

8 Die stromalen Untereinheiten

An der stromalen Seite des PS I-Komplexes befinden sich die drei extrinsischen (nicht membranständigen) Untereinheiten PsaC, PsaD und PsaE. Ihre extrinsische Position in-

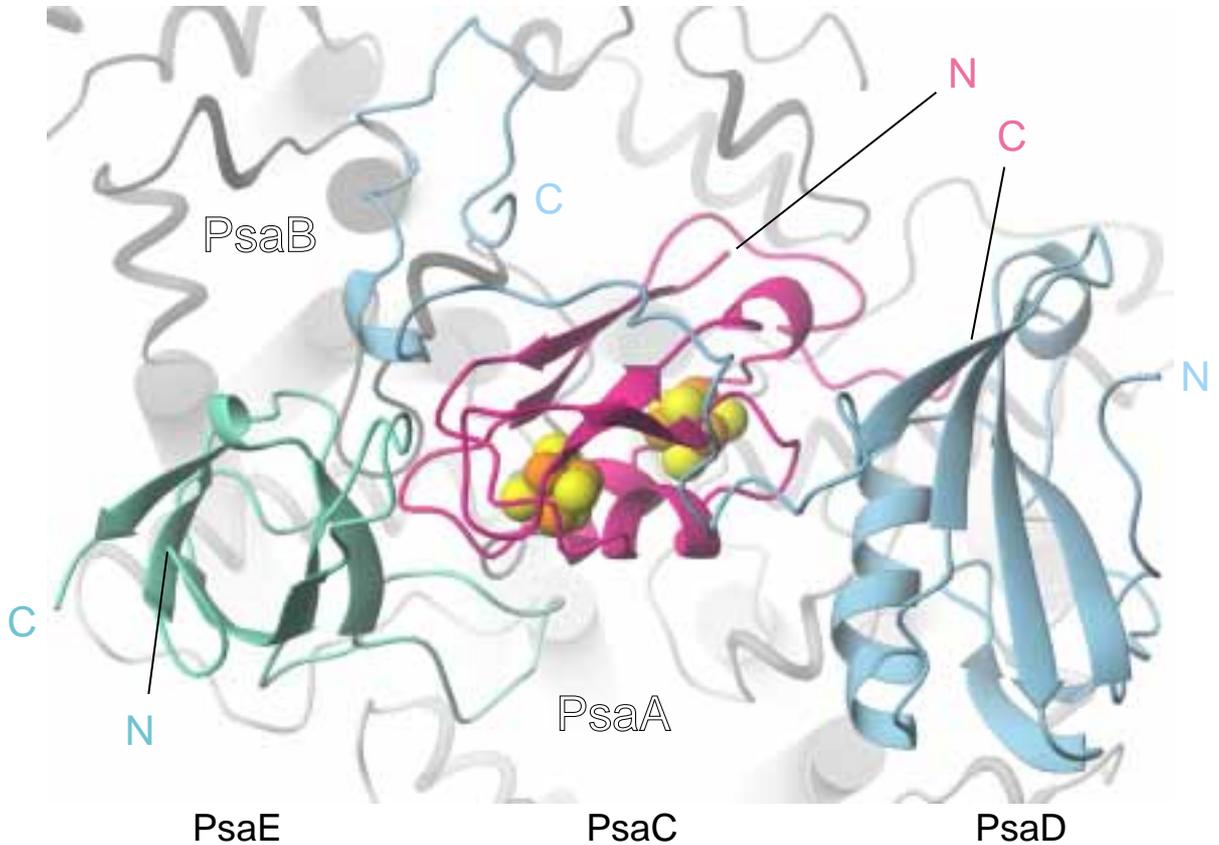


Abbildung 8.1: Blick entlang der dreizähligen Achse auf den stromalen Grat. Links befindet sich die Untereinheit PsaE (grün), in der Mitte PsaC (rosa) und rechts PsaD (blau). Diese drei Untereinheiten liegen oberhalb der Untereinheiten PsaA (hellgrau, unten) und PsaB (dunkelgrau, oben). Die beiden Fe_4S_4 -Cluster F_A (rechts) und F_B (links) werden durch gelb- und orangefarbige Kugeln symbolisiert. Für eine um 90° um die Horizontale gedrehte Ansicht des stromalen Grats parallel zur Membranebene sei auf Abbildung 8.11 verwiesen.

nerhalb des Komplexes konnte durch Solubilisierungsversuche mit chaotropen Reagenzien gezeigt werden (Parrett *et al.*, 1989), für eine Übersicht siehe z. B. Golbeck (1994). Informationen über die Lokalisation dieser drei Untereinheiten konnten sowohl durch Röntgenstrukturanalyse als auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen (Boettcher *et al.*, 1992; Kruip *et al.*, 1997) gewonnen werden. Dadurch wurde auch erstmals strukturell gezeigt, daß diese drei Untereinheiten einen Grat auf der stromalen Seite des Komplexes bilden (Boettcher *et al.*, 1992). Wie zunächst nur postuliert (Fromme *et al.*, 1994), konnte später nachgewiesen werden, daß dieser Grat die Bindungsstelle für die exogenen Elektro-

nentransportproteine Ferredoxin und Flavodoxin bildet (Lelong *et al.*, 1996; Mühlenhoff *et al.*, 1996).

Die drei Untereinheiten sind in Form eines Halbmondes auf der stromalen Seite des Komplexes angeordnet. Dessen Längsachse ist um ca. 45° gegen die Verbindungsachse zwischen PsaF und PsaL gedreht. Die konvexe Seite des Bogens liegt oberhalb der Untereinheit PsaB, so daß die „Unterseite“ der vermutlichen Ferredoxin-Bindungstelle von PsaA gebildet wird.

Im Röntgenstrukturmodell bei 6 Å Auflösung (Krauß *et al.*, 1993) konnte nur die Position von PsaC eindeutig geklärt werden, die aufgrund der hohen Elektronendichteverteilung der beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster gut zu erkennen war. Demnach ist PsaC die mittlere der drei stromalen Untereinheiten und liegt ungefähr auf der pseudozweizähligen Achse. Die Positionen von PsaD und PsaE waren zunächst nur durch Korrelation mit biochemischen Ergebnissen zu bestimmen. Da sich PsaD mit PsaL (Xu *et al.*, 1994; Jansson *et al.*, 1996) und PsaE mit PsaF quervernetzen läßt (Xu *et al.*, 1994; Jansson *et al.*, 1996; Armbrust *et al.*, 1996), befindet sich PsaE auf der proximalen Seite des Komplexes, bezogen auf die dreizählige Symmetrieachse des Trimers, und PsaD auf der distalen Seite (Schubert *et al.*, 1997). Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Deletionsmutanten einzelner stromaler Untereinheiten (Kruip *et al.*, 1997), sowie das letzte Röntgenstrukturmodell (Klukas *et al.*, 1999a) bestätigten diese Zuordnung auf struktureller Basis.

8.1 PsaC

PsaC ist die mittlere der drei stromalen Untereinheiten des PS I-Komplexes. Die Amino-

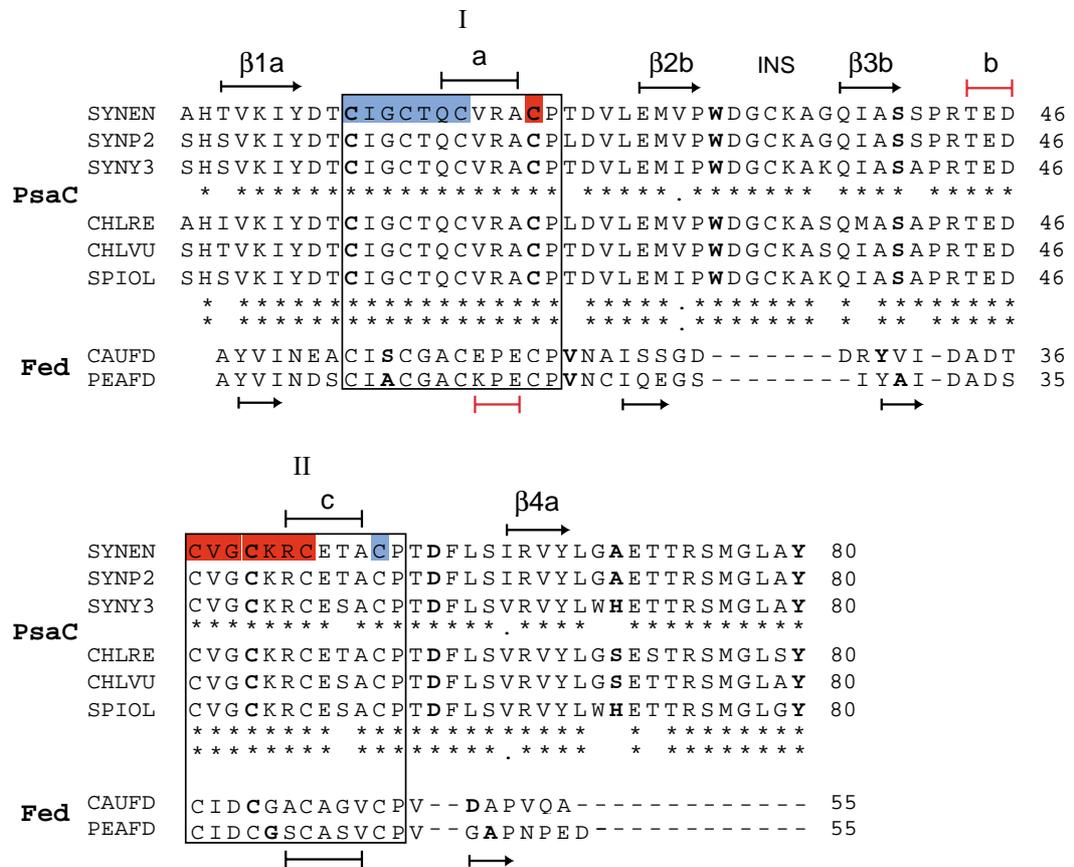


Abbildung 8.2: Anpassung der Aminosäuresequenzen der Untereinheit PsaC aus verschiedenen Organismen und zwei Ferredoxinen. **SYNEN** *Synechococcus el.* (Mühlenhoff *et al.*, 1993), **SYNP2** *Synechococcus sp.* PCC 7002 (Rhiel *et al.*, 1992), **SYNY3** *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Rousseau & Lagoutte, 1990), **CHLRE** *Chlamydomonas reinhardtii* (Takahashi *et al.*, 1991), **CHLVU** *Chlorella vulgaris* (Wakasugi *et al.*, 1997), **SPIOL** *Spinacia oleracea* (Steppuhn *et al.*, 1989), **CAUFD** *Clostridium acidi urici* (Rall *et al.*, 1969), **PEAFD** *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Tsunoda *et al.*, 1968). Die Sequenz PEAFD beruht auf einer neuen hoch aufgelösten Kristallstruktur (Adman, E. T. & Sieker, L., 2000, pdb-Code:1DUR, unveröffentlicht). Jede zehnte Aminosäure ist fett gedruckt. Die Sequenzüberlagerung beruht auf der Überlagerung der Hauptkettenverläufe von PsaC und den Ferredoxinen. Die beiden Sequenzabschnitte, in denen sich die für die Koordination der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster nötigen Aminosäuren befinden, sind schwarz umrandet dargestellt und mit I und II gekennzeichnet. Die Aminosäuren des F_A -Bindungsmotivs sind rot, die des F_B -Bindungsmotivs hellblau hinterlegt. Für eine Erklärung der verwendeten Symbole s. Abschnitt 5.1.

säuresequenz dieser Untereinheit ist unter allen untersuchten Organismen sehr gut konserviert (s. Abbildung 8.2). Schon früh fiel eine, wenn auch eingeschränkte, Sequenzähnlichkeit zwischen PsaC und bakteriellen $2[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Ferredoxinen auf, die sich hauptsächlich

auf das Vorhandensein zweier $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ Bindungsmotive gründet (Oh-hoka. *et al.*, 1987). Dieses Bindungsmotiv besteht aus der Sequenzabfolge CXXCXXCXXXCP, wobei X eine beliebige Aminosäure repräsentiert. Zusammen mit dem Wissen, daß es sich bei den terminalen Akzeptoren des Komplexes um $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster handelt, ergab sich daraus die Konsequenz, daß PsaC diese Cluster bindet (Oh-hoka. *et al.*, 1987). Folgerichtig wurde die bekannte Struktur des Ferredoxins aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Adman *et al.*, 1976) als Basis für den Vorschlag eines Strukturmodells der Untereinheit PsaC vorgeschlagen (für eine Übersicht s. Golbeck, 1994). Diese Annahme konnte mit den letzten Röntgenstrukturmodellen (Schubert *et al.*, 1997; Klukas *et al.*, 1999a) bestätigt und weiter ausgebaut werden.

