

4 Biochemische Charakterisierung des Proteins

4.1 MALDI-Massenspektrometrie

Um die Reinheit des eingesetzten PS I zu überprüfen, wurden im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 312 von Dr. P. Franke MALDI Spektren aufgenommen. Abbildung 4.1 zeigt zwei MALDI Spektren von experimentell verwendeten Proteinchargen.

Tabelle 4.1: Theoretische Massen der Untereinheiten aus PS I, sowie die ihnen zugeordneten Maxima aus zwei MALDI-Spektren.

Untereinheit	theor. Masse (Da)	MALDI-Spektrum a	MALDI-Spektrum b
PsaA	83183	-	-
PsaB	82913	-	-
PsaC	8669	8683	8670
PsaD	15239	15263	15240
PsaE	8257	8274	8260
PsaF	15113	15145	15123
PsaI	4297	4343	4335
PsaJ	4767	4805	4801
PsaK	8065	8077	8073
PsaL	16146	16144	16146
PsaM	3424	3430	3429
PsaX	≈3840	3986	3974

In Tabelle 4.1 sind die theoretischen Massen der Untereinheiten und die ihnen zugeordneten Maxima der MALDI-Spektren gezeigt. Die Interpretation der Spektren wird durch die Tatsache erschwert, daß sich einige Maxima auf verschiedene Weise erklären lassen. Die Massen der beiden Untereinheiten PsaA und PsaB befanden sich außerhalb des meßbaren Bereiches des Gerätes. Für die Massen der Untereinheiten PsaC und PsaD lassen sich passende Maxima in beiden Spektren finden.

Von der Untereinheit PsaE (theor. Masse ca. 8257 Da) konnten im Strukturmodell nur die ersten 69 Aminosäuren modelliert werden (Molekulargewicht: 7620,5 Da). In den MALDI-Spektren verschiedener Proteinchargen finden sich Maxima sowohl bei ca. 8257 Da, als auch bei ca. 7620 Da. Bei den Maxima von ca. 7620 Da kann es sich neben der kurzen Form von PsaE auch um das $(M+2H)^{2+}$ Maximum von PsaD handeln. Es ist somit nicht eindeutig zu entscheiden, ob der C-Terminus von PsaE fehlgeordnet ist oder posttranslational entfernt wurde.

