

3 Erstellung eines Strukturmodells

3.1 Datensammlung

Zu Beginn der kristallographischen Untersuchung an eingefrorenen Kristallen konnten native Datensätze mit einer Auflösung von bis zu 3,0 Å gemessen werden. Allerdings lagen diese Daten in der Raumgruppe $P2_1$ mit den Zellkonstanten $a=277$ Å, $b=165$ Å, $c=283$ Å, $\beta=119^\circ$ vor. Außerdem konnten keine, zu den nativen Daten isomorphen Schweratomderivat-Datensätze gemessen werden. Durch die in Abschnitt 2.3.1 beschriebene Modifikation der Einfrierprozedur gelang es jedoch, Kristalle der Raumgruppe $P6_3$ mit den Zellkonstanten $a=b=281,0$ Å, $c=165,2$ Å, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ zu erhalten. Diese Daten waren damit jedoch nicht isomorph zu den früher bei 4°C gemessenen Daten mit den Zellkonstanten $a=b=286,0$ Å, $c=167,0$ Å. Folglich mußten zur Lösung der Phasenproblems erneut Schweratomverbindungen dargestellt werden (s. Abschnitt 2.5). Von allen gemessenen Datensätzen wurden für die Strukturlösung vier benutzt. Ein EMTS-, ein PIP- und ein nativer Datensatz (Nativ(2)) bei 3,0 Å Auflösung wurden für die Erstellung einer ersten experimentellen Elektronendichteverteilung verwendet. Das Strukturmodell wurde gegen einen später gemessenen nativen Datensatz (Nativ(1)) von 2,5 Å Auflösung verfeinert. Die Meßparameter und Statistiken der zur Strukturlösung herangezogenen Daten sind in

Tabelle 3.1: Zur Strukturlösung genutzte Datensätze. Werte in Klammern geben den Wert für die höchste Auflösungsschale an. Für Nativ(1) entspricht dies einer Auflösung von von 2,59 Å-2,50 Å, für Nativ(2) einer Auflösung von 3,00 Å-2,90 Å und für die übrigen Datensätze einer Auflösung von 3,15 Å-3,00 Å.

| Datensatz | Nativ(1) | Nativ(2) | EMTS | PIP |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Wellenlänge (Å) | 0,99 | 1,44 | 0,99 | 0,99 |
| Konzentration/Zeit | - | - | 1 mM/24h | 1 mM/24h |
| Auflösung (Å) | 30-2,5 | 30-2,9 | 50-3,0 | 50-3,0 |
| Unabhängige Reflexe | 238120 | 148244 | 146662 | 138083 |
| R_{merge}^* | 0,064(0,247) | 0,079(0,207) | 0,076(0,224) | 0,065(0,254) |
| Vollständigkeit (%) | 97,1(88,9) | 90,4(76,3) | 98,8(95,6) | 93,3(68,3) |
| $\langle I/\sigma \rangle$ | 10,6(3,4) | 10,8(4,6) | 20,5(8,9) | 21,1(4,2) |

* $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i | I_i(h) - \langle I(h) \rangle | / \sum_h \sum_i I_i(h)$, wobei $I_i(h)$ die Intensität jedes einzelnen Reflexes bedeutet und $\langle I(h) \rangle$ für die durchschnittliche Intensität steht.

Tabelle 3.1 zusammengefaßt. Abbildung 3.1 zeigt ein Beugungsbild des nativen Daten-