Obwohl PsaC ohne die Verwendung eines Strukturmodells bakterieller Ferredoxine modelliert wurde, soll die Beschreibung der Struktur von PsaC mit Hilfe eines Vergleiches zwischen bakteriellen Ferredoxinen und PsaC erfolgen. Neben der o. g. Struktur aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Adman *et al.*, 1976) wurde für den Vergleich die hoch aufgelöste Struktur aus dem Bakterium *Clostridium acidi urici*(CauFd) (Dauter *et al.*, 1997) herangezogen. In Abbildung 8.2 ist die Überlagerung der Aminosäuresequenzen von PsaC aus verschiedenen Organismen sowie der beiden bakteriellen Ferredoxine gezeigt, die auf Basis der überlagerten Hauptkettenverläufe von PsaC und den Ferredoxinen erstellt wurde.

In den nachfolgenden Abschnitten wird häufig auf die beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster Bindungsmotive Bezug genommen. Daher wird an dieser Stelle im Vorgriff auf Abschnitt 9.7 kurz auf die Koordination der beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_A und F_B durch Aminosäuren von PsaC eingegangen. Wie erwähnt, finden sich in der Aminosäuresequenz von PsaC zwei Sequenzabschnitte mit der Aminosäureabfolge CXXCXXCXXXCP (I und II in Abbildung 8.2). Über die Seitenketten der Cysteine werden die Eisenatome der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster koordiniert. Dabei koordinieren die ersten drei Cysteine eines Sequenzabschnitts drei Eisenatome eines $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters, während das vierte Cystein ein Eisenatom des anderen Clusters koordiniert (s. Abbildung 8.2 und 8.3). Demnach wird F_A von den Cysteinen C20, C47, C50, C53 und F_B von den Cysteinen C10, C13, C16 und C57 koordiniert (Zhao *et al.*, 1992).

Die im folgenden verwendeten Begriffe des F_A - und F_B -Bindungsmotivs sind deshalb wie folgt definiert: das F_A -Bindungsmotiv (Motiv A) umfaßt die Aminosäuren C10-C16 und C57 (blau in Abbildung 8.2), das F_B -Bindungsmotiv (Motiv B) die Aminosäuren C47-C53 und C20 (rot in Abbildung 8.2). Die beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster der bakteriellen Ferredoxine sind spektroskopisch nicht unterscheidbar und besitzen das gleiche Redoxpo-

tential. Wird im folgenden dennoch von den Clustern F_A und F_B der bakteriellen Ferredoxine gesprochen, so bezieht sich dies nur auf o.g. Bindungsmotive und soll keinerlei Unterscheidbarkeit der Cluster in den bakteriellen Ferredoxinen implizieren.

Die Ferredoxine sind 55 Aminosäuren lang. Obwohl sie damit 25 Aminosäuren kürzer sind als PsaC, ist der Verlauf der Hauptkette zwischen beiden Proteinen sehr ähnlich. Dies ist erstaunlich, da die Sequenzhomologie zwischen den beiden Proteinen sehr gering ist. Aufgrund der unterschiedlichen Sequenzlängen (bei ähnlicher Faltung) besitzt PsaC gegenüber den Ferredoxinen einige Insertionen.

In PsaC der N-Terminus zwei Aminosäuren und der C-Terminus elf bis zwölf Aminosäuren länger als in den Ferredoxinen. Ferner findet sich zwischen den beiden Sequenzabschnitten I und II eine sieben bis acht Aminosäuren lange Insertion (INS). Die beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Bindungsmotive sowie die von ihnen gebundenen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster stehen in beiden Proteinen über eine zweizählige pseudo-Rotationssymmetrieachse untereinander in Beziehung.

PsaC ist eine kompakt gefaltete Untereinheit (s. Abbildung 8.3). Die Sekundärstruktur wird im wesentlichen von zweimal zwei antiparallelen β -Strängen (β_{1a}/β_{4a} und β_{2b}/β_{3b}) und den beiden α -Helices **a** und **c** bestimmt, wobei sich die β -Stränge und die beiden α -Helices auf gegenüberliegenden Seiten der Untereinheit befinden. Die beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster werden von diesen Sekundärstrukturelementen umschlossen und dadurch von der Umgebung abgeschirmt. Im Vergleich zu CauFd sind die β -Stränge in PsaC länger und an leicht unterschiedlichen Positionen in der Sequenz angeordnet. Der Hauptunterschied betrifft jedoch die erste α -Helix **a**. Sie ist in CauFd durch eine 3_{10} -Helix ersetzt. Ferner findet sich in PsaC in der Schlaufe zwischen dem β -Strang β_{3b} und der Helix **c** die 3_{10} -Helix **b**, die in CauFd nicht ausgebildet wird.

Die gefundenen Unterschiede legen es nahe, die zweizählige Pseudosymmetrie zwischen den beiden Proteinen zu vergleichen. Dabei wurde zur Überprüfung der zweizähligen Achse wie folgt vorgegangen: statt nur die Überlagerung eines Bindungsmotivs (z. B. Motiv A auf Motiv B) mit dem jeweils anderen Motiv zu untersuchen, wurden gleichzeitig beide Motive überlagert (Motiv A auf Motiv B und umgekehrt) und so eine zweizählige Symmetrie erzwungen. Im Falle einer zufriedenstellenden zweizähligen Symmetrie sollte man für diese Operation eine geringe r.m.s.-Abweichung der Atompositionen erhalten.

Für das Ferredoxin aus *Clostridium acidi urici* findet man eine r.m.s.-Abweichung von 0,84 Å, für PsaC eine r.m.s.-Abweichung von 0,36 Å. Demzufolge ist die zweizählige Pseudosymmetrie in PsaC ausgeprägter als in CauFd. Daher führt die Überlagerung beider

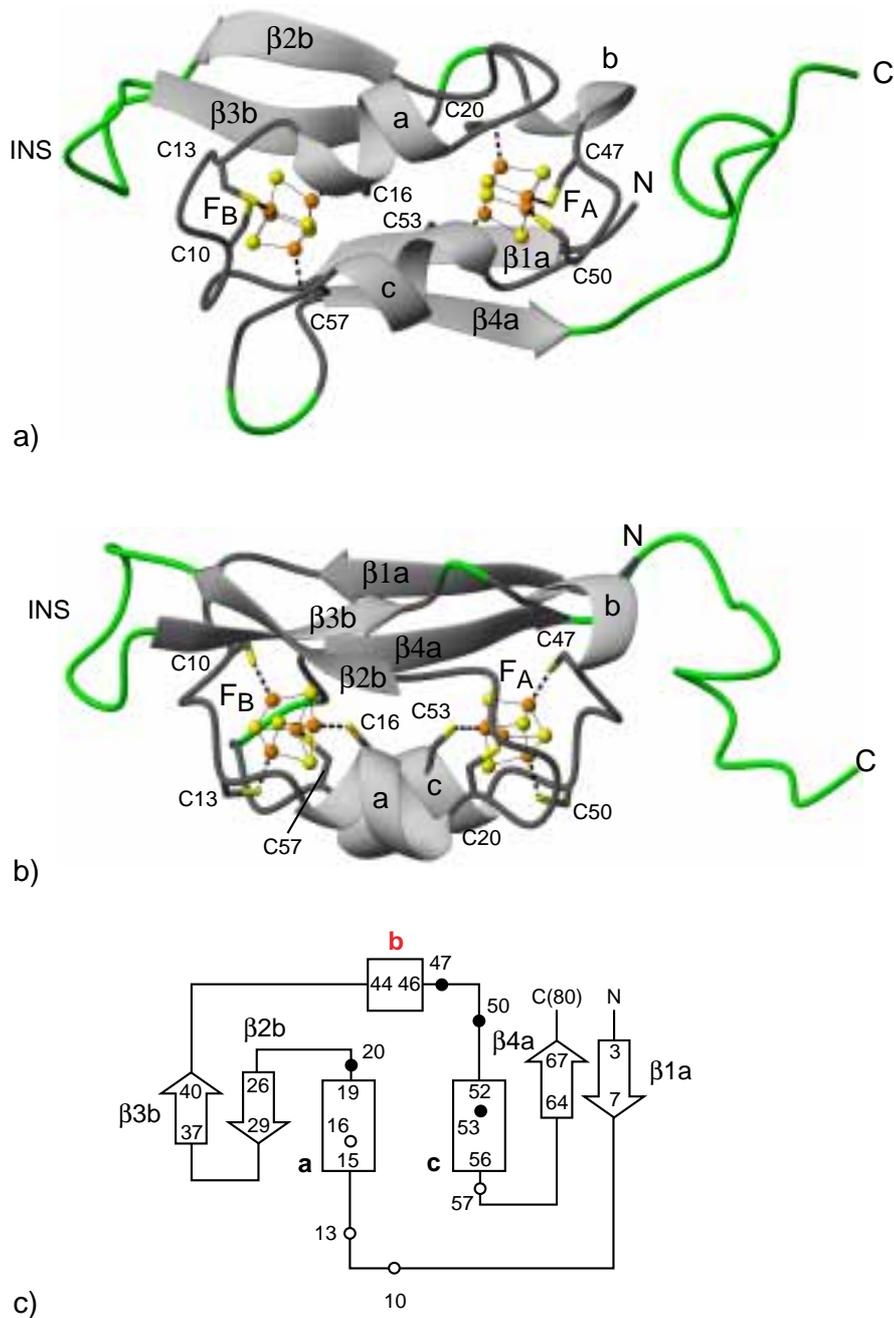


Abbildung 8.3: Blick auf die Untereinheit PsaC **a)** entlang der und **b)** senkrecht zur pseudozweizähligen Rotationsachse von PsaC. Die Eisenatome der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster sind als orangefarbene, die Schwefelatome als gelbe Kugeln eingezeichnet. Gleichfalls in gelb sind die Schwefelatome der Cysteinyliganden der Eisenatome eingezeichnet. Grün markiert sind Bereiche der Hauptkette, in denen Aminosäuren in PsaC gegenüber CauFd inseriert sind. **c)** Topographiediagramm der Untereinheit PsaC. Cysteine des F_A -Bindungsmotifs werden durch ausgefüllte Kreise, Cysteine des F_B -Bindungsmotifs durch offene Kreise symbolisiert.

Proteinstrukturen, bei der alle C_α -Atome innerhalb der $[Fe_4S_4]$ -Cluster Bindungsmotive berücksichtigt wurden ebenfalls nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis (die r.m.s.-Abweichung beträgt $0,83 \text{ \AA}$). Eine gute Überlagerung ergibt sich nur in den Fällen, in denen die beiden Bindungsmotive beider Strukturen nicht gleichzeitig, sondern unabhängig voneinander überlagert werden. Für die Überlagerung der Motive A aus PsaC und CauFd ergibt sich bei dieser Überlagerung eine r.m.s.-Abweichung von $0,29 \text{ \AA}$, für die Motive B eine von $0,21 \text{ \AA}$. Daraus folgt, daß sowohl die beiden Motive A, als auch die beiden Motive B aus PsaC und CauFd ähnlich gefaltet sind.

