

9 Das Elektronentransfersystem

9.1 Einleitung

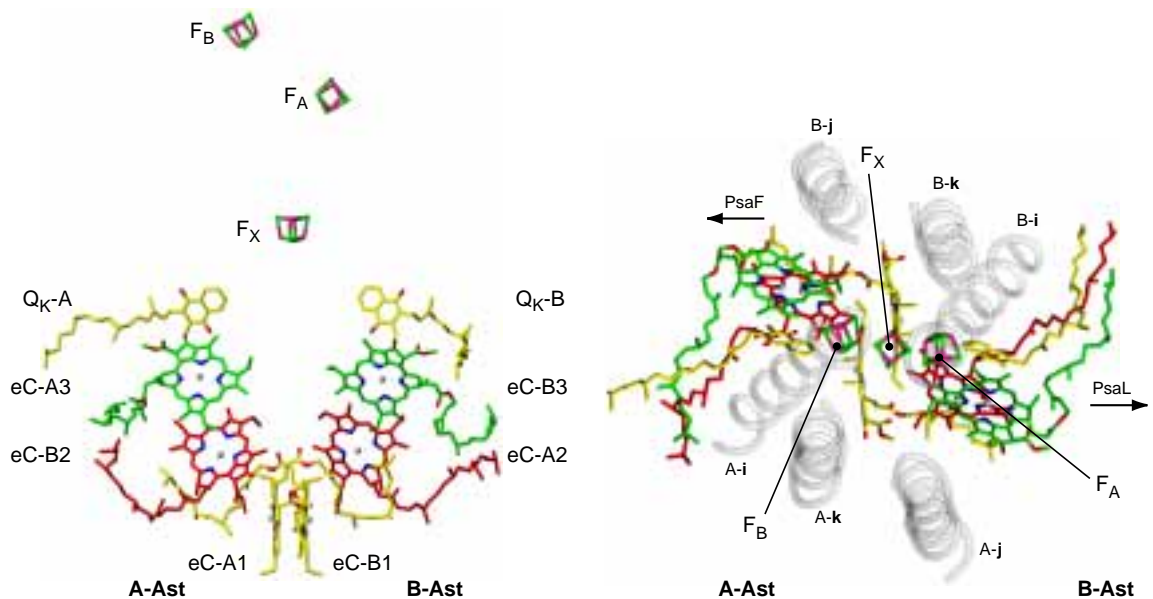


Abbildung 9.1: Die Kofaktoren, die dem ETS zugerechnet werden. (a) Seitenansicht von PsaA ausgehend in Richtung von PsaB und (b) Ansicht von der stromalen Seite. Die Chlorophylle eC-A/B 1 sind gelb, eC-B/A 2 rot und eC-A/B 3 grün dargestellt.

Den Kern des PS I bildet das Elektronentransfersystem (ETS). Das ETS besteht aus elf Kofaktoren, die nach Anregung des primären Donors P700 die transmembrane Ladungstrennung im PS I durchführen (s.a. Abschnitt 1.1). Dieser Prozeß wird durch ein gut ausbalanciertes Zusammenspiel von Potentialdifferenzen zwischen den Kofaktoren und den Kinetiken der Elektronentransferreaktionen ermöglicht.

Die physikochemischen Eigenschaften der Kofaktoren werden nicht nur durch deren chemische Natur bestimmt, sondern auch in großem Maße durch die Proteinumgebung. Aufgrund der Kenntnis der Strukturen der PbrZ (Deisenhofer *et al.*, 1985; Deisenhofer *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1987; Ermler *et al.*, 1994) sind einige dieser Einflüsse in Purpurbakterien genau untersucht worden (Woodbury & Allen, 1995). Auch über das PS I aus *Syn. el.* liegt eine große Anzahl spektroskopischer (Brettel, 1997; Setif, 1992) und biochemischer Daten vor. Deshalb soll in folgendem Kapitel der Versuch unternommen werden, das neu erarbeitete Strukturmodell mit diesen Daten zu korrelieren.

Mit den bisherigen Strukturmodellen des PS I (Klukas *et al.*, 1999b; Schubert *et al.*, 1997) war eine Korrelation mit den experimentellen Ergebnissen im Detail nicht möglich, denn zum damaligen Zeitpunkt lagen nur grobe geometrische Daten vor, d. h. die genauen Orientierungen der Kofaktoren waren noch unbekannt. Außerdem konnten aufgrund der

fehlenden Modellierung der Aminosäureseitenketten die Einflüsse der Umgebung auf die Kofaktoren nicht untersucht werden.

Bezüglich des Vergleichs mit biochemischen und spektroskopischen Daten sei an dieser Stelle noch einmal angemerkt, daß ein prinzipielles Problem darin besteht, die in der Struktur gefundenen Kofaktormoleküle den spektroskopisch nachgewiesenen Kofaktoren zuzuordnen. Dies liegt an der Unmöglichkeit, die spektroskopischen Eigenschaften eines einzelnen strukturellen Elementes direkt zu bestimmen. Im Falle der Kofaktoren des ETS erlauben es die vorliegenden Ergebnisse jedoch, die spektroskopisch gefundenen Kofaktoren mit ziemlicher Sicherheit strukturellen Elementen zuzuordnen.

Die Kofaktoren des ETS werden von einem Teil der Aminosäuren der C-terminalen Domäne von PsaA und PsaB koordiniert. Dabei handelt es sich um die Helices A/B-g bis A/B-k. Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_X wird nicht mehr von den Helices umschlossen, sondern befindet sich knapp oberhalb der Domäne. An der lumenalen Seite wird das P700 von den Helices A/B-ij(2) gegen das Solvens abgeschirmt. Einzelheiten zur Reaktionszentrumsdomäne und zur Sekundärstruktur von PsaA und PsaB in der Nähe des ETS finden sich in Abschnitt 6.1.

Die Gesamtanordnung der elf Kofaktoren des ETS zeigt Abbildung 9.1. Die Chlorophylle und Chinone sind paarweise in zwei Ästen entlang der Membrannormalen angeordnet. Die beiden Kofaktoräste stehen über eine zweizählige Pseudosymmetrieachse untereinander in Beziehung. Als A-Ast wird der Ast bezeichnet, dessen Kofaktoren hauptsächlich von Aminosäuren der Untereinheit PsaA koordiniert werden. Für den B-Ast gilt das Umgekehrte. Bezüglich der Orientierung der beiden Äste sei noch einmal angemerkt, daß der A-Ast auf der der Trimerisierungsdomäne abgewandten Seite (distal) und der B-Ast auf der ihr zugewandten Seite (proximal) liegt.

Eine Analyse der Überlagerung der Kofaktoräste ergibt, daß keine einheitliche Symmetrieachse für alle Kofaktoren existiert. Dies läßt sich qualitativ durch die Abweichung des zentralen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters F_X von der ursprünglichen Lage nach Anwendung des Überlagerungsoperators ermitteln. Durch die Analyse der r.m.s.-Abweichungen verschiedener Überlagerungen der ET-Kofaktoren der beiden Äste läßt sich die Abweichung quantifizieren. Überlagert wurden dazu jeweils die Ringatome des Porphyrinsystems und des Naphthochinons.

Paßt man alle Kofaktoren einander an, so ergibt sich eine r.m.s.-Abweichung von 0,405 Å für alle Kofaktoren. Die so ermittelte Rotationsachse verläuft nicht durch Mitte von F_X , sondern ist seitlich gegen diese versetzt.

Die Aufteilung der anzupassenden Kofaktoren in zwei Gruppen führt zu deutlich besseren Überlagerungen. Überlagert man nur eC-A1 und eC-A2 mit eC-B1 und eC-B2, ergibt sich für das Paar eC-A/B1 eine Abweichung von 0,153 Å und für das Paar eC-A/B2 eine von 0,255 Å. Die r.m.s.-Abweichungen für die Paare eC-A/B3 und Q_K -A/ Q_K -B sind mit 0,897 Å und 1,549 Å wesentlich höher. Die sich aus dieser Überlagerung ergebende Rotationsachse verläuft ebenfalls stark gegen den Mittelpunkt von F_X versetzt. Aufgrund dieser Versetzung verläuft die durch F_X gehende Rotationsachse auf der lumenalen Seite durch das von PsaB koordinierte Chlorophyll-Molekül eC-B1.

Bei gleichzeitiger Überlagerung der beiden stromalen Kofaktorpaare eC-A/B3 und Q_K -A/ Q_K -B ergibt sich das entgegengesetzte Bild. Während eC-A/B1 und eC-A/B2 mit r.m.s.-Werten von 1,725 Å bzw. 1,029 Å stark voneinander abweichen, passen eC-A/B3 und Q_K -A/ Q_K -B mit Abweichungen von 0,129 Å bzw. 0,155 Å gut aufeinander. Betrachtet man auch in diesem Fall die resultierende Rotationsachse, so erkennt man, daß diese Achse annähernd durch die Mitte von F_X und fast parallel zur Membrannormalen verläuft.

Insgesamt gesehen nähern sich die Symmetrieachsen zwischen den Kofaktoren beider Äste in stromaler Richtung immer weiter an die durch die Mitte von F_X verlaufende Achse an.

9.2 Der primäre Donor P700

Die Ladungstrennung wird durch Absorption eines Photons mit einer Energie > 1.77 eV am primären Donor P700 initiiert. Der Name P700 rührt von der Schwächung einer charakteristischen Absorptionsbande bei 700 nm her, die bei der Oxidation von P700 zu $P700^{+\cdot}$ zu beobachten ist.

Zur spektroskopischen Natur des primären Donors liegen verschiedene, z.T. widersprüchliche Ergebnisse vor. Für lange Zeit war umstritten, ob es sich beim P700 um ein Chlorophyll-Monomer oder -Dimer handelt. So zeigten Untersuchungen an $P700^{+\cdot}/P700$ Differenzspektren (Schaffernicht & Junge, 1982) das Verschwinden zweier gegenüber monomerem Chlorophyll verschobener Absorptionsbanden. Diese Banden sind vermutlich auf eine excitonische Kopplung der Chlorophylle zurückzuführen, was auf ein Dimer hindeutet. Ferner sprechen auch Zirkulardichroismusspektren für eine dimere Natur des P700 (Nozawa *et al.*, 1995). Die Belege für den monomeren Charakter des elektronischen Zustands von P700 beruhen vorwiegend auf EPR-Messungen an seinem oxidierten ($P700^{+\cdot}$) und an seinem Triplett (3P700) Zustand. Ausgezeichnete Übersichten über die vielfältige Literatur zu diesem Thema finden sich in Setif (1992) und Brettel (1997).

Daß diese Ergebnisse nicht im Widerspruch zueinander stehen müssen, soll im folgenden dargelegt werden. Treten die excitonischen Wechselwirkungen im angeregten Singulett-Zustand des P700 auf, so ist ein Dimer meßbar. Im P700⁺ könnte die positive Ladung jedoch nur auf einem der beiden Chlorophylle lokalisiert sein und das zweite in seinem neutralen Grundzustand verbleiben, wodurch der monomere Charakter des P700 in den Vordergrund gebracht würde (Schaffernicht & Junge, 1982). In diesem Zusammenhang sind insbesondere die Untersuchungen von H. Käß hervorzuheben (Käß & Lubitz, 1996; Käß *et al.*, 1995) in denen eine deutlich asymmetrische Spindichteverteilung, mit einem Anteil von 85% auf einem Chlorophyll innerhalb des P700⁺, nachgewiesen werden konnte.

Auch über die Natur der beiden Chlorophylle herrschte lange Uneinigkeit. Deuten die P700⁺/P700 Differenzspektren eher auf ein Chl a -Chl a -Dimer hin, so gibt es biochemische Untersuchungen, die das Vorhandensein eines oder zweier Chl a '-Moleküle (dem C13² Epimer von Chl a) pro P700 anzeigen (Watanabe *et al.*, 1987; Maeda *et al.*, 1992).

Im Strukturmodell wird der primäre Donor, wie in den früheren Strukturmodellen, den beiden an der lumenalen Seite oberhalb der Helices A/B-**ij(2)** lokalisierten Chlorophyllen eC-A1 und eC-B1 zugeordnet. Die Anordnung und Koordination der beiden Chlorophylle wird in Abbildung 9.2 gezeigt. Das Chlorophyll eC-A1 wird von Histidin A680 axial ligandiert ($d_{N\epsilon 2-Mg}=2,36 \text{ \AA}$), eC-B1 von Histidin B660 ($d_{N\epsilon 2-Mg}=2,37 \text{ \AA}$). Beide Histidine befinden sich in den Helices A/B-**j**. Die Ringebenen der beiden Chlorophylle sind senkrecht zur Membran und parallel zueinander ausgerichtet, wobei der Ebenenabstand $3,6 \text{ \AA}$ beträgt. Der Winkel zwischen dem Q_Y-Übergangsdipolmoment und der Membrannormalen beträgt für beide Moleküle $63,2^\circ$. Der Abstand zwischen den beiden Mg-Ionen beträgt $6,3 \text{ \AA}$.

In Abbildung 9.2a ist gut zu erkennen, daß die Ringe I und Ringe II der Chlorinsysteme beider Chlorophylle überlappen und so die Wechselwirkung der π -Elektronen beider Chlorophylle möglich wird. Die Nähe der beiden Chlorophylle so wie deren Anordnung läßt somit auf eine dimere Natur des primären Donors schließen, ganz in Analogie zu den spektroskopischen Ergebnissen. Demzufolge muß die unterschiedliche Verteilung der Spindichten auf eine unterschiedliche Umgebung und/oder eine Modifikation eines der beiden Chlorophylle zurückzuführen sein.

In der Tat kann man in der Elektronendichteverteilung zweifelsfrei erkennen, daß es sich bei dem Chlorophyll eC-A1 um ein Chl a '-Molekül handelt, was auch durch die Kontrolle mittels einer sog. „omitmap“ (nicht gezeigt) bestätigt werden konnte. Das Chlorophyll eC-B1 läßt sich hingegen als Chl a modellieren. Allerdings ist der Winkel der Bindung

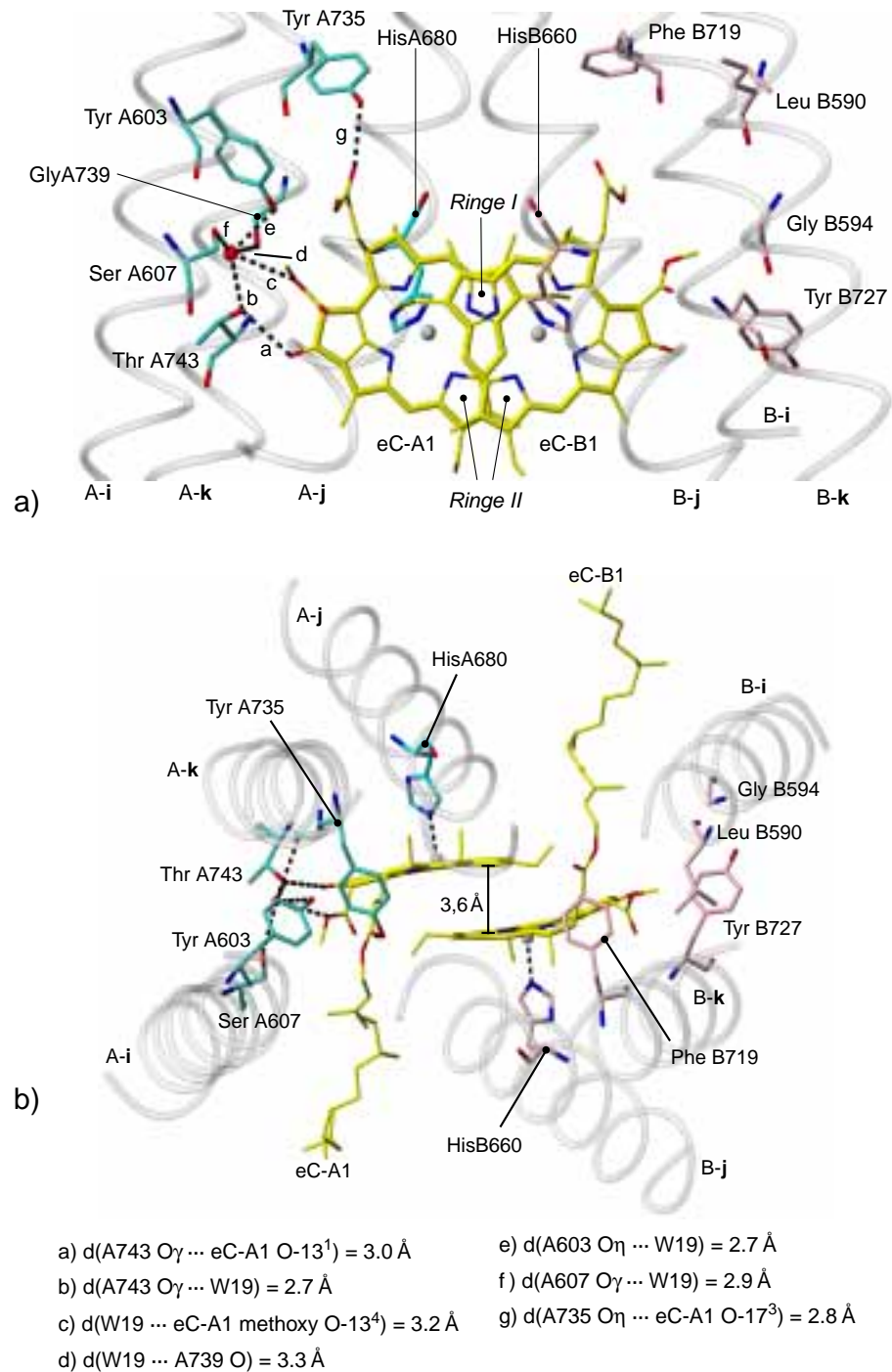


Abbildung 9.2: Blick auf den primären Donor P700 **a)** parallel zur Membranebene und **b)** entlang der Membrannormalen von der stromalen Seite. Transparent dargestellt sind die drei innersten transmembranen Helices von PsaA und PsaB. An Wasserstoffbrückenbindungen beteiligte Aminosäureseitenketten von PsaA sind in cyan dargestellt, die analogen Aminosäuren von PsaB in pink. Die vom Wassermolekül W19 (rote Kugel, links im Bild) ausgehenden möglichen Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze gestrichelte Linie dargestellt und mit den Buchstaben a-f bezeichnet.

