiert, was darauf hindeutet, daß die EM-Negative möglicherweise konsistent „spiegel verkehrt“ digitalisiert wurden.

Abb. 112 zeigt Vergleiche des EM-Modells mit dem Röntgenstrukturmodell aus *Clostridium tyrobutyricum* bei 3,1 Å. Deutlich ist die gute Übereinstimmung der beiden Modelle zu erkennen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

mithilfe der hier vorgestellten Vorgehensweise (Elektronenmikroskopie negativ kontrastierter Einzelmoleküle, Bildverarbeitung mit Mittelung und anschließender drei-dimensionaler Rekonstruktion mittels angular reconstitution) konnte die Röntgenstrukturanalyse von Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* bei einer Auflösung von 3,1 Å gelöst werden - trotz der vergleichsweise geringen Auflösung des EM-Modells von ca. 3,5 nm.

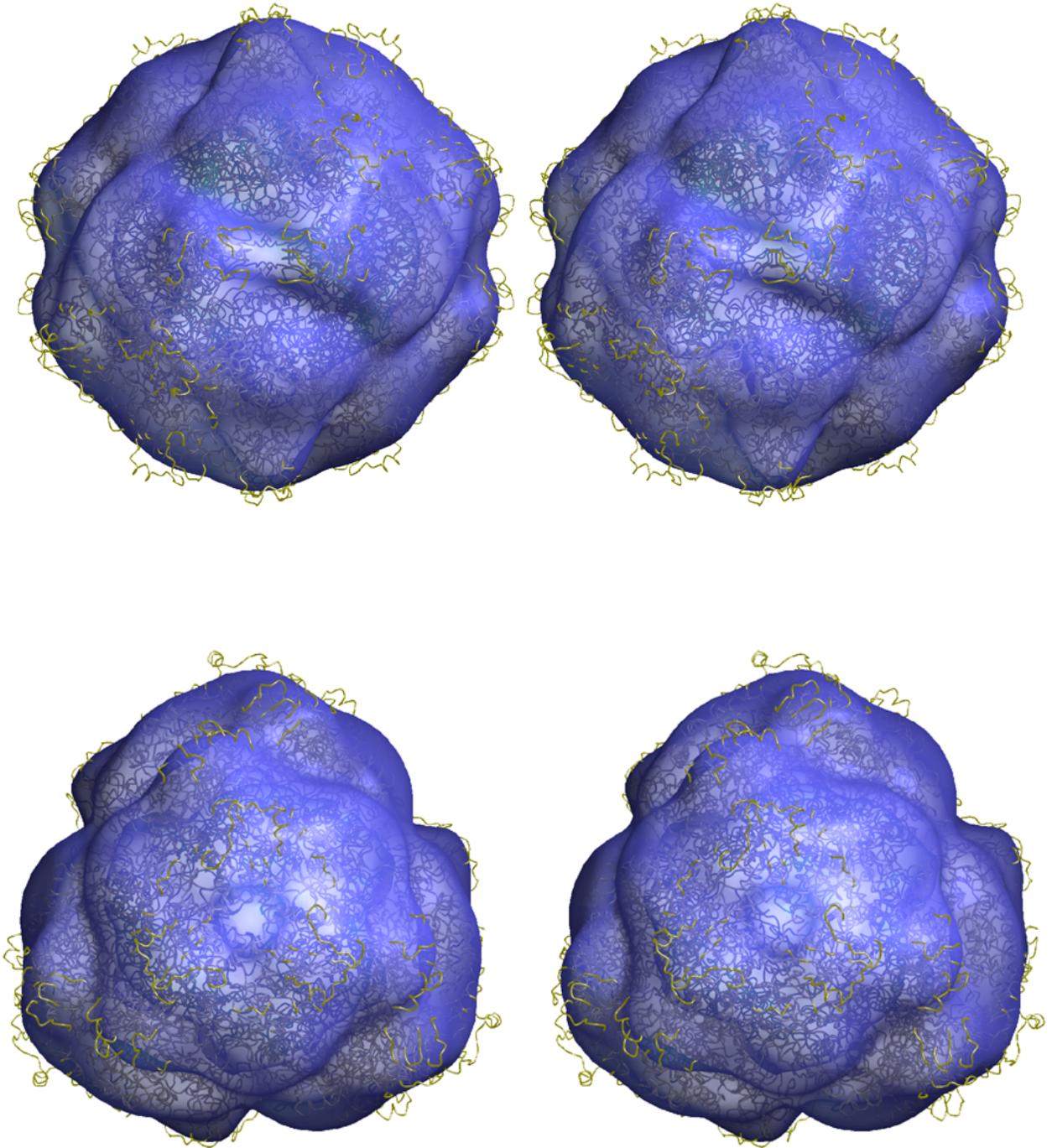


Abb. 112: Vergleich des EM-Modells (blau) durch Negativkontrastierung mittels angular reconstitution mit dem Röntgenstrukturmodell von Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* bei 3,1 Å in „wireframe“ Darstellung; (oben) Blickrichtung auf die zwei-zählige Rotationsachse, (unten) Blickrichtung auf die dreizählige Rotationsachse. Stereodarstellung.

4.2 GroE-Chaperon-System aus *E. coli*

4.2.1 Stand der Forschung, Fragestellung

Die Struktur eines Proteins, und damit seine Funktion, ist zwar in seiner Aminosäuresequenz festgelegt, der Weg zu dieser Struktur ist allerdings auch von anderen proteinspezifischen Faktoren und äußeren Faltungsbedingungen abhängig, u. a. von Faltungshelferproteinen (Kiefhaber et al., 1991; Horwich et al., 1993). Molekulare Chaperone bilden eine funktionelle Gruppe von nicht verwandten Proteinklassen, die die korrekte, nicht-kovalente Assemblierung (Faltung/Oligomerisierung) von anderen Polypeptiden in vivo assistiert. Die molekularen Chaperone werden sowohl unter physiologischen, als auch unter Streßbedingungen vermehrt exprimiert, was deren wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse und der Vermittlung von Streßtoleranz unterstreicht (Beißinger & Buchner, 1998). Neuere Untersuchungen belegen außerdem einen direkten Zusammenhang zwischen unkorrekt gefalteten Proteinen und einer wachsenden Anzahl von Krankheiten (z. B. Alzheimer, Kreuzfeld-Jakob-Syndrom), was molekulare Chaperone mehr in den Mittelpunkt des Interesses rückt (Carrell & Lomas, 1997).

Unter den fünf universalen Klassen von Chaperonen (Hsp70-, Hsp60-, Hsp90- und Hsp100-Proteinfamilien und kleine Hitzeschockproteine) ist das bakterielle GroE-System biochemisch und strukturell am besten charakterisiert. Es besteht aus GroEL und seinem Cochaperon GroES. Die Strukturen beider Proteine wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (Langer et al., 1992; Schmidt et al., 1994) und später mittels Röntgenstrukturanalyse (Braig et al., 1994; Hunt et al., 1996) geklärt.

GroEL ist ein Tetradekamer; 14 Untereinheiten mit je 547 Aminosäuren ($M_w = 57$ kDa) gruppieren sich in 2 Ringen aus jeweils 7 Untereinheiten. Die beiden Ringe sind Rücken an Rücken zusammengelagert, so daß die nach außen gerichteten Ringöffnungen identisch sind. GroEL besitzt eine zylindrische Struktur (Höhe 146 Å, Durchmesser 135 Å) mit einem zentralen Hohlraum mit einem Durchmesser von 45 Å.

GroES ist ein Heptamer aus 7 identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 10 kDa. Nach Röntgenstrukturanalyse bildet GroES eine „domförmige“ Ringstruktur (Durchmesser 75 Å, Höhe 35 Å) mit siebenfacher Rotationssymmetrie. GroES kann an die Enden des GroEL-Zylinders binden, wobei

diese Wechselwirkung von der Nukleotidbindung in den äquatorialen Domänen der GroEL Einheiten abhängig ist. Kryoelektronenmikroskopie (Roseman et al., 1996) und die Kristallstruktur eines asymmetrischen GroE Komplexes (Xu et al., 1997) zeigten, daß die Nukleotidbindung an GroEL starke Konformationsänderungen hervorruft, die zu einer Vergrößerung des zentralen Hohlraums auf das Doppelte seiner Ausgangsgröße führen, so daß globuläre, kompakte Proteine bis zu einer Größe von 65 kDa darin Platz finden.

Biochemische Untersuchungen deuten darauf hin, daß zwischen beiden GroEL-Ringen eine negative Kooperativität herrscht, so daß eine gleichzeitige ATP-Bindung an beide Ringe verhindert wird. Nach Bindung von ATP an einen GroEL-Ring [(GroEL/ATP)₇] und einer Konformationsänderung wird ein asymmetrischer Komplex GroEL₁₄GroES₇ gebildet, der die bevorzugt auftretende Spezies im Reaktionszyklus darstellt. Dabei wird die Substrataffinität in dem GroES-bindenden Ring stark herabgesetzt. In Gegenwart von Substratprotein wird ein „cis-Komplex“ gebildet, der aus einem asymmetrischen GroEL₁₄GroES₇ATP₇ Komplex mit dem eingeschlossenen Substratprotein besteht. Nach Hydrolyse des gebundenen ATP zu ADP wird die ATP Bindung am „trans“ Ring von GroEL möglich. Nach Hydrolyse des am trans-Ring gebundenen ATP werden das gebundene GroES und ADP und das eingeschlossene Substrat freigesetzt.

Über strukturelle Veränderungen des GroE-Systems im ATP-getriebenen Reaktionsmechanismus, die mit Nukleotidbindung/Hydrolyse, GroES-Bindung und Substratbindung einhergehen, ist noch relativ wenig bekannt. Dies ist eine zentrale Fragestellung in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Buchner (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München). In einer Kooperation wird gemeinsam mit Dr. H. Grallert der Frage nachgegangen, welche strukturellen Veränderungen durch die Bindung eines denaturierten Substratproteins (Citratsynthase - dimeres Enzym aus identischen Untereinheiten mit M_w = 49 kDa je Monomer) und ADP am asymmetrischen GroEL/GroES-Komplex hervorgerufen werden.

Im weiteren wird der Komplex GroEL/GroES von *E. coli* mit ADP, inkubiert mit Citratsynthase als ‚GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS‘ bezeichnet.

4.2.2 Ergebnisse

Abb. 113 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS Komplexen (GroEL Konzentration 50 nM [\approx 40 μ g/ml], GroES Konzentration 120 nM [\approx 8 μ g/ml], Citratsynthase Konzentration 75 nM, Nukleotidkonzentration 1 mM ADP, Kontrastierung mit 1 % - 2 % Uranylacetat). Auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme sind im wesentlichen zwei unterschiedliche Projektionen zu sehen: ‚topviews‘ und ‚sideviews‘ des GroE/Substrat- Komplexes.

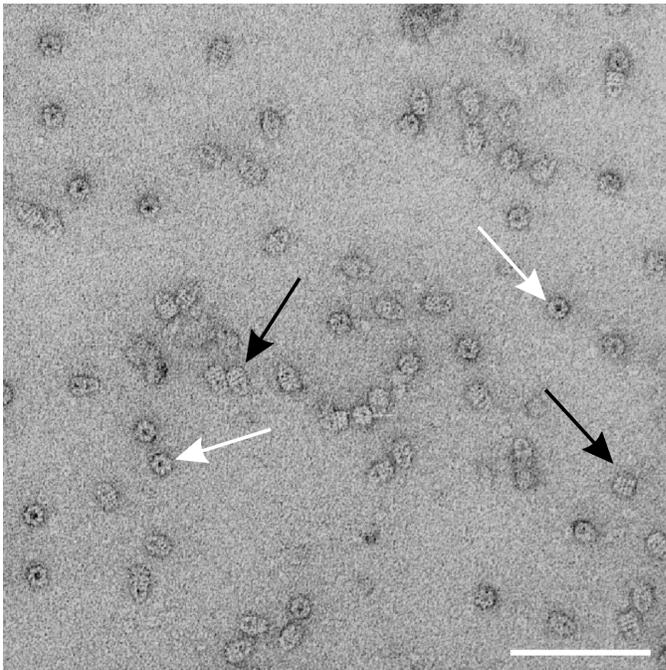


Abb. 113: GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS, negativ kontrastiert; topviews (weiße Pfeile) bzw. sideviews (schwarze Pfeile). Balken 100 nm.