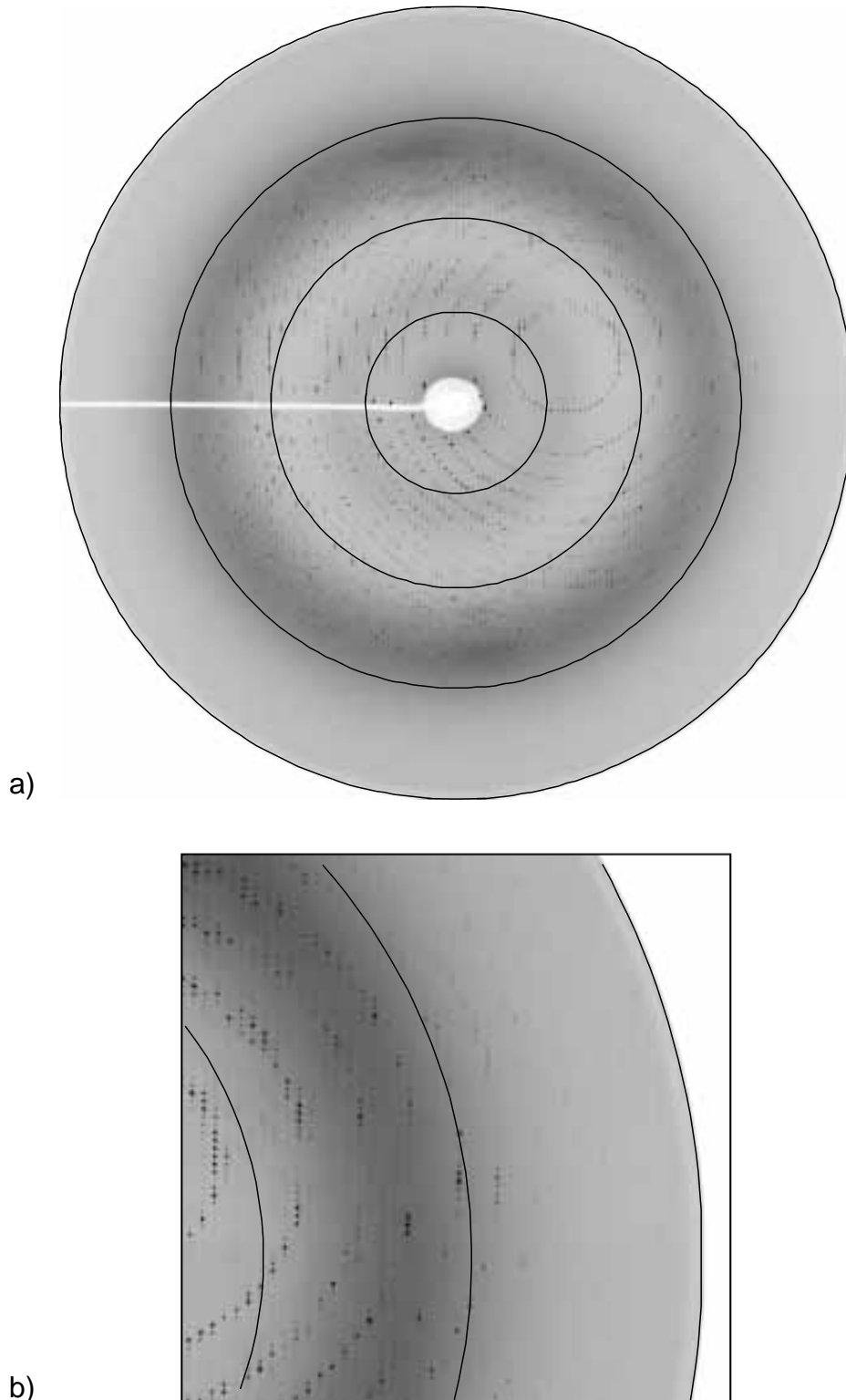


Abbildung 3.1: a) Beugungsbild des Nativ(1) PS I Kristalls gemessen bei 100 K mit einem Oszillationsbereich von $0,4^\circ$ bei einer Wellenlänge von $0,99 \text{ \AA}$ am Strahlrohr ID 2 der ESRF in Grenoble. Der Rand des Detektors entspricht einer Auflösung von $2,4 \text{ \AA}$. Die Ringe entsprechen von innen nach außen Auflösungen von $8,4 \text{ \AA}$; $4,2 \text{ \AA}$; $2,8 \text{ \AA}$ und $2,4 \text{ \AA}$. b) Ausschnitt aus a). Aufgrund des geringen Tonwertumfangs bei der Reproduktion der Aufnahme sind die Reflexe bei ca. $2,5 \text{ \AA}$ nur schwach zu erkennen, konnten für die Strukturlösung jedoch verwendet werden.

satzes bei 2,5 Å Auflösung. Bei der Auswertung aller Datensätze fiel zunächst die geringe Mosaizität von 0,4°-0,6° der Kristalle auf, die vermutlich auf die optimierte Einfrierprozedur und die verbesserte Kristallisation des Proteins zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu betrug die Mosaizität der Datensätze, die den vorherigen Strukturmodellen bei 4,0 Å zugrunde lagen, 0,7° oder mehr. (Klukas, 1999; Schubert, 1997).

3.2 Lösung der Pattersonfunktion

Die ersten auf den Schweratomen beruhenden Phasenwinkel wurden nach der MIRAS Methode bestimmt. Dazu war es zunächst nötig, die Koordinaten der Eisen-, Quecksilber- und Platinatome aus der Analyse von Pattersonfunktionen zu bestimmen. Die Symmetrie

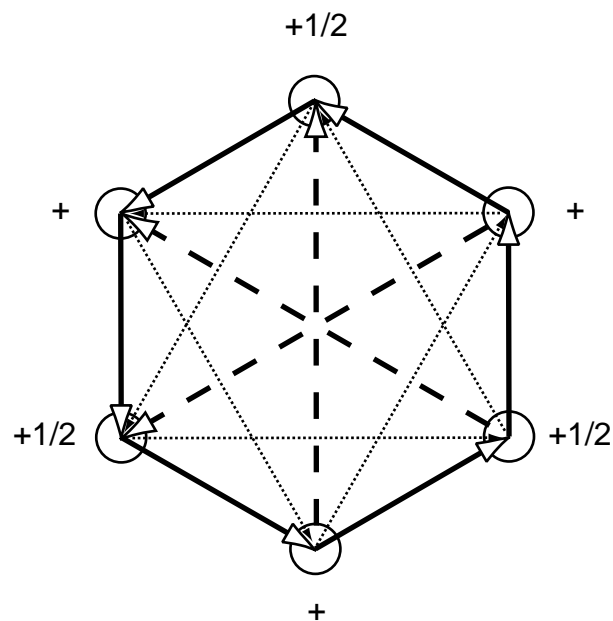


Abbildung 3.2: Ursprung der möglichen Harkervektoren der Pattersonfunktion für die Raumgruppe $P6_3$. Die sechs allgemeinen Lagen der Raumgruppe sind als Kreise eingezeichnet. + und $+\frac{1}{2}$ gibt die Höhe der Lage in z-Richtung an. Die Harkervektoren der Sektion $w=0$ sind als gepunktete Linien dargestellt, die doppelt gewichteten Vektoren der Sektion $w=\frac{1}{2}$ als durchgezogene Linien und die einfachen Vektoren in Sektion $w=\frac{1}{2}$ als gestrichelte Linien.

der Pattersonfunktion in Raumgruppe $P6_3$ ist $P6/m$. Darin gibt es zwei Harkerebenen mit den Koordinaten $w=0$ und $w=\frac{1}{2}$. Aus den sechs symmetrieverwandten allgemeinen Lagen ergeben sich 18 verschiedene Harkervektoren, von denen alle sechs in Sektion $w=0$ und sechs in Sektion $w=\frac{1}{2}$ das doppelte Gewicht haben. Das geometrische Zustandekommen der Harkervektoren in den isomorphen und anomalen Differenzpattersonkarten ist in Abbildung 3.2 illustriert.

Exemplarisch ist in Abbildung 3.3 eine anomale und isomorphe Differenzpattersonverteilung des EMTS Derivats gezeigt. Die Maxima sind mit den die Harkervektoren erzeugenden Schweratomlagen bezeichnet. Nicht bezeichnete Maxima gehören zu sog. Kreuzvektoren, d. h. Vektoren, die zwei verschiedene Lagen verbinden. Abbildung 3.4 zeigt eine anomale Differenzpattersonverteilung des nativen Datensatzes. Deutlich zu erkennen sind drei Maxima, die jeweils dem Mittelpunkt der vier Eisenatome eines der drei $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster entsprechen. Die Positionen der einzelnen Eisenatome können bei der gegebenen Auflösung nicht aufgelöst werden. Die Koordinaten der Schweratompositionen und die koordinierenden Aminosäuren sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt.

