

2 Materialien und Methoden

2.1 Anzucht cyanobakterieller Zellen und Isolation des PS I

Alle biochemischen Arbeiten fanden in Zusammenarbeit mit der AG Fromme/Witt an der Technischen Universität Berlin statt. Das Photosystem I wurde aus dem thermophilen Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* isoliert. Die Anzucht der Cyanobakterien sowie die Isolierung des Proteins erfolgte im wesentlichen wie in Fromme & Witt (1998) angegeben. Um Protein hoher Qualität zu erhalten, wurden die Zellen innerhalb von zwölf Tagen bei niedriger Lichtintensität angezogen. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Zellwände mit Lysozym angedaut, mit einer Yedapresse aufgebrochen und das Protein mit 0,6 % β -DM aus den Thylakoidmembranen extrahiert.

Die Aufreinigung des Rohextraktes erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie. Als Säulenmaterial kam generell Q-Sepharose HP zum Einsatz. Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt. Zur Abtrennung der Phycobilisomen wurde ein Vorreinigungslauf mit einer Säule von 6 cm Durchmesser und 1,5 cm Länge durchgeführt. Dazu wurde der Extrakt in C₅₀ Puffer (C_X:20 mM MES pH 6,4; 0.02 % β -DM; X mM MgSO₄) auf die Säule aufgetragen, mit C₁₀₀ gespült und abschließend mit C₁₅₀ von der Säule eluiert. Anschließend wurde das Eluat durch einen 0,2 μ m Filter gegeben und mit C₀ auf eine MgSO₄ Konzentration von 75 mM verdünnt. Mit diesem Extrakt wurde nun eine HPLC Q-Sepharose-Säule beladen. Die Reinigung erfolgte mittels eines Gradienten von C₇₅ bis C₂₀₀. Die trimere Form des PS I eluierte bei 150 mM MgSO₄. Man erhielt so eine Proteinlösung von ca. 1 mg/ml (300 μ M Chlorophyll). Um das Protein weiter zu reinigen und aufzukonzentrieren, wurde es im folgenden zwei Ultrafiltrationsschritten unterworfen. Dabei wurden Membranen mit einer Ausschlußgröße von 100 kDa (PS 100 der Fa. Intersept) verwendet. Im ersten Schritt wurde das Protein auf eine Konzentration von ca 35 mg/ml (10 mM Chlorophyll) aufkonzentriert. Zu dieser Lösung wurde nun unter Rühren langsam D₀ zugetropft (D_X:5 mM MES pH 6,4; 0.02 % β -DM; X mM MgSO₄) bis eine MgSO₄ Konzentration von 9 mM eingestellt war. Diese Lösung wurde einer zweiten Ultrafiltration unterworfen, im Laufe derer das Protein in mikrokristalliner Form ausfiel, da die geringe Salzkonzentration nicht mehr ausreichte, es in Lösung zu halten. Als weiterer Reinigungsschritt wurden diese Kristalle mit D₁₀₀ aufgelöst und die Lösung unter Zugabe von D₀ auf eine Konzentration von 6 mM MgSO₄ und 100 μ M PS I verdünnt. Über Nacht kristallisierten aus dieser Lösung Mikrokristalle, die die Grundlage der für die kristallographischen Untersuchungen eingesetzten Kristalle bildeten. Auf diese Weise wurden bis zu

100 mg Protein (50% des aufgereinigten Proteins) in mikrokristalliner Form erhalten. Um das Aufreinigungsprotokoll schonender zu gestalten, wurden auch Versuche unternommen, das Protein mittels Dialyse gegen eine 1 M Saccharose-Lösung aufzukonzentrieren. Aufgrund der Zeitdauer dieses Verfahrens wurde diese Methode jedoch verworfen, da mit der Ultrafiltration eine komplette Aufreinigung binnen ca. 14 Stunden möglich war.

2.2 Analytische Techniken

Die Proteinkonzentrationen wurden indirekt über die Extinktion der an den Proteinkomplex gebundenen Chlorophylle bestimmt. Hierzu wurden die Chlorophylle in 80 % (v/v) Aceton extrahiert und die Extinktion bei 663,6 nm ($\epsilon = 76790 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt (Porra *et al.*, 1989). Unter der Annahme, daß pro Reaktionszentrum ca. 100 Chlorophylle gebunden werden, beträgt die Konzentration des monomeren Proteins den einhundertsten Teil der Chlorophyllkonzentration.

