Die Protein-Umgebung des primären Donators P700 im Photosystem I: Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von Mutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Ludwig Krabben

Dem Fachbereich 5 – Chemie –
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jörn Müller

Berichter: Prof. Dr. Wolfgang Lubitz

Berichter: Priv. Doz. Dr. Petra Fromme

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 1999

Berlin 1999
D 83

Abstract

Krabben, Ludwig:

Die Protein-Umgebung des primären Donators P700 im Photosystem I: Biochemische und biophysikalische Charakterisierung von Mutanten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Thema der Arbeit ist die Charakterisierung von mutierten Photosystem I(PSI)-Komplexen der Grünalge *Chlamydomonas (C.) reinhardtii*. Aminosäuren in der Umgebung des primären Elektronendonators P700 werden identifiziert und ihre Bedeutung für die Funktion des Proteinkomplexes untersucht.

Bereits der nicht mutierte PSI-Komplex aus *C. reinhardtii* zeigt gegenüber Präparationen aus Pflanzen und Cyanobakterien Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung des Proteinkomplexes und Abweichungen in den optischen Eigenschaften von P700. Die Verteilung der Spindichte im oxidierten $P700^{+\bullet}$ und die Merkmale des Triplettzustandes sind im PSI der verglichenen Spezies hingegen identisch.

Der Austausch der Aminosäuren Histidin-A676 in der Proteinuntereinheit PsaA und Histidin-B656 sowie Tyrosin-B659 in der Proteinuntereinheit PsaB des PSI wirkt sich auf den Proteingehalt in den Zellen aus und verändert die biophysikalischen Eigenschaften von P700. Die Substitution dieser Aminosäuren mit großen hydrophoben oder potentiell geladenen Seitenketten reduziert den Gehalt des Proteinkomplexes in den Zellen bis unter die Nachweisgrenze. Die geringe Konzentration an PSI in diesen Mutanten gestattet keine weitergehende biophysikalische Untersuchung. Mutationen, die kleine oder polare Aminosäuren an diesen Proteinpositionen generieren, führen zu Phänotypen, die eine moderate Menge des Photosystems akkumulieren. Die Modifizierung des Präparationsverfahrens zur Anreicherung des PSI und die Verwendung einer geeigneten Zellinie bilden die Voraussetzung für die biophysikalische Charakterisierung von P700 in diesen mutierten Proteinkomplexen.
Die optischen Parameter, das Redoxpotential des primären Elektronendonators sowie die Spindichteverteilung im $P700^{+\bullet}$-Radikal werden durch die Aminosäuresubstitutionen beeinflußt.

Die Interpretation dieser Effekte führt mit den Literaturdaten zu dem Ergebnis, daß die beiden Histidine P700 axial ligandieren. Tyrosin-B659 in PsaB bindet sehr wahrscheinlich über eine H-Brücke an den Carbonylsauerstoff der Methylestergruppe des Chlorophyllmoleküls, das durch PsaB koordiniert wird.

Die Resultate zeigen darüber hinaus, daß die beiden Chlorophyll-Moleküle, die P700 bilden, über kein gemeinsames Molekülorbital verfügen und somit kein supramolekulares System darstellen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

L. Krabben, E. Schlodder, R. Jordan, D. Carbonera, G. Giacometti, A. N. Webber, L. Hyeonmoo & W. Lubitz: The Influence of the Axial Ligands of P700 on the Function and Assembly in Photosystem I: A Study of Site-Directed Mutants. In Vorbereitung für *Biochemistry*

J. Austin, L. Krabben, W. Lubitz & A. N. Webber: Assembly and Function of Photosystem I in Chloroplast and Mutants of Chlamydomonas and Tobacco. Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1998). Im Druck.

R. Bittl, S. G. Zech, C. Teutloff, L. Krabben & W. Lubitz: Structural Information on Components of the Electron Transfer chain in Photosystem I from Time-Resolved EPR Spectroscopy. Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1998). Im Druck.

A. N. Webber, H. Su, S. E. Bingham, H. Käß, L. Krabben, M. Kuhn, E. Schlodder & W. Lubitz: Site-Directed Mutations Affecting the Spectroscopic Characteristics and Mid-Point Potential of the Primary Donor in Photosystem I. *Biochemistry* (1996) **35**, 12857-12863.

L. Krabben, H. Käß, E. Schlodder, M. Kuhn, W. Lubitz, H. Xu, S. E. Bingham & A. N. Webber: Site-Directed Mutations of PsaB for the Study of Cofactor-Protein and Protein-Protein Interactions of Photosystem I, in *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (P. Mathis, ed.), Band II, pp. 123-126, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1995).

M. Kuhn, P. Fromme & L. Krabben: A 'membrane attached' a-helix: a conserved structural motif in bacterial reaction centres, photosystem I and chloroplast NADH-plastoquinone oxidoreductase, *TIBS* (1994) **10**, 401-402.

Konferenzbeiträge

L. Krabben & M. Kuhn (1995): Structural and Functional Analysis of Photosystem I. *4th Western Regional Photosynthesis Conference*, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, Kalifornien/USA (Vortrag).

L. Krabben & M. Kuhn (1995): Structure and Function of Photosystem I in C. reinhardtii. *Euroconference on the experimental Biology of Chlamydomonas*, Amsterdam, Niederlande (Poster).

M. Kuhn, L. Krabben, H. Käß, P. Fromme, W. Lubitz, A. N. Webber & S. E. Bingham (1995): ESR and ENDOR Analysis of Photosytem I P700 Targeted Histidine Mutations in Chlamydomonas reinhardtii. A 'Membrane Attached' α-Helix; A Conserved Structural Motif in Bacterial Reaction Centers, the Photosystem I and the Chloroplast NADH-Plastoquinone Oxidoreductase. *4th International Congress of Plant Molecular Biology*, Amsterdam, Niederlande (Poster).

L. Krabben, H. Käß, E. Schlodder, M. Kuhn, W. Lubitz, H. Xu, S. E. Bingham & A. N. Webber (1995): Site-Directed Mutations of PsaB for the Study of Cofactor-Protein and Protein-Protein Interactions of Photosystem I, *10th International Congress on Photosynthesis*, Montpellier, Frankreich (Poster).

L. Krabben, M. Kuhn & W. Lubitz (1996): Site-Directed Mutants of Photosystem I that change the Characteristics of P700. *ESF Workshop: PSI Type Reaction Centers*, Schloß Reinach, Munzingen (Vortrag).

L. Krabben, E. Schlodder, R. Jordan, W. Lubitz, D. Carbonera, A. N. Webber, H. Xu, S. E. Bingham & M. Kuhn (1997): Identification of an amino acid residue coordinating the primary electron donor P700 in photosystem I of Chlamydomonas reinhardtii: biophysical and biochemical characterisation of site-directed mutants. *Plant Biology '97*, Vancouver, Kanada (Vortrag).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung **1**

1.1 Die Lichtreaktion der Photosynthese 3

1.2 Photosynthetische Reaktionszentren 6

1.2.1 Das bakterielle Reaktionszentrum 7

1.2.2 Photosystem I 9

1.3 Problemstellung der vorliegenden Arbeit 13

2 Materialien und Methoden **15**

2.1 Chemikalien 15

2.2 Puffer und Lösungen 15

2.3 Molekularbiologie 16

2.3.1 *in vitro* Mutagenese 16

2.3.2 Kultivierung und Transformation von *C. reinhardtii* 18

2.4 Proteinreinigung und Analyse 21

2.4.1 Chromatographie 21

2.4.2 Proteinanalytik 21

2.5 Optische Spektroskopie 22

2.5.1 Absorptions(-differenz)spektroskopie 22

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie 23

2.5.3 Blitzlichtspektroskopie 24

2.5.4 Bestimmung des Redoxpotentials 25

2.6 Magnetische Resonanz 26

2.6.1 Theoretische Grundlagen 26

2.6.2 EPR-Spektroskopie 31
2.6.3 Absorptionsdetektierte magnetische Resonanz (ADMR) 35

3 Präparation von PSI **39**
3.1 Präparation von Thylakoidmembranen 41
3.2 Präparationen aus den Zellinien FUD7 und CC125 41
3.3 Präparation aus der Zellinie CC2696 43
3.3.1 Solubilisierung der Thylakoidmembran 43
3.3.2 Gelchromatographische Aufreinigung 45
3.3.3 Anionenaustausch-Chromatographie der PSI-Fraktion 48
3.4 Biochemische Charakterisierung der PSI-Präparation 49
3.4.1 Proteinzusammensetzung der PSI-Fraktion 50
3.4.2 Identifizierung von PSI-Untereinheiten 51
3.4.3 Zuordnung weiterer Proteinbanden 54
3.5 Zusammenfassung 56

4 Charakterisierung des WT-PSI **58**
4.1 Spektrale Eigenschaften des PSI-Komplexes 59
4.1.1 Pigmentzusammensetzung des PSI-Komplexes 59
4.1.2 Absorption bei Raumtemperatur 61
4.1.3 Absorptionsspektren bei tiefen Temperaturen 62
4.1.4 Fluoreszenzspektroskopie am PSI-Komplex 64
4.2 Charakterisierung von P700 65
4.2.1 Absorptionsdifferenzspektroskopie 66
4.2.2 Redoxpotential 70
4.2.3 Triplettzustand des primären Donators 71
4.2.4 EPR/ENDOR-Experimente am $P700^{+\bullet}$ 74
4.3 Diskussion 81

5 Substitution von His(A676) und His(B656) **85**
5.1 Die untersuchten His-Mutanten 86
5.2 PSI-Gehalt in der Thylakoidmembran 87

5.2.1 Phänotyp der Mutanten 88
5.2.2 PSI-Aktivität in den Zellen und Thylakoiden der Mutanten 90
5.2.3 Diskussion 95
5.3 Biophysikalische Charakterisierung von P700 99
5.3.1 Redoxpotential 100
5.3.2 Der Triplettzustand ^{3}P700 107
5.3.3 Absorptionsdifferenzspektroskopie bei 77 K 115
5.3.4 $P700^{+\bullet}$/P700-Differenzspektroskopie bei Raumtemperatur 119
5.3.5 EPR/ENDOR-Messungen am $P700^{+\bullet}$ 124
5.4 Zusammenfassung 137

6 Mutationen am Tyr-B659 in PsaB **140**
6.1 Phänotyp der Y-Mutanten 141
6.2 Charakterisierung von PSI aus den Y-Mutanten 142
6.2.1 Redoxpotential 142
6.2.2 $P700^{+\bullet}$/P700-Differenzspektroskopie bei Raumtemperatur 143
6.2.3 Absorptionsdifferenzspektroskopie bei 77 K 144
6.2.4 T–S-Spektroskopie 145
6.2.5 ENDOR-Spektroskopie 147
6.3 EPR am Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ 149
6.4 Zusammenfassung und Diskussion 151

7 Die Einbindung von P700 in den PSI-Komplex **154**
7.1 Ist P700 ein Supermolekül? 155
7.1.1 Eigene Ergebnisse 155
7.1.2 Literaturdaten 156
7.1.3 Schlußfolgerung 157
7.2 Die Funktion von His(A676) und His(B656) 158
7.3 Die Funktion von Tyr(B659) 161
7.4 Die Koordinierung von P700 durch das Proteingerüst 167
7.5 Ist der Elektronentransfer im PSI uni- oder bidirektional? 170

8 Zusammenfassung und Ausblick **172**

Literaturverzeichnis **176**

Anhang **187**

.1 Abkürzungen 187

.2 Aminosäure-Code 189

1

Einleitung und Zielsetzung

Die Photosynthese zählt mit zu den ältesten biochemischen Prozessen, die seit der Entstehung des Lebens vor 3,5 bis 4 Milliarden Jahren auf der Erde ablaufen. Die Entwicklung von den ersten lichtabhängigen Redoxprozessen bis hin zur oxygenen Photosynthese umfaßte einen Zeitraum, der Millionen, vermutlich sogar eine Milliarde von Jahren benötigte. Die Umsetzung von Licht in chemische Energie sorgte im Laufe von Millionen von Jahren nicht nur für die Anreicherung von molekularem Sauerstoff in der Atmosphäre, sondern ist auch heute noch mit einem Jahresumsatz von etwa 300–500 Mrd. Tonnen Kohlendioxid, die als Biomasse gebunden werden, der quantitativ bedeutendste Prozeß auf der Erde. Die Untersuchung der Photosynthese ist daher bereits seit langer Zeit Gegenstand naturwissenschaftlicher Forschung.

Bereits vor mehr als 200 Jahren entdeckte Priestley, daß Pflanzen in der Lage sind, Sauerstoff abzugeben [165]. Ingenhousz zeigte kurz darauf, daß die Entwicklung des Sauerstoffs ein lichtabhängiger Prozeß ist [100]. 1842 formulierte Mayer die These, daß die absorbierte Lichtenergie in Form von chemischer Energie gebunden wird [146]. Die Bruttoreaktionsgleichung der Photosynthese wurde 1925 von Wurmser und in einer allgemeineren Form, die die nicht-oxygenen photosynthetischen Prozesse einiger Bakterien mit einbezog, von van Niel im Jahre 1929 aufgestellt:

$$CO_2 + 2H_2(A) \xrightarrow{h\nu} [CH_2O] + H_2O + 2A \quad , \tag{1.1}$$

wobei $H_2(A)$ für ein oxidierbares Substrat steht: Wasser, Wasserstoff, Schwefelwasserstoff, aber auch einfache organische Moleküle wie Weinsäure oder Isopropanol.
Warburg entdeckte 1919, daß die Photosynthesereaktion eine Licht- und eine Dunkelreaktion umfaßt [210, 211], die beide im Chloroplasten ablaufen, wie Hill 1937 nachwies. Hill zeigte bereits, daß die lichtabhängige Reaktion in der Thylakoidmembran des Chloroplasten erfolgt [90]. Emerson und Mitarbeiter entdeckten schließlich 1957, daß für die oxygene Photosynthese zwei Photosysteme notwendig sind [63]. Kurz darauf entwickelten Hill und Bendall das Z-Schema [91], das von Witt und Mitarbeitern sowie Kok und Hoch experimentell bestätigt wurde [120, 219].
Die moderne Photosyntheseforschung wurde durch die Isolation der lichtabhängigen Reaktionszentren Photosystem I (PSI) und Photosystem II (PSII) der oxigenen Photosynthese [217] sowie des bakteriellen Reaktionszentrums (bRC) der anaeroben Photosynthese [158] eingeleitet. Die photophysikalischen und photochemischen Primärprozesse wurden in neuester Zeit spektroskopisch bis in den Femtosekundenbereich aufgelöst.
Ein entscheidender Durchbruch zum Verständnis der Lichtreaktion war die Strukturaufklärung des bRC [54, 55]. Die Struktur der funktionellen Einheit der lichtinduzierten Ladungstrennung ist damit auf molekularer Ebene bekannt. Die seit kurzem ebenfalls vorliegende Struktur des PSI verdeutlicht, daß der Aufbau der Reaktionszentren sogar zwischen Pflanzen und den anaerob wachsenden Purpurbakterien stark konserviert ist [185].[1]

Die Photosynthese ist somit bereits seit langer Zeit ein Forschungsgebiet von großem Interesse. Bevor der Gesamtprozeß der lichtabhängigen CO_2-Fixierung vollständig aufgeklärt und verstanden sein wird, sind allerdings noch eine Vielzahl von Fragen zu beantworten. Ein noch offener Aspekt, der in dieser Arbeit behandelt wird, ist die Wechselwirkung zwischen den Pigmenten und der Proteinumgebung im Photosystem. Die Funktion der Photosysteme, Lichtenergie in chemische Energie umzuwandeln und zu stabilisieren, geht im wesentlichen auf die spezifische Anordnung der Kofaktoren und ihre Wechselwirkung mit dem Proteingerüst zurück. Auf molekularer Ebene soll durch gerichtete Mutagenese untersucht werden, wie im Protein gebundene Kofaktoren durch Aminosäurereste in ihrer unmittelbaren Umgebung beeinflußt werden.

[1] Eine ausführliche Darstellung der Geschichte der Photosyntheseforschung ist in [99] zu finden.

1.1 Die Lichtreaktion der Photosynthese

Die Photosynthese findet bei Pflanzen und Grünalgen im Chloroplasten statt. Der Plastid enthält ein umfangreiches Membransystem. Es besteht aus den gestapelten diskusförmigen Granathylakoiden und den langgestreckten Stromathylakoiden zwischen den Granastapeln. Die vielfach gefaltete Membran umschließt einen Hohlraum, der als Lumen bezeichnet wird. Die Matrix des Chloroplasten, das Stroma, das durch die innere Chloroplasten- und die Thylakoidmembran begrenzt wird, enthält die Enzyme des Calvin-Zyklus. Diese Proteine reduzieren in einer lichtunabhängigen Reaktion CO_2 zu Kohlenwasserstoffverbindungen (Zucker):

$$\begin{aligned} CO_2 + 2NADPH + 3ATP^{4-} + 2H_2O \xrightarrow{h\nu} \\ [CH_2O] + 2NADP^+ + 3ADP^{3-} + 3HPO_4^{2-} + H^+, \qquad pH = 7-8 \end{aligned} \tag{1.2}$$

Die für diese Reaktion benötigten energiereichen Verbindungen ATP und NADPH werden durch die Lichtreaktion in den Thylakoiden erzeugt. An diesem Prozeß sind im wesentlichen vier integrale Proteinkomplexe der Thylakoidmembran beteiligt: Die beiden Photosysteme PSI und PSII, der Cytochrom b_6f-Komplex und die ATP-Synthase. Daneben sorgen die Lichtsammel-Komplexe (LHC-I, LHC-II) für eine effektive Weiterleitung der Anregungsenergie in die Reaktionszentren. Die löslichen Proteine Plastocyanin oder Cytochrom c_6 sowie Ferredoxin übertragen die Redoxäquivalente zwischen den Proteinkomplexen.

Die Anordnung der am Elektronentransfer beteiligten Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran ist in Abb. 1.1 dargestellt. Die beiden Photosysteme PSI und PSII sind über eine Elektronentransportkette miteinander gekoppelt. Dadurch wird eine Redoxpotentialdifferenz erzeugt, die einerseits die Oxidation von H_2O ($E^\circ = +0,815$ V) und andererseits die Reduktion von $NADP^+$ ($E^\circ = -0,340$ V) unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Diese als Z-Schema [91] bezeichnete Redox-Kaskade ist in Abb. 1.2 dargestellt. Mit dem Elektronentransport geht eine Protonentranslokation über die Thylakoidmembran einher. Die CF_0F_1-ATP-Synthase nutzt den elektrochemischen Potentialgradienten der Protonen für die Erzeugung von ATP. Das für die Kohlenhydratsynthese ebenfalls erforderliche NADPH wird durch die Redoxreaktion mit Ferredoxin aus NADP von der Ferredoxin-Nukleotidreduktase gebildet. Das für die Reduktion notwendige Redoxäquivalent erhält das Ferredoxin aus der lichtabhängigen Reaktion des PSI. Neben

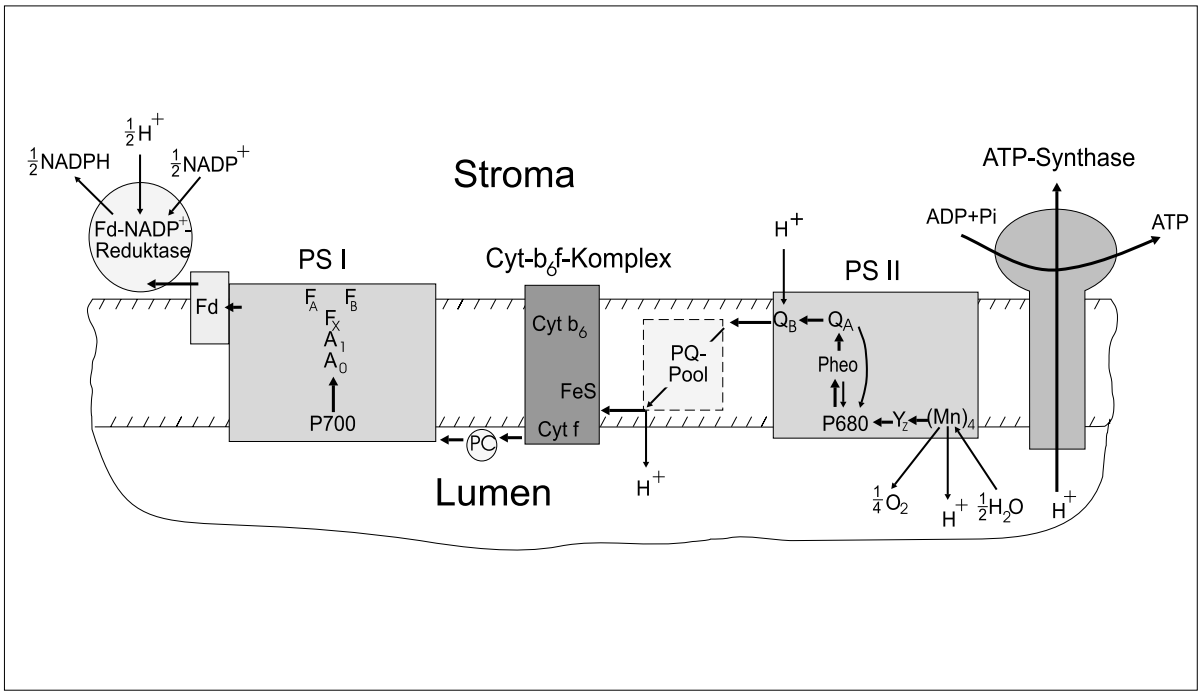

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der an der Lichtreaktion und am Elektronentransfer beteiligten Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran. Das Photosystem II (PSII) reduziert nach zweifacher Lichtanregung das Chinon Q_B zum Hydrochinon, das in den Plastochinonpool wandert. Der Pool wird vom Cytochrom $b_6 7f$-Komplex (Cyt $b_6 f$) unter Protonenabgabe ins Lumen oxidiert und die Elektronen auf das Plastocyanin übertragen. Das lösliche Protein ist der Elektronendonator für das oxidierte P700 im Photosystem I (PSI). Auf der Akzeptorseite des PSI wird das Elektron über drei Eisen-Schwefel-Zentren (F_A, F_B, F_X) und Ferredoxin (Fd) auf $NADP^+$ übertragen.
Das oxidierte P680 wird durch Elektronen aus dem Wasser unter Freisetzung von Sauerstoff und Protonen reduziert. Der Protonengradient zwischen Stroma und Lumen wird von der ATP-Synthase zur Erzeugung von ATP genutzt.

dieser linearen Redoxkaskade vom Wasser zum $NADP^+$, die die Verknüpfung der beiden Photosysteme erfordert, wurde ein zyklischer Elektronentransfer beobachtet, an dem nur PSI beteiligt ist [167]. Ferredoxin überträgt in diesem Fall die Elektronen nicht auf $NADP^+$, sondern sie werden über den Cytochrom $b_6 f$-Komplex [50] oder die Ferredoxin-Nukleotidreduktase [45] wieder ins Lumen zurückgeführt und reduzieren Plastocyanin. Dieses System zur Erzeugung von ATP soll unter folgenden Bedingungen physiologisch aktiv werden [11, 89]:

- Zum Aufbau eines pH-Gradienten auch bei Limitierung des Akzeptors $NADP^+$ zur Deaktivierung von PSII, um unspezifische photochemische Oxidationen durch dieses Photosystem zu vermeiden.

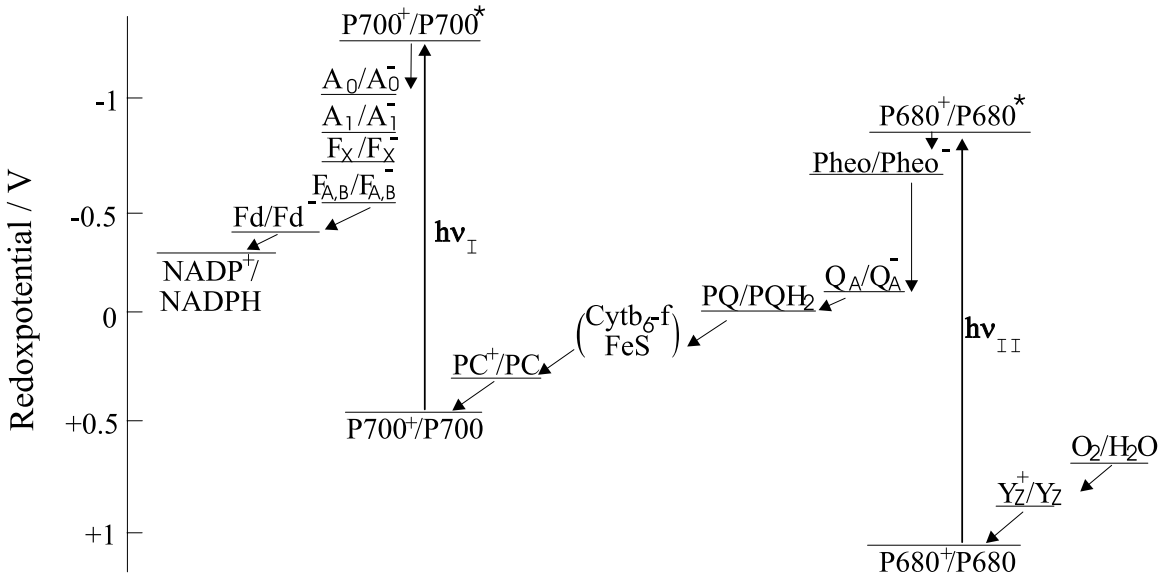

Abbildung 1.2: Komponenten der Elektronentransfer-Kette der beiden Photosysteme PSI und PSII sowie den vermittelnden Redoxproteinen Cytochrom $b_6 7f$ (Cyt $b_6 f$) und Plastocyanin (PC), angeordnet auf einer Redoxskala (Z-Schema). Die einzelnen Kofaktoren sind im Text aufgeführt.

- Als Reservesystem zur Synthese von zusätzlichem ATP, wenn ein erhöhter ATP-Bedarf erforderlich ist (z. B. Stress, N_2-Fixierung).

Für die lichtabhängige ATP-Gewinnung ist also in beschränktem Maße nur PSI als lichtabhängiger Proteinkomplex ausreichend. Eine CO_2-Fixierung ohne Beteiligung von PSI, wie sie von Greenbaum *et al.* [85] postuliert wurde, ist experimentell in detaillierten Untersuchungen von Cournac *et al.* sowie Boichenko ausgeschlossen worden [25, 47].

Einige Bakterienarten besitzen nur ein photosynthetisches Reaktionszentrum. Die Redoxpotentialdifferenz dieses Photosystems reicht in diesen Organismen nicht aus, um Wasser zu oxidieren. Als Elektronenquelle werden reduzierte Schwefelverbindungen, molekularer Wasserstoff oder einfache organische Verbindungen wie Succinat oder Propionat genutzt. Die Blaualgen[2], die als Vorläufer der Chloroplasten angesehen werden, besitzen wie Pflanzen und Grünalgen die beiden Photosysteme PSI und PSII und sind dadurch zu autotrophem Wachstum fähig.

[2] Die Bezeichnung „Alge“ ist historisch bedingt, systematisch allerdings nicht korrekt, da es sich um Prokaryonten handelt. Der Name „Blaubakterie “ hat sich jedoch nicht durchgesetzt.

1.2 Photosynthetische Reaktionszentren

Alle photosynthetischen Proteinkomplexe, die auch als Reaktionszentren bezeichnet werden, ähneln sich in bezug auf die Struktur und die Anordnung der am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren. Auch die in den Reaktionszentren ablaufenden kinetischen Prozesse sind weitgehend vergleichbar [81, 144]. In allen Fällen besteht P, der primäre Elektronendonator, aus zwei parallel angeordneten (Bakterio-)Chlorophyll[(B)Chl]-Molekülen, der primäre Akzeptor A_0 ist ein monomeres Chl oder (Bakterio)-Phäophytin [(B)Phe] und der sekundäre Akzeptor A_1 ein Chinon. Der strukturelle Aufbau ist bei allen Reaktionszentren homolog, obwohl die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Proteinkomplexe wenige Übereinstimmungen aufweisen.
Die oben genannten Kofaktoren werden von zwei homologen Proteinuntereinheiten oder einem Homodimer mit einer näherungsweise zweizähligen Symmetrieachse (Pseudo-C_2-Achse) gebunden. Fünf Transmembranhelices jeder dieser Untereinheiten bilden zusammen das Proteingerüst für den Elektronendonator und die Akzeptoren [185].

Die lichtabhängige Redoxreaktion der photosynthetischen Proteinkomplexe läuft im PSI, PSII und dem bRC jeweils nach dem gleichen Prinzip ab: Ein Photon wird vom Reaktionszentrum selbst oder den umgebenden Antennenkomplexen (LHC in Pflanzen und Grünalgen) absorbiert. Die Anregungsenergie wird zum primären Elektronendonator P transferiert. Dieses Pigment gibt aus dem untersten angeregten Singulettzustand ein Elektron an den primären Akzeptor ab. Bevor eine Rekombination des ladungsgetrennten Zustandes erfolgt, wird das Elektron auf weitere Akzeptoren übertragen bis ein relativ langlebiger Zustand erreicht ist. Aufgrund der unterschiedlichen terminalen Akzeptoren werden die Reaktionszentren in zwei Klassen eingeteilt:

- Die Typ-I-Reaktionszentren enthalten als terminale Akzeptoren drei Eisen-Schwefel-Cluster, die über Cysteinbrücken im Protein koordiniert werden. Hierzu zählen: PSI, die Reaktionszentren der grünen Schwefelbakterien sowie Vertreter der Heliobakterien [33, 134]. Die beiden letzteren Species besitzen ein aus einem Homodimer gebildetes Reaktionszentrum.

- In Typ-II-Reaktionszentren wird das Elektron terminal auf ein weiteres Chinonmolekül übertragen, das mit Q_B bezeichnet wird. Nach einer weiteren lichtinduzierten

Ladungstrennung verläßt das Q_B unter Protonenaufnahme als Hydrochinon das Reaktionszentrum, wandert in die Lipidmembran und diffundiert zum Cytochrom b_6f-Komplex. Das im Reaktionszentrum fehlende Chinon wird durch ein oxidiertes Chinon aus dem Membranpool ersetzt. PSII und die bRC der Purpurbakterien sind neben Photosystemen aus grünen filamentösen Bakterien Vertreter dieses Typ-II-Reaktionszentrums.

1.2.1 Das bakterielle Reaktionszentrum

Die bRC aus *Rhodopseudomonas (Rps.) viridis* und *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides* sind aufgrund der hochaufgelösten Proteinstrukturen, [54, 57] bzw. [1, 199], die Reaktionszentren, deren Struktur und Funktion am besten untersucht wurden. Da im Aufbau und in der Funktion der Reaktionszentren große Übereinstimmungen bestehen, werden Untersuchungen an den anderen Photosystemen oft vergleichbare Messungen am bRC gegenübergestellt. Die Struktur des bRC aus *Rb. sphaeroides* wird daher kurz vorgestellt. Ausführlichere Beschreibungen des bRC sind in vielen Übersichtsartikeln oder Sammelbänden nachzulesen (z. B. [23, 56, 68]). Das bRC aus *Rb. sphaeroides* besteht aus drei Proteinuntereinheiten, die nach ihrem Molekulargewicht mit L (helles grau), M (grau), und H (dunkles grau) (*light, medium* bzw. *heavy*) bezeichnet werden. Die homologen Untereinheiten L und M sind nahezu symmetrisch zu einer Pseudo-C_2-Achse angeordnet (Abb. 1.3). Der Proteinkomplex enthält neben einem Carotinoid und einem Nicht-Häm-Eisen (Fe^{2+}) acht Pigmente: Zwei BChl *a*-Moleküle bilden ein BChl-Dimer, das sogenannte *special pair* [157]. Sie formen den primären Elektronendonator und befinden sich im Proteinkomplex nahe der periplasmatischen Seite der Zellmembran. Die Ebenen dieser beiden BChl *a*-Moleküle sind nahezu parallel zueinander in einem Abstand von 3,5 Å angeordnet [64, 199] (Abb. 1.4).

In Richtung des Cytoplasmas folgen in der L- bzw. M-Untereinheit zwei monomere BChl *a*-Pigmente, die als *accessory pigments* bezeichnet werden, zwei BPhe *a* und zwei Ubichinone (Q_A, Q_B). Die genannten Pigmente bilden zwei symmetrische Kofaktor-Zweige. Der Elektronentransfer im bRC erfolgt bis zum Q_A ausschließlich entlang der

Abbildung 1.3: Quartärstruktur des bRC aus *Rb. sphaeroides* nach der Röntgenstrukturanalyse [199] (Brookhaven Data Bank Eintrag: 1AIJ). Dargestellt sind die einzelnen Proteinuntereinheiten (Untereinheit H, dunkelgrau, ist entgegen der üblichen Anordnung oben, L, hellgrau, rechts und M, grau, links positioniert) weiterhin sind die BChl, BPh und die beiden Ubichinone eingezeichnet.

L-Untereinheit [65, 68].

$$\begin{aligned} \mathrm{PB_AH_AQ_AQ_B} &\xrightarrow{h\nu} \mathrm{P^*B_AH_AQ_AQ_B} \xrightarrow{3\ \mathrm{ps}} \mathrm{P^+B_AH_A^-Q_AQ_B} \\ \mathrm{P^+B_AH_A^-Q_AQ_B} &\xrightarrow{\sim 200\ ps} \mathrm{P^+B_AH_AQ_A^-Q_B} \xrightarrow{\sim 100\ \mu s} \mathrm{P^+B_AH_AQ_AQ_B^-} \end{aligned} \tag{1.3}$$

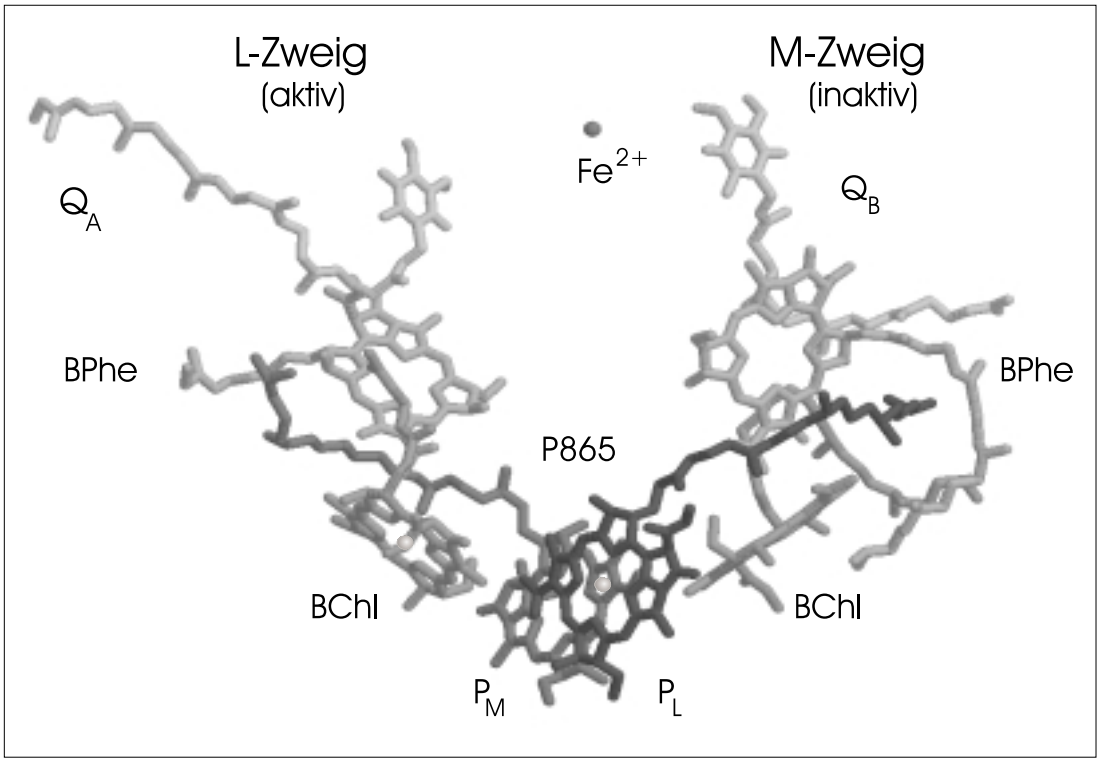

Abbildung 1.4: Kofaktorzweige aus der Kristallstruktur des bRC von *Rb. sphaeroides* nach [199]. Die Pseudo-C_2-Achse verläuft vom primären Donator P865 zum Nicht-Häm-Eisenion. Die Kofaktoren sind: P865, BChl *a*-Dimer; BChl, Bakteriochlorophyll *a*; BPhe, Bakteriophäophytin *a*; Q_A, Q_B, Ubichinon-10.

1.2.2 Photosystem I

Der PSI-Komplex befindet sich überwiegend in den laminaren, nicht gestapelten Bereichen der Thylakoidmembran. Enzymatisch betrachtet, katalysiert das Photosystem I die Oxidation von Plastocyanin bzw. Cytochrom c_6 im Lumen und die Reduktion von Ferredoxin im Stroma des Chloroplasten in einer lichtabhängigen Reaktion [41, 81]. Die Redoxpotentialdifferenz, die bei dieser Reaktion überwunden wird, beträgt etwa 700 mV.

Der Proteinkomplex besteht in Pflanzen und Grünalgen aus mindestens 13 Proteinuntereinheiten, die mit PsaA bis PsaL sowie PsaN bezeichnet werden.[3] Darüber hinaus sind im PSI etwa 100 Chlorophylle, 13 bis 15 β-Karotine, zwei Phyllochinone (Vitamin K_1-Moleküle) und drei Eisen-Schwefel-Cluster gebunden [41, 79, 81]. Die am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren werden durch PsaA und PsaB sowie durch PsaC, das die

[3] Die Untereinheit PsaM ist nur im PSI von Cyanobakterien vorhanden.

terminalen Eisen-Schwefel-Cluster F_A und F_B bindet, koordiniert. Mit dem PSI-Komplex sind in höheren Pflanzen und Grünalgen die LHC-I und abhängig von den physiologischen Bedingungen LHC-II assoziiert [118]. In der vorliegenden Arbeit werden diese Komponenten jedoch nicht als Bestandteil des PSI-Komplexes betrachtet.[4] Die beiden mit 80 kDa größten Untereinheiten PsaA und PsaB besitzen eine zu 80 % identische Aminosäuresequenz mit jeweils 11 Transmembranhelices [71, 204]. Die fünf C-terminalen Helices bilden in einer Art Käfig den Teil des Proteinkomplexes, in dem die Ladungstrennung und der Elektronentransfer ablaufen [185]. Eine schematische Darstellung des PSI-Komplexes mit den Proteinuntereinheiten, die am Elektrontransfer beteiligt sind, ist in Abb. 1.5 zu sehen.

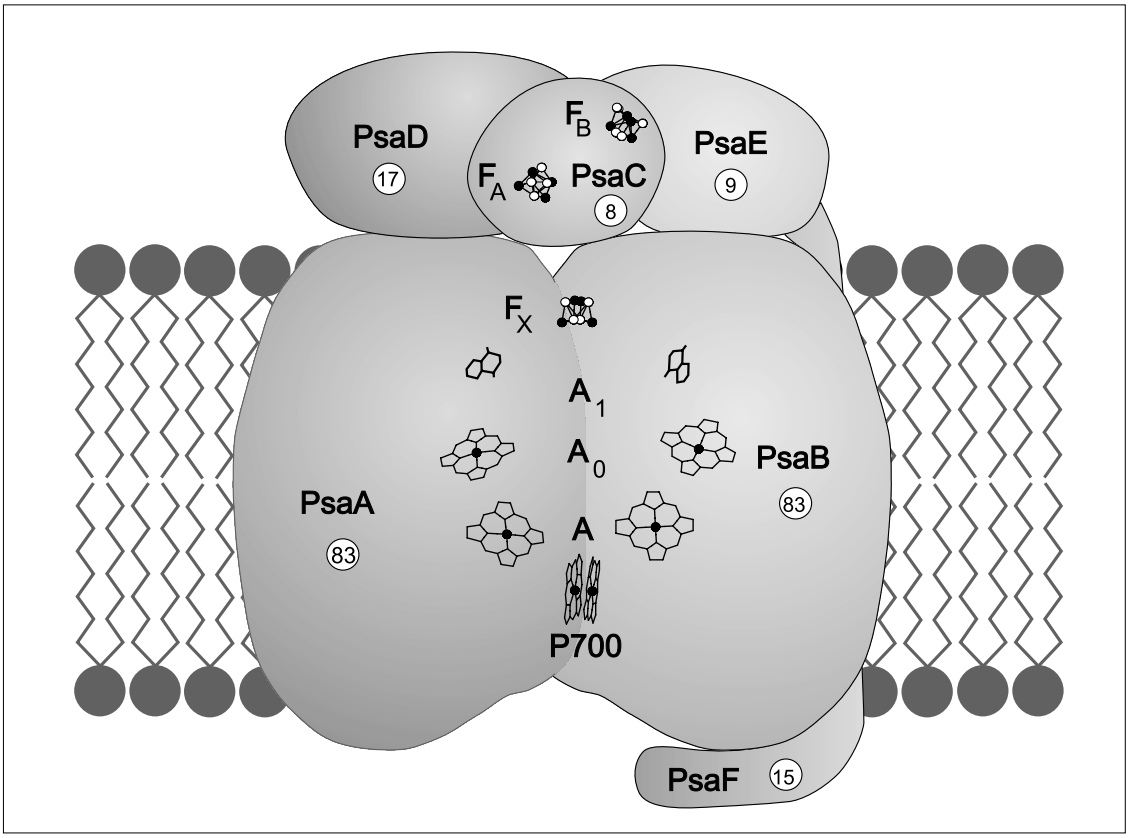

Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des PSI-Komplexes in der Thylakoidmembran. Gezeigt sind nur die am Elektronentransfer und die an der Bindung der löslichen Redoxproteine beteiligten Proteinuntereinheiten und Kofaktoren. Die Zahlen in Kreisen geben die Größe der einzelnen Proteine in kDa an. Die Positionen der Kofaktoren sind der Röntgenstrukturanalyse und EPR-Daten entnommen [184] bzw. [17, 224].

[4] Die Bezeichnung „PSI-Komplex“ wird in der Literatur nicht einheitlich verwendet. In einigen Fällen werden die LHC-I auch als Bestandteil des PSI-Komplexes angesehen.

Nach der Anregung des primären Elektronendonators P700, zwei eng benachbarten Chl *a*-Molekülen, wird das Elektron auf den ersten Akzeptor A_0, ein Chl *a*-Monomer, übertragen. Anschließend gelangt das Elektron über den sekundären Akzeptor A_1, ein Phyllochinon, zu den Eisen-Schwefel-Clustern F_X, F_A und schließlich zum F_B [59], um dort das reversibel gebundene Ferredoxin zu reduzieren [80]. Das oxidierte $P700^{+\bullet}$ wird durch das lösliche Plastocyanin, das sich im Lumen der Thylakoide befindet, wieder reduziert.
Die Kinetiken der Elektronentransferraten in Abb. 1.6 verdeutlichen, daß die Vorwärtsreaktionen gegenüber den Rekombinationsraten mindestens um den Faktor 10^3 schneller sind. Diese Tatsache und der effektive Energietransfer von den Antennenchlorophyllen zum primären Donator sind die Ursache für die maximale Quantenausbeute von nahezu 100 %.

Die Kristallstruktur des PSI aus den Cyanobakterien *Synechococcus (S.) elongatus* wurde bis zu einer Auflösung von 4 Å bestimmt [184]. Die Positionen der am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren innerhalb des Proteingerüstes wurden einschließlich einer postulierten Position des sekundären Akzeptors [17, 106] identifiziert. Beim Vergleich der in Abb. 1.7 dargestellten Kofaktoren des PSI mit dem bRC (Abb. 1.4) wird die Analogie im Aufbau der Reaktionszentren deutlich.
Aufgrund der geringen Auflösung der PSI-Struktur ist die Ligandierung der Kofaktoren durch das Proteingerüst mit Ausnahme der Eisen-Schwefel-Cluster[5] im Gegensatz zum bRC bisher nicht bekannt.

[5] Die Bindung dieser Kofaktoren durch die Proteinuntereinheiten ergibt sich aus einer hochkonservierten Aminosäuresequenz [80].

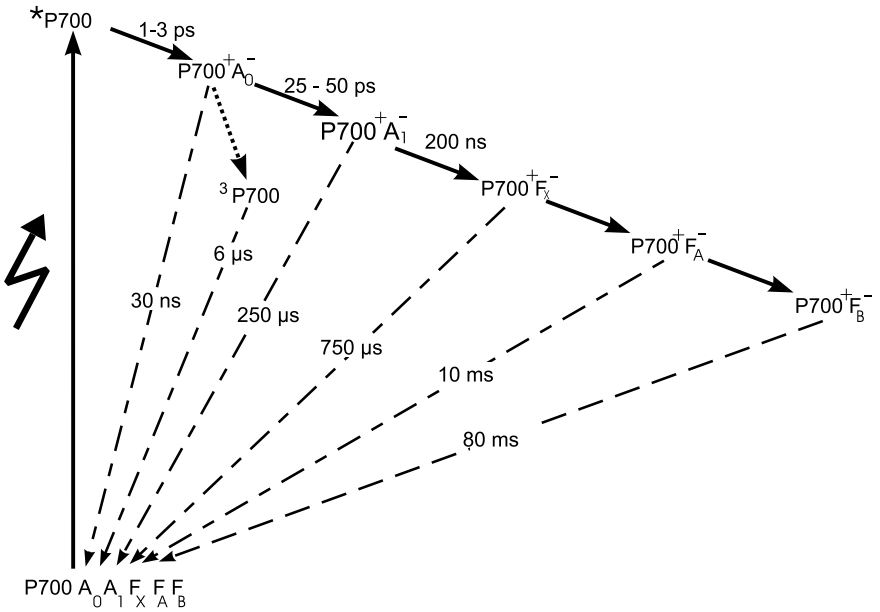

Abbildung 1.6: Kinetik des Elektronentransfers im PSI bei Raumtemperatur. Die Werte wurden den Angaben in [32] entnommen.

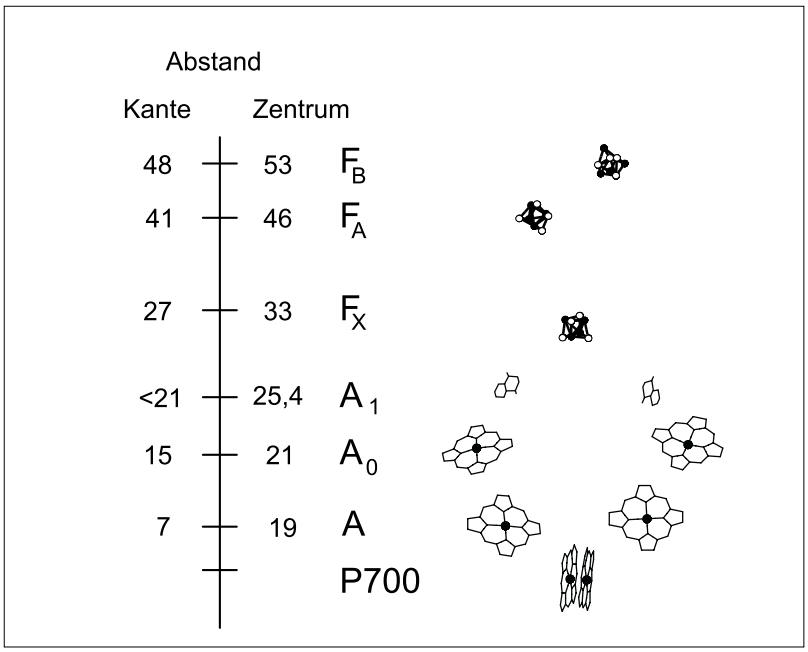

Abbildung 1.7: Anordnung der am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren auf Grundlage der Röntgenstrukturanalyse [184] mit Ausnahme der Position der beiden Chinone, die aus EPR-Experimenten ermittelt wurde (unter der Annahme eines symmetrischen Einbaus dieser beiden Pigmente) [17, 224]. Angegeben sind die kürzesten Abstände zwischen den Kofaktoren und P700 (Kante) und zwischen den Schwerpunkten dieser Pigmente (Zentrum).

1.3 Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Die Anregung des primären Elektronendonators P700 und die Übertragung eines Elektrons aus dem angeregten Singulett-Zustand $P700^*$ auf den Akzeptor A_0 stehen am Anfang der lichtinduzierten Redoxreaktionen des PSI. Dieses aus zwei Chl *a*-Molekülen bestehende Pigment stellt die Schlüsselkomponente für die Funktion des Proteinkomplexes dar. Der primäre Elektronendonator wurde bereits umfassend durch verschiedene spektroskopische Methoden analysiert, wie erst kürzlich in einem Übersichtsartikel von Brettel zusammenfassend dargestellt wurde [32]. Nicht geklärt wurde bislang jedoch, ob die beiden in der Röntgenstruktur des PSI identifizierten Chl *a*-Moleküle, die P700 bilden, ein gemeinsames Molekülorbital besitzen. In diesem Fall würde der primäre Elektronendonator ein elektronisch gekoppeltes Supermolekül darstellen. Besteht zwischen diesen beiden Pigmenten keine Überlagerung der elektronischen Wellenfunktionen der einzelnen Moleküle, beeinflussen sich diese beiden Chl nur aufgrund ihrer elektrostatischen und excitonischen Wechselwirkung; sie bilden jedoch kein supermolekulares System.

Einen in diesem Zusammenhang besonders wichtigen Beitrag lieferte Käß durch EPR/ENDOR-Experimente am PSI-Kristall aus *S. elongatus*. Diese Messungen zeigten, daß das ungepaarte Elektron im $P700^{+\bullet}$ überwiegend oder vollständig auf einem der beiden Chl *a*-Moleküle lokalisiert ist. Darüber hinaus wurde von Käß die Anordnung dieses spintragenden Chl *a* im PSI in bezug auf die Kristallachsen bestimmt [109].

Obwohl die Position und die Orientierung dieses Pigmentes im Proteingerüst bekannt sind, ist die Ursache für seine besonderen Eigenschaften, zum Beispiel das geringe Redoxpotential und die Verteilung des ungepaarten Elektrons im ladungsgetrennten Zustand, nicht verstanden. Von besonderer Bedeutung für die Funktion von P700 ist daher die Einbindung dieses Kofaktors in das Proteingerüst des PSI-Komplexes.

Die Liganden des primären Elektronendonators wurden bisher aufgrund der geringen Auflösung der Röntgenstrukturanalyse nicht zugeordnet. Von einer Koordinierung der Mg-Atome der beiden Chlorophylle durch eine Aminosäureseitenkette des Proteingerüstes ist jedoch auszugehen, da dieses Metallion im Chlorophyll mindestens fünffach koordiniert wird [5]. In den bekannten Strukturen des bRC werden die zentralen Mg-Atome der gebundenen BChl ausschließlich durch den Imidazolring der Aminosäure Histidin (His)

ligandiert [57, 199].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die axialen Liganden des primären Elektronendonators im Proteingerüst des PSI zu identifizieren und ihren Einfluß auf die Funktion dieses Kofaktors zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollen einzelne Aminosäuren der beiden großen Proteinuntereinheiten PsaA und PsaB des PSI ausgetauscht und die Auswirkungen auf die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von P700 analysiert werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse wird insbesondere berücksichtigt, ob die durch die Mutationen hervorgerufenen Veränderungen, die am P700 beobachtet werden, im Rahmen eines elektronisch gekoppelten Chl-Dimer-Modells zu erklären sind.
Die Einführung der Mutationen und die Isolierung des PSI werden an der Grünalge *Chlamydomonas (C.) reinhardtii* durchgeführt. Der Aufbau des Photosyntheseapparates von *C. reinhardtii* ist mit dem höherer Pflanzen nahezu identisch. Gegenüber diesen besitzt die Grünalge die Vorzüge, daß gerichtete Mutationen im Chloroplastengenom einfacher zu generieren sind und aufgrund der schnellen Generationsfolge in relativ kurzer Zeit überprüft werden können. Die einfache Anzucht im Labormaßstab hat darüber hinaus dafür gesorgt, daß dieser Organismus als molekularbiologisches Modellsystem für die oxygene Photosynthese in Pflanzen verwendet wird [88].
Vor der Analyse der mutierten PSI-Komplexe sind einige Vorarbeiten notwendig gewesen:

- Die Isolierung des PSI-Komplexes aus *C. reinhardtii* wird gegenüber den bislang verwendeten Verfahren modifiziert.

- Der angereicherte PSI-Komplex aus *C. reinhardtii*, der keine Mutation trägt, wird eingehend biochemisch und biophysikalisch charakterisiert.

Die Ergebnisse dieser beiden zuletzt genannten Punkte sind den Untersuchungen an den mutierten PSI-Komplexen vorangestellt.

2

Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme stammen von den Firmen Boehringer Mannheim, Biomol (β-n-Dodecylmaltosid), Merck, Sigma, Roth und Serva. Die Reinheit der bezogenen Substanzen entsprach p.a.-Qualität.

2.2 Puffer und Lösungen

PSI-Präparation und Chromatographie:

P1: 50 mM Tricin pH 7,5; 10 mM EDTA

P2: 20 mM Tricin pH 7,5; 10 mM EDTA

T1: 20 mM Tricin pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,02 % β-DM

T2: wie T1 mit 30 mM NaCl

M1: 20 mM MES; pH 6,5; 1 mM EDTA; 1 mM $MgCl_2$; 0,02 % β-DM

M2: wie M1 mit 250 mM $MgCl_2$

Probenpuffer SDS-PAGE 2-fach konzentriert:

20 mM Tris; 2 mM EDTA; 5 % SDS, 0,2 % 1,4-Dithiothreitol; 0,02 % Bromphenolblau

Puffer für Western-Blots und Antikörperreaktionen:

Towbin Transferpuffer: 20 % Methanol; 192 mM Glycin; 25 mM Tris pH 8,2-8,4; 0,1 % SDS

TBS (Tris-buffered-saline): 100 mM Tris; 0,9 % (w/v) NaCl; pH 8,2

2.3 Molekularbiologie

Für die Durchführung der im weiteren beschriebenen molekularbiologischen Arbeiten wurden Standardtechniken und -verfahren verwendet, die in einschlägigen Sammelwerken nachzulesen sind (z. B. Sambrook, Fritsch & Maniatis: Molecular Cloning (1989) [179]).

2.3.1 *in vitro* Mutagenese

In die im Chloroplastengenom vorliegenden Gene *psaA* und *psaB*, die die beiden großen Proteinuntereinheiten kodieren, wurden Punktmutationen eingebracht. Die DNA-Sequenz wurde so manipuliert, daß eine einzelne Aminosäure in den entsprechenden Proteinuntereinheiten PsaA und PsaB ausgetauscht wurde. Die Gene, die für diese beiden Polypeptide kodieren, wurden dazu aus der Chloroplasten-DNA isoliert, in *Escherichia (E.) coli*-Plasmide integriert und amplifiziert. Für die *in vitro* Mutagenese wurde ein Fragment des *psaA*- oder *psaB*-Genes in einen Phagenvektor kloniert und mutiert. Nach der Rückklonierung in das Plasmid wurden für die spätere Selektion in der Grünalge eine Spectinomycin-Resistenz (*aadA-Kassette*) in einem nicht-kodierenden Bereich der Proteinsequenz sowie eine „stille“ Mutation eingefügt. Nach der Verifizierung der Mutation durch Sequenzierung wurden die mutierten Plasmide aus *E. coli* isoliert und für die Transformation von *C. reinhardtii* verwendet. Die Strategie zur Einführung von Punktmutationen wird schematisch am Beispiel des *psaB*-Gens in Abb. 2.1 dargestellt. Im folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte kurz aufgeführt:

Das *Eco*RI–*Pst*I-Fragment der Chloroplasten-DNA, das das *psaB*-Gen und einen Teil des *rbcL*-Gens enthält [15], wurde in pUC19 [223] kloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit pG528G bezeichnet. Zusätzlich wurde eine stille Mutation an der Codonposition 528 im *psaB*-Gen eingefügt, die eine *Stu*I-Schnittstelle generiert, aber die Aminosäure-

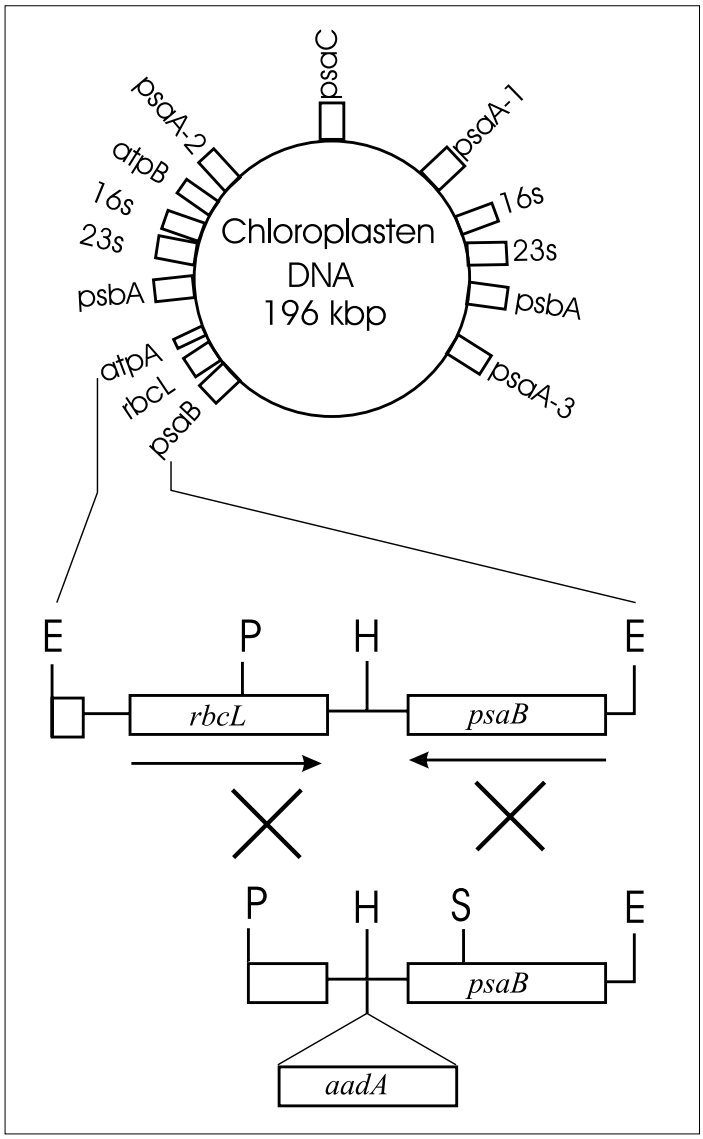

Abbildung 2.1: Chloroplasten-DNA-Karte von *C. reinhardtii* mit Klonierungsstrategie zur Einführung von Punktmutationen. Das *psaB*-Gen liegt innerhalb des *Eco*RI (E) Restriktionsenzymfragmentes E14 [15, 88]. Das zu transformierende *Eco*RI–*Pst*I(P)-Fragment enthält eine zusätzliche *Stu*I(S)-Schnittstelle, die durch eine „stille“ Mutation generiert wurde, die gerichtete Mutation und das chimäre Gen *aadA*, das in die *Hinc*II(H)-Schnittstelle kloniert wurde.

sequenz des Proteins nicht verändert. Das chimäre Genkonstrukt *aadA* [15, 79] wurde in eine *Hinc*II-Schnittstelle kloniert, die sich in der Region zwischen den beiden Genen *psaB* und *rbcL* befindet. Durch diese Manipulation wird die Spectinomycinresistenz eingebracht. Dieses Plasmid wurde mit pG528G-S bezeichnet.

Ein *Bam*HI–*Pst*I-Fragment von pG528G wurde in den Phagenvektor M13mp19 [223] subkloniert. Für die Mutagenese wurde einzelsträngige Phagen-DNA präpariert. Die *in vitro*-

Mutagenese wurde nach Kunkel [126] mit synthetischen Oligonukleotiden (TIB Molbiol, MWG Biotech) durchgeführt. Nach der Verifizierung der Mutation durch Sequenzierung wurde das *Stu*I–*Ban*II-Fragment des *psaB*-Gens vom M13-Vektor in pG528G-S subkloniert. Dieses Plasmid wurde für die Transformation der Mutation in *C. reinhardtii* verwendet.

Mutationen in *psaA* wurden in analoger Weise eingeführt: Ein *Avr*II–*Bam*HI-Fragment der Chloroplasten-DNA, das einen Teil des *psaA*-Exons-3 enthält, wurde kloniert und als Vorlage für die Mutagenese genutzt. Das *aadA*-Gen wurde in 5′-Richtung vor dem *psaA*-Exon-3 durch eine *blunt-end*-Ligation in eine *Eco*RI-Restriktionsstelle integriert. Dieses Konstrukt wurde für die Transformation in *C. reinhardtii* verwendet [131].

2.3.2 Kultivierung und Transformation von *C. reinhardtii*

Zellstämme und Anzuchtmedien

Die Kultivierung und Anzucht von *C. reinhardtii* erfolgte entsprechend den Angaben von Harris [88]. Die verwendeten Zellstämme der Grünalge *C. reinhardtii* waren: CC125 mt^+, FUD7 mt^- [14], CC2696 mt^+ [160]. Die Zellen wurden auf Agarplatten (1,8 %) mit Tris-Acetat-Phosphat-Medium (TAP) [88] gehalten. Flüssigkulturen wurden im Sueoka-Hoch-Salz-Medium mit Acetat (HSA) unter Dauerlicht mit einer geringen Lichtleistung ($\leq 1\mu$E $m^{-2}s^{-1}$) angezogen [88].

Chloroplastentransformation

Die Chloroplastentransformation wurde analog zu der von Boynten *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt [26]. Das Medium enthielt zur Selektion das Antibiotikum Spectinomycin (100 μg/ml) [82]. Dadurch wurde sichergestellt, daß sich nur die Zellen vermehrten, die das manipulierte DNA-Fragment ins Chloroplastengenom integriert hatten.

Für die Transformation wurde hochreine Plasmid-DNA aus *E. coli* isoliert, die in *psaA* oder *psaB* eine Punktmutation enthielt. Pro Transformation wurden 6 μg der DNA auf 60 mg Wolfram- oder Goldpartikel (Biorad) aufgebracht und in 60 μl Ethanol resuspendiert [14].

Eine *C. reinhardtii*-Kultur wurde bis zu einer Dichte von 10^6 Zellen/ml angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert (1000 g) und in TAP in 1 % des Ausgangsvolumens resuspendiert. 600 μl dieser Zellsuspension wurden auf eine Agarplatte mit TAP-Medium gleichmäßig ausgestrichen, die 100 μg/ml des Antibiotikums Spectinomycin enthielt.
Die Transformation wurde mit einer Biolistic Bombardment Apparatur^{TM} (Biorad) durchgeführt, die schematisch in Abb. 2.2 dargestellt ist. Die Agarplatte mit den Zellen wurde

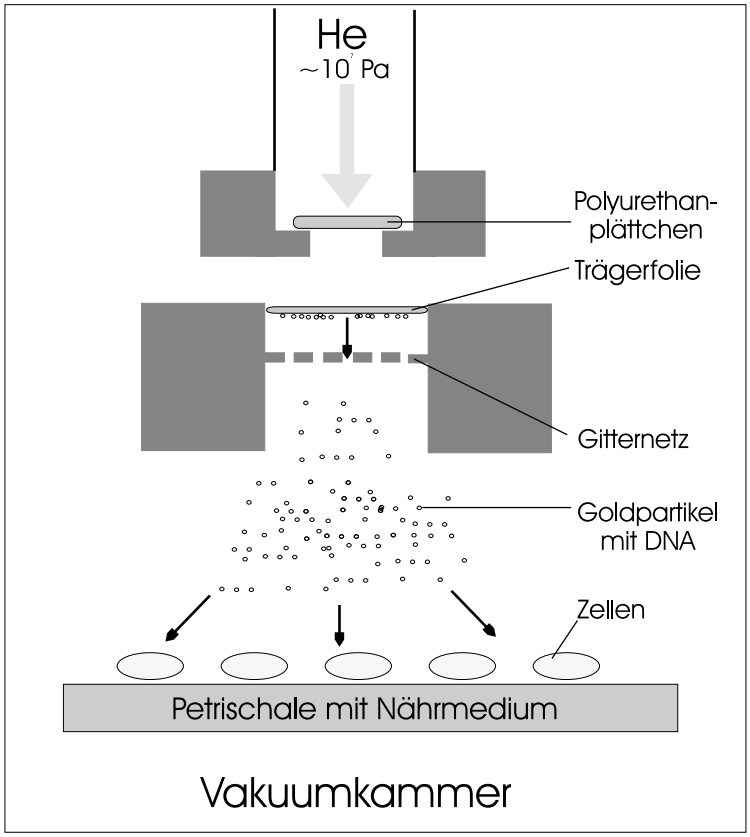

Abbildung 2.2: Schemazeichnung der Biolistic Bombardment Apparatur^{TM} (Biorad).

auf die unterste Ebene der Vakuumkammer gestellt. 10 μl der DNA/Ethanol-Suspension (entsprechend 1 μg Plasmid) wurden auf eine Trägerfolie aufgetragen und diese 7/8 Inch (22 mm) unterhalb eines etwa 1 mm starken Polyurethanplättchens von 1 cm Durchmesser in die Halterung justiert.
Die Apparatur wurde geschlossen und ein Vakuum von $6{,}7\times10^3$ Pa angelegt. Anschließend wurde das Ventil der Heliumdruckgasflasche geöffnet. Bei einem Druck von $\geq 8 \times 10^6$ Pa reißt das Polyurethanplättchen. Durch den plötzlichen Druckanstieg wird die Trägerfolie

mit der DNA beschleunigt. Die Folie wird durch ein Gitternetz gestoppt, so daß nur die Partikel mit der DNA auf die Agarplatte „geschossen“ werden. Nach etwa 7–10 Tagen sind auf dem Medium einzelne Kolonien zu erkennen, die gegen Spectinomycin resistent sind. Diese Klone wurden isoliert [214] und die Chloroplasten-DNA analysiert: Ein 1 kb großes Fragment des mutierten Gens wurde durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Stu*I verdaut. Die DNA wurde durch Gelelektrophorese in einem 1,5 % Agarosegel nach Größe aufgetrennt. Enthielt der isolierte Klon das mutierte *psaA*- oder *psaB*-Gen, so war neben der Punktmutation, die zu einer Aminosäuresubstitution führt, die stille Mutation vorhanden, die eine *Stu*I-Schnittstelle generiert. Im Agarosegel war dies durch eine zusätzliche DNA-Bande zu erkennen, die in nicht mutierten Klonen nicht auftrat.