zwischen C13² und C13³ zur Porphyrinebene mit ca. 35° kleiner als bei den anderen Chlorophyllen in der Struktur. Deshalb ist nicht vollständig auszuschließen, daß es sich auch bei eC-B1 um ein Chla' handelt. Auch aus sterischen Gründen wäre es nicht auszuschließen, daß an PsaB ein Chla' gebunden wird, da sich die Bindungstaschen von eC-A1 und eC-B1 in dieser Hinsicht nur wenig unterscheiden. Diese Möglichkeit wird durch die Ergebnisse von (Maeda *et al.*, 1992) gestützt, die die Möglichkeit für das Vorhandensein zweier Chla'-Moleküle pro P700 offen lassen. Aufschluß darüber kann nur ein Strukturmodell bei höherer Auflösung liefern.

Analysiert man die Bindungstaschen der beiden Chlorophyll-Epimere, so findet man große Unterschiede hinsichtlich möglicher Wasserstoffbrückenbindungen. Während man drei mögliche Wasserstoffbrückenbindungen hin zum Chlorophyll eC-A1 findet, gibt es keine zum eC-B1. Außerdem befand sich in direkter Nähe zu eC-A1 Differenzelektronendichte, die gut durch ein Wassermolekül (W19) modelliert werden konnte. Ein äquivalentes Wassermolekül findet sich bei eC-B1 nicht. Die strukturelle Bedeutung des Wassermoleküls wird durch das Vorhandensein weiterer möglicher Wasserstoffbrücken, die zu diesem führen, noch zusätzlich unterstützt (s. Abbildung 9.2).

Tabelle 9.1: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen, die zum Chlorophyll eC-A1 und dem Wassermolekül W19 führen. In Klammern ist die Bezeichnung der Wasserstoffbrückenbindungen in Abbildung 9.2 angegeben. Bei den mit * gekennzeichneten Wasserstoffbrücken ist eine eindeutige Donor-Akzeptor-Zuordnung nicht möglich. In diesem Fall ist nur eine der beiden Möglichkeiten angegeben. In der Spalte „Winkel“ ist, sofern möglich, der Winkel zwischen dem Donor, dem Wasserstoff und dem Akzeptor angegeben.

Donor	Akzeptor	Abstand (Å)	Winkel (°)
(a) ThrA743 O γ	eC-A1 O-13 ¹	3,0	178
(b) W19*	ThrA743 O γ	2,7	-
(c) W19	Methoxy O an 13 ⁴ Estergruppe	3,2	-
(d) W19	GlyA739 O	3,3	-
(e) TyrA603* O η	W19	2,7	111
(f) SerA607* O γ	W19	2,9	161
(g) TyrA735 O η	eC-A1 O-17 ³	2,8	106

In Tabelle 9.1 sind die Längen und Winkel aller Wasserstoffbrücken in der Nähe von eC-A1 zusammengefaßt. Von den drei Wasserstoffbrücken, die mit eC-A1 gebildet werden, könnte die des Threonins A743 mit O-13¹ am stärksten sein. Die Bindung ist relativ kurz

und hat mit 177.9° einen nahezu optimalen Winkel. Aus FTIR-Messungen geht außerdem hervor, daß die 13^1 Ketogruppe an einer starken Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sein könnte (Breton *et al.*, 1999). Geht man ferner davon aus, das es sich bei O- 13^1 tatsächlich um eine Ketogruppe handelt (und nicht um die Enolform an Ring V), so kommt für die Wasserstoffbrücke zwischen Threonin A743 und Wassermolekül W19 nur noch W19 als Wasserstoffdonor in Betracht.

Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung wird zwischen Tyrosin A735 und der Ketogruppe an C 17^3 von eC-A1 ausgebildet.

Die dritte Wasserstoffbrücke wird zwischen W19 als Donor und dem Sauerstoff der Methoxygruppe der Estergruppe an C 13^4 als Akzeptor gebildet. Mit $3,2 \text{ \AA}$ ist dies die längste Wasserstoffbrücke zu eC-A1, ferner ist die Methoxygruppe als Partner ungewöhnlich (die um 180° gedrehte Orientierung der Estergruppe kann jedoch aufgrund der Elektronendichteverteilung ausgeschlossen werden). Somit ist die vermutlich schwächste der drei Wasserstoffbrücken die einzige, deren Ausbildung nur mit einem Chl a' - und nicht mit einem Chl a -Molekül möglich ist (die zuerst beschriebenen zwei Wasserstoffbrücken wären hingegen ebenso mit einem Chl a -Molekül möglich). Daher ist es zweifelhaft, ob diese Wasserstoffbrücke allein für die spezifische Bindung eines Chl a' anstelle eines Chl a verantwortlich sein kann.

Neben diesen Wasserstoffbrücken gibt es noch vier weitere, an denen das Wassermolekül W19 beteiligt ist (deren Details sind ebenfalls in Tabelle 9.1 verzeichnet).

Vergleicht man die an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligten Aminosäuren von PsaA mit den analogen in PsaB, so erkennt man, daß keine dieser Aminosäuren zwischen PsaA und PsaB konserviert ist (siehe Abbildung 9.2). Zieht man zusätzlich noch die physikochemischen Eigenschaften der analogen Aminosäuren in Betracht, so stellt man fest, daß mit Ausnahme von TyrB727 (analog zu ThrA743) keine der Aminosäuren in PsaB in der Lage ist, mit ihren Seitenketten Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Die Bindungstaschen der beiden P700 bildenden Chlorophylle sind also bezüglich der Möglichkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, stark unterschiedlich. Es ist jedoch keine eindeutige Präferenz einer der beiden Bindungstaschen für ein bestimmtes Chlorophyll-Epimer zu erkennen. Daher ist es naheliegend, daß die Ursache für die Asymmetrie der Spindichteverteilung (s. o.) in den völlig unterschiedlichen Wasserstoffbrücken der beiden Chlorophylle liegt.

Untersuchungen an PbRZ zeigen, daß mit einer Änderung des Wasserstoffbrückenbindungsmusters (insbesondere zur Ketogruppe an C- 13^1) an den beiden Hälften des „Special

Pairs“ sowohl eine Änderung der Spindichtevertellung innerhalb des Dimers als auch eine Änderung des Redoxpotentials einhergeht (Woodbury & Allen, 1995; Artz *et al.*, 1997). Nach Artz *et al.* (Artz *et al.*, 1997) stellen sich die Verhältnisse wie folgt dar: Die Einführung einer Wasserstoffbrückenbindung an der M-Seite hat eine Erhöhung der Spindichte zugunsten der L Seite des „Special Pairs“ von 2:1 auf 5:1 zur Folge. Durch die Wasserstoffbrücke werden die Orbitale des M-seitigen bChl energetisch abgesenkt. Dadurch besitzt das SOMO des Radikalkations des „Special Pairs“ überwiegend den Charakter des L-seitigen bChl Orbitales. Da man den Spin des Elektrons im SOMO mißt, findet man für dieses eine stark asymmetrische Verteilung innerhalb des Dimers. In Analogie zu diesem Ergebnis kann man davon ausgehen, daß im P700⁺ der Spin (und damit die positive Ladung) hauptsächlich auf dem nicht wasserstoffgebundenen Chlorophyll, also eC-B1 lokalisiert ist. Mutationen der zu HisA680 und HisB660 analogen Histidine in *Chlamydomonas reinhardtii* bestätigen diese Interpretation, da diese nur dann einen deutlichen Einfluß auf die spektroskopischen Eigenschaften des primären Donors zeigen, wenn HisB660 mutiert wird (Redding *et al.*, 1998; Webber *et al.*, 1996; Krabben *et al.*, 2000).

In der Umgebung von eC-A/B1 fallen desweiteren vier Tryptophan-Reste auf, die der pseudozweizähligen Symmetrie gehorchen. Es sind dies die direkt unterhalb von eC-A/B1 lokalisierten Tryptophane A655 und B631, die sich in den lumenalen Helices A/B-**ij**(2) befinden (s. Abschnitt 6.1). Deren Indolringe sind parallel zur Membrannormalen angeordnet, wobei der kürzeste Abstand zwischen deren C δ -Atomen und den C8-Atomen der Porphyrinringe ca. 5,1 Å beträgt. Ob diese Reste jedoch aktiv am Elektronentransfer vom Cytochrom *c*₆ zum P700 teilnehmen, kann nicht entschieden werden.

Oberhalb von eC-A/B1 befinden sich in den Helices A/B-**j** zwei weitere Tryptophane: TrpA683 (oberhalb von eC-A1) und TrpB663 (oberhalb von eC-B1). Die Indolringe der Tryptophane sind mit einem Abstand von ca. 3,8 Å oberhalb der Ringe IV der beiden Chlorophylle positioniert. Die Normalen der Indolringe bilden mit der kristallographischen c-Achse einen Winkel von annähernd 10° aus. Die Stickstoffatome N ϵ sind an keiner Wasserstoffbrücke beteiligt. Ob diese Reste eventuell eine Funktion bei der Orientierung des primären Donors besitzen, kann nur durch Mutationsstudien gezeigt werden.

9.3 Die akzessorischen Chlorophylle

Die beiden Chl *a*-Moleküle eC-A2 und eC-B2 werden in Analogie zum zweiten Paar von Bakteriochlorophyllen in PbrZ (Deisenhofer *et al.*, 1985) akzessorische Chlorophylle genannt (Krauß *et al.*, 1996). Die relativen Positionen und Orientierungen von eC-A2 und

eC-B2 zu den anderen Kofaktoren des ETS unterscheiden sich von den Positionen der akzessorischen Chlorophylle im ETS der P680. Dieser Unterschied deutet darauf hin, daß die Funktionsweise der Chlorophylle in PS I und P680 unterschiedlich ist. Einzelheiten zur möglichen Funktion der beiden Chlorophylle finden sich im nächsten Abschnitt 9.4.

Die Chlorophylle eC-A2 und eC-B2 werden indirekt über zwei Wassermoleküle von den Aminosäuren Asparagin B591 und Asparagin A604 axial ligandiert, die sich in der Mitte der transmembranen Helices B-i und A-i befinden. Die Abstände zwischen den einzelnen Molekülen sind in Abbildung 9.3 eingetragen.

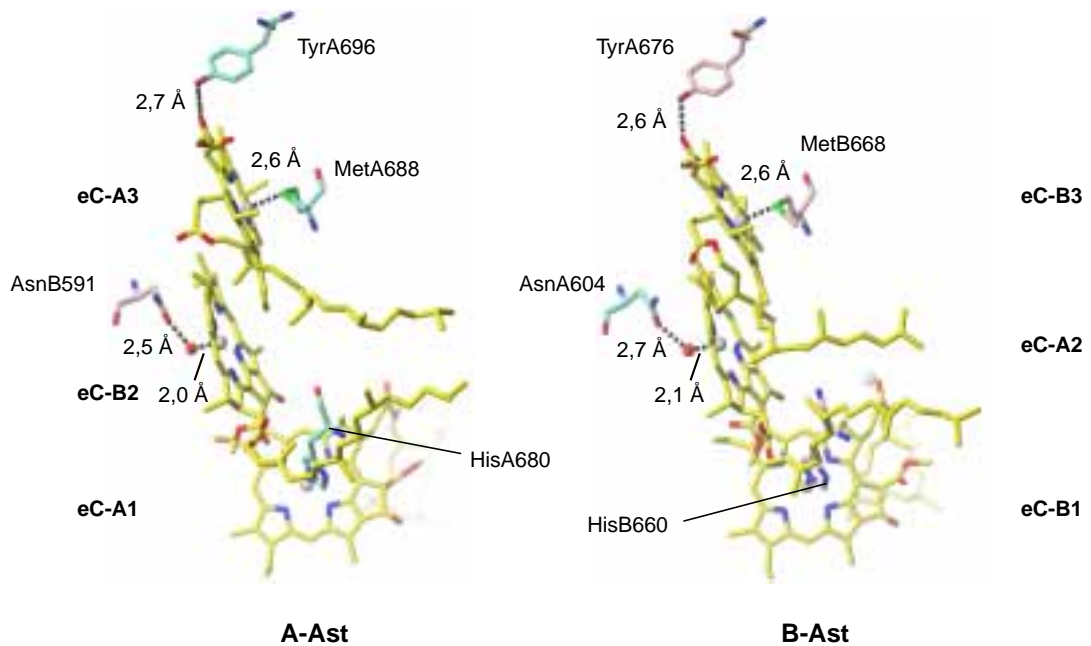


Abbildung 9.3: Die Chlorophyll-Kofaktoren der beiden Äste (links: A-Ast, rechts: B-Ast) des ETS. Die Orientierung ist in beiden Abbildungen willkürlich gewählt, um die Koordination von eC-B2/eC-A2 und eC-A3/eC-B3 hervorzuheben. Zu PsaA gehörige Seitenketten sind cyan gefärbt, solche, die zu PsaB gehören, sind rosa gefärbt. Die das eC-B2 und eC-A2 koordinierenden Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Es ist zu beachten, daß hier der einzige Fall vorliegt, bei dem ein dem A-Ast zugeordneter Kofaktor nicht von PsaA, sondern von PsaB koordiniert wird. Das Gleiche gilt entsprechend umgekehrt für den B-Ast.

Die Chlorinringe der beiden Chlorophylle sind durch eine strenge zweizählige Symmetrieachse ineinander überführbar, die sogar die Krümmung der Ringe mit einbezieht. Die Ringdeformation der Chlorophylle kann bei der gegenwärtigen Auflösung nicht weiter quantifiziert werden. Sie ist bei eC-A2 und eC-B2 jedoch eindeutig ausgeprägter als bei anderen Chlorophyllen innerhalb der Struktur. Eine direkte sterische Ursache hierfür kann

man jedoch nicht erkennen. So laufen die Phytylketten der beiden Chlorophylle eC-B1 und eC-A1 z.T. entlang der Ringebenen von eC-A2 und eC-B2. Aufgrund der Flexibilität der Phytylketten scheint es aber unwahrscheinlich, daß diese Wechselwirkungen die Ursache für die energetisch ungünstige Ringdeformation bilden.

Die Ringebenen von eC-A2 und eC-B2 sind um 29.6° respektive 34.1° gegen die Membrannormale verkippt. Aufgrund der Krümmung der Ringe kann man deren Ringebenen jedoch auf unterschiedliche Weise definieren, weshalb diese Werte nur eine grobe Abschätzung liefern.

Der kürzeste Kantenabstand (für eine Definition des Kantenabstands s. Abschnitt 9.8) von eC-A1 bzw. eC-B1 zu eC-B2 bzw. eC-A2 beträgt $3,1 \text{ \AA}$ bzw. $3,3 \text{ \AA}$, der Abstand zwischen den Zentren beider Chlorophylle $11,7 \text{ \AA}$ bzw. $11,9 \text{ \AA}$. Der horizontale Abstand zwischen den Mg^{2+} -Ionen von eC-B2 und eC-A2 beträgt $18,8 \text{ \AA}$.