Die Zusammensetzung der Kristalle sowie die Reinheit der Proteinproben wurde routinemäßig mit SDS-HD-Phast Gelen der Fa. Pharmacia überprüft. Der LMW-Molekulargewichtsstandard setzte sich aus folgenden Proteinen zusammen: Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa). Der Probenpuffer bestand aus 20 mM TRIS, 2 mM EDTA, 0,2% DTT, 5% SDS und 0,02% Bromphenolblau. Die Färbung der Gele erfolgte mit Silbernitrat Lösung entsprechend dem Standardprotokoll der Fa. Pharmacia.

2.3 Kristallisation

Die Kristallisationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Petra Fromme an der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

Wie oben geschildert, kristallisiert PS I, wenn man die Salzkonzentration (Ionenstärke) der das Protein umgebenden Lösung herabsetzt. Dieses Verhalten konnte durch Steuerung der Bedingungen genutzt werden, um für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Kristalle zu züchten (Fromme & Witt, 1998). Als Methode kam dabei die Mikrodialyse zum Einsatz (Dattagupta *et al.*, 1975). Hierzu wurde ein Quarzglasröhrchen ($\emptyset_{innen} = 2 \text{ mm}$) an einer Seite mit einer Membran (Ausschlußvolumen 12 kDa) verschlossen. Durch das Einschleiben eines Plastikschauchs in das Glasröhrchen wurde die Membran anschließend fixiert. Zur Kristallisation wurde 4 μl Lösung mit variabler Protein und MgSO_4 Konzentration in das Glasröhrchen eingebracht. Die Proteinkonzentration wurde dabei von 100-200 μM

variiert, die Salzkonzentration in der Proteinlösung von 15-50 mM MgSO_4 . Das zusammengesteckte Röhrchen wurde nun in ein Reservoir gestellt, in dem eine geringere MgSO_4 Konzentration herrschte als im Glasröhrchen. Durch die langsame Verringerung der Salzkonzentration im Röhrchen kam es zu einer kontrollierten Kristallisation des Proteins.

Die zur Kristallstrukturanalyse eingesetzten Kristalle wurden durch Kristallisation in drei Stufen erhalten. Zunächst wurden aus 6 mM MgSO_4 und 10 μM PS I enthaltender Lösung Mikrokristalle kristallisiert. In einem zweiten Schritt wurden 4 μl einer 150 μM PS I enthaltenden D_{50} Lösung in das Glasröhrchen pipettiert und einen Tag gegen D_{15} dialysiert. Anschließend wurden mittels einer Schlinge einige der Mikrokristalle in die Lösung im Glasröhrchen eingebracht und der Ansatz in ein Reservoir mit D_9 umgesetzt. Nach ca. zwei Tagen erhielt man Kristalle mit einer Länge von 0,3-0,5 mm, die zum Impfen eines weiteren Kristallisationsansatzes eingesetzt wurden. Dazu wurden 4 μl einer 200 μM PS I enthaltenden D_{50} Lösung im Glasröhrchen für einen Tag gegen D_{30} dialysiert und anschließend 1-3 der im zweiten Schritt gezüchteten Kristalle in das Glasröhrchen eingebracht. Nachdem der Ansatz für zwei Tage gegen D_{11} dialysiert wurde, fanden sich im Glasröhrchen zumeist einer oder mehrere Kristalle, die zur kristallographischen Untersuchung geeignet waren.

Alle o. g. Experimente wurden bei 4° C durchgeführt.

2.3.1 Einfrieren der Kristalle

Um die Strahlenschädigung der Kristalle beim Einsatz von Synchrotronstrahlung zu minimieren, mußten die Röntgenbeugungsdaten bei 100 K gemessen werden. Hierzu werden die Kristalle vorher mit einem Gefrierschutzmittel versetzt und anschließend eingefroren. Bereits in vorangegangenen Arbeiten (Schubert, 1997; Klukas, 1999) unternahm man Versuche in dieser Richtung. Es gelang jedoch nicht, mit den erhaltenen Kristallen Daten einheitlicher Qualität zu messen (s. u.). Als geeignetes Gefrierschutzmittel hatte sich Saccharose herausgestellt, da alle anderen Substanzen zu einer Beeinträchtigung der Röntgenbeugung führten.