Eine weitere Frage ist, ob die Motive A und B in PsaC und CauFd auch untereinander ähnlich sind. Man findet, daß die Überlagerung des Motivs A aus CauFd mit dem Motiv B aus PsaC mit einer r.m.s.-Abweichung von $0,18 \text{ \AA}$ eine gute Übereinstimmung liefert. Überlagert man umgekehrt das Motiv B aus CauFd mit dem Motiv A aus PsaC, so findet man mit $0,30 \text{ \AA}$ ebenfalls eine gute Übereinstimmung. Dies bedeutet, daß der Sekundärstrukturverlauf in der Nähe der beiden Fe_4S_4 -Cluster in beiden Organismen sehr ähnlich ist. Die o. g. Unterschiede zwischen PsaC und CauFd und die in beiden Organismen unterschiedlich ausgeprägte zweizählige Pseudosymmetrie ist also nicht auf unterschiedliche Bindungsmotive für F_A und F_B zurückzuführen. Vielmehr werden die beiden Bindungsmotive auf unterschiedliche Art zum Gesamtkomplex kombiniert.

Worauf ist die unterschiedliche Kombination der Bindungsmotive zurückzuführen?

Abbildung 8.4a zeigt die Überlagerung der Motive B von PsaC und CauFd. Man erkennt, daß der Hauptkettenverlauf in PsaC und CauFd C-terminal von Cystein C16 stark unterschiedlich ist. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz in der Region um Prolin 16 (CauFd) und dem analogen Arginin18 in PsaC (s. Abbildung 8.2) zeigt, daß sich dort in PsaC das C-terminale Ende der α -Helix a und in CauFd eine 3_{10} -Helix befindet. Da die Ganghöhe für eine Windung in einer 3_{10} -Helix größer als die in einer α -Helix ist, wird der Hauptkettenverlauf in CauFd an dieser Stelle gegenüber dem Verlauf in PsaC verschoben. Dadurch weichen die Positionen der Cysteine C20 (PsaC) bzw. C18(CauFd), die den Cluster F_A koordinieren, am C-terminalen Ende der beiden Sequenzabschnitte I stark voneinander ab. Da die Faltung der $[Fe_4S_4]$ -Cluster-Bindungsmotive in sich nicht stark variiert (s. o.), muß die Faltung der gesamten Untereinheit PsaC anders als die von CauFd sein, um das Bindungsmotiv von F_A nicht zu zerstören.

In Abbildung 8.4b ist die Überlagerung der Motive B von PsaC und CauFd dargestellt. Man erkennt, daß die C_α -Positionen innerhalb des F_B -Bindungsmotivs gut übereinstimmen, jedoch die Abweichungen des Sekundärstrukturverlaufs N-terminal von Cystein C16

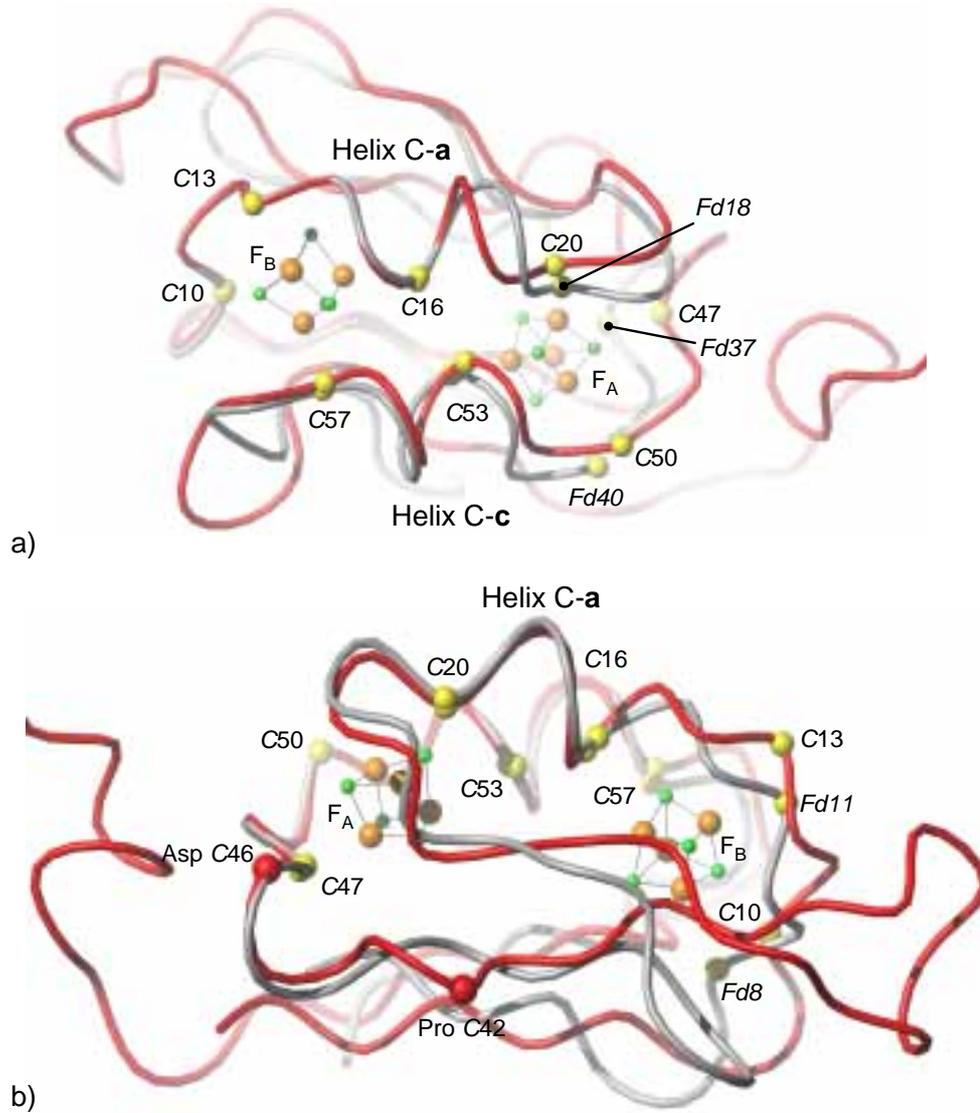


Abbildung 8.4: Überlagerung der C α -Atome der beiden [Fe $_4$ S $_4$]-Cluster Bindungsmotive aus PsaC (rot) und dem Ferredoxin aus *Clostridium acidurici* (grau). **a)** Überlagerung der beiden F $_B$ -Bindungsmotive (Blickrichtung entlang der Pseudozweizähligen Achse von PsaC) und **b)** Überlagerung der beiden F $_A$ -Bindungsmotive (Blickrichtung gegenüber a) um ca. 90° um die Horizontale gedreht). C α -Atome der die [Fe $_4$ S $_4$]-Cluster koordinierenden Cysteine werden durch gelbe Kugeln repräsentiert. C α -Atome der Cysteine von PsaC sind mit Cxx, einige ausgewählte Cysteine von CauFd mit Fdxx beschriftet. In **b)** sind die C α -Atome von Aspartat C46 und Prolin C42 als rote Kugeln dargestellt.

(PsaC) zwischen PsaC und CauFd größer werden. Ferner fällt die Abweichung des Sekundärstrukturverlaufs eingangs des F_A -Bindungsmotivs auf, die ca. von C42 bis C46 reicht. Während sich in PsaC an dieser Stelle von Threonin C44 bis Aspartat C46 eine 3_{10} -Helix befindet, besitzen die bakteriellen Ferredoxine keine derartige Sekundärstruktur an dieser Stelle. Ferner findet man in PsaC an Position C42 ein gegenüber der Sequenz der bakteriellen Ferredoxine inseriertes Prolin, wodurch der Sekundärstrukturverlauf von PsaC gegenüber dem von CauFd geändert wird. Als nächster Rest (C43) findet sich dort in PsaC ein konserviertes Arginin, zu dem in den Ferredoxinen ein Aspartat (CauFd33/PeaFd32) homolog ist. Dieses Arginin liegt mit Abständen von 2,9 Å und 3,3 Å nahe genug an den beiden sauren Resten AspC23 und GluC26, um mit diesen in ionische Wechselwirkung zu treten. Aspartat C23 und Glutamat C26 befinden sich ausgangs des F_B -Bindungsmotivs, so daß durch diese ionischen Wechselwirkung die beiden Bindungsmotive in PsaC aneinander „geklammert“ werden könnten. Die zu AspC23 und GluC26 homologen Reste in den Ferredoxinen sind hingegen ungeladen, so daß die ionischen Wechselwirkungen in bakteriellen Ferredoxinen nicht ausgebildet werden können. Eventuell ist dieser Unterschied mit verantwortlich für die unterschiedliche Faltung von PsaC gegenüber der von CauFd.

Eine mögliche Folge der unterschiedlichen Kombination der Module könnte der mit 11,7 Å um 0,6 Å kürzere Zentrenabstand zwischen den beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern im Ferredoxin aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* gegenüber dem in PsaC sein. Auf die Redoxeigenschaften und die detaillierte Umgebung der beiden Cluster wird im Abschnitt 9.7 eingegangen. An dieser Stelle sei nur angemerkt, daß die Redoxpotentiale der beiden terminalen Cluster F_A und F_B -440 ± 10 mV und -465 ± 10 mV betragen (Jordan *et al.*, 1998) und somit in der gleichen Größenordnung wie die Potentiale der Cluster in CauFd (-435 mV) liegen. Daraus folgt, daß die Umgebung der Cluster in beiden Proteinen ähnlich sein muß, da eine unterschiedliche Protein Umgebung Auswirkungen auf das Redoxpotential der Cluster hat (s. Abschnitt 9.7 und dortige Referenzen).

8.1.1 Die Integration von PsaC in den PS I-Komplex

Neben der Wichtigkeit der Untereinheit PsaC als Träger der beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_A und F_B kommt dieser Untereinheit auch eine tragende Rolle bei der Stabilisierung des stromalen Grates zu.

Untersuchungen an PS I-Mutanten ohne PsaC zeigten, daß in diesen PS I-Komplexen die beiden anderen stromalen Untereinheiten PsaD und PsaE nicht integriert sind (Yu *et al.*, 1995). Auch in der Struktur wird die zentrale Rolle von PsaC durch eine Vielzahl

an bindenden Wechselwirkungen sowohl zu PsaA und PsaB als auch zu den anderen stromalen Untereinheiten PsaD und PsaE deutlich.

Die Orientierung der Untereinheit im PS I-Komplex ist in der Gesamtansicht des stromalen Grates (Abbildung 8.1) und Abbildung 5.2 gezeigt. Die Untereinheit PsaC ist dabei so orientiert, daß ihre pseudozweizählige Rotationsachse einen Winkel von 70° mit der kristallographischen c-Achse einschließt. Die beiden α -Helices C-a und C-c sind auf die vermutliche Ferredoxin-Bindungstasche hin ausgerichtet. Die Insertion (INS) von TrpC30 bis GlnC37 weist in Richtung auf PsaE. Die C-terminale Verlängerung liegt unterhalb von PsaD über der Q_K -B-Bindungstasche.

Tabelle 8.1: Mögliche intermolekulare ionische Wechselwirkungen zwischen PsaC und anderen Untereinheiten. In Klammern gesetzt sind Wechselwirkungen mit Abständen größer 4 \AA , sowie die Wechselwirkung zwischen Asp C23 und His D95, bei der nicht entschieden werden kann, ob das Histidin geladen vorliegt.