Da die Chloroplasten-DNA in mehreren Kopien in diesem Organell vorliegt, führte die homologe Rekombination zunächst zu heterologen Klonen, die sowohl das mutierte als auch das unveränderte Gen enthielten. Nach weiteren Vereinzelungen mit PCR-Kontrolle wurden homologe Klone isoliert. Vor der Isolierung des PSI-Komplexes wurden die Mutationen durch Sequenzierung der Chloroplasten-DNA verifiziert.

PCR-Protokoll

PCR-Ansätze betrugen 25 μl oder 50 μl. Verwendet wurde Taq-Polymerase (Appligene) nach den Angaben des Herstellers. Die Primerkonzentration lag zwischen 10–50 pmol/ Ansatz. Alle Lösungen wurden auf Eis gehalten und vereinigt. Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert und in den auf 95° vortemperierten Heizblock gestellt. Anschließend wurde das PCR-Programm gestartet.

PCR-Programm (Twin Cycler/Perkin Elmer):

1 min	95°C
30 Zyklen	
30 s	95°C
20 s	50°C
45 s	72°C
Abschlußsequenz	
5 min	72°C
∞	8°C

2.4 Proteinreinigung und Analyse

2.4.1 Chromatographie

Für die chromatographischen Trennungen wurde eine Chromatographie-Anlage der Firma Biorad (MPLC ^{TM}) verwendet. Alle Säulenmaterialien wurden von Pharmacia bezogen. Die für Mitteldruck geeigneten Säulenkartuschen (Pharmacia) wurden manuell nach den Angaben des Herstellers befüllt. Die verwendeten Materialien und die Parameter die für die Trennung benutz wurden werden detailliert im Ergebnisteil unter 3 beschrieben.

2.4.2 Proteinanalytik

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für die denaturierende Gelelektrophorese wurde die Phast-System-Einheit (Pharmacia) verwendet. Zur Auftrennung der Proteinproben wurden ausschließlich HD-Gele (Pharmacia) benutzt.
Die aufgetragene Probenmenge betrug 2 μl; die Chlorophyllkonzentration lag abhängig von der Reinheit der Probe zwischen 20–50 μM [Chl], entsprechend 1 bis 2 μg Protein. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit zweifach konzentriertem Probenpuffer (s. 2.2) versetzt und 10 min lang bei 60°C denaturiert. Die Laufzeit der Gele betrug 30 min bei einem Energieverbrauch von 230 VAh.

Western-Blotting

Western-Blots wurden im *semi-dry*-Verfahren mit dem Phast-System (Pharmacia) durchgeführt. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinyldendifluorid-Membran (Millipore) transferiert. Die Transferzeit betrug etwa 60 min bei einem konstanten Strom von 25 mA.

Der Protein-Blot wurde durch 5 % Magermilchpulver in TBS abgesättigt und anschließend ausreichend mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur in TBS. Nach dem Waschen der Membran mit TBS wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen-Antikörper, Boehringer) für 2–3 h inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase wurde

durch FastRed (Sigma) nachgewiesen.
Die primären gereinigten Antikörper gegen PSI-Untereinheiten und LHC I wurden von Kevin Redding (Arbeitsgruppe J.-D. Rochaix, Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt und in folgenden Verdünnungen angewandt:

Antikörper	17.2 (LHC)	18.1(LHC)	PsaA	PsaD	PsaF
Verdünnung	1:1000	1:1000	1:2000	1:1000	1:500

Der Antikörper gegen die ATP-Synthase wurde 1:2000 verdünnt. Diese Immunglobuline wurden von Athina Zouni (Arbeitsgrupppe: P. Fromme/ H.-T. Witt, Max-Volmer-Institut) bereitgestellt.

2.5 Optische Spektroskopie

2.5.1 Absorptions(-differenz)spektroskopie

Die optischen Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 5E (2E) Spektralphotometer der Firma Varian aufgenommen. Dieses Spektrometer wird im Zweistrahlmodus mit Luft als Referenz benutzt.

Absorptionsmessungen bei Raumtemperatur

Die Konzentration der Proben im Meßbereich lag unterhalb einer Extinktion von 1. Der Lichtweg durch die Probe betrug 1 cm. Die Spektren wurden in einem Bereich zwischen 350–800 nm mit einer Spaltbreite von 2 nm aufgenommen. Der Abstand der einzelnen Meßpunkte betrug 0,2 nm, die Aufnahmegeschwindigkeit 200 nm/min. Vor der Messung der Probe wurde eine Basislinie gespeichert. Hierzu wurde jeweils der reine Puffer verwendet.

Pigmentbestimmungen wurden an Acetonextrakten der Proteinproben durchgeführt: Zu 200 μl der wässrigen Probe wurden 800 μl Aceton gegeben und gut vermischt. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt (5 min 8.000 g) und der

Überstand in die Küvette überführt. Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration und des Verhältnisses von Chl a/Chl b erfolgte nach Porra [164] mit den dort angegebenen Extinktionskoeffizienten.

Tieftemperaturmessungen

Bei Tieftemperaturmessungen bis 77 K wurde ein Stickstoff-Bad-Kryostat (Oxford Instruments DN 1710) verwendet. Für Messungen bei 5 K wurde ein Heliumdurchflußkryostat der gleichen Firma (CF 1204) eingesetzt. Beide Kryostaten waren an einem Temperaturkontrollsystem ITC 4 von Oxford Instruments angeschlossen. Die Kryostaten wurden in einen im Eigenbau gefertigten Halter im Strahlengang des Spektrometers arretiert. Bei Differenzmessungen blieb die Position des Kryostaten zwischen den Messungen unverändert. Die Konzentration der Proben wurde so gewählt, daß die Absorption im Meßbereich nicht größer war als 1,5. Die Spektren wurden mit 20 nm/min und einer Spaltbreite von 1 nm aufgenommen. Der Abstand der Meßpunkte betrug 0,1 nm.

Für die Aufnahme des Differenzspektrums wurde zunächst das Absorptionspektrum der dunkeladaptierten Probe gemessen (Dunkelspektrum). Anschließend wurde die Probe im Spektrometer durch zehn sättigende Blitze einer Xenon-Blitzlampe belichtet und das Spektrum der Probe nach Belichtung aufgenommen. Das Differenzspektrum stellt die Subtraktion des Spektrums der dunkeladaptierten Messung vom Spektrum der belichteten Probe dar.

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung der Fluoreszenz wurde ein SLM 8000C Photon Counting Spectrofluorometer von AMINICO verwendet. Die Auswertung der Spektren erfolgte über Computer mit der mitgelieferten Software, die die gerätespezifischen Korrekturfaktoren berücksichtigte.
Die Proben wurden in 1 mM Tricin pH 7,5; 1,25 mM $MgCl_2$ mit 0,001 % β-DM gemessen. Die Chlorophyllkonzentration der Lösung betrug 5 μM.

2.5.3 Blitzlichtspektroskopie

Die Absorption der am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren ändert sich abhängig von ihrem Oxidationszustand. Durch die Aufnahme von zeitaufgelösten Absorptionsdifferenzspektren lassen sich die lichtabhängigen Redoxprozesse verfolgen [31, 78, 176, 219]. Die Photoreaktion wird durch einen sättigenden Lichtblitz ausgelöst und nachfolgend die transiente Absorptionsänderung beobachtet, die als Spannungsänderung des monochromatischen Meßlichtes detektiert wird.
Bei sehr kleinen Änderungen der Absorption ($\Delta A \ll 1$) gilt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$\Delta A(t) = A(t) - A_0 = -\frac{1}{\ln 10}\frac{\Delta U(t)}{U_0} = \Delta\epsilon \Delta c_B(t) d \tag{2.1}$$

A_0 und A(t) sind die Absorption der Probe vor bzw. nach dem Blitz. $\Delta\epsilon = \epsilon_B - \epsilon_A$ ist die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten bei der gemessenen Wellenlänge. d ist die Länge des Lichtweges durch die Probe und Δc_B die Änderung der Konzentration von B. Bei sättigender Anregung und bekanntem $\Delta\epsilon$ ist es möglich, Δc_B absolut zu bestimmen.

Zur Aufnahme der transienten Absorptionsänderungen wurde ein laboreigener Spektrometeraufbau eingesetzt [78]: Das Meßlicht einer 55 W Halogenlampe wurde durch einen Monochromator mit 3 nm Bandbreite – im Maximum der Hauptausbleichung (±10 nm) mit 1 nm Bandbreite – gefiltert. Der Lichtweg befanden sich im weiteren eine optische Küvette von 1 cm Dicke, mit der Probe, dahinter eine Kombination von Interferenz-und Kantenfilter vor einem Photomultiplier (EMI 9558BQ), der mit einem Transientenrekorder (Tektronix TDS 320) verbunden war. Die Probe wurde durch einen 15 μs dauernden, sättigenden Xenon-Lichtblitz angeregt, der durch ein Blauglas (CS96-4 von Corning) gefiltert wurde, um den Photomultiplier vor dem Anregungslicht zu schützen. Jeder Meßpunkt stellt die Mittelung von mehreren Transienten dar (abhängig von der Signalstärke bzw. der Wellenlänge des Meßlichtes 10-100 Aufnahmen).
Messungen bei 826 nm wurden mit einem ähnlichen Aufbau durchgeführt: Das Meßlicht wurde vor der Probe durch einen Kantenfilter (RG 780 Schott) geleitet und vor dem Detektor durch eine Kombination von Kanten- (RG 780 Schott) und Interferenzfiltern (MA 826 Schott). Die Detektion erfolgte über eine Silizium-Photodiode (OSD 100-5T,

Centronix) und einen Tektronix-Verstärker (TEK AM 502).
Die Probenkonzentration war abhängig vom Meßbereich. Zwischen 450-730 nm betrug sie bis maximal 10 μM [Chl]. Messungen bei 826 nm wurden mit bis zu 30 μM [Chl] realisiert. Als artifizieller Elektronendonator des PSI wurde 2 μM Phenanzine-Methosulfat (PMS)[1] verwendet, das durch 5 mM Ascorbat vorreduziert wurde. Der Anteil an oxidiertem PMS in der Lösung war ausreichend, um ebenfalls als Elektronenakzeptor an den terminalen Eisen-Schwefel-Clustern zu wirken. Die Proben wurden durch 20 mM Tricin pH 7,5 gepuffert und enthielten 5 mM $MgCl_2$ und 0,02 % β-DM.
Die aufgenommenen Transienten wurden durch eine Fitroutine ausgewertet (Summe der kleinsten Fehlerquadrate mit maximal biexponentiellem Abfall), um die Absorptionsänderung zum Zeitnullpunkt zu ermitteln.

2.5.4 Bestimmung des Redoxpotentials

Zur Bestimmung des Redoxpotentials wurde die unter 2.5.3 beschriebene Apparatur bei einer Meßlichtwellenlänge von 826 nm benutzt. In diesem Bereich absorbiert in der Probe nur $P700^{+\bullet}$. Aus der blitzinduzierten Absorptionänderung bei 826 nm wurde der Anteil des photoaktiven PSI, abhängig vom Redoxpotential der Lösung, ermittelt. Das Redoxpotential wurde durch Zugabe von definierten Mengen des Redoxpaares Kaliumhexacyanoferrat(II)/(III) eingestellt bis zu einer maximalen Konzentration von 8 mM.
Das Potential der Lösung wurde nach jeder Messung durch eine $Pt/Ag/AgCl$-Elektrode (Schott PT5900) mit einem pH-Meter (Knick) bestimmt. Die Elektrode wurde durch eine pH-abhängige Messung einer gesättigten Chinhydronlösung gegenüber der Standard-Wasserstoff-Elektrode kalibriert. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert von drei Einzelblitzmessungen dar. An die Meßpunkte wurde ein Kurve entsprechend der Nernst-Gleichung (2.2) angepaßt, aus der sich das Halbstufenpotential ergab. In allen gezeigten Abbildungen wurde die Anzahl der je Redoxvorgang übertragenen Elektronen gleich 1 gesetzt ($n = 1$).

$$\mathrm{E} = \mathrm{E_{m,pH}} - \frac{\mathrm{RT}}{n\mathrm{F}} \ln \frac{[\mathrm{red}]}{[\mathrm{ox}]} \quad \text{, für} \quad \mathrm{ox} + \mathrm{ne^-} \rightarrow \mathrm{red} \ , \tag{2.2}$$

[1] Für die Bestimmung des molaren Differenzen-Extinktionskoeffizienten wurde der Redoxfarbstoff N, N, N, N-Tetramethyl-*p*-phenylen-diamin Dihydrochlorid (TMPD) 200 μM verwendet.

wobei R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, F die Farradaykonstante und n die Zahl der pro Redoxvorgang übertragenen Elektronen ist. Die Redoxtitration wurde bei pH=7,5 durchgeführt. Das Redoxpotential von $P700^{+\bullet}$ ändert sich jedoch nicht mit dem pH-Wert [105].

2.6 Magnetische Resonanz

In der Elektronenspinresonanz (EPR) werden paramagnetische Zustände, wie sie zum Beispiel bei den Primärprozessen der Photosynthese auftreten, beobachtet. Die EPR-Spektroskopie liefert Informationen über die räumliche Verteilung des ungepaarten Elektronenspins im paramagnetischen Molekül. Dies geschieht durch Analyse der Wechselwirkung des Elektrons mit anderen Elektronenspins (Spin-Spin-Wechselwirkung) und den Spins der Atomkerne in der unmittelbaren Umgebung (Hyperfein-Wechselwirkung).
Ist die Zahl der „koppelnden“ Kerne groß, sind die Hyperfeinwechselwirkungen im EPR-Experiment nicht mehr auflösbar. Durch die Doppelresonanzmethode ENDOR (*electron-nuclear double resonance*) sind auch in diesen Fällen die Kopplungen der einzelnen Atome mit dem ungepaarten Elektron nachweisbar.
Die EPR und ihre weiterentwickelten Techniken (Puls- und Doppelresonanzverfahren) sind für die Untersuchung von Radikalen in großen Molekülen wie Proteinen ein wichtiges Hilfsmittel zur Struktur- und Funktionsaufklärung. Insbesondere die Primärprozesse der Photosynthese bieten für dieses Meßmethode eine Vielzahl von Anwendungen.
Die theoretischen Grundlagen werden im Rahmen dieser Arbeit nur kurz dargestellt. Zur Vertiefung dieses Themas wird auf Lehrbücher verwiesen [7, 40, 216].

2.6.1 Theoretische Grundlagen

Wird ein Elektron einem äußeren Magnetfeld B_0 ausgesetzt, so richtet sich die $_Z$-Komponente des Spins aufgrund der Zeeman-Wechselwirkung parallel oder antiparallel zum Feld aus. Dies führ zu einer Aufspaltung in zwei verschiedene Energieniveaus, deren Besetzungszahlen unterschiedlich sind. Durch Einstrahlen einer elektromagnetischen Welle mit geeigneter Frequenz werden Übergänge zwischen diesen beiden Zuständen induziert,

wenn die Resonanzbedingung erfüllt ist:

$$h\nu = g\beta \mathrm{B}_0 \ , \tag{2.3}$$

β bezeichnet das Bohrsche Magneton ($0,92{\times}10^{-23} J/T$) und g den g-Faktor des Elektrons, der für ein freies Elektron 2,0023 beträgt. In der EPR-Spektroskopie werden in der Regel magnetische Feldstärken von 0,3 bis 3 Tesla verwendet. Die eingestrahlte Energie, die die EPR-Übergänge erzeugen, liegen dann im Bereich der Mikrowellenstrahlung bei 9–90 GHz. Die am häufigsten verwendeten Frequenzbänder sind das X-Band bei 9,5 GHz und das Q-Band bei 35 GHz.

Hyperfeinaufspaltung

Das Elektron in einem paramagnetischen Radikal wird nicht nur vom äußeren Magnetfeld beeinflußt, sondern auch durch das magnetische Moment der umgebenden Atomkerne. Das magnetische Moment eines Kerns wird durch seinen Spin **I** bestimmt. Das am Ort des Elektrons wirkende Magnetfeld beträgt dann:

$$\mathrm{B}_{local} = \mathrm{B}_0 - \mathrm{A}m_I, \tag{2.4}$$

wobei m_I die magnetische Spinquantenzahl des Kerns und a die Hyperfeinkopplungskonstante ist. Bei Protonen ist der Kernspin $I = 1/2$ und somit $m_I = \pm 1/2$. Aus dem Energieniveauschema wird deutlich, daß in diesem Fall zwei EPR-Übergänge detektiert werden, entsprechend der Resonanzbedingung (siehe auch Abb. 2.3):

$$h\nu = g\mu_B(\mathrm{B}_0 \pm 1/2\mathrm{A}). \tag{2.5}$$

Allgemein spalten n Kerne mit dem Spin I das EPR-Signal in $2nI + 1$ Linien auf, deren Intensität binominal verteilt ist, wenn die Hyperfeinwechselwirkungen der Kerne identisch sind. Der ungepaarte Spin koppelt in einem Protein jedoch mit einer Vielzahl magnetisch nicht-äquivalenter Kerne (z. B. Protonen). Die Zahl der Aufspaltungen des EPR-Signals steigt dabei multiplikativ mit der Anzahl der Sätze äquivalenter Kerne k an:

$$\prod_{i=1}^{k}(2n_i I_i + 1) \tag{2.6}$$

Als Folge überlagern sich die einzelnen Aufspaltungen zu einer inhomogen verbreiterten gaußförmigen EPR-Linie. Die Größe der einzelnen Hyperfeinkopplungen ist aus einem solchen EPR-Signal oft nicht mehr zu ermitteln.
Spezielle Meßtechniken, die auf Puls-Verfahren [z. B. *electron spin echo envelope modulation* (ESEEM)] oder Doppelresonanzmethoden wie ENDOR beruhen, ermöglichen es häufig auch in diesen komplizierten Systemen die Hyperfeinwechselwirkungen der einzelnen Kerne aufzulösen.

Die Hyperfeinkopplungen zerfallen in zwei Anteile: (i) die isotrope Hyperfeinkopplung, die durch die Fermi-Kontakt-Wechselwirkung zustande kommt, und (ii) einem anisotropen Anteil, der aus der Dipol-Dipol-Wechselwirkung resultiert. In flüssiger Lösung ist der dipolare Anteil der Kopplung in der Regel in den Spektren nicht beobachtbar, da die – im Vergleich zur Detektion – schnelle Molekülbewegung diesen Wert ausmittelt. In gefrorener Lösung hingegen ist die Anisotropie (Orientierungsabhängigkeit) der Hyperfeinkopplung wie auch des g-Faktor detektierbar. Die isotrope Hyperfeinkopplung entspricht dann dem Mittel der einzelnen Kopplungsbeiträge:

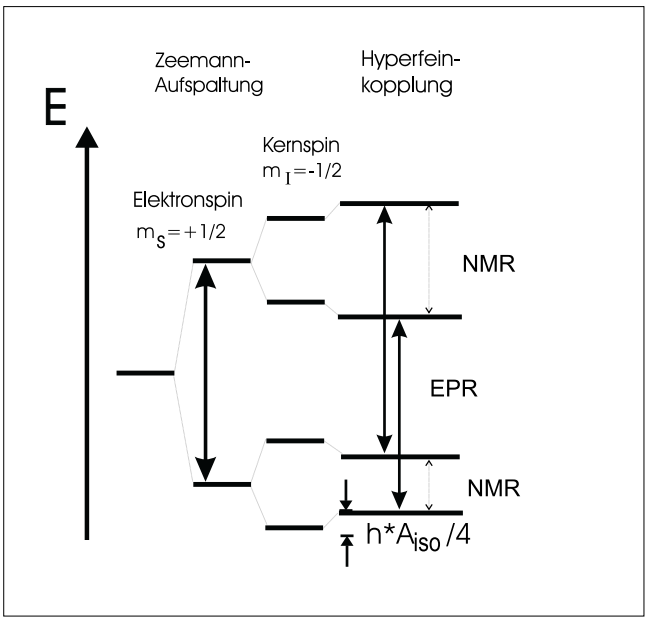

Abbildung 2.3: Vier-Niveau-System für Elektronenspin $S = 1/2$ und Kernspin $I = 1/2$, isotrope Hyperfeinwechselwirkung $A_{\mathrm{iso}} < 0$. Zwei mögliche EPR- und zwei NMR-Übergänge ($\Delta m_I = \pm 1$) sind angegeben.

- Für einen rhombischen Tensor ($A_x \neq A_y \neq A_z$):

$$A_{\text{iso}} = 1/3(A_x + A_y + A_z) \tag{2.7}$$

wobei $A_i (i = x, y, z)$ die Hauptwerte des Hyperfeintensors sind.

- Für einen axialen Tensor ($A_x = A_y \equiv A_\perp \neq A_z \equiv A_\parallel$):

$$A_{\text{iso}} = 1/3(2A_\perp + A_\parallel) \tag{2.8}$$

ENDOR-Spektroskopie

In einem continuous-wave(cw)-ENDOR-Experiment werden durch Einstrahlen eines variablen Radiofrequenzfeldes direkte Übergänge zwischen den Hyperfeinniveaus induziert (NMR-Übergänge). Die Anregung wird dabei über die Änderung der Amplitude eines partiell gesättigten EPR-Überganges beobachtet, der durch die gleichzeitig eingestrahlte Mikrowelle bevölkert wird. Entspricht die Radiofrequenz der Energiedifferenz eines der beiden NMR-Übergänge, ändern sich die Besetzungszahlen der verschiedenen Energieniveaus und beeinflussen dadurch die Absorption des EPR-Signals. Die Hyperfeinkopplung ergibt sich im ENDOR-Spektrum aus dem Abstand der beiden detektierten NMR-Übergänge, die symmetrisch um die Lamorfrequenz ν_n der beobachtbaren Kernsorte (z. B. Protonen $\nu_n = \nu_{^1H}$) auftreten.

$$\nu^{\pm}_{ENDOR} = |\nu_n \pm \frac{A}{2}| \tag{2.9}$$

In Abb. 2.4 ist diese Aufspaltung für einen axialen Hyperfeintensor gezeigt. Hier erstreckt sich die Absorption über den gesamten Bereich anisotroper Hyperfeinwerte. In der üblicherweise detektierten 1. Ableitung des Absorptionssignals ergeben sich ausgeprägte Strukturen bei den Hauptwerten ($A_\parallel$ und $A_\perp$) des Tensors (Abb. 2.4 unterer Kurvenzug).

Der ENDOR-Effekt beruht auf Änderungen der Besetzungszahlen der vier Niveaus, die in Abb. 2.3 dargestellt sind. Eine detaillierte Beschreibung ist z. B. in [128] nachzulesen.

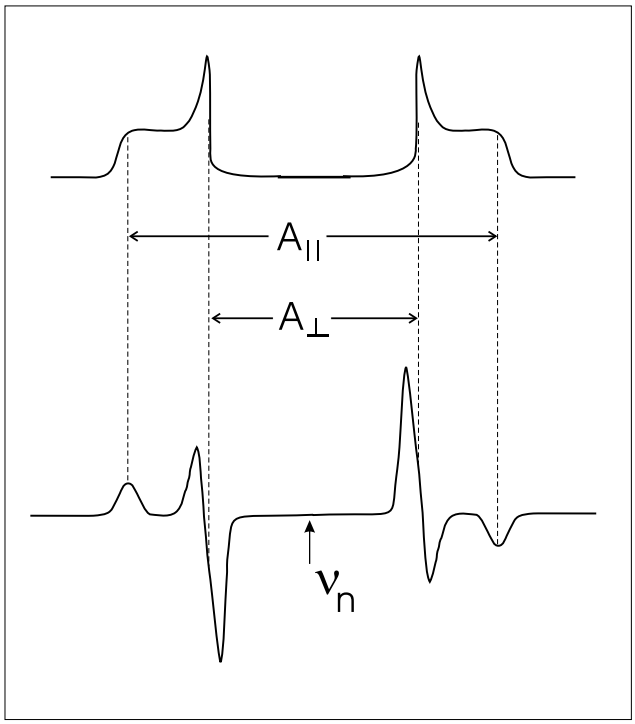

Abbildung 2.4: Spektrale Linienform eines axialen Hyperfeinkopplungstensors und der im ENDOR-Spektrum aufgenommenen ersten Ableitung für einen Kernspin von I=1/2 und einem ungepaarten Elektron (S=1/2) bei statistischer Verteilung aller Molekülorientierungen (Pulverspektrum). Die $A_{\|}$- und die $A_{\perp}$-Komponenten des Tensors sind eingezeichnet. ν_n ist die Lamorfrequenz des untersuchten Kernspins.

EPR am Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$

Der lichtinduzierte Elektronentransfer im PSI erfolgt aus dem Singulettzustand des primären Donators. Dieser Spinzustand bleibt auch nach der Übertragung des Elektrons auf den sekundären Akzeptor A_1 im dann vorliegenden Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ nahezu ausschließlich erhalten (Spinkorrelation). Die Besetzung der Energieniveaus in diesem Zwei-Spin-System liegt dadurch weit entfernt von der Boltzmannverteilung.

In einem transienten EPR-Experiment mit direkter Detektion der EPR-Intensität werden absorptive und emissive EPR-Signale beobachtet. Die Überlagerungen der Absorptions- und Emissionsbeiträge im Spektrum sind – unter Einbeziehung der Anisotropie der magnetischen Wechselwirkung – abhängig von der Orientierung der beiden Radikale zueinander. Sind die g-Tensoren der beteiligten Radikale bekannt, ergibt sich aus dem transient aufgenommenen EPR-Spektrum des Radikalpaares die relative Anordnung der beiden Kofaktoren im Proteingerüst [198].

Die selektive Besetzung der Energieniveaus ist auch verantwortlich für eine ungewöhnliche Eigenschaft im gepulsten EPR-Experiment. In Puls-EPR-Experimenten werden kurze Mikrowellenpulse mit großer Feldstärke B_1 eingestrahlt. Sie erzeugen kohärente Spinzustände. Dies bedeutet, daß nach einem Puls die magnetischen Momente der einzelnen Spins mit einer festen Phasenbeziehung relativ zueinander um das äußere Magnetfeld B_0 präzedieren. Phasenrichtige Überlagerungen führen zu einer makroskopischen Magnetisierung, die durch die Wahl einer geeigneten Pulssequenz als sogenanntes Echo detektiert werden kann.

Im Zweipulsexperiment erzeugt ein spinpolarisiertes Radikalpaar ein *out-of-phase*-Elektronen-Spin-Echo entlang der magnetischen x-Achse und nicht entlang der y-Achse (*in-phase*), wie es im konventionellen Puls-Experiment beobachtet wird. Das Echo weist eine *electron-spin-echo-envelope-modulation* (ESEEM) auf, deren Modulationsfrequenz durch die Spin-Spin-Wechselwirkung der Elektronen des Radikalpaares bestimmt wird [178]. Aus der Fourier-transformierten Echomodulation werden die isotrope Austauschwechselwirkung J und die dipolare Wechselwirkung D ermittelt [17, 61]. Im Vergleich zu anderen EPR-Techniken besitzt die *out-of-phase*-ESEEM-Spektroskopie den Vorteil, daß der Abstand ungepaarter Radikalpaare mit hoher Präzision (Fehler <0,5 Å) bestimmt werden kann.

Da die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Puls-Experimente am transienten Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ nur eine untergeordnete Rolle spielen, wird auf eine weitergehende Erläuterung dieser speziellen Techniken verzichtet und auf die Fachliteratur verwiesen [60, 114, 116].

2.6.2 EPR-Spektroskopie

X-Band cw-EPR/ENDOR-Spektroskopie

Die EPR/ENDOR-Messungen wurden im X-Band mit einem Spektrometer des Typs ESP 300 E der Firma Bruker durchgeführt. Die komplette Steuerung dieses Spektrometers sowie die Datenaufnahme und -verarbeitung wurden mit einem eigenen Datensystem (ESP3220) vollzogen.

Das Spektrometer arbeitete mit einer Mikrowellenbrücke des Typs ER 042 MR, die als

Mikrowellenquelle ein Klystron besaß. Für EPR-Messungen wurde ein TE_{102} Standard-Rechteck-Resonator (ER 4102 ST) mit einer Leergüte von $Q \geq 5000$ verwendet.
Für ENDOR-Experimente wurde dieser Aufbau wie folgt ergänzt: Als Signalquelle für die Radiofrequenz (RF) diente ein Synthesizer von Rhode & Schwarz (Typ SMT), der in einem Frequenzbereich von 100 kHz bis 1040 MHz arbeitete und eine Frequenzmodulation mit einem maximalen Hub von 500 kHz erlaubte. Die Effektmodulationsfrequenz wurde direkt dem Signalkanal entnommen und der interne *lock-in*-Verstärker der Konsole zur Datenaufnahme genutzt. Die RF wurde mit einem ENI 3200 L-Amplifier mit einer maximalen Ausgangsleistung von 200 W verstärkt. Den Abschluß des RF-Kreises bildete ein Leistungswiderstand (Bird) von 50 Ω.
Die ENDOR-Messungen wurden in einem TM_{110}-Hohlraumresonator mit einer speziell an die Feldgeometrie angepaßten ENDOR-Spule realisiert [203]. Die RF-Spule (Außendurchmesser 8 mm, 16 Windungen, 20 mm Länge) war auf ein Quarz-Dewar aufgeklebt, das sich im Resonator befand. Mit dieser Spule wurde bei einer Leistung von 500 W ein maximales RF-Feld B_2 von 2.0 mT bei einer Frequenz von 14 MHz erzeugt. Die Ankopplung der Mikrowelle erfolgte manuell über eine Antenne. Der Resonator wurde über eine Stickstoffkühlung (Bruker ER 4111 VT) temperiert. Die Leergüte dieses Aufbaus betrug $Q \geq 2000$.

Probenvorbereitung und Meßbedingungen

Zur Generierung des $P700^{+\bullet}$-Radikals im intakten Chloroplasten wurden nur Zellabkömmlinge der Stämme CC2696 und FUD7 verwendet, die in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurden. Die Zellen wurden dreimal mit 50 mM Tricin, 5 mM $MgCl_2$ gewaschen. Für den untersuchten Zellstamm wurden zwei unterschiedliche Proben angesetzt:

- Inkubation in 10 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) zur chemischen Oxidation von P700.
- Zugabe von Ascorbat bis zu Endkonzentration von 10 mM und Dunkeladaption bis zur Messsung (mindestens 20 min), um P700 in der Probe vollständig zu reduzieren.

Die Zellsuspensionen wurden in 4 mm Außendurchmesser EPR-Röhrchen (Wilmad 707SQ) gefüllt und bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Proben in

flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Volumen betrug 150 bis 200 μl. Dadurch wurde sichergestellt, daß der Resonanzbereich im Resonator maximal ausgenutzt wurde. Die Proben mit Natriumascorbat wurden zunächst dunkeladaptiert gemessen, anschließend bei Raumtemperatur belichtet (siehe unten) und das lichtinduzierte EPR-Signal aufgenommen. Die durch Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidierten Proben wurden direkt im EPR-Spektrometer untersucht.
Die Einstellung am Spektrometer wurde wie folgt gewählt: Mikrowellenleistung 20 μW; Feldmodulation 100 kHz; Modulationstiefe 0,1 mT; Zeitkonstante pro Überlauf 42 s, 20 Überläufe bei 20 K. Die Nachweisgrenze unter diesen Bedingungen lag bei weniger als 2 % der Signalintensität, die für den WT (Zellen, die kein mutiertes PSI enthielten) bestimmt wurde. Mehrfache Messungen von WT-Proben zeigten eine Reproduzierbarkeit der Intensität innerhalb eines Fehlers von 30 % bezogen auf die Fläche des EPR-Signals nach Doppelintegration. Die Mutanten wiesen erheblich kleinere Signalamplituden auf. Eine quantitative Auswertung dieser Messung war daher nur sehr eingeschränkt möglich.

Zur Bestimmung des g-Faktors und der Linienbreite ΔB_{pp} wurden aufgereinigte PSI-Komplexe verwendet. Das Radikal wurde bei Raumtemperatur lichtinduziert erzeugt und durch Einfrieren stabilisiert. Als interner g-Standard wurde (α, α')-Diphenyl-β-picrylhydroxyl (DPPH) eingesetzt.

cw-ENDOR-Messungen am $P700^{+\bullet}$-Kationradikal wurden an isolierten PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* in gefrorener Lösung vorgenommen. Die Chlorophyllkonzentration der Proben war abhängig von der Ausbeute an PSI und lag in den verschiedenen Mutanten zwischen 1 bis 5 mM [Chl]. Das Verhältnis Chl/P700 betrug im WT etwa 70; die mutierten PSI-Komplexe wiesen Werte zwischen 200 und 800 Chl pro P700 auf.
150 μl der konzentrierten PSI-Lösung wurden in EPR-Röhrchen (Wilmad SQ 727) mit 4 mm Außen- und 3 mm Innendurchmesser überführt. Zur lichtabhängigen Oxidation von P700 wurden die Proben bei Raumtemperatur in das fokussierte Licht einer 1000 W Halogenlampe gebracht und unter Beleuchtung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Wärmestrahlung wurde durch einen Wasserfilter von 8 cm optischer Weglänge absorbiert. Das EPR-Röhrchen befand sich während der Belichtung in einem mit Ethanol gefüllten

Reagenzglas, das unter Belichtung in flüssigen Stickstoff getaucht wurde, um die Probe gleichmäßig einzufrieren. Die Ladungstrennung ist unter diesen Bedingungen ($T \leq 200$ K) stabil [30].

Die ENDOR-Messungen wurden bei 160 K im TM_{110}-Resonator mit Stickstofftemperierung aufgenommen. Der Frequenzmodulationshub betrug 100 kHz, die Effektmodulation 12,5 kHz, bei einer Mikrowellenleistung von 2 mW und einer Radiofrequenzleistung von bis zu 150 W. Die Aufnahmezeit war abhängig von der Signalintensität und lag zwischen 40 bis 120 $\times$ 82 s bei einer Zeitkonstanten von 81 ms/Meßpunkt und 1024 Punkten. Die Hyperfeinkopplungskonstanten (hfc) der Methylprotonen wurden durch Simulation bestimmt [110]. Die hfc-Tensoren wurden dabei entsprechend der Arbeit von Käß [109] als axialsymmetrisch angenommen. Alle übrigen Linien wurden ohne Simulation direkt im Spektrum abgelesen.

Puls-EPR- und transiente EPR-Spektroskopie

Transiente und gepulste EPR-Experimente wurden an einem FT-EPR-Spektrometer ESP 380 der Firma Bruker mit einem ER 4118 X-MD-5W1 dielektrischen Saphirring als Probenkopf im cw-Modus bzw. im Puls-Betrieb durchgeführt. Der Aufbau dieses Gerätes wurde von Holczer *et al.* beschrieben [96]. Die Güte des Resonators betrug etwa Q=3000. Der Resonator wurde durch einen Heliumkryostaten (Oxford CF935) temperiert.
Als Lichtquelle zur Erzeugung des Radikalpaares wurde ein frequenzverdoppelter Nd:YAG Laser (Spectra Physics GCR 130) verwendet, der bei $\lambda = 532$ nm emittiert. Die Pulsweite betrug etwa 8 ns (Breite bei halber Höhe) bei einer Leistung von 5 mJ pro Puls.

Probenvorbereitung und Meßbedingungen

150 μl einer konzentrierten PSI-Präparation (2 mM [Chl] mit 20 mM Tricin, pH=7,5 gepuffert) wurden mit 0,5 M Ascorbat versetzt (Endkonzentration 10 mM), in ein EPR-Röhrchen mit 4 mm Außendurchmesser überführt, dunkeladaptiert und eingefroren.
Bei Temperaturen $\leq$100 K erfolgt die lichtinduzierte Ladungstrennung in einem Teil der PSI-Population nur bis zum sekundären Akzeptor A_1. Das so erzeugte Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ rekombiniert mit einer Halbwertszeit von 200-300 μs (siehe auch Abb. 1.6). Dieses Zeitfenster ist ausreichend für den Nachweis des transienten Zustandes durch EPR.

Einerseits wird das Radikalpaar direkt als transientes EPR-Signal mit sequentieller Änderung des Magnetfeldes aufgenommen. Dieses Experiment gibt Aufschluß über die Orientierung der beiden Radikale zueinander [106]. Andererseits wird aus dem ESEEM-Experiment der Abstand zwischen dem Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1{}^{-\bullet}$ im PSI ermittelt [17, 61].

2.6.3 Absorptionsdetektierte magnetische Resonanz (ADMR)

Im Triplettzustand sind zwei Elektronenspins parallel zueinander ausgerichtet, so daß sich ein Gesamtspin von $S = 1$ ergibt. Der Triplettzustand spaltet wegen der Spinmultiplizität $2S + 1$ in drei verschiedene Unterzustände mit $m_S = 1, 0, -1$ auf, die aufgrund der magnetischen Austausch- und Spin-Spin-Wechselwirkung bereits ohne äußeres Magnetfeld unterschiedliche Energien aufweisen.
Quantenmechanisch betrachtet wird der Triplettzustand durch einen symmetrischen Tensor charakterisiert, der als Nullfeldaufspaltungs- oder Feinstrukturtensor bezeichnet wird. Da dieser Tensor spurlos ist (Gl. 2.10), kann er durch die zwei Nullfeldaufspaltungsparameter D und E beschrieben werden [95].

$$1/3(D_x + D_y + D_z) = 0 \tag{2.10}$$

Der Parameter D hängt vom mittleren Abstand der beiden Elektronen und von der Molekülsymmetrie ab. E beschreibt die Abweichung der Orbitale von der Zylindersymmetrie um die z-Achse. Dementsprechend ist dieser Parameter in axialsymmetrischen Molekülen gleich Null. Bei planaren Molekülen, wie z. B. Chl, steht die molekulare z-Achse senkrecht auf der Molekülebene und die x- und y-Achse liegen in der Ebene (Konvention).

Optische Detektion der magnetischen Resonanz (ODMR)

Bei kontinuierlicher Belichtung einer Probe geht ein Teil der Spinpopulation vom angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand über. Ein Niveau wird häufig in der Boltzmann-Verteilung deutlich überproportional besetzt (in Abb. 2.5 durch den größeren vollen Kreis im z-Niveau symbolisiert). Beim Einstrahlen einer Mikrowellenfrequenz, die dem z- oder y-Übergang entspricht, wird die Besetzung zugunsten der höheren Niveaus

x, y verschoben. Die Zerfallsrate zum Grundzustand S_0 ist in diesem Beispiel für das x-, y-Niveau größer als für das z-Niveau. Es kommt somit zu Verschiebungen der Besetzung von nichtstrahlenden und strahlenden Niveaus, die sich auf die Intensitäten der $S_0 \rightarrow S_1$-(Absorption), der $T_0 \rightarrow S_0$- (Phosphoreszenz) und der $S_1 \rightarrow S_0$-Übergänge (Fluoreszenz) auswirken. Im ODMR-Experiment werden diese – durch die Mikrowellenstrahlung in-

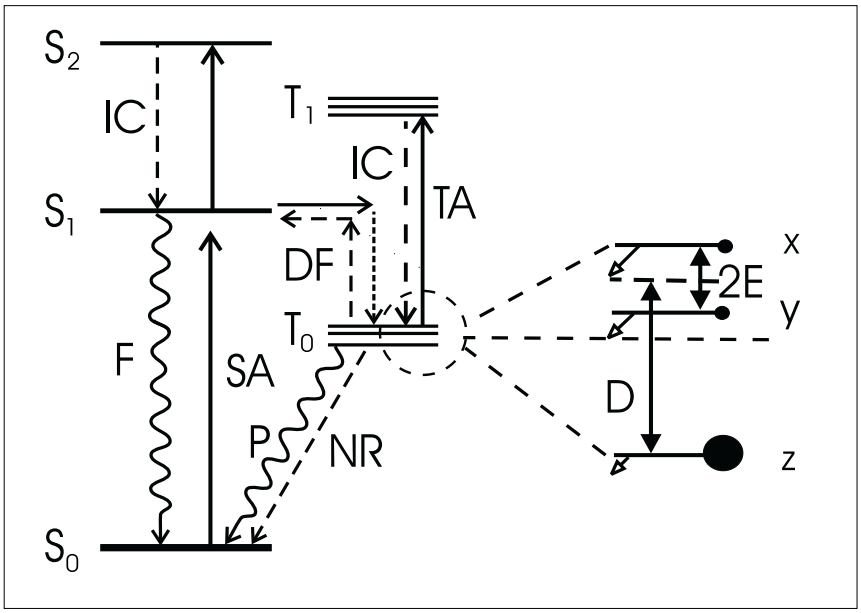

Abbildung 2.5: Energiediagramm der Singulett- und Triplettbesetzung mit den Relaxationswegen nach Anregung. S_0, Singulettgrundzustand; S_1 und S_2, angeregte Singulettzustände; T_0 und T_1, erster und zweiter angeregter Triplettzustand; SA und TA, Singulett- bzw. Triplettabsorption; F und DF, Fluoreszenz bzw. *delayed* Fluoreszenz; P, Phosphoreszenz; NR, strahlungsloser Übergang; IC, interne Konversion. Vergrößerung des gestrichelt gezeichneten Kreises: T_0-Übergänge: x, y und z, Energieniveaus der Dipol-Dipol-Wechselwirkung; D und E, Nullfeldaufspaltungsparameter; nach links gerichtete Pfeile repräsentieren die Zerfallsraten. Die gefüllten Kreise stellen die Besetzung der Niveaus im Gleichgewicht dar (nach Hoff (1996) [95]).

duzierten – Änderungen der Besetzungsverhältnisse optisch nachgewiesen. Entsprechend der gewählten Meßgröße (Absorption, Fluoreszenz und Phosphoreszenz) werden diese Verfahren als ADMR, FDMR und PDMR bezeichnet. Die ODMR im Nullfeld verfügt gegenüber konventioneller EPR im magnetsichen Hochfeld über einige Vorteile:

- Das als Meßgröße verwendete Licht besitzt eine höhere Energie pro Quantum als Mikrowellenstrahlung und erhöht dadurch die Empfindlichkeit des Detektionssystems um einige Größenordnungen.

- Die für die Anregung und die Detektion verwendeten Energieformen (Mikrowelle beziehungsweise Licht) sind nicht miteinander gekoppelt; Fluktuationen in der Mikrowelle beeinflussen das Meßsignal nicht.

- Im Nullfeld tritt keine Anisotropie auf, die in der EPR durch das äußere Magnetfeld hervorgerufen wird; die Linienbreite wird dadurch geringer und die Intensität der Signale erhöht.

Triplett-minus-Singulett(T–S)-Absorptions- Differenzspektroskopie

Zur Bestimmung der Nullfeldaufspaltungsparameter |D| und |E| wird die Probe mit moduliertem Meßlicht bei maximaler Absorption angeregt und ein Mikrowellenfeld sequentiell eingestrahlt. Entspricht die Mikrowellenfrequenz einem der beiden Übergänge $|D|+|E|$ oder $|D|-|E|$ (siehe Abb. 2.6) kommt es zur Verschiebung der Populationen der Triplett-

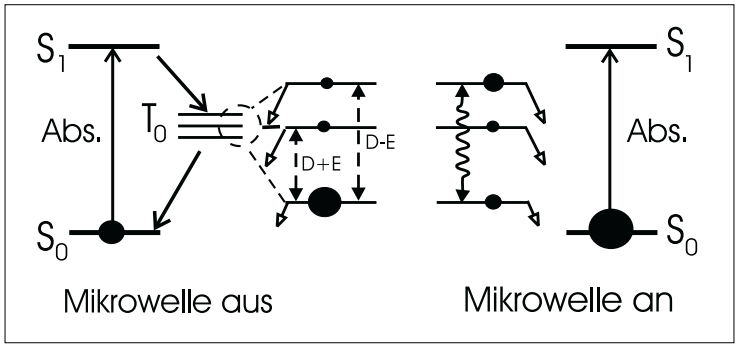

Abbildung 2.6: Prinzip der absorptionsdetektierten magnetischen Resonanz (ADMR). Die gefüllten Kreise stellen die Besetzung der Niveaus im Gleichgewichtszustand dar. Eine sättigend eingestrahlte Mikrowelle, die dem Energieunterschied von zwei Triplettniveaus entspricht (symbolisiert durch die wellenförmigen Pfeile), beeinflußt die Population des Grundzustandes und verändert dadurch die Absorption der Probe (nach Hoff (1996) [95]).

niveaus, die als Absorptionsänderung detektiert werden.

Wird nach der Bestimmung der Nullfeldparameter die Mikrowelle kontinuierlich bei einem der beiden Übergänge eingestrahlt und die Wellenlänge des Lichtes variiert, ergibt sich das T–S-Absorptionsdifferenzspektrum. Dieses Spektrum enthält folgende Beiträge:

- Das Absorptionsspektrum des *unbeeinflußten* Singulettgrundzustandes ($S_n \leftarrow S_0$-Übergang) der Moleküle, die sich nicht im Triplettzustand befinden und auch nicht mit diesem wechselwirken.

- Das Absorptionsspektrum des Singulettgrundzustandes der Moleküle, die sich nicht im Triplettzustand befinden, jedoch mit dem Molekül wechselwirken, das das Triplettexciton trägt.

- Das Absorptionspektrum des Triplettzustandes ($T_n \leftarrow T_0$-Übergang).

Das T–S-Spektrum repräsentiert damit den Unterschied zwischen der Absorption eines Moleküls im Singulett- und der Absorption im Triplettzustand [21].[2]

Probenvorbereitung und Meßbedingungen

Thylakoide aus der Zellinie CC2696 oder aufgereinigte PSI-Komplexe mit einer Chlorophyllkonzentration von 100 μM bis 200 μM wurden mit CAPS Puffer (50 mM) auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt. Die Probe wurden unter einer Stickstoffatmosphäre gehalten und der molekulare Sauerstoff durch ein Glucose/Glucoseoxidase-System entfernt [51]. Anschließend wurden Dithionit (20 mM) und Glycerin (66 %) zugegeben, um die terminalen Eisen-Schwefel-Cluster vorzureduzieren und beim Einfrieren die optische Transparenz der Lösung zu erhalten.

Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur in den fokussierten Lichtstrahl einer 1000 W Halogenlampe gebracht. Die Wärmestrahlung wurde durch einen Wasserfilter absorbiert. Anschließend wurde die Küvette im Kryostaten positioniert und eingefroren. Nach dieser Behandlung liegt der sekundäre Akzeptor A_1 in doppelt reduzierter Form vor [39]. Das durch Lichtpulse erzeugte primäre Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_0^{-\bullet}$ rekombiniert dabei in hoher Ausbeute über den Triplettzustand [189].

Die Messung wurde mit folgenden Parametern bei 1,8 K durchgeführt: 33 Hz Frequenzmodulation, 20 mW Mikrowellenleistung, 0,1 nm/s Zeitintervall mit einer optischen Auflösung von 0,5 nm. Die eingestrahlte Mikrowellenfrequenz entsprach der Energie des $|D| + |E|$-Überganges. Der experimentelle Aufbau des Spektrometers wurde in [37] beschrieben.

[2] Eine ausführliche Beschreibung dieser Technik ist in [95] zu finden.

3

Präparation von PSI aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Isolierung des PSI-Komplexes aus Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien basieren auf einer Solubilisierung der Thylakoidmembran mit unterschiedlichen Detergenzien. In den meisten Fällen folgt die Anreicherung des Protein-Komplexes in einem Sucrose-Dichte-Gradienten durch Ultrazentrifugation, wie dies z. B. in [24, 129, 149, 162, 175, 206] beschrieben wird. Die Auswahl des Detergenz und die weiteren Aufreinigungsschritte haben dabei einen erheblichen Einfluß auf die Protein- und Pigmentzusammensetzung des Komplexes und wirken sich auf die spektroskopischen Eigenschaften des PSI aus [188, 195].
Als Detergenz für die Solubilisierung der Thylakoidmembranen wurde in dieser Arbeit ausschließlich β-n-Dodecylmaltosid (β-DM) verwendet. Das nicht-ionische Detergenz gilt als schonende amphiphile Substanz, die sich zwischen den Proteinkomplex und die Lipide der Membran lagert und homogene Protein-Detergenz-Mizellen bildet, ohne einzelne Proteinuntereinheiten abzulösen. Die Kristallisation von PSI aus *S. elongatus* mit β-DM bestätigt diese Eigenschaften [74, 220, 76].

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die mutierten PSI-Komplexe aus der Zellinie FUD7, die kein PSII enthält, isoliert. Die Einführung von Punktmutationen wirkte sich jedoch erheblich auf den PSI-Gehalt in der Thylakoidmembran aus, wie in 5.2 noch beschrieben wird. Die Anreicherung des PSI-Komplexes durch Zentrifugation der

solubilisierten Membranen im Sucrose-Dichte-Gradienten war in diesen Fällen nicht ausreichend, da der Proteinkomplex sich von den Antennenproteinen nicht mehr abtrennte. Eine spektroskopische Charakterisierung der mutierten PSI-Komplexe war daher wegen des geringen Reinheitsgrades in einigen Fällen nicht möglich.
Als alternatives Verfahren zur Isolierung des PSI-Komplexes wurde die native Gelelektrophorese getestet, die eine Abtrennung der Antennenproteinkomplexe gewährleistete (nicht gezeigt). Die limitierte Probenmenge sowie die schlechten Ausbeuten bei der Extraktion des PSI-Komplexes aus dem Gel waren jedoch nicht ausreichend für weitere Untersuchungen.
Die Grundlage für die erfolgreiche Isolierung von PSI aus Mutanten, die diesen Photosystem nur in geringen Mengen enthielten, bildete die Verwendung des *C. reinhardtii*-Stammes CC2696. Diese Zellinie akkumuliert aufgrund eines Defektes in der Chl *b*-Synthese nur etwa 10 % der Konzentration an Antennenproteinen im Vergleich zu Stämmen, die diese Mutation nicht tragen [160]. Der geringere Gehalt an LHC ermöglichte es, die Isolierung des PSI-Komplexes zu modifizieren. Ein Vorteil der neu entwickelten Methode besteht darin, daß eine größere Menge an Ausgangsmaterial verarbeitet werden kann, ohne die Qualität der Anreicherung zu beeinträchtigen. Darüber hinaus zeichnet sich das Verfahren durch eine schnelle Anreicherung des PSI-Komplexes mit hohen Ausbeuten aus.
Im folgenden werden die beiden in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Präparation von PSI vorgestellt und der aus der Zellinie CC2696 isolierte Proteinkomplex biochemisch charakterisiert. Die Präparation der PSI-Partikel aus der Zellinie FUD7 und des photosynthetisch wachsenden Stammes CC125 erfolgte nach dem Standardverfahren über einen linearen Sucrose-Dichte-Gradienten. Das neu entwickelte Verfahren führt bei diesen Zellinien nicht zur weiteren Anreicherung des PSI-Komplexes (siehe unten).

Zur einfacheren Unterscheidung wird im weiteren der Begriff Wildtyp (WT) bei Zellinien oder PSI-Komplexen verwendet, die keine Mutation in diesem Photosystem tragen.

3.1 Präparation von Thylakoidmembranen

Der Zellaufschluß und die Präparation der Thylakoidmembranen war für beide Aufreinigungsmethoden zur PSI-Isolierung identisch: Die Zellen wurden unter Dauerkunstlicht mit geringer Intensität ($\leq 1\mu$ $\mathrm{Em^{-2}s^{-1}}$) in HSA-Medium bei 27°C angezogen. Zellen aus 15–30 l Flüssigkultur wurden am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (2×10^6 Zellen/ml) mit einer Durchflußzentrifuge geerntet (CEPA ca. 10.000 g). Die Zellpaste besaß ein Feuchtgewicht von 2–3 g pro Liter Kulturvolumen. Die Suspension wurde zweimal in Puffer P1 gewaschen und im gleichen Puffer mit einer Konzentration von 2×10^8 Zellen/ml resuspendiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 0–4°C unter Grünlicht ausgeführt. Die Zellen wurden durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen: Die Suspension wurde dreimal für je 90 s mit einer Pulsfrequenz von 0,5 Hz, einer Pulsdauer von 1 s auf der Leistungsstufe 8 eines Branson-450 Ultraschallgerätes im Eiswasserbad beschallt. Zwischen den Pulssequenzen lag eine Pause von jeweils 3 min. Die Effektivität des Aufschlusses wurde unter dem Mikroskop überprüft; ca. 90 % der Zellen wurden durch diese Behandlung aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 200.000 g für 25 min zentrifugiert. Das Sediment bestand aus drei Schichten: Die Thylakoidmembranen bildeten die oberste Schicht über der weißen Stärke. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer befanden sich am Boden des Röhrchens. Die Thylakoide wurden mit einem Pinsel von der sehr festen Stärkeschicht abgelöst, zunächst in P1 mit 0,5 M NaCl resuspendiert und mit einem Pistill homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 50.000 g für 20 min wurden die Membranen nochmals in P2 gewaschen und in P1 resuspendiert. Die Thylakoide wurden entweder direkt für die weitere Präparation der PSI-Komplexe benutzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

3.2 Präparationen aus den Zellinien FUD7 und CC125

Um die integralen Membranproteinkomplexe aus den Thylakoidmembranen zu isolieren, wurden die Thylakoide unter Zugabe von β-DM bis zu einer Endkonzentration von 1 % auf eine Konzentration von 1 mg/ml [Chl] im Puffer P1 eingestellt und 90 min

bei 4–8°C unter vorsichtigem Rühren solubilisiert. Die Zugabe eines Inhibitor-Cocktails (Complete^{TM}, Boehringer Mannheim) schützte die Proteine vor dem Abbau durch Proteasen. Die Suspension wurde 1:1 mit P2 verdünnt und die nicht gelösten Bestandteile durch Zentrifugation bei 50.000 g abgetrennt.

Von der solubilisierten Lösung wurden maximal 5 ml auf 24 ml eines 0,1–0,7 M linearen Sucrose-Dichte-Gradienten aufgetragen. Am Boden des Zentrifugenröhrchens befand sich ein 2 M Sucrosekissen. Als Puffer der Sucroselösung wurde P2 verwendet, der 0,02 % β-DM enthielt. Zum Schutz vor Photooxidation wurden alle Präparationsschritte im Grünlicht durchgeführt. Die Auftrennung der verschiedenen Protein-Komplexe der Thylakoidmembran erfolgte durch Zentrifugation bei 400.000 g für 16 h. Die mit PSI angereicherte unterste grüne Bande wurde abgenommen, gegen P2 mit 0,02 % β-DM dialysiert und anschließend für die weiteren Messungen eingeengt.

Die Reinheit der Komplexe wurde über die Zahl der Chlorophyllmoleküle pro photoaktivem PSI-Komplex bestimmt. Die Chlorophyllkonzentration der Lösung ergab sich aus den Absorptionen des Acetonextraktes bei 664 und 667 nm, die Menge an photoaktivem PSI aus der blitzlichtinduzierten transienten Absorptionsänderung bei 696 nm. Für WT PSI-Präparationen betrug die Zahl der Chlorophylle pro Reaktionszentrum etwa 200. Bei Präparationen mit mutiertem PSI erhöht sich dieser Wert mindestens um das Dreifache bis an die Nachweisgrenze von etwa 2000 Chl/P700. Die große Zahl der Chlorophyllmoleküle pro Reaktionszentrum im WT belegt, daß in diesen PSI-Präparationen die Antennenproteine (LHC-I) ebenfalls isoliert wurden und ans PSI binden.

Zum Vergleich: Der PSI-Komplex aus den Blaualgen *Synechococcus* oder *Synechocystis* bindet 90–100 Chlorophylle. Diese Organismen besitzen keine chlorophyllhaltigen Antennenkomplexe, sondern Phycobilisomen, die bereits vor der Solubilisierung einfach abzutrennen sind [175, 218, 74].

3.3 Präparation aus der Zellinie CC2696

3.3.1 Solubilisierung der Thylakoidmembran

Der Stamm CC2696 A4D mt$^+$ wurde aus einer Kreuzung der Zellinien B1 (CC-2694) und LM3-4D1c (CC-2692) erzeugt [160] und vom Chlamyomonas Culture Centre der Duke University (Großbritannien) bezogen. Das Fehlen des PSII-Komplexes und die verminderte Akkumulation von Antennenproteinkomplexen LHC-I und LHC-II erhöht den Anteil von PSI an den chlorophyllbindenden Proteinen in der Thylakoidmembran. In Stämmen von *C. reinhardtii*, die keinen Defekt in der Chl *b*-Synthese besitzen, beträgt der Anteil der LHC etwa 90 % der grünen Membranproteinkomplexe. Die übrigen 10 % verteilen sich in photoautotrophen Zellinien zu etwa gleichen Teilen auf die beiden Photosysteme PSI und PSII [88, 42].
In der Zellinie CC2696 beträgt der Prozentsatz der Antennenproteinkomplexe an den chlorophyllbindenden Proteinen etwa 20 %. Darüber hinaus wird PSII in diesem Stamm nicht akkumuliert. Infolgedessen wird die Konzentration an Chlorophyll überwiegend durch die Menge an PSI in den Thylakoiden bestimmt.

Die Präparation von PSI aus diesen Zellen erforderte aufgrund des geringeren Gesamtchlorophyllgehaltes eine Anpassung der Detergenzmege an die Chlorophyllkonzentration bei der Solubilisierung der Thylakoidmembranen. Das unter 3.2 verwendete Verhältnis von Detergenz zu Pigment beruht auf Erfahrungswerten [149]. Ein empirisches Verfahren für jede einzelne Mutante durchzuführen, kam aufgrund der geringen Ausbeuten nicht in Betracht. In erster Näherung wurde angenommen, daß die Gesamtmenge der Thylakoidmembran in CC2696 sich nicht wesentlich von der photoautotropher Stämme unterscheidet. Statt der Chlorophyllkonzentration wurde deshalb die aufgeschlossene Zellmenge, die für die Solubilisierung verwendet wird, als Bezugsgröße herangezogen. Die Rückrechnung auf die eingesetzte Zellmenge bei Thylakoidpräparationen aus den Zellinien FUD7 und CC125 ergab, daß aus 30–35 g Zellpaste gewonnene Thylakoide in 100 ml Puffer P2 solubilisiert wurden. Etwa 90 % der Gesamtchlorophyllmenge befanden sich bei diesem Verhältnis nach der Detergenzeinwirkung in Lösung.
Wurden Thylakoide aus CC2696, die WT-PSI enthielten, entsprechend dem oben be-

schriebenen Verhältnis von Zellmenge und Puffer verdünnt, betrug die Chlorophyllkonzentration der zu solubilisierenden Suspension um 0,1 mM. Dieser Wert spiegelt im wesentlichen die Menge an PSI in den Thylakoiden wider und verdeutlicht, daß die Akkumulation der Antennenproteine in dieser Zellinie erheblich reduziert ist.

Die Bestimmung des Verhältnisses von Chl *a* zu Chl *b* (Chl *a/b*-Verhältnis) bestätigte, daß der Anteil an PSI an den chlorophyllbindenden Proteinkomplexen in dieser Zellinie wesentlich höher ist. PSI bindet überwiegend Chl *a* und besitzt daher ein Chl *a/b*-Verhältnis > 8, während für Antennenkomplexe LHC-I und LHC-II dieser Wert zwischen zwischen 2 und 4 liegt [153, 193]. Entsprechend betrug das Chl *a/b*-Verhältnis von Acetonextrakten der Thylakoidmembran in CC2696 um 6 und in FUD7 oder CC125 zwischen 2–3.

Thylakoidpräparationen aus CC2696, die im PSI mutiert worden waren, enthielten weniger Chlorophyll, und das Chl a/b-Verhältnis lag ebenfalls unterhalb der Werte, die für den WT bestimmt wurden. Aus diesen sehr einfach zu ermittelnden Größen wurde bereits eine gute Abschätzung des PSI-Gehalts in den verschiedenen Mutanten vorgenommen, wie noch unter 5.2 diskutiert wird.

Als Bezugsgröße für die Detergenzkonzentration während der Solubilisierung wurde deshalb bei PSI-Präparationen aus dem Stamm CC2696 sowohl beim WT als auch bei Thylakoidpräparationen aus mutierten Zellen die eingesetzte Zellmenge zugrunde gelegt. Das aus den Präparationen von FUD7 und CC125 gewonnene Verhältnis, daß Thylakoide aus 30–35 g Zellpaste in 100 ml Detergenzlösung suspendiert werden, ließ sich auf diese Zellinie gut übertragen. Die Solubilisierung wurde wie unter 3.2 beschrieben mit 1 % β-DM durchgeführt. Nach 20 min Zentrifugation bei 50.000 g zur Abtrennung der ungelösten Bestandteile wurde der Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration in dieser Lösung ergab, daß die Solubilisierung zu 80–90 % die chlorophyllbindenden Proteine in Lösung brachte. Präparationen mit Thylakoiden aus CC2696, die im PSI mutiert worden waren, wurden identisch behandelt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

3.3.2 Gelchromatographische Aufreinigung des PSI-Komplexes

Die weitere Isolierung des PSI-Komplexes erfolgte durch eine gelchromatographische Auftrennung der solubilisierten Lösung. Da das Probenvolumen bei diesem Verfahren für eine gute Trennung limitierend ist, wurde der Überstand der Solubilisierung über eine kurze Ultrazentrifugation angereichert: Jeweils 25 ml des Überstandes wurden 5 ml einer 40 % Sucroselösung überschichtet und für 90 min bei 360.000 g zentrifugiert [77]. Während der Zentrifugation sammelten sich die PSI-Komplexe als grüne Bande direkt über dem Zuckerkissen. Freies Chlorophyll und Karotine reicherten sich in den oberen Bereichen des Röhrchens an.

Auffällig war die hohe Konzentration an freiem Karotin, das die oberste orange Schicht auf dem Gradienten bildete. Dieses Phänomen wurde nur bei Präparationen aus dem Stamm CC2696 beobachtet. Das Fehlen eines großen Teils der Antennenproteine führt in dieser Zellinie vermutlich dazu, daß sich die ungebundenen Karotine in die Lipidmembran einlagern. In den nicht Chl *b*-defizienten Stämmen binden die LHC den Großteil der Karotine.

Die grüne Fraktion des Gradienten wurde abgenommen und auf eine Gelfiltrationssäule von 130 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser oder, bei größerem Probenvolumen, auf eine 95 cm lange Säule und 5 cm Durchmesser aufgetragen (Sepharose CL6B/Pharmacia)[1], die in M1 äquilibriert worden war. Eine zufriedenstellende Trennung war bis zu einem Probenvolumen, das 10 % des Gelbettes der Säulen entspricht, bei einer Flußrate von 1 ml/min bei 8°C möglich. Das Elutionsprofil wies drei Proteinfraktionen auf, die bei 280 nm detekiert wurden (Abb. 3.1). Die erste Proteinfraktion (Fraktion-I) eluierte mit dem Ausschlußvolumen der Säule, das bei 2×10^6 kDa liegt. Diese Bande war orange gefärbt. Es handelte sich vermutlich um Protein-Karotin-Aggregate. Die zweite Fraktion (Fraktion-II) eluierte bei einem apparenten Molekulargewicht von $5–10\times10^5$ kDa und war ebenso wie die nachfolgende Fraktion-III, die bei etwa $1–3\times10^5$ kDa eluierte, grün

[1] Die Auswahl des geeigneten Trägermaterials für die Auftrennung hatte umfangreiche Vorversuche erfordert. Alle anderen getesteten Materialen, wie Sephacryl, Fraktogel, und POROS^{TM} zeigten aufgrund des sehr hydrophoben Charakters des PSI eine starke Wechselwirkung mit dem Proteinkomplex. Die qualitativ schlechten Trennungen und die dadurch entstandenen Ausbeuteverluste schlossen im Hinblick auf die geringeren Mengen an PSI in mutierten Zellen die Verwendung dieser Materialien aus.