9.4 Die primären Akzeptoren A_0

Der reduzierte primäre Akzeptor A_0^- stellt mit einem Redoxpotential von $\sim -1,0 \text{ V}$ für das Redoxpaar A_0/A_0^- (für eine Zusammenfassung s. Brettel (1997)) eines der am stärksten reduzierenden in der Natur vorkommenden Moleküle dar.

Spektroskopischen Ergebnissen zu Folge handelt es sich bei A_0 um ein monomeres Chlorophyll *a* (Bonnerjea & Evans, 1982; Mansfield & Evans, 1985). Das dritte Paar von Chlorophyllen eC-A3/eC-B3 in stromaler Richtung wurde deshalb (wie in den vorangegangenen Strukturmodellen, (Krauß *et al.*, 1996)) diesem Kofaktor zugeordnet (s. Abbildung 9.3). Ob dabei nur eines oder beide Chlorophylle dem spektroskopischen Akzeptor A_0 entsprechen, muß derzeit noch offengelassen werden.

Mit einem Zentrenabstand von $23,6 \text{ \AA}$ zwischen den symmetrieäquivalenten Chlorophyllen bilden diese das am weitesten auseinanderliegende Kofaktorpaar. Die Ringebenen von eC-A3 und eC-B3 sind um $35,7^\circ$ und $39,2^\circ$ gegen die Membrannormale gekippt, so daß die Porphyrinebenen von eC-A3 und eC-B3 annähernd parallel zu den Ringebenen der Chlorophylle eC-B2 respektive eC-A2 angeordnet sind. Der Zentrenabstand zwischen eC-A3 und eC-B2 beträgt $8,8 \text{ \AA}$, der Zentrenabstand zwischen eC-B3 und eC-A2 $8,2 \text{ \AA}$. Der kürzeste Kantenabstand zwischen den Chlorophyllen beträgt in beiden Paaren $3,3 \text{ \AA}$, wobei diese Abstände zwischen Atomen der Ringe I des Porphyrins gemessen werden.

Die parallele Ausrichtung der Ringsysteme sowie die kurzen Abstände deuten auf eine mögliche π - π Wechselwirkung zwischen diesen Paaren von Chlorophyllen hin. Im Paar eC-A3/eC-B2 könnte die π - π Wechselwirkung aufgrund einer günstigeren Orientierung

der beiden Chlorophylle zueinander jedoch ausgeprägter sein als im Paar eC-B3/eC-A2. Dies kann allerdings nicht eindeutig entschieden werden, da sich nur vier Atome pro Chlorophyll in beiden Paaren genügend nahe kommen, um eine entsprechende Wechselwirkung zu ermöglichen. Die Abstände zwischen diesen Atomen sind dabei mit ca. 3,8 Å in den beiden Paaren sehr ähnlich.

Durch diese Wechselwirkung können nicht nur die spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften von eC-A/B-3 beeinflusst werden. Eventuell müssen die Chlorophyllpaare eC-A3/eC-B2 bzw. eC-B3/eC-A2 sogar als Einheit betrachtet werden, was einen großen Einfluß auf die Elektronentransferraten hätte.

Die axialen Liganden für die zentralen Mg^{2+} -Ionen von eC-A3 und eC-B3 bilden die beiden Methionine A688 ($d_{Mg-S}=2,6$ Å) und B668 ($d_{Mg-S}=2,6$ Å). Nach dem Konzept der harten und weichen Säuren und Basen (HSAB-Konzept) ist die bindende Wechselwirkung zwischen dem „weichen“ Schwefel und dem harten Mg^{2+} -Ion jedoch als schwach einzustufen. Deshalb wäre es möglich, eC-A3/eC-B-3 als Chlorophylle ohne axialen Liganden zu betrachten. Die Funktion des Methionins bestünde dann nur in der rein sterischen Abschirmung des Mg^{2+} -Ions von der Umgebung. Auf der anderen Seite der Porphyrinringe von eC-A3 und eC-B3 befinden sich die Tryptophane B588 ($d=3,1$ Å) und A601 ($d=3,3$ Å). Ihre Ringebenen sind ungefähr senkrecht zu der Porphyrinebene der Chlorophylle orientiert. Eine funktionelle Bedeutung der Tryptophane kann aus der Struktur nicht abgeleitet werden.

Beide Chlorophylle sind Partner für eine vermutlich starke Wasserstoffbrückenbindung. So bildet das Sauerstoffatom an C13¹ von eC-A3 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe von Tyrosin A696 ($d=2,7$ Å) aus. Die analoge Bindung von eC-B3 zum Tyrosin B676 weist einen entsprechenden Abstand von $d=2,6$ Å auf.

Anhand des Strukturmodells läßt sich keine offensichtliche Ursache für das niedrige Redoxpotential von A_0 finden. Auffällig ist nur die schwache Wechselwirkung mit Methionin als axialem Liganden, sowie das Vorliegen einer Wasserstoffbrückenbindung. Diese Wasserstoffbrücke sollte jedoch zu einer Erhöhung des Redoxpotentials führen, was dem niedrigen Redoxpotential widersprechen würde. Mutageneseexperimente an den Tyrosinen A696 und B676, sowie den beiden Methioninen könnten Aufschluß über deren Einfluß auf das Redoxpotential von A_0 geben.

9.5 Die sekundären Akzeptoren Q_K -A und Q_K -B

Von allen Kofaktoren des ETS warfen die beiden Phyllochinone (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon, Vitamin K_1) Q_K -A und Q_K -B bisher die meisten Fragen auf. Im Gegensatz zu allen anderen Kofaktoren konnte bei ihnen jedoch eine eindeutige Zuordnung von spektroskopischen Eigenschaften und chemischer Identität getroffen werden. Der spektroskopische Kofaktor A_1 wurde eindeutig als Chinon identifiziert. Für weitere Details bezüglich der spektroskopischen Experimente an den Phyllochinonen sei auf den Übersichtsartikel von Setif (1992) verwiesen.

In der Elektronendichteverteilung bei 4,0 Å Auflösung konnte erstmals ein struktureller Hinweis auf die Existenz zweier Phyllochinone gefunden werden (Klukas *et al.*, 1999b). Allerdings waren die genaue Position und die Orientierung des mutmaßlichen zweiten Chinons mit großen Unsicherheiten behaftet. Mit dem aktuellen Strukturmodell kann nun die Existenz eines zweiten Chinons zweifelsfrei gezeigt werden. Bezüglich der genauen Orientierung und der Position ergeben sich jedoch Unterschiede zum Strukturmodell bei 4,0 Å.

Die beiden Phyllochinone befinden sich in einer in PsaA und PsaB symmetrisch äquivalenten Bindungstasche, die im wesentlichen von der Helix A/B-**jk(1)** und der darauffolgenden Schlaufe bis zur transmembranen Helix A/B-**k** gebildet wird. Dabei liegen in direkter Nachbarschaft zum Chinon die Sequenzabschnitte A689-A701 bzw. B669-B681, sowie der Abschnitt A720-A727 bzw. B704-B711. Neben der sehr ähnlichen Faltung von PsaA und PsaB in diesem Bereich ist auch die Sequenz zwischen beiden Untereinheiten in dieser Region stark konserviert (näheres s. Abschnitt 6.1).

Die Umgebung von Q_K -A und Q_K -B ist in Abbildung 9.4 dargestellt. Die beiden Phyllochinone sind so angeordnet, daß der O1-O4 Verbindungsvektor im Falle von Q_K -A um $36,2^\circ$ und im Falle von Q_K -B um $42,0^\circ$ gegen die Membrannormale verkippt ist. EPR-spektroskopisch konnte hier ein Winkel von $27 \pm 10^\circ$ ermittelt werden (MacMillan *et al.*, 1997). Zum weitergehenden Vergleich mit EPR-Ergebnissen ist ferner noch der Winkel zwischen dem P700- A_1 -Verbindungsvektor und der Membrannormalen von Bedeutung. Aus den vier möglichen Verbindungsvektoren wird hier im Vorgriff auf Abschnitt 9.8 der Vektor zwischen eC-B1 und Q_K -A herausgegriffen. Seine Länge beträgt 25,9 Å, und der Winkel zur Membrannormalen beträgt $27,2^\circ$. Dies stimmt gut mit den durch Puls-EPR (Bittl *et al.*, 1997) und transientser EPR-Spektroskopie (Kamlowski *et al.*, 1998) bestimmten Werten überein.

Ein anderes EPR-Experiment zeigt, daß die O1-O4 und die P700- A_1 Verbindungsachse

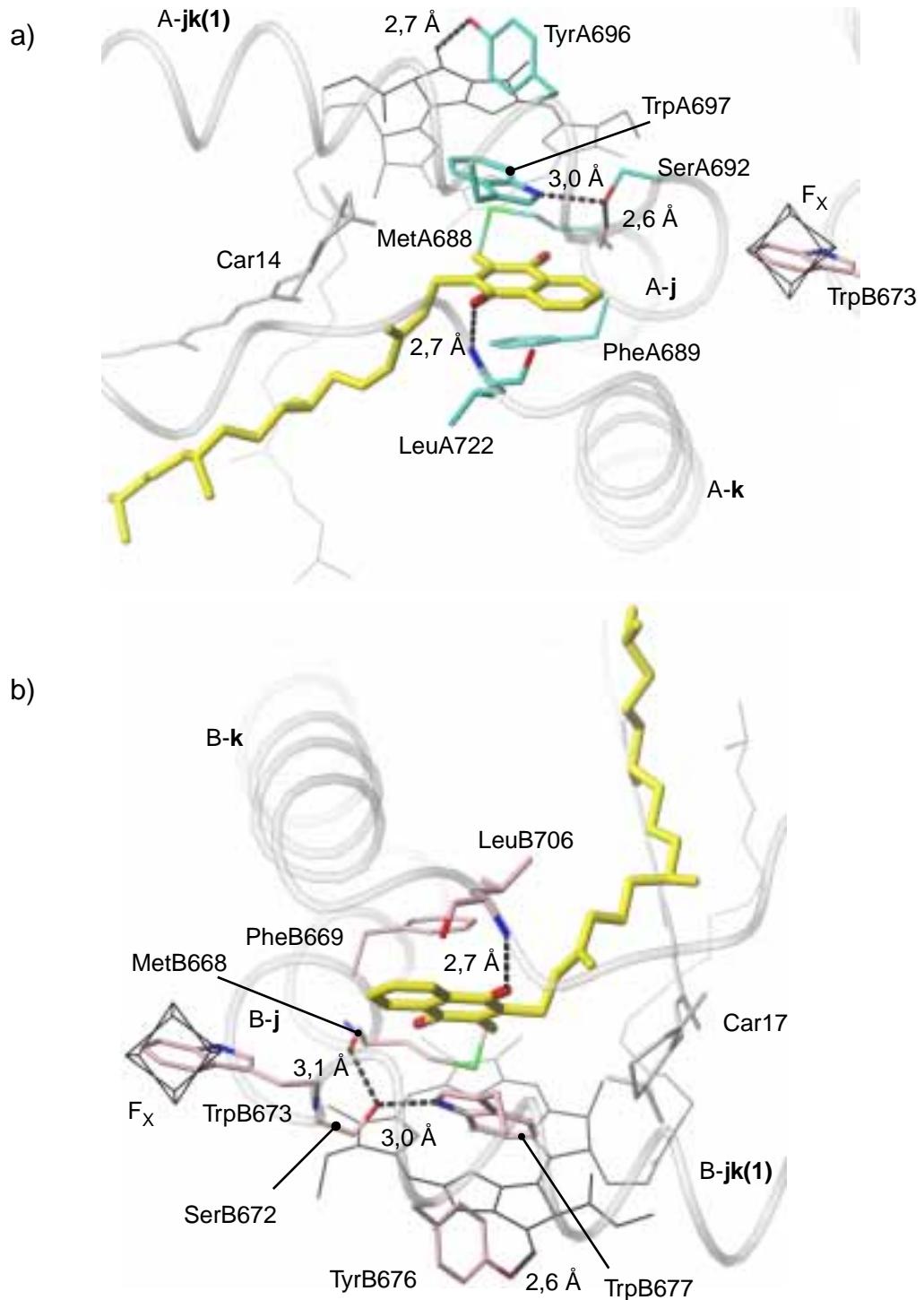


Abbildung 9.4: Die Umgebung von a) Q_K -A und b) Q_K -B. Blickrichtung parallel zur Membrannormalen von der stromalen Seite. Eingezeichnet sind einige wichtige Aminosäuren in der Nähe der beiden Chinone. In schwarz sind der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_X sowie die Chlorophylle eC-A3 bzw. eC-B3 dargestellt. Hellgrau sind die Karotinmoleküle Car14 und Car17 dargestellt, die sich in direkter Nähe zu den Chinonmolekülen befinden. Im Text beschriebene Wasserstoffbrückenbindungen sind als unterbrochene Linien eingezeichnet. Auffällig ist die räumliche Nähe der Kofaktoren und wichtiger Aminosäuren in dieser Region. So sind z. B. die Tyrosine A696 und B676 direkt benachbart zu den beiden Tryptophanen, die mit den Chinonen eine π - π -Stapelung ausbilden.

annähernd parallel ($\pm 10^\circ$) verlaufen (van der Est *et al.*, 1997). Auch dieses Ergebnis ist im Rahmen der Fehlergrenzen mit dem Strukturmodell kompatibel.

Die Chinonebene ist in Q_K-A um $22,5^\circ$ und in Q_K-B um $17,4^\circ$ gegen die Membrannormale gekippt. Der durch EPR-Spektroskopie bestimmte Winkel beträgt $24 \pm 10^\circ$ (MacMillan *et al.*, 1997). Diese Parameter sind noch einmal in Tabelle 9.3 zusammengefaßt.

Der horizontale Abstand der Schwerpunkte zwischen den Sauerstoffatomen der Chinonmoleküle beträgt $21,7 \text{ \AA}$. Von den Chlorophyllen eC-A3 und eC-B3 sind Q_K-A und Q_K-B $6,5 \text{ \AA}$ entfernt (Kantenabstand). Die Abstände der Schwerpunkte zwischen den Sauerstoffatomen der Chinonmoleküle und dem Mg²⁺-Ion von eC-A3 bzw. eC-B3 betragen in beiden Ästen $8,6 \text{ \AA}$.

Die Koordination der beiden Chinone scheint hauptsächlich von zwei Wechselwirkungen bestimmt zu sein: zum einen von einer Wasserstoffbrückenbindung und zum anderen von einer π - π -Stapelung mit einer Tryptophan-Seitenkette. Diese Bindungsmodi sind für die beiden Chinone nahezu identisch. Beide bilden über die Ketogruppe an Position 4, die sich in ortho-Position zur Phytlyseitenkette des Chinons befindet, eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Peptid-NH-Gruppe eines konservierten Leucins aus. Das dem A-Ast zugehörige Chinon Q_K-A bildet diese Wasserstoffbrücke mit LeuA722 ($d_{O-N} = 2,7 \text{ \AA}$, Winkel_{N-H-O} = $153,3^\circ$). Das Chinon Q_K-B des B-Astes bildet diese Wasserstoffbrücke mit LeuB706 ($d_{O-N} = 2,7 \text{ \AA}$, Winkel_{N-H-O} = $150,6^\circ$).

Die π - π -Wechselwirkung wird von Q_K-A mit dem Indolring des Tryptophans A697 gebildet und von Q_K-B mit TrpB677 (siehe Abbildung 9.5). Es überlappen dabei nur der Fünfring des Indolsystems und der die Sauerstoffatome des Chinons tragende Teil des Naphthochinons. Die Ringebenen des Tryptophans und des Chinons bilden im Fall von Q_K-A einen Winkel von $12,4^\circ$, während der Winkel zwischen den Ringebenen von Q_K-B und TrpB677 $10,7^\circ$ beträgt. D. h., die beiden Ringebenen sind nur annähernd parallel zueinander orientiert. Daraus folgt, daß sich kein einheitlicher Abstand zwischen den Ringebenen angeben läßt. Für die Atome des Tryptophans A697 variieren die senkrechten Abstände zur Ringebene des Q_K-A von $3,1 \text{ \AA}$ (N ϵ 2), über $3,2 \text{ \AA}$ (C ϵ 2) über $3,3 \text{ \AA}$ (C δ 1) bis zu $3,5 \text{ \AA}$ (C γ und C δ 2). Die analogen Abstände von TrpB677 zu Q_K-B lauten $3,1 \text{ \AA}$ (N ϵ 2), $3,2 \text{ \AA}$ (C δ 1), $3,4 \text{ \AA}$ (C γ , C ϵ 2) und $3,5 \text{ \AA}$ (C δ 2).