Um die Kristalle einzufrieren, wurden diese mit Saccharoselösungen ansteigender Konzentration versetzt. Diese Prozedur wurde gewählt, um die Kristalle nicht direkt der hohen Saccharosekonzentration auszusetzen, da dies aufgrund des hohen Konzentrationsgefälles zur Zerstörung der Kristalle geführt hätte. Aus der letzten Lösung wurden die Kristalle anschließend mittels einer an einem Halter montierten Schlinge in ein Gefäß mit flüssigem Propan getaucht. Diese Gefäß wurde in einem Bad aus flüssigem Stickstoff ge-

kühlt. Das verschlossene Gefäß wurde dann in einen Stickstofftank überführt. Trotz der prinzipiellen Möglichkeit Kristalle einzufrieren, existierten beim Beginn der Arbeit einige Probleme, die für eine erfolgreiche Röntgenstrukturanalyse bei höherer Auflösung gelöst werden mußten. Das Hauptproblem bestand darin, daß die an eingefrorenen Kristallen gemessenen Röntgendaten nur in der Raumgruppe $P2_1$ ausgewertet werden konnten, während bei 4° gemessene Kristalle in der Raumgruppe $P6_3$ vorlagen. Darüberhinaus waren auch die Datensätze von verschiedenen Kristallen, sowie auch an verschiedenen Stellen desselben Kristalls gemessene Teildatensätze nicht konsistent zueinander (Klukas, 1999). Die Ursache für dieses Verhalten waren vermutlich beim Einfrieren entstandene lokale Inhomogenitäten (Klukas, 1999) in den Kristallen. Auffällig war außerdem die Zunahme der Mosaikbreite der tiefgefrorenen Kristalle, die die Auswertung bei höherer Auflösung zunehmend erschwerte. Um den mechanischen Streß auf die Kristalle, sowie das Austrocknen und das Anlösen der Kristalle beim Einfrieren zu verringern, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Einfrierbedingungen milder zu gestalten. Aufgrund des hohen Solvensgehaltes der Kristalle von ca. 80 % mußte dabei besonders behutsam vorgegangen werden. Andererseits mußten die Kristalle auch lange genug in Saccharose getränkt werden, um einen vollständigen Austausch des Wassers gegen Saccharose zu gewährleisten.

Die nachfolgenden Bedingungen stellten sich nach Abschluß der Experimente als optimal heraus. Bei 20°C wurden die Kristalle nacheinander für jeweils 5 Minuten in Saccharoselösungen folgender Konzentration getränkt: 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1.0 M, 1.5 M. In einem letzten Schritt wurden die Kristalle dann für eine Stunde in einem verschlossenen Gefäß in 2,0 M Saccharose getränkt. Wesentlich war es, insbesondere beim Einsatz der 1,5 M und 2,0 M darauf zu achten, das die Kristalle nicht aufschwammen und immer vollständig von der Saccharoselösung umgeben waren, um nicht auszutrocknen. Aus der 2,0 M Lösung heraus wurden die Kristalle anschließend wie oben beschrieben eingefroren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der die Güte der gesammelten Daten beeinflusste, war die Kristallgröße. Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, das nur Kristalle mittlerer Größe ($\emptyset=0,3-0,5$ mm, Länge=1,0-1,5 mm) geeignet waren, um auf die o. g. Weise eingefroren zu werden, da bei größeren Kristallen offenbar der Austausch des Wassers gegen Saccharose zu ungleichmäßig war und zu einer Verschlechterung der Röntgenbeugung führte.

2.4 Datensammlung und Reduktion

Alle in dieser Arbeit erwähnten Röntgenbeugungsdaten wurden mittels der Oszillations- (Rotations-)methode gemessen. Hierbei wird ein Kristall senkrecht zum Röntgenstrahl