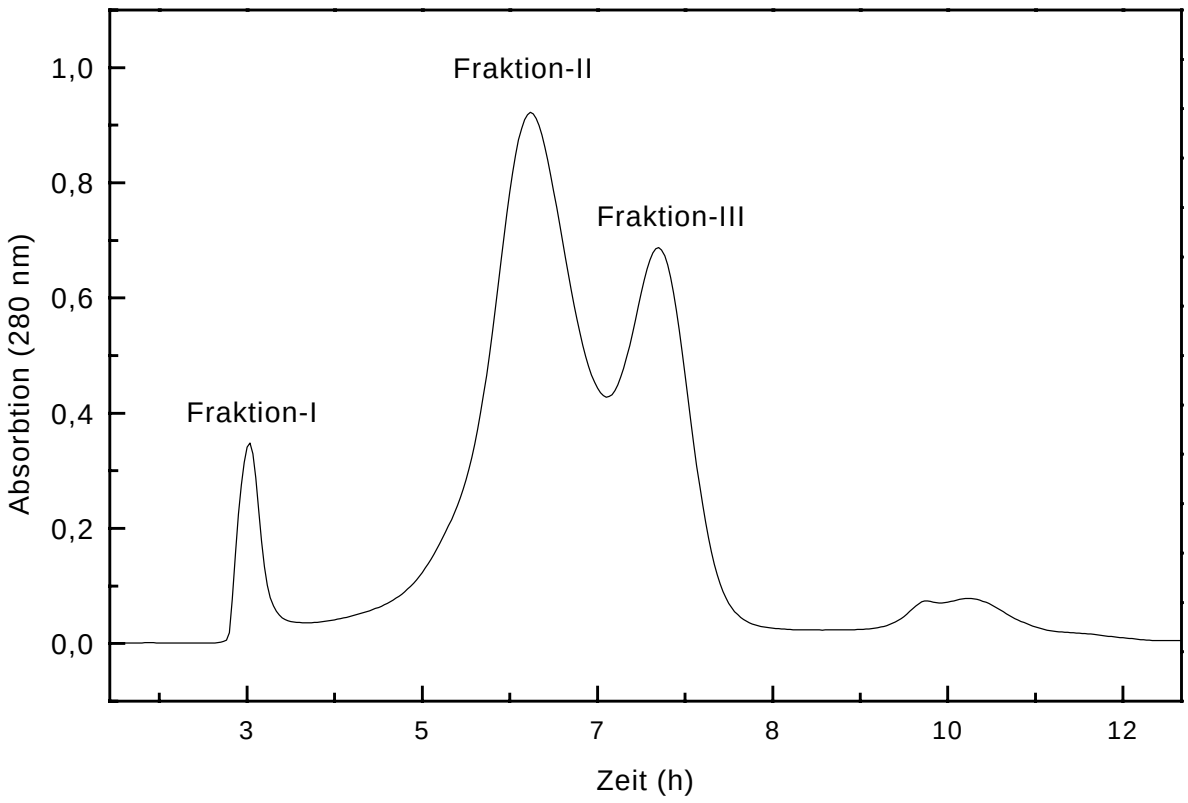

Abbildung 3.1: Elutionsprofil des Solubilisates der Thylakoide nach Auftragen auf eine Gelchromatographiesäule (CL6B/Pharmacia). Flußrate 1 ml/min.

gefärbt.

Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration, insbesondere des Chl *a*/b-Verhältnisses, ergab bereits, in welcher Elutionsbande die größte PSI-Anreicherung zu finden war. Fraktion-I enthielt weniger als 2 % der aufgetragenen Chlorophyllmenge, die Fraktionen-II und -III jeweils etwa 40 %. Das Chl *a/b*-Verhältnis in Fraktion-II betrug 12, demgegenüber fiel der Wert der später eluierenden Fraktion-III auf 2–3 ab (Tabelle 3.1). Die größte Anreicherung des PSI-Komplexes wurde in der Fraktion-II erzielt, wie sich bereits aus dem Chl *a/b*-Verhältnis ergibt. Die Aktivität von PSI in den einzelnen Fraktionen wurde durch die blitzlichtinduzierte Absorptionsänderung bei 696 nm ermittelt. In der Fraktion-II waren mehr als 90 % der PSI-Aktivität zu finden. Die Zahl der Chlorophyllmoleküle pro aktivem PSI-Komplex betrug etwa 80. In Fraktion-I wurde keine PSI-Aktivität bestimmt. In Fraktion-III fiel der Anteil an PSI auf unter 5 % der in Fraktion-II bestimmten Konzentration ab. Im Bereich mit geringer UV-Absorption vor Fraktion-II waren ebenfalls geringe Konzentrationen an PSI zu finden, die in der Summe jedoch we-

	Fraktion-I	Fraktion-II	Fraktion-III
[Chl] %	< 2	40	40
Chl a/b	20	11–12	2–3
Chl/P700	–	70-80	600–800

Tabelle 3.1: Chlorophyllmenge und PSI-Gehalt der einzelnen Fraktionen nach der Gelchromatographie. [Chl] wurde bezogen auf die Chlorophyllmenge vor der Trennung (=100 %). Das Verhältnis von Chl/P700 wurde aus der transienten blitzlichtinduzierten Absorptionsänderung bei 696 nm und aus der Pigmentanalyse bestimmt.

niger als 2 % der Gesamtmenge des Proteinkomplexes ausmachten. Hierbei handelt es sich vermutlich um PSI-Aggregate. Die hohen Chl *a/b*-Verhältnisse (≥ 20) legen nahe, daß diese Komplexe bereits Chlorophylle verloren haben. Eine unspezifische Zusammenlagerung mehrerer PSI-Komplexe mag die Ursache für das Auftreten der PSI-Aktivität in diesem Elutionsfenster sein. Der betreffende Elutionsbereich wurde bei der weiteren Aufreinigung außer acht gelassen.

Die gelchromatographische Trennung ergab somit: Die durch die Solubilisierung der Thylakoidmembran in Lösung gebrachten Protein-Detergenz-Mizellen wurden in drei Fraktionen aufgetrennt. Fraktion-II enthielt den überwiegenden Anteil an PSI mit 75 ± 5 Chlorophyllen pro PSI-Komplex und Chl *a/b*-Verhältnissen von 11 ± 1. In Fraktion-III waren nur geringe Mengen an PSI zu finden. Das Chl *a/b*-Verhältnis dieser Fraktion legt nahe, daß es sich um Antennenkomplexe handelt, die nur in kleiner Menge in dieser Zellinie akkumuliert werden. Die Zuordnung der Elutionsbanden zu den einzelnen Proteinkomplexen wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western-Blots bestätigt, wie noch unter 3.4 beschrieben wird.

Das hier vorgestellte Verfahren ist bei Thylakoidpräparationen aus Zellinien mit zehnfach höherer Konzentration an Antennenkomplexen, wie sie in den Zellinien FUD7 und CC125 vorliegen, nicht zufriedenstellend. Obwohl bereits die mit PSI angereicherte Fraktion aus dem linearen Sucrose-Dichte-Gradienten verwendet wurde (siehe 3.2), wurde keine Verbesserung der Anreicherung durch die Gelchromatographie erreicht. Die PSI-Fraktionen aus diesen Zellinien eluierten über einen weiten Molekulargewichtsbereich. Vermutlich liegt in diesen Präparationen eine Verteilung von PSI-Komplexen vor, die

eine unterschiedliche Anzahl von Antennenproteinen gebunden haben.

3.3.3 Anionenaustausch-Chromatographie der PSI-Fraktion

Die mit PSI angereicherte Fraktion-II wurde in eine Fritte gegeben, die mit DEAE-Cellulose gefüllt war. Der schwache Anionentauscher war in T1 äquilibriert worden. Nach dem Auftragen der PSI-Fraktion wurde mit T2 – entsprechend 3 Volumina der aufgetragenen Probenmenge – gespült. Durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 100 mM NaCl wurde die Probe in 100 ml eluiert. Dieser Reinigungsschritt entfernte einen Großteil der in der Lösung enthaltenen Lipide und Karotinoide, die bei direkter Auftragung auf die starken Ionentauschersäule das Säulenmaterial irreversibel blockierten.
Das Eluat wurde 1:1 mit T1 verdünnt und auf eine starke Anionentauschersäule von 4 cm Länge und 2,6 cm Durchmesser aufgetragen (Q-HP-Sepharose/Pharmacia), die in M1 äquilibriert worden war.

Anschließend wurde die Säule mit einem Säulenvolumen M1 gespült. Der Proteinkomplex wurde mit einem sehr flach ansteigenden $MgSO_4$-Gradienten eluiert (1–90 mM über 180 ml bei einer Flußrate von 2,5 ml/min). Es folgte ein weiterer steiler Salzgradient bis 250 mM $MgSO_4$, um die Säule wieder zu reinigen. Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen ist, eluierte der PSI-Komplex ab einer $MgSO_4$-Konzentration von etwa 34 mM entsprechend einer Leitfähigkeit von 0,17 S. Auffällig ist, daß die Elution des Proteinkomplexes immer mit einem Einbruch in der Leitfähigkeit einhergeht. Die eluierenden Proteine fangen scheinbar einen Teil des Salzes ab, was zu einem zweiten Gradienten auf der Säule führt. Dieser Effekt ist auch bei der Verwendung eines monovalenten Salzes zu beobachten. Das Elutionsprofil zeigte deswegen keine symmetrische Bande, obwohl die einzelnen Fraktionen sich in der Proteinzusammensetzung nicht unterschieden, wie die Auftrennung der einzelnen Fraktionen über PAGE ergab.
Nach der Bestimmung der Chlorophyllmenge und der PSI-Konzentration betrug das Chl *a/b*-Verhältnis 12-13 und die Zahl der Chlorophylle pro PSI-Komplex 65–70. Die einheitliche Elution der Probe legte nahe, daß der angereicherte PSI-Komplex bereits einen hohen Reinheitsgrad aufwies. Die Anzahl von 65 Chlorophyllmolekülen pro PSI liegt bereits unter dem Wert, der für PSI-Kristalle aus *S. elongatus* angegeben wird (90

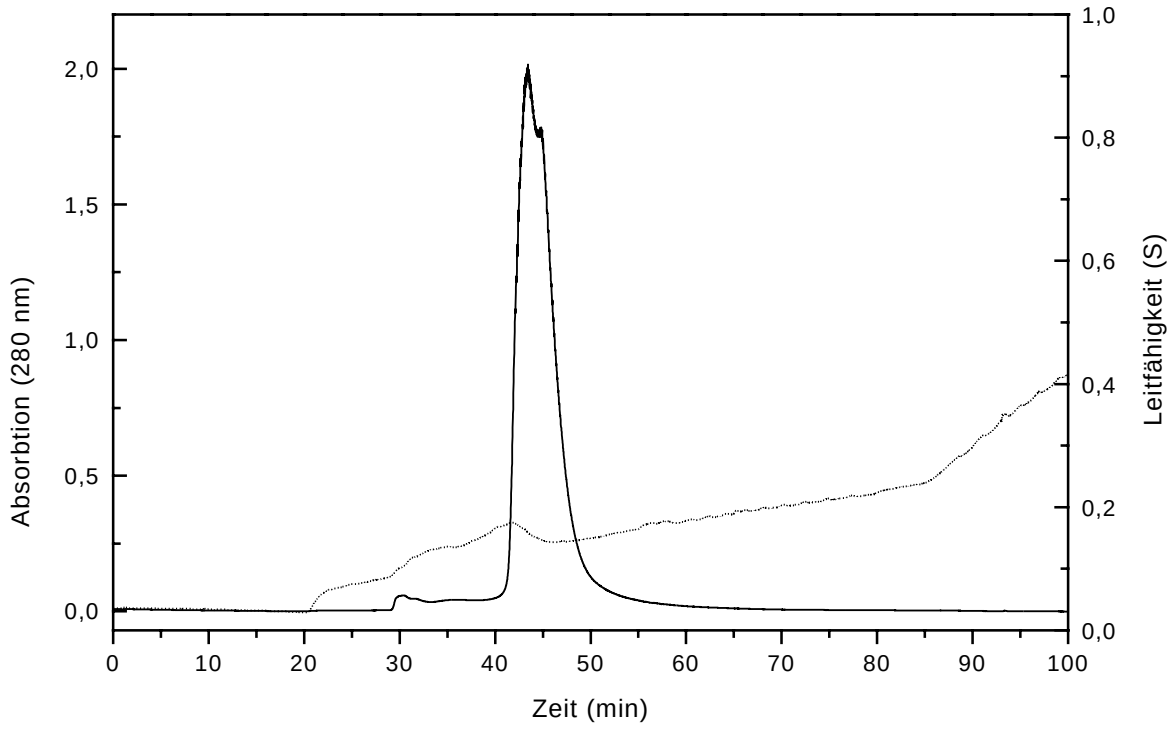

Abbildung 3.2: Elutionsprofil von aufgereinigten PSI-Komplexen nach Auftrag auf einen starken Anionentauscher (Q-HP-Sepharose/Pharmacia) mit $MgSO_4$-Gradienten. Gezeigt sind die Proteinabsorption im UV-Bereich und die Leitfähigkeit (gepunktet).

Chl/P700) [72]. Die in dieser Zellinie in geringer Konzentration vorhandenen Antennenproteinkomplexe LHC-I oder auch LHC-II wurden somit vollständig vom PSI-Komplex abgetrennt.

Die im nächsten Abschnitt behandelte Analyse der Proteinzusammensetzung durch Gelelektrophorese und Western-Blots zeigte jedoch, daß noch ein zweiter Proteinkomplex mit angereichert wurde. Dieser Komplex konnte auch durch weitere Reinigungsschritte, wie Präzipitation mit Polyethylenglykol oder Einsalzen, Hydroxylapatitchromatographie analog zu [175] und hydrophober Interaktionschromatographie nicht abgetrennt werden.

3.4 Biochemische Charakterisierung der PSI-Präparation

Die Anreicherung des PSI-Komplexes wurde während der Aufreinigung durch die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration und des Gehaltes an photoaktivem PSI verfolgt.

Für die spektroskopischen Charakterisierungen des PSI-Komplexes war der Reinheitsgrad der Probe bereits nach der Gelfiltration ausreichend. Die Anforderungen an die Reinheit der Probe für die biophysikalischen Untersuchungen wurden im wesentlichen durch zwei Randbedingungen bestimmt:

- Der Anteil der Pigmente, die nicht zum PSI-Komplex gehören, mußte möglichst gering gehalten werden, um bei den optischen Messungen ein optimales Signal/ Rauschverhältnis zu erreichen.
- Eine sehr hohe Konzentration an PSI war einzustellen, um ein ausreichendes Signal zu erzeugen (EPR/ENDOR-Messung).

Verunreinigungen durch Proteine, die diese beiden Parameter nicht oder nur wenig beeinflußten, waren bei den spektroskopischen Messungen nicht weiter störend.
Die Aufreinigung des PSI-Komplexes wurde trotz der für die spektroskopischen Untersuchungen ausreichenden Qualität weiter vorangetrieben. Neben der Charakterisierung der biophysikalischen Parameter des Komplexes wurde getestet, ob eine Isolierung des PSI-Komplexes aus *C. reinhardtii* in reiner Form möglich ist. Diese Präparation sollte als Grundlage für Kristallisationsansätze dienen. Die Reinheit und die Homogenität der Probe sind hierfür eine wichtige Voraussetzung. Die Proteinzusammensetzung der mit PSI angereicherten Proben wurde daher durch PAGE und Western-Blots analysiert.

3.4.1 Proteinzusammensetzung der PSI-Fraktion

Aliquots der einzelnen Aufreinigungsschritte wurden durch Gelelektrophorese analytisch aufgetrennt (Abb. 3.3). Die Silberfärbung des Polyacrylamidgels zeigt, daß die Zahl der Proteinbanden nach der Ultrazentrifugation der solubilisierten Probe auf dem Sucrosekissen noch sehr hoch ist (Spur „Suc“). Eine deutliche Anreicherung von Proteinbanden ist nach der Gelfiltration zu erkennen: In Fraktion-II (Spur Frk-II) treten bereits die Proteinbanden, die dem PSI-Komplex zugeordnet werden, deutlich hervor (Banden um 66 kDa und um 20 kDa). In Fraktion-III hingegen reichern sich Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa an (Spur Frk-III). Die Zahl der Proteinbanden verringert sich nochmals durch die Anionenaustauschchromatographien (Spur DEAE und

QHP). Das Bandenmuster dieser beiden Reinigungsschritte unterscheidet sich praktisch nicht. Durch die letzte Säulenreinigung wurde jedoch der Anteil an Verunreinigungen vermindert, wie am geringeren Hintergrund in dieser Spur zu erkennen ist (Spur QHP).

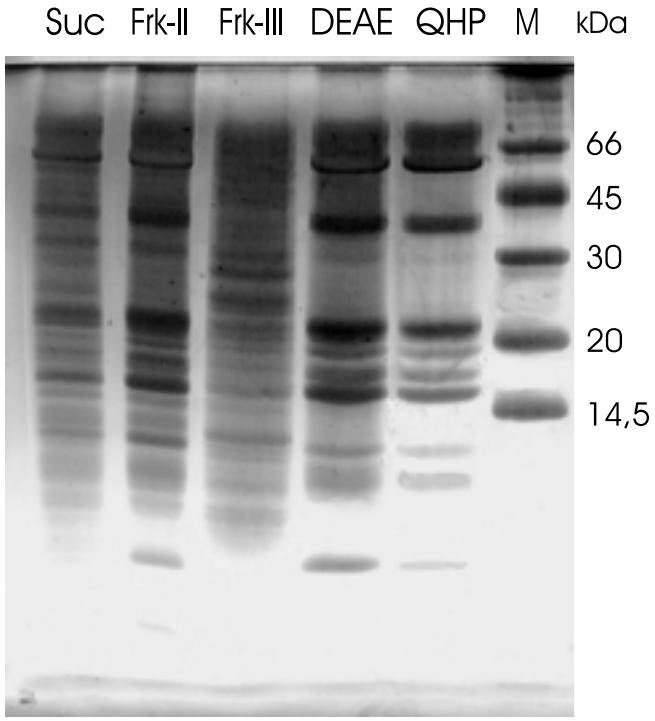

Abbildung 3.3: SDS-PAGE von Proteinproben der PSI-Aufreinigung. Aufgetragen wurde jeweils eine identische Chlorophyllmenge (50 μg/ml). Suc.: Solubilisierte PSI-Fraktion nach der Sucrosezentrifugation; Frk-II/Frk-III: grüne Proteinfraktionen nach der Gelchromatographie; DEAE/QHP: Proteinfraktionen mit PSI-Aktivität nach den Anionentauschersäulen; M: Proteingrößenmarker. Angabe des apparenten Molekulargewichtes in kDa.

3.4.2 Identifizierung von PSI-Untereinheiten

Die mit PSI angereicherte Präparation aus *C. reinhardtii* zeigt im SDS-Gel ein ähnliches Bandenmuster wie aufgelöste PSI-Kristalle aus *S. elongatus* (Abb. 3.4). Eindeutig dem PSI zuzuordnen sind die beiden großen Proteinuntereinheiten PsaA und PsaB. Sie treten bei einem apparenten Molekulargewicht um 68 kDa als breite diffuse Bande auf. Aufgrund der Sequenzhomologie mit den PSI-Untereinheiten aus *S. elongatus* wurden die diffuse Proteinbande um 9 kDa PsaC und die darüber liegende Bande PsaE zugeordnet. Letztere weist als charakteristisches Merkmal einen bläulichen Schimmer bei der Silberfärbung des

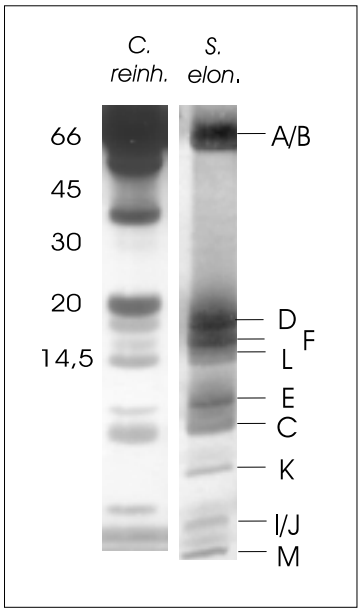

Abbildung 3.4: SDS-PAGE der PSI-Fraktion aus *C. reinhardtii* nach der Aufreinigung des Komplexes und von PSI-Kristallen aus *S. elongatus*. Die angegebenen Proteinbanden wurden in *S. elongatus* identifiziert [151]. Ganz links sind die Molekulargewichte des Proteingrösenstandards in kDa angegeben.

Proteingels auf. Entsprechend wird die Bande um 5 kDa in *C. reinhardtii* den Untereinheiten PsaI und PsaJ zugeordnet, da sie in der Blaualge ebenfalls an gleicher Stelle zu finden ist.

Unterhalb von 20 kDa liegt eine sehr dominante Bande, die in der PSI-Präparation aus *C. reinhardtii* wahrscheinlich mehrere verschiedene Proteine enthält. Durch Antikörper wurde PsaD als ein Bestandteil dieser Bande identifiziert. PsaF wurde – ebenfalls durch Antikörper – der Bande unterhalb von PsaD zugeordnet. Die bei *S. elongatus* um 15 kDa auftretende Bande der Untereinheit PsaL besitzt in der PSI-Probe der Grünalge ebenfalls ein Pendant bei gleichem apparenten Molekulargewicht. Die kleinste Untereinheit PsaM im PSI der Blaualge kommt in Pflanzen und Grünalgen nicht vor. Demgegenüber sind PsaH, PsaG und PsaN spezifisch für das PSI der Eukaryoten [41]. Diese Proteine ebenso wie PsaK wurden im einzelnen in der PSI-Präparation der Grünalge nicht nachgewiesen. Aufgrund der Molekulargewichte von 12, 14 bzw. 11 kDa ist davon auszugehen, daß diese Untereinheiten durch die Banden um 14 kDa repräsentiert werden bzw. in der PsaC- oder PsaE-Bande enthalten sind. Mit PsaA, PsaB, PsaC, PsaD und PsaE wurden alle

Untereinheiten in der PSI-Fraktion den Proteinbanden im Gel zugeordnet, die an der Ladungstrennung und am primären Elektronentransport beteiligt sind. Die übrigen kleineren Proteinuntereinheiten des PSI-Komplexes wurden nicht einzeln identifiziert. An den am PSI stattfindenden Redoxreaktionen sind sie nicht beteiligt. Ihre Funktion ist weitgehend ungeklärt [41].

Quantitative Auswertung der PsaF-Menge

Die quantitative Auswertung des Antikörperblots gegen PsaF zeigte, daß die Konzentration der Untereinheit PsaF im Verlaufe der Anreicherung von PSI ab- statt zunimmt (Abb. 3.5). Überraschend ist die starke Reaktion der Fraktion-I nach der Gelfiltration der

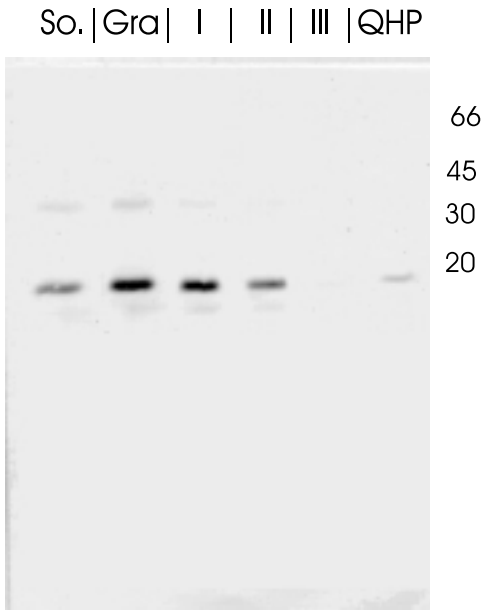

Abbildung 3.5: Western-Blot mit Antikörpern gegen PsaF der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine nach den verschiedenen Aufreinigungsschritten. So.: Solubilisierte Proteinfraktion der Thylakoide; Gra: PSI-Fraktion nach dem Sucrose-Dichte-Gradienten; I: Fraktion-I der Gelfiltration; II: Fraktion-II der Gelfiltration; III: Fraktion-III der Gelfiltration; QHP: PSI-Fraktion nach der zweiten Anionentauschersäule. Die Zahlenangaben beziehen sich auf das apparente Molekulargewicht von Proteinstandards in kDa.

solubilisierten Thylakoidmembran mit dem Anti-PsaF-Antikörper (Spur I). In Fraktion-II, die den angereicherten PSI-Komplex enthält, ist die Reaktion bereits deutlich geringer (Spur II). Nach der zweiten Anionentauschersäule ist diese Proteinuntereinheit nur noch schwach zu detektieren (QHP-Anionentauscher). Im Fortgang der Aufreinigung des PSI-

Komplexes geht somit die Untereinheit PsaF verloren. Der Nachweis in der Fraktion-I nach der Gelfiltration, die vermutlich Proteinaggregate enthält, spricht dafür, daß dieses Protein zu unspezifischen Interaktionen mit hydrophoben Umgebungen neigt. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, daß die Fraktion-III kein PsaF enthält. Ein einfaches Ablösen der Untereinheit ist damit auszuschließen, da kein „Verschmieren“ dieses Proteins über die Säule beobachtet wird.
Auch in PSI-Präparationen aus den Blaualgen *S. elongatus* und *S. species* wurde beobachtet, daß sich diese Untereinheit unter bestimmten Bedingungen bei der Solubilisierung der Membranen vom PSI-Komplex ablöst [77, 222]. Die schwache Wechselwirkung von PsaF mit dem PSI-Komplex wird auch durch Kraftfeldmikroskopieaufnahmen an der Thylakoidmembran bestätigt, die zeigten, daß diese Untereinheit in vielen Fällen nicht ans PSI gebunden ist [73].

3.4.3 Zuordnung weiterer Proteinbanden

Die Proteinbanden um 50 kDa und zwischen 30-40 kDa gehören eindeutig nicht zum intakten PSI-Komplex. Für das Auftreten dieser Banden gibt es zwei Erklärungen:

1. Die Banden stammen von anderen Proteinen oder einem anderen Proteinkomplex, die/der mit angereichert wurde.

2. Es handelt sich um Abbauprodukte der beiden großen Untereinheiten.

Ein Western-Blot mit Antikörpern gegen PsaA reagierte ausschließlich mit der 68 kDa-Bande, die im SDS-Gel bereits den beiden großen Untereinheiten zugeordnet wurde. Kreuzreaktionen mit den Banden um 50 kDa und 35 kDa traten nicht auf. Es handelt sich damit nicht um Abbauprodukte von PsaA und PsaB.

Aufgrund des apparenten Molekulargewichtes dieser Proteinbanden wurde vermutet, daß es sich um Untereinheiten der CF_0F_1-ATP-Synthase des Chloroplasten handelt. Dieser Komplex befindet sich ebenfalls wie PSI überwiegend in den nicht gestapelten Bereichen der Thylakoidmembran [197]. Eine Anreicherung dieses Proteinkomplexes zusammen mit PSI ist wegen der vergleichbaren Größe und der Lokalisation in der Membran durchaus wahrscheinlich.

Western-Blots der PSI-Fraktion mit Antikörpern, die gegen die CF_1-Untereinheit (**CF1**) und gegen die α-Untereinheit ($\boldsymbol{\alpha}$) der ATP-Synthase gerichtet waren, reagierten deutlich mit der Proteinbande, die bei 66 kDa auftritt (Abb. 3.6). Diese Bande entspricht somit

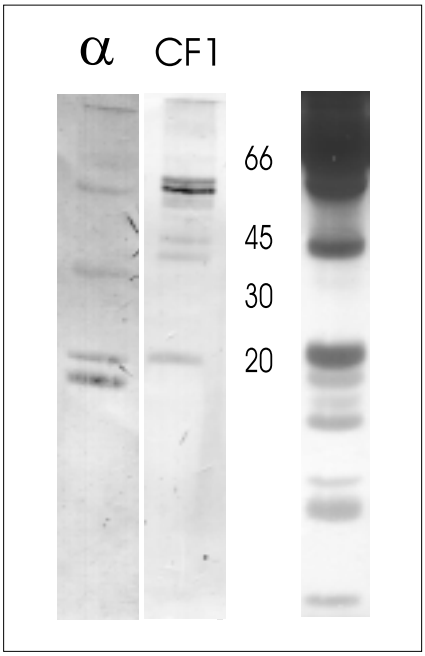

Abbildung 3.6: Western-Blot des angereicherten PSI-Komplexes nach der zweiten Anionentauschersäule mit Antikörpern, die gegen die α-Untereinheit ($\boldsymbol{\alpha}$) und gegen den CF1-Teil (**CF1**) der ATP-Synthase gerichtet sind. Neben den Größenangaben in kDa ist zum Vergleich das silbergefärbte Proteingel abgebildet.

den α- und β-Untereinheiten der F_0-Einheit der ATP-Synthase. Die beiden Banden um 45 kDa sowie die schwache Bande bei 30 kDa und die Proteinbanden unterhalb von 20 kDa ließen sich ebenfalls durch diese Antikörper anfärben. Die apparenten Molekulargewichte entsprechen damit den Größen der Untereinheiten γ (38 kDa), die je nach Oxidationsgrad im SDS-Gel als Doppelbande erscheint [197], und δ (21 kDa) des CF1-Teils der ATP-Synthase. Bei der PSI-Präparation wurden aufgrund des Western-Blots zumindest Teile der Chloroplasten-ATP-Synthase mit angereichert.[2]

Weitere potentielle Verunreinigungen in der PSI-Präparation sind die Antennenkomplexe. Durch Western-Blot mit den Antikörpern 17.2 und 18.1[3], die beide überwiegend mit LHC-

[2] Während der schriftlichen Abfassung der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die ATP-Synthase vollständig mit angereichert wurde und aktiv ist [70].

[3] Die Bezeichnung der Antikörper geht auf auf die für die Immunisierung eingesetzte Proteinbande zurück; vgl. in Bassi et al. [9].

I-Untereinheiten und schwach mit LHC-II reagieren [9], wurde gezeigt, daß diese Proteine nach der Gelfiltration nicht mehr in der PSI-Fraktion (Fraktion-II) vorhanden sind (Abb. 3.7). Die Fraktion-III enthält hingegen diese Proteine in sehr hoher Konzentration, wie

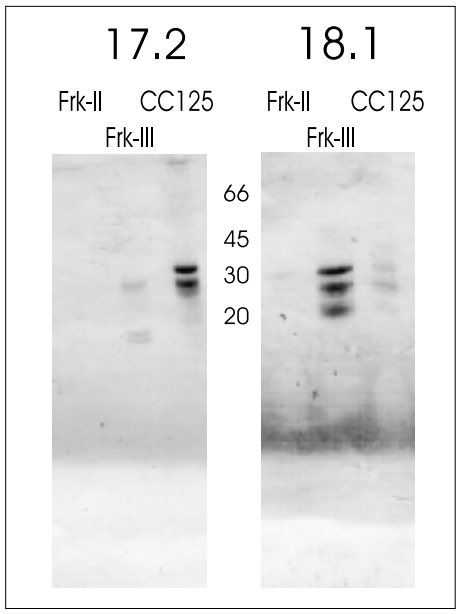

Abbildung 3.7: Western-Blot des angereicherten PSI-Komplexes mit den Antikörpern 17.2 und 18.1, die gegen die Antennenkomplexe LHC-I gerichtet sind [9]. Geblottet wurden SDS-Polyacrylamidgele von Proteinproben der Fraktion-II (Frk-II) und Fraktion-III (Frk-III) der Gelfiltration sowie eine PSI-Präparation aus der Zellinie CC125.

die Reaktion mit dem Antikörper 18.1 deutlich zeigt. Zum Vergleich wurde eine PSI-Präparation aus dem *C. reinhardtii*-Stamm CC125 mit aufgetragen.

3.5 Zusammenfassung

Für die Isolierung von PSI aus der Zellinie CC2696 wurde ein neues Präparationsverfahren entwickelt. Durch die Verwendung einer gelchromatographischen Auftrennung war es möglich, sehr schonend und schnell eine hohe Anreicherung an PSI mit sehr guten Ausbeuten zu erhalten. Auch geringere PSI-Konzentrationen, wie sie in einigen Mutanten auftraten, beeinträchtigten die Qualität der Trennung nicht. Die Reinheit der Probe nach diesen Präparationsschritten war für alle weiteren spektroskopischen Untersuchungen sehr zufriedenstellend. Die vollständige Abtrennung der Antennenkomplexe war dafür eine wesentliche Voraussetzung.

Die Analyse der Proteinzusammensetzung ergab, daß der PSI-Komplex mit allen am Elektronentransport beteiligten Untereinheiten isoliert wurde. Die Untereinheit PsaF ist allerdings nicht mehr im stöchiometrischen Verhältnis an den Komplex gebunden. Dieses Protein ist unter physiologischen Bedingungen an der Re-Reduktion des PSI beteiligt [67, 92]. Die in dieser Arbeit untersuchte Ladungstrennung und der lichtinduzierte Elektronentransfer werden dadurch nicht beeinträchtigt.

Neben den Proteinen des PSI wurden weitere Polypeptide identifiziert, die Bestandteil der Chloroplasten-ATP-Synthase sind. Dieser Proteinkomplex war auch durch zwei weitere Chromatographieschritte nicht abzutrennen. Andere hier nicht aufgeführte Verfahren ergaben ebenfalls keine höhere PSI-Anreicherung. Die vollständige Isolierung von PSI aus *C. reinhardtii* gelang somit nicht. Vermutlich wird die ATP-Synthase bereits während der Solubilisierung mit dem PSI-Komplex in eine Detergenzmizelle eingeschlossen. Das apparente Molekulargewicht der Fraktion-II von etwa 9×10^5 kDa, das sich aus der analytischen Gelchromatographie ergibt, unterstützt diese Annahme. Es entspricht der Summe der Molekulargewichte der ATP-Synthase (5-5,5$\times10^5$ kDa), des PSI-Komplexes (3×10^5 kDa) und der Detergenzmoleküle (etwa 8×10^4 kDa, abgeschätzt aus der kritischen Mizellenkonzentration von β-DM). Wenn die Protein-Detergenzmizellen in der Probe homogen sind und die eingeschlossene ATP-Synthase eine definierte Bindung zum PSI besitzt, ist auch eine Co-Kristallisation der beiden Komplexe denkbar. Erste Versuche, die aufgereinigten Protein-Komplexe zu kristallisieren, wurden begonnen.

Der Einschluß dieser beiden Komplexe in eine Mizelle kann auch dadurch erklärt werden, daß bereits in der Thylakoidmembran eine Wechselwirkung zwischen PSI und der ATP-Synthase besteht. Eine solche Anordnung wäre für den zyklischen Elektronentransport, der nur PSI als lichtgetriebenes Redoxprotein benötigt, von Vorteil. Der durch das PSI entstandene Protonengradient würde dann – räumlich betrachtet – unmittelbar von der ATP-Synthase genutzt. Die Anreicherung dieser beiden Komplexe in den nicht gestapelten Bereichen der Stromathylakoide des Chloroplasten [197] spricht für diese Hypothese.

4

Biophysikalische Charakterisierung von WT-PSI aus *C. reinhardtii*

Die Grünalge *C. reinhardtii* enthält einen Chloroplasten mit einer für höhere Pflanzen typischen Faltung der Thylakoidmembran. Die an der Lichtreaktion beteiligten Proteinkomplexe sind zwischen Pflanzen und der Grünalge homolog; die Aminosäuresequenzen jeweils hochkonserviert [88].
Im Rahmen biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen von Mutanten verfügt der einzellige Organismus gegenüber Pflanzen jedoch über einige Vorteile:

1. Die Anzucht ist im Labormaßstab in größeren Mengen mit kurzen Generationszeiten möglich.

2. Mutageneseverfahren wurden sowohl für das Chloroplastengenom als auch für die DNA im Zellkern entwickelt.

3. Der Organismus wächst fakultativ photoautotroph. Durch Zugabe einer reduzierten Kohlenstoffquelle sind Untersuchungen an Mutanten möglich, die Defekte im Photosyntheseapparat aufweisen.

Trotz der stammesgeschichtlichen Nähe zu den Pflanzen ergaben die spektroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit, daß sich PSI aus *C. reinhardtii* in einigen spektralen Eigenschaften sowohl vom PSI der Pflanzen als auch von den Cyanobakterien unterscheidet. In diesem Kapitel werden die biophysikalischen Charakteristika des isolierten PSI-

Komplexes aus *C. reinhardtii* vorgestellt. Die Ergebnisse werden mit Literaturdaten von PSI-Komplexen aus anderen Organismen verglichen und diskutiert.

4.1 Spektrale Eigenschaften des PSI-Komplexes

Die Absorptionsspektren des PSI-Komplexes wurden bei Raumtemperatur, 77 K und 5 K aufgenommen und den Messungen am PSI aus *S. elongatus* gegenübergestellt. Das Fluoreszenzspektrum des PSI-Komplexes wurde nur bei Raumtemperatur gemessen. Zunächst wird allerdings die Pigmentzusammensetzung der Proteinkomplexe aus beiden Organismen nach Extraktion des PSI mit Aceton aus dem Absorptionsspektrum der Pigmente ermittelt und verglichen.

4.1.1 Pigmentzusammensetzung des PSI-Komplexes

Eine Bestimmung der einzelnen Pigmentkonzentrationen direkt aus dem Spektrum des PSI-Komplexes ist aus den weiter unten genannten Gründen nicht möglich. Hierzu ist die Extraktion der Kofaktoren mit Aceton erforderlich. Mit den bekannten Extinktionskoeffizienten für dieses Lösungsmittel [164] läßt sich aus dem Spektrum des Extraktes die Zahl der im PSI gebundenen Pigmente ermitteln, wenn die Konzentration an PSI bekannt ist. Abb. 4.1 zeigt das Spektrum des PSI-Extraktes aus *C. reinhardtii*, das in die Anteile der Absorptionen von Chl *a*, Chl *b* und der Karotine zerlegt wurde. Die Konzentrationen von Chl *a* und Chl *b* wurden über einen Vergleich mit Chlorophyllmaßlösungen und nach Porra [164] bestimmt bzw. berechnet (beide Verfahren führten zum gleichen Ergebnis). Die Karotinabsorption resultiert aus der Subtraktion der Absorptionen, die auf Chl *a* und Chl *b* zurückgehen, vom Ausgangsspektrum. Die Strukturformel von Chl *a* und von BChl *a*, das später noch als Bestandteil des P865 im bRC von *Rb. sphaeroides* erwähnt wird, ist unter den Spektren aufgeführt (Ab. 4.2).

Aus den reinen Pigmentkonzentrationen der Extrakte läßt sich zunächst nur das Verhältnis der im PSI gebundenen Kofaktoren zueinander entnehmen. Nach der Bestimmung der PSI-Konzentration durch blitzlichtinduzierte Differenzspektroskopie ergibt sich die Anzahl der pro Reaktionszentrum gebundenen Pigmente: Der isolierte PSI-Komplex

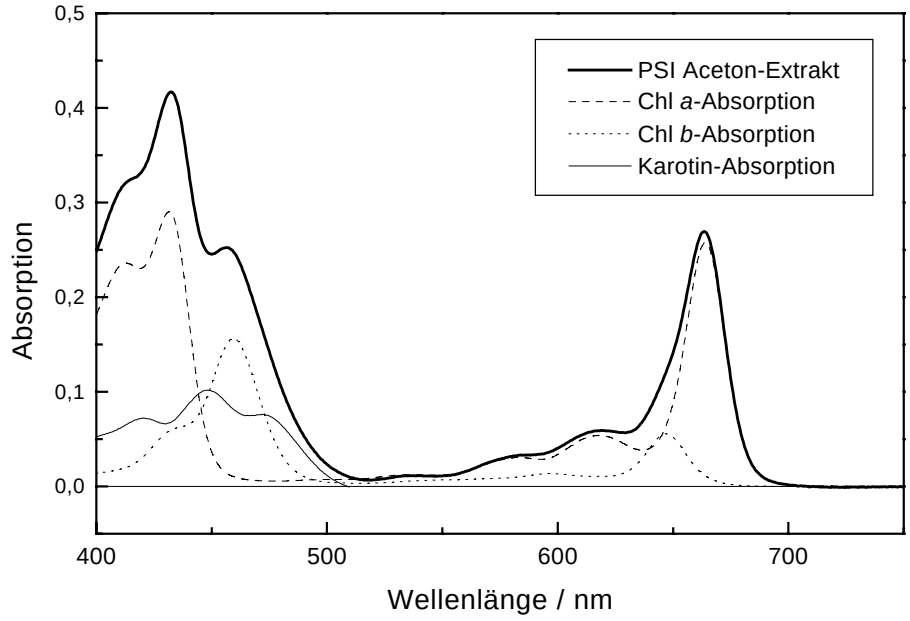

Abbildung 4.1: Spektrum und Dekonvolution des Acetonextraktes von PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii*. Das Ausgangsspektrum (fettgedruckt) wurde in die spektralen Anteile der einzelnen Pigmente zerlegt: Chl *a* (gestrichelt); Chl *b* (gepunktet); Karotin (durchgezogener dünner Kurvenverlauf).

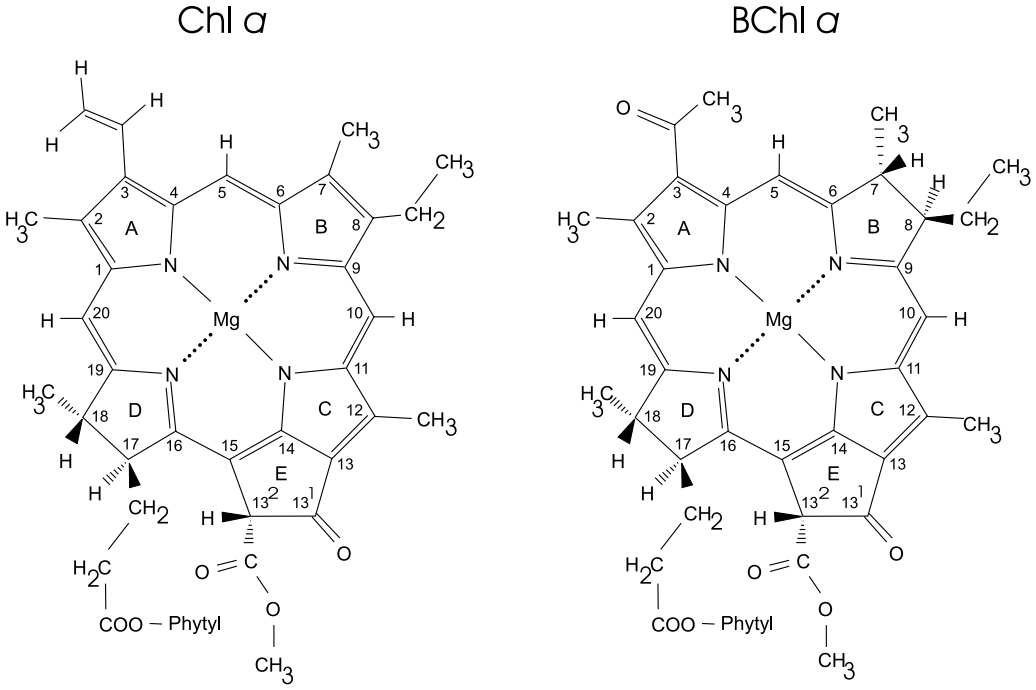

Abbildung 4.2: Strukturformel von Chl *a* und BChl *a* mit Numerierung der Kohlenstoffatome des Porphyrinringes nach IUPAC. Chl *b* enthält an Position 7 des Porphyrinringes anstelle der Methyl- eine Formylgruppe.

aus *C. reinhardtii* bindet etwa 60 Chl *a*-, 5-6 Chl *b*- und 13-14

Karotinmoleküle.[1] Die Zahl der Karotine entspricht damit den Werten, die für PSI-Päparationen aus höheren Pflanzen angegeben werden [4, 12, 191]. Für PSI aus *S. elongatus* wurden 20 Karotine pro PSI bestimmt [72].

Ungewöhnlich ist der Gehalt an Chl *b* im PSI. Dieses Pigment wird in Pflanzen nur in den Antennenkomplexen und nicht in den Reaktionszentren vermutet [153]. Die Grünalge weicht in diesem Punkte von den Pflanzen und den Cyanobakterien ab. Letztere synthetisieren überhaupt kein Chl *b*.

4.1.2 Absorption bei Raumtemperatur

Abb. 4.3 zeigt die Absorptionsspektren von PSI aus *C. reinhardtii* und *S. elongatus* [161]. Die Spektren werden bestimmt durch zwei Bereiche mit hoher Extinktion, die jeweils an der unteren und oberen Grenze des sichtbaren Lichtes auftreten und überwiegend auf die Absorption der Chlorophylle zurückzuführen sind. Zwischen 400-520 nm enthalten

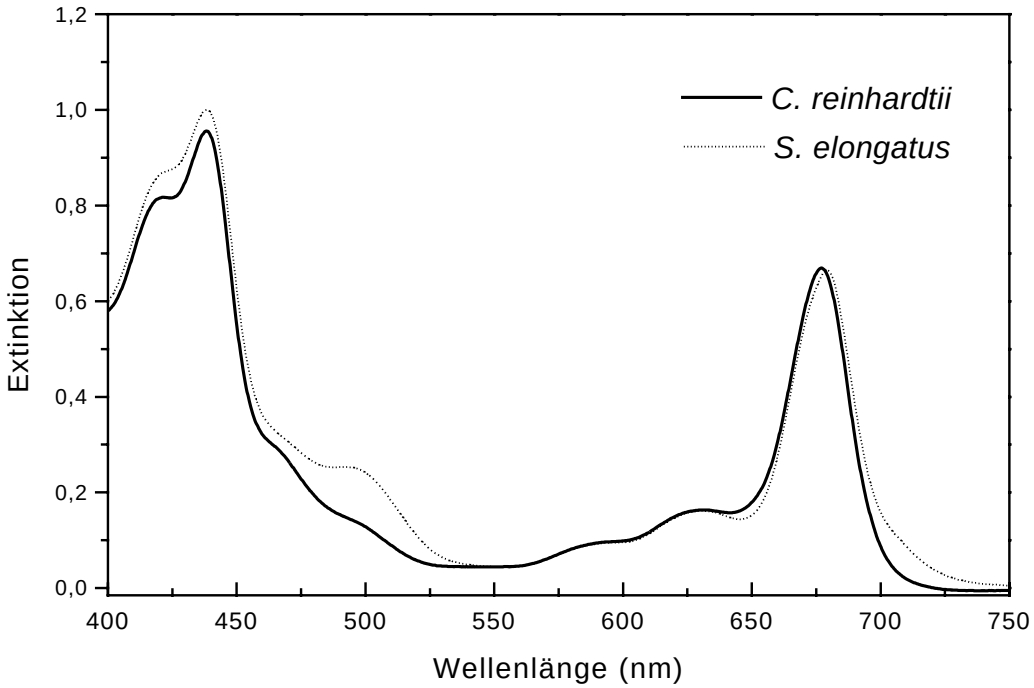

Abbildung 4.3: Absorptionsspektren von PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* (fettgedruckt) und *S. elongatus* (gepunktet) [161] bei Raumtemperatur. Die Spektren wurden auf die maximale Absorption der Q_y-Bande normiert (677 nm).

[1] Zur Berechnung wurde der Extinktionskoeffizient von β-Karotin benutzt (ϵ_{450}=134 $mM^{-1}cm^{-1}$).

die Spektren neben der Soret-Bande der Chlorophylle die Absorption der Karotine. Die Unterschiede zwischen den beiden Spezies in diesem Bereich gehen darauf zurück, daß der PSI-Komplex aus *C. reinhardtii* Chl *b* enthält, welches in Cyanobakterien nicht vorkommt. Die Soret-Bande dieses Pigmentes besitzt ein Maximum bei 460 nm. Die Schulter bei 500 nm im Spektrum von *S. elongatus* geht allein auf die Absorption der Karotine zurück, da Chl *a* in diesem Bereich nur unbedeutend absorbiert.

Der zweite Bereich mit hoher Extinktion befindet sich zwischen 650 nm und 730 nm; diese Absorption entspricht den Q_y-Banden der Chlorophylle. Durch die Einbindung in das Proteingerüst werden die spektralen Eigenschaften jedes einzelnen Chlorophyllmoleküls im PSI-Komplex durch dessen lokale Umgebung beeinflußt. Die Extinktionsbande des PSI-Komplexes muß somit als Summe von unterschiedlichen Chlorophyllabsorptionen angesehen werden. Die Linienbreite der Absorption ist daher größer als in Lösungsmittelspektren der reinen Pigmente.

Das im PSI von *C. reinhardtii* gebundene Chl *b* trägt im roten Bereich des Spektrums nur zu einem geringen Teil zur Absorption bei, da es nur etwa 10 % des Gesamtchlorophylls repräsentiert und der Extinktionskoeffizient für Chl *b* in diesem Wellenlängenbereich nur halb so groß ist wie der für Chl *a*. Das Spektrum der Grünalge unterscheidet sich deshalb in diesem Bereich nicht wesentlich von den Cyanobakterien. Die geringen Abweichungen im Maximum der Absorption von 3 nm können auf eine etwas andere Proteinumgebung einiger Chlorophyllmoleküle in den Cyanobakterien zurückzuführen sein. PSI-Präparationen aus Pflanzen weisen wie *C. reinhardtii* das Maximum bei 677 nm auf [8].

4.1.3 Absorptionsspektren bei tiefen Temperaturen

Zur Verbesserung der spektralen Auflösung wurde das Absorptionsspektrum von PSI bei 5 K und 77 K aufgenommen; ersteres ist in Abb. 4.4 für *C. reinhardtii* und *S. elongatus* zu sehen. Das 77 K-Spektrum von PSI aus *C. reinhardtii* wies nur unwesentlich schmalere Linien als das bei Temperaturen des flüssigen Heliums (5 K) gemessene auf. Im Spektrum bei 5 K sind im Q_y-Bereich neben dem Maximum, das für PSI aus der Grünalge gegenüber dem Spektrum bei Raumtemperatur nahezu unverändert bei 676 nm liegt, zwei Schultern bei 648 nm und 696 nm zu erkennen. Die kurzwellige Komponente ist auf den

Anteil an Chl *b* zurückzuführen, dessen Q_y-Absorption gegenüber Chl *a* um etwa 20 nm blauverschoben ist. Das Fehlen der Komponente im Spektrum von PSI aus *S. elongatus* bestätigt diese Zuordnung. Die zweite Schulter bei 696 nm geht auf das Chl-Paar P700 zurück (siehe unten).

Das Spektrum der Cyanobakterien ist bei 5 K deutlich strukturierter: Im Q_y-Bereich sind mindestens 6 verschiedene Komponenten zu erkennen, die bei 673 nm, 680 nm, 684 nm, 698 nm, 708 nm und um 720 nm ihr jeweiliges Maximum haben. Die P700-Absorption ist etwas langwelliger als in der Grünalge (Schulter um 698 nm). Darüber hinaus absorbieren mindestens zwei Chl *a*-Moleküle um 709 nm, die in *C. reinhardtii* fehlen. Der aus der Grünalge isolierte PSI-Komplex enthält offensichtlich keine Chl-Moleküle, die längerwellig als P700 absorbieren.

In PSI aus Pflanzen treten solch eine langwellige Absorption ebenso wie die Chl *b*-Bande nur dann auf, wenn die Präparationen LHC-I enthalten [9, 202]. In den Cyanobakterien hingegen sind die langwellig absorbierenden Chlorophylle Bestandteil des PSI-Komplexes [72].

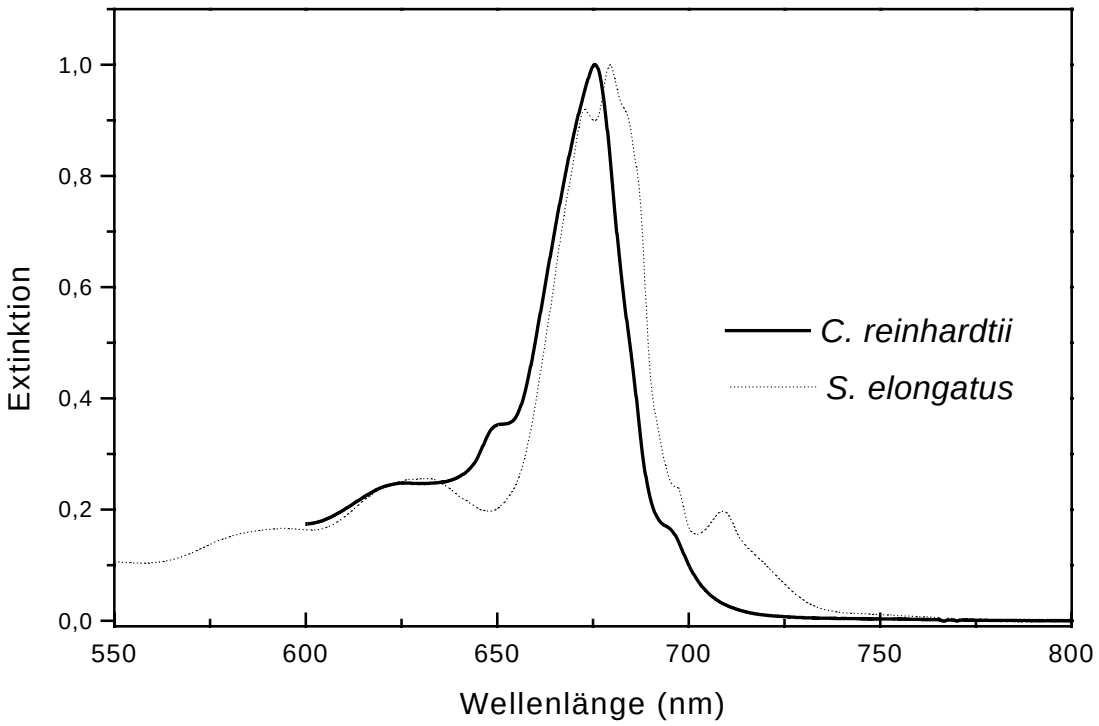

Abbildung 4.4: Absorptionsspektrum von PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* (fettgedruckt) und *S. elongatus* (gepunktet) bei 5 K.

4.1.4 Fluoreszenzspektroskopie am PSI-Komplex

Die Fluoreszenz der isolierten PSI-Komplexe aus *C. reinhardtii* wurde bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Fluoreszenzquantenausbeute des PSI ist gering, da P700 sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Zustand ein starker Fluoreszenzquencher ist [32]. In Abb. 4.5 ist das Emissionsspektrum des PSI der Grünalge dem Spektrum von trimerem PSI aus *S. elongatus* gegenübergestellt. Das Spektrum des PSI aus *C. reinhardtii* zeigt eine dominante Emissionsbande mit einem Maximum bei 688 nm, die im langwelligen Bereich weit ausläuft. Das Maximum des Spektrums von PSI aus *S. elongatus* liegt hingegen bei 721 nm und weist eine ausgeprägte Schulter bei 690 nm auf. Das Fluoreszenzspektrum der Cyanobakterien wurde von C. Flemming eingehend analysiert und interpretiert. Sie ordnet die Schulter um 690 nm dem Chl-Pool des PSI-Komplexes zu, der um 668 nm absorbiert. Die langwelligere Fluoreszenz bei 715–760 nm wird hervorgerufen durch die Pigmentpools, die bei 708 und 720 nm absorbieren [72].

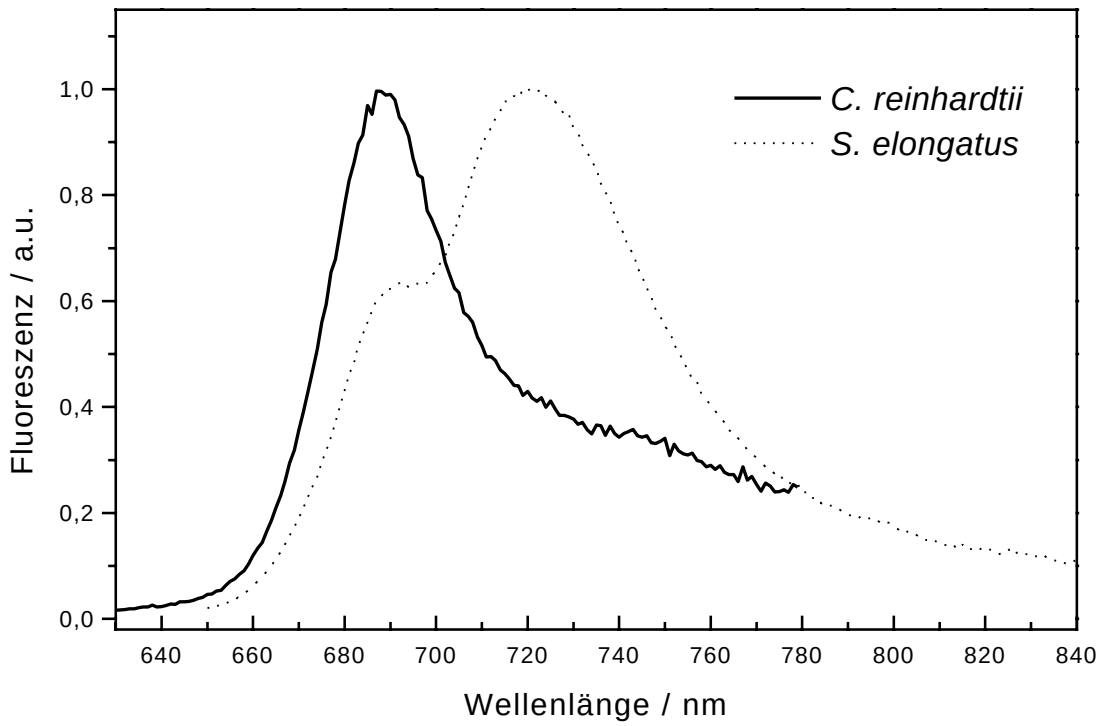

Abbildung 4.5: Fluoreszenzspektren von PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* (fettgedruckt) und *S. elongatus* (gepunktet). Die Spektren wurden im Maximum auf 1 normiert.

Im PSI-Komplex höherer Pflanzen und Grünalgen werden keine Chlorophylle direkt im PSI-Komplex gebunden, die bei Wellenlängen > 700 nm ihr Absorptionsmaximum haben. In diesen Spezies absorbieren Subtypen der LHC-I in diesem Bereich [193]. Die LHC waren in der PSI-Präparation aus *C. reinhardtii* CC2696 biochemisch nicht mehr nachzuweisen (vgl. 3.4.3). Die spektroskopische Analyse bestätigt, daß Antennenproteinkomplexe in den PSI-Präparationen der Grünalge nicht mehr vorhanden sind. Das bei 688 nm auftretende Maximum im Emissionsspektrum von *C. reinhardtii* belegt darüber hinaus, daß die in der Probe vorhandenen Chlorophylle spezifisch an den PSI-Komplex gebunden sind: Ein freies oder nur sehr schwach an das Photosystem gebundene Chlorophyll würde um 670 nm emittieren.

4.2 Charakterisierung von P700

Der primäre Donator P700 stand bei den Untersuchungen der mutierten PSI-Komplexe im Vordergrund. Nachfolgend werden daher zunächst die biophysikalischen Eigenschaften dieses Pigmentes an isolierten PSI-Komplexen aus dem WT vorgestellt und mit PSI aus anderen Spezies verglichen.

Die optische Charakterisierung von P700 ist aufgrund der zahlreichen im PSI-Komplex gebundenen Chlorophylle nur durch die getrennte Aufnahme des Absorptionsspektrums im Grundzustand und im oxidierten oder Triplett-Zustand zugänglich. Aus der Differenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustand treten die Unterschiede hervor, die durch die Ladungstrennung am P700 hervorgerufen werden. Die Beiträge der übrigen Pigmente werden dadurch bis auf die Bandenverschiebungen durch Elektrochromien, die im geladenen Zustand auftreten, ausgeblendet.

Durch dieses Verfahren wird auch die Konzentration des photoaktiven PSI bestimmt. Zur Ermittlung des Oxidationspotentials des Redoxpaares $P700^{+\bullet}$/P700 wird es ebenfalls genutzt.

Paramagnetische Resonanzexperimente hingegen geben Aufschluß über die die elektronische Struktur des $P700^{+\bullet}$-Radikal oder des ^{3}P700-Triplettzustandes sowie über Abstand und Orientierung des Radikalpaares $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$.

4.2.1 Absorptionsdifferenzspektroskopie

Das Absorptionsdifferenzspektrum von $P700^{+\bullet}$/P700 wurde bei Raumtemperatur, 77 K und 5 K aufgenommen. Die Ergebnisse für *C. reinhardtii* werden mit Messungen an *S. elongatus* verglichen.

Messung bei Raumtemperatur

In Abb. 4.6 sind die Differenzspektren der PSI-Präparation aus *C. reinhardtii* und *S. elongatus* gezeigt. Die Spektren sind auf den molaren Differenzen-Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon$, der im Minimum der Hauptausbleichung bestimmt wurde, normiert.[2] In *C. reinhardtii* beträgt $\Delta\epsilon_{696} = 110\ \mathrm{mM^{-1}cm^{-1}}$. Dieser Wert, der zur Bestimmung der P700-Konzentration verwendet wurde, ist fast doppelt so groß wie der Differenzen-Extinktionskoeffizent, der für PSI aus *S. elongatus* bei 700 nm ermittelt wurde (60 $\mathrm{mM^{-1}cm^{-1}}$ oder 70 $\mathrm{mM^{-1}cm^{-1}}$ für PSI-Monomere bzw. -Trimere).

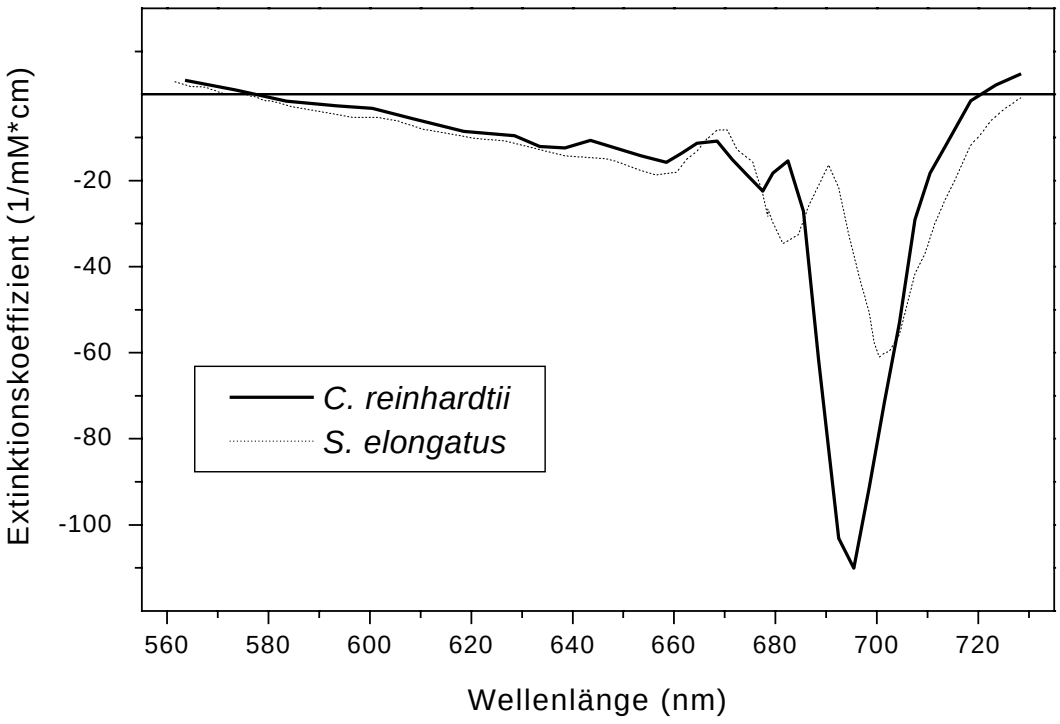

Abbildung 4.6: $P700^{+\bullet}$/P700-Absorptionsdifferenzspektren von PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* (fettgedruckt) und *S. elongatus* (gepunktet) bei Raumtemperatur.

[2] Die Bestimmung von $\Delta\epsilon$ erfolgte in einem eigenständigen Experiment [72].

Neben diesem deutlichen Unterschied ist das Minimum der Hauptausbleichung in der Grünalge um etwa 5 nm blauverschoben. Das lokale Maximum, das in den Cyanobakterien bei 690 nm auftritt, liegt in *C. reinhardtii* bei 685 nm. Interessanterweise entsprechen die $P700^{+\bullet}$/P700-Spektren von PSI aus Pflanzen eher denen von *S. elongatus* [93, 195]. Das Differenzspektrum von $P700^{+\bullet}$/P700 aus *C. reinhardtii* ist in dieser Form in bezug auf die bisher charakterisierten Spezies in dieser Art als einmalig anzusehen.
Die Besonderheiten in den optischen Charakteristika bei *C. reinhardtii* sind vermutlich durch Unterschiede in den Wechselwirkungen von P700 mit der Umgebung zu erklären, wie etwa eine geringfügig geänderte Einbindung des primären Elektronendonators oder der benachbarten Pigmente. Dieser Aspekt wird im Zusammenhang mit der Untersuchung der Mutanten nochmals aufgegriffen.