Alle Quecksilberatome des EMTS Derivates binden an von außen frei zugängliche Cystein-Reste. Besonders interessant ist die Koordination eines Quecksilberatoms durch ein Cystein, welches sich vermutlich in Untereinheit K befindet (s. Abschnitt 7.5). Dadurch konnte die Zuordnung einer schlecht definierten Elektronendichteverteilung zur Untereinheit K unterstützt werden. Über die Bindungsstellen, die PIP an Proteinen besetzt, ist bislang nichts bekannt. Eine Analyse der Aminosäuren, die in der Nähe der Platinpositionen gefundenen werden zeigt ebenfalls keinen einheitlichen Trend, es fällt jedoch auf, daß sich häufig Methionine in der Nähe der Platinatome befinden. Daher sind in Tabelle 3.2 alle in der Nähe der Platinpositionen befindlichen Aminosäuren angegeben .

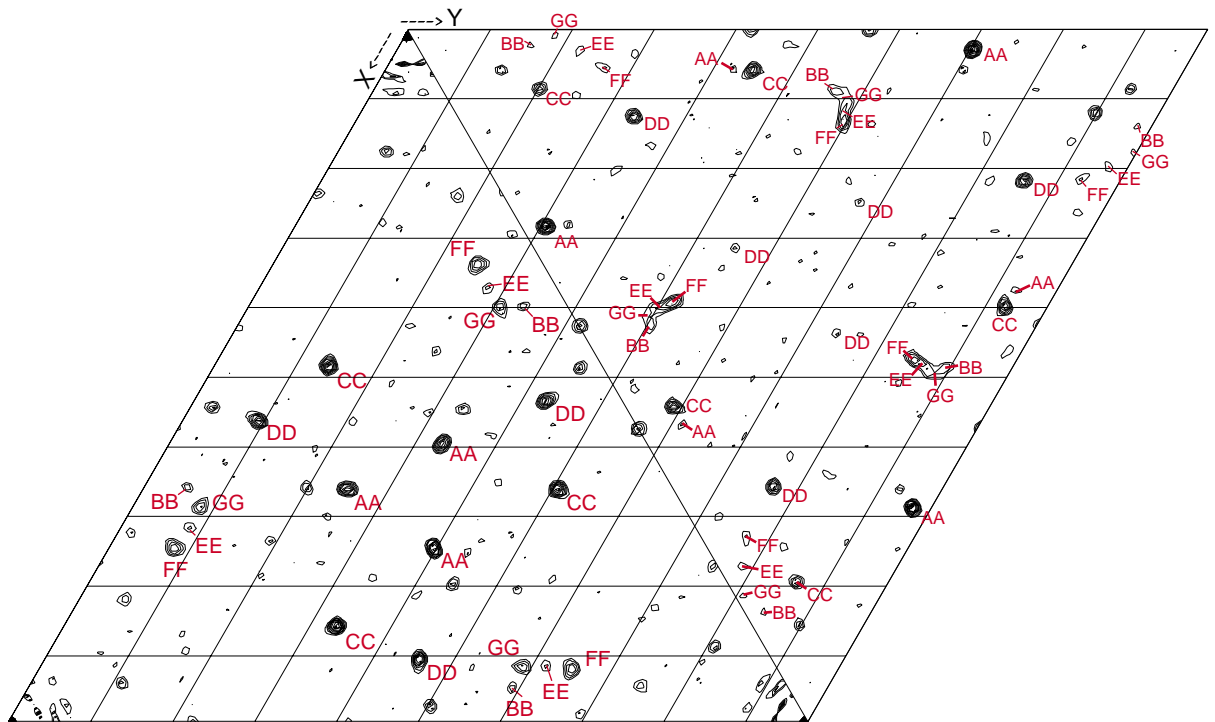
3.3 Verfeinerung der Schweratomparameter

Die ersten Verfeinerungsschritte der Schweratomparameter wurden ausschließlich mit dem Programm MLPHARE durchgeführt. Auf die Benutzung von SHARP wurde während der ersten Tests der Vefeinerungsstrategie verzichtet, da die Kombination der großen Datenmengen mit der besonderen Methodik von SHARP zu Rechenzeiten von ca. einer Woche für einen Verfeinerungslauf führte.

Die Ausgangspositionen der Schweratomlagen wurden, wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, aus den Differenz-Pattersonfunktionen der Derivate ermittelt. Anschließend wurden die realen Besetzungsfaktoren der Schweratomlagen aller Derivate mit dem Programm VECREF abgeschätzt, um vernünftige Startwerte für die Vefeinerung mit MLPHARE zu erhalten. Die Verfeinerung des Schweratommodells wurde dann wie folgt durchgeführt.

Aus den isomorphen und anomalen Differenzpattersonfunktionen des EMTS-Derivats wurden die Koordinaten der drei am stärksten besetzten Quecksilber-Lagen erhalten. Diese wurden mit MLPHARE gegen die isomorphen und anomalen Besetzungsfaktoren verfeinert und den realen und anomalen Differenzen angepaßt. Die daraus gewonnenen SIRAS-

a)



b)