Die geringen Abstände zwischen den Ringatomen erlauben es, diese Wechselwirkung tatsächlich als π - π -Wechselwirkung zu bezeichnen. Interessanterweise wurde bereits 1991 von Iwaki und Itoh (Iwaki & Itoh, 1991) über den Austausch verschiedener Chinone eine π - π -Wechselwirkung mit einem Tryptophan postuliert. Dies konnte durch weitere Modell-

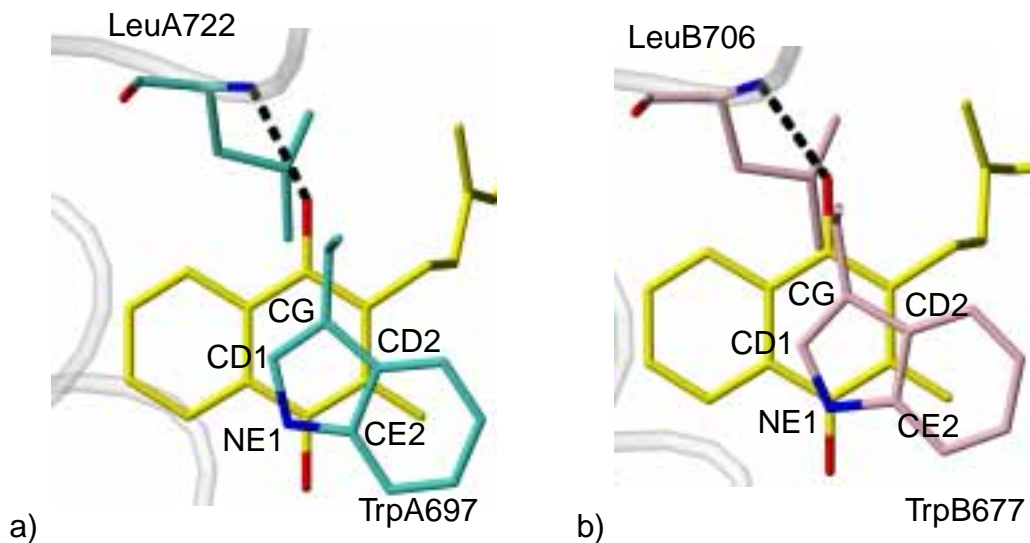


Abbildung 9.5: Die $\pi - \pi$ -Wechselwirkung zwischen a) Q_K-A und TrpA697, sowie b) Q_K-B und TrpB677. Blickrichtung parallel zur Flächennormalen des Chinonrings. Als schwarze unterbrochene Linie ist die Wasserstoffbrückenbindung von O4 des Phyllochinons zum Hauptkettenstickstoff angegeben. Die Atome innerhalb des Fünfrings des Indolsystems sind mit den in der Koordinatendatei verwendeten Namen beschriftet.

rechnungen unterstützt werden (Kamlowski *et al.*, 1998).

ESEEM-Untersuchungen zeigen, daß sich in der Nähe des Chinons zwei Stickstoffatome befinden müssen, die mit dem Chinon wechselwirken (Hanley *et al.*, 1997). Eines davon konnte dem Ne-Stickstoffatom eines Tryptophans zugeordnet werden. Das andere Stickstoffatom wurde dem Stickstoffatom eines Histidins zugeordnet. In der Umgebung des Chinons ist jedoch kein Histidin lokalisiert. Da die Zuordnung des zweiten Stickstoffatoms zu einem Histidin von den Autoren selbst als zweifelhaft beschrieben wird, wäre es auch möglich, daß das gemessene ESEEM-Signal vom Stickstoffatom einer Peptid-NH-Gruppe herrührt.

In der Nähe der beiden Chinone befinden sich zwei Karotinmoleküle. In einem Abstand von ca. 6,6 Å bis 7,6 Å zur Naphtochinon Kopfgruppe von Q_K-A befindet sich eine Kopfgruppe des Karotins Car14. Das Karotin verläuft (in einem flachen Winkel) zur Membran. Seine Kette führt dabei von der stromalen zur lumenalen Seite zur distalen Seite des Komplexes (in der Nähe zu PsaF). In der Nähe des zweiten Chinons Q_K-B befindet sich das Karotin Car17. Dessen Kopfgruppe ist ca. 7,0 Å bis 7,8 Å vom Ring des Chinons entfernt. Das Molekül verläuft dabei in einem steilen Winkel gegen die Membran zur lumenalen Seite. Die Nähe von Karotinen zu den Phyllochinonen konnte auch bei spektroskopischen Untersuchungen gefunden werden (Joliot & Joliot, 1999). Die durch die reduzierten Chino-

ne induzierte elektrochrome Verschiebung der Karotine scheint jedoch für beide Chinone unterschiedlich zu sein (K. Redding, persönliche Mitteilung). Dies ist wahrscheinlich auf die oben beschriebene unterschiedliche Anordnung der beiden Karotine zurückzuführen.

Das Redoxpotential des sekundären Akzeptors A_1 in PS I weist große Unterschiede zu den Redoxpotentialen der Chinone in PbRZ und in PS II auf. Während das Redoxpotential in PS I ca. -820 mV beträgt (Iwaki91), liegt es in PbRZ (Q_A) bei ca. -130 mV. Die im Vergleich zu den Typ II Reaktionszentren ungewöhnlich stark reduzierende Wirkung des A_1 in PS I wird auf seine Umgebung und die Bindung an das Proteingerüst zurückgeführt.

In PbRZ findet man neben der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Chinon und einer Peptid-NH-Gruppe noch eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zum Chinon. Sie wird in *Rhodobacter sphaeroides* zwischen dem $N\delta$ -Atom des Histidins M219 und dem Sauerstoffatom O1 des Ubichinons ausgebildet. Anstelle der zweiten Wasserstoffbrücke in PbRZ ausbildenden Histidins M219 befindet sich dort in PS I das Phenylalanin A689/B669 mit einem kürzesten Abstand von 3,5 Å in beiden Ästen. Eine mögliche π - π -Wechselwirkung scheint jedoch aufgrund der ungünstigen geometrischen Anordnung, die keine Stapelung erlaubt, unwahrscheinlich.

Die fehlende zweite Wasserstoffbrückenbindung der Chinone in PS I könnte eine der Ursachen für deren geringeres Redoxpotential sein, weil dadurch eine negative Ladung auf $Q_{K-A/B}$ gegenüber der auf Q_A in PbRZ weniger stabilisiert wäre.

Vergleicht man die Wechselwirkung zwischen Q_A und Tryptophan M250 aus PbRZ auf der einen und die Wechselwirkung zwischen Q_{K-A}/Q_{K-B} mit den Tryptophanen A697/B677 auf der anderen Seite, so stellt man fest, daß die π - π -Wechselwirkung in PbRZ vermutlich schwächer ist als in PS I. Die π -Elektronensysteme beider Ringe überlappen in PbRZ nur in einem sehr geringen Maße. In PS I hingegen erstreckt sich die Überlappung über die Hälfte beider Ringe (siehe Abb. 9.5). Ein Vergleich von EPR-spektroskopischen Messungen deutet ebenfalls auf eine stärkere π - π -Wechselwirkung in PS I hin (Kamrowski *et al.*, 1998). Diese Wechselwirkung kann einen destabilisierenden Einfluß auf das Q_K^- -Radikal haben und damit zur Verringerung (negativer) des Redoxpotentials beitragen (Iwaki & Itoh, 1991).

Am C-terminalen Ende der transmembranen α -Helix A/B-j befindet sich das zwischen PsaA und PsaB konservierte Serin A692 bzw. B672. Die terminalen $O\gamma$ -Sauerstoffatome der beiden Serinseitenketten bilden eine Wasserstoffbrückenbindung mit den $N\epsilon$ -Stickstoffatomen der Tryptophane A697 respektive B677 aus ($d_{O\gamma-N\epsilon} = 3,0$ Å in beiden Ästen). In bakteriellen Reaktionszentren findet man ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zum $N\epsilon$ -

Stickstoffatom des Tryptophans M250, das analog zu Tryptophan A697 bzw. B677 eine π - π -Stapelung mit dem Ubichinon ausbildet. Sie geht hier von der Hydroxylgruppe des Threonins M222 aus.

Sowohl das Threonin M222 als auch die Serine A692 und B672 können in ähnlicher Weise eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoffatom der Peptid-Keto-Gruppe einer weiteren Aminosäure ausbilden, die sich in der Sequenz vier Aminosäuren N-terminal von ihrer Position befindet. So bildet Serin A692 eine Wasserstoffbrücke mit Methionin A688 ($d=2,6 \text{ \AA}$) und Serin B672 eine Wasserstoffbrücke mit Methionin B668 ($d=3,1 \text{ \AA}$) aus. Interessanterweise handelt es sich beim Wasserstoffbrückenbindungspartner von Threonin M222 ebenfalls um ein Methionin (M218). Es sei an dieser Stelle nochmal darauf hingewiesen, daß die beiden Methionine in PS I den axialen Liganden für die Chlorophylle eC-A3 und eC-B3 bilden, das Methionin in *Rhodobacter sphaeroides* jedoch kein Ligand für einen Kofaktor ist. Ein Blick auf die Position der oben beschriebenen Aminosäuren in der Proteinsequenz zeigt, daß das Threonin M222 und Tryptophan M250 28 Aminosäuren auseinander liegen, während der Abstand zwischen den funktionell identischen Aminosäuren Serin A692/B672 und Tryptophan A697/B677 in PS I jedoch nur fünf Aminosäuren beträgt. Da die Bindungstaschen für die Chinone in PbrZ und PS I ähnlich sind, scheint als Folge dieses Unterschieds der Verlauf der transmembranen Helices in der Nähe der Bindungstaschen in PbrZ und PS I anders zu sein.

Generell wird für die Bindungstasche der Chinone eine unpolare Umgebung erwartet, da diese zu einer weiteren Verringerung des Redoxpotentials beitragen könnte. Vergleicht man die Aminosäurereste der Bindungstasche aus PbrZ mit den entsprechenden aus PS I, so findet man nur geringe Unterschiede die physikochemischen Eigenschaften betreffend. In beiden Proteinen sind die Aminosäurereste überwiegend unpolar. Ein Unterschied besteht hinsichtlich des Arginins A694/B674, das stromal vom Chinon gelegen ist. Die analoge Aminosäure in PbrZ ist ebenfalls ein Arginin (M251). Allerdings ist es mit $9,6 \text{ \AA}$ gegenüber $6,3 \text{ \AA}$ (PsaA) und $6,8 \text{ \AA}$ (PsaB) weiter vom Chinon entfernt als in PS I. $11,7 \text{ \AA}$ von Q_K -A entfernt befindet sich das Arginin A720, das in PsaB durch ein ungeladenes Valin ersetzt ist. Dieser Unterschied könnte eine Rolle bei der Diskussion der Aktivität der beiden Kofaktorräste spielen. Im Bezug auf das negative Redoxpotential ist die Nähe dieser Arginine allerdings unvorteilhaft, da deren positive Ladung eine negative Ladung auf den Chinonen stabilisiert und damit des Redoxpotential erhöht.

Die einzigen potentiell negativ geladenen Aminosäuren in der Q_K -Bindungstasche sind die Glutamate A699/A702 und B679/B682. Diese sind mit Abständen von $12,0 \text{ \AA}$ und

mehr allerdings weit vom Chinon entfernt. Dabei können die Reste A699 und B679 geladen vorliegen, da sie in direkter Nachbarschaft zu den Lysininen B556 ($d=3,1 \text{ \AA}$) und B569 ($d=3,5 \text{ \AA}$) liegen. In der Nähe der Aminosäuren A702 und B682 befinden sich keine positiv geladenen Seitenketten, so daß nicht entschieden werden kann, ob diese Seitenketten protoniert vorliegen oder eine negative Ladung tragen.

Wie bereits oben erwähnt, liegt ein Unterschied zwischen PbrZ und PS I in den Sekundärstrukturelementen, die die Chinon-Bindungstasche umgeben. Das Phyllochinon in PS I liegt am C-terminalen Ende der transmembranen Helix A/B-**j**. In PbrZ liegt an dieser Stelle die Helix M/L-**e**, die parallel am Chinon vorbeiführt. In PS I könnte also der negative Dipol, der von der Helix A/B-**j** ausgeht, das Redoxpotential des Q_K zu negativeren Werten hin verschieben. Ob dies jedoch allein ausreicht, um das Potential weit in den negativen Bereich zu verschieben, ist fraglich.

Es muß davon ausgegangen werden, daß ähnlich wie bei $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern beobachtet (Stephens *et al.*, 1996), die Verteilung aller Dipole in der Umgebung des Chinons von entscheidender Bedeutung ist. Der unterschiedliche Verlauf der Hauptketten an der Chinon-Bindungsstelle in PbrZ und *Syn. el.* könnte demzufolge eine der Ursachen für die unterschiedlichen Potentiale sein.

Eine Solvenz Zugänglichkeit der beiden Q_K Bindungstaschen kann weitgehend ausgeschlossen werden, da beide Chinone durch das Protein und andere Kofaktoren vom Solvens abgeschirmt werden. Allerdings konnten zwischen den Chinonen und dem nachfolgenden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_X in beiden Ästen in Anzahl und Position unterschiedliche Wassermoleküle modelliert werden. Mit Ausnahme der beiden die akzessorischen Chlorophylle koordinierenden Wassermoleküle sind dies die einzigen vollständig von Protein umgebenen Wassermoleküle. Diese Region ist in Abbildung 9.6 dargestellt. Die Position der Wassermoleküle kann als sicher gelten, da sie sowohl untereinander als auch mit dem Protein über ein Netzwerk möglicher Wasserstoffbrücken verknüpft sind (s. Abbildung 9.6).

Zwischen Q_K -A und F_X befinden sich fünf, zwischen Q_K -B und F_X sechs Wassermoleküle. Die Wassermoleküle zwischen Q_K -A und F_X sind linear angeordnet. Im Gegensatz dazu sind fünf der sechs Wassermoleküle zwischen Q_K -B und F_X in Form eines Fünfecks angeordnet. Dies ist ein häufig in Proteinen anzutreffendes strukturelles Motiv. Die nächsten Abstände der Wassermoleküle zu Q_K -A betragen $3,5 \text{ \AA}$ bis $3,7 \text{ \AA}$, die nächsten Abstände zu Q_K -B betragen $3,8 \text{ \AA}$ bis $3,9 \text{ \AA}$. Die beiden Chinone sind mit der hydrophoben Hälfte des Chinonrings zu den Wassermolekülen hin ausgerichtet, so daß von diesen

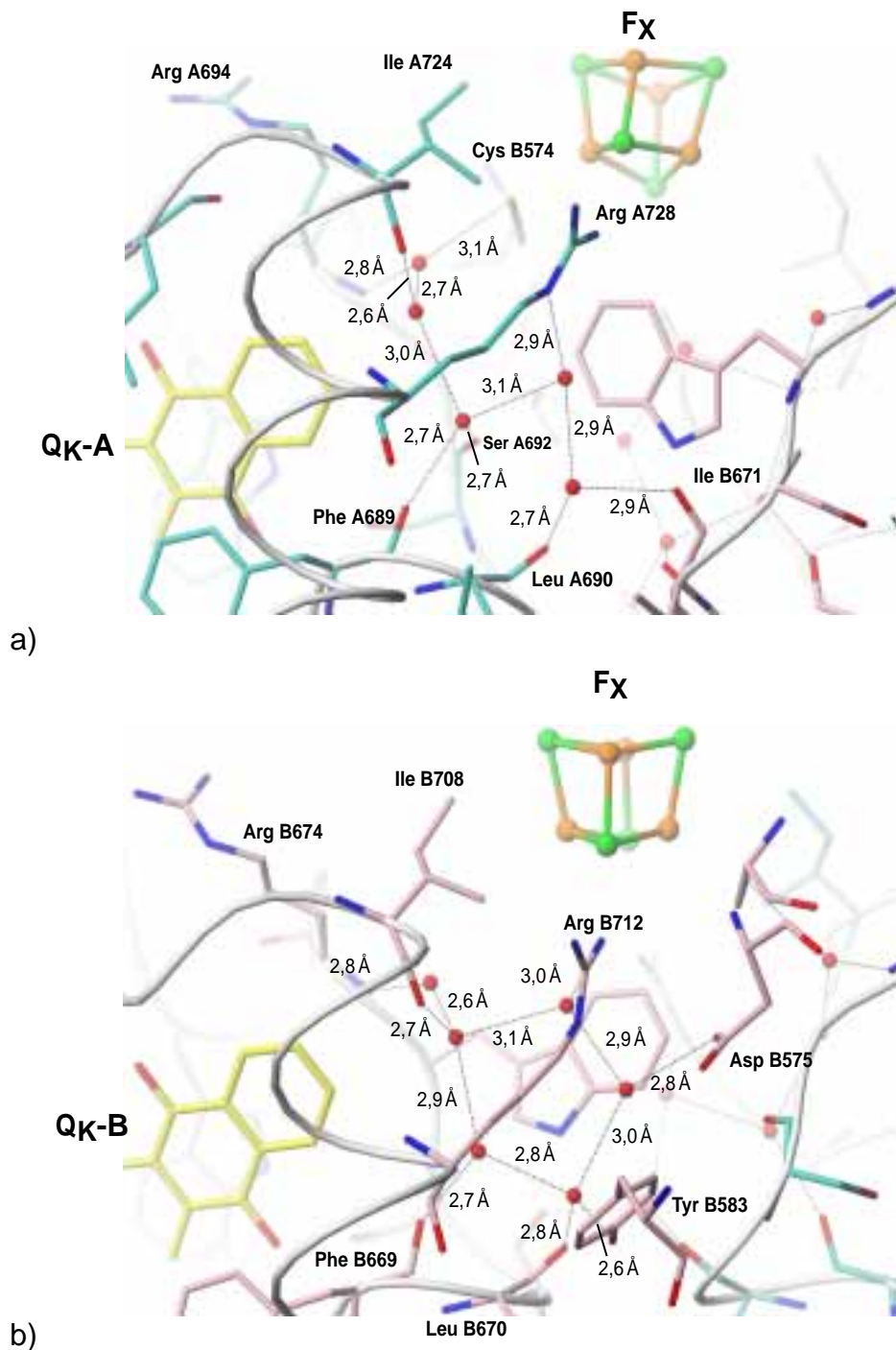


Abbildung 9.6: Die Wassermoleküle zwischen den beiden Phyllochinonen und F_X . Eingezeichnet sind alle möglichen Wasserstoffbrückenbindungen, an denen diese Wassermoleküle beteiligt sein können. a) Die Region zwischen Q_K -A und F_X . Die fünf Wassermoleküle sind in etwa linear angeordnet. b) Die Region zwischen Q_K -B und F_X . Auffällig ist, daß sich dort sechs Wassermoleküle befinden, von denen fünf in Form eines Fünfecks angeordnet sind.

zu den Chinonen keine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden kann. Ob die Wassermoleküle einen Einfluß auf das Redoxpotential der Chinone haben, kann nicht geklärt werden. Über die Auswirkungen auf die Elektronentransferschritte, die $Q_K\text{-A}/Q_K\text{-B}$ involvieren, wird in Abschnitt 9.8 näher eingegangen.