Nach Digitalisierung (Pixelgröße 20 μ m, d. h. 3,7 Å auf der Objektebene, da mittels Katalasekristallen die wahre Vergrößerung als 54000 festgestellt wurde) und Partikelextraktion wurden 2365 Projektionen unter Verwendung verschiedener Methoden der Bildverarbeitung unterzogen, jeweils beginnend mit Normierung und Bandpaßfilterung (außerhalb 1,0 nm und 19,0 nm).

a) Invariante Klassifizierung/3D-Rekonstruktion:

Anhand der ersten 12 Eigenvektoren wurde eine Invariante Klassifizierung der Partikelprojektionen in 24 Klassen durchgeführt und anschließend die Klassenmittlungen berechnet (Abb. 114).

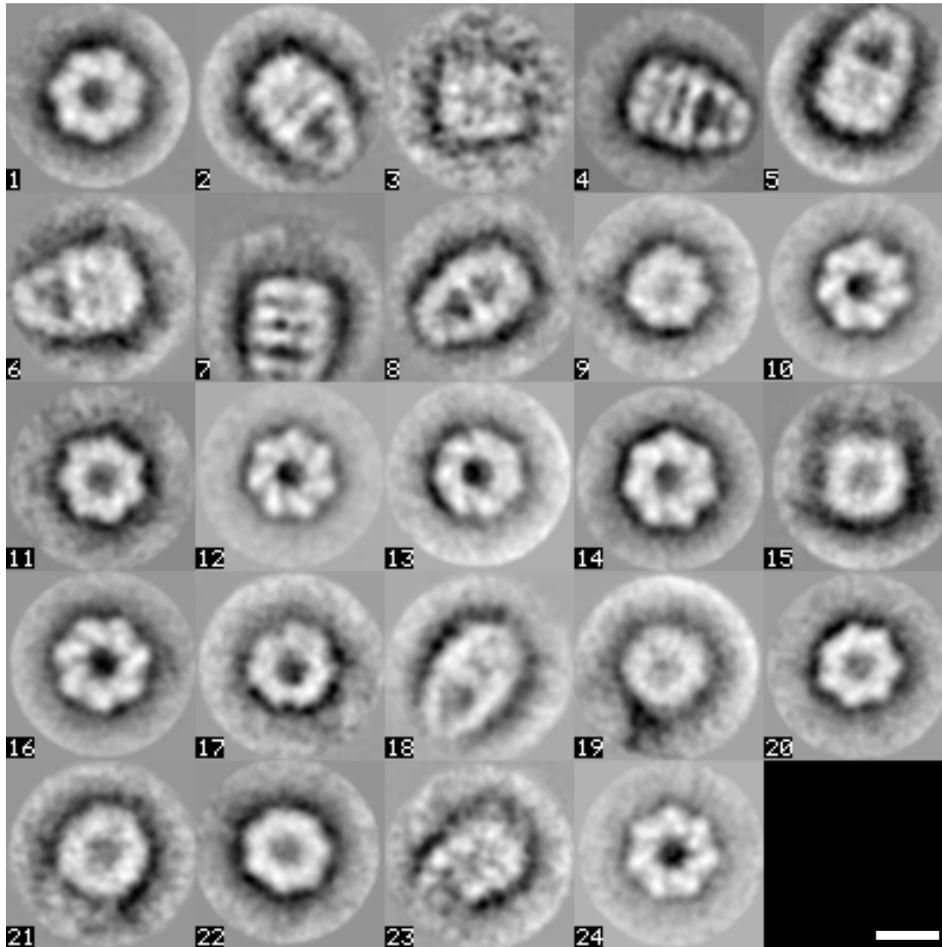


Abb. 114: Ergebnis der Invarianten Klassifizierung von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS. Balken 10 nm.

Wie in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Abb. 113) zeigen sich auch in den Klassenmittlungen (Abb. 114) zwei unterschiedliche Projektionen, nämlich topviews und sideviews (abgesehen von den Klassenmittlungen #3 und #23, die ein rel. geringes Signal/Rausch-Verhältnis aufweisen). Bei den topviews zeigen die Klassenmittlungen runde Projektionen mit einem Durchmesser von ca. 15 nm und einen zentralen Hohlraum (d. h. ein Gebiet geringerer Proteindichte), wobei die Stainverteilung innerhalb des Hohlraumes variiert (z. B. ist in #1, #10 und #12 viel Kontrastmittel akkumuliert, dagegen weniger in #9, #20 und #22); dies kann auf unterschiedliche Einbettung des Objektes in das Kontrastmittel zurückzuführen sein.

Die topviews zeigen teils eine siebenzählige Rotationssymmetrie (z. B. #12 und #16). Bei den sideviews zeigen die Klassenmittelungen domförmige Projektionen (Durchmesser ca. 15 nm bzw. ca. 7 nm, Höhe ca. 19 nm); deutlich sind in den sideviews Hohlräume zu sehen, insb. zwischen dem GroEL- und GroES-Ring (der Durchmesser des Hohlraumes ist ca. 6 nm, dessen Höhe ca. 5 nm, was einem Volumen von ca. 47 nm³ entspricht - ausgehend von einem Kegel mit runder Grundfläche).

Nach Auswahl zweier charakteristischer Klassenmittelungen (#1 und #4) und deren Maskierung wurde eine drei-dimensionale Rekonstruktion mittels angular reconstitution unter Annahme siebenzähliger Rotationssymmetrie des Komplexes berechnet (Abb. 116). Abb. 115 zeigt die Konturbilder der zwei ausgewählten Klassenmittelungen (#1 und #4); deutlich ist im Konturbild von #1 eine siebenzählige Rotationssymmetrie zu erkennen, die jedoch für sämtliche topviews in diesem Kapitel nicht zur Berechnung der Klassenmittelungen verwendet wurde. Diese Symmetrieminformation fand jeweils nur Anwendung bei der Berechnung der drei-dimensionalen Rekonstruktionen mittels angular reconstitution.



Abb. 115: Konturbilder der zwei ausgewählten Klassenmittelungen von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS zur drei-dimensionalen Rekonstruktion aus der Invarianten Klassifizierung. Balken 10 nm.

Abb. 116 zeigt das 3D-Modell des GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS Komplexes als siebenzählig-rotationssymmetrisches, domförmiges Objekt (Durchmesser ca. 14 nm bzw. ca. 7 nm, Höhe ca. 18 nm), das insbesondere einige Öffnungen in seiner Hülle aufweist. Wie auch bei allen weiteren drei-dimensionalen Rekonstruktionen in diesem Kapitel wurde eine molekulare Masse von ca. 920 kDa (= 14 x 57 kDa [GroEL] + 7 x 10 kDa [GroES] + 49 kDa [Citratsynthase] + 7 x 0,4 kDa [ADP]) für den gesamten GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS Komplex angenommen (Proteindichte = 844 Da/nm³).

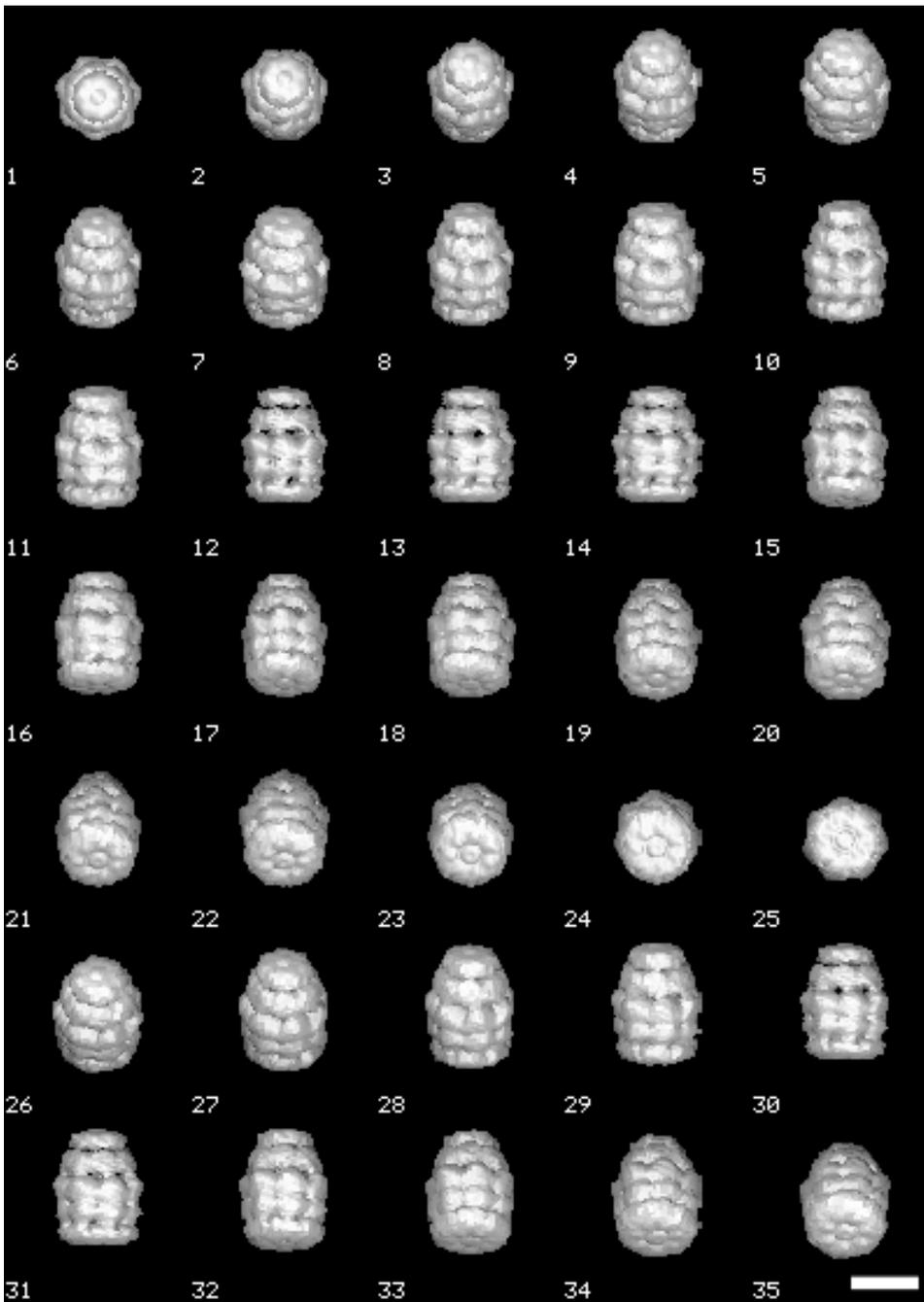
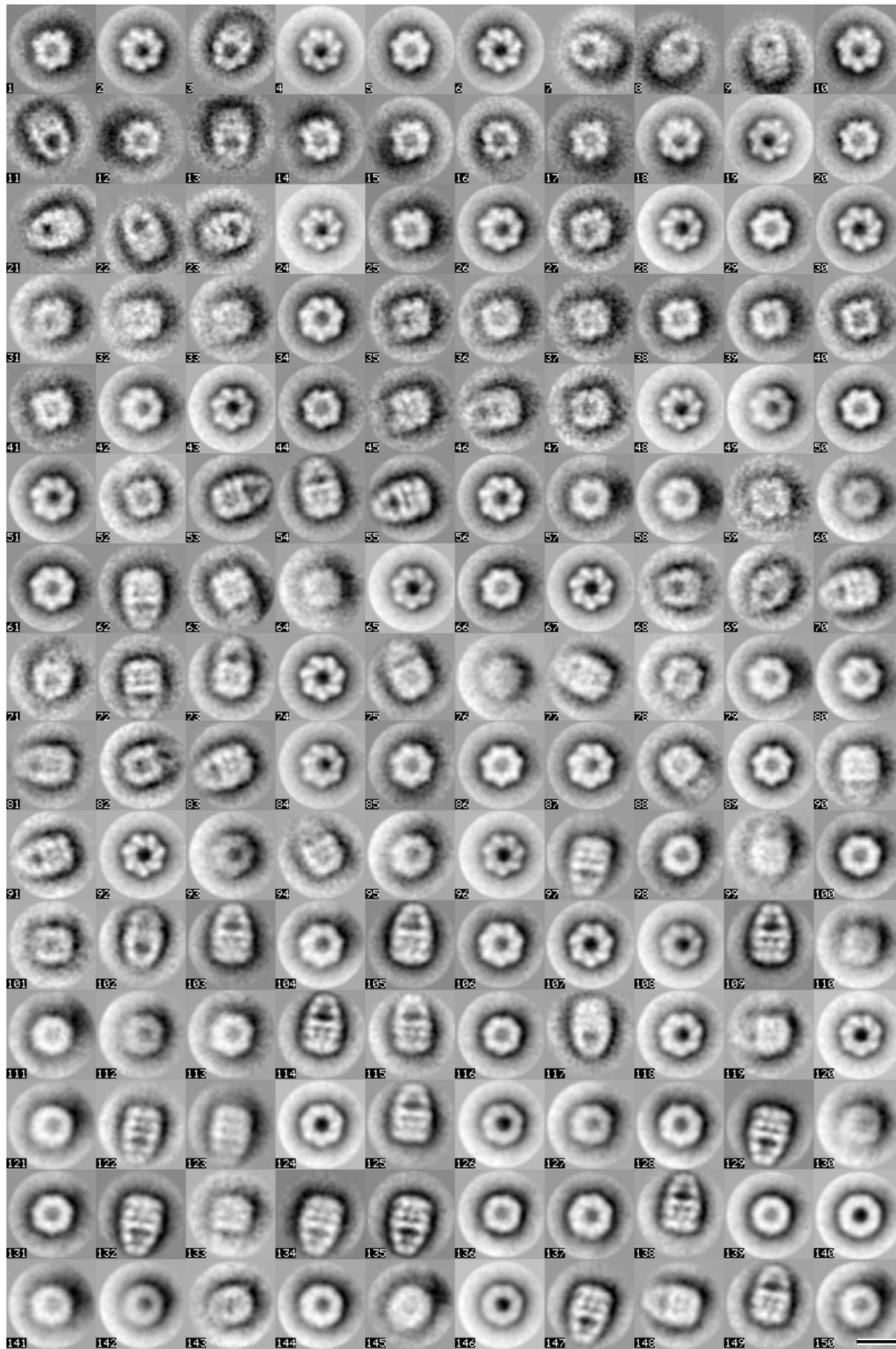