Tieftemperaturmessungen

Das Spektrum des PSI-Komplexes wird zunächst im dunkeladaptierten Zustand aufgenommen, in dem P700 im reduzierten Zustand vorliegt, und anschließend belichtet, um P700 zu oxidieren. Bei Temperaturen ≤ 100 K ist die Ladungstrennung zwischen $P700^{+\bullet}$ und den Eisen-Schwefel-Clustern $F_{A/B}$ irreversibel [140]. Das Spektrum nach Belichtung der Probe nimmt damit den Zustand an, in dem P700 oxidiert vorliegt. Die Differenz der belichteten und der dunkeladaptierten Messung entspricht der Absorptionsdifferenz von $P700^{+\bullet}$ und P700. Das Differenzspektrum, das auf die irreversible Ladungstrennung zwischen P700 und $F_{A/B}$ zurückgeht, ist in Abb. 4.7 (durchgezogene Linie) gezeigt.
Eine Fehlerquelle bei der Messung der irreversiblen Ladungstrennung besteht darin, daß infolge der Belichtung der Probe auch andere Chlorophylle des PSI unspezifisch photooxidiert werden könnten. Dies würde zu einer Verfälschung des P700-Differenzspektrums führen.
In einem Teil der PSI-Population erfolgt die Ladungstrennung jedoch nur bis zum sekundären Akzeptor A_1. Dieser Anteil rekombiniert in *C. reinhardtii* reversibel mit einer Halbwertszeit von 350 μs. Das Differenzspektrum, das aus der transienten Absorptionsänderung mit dieser Kinetik bestimmt wurde, ist damit eindeutig dem Übergang $P700/P700^{+\bullet}$ zuzuordnen. Diese bei 77 K reversible Kinetik ist ebenfalls in Abb. 4.7 dargestellt (Quadrate, die mit einer gepunkteten Linie verbunden sind). Die Auflösung

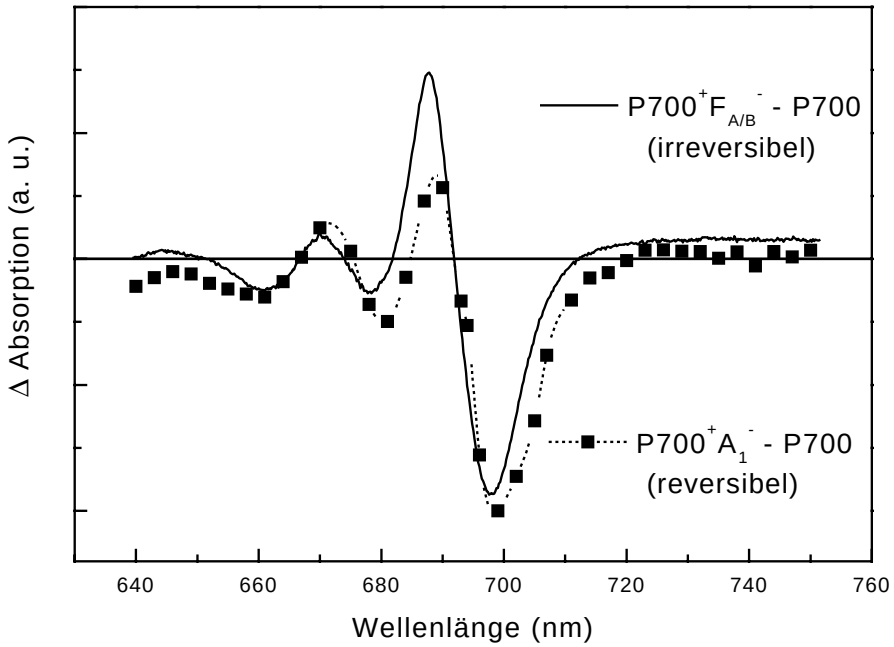

Abbildung 4.7: $P700^{+\bullet}$/P700-Absorptionsdifferenzspektrum bei 77 K. Die durchgezogene Linie entspricht dem irreversiblen lichtinduzierten Übergang von P700 nach $P700^{+\bullet}F_{A/B}^{-}$; die Quadrate entsprechen dem reversiblen Übergang nach $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$, der in *C. reinhardtii* mit 350 μs rekombiniert. Ein Meßpunkt im reversiblen Spektrum entspricht dem Mittelwert aus mehreren transienten Absorptionsänderungen.

dieses Spektrums ist aufgrund des kleineren Anteils der PSI-Population, die nach dieser Kinetik rekombiniert, und aufgrund der größeren spektralen Linienbreite der transienten Messung geringer als im Differenzspektrum, das dem irreversiblen Übergang entspricht. Das irreversible und das reversible P700/$P700^{+\bullet}$-Differenzspektrum stimmen unabhängig vom Meßverfahren gut überein. Die Photooxidation von Chlorophyllen des PSI-Komplexes, die nicht an der Ladungstrennung beteiligt sind, ist damit unter den gewählten Bedingungen auszuschließen. Die Abweichungen in den Intensitäten sind im wesentlichen auf die letztgenannte Ursache zurückzuführen.[3]

Die reversible Rekombination zwischen $P700^{+\bullet}$ und $A_1^{\bullet-}$ unterscheidet sich in *C. reinhardtii* in einigen Parametern von *S. elongatus*. Die Halbwertszeit der Rekombination ist mit (350±50) μs langsamer als in den Cyanobakterien, die $t_{1/2} = (170 \pm 30)$ μs bei 77 K beträgt [161]. Neben dieser Rekombination mit A_1 wurden in etwa 50 % der reversiblen Population weitere Kinetiken beobachtet, die Halbwertszeiten zwischen 10^{-3} s und 10^2 s

[3] Die Reduzierung von $F_{A/B}$ bzw. A_1 trägt im dargestellten Bereich nicht zum Spektrum bei.

aufwiesen. Vermutlich handelt es sich hierbei um Rekombinationen von F_X^- mit $P700^{+\bullet}$. Darüber hinaus ist der Anteil der PSI-Population, in der die reversible Ladungstrennung induziert wird, in *C. reinhardtii* wesentlich kleiner. Bereits nach einem sättigenden Lichtblitz wurde in 80 % der Reaktionszentren eine irreversible Ladungstrennung induziert. In den Cyanobakterien betrug der Anteil dieser Population etwa 55 % und wurde erst nach 3–5 Blitzen erreicht [183].

Das Absorptionsdifferenzspektrum $P700^{+\bullet}$/P700 bei 5 K für PSI aus *C. reinhardtii* ist nahezu identisch mit der Messung bei 77 K (eingefügte Graphik in Abb. 4.8). PSI aus *S. elongatus* hingegen weist bei sehr tiefen Temperaturen deutlich mehr Strukturen auf. Der Vergleich der beiden Spektren aus den unterschiedlichen Organismen wird aufgrund der höheren Auflösung nur für 5 K diskutiert.
Im $P700^{+\bullet}$/P700-Spektrum der Grünalge sind die gleichen Merkmale zu erkennen, die bereits bei Raumtemperatur auftreten: Die Hauptausbleichung liegt bei 698 nm, zwei lokale Maxima sowie ein Minimum treten bei 690 nm und 637 nm bzw. 681 nm auf. Auch die Positionen dieser Strukturen haben sich nur unwesentlich verändert. Die unterschiedlichen Intensitäten sind durch die geringere Linienbreite bei tiefen Temperaturen zu erklären, die Überlagerung der einzelnen Banden verringert sich dadurch. Das Differenzspektrum von *S. elongatus* zeigt hingegen deutlich mehr Strukturen als jenes bei Raumtemperatur. Am auffälligsten ist der Unterschied in bezug auf Position und Linienform der Hauptausbleichung. Die P700-Ausbleichung ist in der Grünalge gegenüber den Cyanobakterien um 5 nm blauverschoben und nahezu symmetrisch. In *S. elongatus* liegt innerhalb dieser Bande eine sehr schmale Absorptionszunahme, die im PSI aus *C. reinhardtii* fehlt.

Das von Setif *et al.* aufgenommene Spektrum von PSI aus Spinat zeigt bei 10 K Strukturen, die eher mit *S. elongatus* vergleichbar sind. Die einzelnen Komponenten sind allerdings nicht so gut aufgelöst. Das Minimum der breiten Hauptausbleichung liegt im Spektrum der Pflanze bei 703 nm [187]. Auch in 77 K-Messungen an PSI-Proben aus anderen Spezies befindet sich das Minimum der P700-Bande immer zwischen 700–703 nm. Die Strukturen zwischen 660 nm und 690 nm variieren hingegen stärker [136, 205].
Die Ursachen für die Abweichungen im $P700^{+\bullet}$/P700-Absorptionsdifferenzspektrum und die Unterschiede bei der Rekombination, die in *C. reinhardtii* gegenüber *S. elongatus*

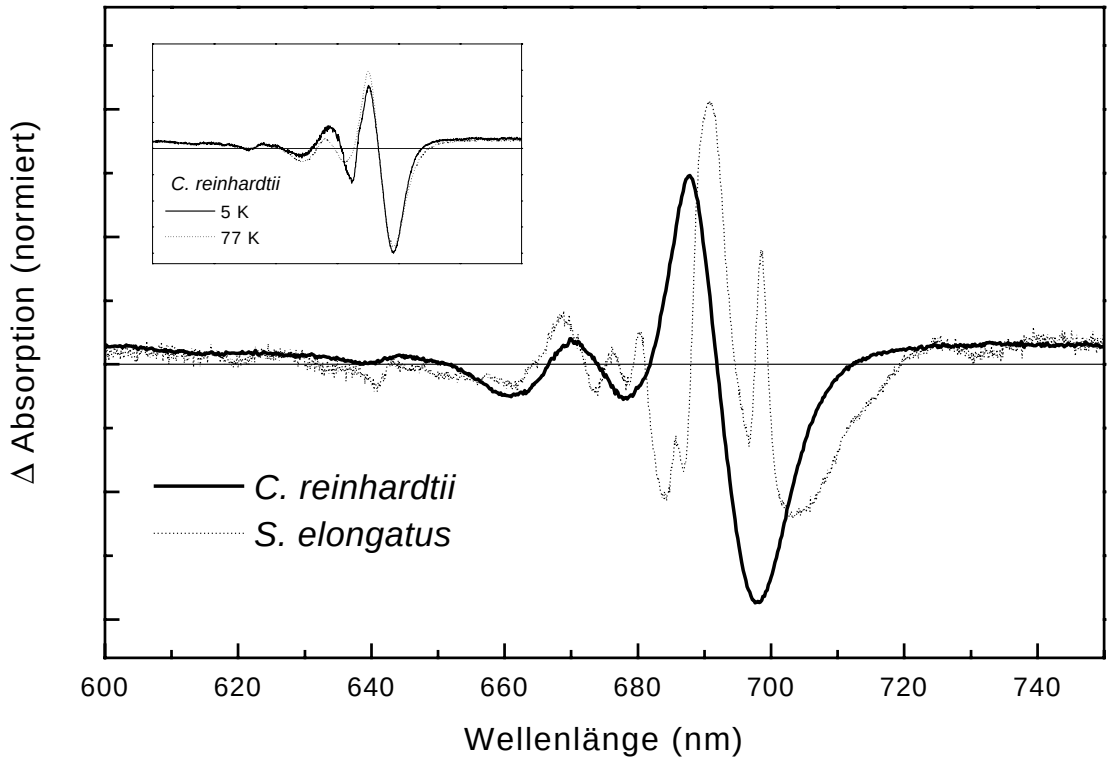

Abbildung 4.8: $P700^{+\bullet}$/P700-Absorptionsdifferenzspektrum bei 5 K.

auftreten, sind nicht geklärt. Eventuell könnten die in der hier vorgestellten Präparation aus *C. reinhardtii* abgetrennten LHC-Komplexe oder das bisher nur im PSI-Komplex der Grünalge nachgewiesene Chl *b* diese Abweichungen zu den bisher bekannten Spektren hervorrufen.

4.2.2 Redoxpotential

Die Konzentration von $P700^{+\bullet}$ ist spektroskopisch sehr genau als transiente Absorptionsänderung zu bestimmen. Diese Größe wurde daher zur Ermittlung des Oxidationspotentials des Redoxpaares $P700^{+\bullet}$/P700 verwendet. Die blitzlichtinduzierten Transienten wurden bei 826 nm aufgenommen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert nur das entstandene $P700^{+\bullet}$-Kation.

Das Halbstufen-Oxidationspotential des Redoxpaares $P700^{+\bullet}$/P700 beträgt für PSI aus *C. reinhardtii* (447 ± 4) mV. Dieser Wert liegt sehr nahe bei den (436 ± 4) mV, die für PSI aus *S. elongatus* ermittelt wurden [105]. (Die Redoxtitrationskurve von $P700^{+\bullet}$/P700 für PSI aus *C. reinhardtii* wird im nächsten Kapitel unter 5.3.1 gezeigt.)

In der Literatur schwanken die Werte für das Redoxpotential von P700 zwischen 400 mV und 520 mV [5, 80]. Mögliche Ursachen für die breite Streuung sind systematischer Fehler des Meßverfahrens oder Abschätzungen beim Redoxpotential der Lösung anstelle einer akkuraten Messung.
Die in dieser Arbeit angewandte Meßtechnik [105, 215] erlaubte sowohl die sehr genaue Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses von $P700^{+\bullet}$/P700 als auch die gleichzeitige akkurate Ermittlung des Redoxpotentials in der Lösung. Die PSI-Komplexe aus beiden Spezies wurden zudem mit dem gleichen Detergenz und vergleichbaren Präparationsmethoden hergestellt.

4.2.3 Triplettzustand des primären Donators

Der Triplettzustand der isolierten PSI-Komplexe wurde bei 2 K analysiert, da die Kinetik des Triplettzerfalls bei diesen Temperaturen mit der Zeitauflösung der EPR problemlos nachgewiesen werden kann. Durch die Vorreduktion der terminalen Eisen-Schwefel-Cluster $F_{A/B}$ rekombinieren unter Dauerbelichtung in einem Teil der PSI-Population $A_0^{-\bullet}$ und $P700^{+\bullet}$ nach Doppelreduktion des sekundären Akzeptors über den Triplettzustand. Dieser Zustand ist bereits ohne äußeres Magnetfeld in drei Energieniveaus aufgespalten [Nullfeldaufspaltung bzw. zero field splitting (ZFS)]. Durch Einstrahlen resonanter Mikrowellenstrahlung werden die Besetzungszahlen dieser Niveaus verschoben. Abhängig vom experimentellen Aufbau wird diese Veränderung der Triplettpopulationen als Zu- oder Abnahme der Mikrowellen- oder der optischen Absorption detektiert.

Nullfeldaufspaltungsparameter |D| und |E|

Die Probe wird mit einer festen Wellenlänge im sichtbaren Bereich, die etwa dem Maximum der Singulettabsorption von P700 entspricht, angeregt, während Mikrowellenfrequenzen (600–1200 MHz) sequentiell eingestrahlt werden. Entspricht die Energie der Mikrowelle dem $|D|+|E|$- oder $|D|-|E|$-Übergang wird eine Absorptionsänderung des eingestrahlten Meßlichts detektiert (absorptionsdetektierte magnetische Resonanz, ADMR).

Die ADMR-Spektren sind in Abb. 4.9 gezeigt. Die aus dieser Messung ermittelten |D|-

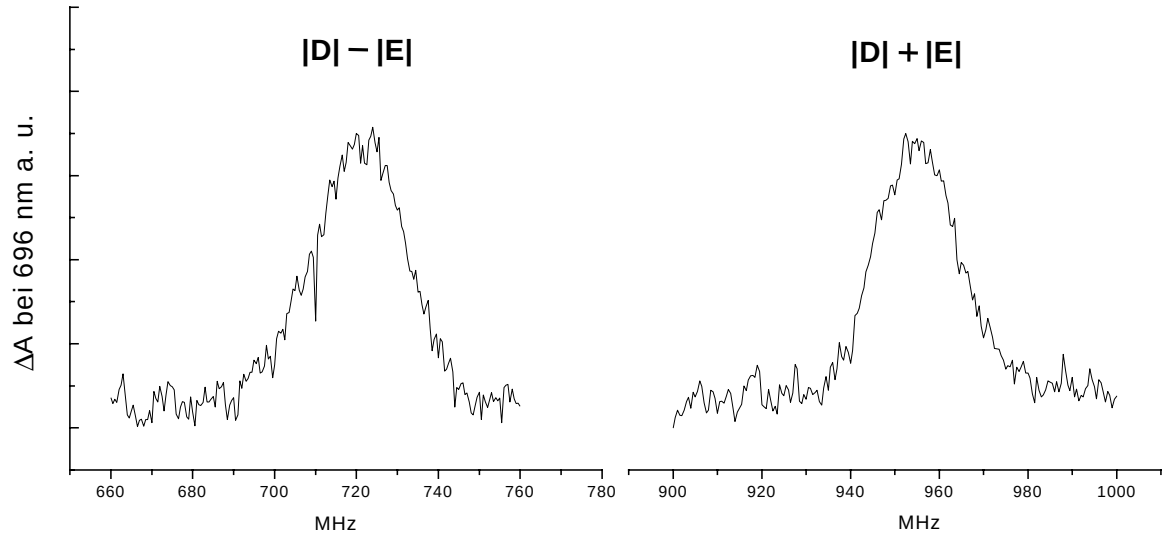

Abbildung 4.9: Mikrowelleninduzierte magnetische Resonanz von PSI-Partikeln aus *C. reinhardtii*. Aufgenommen wurde die transiente Absorptionsänderung des modulierten Meßlichts bei 2 K im Maximum der P700-Absorption.

und |E|-Werte betrugen für die PSI-Präparation aus *C. reinhardtii* $280\pm1 \times 10^{-4}$ cm^{-1} bzw. $39{,}5\pm0{,}5 \times 10^{-4}$ cm^{-1}. Sie liegen damit im Rahmen der Werte, die für unterschiedliche PSI-Präparationen aus Spinat angegeben werden (276–283$\times10^{-4}$ cm^{-1} für |D| und 36–40$\times10^{-4}$ cm^{-1} für |E|) [19, 39]. Wie weiter unten noch ausführlich diskutiert wird (siehe 5.3.2), weist auch Chl *a* – gemessen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln – Nullfeldparameter auf, die diesen Werten entsprechen [177].

Triplett–Singulett-Absorptionsdifferenzspektrum (T–S-Spektrum)

Das Absorptionsdifferenzspektrum des Triplett-minus-Singulett-Zustandes wurde durch sequentielles Einstrahlen modulierten Meßlichtes bei fester Mikrowellen-Resonanzfrequenz bei den |D| + |E|- bzw. |D| − |E|-Übergängen des ^{3}P700-Tripletts bei 2 K aufgezeichnet. Das unter diesen Bedingungen im Q_y-Bereich gemessene Spektrum entspricht der Absorptionsdifferenz zwischen ^{3}P700 (Triplettzustand) und P700 (Singulett-Grundzustand). Das Ergebnis dieser Absorptionsdifferenzmessung wird als Triplett–minus–Singulett-Spektrum (T–S-Spektrum) bezeichnet, das in Abb. 4.10 für PSI-Proben aus *C. reinhardtii* zu sehen ist (durchgezogene Kurve). Zum Vergleich ist das T–S-Spektrum von *S. elongatus* ebenfalls gezeigt (gepunktete Kurve). Das T–S-Spektrum der Grünalge weist die gleichen Merkmale auf, die bereits im P700$^{+\bullet}$/P700-Spektrum bei tiefer Temperatur auftraten

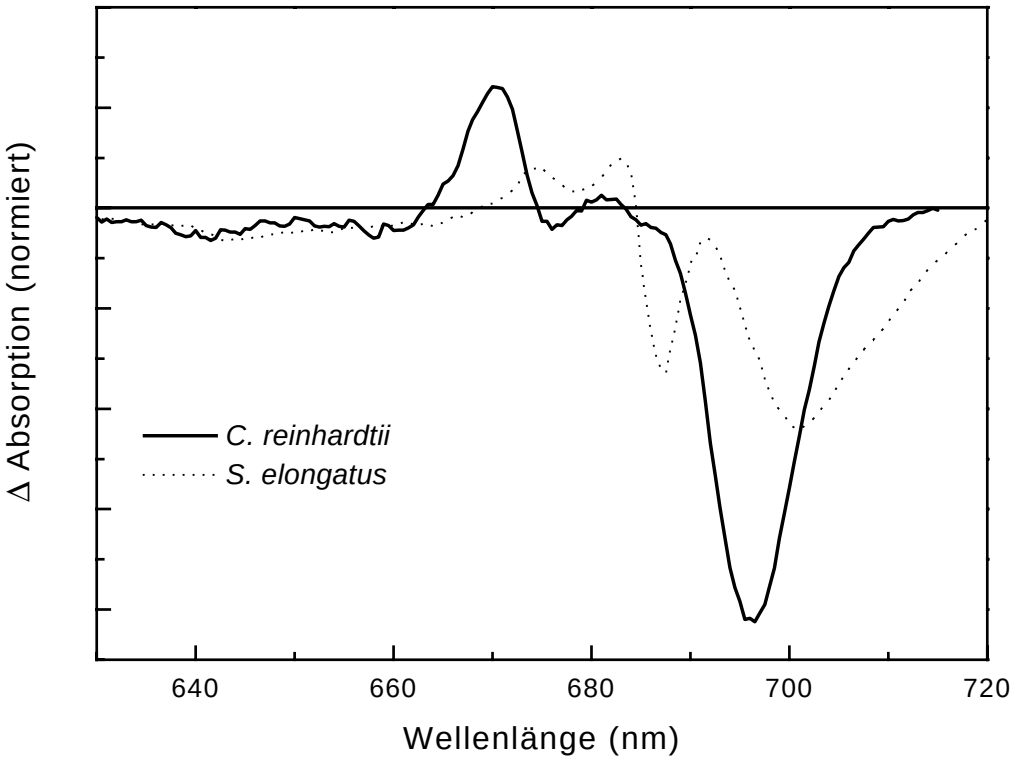

Abbildung 4.10: T–S-Spektrum von PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* (durchgezogene Kurve) und *S. elongatus* (gepunktet). Die Spektren wurden zwischen 640–720 nm auf die gleiche Fläche normiert. Die eingestrahlte Mikrowellenfrequenz entspricht dem |D| + |E|-Übergang.

(vgl. Abb. 4.4). Im T–S-Spektrum von PSI aus *C. reinhardtii* ist die Hauptausbleichung gegenüber dem PSI aus Cyanobakterien blauverschoben und die Linienbreite bei halber Höhe des Minimums schmaler. Das Minimum liegt bei 696 nm. Die zwei lokalen Maxima treten bei 685 nm und 671 nm auf, die Intensität des ersteren ist beim Vergleich mit dem $P700^{+\bullet}$/P700-Absorptionsdifferenzspektrum bei tiefer Temperatur allerdings erheblich geringer.

Im Spektrum der Cyanobakterien sind neben der wesentlich breiteren Hauptausbleichung um 701 nm eine dominante Ausbleichung bei 688 nm und zwei Absorptionszunahmen bei 675 nm und 683 nm zu erkennen. Vergleichbare Strukturen zu *S. elongatus* traten im T–S-Spektrum von PSI aus Spinat auf [39]. Das T–S-Spektrum wird im anschließenden Kapitel unter 5.3.2 im Vergleich mit den T–S-Spektren der mutierten PSI-Komplexen detailliert diskutiert.

Das T–S-Spektrum der Grünalge unterscheidet sich somit auch deutlich in den optischen Eigenschaften vom PSI aus den anderen bisher untersuchten Spezies.

4.2.4 EPR/ENDOR-Experimente am $P700^{+\bullet}$

Die stabile Akkumulation des $P700^{+\bullet}$-Radikalkations durch Einfrieren der Probe im photooxidierten Zustand erlaubt die Untersuchung der Spindichteverteilung mit Methoden der paramagnetischen Resonanz. Insbesondere die Anwendung des Doppelresonanzverfahrens ENDOR gibt Aufschluß über die Hyperfeinkopplungen (hfc) und damit über die magnetische Wechselwirkung zwischen den Porphyrinringen im primären Elektronendonator.

Das lichtinduzierte Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ wird mit Hilfe eines transienten EPR-Meßverfahrens [198] und durch das Puls-EPR-Verfahren ESEEM charakterisiert [16, 17, 224]. Die Auswertung dieser Messung erlaubt eine Aussage über die relative Orientierung der beiden Radikale und den Abstand der beiden Radikalzentren.

Spindichteverteilung im $P700^{+\bullet}$

Die Verteilung der Spindichte im $P700^{+\bullet}$-Radikal in verschiedenen Organismen wurde von Käß ausführlich untersucht und ausgewertet [109]. Aus den ENDOR-Messungen am PSI-Kristall aus *S. elongatus* wurden die hfc einiger Protonen des Radikals den Molekülpositionen im Porphyrinring zugeordnet und die Orientierung eines der beiden Chlorophylle bezüglich der Kristallachsen des PSI bestimmt [109].

Das $P700^{+\bullet}$-EPR-Signal der PSI-Präparation aus CC2696 zeigte eine nicht gaußförmige Linie bei $g = 2,0026 \pm 0,0001$ ohne Hyperfeinstruktur mit einer Linienbreite von $0,75 \pm 0,01$ mT. Der g-Wert stimmt mit den publizierten Werten, die aus hochauflösenden Messungen bei 140 GHz gewonnen wurden [166, 27], überein.

Die einzelnen hfc des ungepaarten Elektrons mit den Protonen des Radikals werden im ^{1}H-ENDOR-Experiment aufgelöst. Käß [109] wie auch Davies *et al.* [53] und O'Mally *et al.* [159] gehen davon aus, daß die Verteilung des ungepaarten Elektrons über die beiden Chl-Moleküle asymmetrisch ist. In der erst kürzlich erschienenen Arbeit von Mac *et al.* wird das $P700^{+\bullet}$-Radikal aufgrund von ESEEM- und ENDOR-Messungen mit zum Teil isotopenmarkierten PSI-Komplexen sogar als rein monomeres Chl $a^{+\bullet}$-Radikal interpretiert [139]. 85–100 % des Spins sind somit aufgrund der Auswertung von Daten aus magnetischen Resonanzexperimenten auf einem der beiden Chl *a*-Moleküle von P700

lokalisiert. Die im ENDOR-Spektrum auftretenden Kopplungen repräsentieren danach im wesentlichen Kopplungen des Chl *a*-Moleküls auf dem die Spindichte lokalisiert ist.

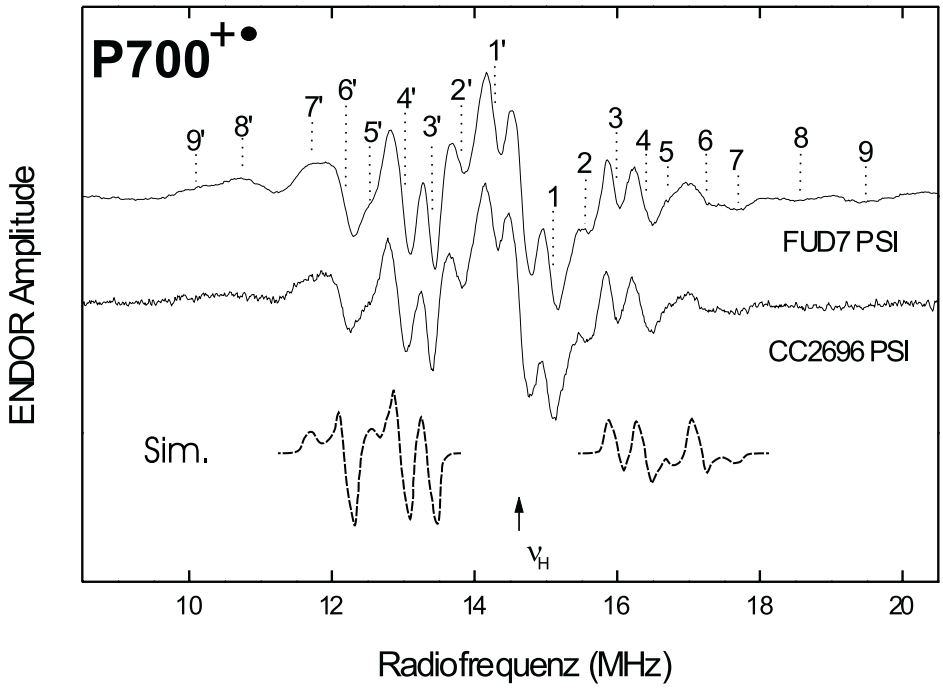

Abbildung 4.11: $P700^{+\bullet}$-ENDOR-Spektren von PSI-Präparationen aus den *C. reinhardtii*-Stämmen FUD7 und CC2696. Die einzelnen hfc sind durch Zahlenpaare markiert. Die Linienpaare (3',3) bis (7',7) wurden simuliert (Tensoren der Methylgruppen am Porphyrinring von $P700^{+\bullet}$, unterster gestrichelter Kurvenzug).

In Abb. 4.11 sind die ENDOR-Spektren des $P700^{+\bullet}$-Radikals der PSI-Komplexe dargestellt, die nach der neu entwickelten Methode aus der Zellinie CC2696 präpariert wurden, sowie für PSI aus FUD7. Die einzelnen ^{1}H-hfc sind abzulesen aus dem Abstand der korrespondierenden hoch- und tieffrequenten Linien, die symmetrisch um ν_H liegen (Zahlenpaare in Abb. 4.11). Da die Messungen an gefrorenen Lösungen durchgeführt wurden, treten die anistropen Anteile der Kopplungen im Spektrum auf. Die ausgewerteten hfc-Tensoren der Methylprotonen sind dabei in guter Näherung als axialsymmetrisch zu betrachten [109]. Neben dem Matrixpeak im Zentrum des Spektrums, der unter anderem die sehr kleinen Kopplungen der Protonen aus der Proteinumgebung enthält, sind neun Linienpaare zu erkennen. Die größten Hyperfeinkopplungen (8',8) und (9',9) werden den β-Protonen des spintragenden Chl *a*-Moleküls an den Kohlenstoffatomen 17 und 18 des

Porphyrinringes zugeordnet.[4] Aufgrund der breiten Linien ist eine genauere Bestimmung der Tensor-Komponenten nicht möglich. Für PSI-Präparationen aus FUD7 wurden hfc von 8,7 MHz und 7,4 MHz ermittelt (±250 kHz) [109]. Diese Werte ergeben sich auch für $P700^{+\bullet}$ im PSI aus der Zellinie CC2696.
Drei axialsymmetrische Tensoren wurden den Methylgruppen des spintragenden Chl *a* – an den molekularen Positionen 2, 7 und 12 des Porphyrinringes – wie folgt zugeordnet:

- Methylgruppe an Position 2: (3',3)= $A_\perp$, die $A_\parallel$-Komponente des Tensors wird höchstwahrscheinlich durch die Linien (4',4) überlagert.
- Methylgruppe an Position 7: (4',4)= $A_\perp$ und (5',5)= $A_\parallel$.
- Methylgruppe an Position 12: (6',6)= $A_\perp$ und (7',7)= $A_\parallel$.

Auch diese hfc sind in beiden Präparationen innerhalb des Fehlers identisch. Der isotrope Anteil A_{iso}, der sich nach $\mathrm{A_{iso}} = 1/3(2\mathrm{A}_\perp + \mathrm{A}_\parallel)$ aus den einzelnen Tensorkomponenten ableitet (siehe 2.8), ist in Tabelle 4.1 für die beiden unterschiedlichen PSI-Präparationen aus *C. reinhardtii* zusammen mit den Kopplungen der β-Protonen und den hfc der Linienpaare (1',1) und (2',2) aufgeführt; zum Vergleich sind die Werte für Chl $a^{+\bullet}$ in organischem Lösungsmittel ebenfalls aufgelistet. Die beiden zuletzt genannten Kopplungen sind bisher nicht eindeutig zugeordnet worden. Sie könnten den Kopplungen der restlichen am Porphyrinring des spintragenden Chl *a* gebundenen Protonen enthalten. Käß schlägt allerdings auch vor, daß sich Anteile von hfc des zweiten Chl-Moleküls, das P700 bildet, in diesen Linien verbergen [109].

Die Spindichteverteilung des ungepaarten Elektrons im $P700^{+\bullet}$ ist eine sehr empfindliche Sonde für strukturelle Änderungen. Ein Unterschied in der Ligandierung des Chl *a*, eine Änderung in der Geometrie einer Seitenkette des Porphyrinringes oder eine Abweichung im Abstand zu benachbarten Pigmenten, wie z. B. dem parallel angeordneten Chl *a*, beeinflussen das Molekülorbital des ungepaarten Elektrons und wirken sich auf die einzelnen hfc aus [137]. Die elektronische Struktur und somit auch die direkte Nachbarschaft von $P700^{+\bullet}$ im Proteingerüst des PSI müssen folglich in den beiden unterschiedlichen PSI-Präparationen identisch sein.

[4] Numerierung des Porphyrinringes nach IUPAC, siehe Abb. 4.2 S. 60.

Position der Protonen am Porphyrinring	**Chl $a^{+\bullet}$** CH_2Cl_2/THF	**$P700^{+\bullet}$** *C. reinhardtii* FUD7	CC2696
17/18	10,17	8,70	8,70
		7,40	7,40
12^1 (Methyl)	7,12	5,32	5,30
7^1 (Methyl)	2,97	3,65	3,65
2^1 (Methyl)	2,97	2,93	2,94
13^2	1,97	1,7*	1,7*
20/18	0,57	0,8*	0,8*

Tabelle 4.1: ^{1}H-Hyperfeinkopplungen im $P700^{+\bullet}$-Radikal im PSI-Komplex aus *C. reinhardtii* Zelllinien FUD7 und CC2696, aus denen PSI mit unterschiedlichen Methoden präpariert wurde (siehe Kapitel 3). Zum Vergleich sind die Daten für Chl $a^{+\bullet}$ in flüssiger Lösung (210 K, CH_2Cl_2/THF) angegeben. Zuordnung der Kopplungen nach Käß; die Zuordnungen mit „*“ sind nicht eindeutig [109, 113]. Angaben in MHz ±50 kHz für die isotropen Methylkopplungen, ±25 kHz für die Kopplungen im Chl $a^{+\bullet}$, weitere Kopplungen ±250 kHz. Alle Werte mit Ausnahme der hfc von *C. reinhardtii* CC2696 sind [109] entnommen.

EPR-Messungen am Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$

Die Messung des Radikalpaares $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ ist an PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii*, die aus der Zellinie CC2696 nach dem hier beschriebenen neuen Verfahren isoliert wurden, erstmals zufriedenstellend gelungen. In allen anderen PSI-Präparationen der Grünalge störte ein intensives Chlorophyll-Triplett-Signal die Messung. Dieses Triplett stammt vermutlich aus den LHC, die durch die Modifizierung der PSI-Präparation abgetrennt wurden.

Die im transienten Meßverfahren mit direkter Detektion aufgenommenen EPR-Spektren vom Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ von PSI aus *C. reinhardtii* und *S. elongatus* weisen keine signifikanten Unterschiede auf [18]. Im gezeigten Spektrum im X-Bandfrequenzbereich ist ein Emissions/Absorptions/Emissions-Polarisationsmuster mit teilweise aufgelöster Hyperfeinstruktur zu erkennen (Abb. 4.12). Die Hyperfeinstruktur geht auf einen axialen Hyperfeinkopplungstensor mit den Hauptwerten $A_{\parallel} = 12,8$ MHz und $A_{\perp} = 9,0$ MHz zurück, der der Methylgruppe des Phyllochinons zugeordnet wurde [173].

Aus der Emissions/Absorptions-Polarisation im Tieffeldbereich des Spektrums ergibt sich eine annähernd parallele Orientierung der g_x-Achse, welche entlang der Carbonylbindung des A_1 liegt, und der dipolaren Achse (Z_D), die $P700^{+\bullet}$ und $A_1^{-\bullet}$ verbindet [198].
Die relative Orientierung dieser beiden Achsen ist in *C. reinhardtii* und *S. elongatus* innerhalb eines Fehlers von $\pm 5°$ gleich [18]. Die etwas geringere Linienbreite, die in *S. elongatus* beobachtet wird, ist ohne Bedeutung für diese Auswertung.

Auch aus dem *out–of–phase*-ESEEM-Experiment ergibt sich eine sehr große Übereinstimmung zwischen *C. reinhardtii* und *S. elongatus* (Abb. 4.13). Die identische Modulationsfrequenz, die für beide Spezies beobachtet wurde, zeigt, daß der Abstand von $(25,4 \pm 0,3)$ Å zwischen den Zentren der Spindichten von $P700^{+\bullet}$ und $A_1^{-\bullet}$ identisch ist. Dieser Wert wurde bereits für *S. elongatus* publiziert [16, 224]. Dzuba *et al.* ermittelten aus Messungen an PSI-Partikeln aus Spinat innerhalb des Fehlers denselben Abstand von $(25,3 \pm 0,3)$ Å [61].

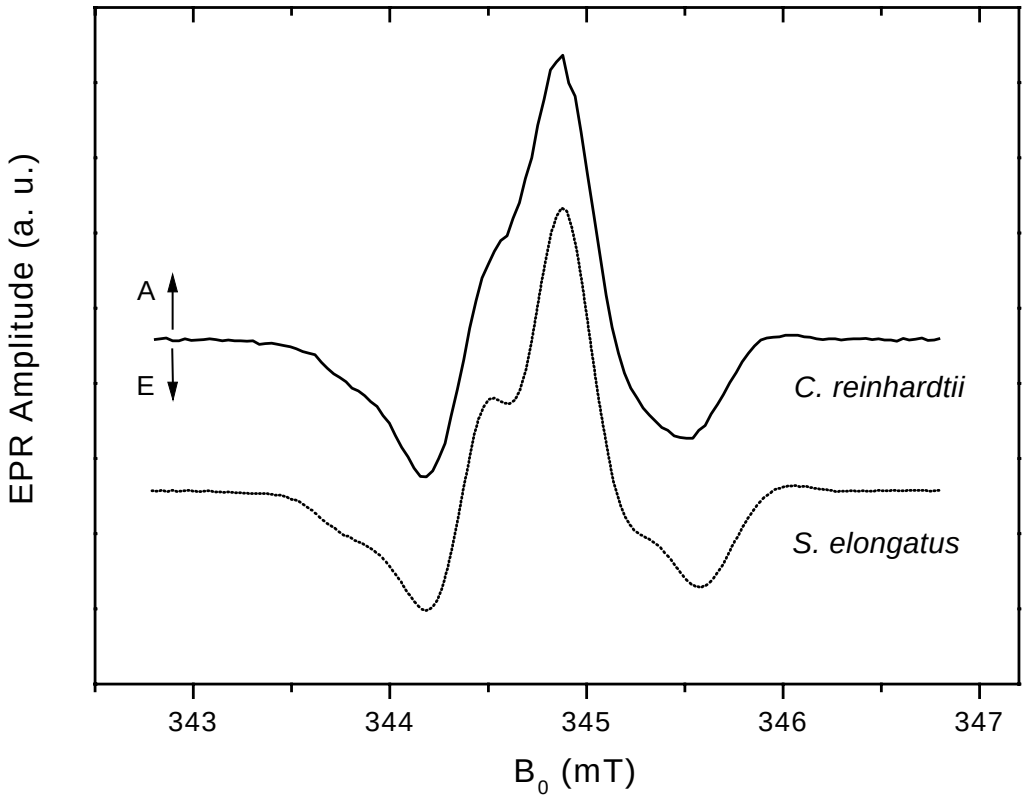

Abbildung 4.12: Transiente X-Band-EPR-Spektren von $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ an PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* und *S. elongatus*.

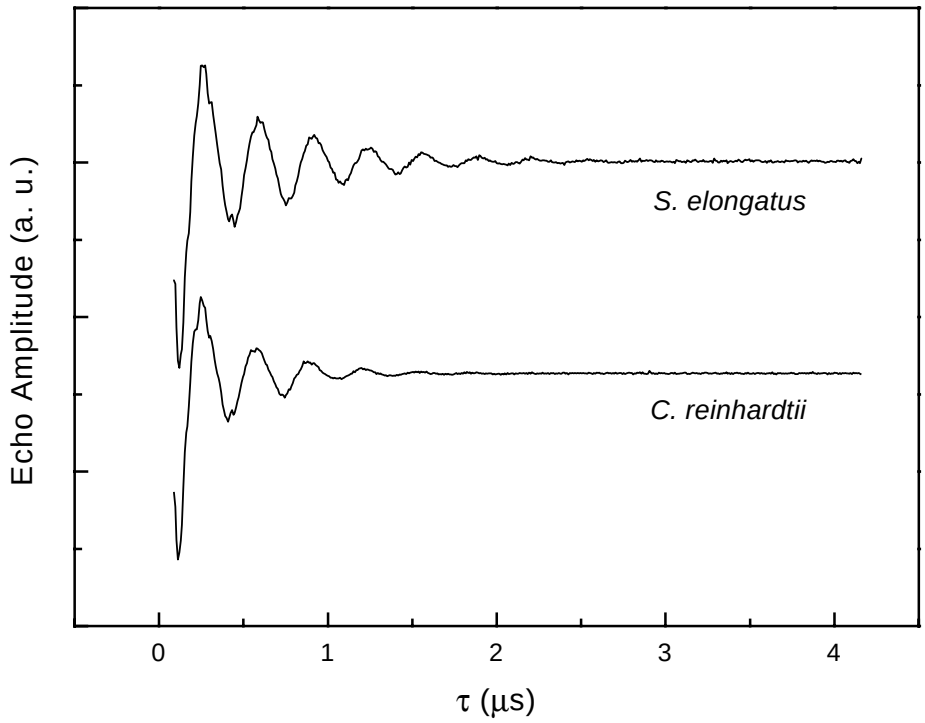

Abbildung 4.13: Modulation des *out-of-phase*-Echo des Radikalpaares $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ als Funktion des Pulsabstandes τ. Die Messungen wurden an PSI-Präparationen aus *C. reinhardtii* und *S. elongatus* durchgeführt.

Aus den Messungen am PSI-Einkristall aus *S. elongatus* wurde bestimmt, daß die kristallographische c-Achse, die senkrecht zur Membranebene steht, mit dem Verbindungsvektor Z_D einen Winkel von $(27 \pm 5)^\circ$ einschließt [17]. Aufgrund der großen Identität in der Aminosäuresequenz zwischen *C. reinhardtii* und *S. elongatus* sowie der innerhalb des Fehlers identischen Anordnung der beiden Kofaktoren P700 und A_1 ist die Annahme berechtigt, daß die Orientierung des primären Elektronendonators und des sekundären Akzeptors in bezug auf die Membrannormale analog zu der in Abb. 4.14 für *S. elongatus* bestimmten Anordnung ist. Die beiden Radikale werden durch ihre g-Tensorachsen beschrieben und ihre Orientierung im PSI wird durch die Normale bestimmt, die senkrecht zur Thylakoidmembran verläuft.

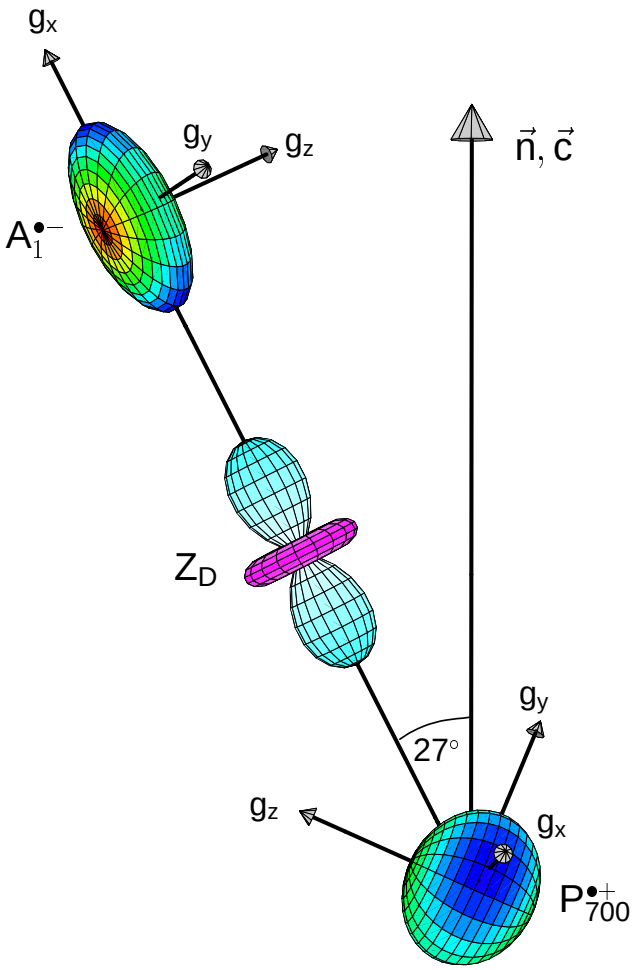

Abbildung 4.14: Darstellung des Radikalpaares $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ aus Sicht der EPR-Ergebnisse. Der Winkel zwischen der kristallographischen c-Achse (Membrannormale) und der dipolaren Achse Z_D von 27° ergibt sich aus den *out-of-phase*-ESEEM-Experimenten an PSI-Kristallen aus *S. elongatus* [17]. Der Abstand von 25,4 Å wurde aus *out-of-phase*-ESEEM-Experimenten ermittelt [16]. Die Orientierungen der g-Tensoren von $A_1^{-\bullet}$ und $P700^{+\bullet}$ folgen aus transienten EPR-Messungen von PSI aus *S. elongatus* ([106] bzw. [66]). Nach [225].

4.3 Diskussion

Das mit der neu entwickelten Methode isolierte PSI aus *C. reinhardtii* wurde spektroskopisch charakterisiert. Neben den spektralen Eigenschaften des gesamten Komplexes wurde der primäre Elektronendonator P700 eingehend biophysikalisch analysiert.

Der aufgereinigte Proteinkomplex enthält 60 Chl *a*- und 5–6 Chl *b*- sowie 13–14 Karotin-Moleküle. Bemerkenswert ist der Anteil an Chl *b*, da PSI-Präparationen aus Pflanzen mit einer vergleichbaren Zahl an Chlorophyllen laut Literatur nur Chl *a* binden [153]. Diese oft als PSI *reaction center* (PSI-RC) bezeichneten Präparationen sind frei von LHC-Proteinen [80, 153]. Die Entfernung der LHC erfordert in diesen Präparationen nach bisherigem Kenntnisstand immer eine weitere Detergenzbehandlung [9], die nur schwach an den PSI-Komplex gebundene Chl *b*-Moleküle abtrennen könnte. Die hier vorgestellte Isolierung des PSI aus *C. reinhardtii* benötigte diese zweite Solubilisierung nicht, um die LHC-I zu entfernen. Im Unterschied zu den bisher präparierten PSI-RC aus Pflanzen ist in der Grünalge *C. reinhardtii* Chl *b* Bestandteil des PSI-RC, der im weiteren als PSI-Komplex bezeichnet wird. Es bleibt offen, ob die Bindung von Chl *b* im PSI spezifisch für *C. reinhardtii* ist, da eine vergleichbare PSI-Präparation aus höheren Pflanzen bislang nicht vorliegt. Zum Vergleich der spektroskopischen Messungen am PSI dieser Grünalge wurde deswegen der PSI-Komplex aus *S. elogatus* herangezogen. Die Cyanobakterien enthalten keine LHC, sondern Phycobilisomen, die einfach abzutrennen sind. Da es sich bei den Vergleichsproben um aufgelöste Kristalle handelte, ist zudem von einer hochreinen homogenen Probe auszugehen.

Der Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften des isolierten PSI-Komplexes aus *C. reinhardtii* mit PSI-Präparationen aus *S. elongatus* zeigte bereits deutliche Unterschiede. Die Abweichungen im Bereich der Soretbande (350–500 nm) und der Q_y-Bande um 650 nm gehen eindeutig auf den Anteil an Chl *b* zurück. Im Tieftemperaturspektrum treten weitere Unterschiede auf. Das Absorptionsspektrum des PSI aus dem Cyanobakterium weist mehr Strukturen im Bereich von 670–730 nm auf, die neben der Absorption von P700 auf mindestens fünf verschiedene Chl-Pools hindeuten [72]. PSI aus *C. reinhardtii* hingegen besitzt außer der Schulter um 696 nm, die auf P700 zurückgeht, einen einheitlichen Chl *a*-Pool, der sich auch im Fluoreszenzspektrum wiederfindet. Diese ein-

fach strukturierte Antenne im PSI-Komplex der Grünalge könnte so interpretiert werden, daß in diesem Organismus und eventuell auch in Pflanzen die LHC-Proteinkomplexe wesentlich dazu beitragen, das Absorptionsspektrum zu erweitern. In den Cyanobakterien werden hingegen die Eigenschaften der Antennenchlorophylle im PSI auf ein optimales Zusammenspiel mit den Phycobilisomen angepaßt sein.

Weitere Besonderheiten des PSI der Grünalge wurden bei der spektroskopischen Charakterisierung von P700 festgestellt: Im Absorptionsdifferenzspektrum dieses Kofaktors ist die Hauptausbleichung gegenüber anderen Spezies blauverschoben. Der Differenzen-Extinktionskoeffizient im Minimum der Bande $\Delta\epsilon_{696}$ ist in *C. reinhardtii* mit 110 mM^{-1} nahezu doppelt so groß wie in den Cyanobakterien [72] oder Spinat.[5] Die Merkmale des Differenzspektrums ändern sich auch bei tiefen Temperaturen nur wenig. Im Spektrum von *S. elongatus* und Spinat treten dagegen bei 5 K wesentlich mehr Strukturen auf.
Bereits im Absorptionsspektrum wurde bei sehr tiefer Temperatur deutlich, daß im PSI der Cyanobakterien mehrere Chl-Pools vorhanden sind, die unterschiedliche Absorptionsmaxima erkennen lassen. Bestehen zwischen den verschiedenen Chl-Pools in *S. elongatus* und P700 dipolare Kopplungen, so treten diese im Differenzspektrum hervor und ergeben ein komplizierteres Spektrum als es in *C. reinhardtii* beobachtet wird.
Die Ursache für die erhebliche Verschiebung der P700-Ausbleichung um 5 nm gegenüber dem PSI der Cyanobakterien ist bislang nicht bekannt. An dieser Stelle kann nur spekuliert werden, daß im PSI der Grünalgen die Abstände oder Orientierungen von Pigmenten in der Umgebung von P700 geringfügig vom PSI-Komplex der Blaualgen abweichen. Da bei der excitonischen Wechselwirkung – wie weiter unten noch ausführlicher diskutiert wird (siehe 5.3.4) – sowohl die Winkel der beiden Dipolübergangsmomente als auch der Vektor, der die beiden Monomere miteinander verbindet, eine Rolle spielen [36], wirkt sich bereits ein kleinerer Unterschied in der Anordnung der Kofaktoren auf die spektralen Eigenschaften des Gesamtsystems aus. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß die unmittelbare Proteinumgebung von P700 in der Grünalge die spektroskopischen Eigenschaften dieser beiden Pigmente anders beeinflußt als es in den Cyanobakterien der Fall ist.

[5] 60-70 mM^{-1}, abhängig von den Präparationsbedingungen [94, 194].

Der Vergleich der T–S-Spektren führt zu einem ähnlichen Ergebnis. Dies ist durch die identische Singulettabsorption von P700 in beiden Messungen und die geringe Absorption von $P700^{+\bullet}$ bzw. $^3P700$ in dem untersuchten Wellenlängenbereich zu erklären. Der Unterschied zwischen den Absorptionsdifferenzspektren von $P700^{+\bullet}$/P700 und $^3P700$/P700 ist im wesentlichen auf einen starken elektrochromen Effekt zurückzuführen, der im geladenen Zustand auftritt [180, 181].

Im Gegensatz zu den optischen Messungen zeigen die EPR/ENDOR-Untersuchungen, daß sowohl die Spindichteverteilung im $P700^{+\bullet}$-Radikal als auch der Abstand und die Orientierung des sekundären Akzeptors A_1 zum primären Elektronendonator in *C. reinhardtii*, Pflanzen und Cyanobakterien innerhalb des Fehlers identisch sind [17, 18, 61, 224, 225]. In Tabelle 4.2 sind dazu ergänzend die isotropen hfc der Methyltensoren von $P700^{+\bullet}$ aus verschiedenen Spezies und für Chl $a^{+\bullet}$ aufgeführt.

Die hfc sind ein sehr empfindlicher Parameter für die Verteilung der Spindichte im Radikal und werden durch die unmittelbare Umgebung des Moleküls beeinflußt. Die innerhalb des Fehlers nahezu identischen Werte der hfc der drei Methylgruppen des Porphyrinringes belegen, daß $P700^{+\bullet}$ in den PSI-Komplexen aus unterschiedlichen Spezies sehr ähnlich eingebunden sein muß. Der Einfluß der Proteinumgebung wird deutlich beim Vergleich der hfc von $P700^{+\bullet}$ und Chl $a^{+\bullet}$.

	$P700^{+\bullet}$						**Chl $a^{+\bullet}$**
Methyl-	*Synecho-*	*Synecho-*	*Spinacea*	*Hordeum*	*C. reinhardtii*		CH_2Cl_2/
Gruppe	*coccus*	*cystis*	*oleracea*	*vulgare*	FUD7	CC2696	THF
12^1	5,25	5,60	5,57	5,36	5,32	5,30	7,12
7^1	3,51	3,61	3,56	3,54	3,65	3,65	2,97
2^1	2,89	2,86	2,94	2,93	2,93	2,94	2,97

Tabelle 4.2: ^{1}H-Hyperfeinkopplungen der Methyltensoren im $P700^{+\bullet}$-Radikal im PSI-Komplex aus Blaualgen, Gerste und *C. reinhardtii*. FUD7 sowie CC2696 sind verschiedene Zellinien der Grünalge, aus denen PSI mit unterschiedlichen Methoden präpariert wurde (siehe Kapitel 3). Die Messung von Chl $a^{+\bullet}$ wurde in flüssiger Lösung bei 210 K aufgenommen. Zuordnung der A_{iso}-Kopplungen nach Käß [109, 113]. Angaben in MHz ±50 kHz, für Chl $a^{+\bullet}$ ±25 kHz. Alle Werte mit Ausnahme der hfc von *C. reinhardtii* CC2696 sind [109] entnommen.

Die Einbindung des primären Elektronendonators im Proteingerüst und die Wechselwirkung mit den Liganden muß daher in allen Spezies hochkonserviert sein. Dies wird auch durch das Redoxpotential von $P700^{+\bullet}$/P700 bestätigt, das für *S. elongatus* und *C. reinhardtii* nahezu übereinstimmt.[6]
Die exakte Anordnung und Ausrichtung der am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren scheint somit ein für die Funktion des Photosystems notwendiges Kriterium zu sein, wie die großen Übereinstimmungen in den biophysikalischen Eigenschaften der PSI-Komplexe aus verschiedenen Organismen nahelegen. Insbesondere die Parameter, die überwiegend die lokalen Wechselwirkungen von P700 beschreiben (Redoxpotential, Verteilung der Spindichte) sprechen für diese Annahme. Abweichungen zwischen den PSI-Präparationen aus verschiedenen Organismen treten hingegen bei den Untersuchungen auf, in denen auch weitreichende Kopplungen eine Rolle spielen (optische Messungen).

Die mit dem neu entwickelten Präparationsverfahren isolierten PSI-Komplexe zeichnen sich bei allen Messungen durch das gute Signal/Rausch-Verhältnis und die hohe Stabilität der Proben aus, die auf die hohe Anreicherung des Proteinkomplexes zurückzuführen sind. Die Messung am Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ ist dadurch erstmals an Präparationen aus *C. reinhardtii* mit guter Auflösung gelungen.

[6] Eine gleichwertige Messung mit PSI-Präparationen aus Pflanzen wurde nicht durchgeführt. Die Werte in der Literatur streuen für diverse Präparationen zwischen 400-500 mV [80].

5

Substitution von His(A676) und His(B656)

Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Untersuchung von PSI-Komplexen der Grünalge *C. reinhardtii*, in denen durch Punktmutation Aminosäureseitenketten in den Untereinheiten PsaA und PsaB ausgetauscht wurden. Die mutierten PSI-Komplexe wurden hinsichtlich der akkumulierten PSI-Menge und in bezug auf die biophysikalischen Eigenschaften von P700 analysiert. In diesem Kapitel werden die Auswirkungen von Substitionen am His(A676) in PsaA und His(B656) in PsaB, die als potentielle axiale Liganden der beiden Chl-Moleküle favorisiert werden, vorgestellt und diskutiert.
Neben der strukturellen Information, die sich aus der Bestimmung der Liganden des P700 ergibt, liefert die biophysikalische Untersuchung des mutierten Proteinkomplexes auch Erkenntnisse über den Einfluß der Proteinumgebung auf den primären Elektronendonator und die Funktion des Proteinkomplexes.

Das zentrale Mg-Atom im Porphyrinring des Chlorophylls wird in den Protein-Pigment-Komplexen bevorzugt durch die Imidazolgruppe eines Histidins ligandiert. In der Elektronentransportkette der bRC ligandiert ausschließlich diese funktionelle Gruppe die BChl-Moleküle axial [64, 199].
Im PSI haben wurden die konservierten Histidine in der Aminosäuresequenz der beiden großen Untereinheiten PsaA und PsaB des PSI systematisch ausgetauscht. Zunächst wurde das His, das jeweils in den Transmembranhelices VIII der beiden Proteinunterein-

heiten PsaA und PsaB auftritt [in *C. reinhardtii* Position His(A537) bzw. His(B523)], als wahrscheinlichster Kandidat für eine axiale Ligandierung angesehen, da die Aminosäuresequenz in diesem Bereich des Proteins eine hohe Übereinstimmung zu den homologen Proteinen der Reaktionszentren der grünen Schwefelbakterien aufweist [33, 134].
Der Austausch der entsprechenden Aminosäure His(B523) in *C. reinhardtii* führte zwar zur Verringerung der PSI-Menge in den Mutanten, es wurden jedoch keine signifikanten Änderungen in den spektroskopischen Eigenschaften des primären Donators beobachtet [52].

Gegenstand dieses Kapitels sind Mutanten, bei denen jeweils das Histidin His(A676) oder His(B656) in der Transmembranhelix X in den beiden Proteinuntereinheiten PsaA bzw. PsaB ausgetauscht wurde. Diese Position in der Aminosäuresequenz ist ebenfalls in den Reaktionszentren der grünen Schwefelbakterien konserviert [33, 134].
Die in *C. reinhardtii* eingeführten Mutationen hatten nicht nur Einfluß auf die Anreicherung des PSI-Komplexes in der Thylakoidmembran, sondern zeigten bei der Charakterisierung der spektroskopischen Eigenschaften und des Redoxpotentials von P700 deutliche Veränderungen gegenüber dem PSI aus WT-Präparationen.
Die Auswirkungen der Mutationen werden im folgenden besschrieben und erörtert.

5.1 Untersuchte Aminosäure-Substitutionen am His(A676) und His(B656)

Der Aminosäurerest Histidin an der Position 676 in PsaA und der entsprechenden homologen Position 656 in PsaB in *C. reinhardtii* wurde gegen hydrophobe, basische, saure, polare und Aminosäuren mit kleiner Seitenkette ausgetauscht. Die untersuchten Mutanten sind in Tabelle 5.1 aufgeteilt nach mutierter Proteinuntereinheit und den chemischen Eigenschaften der Seitengruppe aufgeführt. Für die einzelnen Aminosäuresubstitutionen wird eine Kurzschreibweise eingeführt, die auch im weiteren verwendet wird: Der Austausch von Leucin in der Untereinheit PsaA wird mit HL(A676), in PsaB analog mit HL(B656) bezeichnet. Für die verbleibenden Mutationen wird analog der Einbuchstabencode benutzt (siehe .2).

Die mutierten PSI-Gene wurden in zwei verschiedene Stämme der Grünalge transformiert. Die verwendete Zellinie hatte dabei keinen nachweisbaren Einfluß auf die untersuchten Eigenschaften des PSI.[1]

Eigenschaft der Seitenkette	**PsaA**	**PsaB**
hydrophob	HL(A676) •	HL(B656) ∗•
	HF(A676) •	HF(B656) ∗•
polar/ klein	HQ(A676) ∗•	HQ(B656) ∗•
	HS(A676) •	HS(B656) ∗•
	HC(A676) •	HC(B656) ∗•
		HG(B656) •
		HN(B656) ∗•
sauer/basisch		HD(B656) ∗
		HR(B656) ∗

Tabelle 5.1: Untersuchte PSI-Mutationen am Histidin in Helix X der Untereinheit PsaA oder PsaB in *C. reinhardtii*. „∗“ steht für Transformationen in die Zellinie FUD7, „•“ für Transformationen in den Stamm CC2696.

5.2 PSI-Gehalt in der Thylakoidmembran

Zu Beginn der Arbeiten wurde das mutierte *psaB*-Gen nur in den Stamm FUD7 transformiert. Bei der Aufreinigung der mutierten Komplexe wurde festgestellt, daß die Abtrennung der PSI-Komplexe von den LHC schwierig war, wenn das Photosystems in der Thylakoidmembran nur zu einem Bruchteil der WT-Konzentration akkumuliert wurde. Die isolierte Menge an PSI reichte bei einigen Mutationen für eine Charakterisierung nicht aus. Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Stamm CC2696 als Empfänger des mutierten Gens eingesetzt. Diese Zellinie, die Antennen-Komplexe nur in geringer Menge enthält, exprimiert wie auch FUD7 kein PSII. Durch dieses Vorgehen und eine

[1] Vergleichende Untersuchungen wurden für die Mutanten HL(B656), HF(B656), HQ(B656), HN(B656), HS(B656) und beim WT durchgeführt.

Änderung der Aufreinigungsmethode (vgl. Kapitel 3) war es möglich, PSI aus Mutanten zu isolieren, die nur geringe Mengen an PSI akkumulierten.

5.2.1 Phänotyp der Mutanten

Die Auswirkungen der Mutationen auf den PSI-Gehalt war beim Stamm CC2696 bereits an der Farbe der Zellkolonien auf halbfestem Kulturmedium (Agarplatten) deutlich zu erkennen, da PSI der vorherrschende grüne Protein-Komplex in der Thylakoidmembran dieser Zellinie ist. Der WT zeichnet sich durch eine grasgrüne Farbe aus. Die Mutanten hingegen haben einen grün-orangen bis gelb-orangen Farbton, so daß bereits mit bloßem Auge eine deutliche Abnahme des Chlorophyllgehaltes sichtbar wurde, die auf eine geringere Konzentration an PSI hinweist. Die gelb-orange Farbe ist auf die in der Thylakoidmembran verbliebenen Karotine zurückzuführen.
In der Wachstumsphase der Zellen wurde sichtbar, daß die gelblichen Zellen lichtempfindlicher waren als der WT. Dieser Effekt deutet ebenfalls auf einen geringeren PSI-Gehalt hin, da auch bei Deletionsmutanten der Grünalge, die kein PSI akkumulieren, eine erhöhte Lichtempfindlichkeit auftritt [196]. Erklärt werden kann dieses Phänomen durch ein vermehrtes Vorkommen von Triplettzuständen. Die Antennenkomplexe können die absorbierte Lichtenergie nicht mehr an das Reaktionszentrum abführen. Als Folge bildet sich eine höhere Konzentration an Singulett-Sauerstoff, der die Zelle schädigt. Detaillierte Untersuchungen hierzu wurden nicht durchgeführt.

Für eine genauere Quantifizierung des PSI-Gehaltes in den Mutanten wurden die Chlorophyllmenge und das Verhältnis von Chl *a* zu Chl *b* (Chl *a*/*b*-Verhältnis) in den Zellen bestimmt. Die im Acetonextrakt gemessene Chlorophyllkonzentration wurde zunächst auf die Dichte der Zellen im Medium bezogen, die durch Auszählen ermittelt wurde. Ein Fehler von 20 % wurde für die Zellenzahl und die Abweichungen bei der Extraktion der Proben angenommen. Im Rahmen der Auswertung der Daten wurde festgestellt, daß die Absorption bei 450 nm bei gleicher Zellenzahl nahezu identisch ist. Im Bereich dieser Wellenlänge tragen vorwiegend Karotine zum Spektrum bei, während die Absorption der Chlorophylle um 450 nm ca. 20 % beim WT und ca. 10 % bei den Mutanten beträgt.[2] Die

[2] Der Extinktionskoeffizient bei 450 nm wurde für Chl *a* und Chl *b* aus Spektren mit den reinen Pigmenten in 80 %igem Aceton ermittelt: Chl *a*, $\epsilon_{450} = 11,4\ \mathrm{mM^{-1}cm^{-1}}$; Chl *b*, $\epsilon_{450} = 83\ \mathrm{mM^{-1}cm^{-1}}$.

Karotinoidmenge in den Zellen wird somit nicht signifikant durch die geringere Konzentration an PSI beeinflußt. Der Überschuß dieser Pigmente, die nicht ins PSI eingebaut werden, liegt vermutlich frei in der Thylakoidmembran vor. Aufgrund der Korrelation von Zellenzahl und Karotinkonzentration wurden die Spektren einheitlich auf 450 nm normiert. Abb. 5.1 zeigt die Spektren der Acetonextrakte für eine Auswahl von Mutanten, die jedoch den gesamten Intensitätsbereich aller analysierten Zellen wiedergibt.

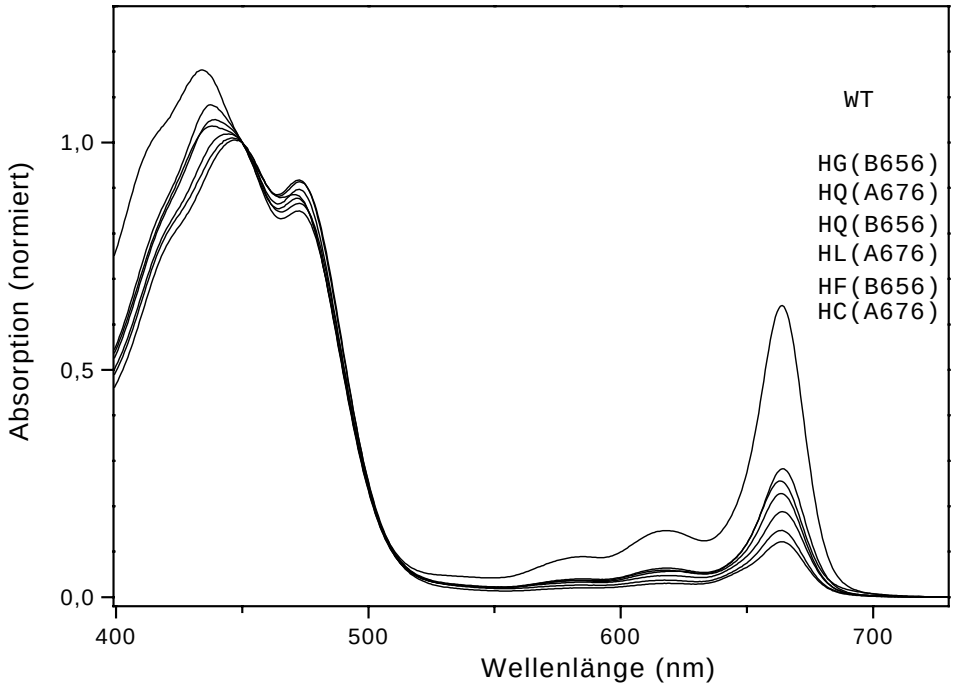

Abbildung 5.1: Absorptionsspektrum von Acetonextrakten vom WT und von mutierten Zellen (Auswahl). Die Absorption wurde auf 450 nm normiert. Die einzelnen Mutanten sind in der Legende entsprechend der Intensität der Absorption bei 664 nm von oben nach unten aufgeführt. Das Spektrum mit der höchsten Intensität bei 664 nm stammt vom WT.