Donor	Akzeptor	Abstand (\AA)
(C8 Asp O δ 2	E33 Lys N ζ	5,6)
(C23 Asp O δ 2	D95 His N δ 1	2,7)
(C26 Glu O ϵ 2	D109 Arg N η 1	4,6)
C34 Lys N ζ	E27 Asp O δ 1	3,9
C46 Asp O δ 1	D84 Arg N η 1	2,7
C46 Asp O δ 2	D61 Lys N ζ	2,9
C52 Arg N η 2	A579 Asp O δ 1	2,7
C52 Arg N η 2	A568 Asp O δ 1	2,9
C52 Arg N η 1	A568 Asp O δ 1	3,2
C51 Lys N ζ	B566 Asp O δ 1	2,7
C65 Arg N η 1	B555 Asp O δ 2	3,0
C65 Arg N η 2	B566 Asp O δ 2	2,6
C74 Arg N η 2	D25 Glu O ϵ 1	2,7

In Tabelle 8.1 sind mögliche PsaC involvierende, ionische Wechselwirkungen aufgeführt. Wie im Abschnitt 6.1 näher ausgeführt, werden die meisten ionischen Wechselwirkungen zwischen PsaC und der F_X -Bindungsregion von PsaA und PsaB ausgebildet. Auffällig ist, daß mit zwei Ausnahmen von PsaC nur Arginine und von PsaA/PsaB nur Aspartate an diesen Wechselwirkungen beteiligt sind.

Die Aminosäuren, die an den Wechselwirkungen zwischen PsaC und PsaD beteiligt sind, sind, obwohl sie in der Sequenz weit auseinander liegen, wegen der kompakten Faltung auf engem Raum lokalisiert. Sie befinden sich, mit Ausnahme von zwei weiteren mög-

lichen ionischen Wechselwirkungen, oberhalb einer Schlaufe (sog. Turn I-Struktur) am C-Terminus, die von Aminosäure C73 bis C76 reicht.

Die beiden weiteren ionischen Wechselwirkungen zwischen Aspartat C23 und Histidin D95 sowie Glutamat C26 und Arginin D109 werden zwischen PsaC und der „Klammer“ von PsaD (s. Abschnitt 8.2) ausgebildet. Allerdings kann im Falle des Histidins D95 nicht eindeutig entschieden werden, ob es geladen vorliegt. Wichtig ist diese Bindung, da die Mutation des analogen Histidins D97 aus *Synechocystis* PCC6803 in ein Alanin einen Einfluß auf die Ferredoxin-Reduktion zeigt (Hanley *et al.*, 1997).

Die zweite ionische Wechselwirkung ist zwischen Glutamat C26 und Arginin D109 möglich, könnte aber aufgrund des großen Abstandes schwächer als die übrigen Wechselwirkungen sein.

Alle an diesen Wechselwirkungen beteiligten Reste von PsaC sind in CauFd und PeaFd durch ungeladene Aminosäuren ersetzt oder befinden sich wie ArgC74 in der C-terminalen Verlängerung von PsaC. Daher wird diesen Aminosäuren eine entscheidende Bedeutung bei der Integration von PsaC in den PS I-Komplex zufallen. In einer Mutationsstudie an PsaC aus *Synechococcus sp.* PCC6301 wurden acht negativ geladene Aminosäurereste durch ein Alanin oder Arginine ersetzt (Rodday *et al.*, 1996). Bei drei Mutationen fand man eine verringerte Bindung von PsaC an das PS I (den Autoren zufolge an PsaA und PsaB). Es waren dies die Mutationen D9R, E27R und D32R. Aus der schlechten Bindung der D9A-Mutante schlossen die Autoren, daß dieser Rest essentiell für die Bindung an den PS I-Komplex sein müsse. Der zu AspC9 analoge Rest AspC8 in *Syn. el.* bildet Wasserstoffbrücken mit den Untereinheiten PsaD und PsaE aus. Wie aus Tabelle 8.1 ersichtlich, bilden alle negativ geladenen Aminosäuren von PsaC ausschließlich Wechselwirkungen mit PsaD aus. Die Folgerung, daß PsaC durch diese Wechselwirkungen an PsaA und PsaB gebunden wird (Rodday *et al.*, 1996), ist somit nicht richtig. Vielmehr wird PsaC aufgrund der fehlenden Wechselwirkungen mit PsaD schlechter in den Komplex integriert worden sein.

Bei Betrachtung der Verteilung der Wasserstoffbrückenbindungen (Tabelle 8.2) findet man nur wenige Besonderheiten. Weder die Aminosäuren in der Insertion noch die in der C-terminalen Verlängerung zeichnen sich durch eine besonders hohe Anzahl oder Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen aus. In der Region der Insertion findet sich sogar nur eine Wasserstoffbrücke zu PsaE und eine ionische Wechselwirkung von Lys C34 und Asp E27. Auf das Lysin C34 wird nochmals im Abschnitt 8.4 eingegangen werden, da es gemäß Mutageneseexperimenten auch eine wichtige Funktion bei der Reduktion der

Tabelle 8.2: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PsaC und anderen Untereinheiten.

Donor	Akzeptor	Abst. (Å)	Donor	Akzeptor	Abst. (Å)
C5 Lys N η	D113 Asn O δ 1	3,0	C40 Ser O γ	D112 Val O	3,5
C6 Ile N	D113 Asn O	3,0	C41 Ser N	D112 Val O	3,4
D115 Val N	C6 Ile O	2,8	D113 Asn N δ 2	C41 Ser O γ	2,7
D122 Asn N δ 2	C7 Tyr O η	2,9	D113 Asn N δ 2	C41 Ser O	3,0
C8 Asp N	D117 Arg O	3,2	A583 Arg N	C48 Val O	2,9
E34 Tyr OH	C8 Asp O δ 1	2,6	C60 Asp N	E58 Asn O δ 1	2,8
D61 Lys N η	C22 Thr O	2,6	E44 Asn N δ 2	C60 Asp O δ 1	3,2
D95 His N δ 1	C23 Asp O δ 2	2,7	E14 Ser O γ	C60 Asp O δ 2	3,0
C27 Met N	D102 Pro O	3,0	E15 Tyr N	C60 Asp O δ 2	2,8
D19 Arg N η 1	C27 Met O	2,8	C74 Arg N ϵ	D25 Glu O ϵ 2	2,9
E33 Lys N	C32 Gly O	2,9	C80 Tyr OH	B703 Pro O	2,7
D112 Val N	C40 Ser O γ	2,7	C80 Tyr OH	B678 Gln O ϵ 1	3,1

exogenen Elektronentransporter Ferredoxin und Flavodoxin zu besitzen scheint (Meimberg *et al.*, 1999). Wie zu erwarten, finden sich im Bereich der „Klammer“ von PsaD (ca. Aminosäuren D94 bis D122) einige Wasserstoffbrückenbindungen, die den Komplex stabilisieren. Hervorzuheben ist dabei erneut die Wechselwirkung eingangs der „Klammer“ zwischen Histidin D95 und Aspartat C23.

Zusammenfassend stellen sich die Bindungsverhältnisse wie folgt dar: PsaC scheint durch die basischen Arginine an die beiden großen Untereinheiten PsaA und PsaB gebunden zu werden. Die von PsaD ausgebildete „Klammer“ und die Wechselwirkungen des C-Terminus fixieren die Untereinheit in ihrer Position. So zeigen auch Mutationsstudien, in denen der C-Terminus von PsaC entfernt wurde, daß die so modifizierte Untereinheit schwächer als der Wildtyp an das PS I bindet (Naver *et al.*, 1996). In der selben Studie wurde auch gezeigt, daß die mutierte Untereinheit PsaC, der die inserierte Schlaufe entfernt wurde, nicht mehr an den Komplex bindet. Da die Aminosäuren in der Schlaufe selbst nur wenige Wechselwirkungen mit den Aminosäuren benachbarter Untereinheiten eingehen, kann die Ursache hierfür nur in einer leicht geänderten Faltung von PsaC liegen, welche die Bindung an das PS I verschlechtert. Dies könnte die Ursache für die durch die Struktur nicht unterstützte Schlußfolgerung der Autoren von (Naver *et al.*, 1996) sein, daß die Insertion für die Bindung an PsaA und PsaB verantwortlich wäre.

Über die Sekundärstruktur von PsaD ist bislang wenig bekannt. In den Modellen bei 4,0 Å (Schubert *et al.*, 1997) wurde eine α -Helix PsaD zugeordnet und später (Klukas *et al.*, 1999a) in der Nähe dieser Untereinheit drei β -Stränge lokalisiert. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten, daß PsaD in Lösung einen geringen α -helicalen Anteil und einen relativ hohen Anteil an β -Strängen besitzt (Xia *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1999). Ein besonderes Detail von PsaD konnte ebenfalls bereits in der Elektronendichteverteilung bei 4 Å Auflösung erkannt werden. PsaD bildet demzufolge in der Nähe einer seiner beiden Termini eine „Klammer“ um PsaC aus (Klukas *et al.*, 1999a). Alle diese Ergebnisse sind mit dem aktuellen Strukturmodell in Einklang. Gemäß einer Vielzahl biochemischer Untersuchungen (s. u.) scheint PsaD eine essentielle Rolle für die richtige Faltung aller stromalen Untereinheiten und bei der Ausbildung und Assemblierung des stromalen Grates zu spielen. Neben den in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnten Quervernetzungsexperimenten wurde auch gezeigt, daß sich die EPR-Spektren von F_A und F_B in Komplexen mit und ohne PsaD unterscheiden (Li *et al.*, 1991), mithin PsaD eventuell auch die Faltung von PsaC beeinflussen kann.

Aufgrund der Position der Untereinheit an der dreizähligen Achse liegt PsaD nicht nur in Nachbarschaft zu PsaA, PsaB und PsaC, sondern auch in der Nähe von PsaL. Mit allen diesen Untereinheiten bildet PsaD diverse Wechselwirkungen aus. Die vermutlich ionischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen, an denen PsaD beteiligt ist, sind in den Tabellen 8.3 und 8.4 aufgelistet.

Tabelle 8.3: Mögliche inter- und intramolekulare ionische Wechselwirkungen, an denen PsaD beteiligt ist.

Donor	Akzeptor	Abstand (Å)
B702 Lys N ζ	D24 Glu O ϵ 2	2,9
C74 Arg N η 2	D25 Glu O ϵ 1	2,7
A561 Arg N η 2	D40 Glu O ϵ 1	3,0
D60 Arg N η 2	D62 Glu O ϵ 2	2,8
D61 Lys N ζ	C46 Asp O δ 2	2,9
A583 Arg N η 2	D62 Glu O ϵ 2	2,8
D73 Arg N η 2	D103 Glu O ϵ 1	4,4
D84 Arg N η 2	C46 Asp O δ 1	2,7
D109 Arg N η 2	D98 Asp O δ 2	3,1
D129 Lys N ζ	B400 Asp O δ 1	2,7

Tabelle 8.4: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PsaD und anderen Untereinheiten.

Donor	Akzeptor	Abst. (Å)	Donor	Akzeptor	Abst. (Å)
A435 Arg N η 1	D12 Gly O	2,6	D120 Gly N	E13 GLUO ϵ 1	2,9
A564 Arg N η 2	D14 Thr O	2,8	D14 Thr N	A435 Arg O	2,9
D14 Thr O γ 1	A438 Asp O δ 1	2,9	A438 Asp N	D14 Thr O γ 1	3,3
A564 Arg N η 2	D16 Gly O	2,9	D17 Leu N	L13 Phe O	3,4
L15 Gly N	D17 Leu O	2,7	D19 Ser N	B689 Glu O ϵ 2	2,9
A562 Ser O γ	D42 Pro O	3,3	D46 Ala N	A431 Asp O δ 1	2,9
D60 Arg N η 1	A564 Arg O	2,9	D60 Arg N η 1	A565 Leu O	3,3
D61 Lys N ζ	C22 Thr O	2,6	C27 Met N	D102 Pro O	3,0
D109 Arg N η 1	C27 Met O	2,8	D112 Val N	C40 Ser O γ	2,7
C40 Ser O γ	D112 Val O	3,5	C41 Ser N	D112 Val O	3,4
D113 Asn N δ 2	C41 Ser O γ	2,7	D113 Asn N δ 2	C41 Ser O	3,2
C5 Lys N ζ	D113 Asn O δ 1	3,0	C6 Ile N	D113 Asn O	3,0
D115 Val N	C6 Ile O	2,8	C8 Asp N	D117 Arg O	3,2
D122 Asn N δ 2	C7 Tyr O η	2,9	D122 Asn N δ 2	B558 Asp O δ 2	3,2
B557 Lys N ζ	D124 Asn O δ 1	2,4	D126 Ser O γ	B41 Tyr O	2,6
D95 His N δ	C23 Asp O δ 2	2,7	D120 Gly N	E13 Glu O ϵ 1	2,9

Die Hauptstruktur motive der Untereinheit PsaD sind ein viersträngiges und ein zwei-strängiges antiparalleles β -Faltblatt (s. Abbildung 8.6). Die Topographie der Untereinheit ist in Abbildung 8.7 schematisch dargestellt.