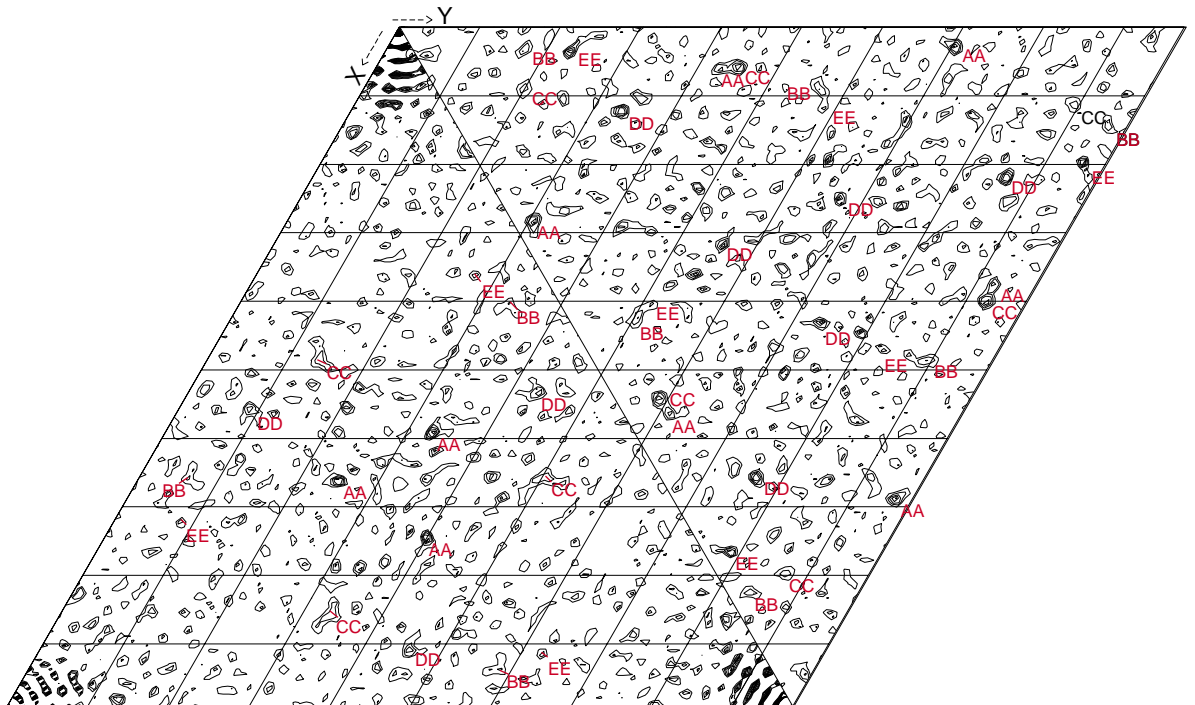


Abbildung 3.3: (a) Anomale Differenzpattersonfunktion des EMTS-Derivates. (b) Isomorphe Differenzpattersonfunktion des EMTS-Derivates. Beide berechnet für einen Auflösungsbereich von 20-6 Å. Links unten sind jeweils die Maxima für die Harkersektion $w=0$ und rechts oben die für Harkersektion $w=\frac{1}{2}$ gezeigt.

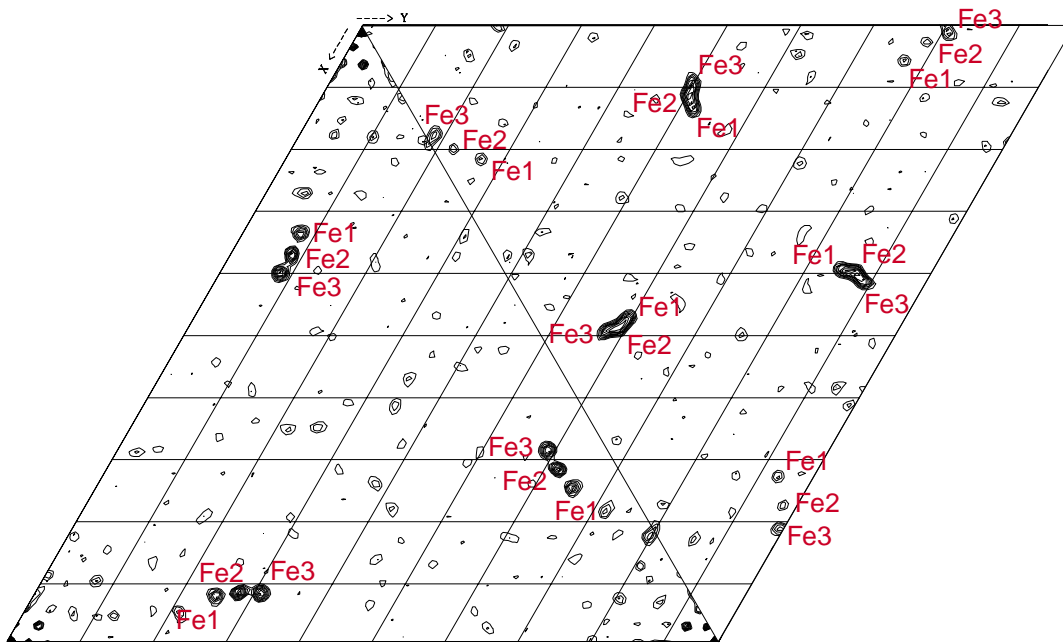


Abbildung 3.4: Pattersonfunktion errechnet aus den anomalen Differenzen des nativen Datensatzes, für eine Auflösung von $10\text{-}6\text{ \AA}$. Links unten sind jeweils die Maxima für die Harkersektion $w=0$ und rechts oben die für die Harkersektion $w=\frac{1}{2}$ gezeigt. Deutlich zu erkennen sind die Maxima, die aus den Harkervektoren der drei $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster resultieren. Die Positionen der einzelnen Eisenatome können bei der gegebenen Auflösung nicht unterschieden werden, weshalb die Maxima den Mittelpunkt des jeweiligen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters anzeigen.

Phasenwinkel wurden mit den isomorphen und anomalen Differenzen des PIP-Derivats kombiniert und daraus jeweils eine Kreuz-Differenz-Fouriersynthese errechnet. Für Positionen der Maxima in diesen Elektronendichteverteilungen wurden Harkervektoren berechnet und deren Maxima mit den entsprechenden Maxima in den Harkerebenen der Pattersonfunktionen des PIP-Derivats verglichen. So wurden die Positionen von 4 Platinlagen sicher bestimmt. Die Quecksilber- und Platinlagen wurden kombiniert und gemeinsam die Schweratomparameter für Position und Besetzung verfeinert. Die so gewonnenen MIRAS-Phasenwinkel wurden mit den anomalen Differenzen des Nativ(2)-Datensatzes kombiniert und so die Positionen der Mittelpunkte der drei $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster ermittelt. Nach einem weiteren Verfeinerungsschritt, in dem die Positionen und Besetzungsfaktoren aller o. g. Schweratomlagen optimiert wurden, wurden die erhaltenen Schweratomphasenwinkel mit den Strukturfaktoramplituden des Datensatzes Nativ(2) kombiniert und einer Solvensglättung mit dem Programm DM unterworfen, wodurch sich die Güte der Phasenwinkel verbesserte. Nach der Kombination dieser Phasenwinkel mit den isomorphen und anomalen Differenzen aller Schweratomdatensätze konnten verbesserte Kreuz-Differenz-

Tabelle 3.2: Schweratomlagen des EMTS- und PIP-Datensatzes. Zusätzlich sind die Mittelpunktskoordinaten der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster angegeben, die den anomalen Differenzpattersonfunktionen des nativen Datensatzes entsprechen. In der Spalte Koordination sind die Aminosäuren angegeben, die das jeweilige Schweratom koordinieren. Welche Aminosäuren die Platinatome koordinieren kann nicht zweifelsfrei geklärt werden, daher sind für die Platinatome alle in der Nähe liegenden Aminosäuren angegeben.