Abb. 116: Drei-dimensionale Rekonstruktion mittels angular reconstitution von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS nach Invarianter Klassifizierung. Balken 10 nm.

b) Iterative Klassifikation basierend auf Invarianter Analyse mit MRA/MSA/3D-Rekonstruktion:

Basierend auf den 24 Klassenmittlungen der Invarianten Klassifizierung wurde eine iterative Methode zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses der Klassenmittlungen eingesetzt. Dazu wurde eine Multireferenz-Alignierung des Datensatzes auf die 24 Klassenmittlungen aus Abb. 114 durchgeführt und nach MSA und Klassifizierung in 24 Klassen die Klassenmittlungen berechnet; diese dienten als neue Referenzen zur erneuten Multireferenz-Alignierung des Datensatzes. Diese Iteration wurde insgesamt fünf mal durchgeführt. Anschließend wurde nur noch in 18 Klassen klassifiziert, wobei die 18 Klassenmittlungen als neue Referenzen zur Multireferenz-Alignierung dienten; diese Iteration wurde insgesamt vier mal durchgeführt. Dann wurde nur noch in 12 Klassen klassifiziert, wobei die 12 Klassenmittlungen als neue Referenzen zur Multireferenz-Alignierung dienten; diese Iteration wurde insgesamt sieben mal durchgeführt. Insgesamt erhält man während der Iteration 276 ($= 5 \times 24 + 4 \times 18 + 7 \times 12$) Klassenmittlungen, die in Abb. 117 gezeigt sind.

Erstaunlicherweise verloren die topviews im Laufe der Iteration teils ihre sieben-zählige Rotationssymmetrie; dies ist insbesondere bei der Klassifizierung in 12 Klassen signifikant (siehe z. B. die finale Klassifikation, d. h. #265-#276 in Abb. 117). Die sideviews hingegen wurden während der Iteration eher dominanter, sowohl in deren relativer (Klassen-) Anzahl, als auch in ihrer „Erscheinungsform“. Offensichtlich ist die gezeigte Iterationsvorschrift, basierend auf der Invarianten Klassifikation, für die Strukturfindung von negativkontrastierten *E. coli* GroE vergleichsweise weniger geeignet; topviews werden gegenüber der Invarianten Klassifizierung in den Klassenmittlungen teils unzureichend wiedergegeben, während bei sideviews keine signifikante Verbesserung bzgl. Auflösung und Erscheinungsform gegenüber der Invarianten Klassifikation zu erkennen sind.



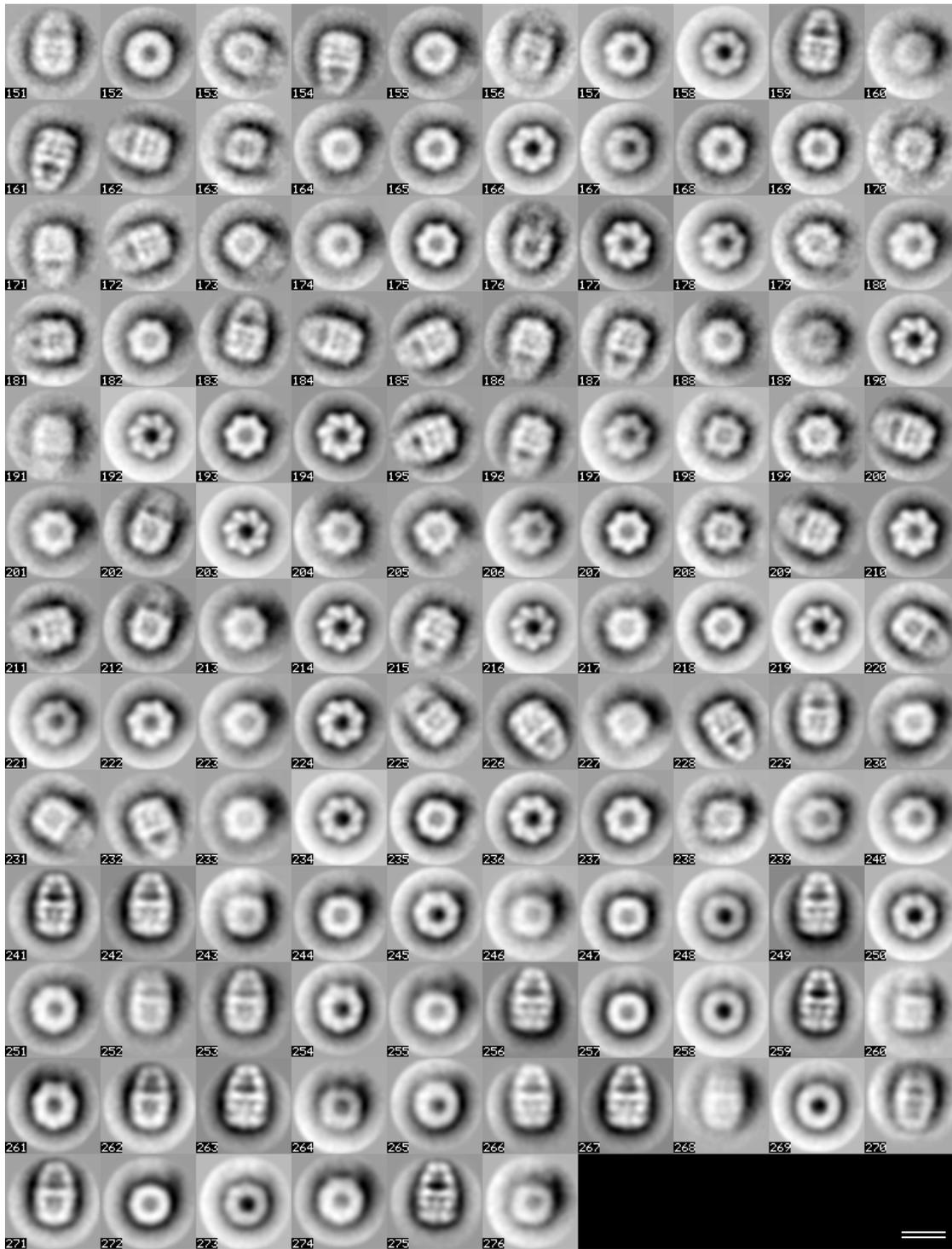


Abb. 117: Iterative Klassifikation zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses von Mittelungsbildern von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS, basierend auf der Invarianten Klassifikation. Balken 10 nm.

Für die Auflösung der Klassensumme #22 aus Abb. 117 ergibt sich nach dem S-Bild Kriterium etwa 3,3 nm (Abb. 118), wobei die Auflösung um $\pm 1,0$ nm je Klassensumme variiert.

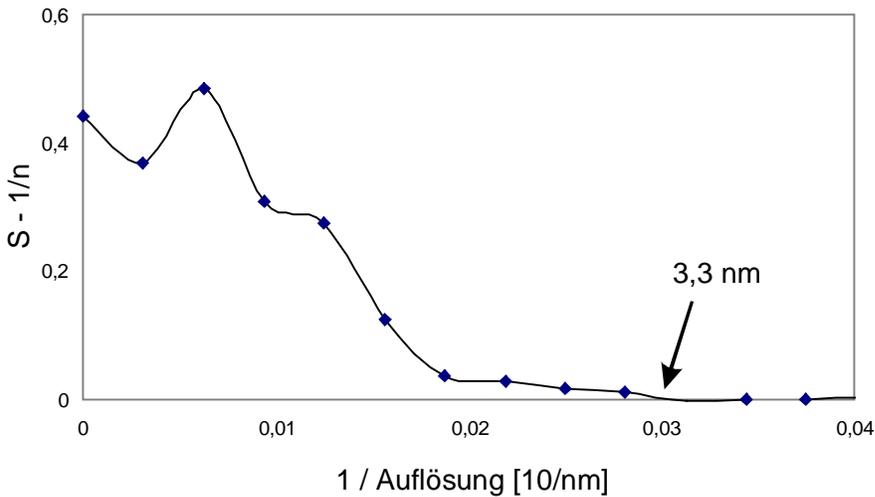


Abb. 118: Auflösungsbestimmung einer Klassenmittelung von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS nach dem S-Bild Kriterium. Die betrachtete Klasse ist Klassenmittelung #22 des Datensatzes (vgl. Abb. 117) mit 52 Bildern, die zur Mittelung beitragen. Die Ordinate gibt das „modifizierte S-Bild“ wieder, d. h. der Erwartungswert für statistisches Rauschen (1/n) ist vom S-Bild subtrahiert; n: Anzahl der Bilder, die zur Mittelung beitragen.

Zur drei-dimensionalen Rekonstruktion mittels angular reconstitution wurden zwei charakteristische Ansichten ausgewählt (#214 und #275); Abb. 119 zeigt Konturbilder der zwei ausgewählten Klassenmittelungen, wobei für den topview #214 eine siebenzählige Rotationssymmetrie zu erkennen ist; diese Symmetrieinformation wurde für die drei-dimensionale Rekonstruktion (Abb. 120), nicht aber für die Berechnung der Klassenmittelungen verwendet.



Abb. 119: Konturbilder der zwei ausgewählten Klassenmittelungen (#214 und #275) zur drei-dimensionalen Rekonstruktion, basierend auf der Invarianten Klassifizierung. Balken 10 nm.