gedreht, wobei die Drehung in kleinen Winkelinkrementen erfolgt und nach jedem Inkrement eine Aufnahme angefertigt wird. Das Winkelinkrement mußte gerade so groß gewählt werden, daß benachbarte Reflexe noch getrennt voneinander gemessen werden konnten. Aufgrund der Strahlenschädigung an den Kristallen war es jedoch nicht möglich, ein beliebig kleines Winkelinkrement zu wählen. Die Größe dieses Winkelinkrements wird wesentlich von der Mosaizität der Kristalle, der zu messenden Auflösung, der Länge und Orientierung der Gitterachsen, sowie der Strahldivergenz bestimmt. Die günstigste Orientierung des Kristalls wäre demnach diejenige mit den a^*/b^* Achsen parallel zur Rotationsachse. Aufgrund des meist nadelförmigen Wachstums der Kristalle waren diese aus technischen Gründen häufig mit ihrer c^* -Achse ungefähr parallel zur Rotationsachse ausgerichtet. Aufgrund des dadurch bedingten kleineren tolerierbaren Rotationsinkrements erhöhte sich die Anzahl der zur Messung eines vollständigen Datensatzes nötigen Röntgenaufnahmen und somit die Strahlenschädigung am Kristall. Der Vorteil dieser Kristallorientierung lag jedoch darin, daß für einen vollständigen Datensatz der Kristall nur um 60° gedreht werden mußte und somit insgesamt weniger Aufnahmen als bei anderen Kristallorientierungen nötig waren. Als geeignetes Winkelinkrement wurde für den nativen Datensatz „Nativ(1)“ 0.3° pro Aufnahme gewählt. Alle anderen Datensätze wurden mit einem Winkelinkrement von 0.4° pro Aufnahme gemessen. Die Zahl der sich daraus ergebenden Aufnahmen war in sinnvoller Zeit nur an einem Synchrotron zu messen. Zudem sprach auch die hohe Mosaizität der PS I Kristalle von z. T. $0,7^\circ$ und mehr, sowie die zu messende Auflösung für den Einsatz von Synchrotronstrahlung. Deshalb wurden alle dem Strukturmodell zugrundeliegenden nativen und Schweratomderivat-Datensätze am ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) in Grenoble am Strahlrohr ID 2 gemessen. Als Detektor stand dort eine MAR Research Image Plate mit einem Plattendurchmesser von 345 mm zur Verfügung. Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 100 K mit einem Oxford Cryosystems Cryostream durchgeführt. Durch die hohe Brillanz des Röntgenstrahles war es möglich, kurze Belichtungszeiten zu verwenden und wegen der geringeren Strahldivergenz die Auflösung der Röntgendaten voll zu nutzen, da sich die Reflexe nicht überlagerten.

Da PS I drei $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster enthält, sollte das Signal der anomalen Dispersion der Eisenatome als zusätzliche Phaseninformation genutzt werden. Die K-Absorptionskante von Eisenatomen liegt bei einer Wellenlänge $1,74 \text{ \AA}$. Deshalb wurde der Datensatz Nativ(2) bei der langwelligsten technisch möglichen Wellenlänge von $1,44 \text{ \AA}$ gemessen, um ein intensives anomales Signal zu erhalten. Die Quecksilber- und Platin-Derivatdatensätze

wurden bei der an diesem Meßplatz üblichen Wellenlänge von $1,0 \text{ \AA}$ gemessen, da die L_{III} Kanten von Platin und Quecksilber bei $1,07 \text{ \AA}$ und $1,01 \text{ \AA}$ liegen und deshalb auch hier das Signal der anomalen Dispersion genutzt werden konnte. Die genauen Meßparameter für die einzelnen Datensätze sind in Tabelle 3.1 angegeben. Trotz der Messung bei einer Temperatur von 100 K kam es im Verlauf der Messung der Datensätze zu Strahlenschädigungen an den Kristallen. Deshalb war es nötig, den Kristall 3-5 mal parallel zur Rotationsachse auf noch nicht bestrahlte Positionen zu verschieben, um einen Datensatz von konstanter Qualität zu erhalten.

Für Röntgenaufnahmen im Laboratorium stand ein FR-571 Röntgengenerator der Firma Delft Instruments zu Verfügung. Dieser mit einer rotierenden Anode arbeitende Generator erzeugte Röntgenstrahlung einer Wellenlänge von $1,542 \text{ \AA}$. Aufgrund der geringen Intensität - die üblichen Belichtungszeiten bewegten sich im Rahmen von 45 bis 60 Minuten - und der geringen Brillanz erwies sich dieser Generator jedoch als ungeeignet für die Messung ganzer Datensätze und wurde deshalb nur für Testaufnahmen verwendet.

Die Indizierung der Röntgenaufnahmen und die Integration der Reflexe erfolgte mit dem Programm Denzo/XdisplayF (Otwinowski, 1993). Anschließend wurden mit dem Programm SCALEPACK (Otwinowski, 1993) die einzelnen Röntgenaufnahmen aufeinander skaliert und die partiellen Reflexe aufsummiert. Bei diesem Schritt wurden auch die Güte und das Vorhandensein des anomalen Signals überprüft. Dazu wurde der Datensatz mit und ohne Mittelung der Friedelpaare aufeinander skaliert und anhand der Übereinstimmung dessen Nutzbarkeit beurteilt. Zur Umwandlung der so gewonnenen Intensitäten in Strukturfaktoramplituden wurde das Programm Truncate (CCP4, 1994) eingesetzt.