Im Hinblick auf den Einfluß von Ladungen auf das Redoxpotential der Chinone scheint noch ein weiteres strukturelles Merkmal von Bedeutung. In einem Abstand von ca. 11,0 Å zu $Q_K\text{-A}$ und $Q_K\text{-B}$ befindet sich jeweils ein Lipidmolekül. Während es sich beim Lipid in der Nähe von $Q_K\text{-B}$ um ein ungeladenes MGDG-Molekül handelt, befindet sich in der Nähe von $Q_K\text{-A}$ ein negativ geladenes PG-Molekül. Wie bei der Analyse potentiell geladener Aminosäuren in der Nähe der Chinone, so kann auch in diesem Fall nicht allein anhand der Struktur entschieden werden, ob der Einfluß der negativen Ladung im Abstand von 11,0 Å ausreicht, um das Redoxpotential des Chinons zu beeinflussen. Die durch die unterschiedlichen Lipide zusätzlich eingeführte Asymmetrie zwischen dem A-Ast und dem B-Ast ist jedoch ein weiteres Indiz für eine Asymmetrie im Elektronentransfer über die beiden Äste des ETS.

9.6 Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_X

Im Zentrum zwischen den beiden Untereinheiten PsaA und PsaB befindet sich ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster. Dieser wird wie in den vorangegangenen Strukturmodellen dem spektroskopischen Eisen-Schwefel-Cluster F_X zugeordnet, der sich durch ein ungewöhnlich geringes Redoxpotential von $\sim -0.7\text{ V}$ auszeichnet (Chamorovski & Cammack, 1982).

Er besteht aus zwei ineinandergestellten Tetraedern von Eisenatomen und Schwefelatomen. Die Abstände zwischen den Eisenatomen wurden mit $d_{\text{Fe-Fe}}=2,7\text{ Å}$ und die zwischen den Schwefelatomen mit $d_{\text{S-S}}=3,6\text{ Å}$ modelliert, so das sich insgesamt eine verzerrt würfelförmige Struktur des Clusters ergibt. Mit diesen Parametern läßt sich die Elektronendichteverteilung gut erklären. Abweichungen von dieser idealen Geometrie, die das ungewöhnliche Redoxpotential des Clusters erklären könnten, können jedoch bei der gegenwärtigen Auflösung nicht ermittelt werden.

An seiner ungefähren Lage auf der pseudozweizähligen Rotationsachse hat sich gegenüber dem Strukturmodell bei 4,0 Å (Klukas *et al.*, 1999a) nichts geändert. Der Würfel ist so orientiert, daß die Normale der stromalen und lumenalen Seitenfläche parallel zur Membrannormalen ausgerichtet ist. EPR-Untersuchungen zeigen, daß die magnetische x-Achse von F_X^- senkrecht zur Thylakoidmembran orientiert ist (Guigliarelli *et al.*, 1993).

Zusammen mit den Modellstudien von Gloux *et al.* (1993) ergibt sich daraus, daß in

F_X die Tensor-Hauptachsen parallel zu den Flächennormalen des Würfels orientiert sein müssen, was im Einklang mit dem Strukturmodell steht.

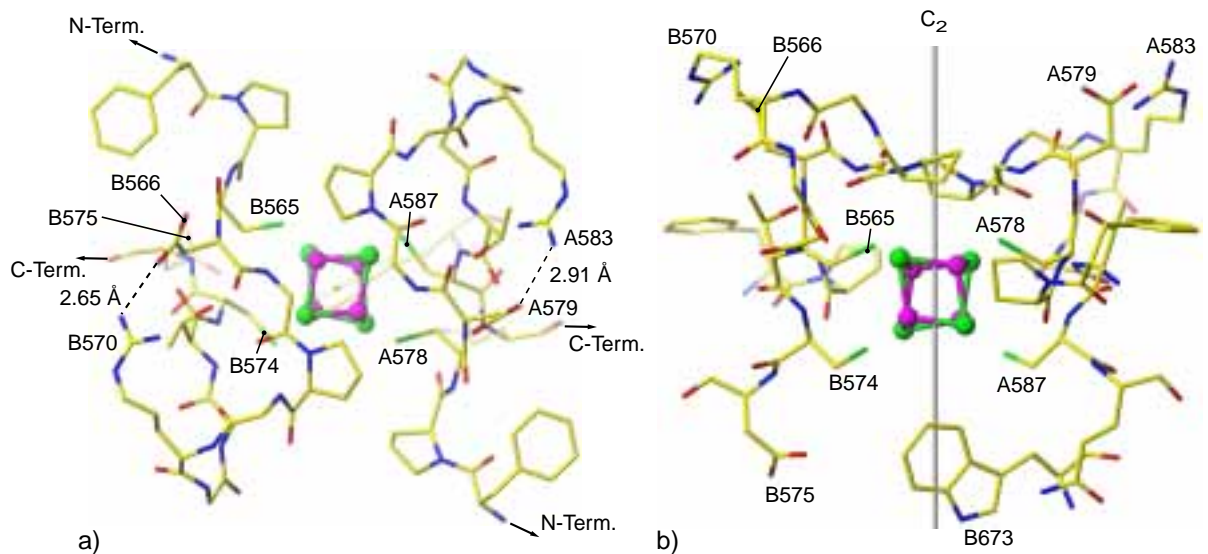


Abbildung 9.7: Der Fe_4S_4 -Cluster F_X . **a)** Blickrichtung entlang der Membrannormalen. **b)** Blickrichtung um 90° gegen **a)** gedreht. Auf der linken Seite beider Ansichten befindet sich die Aminosäuren von PsaB, auf der rechten Seite die Aminosäuren von PsaA. Eingetragen sind alle wichtigen Aminosäuren in der F_X Bindungstasche.

Die Umgebung von F_X wird von den Schlaufen A/B-**hi** gebildet (s. Abbildung 9.7). Wie bereits aus der Überlagerung von Aminosäuresequenzen abgeleitet (Cantrell & Bryant, 1987) wird der Cluster von den in der Schlaufe befindlichen Cysteinen A578, A587, B565 und B574 koordiniert. Dieser Sequenzabschnitt von A576-A588 bzw. B563-B575, der das F_X Bindungsmotiv bildet, ist zwischen vielen Organismen sowie den Untereinheiten PsaA und PsaB stark konserviert (siehe Abbildung 6.4). Die Faltung des Bindungsmotivs ist in Abschnitt 6.1 detailliert beschrieben.

Die beiden stromalen Eisenatome werden von den Schwefelatomen der Cysteine A578 ($d_{\text{Fe-S}}=2,2 \text{ \AA}$) und B565 ($d_{\text{Fe-S}}=2,3 \text{ \AA}$), die beiden luminalen Eisenatome von den Schwefelatomen der Cysteine A587 ($d_{\text{Fe-S}}=2,4 \text{ \AA}$) und B574 ($d_{\text{Fe-S}}=2,4 \text{ \AA}$) koordiniert. Das ungewöhnliche an dieser Art der Koordination ist, daß nicht eine Untereinheit allein, sondern zwei symmetrieäquivalente Bereiche von zwei verschiedenen Untereinheiten den Cluster koordinieren. Es gibt hierfür nur ein weiteres in der Literatur erwähntes Beispiel (Buckel et al. in Vorbereitung).

Aus den Kristallstrukturen und Untersuchungen an bakteriellen Ferredoxinen ist bekannt, daß die Anzahl und Verteilung der Wasserstoffbrückenbindungen der Schwefela-

tome des Clusters und der koordinierenden Cysteine das Redoxpotential des Clusters beeinflusst (Backes *et al.*, 1991). Einzelheiten zu diesen Einflüssen sind im nächsten Abschnitt über F_A und F_B zu finden.

Für den Cluster F_X stellt sich die Situation der Wasserstoffbrückenbindungen wie folgt dar: für die beiden stromal gelegenen Cysteine A578 und B565 findet man Wasserstoffbrückenbindungen vom γ -Schwefelatom zum Wasserstoffatom der Peptid-NH-Gruppe von Glycin A580 ($d_{S-H}=3,4 \text{ \AA}$) bzw. B567 ($d_{S-H}=3,5 \text{ \AA}$). Dieses Wasserstoffbrückenbindungsmuster $n \rightarrow n+2$ ist ein übliches für Eisenschwefelcluster beobachtetes Muster (s. u.). Dieses Muster wird für die luminalen Cysteine A587 und B574 nicht beobachtet. Stattdessen bilden die γ -Schwefelatome dieser Cysteine Wasserstoffbrücken zu zwei der luminal von F_X gelegenen Wassermoleküle aus.

Die in anderen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern gefundenen Muster von Wasserstoffbrückenbindungen der anorganischen Schwefelatome zu Wasserstoffatomen von Peptid-NH-Gruppen (s. Abschnitt 9.7) fehlen bei F_X gänzlich. Dies wird zum einen durch die besondere Koordination des Clusters und den dadurch gegenüber anderen Clustern veränderten Hauptkettenverlauf hervorgerufen. Auf der anderen Seite befinden sich an Positionen, von denen aus eine Wasserstoffbrückenbindung strukturell möglich wäre mit jeweils einem Prolin (Prolin A581/B568) eine Aminosäure, die über kein Wasserstoffatom am Hauptkettenstickstoffatom verfügt. Die beiden luminal gelegenen anorganischen Schwefelatome des Clusters liegen $3,6 \text{ \AA}$ bzw. $3,8 \text{ \AA}$ entfernt von den $N\eta$ -Atomen der Arginine A728 und B712. Damit ist an dieser Stelle eine Wasserstoffbrückenbindung möglich.

Insgesamt gesehen ist das Wasserstoffbrückenbindungsmuster um F_X unterschiedlich zu dem in $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern anderer Eisen-Schwefel-Proteine. Die geringe Zahl von Wasserstoffbrücken zum Cluster könnte einer der Gründe für das niedrige Potential dieses Clusters darstellen.

Nach Stephens *et al.* (Stephens *et al.*, 1996) ist der alleinige Einfluß der Wasserstoffbrückenbindungen auf das Redoxpotential der Cluster jedoch eher gering. Vielmehr gehen diese zusammen mit der Verteilung der Hauptkettendipole in die Dipolverteilung in der Nähe des Clusters ein. Diese Dipolverteilung ist nach (Stephens *et al.*, 1996) der hauptsächlich das Potential eines Clusters bestimmende Faktor. Da der Hauptkettenverlauf des F_X -Bindungsmotivs stark von den Bindungsmotiven anderer $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster abweicht, kann dieser demnach als Ursache für das ungewöhnlich geringe Potential in Betracht kommen.

Wie in Abschnitt 6.1 beschrieben, finden sich in der Umgebung von F_X viele geladene

Aminosäuren (Abstände zwischen $3,6 \text{ \AA}$ und ca. 9 \AA von F_X). Die Arginine A728 und B712 sind mit Abständen von $3,6 \text{ \AA}$ und $3,8 \text{ \AA}$ in lumenaler Richtung die am nächsten an F_X gelegenen positiv geladenen Reste. Ihre Ladung wird vermutlich von den zwischen PsaA und PsaB konservierten Aspartaten A593 ($d=2,6 \text{ \AA}$) und B580 ($d=2,7 \text{ \AA}$) kompensiert. In PsaB existiert jedoch das nicht konservierte Aspartat B575, welches ebenfalls deprotoniert vorliegen könnte, da es nur $3,8 \text{ \AA}$ von ArgB712 entfernt ist. Es ist mit einem Abstand von $6,0 \text{ \AA}$ die nächste negativ geladene Aminosäure und könnte zur Erniedrigung des Redoxpotentials des Clusters beitragen. Ob alle diese potentiell geladenen Aminosäuren zum ungewöhnlichen Redoxpotential von F_X beitragen, kann jedoch nicht entschieden werden.

Wie in Abschnitt 9.5 beschrieben, befinden sich zwischen den Chinonen beider Äste und F_X einige Wassermoleküle. Das am nächsten an F_X gelegene Wassermolekül innerhalb des A-Astes, also zwischen $Q_K\text{-A}$ und F_X , ist $5,4 \text{ \AA}$ entfernt. Innerhalb des B-Astes beträgt der kürzeste Abstand $4,2 \text{ \AA}$. Eine theoretische Studie zeigte, daß neben der Verteilung der Hauptkettendipole die Dipole von Wassermolekülen in der Nähe von Eisen-Schwefel-Clustern einen nicht zu unterschätzenden Einfluß auf dessen Redoxpotential haben (Jensen *et al.*, 1994). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß eine Ursache für das geringe Redoxpotential des Ferredoxins aus *Azotobacter vinelandii* das Nichtvorhandensein von Wassermolekülen in einem Abstand von $6,0 \text{ \AA}$ um den Schwerpunkt des Clusters ist. Die beiden kürzesten Abstände von Wassermolekülen zum Mittelpunkt von F_X betragen $5,9 \text{ \AA}$ und $6,9 \text{ \AA}$. Somit kann im Rahmen der Genauigkeit des Modells auch für F_X nicht ausgeschlossen werden, daß eine Ursache für das geringe Redoxpotential in den Wassermolekülen liegt.

Luminal von F_X befindet sich ferner noch das Tryptophan B673 (kürzester Abstand $4,1 \text{ \AA}$), dessen äquivalente Aminosäure in PsaA das Glycin A693 ist. Das Tryptophan befindet sich zwischen F_X und $Q_K\text{-B}$, von dem es $5,1 \text{ \AA}$ entfernt liegt und könnte somit ebenfalls eine Rolle in der Diskussion um die Aktivität der Kofaktoräste spielen (siehe Abschnitt 9.8).

9.7 Die terminalen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_A und F_B

Die terminalen Elektronenakzeptoren des PS I bilden die beiden $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster F_A und F_B (für eine Übersicht s. (Brettel, 1997)). Die Redoxpotentiale von F_A und F_B wurden zunächst zu -520 mV (F_A) und -580 mV (F_B) ermittelt (Ke *et al.*, 1973). Neueren Ergebnissen zufolge beträgt das Mittelpunktspotential für die erste Reduktion der beiden Cluster

-440±10 mV und das für die zweite Reduktion -465±10 mV (Schlodder *et al.*, 1998).