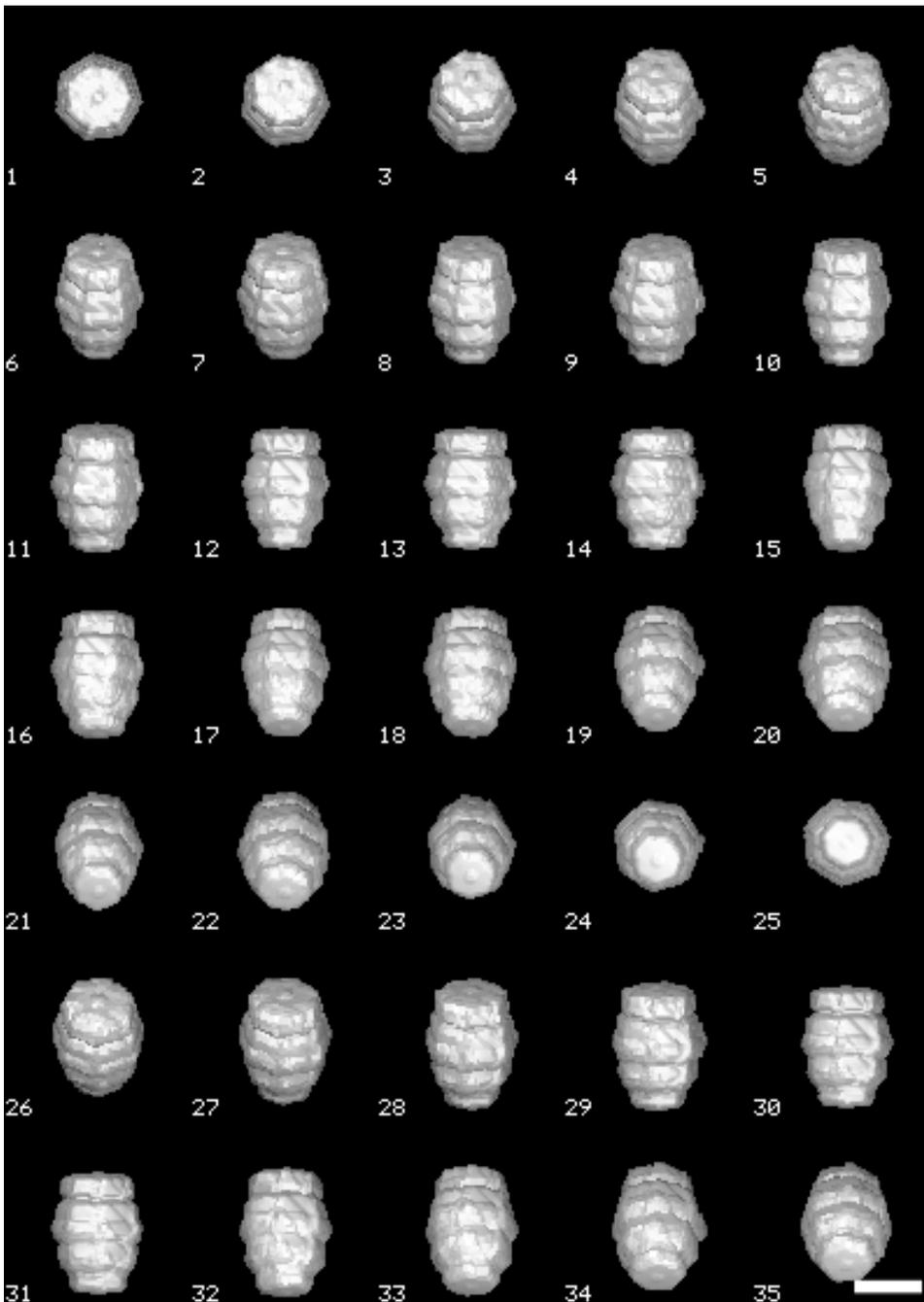


Abb. 120: Drei-dimensionale Rekonstruktion mittels angular reconstitution von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS nach iterativer Klassifikation, basierend auf Invarianter Klassifizierung. Balken 10 nm.

Im Gegensatz zum 3D-Modell aus der Invarianten Klassifikation (Abb. 116) zeigt Abb. 120 eine Rekonstruktion, die v. a. von außen keine Öffnung in seiner Hülle aufweist. Bezüglich Größe und Form sind sich die Rekonstruktionen prinzipiell ähnlich; das 3D-Modell aus der Invarianten Klassifikation zeigt die ausgeprägtere Domstruktur.

c) ,Alignment by classification'/3D-Rekonstruktion:

Eine weitere Methode zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses basiert auf der „alignment by classification“-Methode von Dube et al., 1993. Das Flußdiagramm dazu ist in Abb. 121 gezeigt; die daraus resultierenden 5 x 24 Klassenmittelungen sind in Abb. 122 gezeigt. Bezüglich Größe, Form, Auflösung und der teils siebenzähligen Rotationssymmetrie der topviews (Symmetrieinformation wurde auch bei dieser Methode nur zur Berechnung der drei-dimensionalen Rekonstruktion, nicht zur Berechnung der Klassenmittelungen verwendet) sind die Klassenmittelungen denen der vorangegangenen Bildverarbeitungsmethoden vergleichbar.

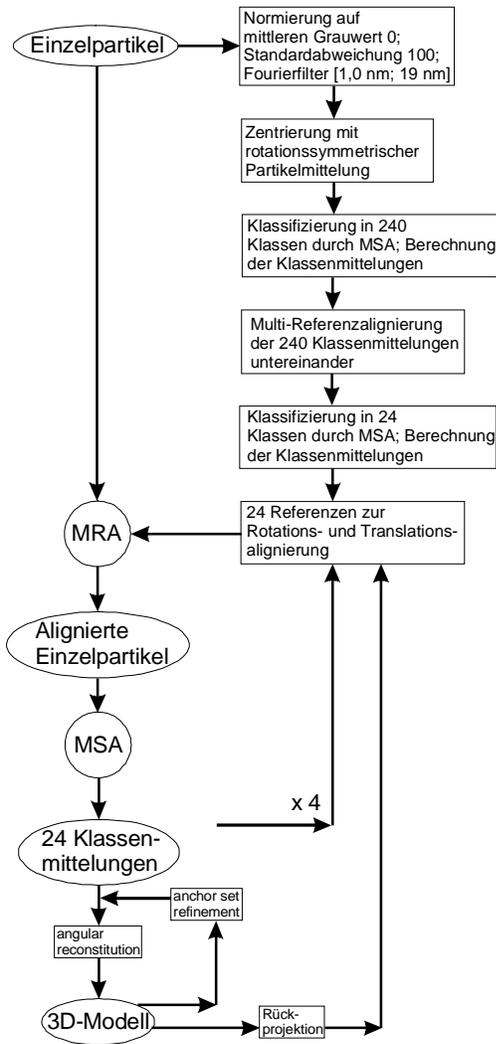


Abb. 121: Flußdiagramm der iterativen Methode zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses der Klassenmittelungen von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS basierend auf „alignment by classification“.

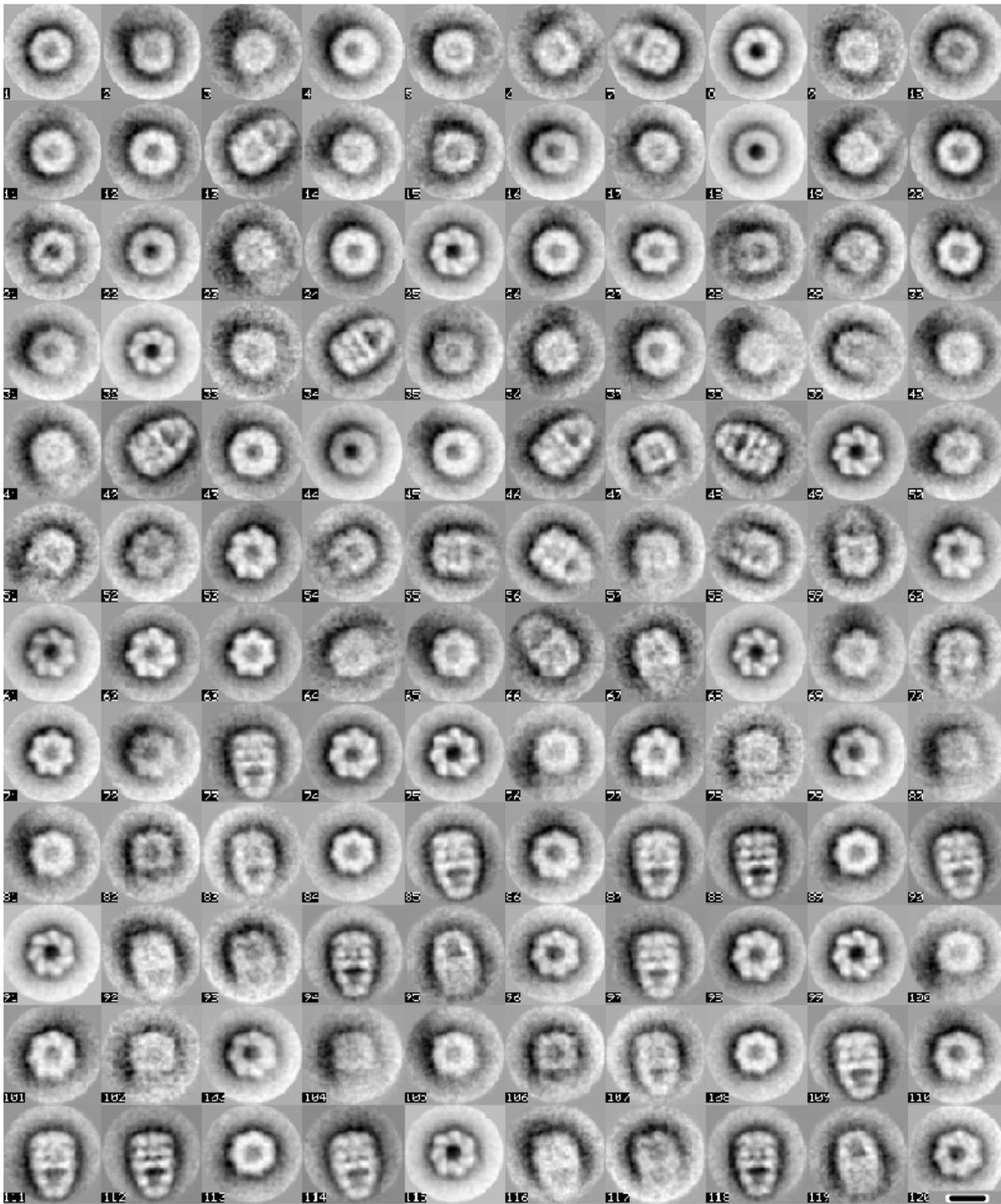


Abb. 122: Iterative Methode zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnis von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS basierend auf der „alignment by classification“-Methode. Gezeigt sind 5 x 24 Klassenmittelungen. Balken 10 nm.

Abb. 123 zeigt Konturbilder der zwei ausgewählten Klassenmittelungen (#115 und #118). Abb. 124 zeigt die erste drei-dimensionale Rekonstruktion nach anchor set refinement mittels angular reconstitution von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS aus den Klassensummen #115 und #118 nach „alignment by classification“ unter Annahme einer siebenzähliger Rotationssymmetrie.

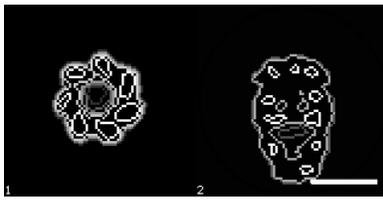


Abb. 123: Konturbilder der zwei ausgewählten Klassenmittelungen (#115 und #118) aus der „alignment by classification“-Methode zur dreidimensionalen Rekonstruktion. Balken 10 nm.

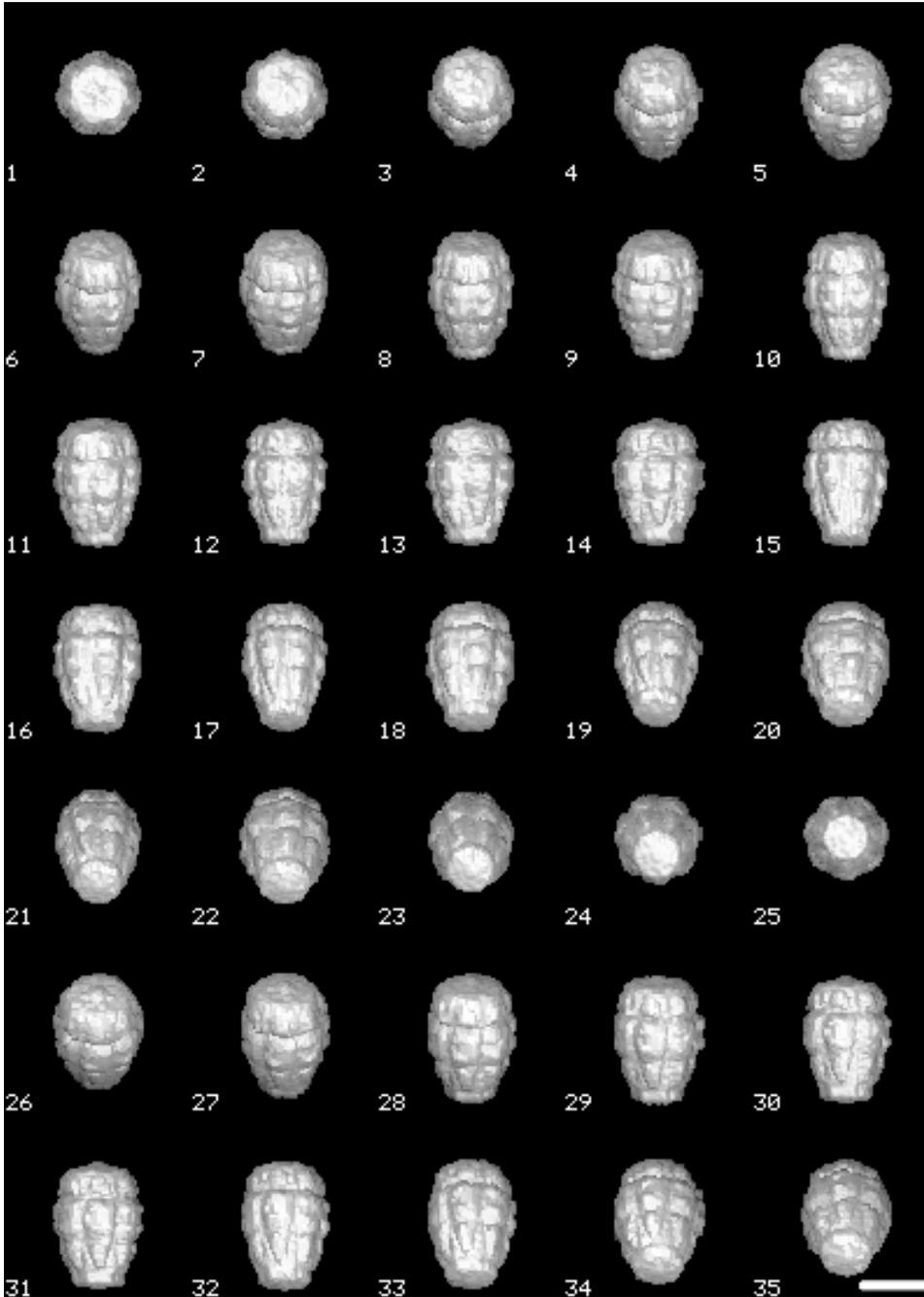


Abb. 124: Erste drei-dimensionale Rekonstruktion mittels angular reconstitution von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS aus Klassensummen #115 und #118 nach „alignment by classification“ und nach anchor set refinement unter Verwendung einer siebenzähligen Rotationssymmetrie. Balken 10 nm.