| Schweratom | x (Å) | y (Å) | z (Å) | Koordination |
|------------|---------|---------|--------|---------------------------------|
| Hg1 | -92.852 | 174.341 | 7.465 | Cys A160 |
| Hg2 | 196.600 | 103.993 | 27.578 | Cys C33 |
| Hg3 | -47.735 | 111.270 | 58.346 | Cys F109 |
| Hg4 | 153.537 | 160.073 | 80.613 | Cys K22 |
| Pt1 | 3.044 | 154.790 | 13.679 | Glu L140, Asn L75 |
| Pt2 | -21.296 | 90.044 | 16.513 | Met B215 |
| Pt3 | -18.875 | 118.719 | 22.820 | Met M1, Glu B74 |
| Pt4 | -45.927 | 124.378 | 22.618 | His B368, Trp B608 |
| Pt5 | 18.361 | 113.411 | 23.122 | Met A527, His A633 |
| Pt6 | 96.912 | 36.495 | 49.713 | Met A424, Asp A421, Glu A346 |
| Pt7 | -4.226 | 92.993 | 18.340 | Asn A504, PsaK |
| Pt8 | -19.523 | 146.258 | 14.530 | Met I1 |
| Fe1 | 100.856 | 118.057 | 56.553 | |
| Fe2 | 104.500 | 114.812 | 42.339 | |
| Fe3 | 96.421 | 120.047 | 34.944 | |

Fouriersynthesen erhalten werden, die für das EMTS-Derivat die Bestimmung einer weiteren Quecksilberlage und für das PIP-Derivat von fünf weiteren Platinlagen ermöglichten, die mit den entsprechenden Pattersonfunktion übereinstimmten. Ferner wurden nun auch die in den beiden Derivaten gefundenen anomalen Signale der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster mit in die Verfeinerung einbezogen. Der abschließende Verfeinerungsschritt bestand darin, mit diesem Schweratommodell einen globalen Skalierungs- und Temperaturfaktor der Schweratomdaten gegen den Nativ(2)-Datensatz zu bestimmen. Hierzu wurden alle Strukturfaktoramplituden der Reflexe von 20,0 Å bis 3,0 Å verwendet.

Nachfolgend werden die Begriffe reale und anomale Besetzung verwendet. Bei diesen handelt es sich um rein technische Begriffe des Programms MLPHARE. Der Parameter der realen Besetzung spiegelt tatsächlich die Besetzung einer Schweratomlage wider. Da für anomale Streuer eine Unsicherheit bezüglich des Imaginärteils des Strukturfaktors be-

steht, wird für diese Atome ein gesonderter Parameter für die Besetzung, die anomale Besetzung, eingeführt, um die o. g. Unsicherheiten in die Verfeinerung einzubeziehen. Die Verfeinerung der Schweratompositionen, Besetzungsfaktoren und Temperaturfaktoren erwies sich als schwierig. Eine konvergierende Verfeinerung ergab sich bei der Benutzung des nachfolgenden Schemas, das für alle oben erwähnten Verfeinerungsschritte, also nach jedem hinzufügen neuer Schweratomlagen in das Schweratommodell angewandt wurde. In einem ersten Schritt wurden unter Verwendung der zentrischen Reflexe und der isomorphen Differenzen die x- und y-Positionen der Lagen, sowie deren realer Besetzungsgrad verfeinert. Im nächsten Schritt wurden auch die azentrischen Reflexe verwendet und neben den Positionen die anomalen Besetzungsfaktoren angepaßt. Das Hauptproblem während

Tabelle 3.3: Statistiken der Schweratomparameterverfeinerung mit MLPHARE und SHARP. Die Abkürzungen iso und ano stehen für die iosomorphen bzw. anomalen Differenzen.

Phasierung mit MLPHARE

| Datensatz | Nativ(1) | EMTS | PIP |
|--|----------|-----------|-----------|
| $R_{\text{cullis}}^{\dagger}$ zentrisch | - | 0,87 | 0,87 |
| $R_{\text{cullis}}^{\dagger}$ azentrisch (iso/ano) | -/0,98 | 0,94/0,98 | 0,88/0,96 |
| „Phasing power“ azentrisch, (iso) [‡] | - | 0,90 | 1,13 |

Figure of merit:

| Aufl. (Å) | 20-11,7 | 8,3 | 6,4 | 5,2 | 4,4 | 3,8 | 3,4 | 3,0 | ges. |
|------------------------------|---------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $\langle \text{FOM} \rangle$ | 0,62 | 0,62 | 0,63 | 0,59 | 0,47 | 0,40 | 0,38 | 0,33 | 0,42 |

Phasierung mit SHARP

| Datensatz | Nativ(1) | EMTS | PIP |
|--|----------|-----------|-----------|
| $R_{\text{cullis}}^{\dagger}$ zentrisch | - | 0,87 | 0,87 |
| $R_{\text{cullis}}^{\dagger}$ azentrisch (iso/ano) | -/0,98 | 0,86/0,95 | 0,81/0,95 |
| „Phasing power“ azentrisch, (iso) [‡] | - | 1,23 | 1,62 |

Figure of merit:

| Aufl. (Å) | 30,0-7,9 | 5,7 | 4,7 | 4,1 | 3,7 | 3,3 | 3,1 | 3,0 | ges. |
|------------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $\langle \text{FOM} \rangle$ | 0,75 | 0,78 | 0,70 | 0,63 | 0,59 | 0,54 | 0,50 | 0,37 | 0,57 |

[†] $R_{\text{cullis}} = \sum_h \text{LOC} / \sum_h [|F_{PH}| - |F_P|]$ mit LOC (lack of closure) gleich $|F_P + F_{H(\text{calc})}| - |F_{PH}|$ (für zentrische Reflexe)

[‡] „Phasing power“ ist gleich $[\sum_n |F_{H(\text{calc})}|^2 / \sum_n |\text{LOC}|^2]^{1/2}$

der Verfeinerung bestand darin, die Temperaturfaktoren der Schweratomlagen zu verfei-

nern. Eine Anpassung der Temperaturfaktoren lieferte kein zufriedenstellendes Ergebnis. Daher wurden die Temperaturfaktoren im Laufe der Verfeinerung konstant gehalten. Dieses Vorgehen hatte Auswirkungen auf die Verfeinerung der Besetzungen. Insbesondere für die anomalen Besetzungen wurden bei Verwendung aller Reflexe im Auflösungsbereich von 20,0 Å bis 3,0 Å zu geringe Werte erhalten. Nur im Auflösungsbereich von 20,0 Å bis 6,0 Å lieferte die Verfeinerung sinnvolle Ergebnisse, weshalb dieser Auflösungsbereich für alle Verfeinerungen eingesetzt wurde. Die Statistiken sind in Tabelle 3.3 unter dem Punkt „MLPHARE“ zusammengefaßt.