Mit einer Vielzahl von Experimenten konnte gezeigt werden, daß die beiden [Fe₄S₄]-Cluster von Untereinheit PsaC koordiniert werden (für eine Übersicht s. (Golbeck, 1999)).

Bei der Interpretation der experimentellen Daten dieser beiden [Fe₄S₄]-Cluster waren vorwiegend zwei Probleme von großem Interesse: zum einen ist die Position der drei [Fe₄S₄]-Cluster innerhalb der Elektronentransfersequenz des ETS umstritten. Die Sequenz F_X →F_B →F_A wäre energetisch günstiger als die Sequenz F_X →F_A →F_B, wobei letztere jedoch durch Mutageneseexperimente unterstützt wird. So zeigen Untersuchungen an Mutanten aus *Synechococcus* sp. PCC6301, in denen die den Cluster F_B koordinierenden Cysteine gegen andere Aminosäuren ausgetauscht wurden, daß F_B essentiell für die Reduktion von Ferredoxin/Flavodoxin ist (Vassiliev *et al.*, 1998; Mamedov *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 1999). Eine detaillierte Auseinandersetzung mit diesem Thema würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Ausgezeichnete Übersichten hierzu finden sich in (Golbeck, 1999; Brettel, 1997). Eng damit verknüpft ist das zweite Problem: die Orientierung von PsaC auf der stromalen Seite des Komplexes. Aufgrund der zweizähligen Pseudosymmetrie der Untereinheit PsaC war es im Rahmen der vorangegangenen Strukturanalysen nicht möglich, diese Untereinheit eindeutig in Bezug auf diese Achse zu positionieren. Deshalb konnte bislang auch noch nicht eindeutig bestimmt werden, ob F_A oder F_B näher an F_X liegt. So wurde mittels EPR-Experimenten und darauf basierenden Modellierungen keine Vorzugsorientierung für PsaC ermittelt und damit ebenfalls keine Entscheidung über die Position von F_A und F_B getroffen (Kamlowski *et al.*, 1997a). Unlängst durchgeführte spektroskopische Untersuchungen (Lakshmi *et al.*, 1999) sowie die o.g. Untersuchungen des Elektronentransfers von F_B zu Ferredoxin (Vassiliev *et al.*, 1998; Mamedov *et al.*, 1998) deuten darauf hin, daß sich F_A näher an F_X befindet als F_B, wodurch eine ungefähre Orientierung von PsaC ermöglicht wird. Im letzten Röntgenstrukturmodell wurde PsaC - im Gegensatz zu den vorherigen Modellen - so orientiert, daß F_A der näher an F_X gelegene Cluster ist (Klukas *et al.*, 1999a).

Von den beiden [Fe₄S₄]-Clustern wird der näher an F_X gelegene durch die Cysteine C20, C47, C50 und C53 koordiniert; der entfernt liegende Cluster wird von den Cysteinen C10, C13, C16, C57 koordiniert (s. Abbildung 9.8 und Abschnitt 8.1). Mittels Mutationsstudien an *Synechococcus* sp. PCC6301 wurde bereits 1992 gezeigt (Zhao *et al.*, 1992), daß der Cluster F_A von den Aminosäuren C20, C47, C50 und C53 koordiniert wird und F_B von den Aminosäuren C10, C13, C16, C57 (Numerierung angepaßt an *Synechococcus* *el.*). Damit wird eindeutig gezeigt, daß es sich beim F_X-nahen Cluster um F_A und beim ent-

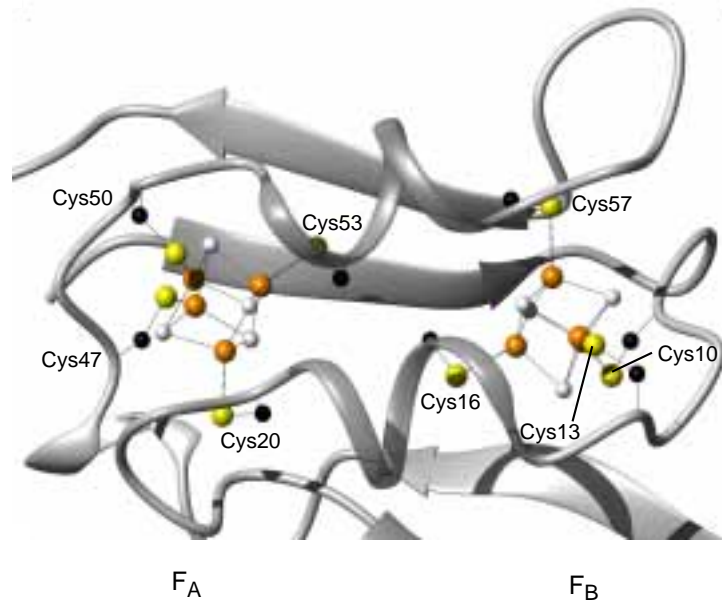


Abbildung 9.8: Die Koordination der beiden Fe_4S_4 -Cluster F_A (links) und F_B (rechts) von den Aminosäuren der Untereinheit PsaC. Die Schwefelatome der koordinierenden Cysteine sind gelb, die der Eisenschwefel-Cluster grau eingefärbt. Die Eisenatome sind orange dargestellt.

fernt liegenden um F_B handelt.

Der Mittelpunktsabstand zwischen F_A und F_X beträgt $15,0 \text{ \AA}$, der Abstand zwischen F_B und F_X beträgt $22,0 \text{ \AA}$. Die Mittelpunkte der beiden Cluster F_A und F_B sind $12,3 \text{ \AA}$ voneinander entfernt. Die kürzesten Kantenabstände zwischen F_X und F_A bzw. F_B betragen $11,6 \text{ \AA}$ respektive $18,8 \text{ \AA}$, der kürzeste Kantenabstand zwischen F_A und F_B beträgt $9,5 \text{ \AA}$.

Um eine Orientierung der beiden Eisenschwefelcluster anzugeben, bietet es sich an, die Winkel der Flächennormalen des Clusters zur kristallographischen c -Achse zu bestimmen und diese zu den magnetischen Tensorhauptachsen in Relation zu setzen. Neben der für F_X ermittelten Orientierung der magnetischen Achsen (Gloux *et al.*, 1994), ist für andere $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster eine andere Orientierung für die Achsen ermittelt worden. Danach verlaufen die g_{xx} - und g_{yy} -Achse entlang des Verbindungsvektors der beiden gemischtvalenten respektive der beiden gleichvalenten Eisenatome; die g_{zz} -Komponente verläuft entlang der Normalen der durch g_{xx} und g_{yy} aufgespannten Fläche (Ruis & Lamotte, 1989). Mittels NMR-Untersuchungen an der solubilisierten Untereinheit PsaC aus *Synechococcus* PCC 7002 konnte gezeigt werden, daß die gemischtvalenten Eisenatome in F_A^- von den Cysteinen C47 und C53 und die in F_B^- von den Cysteinen C10 und C16 koordiniert werden (Antonkine *et al.*, 2000). Errechnet man auf Basis dieser Zuordnung die Flächennormalen

der Cluster, so findet man keine Übereinstimmung mit den experimentell von Kamlowski *et al.* (Kamlowski *et al.*, 1997b) ermittelten EPR-Daten. Die Gründe für diese Diskrepanz sind derzeit noch unbekannt. Möglich scheint jedoch eine bislang unbekannte Orientierung der magnetischen Tensorachsen in den beiden Clustern (D. Stehlik, pers. Mitteilung).

Aufgrund der Ähnlichkeit von PsaC mit den bakteriellen Ferredoxinen aus *Peptostreptococcus asaccharolyticus* und *Clostridium acidi urici* (CauFd) (s. Abschnitt 8.1) werden nachfolgend die Bindungsverhältnisse der Cluster in den beiden Proteinen verglichen. Dies ist von Bedeutung, da die Wasserstoffbrückenbindungen der Cluster deren Redoxpotentiale beeinflussen können (Backes *et al.*, 1991).

In CauFd findet man das folgende Bindungsmuster (Dauter *et al.*, 1997): Die Schwefelatome $S\gamma$ der ersten beiden Cysteine eines Bindungsmotivs bilden eine Wasserstoffbrücke zum Wasserstoff der Peptid-NH-Gruppe des jeweils übernächsten Aminosäurerestes aus. Das erste Cystein bildet zusätzlich noch eine weitere Wasserstoffbrücke über das $S\gamma$ -Schwefelatom aus.

Das dritte Cystein bildet keine Wasserstoffbrücke aus.

Zwei weitere Wasserstoffbrücken werden ausgehend vom $S\gamma$ -Schwefelatom des vierten Cysteins gebildet. Eine zum Wasserstoffatom der Peptid-NH-Gruppe des zwei Aminosäuren entfernten Restes und eine zur Peptid-NH-Gruppe des vier Aminosäuren entfernt liegenden Restes.

Ferner bestehen drei Wasserstoffbrücken von den anorganischen Schwefelatomen S1, S3 und S4 der Cluster zu Wasserstoffatomen benachbarter Peptid-NH-Gruppen. Weitere Details hierzu finden sich z. B. in Dauter *et al.* (Dauter *et al.*, 1997).

Die detaillierte Koordination von F_A und F_B ist in Abbildung 9.9 dargestellt. Man erkennt, daß das Bindungsmuster von F_B (Abbildung 9.9b), mit Ausnahme einer fehlenden zweiten Wasserstoffbrückenbindung zu Atom $S\gamma$ von Cystein C10, im wesentlichen dem des Clusters I in CauFd entspricht. Zwischen den Bindungsverhältnissen an Cluster II in CauFd und F_A besteht ebenfalls große Ähnlichkeit. Aufgrund eines schlechten Bindungswinkels wurde die Wasserstoffbrücke zwischen Schwefelatom $S\gamma$ von Cystein C47 und dem Wasserstoffatom am Hauptketten-Stickstoffatom von Glycin C49 in Abbildung 9.9a jedoch in Klammern gesetzt.

Das Strukturmodell zeigt, daß abgesehen von der zweiten fehlenden Wasserstoffbrücke am ersten Cystein eines jeden Clusters die Bindungsverhältnisse der Cluster in PsaC im wesentlichen denen in CauFd entsprechen. Bei der gegenwärtigen Auflösung ist die Frage nach dem Vorliegen bestimmter Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Cluster in-

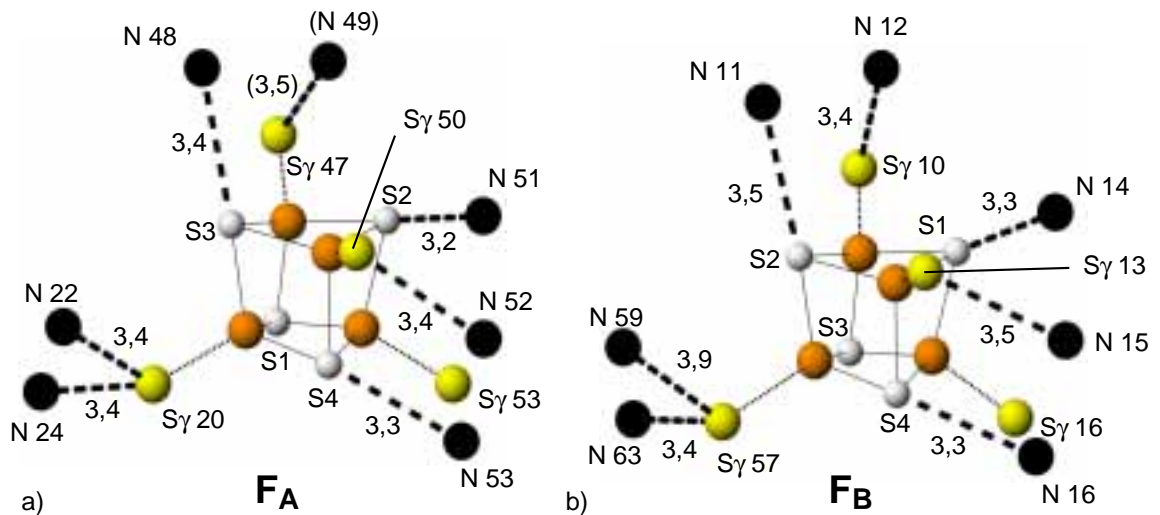


Abbildung 9.9: Wasserstoffbrückenbindungen zu den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern F_A a) und F_B b). Die Schwefelatome der koordinierenden Cysteinyreste sind mit S γ , Stickstoffatome innerhalb der Hauptkette mit N benannt. Hinter dem Atomnamen ist die Nummer der Aminosäure in PsaC angegeben. Die anorganischen Schwefelatome (grau) sind mit den Namen S1-S4 bezeichnet. Die Zahlen an den unterbrochenen Linien geben die Länge der entsprechenden Wasserstoffbrückenbindung in Å an.

volvieren, nicht mit letzter Gewißheit zu klären, weshalb man davon ausgehen sollte, daß die Wasserstoffbrückenbindungen zu den Clustern in PsaC denen in CauFd entsprechen.

Gemäß den gängigen Vorstellungen über den Einfluß von Wasserstoffbrückenbindungen auf die Redoxpotentiale von Eisen-Schwefel-Clustern (Backes *et al.*, 1991) besitzt ein Cluster mit weniger Wasserstoffbrückenbindungen ein geringeres Redoxpotential als ein Cluster mit mehr Wasserstoffbrückenbindungen. Ob jedoch das Fehlen einer einzigen Wasserstoffbrücke allein für die unterschiedlichen Redoxpotentiale in CauFd und PsaC verantwortlich sein kann, ist zweifelhaft. Denn zum einen liegen die von Schlodder *et al.* bestimmten Potentiale von -445 ± 10 mV und -465 ± 10 mV für F_A und F_B in derselben Größenordnung wie die -435 mV, die für die Cluster in CauFd bestimmt wurden. Und zum anderen wurde für Ferredoxin aus *Azotobacter vinelandii* bei einem identischem Wasserstoffbrückenbindungsmuster für die beiden Cluster sogar ein Potential von -645 mV gemessen (Backes *et al.*, 1991). Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, daß auch andere Faktoren die Redoxpotentiale wesentlich beeinflussen. Auf die Bedeutung der Verteilung der Dipole in der Umgebung der Cluster als bestimmendes Element (Stephens *et al.*, 1996) wurde bereits in Abschnitt 9.6 hingewiesen. Aufgrund der Sensibilität der Dipole auf Veränderung der Atompositionen in der Umgebung führt eine derartige Analyse bei der gegenwärtigen Auflösung zu keinem eindeutigen Ergebnis.

Ein weiteres Problem beim Vergleich der Redoxpotentiale stellt die Glaubwürdigkeit

der für F_A und F_B gemessenen Werte dar. Die Potentiale der Cluster sind schwierig zu bestimmen, da sie sich eventuell gegenseitig beeinflussen können, d. h. daß bei bereits reduziertem Cluster F_A für die Reduktion F_B ein falsches Potential gemessen werden könnte (Brettel, 1997). Letztendlich kann die Kristallstruktur gegenwärtig nur einen Hinweis auf die möglichen Potentiale der Cluster geben. Zur Klärung der aufgeworfenen Widersprüche bedarf es weiterer spektroskopischer Experimente, genauer Modellrechnungen und einer Kristallstruktur bei noch höherer Auflösung.

9.8 Die Gesamtheit der ETS-Kofaktoren und die beiden Äste des ETS

Im folgenden Abschnitt soll näher auf die Relationen der Kofaktoren untereinander, d. h. deren Abstände und Orientierungen und deren Korrelation mit experimentell bestimmten Kinetiken eingegangen werden. Dazu werden zunächst kurz die dem Elektronentransfer zugrunde liegenden Theorien erläutert und diese anschließend mit den strukturellen Daten korreliert.

Die theoretische Grundlage für Elektronentransferreaktionen bildet Fermis „goldene Regel“ (Gleichung 9.7).

$$k_{\text{ET}} = \frac{2\pi}{\hbar} |V|^2 \cdot (\text{F. C.}) \quad (9.7)$$

Demnach ist die Geschwindigkeitskonstante einer Elektronentransferreaktion (k_{ET}) von zwei Faktoren abhängig: dem Maß für die elektronische Kopplung zwischen Donor und Akzeptor $|V|^2$ und dem Franck-Condon-Faktor (F. C.) (integrierte Überlappung der Kernwellenfunktionen von Edukt und Produkt bei gleicher Energie).