Der N- und C-Terminus von PsaD liegen frei zugänglich an der Außenseite des stromalen Grates.

PsaD bildet ca. von Prolin D7 bis Leucin D17 und Valin D56, sowie Phenylalanin D58 eine vermutlich leicht hydrophobe Bindungstasche aus, in die eine N-terminale Schlaufe von PsaL im Bereich von L12 bis L14 mit Phenylalanin L13 an der Spitze hineinragt. Dort finden sich auch zwei Wasserstoffbrücken zu PsaL (s. Tabelle 8.4). Ferner verläuft dieser Bereich von PsaD oberhalb der Helix A-**fg(2)**.

Eingangs des ersten β -Strangs β 1a befinden sich die Glutamate D24 und D25. Während ersteres vermutlich mit Arginin B702 wechselwirkt, bildet D25 zusammen mit Arginin C74, Aspartat C46 und Arginin D84 ein Netzwerk ionischer Bindungen aus, die PsaC und PsaD sowohl intern als auch untereinander verzahnen. Von D26 bis D33 verläuft der erste β -Strang (β 1a) des zentralen viersträngigen antiparallelen β -Faltblatts (a). Die ersten drei Stränge (β 1a, β 4a und β 5a) verlaufen ungefähr parallel zur Membranebene.

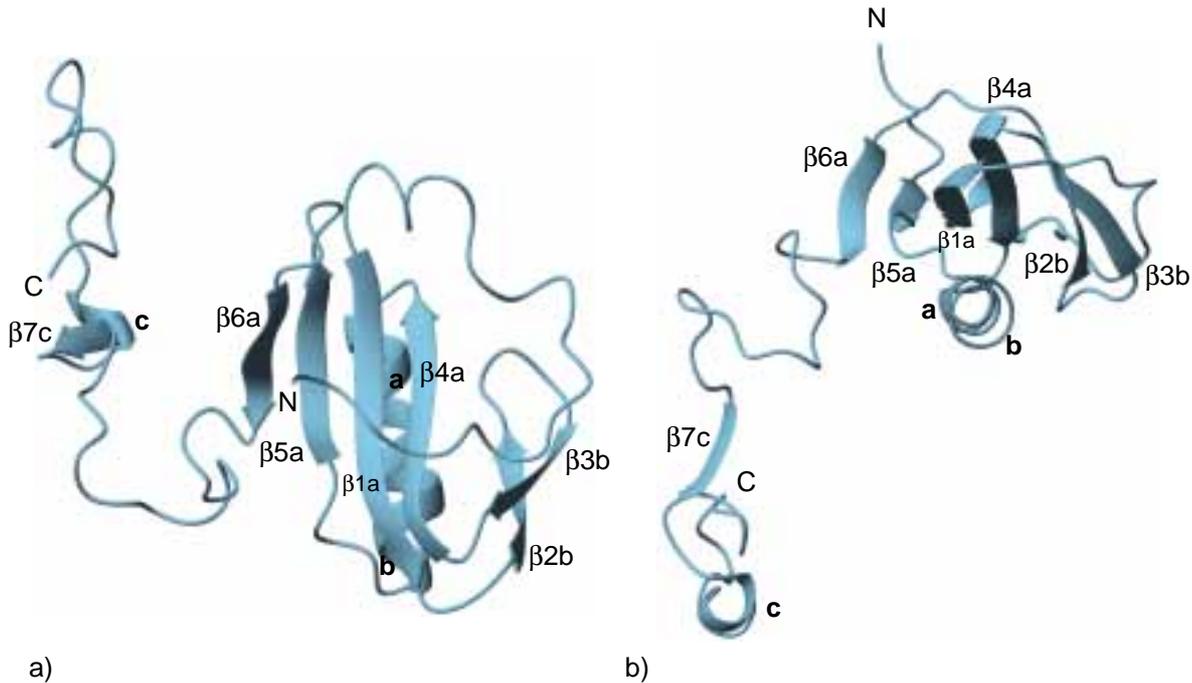


Abbildung 8.6: Zwei Ansichten der Untereinheit PsaD. Die Orientierung wurde willkürlich gewählt, um einen Blick auf alle Sekundärstrukturelemente zu gewährleisten. **a)** Blick senkrecht zur Helixachse von D-b. **b)** Ansicht 90° um die horizontale Achse gegen a) gedreht. Eine Ansicht von PsaD parallel zur Membranebene zeigt Abbildung 8.11.

Der C-terminale Strang $\beta 6a$ verläuft leicht geknickt zu den anderen drei Strängen an der stromalsten Außenseite der Untereinheit am Beginn der „Klammer“ um PsaC.

In der Sequenz zwischen den beiden Strängen $\beta 1a$ und $\beta 4a$ befinden sich die beiden β -Stränge $\beta 2b$ und $\beta 3b$, die ein zweisträngiges Faltblatt (b) ausbilden. Dieses Faltblatt ist in einem Winkel von ca. 70-90° gegen das Faltblatt (a) gedreht. Dadurch wird die die Faltblätter verbindende Schlaufe z. T. unterhalb von Faltblatt (a) gefaltet und die Schlaufe von D41 bis D45 zwischen PsaD und PsaA eingeklemmt (oberhalb von Helix A-h). Die Schlaufe bildet mit Methionin D41 die lumenale Begrenzung der Bindungsstelle für PsaL.

In der Sequenz zwischen den Faltblättern $\beta 4a$ und $\beta 5a$ befindet sich die einzige α -Helix der Untereinheit. Sie liegt unterhalb der Stränge $\beta 4a$ und $\beta 5a$ und verläuft parallel zum Faltblatt (a). Sowohl am Beginn als auch am Ende der Helix befindet sich eine Vielzahl potentiell geladener Reste. Die Aminosäuren D60 bis D62 am N-terminalen Ende treten mit PsaA und PsaC in Wechselwirkung (s. Tabelle 8.3 und 8.4). Vermutlich stabilisieren diese Wechselwirkungen die Helix D-a. Am C-terminalen Ende der Helix verändert sich die Geometrie der α -Helix bei Leucin D72 in die einer 3_{10} -Helix. In diesem Sequenzabschnitt befinden sich die positiv geladenen Aminosäuren ArgD73, ArgD75 und LysD76. Zumindest

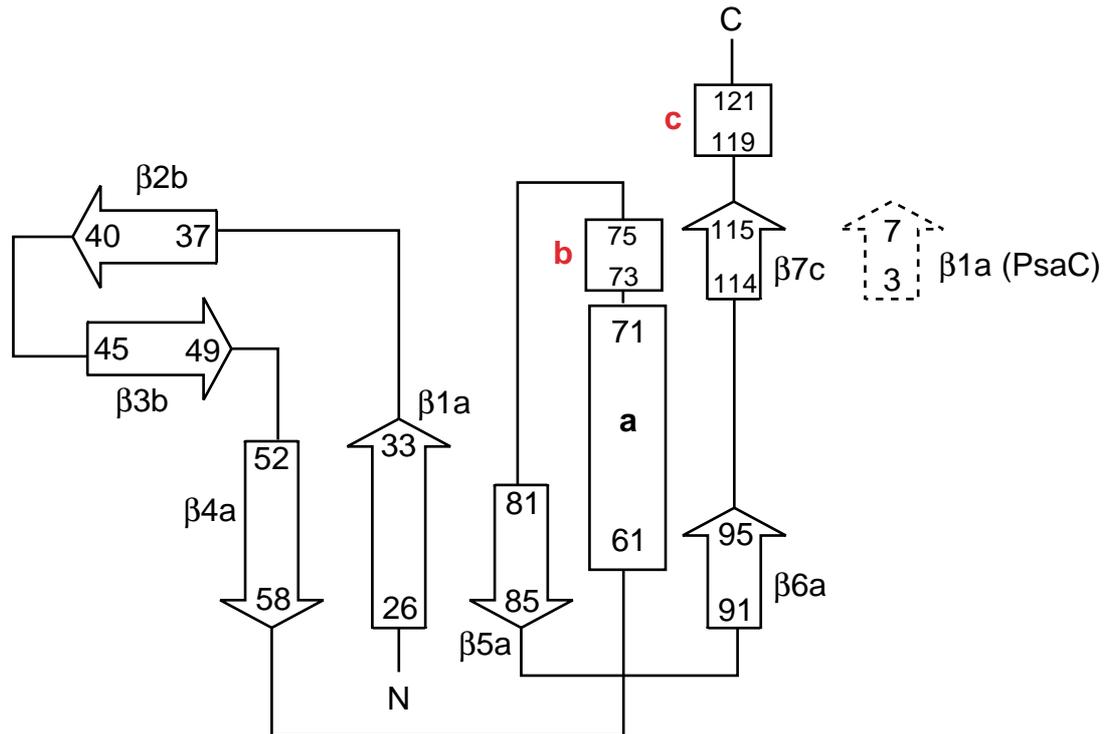


Abbildung 8.7: Die Topographie der Untereinheit PsaD. Die Helices D-a und D-b liegen unterhalb des Faltblattes a. Der gestrichelte β -Strang auf der rechten Seite der Abbildung gehört zu PsaC und steht in Wechselwirkung mit $\beta 7c$ von PsaD.

die Seitenketten von D73 und D76 ragen in die vermutliche Ferredoxin-Bindungstasche. Mutageneseexperimente zeigten, daß Substitutionen der analogen Aminosäuren in PsaD aus *Synechocystis* PCC6803 die NADP^+ -Reduktion herabsetzten (Chitnis *et al.*, 1997). Die Autoren führten dies allerdings nicht auf eine verschlechterte Ferredoxin-Bindung, sondern auf eine Verminderung von an das PS I gebundenen PsaD zurück. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von PsaD verschiedener Organismen in dieser Region zeigt (s. Abbildung 8.5), daß dort in allen Organismen negativ geladene Reste vorliegen. Allerdings sind die Überlagerungen nicht immer eindeutig zu erstellen, so daß dort in den Proteinen anderer Organismen eine andere Faltung möglich wäre. Es erscheint jedoch plausibel, daß diese Aminosäuren an der Bindung des löslichen Ferredoxins beteiligt sind.