In allen Mutanten lag die Chlorophyllkonzentration in den Zellen um mehr als 50 % unter dem WT-Wert. Innerhalb des Fehlers unterschieden sich die einzelnen Mutanten nicht signifikant. Beim Vergleich der Chl *a*/*b*-Verhältnisse fiel auf, daß der für den WT bestimmte Wert von 6 bei Substitution mit polaren Aminosäuren auf 4–5, bei hydrophoben sowie potentiell geladenen Aminosäuren auf 2–3 zurückgeht. Eine Ausnahme stellte HC(A676) aus der Gruppe der polaren Aminosäuren dar: Diese Mutante besaß wie die hydrophoben Substitutionen ein Chl *a*/*b*-Verhältnis von 2,5.

Eigenschaft der Seitenkette	**WT** Chl *a/b*	**PsaA** Mutation	Chl *a/b*	**PsaB** Mutation	Chl *a/b*
hydrophob		HL(A676)	2	HL(B656)	2,5
		HF(A676)	2,5	HF(B656)	2
polar/klein	His 6	HQ(A676)	4,5	HQ(B656)	5
		HS(A676)	4	HS(B656)	4
		HC(A676)	2,5	HC(B656)	3
				HG(B656)	3,5
				HN(B656)	4
sauer/basisch				HD(B656)	2,5
				HR(B656)	2

Tabelle 5.2: Chl *a/b*-Verhältnisse in den mutierten Zellen. Die Zahlenwerte ergeben sich aus dem Spektrum der Acetonextrakte unter Verwendung der von Porra *et al.* aufgestellten Gleichung [164]. Der Fehler beträgt ±0,5.

Die Abnahme der Chl *a/b*-Konzentration in den Zellen entspricht einer geringeren Menge an PSI, da dieser Komplex überwiegend Chl *a* bindet [80], während die Antennen-Komplexe, LHC-I und LHC-II, Chl *a* und Chl *b* im Verhältnis von (2-4):1 enthalten [84]. Für die Mutanten HD(B656) und HR(B656) wurden diese Messungen nicht durchgeführt. Diese beiden Mutationen wurden nur in die Zellinie FUD7 transformiert. Die Konzentration der Antennenkomplexe ist in diesem Hintergrundstamm sehr viel höher als die PSI-Menge. Veränderungen des PSI-Gehaltes wirken sich nur unwesentlich auf die Gesamtchlorophyllkonzentration in den Zellen aus und sind damit in den Zellen nicht direkt nachweisbar.

5.2.2 PSI-Aktivität in den Zellen und Thylakoiden der Mutanten

Der Phänotyp der Zellen und die Bestimmungen des Chlorophyllgehaltes ergaben, daß der Gehalt an PSI in den Mutanten stark abgenommen hatte. Um festzustellen, ob die lichtinduzierte Ladungstrennung und der Elektronentransfer in den mutierten PSI-Kom-

plexen nachzuweisen sind, wurden zwei Methoden angewandt:

1. EPR, die das $P700^{+\bullet}$-Radikal bereits in den Zellen nachweist.

2. Blitzlichtinduzierte transiente Absorptionspektroskopie an Thylakoidpräparationen der Mutanten.

EPR-Messung an ganzen Zellen

In den beiden verwendeten Zellstämmen FUD7 und CC2696 waren infolge des Fehlens von PSII keine weiteren Proteinkomplexe in den Zellen vorhanden, die lichtinduziert ein organisches Radikal erzeugen. Der spektroskopische Nachweis von $P700^{+\bullet}$ durch EPR war damit möglich.

Obwohl die EPR eine sehr empfindliche Nachweismethode ist, die im X-Band unter günstigsten Bedingungen bis zu einer unteren Grenze von 10^{11} Spins/Gauß [216] detektiert, ist eine gute Quantifizierung der Signalintensität nicht einfach realisierbar. Bereits geringe Abweichungen bei der Positionierung der Probe im Resonator, kleine Variationen im Durchmesser der Probenröhrchen und Unterschiede im Wassergehalt beeinflussen die Intensität in so starkem Maße, daß die Signalintensität unterschiedlicher Proben, insbesondere wenn es sich um so uneinheitliche Präparationen wie Zellen handelt, nur ein erster Anhaltspunkt über den PSI-Gehalt sein kann. So wurden für mehrere Messungen an WT-Zellen Unterschiede in den Intensitäten von etwa 30 % gemessen. Im Vordergrund dieser Messung stand daher, festzustellen, ob überhaupt eine stabile Ladungstrennung in den Mutanten im intakten Chloroplasten[3] detektiert und damit eine nachweisbare Menge an funktionellen PSI-Komplexen in der Thylakoidmembran akkumuliert wird.

Das Radikal wurde für den WT und alle Mutanten sowohl lichtinduziert als auch chemisch generiert. Die chemische Oxidation gewährleistete, daß auch dann ein Radikal erzeugt wird, falls die Mutation den lichtinduzierten Elektronentransfer blockiert. Um sicherzustellen, daß das gemessene Signal auf $P700^{+\bullet}$ zurückgeht, wurde die Probe, die mit Licht bestrahlt werden sollte, zuvor mit Ascorbat versetzt, dunkel adaptiert und im

[3] Intakt meint hier, daß die Proteinkomplexe in den Thylakoidmembranen noch nicht durch die Präparation manipuliert wurden, der Chloroplast also quasi *in vivo* vorliegt. Die Zellen selber sterben durch das Einfrieren bereits ab.

EPR-Spektrometer vermessen. Durch diese Verfahren wurde überprüft, ob andere Radikale vorhanden waren, die nicht durch Photooxidation induziert wurden.
In allen untersuchten Proben wurde unter diesen reduzierenden, dunkel adaptierten Bedingungen um g=2,00 kein signifikantes Signal gemessen. Allerdings traten Hintergrundsignale mit sehr großen Linienbreiten auf, die vermutlich auf spintragende Metall-Komplexe wie die Eisen-Schwefel-Cluster im PSI oder auf andere Proteine, die paramagnetische Metalle enthalten, zurückgehen.

Das EPR-Signal des WT zeigte eine unaufgelöste gaußförmige EPR-Linie mit einer Breite (*peak-to-peak*) ΔB_{PP} von $(0,76 \pm 0,02)$ mT um $g = (2,0026 \pm 0,0002)$ bei 20 K und 1 μW Mikrowellenleistung (Abb. 5.2, eingefügtes Bild). Dies ist konsistent mit den publizierten Werten für $P700^{+\bullet}$, die aus isolierten PSI-Partikeln aus *C. reinhardtii* oder anderen Organismen gewonnen wurden [109]. Die Signalform war unabhängig von der verwendeten Methode, die zur Radikalbildung führte (Photooxidation oder chemische Oxidation). In allen Fällen war jedoch die Intensität des lichtinduzierten EPR-Signals weniger ausgeprägt als das durch chemische Oxidation gemessene Signal, da unter den lichtinduzierten Bedingungen $P700^{+\bullet}$ zum Teil durch Plastocyanin reduziert wird oder mit einem Elektronenakzeptor rekombiniert.
In Abb. 5.2 sind die EPR-Signale der Mutanten gezeigt, die durch chemische Oxidation erzeugt wurden. Alle EPR-Spektren der in PsaA und PsaB mutierten Zellen zeigten eine zum Teil erhebliche Linienverbreiterung, die in den Extremfällen von HL(B656) und HF(B656) bis auf $(1,00 \pm 0,04)$ mT anstieg. Eine Verbreiterung der Linie durch breite Hintergrundsignale von anderen in den Zellen vorhandenen Radikalen war allerdings nicht auszuschließen. Weitere Messungen an isolierten PSI-Komplexen, die in 5.3.5 diskutiert werden, wiesen kleinere Linienbreiten auf. Die Auswertung der Linienbreite des EPR-Signals ist daher aufgrund der unterschiedlichen Probenqualität an dieser Stelle nicht sinnvoll.
Die Nachweisgrenze lag unter den gewählten Bedingungen bei weniger als 5 % der EPR-Signalintensität des WT (nach Doppelintegration der EPR-Linie). Die Mutanten HL(A676) und HR(B656) zeigten kein EPR-Signal, das eindeutig auf die Bildung von $P700^{+\bullet}$ hinweist. Das Signal/Rauschverhältnis lag bei diesen Proben um 2. In den übrigen Mutanten nimmt die Signalintensität auf etwa ein Fünftel der WT-Amplitude ab. Eine genauere

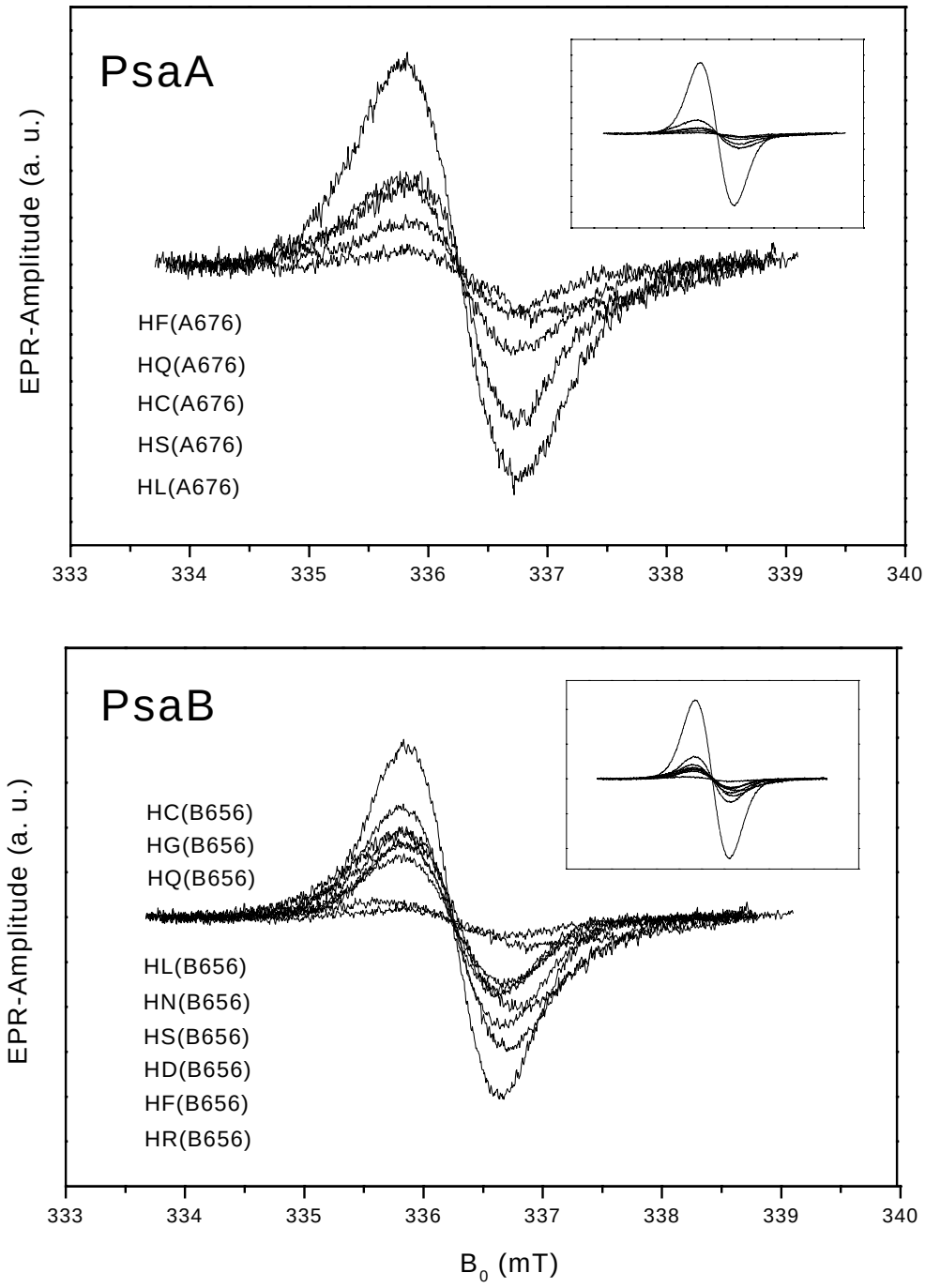

Abbildung 5.2: EPR-Signal von mutierten Zellen nach chemischer Oxidation von P700 durch Hexacyanoferrat(III). Die Einstellungen am Spektrometer waren bei allen Messungen identisch einschließlich der Verstärkung und der Anzahl der Überläufe. In der kleinen Graphik wurde zum Vergleich das EPR-Signal des WT hinzugefügt (größte Amplitude). Die einzelnen Mutanten sind entsprechend der Signalintensität von oben nach unten aufgeführt.

quantitative Analyse ist aufgrund des relativ großen Fehlers von etwa 30 % beim Signal/Rauschverhältnis des WT-PSI, der bei dieser Meßmethode zu berücksichtigen ist, nicht angebracht.

In fast allen Mutanten ist somit ein PSI-Komplex vorhanden, in dem lichtinduziert oder durch chemische Oxidation das $P700^{+\bullet}$-Radikal erzeugt wird. Die deutliche Abnahme der Signalintensität in den mutierten Zellen korreliert jedoch mit dem Ergebnis der Pigmentextraktion: Die Menge an PSI ist in den Mutanten erheblich geringer als im WT.

Transiente Absorptionsspektroskopie an Thylakoiden

Die „PSI-Aktivität“[4] in den Mutanten wurde auch durch zeitaufgelöste optische Spektroskopie bestimmt. Die blitzlichtinduzierte Absorptionsänderung, die auf die Photooxidation von P700 zurückgeht, wurde an Thylakoidpräparationen der mutierten Zellen gemessen.

Die Mutationen mit hydrophoben und potentiell geladenen Resten wiesen bis auf die Substitution HF(A676) keine nachweisbare PSI-Aktivität in den Thylakoiden auf. HC(A676) zeigte ebenfalls kein $P700^{+\bullet}$-Signal. Bei den übrigen mutierten PSI-Komplexen, die einen polaren oder kleinen Aminosäurerest als Substituent enthielten, wurde eine lichtabhängige Absorptionsänderung detektiert.

Die Zentrenzahl, die das Verhältnis an aktivem PSI bezogen auf die Gesamtchlorophyllmenge in der Probe angibt, schwankte zwischen 200 und 800 Chlorophyllen pro Zentrum für die Substitutionen mit polaren Seitenketten – ausgenommen HC(A676) – und um die 1000 Chlorophylle pro Zentrum für die Mutation HF(A676). Im WT betrug dieser Wert etwa 150 Chlorophylle pro P700.[5] Der PSI-Gehalt in den verschiedenen Mutanten ist in Tabelle 5.3 zusammen mit den Ergebnissen der EPR-Messungen an ganzen Zellen aufgeführt. Die Isolierung des PSI-Komplexes, die für die weitere biophysikalische Charakterisierung der Mutanten erforderlich war, gelang nur bei den Mutationen, die noch über etwa 20 % der PSI-Menge des WT verfügten.

Aus der Mutante HF(A676) wurde PSI isoliert. Die Ausbeute war jedoch für eine weitere Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit zu gering.

[4] PSI-Aktivität wird im weiteren synonym für die Ladungstrennung und den Elektronentransfer verwendet.

[5] Die angegebenen Zentrenzahlen gelten nur für Präparationen aus dem Zellstamm CC2696.

Eigenschaft der Seitenkette	PsaA			PsaB		
	Mutante	ΔA(%)	EPR	Mutante	ΔA(%)	EPR
hydrophob	HL(A676)	n. n.	–	HL(B656)	n. n.	+
	HF(A676)	10-20	+	HF(B656)	n. n.	+
polar/klein	HQ(A676)	60-90	+	HQ(B656)	80-100	+
	HS(A676)	40-70	+	HS(B656)	50-70	+
	HC(A676)	n. n.	+	HC(B656)	40-60	+
				HG(B656)	50-70	+
				HN(B656)	40-70	+
sauer/basisch				HD(B656)	n. n.	+
				HR(B656)	n. n.	–

Tabelle 5.3: Aktiver PSI-Gehalt in den Zellen oder der Thylakoidmembran von PSI-Mutanten der Grünalge *C. reinhardtii*. Die PSI-Menge in % des WT-Wertes wurde mit Hilfe der Blitzlichtspektroskopie durch die Größe der Absorptionsänderung (ΔA) bestimmt (n. n.: nicht nachweisbar). Wurde die Bildung von $P700^{+\bullet}$ durch EPR-Messung an ganzen Zellen nachgewiesen, ist dies mit „+“ in der Spalte EPR gekennzeichnet. War die Intensität des EPR-Signals unterhalb der Nachweisgrenze von 5 % ib bezug auf die Intensität des WT-Probe, wird „–“ verwendet.
Merke: Zur Bestimmung von ΔA mußten die Zellen aufgeschlossen und die Thylakoidmembranen präpariert werden; für die Messung war zusätzlich die Zugabe von β-DM erforderlich.

5.2.3 Diskussion

Substitution mit hydrophoben oder potentiell geladenen Aminosäuren

Die Mutanten, in denen His(A676) bzw. His(B656) gegen einen hydrophoben oder geladenen Aminosäurerest ausgetauscht wurden, enthielten kaum nachweisbare Mengen an PSI. Ein schwaches $P700^{+\bullet}$-EPR-Signal wurde in Zellen für die Mutanten HL(B656), HF(B656) und HF(A676) detektiert (2–5 % der WT-Konzentration). HL(A676) zeigte keine signifikante Aktivität ($\leq$ 2 % der WT-Konzentration). In den Thylakoidmembranen wurde nur für HF(A676) eine lichtinduzierte Ladungstrennung nachgewiesen. Eine Anreicherung und Isolierung des PSI-Komplexes gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht. Ähnliche Beobachtungen stellten Redding *et al.* für die Mutanten HL(A676) und HL(B656) im Hintergrundstamm FUD7 fest. Sie bestimmten die PSI-Aktivität über den O_2-Verbrauch in den Thylakoidmembranen. Dieser betrug in HL(A676) 5 % und in HL(B656)

10 % des WT-Wertes [170].

Die Abweichungen in den PSI-Konzentrationen bei Redding *et al.* [170] zu den hier aufgeführten Ergebnissen sind durch folgende Argumente zu erklären: Die meßtechnischen Unsicherheiten, die bei der Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs zu berücksichtigen sind, ähneln denen, die beim Vergleich der Intensitäten der EPR-Signale von $P700^{+\bullet}$ verschiedener Proben auftreten (siehe 5.2.2), da die Konzentration an PSI jeweils nur indirekt gemessen wird. Diese Werte sind deshalb mit einem hohen Fehler behaftet. Es ist jedoch auch möglich, daß der in dieser Arbeit verwendete Stamm CC2696 generell eine geringere Menge an PSI akkumuliert. Das fast quantitative Fehlen der Antennenkomplexe führt immerhin zu einer deutlichen Verschiebung des Protein/Lipid-Verhältnisses, die sich negativ auf die Bildung oder Stabilität des PSI-Komplexes auswirken könnte.

Das Ergebnis, daß die Substitution der potentiellen axialen Liganden zum P700 nahezu PSI-freie Phänotypen generiert, unterscheidet sich deutlich von den Auswirkungen, die der entsprechende Austausch der Histidine im bRC nach sich zieht. Die Mutationen HL(M202) und HL(L173) im bRC von *Rb. sphaeroides* oder die homologen Mutation in *Rb. capsulatus* wirken sich nur unwesentlich auf die Ausbeute an bRC aus [145, 34], obwohl der Austausch des Histidins gegen einen großen hydrophoben Rest in den bRC zum Verlust des Mg-Atoms des jeweils koordinierten BChl *a*-Moleküls führt. Der primäre Donator besteht in diesen Mutanten aus einer BChl *a*- und einer BPheo *a*-Einheit und wird als „Heterodimer“ bezeichnet [34].

Die starke Abnahme der PSI-Menge in den mit hydrophoben Aminosäuren substituierten Mutanten deutet darauf hin, daß die Bildung des Proteinkomplexes durch den Austausch der Aminosäure erheblich beeinträchtigt wird. Die im Vergleich mit dem bRC kompaktere Anordnung der transmembranen Helices in der PSI-Struktur [185] gestattet dem Komplex weniger Freiheitsgrade beim Einbau der Kofaktoren. Das Chl *a*-Molekül selbst ist weniger biegsam in der Ebene des Porphyrinringes als das BChl *a*, da es eine zusätzliche Doppelbindung im Makrozyklus aufweist (siehe Abb. 4.2, S. 60). Durch die Sättigung des Ringes B im BChl *a* nehmen die beiden Substituenten – die in trans angeordnete Methyl- und Ethylgruppe – mehr Raum ein als es im Chl *a* der Fall ist. Im zuletzt genannten Pigment sind diese beiden Reste in der Ebene des Porphyrinringes angeordnet. Die Bin-

dungstasche für P865 im bRC sollte aus diesem Grund voluminöser sein als im PSI und könnte eine Erklärung für die etwas offenere Anordnung der Transmembranhelices im bakteriellen System sein.

Beim Zusammenbau des PSI-Komplexes aus den einzelnen Untereinheiten und Kofaktoren stehen somit weniger Freiheitsgrade beim Einbau zur Verfügung als im bRC. Die beiden Chl *a*-Moleküle werden im mutierten PSI nicht mehr eingefügt, da die Bindungstasche aufgrund eines hydrophoben oder geladenen Restes keinen ausreichenden Platz bietet.

Eine andere Ursache für die Abnahme des PSI-Gehaltes könnte darin begründet sein, daß die Komplexe der HL- und HF-Mutanten schnell degradieren, weil Änderungen in der Struktur zur lichtinduzierten Selbstoxidation oder zur erhöhten Triplettbildung beitragen. Eine Abnahme der Excitontransferrate zwischen den Antennenchlorophyllen und P700 würde das Gleichgewicht zugunsten der Chlorophyll-Triplettbildung verschieben, wenn die Lichtenergie aufgrund der Ladungstrennung nicht abgeführt wird. Eine Folge wäre die vermehrte Bildung von reaktivem Singulett-Sauerstoff entsprechend Gl. (5.1), die auch als Ursache für die erhöhte Lichtempfindlichkeit von Zellinien angesehen wird, die kein PSI akkumulieren [196].

$$\mathrm{Chl} \xrightarrow{h\nu} \mathrm{Chl}^{*} \qquad {}^{3}\mathrm{Chl} \overset{{}^{3}\mathrm{O}_2}{} \mathrm{Chl} + {}^{1}\mathrm{O}_2 \tag{5.1}$$

Die Beobachtung von Redding *et al.* [170], daß die HL-Mutanten unter anaeroben Bedingungen photoautotroph wachsen, würde die letztgenannte Hypothese unterstützen. Die erheblich herabgesetzte Wachstumsrate unterstreicht allerdings, daß auch unter diesen Bedingungen die PSI-Konzentration gering ist. Der ineffekive Zusammenbau des PSI-Komplexes ist somit als wahrscheinlichste Ursache für die geringe Akkumulation des Proteinkomplexes in diesen Mutanten anzunehmen.

Substitution mit polaren Aminosäuren

Die Substitution mit polaren oder kleinen Aminosäureresten führte zu einer Abnahme des PSI-Gehalts in den Zellen um etwa 50 %. Eine Ausnahme stellt die Mutante HC(A676) dar. In den Thylakoiden dieser Zellen war keine PSI-Aktivität nachweisbar, obwohl ein $P700^{+\bullet}$-EPR-Signal in den Zellen nachgewiesen wurde. Die Ursache für die sehr geringe

Anreicherung oder auch Stabilität des PSI-Komplexes in der Mutante HC(A676) ist bisher unverstanden. Möglicherweise ist der Einbau des Chl-Moleküls in das Proteingerüst des PSI in der Umgebung der mutierten Aminosäure His(A676) in PsaA stärker durch die lokale Umgebung limitiert als bei der Mutation in PsaB.

Festzuhalten ist, daß die Punktmutation von His(A676) und His(B656) bei Substitution mit polaren oder kleinen Aminosäuren bis auf eine Ausnahme eine für die Isolierung des Komplexes ausreichende Menge an PSI-Komplexen in den Thylakoiden enthalten. Die 50 %ige Abnahme des PSI-Gehaltes in diesen Mutanten zeigt jedoch, daß His(A676) und His(B656) für den Zusammenbau des Proteinkomplexes eine besondere Bedeutung haben. Inwieweit die Funktion des Komplexes durch den Austausch der Aminosäure beeinflußt wird, ist Thema des nächsten Abschnittes.

5.3 Biophysikalische Charakterisierung von P700 am mutierten PSI-Komplex

Der Austausch von His(A676) in PsaA oder His(B656) in PsaB verringerte die PSI-Menge in den Thylakoidmembranen erheblich. Ähnliche Veränderungen wurden bereits bei der Mutation anderer Histidine in den beiden großen Proteinuntereinheiten beobachtet. So führten die Substitutionen der zwei Histidine in Helix VI und in Helix VIII von PsaA und PsaB ebenfalls zu einer Abnahme der PSI-Konzentration in den Thylakoiden. Die weitere Charakterisierung dieser Mutationen zeigte jedoch, daß sie keine Auswirkungen auf den primären Elektronendonator P700 haben [52, 170].

Der Austausch von His(A676) oder His(B656) hingegen hatte nicht nur Einfluß auf die PSI-Akkumulation, sondern veränderte die biophysikalischen Eigenschaften von P700. Detailliert untersucht werden hier die Auswirkungen auf das Redoxpotential, die optischen Eigenschaften von P700 und die Spindichteverteilung des ungepaarten Elektrons im $P700^{+\bullet}$-Kation-Radikal.

Die Interpretation dieser Ergebnisse wirft dabei die Frage auf, ob die beiden benachbarten Chl *a*-Moleküle, die P700 bilden und als solche bereits in der Röntgenstruktur identifiziert wurden [123, 184], in einem Supermolekül miteinander wechselwirken. Im chemischen Sprachgebrauch ist hiermit gemeint, ob die Wellenfunktionen der beiden einzelnen Chl-Moleküle in einem Bereich so weit überlappen, daß sie durch ein gemeinsames Molekülorbital beschrieben werden können. Es ist mithin bisher nicht eindeutig geklärt, ob P700 in bezug auf die Elektronenkonfiguration als ein Chl-Dimer oder als Paar zweier monomerer Chl *a*-Einheiten aufzufassen ist.

Diese rein elektronische Wechselwirkung ist klar abzugrenzen von dipolaren Kopplungen, die über größere Bereiche durch den Raum wirken, ohne daß hierfür eine Überlagerung der Elektronenwolken der einzelnen Moleküle erforderlich ist. Eine solche Interaktion, die von den Übergangsdipolmomenten der Pigmente und deren relativer Orientierung abhängig ist, wird für die beiden Chl-Moleküle vorausgesetzt und findet sich überwiegend in den optischen Eigenschaften von P700 wieder.

5.3.1 $P700^{+\bullet}$/P700-Redoxpotentiale der mutierten PSI-Komplexe

Das Halbstufenpotential des Redoxpaares $P700^{+\bullet}$/P700 wurde durch die blitzlichtinduzierte Absorptionsänderung bei 826 nm bestimmt. Das $P700^{+\bullet}$-Kation weist in diesem Wellenlängenbereich eine breite Absorptionsbande auf, während der Grundzustand nicht absorbiert. Über die Änderung dieser Meßgröße wurde der Anteil des oxidiert vorliegenden Redoxpartners ermittelt. Die Einstellung des Redoxpotentials der Lösung wurde durch Zugabe des Redoxpaares Fe^{2+}/Fe^{3+} in Form von Kaliumhexacyanoferrat(II)/(III) in definierten Verhältnissen erreicht. Die Meßwerte wurden durch eine Fitroutine einer Kurve angepaßt, die der Nernst-Gleichung mit einem Ein-Elektronenübertrag ($n = 1$) entspricht.

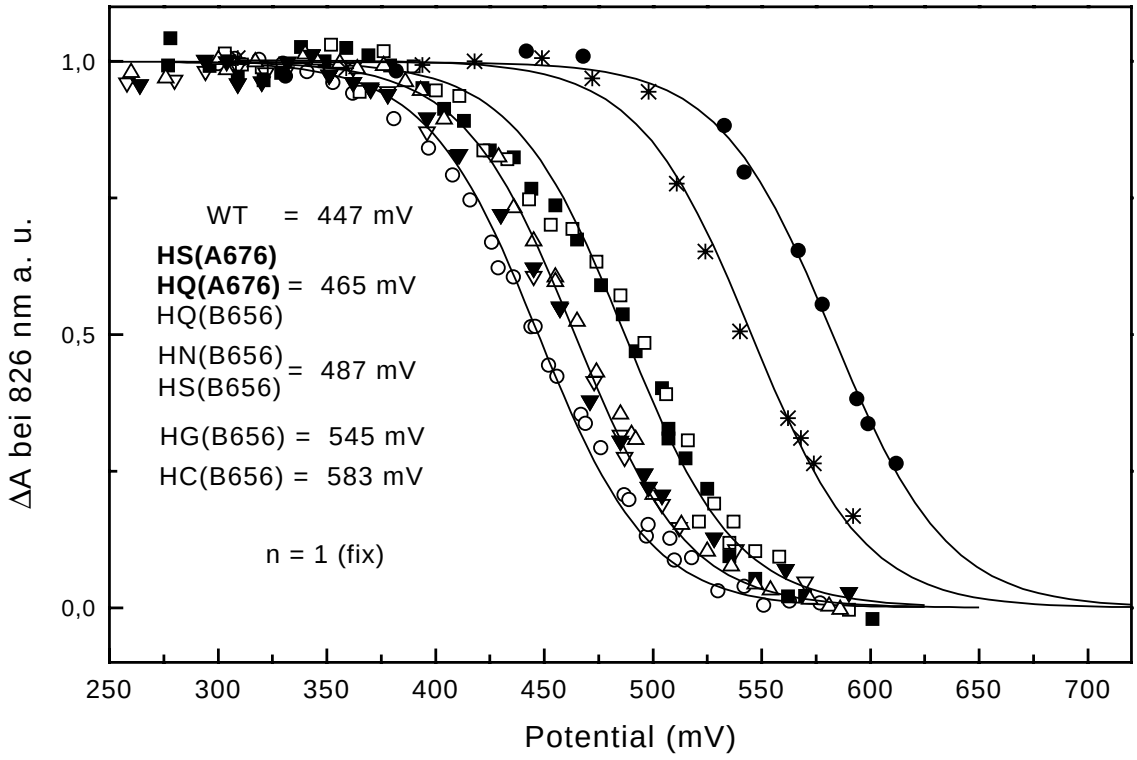

Abbildung 5.3: Redoxtitrationen der blitzlichtinduzierten Absorptionsänderung bei 826 nm zur Bestimmung von $P700^{+\bullet}$ in PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* : WT (○), HQ(A676) (△), HQ(B656) (▽), HS(A676) (H), HS(B656) ( ), HN(B656) ( ), HG(B656) (∗), HC(B656) (•). Der Fehler beträgt ±6 mV [±4 mV für HG(B656) und HC(B656)].

Ohne Festlegung des Parameters „n“ liegt die Zahl der pro Redoxvorgang übertragenen Elektronen mit 0,9 sehr nahe an 1. Die Titrationen von HG(B656) und HC(B656) ergeben sogar $n = 0,98$.
Die geringe Abweichung der Meßwerte vom theoretischen Kurvenverlauf bestätigt sowohl die Stabilität als auch die Homogenität der isolierten PSI-Komplexe.

In allen Mutationen erhöht sich das Halbstufenpotential gegenüber dem WT. Die einzelnen Werte sind in Abb. 5.3 zusammen mit den Redoxtitrationskurven dargestellt. Die Mutationen HQ(A676) und HS(A676) auf der Untereinheit PsaA führen zu einer Anhebung des Potentials um 20 mV. Der gleiche Wert von 465 mV wurde für PSI aus der Mutante HQ(B656) in PsaB bestimmt. In HS(B656) und HN(B656) nimmt das Potential um 40 mV zu. Die größten Veränderungen zeigen die PSI-Präparationen aus HG(B656) und HC(B656), die 100 mV und 140 mV über dem Potential des WT liegen.

Diskussion

Das Potential des Redoxpaares $P700^{+\bullet}$/P700 ist ein empfindlicher Parameter für elektrostatische Wechselwirkungen der Umgebung mit dem primären Elektronendonator und für die Lage des Energieniveaus des höchsten besetzten Molekülorbitals (HOMO) des primären Elektronendonators. Ein veränderter Ligand, eine Änderung der Umgebung durch Austausch eines Aminosäurerestes mit anderen chemischen Eigenschaften oder auch eine durch die Mutation ausgelöste Strukturänderung des Proteingerüstes können das Redoxpotential von P700 beeinflussen [49].

Im bRC wurde durch zwei Arten von Mutationen das Redoxpotential des primären Elektronendonatos P865 verändert:

1. Es wurden Wasserstoffbrücken (H-Brücken) zum BChl-Dimer gebrochen oder hinzugefügt.

2. Ein axialer Ligand des P865 wurde ausgetauscht.

Im ersten Fall führt eine zusätzliche H-Brücke zum Sauerstoff der Ketogruppe im Ring E des Porphyrinringes (vgl. Abb. 4.2, S. 60) zu einem Anstieg des Redoxpotentials von P865 um etwa 50 mV unabhängig davon, ob die H-Brücke zu P_L oder P_M verändert

wurde [168]. Die analogen, zusätzlichen H-Brücken wurden in der Heterodimermutante HL(M202) des bRC generiert, in der der primäre Elektronendonator aus einem BChl *a* und einem BPheo *a* besteht. Wird statt dieser Substitution eine weitere H-Brücke auf der Seite des BPheo *a* eingebracht, steigt das Potential lediglich um 15 mV an. Auf der Seite des BChl *a* erhöht eine H-Brücke das Redoxpotential um 80 mV [3].
Der wesentlich stärkere Einfluß der H-Brücke auf der Seite des BChl *a* ist überwiegend auf die Destabilisierung des oxidierten Donators zurückzuführen. Im Heterodimer ist das ungepaarte Elektron auf dem BChl *a* lokalisiert. Die positive Partialladung einer zusätzlichen H-Brücke an diesem Molekül erhöht das Energieniveau des Radikals, da die Spindichte weniger delokalisiert wird. Das Redoxgleichgewicht verschiebt sich durch die Zunahme des Potentials der oxidierten Spezies zugunsten des reduzierten Zustandes. Eine zusätzliche H-Brücke am BPheo *a* erhöht hingegen das energetische Niveau des Porphyrinringes ohne Mg-Atom. Der Ladungsdipol des BPheo *a*, der durch die H-Brücke anders ausgerichtet wird, wirkt sich jedoch ebenfalls ungünstig – allerdings deutlich schwächer – auf das oxidierte BChl *a* aus [6, 168].

Die zweite Art der Modifizierung – der Austausch der axialen Liganden – führt im bRC bei den bereits oben erwähnten Mutanten HL(M202) und HL(L173) zu einem Anstieg des Redoxpotentials von $P865^{+\bullet}/P865$ um 160 mV [2]. Der Wert entspricht nahezu dem von monomerem BChl *a*.[6] Aufgrund des höheren Energieniveaus des BPheo, das die zweite Hälfte des Dimers in diesen Mutanten bildet, ist die elektronische Kopplung zwischen den beiden Molekülen nur noch sehr gering, so daß die monomeren Eigenschaften der beiden Pigmente stärker hervortreten.
Werden die axialen Liganden des P865 gegen die kleineren und polaren Aminosäuren Gly, Ser und Asn ausgetauscht, enthält das bRC weiterhin ein BChl-Dimer [83, 186]. Das Redoxpotential steigt in diesen Mutanten des bRC um 5 mV (Gly) bzw. 20–25 mV (Ser, Asn) an [186]. Aufgrund des vergleichsweise geringen Anstiegs des Potentials wird insbesondere bei der Substitution mit der unpolaren Aminosäure Gly vermutet, daß P685 durch einen „Ersatzliganden“ koordiniert wird. Als wahrscheinlichster Bindungspartner zum Mg-Atom wird das Sauerstoffatom eines Wassermoleküls angesehen [83, 186].

[6] Das Halbstufenpotential von BChl *a* beträgt 660 mV, das von BPheo 1020–1120 V (abhängig vom organischen Lösungsmittel) [212].

In den hier untersuchten mutierten PSI-Komplexen ist das Redoxpotential immer höher als im WT. Sollten die Aminosäuresubstitutionen die Anzahl der H-Brücken zum P700 mit Einfluß auf das π-Elektronensystem der Porphyrinringe verändern, ist durch die Mutation – in Analogie zu den bRC – eine zusätzliche H-Brücke induziert worden. Aufgrund der Substituenten am Porphyrinring des Chl *a* steht für eine solche Bindung im primären Elektronendonator des PSI nur der Keto-Sauerstoff am Ring E zur Verfügung (vgl. Abb. 4.2, S. 60).
Der ausgetauschte Imidazolring des His ist aufgrund der beiden Stickstoffatome eine ideale funktionelle Gruppe, um H-Brücken zu bilden. Diese Eigenschaft ist in einer Vielzahl von Proteinstrukturen belegt [200]. Es ist unwahrscheinlich, daß ein Austausch dieses Aminosäurerestes gegen kleinere Seitenketten wie Ser oder Asn zur Bildung einer H-Brücke führen soll, die im WT nicht existiert. Im Falle des Austausches gegen Gly ist eine solche Bindung sogar auszuschließen, da dieser Rest diese Koordinierung nicht eingeht. Daraus wird in Analogie zum bRC gefolgert, daß His(A676) oder His(B656) P700 nicht über eine H-Brücke koordinieren.

Die Annahme, daß die beiden His die Mg-Atome von P700 axial ligandieren, weist hingegen in bezug auf die mutierten PSI-Komplexe eine gute Korrelation mit dem bRC auf. Der Austausch des Imidazolringes gegen eine kleinere Aminosäureseitenkette erhöht sowohl im PSI als auch im bRC das Redoxpotential. Die beiden Photosysteme unterscheiden sich allerdings in der Ausprägung des Effektes: Die Substitution mit Gly wirkte sich im bRC nur wenig auf das Redoxpotential aus (+5 mV) [83]. Im PSI erhöht diese Substitution das Potential um 100 mV gegenüber dem WT und im Fall der Mutation HC(B656) sogar um 140 mV. Der Austausch der axialen Ligaden im bRC gegen Ser oder Asn erhöht hingegen das Redoxpotential um (16 ± 3) mV bzw. (21 ± 2) mV [186]. Im PSI bewirkt dieser Aminosäureaustausch einen Anstieg des Potentials um (40 ± 6) mV.

Die Ursache für die Potentialerhöhung von P700 in den mutierten PSI-Komplexen ebenso wie im mutierten bRC ist wahrscheinlich überwiegend auf Änderungen in der Verteilung von Partialladungen in der Umgebung der beiden (B)Chl-Moleküle zurückzuführen, die sich, wie im folgenden diskutiert wird, stärker auf das Energieniveau des oxidierten primären Donators als auf das Potential des Grundzustandes auswirken.

Im WT werden im bRC und vermutlich auch im PSI die Mg-Atome des primären Elektronendonators durch His axial koordiniert. Das ligandierende Stickstoffatom im Imidazolring besitzt aufgrund des freien Elektronenpaares eine starke negative Partialladung. Im oxidierten Zustand stabilisiert diese hohe Elektronendichte in der Nähe des Porphyrinringes die positive Ladung, die sich auf dem primären Donator befindet, wie in Abb. 5.4 schematisch dargestellt ist. Die Gesamtenergie des geladenen Zustandes wird dadurch erheblich verringert. Das Potential des Grundzustandes hingegen wird wahrscheinlich durch die Ligandierung nur wenig abgesenkt. Das Redoxpotential von $P700^{+\bullet}$/P700, das sich aus der Differenz der Energien des oxidierten und des reduzierten Zustandes ergibt, ist dadurch erheblich weniger positiv als für das Redoxpaar Chl $a^{+\bullet}$/Chl a in Lösung.[7] So haben Plato *et al.* für $P960^{+\bullet}$ im bRC aus *Rps. viridis* berechnet, daß die Stabilisierungsenergie, die durch die Aminosäureseitenketten der Umgebung gewonnen wird, $0,55$ eV beträgt. Die beiden axialen His-Liganden haben daran mit jeweils etwa 20 % den größten Anteil [163]. Im PSI muß die Stabilisierung von $P700^{+\bullet}$ durch die Proteinumgebung im Vergleich zu den bRC sogar wesentlich größer sein, da die Differenz zum Redoxpotential des freien Chl a etwa 450 mV beträgt. In bRC liegt der Wert um 170 mV unter dem des BChl in Lösung.

In den mutierten PSI-Komplexen wird der potentielle axiale Ligand His ausgetauscht. Zur Vereinfachung wird im weiteren das Chl-Molekül, das durch die Proteinuntereinheit PsaA koordiniert wird, mit P_A und entsprechend das andere Chl-Molekül mit P_B bezeichnet. Die Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen auf das Redoxpotential korrelieren bei Mutationen in PsaB sehr gut mit den polaren Eigenschaften und dem Volumen der eingeführten Seitenkette. Zum Vergleich sind die Strukturformeln dieser Aminosäuren in Abb. 5.5 aufgeführt.

Der PSI-Komplex aus der Mutante HQ(B656) weist eine geringe Zunahme des Potentials von $P700^{+\bullet}$/P700 gegenüber dem WT auf (+20 mV) auf. Die Seitenkette der Aminosäure Gln ähnelt in ihrer Größe und der Polarität sehr dem ausgetauschten His. Sowohl der terminale Carbonylsauerstoff als auch der Stickstoff der Amidgruppe besitzen hohe Elektronegativität und freie Elektronenpaare. Die längere Kohlenwasserstoffkette ist zusätz-

[7] Das Potential von Chl $a^{+\bullet}$/Chl a liegt um 850 mV und ist stark abhängig vom verwendeten Lösungsmittel (±100 mV) [212].

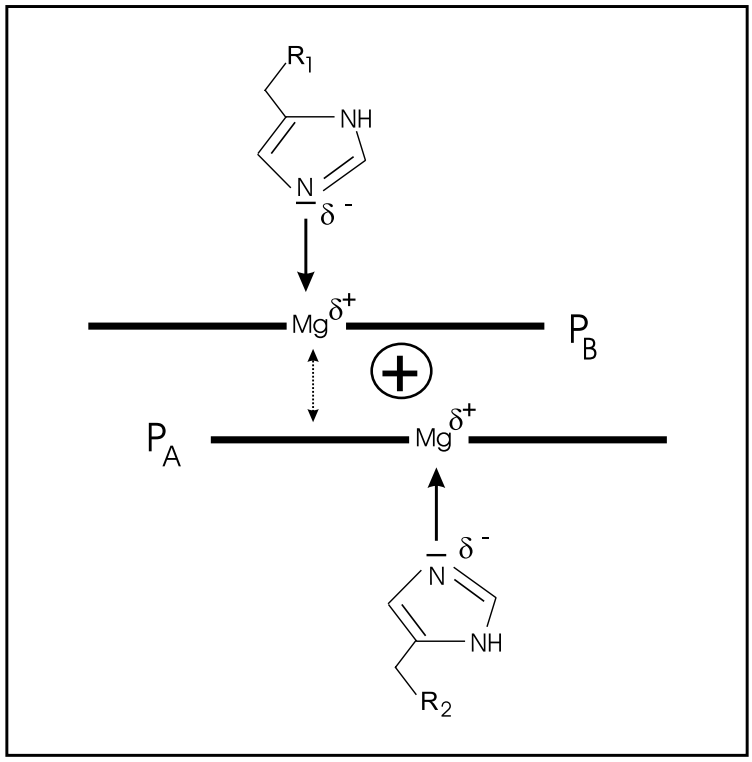

Abbildung 5.4: Modell zur Verteilung der Partialladungen im $P700^{+\bullet}$ bei axialer Ligandierung durch His. Nur die für die Stabilisierung von $P700^{+\bullet}$ relevanten Dipole sind eingezeichnet. P_A und P_B stellen die, durch die Proteinuntereinheiten PsaA bzw. PsaB koordinierten, Chl-Moleküle dar, die P700 bilden. Entsprechend markieren R_1 und R_2 die beiden Polypeptidketten PsaB bzw. PsaA. Der gepunktete Doppelpfeil soll andeuten, daß auch eine Stabilisierung durch die π-Elektronensysteme der Porphyrinringe möglich ist.

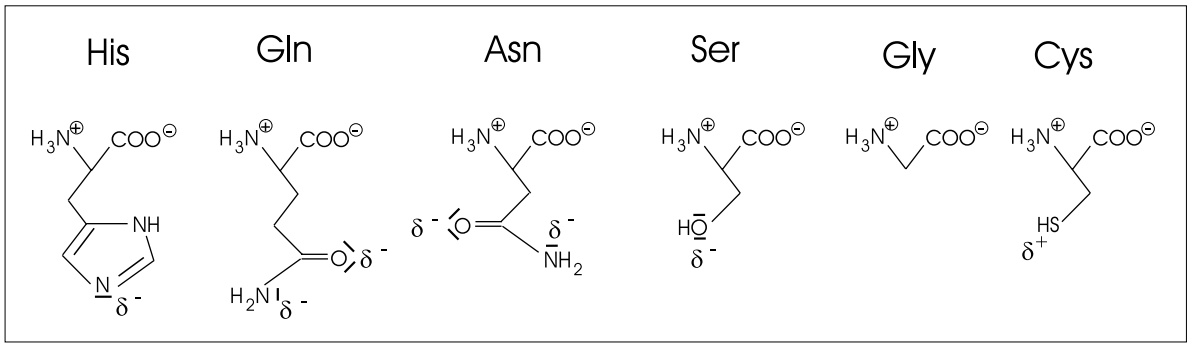

Abbildung 5.5: Strukturformel der Aminosäuren, die in den biophysikalisch untersuchten PSI-Komplexen an den Positionen His(B656) und His(A676) substituiert wurden. Die Partialladungen, die in Richtung P700 orientiert sein könnten, sind eingezeichnet.

lich flexibel genug eine günstige Koordinierung zum Mg-Atom zu gewährleisten.
Die Substitutionen mit Ser und Asn belegen, daß der Abstand der Partialladung von P_B eine wesentliche Rolle spielt. Beide Seitenkette weisen eine vergleichbare Polarität auf. Die Größe und die Geometrie stimmen ebenfalls nahezu überein. Entsprechend erhöhen beide Mutationen das Redoxpotential um 40 mV. Der größere Abstand des negativen Dipols zum Mg-Atom wirkt sich in diesen beiden Fällen entscheidend auf die Stabilisierung des oxidierten Zustandes aus.
Fehlt hingegen die kompensierende Partialladung ganz, wie es bei der Substitution mit Gly der Fall ist, wird der oxidierte primäre Elektronendonator soweit energetisch angehoben, daß das Redoxpotential um 100 mV ansteigt. Die noch stärkere Zunahme, die in HC(B656) beobachtet wird, ist nur so zu erklären, daß neben der geringen Elektronegativität des Schwefels das acide Proton in unmittelbarer Nähe zum P700 angeordnet sein muß. Die positive Partialladung des Wasserstoffatoms wäre dann verantwortlich für die weitere Erhöhung des Redoxpotentials.

Insbesondere die beiden zuletzt genannten Resultate weisen darauf hin, daß in den mutierten PSI-Komplexen im Gegensatz zu den analogen Aminosäuresubstitutionen im bRC von *Rb. sphaeroides* kein Wasser als Ersatzligand vorhanden sein kann. Der hohe negative Dipol am Sauerstoffatom im Wassermolekül würde ansonsten, wie es in den bRC HG(M202) und HG(L173) aus *Rb. sphaeroides* beobachtet wird, den fehlenden Liganden gut kompensieren.
Auch die Position von P700 im Proteingerüst, die sich aus der Röntgenstrukturanalyse ergibt [184], spricht gegen eine Einlagerung von Wasser in der Umgebung der beiden Chl-Moleküle, da der primäre Elektronendonator deutlich tiefer im hydrophoben Bereich des Proteinkomplexes angeordnet ist, der in der Thylakoidmembran liegt. Im bRC hingegen ist der primäre Donator relativ nahe an der periplasmatischen Seite der Membran lokalisiert.

Der Austausch des His(A676) in PsaA wirkt sich auf das Redoxpotential von $P700^{+\bullet}/P700$ nicht so spezifisch aus, wie es bei den Substitutionen am His(B656) in PsaB beobachtet wird. Sowohl die Mutation HQ(A676) als auch HS(A676) erhöhen das Potential um 20 mV. Der Einfluß der negativen Partialladung der eingeführten Seitenkette steht damit

nicht mehr in direktem Zusammenhang mit dem Redoxpotential, wie es bei den Mutationen in PsaB beobachtet wird. Da die Änderungen des Redoxpotentials einerseits gering, andererseits für beide Substitutionen innerhalb des Fehlers identisch sind, erfolgt die Destabilisierung des oxidierten Zustandes in diesen Mutanten nicht direkt durch die Einwirkung der eingeführten Aminosäureseitenkette.
Wenn sich im $P700^{+\bullet}$ das ungepaarte Elektron überwiegend auf P_B befindet, wird der Austausch des Liganden am P_A die positive Ladung aufgrund der größeren Distanz nur wenig stabilisieren können. Es ist allerdings in diesem Modell vorstellbar, daß der Dipol des π-Elektronensystems von P_A stabilisierend auf das geladene Molekül $P_B{}^{+\bullet}$ wirkt, wie es auch in Abb. 5.4 durch den gepunkteten Doppelpfeil angedeutet ist. Wird die Ausrichtung des Dipols durch die Substitution mit einer weniger negativen Partialladung in der Nähe des Mg-Atoms von P_A ungünstig beeinflußt, ist eine Destabilisierung von $P_B{}^{+\bullet}$ die Folge. Die geringe unspezifische Zunahme des Redoxpotentials von HQ(A676) und HS(A676) ist damit zu erklären. Eine Überlagerung der Molekülorbitale von P_A und P_B ist bei dieser Interpretation der Ergebnisse nicht notwendig.

Die Diskussion der Resultate der Redoxtitrationen der mutierten PSI-Komplexe legt somit nahe, daß die positive Ladung überwiegend auf dem P_B lokalisiert ist. Die Zunahme der Redoxpotentiale die in den mutierten PSI-Komplexen beobachtet wird, ist dann gut durch die Änderung der elektrostatischen Wechselwirkungen der Proteinumgebung mit P700 zu beschreiben.
Die Einbindung eines Wassermoleküls als „Ersatzliganden“, wie für einige Mutanten im bRC postuliert wird [83, 185], ist in den mutierten PSI-Komplexen nicht sehr wahrscheinlich.

5.3.2 Der Triplettzustand ^{3}P700

Werden die Elektronenakzeptoren des PSI durch Zugabe eines Reduktionsmittels vorreduziert, ist die lichtangeregte Ladungstrennung nur noch bis zum F_x möglich. Das erzeugte Singulett-Radikalpaar rekombiniert dann entweder direkt in den Grundzustand oder geht aus dem Triplett-Radikalpaar, das mit dem Singulett im Gleichgewicht steht,

in das langlebigere ^{3}P700-Triplett über:

$$P700A_1 \xrightarrow{h\nu} P700^*A_1 \qquad {}^1[P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}] \qquad {}^3[P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}] \longrightarrow {}^3P700^{+\bullet}A_1 \tag{5.2}$$

Die Analyse des Tripletts ist durch Doppelresonanzexperimente möglich. Die Größe, die den Triplettzustand charakterisiert, ist die Nullfeldaufspaltung. Diese erlaubt Aussagen über die Geometrie dieser Elektronenkonfiguration. Bei überwiegend planaren Molekülen, wie zum Beispiel Chl, hängt der Parameter |D| vom mittleren Abstand der beiden Elektronen und von der Symmetrie des Moleküls ab. |E| beschreibt dann die Abweichung von der Zylindersymmetrie und ist im axialsymmetrischen System gleich Null [95].
Die excitonischen Wechselwirkungen der beiden Chl *a*-Moleküle, die P700 bilden, sowie andere Pigmente in unmittelbarer Nachbarschaft werden ebenfalls durch diese spektroskopische Untersuchung abgetastet, da P700 im Triplettzustand andere optische Eigenschaften als im Singulettzustand besitzt.
Der Austausch von Aminosäuren in der Nähe des Moleküls, das im Tripettzustand untersucht wird, sollte sich in den spektroskopisch zugänglichen Größen niederschlagen. Aufgrund der Ausprägung der Effekte sind Rückschlüsse auf die molekulare und elektronische Struktur dieses Moleküls und dessen Einbindung ins Proteingerüst möglich.
In den mutierten PSI-Partikeln wurden die Nullfeldaufspaltungsparameter |D| und |E| bestimmt und das Absorptionsdifferenzspektrum zwischen dem Triplett- und dem Singulettzustand aufgenommen.

|D|- und |E|-Parameter des Triplettzustandes

Die Nullfeldparameter |D| und |E| der mutierten PSI-Komplexe sind in Tabelle 5.4 den WT-Werten und ^{3}Chl *a* gegenübergestellt. Der |D|-Parameter des PSI aus den Mutanten unterscheidet sich nur unwesentlich von den WT-Werten. Der Parameter |E| ist für Mutationen in PsaA und für HQ(B656) um 5 % höher als im WT. Die übrigen Mutationen in PsaB zeigen hingegen eine Abnahme um 2,6 % für HS(B656), um 5 % für HN(B656) und HG(B656) bis hin zu 7,6 % im Falle von HC(B656). Insgesamt sind die Abweichungen jedoch gering. Die Verteilung des Triplettzustandes in ^{3}P700 stellt sich in den mutierten Partikeln bei sehr tiefen Temperaturen nicht wesentlich anders als beim WT dar.

	^{3}**P700**								^{3}**Chl *a***	
	WT	**PsaA**		**PsaB**					n-Oktan[a]	n-Oktan/H_2O[b]
ZFS	His	Gln	Ser	Gln	Ser	Asn	Gly	Cys		
$\|\mathbf{D}\|$	280	280	283	280	281	282	281	282	280±3	299±2
$\|\mathbf{E}\|$	39,5	41,0	41,5	41,5	38,5	37,5	37,5	36,5	38±3	44,4±2

Tabelle 5.4: Nullfeldaufspaltungsparameter (ZFS) im WT und den His-Mutanten. $|D|$ und $|E|$ sind in Einheiten von 10^{-4}cm^{-1} angegeben. Der Fehler liegt bei $\pm 1 * 10^{-4}$cm^{-1} für $|D|$ und $\pm 0,5 * 10^{-4}$cm^{-1} für $|E|$. Die Angaben für Chl *a* geben die beiden Extremwerte an, die in verschiedenen organischen Lösungsmitteln bestimmt wurden.
[a] Entnommen aus Clarke *et al.* (1976) [43], [b] Entnommen aus Clarke *et al.* (1982) [44].

Triplett-minus-Singulett-Differenzspektren von P700

Die T–S-Spektren des WT und der mutierten PSI-Komplexe sind in den Abb. 5.6 und 5.7 dargestellt.

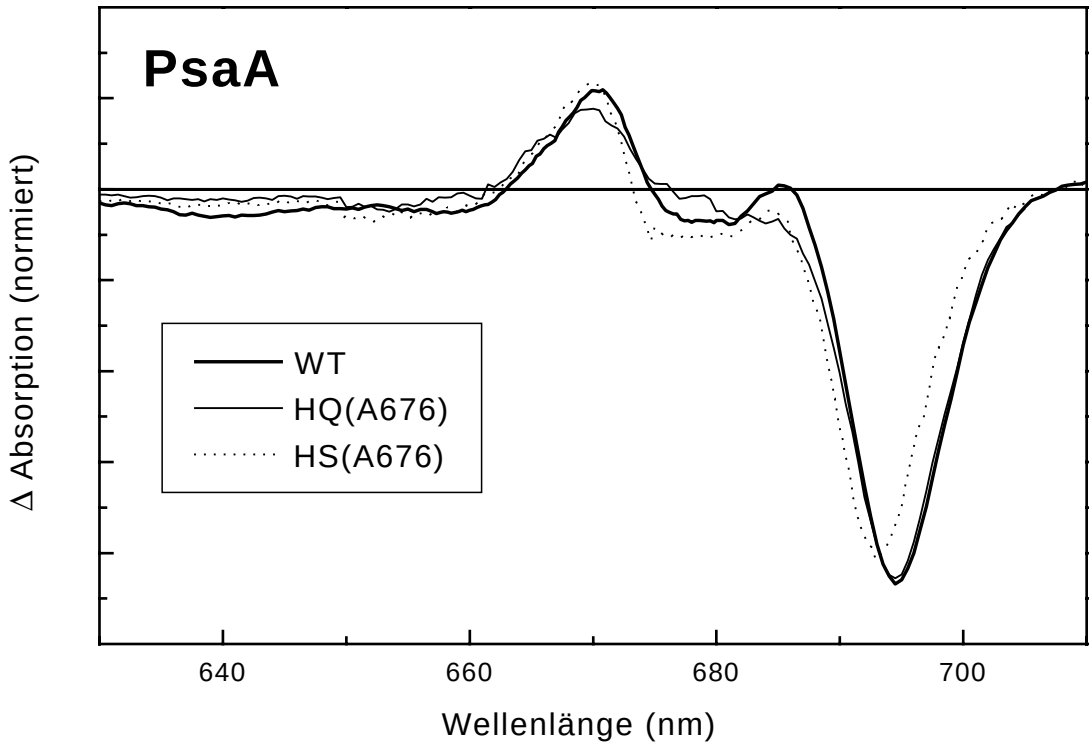

Abbildung 5.6: T–S-Spektren von PSI-Komplexen, die am His(A676) mutiert wurden. Die Proben wurden mit Dithionit vorreduziert und 5 min bei Raumtemperatur belichtet. Die Messung wurde bei maximaler EPR-Resonanz aufgenommen, die den |D| + |E|-Übergängen aus Tabelle 5.4 entspricht.

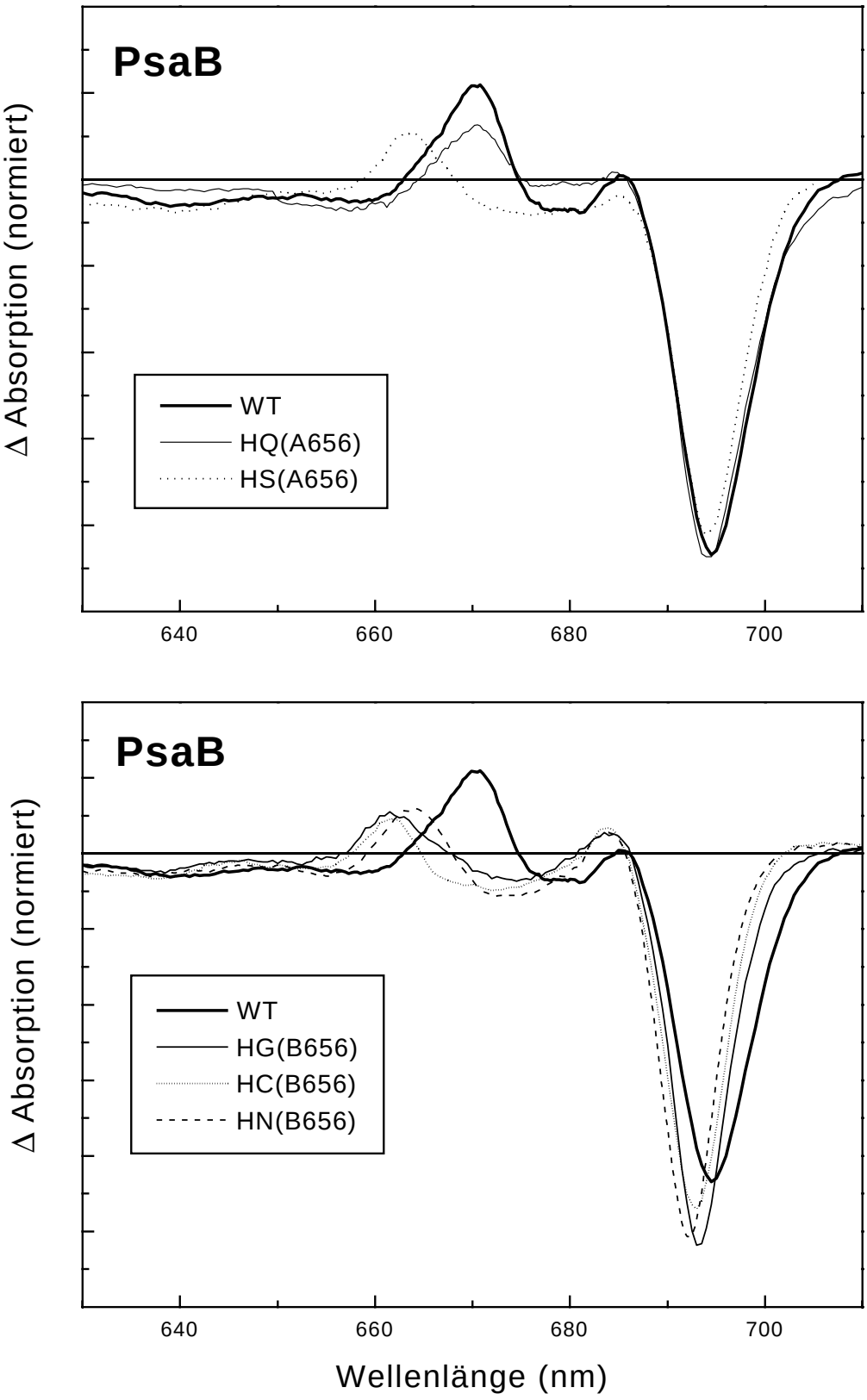

Abbildung 5.7: T–S-Spektren von PSI-Komplexen, die am His(B656) mutiert wurden.

Die Spektren wurden zwischen 630–720 nm flächennormiert, da das Differenzspektrum in erster Näherung der Ausbleichung der P700-Singulettabsorption entspricht. Bei weitgehend unveränderter Oszillatorstärke dieses Pigmentes ist zu erwarten, daß das Integral der Kurve für PSI aus den Mutanten und aus dem WT identisch ist. Die gute Übereinstimmung der Spektren zwischen 630-650 nm und oberhalb von 710 nm bestätigen diese Annahme. Das Minimum der Hauptausbleichungsbande liegt im T–S-Spektrum des WT bei 696 nm (Abb. 5.6 und 5.7 fettgedruckt). Weitere Merkmale im Spektrum sind eine positive Bande bei 685 nm, eine geringe Absorptionsabnahme um 680 nm und eine positive Bande um 670 nm. Die T–S-Spektren mit den Mutationen HQ(A676) und HQ(B656) weichen am wenigsten von denen des WT ab (Abb. 5.6 bzw. 5.7 oben, durchgezogene Linie). In den Spektren der verbleibenden mutierten PSI-Komplexe ist die Position der Hauptausbleichung zu kürzeren Wellenlängen verschoben und die Halbwertsbreite dieser Bande deutlich schmaler. Die Absorptionszunahme, die im WT bei 670 nm liegt, tritt bei HS(B656) und HN(B656) um 664 nm auf, in HG(B656) und HC(B656) ist sie bei 662 nm zu finden.

Mutation	**Hauptausbleichung**		**650-680 nm Bereich**	
	Minimum	Δhw	Maximum	Minimun
WT	694,5	9,0	671,0	679
HQ(A676)	694,5	9,0	671,0	679
HS(A676)	693,0	8,0	671,0	679
HQ(B656)	694,0	8,5	671,0	678
HS(B656)	694,0	7,5	663,5	676
HC(B656)	693,0	7,0	662,0	672
HG(B656)	693,0	7,0	661,5	675
HN(B656)	692,0	6,5	664,0	674

Tabelle 5.5: Merkmale der T–S-Spektren im WT und den His-Mutationen. Die Werte der Absorptionsbanden sind in nm angegeben. Die Halbwertsbreite Δhw in nm wurde auf halber Höhe der maximalen Ausbleichung bestimmt. Der Fehler beträgt $\pm 0,5$ nm für die Hauptausbleichungsbande und die lokale Absorptionszunahme um 670 nm (Max) und ± 2 nm für das lokale Minimum (Min) um 679 nm.

Die Mutation HS(A676) in PsaA weist hingegen dieses Charakteristikum im Bereich von 670 nm nicht auf, sondern zeigt nur eine Blauverschiebung der Hauptausbleichung und eine geringere Linienbreite (Abb. 5.6, gepunktete Kurve). In Tabelle 5.5 sind die Unterschiede für alle mutierten PSI-Komplexe zusammengefaßt.