Innerhalb dieser Bildverarbeitungsmethode unterscheiden sich die berechneten 3D-Modelle vor und nach anchor set refinement nur unwesentlich. Im Gegensatz zum 3D-Modell aus der Invarianten Klassifikation (Abb. 116) zeigt Abb. 124 eine Rekonstruktion, die von außen keine Öffnung in seiner Hülle aufweist und entspricht diesbezüglich eher der Rekonstruktion aus Abb. 120; die ausgeprägte Domstruktur zeigt hingegen eher Ähnlichkeit zum Modell der Invarianten Klassifikation.

Nach Rückprojektion der drei-dimensionalen Rekonstruktion aus Abb. 124 in 235 Projektionsrichtungen, Multireferenz-Alignierung des Datensatzes auf die Rückprojektionen, MSA und Klassifizierung in 24 Klassen ergaben sich die finalen Klassenmittelungen dieser Bildverarbeitungsmethode (Abb. 125). Für die Auflösung der Klassensumme #4 (107 Klassenmitglieder) aus Abb. 125 ergibt sich nach dem (modifizierten) S-Bild ca. 2,5 nm (Abb. 126).

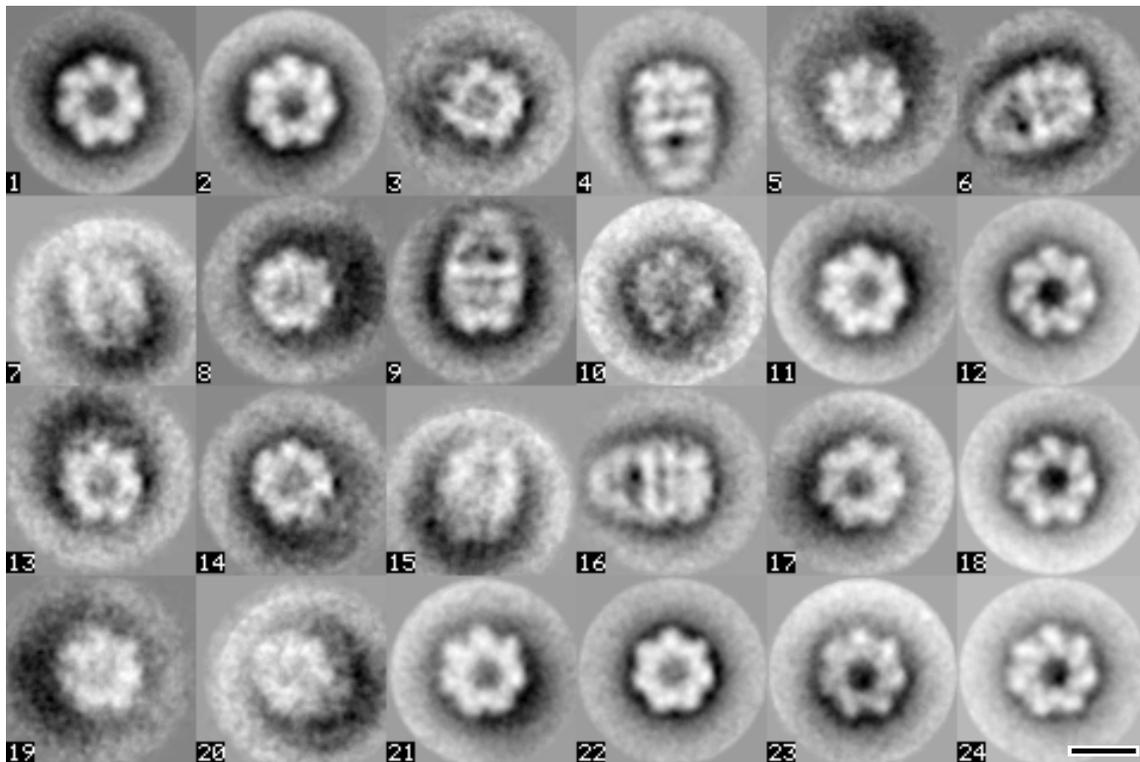


Abb. 125: 24 Klassenmittelungen von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS nach Multireferenz-Alignierung auf 235 Rückprojektionen des Modells aus Abb. 124. Balken 10 nm.

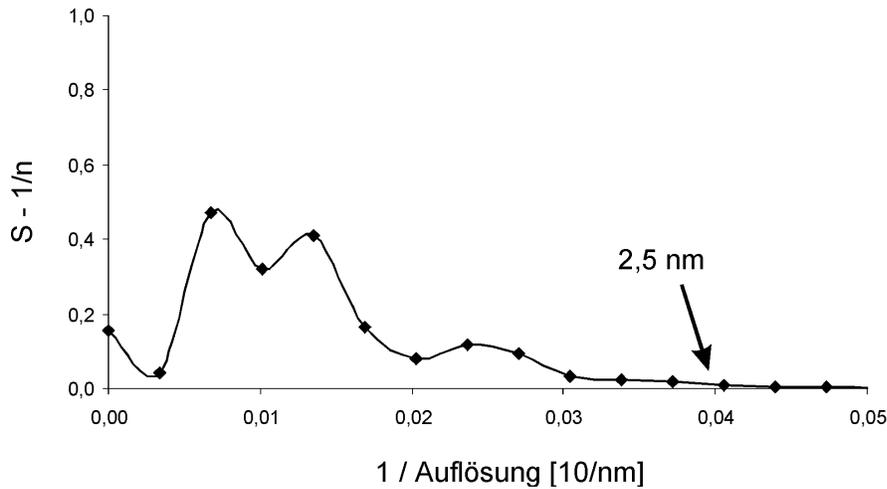


Abb. 126: Auflösungsbestimmung einer Klassenmittelung von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS nach dem S-Bild Kriterium. Die betrachtete Klasse ist Klassenmittelung #4 des Datensatzes (vgl. Abb. 125) mit 107 Bildern, die zur Mittelung beitragen.

Zur drei-dimensionalen Rekonstruktion mittels angular reconstitution wurden zwei charakteristische Ansichten ausgewählt (#4 und #12); auch hier ist für den topview #12 eine siebenzählige Rotationssymmetrie zu erkennen; diese Symmetrieinformation wurde nur für die drei-dimensionale Rekonstruktion, nicht aber für die Berechnung der Klassenmittelungen verwendet.

Bezüglich Größe und Form stimmt das finale 3D-Modell (Abb. 127) mit den vorangegangenen Rekonstruktionen dieses Kapitels prinzipiell überein. Insbesondere zeigt sich aber durch die ausgeprägte Domstruktur und einige Öffnungen in seiner Hülle eine starke Ähnlichkeit zum 3D-Modell der Invarianten Klassifikation (Abb. 116).

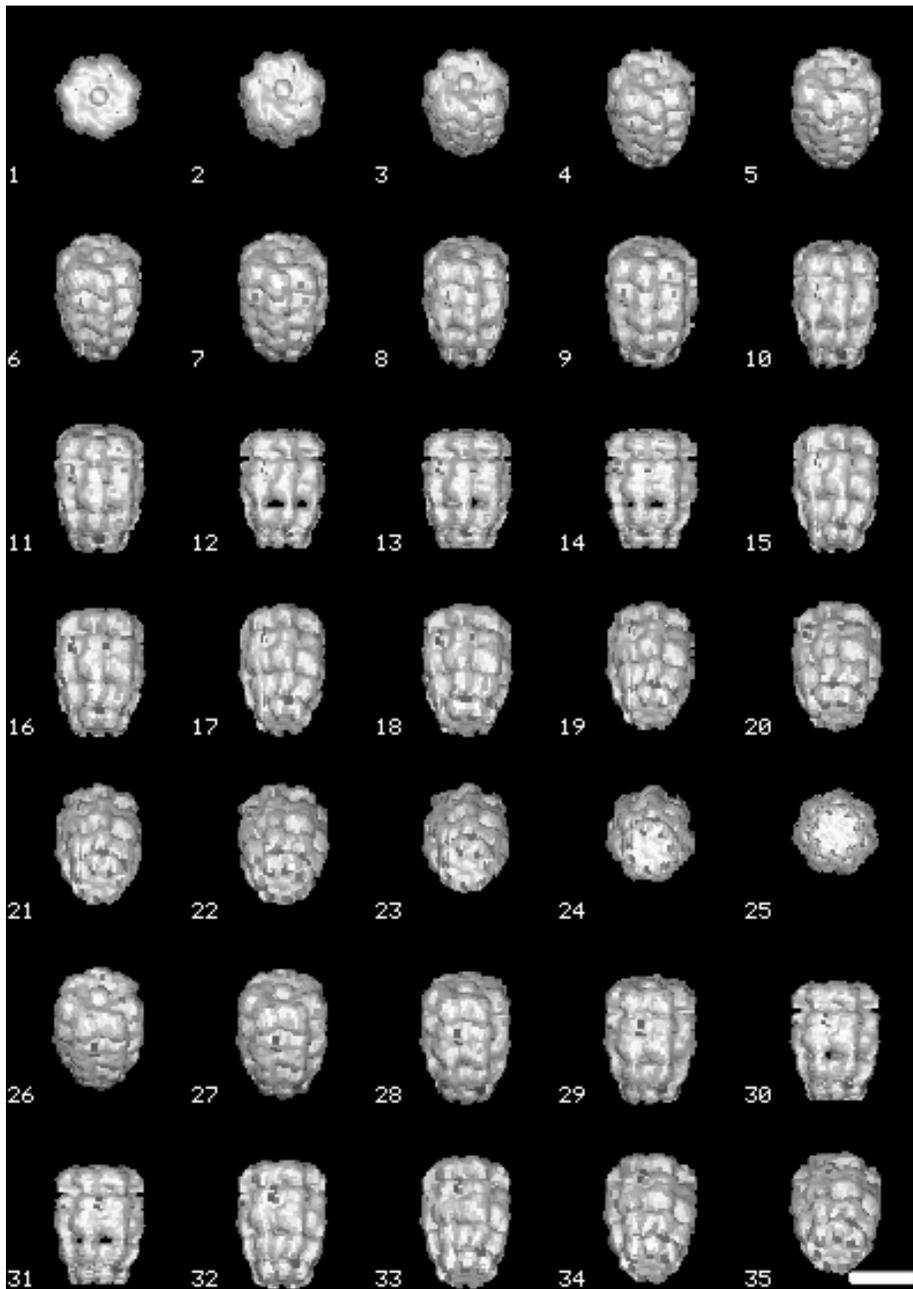


Abb. 127: Finale drei-dimensionale Rekonstruktion mittels angular reconstitution von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS aus Klassensummen #4 und #12 nach „alignment by classification“ und nach anchor set refinement unter Verwendung einer siebenzähligen Rotationssymmetrie. Balken 10 nm.