Ausgangs des letzten Stranges des Faltblatts (a) beginnt der sicherlich ungewöhnlichste Teil der Untereinheit PsaD. Die Hauptkette führt hier von der einen Seite des stromalen Grates zur anderen über die Untereinheit PsaC hinweg und umklammert diese (s. Abbildung 8.8). Diese „Klammer“ reicht ca. von Aminosäure D94 bis D122. Ein Blick auf die Sequenzüberlagerung in Abbildung 8.5 zeigt, daß dieser Sequenzabschnitt stark zwischen vielen Organismen konserviert ist. Dies deutet auf die Wichtigkeit dieses strukturellen

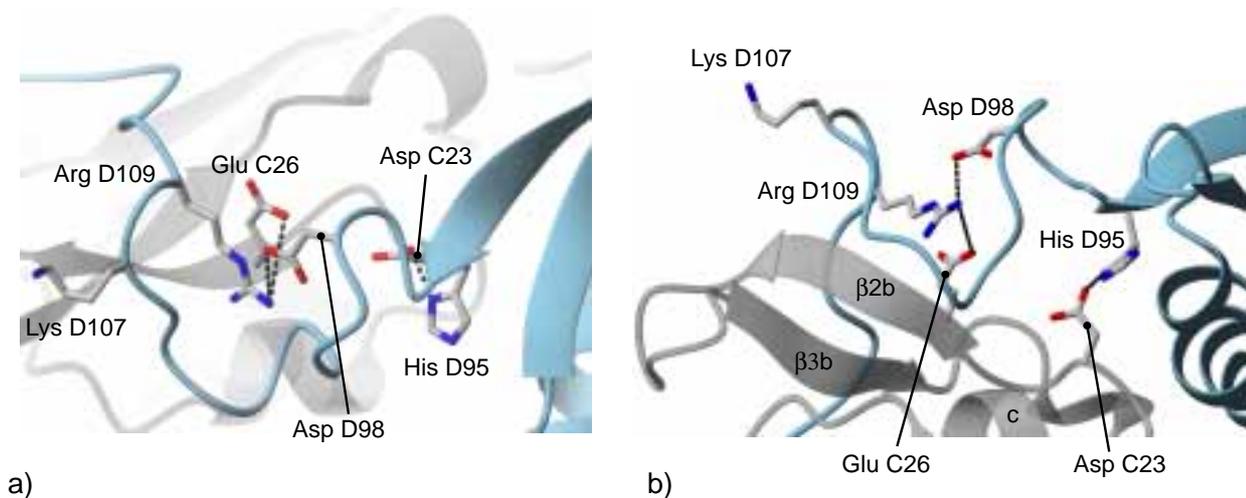


Abbildung 8.8: Zwei Ansichten der von PsaD ausgebildeten Klammer um PsaC: **a)** Blick von der stromalen Seite, **b)** Blick ca. 90° gegen a) gedreht. Die Untereinheit PsaC ist grau, PsaD hellblau eingefärbt. Wechselwirkungen wichtiger Aminosäuren innerhalb der Klammer sind eingezeichnet.

Elementes hin.

Auf die vermutlich wichtige Wasserstoffbrücke von Histidin D95 zu Aspartat C23 wurde bereits im Abschnitt 8.1 eingegangen.

Die „Klammer“ bildet bei Prolin D102 einen Knick aus, dessen Spitze vor der Helix C-a liegt. Zwei Aminosäuren weiter befindet sich Lysin D104, das gemäß Mutationsstudien an der Bindung des löslichen Ferredoxins beteiligt ist (Lelong *et al.*, 1994). Der Knick scheint durch eine Salzbrücke zwischen Aspartat D98 und Arginin D109 stabilisiert zu werden. Die äußerste Spitze der „Klammer“ liegt oberhalb des Anfangs und Endes der inserierten Schlaufe von PsaC. An dieser Stelle befindet sich Lysin D107. Daran anschließend führt die „Klammer“ von der möglichen Ferredoxinbindungsstelle zur „Rückseite“ des stromalen Grates. Dabei führt die „Klammer“ über die Helices B-hi(1) und B-f von PsaC weg und faltet sich bei Aminosäure B130 wieder zurück in Richtung auf PsaC. Die zurückgefaltete Schlaufe wird vermutlich von einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Arginin D117 und Aspartat D137 ($d_{N\eta_2-O} = 3.2 \text{ \AA}$) in der richtigen Position gehalten.

Von D114 bis D115 bildet die „Klammer“ den β -Strang $\beta 7c$ aus, der mit dem Strang $\beta 1a$ von PsaC in Wechselwirkung tritt und die Verbindung zwischen den beiden Untereinheiten stabilisiert. Auch in diesem Abschnitt der „Klammer“ finden sich zahlreiche Wechselwirkungen zwischen PsaD und den Untereinheiten PsaB und PsaC. Die Wechselwirkungen innerhalb der „Klammer“ sind im Hinblick auf eine Mutationsstudie interessant. So zeigten die Mutationen von Arginin D111 (Numerierung nach *Synechocystis* PCC6803, entsprechend D109 in *Syn. el.*) und Histidin D97 (D95 in *Syn. el.*) eine verringerte Bindung von

Ferredoxin an den Komplex und eine veränderte Reduktionskinetik. Desweiteren wurde eine pH-Wert Abhängigkeit der Ferredoxin Affinität beobachtet, die dem Histidin D97 zugeschrieben wurde (Hanley *et al.*, 1996). Die Struktur zeigt, daß diese beiden Aminosäuren wahrscheinlich nicht zu der angenommenen Ferredoxin-Bindungsstelle weisen, sondern die Struktur der „Klammer“ bestimmen. Damit könnte der Einfluß auf die Ferredoxin Bindung auf einer Veränderung der Struktur der „Klammer“ und einer damit eventuell einher gehenden Strukturänderung von PsaD beruhen. Zusätzlich könnte eine Änderung der „Klammer“ auch Auswirkungen auf die inserierte Schlaufe von PsaC haben, in der sich der für die Ferredoxin Reduktion wichtige Rest Lysin C34 befindet.

Die Vielzahl von Wechselwirkungen, an denen PsaD beteiligt ist, sowie die starke Konservierung der Aminosäuresequenz in strukturell wichtigen Bereichen zeigen, daß PsaD eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und räumlichen Anordnung des stromalen Grates zukommt.

cyanobakteriellen Sequenz findet man in Eukaryonten, sowie dem filamentösen Cyanobakterium *Nostoc* sp. PCC 8009. Cyanobakterien besitzen gegenüber diesen Organismen eine sieben Aminosäure lange Insertion von Aminosäure 47 bis 53, die unter den Cyanobakterien nahezu vollständig identisch ist. Ein weiterer Unterschied zwischen den Cyanobakterien und Eukaryonten ist der in letzteren Organismen verlängerte N-Terminus.

PsaE ist die einzige Untereinheit des PS I Komplexes, von der bereits detaillierte dreidimensionale Strukturmodelle existieren. Diese Modelle beruhen auf zwei NMR-Strukturen von PsaE aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Falzone *et al.*, 1994) und aus *Nostoc* sp. PCC 8009 (Mayer *et al.*, 1999). Demnach besteht PsaE aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt in Form einer β -Fass Struktur, die der Topologie einer SH3-Domäne entspricht (Falzone *et al.*, 1994). Der einzig signifikante Unterschied zwischen den beiden NMR-Strukturen besteht in der Schlaufe, welche den dritten (β C) und vierten (β D) β -Strang verbindet, da PsaE aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 dort die o. g. sieben Aminosäuren lange Insertion besitzt.

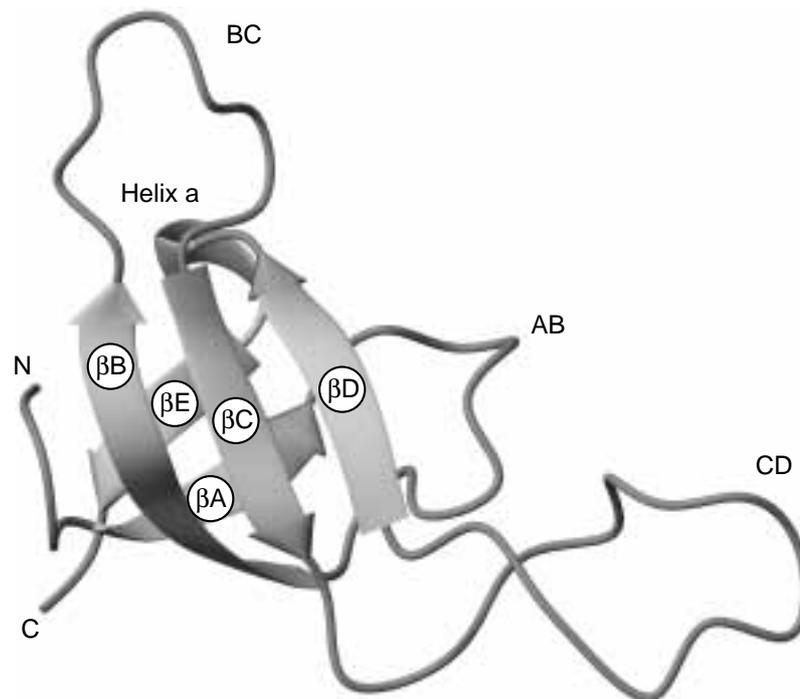


Abbildung 8.10: Die Sekundärstruktur von PsaE. Das Bild ist in einer willkürlichen Orientierung gezeigt, um die fünf antiparallelen β -Stränge des β -Fasses zu zeigen. Die Benennung der Sekundärstrukturelemente erfolgte gemäß (Falzone *et al.*, 1994). Die Schlaufe AB befindet sich oberhalb des C-Terminus von PsaF und nahe an PsaD, PsaC und PsaB. Die Schlaufe BC bildet die am weitesten ins Stroma ragende Region von PsaE und liegt direkt neben der Schlaufe zwischen β 2b und β 3b von PsaC. Die Schlaufe CD liegt stromal der Untereinheiten PsaA und PsaB ca. 8 Å von der F_X Bindungsstelle entfernt. Eine weitere Ansicht von PsaE parallel zur Membranebene zeigt Abbildung 8.11.

Da es sich bei den beiden NMR-Modellen um in Lösung ermittelte Strukturen handelt, ist ein Vergleich mit dem Röntgenstrukturmodell der an den Komplex gebundenen Untereinheit PsaE von Interesse. Zur Vereinfachung wurde für diese die Nomenklatur der Sekundärstrukturelemente nach (Falzone *et al.*, 1994) beibehalten.

Die Kristallstruktur von PsaE (s. Abbildung 8.10) ist in den Bereichen der β -Stränge nahezu identisch mit den NMR-Strukturen. Bei Überlagerung der wesentlichen Strukturelemente ergibt sich mit der *Synechococcus sp.* PCC 7002-Struktur eine RMS-Abweichung von 0,7 Å und mit dem Modell aus *Nostoc sp.* PCC 8009 eine RMS-Abweichung von 0,5 Å. Im PS I-Komplex sind die β -Stränge β B, β C und β D auf die mögliche Ferredoxin-Bindungsstelle hin ausgerichtet.

Der N- und C-Terminus von PsaE sind dem Solvens zugewandt und nicht in den Komplex eingebettet, was im Widerspruch zu biochemischen Ergebnissen steht (Rousseau *et al.*, 1993). So führt die alleinige Mutation von Arg12 in *Synechocystis sp.* PCC 6803 (SYNP3) nicht zu einer Beeinflussung des Bindungsverhaltens von PsaE an den Komplex. Nur in Kombination mit Mutationen von Lys7 und Lys11 oder Arg4 und Arg9 findet keine Bindung von PsaE mehr an den Komplex statt (Rousseau *et al.*, 1993). Obwohl eine ionische Bindung zwischen ArgE11 (entsprechend ArgE12 in SYNP3) und GluE64 (d=2,9 Å) den Komplex intern stabilisieren wird, kann der Verlust dieser Bindung offenbar durch andere Wechselwirkungen aufgefangen werden. Die Mutation von Arg9 (entsprechend LysE8 in *Syn. el.*) in ein Alanin führt wahrscheinlich zum Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung zu Untereinheit PsaF (s. Tabelle 8.5).

Tabelle 8.5: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PsaE und anderen Untereinheiten.