Diskussion

Die mutierten PSI-Komplexe verändern die Nullfeldparameter |D| und |E| nur in geringem Maße. Die räumliche Ausdehnung des Triplettzustandes wird somit durch den Austausch der Aminosäureseitenkette nicht signifikant beeinflußt. Das Elektron im Triplettzustand ist auch in den mutierten PSI-Komplexen entsprechend der Interpretation der WT-Werte nach den Blanken und Hoff [19] auch in den Mutanten überwiegend auf **einem** der beiden Chl-Moleküle lokalisiert. Der geringe Einfluß der Mutation auf den Triplettzustand wird bestätigt durch das T–S-Spektrum im Bereich von 700-850 nm. Bei diesen Wellenlängen trägt nur die Absorption des Tripletts zum Spektrum bei. Die mutierten PSI-Komplexe unterscheiden sich hier nicht vom WT (nicht gezeigt).
Beim Vergleich der in PsaA und PsaB mutierten Komplexe fällt auf, daß die Substitutionen mit Gln kaum Einfluß auf das T–S-Spektrum haben unabhängig von der mutierten Proteinuntereinheit. Die aus den Mutanten HS(A676) und HS(B656) isolierten PSI-Komplexe unterscheiden sich allerdings sehr deutlich in der Region zwischen 650–680 nm. Nur die Substitution in PsaB zeigt hier Veränderungen zum WT-PSI. Die funktionelle Gruppe der Aminosäureseitenkette scheint dabei wenig Einfluß auf das veränderte Spektrum zu haben, da sowohl die Intensität als auch die Lage der in den mutierten PSI-Komplexen auftretenden Struktur nahezu identisch ist. Es wird daher vermutet, daß auch Substitutionen mit Gly, Asn und Cys in PsaA T–S-Spektren ergeben, die wie das von HS(A676) kaum vom WT abweichen. /medskip
Um diese Resultate zu interpretieren, werden zunächst die verschiedenen Beiträge zum T–S-Spektrum für PSI-Präparationen aus höheren Pflanzen diskutiert:

- Im Triplettzustand geht die excitonische Kopplung zwischen den Chl-Molekülen P_A und P_B verloren. Die beiden zugehörigen Absorptionsbanden bleichen aus. Es ist jedoch nur die Lage der niederenergetischen Komponente bekannt, die als Haupt-

ausbleichung im Spektrum bei 695 nm auftritt und über den Hauptanteil der Oszillatorstärke im Q_y-Bereich verfügt [190]. Die Position der höherenergetischen Komponente ist bislang umstritten [208]. Unter Einbeziehung der Chl *a*-Abstände aus der PSI-Kristallstruktur von *S. elongatus* und der Daten über die Orientierung der Chl-Moleküle im P700, die aus magnetischen Resonanz-Experimenten gewonnen wurden [184, 109], liegt diese Bande nach Berechnung der excitonischen Kopplungen bei etwa 680 nm (einfache Excitontheorie [36]).

- Neben dem Chl *a*-Molekül im Triplettzustand absorbiert das zweite, nun nicht mehr gekoppelte Chl *a* des primären Donators entsprechend dem Singulettzustand. Es wird in erster Näherung angenommen, daß die Oszillatorstärke dieser Absorption der Hälfte des $Q_y(S_0 \leftarrow S_1)$-Überganges von P700 beträgt [180]. Die Auswertung von ADMR-Messungen mit linear-dichroistischem Licht ordnet die Strukturen bei 692 nm oder 682 nm der Absorption des monomeren Chl *a* zu. Die Absorption des ^{3}Chl *a* ist in diesem Bereich sehr gering und strukturlos [39, 208].

- Die excitonischen Wechselwirkungen, die zwischen P700 im Singulettzustand und den anderen Pigmenten in der näheren Umgebung besteht, fällt beim Übergang in das ^{3}P700-Triplett weg. Die Absorptionsbanden dieser Chl-Moleküle verschieben sich dadurch. Der Unterschied in den spektralen Parametern wird im T–S-Spektrum sichtbar. Die in der Region zwischen 650 nm und 680 nm auftretenden Merkmale werden den Wechselwirkungen mit benachbarten Chlorophyllen zugeordnet [208, 39]. Da der Triplettzustand nur auf einem Chl *a* von P700 lokalisiert ist, werden vermutlich die Pigmente, die sich näher an diesem Molekül befinden, eine größere Veränderung in den optischen Merkmalen aufweisen als die Chlorophylle, die in der Umgebung des Chl-Moleküls zu finden sind, das im Singulettzustand verbleibt und mit dem sie weiterhin excitonisch gekoppelt sind. Die letztgenannten Pigmente werden somit nur einen kleinen Beitrag zum T–S-Spektrum liefern.

Im T–S-Spektrum von PSI-Komplexen aus WT-Zellen der Grünalge finden sich die Merkmale des Spektrums, die für PSI-Präparationen aus Spinat zugeordnet wurden, mit einigen Abweichungen wieder: Die Hauptausbleichung ist in *C. reinhardtii* um 5 nm blauverschoben, und die sehr schmale positive Absorptionszunahme, die bei hochaufgelösten

Differenzspektren im PSI der Pflanze gefunden wurde [39], ist nicht vorhanden.

Im mutierten PSI fallen zwei wesentliche Veränderungen gegenüber dem WT auf:

1. Die Hauptausbleichung, die mit dem Wegfall der excitonischen Kopplung erklärt wurde, ist kürzerwellig und die Linienbreite schmaler. Die Position der Bande korrespondiert in erster Näherung mit der Stärke der excitonischen Wechselwirkung. Eine schwächere Kopplung der beiden Moleküle sollte zu einer geringeren Aufspaltung und somit zu einer Blauverschiebung der niederenergetischen Absorptionsbande führen (analog zu der oben angegebenen Berechnung der excitonischen Aufspaltung). Der Austausch der beiden Histidine hat daher einen zwar geringen, aber direkten Einfluß auf die Stärke der exitonischen Wechselwirkung zwischen P_A und P_B. Ein axialer Ligand kann durch minimale Veränderungen in Positionierung oder Geometrie (Bindungswinkel) des koordinierten Moleküls solche Effekte hervorrufen. Prognosen oder gar Berechnungen sind aufgrund der fehlenden strukturellen Informationen, die in Auflösung bis etwa 2 Å vorhanden sein müßten, nicht möglich.

2. Änderungen im Bereich zwischen 650–680 nm werden nur bei Substitution von His(B656) beobachtet. Einflüsse auf diesen Teil des T–S-Spektrum sind zu erwarten, wenn der Austausch der Aminosäureseitenkette die excitonische Wechselwirkung des Chl-Moleküls, das in den Triplettzustand wechselt, und den benachbarten Pigmenten, wie z. B. eines der *accessory*-Chl (Acc), modifiziert.

In T–S-Spektren von bRC aus *Rb. sphaeroides* sind die Verschiebungen der Absorptionsbanden der *accessory*-BChl als S-förmiger Kurvenverlauf um 800 nm zu erkennen [209]. In den Heterodimer-Mutanten HL(M202) und HL(L173) sind diese Kurven gegenüber dem WT verschoben. Aus den Absorptionsspektren dieser Mutanten wird deutlich, daß die optischen Eigenschaften der *accessory*-BChl durch den Triplettzustand auf P865 beeinflußt werden [209].[8]

Im PSI ist bei Mutationen in PsaB ein vergleichbarer Effekt zu beobachten. Analog zu den

[8] Die Absorptionsbanden wurden im bRC den einzelnen Kofaktoren zugeordnet, da die Absorptionsmaxima der Pigmente sehr unterschiedlich sind, und pro Reaktionszentrum lediglich vier BChl *a*- und zwei BPheo *a*-Moleküle gebunden werden. Im PSI-Absorptionsspektrum überlagern sich etwa 100 Chlorophylle pro Reaktionszentrum mit sehr ähnlichen spektralen Eigenschaften, die nicht einzeln aufzulösen sind.

Heterodimermutanten der bRC ist daher zu vermuten, daß dieser Aminosäureaustausch im PSI sich auf die excitonische Kopplung zwischen P700 und den Acc im Singulettgrundzustand auswirkt. Die Substitution von His(A676) durch Ser in der Untereinheit PsaA hingegen zeigt keine sigifikanten Veränderungen in diesem Teil des Spektrums. Nur beim Aminosäureaustausch in der Umgebung von P_B, das durch PsaB koordiniert wird, ist der Einfluß auf die excitonische Kopplung zwischen benachbarten Pigmenten und P700 sichtbar. Das Triplettexciton muß folglich auf P_B lokalisiert sein.
Es wird dadurch nicht ausgeschlossen, daß auch die Substitutionen am P_A die Wechselwirkung mit den benachbarten Pigmenten verändert. Dieses Molekül bleibt jedoch beim Übergang von P700$\longrightarrow{}^3$P700 im Singulettzustand. Die Kopplung zu den umgebenden Chl-Molekülen ändert sich damit nicht und tritt im T–S-Spektrum nicht auf.
Die Effekte der Substitutionen, die in den T–S-Spektren beobachtet werden, unterstreichen, daß der Austausch von His(A676) oder His(B656) die excitonische Kopplung zwischen P_A und P_B im Singulettgrundzustand gering beeinflußt. Die Wechselwirkung mit den umgebenden Pigmenten wird in bezug auf die optischen Eigenschaften nur durch Substitutionen am His(B656) nachweislich gestört.
Der Triplettzustand wird durch die Mutationen innerhalb des Fehlers nicht beeinflußt. Daraus wird der Schluß gezogen, daß keine grundlegenden Änderungen in der Anordnung der Pigmente und des Proteingerüstes in den mutierten PSI-Komplexen eingetreten sind. Sowohl die optischen Veränderungen als auch die Nullfeldparameter geben keine Hinweise auf den Einbau eines Phäophytins in die mutierten PSI-Komplexe. Die untersuchten Aminosäuresubstitutionen induzieren somit nicht das Herauslösen eines der beiden Mg-Atome aus dem P700.

5.3.3 Absorptionsdifferenzspektroskopie bei 77 K

Die Absorptionsdifferenzspektren der mutierten PSI-Komplexe und des WT sind in Abb. 5.8 für die Substitutionen am His(A676) und in Abb. 5.9 für den Austausch von His(B656) im Bereich zwischen 600 nm und 730 nm dargestellt. Die Merkmale des $P700^{+\bullet}$/P700-Differenzspektrums sind im WT die Hauptausbleichung bei 698 nm sowie eine deutliche Absorptionszunahme bei 687 nm. Weitere geringere Absorptionsänderungen traten bei

678 nm (–), 672 nm (+) und 666 nm (–) auf, wie bereits in 4.2.1 für das Spektrum bei 5 K gezeigt wurde.

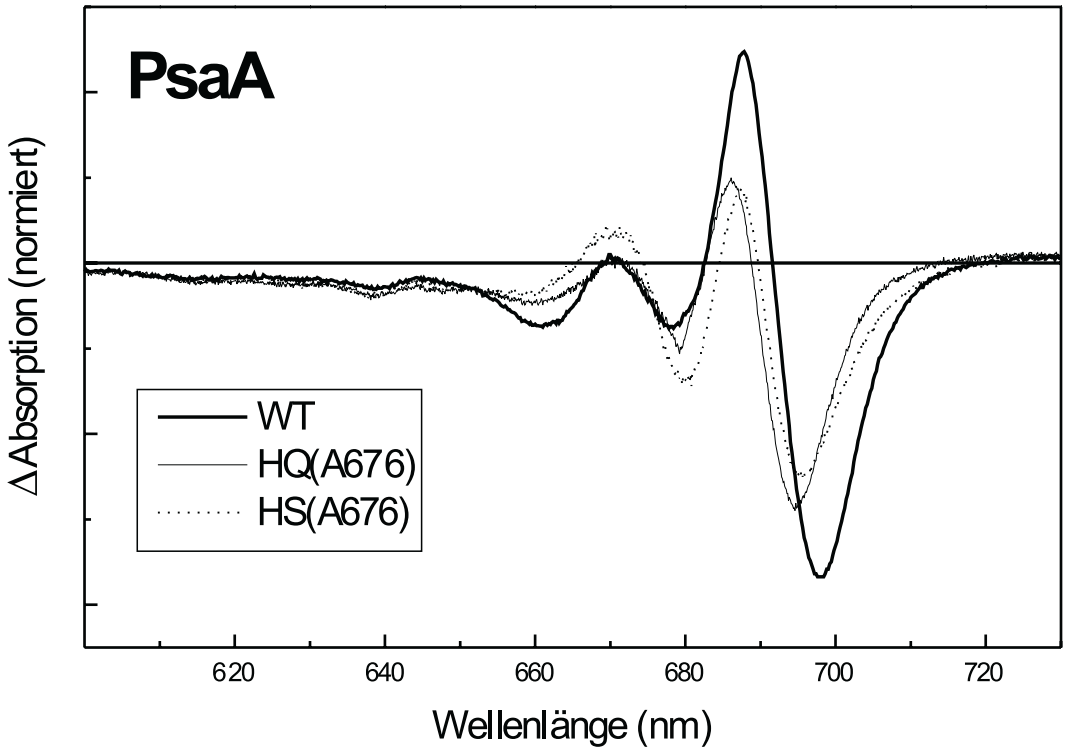

Abbildung 5.8: Absorptionsdifferenzspektren bei 77 K der am His(A676) substituierten PSI-Komplexe.

Alle mutierten PSI-Komplexe verschieben das Minimum der Hauptausbleichung um circa 2 nm zu kürzeren Wellenlängen. Die Halbwertsbreite dieser Bande war ebenfalls in allen Fällen geringer als im WT. Im Bereich zwischen 650 und 680 nm sind in den Spektren von PSI-Komplexen, die in PsaA mutiert wurden, keine Veränderungen in den Positionen der lokalen Minima und Maxima festzustellen. Es ändern sich lediglich die Intensitäten. Die Spektren der PSI-Komplexe, die in PsaB mutiert wurden, zeigten zusätzlich zu den Blauverschiebungen deutliche Veränderungen in den Absorptionsbanden zwischen 650 nm und 680 nm. Unabhängig von der eingeführten Aminosäure waren die Ausprägungen dieses Effektes bei allen Mutationen in PsaB nahezu identisch. Lediglich das Spektrum von HQ(B656) unterschied sich von denen der anderen Mutationen. Es wies mehr Übereinstimmungen mit dem des WT auf.

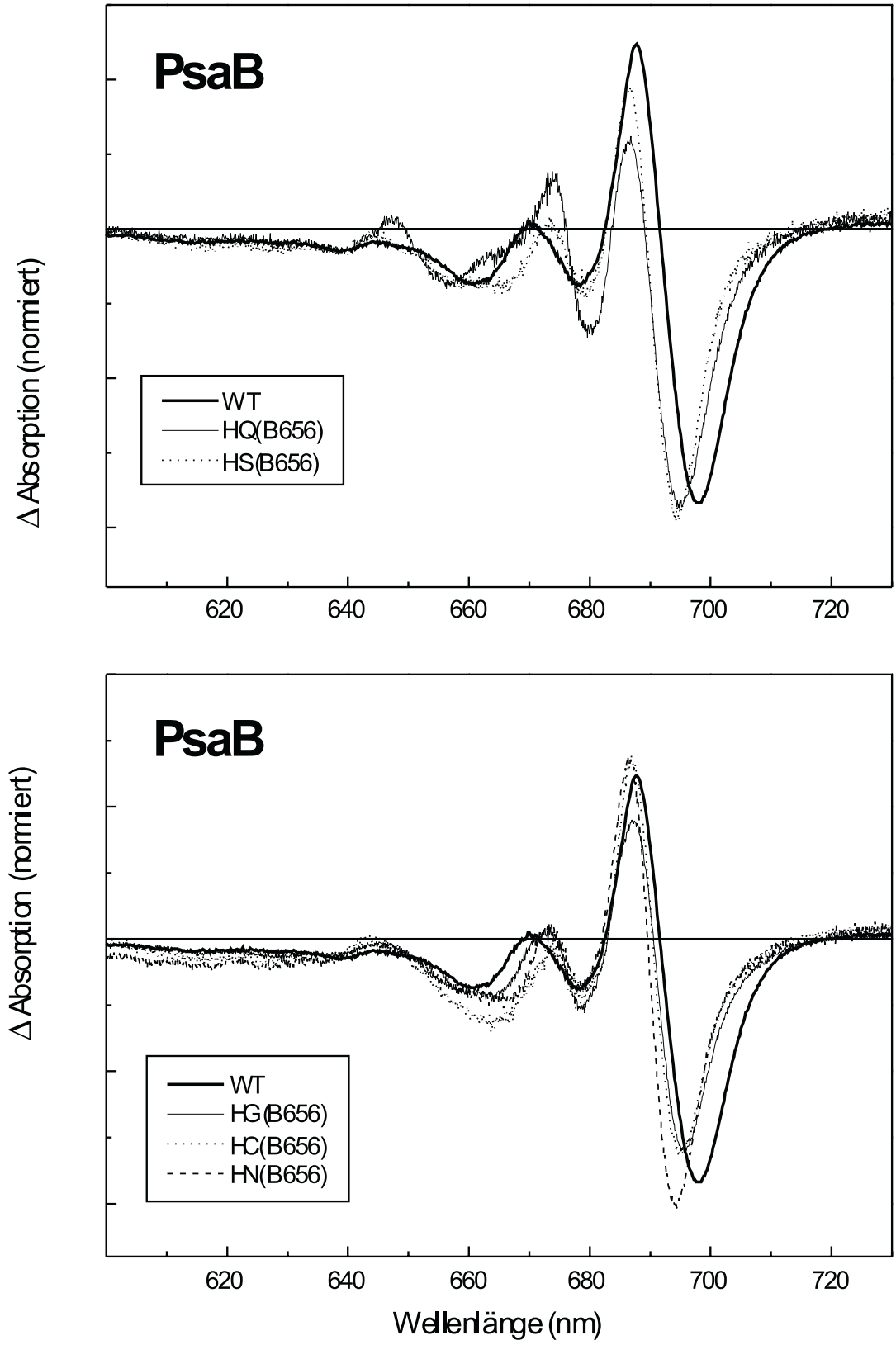

Abbildung 5.9: Absorptionsdifferenzspektren der am His(B656) substituierten PSI-Komplexe.

Diskussion

Die Verschiebungen in den Absorptionsdifferenzspektren von $P700^{+\bullet}$/P700 bei 77 K lassen sich analog zu den oben gezeigten T–S-Spektren interpretieren. Alle mutierten PSI-Komplexe zeigen eine Verschiebung der Hauptausbleichung zu kürzeren Wellenlängen und eine geringere Linienbreite dieser Bande. Bei Substitutionen in PsaB traten zusätzlich Änderungen im Bereich zwischen 650–680 nm auf (Abb. 5.9).
Das $P700^{+\bullet}$/P700-Differenzspektrum von PSI aus Pflanzen, Blau- oder Grünalgen wurde von Schaffernicht und Junge vergleichbar zum oben beschriebenen T–S-Spektrum interpretiert [181]. Über die bereits dort aufgeführten Charakteristika hinaus induziert die positive Ladung von $P700^{+\bullet}$ einen elektrochromen Effekt, der die Absorptionsbanden der umliegenden Pigmente verschiebt. Die größte Veränderung dieser Art tritt als positive Bande bei etwa 690 nm auf.

Auch in diesem Differenzspektrum werden die Merkmale zwischen 650-680 nm den Wechselwirkungen mit umgebenden Chlorophyllen zugeschrieben [181]. In gleicher Weise wie es bereits im T–S-Spektrum beobachtet wurde, zeigen von den untersuchten mutierten PSI-Komplexen nur die Substitutionen in PsaB in dieser Region Unterschiede zum WT. Innerhalb des Fehlers sind die Spektren der in PsaB mutierten PSI-Komplexe mit Ausnahme von HQ(B656) unabhängig von der substituierenden Aminosäure identisch. Der starke elektrochrome Effekt mag die Ursache dafür sein, daß die spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Aminosäureseitenketten, die im T–S-Spektrum zu erkennen waren, nicht mehr hervortreten.
Schaffernicht und Junge führen die Abweichungen zwischen PSI-Präparationen aus unterschiedlichen Spezies ebenfalls überwiegend auf Änderungen bei den Elektrochromien zurück, da das elektrische Feld bereits durch kleinste Unterschiede in der Umgebung der Pigmente andere Ausprägungen erfährt [181].

Die durch den Austausch der Aminosäure induzierten Änderungen im $P700^{+\bullet}$/P700-Differenzspektrum entsprechen somit phänomenologisch den im T–S-Spektrum auftretenden Effekten. Die Auswirkungen der Mutationen auf das $P700^{+\bullet}$/P700-Spektrum werden folglich auf gleiche Weise interpretiert:
Die Blauverschiebung der Hauptausbleichung belegt, daß die excitonische Kopplung von

P_A und P_B durch den Aminosäureaustausch beeinflußt wird. Die geringe Verschiebung der Bande bestätigt zudem – vergleichbar zum T–S-Spektrum –, daß die Position und die Orientierung dieser beiden Moleküle zueinander in den mutierten PSI-Komplexen gegenüber dem WT kaum verändert sein kann.
Die Verschiebung der Banden, die den Kopplungen mit anderen Pigmenten zugeordnet wurden, beschränken sich wiederum nur auf die in PsaB mutierten PSI-Komplexe. Auch hier ist der Effekt so zu erklären, daß das ungepaarte Elektron (die positive Ladung) im $P700^{+\bullet}$ auf P_B lokalisiert ist.

5.3.4 $P700^{+\bullet}$/P700-Absorptionsdifferenzspektroskopie bei Raumtemperatur

Die blitzlichtinduzierten transienten Absorptionsänderungen, die die Photooxidation von P700 anzeigen, wurden im Q_y-Bereich zwischen 570 nm und 730 nm aufgenommen. In den Abb. 5.10 und 5.11 sind die Absorptionsdifferenzspektren des WT und der mutierten PSI-Komplexe bei Raumtemperatur dargestellt. Die Spektren wurden auf die gleiche ausgebleichte Fläche zwischen 650 nm und 720 nm normiert, da angenommen wurde, daß sich die Oszillatorstärke von P700 in erster Näherung nicht wesentlich ändert.
Bestätigt wurde diese These durch die Bestimmung der Differenzen-Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon_{696}$ nach Hiayama und Ke [93, 94] für die mutierten PSI-Komplexe: HN(B656), HQ(B656) und HQ(B656). In diesen Mutanten betrug $\Delta\epsilon_{696}$ 90–100 $mM^{-1}cm^{-1}$. Der WT-Wert liegt bei 115 $mM^{-1}cm^{-1}$ [72].
Eine innerhalb des Fehlers identische Abnahme von $\Delta\epsilon_{696}$ ergab sich, wenn die Differenzspektren dieser mutierten PSI-Komplexe flächennormiert wurden. Auf die Bestimmung von $\Delta\epsilon_{696}$ für die übrigen Mutationen wurde aufgrund der guten Übereinstimmung mit der Flächennormierung der Spektren verzichtet.
Beim Vergleich des WT-Spektrums mit mutiertem PSI fällt der Blick zunächst auf die Hauptausbleichung um 696 nm. Eine Verschiebung des Minimums wird nicht beobachtet. Die Intensität der Bande ist jedoch für HQ(A676) um 10 % und in allen übrigen Mutationen um etwa 20 % geringer.
Der Verlust an Oszillatorstärke im Bereich der P700-Absorption wird durch weitere Aus-

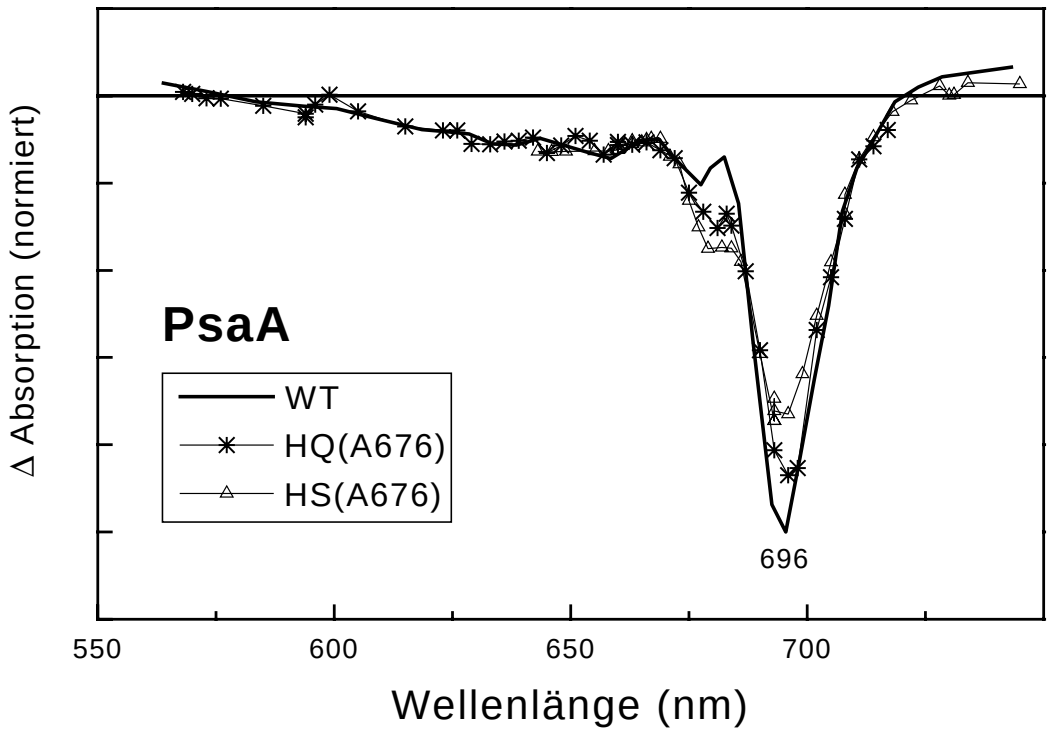

Abbildung 5.10: Blitzlichtinduzierte Differenzspektren der in PsaA mutierten PSI-Komplexe bei Raumtemperatur. Die maximale Absorptionsänderung bei festgelegter Wellenlänge wurde durch eine Fitroutine ermittelt. Jeder Meßpunkt stellt einen Mittelwert von 20–100 Transienten dar.

bleichungsbanden ausgeglichen, die im WT in dieser Form nicht auftreten. Wiederum unterscheiden sich die Auswirkungen der Mutationen in bezug auf die modifizierte Proteinuntereinheit: In HQ(A676) und HS(A676), die in PsaA substituiert wurden, tritt eine zusätzliche Ausbleichung um 680 nm auf, die für die Substitution mit Ser etwas ausgeprägter ist. Mutationen in PsaB weisen für HQ(B656) eine breite Absorptionsabnahme zwischen 650–680 nm gegenüber dem WT auf, während die anderen Substitutionen in PsaB eine sehr dominante Bande ähnlicher Form und Ausprägung um 665 nm zeigen. Die Oszillatorstärke dieser zusätzlichen Bande beträgt für die in PsaB modifizierten PSI-Komplexe mehr als ein Drittel der Hauptausbleichung bei 696 nm. Die Intensität der Bande ist für HS(B656), HG(B656) und HC(B656) nahezu identisch. HN(B656) weist in dieser Reihe die stärkste Zunahme auf.

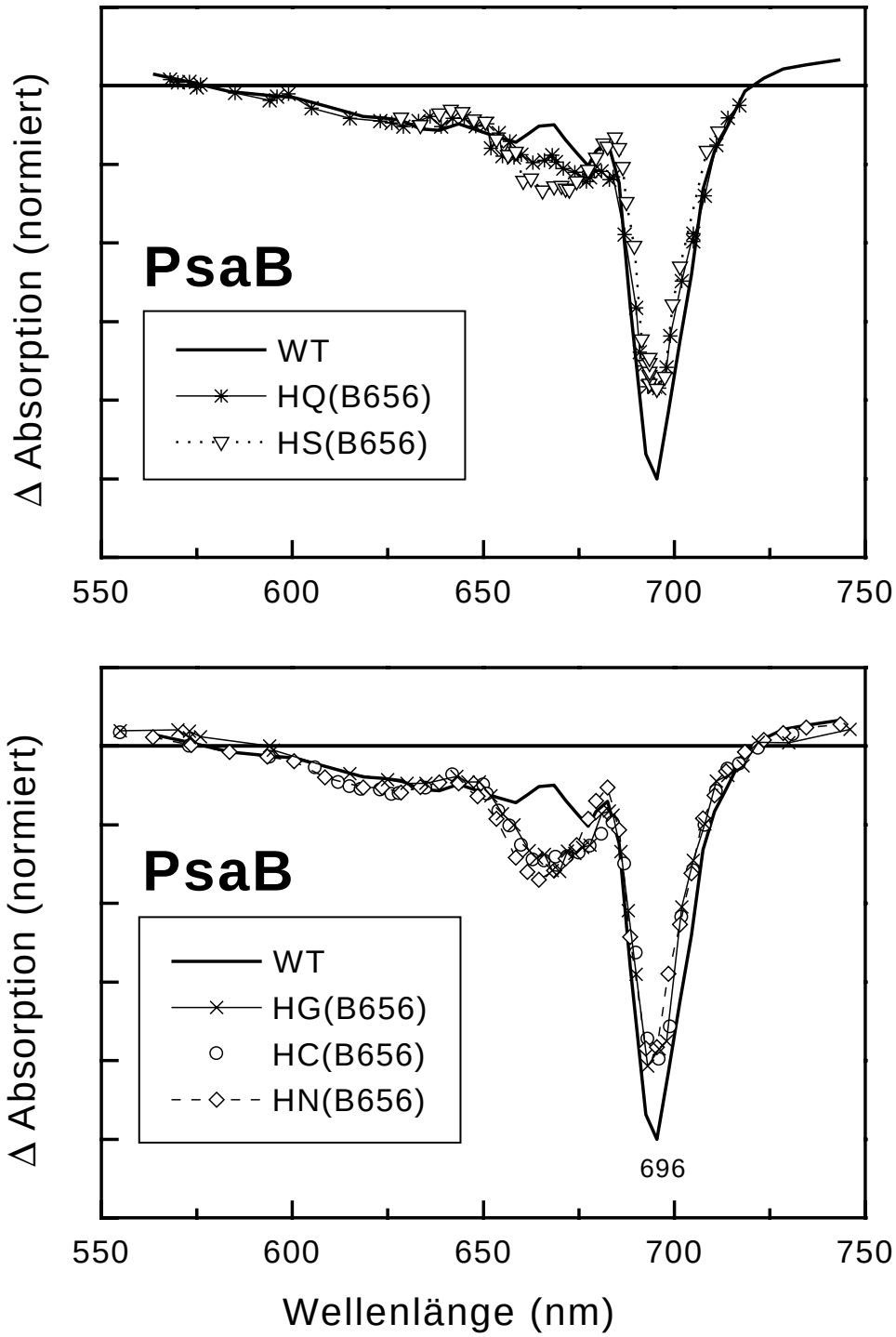

Abbildung 5.11: Blitzlichtinduzierte Differenzspektren der in PsaB mutierten PSI-Komplexe bei Raumtemperatur. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 5.10.

Diskussion

Die Absorptionsdifferenzspektren bei Raumtemperatur wiesen ebenfalls in bezug auf die mutierte Proteinuntereinheit unterschiedliche Effekte auf. Die Interpretation der $P700^{+\bullet}$/-P700-Tieftemperaturspektren ist jedoch nicht in vollem Umfang auf das Raumtemperaturspektrum übertragbar. Die Spektren, die bei 77 K aufgenommen wurden, zeichnen sich im wesentlichen durch

Bandenverschiebungen[9] aus. Bei Raumtemperatur existieren in den mutierten PSI-Komplexen hingegen zusätzliche Ausbleichungsbanden, die die Oszillatorstärke der Hauptausbleichung bei 696 nm verringern. Die Annahme, daß es sich um Veränderungen in den Wechselwirkungen mit benachbarten Chlorophyllen handelt, die bei der Diskussion der $P700^{+\bullet}$/P700-Tieftemperatur- bzw. der T–S-Spektren im Vordergrund standen, ist aufgrund der Größe des Effektes nicht plausibel. Im Gegenteil, bei höheren Temperaturen wird eher eine schwächere Ausprägung der Bandenverschiebung erwartet, da die Linienbreite der einzelnen Absorptionsbanden zunimmt und diese dadurch stärker überlagern. Die Veränderungen der mutierten PSI-Komplexe bei Raumtemperatur gegenüber dem WT stellen infolgedessen einen anderen Einfluß auf P700 dar.

Webber *et al.* haben vorgeschlagen, daß diese neue Bande die höherenergetische Excitonkomponente der beiden dipolar gekoppelten Chl sei, die aufgrund der Mutation eine größere Oszillatorstärke besitzt [215]. Aufgrund der Lage und der Intensität der Bande ist mit Hilfe der einfachen Excitontheorie die Orientierung der beiden Chl-Moleküle zueinander im P700 ableitbar. In erster Näherung ergibt sich die Intensität der beiden excitonisch gekoppelten Absorptionsbanden aus dem Winkel θ zwischen den Übergangsdipolmomenten der beiden Pigmente und der Dipolstärke eines Monomers [36]:

- Absorptionsbande(1)$\equiv D_m(1 + cos\theta)$
- Absorptionsbande(2)$\equiv D_m(1 - cos\theta)$

Im WT wird die Oszillatorstärke der höherenergetischen Excitonbande auf weniger als 10 % der Intensität der Hauptausbleichung geschätzt [190]. Daraus ergibt sich im WT

[9] Der Begriff Verschiebung wird nur zur vereinfachten Beschreibung verwendet. Die beobachteten Veränderungen stellen die Überlagerung mehrerer Absorptionskurven mit unterschiedlichen Vorzeichen dar. Der Eindruck der Verschiebung darf daher nicht damit gleichgesetzt werden, daß sich nur eine Position einer Absorptionsbande ändert.

ein Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der beiden Chlorophylle von $\leq 35°$.[10] Würde die zusätzliche Bande bei 665 nm in den mutierten PSI-Komplexen auf die höherenergetische Excitonkomponente zurückgehen, ergäbe sich aus dem Intensitätsverhältnis von 1:3 ein Winkel von 60° zwischen den Übergangsdipolmomenten.
Nach dieser Interpretation führt die Mutation zu einer erheblichen Veränderung in der Orientierung der beiden Chlorophylle zueinander. Es ist allerdings schwer nachvollziehbar, daß der Austausch eines axialen Liganden die Drehung des koordinierten Moleküls senkrecht zur Bindungsachse bewirken soll. Darüber hinaus wird die Bindungstasche der beiden Chlorophylle vermutlich eine solche Flexibilität dieser Kofaktoren kaum zulassen, da die Reste am Porphyrinring, insbesondere der Phytylschwanz, ebenfalls neu positioniert würden. Unvereinbar mit dieser Interpretation ist jedoch das Ergebnis der Tieftemperaturmessung: Die deutliche Intensitätsverschiebung einer excitonischen Kopplung müßte auch in diesem Spektrum in Erscheinung treten, da die excitonische Aufspaltung in erster Näherung keine Temperaturabhängigkeit zeigt. Die bei Raumtemperatur deutlich ausgeprägte Struktur ist jedoch in gefrorener Lösung – wie oben gezeigt wurde (5.3.3) – nicht vorhanden.

Eine plausible Erklärung für das Auftreten der zusätzlichen Ausbleichung in den mutierten PSI-Komplexen liegt bislang nicht vor. Eine notwendige Voraussetzung, um weitere Hinweise für die Ursache der Veränderung in den optischen Eigenschaften von P700 zu erhalten, wäre die vollständige Dekonvolution des WT-Differenzspektrums. Aufgrund der Anzahl der am Spektrum beteiligten Komponenten ist die Zahl der freien Parameter jedoch zu groß, um zu einer eindeutigen Lösung gelangen zu können. Die temperaturabhängige Messung des Differenzspektrums könnte möglicherweise zum besseren Verständnis der in den mutierten PSI-Komplexen stattfindenden Prozesse beitragen.

Ob die positive Ladung bei Raumtemperatur vorwiegend auf P_A oder P_B lokalisiert ist, ergab sich aus den Messungen nicht. Die ausgeprägteren Effekte für die Mutationen in PsaB und die Unterschiede zu den Mutationen in PsaA deuten allerdings darauf hin, daß auch bei Raumtemperatur P_B einen größeren Anteil am $P700^{+\bullet}P700$/-Absorptionsspek-

[10] Die Position der höherenergetischen Excitonbande ist bisher im Spektrum nicht eindeutig zugeordnet worden. Es tritt jedoch keine Absorptionsbande auf, die mehr als 10 % der Intensität der Hauptausbleichung besitzt.

trum hat.

5.3.5 Paramagnetische Resonanzmessungen am $P700^{+\bullet}$

Das $P700^{+\bullet}$-Kationradikal in den mutierten PSI-Komplexen wurde durch EPR/ENDOR-Messungen charakterisiert.

Die Verteilung des ungepaarten Elektrons im $P700^{+\bullet}$ hängt vom Aufbau des Moleküls, dessen Konformation und von seiner unmittelbaren Umgebung ab. Die hfc, die aus dem EPR- oder – bei komplizierteren Molekülen – aus dem ENDOR-Experiment gewonnen werden, sind die Parameter, die Informationen über die Verteilung des Spins im Molekül, die Konformation des Moleküls, die Art der Liganden und den Einfluß der chemischen Umgebung enthalten. Der elektronische g-Faktor ist hingegen eine integrale Eigenschaft des Systems und wird daher hier nicht weiter diskutiert.

Der Austausch einer Aminosäureseitenkette in direkter Nachbarschaft zum P700 verändert die chemischen Eigenschaften oder auch die Konformation der beiden Chl-Moleküle, insbesondere, wenn es sich um einen Liganden zu einem der Pigmente handelt. Die im EPR/ENDOR-Experiment zugänglichen hfc von $P700^{+\bullet}$ sollten dann auf die modifizierte Bindungstasche in den mutierten PSI-Komplexen reagieren.

Zur Interpretation der Ergebnisse werden hierzu Untersuchungen an (B)Chl herangezogen, die gezeigt haben, daß bereits geringe Veränderungen in den Bindungswinkeln der Seitengruppen des makrozyklischen Ringes, des Abstandes der beiden Chl-Moleküle voneinander oder der chemischen Eigenschaften eines Liganden Auswirkungen auf die Spinverteilung und folglich auf die experimentell zugänglichen hfc haben [182, 108, 112, 137]. Das ENDOR-Experiment gibt damit direkten Aufschluß darüber, ob als Folge der Aminosäuresubstitution molekulare Veränderungen im $P700^{+\bullet}$ aufgetreten sind.

EPR-Messungen

Alle PSI-Präparationen zeigen eine nicht aufgelöste gaußförmige Linie ohne Hyperfeinstruktur bei $g = 2,0026 \pm 0,0001$ (Abb. 5.12) übereinstimmend mit den publizierten Werten [166, 27]. Die Linienbreite ΔB_{pp} beträgt beim WT $\Delta B_{pp} = (0,76 \pm 0,01)$ mT. In den mutierten PSI-Komplexen ist ΔB_{pp} in den meisten Fällen größer als im WT-PSI,

wie in Tabelle 5.6 aufgeführt ist. Die Linienbreiten der mutierten PSI-Komplexe liegen jedoch deutlich unterhalb der Linienbreite von Chl *a* in gefrorener Lösung (CH_2Cl_2), die bei 10 K mit 1,00 mT bestimmt wurde [109].

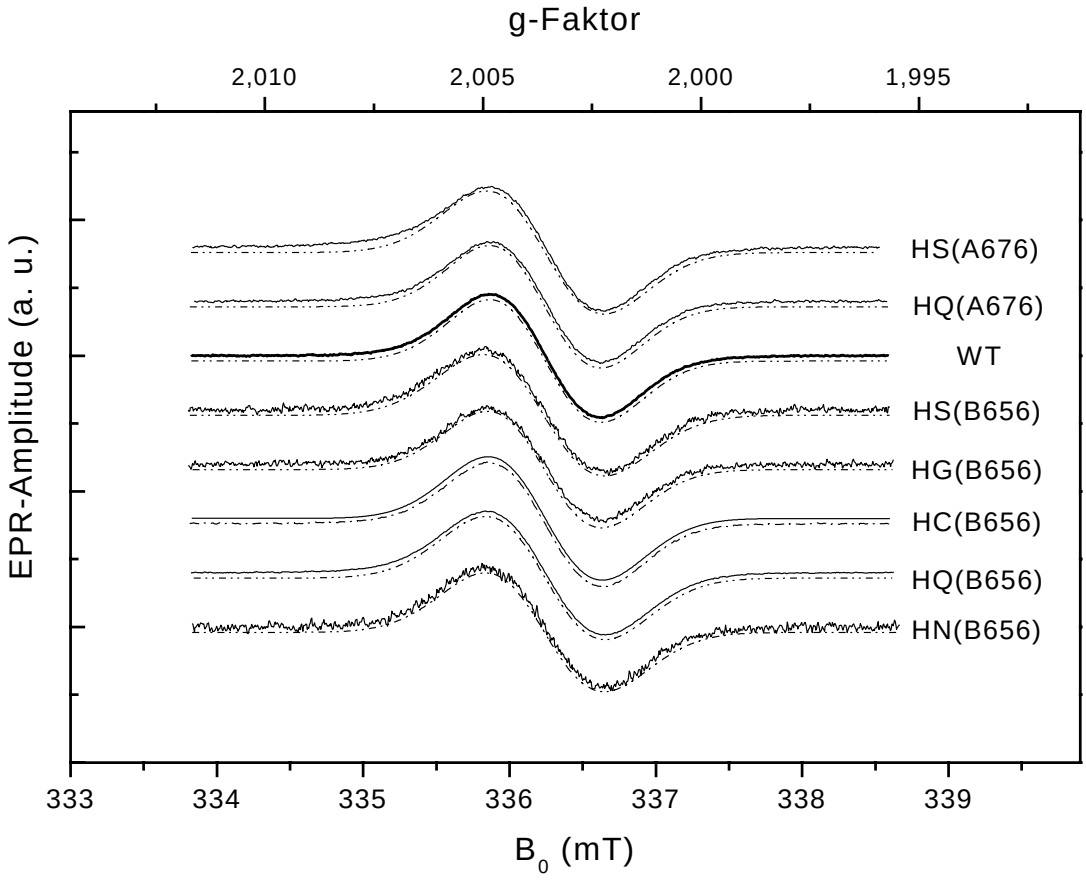

Abbildung 5.12: $P700^{+\bullet}$-EPR-Spektren vom WT-PSI und mutierten PSI-Komplexen. Die Intensitäten wurden normiert. Die gestrichelten Linien stellen einen gaußförmigen Kurvenverlauf dar.

	$P700^{+\bullet}$								**Chl $a^{+\bullet}$**
	WT	**PsaA**		**PsaB**					CH_2Cl_2/THF
	His	Gln	Ser	Gln	Ser	Asn	Gly	Cys	
$\mathbf{\Delta B_{pp}}$	0,76	0,76	0,80	0,82	0,83	0,81	0,78	0,78	1,00

Tabelle 5.6: Linienbreiten ΔB_{pp} in mT, bestimmt aus EPR-Messungen von $P700^{+\bullet}$ an aufgereinigten PSI-Komplexen (WT und Mutanten). Der Fehler beträgt $\pm 0,01$ mT, für HS(A676) $\pm 0,002$ mT. Der Wert für Chl *a* in CH_2Cl_2/THF ist [109] entnommen (in gefrorener Lösung bei 10 K).

Die Substitution HQ(A676) ändert die Linienbreite des EPR-Signals nicht. HC(B656) und HG(B656) zeigen mit $\Delta B_{pp} = 0,78$ mT nur geringe Veränderungen gegenüber dem WT (0,76 mT). HS(B656), HN(B656) und HQ(B656) beeinflussen am stärksten die Linienbreite mit Werten um 0,82 mT. ΔB_{pp} von HS(A676) lag mit 0,80 mT etwas unterhalb dieser Werte. Allerdings weicht das Spektrum bereits deutlich von einer Gaußkurve ab (gestrichelte Linie). Die Ursache für die unsymmetrische Linienform könnte auf Verunreinigungen von anderen Radikalspezies zurückzuführen sein, die aufgrund der geringeren Anreicherung des PSI-Komplexes in dieser Präparation stärker zur Geltung kommen.
Die Zunahme der Linienbreite von $P700^{+\bullet}$, die in fast allen mutierten PSI-Komplexen beobachtet wird, weist darauf hin, daß His(A676) und His(B656) sich in unmittelbarer Nähe zum spintragenden Molekül befinden müssen. Generell ist die Zunahme von ΔB_{pp} ein Hinweis auf eine geänderte Spindichteverteilung im Radikal. Die molekulare Ursache für diese Änderung ergibt sich allein aus der EPR-Messung nicht. Im Vergleich mit dem Chl *a*-Radikal ist festzustellen, daß der Aminosäureaustausch in der EPR einen kleinen Effekt induziert. Die Substitutionen mit den polaren Aminosäuren Ser und Asn heben sich klarer vom WT-PSI ab als der Austausch von His gegen Gly oder Cys.

ENDOR-Messungen

Die einzelnen hfc zwischen dem ungepaarten Elektron im $P700^{+\bullet}$-Radikalkation und den Protonen in dessen unmittelbarer Umgebung wurden im ^{1}H-ENDOR-Experiment aufgelöst. Die Messungen wurden für alle Proben bei 160 K unter identischen Meßbedingungen aufgenommen (siehe 2.6.2). Aufgrund der Untersuchungen von Käß [109] steht fest, daß die Spindichte überwiegend oder vollständig auf einem der beiden Chl-Moleküle lokalisiert. Dieses Pigment wird im weiteren als das spintragende Chl *a* bezeichnet.
In Abb. 5.13 sind die ENDOR-Spektren von $P700^{+\bullet}$ von PSI-Komplexen des WT und den Mutationen in PsaB dargestellt. Alle in PsaB modifizierten PSI-Komplexe zeigen Veränderungen der hfc, die auf die Methylgruppe an Position 12 des spintragenden Chl *a* zurückgehen (Linienpaare (6',6) und (7',7) in den Spektren). Im Falle von HQ(B656) betrug die Zunahme dieser hfc bezogen auf die isotrope Kopplung (A_{iso}) 8 %, für HC(A676) 11 %; in HS(B656) und HG(B656) nahm A_{iso} um 15 % und bei der Mutation HN(B656) um 20 % zu. Die hfc, die von den beiden anderen Methylgruppen an Position 2 und 7 des

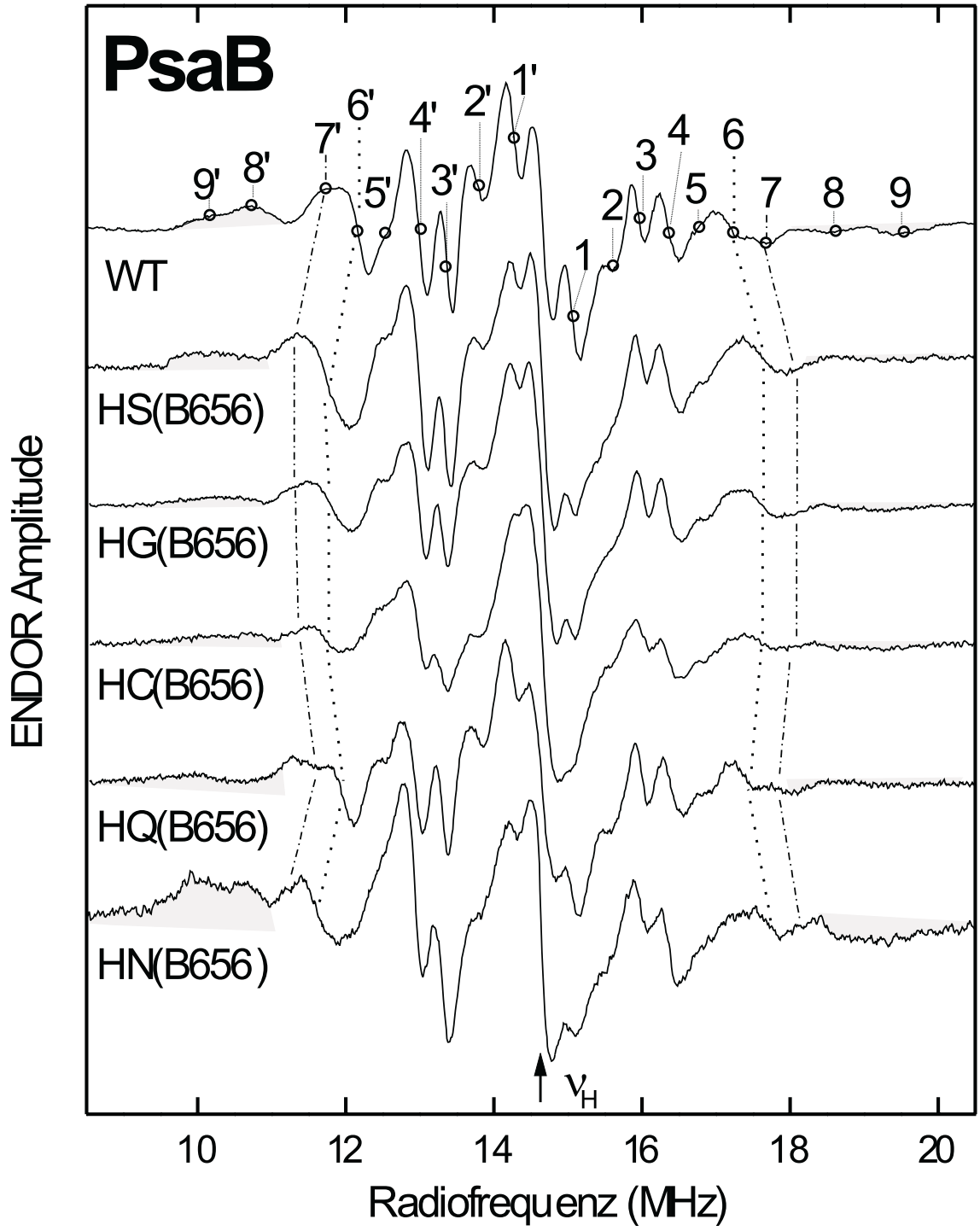

Abbildung 5.13: ^{1}H-ENDOR-Spektrum des P700$^{+\bullet}$-Radikalkations aus WT- und in PsaB mutiertem PSI. Die hoch- und tieffrequenten Linien, die zur $A_{\|}$-, (7',7) und $A_{\perp}$-Komponente, (6',6), des Tensors der Methylgruppe an Position C_{12} des spintragenden Chl-Moleküls gehören, sind im WT gekennzeichnet und zusätzlich durch Linien markiert. Die hfc der β-Protonen sind grau unterlegt. Die Werte für alle Methylkopplungen, die aus Simulationen bestimmt wurden, sind in Tabelle 5.7 aufgeführt.

spintragenden Pigmentes stammen, verändern sich nur geringfügig und liegen innerhalb des Fehlers von ±50 kHz [Linienpaare (3',3) bzw. (4',4) und (5',5)].

Die parallelen ($A_{\parallel}$) und senkrechten Komponenten ($A_{\perp}$) dieser drei Methyltensoren wurden für alle mutierten PSI-Komplexe analog zu Abb. 4.11 simuliert. Die Ergebnisse mit den daraus resultierenden isotropen Kopplungen (A_{iso}) sind für alle Aminosäuresubstitutionen in Tabelle 5.7 zusammengefaßt. Die hfc der β-Protonen zeigen ebenfalls Veränderungen, die jedoch aufgrund der sehr breiten Linien in den mutierten PSI-Komplexen quantitativ nicht gut auszuwerten sind. Qualitativ wird die Intensität der β-Protonen in den Mutanten HG(B656) und HC(B656) erheblich geringer. Als Ursache wird eine größere Linienbreite vermutet. Auch in HQ(B656) ist die Intensität in dem Bereich, in dem im WT die Linienpaare (8',8) und (9',9) auftreten, schwach. Allerdings weist das Spektrum dieser Mutation neben dem Linienpaar (7',7) eine Schulter auf, die den β-Protonen zugeordnet wird.

		$P700^{+\bullet}$								**[a] Chl $a^{+\bullet}$**
		WT	**PsaA**		**PsaB**					CH_2Cl_2/THF
hfc		His	Gln	Ser	Gln	Ser	Asn	Gly	Cys	
12[b]	$A_{\parallel}$	5,95	6,15	6,10	6,80	6,75	6,95	6,80	6,65	8,30
	$A_{\perp}$	5,00	4,90	5,00	5,25	5,75	6,00	5,60	5,65	7,15
	A_{iso}	5,32	5,32	5,32	5,76	6,10	6,30	6,07	5,90	7,55
7[b]	$A_{\parallel}$	4,30	4,32	4,30	4,50	4,30	4,55	4,32	4,20	3,90
	$A_{\perp}$	3,30	3,29	3,30	3,30	3,27	3,40	3,25	3,25	2,75
	A_{iso}	3,65	3,63	3,65	3,70	3,63	3,80	3,60	3,60	3,15
2[b]	$A_{\parallel}$	3,70	3,75	3,70	3,75	3,60	3,90	3,90	3,60	3,90
	$A_{\perp}$	2,55	2,55	2,60	2,65	2,65	2,70	2,65	2,65	2,95
	A_{iso}	2,93	2,95	2,90	3,00	3,00	3,00	3,07	3,00	3,15

Tabelle 5.7: Hyperfeinkopplungskonstanten (hfc) der Methylprotonen des $P700^{+\bullet}$-Kationradikals von PSI-Partikeln aus WT- und mutierten PSI-Komplexen. Alle Angaben in MHz; der Fehler beträgt $\pm 0,05$ MHz.
[a] Die Werte für Chl $a^{+\bullet}$ sind [109] entnommen. Die Messung wurde in CH_2Cl_2/THF in gefrorener Lösung bei 100 K durchgeführt, Fehler ±25 kHz.
[b] Molekülposition am Porphyrinring, an der sich die Methylgruppen befinden.

HS(B656) zeigt bei diesen Linien wenig Veränderungen gegenüber dem WT, abgesehen von der geringeren Auflösung. HN(B656) weist als einzige Aminosäuresubstitution eine Verstärkung der Signalintensität gegenüber dem WT auf.

Auffallend ist die Abnahme von Signalintensität im Bereich des Linienpaares (2',2), die mit einer Zunahme des Signals der Matrixlinie zu korrelieren scheint. In Abb. 5.14 wurde der Bereich mit den kleinen Kopplungen deshalb vergrößert dargestellt. HQ(B656) zeigt in diesem Frequenzbereich keine Veränderungen zum WT. Im ENDOR-Spektrum von HN(B656) und HC(B656) bricht die Intensität des Linienpaares (2',2) deutlich ein.

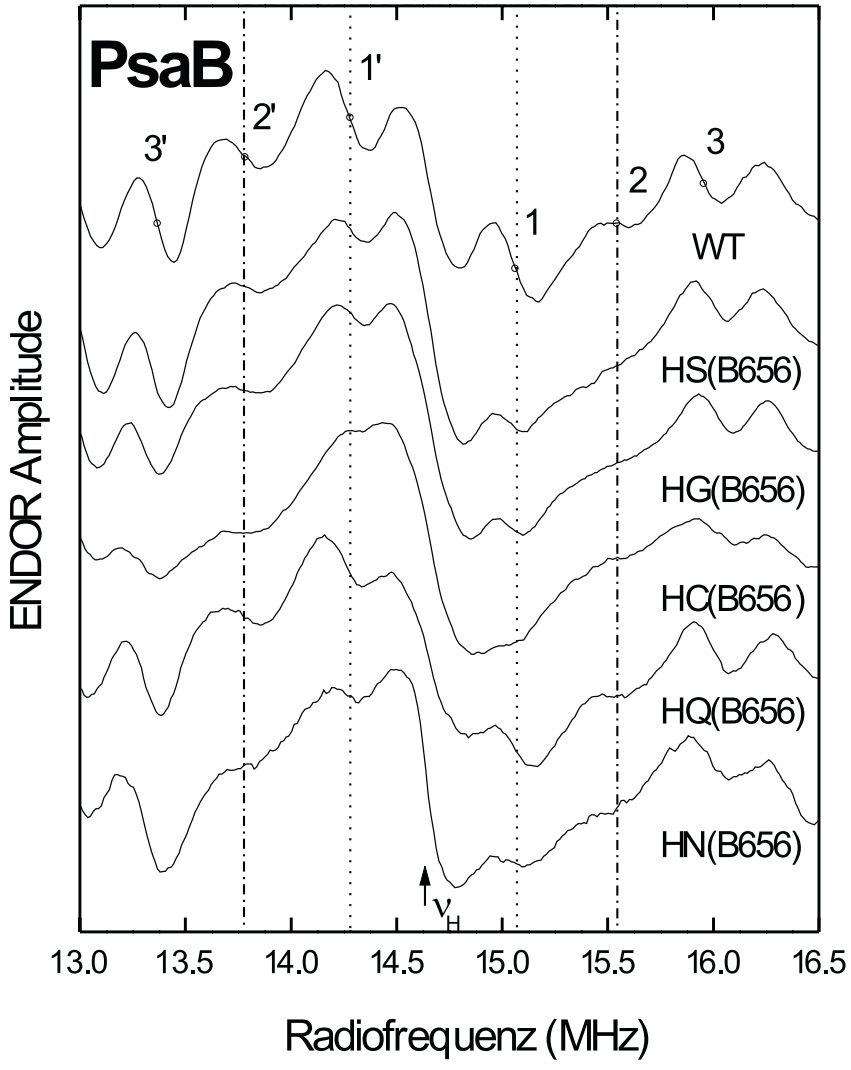

Abbildung 5.14: ^{1}H-ENDOR-Spektrum des P700$^{+\bullet}$-Radikalkations aus WT- und in PsaB mutiertem PSI; der Bereich der kleinen Kopplungen (< 3 MHz) ist vergrößert dargestellt. Die Positionen der Linienpaare (1',1) und (2',2) sind im WT-Spektrum markiert und durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet.

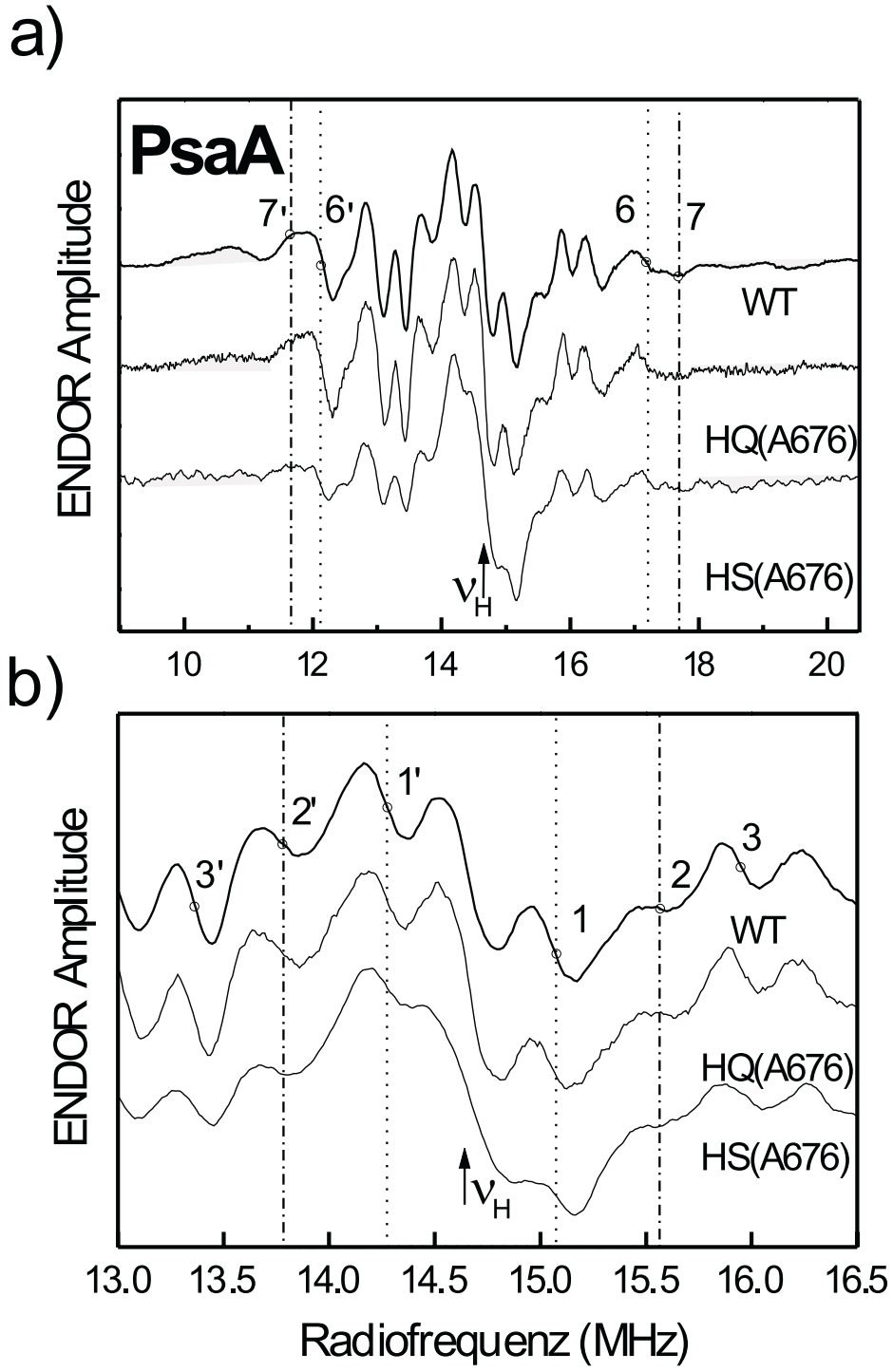

Abbildung 5.15: ^{1}H-ENDOR-Spektren des P700$^{+\bullet}$-Radikalkations vom WT- und in PsaA mutiertem PSI; a) gesamtes ENDOR-Spektrum; die $A_{\|}$- (gestrichelt-gepunktet) und die $A_{\perp}$-Komponente (gepunktet) der Methylgruppe an Position 12 sind im Spektrum des WT-PSI gekennzeichnet und die Position im WT markiert. Die grau unterlegten Bereiche entsprechen den hfc der β=Protonen (vgl. 4.2.4)
b) Bereich der kleinen Kopplungen (< 3 MHz). Die Positionen der Linienpaare (1',1) und (2',2) wird durch Hilfslinien angezeigt.

Die Position der Linie ändert sich dabei innerhalb des Fehlers nicht. Eine geringe Verschiebung ist bei dem Linienpaar (1',1) bei HC(B656) zu erkennen. Die Wendepunkte des Ableitungsspektrums scheinen etwas dichter an der Matrixlinie zu liegen. Nur bei HQ(B656) treten in diesem Bereich keine Abweichungen gegenüber dem WT auf.

Mutationen in PsaA weisen im ENDOR-Spektrum keine Veränderungen in den hfc der β-Protonen und der Methylgruppen im Vergleich zum WT auf (Abb. 5.15a). Auch bei den nicht zugeordneten kleinen hfc sind keine Verschiebungen der Linienpositionen zu beobachten (Abb. 5.15b).

Die ENDOR-Messungen der PSI-Präparationen aus den Mutanten belegen, daß nur Mutationen in PsaB zu Veränderungen in der Spinverteilung des $P700^{+\bullet}$-Radikals führen. Auch die Substitution mit Gln zeigt in PsaB einen Effekt, der in der Ausprägung zwar schwächer ist als bei den übrigen Substitutionen in dieser Proteinuntereinheit, aber klar außerhalb des Fehlers liegt. Die auffälligsten Effekte sind die Verschiebungen der hfc der Methylgruppe an Position 12 und die Abnahme der Signalintensität in der Mitte des Spektrums. Die Ausprägung des Effektes wird durch die verschiedenen Aminosäureseitenketten nur wenig beeinflußt. Allein HQ(B656) in PsaB hebt sich von den anderen Aminosäuresubstitutionen etwas ab: Die Zunahme der hfc an Position 12 ist in dieser Mutante erheblich geringer, und im Bereich der kleinen Kopplungen sind keine Veränderungen gegenüber dem WT-PSI festzustellen. Daneben treten Veränderungen in den Intensitäten der Kopplungen der β-Protonen auf, die abhängig von der eingeführten Seitenkette die ENDOR-Amplitude verstärken [HN(B656)] oder abschwächen [HC(B656), HG(B656)].

EPR-Spektroskopie am Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$

Das transiente $P700^{+\bullet}A_1{}^{-\bullet}$-EPR-Spektrum von HG(B656) zeigt innerhalb der Nachweisgrenzen, bis auf die weniger ausgeprägte Schulter auf der Tieffeldseite der Absorptionsbande, keine Unterschiede zum WT (Abb. 5.16).

Auch das Oszillationsmuster des *out-of-phase*-Echos im ESEEM-Experiment weist keine Veränderungen als Folge der Aminosäuresubstitution auf (Abb. 5.17). Die etwas unterschiedliche Dämpfung der Signale ist präparationsbedingt (Viskosität der Probe, Probenkonzentration etc.).