2.5 Darstellung von Schweratomderivaten und Lösung des Phasenproblems

Das Phasenproblem wurden mit Hilfe des multiplen isomorphen Ersatzes unter Nutzung des anomalen Signals (MIRAS) gelöst. Bei dieser Methode wird ein nativer Kristall in Schweratomlösung getränkt, um Schweratome an definierten Positionen am Protein im Kristall einzuführen. Aufgrund der bisherigen Erfahrungen wurden zunächst Natrium -2-ethylmercurithiosalicylat (EMTS), Bis(μ -iodo-ethylendiamin-platin(II) nitrat (PIP) und $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$ als Schweratomverbindungen eingesetzt (Klukas, 1999; Schubert, 1997; Krauß *et al.*, 1993). Zur Darstellung wurden die Kristalle bei 4° C für 12 bis 24 Stunden in $0,5\text{-}1 \text{ mM}$ Lösung der entsprechenden Schweratomverbindung belassen. Höhere Konzentrationen konnten nicht eingesetzt werden, da aufgrund der besonderen Kristallisations-

methode (Auskristallisieren durch Verringerung der Salzkonzentration) die Tendenz der Kristalle zur Auflösung mit ansteigender Ionenstärke der Lösung zunimmt. Dies ist insbesondere beim Zusatz von Saccharose als Gefrierschutzmittel wichtig, da deren Zusatz die Löslichkeit des Proteins weiter steigert. Im Falle von PIP war es wichtig, die Lösungen durch einen $0,2\ \mu\text{m}$ Filter zu filtrieren. Um eine höhere Besetzungsdichte des Proteins mit Schweratomen zu erreichen und den mechanischen Streß durch Zusetzen von Schweratomverbindungen zu bestehenden Kristallen zu minimieren, wurden Kristallisationsexperimente in Gegenwart von Schweratomverbindungen durchgeführt (Kokristallisation). Zusätzlich zu den Verbindungen EMTS, PIP und $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$ wurde hier noch K_2PtCl_4 eingesetzt. Die Konzentrationen an Schweratomverbindung betragen 0,5 und 1 mM. Es ist zu beachten, daß der Anteil an MgSO_4 in den Lösungen entsprechend der Konzentration der zugesetzten Schweratomverbindung herabgesetzt wurde, um eine konstante Ionenstärke der Lösung zu gewährleisten, wodurch immer unter optimalen Bedingungen kristallisiert werden konnte. Die übrigen Bedingungen und Arbeitsschritte entsprechen denen der Kristallisation nativer Proteinkristalle.

Alle Schweratomderivatkristalle wurden entsprechend der in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Prozedur mit dem Gefrierschutzmittel Saccharose versetzt und in Propan eingefroren. Jedoch wurde in den Saccharoselösungen eine dem jeweiligen Derivat entsprechende Konzentration an der Schweratomverbindung eingestellt, um eine Diffusion der Schweratomverbindung aus den Kristallen zu verhindern. Bei den Quecksilberderivaten kann man davon ausgehen, daß die Quecksilberatome kovalent an das Protein gebunden werden. Über die Bindung von PIP an das Protein ist hingegen nichts bekannt. Deshalb sollte diese Maßnahme insbesondere im Falle einer reversiblen Bindung des Platins an das Protein zu einer Steigerung der Qualität der PIP-Derivate beitragen.

2.5.1 Lösung des Phasenproblems

Sämtliche zur Skalierung der Derivatdatensätze und Lösung der Pattersonfunktion eingesetzten Programme entstammen, sofern nicht anders erwähnt, dem CCP4-Programmpaket (CCP4, 1994). Für die Skalierung der Schweratomdatensätze auf die nativen Datensätze wurde das Programm FHSCAL verwendet, das nach der Methode von Kraut (Kraut *et al.*, 1962) vornimmt. Eine weitere Analyse der Skalierung, der Güte der isomorphen und anomalen Differenzen, sowie der Konsistenz der Achsenaufstellung wurde mit dem Programm SCALEIT durchgeführt. Da die Struktur komplett auf Datensätzen beruht, die bei 100 K gemessen wurden, wurden die Schweratomlagen gänzlich neu bestimmt.

Da in der polaren Raumgruppe $P6_3$ der Koordinatenursprung entlang der c -Achse frei wählbar ist, mußten die Lagen der Schweratome in den verschiedenen Derivaten auf einen gemeinsamen Ursprung bezogen werden. Dies wurde durch Analyse von isomorphen und anomalen Kreuz-Differenz-Fouriersynthesen erreicht. Bei diesem Verfahren werden die aus einem Derivat gewonnenen Phasenwinkel mit den isomorphen bzw. anomalen Amplitudendifferenzen eines anderen Derivates kombiniert. Die z -Koordinaten der Schweratomlagen des ersten Derivates wurden hierbei auf einen willkürlich gewählten Ursprung bezogen. Da durch Analyse der Pattersonfunktion des zweiten Derivats die x - und y -Koordinaten der Schweratomlagen des zweiten Derivates bekannt waren, konnte nun aus der Kreuz-Differenz-Fouriersynthese die z -Koordinate der Schweratomlagen des zweiten Derivates in bezug auf das erste festgelegt werden.