Näherungsweise läßt sich $|V|^2$ durch folgende Abhängigkeit beschreiben:

$$|V|^2 \propto e^{-\beta R} \quad (9.8)$$

Nach Gleichung 9.8 nimmt die elektronische Kopplung exponentiell mit dem Kantenabstand R zwischen Donor (D) und Akzeptor (A) ab, wobei die Größe von β vom Medium zwischen Donor und Akzeptor abhängt. Gemäß einer empirischen Näherung beträgt in Proteinen $\beta \approx 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ (Moser *et al.*, 1992), im Vakuum ist $\beta \approx 2,8 \text{ \AA}^{-1}$. Der Wert von $\beta \approx 1,4 \text{ \AA}^{-1}$ bedeutet praktisch, daß die Elektronentransferrate bei einer Zunahme des Abstands zwischen Donor und Akzeptor um $1,7 \text{ \AA}$ um eine Größenordnung abnimmt.

Zum Kantenabstand R ist zu bemerken, daß es sich bei diesem um den kürzesten Kantenabstand zwischen den konjugierten π -Elektronensystemen von Donor und Akzeptor handelt. Im Falle der Chlorophylle wurden für die Abstandsberechnungen neben dem Porphyrinsystem auch das Sauerstoffatom an C13¹ und die Vinylgruppe an C3 dem konjugierten System zugerechnet. Anlaß, das Sauerstoffatom in das konjugierte System einzu beziehen gibt die Kristallstruktur von Ethylchlorophyllid (Kratky & Dunitz, 1977), in der die Bindung zwischen C13 und C13¹ mit $1,43 \text{ \AA}$ signifikant kürzer als eine C-C Einfachbindung ist und somit partiellen Doppelbindungscharakter besitzt. Analog zu (Brettel, 1997) wurden zur Berechnung der Abstände von und zu den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern die ligandierenden Cysteine einbezogen, da sich auf diese bei der Reduktion des Clusters ebenfalls ein Teil der negativen Ladung verteilt.

Der zweite die Elektronentransferrate bestimmende Faktor ist der Franck-Condon-

Faktor F.C., der durch Gleichung 9.9 beschrieben werden kann. Zusammen mit Gleichung 9.10 ergibt sich daraus die sog. Markus-Theorie (Marcus & Sutin, 1985).

$$(F.C.) = Ce^{-\Delta G^*/k_B T} \quad (9.9)$$

$$\Delta G^* = \frac{\lambda}{4} \left(1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda} \right)^2 \quad (9.10)$$

Die Aktivierungsenergiebarriere ΔG^* in Gleichung 9.9 ist dabei durch Gleichung 9.10 gegeben; in der Größe C sind diverse Konstanten zusammengefaßt. In Gleichung 9.10 ist ΔG^0 die Standard-Gibbs-Energie (freie Enthalpie) für den Elektronentransfer vom Donor D zum Akzeptor A. λ bezeichnet die Reorganisationsenergie, die im theoretischen Fall aufgebracht werden müßte, um die Kerngeometrien der Produkte in die Geometrie der Edukte zu überführen, ohne ein Elektron zu übertragen. Diese Zusammenhänge sind in

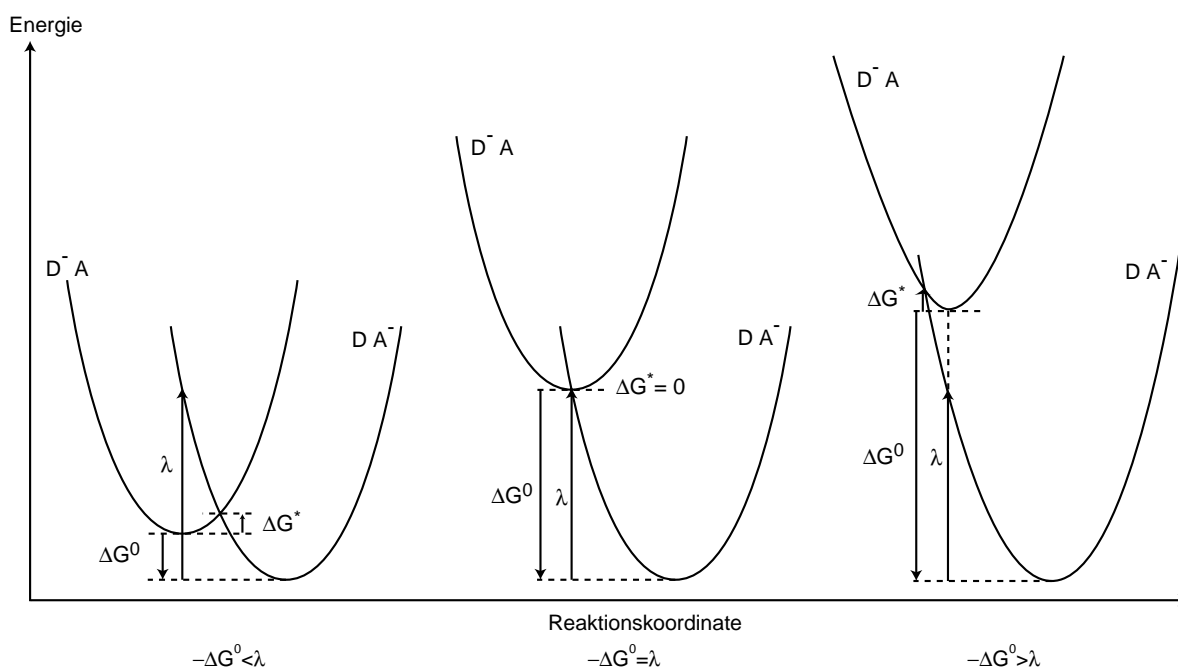


Abbildung 9.10: Graphische Darstellung der Zusammenhänge, die der Markustheorie zugrunde liegen. Dargestellt sind die drei möglichen Relationen zwischen ΔG^0 und λ bei konstantem λ . Links ist der normale Fall $-\Delta G^0 < \lambda$, in der Mitte der optimale Fall für $-\Delta G^0 = \lambda$ und rechts die inverse Marcusregion für $-\Delta G^0 > \lambda$ dargestellt.

Abbildung 9.10 dargestellt.

Aus den Gleichungen 9.9 und 9.10 ist ersichtlich, daß sich die größte Transferrate für den Fall $-\Delta G^0 = \lambda$ ergibt, da hier die Aktivierungsenergie für den Übergang null beträgt (mittlere Zeichnung in Abbildung 9.10). In allen anderen Fällen, in denen $-\Delta G^0 \neq \lambda$ ist, also auch im Falle einer sehr exergonischen Reaktion (!), ist die Transferrate immer geringer als im optimalen Fall.

Eine einfachere empirische Näherung (Gleichung 9.11) - die auf der Markustheorie beruht - stammt von Moser und Dutton (Moser *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1995).

$$\log k_{ET} = 15 - 0,6R - 3,1(\Delta G^0 + \lambda)^2/\lambda \quad (9.11)$$

In Gleichung 9.11 ist die Transferrate k_{ET} in s^{-1} , der kürzeste Kantenabstand R in Å und ΔG^0 sowie λ in eV einzusetzen. Für den optimalen Fall $-\Delta G^* = \lambda$ folgt aus Gleichung 9.11 eine einfache Abhängigkeit der optimalen (d.h. größtmöglichen) Transferrate vom Abstand zwischen den beiden an der Transferreaktion beteiligten Kofaktoren. Mit den aus dem Strukturmodell gewonnenen Abständen lassen sich so die optimalen Transferaten errechnen und mit den spektroskopisch ermittelten Raten vergleichen. Die für die kinetischen Betrachtungen nötigen kürzesten Kantenabstände zwischen den Kofaktoren, sowie die für weitere geometrische Betrachtungen nötigen Zentrenabstände zwischen den Kofaktoren sind in Tabelle 9.2 angegeben.

Die kürzesten Kanten- und Zentrenabstände zwischen äquivalenten Kofaktoren sind innerhalb des A- und des B-Astes sehr ähnlich. Ein größerer Unterschied ergibt sich nur beim Zentrenabstand von eC-B2-eC-A3 (A-Ast, 8,8 Å) gegenüber dem Abstand eC-A2-eC-B3 (B-Ast, 8,2 Å). Dies hat jedoch keinerlei Auswirkungen auf den Kantenabstand zwischen diesen beiden Kofaktoren (siehe auch Abschnitt 9.4). Die Ähnlichkeit der Abstände in beiden Ästen des ETS führt direkt zu einer der zentralsten, den Elektronentransfer in PS I betreffenden Fragen: Findet der Elektronentransfer von P700 zu F_X unidirektional über einen Ast statt, oder sind beide Äste daran beteiligt?

Für PbRZ (Typ II Reaktionszentren) konnte eindeutig gezeigt werden, daß der Elektronentransfer unidirektional über den L-Ast des ETS stattfindet (Hoff & Deisenhofer, 1997). Für PS I gibt es hingegen viele widersprüchliche Aussagen darüber, ob ein Ast oder beide Äste aktiv am Elektronentransport teilnehmen.

Während in Typ II-Reaktionszentren insgesamt zwei Elektronen über das Chinon Q_A auf das Chinon Q_B übertragen werden, welches dann aus der Bindungstasche diffundiert, ist dies in PS I nicht der Fall. Beide Chinone besitzen eine nahezu identische Bindungstasche (s. Abschnitt 9.5), und der Elektronentransfer findet von einem oder beiden Chinonen auf den $[Fe_4S_4]$ -Cluster F_X statt. Die spektroskopischen Untersuchungen in Bezug auf die beteiligten Äste beruhen daher auf dem Elektronentransfer von Q_{K-A}/Q_{K-B} nach F_X , d. h. der Reoxidation von Q_{K-A}/Q_{K-B} . Eine detailliertere Auseinandersetzung mit allen spektroskopischen Ergebnissen würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, eine Übersicht über die ältere Literatur findet sich in (Brettel, 1997).

	<i>eC-A1</i>	<i>eC-B1</i>	<i>eC-B2</i>	<i>eC-A2</i>	<i>eC-A3</i>	<i>eC-B3</i>	<i>Q_K-A</i>	<i>Q_K-B</i>	<i>F_X</i>	<i>F_A</i>	<i>F_B</i>
<i>eC-A1</i>	0	6,3	11,7	12,7	19,1	19,8	24,2	26,0	31,4	46,1	52,7
<i>eC-B1</i>	3,1	0	12,6	11,9	20,1	19,0	26,0	24,4	31,6	45,9	53,3
<i>eC-B2</i>	3,1	6,3	0	18,8	8,8	22,8	16,4	25,3	26,3	41,1	46,0
<i>eC-A2</i>	6,3	3,3	8,4	0	22,5	8,2	24,6	16,0	25,6	38,7	47,5
<i>eC-A3</i>	10,0	12,4	3,3	13,9	0	23,6	8,6	23,5	20,0	34,3	37,9
<i>eC-B3</i>	12,7	10,2	14,4	3,3	15,7	0	23,3	8,6	19,9	31,5	41,2
<i>Q_K-A</i>	18,5	20,3	11,4	18,8	6,5	16,5	0	21,9	14,2	27,8	30,6
<i>Q_K-B</i>	20,3	18,8	19,4	11,0	17,1	6,5	15,2	0	14,1	24,1	34,5
<i>F_X</i>	26,9 (25.9)	26,9 (26.2)	21,2 (19.9)	20,5 (19.2)	16,2 (14.4)	16,1 (14.2)	9,1 (6.8)	9,0 (6.7)	0	14,9	22,0
<i>F_A</i>	41,2 (39.8)	40,8 (39.8)	35,4 (35.0)	33,6 (31.9)	29,6 (29.6)	27,4 (25.6)	22,8 (21.7)	19,4 (18.5)	11,6 (10.1)	0	12,3
<i>F_B</i>	47,8 (46.3)	48,4 (46.9)	40,9 (38.8)	42,0 (41.3)	32,9 (30.6)	36,7 (36.5)	26,3 (24.6)	29,5 (28.9)	18,8 (17.6)	9,5 (6.7)	0

Tabelle 9.2: Die kürzesten Kanten- (unterhalb der Diagonalen) und Zentrenabstände (oberhalb der Diagonalen) zwischen den Kofaktoren des Elektronentransfersystems. Dem A-Ast zugeordnete Kofaktoren sind kursiv gesetzt. In Klammern gesetzt sind die kürzesten Kantenabstände zu den [Fe₄S₄]-Clustern unter Einbeziehung der sie koordinierenden Cysteine.

In jüngster Zeit haben sich jedoch die Anzeichen für die Richtigkeit einer der möglichen Theorien verdichtet. Joliot & Joliot (1999) haben eine zweiphasige Kinetik für die Reoxidation von A_1^- gemessen. Als plausibelste Erklärung erscheint den Autoren das Vorhandensein zweier aktiver Äste mit zwei leicht unterschiedlichen Kinetiken für den Transfer von Q_K -A und Q_K -B nach F_X . Diese Unterschiede wiederum werden auf eine Asymmetrie in der Position relativ zu F_X zurückgeführt (näheres siehe Abschnitt 9.8.2).

Dieses - zwei aktive Äste favorisierende - Ergebnis steht im Widerspruch zu einigen EPR-Untersuchungen, die auf nur einen aktiven Ast hindeuten. So konnte durch eine kombinierte EPR/Mutationsstudie gezeigt werden, daß die Entfernung von PsaF oder PsaE und PsaF die spektroskopischen Eigenschaften von A_1 ändert (Yang *et al.*, 1998). Eine Entfernung der Untereinheiten PsaK, PsaI, PsaL oder PsaM führte hingegen zu keiner Beeinflussung von A_1 . Daraus folgern die Autoren, daß nur das auf der distalen Seite des Komplexes positionierte Chinon und der damit korrelierte ETS-Ast am Elektronentransfer teilnimmt. Der Einsatz von Triton X-100 bei der Extraktion der PsaE/PsaF Mutante führte darüberhinaus zum vollständigen Verschwinden des Chinon-EPR-Signals und zu einem 100 %igen A_0^- Signal, ohne jedoch das Chinon aus dem Komplex zu entfernen. Dies wird auf eine doppelte Reduktion des Chinons mit anschließender zweifacher Protonierung zurückgeführt. Dem Strukturmodell ist eindeutig zu entnehmen, daß eine Entfernung von PsaF und PsaE die Bindungsstelle des Chinons Q_K -A „freilegt“ und somit wahrscheinlich das Verschwinden des EPR-Signals von Q_K -A beobachtet wurde.

Wurden die geometrischen Parameter der Chinone bereits in Abschnitt 9.5 mit einigen EPR-Ergebnissen verglichen, so soll dies an dieser Stelle noch einmal im Hinblick auf die beiden Kofaktoräste getan werden.

Die Länge des mittels EPR-Spektroskopie gewonnenen $P700^{+}-A_1^-$ Verbindungsvektors beträgt $25,4 \pm 0,3 \text{ \AA}$ (Bittl *et al.*, 1997). Dies stimmt am besten mit den diagonal verlaufenden Verbindungsvektoren eC-A1— Q_K -B und eC-B1— Q_K -A überein (s. Tabelle 9.3). Von den Winkeln, die diese beiden Vektoren mit der c-Achse ausbilden, liegt allerdings nur der von eC-B1— Q_K -A innerhalb der Fehlergrenzen des EPR-spektroskopisch bestimmten Winkels von $27,0 \pm 5^\circ$ (Bittl *et al.*, 1997). Die Zusammenfassung einiger wichtiger geometrischer Parameter in Tabelle 9.3 zeigt, daß sich die besten Übereinstimmungen zwischen dem Strukturmodell und den EPR-Daten das Chinon Q_K -A bzw. für das Paar eC-B1/ Q_K -A ergeben. Das bedeutet, daß es sich bei dem mit der EPR-Spektroskopie gemessenen Chinon um das Chinon des A-Astes des ETS handelt, der gemessene Elektronentransfer zum Chinon also über den A-Ast stattgefunden haben wird. Zu beachten ist dabei aller-

Tabelle 9.3: Vergleich diverser geometrischer Parameter zwischen EPR-Experimenten und dem aktuellen Röntgenstrukturmodell, die die Chinone sowie den Verbindungsvektor zwischen den Chinonen und P700 betreffen. Die EPR-Resultate stammen aus Bittl *et al.* (1997). In der ersten Spalte bedeuten: Winkel (O-O, **c**), Winkel zwischen dem O-O Verbindungsvektor im Chinon und der c-Achse; Winkel (C2-CH3, **c**), Winkel zwischen dem C2-CH3 Verbindungsvektor im Chinon und der c-Achse; Winkel (Ebene, **c**), Winkel zwischen der Chinonebene und der c-Achse; Abstand P-Q, Länge des P700-Chinon Verbindungsvektors; Winkel(P-Q, **c**), Winkel dieses Vektors mit der c-Achse; Winkel (Proj. P-Q, **a**), Winkel der Projektion dieses Vektors auf die a/b-Ebene mit der a-Achse.