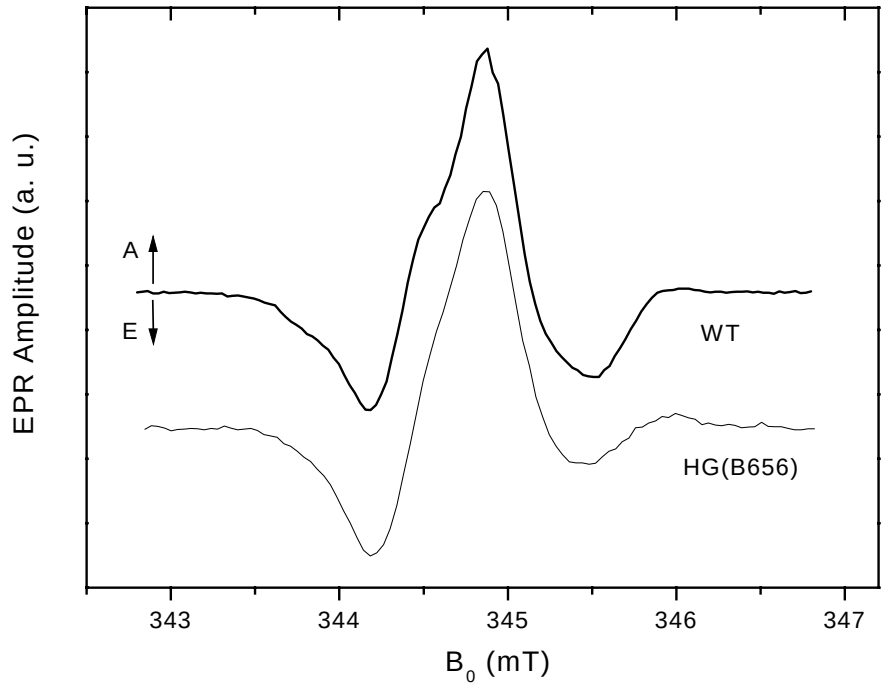

Abbildung 5.16: Transiente X-Band-EPR-Spektren von $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ an PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* WT und HG(B656).

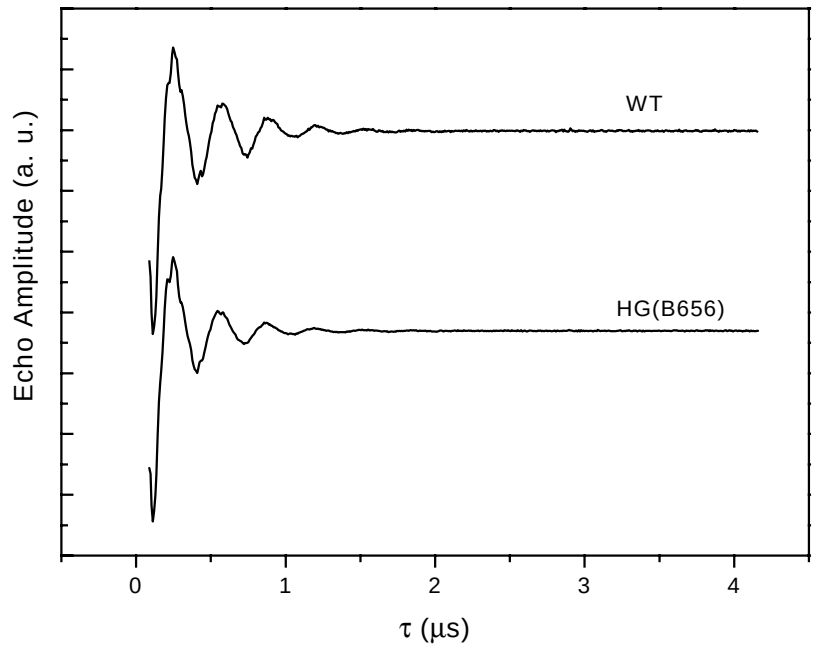

Abbildung 5.17: *out-of-phase*-Echo-Modulation als Funktion des Pulsabstandes τ des Radikalpaares $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ an PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* WT und HG(B656).

Die parallele Orientierung der g_x-Achse von $A_1^{-\bullet}$ zur dipolaren Verbindungsachse der beiden Radikalzentren, Z_D, die sich aus dem Emissions/Absorptions-Polarisationsmuster ergibt [198], ist somit im mutierten PSI-Komplex unverändert. Auch die Modulationsfrequenz, die aus dem ESEEM-Experiment bestimmt wurde, weicht in HG(B656) nicht von den Werten des WT-PSI ab (vgl. 4.2.4, sowie [17, 224, 225]). Folglich sind der Abstand mit $(25,4 \pm 0,3)$ Å und die relative Orientierung der beiden Radikale durch diese Mutation nicht beeinflußt worden.

Die Messung ist nur für HG(B656) gezeigt. Die übrigen Mutationen weisen ebenfalls innerhalb des Fehlers keine Abweichungen auf [226]. Veränderungen in der Orientierung und im Abstand von P700 und A_1 werden daher auch für diese modifizierten PSI-Komplexe ausgeschlossen.

Diskussion

Die Zunahme der Linienbreite ΔB_{pp}, die bei allen mutierten PSI-Komplexen mit Ausnahme von HQ(A676) im EPR-Spektrum beobachtet wird, ist ein Beleg dafür, daß sich die Spindichte im $P700^{+\bullet}$ ändert. Für den durch die Mutation ausgelösten Effekt gibt es zwei Erklärungen:

1. Die Mutation beeinflußt hfc in einem der beiden Chl-Moleküle.

2. Die Verteilung der Spindichte zwischen den beiden Chl verschiebt sich.

Der zweite Fall erfordert, daß die beiden Chl-Moleküle ein gemeinsames Molekülorbital besitzen und damit ein Supermolekül bilden. Die Zunahme von ΔB_{pp} entspricht dann einer größeren Asymmetrie in der Spinverteilung zwischen den beiden Chl-Molekülen, wenn angenommen wird, daß die im Vergleich zum Chl $a^{+\bullet}$ schmalere Linienbreite des EPR-Signals im $P700^{+\bullet}$ auf die Delokalisierung des Elektrons auf zwei Chl-Moleküle zurückgeht [156]. Für den Extremfall, daß sich das ungepaarte Elektron durch die Mutation nur noch auf einem der beiden Chl a befindet, nimmt nach diesem Modell ΔB_{pp} etwa den Wert von monomeren Chl a an. Ein solcher Anstieg der hfc wurde in den Heterodimer-Mutanten des bRC beobachtet [68].

Bezogen auf $P700^{+\bullet}$ würde ein Zuwachs von ΔB_{pp} um etwa 0,25 mT erwartet, falls in den

mutierten PSI-Komplexen der primäre Elektronendonator aus einem Chl *a* und einem Pheo *a* besteht. Die maximale Zunahme betrug jedoch nur $0{,}07 \pm 0{,}01$ mT. Unter dieser Annahme bestätigt auch das EPR-Experiment, daß in den mutierten PSI-Komplexen P700 aus zwei Chl-Molekülen gebildet wird.

Es ist aus den EPR-Messungen allerdings nicht zu erkennen, ob die Änderung der hfc auf eine Verschiebung von Spindichte zwischen den beiden Pigmenten oder auf Änderungen von Hyperfeinwechselwirkungen innerhalb eines der Chl-Moleküle zurückzuführen ist. Eine genauere Analyse der Spindichteverteilung erlaubt die Auswertung der ENDOR-Experimente.

Die im ENDOR-Spektrum detektierten ^{1}H-hfc verändern sich nur bei Substitution von His(B656) in PsaB und nicht beim Austausch von His(A676) gegenüber dem WT-PSI. Die Mutationen in PsaA haben keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Spindichteverteilung im $P700^{+\bullet}$-ENDOR-Spektrum.

Die im EPR-Spektrum beobachtete Zunahme der Linienbreite von HS(A676) hatte keinen Einfuß auf die hfc im ^{1}H-ENDOR-Spindichteverteilung. Es wird aufgrund der asymmetrischen Linienform des EPR-Spektrums vermutet, daß in diesem Spektrum ein weiteres Radikal enthalten ist. Im ENDOR-Spektrum wären die Beiträge eines zweiten Radikals minimal, da die Messung im Maximum der Resonanz von $P700^{+\bullet}$ aufgenommen wurde. Die Zunahme von ΔB_{pp} wird daher auf die Beimischung eines zweiten Radikals in der Probe zurückgeführt.

Das Ergebnis der ENDOR-Messungen zeigt, wie im weiteren erläutert wird, daß das ungepaarte Elektron im $P700^{+\bullet}$ nur auf P_B lokalisiert ist. Ein Hauptargument für diese Interpretation ist, daß die Aminosäuresubstitutionen in PsaA keine Verschiebung der Linienpaare (1',1) und (2',2) aufweisen. Käß vermutete, daß diese Linien zumindest anteilig den hfc von P_A zuzuordnen sind [109]. Wird angenommen, daß der Austausch von His(A676) in PsaA vergleichbare Auswirkungen auf P_A hat wie die Substitution von His(B656) in PsaB auf P_B, so ist eine Zunahme der hfc der Methyltensoren von 10–15 % zu erwarten. Da keine Veränderungen in dieser Größenordnung beobachtet werden, sind drei Interpretationen in bezug auf die Zuordnung der Linienpaare (1',1) und (2',2) möglich:

- Die Mutation von His(A676) hat trotz der homologen Substitution einen geringeren Einfluß auf P_A; die hfc der Methyltensoren von P_A verändern sich nur unterhalb der Nachweisgrenze der ENDOR-Messung.

- (1',1) und (2',2) ergeben sich aus Überlagerungen von hfc von P_B und P_A. Die Intensität wird jedoch überwiegend durch Kopplungen von P_B bestimmt. Die durch die Mutation in PsaA induzierten Veränderungen führen dann kaum zu Verschiebungen. Abweichungen im ENDOR-Spektrum werden nicht detektiert.

- Es befindet sich keine Spindichte auf P_A. Die Substitutionen in PsaB beeinflussen nur die Verteilung des ungepaarten Elektrons in P_B. Der Austausch von His(A676) wirkt sich nicht auf die elektronische Struktur von P_B aus.

Gegen die erste Interpretation spricht, daß die Linienpaare (1',1) und (2',2) durch Mutationen in PsaB beeinflußt werden. Es ist unter dieser Prämisse schwer nachzuvollziehen, daß der Austausch von His(B656), das P_B ligandiert, die Methyltensoren von P_A – Linienpaare (1',1) und (2',2) – beeinflußt, die Substitution des direkten axialen Liganden von P_A, His(A676), jedoch keine Auswirkungen auf diese hfc zeigt.
Die zweite und dritte Interpretation sind naheliegender. Die Linienpaare (1',1) und (2',2) repräsentieren dann überwiegend oder ausschließlich hfc von P_B. ENDOR-Messungen an Chl $a^{+\bullet}$ und dessen Derivaten weisen in diesem Bereich hfc auf, die vermutlich auf Protonen an den Positionen 20, 3^1, 3^2, 8^2, 17^1 und 18^1 zurückgehen [113]. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß insbesondere Substitutionen am exozyklischen Ring E des Chl *a* einen starken Einfluß auf die Größe der hfc zeigten. In diesem Ring treten extreme C–C-Bindungslängen auf. Abhängig von den Substituenten wirkt sich dies sehr empfindlich auf die Ausdehnung des π-Systems des Porphyrinringes zu den benachbarten Molekülpositionen aus [113].

Es ist auf den ersten Eindruck überraschend, daß der Austausch eines axialen Liganden gegen einen hydrophilen Aminosäurerest nur geringe Auswirkungen auf die Ladungsverteilung des $P700^{+\bullet}$-Radikals hat. Möglicherweise verschiebt die Seitenkette der substituierenden Aminosäure lediglich die Position des Mg-Atoms im Porphyrinring. Die im Vergleich zum Imidazolring kürzeren Aminosäurereste der untersuchten Mutationen schaffen vermutlich die Voraussetzung für eine gelockerte Bindung des Mg-Atoms oder

eine schwache Ligandierung über ein Wassermolekül, wie bereits in 5.3.1 vorgeschlagen wurde. Der Austausch des Liganden mag auch mit einer Entspannung des Porphyrinringes verbunden sein, wenn His im WT das Mg-Atom aus der Ebene dieses Ringes zieht.[11] Die geringe Zunahme der hfc, die beim Austausch von His(B656) gegen Gln bestimmt wurde, legt nahe, daß diese Seitenkette wie im WT das Mg-Atom direkt ligandiert. Diese Vermutung wird durch die vergleichbare Polarität und das ähnliche Seitenkettenvolumen von His und Gln unterstützt.
Die Verschiebung der Spindichte würde damit vorwiegend auf Veränderungen der Molekülkonformation des P_B zurückgehen und weniger auf den direkten Einfluß des axialen Liganden. Ursache dafür ist wahrscheinlich die geringe Wechselwirkung des zentralen Metallatoms im Porphyrinring mit dem π-Elektronensystem zurückzuführen. EPR-Messungen an isotopenmarkiertem BChl *a* haben zum Beispiel gezeigt, daß am Mg-Atom wenig Spindichte vorhanden ist [132]. Auch der Austausch von Mg^{2+} gegen Zn^{2+} in BChl *a* hatte nur einen zu vernachlässigenden Einfluß auf die elektronische Struktur [113].

Aus den Änderungen in den ENDOR-Spektren der mutierten PSI-Komplexe gibt es keinen Hinweis darauf, daß das ungepaarte Elektron zu einem geringen Prozentsatz auf P_A lokalisiert ist. Die ausschließlich für die Methylgruppen an Position 12 beobachtete Zunahme der hfc spricht ebenfalls gegen die Verschiebung von Spindichte zwischen den beiden Chl-Molekülen. Dieser in mutierten bRC eindeutig identifizierte Effekt wirkt sich in den bisher untersuchten Mutanten auf alle Methylgruppen aus [3, 6, 168, 169]. Diese Argumentation und die ENDOR-Spektren der PsaA-Mutanten, die identisch mit der WT-Messung sind, sprechen für das Modell, daß die elektronische Struktur von $P700^{+\bullet}$ dem Chl $a^{+\bullet}$-Monomer $P_B{}^{+\bullet}$ entspricht und kein Spin auf P_A lokalisiert ist. P700 besteht demnach nicht aus einem Supermolekül wie es im *special pair* des bRC der Fall ist, sondern aus zwei „einzelnen“ Chl a-Molekülen, die kein gemeinsames Molekülorbital besitzen bzw. in ihren Wellenfunktionen höchstens geringfügig überlappen. Zum gleichen Ergebnis sind vor kurzem Mac *et al.* nach Auswertung von ENDOR- und ESEEM-Experimenten von $P700^{+\bullet}$ an isotopenmarkierten und nicht markierten PSI-Komplexen gekommen [139]. Die besonderen Eigenschaften von P_B müssen damit auf die speziellen

[11] Die „Verspannung“ des Porphyrinringes wurde zum Beispiel im Hämoglobin festgestellt, in dem ein His das Eisenatom des Häms koordiniert [69].

Einflüsse der Proteinumgebung zurückgeführt werden. Das zweite Pigment P_A hat daran natürlich auch einen erheblichen Anteil.
Diese Interpretation berührt nicht die excitonische Wechselwirkung der beiden Pigmente. Für diese Art der Kopplung sind die Übergangsdipolmomente von P_A und P_B verantwortlich, die – nach der einfachen Excitontheorie – von Abstand und Orientierung der beteiligten Moleküle abhängig sind [36]. Die besonderen optischen Eigenschaften von P700 gehen im wesentlichen auf diese Wechselwirkung zurück.

Die EPR-Messungen am Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ weisen keine Unterschiede zum WT auf. Die Position von P700 innerhalb des Proteingerüstes hat sich durch die Mutation innerhalb von $\pm 0,3$ Å nicht verändert. Eine meßbare Abweichung der Orientierung von P700 in bezug auf den sekundären Elektronenakzeptor A_1 ist allerdings aufgrund des eher geringen Einflusses der Mutationen auf die physikalischen Eigenschaften von P700 nicht zu erwarten. Die unveränderte Positionierung dieser beiden Kofaktoren zeigt, daß in den mutierten PSI-Komplexen keine grundsätzlichen Verschiebungen im Proteingerüst stattgefunden haben.

5.4 Zusammenfassung

Der Austausch von His(A676) und His(B656) wirkte sich auf die Anreicherung des PSI-Komplexes in der Thylakoidmembran und auf die biophysikalischen Eigenschaften des primären Elektronendonators P700 aus. Die Substitution mit großen hydrophoben oder geladenen Seitenketten verhinderte den stabilen Zusammenbau des PSI. Enthielten die substituierenden Aminosäuren kleine und polare Seitenketten, verringerte sich die PSI-Menge um etwa 50 %. Dieser Effekt deutet darauf hin, daß die mutierten Histidine beim strukturellen Aufbau des PSI eine wesentliche Funktion übernehmen.

Die biophysikalischen Untersuchungen der isolierten PSI-Komplexe zeigten, daß die eingeführten Aminosäureseitenketten die Eigenschaften von P700 veränderten:

- Das Redoxpotential erhöhte sich in den in PsaB mutierten PSI-Komplexen bei Substitution mit unpolaren Seitenketten wie Gly und Cys um 100 bzw. 140 mV. In HN(B656) und HS(B656) betrug der Anstieg 40 mV. Die dem ausgetauschten

His am ehesten vergleichbare Aminosäure Gln wies die geringste Veränderung im Potential auf (+20 mV).

Auch die Substitutionen in PsaA beeinflußten diesen Parameter, allerdings betrug die Zunahme unabhänig von der Mutation nur 20 mV. Der Anstieg des Redoxpotentials von $P700^{+\bullet}$/P700 in den mutierten PSI-Komplexen wird auf die veränderte elektrostatische Umgebung des primären Elektronendonators zurückgeführt.

- Die optischen Untersuchungen am Triplettzustand und oxidierten PSI zeigten einen Einfluß der Mutation auf die excitonische Wechselwirkung zwischen den beiden Chl-Molekülen , die P700 bilden, unabhängig von der mutierten Proteinuntereinheit. Die Substitution mit Gln wies wiederum die geringsten Effekte auf.

  Die in PsaB mutierten PSI-Komplexe – HQ(B656) ausgenommen – veränderten darüber hinaus die excitonische Wechselwirkung mit den benachbarten Pigmenten. Hieraus wurde geschlußfolgert, daß das durch PsaB ligandierte P_B den wesentlichen Charakter von ^{3}P700 und $P700^{+\bullet}$ bestimmt.

- Die ENDOR-Experimente schließlich bestätigten, daß nur die Substitutionen des His(B656) die Spindichteverteilung im $P700^{+\bullet}$-Radikal beeinflussen. Die beiden zentralen Chl-Moleküle im PSI bilden somit kein Supermolekül, da ihre Orbitale nicht signifikant überlappen. Eine asymmetrische Verteilung der Spindichte zwischen P_A und P_B, wie sie von Käß favorisiert wird [109], wird als nicht sehr wahrscheinlich angesehen. Das ungepaarte Elektron im oxidierten primären Elektronendonator ist höchstwahrscheinlich ausschließlich auf P_B lokalisiert.

Die durch die Aminosäuresubstitutionen im PSI beobachteten Veränderungen in den Eigenschaften des primären Elektronendonators P700 stimmen beim Vergleich mit bRC, die am axialen Liganden modifiziert wurden, weitgehend überein. Auch wenn die Bildung eines Heterodimers durch Mutation im PSI nicht erreicht wurde, lassen die gewonnenen Ergebnisse in der Summe nur den Schluß zu, daß His(B656) das Mg-Atom von P_B axial ligandiert.

Die verhältnismäßig geringen Auswirkungen der Aminosäuresubstitutionen an der Position His(A676) in PsaA lassen eine direkte Zuordnung dieser Seitenkette als axialer Bindungspartner zum $P_A$durch die experimentellen Befunde nicht als ausreichend er-

scheinen. Allerdings ist aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den beiden Proteinuntereinheiten PsaA und PsaB, die sich auch im pseudo-symmetrischen Aufbau des Proteinkomplexes wiederfindet [184], davon auszugehen, daß His(A676) das Mg-Atom des symmetrisch angeordneten Chl-Moleküls, P_A, koordiniert.

Die Einbindung von P700 in das Proteingerüst durch zwei axiale His-Liganden entspricht damit auch den Anordnungen der primären Elektronendonatoren in den bRC. Die zentrale Komponente der Ladungstrennung in den verschiedenen Photosystemen ist damit auch aus evolutionärer Hinsicht strukturell konserviert.

6

Mutationen am Tyr-B659 in PsaB

Die Aminosäuresequenz der beiden Untereinheiten PsaA und PsaB ist in den fünf N-terminalen transmembranen Helices in Pflanzen, Blau- und Grünalgen hochkonserviert. Die Identität der Aminosäuren liegt in diesem Bereich bei über 90 % [41]. In der Röntgenstruktur, die aus PSI-Kristallen der Blaualge *S. elongatus* gewonnen wurde, ist zu erkennen, daß diese Helices das Reaktionszentrum des Photosystems bilden. Sie umschließen die Kofaktoren der Elektronentransportkette vom P700 bis zum F_x [184].
Trotz des nahezu identischen Aufbaus unterscheidet sich das aus *C. reinhardtii* isolierte PSI in den spektroskopischen Eigenschaften des P700 von den bisher untersuchten Spezies (vgl. Kapitel 4). Die Ursache für diese Abweichung ist bislang unverstanden.

In *C. reinhardtii* ist in der bereits oben genannten Helix X an Position 659 der Aminosäuresequenz der Untereinheit PsaB ein Tyrosin (Tyr bzw. Y) zu finden. Alle übrigen bisher bekannten Sequenzen anderer photosynthetischer Organismen weisen an homologer Stelle ein Tryptophan (Trp bzw. W) auf. In der Untereinheit PsaA ist auch in *C. reinhardtii* ein Trp an homologer Position vorhanden. In den Reaktionszentren der grünen Schwefelbakterien *Heliobacillus mobilis* und *Chlorobium limincola*, die aus einem Protein-Homodimer bestehen und in der Aminosäuresequenz nur zu 17 % mit dem PSI übereinstimmen, ist ebenfalls Trp konserviert [33, 134]. Diese punktuelle Abweichung in der Aminosäuresequenz in *C. reinhardtii* ist möglicherweise die Ursache für die spektroskopischen Unterschiede zum PSI aus anderen Organismen.
Die Position Tyr(B659) ist darüber hinaus interessant, weil sie in der Abfolge der Primärse-

quenz nur drei Positionen vom His(B656) entfernt ist. Tyr(B659) ist etwa 4,5 Å über diesem Histidin mit ähnlicher radialer Orientierung positioniert.[1] Eine Wechselwirkung dieser Seitenkette mit P_B ist daher zu vermuten.

Um zu überprüfen, welchen Einfluß diese Seitenkette auf P700 hat, wurde Tyr(B659) in PsaB gegen Leu, His, Ala und gegen die in den anderen Spezies vorhandene Aminosäure Trp ausgetauscht und die Auswirkungen auf P700 untersucht. Als Hintergrundstamm wurde nur die PSII-freie Zellinie CC2696 verwendet, die zusätzlich eine sehr eingeschränkte Chl *b*-Syntheserate besitzt. Die Mutanten oder die mutierten PSI-Komplexe werden wie oben erläutert abgekürzt.

6.1 Phänotyp der Y-Mutanten

Die Auswirkung der Aminosäuresubstitutionen war bereits an der Färbung der Zellkultur zu erkennen, da die mutierten Gene in die Zellinie CC2696 transformiert worden waren, in der PSI der vorherrschende Chl-bindende Proteinkomplex ist. Die Mutanten YW(B659) und YL(B659), in denen Trp oder Leu substituiert wurde, zeigten einen sehr gelben Phänotyp. Beim Austausch durch His oder Ala war hingegen der Unterschied zum WT gering. Die Bestimmung der Chl-Konzentration und des Chl a/b-Verhältnisses in den Zellen ergab, daß der PSI-Gehalt in den Mutanten YL(B659) und YW(B659) aufgrund des Chl a/b-Verhältnisses von 2–3 sehr gering sein mußte. In YA(B659) und YH(B659) hingegen lag diese Zahl bei 4–5. Diese Werte deuteten auf eine moderate Menge an PSI in den Zellen hin.

Der Versuch der Detektion des $P700^{+\bullet}$-Kationradikals in ganzen Zellen durch EPR zeigte, daß in YL(B659) kein lichtabhängiges oder durch chemische Oxidation erzeugtes EPR-Signal um $g = 2,00$ vorhanden war. Die anderen drei Mutanten wiesen ein Signal bei $g = 2,0026$ auf. Die Intensität von YW(B659) war allerdings sehr gering.

In den isolierten Thylakoidmembranen dieser Mutanten trat nur bei YA(B659) und YH(B659) eine lichtabhängige Ladungstrennung auf. Die beiden anderen Aminosäuresubstitutionen zeigten kein Signal, das auf die Bildung von $P700^{+\bullet}$ hinwies. Auch nach

[1] In der üblichen Darstellung von PSI-Modellen ist die Anordnung der Kofaktoren so angelegt, daß P700 unten und $F_{A/B}$ oben ist. Die Helix X verläuft mit aufsteigender Aminosäuresequenz von P700 in Richtung der Eisen-Schwefel-Cluster. Bei dieser Betrachtungsweise liegt das Tyr oberhalb des His.

weiteren Aufreinigungsschritten war in YL(B659) und YW(B659) kein PSI nachzuweisen. Die biophysikalische Charakterisierung der PSI-Komplexe wurde somit nur an PSI-Komplexen aus YA(B659) und YH(B659) durchgeführt.

Die Substitution mit großen, hydrophoben Resten wie Leu und Trp wirkt sich negativ auf die stabile Anreicherung von PSI in den Zellen aus. Der Austausch mit Ala und His hingegen führt zu einer moderaten Anreicherung von PSI in den Zellen. Ähnlich wie bei den Substitutionen von His(B656) und His(A676) sind weniger die chemischen Eigenschaften der Aminosäure als deren Größe für den Zusammenbau des PSI-Komplexes von Bedeutung.

6.2 Biophysikalische Charakterisierung von P700 am isolierten PSI-Komplex der Y-Mutanten

Aus den Mutanten YH(B659) und YA(B659) wurden PSI-Komplexe isoliert. Die Ausbeute entsprach etwa 50 % der Menge einer WT-Präparation. Analog zu den im letzten Kapitel vorgestellten Aminosäuresubstitutionen am His(B656) und His(A676) wurden die Auswirkungen des Austauschs von Tyr(B659) auf die physikalischen Eigenschaften von P700 untersucht.

6.2.1 Redoxpotential

Die Redoxpotentiale von YA(B659) und YH(B659) betragen (467 ± 4) mV bzw. (435 ± 4) mV und weichen damit signifikant vom WT ($E_m = (447 \pm 6)$ mV) ab. Die Meßkurven sind in Abb. 6.1 gezeigt. Die angefitteten Kurven entsprechen der Nernstgleichung mit einem Elektronenübergang von n=1. Wird der Parameter „n“ in der Nernstgleichung nicht fixiert, ergeben sich Werte von 0,96 für YH(B659) und 0,98 für YA(B659). Die sehr gute Übereinstimmung des theoretischen Kurvenverlaufs mit den gemessenen Daten bestätigt, daß die PSI-Präparationen der beiden Mutanten eine homogene Population an Proteinkomplexen enthalten und auch während der Messung stabil bleiben.[2]

[2] Die Stabilität der aufgereinigten Komplexe war im allgemeinen sehr gut. Ohne Zusatz von Oxidationsmitteln war auch nach mehreren Stunden bei Raumtemperatur kein signifikanter Abfall in der Aktivität von PSI zu beobachten.

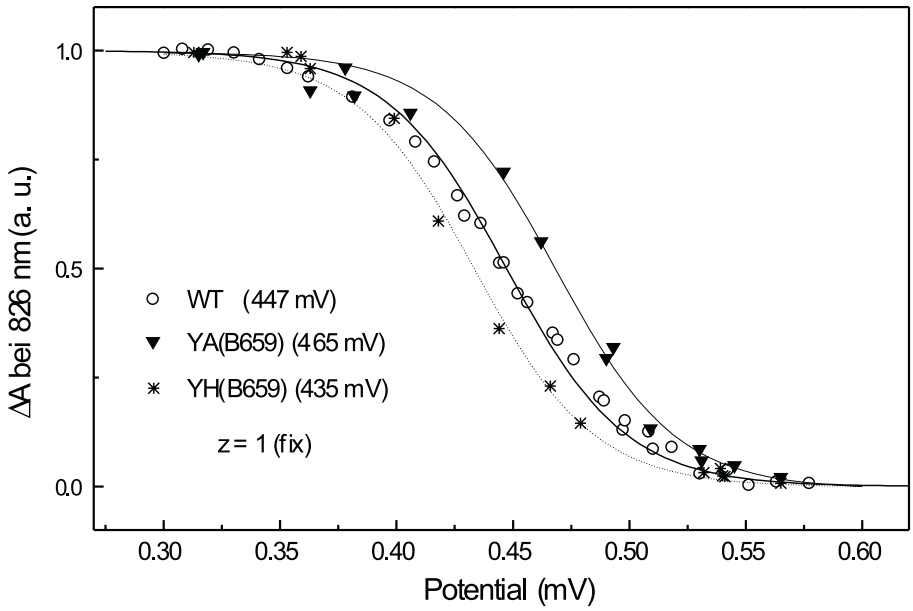

Abbildung 6.1: Redoxtitrationen von $P700^{+\bullet}$/P700 an isolierten PSI-Komplexen aus dem WT und den Mutanten YH(B659) sowie YA(B659). Die angepaßten Kurven entsprechen der Nernstgleichung mit einem Elektronenübergang von n=1. Der Fehler beträgt beim WT ± 6 mV und ± 4 mV für die Messungen von YH(B659) und YA(B659).

6.2.2 $P700^{+\bullet}$/P700-Absorptionsdifferenzspektroskopie bei Raumtemperatur

In den flächennormierten Absorptionsdifferenzspektren bei Raumtemperatur treten im Vergleich zum WT Veränderungen im Bereich zwischen 650-680 nm bei YA(B659) und zwischen 675-685 nm bei YH(B659) auf (Abb. 6.2). Das Spektrum von YH(B656) ähnelt den Ergebnissen, die bei Austausch von His(A676) gegen Ser oder Gln beobachtet wurden. Das Spektrum von YA(B659) hingegen weist eine zusätzliche Ausbleichung im Bereich von 665 nm bis 685 nm auf. Der Effekt dieser Substitution von Tyr(B659) zeigt damit in diesem Bereich des Spektrums vergleichbare Effekte wie die Mutationen, bei denen His(B656) substituiert wurde (vgl. Abb. 5.9). Die Ausbleichung umfaßt allerdings bei YA(B659) einen größeren Bereich. Der Differenzen-Extinktionskoeffizient $\Delta\epsilon_{696}$ im Minimum der Ausbleichung beträgt für YA(B656) 80 % des WT-Wertes, für YH(B656) etwa 85 %. Die Position der P700-Ausbleichung ist in den Mutanten gegenüber dem WT-PSI unverändert.

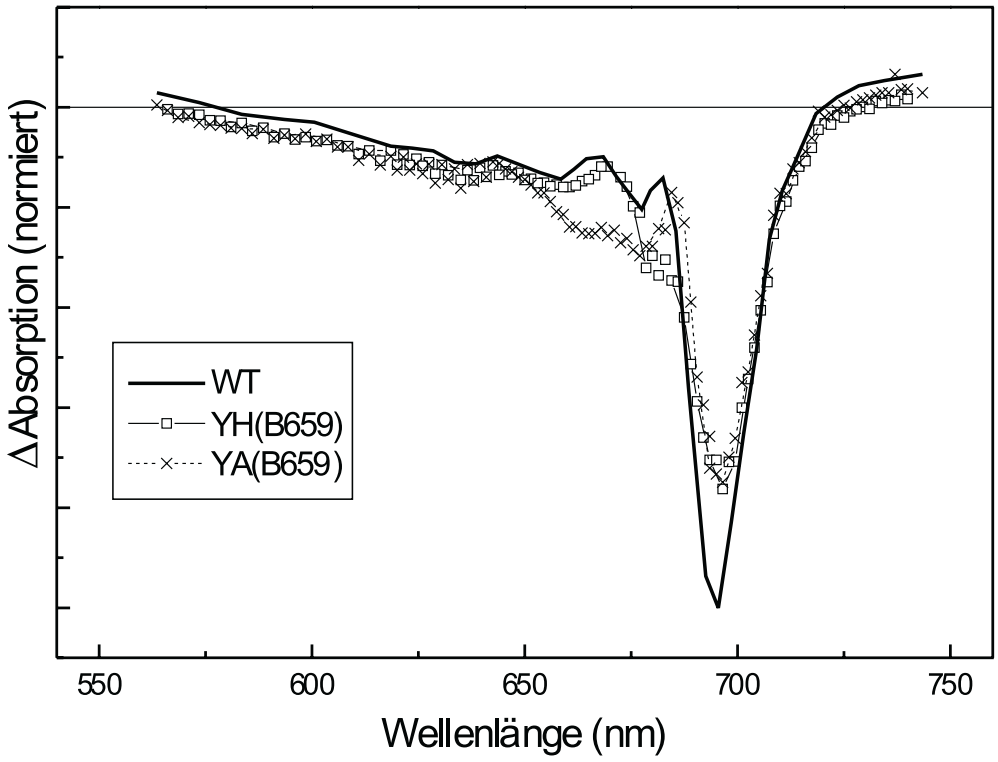

Abbildung 6.2: Absorptionsdifferenzspektren bei Raumtemperatur von PSI-Komplexen aus dem WT und YH(B659) und YA(B659). Die Spektren wurden auf die gleiche ausgebleichte Fläche im Bereich der Q_y-Absorption normiert (650–720 nm). Jeder Meßpunkt stellt das Mittel mehrerer transienter Messungen dar (20–200 Einzelblitze).

6.2.3 Absorptionsdifferenzspektroskopie bei 77 K

Bei tiefen Temperaturen zeigt das Absorptionsdifferenzspektrum um 675 nm in den PSI-Komplexen aus YA(B659) eine Struktur, die nahezu identisch mit den am His(B656) substituierten PSI-Komplexen ist. Die Spektren von YA(B659) und HS(B656) sind deswegen im Bereich von 650 nm bis 715 nm hinzugefügt worden (Abb. 6.3 kleines Bild).

Wie in Abb. 6.3 zu erkennen ist, sind die starke Absorptionszunahme und die Hauptausbleichung bei 698 nm jedoch gegenüber dem WT innerhalb des Fehlers nicht verschoben. Das Spektrum von YH(B656) zeigt in diesem Bereich in bezug auf die Linienposition keine Veränderungen zum WT. Die Abweichungen, die bei Raumtemperatur um 680 nm beobachtet wurden, sind bei einer Temperatur von 77 K so nicht wiederzufinden.

Ein wesentlicher Unterschied zu den His-Mutanten besteht hingegen darin, daß weder YH(B659) noch YA(B659) die Hauptausbleichungsbande um 698 nm signifikant verschieben. Die Linienbreite dieser Bande ist ebenfalls unverändert.

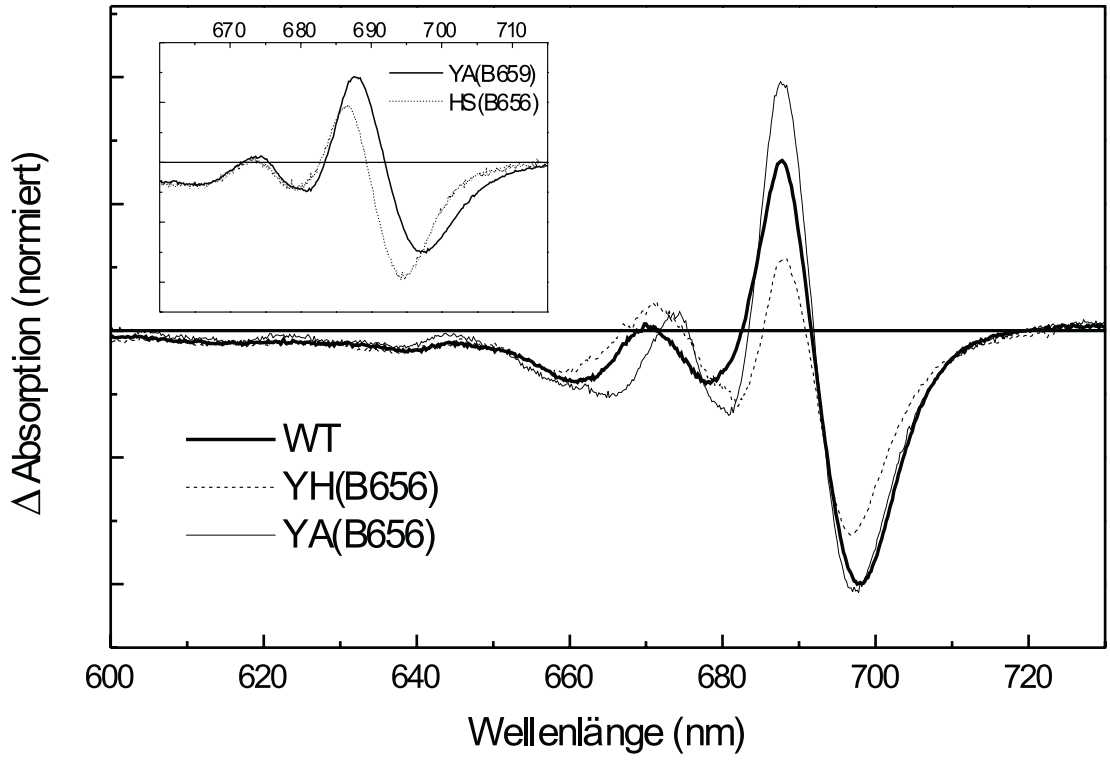

Abbildung 6.3: Absorptionsdifferenzspektren bei 77 K von PSI-Komplexen aus dem WT und YH(B659) und YA(B659). Die Spektren wurden auf die gleiche ausgebleichte Fläche im Bereich der Q_y-Absorption normiert (650–720 nm). In dem eingefügten Bild sind die Spektren von YA(B659) und HS(B656) im Bereich zwischen 660–715 nm zu sehen.

Die Ursache für die Intensitätsunterschiede um 688 nm und 698 nm ist nicht eindeutig geklärt.

6.2.4 T–S-Spektroskopie

Bei der spektroskopischen Analyse des Triplettzustandes werden ebenfalls Unterschiede im Bereich zwischen 660 nm und 685 nm bobachtet (Abb. 6.4). Wiederum sind die Effekte von YA(B659) vergleichbar mit Substitutionen am His(B656). Sie erstrecken sich jedoch wie beim Raumtemperaturspektrum von $P700^{+\bullet}$/P700 über einen größeren Bereich. Bei YH(B659) treten signifikante Unterschiede nur um 685 nm auf.

Im T–S-Spektrum von YA(B659) ist darüber hinaus eine Rotverschiebung des Minimums der Hauptausbleichung zu erkennen. Die niederenergetische Flanke dieser Bande stimmt jedoch weiterhin mit dem WT überein. Die Ursache für diesen Effekt geht daher wahr-

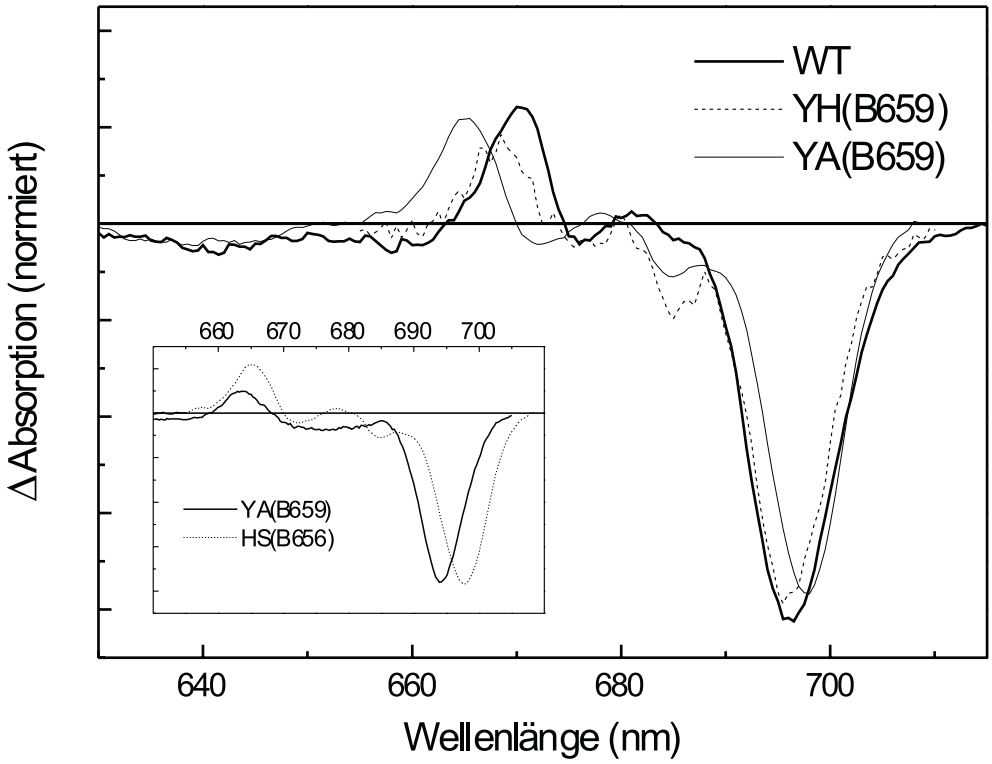

Abbildung 6.4: T–S-Spektren von PSI-Komplexen aus WT und YH(B659) sowie YA(B659). Die Spektren wurden im Bereich von 650 nm bis 710 nm auf die gleiche Fläche normiert. In dem eingefügten Bild sind die T–S-Spektren von YA(B659) und HS(B656) für den Bereich zwischen 660 nm und 715 nm gezeigt.

scheinlich nicht auf eine Änderung der P700-Absorption im Singulettzustand zurück, sondern auf Verschiebungen von Absorptionsbanden anderer Pigmente. Verschiebt sich zum Beipiel die um den Wert von 692 nm vermutete Absorption von P_A [39, 208] im Triplettzustand um einige Wellenlängen ins Rote, nimmt in der Summe die Intensität der P700-Hauptausbleichung in diesem Bereich ab. In der Überlagerung wirkt sich das in einer Verschiebung des Minimus zu längeren Wellenlängen aus.

Die unter 5.3.2 diskutierte Blauverschiebung kann jedoch nicht auf einen vergleichbaren Effekt zurückgeführt werden, da P700 die langwelligste Absorption aufweist. Die Substitution des Tyr wirkt sich somit im Gegensatz zum Austausch der Histidine nicht nachweisbar auf die excitonische Wechselwirkung der beiden Dimerhälften untereinander aus.

6.2.5 ENDOR-Spektroskopie

Die Mutation von Tyr(B659) beeinflußt die Spindichteverteilung im $P700^{+\bullet}$-Kationradikal: Im ENDOR-Spektrum von YH(B659) wurden kleine Abweichungen der hfc detektiert. Am deutlichsten ist die Änderung des Linienpaares (4',4) zu erkennen, die der $A_\perp$-Komponente des Tensors der Methylgruppe an Position 7 des Porphyrinringes zugeordnet werden. Dieser Anteil der hfc tritt in YH(B659) wesentlich deutlicher hervor (Abb. 6.5). Die hfc der Methylgruppe an Position 12 [Linienpaare (6',6) und (7',7)] sind in YH(B659) innerhalb des Fehlers unverändert. Deutlich ist die Abnahme der Signalin-

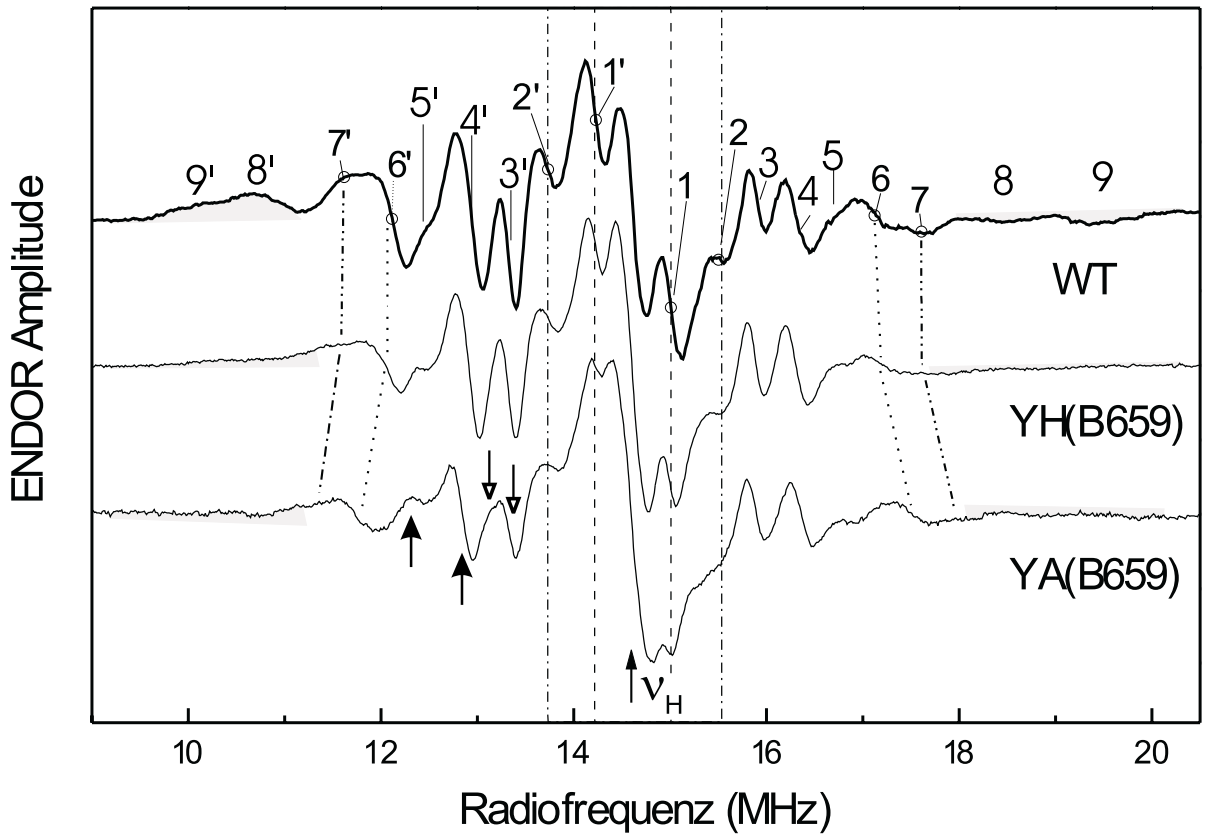

Abbildung 6.5: ENDOR-Spektren des $P700^{+\bullet}$-Kationradikals von PSI aus WT und YH(B659) sowie YA(B659). Die $A_\parallel$- und die $A_\perp$-Komponente des Methyltensors an der Kohlenstoffposition 12 im Porphyrinring von P_B wurden gekennzeichnet und durch Linien verbunden [Linienpaare (6',6) bzw. (7',7)]; die beiden Tensorkomponenten der Methylgruppen 7 und 2 sind neben der Hervorhebung im Spektrum durch aufrechte bzw. senkrechte Pfeile im Spektrum markiert; die beiden Hilfslinien im Zentrum des Spektrums markieren die hfc der Linienpaare (1',1) und (2',2) im WT. Die Bereiche, in denen die hfc der β-Protonen auftreten, sind grau unterlegt.

tensität bei den hfc der β-Protonen zu erkennen (in Abb. 6.5 grau unterlegter Bereich). Ob sich die Lage dieser Kopplungen ändert ist wegen der geringen Intensität kaum zu entscheiden, da vermutlich ein Anteil dieser hfc durch das Linienpaar (7 ',7) überlagert wird. Die Linienpaare (1',1) und (2',2) werden in YH(B659) nicht signifikant beeinflußt. Eine Auswertung in bezug auf die hfc ist jedoch nur für die Kopplungen der Methylgruppen sinnvoll, die mit 5 % Zunahme gerade außerhalb des Fehlers liegen. Die einzelnen Komponenten der Methyltensoren für YH(B659) wurden simuliert. Für die Methylgruppe an Position 12 des Porphyrinringes ergeben sich folgende hfc: $A_{\parallel} = 6,2$ MHz und $A_{\perp} = 5,25$ MHz. Dies ergibt eine isotrope Kopplung von $A_{iso} = 5,6$ MHz. Der Fehler der Methylkopplungen liegt nach der Simulation der Tensorkomponenten bei $\pm$50 kHz. Die hfc der Methylgruppe an Position 7 nimmt geringfügig zu. Die Tensorkomponenten der Methylgruppe an Position 2 sind in YH(B659) unverändert gegenüber dem WT.

YA(B659) unterscheidet sich im ENDOR-Spektrum wesentlich stärker vom WT als PSI aus der Mutante YH(B659). Die Tensorkomponenten der Methylgruppe an Position 12 sind erheblich größer als im WT mit $A_{\parallel} = 6,58$ MHz und $A_{\perp} = 5,70$ MHz, so daß $A_{iso} = 5,99$ MHz beträgt. Die Änderungen dieses Methyltensors sind somit nahezu identisch mit den Werten, die für HN(B656) bestimmt wurden. Im Unterschied zu den Substitutionen am His(B656) werden die hfc der beiden Methylgruppen an Position 2 und 7 durch die Substitution YA(B659) auch beeinflußt. Die $A_{\parallel}$- und die $A_{\perp}$-Komponente des hfc-Tensors der Methylgruppe an Position 7 sind im ENDOR-Spektrum von $P700^{+\bullet}$ aus YA(B659) vollständig aufgelöst. Beide Tensorkomponenten sind in YA(B659) um etwa 7 % größer als im WT.

Eine deutliche Abnahme tritt hingegen bei der $A_{\parallel}$-Komponente des Tensors der Methylgruppe an Position 2 auf. Im WT ist diese hfc nicht direkt aus dem Spektrum abzulesen, da sie unter dem Linienpaar (4', 4) verborgen ist und nur durch die Simulation des Spektrums zugänglich wird. Der Wert nimmt in YA(B659) im Vergleich mit dem WT um fast 0,7 MHz ab.

Diese deutliche Veränderung von $A_{\parallel}$ in YA(B659) wirft natürlich die Frage auf, ob die Zuordnung dieser hfc zur Methylgruppe 2 gerechtfertigt ist, oder ob es sich um eine Kopplung handelt, die im WT-Spektrum überlagert wird und anderen Protonen des Porphyrinringes zuzuordnen ist. Die geringere Signalintensität des Linienpaares (4',4), die im

WT und auch in YH(B659) neben der $A_\perp$-Komponente die $A_\parallel$-Anteile der Methylgruppe 2 enthält, erhärtet jedoch die Zuordnung für YA(B659). In Tabelle 6.1 sind die einzelnen hfc der drei Methylgruppen für die beiden Mutationen zusammengefaßt und den Werten für WT-PSI gegenübergestellt.

	12[a]			**7**[a]			**2**[a]		
	$A_\parallel$	$A_\perp$	A_{iso}	$A_\parallel$	$A_\perp$	A_{iso}	$A_\parallel$	$A_\perp$	A_{iso}
WT	5,98	5,00	5,32	4,30	3,32	3,65	3,70	2,55	2,93
YH(B659)	6,20	5,25	5,60	4,45	3,37	3,73	3,72	2,55	2,94
YA(B659)	6,58	5,70	5,99	4,59	3,55	3,90	3,05	2,55	2,75

Tabelle 6.1: Hyperfeinkopplungskonstanten der Methylprotonen des $P700^{+\bullet}$-Kationradikals von PSI-Partikeln aus WT- und am Tyr(B659) mutierten PSI-Komplexen. Alle Angaben in MHz; der Fehler beträgt $\pm 0,05$ MHz.
[a]Molekülposition am Porphyrinring an der sich die Methylgruppen befinden.

Auch die Linienpaare (2',2) und (1',1) im Zentrum des ENDOR-Spektrums werden durch die Aminosäuresubstitution am Tyr(B659) beeinflußt. Die Ursache der Intensitätsverschiebung der ENDOR-Amplitude ist nicht eindeutig zu klären, da eine Simulation dieser Linien wegen der fehlenden Zuordnung nicht möglich ist. Es bleibt folglich unverstanden, ob diese Veränderungen bei den kleinen Kopplungen in den mutierten PSI-Komplexen auf Linienbreiteneffekte oder Unterschiede in den hfc zurückgehen (vgl. 5.7).

6.3 EPR am Radikalpaar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$

Sowohl die transient aufgenommenen EPR-Spektren des Radikalpaares $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ als auch die *out-of-phase*-Echo-Experimente an PSI-Komplexen aus den beiden Mutanten YH(B659) und YA(B659) zeigen keine signifikanten Veränderungen zum WT (Abb. 6.6 und 6.7).
Der Abstand zwischen den Zentren der beiden Radikale $P700^{+\bullet}$ und $A_1^{-\bullet}$, der sich aus der Modulationsfrequenz ergibt (vgl. 4.2.4), wies zwar mit $25{,}9 \pm 0{,}4$ Å einen etwas größeren Wert auf, diese Veränderung liegt jedoch noch innerhalb des Fehlers.
Auch durch diese beiden Mutationen wird also die absolute Position von P700 innerhalb

des Proteingerüstes nicht signifikant beeinflußt. Die Position des sekundären Akzeptors A_1 wird dabei als unverändert angenommen, da ein Effekt einer einzelnen Aminosäuresubstitution über diese Entfernung im Protein sehr unwahrscheinlich ist.

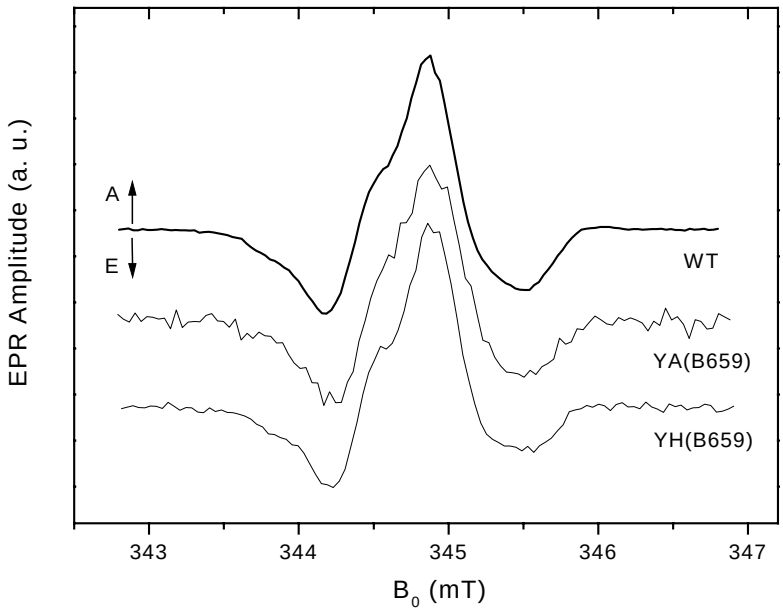

Abbildung 6.6: Transiente X-Band-EPR-Spektren von $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ an PSI-Komplexen aus *C. reinhardtii* WT, YH(B659) und YA(B659).

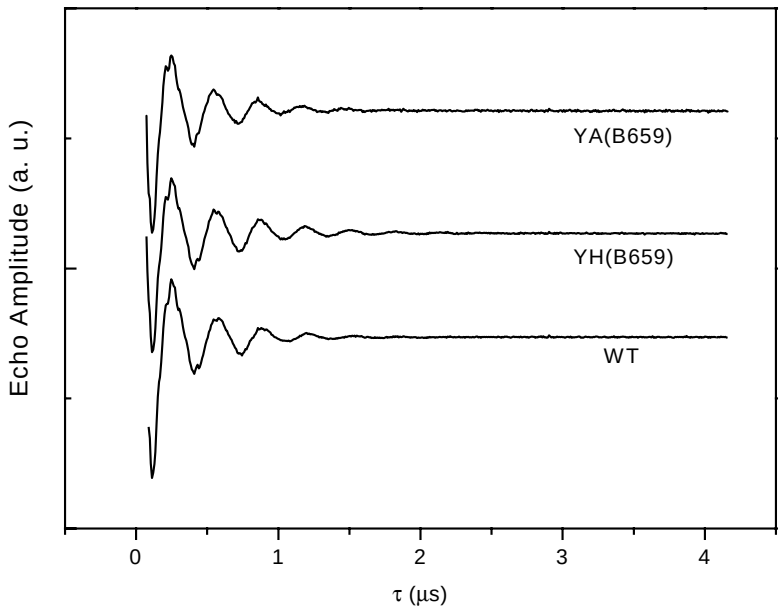

Abbildung 6.7: *out-of-phase*-Echo-Modulation des Radikalpaares $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ als Funktion des Pulsabstandes τ gemessen an PSI-Komplexen aus dem WT, YH(B659) und YA(B659).

6.4 Zusammenfassung und Diskussion

Der Austausch von Tyr(B659) wirkt sich ähnlich wie die Substitutionen von His(B656) und His(A676) auf die Stabilität des PSI-Komplexes aus. Die Einführung von Aminosäuren mit großen Seitenketten wie Leu oder Trp verringert die PSI-Menge in den Mutanten in einem solchen Maße, daß die Isolierung und weitere Charakterisierung der mutierten PSI-Komplexe nicht möglich war. Die Substitutionen mit Ala oder His führen hingegen zu einer moderaten Anreicherung der mutierten PSI-Komplexe.
Der negative Phänotyp der Mutante YW(B659) ist in diesem Zusammenhang überraschend, da die Aminosäure Trp in allen bisher sequenzierten photosynthetischen Organismen, die PSI enthalten, an homologer Position zu finden ist.
Ohne weitere strukturelle Daten ist nicht zu verstehen, aus welchem Grund der Austausch von Tyr(B659) gegen Trp diese Auswirkung auf den PSI-Komplex in *C. reinhardtii* hat. Die Konservierung der Aminosäuresequenzen im PSI verschiedener Organismen liegt im Bereich der fünf C-terminalen α-Helices bei über 90 % [41]. Die dreidimensionale Struktur des Proteingerüstes müßte daher in diesem Teil des Komplexes ebenfalls nahezu identisch aufgebaut sein. Das vorgefundene Ergebnis spricht jedoch dafür, daß in *C. reinhardtii* die Seitenkette des Trp aus sterischen Gründen den Aufbau des PSI-Komplexes stark behindert. Ob hierfür allein die Faltung der Polypeptidketten oder eines der Pigmente die entscheidende Rolle spielen, bleibt Spekulation. Für einen funktionellen Vorteil dieses Unterschiedes im PSI von *C. reinhardtii* gibt es keinen Hinweis. Aufgrund der geringen Akkumulation war eine Untersuchung von PSI aus YW(B659) in bezug auf die spektroskopischen Eigenschaften von P700 nicht möglich. Es bleibt damit weiterhin ungeklärt, ob Tyr(B659) für die Unterschiede zwischen PSI aus *C. reinhardtii* und anderen Organismen verantwortlich ist.

Die biophysikalische Charakterisierung von YH(B659) und YA(B659) bestätigt, daß Tyr(B659) in unmittelbarer Nähe von P700 lokalisiert ist. Das Redoxpotential von P700 wird durch die Aminosäure Ala erhöht und durch die Einführung von His an dieser Position sogar gesenkt. Als Ursache für die Potentialänderung käme eine Wasserstoffbrücke zwischen P_B und Tyr(B659) im WT in Frage. Durch den Austausch gegen Ala würde diese Bindung zum P_B in in der Mutante YA(B659) gebrochen, das His in YH(B659) hinge-

gen würde diese H-Brücke stabilisieren. Im Vergleich mit den Mutationen am His(B656) ist der Einfluß auf das Redoxpotential von P700 durch den Austausch von Tyr(B659) schwächer.

Interessanterweise stimmen die optischen Spektren von YA(B659) mit den am His(B656) mutierten PSI-Komplexen in dem Bereich nahezu überein, der die Wechselwirkung mit den benachbarten Pigmenten widerspiegelt. Die excitonische Kopplung zwischen P_B und P_A, die sich in der Hauptausbleichungsbande niederschlägt, wird durch die Substitution von Tyr(B659) nicht signifikant verändert.

Der direkte Einfluß von Tyr(B659) mit P700, genauer gesagt mit P_B, wurde im ENDOR-Experiment nachgewiesen. Die aus der Mutante YH(B659) isolierten PSI-Komplexe zeigen in bezug auf die Spindichteverteilung geringe Veränderungen zum WT, die sich auf die Kopplungen der β-Protonen und die Methylgruppen an Position 12 und 7 des Porphyrinringes beschränken. Der Austausch gegen Ala in YA(B659) verändert praktisch alle Linienpositionen und Intensitäten im ENDOR-Spektrum. Die auffälligsten Abweichungen sind die Zunahme der hfc, die den Tensorkomponenten der Methylgruppe 12 zugeordnet werden, und die Änderung der Tensorkomponente der Methylgruppe an Position 2 des Porphyrinringes. Diese erhebliche Störung der Spindichteverteilung im P_B bestätigt die unmittelbare Wechselwirkung zwischen der eingeführten Aminosäureseitenkette und diesem Chl *a*-Molekül. Eine in der Mutante YA(B659) nicht mehr ausgebildete H-Brücke zu P_B ist als molekulare Ursache für die im ENDOR-Spektrum beobachteten Veränderungen eine gute Erklärung. Vermutlich fixiert im WT-PSI die Bindung zwischen Tyr(B659) und einem Substituenten des Porphyrinringes das Pigment, P_B, in seiner Bindungstasche. Die Konformation dieses Chl-Moleküls wird damit wahrscheinlich sehr definiert festgelegt, um eine optimale Funktion oder maximale Stabilität des Proteinkomplexes zu gewährleisten. Durch die neue Bindungssituation im Protein kann das Pigment im mutierten PSI-Komplex von YA(B659) in einer anderen Konformation vorliegen, da der Substituent, der im WT-PSI duch die H-Brücke gebunden wird, anders im Proteingerüst ausgerichtet sein wird. Die Änderung der Molekülstruktur wirkt sich dann nachweisbar auf die Spindichteverteilung im oxidierten Zustand aus.

Überraschend an den biophysikalischen Untersuchungen der am Tyr(B659) mutierten PSI-Komplexe ist, daß die Substitution Veränderungen induzierte, die zum Teil auch

beim Austausch von His(B656) beobachtet werden. Im folgenden Kapitel wird auf der Grundlage der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und der vorhandenen Strukturdaten ein Modell für die Einbindung von P700 in das Proteingerüst des PSI-Komplexes vorgeschlagen, das die Auswirkungen der Substitution von His(B656), His(A676) und Tyr(B659) berücksichtigt.

7

Die Einbindung von P700 in den PSI-Komplex

Hauptanliegen der Arbeit war die biochemische und biophysikalische Charakterisierung von PSI-Komplexen, die durch Austausch einer Aminosäure in einer der beiden Proteinuntereinheiten PsaA und PsaB modifiziert worden waren. Die Auswahl der Mutationen erfolgte mit dem Ziel, Bindungspartner des primären Elektronendonators P700 mit dem Proteingerüst zu identifizieren.

His(A676) in Untereinheit PsaA und His(B656) in PsaB wurden aufgrund der Position in der Sekundärstruktur und aufgrund der Homologie zu den Reaktionszentren der grünen Schwefelbakterien als potentielle axiale Liganden zum P700 favorisiert. Substitutionen an den übrigen His in den fünf N-terminalen Transmembranhelices der beiden großen Proteinuntereinheiten zeigten zudem keinen Einfluß auf die biophysikalischen Eigenschaften des primären Elektronendonators [52, 170].

Diese beiden Aminosäuren wurden gegen hydrophobe, geladene und polare Seitenketten ausgetauscht. Weiterhin wurden mutierte PSI-Komplexe untersucht, in denen Tyr(B659) substituiert wurde. Dieser Aminosäure befindet sich in unmittelbarer Nähe zum His(B656) und tritt nur in *C. reinhardtii* an dieser Position auf. Alle anderen bisher sequenzierten Spezies, die PSI enthalten, weisen an homologer Position ein Trp auf.

Es wurde vermutet, daß diese Seitenkette für die besonderen spektralen Eigenschaften von P700, die in der Grünalge im Vergleich mit PSI aus anderen photosynthetischen

Organismen festgestellt wurden, verantwortlich sein könnte.

7.1 Ist P700 ein Supermolekül?

7.1.1 Eigene Ergebnisse

Der Austausch von His(A676) oder His(B656) durch andere Aminosäuren wirken sich sowohl auf die Anreicherung des PSI-Komplexes in der Thylakoidmembran als auch auf die biophysikalischen Eigenschaften von P700 aus. Die Substitutionen mit großen hydrophoben oder geladenen Seitenketten resultieren in Phänotypen, die PSI in so geringen Mengen akkumulieren, daß eine Isolierung und weitere Charakterisierung der Proteinkomplexe nicht möglich ist. Kleine und polare Reste an diesen Positionen führen zu einer moderaten Anreicherung der mutierten Photosysteme, die spektroskopisch in bezug auf die Eigenschaften von P700 untersucht wurden.

Die Redoxpotentiale, die T–S-Spektren und die Absorptionsdifferenzspektren der untersuchten mutierten PSI-Komplexe verändern sich gegenüber dem WT-PSI deutlich. Die Aminosäure Gln zeigt sowohl bei Substitution in PsaA als auch in PsaB den geringsten Einfluß auf die spektroskopischen Eigenschaften von P700. Auch wenn der Anstieg des Redoxpotentials in den mutierten PSI-Komplexen aus HQ(A676) und HQ(B656) identisch ist, sind die Auswirkungen auf die optisch detektierten Parameter von P700 klar unterschiedlich. Die Verteilung der Spindichte im $P700^{+\bullet}$ wird sogar nur in HQ(B656) beeinflußt. Die Substitution durch Ser, die ebenfalls in beiden Proteinuntereinheiten generiert und charakterisiert wurde, bestätigt die Feststellung, daß die Effekte des Aminosäureaustausches auf P_A und P_B verschieden sind. Beim Vergleich dieser beiden Substitutionen verstärkt sich der Eindruck, daß die beobachteten Veränderungen bei der Mutation in PsaB ausgeprägter sind. Dies wird insbesondere bei den ENDOR-Experimenten sehr deutlich, die für HS(B656) eine erhebliche Verschiebung von hfc ergeben, im Spektrum von HS(A676) jedoch keinen Unterschied zum WT-PSI zeigen. Die übrigen nur in PsaB vorhandenen Substitutionen unterstreichen diesen Eindruck, da dere Auswirkungen auf P700 mit Ausnahme des Redoxpotentials wenig von der funktionellen Gruppe der kleinen oder polaren Aminosäure abzuhängen scheinen.