Donor	Akzeptor	Abst. (Å)	Donor	Akzeptor	Abst. (Å)
E8 Lys N ζ	F134 Asn O	3,0	D120 Gly N	E13 Glu O ϵ 1	2,9
E14 Ser O γ	C60 Asp O δ 2	3,0	E15 Tyr N	C60 Asp O δ 2	2,8
A718 Gln N ϵ 2	E15 Tyr O η	2,7	A720 Arg N η 1	E15 Tyr O η	3,0
A720 Arg N η 2	E15 Tyr O η	3,1	B551 Lys N ζ	E15 Tyr O	2,9
F137 Thr O γ 1	E15 Tyr O	3,4	F137 Thr O γ 1	E17 Tyr O	2,8
E33 Lys N	C32 Gly O	2,9	E34 Tyr O η	C08 Asp O δ 1	2,6
E44 Asn N δ 2	C60 Asp O δ 1	3,2	A720 Arg N η 2	E44 Asn O	3,1
E45 Tyr O η	A702 Glu O ϵ 2	2,5	B571 Gly N	E47 Gly O	2,8
E48 Tyr O η	A578 Cys O	3,2	E49 Ser N	B568 Pro O	2,9
A724 Ile N	E49 Ser O γ	3,2	C60 Asp N	E58 Asn O δ 1	2,8

Der Verlauf der Schlaufe AB ist in den drei untersuchten Strukturmodellen sehr ähnlich. Sie befindet sich oberhalb des C-Terminus von PsaF und nahe an PsaD, PsaC und PsaB (Schlaufe **h-i**), sowie PsaA (Helix **jk(1)**). In dieser Schlaufe befindet sich der streng konservierte Sequenzabschnitt von GluE13 bis TyrE17, doch ist das letzte Tyrosin vereinzelt durch ein Phenylalanin ersetzt. Zahlreiche Wasserstoffbrücken werden von diesen Aminosäuren zu benachbarten Untereinheiten ausgebildet (s. Tabelle 8.5). Interessanterweise ruft die Mutation von TyrE16 (in SYNP3) keine verändertes Bindungs- oder Faltungsverhalten von PsaE hervor, obwohl das Sauerstoffatom O_ζ des analogen Restes TyrE15 (in *Syn. el.*) an zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein kann.

Ausgangs des β -Stranges β B befindet sich die Schlaufe BC. Sie bildet den höchsten Punkt von PsaE im stromalen Grat. Am Beginn der Schlaufe ist in allen Organismen eine potentiell negativ geladene Aminosäure lokalisiert. In *Syn. el.* ist dies das Aspartat E27, das mit einem Abstand von 3,9 Å in direkter Nähe zu Lysin C34 liegt, das eine wichtige Funktion bei der Bindung des löslichen Ferredoxins besitzen soll. Weiter C-terminal in dieser Schlaufe befindet sich Prolin E30, das von den in Abbildung 8.9 verglichenen Organismen nur in *Syn. el.* und Spinat existiert. Gegenüber den anderen PsaE Sequenzen bildet es eine Insertion in dieser Schlaufe, was jedoch keinen großen Einfluß auf deren Faltung hat. Trotz der Unterschiede im Detail ist der Charakter dieser Schlaufe in allen drei Strukturmodellen ähnlich. Der vorletzte Rest in der Schlaufe ist das Tyrosin E34, dessen Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrücke mit Aspartat C8 ausbildet. Die Tatsache, daß es in allen verglichenen Organismen konserviert ist, deutet daraufhin, daß es einen Beitrag zur Stabilisierung dieser Region des Komplexes leistet. Am Ende des sich C-terminal anschließenden β -Stranges β C befindet sich die in allen bisher bekannten PS I-Komplexen konservierte Aminosäure Arginin E39. Mutationsstudien zeigten, daß eine Änderung des Arginins in ein Glutamin die Affinität für Ferredoxin um den Faktor 20 absenkt (Sétif *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Position des Arginins, das in die vermutliche Bindungstasche des Ferredoxins ragt (siehe Kapitel 8.4).

Zwischen den beiden β -Strängen β C und β D befindet sich die Schlaufe CD, die aus den Aminosäuren Phenylalanin E40 bis Asparagin E56 gebildet wird. In dieser Schlaufe finden sich die größten Unterschiede zwischen den drei Strukturmodellen. Wie bereits erwähnt, ist diese Schlaufe in *Nostoc sp.* PCC 8009 sieben Aminosäuren kürzer als in *Synechococcus sp.* PCC 7002 und *Syn. el.* Trotz der Insertion in *Syn. el.* sind sich die Bereiche vor und nach der Insertion zwischen *Nostoc sp.* PCC 8009 und *Syn. el.* ähnlicher als zwischen *Synechococcus sp.* PCC 7002 und *Syn. el.* Diese große Abweichung trotz gleicher Pri-

märstruktur hängt vermutlich mit der Flexibilität dieser Schlaufe in der NMR-Struktur zusammen, die eine andere Faltung als in der komplexgebundenen Struktur erlaubt. Die Schlaufe liegt stromal der Untereinheiten PsaA und PsaB, mit der N-terminalen Hälfte (E44 bis E49) unterhalb von PsaC. Die Spitze der Schlaufe um Aminosäure E50 zeigt auf das N-terminale Ende der Helix A-k. Damit kommt die Schlaufe mit einem Abstand von ca. 8 Å in die Nähe der F_X-Bindungstasche. Am Beginn der Schlaufe befinden sich die beiden konservierten Aminosäuren Asparagin E44 und Tyrosin E45. Sie liegen vor der Insertion und ihre Positionen unterscheiden sich leicht von denen in *Nostoc sp.* PCC 8009. Die generelle Faltung in dieser Region bleibt von diesen Unterschieden jedoch unbeeinflusst, so daß es vorstellbar ist, daß sich die Faltung bei Bindung an den Komplex in Richtung auf die Kristallstruktur ändert. Asparagin E44 kann sowohl zu PsaC als auch zu PsaA Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, Tyrosin E45 zu PsaA (s. Tabelle 8.5). Die konservierte Natur dieser Reste läßt darauf schließen, daß sie zur Bindung von PsaE an den Proteinkomplex benötigt werden. Von den gegenüber Eukaryonten inserierten sieben Aminosäuren bilden E47, E48 und E49 vier Wasserstoffbrückenbindungen mit der Umgebung aus, davon drei mit Aminosäuren in der F_X-Bindungstasche. Die Schlaufe wird durch eine interne Wasserstoffbrücke zwischen Tyrosin E48 und Serin E51 (sog. β II Turn) stabilisiert.

Ob die in Cyanobakterien inserierte Schlaufe eine funktionelle Bedeutung besitzt, kann nicht entschieden werden. Eine Funktion bei der Ferredoxin-Reduktion scheint jedoch unwahrscheinlich, da sie keinerlei geladene Reste enthält, die in die Bindungstasche für Ferredoxin ragen.

Zwischen β -Strängen β D und β E befindet sich die 3_{10} Helix a. Sie liegt an der Rückseite des stromalen Grates und die dort lokalisierten Reste treten in keinerlei Wechselwirkung mit den umgebenden Untereinheiten PsaC und PsaD.

Der C-Terminus und auch der N-Terminus liegen am Rand des PS I-Komplexes (s. o.). Daher sollten die verlängerten N-Termini in höheren Pflanzen sowie die unterschiedlich langen C-Termini in verschiedenen Organismen keine Rolle bei der Integration von PsaE in den Gesamtkomplex spielen.

In der Literatur werden verschiedene Funktionen von PsaE innerhalb des PS I Komplexes diskutiert. Aus Quervernetzungsexperimenten wurde geschlossen, daß sich PsaE in der Nähe der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreductase (FNR) befindet (Andersen *et al.*, 1992b). Neben dieser Funktion finden sich häufig Hinweise auf eine Beteiligung der Untereinheit bei der Reduktion der exogenen Elektronentransporter Ferredoxin (Andersen

et al., 1992a; Rousseau *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1994) und Flavodoxin (Xu *et al.*, 1994; Meimberg *et al.*, 1998). Die Wichtigkeit von PsaE für die Bindung von Ferredoxin an den PS I Komplex wird auch durch eine jüngst durchgeführte Untersuchung von van Thor *et al.* (van Thor *et al.*, 1999) bestätigt. Die Autoren konnten zeigen, daß in *Synechocystis* PCC6803 Mutanten, denen PsaE fehlt, dieser Verlust durch eine um Größenordnungen erhöhte Ferredoxinkonzentration ausgeglichen wird. Eine weitere Rolle scheint PsaE auch beim zyklischen Elektronentransfer zu spielen (Zhao *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1993).

8.4 Die Bindungstasche des Elektronentransportproteins Ferredoxin

Nachdem ein Elektron von den Kofaktoren des ETS von der lumenalen Seite der Membran zur stromalen Seite transportiert wurde, wird es dort vom terminalen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_B auf ein lösliches $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ -Cluster Ferredoxin übertragen. Bei diesem Protein handelt es sich um ein kleines (10 kDa) Protein, das aus einer Vielzahl saurer Aminosäuren besteht. Konsequenterweise konnten Hervás *et al.* (Hervás *et al.*, 1992) zeigen, daß mit zunehmender Ionenstärke der umgebenden Lösung die Reduktionsrate von Ferredoxin absinkt, woraus die Autoren folgerten, daß die Wechselwirkungen zwischen Ferredoxin und dem PS I Komplex vorwiegend elektrostatischer Natur seien. Der aus PsaC, PsaD und PsaE gebildete stromale Grat formt vermutlich die positiv geladene Bindungstasche für das Ferredoxin (Fromme *et al.*, 1994; Lelong *et al.*, 1996). Wie bereits bei der Beschreibung der einzelnen stromalen Untereinheiten erwähnt, reichen einige basische Aminosäuren dieser Untereinheiten in die Bindungstasche. Diese Aminosäuren sind in Abbildung 8.11 gelb hervorgehoben. Es handelt sich dabei um die Aminosäuren Arginin C18, Lysin C34, Arginin E3 und E39, sowie die Lysine D76, D104, D107, und Arginine D73, D75, A40 und A36.

Für einige dieser Aminosäuren gibt es Hinweise, daß sie an der Bindung von Ferredoxin oder Flavodoxin beteiligt sind. Verschiedene Mutationen von Lysin C34, das sich an der Spitze der Insertion in PsaC gegenüber bakteriellen Ferredoxinen befindet, zeigen, daß diese Aminosäure die Reduktion von Ferredoxin und Flavodoxin beeinflusst (Fischer *et al.*, 1998; Meimberg *et al.*, 1999). Interessanterweise werden nach einer Mutation von Lys C34 in andere Aminosäuren als in Arginin nicht nur die Quervernetzungsraten zwischen PsaC und Ferredoxin, sondern auch die zwischen Ferredoxin und PsaD und PsaE herabgesetzt (Fischer *et al.*, 1998). Dies kann zum einen bedeuten, daß eine direkte Bindung des mutierten Lysins an das Ferredoxin nicht mehr möglich ist und das Ferredoxin deshalb nicht mehr korrekt in der Bindungstasche sitzt. Auf der anderen Seite wäre es