Alle o.g. Patterson- und Elektronendichtefunktionen wurden mit dem Programm FFT errechnet. Die Überprüfung der Schweratomlagen mittels Kreuzvektoren wurde unter Zuhilfenahme des Programms PEAKMAX durchgeführt. Eine erste Verfeinerung der Schweratomlagen im Pattersonraum erfolgte mit dem Programm VECREF. Nachdem auf diese Weise ein erstes Schweratommodell gewonnen wurde, wurden die Positionen der Schweratomlagen, sowie deren Besetzungen mit den Programmen MLPHARE und SHARP (de La Fortelle & Bricogne, 1997) verfeinert und mit diesen erste Phasenwinkel bestimmt.

Die Kombination der so ermittelten Phasenwinkel mit den nativen Strukturfaktoramplituden lieferte eine erste Elektronendichteverteilung. Um die Elektronendichteverteilung zu verbessern, wurde diese mit dem Programm SOLOMON modifiziert, wobei die im Programm implementierten Funktionen des „solvens flipping“ und „histogram matching“ eingesetzt wurden. Die so gewonnene Elektronendichteverteilung bei $3,5 \text{ \AA}$ Auflösung diente als Basis für die Erstellung des ersten Strukturmodells.

2.6 Modellbau und Verfeinerung

Zur Darstellung der Elektronendichten wurden sowohl $2F_O-F_C$ als auch F_O-F_C sigma A-gewichtete (Read, 1986) Elektronendichtekarten benutzt.

Zur Manipulation von PDB-Dateien und Elektronendichtekarten kamen die Programme moleman (Kleywegt, 1997) und mapman (Kleywegt & Jones, 1996) aus dem Uppsala-Software-Factory Programmpaket zum Einsatz.

Zur Begutachtung der Elektronendichten und Erstellung des Molekülmodells wurde

das Programm O (Jones *et al.*, 1991) eingesetzt, das alle nötigen Funktionalitäten zur Manipulation des Molekülmodells bereitstellte.

Die Strukturmodelle wurden wie folgt erzeugt: zunächst wurde ein sog. „C α -Trace“, d. h. die Verbindungen zwischen einzelnen C α Atomen innerhalb einer Polypeptidkette modelliert. Daraus wurde dann eine Polyalaninkette gebildet. In diese Polyalaninkette wurde die bekannte Aminosäuresequenz eingepaßt. Die modellierten Aminosäuresequenzen stimmen mit wenigen Abweichungen mit den in Mühlenhoff *et al.* (1993) beschriebenen Sequenzen überein. Da die am besten definierten Sekundärstrukturelemente die transmembranen α -Helices waren, wurde mit diesem Procedere dort begonnen. Das Auffinden zusammenhängender Dichtebereiche wurde z.T. durch die bereits bekannten Strukturmodelle (Schubert, 1997; Klukas, 1999) erleichtert. Die korrekte Modellierung der Aminosäuresequenzen beruhte im wesentlichen auf dem Auffinden voluminöser Elektronendichten in der Nähe der Hauptkette. Diese wurden dann mit den Abfolgen aromatischer Aminosäuren innerhalb der Aminosäuresequenzen korreliert. Als hilfreich erwies sich hierbei, daß Chlorophyll-Moleküle axial zumeist von Histidinen koordiniert werden. Da Elektronendichten von Chlorophyllen meistens sicher zu erkennen waren, konnten diese Histidine als „Anker“ innerhalb der Sequenz dienen. Die zweizählige Pseudosymmetrie zwischen PsaA und PsaB konnte ausgenutzt werden, um Teile des Modells zwischen den Untereinheiten zu transferieren. Dadurch konnte der Aufwand beim Verfolgen der Hauptkette z. T. verringert werden.

Die kristallographische Verfeinerung wurde mit dem Programm CNS (Brünger, 1998) durchgeführt. Für alle Verfeinerungsschritte wurden die im Programm enthaltenen Protokolle verwendet, deren Optimierungsprozedur auf dem Prinzip maximaler Wahrscheinlichkeiten beruht. Vor der geometrischen Verfeinerung wurde jeweils eine Temperaturfaktor-Korrektur der Röntgendaten errechnet und eine Korrektur für den Solvensanteil des Modells eingeführt (bulk solvent correction).