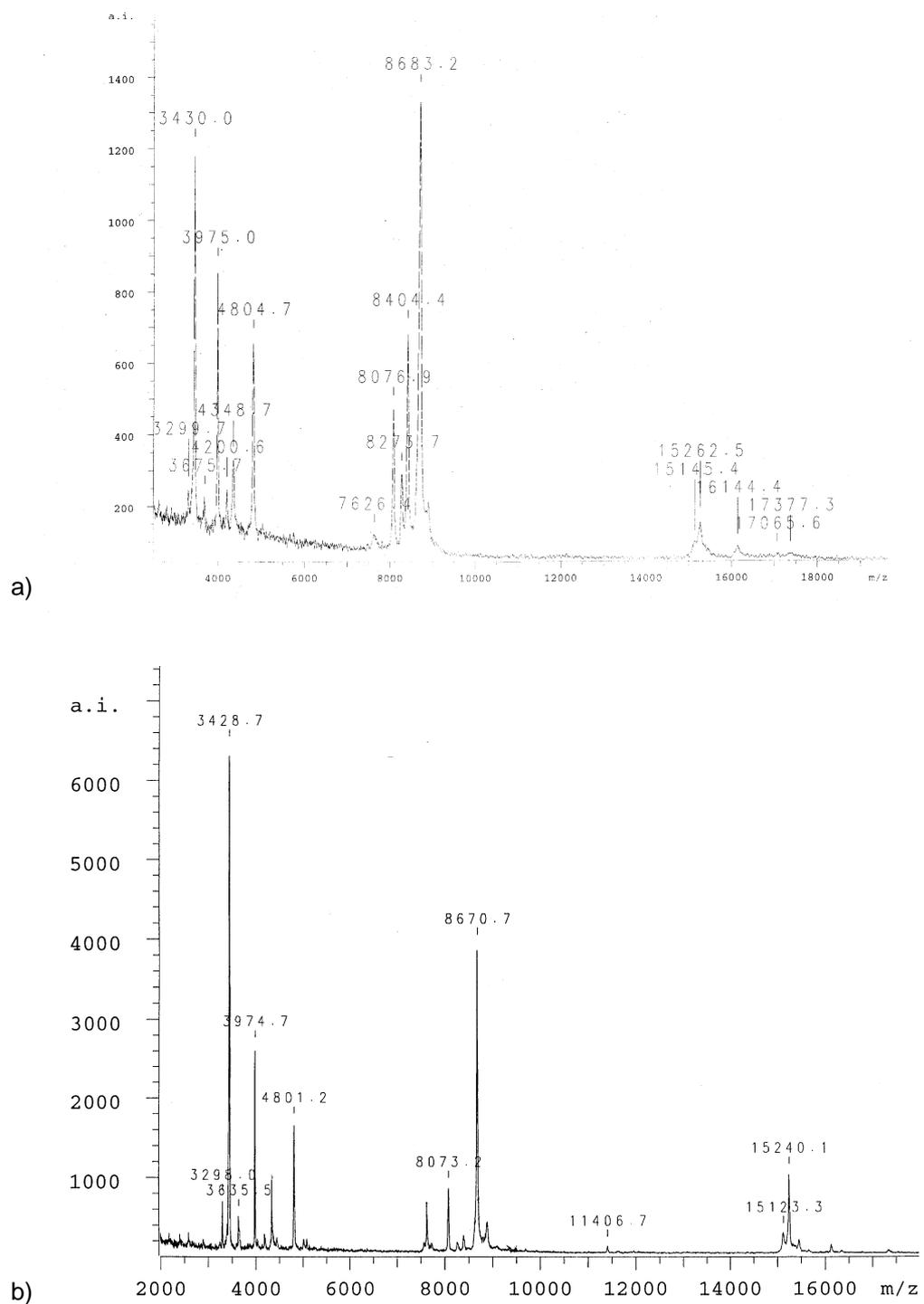


Abbildung 4.1: Die MALDI Spektren von zwei verschiedenen Proteinchargen. Die Proben wurden durch Auflösung von Kristallen gewonnen. Spektrum **a)** zeigt das Spektrum eines Kristalls, dessen Datensatz nicht in die Strukturlösung einging. Spektrum **b)** wurde von einem Kristall gemessen, der derselben Proteinpräparation entstammte, die zur Züchtung des Kristalls verwendet wurde, an dem der Datensatz Nativ(2) gemessen wurde.

Schwierig ist die Zuordnung der Untereinheit PsaL. Wie aufgrund des Strukturmodells geschlossen werden kann (s. Abschnitt 7.6) beträgt deren Molmasse, abweichend zur veröffentlichten Masse, 16146 Da. In den beiden gezeigten Spektren läßt sich für diese Masse ein Maximum finden, das jedoch nicht sehr ausgeprägt ist. Das Maximum bei halber Masse, das dem $(M+2H)^{2+}$ Maximum entspricht, liegt ebenfalls in den beiden gezeigten Spektren vor. Allerdings findet sich dieses z. T. auch in den Spektren, in denen der *Molekülpeak* selbst nicht vorliegt. Die eindeutige Zuordnung des $(M+2H)^{2+}$ Maximums von PsaL ist jedoch nicht möglich, da es nicht vom *Molekülpeak* von PsaK unterschieden werden kann.

Die beiden Maxima von 3430 Da (Spektrum a) und 3429 Da (Spektrum b) entsprechen gut dem für PsaM erwarteten *Molekülpeak* von 3424 Da.

Unerwarteterweise konnte in der Elektronendichteverteilung die Untereinheit PsaX modelliert werden (s. Abschnitt 7.8). Aus dem Strukturmodell wurde für dieses Protein eine theoretische Masse von ≈ 3840 Da abgeleitet. Die am nächsten liegenden Maxima liegen im Bereich von 3970-3980 Da. Der Unterschied zwischen theoretischer Masse und gemessenem Maximum beträgt also ca. 100 Da, was ungefähr einer Aminosäure entspricht. Diese Abweichung könnte auf einer am C-Terminus ungeordnet vorliegenden Aminosäure beruhen, wodurch die theoretische Masse nicht korrekt berechnet wurde.

4.2 Gelelektrophorese

Zur genaueren Überprüfung der Zusammensetzung des eingesetzten Proteins wurde von Dr. W. Schröder mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese das Protein weitergehend untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen gelang es auch einzelne der Proteinbanden aus dem Gel herauszulösen und N-terminal zu sequenzieren. Dabei wurden zweifelsfrei die Untereinheiten PsaC, PsaD, PsaE und PsaF nachgewiesen. Ferner fand sich eine 11 Aminosäuren lange Sequenz, die dem N-Terminus von PsaX aus *Synechococcus vulcanus* sehr ähnlich ist (W. Schröder, persönliche Mitteilung). Zusammen mit der aus der Elektronendichteverteilung abgeleiteten Sequenz einer bislang unbekanntem transmembranen Helix kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß PsaX auch in *Syn. el.* vorhanden ist (s. Abschnitt 7.8).