Als weitere alternative Bildverarbeitungsmethode wurde eine Analyse analog zu der von SecA verwendet, d. h. basierend auf einer Eigenwertanalyse. Nach Klassifizierung in 8 Klassen ergaben sich die Mittelungen in Abb. 128.

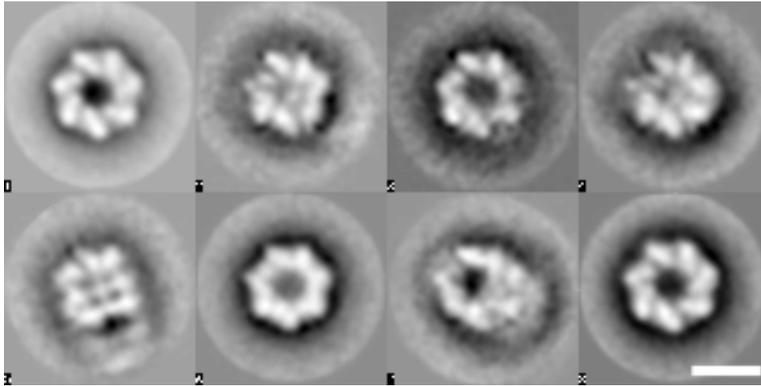


Abb. 128: Bildverarbeitung von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS basierend auf einer Eigenwertanalyse. Balken 10 nm.

Offensichtlich ist die Bildverarbeitungsmethode, basierend auf der Eigenwertanalyse ungeeignet, da sideviews nur unzureichend wiedergegeben werden; die topviews hingegen geben teils eine deutliche siebenzählige Rotationssymmetrie wieder.

4.2.3 Diskussion

In Abb. 129 ist ein Schnittmodell der Röntgenstruktur in sideview vom *E. coli* GroE-Komplex GroEL₁₄/GroES₇/ADP₇ (d. h. ohne Bindung eines Substratproteins) gezeigt; deutlich ist innerhalb der Struktur eine Kavität zwischen GroES und GroEL und eine Kavität im Bereich der äquatorialen Domäne des freien GroEL-Rings zu erkennen. Anhand der Mittelungsbilder lassen sich die Kavitäten in allen drei vorgestellten Bildverarbeitungsmethoden wiederfinden, insbesondere die Kavität zwischen GroES und GroEL. Die Kavitäten finden sich auch in den Rückprojektionen der 3D-Modelle; exemplarisch ist dies für die Methode der Invarianten Klassifizierung mit anschließender drei-dimensionaler Rekonstruktion mittels angular reconstitution dargestellt (Abb. 130).

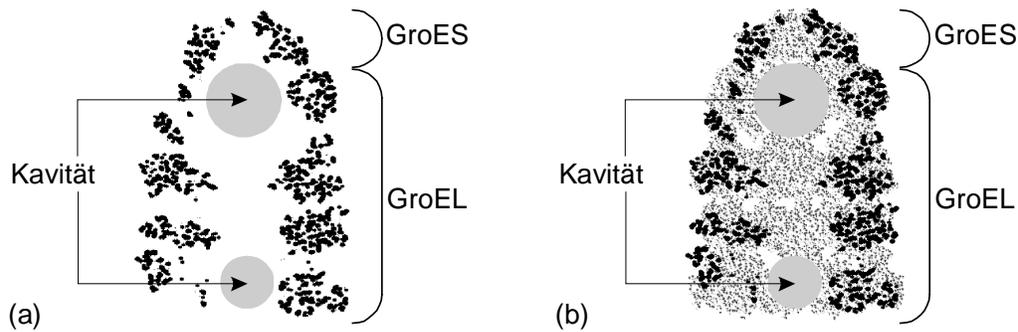


Abb. 129: Zentraler Schnitt durch das drei-dimensionale Modell der Röntgenstruktur von *E. coli* GroEL₁₄/GroES₇/ADP₇ in sideview; (a) Scheibchendarstellung, (b) raumfüllende Darstellung. Deutlich sind Kavitäten im Bereich zwischen GroES und GroEL und im Bereich der äquatorialen Domäne des freien GroEL-Rings zu erkennen.

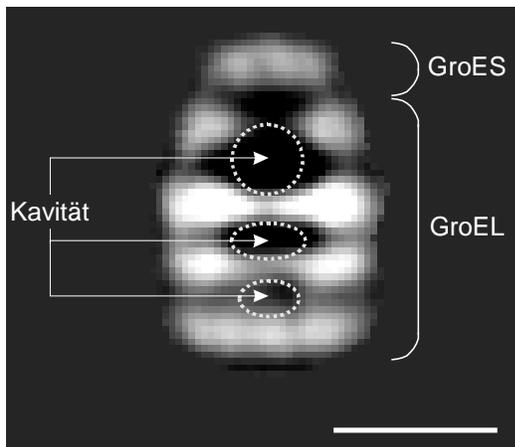


Abb. 130: Rückprojektion des 3D-Modells aus Abb. 116 (#12). Deutlich sind Kavitäten innerhalb des Modells zu erkennen; insbesondere die Kavität zwischen GroES und GroEL ist sehr deutlich. Balken 10 nm.

Ein direkter Vergleich der Röntgenstruktur in sideview und topview vom *E. coli* GroE-Komplex GroEL₁₄/GroES₇/ADP₇GroEL/GroES mit den verschiedenen Mittelungsbildern bzw. drei-dimensionalen Rekonstruktionen dieser Arbeit zeigt im Rahmen der erreichten Auflösung der Mittelungsbilder von ca. 2,5 nm eine gute Übereinstimmung bzgl. Form („domförmige Ringstruktur“) und Größe (Abb. 131). Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Röntgenmodell und den EM-Modellen findet sich jedoch in der äquatorialen Domäne des GroEL-Rings: die 3D-Modelle der drei verschiedenen Bildverarbeitungsmethoden zeigen an dieser Stelle eine Masse (Durchmesser ca. 3 nm), die als Substratprotein Citratsynthase identifiziert werden kann. Bei einem Molekulargewicht von 49 kDa, einer Proteindichte von 844 Da/nm³ ergebe sich für CS ein Moleküldurchmesser von ca. 2,4 nm (ausgehend von einem kugelförmigen Molekül).

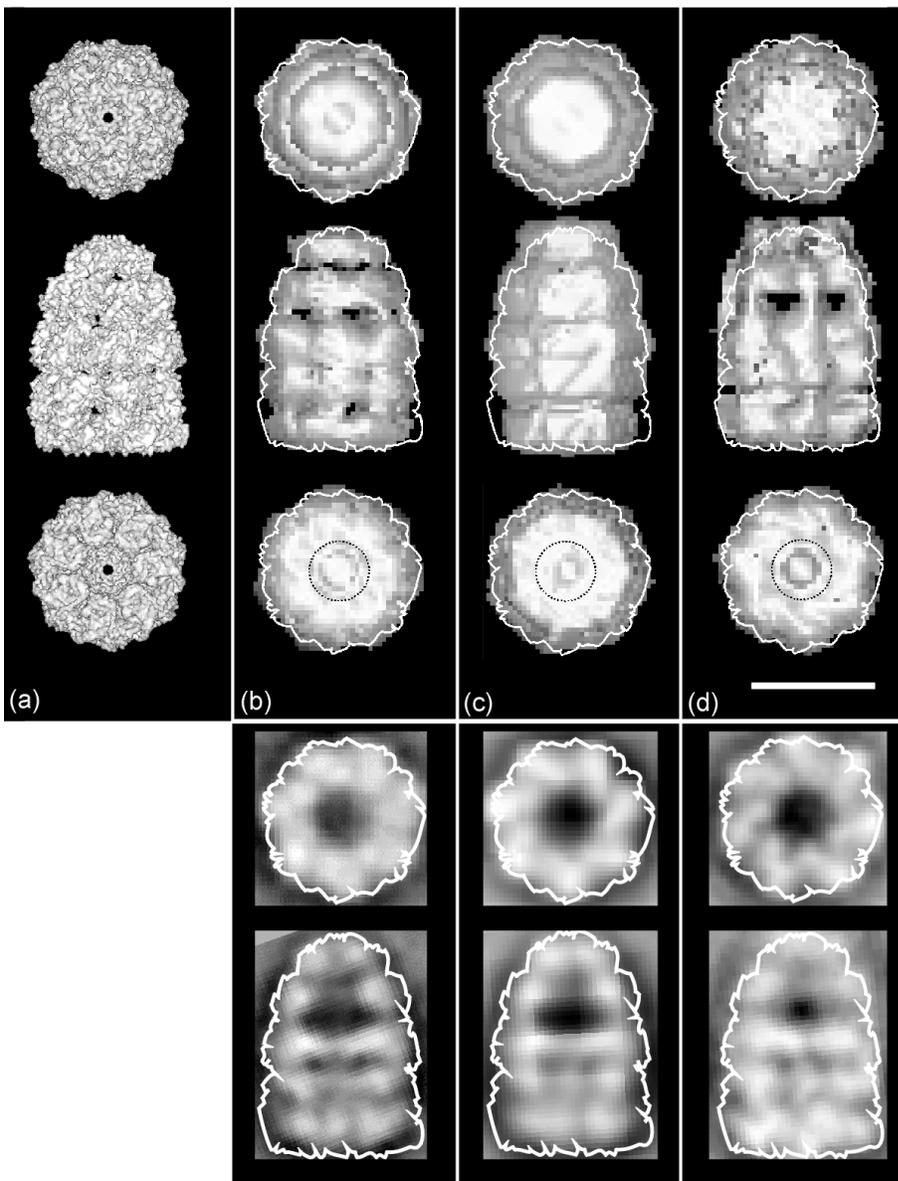


Abb. 131: Vergleich der Röntgenstruktur von *E. coli* GroEL₁₄/GroES₇/ADP₇ in sideview und topview mit den Mittelungsbildern bzw. 3D-Modellen der verschiedenen Bildverarbeitungsmethoden von GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS: (a) Röntgenstruktur, (b) Invariante Klassifizierung, (c) iterative Methode, basierend auf Invarianter Klassifikation, (d) „alignment by classification“-Methode. Gezeigt sind (von oben nach unten): topview mit Blickrichtung auf GroES-Ring, sideview, topview mit Blickrichtung auf freien GroEL-Ring und die jeweiligen EM-Mittelungsbilder. Während das Röntgenmodell in Form und Größe mit den 3D-Modellen aus EM prinzipiell gut übereinstimmt, zeigt sich in allen drei EM-Modellen (und in den sideview Mittelungsbildern) im äquatorialen Bereich des freien GroEL-Rings eine Masse (Kreise) die im Röntgenmodell nicht zu sehen ist, und die als das Substratprotein Citratsynthase identifiziert werden kann. Balken 10 nm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

innerhalb der erreichten Auflösung der Mittelungsbilder (und der drei-dimensionalen Rekonstruktionen) gibt es unter den drei getesteten Bildverarbeitungsmethoden von negativ kontrastierten GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇/CS-Komplexen keine signifikanten Unterschiede. Die Übereinstimmung zu dem Röntgenmodell von *E. coli* GroEL₁₄/GroES₇/ADP₇ bzgl. Größe, Form und Symmetrie ist in jedem Fall prinzipiell gegeben; die beste Übereinstimmung mit dem Röntgenmodell wurde dennoch durch die Invariante Klassifikation erreicht, u. a. wegen der exakten Molekülform und den Öffnungen in der Molekülhülle, die sowohl durch das Röntgenmodell, als auch durch Kryoelektronenmikroskopie für *E. coli* GroEL₁₄/GroES₇/ADP₇ bestätigt werden.

Prinzipiell unterscheiden sich das Röntgenmodell und die drei EM-Modelle v. a. durch eine ca. 3 nm große Masse im Bereich der äquatorialen Domäne des freien GroEL-Rings. Diese kann als das Substratprotein Citratsynthase identifiziert werden. Weitere vergleichende Experimente werden z. Z. von Dr. H. Grallert an negativ kontrastierten GroEL₁₄/ADP₇/GroES₇-Komplexen durchgeführt.