Die Anpassung des Modells an die Meßdaten und die Korrektur der Geometrie des Modells fand in zwei Schritten statt.

Im ersten Schritt wurden grobe Fehler des Modells, wie z. B. Verletzung von van der Waals Kontakten durch Energiezufuhr bei einer konstanten Temperatur korrigiert. Anschließend wurde die Verfeinerung nach dem 'simulated annealing' Protokoll durchgeführt. Die dabei verwendeten Starttemperaturen bewegten sich im Bereich von 2500 K-5000 K. Die Temperatur wurde in Schritten von 25 K pro Zyklus herabgesetzt. Anschließend wurde noch 100 Zyklen bei einer konstanten Temperatur von 300 K verfeinert.

In den letzten Stadien der Verfeinerung wurde das 'simulated annealing' Protokoll durch eine konventionelle Koordinatenverfeinerung ersetzt.

Im Anfangsstadium der Verfeinerung wurden nur zwei Gruppen-B-Faktoren pro Aminosäure eingeführt, einer für die Hauptkettenatome und einer für die Seitenkettenatome. In den letzten Rechnungen wurden individuelle isotrope B-Faktoren benutzt. Diese waren jedoch hinsichtlich der Abweichung zwischen benachbarten Atomen eingeschränkt. Die Sollwerte für die Standardabweichungen der Temperaturfaktoren benachbarter Atome lagen zwischen $1,5 \text{ \AA}^2$ und $2,5 \text{ \AA}^2$. Zur Überprüfung der Güte des angepaßten Modells wurde der freie R-Wert (R_{free}) (Brünger, 1992) verwendet. Dazu wurden von den 238120 gemessenen (93,3 % der im gegebenen Auflösungsbereich theoretisch meßbaren) Röntgenreflexen 4743 (2,0 %) von der Verfeinerung ausgenommen. Es wurden nur 2,0 % der Reflexe in den Testset aufgenommen, um das Verhältnis von Daten zu Parametern nicht zu gering werden zu lassen. Dies schien insbesondere in den höheren Auflösungsschalen notwendig, da hier nur eine Vollständigkeit von ca. 78,0 % erreicht wurde. Im Rahmen der Verfeinerung wurde das Gewicht (w_a) zwischen dem kristallographischen und geometrischen Energie-term über die Änderung des R_{free} und die Änderung geometrischer Kriterien wie z. B. rms-Abweichungen von optimalen Bindungswinkeln bestimmt und angepaßt.

Die idealen geometrischen Parameter der Aminosäuren beruhen auf den Daten von Engh und Huber (Engh & Huber, 1991). Zur Verfeinerung der Kofaktoren (s. Abb. 2.1) mußten die entsprechenden Topologie- und Parameterdateien entworfen werden. Die geometrischen Parameter der Kofaktoren wurden, sofern vorhanden, aus Kleinkristallstrukturen abgeleitet. Die Geometrie des Porphyrinsystems beruht auf der Ethyl-Chlorophyllid-Struktur von Kratky & Dunitz (1977). Beim Chl a handelt es sich um ein Chlorophyll, das mit dem C $_{20}$ -Alkohol (2-*E*, 7-*R*, 11-*R*)-Phytol verestert wird. Diese Phytylseitenketten wurden mit dem Programm Spartan¹ modelliert und die Geometrie mit einer einfachen Kraftfeldrechnung optimiert. Aus den so erhaltenen Modellen wurden die Parameter für CNS gewonnen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Phytylseitenkette zwei Chiralitätszentren besitzt. In analoger Weise wurde mit dem Modell für das Phyllochinon-Molekül verfahren. Die Topologie der Fe $_4$ S $_4$ -Cluster stammt aus der Kristallstruktur von Ferredoxin aus *Chlostridium acidi urici* (Dauter *et al.*, 1997), die des β -Karotin Modells aus der Kristallstruktur von β -Karotin (Bart & MacGillavry, 1968). Zur räumlichen Struktur des β -Karotins ist zu bemerken, daß die Doppelbindungen in den terminalen Ringen nicht in der Ebene des konjugierten π -Systemes liegen, sondern aufgrund steri-