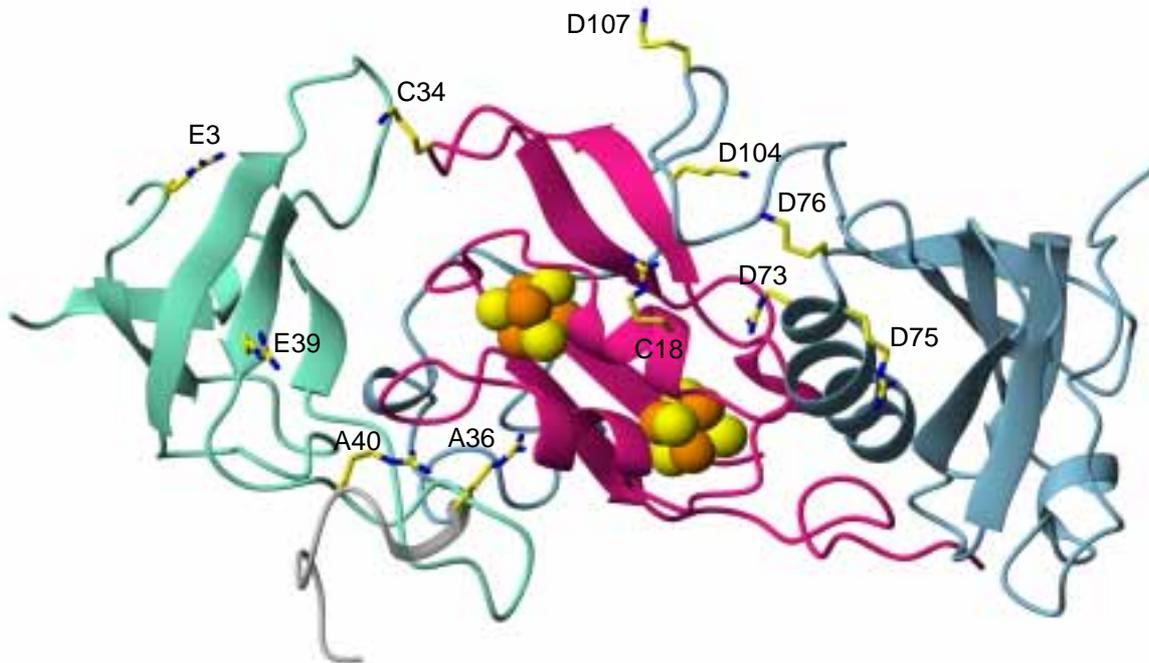


Abbildung 8.11: Die vermutliche Bindungstasche für den löslichen Elektronentransporter Ferredoxin. Dargestellt sind die Untereinheiten PsbA(cyan), PsbB(magenta) und PsbD(hellblau). Blickrichtung parallel zur Membranebene. Die in die vermutete Bindungstasche ragenden basischen Aminosäuren sind gelb eingezeichnet und mit dem Namen der Untereinheit und der Sequenznummer bezeichnet.

auch möglich, daß durch die Unmöglichkeit der Salzbrücke zwischen LysC34 und AspE27 die Faltung der in PsbB inserierten Schlaufe und deren Umgebung durch Mutation gestört und dadurch die Quervernetzung von PsbD und PsbA z. T. verhindert wird. In Abbildung 8.11 erkennt man, daß eine flexible Schlaufe um C34 eventuell die Faltung der „Klammer“ von PsbD, in der sich die Lysine D104 und D107 befinden, stört.

Das zu Lysin D104 analoge Lysin D106 in *Synechocystis* PCC6803 kann mit Glutamat 93 aus Ferredoxin quervernetzt werden (Lelong *et al.*, 1994). Aufgrund von EPR-Messungen schlossen die Autoren, daß der quervernetzte Komplex annähernd dem *in vivo* vorliegenden Komplex entspricht. Ferner konnte später gezeigt werden, daß die Reduktionskinetik im Komplex der des Wildtyps entspricht (Lelong *et al.*, 1996). Interessanterweise hatten Mutationen von Lysin D106 aus *Synechocystis* PCC6803 in neutrale oder saure Aminosäuren keinen oder nur geringen Einfluß auf die Reduktionskinetik von Ferredoxin (Hanley

et al., 1996; Chitnis *et al.*, 1996), weshalb die Autoren folgerten, daß neben Lysin D106 noch weitere basische Aminosäuren an der Ferredoxinbindung beteiligt sein müßten. Dies deckt sich mit Untersuchungen an PsaD in Lösung (Pandini *et al.*, 1999), mit denen gezeigt werden konnte, daß auch die Aspartate von 92-94 im Ferredoxin nicht allein für die Bindung des Ferredoxins an den Komplex verantwortlich sind.

Auch von PsaE ist bekannt, daß die Entfernung dieser Untereinheit aus dem Komplex die Ferredoxinreduktion beeinflusst (s. o.). Genauere Untersuchungen zeigten dabei, daß Arginin E39 einen großen Einfluß auf die Affinität des Ferredoxins zum PS I-Komplex hat (Sétif *et al.*, 1995). Mit Hilfe dieser Erkenntnisse und des Strukturmodells kann versucht werden, eine grobe Positionierung des Ferredoxins in der Bindungstasche vorzunehmen. Dazu wurde das NMR-Strukturmodell des [2Fe-2S]-Cluster Ferredoxins aus *Syn. el.* verwendet (Hatanaka *et al.*, 1997).

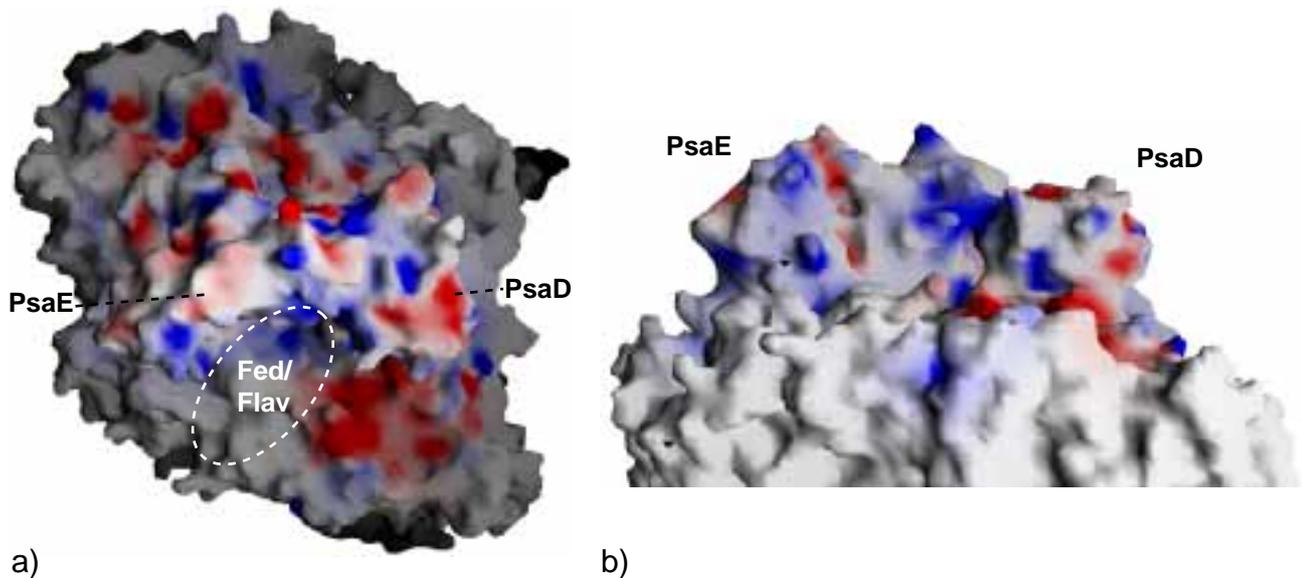


Abbildung 8.12: Van der Waals Oberfläche des Proteinkomplexes, eingefärbt gemäß des Potentials auf einer Skala von -1 (rot) bis +1 (blau). a) Blick entlang der Membrannormalen, der stromale Grat ist hell hervorgehoben. b) Blickrichtung um 90° gedreht zu a). Links befindet sich jeweils die Untereinheit PsaE, rechts PsaD. Die mögliche Ferredoxin/Flavodoxin Bindungstasche ist durch eine Ellipse markiert.

Abbildung 8.12 a zeigt das elektrostatische Potential an der stromalen Oberfläche. Man erkennt, daß sich an der stromalen Oberfläche von PsaA vor Untereinheit PsaD eine große negativ geladene Region befindet. Deshalb ist es unwahrscheinlich, daß das ebenfalls sehr negativ geladene Ferredoxin sich oberhalb dieser Region befindet. Dadurch bleibt nur noch der durch eine Ellipse markierte Bereich vor PsaE, um das Ferredoxin zu positionieren. Auf der stromalen Oberfläche befinden sich dort im wesentlichen positiv geladene

Reste. Diese Ausrichtung entspricht qualitativ der in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen gefundenen Ausrichtung von Ferredoxin/Flavodoxin (Lelong *et al.*, 1996; Mühlhoff *et al.*, 1996). Mit dieser Anordnung ist es möglich, viele der negativ geladenen Aminosäuren in Ferredoxin in der Nähe der oben erwähnten positiv geladenen Aminosäuren zu positionieren. Dieses Modell darf allerdings nur qualitativ gesehen werden, da die genaue Position einiger Aminosäuren in PS I nicht bestimmt werden konnte (Fehlordnung). Desweiteren können diese Aminosäuren in der Kristallstruktur in einer anderen Konformation als im Ferredoxin-Komplex vorliegen.

Zur Modellierung wurden zunächst das Aspartat 93 des Ferredoxins und das Lysin D104 nahe beieinander positioniert. Davon ausgehend wurde das Ferredoxin leicht rotiert und translatiert, bis allen positiv geladenen Aminosäuren des PS I eine oder mehrere negativ geladene Aminosäuren des Ferredoxins zugeordnet werden konnten.

Dadurch wird das Ferredoxin zunächst so orientiert, daß die Lysine 4, 87, 51 und 72 zum Stroma weisen (von der Bindungstasche weg). Da sich der [2Fe2S]-Cluster auf der gegenüberliegenden Seite des Ferredoxins befindet, liegt dieser nahe der PS I Oberfläche. Auf diese Weise wird der [2Fe2S]-Cluster in einem Abstand von ca. 12-15 Å zum terminalen Cluster F_B positioniert. Demnach beträgt die optimale Transferrate nach Gleichung 9.11 $6,3 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ bis $1,0 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$. Nach (Setif & Bottin, 1994) läßt sich die Rate für den Elektronentransfer von F_B zum Ferredoxin zu $1,4 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ bestimmen. Damit wäre die modellierte Orientierung des Ferredoxins auch zur gemessenen Kinetik dieses Elektronentransferschritts kompatibel.

Tabelle 8.6: Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Aminosäuren der vermutlichen Ferredoxinbindungstasche des PS I und Ferredoxin. Auf die Angabe von Abständen wurde verzichtet, da diese mit großen Unsicherheiten behaftet sind. Angaben in Klammern deuten auf entferntere Aminosäuren hin, die sich eventuell bei präziserer Modellierung nahe kommen könnten.

Bindungstasche	Ferredoxin
Arg A36	(Asp 61)
Arg A40	(Asp 27, Glu 23, Glu31)
Lys C34	Asp 11, Asp 35
Arg D76, (D73)	Asp 66, Asp 68, (Asp 67)
Lys D104	Glu 93
Lys D107	Glu 97
Arg E39	(Asp 27), Glu 30, Glu 31

In Tabelle 8.6 sind die in der Nähe der positiv geladenen Aminosäuren der Bindungstasche gelegenen negativ geladenen Aminosäuren des Ferredoxins aufgelistet. Man erkennt, daß sich in der Nähe der meistens positiv geladenen Reste der Bindungstasche negativ geladene Reste des Ferredoxins befinden. Lediglich in der Umgebung zu Arg E3 und C18 finden sich nur sehr entfernt liegende negativ geladene Aminosäuren. In der Nähe zu den beiden Aminosäuren von PsaA befinden sich gleichfalls nur wenige negative geladene Aminosäuren von Ferredoxin. In Abbildung 8.12 b ist rechts neben den beiden Argininen von PsaE ein Bereich negativen Potentials erkennbar. Dieser kommt eventuell für eine Wechselwirkung mit Arg 41 des Ferredoxins in Betracht.

Abschließend sei nochmals betont, daß es sich bei den obigen Ausführungen lediglich um eine Abschätzung der Bindungsverhältnisse handelt. Genaueres kann nur mittels aufwendiger „Docking“-Studien bestimmt werden. Die Nachbarschaftsbeziehungen können als Grundlagen für Mutageneseexperimente dienen, solange weder eine genaue Simulation noch eine erfolgreiche Strukturanalyse von mit Ferredoxin kokristallisiertem PS I vorhanden ist.