Literaturverzeichnis

Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S. D., Harris, J. R. (1998)

Cryo-negative staining, *Micron*, **29**, 145-160

Arkowitz, RA, Wickner, W. (1994)

SecD and SecF are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation, *EMBO J.*, **13**, 954-963

Auer, M., Scarborough, G. A., Kühlbrandt, W. (1999)

Surface crystallisation of the plasma membrane H⁺-ATPase on a carbon support film for electron crystallography, *J. Mol. Biol.*, **287**, 961-968

Bachmann, L., Mayer, E. (1987)

Physics of water and ice: implications for cryofixation, cryotechniques in biological electron microscopy (Steinbrecht, R. A. & Zierold K. eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3-35,

Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., Frank, J. (1997)

Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex, *Science*, **278**, 2123-2136

Beissinger, M., Buchner, J. (1998)

How chaperones fold proteins, *Biol. Chem.*, **379**, 245-259

Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L., Sigler, P. B. (1994)

The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å, *Nature*, **371**, 578-586

Bremer, A., Henn, C., Engel, A., Baumeister, W., Aebi, A. (1992)
Has negative staining still a place in biomolecular electron microscopy?
Ultramicroscopy, **46**, 85-111

Brenner, S., Horne, R. W. (1959)
A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses,
Biochem. Biophys. Acta, **34**, 103-110

Breukink, E., Demel, R. A., de Korte-Kool, G., de Kruijff, B. (1992)
SecA insertion into phospholipids is stimulated by negatively charged lipids and
inhibited by ATP: a monolayer study, *Ultramicroscopy*, **31**, 1119-1124

Breukink, E., Nouwen, N., van Raalte, A., Mizushima, S., Tommassen, J., de Kruijff,
B. (1995)
The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding, *J. Biol.
Chem.*, **270**, 7902-7907

Brisson, A., Bergsma-Schutter, W., Oling, F., Lambert, O., Reviakine, I. (1999)
Two-dimensional crystallisation of proteins on lipid monolayers at the air-water
interface and transfer to an electron microscopy grid, *Journal of Crystal Growth*, **196**,
456-470

Caldeira, J., Feicht, R., White, H., Teixeira, M., Moura, J. J., Simon, H., Moura, I.
(1996)
EPR and Mossbauer spectroscopic studies on enoate reductase, *J. Biol. Chem.*, **271**,
18743-18748

Cabelli, R. J., Chen, L., Tai, P. C., Oliver, D. B. (1988)
SecA protein is required for secretory protein translocation into *E. coli* membrane
vesicles, *Cell*, **55**, 683-692

- Cabelli, R. J., Dolan, K. M., Qian, L., Oliver D.B. (1991)
Characterization of membrane associated and soluble states of SecA protein from wild-type and *SecA51(TS)* mutant strains of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 24420-24427
- Carrell, R. W., Lomas, D. A. (1997)
Conformational disease, *Lancet*, **350**, 134-138
- Crowther, R. A., DeRosier, D. J., Klug, A. (1970)
The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy, *Proc. Roy. Soc. Lond. A.*, **317**, 319-340
- DeRosier, D. J., Klug, A. (1968)
Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs, *Nature*, **217**, 130-134
- den Blaauwen, T., Driessen, A. J. M. (1996)
Sec-dependent preprotein translocation in bacteria, *Arch. Microbiol.* **165**, 1-8
- den Blaauwen, T., Fekkes, P., de Wit, J. G., Kuiper, W., Driessen, A. J. M. (1996)
Domain interactions of the peripheral preprotein translocase subunit SecA, *Biochemistry*, **35**, 11994-12004
- den Blaauwen, T., Terpetschnig, E., Lakowicz, J. R., Driessen, A. J. M. (1997)
Interaction of SecB with soluble SecA, *FEBS Lett.*, **416**, 35-38
- den Blaauwen, T., van der Wolk, J. P., van der Does, C., van Wely, K. H., Driessen, A. J. M. (1999)
Thermodynamics of nucleotide binding to NBS-I of the *Bacillus subtilis* preprotein translocase subunit SecA, *FEBS Lett.*, **458**, 145-150
- Dierksen, K., Typke, D., Hegerl, R., Koster, A. J., Baumeister, W. (1992)
Towards automatic electron tomography, *Ultramicroscopy*, **40**, 71-87

Dietrich, C., Boscheinen, O., Scharf, K. D., Schmitt, L., Tampé, R. (1996)
Functional immobilization of a DNA-binding protein at a membrane interface via
histidine tag and synthetic chelator lipids, *Biochemistry*, **35**, 1100-1105

Dietrich, C., Schmitt, L., Tampé, R. (1995)
Molecular organization of histidine-tagged biomolecules at self-assembled lipid
interfaces using a novel class of chelator lipids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9014-
9018

Douville, K., Price, A., Eichler, J., Economou, A., Wickner, W. (1995)
SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase, *J.
Biol. Chem.*, **270**, 20106-20111

Downing, K. H. (1991)
Spot-scan imaging in transmission electron microscopy, *Science*, **251**, 53-59

Driessen, A. J. M. (1992)
Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the
protonmotive force, *EMBO J.*, **11**, 847-853

Driessen, A. J. M. (1993)
SecA, the peripheral subunit of the *Escherichia coli* precursor protein translocase, is
functional as a dimer, *Biochemistry*, **32**, 13190-13197

Driessen, A. J. M. (1994)
How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane, *J. Membrane Biol.* **142**, 145-
159

Driessen, A. J. M., de Wit, J. G., Kuiper, W., van der Wolk, J. P., Fekkes, P., van der
Does, C., van Wely, K., Manting, E., den Blaauwen, T. (1995)
SecA, a novel ATPase that converts chemical energy into a mechanical force to drive
precursor protein translocation, *Biochem. Soc. Trans.*, **23**, 981-985

Dube, P., Tavares, P., Lurz, R., van Heel, M. (1993)

The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry, *EMBO J.*, **12**, 1303-1309

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J., Homo, J., Lepault, J., McDowell, A., Schultz, P. (1988)

Cryo-electron microscopy of vitrified specimens, *Quarterly Review of Biophysics*, **21**, 129-228

Duong, F., Wickner, W. (1997a)

The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling, *EMBO J.*, **16**, 4871-4879

Duong, F., Wickner, W. (1997b)

Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme, *EMBO J.*, **16**, 2756-2768

Economou, A., Wickner, W. (1994)

SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion, *Cell*, **78**, 835-843

Economou, A., Pogliano, J. A., Beckwith, J., Oliver, D. B., Wickner, W. (1995)

SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF, *Cell*, **83**, 1171-1181

Eichler, J., Wickner, W. (1997)

Both an N-terminal 65-kDa domain and a C-terminal 30-kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 5574-5581

Eichler, J., Brunner, J., Wickner, W. (1997)

The protease-protected 30 kDa domain of SecA is largely inaccessible to the membrane lipid phase, *EMBO J.*, **16**, 2188-2196

Erickson, H. P., Klug, A. (1971)

Measurement and compensation of defocusing and aberrations by fourier processing of electron micrographs, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **261**, 105-118

Ermantraut, E., Wohlfart, K., Tichelaar, W. (1998)

Perforated support foils with pre-defined hole size, shape and arrangement, *Ultramicroscopy*, **74**, 75-81

Fekkes, P., van der Does, C., Driessen, A. J. M. (1997)

The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation
EMBO J., **16**, 6105-6113

Fekkes, P., Driessen, A. J. M. (1999)

Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 161-173

Fekkes, P., de Wit, J. G., Boorsma, A., Friesen, R. H., Driessen, A. J. M. (1999)

Zinc stabilizes the SecB binding site of SecA, *Biochemistry*, **38**, 5111-5116

Frank, J., Al-Ali, L. (1975)

Signal-to-noise ratio of electron micrographs obtained by cross correlation, *Nature*, **256**, 376-379

Frank, J., Shimkin, B., Dowse, H. (1981a)

SPIDER – a molecular software system for electron image processing, *Ultramicroscopy*, **6**, 343-358

Frank, J., Verschoor, A., Boublik, M. (1981)

Computer averaging of electron micrographs of 40S ribosomal subunits, *Science*, **214**, 1353-1355

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., Leith, A. (1996)
SPIDER and WEB: processing and visualisation of images in 3D electron microscopy
and related fields, *J. Struc. Biol.*, **116**, 190-199

Frank, J. (1996)

Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies, Academic
Press, San Diego

Frey, W., Schief, W. R. Jr., Vogel, V (1996a)

Two-dimensional crystallization of streptavidin by quantitative Brewster Angle
Microscopy, *Langmuir*, **12**, 1312-1320

Frey, W., Schief, W. R. Jr., Pack, D. W., Chen, C. T., Chilkoti, A., Stayton, P., Vogel,
V., Arnold, F. H. (1996b)

Two-dimensional protein crystallization via metal-ion coordination by naturally
occurring surface histidines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4937-4941

Frey, W., Brink, J., Schief, W. R., Chiu, W., Vogel, V. (1998)

Electron crystallographic analysis of two-dimensional Streptavidin crystals
coordinated to metal-chelated lipid monolayers, *Biophysical Journal*, **74**, 2674-2679

Hainfeld, J. F., Safer, D., Wall, J. S., Simon, M., Lin, B., Powell, R. D. (1994)

Methylamine vandate (NANOVAN) negative stain, Proceedings of the fifty-second
Annual Meeting, Microscopy Society of America, 132-133

Hanein, D., Matlack, K. E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K. U., Miller, K. R.,
Rapoport, T. A., Akey, C. W. (1996)

Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein
translocation, *Cell*, **87**, 721-732

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

Exact filters for general geometry three-dimensional reconstruction, *Optik*, **73**, 146-
156

- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., Wickner W. (1990)
The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane, *Cell*, **63**, 269-279
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K. H. (1990)
Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-929
- Hirano, M., Matsuyama, S., Tokuda, H. (1996)
The carboxyl-terminal region is essential for Sec A dimerization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 90-95
- Horwich, A. L., Low, K. B., Fenton, W. A., Hirshfield, I. N., Furtak, K. (1993)
Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL, *Cell*, **74**, 909-917
- Hunt, J. F., Weaver, A. J., Landry, S. J., Gierasch, L., Deisenhofer, J. (1996)
The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution, *Nature*, **379**, 37-45
- Hunt, J. F., Weinkauff, S., Henry, L., Oliver, D. B., Deisenhofer, J. (2000)
The crystal structure of the SecA translocation ATPase at 2.7 Å, *Manuskript in Vorbereitung*
- Jap, B. K., Zulauf, M., Scheybani, T., Hefti, A., Baumeister, W., Aebi, U., Engel, A. (1992)
2D crystallization: from art to science, *Ultramicroscopy*, **46**, 45-84
- Joly, J. C., Wickner, W. (1993)
The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids, *EMBO J.*, **12**, 255-263

Jong, M., Kim, H. (1997)

Stability and solvent accessibility of SecA protein of *Escherichia coli*, *J. Biochem.*, **122**, 1010-1018

Keller, R. C., Snel, M. M., de Kruijff, B., Marsh, D. (1995)

SecA restricts, in a nucleotide-dependent manner, acyl chain mobility up to the center of a phospholipid bilayer, *FEBS Lett.*, **358**, 251-254

Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., Buchner, J. (1991)

Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation, *Biotechnology*, **9**, 825-829

Kimura, E., Akita, M., Matsuyama, S., Mizushima, S. (1991)

Determination of a region in SecA that interacts with presecretory proteins in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 6600-6606

Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E. (1992)

Autogenous translation regulation by *Escherichia coli* ATPase SecA may be mediated by an intrinsic RNA helicase activity of this protein, *FEBS Lett.*, **298**, 6-8

Koster, A. J., de Ruijter, W. J. (1992)

Practical autoalignment of transmission electron microscopes, *Ultramicroscopy*, **40**, 89-107

Kühlbrandt, W. (1982)

Discrimination of protein and nucleic acids by electron microscopy using contrast variation, *Ultramicroscopy*, **7**, 221-232

Kühlbrandt, W., Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. (1994)

Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography, *Nature*, **367**, 614-621

- Kumamoto, C. A., Beckwith, J. (1985)
Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*, J. Bacteriol., **163**, 267-274
- Kuno, S., Bacher, A., Simon, H. (1985)
Structure of enoate reductase from a *Clostridium tyrobutyricum* (C. spec. La1), Biol. Chem. Hoppe Seyler, **366**, 463-472
- Kusters, R., Breukink, E., Gallusser, A., Kuhn, A., de Kruijff, B. (1994)
A dual role for phosphatidylglycerol in protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane, J. Biol. Chem., **269**, 1560-1563
- Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W., Hartl, F. U. (1992)
Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity, EMBO J., **11**, 4757-4765
- Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., Candia, O. A. (1979)
An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate, Anal. Biochem., **100**, 95-97
- Lill, R., Dowhan, W., Wickner, W. (1990)
The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins, Cell, **60**, 271-280
- Maksymiuk, R., Nitsch, W. (1991)
Catalase monolayer at the air/water interface, Journal of colloid and interface science, **147**, 67-77
- Manting, E. H., van der Does, C., Remigy, H., Engel, A., Driessen, A. J. M. (2000)
SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel, EMBO J., **19**, 852-861