Während im Programm MLPHARE der durch Nichtisomorphie zwischen Derivatdatensatz und nativem Datensatz verursachte Fehler am Ende des Verfeinerungszyklus für die Phasenwinkel abgeschätzt und nicht kontinuierlich verfeinert wird, wird in SHARP die Nichtisomorphie in die Verfeinerung mit einbezogen, wodurch eine bessere Anpassung der Schweratommodelle an die Datensätze möglich ist. Daher wurden die mit MLPHARE bestimmten Schweratomparameter und Phasenwinkel als Startmodell für eine abschließende Verfeinerung mit SHARP verwendet. Ein Vergleich beider Verfeinerungstatistiken zeigt, daß die Verfeinerung mit SHARP das Schweratommodells verbesserte (s. Tabelle 3.3).

Die aus diesem Modell gewonnenen Schweratomphasenwinkel wurden einer Dichtemodifikation mit dem Programm SOLOMON unterworfen. Mit der Kombination der so optimierten Phasenwinkel des Schweratommodells mit den nativen Strukturfaktoramplituden des Datensatzes Nativ(2) wurde eine MIRAS Elektronendichteverteilung bei einer Auflösung von 3,5 Å errechnet, die den Ausgangspunkt für die Erstellung des Strukturmodells bildete.

3.4 Verfeinerung des Modells

Abbildung 3.5 zeigt einen Ausschnitt aus der MIRAS-Elektronendichteverteilung nach der Dichtemodifikation. Die Dichte war in weiten Teilen zusammenhängend und gut definiert. Die Modellierung der Kofaktoren, insbesondere der Phytylseitenketten der Chlorophylle erwies sich jedoch als schwierig, da deren Verlauf aufgrund der Möglichkeit der Rotation im die C-C Einfachbindungen nicht immer abzuschätzen war. Dennoch mußte bereits das erste Strukturmodell einen großen Teil der Kofaktoren enthalten, da sich die Masse aller Kofaktoratome auf ca. 27 % der Gesamtmasse des ganzen Komplexes beläuft und somit auf diese Phaseninformation nicht verzichtet werden konnte.

Das erste Strukturmodell, das der Verfeinerung unterworfen wurde, besaß eine Vollständigkeit von ca. 65 %. Die Anpassung dieses Modells erfolgte gegen den Datensatz Na-

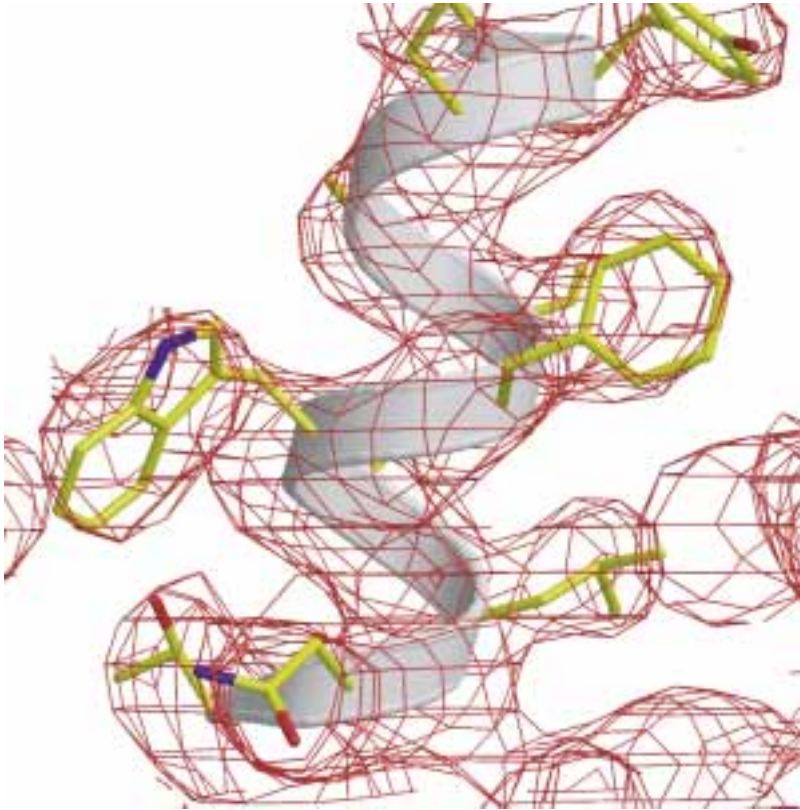


Abbildung 3.5: MIRAS Elektronendichteverteilung bei 3,5 Å Auflösung nach der Dichtemodifikation mit dem angepaßten Strukturmodell. Das Konturniveau liegt 1σ oberhalb der mittleren Dichte. Gut zu erkennen sind die ausgeprägten voluminösen Elektronendichten der aromatischen Seitenketten.

tiv(1). Der R-Wert dieses Modells betrug 38,4 %, der freie R-Wert 40,8 %. Im dem Maße, indem sich die Qualität der Phasenwinkel des Strukturmodells verbesserte, konnte auch die Elektronendichteverteilung immer vollständiger erklärt werden. Das verfeinerte Strukturmodell enthält pro Monomer 2243 Aminosäuren, die in 12 Proteinuntereinheiten organisiert sind, 96 Chlorophylle, 22 Karotine, 4 Lipide, 3 $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, 2 Phyllochinone, ein Ca^{2+} -Ion und 206 Wassermoleküle. Die Differenzelektronendichteverteilungen erlaubten es ferner, im abschließenden Strukturmodell 206 Wassermoleküle zu modellieren. Aufgenommen wurden dabei nur solche Wassermoleküle, die unzweifelhaft an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein können. Es verbleiben in der Elektronendichteverteilung nur wenige nicht zu modellierende Bereiche. Vorwiegend in den Bereichen zwischen den Monomeren finden sich einige langgestreckte Differenzelektronendichten. Einige davon sind an den Enden stark verbreitert. Eine Modellierung dieser Bereiche war zwar nicht möglich, dennoch erinnert die Form dieser Dichten stark an die von β -Dodecylmaltosid. In der Nähe der Untereinheit PsaL fand sich eine sphärische Differenzelektronendichte, die durch ein Ca^{2+} -Ion erklärt wurde (s. Abschnitt 7.9.3). Das Vorliegen eines anderen Ions

wie z. B. Mg^{2+} läßt sich allerdings nicht ausschließen. In der Trimerisierungsdomäne findet sich eine Elektronendichteverteilung, deren Form an zwei Fettsäureseitenketten eines Lipids erinnert. Da keine Kopfgruppe zu erkennen war, wurde diese Dichte dennoch nicht