	EPR	Q _K -A		Q _K -B	
Winkel (O-O, c) (°)	27,0±10	36,2		42,0	
Winkel (C2-CH3, c) (°)	52±10	35		28,0	
Winkel (Ebene, c) (°)	25,0±7	22,5		17,5	
		eC-A1-Q _K -A	eC-A1-Q _K -B	eC-B1-Q _K -A	eC-B1-Q _K -B
Abstand P-Q (Å)	25,4±0,3	24,2	26,0	26,0	24,4
Winkel (P-Q, c) (°)	27,0±5	20,3	32,9	27,8	25,0
Winkel (Proj. P-Q, a) (°)	25,0±10	18,8	14,2	12,2	21,6

dings, daß die spintragende Hälfte des P700 formal dem B-Ast zugerechnet wird. Dieses Ergebnis ist ebenfalls konsistent mit der Annahme (s. Abschnitt 9.2), daß das Chlorophyll eC-B1 80 % der Spindichte im oxidierten P700 trägt. Allerdings kann daraus nicht zwingend gefolgert werden, daß der A-Ast der einzig aktive Ast des ETS ist, was im Widerspruch zu den spektroskopischen Ergebnissen ((Joliot & Joliot, 1999), s. o.) stünde. Es verbleibt nämlich die Möglichkeit, daß beide Äste aktiv sind, der Elektronentransfer über den schnelleren B-Ast jedoch zu schnell verläuft, um mittels EPR-Spektroskopie detektiert zu werden. Dies ist derzeit Gegenstand kontroverser Diskussionen und kann auch mit Hilfe des Strukturmodells nicht geklärt werden.

Soll jedoch der Elektronentransfer über den B-Ast schneller verlaufen, so kann dies angesichts der nahezu identischen Abstände zwischen den Kofaktoren beider Äste nur durch eine Änderung von ΔG^0 und λ , also durch eine unterschiedliche Proteinumgebung der jeweiligen Kofaktoren hervorgerufen werden. Die gleiche Ursache wird auch für die Unidirektionalität des Elektronentransfers über den L-Ast in PbrZ angeführt (Moser *et al.*, 1992).

9.8.1 Der Elektronentransferschritt $P700^*A_0 \rightarrow P700^+A_0^-$

Für die primäre Ladungstrennung, d. h. der Übertragung eines Elektrons von P700 auf A₀ wird spektroskopisch eine Geschwindigkeitskonstante von $k=5 \cdot 10^{11} \text{s}^{-1}$ gemessen (Brettel,

1997).

Nach Gleichung 9.11 ergeben sich für alle möglichen Abstände eC-A/B1 und eC-A/B3 die in Tabelle 9.4 angegebenen optimalen Raten. Man erkennt, daß alle diese optimalen

Tabelle 9.4: Optimale Transferraten nach Gleichung 9.11 für alle möglichen Abstände zwischen den Kofaktoren eC-A/B1 und eC-A/B3.

	Experimentell	eC-A1/eC-A3	eC-A1/eC-B3	eC-B1/eC-A3	eC-B1/eC-B3
Rate (s^{-1})	$5 \cdot 10^{11}$	$1 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^7$	$6,3 \cdot 10^9$

Raten weit unterhalb der experimentell bestimmten Rate liegen. Deshalb wurde bereits mit dem letzten Strukturmodell vorgeschlagen, daß die Chlorophylle eC-B2 und eC-A2 in den Elektronentransfer von P700 nach A_0 involviert sind (Klukas *et al.*, 1999b). Eine Beteiligung dieser Chlorophylle am Elektronentransfer von P700 nach A_0 ist strukturell gesehen sogar wahrscheinlicher als in PbRZ, da eC-B2 und eC-A2 entlang des kürzesten Verbindungsvektors zwischen P700 und A_0 liegen, sich die akzessorischen Chlorophylle in PbRZ hingegen abseits der kürzesten Verbindung zwischen dem „Special Pair“ und dem primären Akzeptor befinden.

Die optimalen Transferraten aller sinnvollen Kombinationen von eC-A/B1 und eC-A/B3 mit eC-B2 und eC-A2 sind in Tabelle 9.5 zusammengefaßt. Die Raten liegen für die diago-

Tabelle 9.5: Optimale Transferraten nach Gleichung 9.11 für alle möglichen Abstände zwischen den Kofaktoren eC-A/B1 und eC-B2/A2 sowie eC-A/B3 und eC-B2/A2.

	eC-A1/eC-A2	eC-A1/eC-B2	eC-B1/eC-A2	eC-B1/eC-B2
Rate (s^{-1})	$1,7 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^{13}$	$1 \cdot 10^{13}$	$1,7 \cdot 10^{11}$
	eC-A2/eC-B3		eC-B2/eC-A3	
Rate (s^{-1})	$1 \cdot 10^{13}$		$1 \cdot 10^{13}$	

naln Kombinationen von Kofaktoren im Bereich der gemessenen Rate für $P700 \rightarrow A_0$, für die Kombinationen innerhalb eines Astes liegen sie sogar zwei Größenordnungen darüber. Zieht man die mögliche π - π -Wechselwirkung zwischen den Chlorophyllen eC-B2/eC-A3 und eC-A2/eC-B3 in Betracht, so wäre die Elektronenübertragung zwischen diesen Chlorophyllen im idealen Fall sogar Abstands-unabhängig ($\beta=0$ in Gleichung 9.8) und damit sogar schneller als der berechneten Rate von $1 \cdot 10^{13} s^{-1}$ entspräche. Deshalb wäre dieser Elektronenübertragungsschritt mittels optischer Spektroskopie nicht detektierbar. Somit können unter der Annahme einer Kopplung der Chlorophyllpaare eC-B2/eC-A3 bzw. eC-

A2/eC-B3 die optimalen Raten für die diagonalen Paare eC-B1/eC-B2 und eC-A1/eC-A2 den Transferschritt von P700 nach A_0 erklären und stehen darüberhinaus nicht im Widerspruch zu der Annahme, daß der aktive (bzw. EPR-sichtbare) Ast des ETS der A-Ast ist und das Chlorophyll eC-B1 den Spin von $P700^{+}$ trägt.

Verkompliziert wird dies jedoch dadurch, daß die beiden Chlorophylle des P700, eC-A1 und eC-B1, eine starke π - π -Wechselwirkung eingehen, der Elektronentransfer innerhalb dieses Dimers also sehr schnell verlaufen wird und somit ein Elektronentransfer von eC-A1 zu eC-B2 günstiger ist als ein direkter Transfer von eC-B1 zu eC-B2.

Näheren Aufschluß können zwei weitere, in der Literatur (Brettel, 1997) genannte kinetische Angaben liefern, die das Paar P700/ A_0 betreffen: Zum einen die Rekombinationsrate des Triplets $^3(P700^+A_0^-) \rightarrow ^3P700A_0$ mit $k \approx 1 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ und zum anderen die Rekombinationsrate des Singulets $^1(P700^+A_0^-) \rightarrow P700A_0$ mit $k \approx 1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Ein Blick in Tabelle 9.4 zeigt, daß die optimalen Raten zwischen den Kofaktoren innerhalb eines (eC-A1/eC-A3 und eC-B1/eC-B3) Astes in der Größenordnung der Triplettrekombination liegen, während die optimalen Raten für die diagonalen Anordnungen (eC-A1/eC-B3 und eC-B1/eC-A3) mit den Singulettrekombinationsraten korrespondieren. Ähnlich wie die Ladungsdichteverteilung im Radikalkation des $P700^{+}$, so ist auch der Triplettzustand asymmetrisch im P700 Heterodimer verteilt. Unlängst durchgeführte Messungen (Breton *et al.*, 1999) zeigen, daß der Triplettzustand vorwiegend auf der Wasserstoffbrückenbindungen ausbildenden Hälfte des Dimers residiert. Nach dem aktuellen Strukturmodell wäre dies genau das Chlorophyll eC-A1, welches mit eC-A3 die optimale Transferrate für den Tripletttransfer bilden würde.

Unter der Annahme, daß die Orbitalkoeffizienten im P700 (Singulett-) Grundzustand denen im Radikalkation entsprechen, wäre eine Singulettrekombination zwischen eC-A3 und eC-B1 zu erwarten, dessen optimale Rate ebenfalls in der gleichen Größenordnung wie die spektroskopisch abgeschätzten Singulettrekombinationsraten liegt.

Problematisch an dieser Argumentation ist allerdings, daß man die Chlorophylle eC-B2/eC-A2 nicht zur Erklärung der Rekombinationsreaktionen heranziehen muß, sie für die Erklärung der Ladungstrennung (s. o.) jedoch benötigt. Insbesondere für die Annahme, daß eC-B2/eC-A3 und eC-A2/eC-B3 in irgendeiner Form gekoppelt sind, wäre dies nicht zu begründen. Die Vereinheitlichung der o. g. Schlußfolgerungen kann jedoch nur über weitere spektroskopische Untersuchungen und aufwendige Rechnungen erfolgen.

9.8.2 Die A_1 involvierenden Elektronentransferschritte

Nachdem in der Einführung zu diesem Abschnitt die geometrischen Parameter der Chinone und des P700 vor dem Hintergrund der Problematik der aktiven Äste diskutiert wurden, wird die Diskussion nun auf die Kinetiken, die A_1 involvieren ausgeweitet.

Im Hinblick auf die in Abschnitt 9.8.1 angesprochenen Rekombinationskinetiken wird zunächst die Rekombinationsreaktion $A_1^-P700^+ \rightarrow A_1P700$ betrachtet. Für die beiden diagonalen Paare ergibt sich hier nach Gleichung 9.11 eine optimale Transferrate von $6,6 \cdot 10^2 s^{-1}$. Für die Paare innerhalb eines Astes findet man optimale Raten von $7,93 \cdot 10^3 s^{-1}$ (eC-A1/ Q_K -A) und $5,2 \cdot 10^3 s^{-1}$ (eC-B1/ Q_K -B). Die experimentell bestimmte Rate liegt bei $4 \cdot 10^3 s^{-1}$ (Brettel, 1997). Gemäß der bisherigen Argumentation müßten die relevanten Transferraten die der diagonalen Paare eC-A1/ Q_K -B und eC-B1/ Q_K -A sein. Die optimalen Raten dieser Paare liegen allerdings nach Gleichung 9.11 unterhalb der experimentellen. Da die optimalen Raten nach der Theorie die schnellsten tatsächlich möglichen Raten darstellen, können die experimentell ermittelten Raten nicht schneller sein. Diese Problematik wurde bereits im letzten Strukturmodell (Klukas *et al.*, 1999b) aufgeworfen (dort allerdings für einen gemittelten Abstand zwischen eC1 und Q_K). Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar. Im Rahmen der Genauigkeit des Strukturmodells entsprechen die für die Paare innerhalb eines Astes errechneten optimalen Raten am ehesten dem experimentell ermittelten Wert.

Für die Rate des Elektronentransfers von A_0 nach A_1 wurde spektroskopisch ein Wert von $5,0 \cdot 10^{10} s^{-1}$ ermittelt (Kumazaki *et al.*, 1994). Der damit ermittelte Kantenabstand zwischen A_0 und A_1 beträgt $7,3 \text{ \AA}$ (Kumazaki *et al.*, 1994) bzw. $7,8 \text{ \AA}$ (Iwaki *et al.*, 1996). Der aus dem Strukturmodell ermittelte Abstand beträgt für beide Äste $6,5 \text{ \AA}$ und die optimale Transferrate $1,3 \cdot 10^{11} s^{-1}$. Damit ist der Abstand kürzer und die optimale Rate größer als spektroskopisch ermittelt. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, daß die Bedingung $-\Delta G^0 = \lambda$ nicht erfüllt und die spektroskopisch ermittelte tatsächliche Rate daher kleiner als die optimale Rate ist.

Der kürzeste Kantenabstand zwischen Q_K -A und F_X und Q_K -B und F_X beträgt $9,0 \text{ \AA}$ bzw. $9,1 \text{ \AA}$. Bezieht man die die F_X ligandieren Cysteine in die Abstandsberechnung ein, so ergibt sich ein kürzester Abstand von $6,8 \text{ \AA}$. Für den Elektronentransfer zwischen diesen beiden Kofaktoren erhält man damit eine optimale Rate von $8,3 \cdot 10^{10} s^{-1}$. Die experimentell in *Syn. el.* ermittelte Rate liegt in der Größenordnung von $3,9 \cdot 10^6 s^{-1}$ (Schlodder *et al.*, 1995; Schlodder *et al.*, 1998). Schlodder *et al.* konnten außerdem zeigen, daß für diese Reaktion $-\Delta G^0 \neq \lambda$ ist. Auf Basis der von ihnen experimentell ermittelten Akti-

vierungsenergie der Transferreaktion konnten die Autoren mittels einer erweiterten Form von Gleichung 9.9 eine theoretische optimale Rate von $9,0 \cdot 10^{10} \text{s}^{-1}$ bestimmen. Diese Rate und der daraus abgeschätzte Kantenabstand zwischen A_1 und F_X von $7,8 \text{ \AA}$ ist damit kompatibel mit den jetzigen Röntgenstrukturdaten.

Nach diesem Ergebnis wäre also ein Elektronentransfer über beide Chinone zum F_X möglich und beide Wege nicht unterscheidbar.

Jüngste Ergebnisse, die an *Chlorella sorokiniana* gemessen wurden, deuten allerdings auf eine zweiphasige Kinetik für den Transfer von A_1^- nach F_X hin (Joliot & Joliot, 1999). Die schnelle Kinetik besitzt eine Geschwindigkeitskonstante von $3,9 \cdot 10^7 \text{s}^{-1}$, die langsame eine Geschwindigkeitskonstante von $4,3 \cdot 10^6 \text{s}^{-1}$. Das Verhältnis zwischen den Amplituden beider Kinetiken ist 1:1. Mutationsstudien an *Chlamydomonas reinhardtii*, bei denen die Tryptophane, die mit den Chinonen wechselwirken, durch andere Aminosäuren ausgetauscht wurden, zeigen, daß eine Mutation des Tryptophans in PsaA die langsame Kinetik verlangsamt und eine in PsaB die schnelle Kinetik verlangsamt (K. Redding pers. Mitteilung). Demzufolge scheint die in *Syn. el.* gemessene Kinetik dem Elektronentransferschritt von Q_K -A nach F_X zu entsprechen. Für die schnelle Kinetik scheint es in *Syn. el.* keine Entsprechung zu geben, zumindest ist jedoch der Anteil der schnellen Kinetik wesentlich geringer als 50 % (K. Brettel pers. Mitteilung).

Aufgrund der Ähnlichkeit des Hauptkettenverlaufs in der direkten Nähe von Q_K -A und Q_K -B lassen sich keine offensichtlichen Ursachen für die unterschiedlichen Kinetiken innerhalb der beiden Äste finden. Es existieren jedoch einige Unterschiede in der Umgebung der Chinon-Bindungstaschen, die einen Einfluß auf die Redoxeigenschaften der Chinone haben können:

- PsaE und PsaD bilden eine unterschiedliche Anzahl von Kontakten zu den Aminosäuren der beiden Chinonbindungsstellen von Q_K -A respektive Q_K -B aus (s. Tabelle 8.4 und 8.5).
- Es gibt keine zur 3_{10} -Helix B-jk(2) analoge Helix in PsaA. Die direkte Umgebung der beiden Chinone wird davon jedoch offensichtlich nicht beeinflusst.
- Zwischen Q_K -B und F_X befindet sich Tryptophan B673 (s. Abschnitt 9.6).
- Zwischen Q_K -A/ Q_K -B und F_X befindet sich ein jeweils unterschiedliches Netzwerk von Wassermolekülen (s. Abbildung 9.6).
- In der Nähe von Q_K -A befindet sich ein negativ geladenes PG-Molekül, in der Nähe von Q_K -B ein ungeladenes MGDG-Molekül (s. Abschnitt 9.5).

Ob einer der oben genannten Unterschiede tatsächlich einen Einfluß auf den Elek-

tronentransfer über die beiden Chinone hat, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht entschieden werden. Die Röntgenstruktur kann jedoch auch in diesem Fall wertvolle Hinweise für Mutageneseexperimente liefern, die zur Aufklärung der Widersprüche führen können.

Schreibt man allerdings die Ursache für die unterschiedlichen Transferraten von Q_K -A nach F_X und Q_K -B nach F_X vollständig den Unterschieden in der Aktivierungsenergie zu, so sollte dieser Unterschied nur einige zehn mV ausmachen. Zieht man ferner in Betracht, daß derartige energetische Unterschiede bereits durch eine geänderte Verteilung von Dipolen in der Nähe der Kofaktoren verursacht werden können (siehe z. B. Stephens et al., 1996), so wäre dieser Unterschied mit der gegenwärtigen Röntgenstruktur bei 2,5 Å Auflösung prinzipiell nicht erklärbar.