McDowall, A. W., Chang, J. J., Freeman, R., Lepault, J., Walter, C. A., Dubochet, J. (1983)

Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples, *J. Microscopy*, **131**, 1-9

McNicholas, P., Rajapandi, T., Oliver, D. (1995)

SecA proteins of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* possess homologous amino-terminal ATP-binding domains regulating integration into the plasma membrane, *J. Bact.*, **177**, 7231-7237

Meyer, T. H., Menetret, J. F., Breitling, R., Miller, K. R., Akey, C. W., Rapoport, T. A. (1999)

The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex, *J. Mol. Biol.*, **285**, 1789-1800

Mitchell, C., Oliver, D. (1993)

Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase, *Mol. Microbiol.*, **10**, 483-497

Mitsuoka, K., Murata, K., Walz, T., Hirai, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., Fujiyoshi, Y. (1999)

The structure of aquaporin-1 at 4.5 Å resolution reveals short alpha-helices in the center of the monomer, *J. Struct. Biol.*, **128**, 34-43

Nicastro, D., Frangakis, A. S., Typke, D., Baumeister, W. (2000)

Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria, *J. Struct. Biol.*, **129**, 48-56

Nogales, E., Wolf, S. G., Khan, I. A., Luduena, R. F., Downing, K. H. (1995)

Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site, *Nature*, **375**, 424-427

Nitsch, W., Maksymiw, R., Erdmann, H. (1991)

Lipase monolayers at the air/water interface: interfacial behaviour and enzymatic activity, *Journal of colloid and interface science*, **141**, 322-328

- Oliver, D. B., Beckwith, J. (1981)
E. coli mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins, *Cell*, **25**, 765-772
- Price, A., Economou, A., Duong, F., Wickner, W. (1996)
Separable ATPase and membrane insertion domains of the SecA subunit of preprotein translocase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 31580-31584
- Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A., Frank J. (1987)
Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *J. Microsc.*, **146**, 113-136
- Rajapandi, T., Oliver, D. (1996)
Integration of SecA protein into the *Escherichia coli* inner membrane is regulated by its amino-terminal ATP-binding domain, *Mol. Microbiol.*, **20**, 43-51
- Ramamurthy, V., Oliver, D. (1997)
Topology of the integral membrane form of *Escherichia coli* SecA protein reveals multiple periplasmically exposed regions and modulation by ATP binding, *J. Biol. Chem.*, **272**, 23239-23246
- Randall, L. L., Hardy, S. J. (1995)
High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding, *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 65-69
- Rath, B. K., Marko, M., Radermacher, M., Frank, J. (1997)
Low-dose automated electron tomography: a recent implementation, *J. Struct. Biol.*, **120**, 210-218
- Rietveld, A. G., Koorengel, M. C., de Kruijff, B. (1995)
Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of *Escherichia coli*, *EMBO J.*, **14**, 5506-5513

Ringler, P., Borgnia, M. J., Stahlberg, H., Maloney, P. C., Agre, P., Engel, A. (1999)
Structure of the water channel AqpZ from *Escherichia coli* revealed by electron
crystallography, *J. Mol. Biol.*, **291**, 1181-1190

Roseman, A. M., Chen, S., White, H., Braig, K., Saibil, H. R. (1996)
The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of
substrate-binding domains in GroEL, *Cell*, **87**, 241-251

Sadaie, Y., Takamatsu, H., Nakamura, K., Yamane, K. (1991)
Sequencing reveals similarity of the wild-type div+ gene of *Bacillus subtilis* to the
Escherichia coli secA gene, *Gene*, **98**, 101-5

Salavati, R., Oliver, D. (1997)
Identification of elements on GeneX-secA RNA of *Escherichia coli* required for SecA
binding and secA auto-regulation, *J. Mol. Biol.*, **265**, 142-152

Sass, H. J., Buldt, G., Beckmann, E., Zemlin, F., van Heel, M., Zeitler, E.,
Rosenbusch, J. P., Dorset, D. L., Massalski, A. (1989)
Densely packed beta-structure at the protein-lipid interface of porin is revealed by
high-resolution cryo-electron microscopy, *J. Mol. Biol.*, **209**, 171-175

Saxton, W.O., Baumeister, W. (1982)
The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein, *J.*
Microsc., **127**, 127-138

Saxton, W. O., Frank, J. (1977)
Motif detection in quantum noise-limited electron micrographs by cross-correlation,
Ultramicroscopy, **2**, 219-227

Saxton, W. O., Pitt, T. J., Horner, M. (1979)
Digital image processing: the SEMPER system, *Ultramicroscopy*, **4**, 343-354

Schatz, M., van Heel, M. (1992)

Invariant recognition of molecular projections in vitrous ice preparations,
Ultramicroscopy, **45**, 15-22

Schmidt, M. G., Rollo, E. E., Grodberg, J., Oliver, D. B. (1988)

Nucleotide sequence of the *secA* gene and *secA*(Ts) mutations preventing protein export in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **170**, 3404-3414

Schmidt, M., Rutkat, K., Rachel, R., Pfeifer, G., Jaenicke, R., Viitanen, P., Lorimer, G., Buchner, J. (1994)

Symmetric complexes of GroE chaperonins as part of the functional cycle, *Science*, **265**, 656-659

Schmitt, L., Dietrich, C., Tampé, R. (1995)

Synthesis and characterization of chelator-lipids for reversible immobilization of engineered proteins at self-assembled lipid interfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8485-8491

Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J. L., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J. M., Oudega, B., Luirink, J. (2000)

YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase, *EMBO J.*, **19**, 542-549

Shilton, B., Svergun, D. I., Volkov, V. V., Koch, M. H., Cusack, S., Economou, A. (1998)

Escherichia coli SecA shape and dimensions, *FEBS Lett.*, **436**, 277-282

Simon, H. (1991)

Enoate reductase, F. Müller (ed.) *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (CRC Press Inc., Boca Raton, Florida) Vol. II, pp. 317-328.

Snyders, S., Ramamurthy, V., Oliver, D. (1997)

Identification of a region of interaction between *Escherichia coli* SecA and SecY proteins, *J. Biol. Chem.*, **272**, 11302-11306

Takamatsu, H., Fuma, S., Nakamura, K., Sadaie, Y., Shinkai, A., Matsuyama, S., Mizushima, S., Yamane, K. (1992)

In vivo and in vitro characterization of the secA gene product of *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., **174**, 4308-4316

Thon, F. (1966)

Zur Defokussierungsabhängigkeit des Phasenkontrastes bei der elektronenmikroskopischen Abbildung, Z. Naturforsch., **21a**, 476-47

Tietz, H. (1992)

On-line processing and analysis of TEM slow-scan CCD images, theory and practical aspects, Electron Microscopy, Vol. **1**, EUREM 92

Trurnit, H. J. (1960)

A theory and method for the spreading of protein monolayers, Journal of Colloid Science, **15**, 1-13

Ulbrandt, N. D., London, E., Oliver, D. B. (1992)

Deep penetration of a portion of *Escherichia coli* SecA protein into model membranes is promoted by anionic phospholipids and by partial unfolding, J. Biol. Chem., **267**, 15184-15192

van der Does, C., den Blaauwen, T., de Wit, J. G., Manting, E. H., Groot, N. A., Fekkes, P., Driessen, A. J. M. (1996)

SecA is an intrinsic subunit of the *Escherichia coli* preprotein translocase and exposes its carboxyl terminus to the periplasm, Mol. Microbiol., **22**, 619-629

van der Does, C., Swaving, J., van Klompenburg, W., Driessen, A. J. M (2000)

Non-bilayer lipids stimulate the activity of the reconstituted bacterial protein translocase, J. Biol. Chem., **275**, 2472-2478

van der Wolk, J. P. W., de Witt, J. G., Driessen, A. J. M. (1997)

The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events, EMBO J., **16**, 7297-7304

van Heel, M. (1984)

Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules), *Ultramicroscopy*, **13**, 165-183

van Heel, M. (1987)

Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction, *Ultramicroscopy*, **21**, 111-124

van Heel, M., Frank, J. (1981)

Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules, *Ultramicroscopy*, **6**, 187-194

van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R., Schatz, M. (1996)

A new generation of the IMAGIC image processing system, *J. Struc. Biol.*, **116**, 17-24

van Heel, M., Keegstra, W. (1981)

Imagic: a fast, flexible and friendly image analysis software system, *Ultramicroscopy*, **7**, 113-130

van Heel, M., Schatz, M., Orlova, E. (1992)

Correlation functions revisited, *Ultramicroscopy*, **46**, 307-316

van Heel, M., Stoffler-Meilicke, M. (1985)

Characteristic views of *E. coli* and *B. stearothermophilus* 30S ribosomal subunits in the electron microscope, *EMBO J.*, **4**, 2389-2395

Vénien-Bryan, C., Balavoine, F., Toussaint, B., Mioskowski, C., Hewat, E. A., Helme, B., Vignais, P. M. (1997)

Structural study of the response regulator HupR from *Rhodobacter capsulatus*. Electron microscopy of two-dimensional crystals on nickel-chelating lipid, *J. Mol. Biol.*, **274**, 687-692

Vogel, V., Schief, W. R., Frey, W. (1997)

Dynamics of two-dimensional protein crystallisation at the air/water interface: streptavidin targetted to surfaces via high-affinity binding or metalcoordination, *Supramolecular Science*, **4**, 163-171

Wade, R. H. (1992)

A brief look at imaging and contrast transfer, *Ultramicroscopy*, **46**, 145-156

Wang, L., Miller, A., Kendall, D. A. (2000)

Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity, *J. Biol. Chem.*, **275**, 10154-10159

Weaver, A. J., McDowall, A. W., Oliver, D. B., Deisenhofer, J. (1992)

Electron microscopy of thin-sectioned three-dimensional crystals of SecA protein from *Escherichia coli*: structure in projection at 40 Å resolution, *J. Struct. Biol.*, **109**, 87-96

Weinkauf, S., Hunt, J. F., Scheuring, J., Henry, L., Fak, J., Oliver, D. B., Deisenhofer, J. (2000)

Conformational stabilization and crystallization of the SecA translocation ATPase from *Bacillus subtilis*, Manuskript eingereicht

Wrigley, N. G. (1968)

The lattice spacing of crystalline catalase as an internal standard of length in electron microscopy, *J. Ultrastruct. Res.*, **24**, 454-464

Xu, Z., Horwich, A. L., Sigler, P. B. (1997)

The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex, *Nature*, **388**, 741-750

Yoshida, M., Amano, T. (1995)

A common topology of proteins catalyzing ATP-triggered reactions, *FEBS Lett.*, **359**, 1-5

- Zemlin, F., Reuber, E., Beckmann, E., Zeitler, E., Dorset, D. L. (1985)
Molecular resolution electron micrographs of monolamellar paraffin crystals, *Science*, **229**, 461-472
- Zhou, Z. H., Chiu, W. (1993)
Prospects for using an IVEM with a FEG for imaging macromolecules towards atomic resolution, *Ultramicroscopy*, **49**, 407-416
- Zhu, J., Penczek, P. A., Schröder, R., 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, *J. Struc. Biol.*, **118**, 197-219
- Zhuang J., Privé, G. G., Werner, G. E., Ringler, P., Kaback, H. R., Engel, A. (1999)
Two-dimensional crystallisation of *Escherichia coli* lactose permease, *J. Struc. Biol.*, **125**, 63-75

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1996 bis Oktober 2000 vorwiegend am Institut für Ultrastrukturforschung der Friedrich-Schiller-Universität Jena und am Institut für Technische Chemie der Technischen Universität München.

Ich danke

Prof. Sevil Weinkauf für ihre engagierte Betreuung dieser Arbeit und die nie endende Bereitschaft die Unmengen an entstandenen Daten zu diskutieren. Insbesondere möchte ich ihr aber auch danken, daß sie mir unglaublich oft die Möglichkeit gab, auf etlichen (Dienst-) Reisen stets einiges zu sehen und einiges zu lernen.

Dr. Johannes Scheuring für die weitgehende Übernahme der biochemischen Arbeit.

recht herzlich allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, sei es in Jena oder Garching.

den Mitgliedern des Lehrstuhl I für Technische Chemie der TU München.

der Belegschaft des Institut für Ultrastrukturforschung der FSU Jena.

allen, die mit mir und meiner Arbeitsgruppe sonst noch zusammengearbeitet haben. Es sind ziemlich viele - eine Auflistung der Namen würde wahrscheinlich endgültig den Rahmen sprengen.

allen, die in welcher Weise auch immer zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