Tabelle 3.4: Statistiken des Strukturmodells nach der abschließenden Verfeinerung gegen den Datensatz Nativ(1). Die Abweichungen von der Standardgeometrie sind als Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate vom Mittelwert angegeben.

| Verwendete Reflexe: | |
|---|-------------|
| in der Verfeinerung | 233377 |
| in der Kontrolle (freier R-Faktor) | 4743 |
| R-Faktor / freier R-Faktor (%) | 19,8 / 21,6 |
| Anzahl der Nicht-Wasserstoffatome | |
| des Proteins | 17390 |
| der Kofaktoren | 6635 |
| der Wassermoleküle | 206 |
| Anzahl der Metallatome [†] | 1 |
| Koordinatenfehler:* | |
| Luzzati (Å) | 0,29 |
| SigmaA (Å) | 0,34 |
| r. m. s. Abweichung von der Standardgeometrie: | |
| Bindungslängen (Å) | 0,013 |
| Bindungswinkel (°) | 1,48 |
| Torsionswinkel (°) | 19,65 |
| Ramachandran-Analyse: Aminosäuren in | |
| bevorzugter Region | 87,8 % |
| zusätzlich erlaubter Region | 10,5 % |
| großzügig erlaubter Region | 1,2 % |
| verbotener Region | 0,5 % |

*aus einem Luzzati-Plot und einer SigmaA Analyse, durchgeführt mit dem Programm CNS (Brünger, 1998).

[†] mit Ausnahme der, den Kofaktoren zugerechneten, Eisenatome der $[Fe_4S_4]$ -Cluster und der zentralen Mg^{2+} -Ionen der Chlorophylle.

modelliert. Die Proteinuntereinheiten konnten fast vollständig modelliert werden. Lediglich die Aminosäuren der Schlaufe von A263 bis A265, sowie einige Aminosäuren an den N- oder C-Termini mancher Untereinheiten konnten nicht modelliert werden. Einzelhei-

ten hierzu finden sich in den entsprechenden Kapiteln. Von einigen weiteren Aminosäuren konnten die Atome der Seitenketten nicht oder nicht vollständig modelliert werden. Die Besetzungsfaktoren der entsprechenden Atome sind in der pdb-Datei auf null gesetzt. Von der Untereinheit PsaK konnte nur ein Polyalaninmodell erstellt werden, da die Elektronendichteverteilungen im Bereich der Seitenketten zu schlecht definiert war. Die Orientierung der Untereinheit konnte jedoch auf Basis anderer Daten mit großer Sicherheit bestimmt werden (s. Abschnitt 7.5). Von den 96 Chlorophyllen konnten 47 vollständig mit der Phytlyseitenkette modelliert werden, während dies bei den 49 übrigen Chlorophyllen nur partiell möglich war. Die Orientierung der Chlorophylle kann als gesichert gelten, da die asymmetrische Form der Porphyrinringe gut in der Elektronendichteverteilung zu erkennen war.

Die abschließende Verfeinerung des Strukturmodells lieferte einen R-Wert von 19,8 % bei einem freien R-Wert von 21,6 %. Sämtliche Statistiken des verfeinerten Modells sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Die Güte der geometrischen Parameter liegt im Rahmen der üblicherweise für eine Struktur dieser Auflösung erwarteten Werte. Im Hinblick auf die hohe Anzahl gebundener Kofaktoren ist bemerkenswert, daß nur wenige Aminosäuren im Ramachandranplot in der verbotenen Region zu finden sind und die Geometrien des Proteins nicht stärker als üblich von den idealen Geometrien abweichen.

Ein Blick auf die durchschnittlichen Temperaturfaktoren der Proteinuntereinheiten und der Kofaktoren in Tabelle 3.5 zeigt, daß in der Nähe der dreizähligen kristallographischen Achse befindliche Untereinheiten (PsaL, PsaI, PsaM) geringere Temperaturfaktoren als an der Außenseite des Komplexes lokalisierte Untereinheiten (PsaF, PsaJ, PsaK) aufweisen. Dies ist zu erwarten, da die inneren Untereinheiten fester in den trimeren Komplex eingebunden sind als die äußeren, solvens-exponierten Untereinheiten. Wie aufgrund der Elektronendichteverteilung und der Flexibilität von Ketten aus C-C-Einfachbindungen erwartet, besitzen die Atome der Phytlyseitenketten höhere Temperaturfaktoren als die Atome der Porphyrinringe.

Auffällig ist, daß die Kofaktoren des B-Astes des ETS und davon insbesondere die Atome des Phyllochinons Q_K -B geringere Temperaturfaktoren als die des A-Astes aufweisen. Vermutlich beruht dieser Unterschied auf der besseren Fixierung der Kofaktoren des B-Astes aufgrund der Nähe zur dreizähligen Achse.

Tabelle 3.5: Gemittelte Atom-Temperaturfaktoren der Untereinheiten des PS I Komplexes, sowie der Kofaktormoleküle. R.m.s. steht für die Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate vom Mittelwert. Für die Kofaktoren ist als erster Wert der durchschnittliche Temperaturfaktor und als zweiter Wert die r.m.s.-Abweichung angegeben. Ferner sind die Temperaturfaktoren für die Kofaktoren des ETS für beide Äste und die Temperaturfaktoren der Antennenchlorophylle für die Atome der Porphyrinringe und die Atome der Phytlyseitenketten getrennt angegeben.