1. SPARTAN V. 5.0 Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Ave., Ste. 370 Irvine, CA 92612 U.S.A

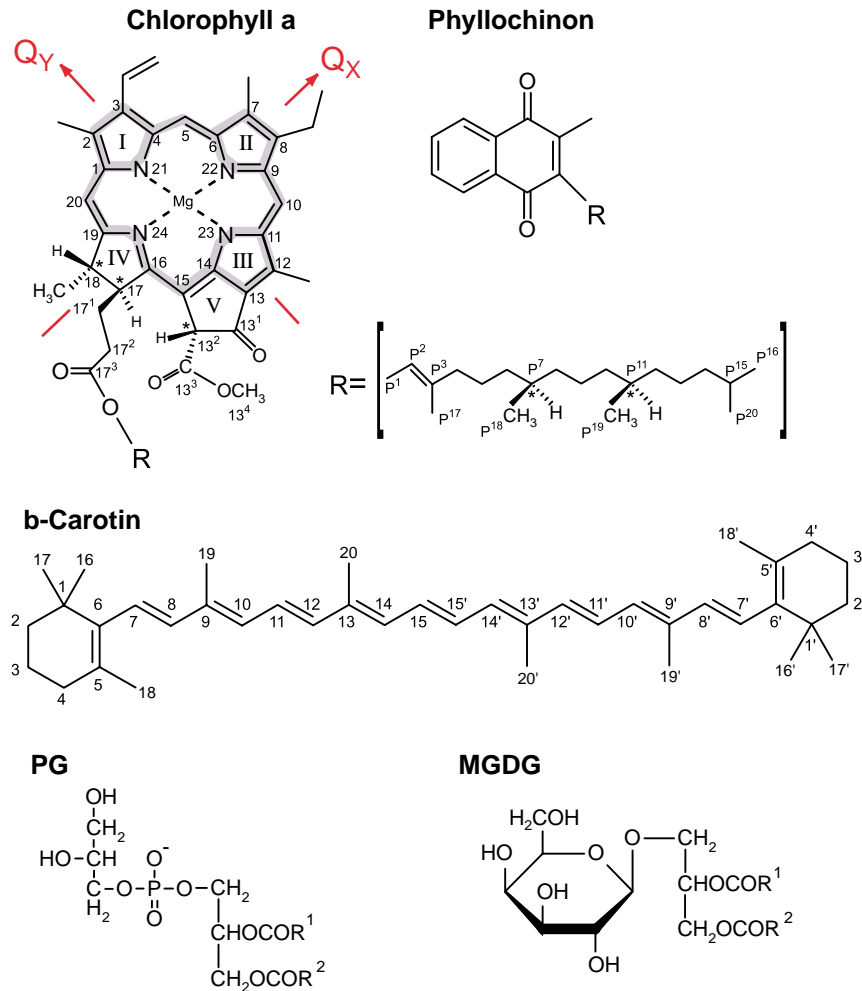


Abbildung 2.1: Die Modelle der Kofaktoren die der Verfeinerung zugrunde liegen. Bei dem als R bezeichneten Rest handelt es sich um die Phytlyseitenkette. Das konjugierte π -System des Chlorophylls ist grau hinterlegt. Die Reste R¹ und R² stehen für die Alkylketten von Fettsäuren variabler Länge und Sättigung.

schon Hinderung um 40° gegen diese Ebene um die Bindung zwischen C₆(C_{6'}) und C₇(C_{7'}) gedreht sind. In der Struktur gefundene Lipide wurden als Phosphatidylglycerin (PG) und Monogalactosyldiglycerin (MGDG) modelliert und ihre Modelle analog zu den Phytlyseitenketten mit dem Programm Spartan erzeugt. Da aufgrund der Elektronendichteverteilung keine Entscheidung zu fällen war, welche Fettsäure vorliegt, wurden die Topologien willkürlich auf Basis der ungesättigten Stearinsäure (C₁₈) erzeugt.

2.7 Analyse des Strukturmodells und Visualisierung

Die Analyse der geometrischen Parameter des Strukturmodells wurde mit den Programmen PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) und PROMOTIF (Hutchinson & Thornton,

1996) durchgeführt. Für die Analyse der Wasserstoffbrückenbindungen wurde das Programm HBPLUS (McDonald & Thornton, 1994) verwendet. Die Darstellungen der Elektronendichteverteilungen wurden mit den Programmen O (Jones *et al.*, 1991) und BOBSCRIPT (Kraulis, 1991), Darstellungen von van der Waals Oberflächen mit Grasp (Nicholls *et al.*, 1991) angefertigt. Alle übrigen Abbildungen des Proteins wurden mit dem Programm MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) in Kombination mit POVRAY (Informationen unter <http://www.povray.org>) angefertigt.