| Untereinheit | B-Faktor (\AA^2) | r.m.s. (\AA^2) | Bmin (\AA^2) | Bmax (\AA^2) |
|----------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PsaA | 46,72 | 14,22 | 19,36 | 96,49 |
| PsaB | 42,08 | 13,93 | 16,49 | 90,29 |
| PsaC | 34,87 | 6,94 | 18,12 | 62,07 |
| PsaD | 43,02 | 9,54 | 24,64 | 86,02 |
| PsaE | 47,01 | 9,40 | 25,22 | 76,07 |
| PsaF | 57,07 | 8,03 | 31,00 | 81,55 |
| PsaI | 33,82 | 7,30 | 18,77 | 62,37 |
| PsaJ | 66,35 | 8,92 | 52,17 | 90,88 |
| PsaK | 79,54 | 4,07 | 70,33 | 87,47 |
| PsaL | 30,57 | 9,69 | 15,35 | 69,53 |
| PsaM | 41,78 | 8,71 | 28,32 | 74,62 |
| PsaX | 63,86 | 7,93 | 52,67 | 85,28 |
| Wassermoleküle | 33,87 | 9,89 | 15,32 | 65,51 |

Kofaktoren

| ETS: | A-Ast | B-Ast |
|---|---------------|-------------------|
| Chlorophylle | 38,08 / 8,84 | 30,12 / 4,72 |
| Chinone | 51,61 / 10,61 | 31,22 / 3,83 |
| [Fe ₄ S ₄]-Cluster | 29,00 / 4,06 | |
| Antenne: | Porphyrinring | Phytlyseitenkette |
| Chlorophylle | 52,23 / 18,83 | 63,12 / 13,31 |
| Karotine | 54,46 / 20,47 | |
| Lipide | 56,44 / 15,39 | |

3.5 Kristallpackung und Kristallkontakte

Wie bereits zu Beginn des Kapitels erwähnt, liegen die Kristalle in der Raumgruppe $P6_3$ mit den Zellkonstanten $a=b=281,0 \text{ \AA}$; $c=165,2 \text{ \AA}$; $\alpha=\beta=90^\circ$; $\gamma=120^\circ$ vor. Damit ergeben sich für den Aufbau des Kristalls keine Unterschiede zum bisherigen Modell bei $4,0 \text{ \AA}$ Auflösung. Die Elementarzelle enthält zwei Trimere, die asymmetrische Einheit ein Monomer (s. Abbildung 3.6). Bemerkenswert ist der hohe Solvensgehalt der Kristalle von 78 %.

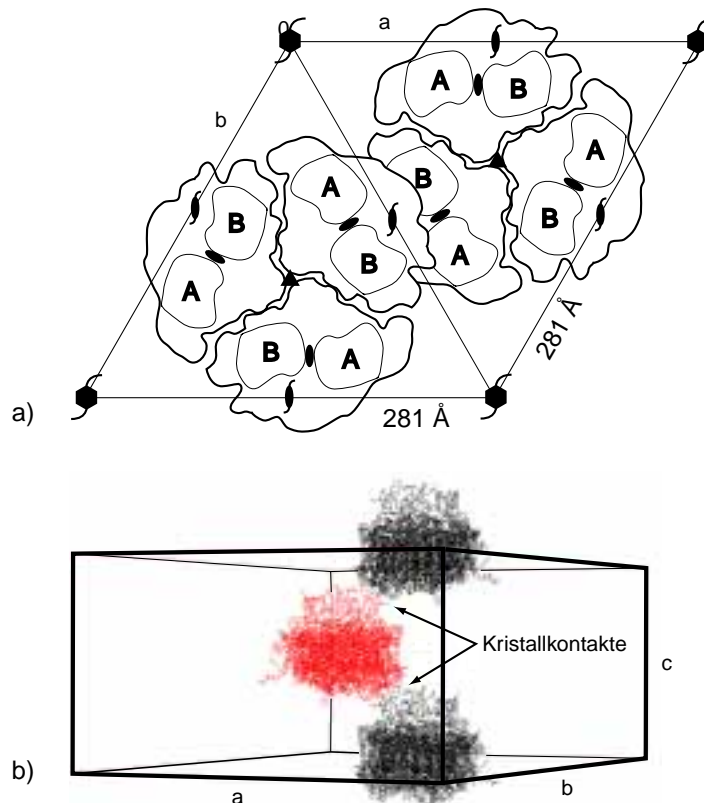


Abbildung 3.6: a) Blick entlang der dreizähligen Achse auf die Elementarzelle der PS I Kristallstruktur. Neben den Symmetrieelementen der Raumgruppe $P6_3$ ist die Position der zweizähligen Pseudosymmetrieachse zwischen PsaA und PsaB mit einer Ellipse gekennzeichnet. b) Die Trimere sind entlang der c-Achse ausgerichtet. Somit ist der Kristall aus Schichten von Trimeren aufgebaut. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in Abbildung b) nur ein Monomer des jeweiligen Trimers eingezeichnet.

Wie bereits im Strukturmodell bei $4,0 \text{ \AA}$ Auflösung zu erkennen war, werden die Kristallkontakte zwischen zwei trimeren PS I-Komplexen zwischen den Untereinheiten PsaE und PsaF zweier verschiedener Trimere ausgebildet. Die Art der Wechselwirkungen war zwar unbekannt, jedoch wurden ionische Wechselwirkungen vermutet (Klukas, 1999). Im jetzigen Strukturmodell werden die Trimer-Trimer Kontakte tatsächlich zwischen PsaE eines

Tabelle 3.6: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen an den Kontaktstellen zwischen zwei Trimeren.

| Donor/Akzeptor | Donor/Akzeptor | Abst. (Å) |
|-----------------------|-----------------------|------------------|
| 1E Val N | W205 O | 2,7 |
| W205 O | W204 | 3,6 |
| W204 O | F68 Glu OE2 | 3,4 |
| 28E Gln OE1 | 24F Asp N | 2,7 |
| 62E Leu N | W206 O | 3,0 |
| 63E His N | W206 O | 3,3 |
| 63E His ND1 | W206 O | 3,1 |
| W206 O | F33 Asp O | 2,9 |

Trimers und PsaF eines benachbarten Trimers ausgebildet werden (s. Abbildung 3.6b). Allerdings sind ionische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäuren nicht zu erkennen. Es existieren stattdessen einige Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten. Diese Wechselwirkungen werden zwischen dem N-terminalen Bereich von PsaF auf der einen und den N- und C-terminalen Regionen, sowie der Schlaufe BC von PsaE auf der anderen Seite ausgebildet. In Tabelle 3.6 sind die Wasserstoffbrückenbindungen aufgelistet. Man sieht, daß die Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Ausnahme nicht direkt zwischen den Untereinheiten, sondern über Wassermoleküle ausgebildet werden.