7.1.2 Literaturdaten

Zu vergleichbaren Ergebnissen mit mutierten PSI-Komplexen kamen Redding *et al.*, die das Fourier-transformierte-Infrarot(FTIR)-Differenzspektrum von $P700^{+\bullet}$/P700 aus den Mutanten HQ(B656) und HQ(A676) aufgenommen haben. Die Bande, die der 13^1-Ketocarbonylschwingung zugeordnet wurde [152], wird durch die Substitution in PsaB zu größeren Wellenzahlen verschoben, durch Austausch in PsaA zu kleineren Wellenzahlen [170].
Diese Ergebnisse zeigen, daß die beiden nahezu symmetrisch im Proteingerüst angeordneten Chl-Moleküle, die P700 bilden, funktionell unterschiedlich sind. Auch aufgrund der biophysikalischen Charakterisierung von WT-PSI wurde postuliert, daß eine Asymmetrie in bezug auf die Eigenschaften der beiden Chl-Moleküle besteht:

- Das $P700^{+\bullet}$/P700-Differenzspektrum wurde im wesentlichen als Überlagerung eines neutralen und eines oxidierten Chl *a* interpretiert [180, 181]. Das ungepaarte Elektron im $P700^{+\bullet}$ ist nach dieser Interpretation nur auf einem Chl *a* lokalisiert.

- Die Absorptionsspektren im nahen Infrarot von $P700^{+\bullet}$ und Chl $a^{\bullet+}$ stimmen nahezu überein. Eine Lokalisation der Ladung auf einem Chl *a*-Molekül wird angenommen [143].

- Im $P700^{+\bullet}$/P700-FTIR-Differenzspektrum wurden die Vibrationsschwingungen der 13^1-Keto-Funktion und der 13^2-Esterbindung am Ring E des Porphyrinringes zugeordnet. Beide Schwingungen treten paarweise auf. Das doppelte Auftreten der Schwingung wird darauf zurückgeführt, daß die beiden Chl-Moleküle P_B und P_A eine unterschiedliche Umgebung oder Geometrie aufweisen [152].

- Die kürzlich erschienene Arbeit zur FTIR-Differenzspektroskopie am chemisch oxidierten P700 bestätigte im wesentlichen diese Zuordnungen und bekräftigte, daß $P700^{+\bullet}$ durch ein monomeres Chl-Pigment beschrieben werden sollte [87]. Die Autoren führen in ihrer Argumentation im besonderen an, daß die im bRC beobachtete sogenannte „*new band*“ [29] im PSI nicht auftritt [87]. Diese Absorption im Bereich von 1800–3000 cm^{-1} setzt eine elektronische Kopplung der beiden Pigmente und damit ein Dimermodell voraus [171].

- Die Messungen am Triplettzustand von P700 ergaben, wie bereits unter 5.3.2 erörtert wurde, daß die Nullfeldparameter |D| und |E| bei tiefen Temperaturen mit den Werten von ^{3}Chl *a* übereinstimmen [19]. Allerdings wurden transiente EPR-Messungen am ^{3}P700 bei verschiedenen Temperaturen so interpretiert, daß eine Ausdehnung des Triplettexcitons über beide Chl-Moleküle nicht auszuschließen ist [192]. Den Blanken und Hoff geben jedoch zu bedenken, daß ohne eine genaue Kenntnis der geometrischen Anordnung der beiden Pigmente die Aussagen über die Lokalisation des Triplettzustandes allein aus den |D|- und |E|-Parametern zweifelhaft bleiben müssen [19, 20, 21].

- Die ENDOR-Messungen von $P700^{+\bullet}$ an PSI-Kristallen aus *S. elongatus* bestätigten die Interpretation einer stark asymmetrischen Ladungsverteilung des ungepaarten Elektrons. Eine vollständige Lokalisation auf einem der beiden Chl *a*-Moleküle wurde nicht ausgeschlossen. Die ENDOR-Messungen legten aufgrund der Reduktion der meisten Hyperfeinkopplungen gegenüber monomerem Chl $a^{+\bullet}$ nahe, daß sich die Spindichte zu mehr als 85 % auf einem Chl *a* befindet [109].

- Die Auswertung von ESEEM- und ENDOR-Experimenten von $P700^{+\bullet}$ an isotopenmarkierten PSI-Komplexen ergab eine Spindichteverteilung zugunsten von einem der beiden Chl-Moleküle in P700 [139].

7.1.3 Schlußfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an mutierten PSI-Komplexen erhärten nicht nur die funktionelle Asymmetrie zwischen den beiden eng benachbarten Chl-Molekülen im PSI, sondern identifizieren auch P_B als das Pigment, das im oxidierten Zustand das ungepaarte Elektron und bei der Rekombination zum Triplett beide Elektronen mit gleichem Spin trägt. In den mutierten PSI-Komplexen wurde darüber hinaus keine Verschiebung der Spindichte zwischen P_B und P_A beobachtet. Diese Ergebnisse sowie die oben angeführten Untersuchungen am nicht modifizierten PSI belegen, daß die in der Röntgenstruktur des PSI identifizierte Chl-Moleküle nicht nachweisbar

elektronisch gekoppelt sind und somit kein Supermolekül[1] darstellen, da die Molekülorbitale dieser beiden Pigmente nicht überlappen. Der oxidierte primäre Elektronendonator $P700^{+\bullet}$ ist somit identisch mit ${P_B}^{+\bullet}$.

Die gegenüber dem monomeren Chl $a^{+\bullet}$ deutlichen Abweichungen in der Spindichteverteilung von ${P_B}^{+\bullet}$ im PSI gehen wahrscheinlich auf die leicht unterschiedliche Geometrie des Moleküls, die durch die Einbindung in das Proteingerüst induziert wird, und die verschiedenen Wechselwirkungen mit der umgebenden Matrix zurück. Der erhebliche Einfluß von Partialladungen in der Nähe der beiden Chl-Moleküle wurde im Zusammenhang mit den Redoxpotential von $P700^{+\bullet}$/P700 diskutiert (s. 5.3.1). Die hohe Empfindlichkeit der hfc der Methylgruppen an den Positionen 2, 7 und 12 des Porphyriringes im ${P_B}^{+\bullet}$ gegenüber solchen Effekten kam in dieser Arbeit und in Untersuchungen an modifizierten Chl-Molekülen klar zum Ausdruck (vgl. 5.7 und [109, 112]).

Die nicht nachweisbare elektronische Kopplung von P_A und P_B ist eindeutig abzugrenzen von der excitonischen Kopplung der beiden Pigmente. Dieser dipolare Wechselwirkung ist aufgrund der geringe Entfernung der beiden Moleküle und der voraussichtlichen Orientierung der Übergangsdipolmomente sogar sehr ausgeprägt. Die besonderen optischen Eigenschaften von P700 gehen im wesentlichen auf diese Art der Wechselwirkung zurück [39, 180, 181, 208].

7.2 Die Funktion von His(A676) und His(B656)

Die Auswirkungen der Substitutionen von His(A676) und His(B656) auf die biophysikalischen Eigenschaften von P700 zeigen, daß die mutierten Positionen im Proteingerüst des PSI in unmittelbarer Nachbarschaft zum primären Elektronendonator sein müssen. Es gelang allerdings nicht, die Bildung eines Pigmentpaares Chl *a*–Pheo *a* zu induzieren, wie es in den bRC beim Austausch eines der axialen Liganden gegen Leu beobachtet wurde [35]. Die analogen Substitutionen in *C. reinhardtii* führen zu Phänotypen, die den PSI-Komplex nicht in ausreichender Menge akkumulieren.

[1] Die oft verwendete Bezeichnung „Dimer“ wird in dieser Arbeit nicht für P700 verwendet, da dieser Begriff in der Literatur nicht eindeutig benutzt wird. Der Begriff Dimer kann sich insofern auf die molekulare Anordnung, die excitonischer Wechselwirkung oder die elektronische Struktur zweier Moleküle beziehen.

Redding *et al.* stellten ebenfalls fest, daß die Anreicherung von PSI bei Substitution mit Leu erheblich abnahm. Eine Isolierung des Komplexes wird nicht beschrieben [170]. Die EPR-Linienbreite von $P700^{+\bullet}$ in diesen Mutanten nahm jedoch gegenüber dem WT in Thylakoidpräparationen um 13 % zu. Die Autoren werteten diese Veränderung als möglichen Hinweis auf den Einbau eines Chl *a*–Pheo *a* als primären Elektronendonator.
Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, daß die EPR-Linienbreite in inhomogenen Präparationen deutlich von den Werten abweicht, die an den isolierten Partikeln beobachtet werden. Als Ursache werden Beiträge von anderen Radikalen vermutet, die insbesondere bei geringer PSI-Konzentration deutlich hervortreten (vgl. 5.3.5). Darüber hinaus ist die EPR-Linienbreite kein hinreichendes Kriterium für Aussagen über die Spindichteverteilung im $P700^{+\bullet}$-Radikal. Redding *et al.* setzen in ihrer Argumentation voraus, daß es sich bei $P700^{+\bullet}$ im WT-PSI um ein Supermolekül handelt, in dem der Spin über zwei Chl-Moleküle verteilt ist. Diese Annahme ist jedoch, wie oben ausführlich diskutiert wird, höchstwahrscheinlich nicht richtig. Eine eindeutige Klärung für die Ursache der Linienbreitenänderung in diesen Mutanten ist damit nur durch ENDOR-Spektroskopie möglich.

Die Charakterisierung von mutierten PSI-Komplexen, die kleine oder polare Aminosäuren anstelle von His(B656) oder His(A676) enthalten, ergeben in bezug auf die beobachteten Effekte eine große Übereinstimmung mit homologen Mutationen im bRC: Der Austausch eines axialen Liganden gegen Gly, Ser oder Asn in der Proteinuntereinheit M des bRC von *Rb. sphaeroides* erhöhte das Redoxpotential, veränderte die optischen Eigenschaften des Photosystems und beeinflußte die Spindichte des primären Elektronendonators P865 [186]. In den bRC dieser Mutanten besteht P865 aus BChl *a*-Dimer. Die Bildung eines Heterodimers wurde nur durch den Austausch eines der beiden His gegen Leu(Glu) erreicht [34, 185] Es wird vermutet, daß in diesen mutierten bRC der fehlende axiale Ligand durch ein Wassermolekül ersetzt wird [83, 186].

Aus den experimentellen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird der Schluß gezogen, daß P700 durch His(B656) axial ligandiert wird. Für die Substitutionen von His(A676) ist wegen der vergleichsweise geringen Auswirkungen auf die biophysikalischen Eigenschaften von P700 diese Zuordnung nicht eindeutig zu erkennen. Aufgrund der sehr hohen Homo-

logie in der Aminosäuresequenz von PsaA und PsaB und aufgrund des symmetrischen Aufbaus dieser beiden Proteinuntereinheiten im PSI-Komplex [185] ist davon auszugehen, daß His(A676) das Chl-Molekül, P_A, axial ligandiert. Neben den Übereinstimmungen, die sich aus dem Vergleich mit mutierten bRC ergeben, sprechen auch die Untersuchungen an anderen Mutanten des PSI-Komplexes und die zur Zeit bekannten kristallographischen Daten für eine axiale Ligandierung durch die beiden mutierten Histidine:

- Die Substitution aller verbleibenden Histidine in den 6 C-terminalen Transmembranhelices, die den Kern des Reaktionszentrums bilden [184, 185], vermindert zwar in einigen Fällen die PSI-Menge in den Thylakoidmembranen, eine Änderung der physikalischen Eigenschaften von P700 wird jedoch nur beim Austausch von His(A676) und His(B656) beobachtet [52, 121, 170, 215].

- Die dreidimensionale Struktur des PSI-Komplexes aus *S. elongatus* bei 4 Å spektraler Auflösung zeigt, daß die jeweiligen Helices X der Untereinheiten PsaA und PsaB zu P700 den geringsten Abstand aufweisen. Eine Koordinierung des primären Elektronendonators durch einen Aminosäurerest der Helix X wurde postuliert, da die Abstände der anderen Transmembranhelices zu diesem Chl-Paar eine axiale Ligandierung kaum ermöglichen [185]. Die Sekundärstrukturvoraussage für die Polypeptidsequenz der Untereinheiten PsaA und PsaB ergibt, daß die Positionen von His(A676) und His(B656) innerhalb der Helix X der jeweiligen Proteinuntereinheit etwa in der Höhe von P700 liegen [185].

- Die axiale Ligandierung von proteingebundenen Chl erfolgt in fast allen bekannten Proteinstrukturen bevorzugt über den N^{ϵ}-Stickstoff des His. In den Antennenproteinkomplexen LHC-II aus Erbse wurden neben His zwar auch Asn, Gln und Glu als axiale Liganden zu einem Chl identifiziert [125]. In allen untersuchten Reaktionszentren, deren Struktur bekannt ist, treten jedoch nur Histidine als Bindungspartner zum BChl auf [130, 64, 199]. Aufgrund des homologen Aufbaus der am Elektronentransport beteiligten Kofaktoren und der analogen Organisation des Proteingerüstes von PSI und bRC [185] ist davon auszugehen, daß die zentrale Position des primären Elektronendonators in hohem Maße konserviert ist.

Neben der Identifizierung der zentralen Bindungspartner des primären Elektronendonators ergibt sich aus den Charakterisierungen der Mutanten ein weiteres unerwartetes Ergebnis: Die Analogie im Aufbau der Reaktionszentren in bezug auf die ersten an der Ladungstrennung beteiligten Kofaktoren, die zwischen PSI und dem bRC beobachtet wird, läßt vermuten, daß die konservierten Aminosäuren, die diese Pigmente binden, auch funktionell am Elektronentransport beteiligt sind. In allen bisher untersuchten mutierten Reaktionszentren wurde jedoch der Einfluß auf die lichtabhängige Ladungstrennung durch den Austausch des axialen Liganden kaum verändert. Selbst in den Heterodimermutanten im bRC sind lediglich die Quantenausbeute und die Reduktionsrate durch das lösliche Cytochrom c_2 geringer als im WT [34, 135]. Die Substitution der axialen Liganden wirkt sich somit – soweit sie in dieser Arbeit analysiert wurden – nicht wesentlich auf die Funktion der Photosysteme aus, obwohl die spektralen und chemischen Eigenschaften des primären Donators verändert wurden.

In *C. reinhardtii* verringert sich durch die Mutationen jedoch sehr deutlich die PSI-Menge in den Thylakoidmembranen. Die Funktion von His(A676) und His(B656) scheint daher überwiegend struktureller Art zu sein. Offensichtlich wird der Aufbau des Proteinkomplexes infolge des Austausches dieser beiden Aminosäuren erschwert. Die gute Ligandierung des Chl-Moleküls über das zentrale Mg-Atom, die der Imidazolring gewährleistet, wird sicherlich dazu beitragen, daß zwei dieser Pigmente in unmittelbarer Nähe in das Proteingerüst des PSI eingebunden werden, um als P700 zu interagieren. Die Verwendung von His als axialen Liganden in photosynthetischen Reaktionszentren ist – zumindest in bezug auf den primären Donator – wahrscheinlich weniger auf einen funktionellen Beitrag während der Ladungstrennung als auf eine Funktion beim Aufbau des Proteinkomplexes zurückzuführen.

7.3 Die Funktion von Tyr(B659)

In *C. reinhardtii* stellt das Tyr(B659) eine punktuelle Abweichung in einem hochkonservierten Bereich der Aminosäuresequenz gegenüber anderen photoautotrophen Organismen dar. Es wurde vermutet, daß dieser Unterschied im Aufbau des PSI für die spektroskopischen Abweichungen in den Charateristika von P700 verantwortlich sein könnte.

Tyr(B659) ist in der Abfolge der Aminosäurensequenz von PsaB drei Positionen vom His(B656) entfernt, das als einer der axialen Liganden zum P700 identifiziert wurde. In der Transmembranhelix X befindet sich die Seitenkette des Tyr(B659) somit fast eine vollständige Windung oberhalb von His(B656) in Richtung der Eisen-Schwefel-Cluster. Die Seitenkette des Tyr(B659) ist also in unmittelbarer Umgebung von P_B, da die Ganghöhe einer α-Helix 5,4 Å und der Durchmesser des Porphyrinringes etwa 10 Å beträgt. Eine direkte Wechselwirkung der Aminosäureseitenkette des Tyr(B659) mit dem primären Eletronendonator ist sehr wahrscheinlich. Diese Vermutung wird durch die Untersuchung der Substitutionen YH(B659) und YA(B659) bestätigt, die beide die Eigenschaften von P700 beeinflussen. Die Auswirkungen dieser Aminosäuresubstitutionen sind jedoch in zweifacher Hinsicht unerwartet:

1. Die Substitution durch die in allen übrigen phototrophen Spezies an homologer Position konservierte Aminosäure Trp führt zu einem PSI-freien Phänotyp.

2. Die Mutation YA(B659) zeigt in den biophysikalischen Charakteristika von P700 einige Parallelen zu den Substitutionen am His(B656).

Zum ersten Punkt gibt es keine Erklärung, die durch weitere experimentelle Daten gestützt werden kann. Die beiden folgenden Hypothesen sind daher rein spekulativ:
a) Die PSI-Struktur in *C. reinhardtii* weist trotz der hohen Übereinstimmung mit den homologen PSI-Sequenzen anderer Organismen in der Umgebung des primären Elektronendonators größere Abweichungen auf, die aus sterischen Gründen ein Trp an dieser Position nicht zulassen.

b) Die Grünalge besitzt für den Aufbau des Proteinkomplexes PSI aus den einzelnen Proteinuntereinheiten und den Kofaktoren eine *assembly*-Maschinerie, die sich von den anderen photoautotrophen Spezies unterscheidet. So mag zum Beispiel ein Protein, das beim Einbau der Chl-Moleküle von Bedeutung ist – allerdings nicht Bestandteil des PSI-Komplexes ist – in *C. reinhardtii* anders aufgebaut sein. Der Austausch mit Trp könnte dann die Wechselwirkung mit diesem Protein stören und den Einbau des Chlorophylls verhindern.

Ob eine dieser Hypothesen zutrifft, kann nur geklärt werden, wenn die Struktur des PSI-Komplexes aus *C. reinhardtii* in hoher Auflösung vorliegt oder der *assembly*-Prozeßes

chlorophyllbindender Proteinkomplexe weitgehend verstanden ist. Eine eindeutige Interpretation der gewonnenen Ergebnisse ist daher in absehbarer Zeit nicht zu erwarten.

Der zweite Punkt, der den Einfluß von Tyr(B659) auf P700 betrifft, läßt sich hingegen im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Substitutionen am His(B656) besser verstehen: Die auf den ersten Blick zum Teil ähnlichen Auswirkungen, die die Mutationen am His(B656) und Tyr(B659) aufweisen, zeigen bei näherer Betrachtung einige signifikante Unterschiede. In den optischen Differenzspektren werden besonders in dem Bereich, in dem die Wechselwirkungen mit den benachbarten Pigmenten auftreten, vergleichbare Effekte zwischen YA(B659) und den verschiedenen His-Substitutionen gemessen. Die Hauptausbleichungsbande von P700 wird nur durch den Austausch von His(B656) blauverschoben. Die Lage dieser Bande spiegelt die excitonische Wechselwirkung von P_B und P_A wider, die im wesentlichen von der Orientierung und dem Abstand der beiden Pigmente zueinander bzw. deren Übergangsdipolmomenten abhängig ist [36]. Aus dem Vergleich der Substitutionen am His(B656) und am Tyr(B659) ergibt sich dann, daß der Austausch des Histidins den Abstand oder die Geometrie der beiden Chl-Moleküle stärker beeinflußt als die Substitution von Tyr(B659). Der größere Anstieg des Redoxpotentials der His-Mutationen unterstützt diese These.

Es bleibt zu klären, wie die Verschiebungen der Spindichte im $P700^{+\bullet}$-Radikal bei der Mutation YA(B659) und den Substitutionen am His(B656) zustande kommen, die sich aus den ENDOR-Spektren dieser Mutanten ergeben.

Im bRC wird der primäre Elektronendonator P865 oder P960 in *Rb. sphaeorides* bzw. *Rps. viridis* neben der axialen Ligandierung zusätzlich durch H-Brücken im Proteingerüst fixiert. In *Rb. sphaeroides* existiert eine H-Brücke zum Sauerstoffatom der Acetylgruppe der P_L-Hälfte von P865 [62, 64, 199]. In *Rps. viridis* werden die Sauerstoffatome der Acetylgruppen von P_L und P_M durch H-Brücken fixiert [His(L168) bzw. Tyr(M195)]. Zusätzlich gibt es eine weitere H-Brücke zwischen dem Ketosauerstoff am exocyklischen Ring E von P_L und Thr(L248) [57, 64, 130].

Im PSI könnte eine H-Brücke zwischen Tyr(B659) und dem Sauerstoffatom der Ketogruppe an Position 13^1 oder dem Carbonyl-Sauerstoff der Esterfunktion an der Position

13^2 des P_B existieren. Die letztgenannte Variante einer H-Brücke wurde zum Beispiel im bRC von *Rb. sphaeroides* zwischen dem $Pheo_A$ und dem Trp(L100) postuliert [30, 150]. Die Ligandierung durch eine Wasserstoffbrücke ist am Chl *a* nur am exocyklischen Ring E möglich, da am Ring A eine Vinylgruppe und keine Acetylfunktion wie im BChl *a* substituiert ist.

Wenn Tyr(B659) im PSI ebenfalls eine H-Brücke zum P700 bildet, wird in YH(B659) das His mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine solche Bindung eingehen, da der Imidazolring ein vergleichbares Seitenkettenvolumen aufweist und ähnliche Polarität besitzt. Das hohe Potential des Imidazolringes zur Ausbildung von H-Brücken zu (B)Chl-Pigmenten wird durch die erfolgreiche Knüpfung solcher Bindungen zum P865 in mutierten bRC von *Rb. sphaeroides* belegt [6]. Die geringfügigen Veränderungen der optischen Eigenschaften, des Redoxpotentials und der Spinverteilung, die im mutierten PSI aus YH(B659) beobachtet werden, bestätigen die gute Kompensation dieser Aminosäuresubstitution.

In der Mutante YA(B659) hingegen ist wegen des unpolaren Charakters und der geringen Größe der Seitenkette von Ala eine H-Brücke zum P700 auszuschließen. Die besonders auffälligen Veränderungen der Hyperfeinwechselwirkung der Methylgruppe an Position 12 des Porphyrinringes, die im ENDOR-Spektrum nachgewiesen wurden, unterstützen diese Interpretation.

Die Methylgruppe an Position 12 reagiert besonders empfindlich auf geometrische Veränderungen am Ring E, wie Untersuchungen mit modifiziertem Chl *a* gezeigt haben [113]. Der Ring E ist aufgrund der ungewöhnlichen Bindungslängen bereits stark gespannt und besitzt die Tendenz, aus der Ebene des Porphyrinringes zu „kippen“. Der benachbarte Ring C wird dadurch ebenfalls ein wenig aus seiner idealen planaren Konformation gedreht. Eine H-Brücke zu einem der beiden Substituenten am Ring E kann somit einen erheblichen Einfluß auf die Geometrie des Porphyrinringes haben, der zu den Veränderungen in den Methylkopplungen führt.

Es ist jedoch nicht unbedingt erforderlich, daß sich die Geometrie des Moleküls ändert. Die Verteilung der Spindichte im Chl $a^{+\bullet}$ ist ebenfalls abhängig von der Anordnung der elektrischen Dipole in der Umgebung des Radikals. Eine Verringerung der negativen Partialladung in der Nachbarschaft von P_B (Substitution von Tyr(B659) gegen Ala) wird

eine Verschiebung der Elektronenwolke im $P_B{}^{+\bullet}$ zur Folge haben. Die oben angesprochene „Konformationsänderung“ wird sich also auch auf die elektronische Struktur im oxidierten primären Elektronendonator auswirken.

Diese plausible Deutung der in der Mutante YA(B659) auftretenden Verschiebungen der Spindichte wirft allerdings die Frage auf, weshalb die Substitution von His(B656) die Hyperfeinkopplung der Methylgruppe ebenfalls verändert. Käß räumte in seiner Arbeit bereits ein, daß die Verschiebung der hfc durch die Substitution von His(B656) eher einem lokalen Effekt am P_B entspricht und favorisiert eine Ligandierung in der Nachbarschaft der Methylgruppe an Position 12 des Porphyrinringes [111].

Wird jedoch angenommen, daß im WT-PSI P_B sowohl durch den axialen Liganden als auch über eine H-Brücke zum Tyr(B659) im Proteingerüst fixiert wird, läßt sich die Verschiebung von hfc, die im ENDOR-Spektrum durch den Austausch eines dieser Bindungspartner induziert wird, anschaulich erklären: Im WT wird P_B über die doppelte Fixierung in eine – durch die beiden Bindungspartner des Proteingerüstes – sehr festgelegte Konformation gebracht (Abb. 7.1a). Fällt aufgrund der Aminosäuresubstitution einer der Liganden weg, liegt P_B in einer weniger fixierten Konformation vor (Abb. 7.1a/b). Die Veränderung des Porphyrinringes macht sich am Ring E besonders deutlich bemerkbar, da aufgrund der Bindungsverhältnisse hier die größten Verzerrungen in der Geometrie des Moleküls zu erwarten sind. Dies wirkt sich dann auch auf die Spindichteverteilung im oxidierten Pigment aus. In dem, in Abb. 7.1 gezeigten, Modell unterscheidet sich P_B im WT-PSI und in den mutierten PSI-Komplexen überwiegend durch die strukturelle und/oder elektronische Konformationsänderung, die durch die gekrümmte Darstellung von P_B im WT und die planare Struktur in den substitutierten Modellen symbolisiert wird.

Die Abb. 7.1 veranschaulicht, weshalb nur die Mutationen am His(B656) zu einer meßbaren Änderung der excitonischen Wechselwirkung von P_B und P_A führen, die in den optischen Spektren als Blauverschiebung der Hauptausbleichung auftritt: Die Konformationsänderung des Porphyrinringes ist unabhängig vom substituierten Liganden zu beobachten, der Abstand zum P_A ändert sich jedoch nur beim Austausch des axialen Liganden His signifikant.

Die Hypothese der zwei Konformationen wird bekräftigt durch den Vergleich der Absorp-

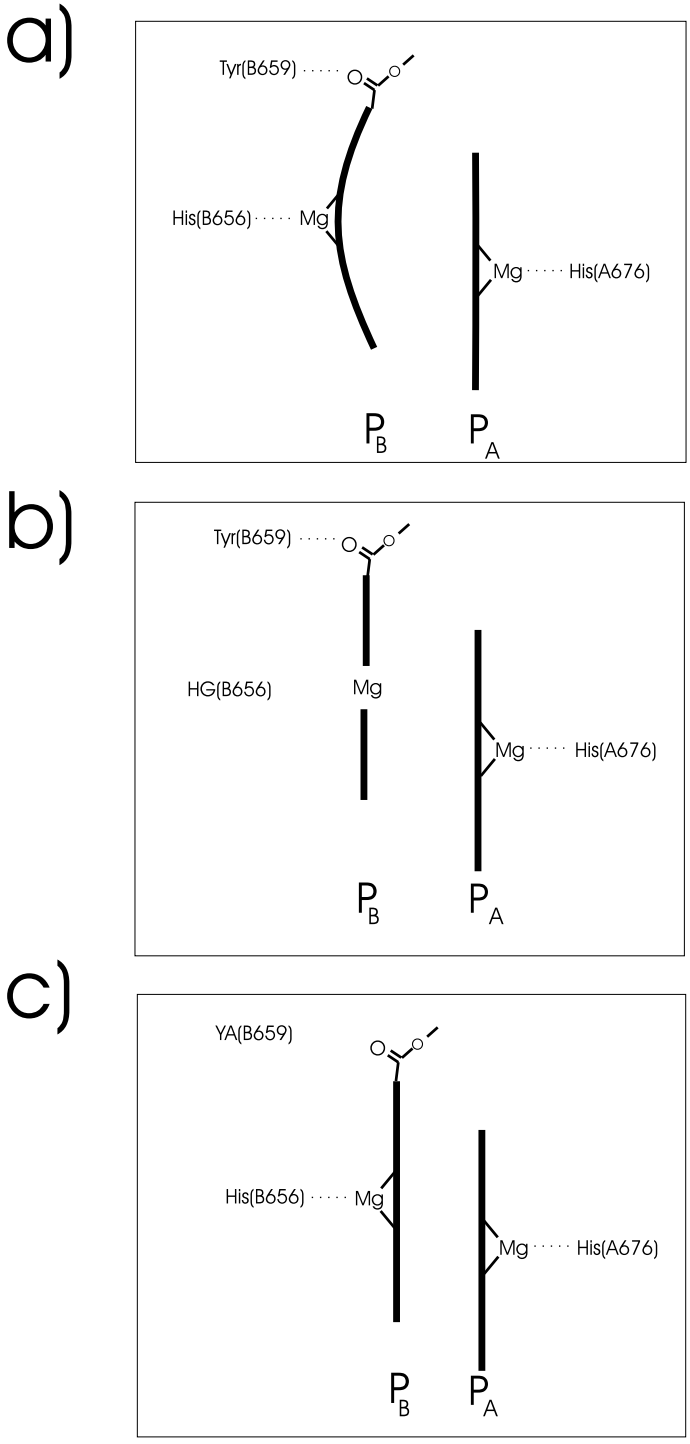

Abbildung 7.1:
a) Schematisches Modell zur Ligandierung von P_B und P_A durch Tyr(B659) und His(B656) bzw. His(A676) im WT
b) Konformationsänderung durch die Mutation HG(B656)
c) Konformationsänderung durch die Mutation YA(B659).
Die dargestellte Geometrieänderung von P_B symbolisiert eine unterschiedliche strukturelle oder elektronische Konformation des Moleküls.

tionsdifferenzspektren von YA(B659) und am His(B656) substituierten PSI-Komplexen bei tiefen Temperaturen im Bereich von 650–690 nm:
Die Spektren von YA(B659) und den Mutationen am His(B656) – mit Ausnahme von HQ(B656) – sind in diesem Bereich deckungsgleich (siehe Abb. 6.3, S. 145). Auch im T–S-Spektrum ist dieser Bereich, der die Wechselwirkung mit den benachbarten Pigmenten widerspiegelt, nahezu identisch (siehe Abb. 6.4, S. 146). Die excitonische Kopplung zu diesen Chl-Molekülen ist somit jeweils unabhängig davon, ob Tyr(B659) gegen Ala ausgetauscht oder eine Substitution am His(B656) durch Ser, Asn, Cys oder Gly eingeführt wurde.

7.4 Die Koordinierung von P700 durch das Proteingerüst

In der vorliegenden Arbeit wurde His(B656) durch die experimentellen Befunde als axialer Ligand zum P_B identifiziert. Die experimentellen Ergebnisse der Substitutionen am His(A676) sind in dieser Hinsicht nicht so eindeutig. Aus Symmetriegründen, experimenteller Daten anderer Arbeitsgruppen [52, 170] und aufgrund der Analogie zum Aufbau der bRC ist davon auszugehen, daß His(A676) der axiale Ligand zum P_A ist. Darüber hinaus deuten die Resultate, die sich aus der Substitution des Tyr(B659) ergaben, auf eine H-Brücke zwischen dieser Aminosäure und P_B hin. Der primäre Elektronendonator ist dann wie in Abb. 7.2 gezeigt in das Proteingerüst eingebunden.
Die Lage und der Verlauf der Helices entspricht in diesem Modell der Röntgenstruktur bei 4 Å-Auflösung ebenso wie die Position der beiden Chl-Moleküle.[2] Die beiden Histidine – His(A676) und His(B656) – wurden aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit axial zu den zentralen Mg-Atomen der Porphyrinringe angeordnet. Es wird eine Ligandierung über das N^{ϵ}-Atom der Imidazolgruppe angenommen, da in nahezu allen bekannten Proteinstrukturen eine Koordinierung über das distale Stickstoffatom erfolgt [200].
Die Orientierung der Porphyrinringe in bezug auf die Pseudo-Symmetrieachse geht auf die Auswertung von ENDOR-Experimenten am PSI-Einkristall zurück [109, 113]. Direkt

[2] Die Zuordnung der Proteinuntereinheiten PsaA und PsaB zu den Helices ist willkürlich. Die vertauschte Anordnung führt im Rahmen dieses Modells zum gleichen Ergebnis.

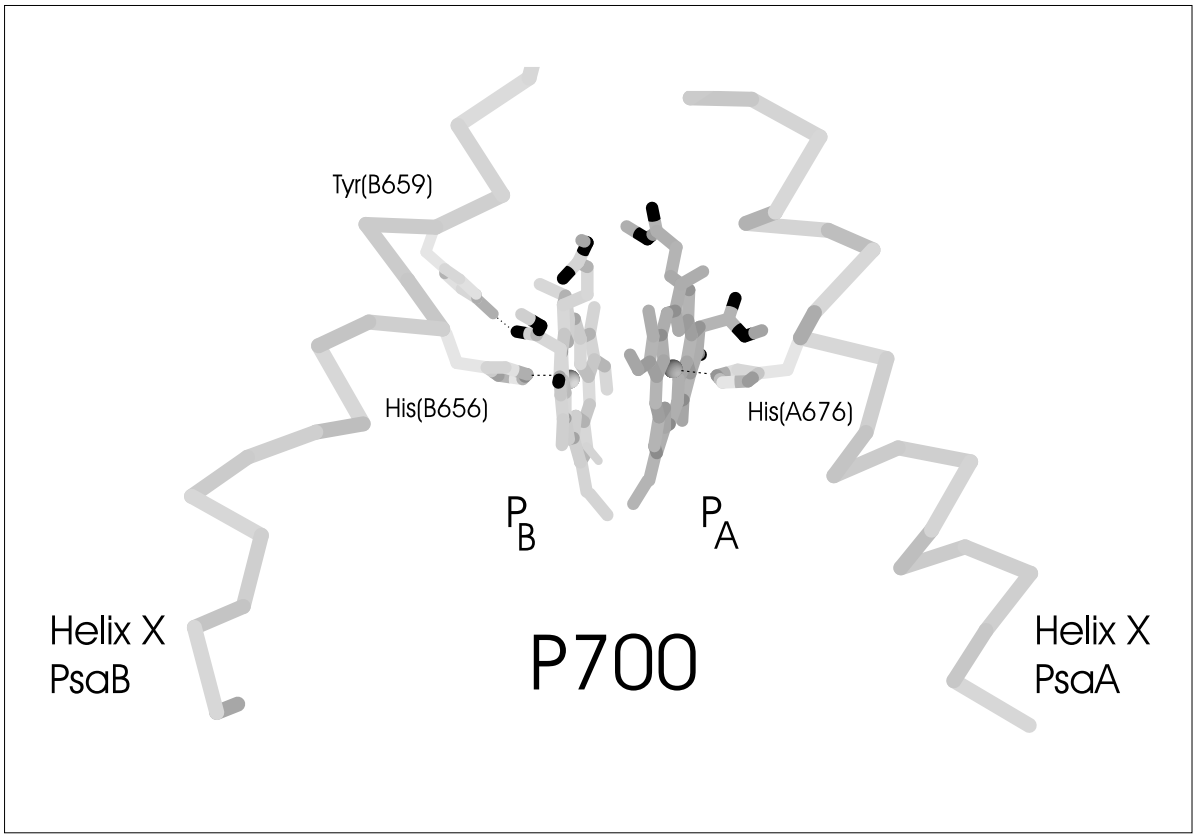

Abbildung 7.2: Modell der Ligandierung von P700 im PSI-Komplex. Der Verlauf der Helices und die Position des Chl-Paares entsprechen der Kristallstruktur bei 4 Å-Auflösung von PSI aus *S. elongatus* nach [184](Brookhaven Datenbankeintrag: 1PPS). Die Orientierung der Molekülachsen der beiden Chlorophylle in bezug auf die Kristallachsen geht auf Käß [109, 113] zurück. Die Position der Liganden wurde aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit zugeordnet.

bestimmt wurde aus diesen Messungen allerdings nur die Lage der Molekülachsen des spintragenden Chl (= P_B). Die Orientierung dieses Porphyrinringes ist nahezu identisch mit der von P865 im bRC von *Rb. sphaeroides* und *Rps. viridis* [199, 64]. Aufgrund der hohen Übereinstimmung mit dem bRC, die sich in der gesamten Anordnung der Kofaktorkette fortsetzt, ist die Annahme, daß auch im PSI das zweite Chl-Molekül – P_A – analog angeordnet ist, gerechtfertigt.

Das ebenfalls untersuchte Tyr(B659) befindet sich aufgrund der Windung der α-Helix etwa 4,5 Å oberhalb des C_α-Kohlenstoffatoms des His(B656) in Richtung der Eisen-Schwefel-Cluster. Bei dieser Anordnung von P700 wird deutlich, daß die Seitenkette von Tyr(B659) in Richtung der Esterbindung am Ring E von P_B weist. Der Abstand zwischen dem Sauerstoff des Tyr(B659) und den Sauerstoffen am P_B beträgt in diesem Modell

ca. 3–5 Å, die Entfernung zum Keto-Sauerstoff an Position 13^1 hingegen mehr als 5 Å. Eine H-Brücke zwischen der Aminosäureseitenkette und einem Substituenten des Porphyrinringes wäre nach dieser Anordnung wahrscheinlich. Es ist aufgrund der fehlenden Genauigkeit in den Atomkoordinaten nicht zu entscheiden, ob die H-Brücke zum Keto-Sauerstoff oder zur Estergruppe gebildet wird. Die Koordinierung des Porphyrinringes über die Hydroxylgruppe des Tyr(B659) und den Carbonylsauerstoff der Esterfunktion ist jedoch aus zwei Gründen der Bindung über den Ketosauerstoff vorzuziehen:

1. Eine Verknüpfung über die Estergruppe resultiert in einer annähernd linearen H-Brücke; die Bindung über den Keto-Sauerstoff an Position 13^1 wäre gewinkelt und damit deutlich schwächer.

2. Das π-Elektronensystem des Porphyrinringes erstreckt sich über den Keto-Sauerstoff an Position 13^1, jedoch nicht über die Esterfunktion, da sich im bRC eine Substitution an der Position 13^1 genau gegenteilig auf das Redoxpotential auswirkt: Eine zusätzliche H-Brücke erhöht das Potential von $P865^{\bullet+}/P865$ um 60 bis 130 mV. Der Bruch der im WT vorhandenen H-Brücke senkte das Potential um 90 mV [135].

In der Mutante YA(B659) im PSI, in der diese im WT postulierte H-Brücke nicht vorhanden sein kann, steigt das Redoxpotential jedoch an. Mutationen im bRC mit geringerer H-Brückenzahl zum primären Donator erhöhten hingegen das Potential.
Im Gegensatz zum Keto-Sauerstoff an Position 13^1 ist die Esterfunktion am 13^2-Kohlenstoffatom nicht Teil des konjugierten π-Systems des Porphyrinringes. Die Auswirkungen auf das Redoxpotential beim Bruch einer solchen H-Brücke sind dann im wesentlichen von Änderungen in der Konformation des Chl-Moleküls oder vom schwer einzuschätzenden Einfluß elektrostatischer Wechselwirkungen abhängig. Aus diesen Gründen wird in diesem Modell eine H-Brücke zwischen Tyr(B659) und dem Sauerstoff der Esterfunktion als wahrscheinlicher angesehen.

An der zum Tyr(B659) homologen Position in PsaA befindet sich Trp(A679) (nicht dargestellt). Auch auf dieser Seite ist die Bildung einer H-Brücke zwischen P_A und dem

Stickstoffatom der Indolgruppe dieser Aminosäureseitenkette theoretisch möglich.[3] Zu dieser Position gibt es allerdings bislang keine experimentellen Daten.

Aus den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergab sich folgende Koordinierung von P700 durch das Proteingerüst: Der primäre Elektronendonator wird im Proteingerüst auf der Seite von P_B durch His(B656) axial ligandiert und sehr wahrscheinlich über eine H-Brücke zum Tyr(B659) fixiert, die vermutlich an den Sauerstoff der Methylestergruppe des Porphyrinringes bindet. P_A wird durch His(A676) axial ligandiert.

7.5 Ist der Elektronentransfer im PSI uni- oder bidirektional?

In der Kristallstruktur des PSI wurden zwei symmetrisch angeordnete Kofaktorzweige im Zentrum des Proteingerüstes bis zum Eisen-Schwefel-Cluster F_X identifiziert. Aufgrund dieser Anordnung ist ein bidirektionaler Elektronentransport vom P700 bis zum F_X möglich. Die spektroskopischen Messungen geben bislang keinen Aufschluß darüber, ob nur einer oder beide Pigment-Äste genutzt werden [32]. Die strukturelle Homologie zwischen PSI und den bRC legt jedoch nahe, daß nur einer der beiden potentiellen Elektronentransferwege aktiv ist.

Die Identifizierung von P_B als das spintragende Chl-Molekül im $P700^{+\bullet}$ bekräftigt diese Hypothese, da hierdurch auch funktionell eine Übereinstimmung mit dem bRC gezeigt wurde. Die asymmetrische Natur des primären Elektronendonators wurde zwar bereits aufgrund der vielen Übereinstimmungen zwischen Chl $a^{+\bullet}$*und* $P700^{+\bullet}$ vermutet (siehe Diskussion in 7.1), es war jedoch nicht eindeutig zu klären, ob diese Asymmetrie abhängig davon ist, welcher Kofaktorzweig aktiv wird. Das ungepaarte Elektron hätte in einem Teil der PSI-Population auf P_A, im anderen Teil auf P_B lokalisiert sein können, wenn die Eigenschaften der beiden Pigmente völlig identisch sind.

In Kombination mit den Abstandsbestimmungen zwischen P700 und dem sekundären Akzeptor A_1 aus transienten EPR-Experimenten, die für PSI aus Spinat, *C. reinhardtii* und *S. synechococcus* innerhalb des Fehlers identisch sind, ergibt sich eine überzeugende

[3] Das Potential von Trp zur Bildung einer H-Brücke zum 13^2-Methylester wurde im bRC von *Rb. sphaeroides* für das BPhe *a* im aktiven Zweig postuliert [30, 150].

Argumentation für den unidirektionalen Elektronentransfer im PSI:
Die Position und die Orientierung des Phylloquinon-Akzeptors wurde durch gepulste EPR-Messungen am Radikal-Paar $P700^{+\bullet}A_1^{-\bullet}$ im Kristall bestimmt. Diese Experimente ergaben zwei symmetrische Positionen, abhängig davon, welche der beiden Chl-Moleküle als spintragendes Pigment betrachtet wurde [17, 16]. Obwohl die Auswertung dieser Experimente zeigt, daß nur ein Abstand $P700^{+\bullet} \longleftrightarrow A_1^{-\bullet}$ in den PSI-Komplexen existiert, war nicht auszuschließen, daß ein Gemisch von PSI-Partikeln vorlag, bei denen einerseits $P_A{}^{+\bullet}$ und das $A_{1A}^{-\bullet}$ (Phyllochinon des Kofaktorzweiges auf der PsaA-Seite) das Radikalpaar bildeten, andererseits die positive Ladung auf dem $P_B{}^{+\bullet}$ verblieb und das symmetrisch angeordnete $A_{1B}^{-\bullet}$ reduziert wurde.
Die eindeutige Zuordnung des ungepaarten Elektrons im $P700^{+\bullet}$ zum P_B schließt dieses Modell eindeutig aus. Der Elektronentransfer im PSI ist somit ebenfalls wie im bRC unidirektional. Welche Eigenschaften der Proteinumgebung für die funktionelle Asymmetrie in den Photosystemen verantwortlich sind, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

8

Zusammenfassung und Ausblick

Seitdem die Röntgenstruktur des PSI in einer Auflösug von 4 Å vorliegt, ist eindeutig gesichert, daß in dem Proteinkomplex ein Paar eng benachbarter Chl-Moleküle enthalten ist. Aufgrund der Lage dieser Pigmente im Proteingerüst und in Homologie zum BChl-*special pair* in bRC wurde das Chl-Paar mit dem primären Elektronendonator P700 gleichgesetzt. Die Anordnung der beiden Pigmente im PSI steht in gewissem Widerspruch zu einigen spektroskopischen Ergebnissen, die den Eindruck erwecken, daß der Kofaktor aus einem Chl *a*-Monomer besteht. Von besonderer Bedeutung ist es deswegen, den Einfluß der Proteinumgebung auf die Eigenschaften von P700 zu untersuchen, um weitere strukturelle Informationen über die Einbindung in das Proteingerüst zu erhalten.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung des primären Elektronendonators P700 in PSI-Komplexen, die durch Punktmutationen modifiziert worden waren. Ziel war es, die Bindungspartner des Kofaktors im Proteingerüst zu lokalisieren und deren Einfluß auf die Funktion des Photosystems zu untersuchen. Insbesondere sollten die axialen Liganden von P700, die die zentralen Mg-Atome der beiden Porphyrinringe koordinieren, identifiziert werden.

Um die Untersuchungen an den mutierten PSI-Komplexen durchzuführen, waren umfangreiche Vorarbeiten notwendig. Der Austausch der Aminosäuren führte zu einer erheblichen Verringerung des PSI-Gehaltes in den Thylakoidmembranen. Die Präparation des PSI-Komplexes aus den Thylakoidmembranen wurde deswegen neu entwickelt. Diese Methode gewährleistete eine Anreicherung des Proteinkomplexes mit hoher Ausbeute,

auch wenn die Ausgangsmenge in den Mutanten gering war.
Die wesentliche Grundlage der neuen Präparationsmethode stellte die *C. reinhardtii*-Zelllinie CC2696 dar. Der aus diesen Zellen isolierte PSI-Komplex wurde in hohen Ausbeuten homogen isoliert und biochemisch charakterisiert. Neben dem PSI-Komplex enthält diese Präparation die CF_0-ATP-Synthase. Die am PSI gebundenen Antennenproteinkomplexe LHC-I und LHC-II sind in der hier vorgestellten Präparation nicht vorhanden. Die Proteinuntereinheit PsaF des PSI wurde ebenfalls abgetrennt.

Die biophysikalischen Eigenschaften des PSI aus dem WT der Grünalge *C. reinhardtii*, auf deren Grundlage die Effekte der mutierten PSI-Komplexe diskutiert werden, zeigen im Vergleich mit dem PSI aus *S. elongatus* und pflanzlichem PSI einige Unterschiede in den optischen Eigenschaften von P700. Interessant ist, daß der isolierte PSI-Komplex der Grünalge Chl *b* enthält. Dieses Pigment wurde bisher in höheren Pflanzen nicht als Bestandteil des PSI-Komplexes nachgewiesen. Die elektronische Struktur des oxidierten primären Donators $P700^{+\bullet}$, das Redoxpotential von $P700^{+\bullet}$/P700 und der Abstand zum sekundären Akzeptor A_1 ist hingegen im WT-PSI aus *C. reinhardtii* vergleichbar mit den Werten, die für PSI aus pflanzlichen Präparationen oder Blaualgen publiziert sind.

Die Substitution von His(B656), His(A676) und Tyr(B659) verringert die Akkumulation des PSI-Komplexes in der Thylakoidmembran. Insbesondere der Austausch gegen große hydrophobe Aminosäuren bewirkt eine so starke Abnahme des Proteinkomplexes, daß die Proteinmenge für eine weitergehende biophysikalische Charakterisierung nicht ausreichend ist.
Die Mutationen, die den Einbau kleiner oder polarer Seitenketten in den PSI-Komplex generierten, verringern den Gehalt an PSI in moderater Weise, so daß eine Isolierung des Proteinkomplexes gewährleistet ist. Die modifizierten PSI-Komplexe weisen Veränderungen in den optischen Eigenschaften von P700, beim Redoxpotential und – bei Substitution in PsaB – bei der Spindichteverteilung des ungepaarten Elektrons im $P700^{+\bullet}$ auf. Aufgrund der Interpretation der in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Ergebnisse und der derzeit vorliegenden Daten aus der Literatur werden His(B656) und His(A676) als axiale Liganden zum P700 identifiziert. Darüber hinaus sprechen die Auswirkungen der Aminosäuresubstitution am Tyr(B659) mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, daß die-

se Seitenkette eine H-Brücke zu einem Substituenten am Ring E von P_B ausbildet. Im Strukturvorschlag wird der Carbonylsauerstoff des Methoxyesters an der Position 13^2 von P_B als H-Brückenbindungspartner zum Tyr(B659) favorisiert.

Neben der strukturellen Information, die sich aus den Untersuchungen an den mutierten PSI-Komplexen der vorliegenden Arbeit ergibt, wird die elektronische Struktur des oxidierten primären Elektronendonators aufgeklärt. Das in der Struktur identifizierte, eng benachbarte Chl *a*-Paar, das bereits zur Verwendung des Begriffs „Chl-Dimer" verleitete, besitzt kein gemeinsames Molekülorbital und ist somit kein Supermolekül. Das ungepaarte Elektron im oxidierten $P700^{+\bullet}$ ist vielmehr ausschließlich auf P_B lokalisiert. Dieses Ergebnis erklärt die sich scheinbar widersprechenden Resultate der spektroskopischen Untersuchungen und der Anordnung der beiden Chl-Moleküle im PSI.

Ausblick

Die bald erwartete Röntgenstruktur des PSI mit hoher Auflösung wird ein wichtiger Ansatzpunkt sein, um einen tieferen und genaueren Einblick in den Aufbau der Elektronentransportkette zu gewinnen. Aber auch in Zukunft muß das strukturelle Modell des Photosystems, das natürlich wichtige Informationen über die Abstände der Kofaktoren zueinander und zu den Aminosäureseitenketten des Proteingerüstes beinhaltet, in bezug auf die funktionelle Bedeutung untersucht werden. Der Proteinkomplex mit seiner Vielzahl an verschiedenen Kofaktoren ist ein zu komplexes Gebilde und die darin ablaufenden Prozesse zu vielfältig, als daß der Mechanismus der Ladungstrennung und des Elektronentransfers nur aus den Atomkoordinaten ersichtlich wird. Gerade das Ergebnis der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, wie schnell strukturelle Daten zu voreiligen Schlüssen verleiten, die erst durch gezielte Experimente aufgeklärt werden.
Es wird somit auch in Zukunft erforderlich sein, durch Manipulation des PSI-Komplexes oder neue hochauflösende Meßverfahren die Funktion des Photosystems zu untersuchen.

Der primäre Elektronendonator als Startpunkt der lichtgetriebenen Ladungstrennung wird dabei weiterhin von großem Interesse für experimentelle Untersuchungen sein. Die durch das Protein geschaffene Umgebung von P700 einschließlich der benachbarten Pigmente stellt eine wichtige Voraussetzung für den Elektronentransfer dar. Die gezielte Einführung von Punktmutationen in der Nachbarschaft von P700 ist somit auch zukünf-

tig eine Option, um die Wechselwirkung zwischen Protein und Pigment zu analysieren.

Ein bisher bezüglich der in dieser Arbeit vorgestellten Mutanten nicht behandelter Aspekt ist die Auswirkung der Aminosäuresubstitution auf die kinetischen Eigenschaften des PSI-Komplexes und auf die Effizienz der Ladungstrennung. Auch der Einfluß der Substitutionen auf die Reduktionsrate des oxidierten Proteinkomplexes durch die löslichen Proteine Plastocyanin oder Cytochrom *c* ist bislang nicht untersucht worden. Erste Arbeiten, die die letztgenannte Fragestellung zum Thema haben, wurden allerdings begonnen.

Neben dem Ziel die elementaren Prozesse der lichtinduzierten Ladungstrennung und des Elektronentransfers sowohl chemisch als auch physikalisch detailliert aufzuklären und zu verstehen, ist die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Kofaktor und Proteingerüst von großem Interesse. Die durch das Protein geschaffene Mikroumgebung verköpert das Handwerkszeug der Natur, die Eigenschaften von Pigmenten oder anderen kleinen Molekülen oder Atomen gezielt im Sinne einer optimalen Funktion zu beeinflussen.
Die Photosysteme, die die unterschiedlichsten Kofaktoren, wie Chl, Karotine, Chinone und auch Metalle im Proteinkomplex binden, stellen in dieser Hinsicht eine großflächige Spielwiese dar. Aufgrund der vielfältigen experimentellen Ansätze und mit Hilfe der vorliegenden Strukturdaten sind diese Proteine auch als generelles Modell für Protein-Kofaktor-Wechselwirkungen anzusehen. Diese Eigenschaften gezielt in artifizielle Systeme mit neuen Funktionen zu übertragen, ist eine Herausforderung für die zukünftige (bio)-chemische Forschung.

Literaturverzeichnis

[1] Allen, J. P., Feher, G., Yeates, T. O., Komiya, H. & Rees, D. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5730-5734.

[2] Allen, J. P. & Williams, J. C. (1995) *J. Bioenerg. Biomemb.* **27**, 275-283.

[3] Allen, J. P., Artz, K., Lin, X., Williams, J. C., Ivancich, A., Albouy, D., Mattioli, T. A., Fetsch, A., Kuhn, M. & Lubitz, W. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **35**, 6612-6619.

[4] Anderson, J. M., Brown, J. S., Lam, E. & Malkin, R. (1983) *Photochem. Photobiol.* **38**, 204-210.

[5] Angerhofer, A. (1991) in *Chlorophylls* (Herausgeber: H. Scheer), CRC Press, Boca Raton, pp 945-991.

[6] Artz, K., Williams, J. C., Allen, J. P., Lendzian, F., Rautter, J. & Lubitz, W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13582-13587.

[7] Atherton, N. M. (1993) *Principles of Electron Spin Resonance*, Ellis Horwood PTR Prentice Hall, New York.

[8] Baba, K., Itoh, S., Hastings, G. & Hoshina, S. (1996) *Photosyn. Res.* **47**, 121-130.

[9] Bassi, R., Soen, S. Y., Frank, G., Zuber, H. & Rochaix, J. D. (1992) *J. Biol Chem.* **267**, 25714-25721.

[10] Beinert, H., Kok, B. & Hoch, G. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 209-212.

[11] Bendall, D. S. & Manasse, R. S. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 175-181.

[12] Bengis, C. & Nelson, N. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 2783-2788.

[13] Bennoun, P. & Chua, N. H. (1976) in *Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria.* (Herausgeber: T. Bücher, W. Neupert, W. Sebald & S. Werner), North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp 33-39.

[14] Bennoun, P., Spierer-Herz, M., Erickson, J., Girard-Bascou, J., Pierre, Y., Delosme, M. & Rochaix, J.-D. (1986) *Plant Mol. Biol.* **6**, 151-160.

[15] Bingham, S. E., Xu, R. & Webber, A. N. (1991) *FEBS Lett.* **292**, 137-140.

[16] Bittl, R. & Zech, S. G. (1997a) *J. Phys. Chem. B* **101**, 1429-1436.

[17] Bittl, R., Zech, S. G., Fromme, P., Witt, H. T. & Lubitz, W. (1997) *Biochemistry* **36**, 12001-12004.

[18] Bittl, R.,Zech,s. G., Teutloff, C., Krabben, L. & Lubitz,W. (1998)in in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, (Herausgeber: G. Garab), Kluwer, Dordrecht, Niederlande, im Druck.

[19] den Blanken, H. J. & Hoff, A. J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 52-61.

[20] den Blanken, H. J. & Hoff, A. J. (1983) *FEBS Lett.* **157**, 21-27.

[21] den Blanken, H. J., Meiburg, R. F. & Hoff, A. J. (1988) *Chem. Phys. Lett.* **105**, 336-342.

[22] Blankenship, R. E. & Prince, R. C. (1985) *Trends in Biochem. Sci.* **10**, 382-384.

[23] Blankenship, R. E., Madigan, M. T. & Bauer, C. E. (1995) *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, Kluwer Verlag, Dordrecht, Niederlande.

[24] Boardman, N. K. in *Methods in Enzymology* (Herausgeber: A. SanPietro) **23** A, Academic Press, New York, pp 268-276.

[25] Boichenko, V. A. (1998) *Biochemistry* **63**, 164-170.

[26] Boynton, J. E., Gillham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, D., Klein, T. M., Shark, K. B. & Sanford, J. C. (1988) *Science* **240**, 1534-1538.

[27] Bratt, P. J., Rohrer, M., Krzystek, J., Evans, M. C. W., Brunel, L.-C. & Angerhofer, A. (1997) *J. Phys. Chem. B* **101**, 9686-9689.

[28] Van Brederode, M. E., Jones, M. R., Van Mourik, F., Van Stokkum, I. H. M. & Van Grondelle, R. (1997) *Biochemistry* **36**, 6855-6861.

[29] Breton, J., Nabedryk, E. & Parson, W. W. (1992) *Biochemistry* **31**, 7503-7510.

[30] Breton, J., Nabedryk, E., Allen, J. P. & Williams J. C. (1997) *Biochemistry* **36**, 4515-4525.

[31] Brettel, K. (1984) *Blitzlichtphotometrische Untersuchung der Chlorophyll-a_{II}-Reaktion im wasseroxidierenden System II der Photosynthese mit Nanosekunden-Zeitauflösung*, Dissertation, TU Berlin.

[32] Brettel, K. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 322-373.

[33] Büttner, M., Xie, D. L., Nelson, H., Pinther, W., Hauska, G. & Nelson, N. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8135-8139.

[34] Bylina, E. J. & Youvan, D. C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7226-7230.

[35] Bylina, E. J., Kolaczkowski, S. V., Norris, J. R. & Youvan, D. C.(1990) *Biochemistry* **29**, 6203-6210.

[36] Cantor, C. & Schimel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function* (Herausgeber: W. H. Freeman), San Fancisco, pp 349-408.

[37] Carbonera, D., Giacometti G. & Agostini, G. (1992) *Appl. Magn. Res.* **3**, 859-872.

[38] Carbonera, D., Giacometti, G. & Agostini, G. (1994) *FEBS Lett.* **343**, 200-204.

[39] Carbonera, D., Collareta, P. & Giacometti, G. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1322**, 115-128.

[40] Carrington, A. & McLachlan, A. D. (1969) *Introduction to Magnetic Resonance*, Harper and Row, New York.

[41] Chitnis, P. R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 322-373.

[42] Chua, N.-H. & Bennoun, P. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **72**, 2175-2179.

[43] Clarke, R. H., Connors, R. E., Schaafsma, T. J., Kleibeuker, J. F. & Platenkamp, R. J. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3674-3687.

[44] Clarke, R. H., Hotchandani, S., Jagannathan, S. P. & Leblanc, R. M. (1982) *Chem. Phys. Lett.* **89**, 37-42.

[45] Cleland, R. E. & Bendall, D. S.(1992) *Photosynth. Res.* **34**, 409-418.

[46] Cohen, Y., Yalovsky, R. & Nechustai, R. (1995) **1241**, 1-30.

[47] Cournac, L., Redding, K., Bennoun, P. & Peltier, G. (1997) *FEBS Lett.* **416**, 65-68.

[48] Cowan, J. A. (1997) in *Inorganic Biochemistry, Second Edition*, Wiley-VCH Verlag, New York, pp 11-15.

[49] Cramer, W. A. & Knaff, D. B. (1991) in *Energy transduction in biological membranes*, Springer Verlag, pp 48-51.

[50] Crowther, D. & Hind, G. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **204**, 568-577.

[51] Crystall, B., Booth, P. Y., Klug, D. R., Barber, J. & Porter, G. (1989) *FEBS Lett.* 269, 138-140.

[52] Cui, L., Bingham, S. E., Kuhn, M., Käß, H., Lubitz, W. & Webber, A. N. (1995) *Biochemistry* **34**, 1549-1558.

[53] Davies, I. H., Heathcote, P., MacLachlan, D. J. & Evans, M. C. W. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 183-189.

[54] Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1984) *J. Mol. Biol.* **180**, 385-398.

[55] Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. & Michel, H. (1985) *Nature* **318**, 618-624.

[56] Deisenhofer, J. & Norris, J. R. (1993) *The Photosynthetic Reaction Center*, Academic Press, San Diego, Kalifornien.

[57] Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I. & Michel, H. (1995) *J. Mol. Biol.* **246**, 429-457.

[58] Dekker, M. (1990) in *Metal Ions in Biological Systems* (Herausgeber: H. Sigel & A. Sigel) **26**, pp 1-12.

[59] Diaz-Quintana, A., Leibl, W., Bottin, H. & Setif, P. (1998) *Biochemistry* **37**, 3429-3439.

[60] Dikanov, S. A. & Tsvetkov, Y. D. (1992) *Electron Spin Echo Modulation (ESEEM) Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton.

[61] Dzuba, S. A., Hara, H., Kawamori, A., Iwaki, M., Itoh, S. & Tsvetkov, Y. D. (1997) *Chem. Phys. Lett.* **264**, 238-244.

[62] El-Kabbani, O., Chang, C. H., Tiede, D., Norris, J. & Schiffer, M. (1994) *Biochemistry* **30**, 5361-5369.

[63] Emerson, R., Chalmers, R. V. & Cederstrand, C. (1957) *Proc. Natl. Acad. Sci* **43**, 133-143.

[64] Ermler, U., Fritzsch, G., Buchanan, S. K. & Michel, H. (1994) *Structure* **2**, 925-936.

[65] Ermler, U., Michel, H. & Schiffer, M. (1994) *J. Bioenerg. Biomembranes* **26**, 5-15.

[66] van der Est, A., Sieckmann, I., Lubitz, W. & Stehlik, D. (1997) *Chem. Phys.* **194**, 349-359.

[67] Farah, J., Rappaport, F., Choquet, Y., Joliot, P. & Rochaix, J.-D. (1995) *EMBO J.* **14**, 4976-4984.

[68] Feher, G. (1992) *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* **211**, 1861-1874.

[69] Fermi, G., Perutz, M. F., Shaanan, B. & Fourne, R. (1984), *J. Mol. Biol.* **175**, 159-174

[70] Fink, U., Max-Volmer-Institut, TU Berlin, persönliche Mitteilung.

[71] Fish, L. E., Kück, U. & Bogorad, L. (1985) *Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 111-120.

[72] Flemming, C. (1996) *Charakterisierung der Antennensysteme von monomeren und trimeren Photosystem I Komplexen*, Diplomarbeit am Max-Volmer-Institut, TU Berlin.

[73] Fotiadis, D., Müller, D. J., Tsiotis, G., Hasler, L., Tittmann, P., Mini, T., Jeno, P., Gross, H. & Engel, A. (1998) *J. Mol. Biol.* **283**, 83-94.

[74] Fromme, P., Witt, H. T., Schubert, W.-D., Klukas, O., Saenger, W. & Krauss, N. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 76-83.

[75] Fromme, P. (1998) *Kristallisation und strukturelle Untersuchungen am Photosystem I*, Habilitationsschrift am Fachbereich Chemie, TU Berlin.

[76] Fromme, P. & Witt, H. T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 175-184.

[77] Fromme, P. & Difiore, D., unveröffentlichte Mitteilung.

[78] van Gerken, S., Dekker, J. P., Schlodder, E. & Witt, H. T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 52-61.

[79] Golbeck, J. H. & Bryant, D. A. (1991) *Curr. Top. Bioenerg.* **16**, 83-177.

[80] Golbeck, J. H.(1992) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 293-324.

[81] Golbeck, J. H. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1642-1646.

[82] Goldschmidt-Clermont, M. (1991) *Nucl. Acids Res.* **19**, 4083-4089.

[83] Goldsmith, J. O., King, B. & Boxer, S. G. (1996) *Biochemistry* **35**, 2421-2428.

[84] Green, B. (1988) *Photosyn. Res.* **15**, 205-210.

[85] Greenbaum, E., Lee, J. W., Tevault, C. V., Blankinship, S. L. & Mets, L. J. (1995) *Nature* **376**, 438-441.

[86] Hallahan, B. J., Purton, S., Ivison, A., Wright, D. & Evans, M. C. W. (1995) *Photosynth. Res.* **46**, 257-264.

[87] Hamacher, E., Kruip, J., Roegner, M. & Maentele, W. (1996) *Spectrochimica acta A* **52**, 107.

[88] Harris, E. H. (1989) *The Chlamydomonas Sourcebook*, Academic Press, San Diego New York.

[89] Heber, U., Gerst, U., Krieger, A., Neimansi, S. & Kobayashi, Y. (1995) *Photosynth. Res.* **46**, 295-305.

[90] Hill, R. (1937) *Nature*, **139**, 181-182.

[91] Hill, R. & Bendall, F. (1960) *Nature* **186**, 136-137.

[92] Hippler, M., Drepper, F., Farah, J. & Rochaix, J.-D. (1997) *Biochemistry* **36**, 6343-6349.

[93] Hiyama, T. & Ke, B. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 99-108.

[94] Hiyama, T. & Ke, B. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **267**, 160-171.

[95] Hoff, A. J. (1996) in *Biophysical Techniques in Photosynthesis* (Herausgeber: J. Amesz und A. J. Hoff), Kluwer, Dordrecht, Niederlande, pp 277-298.

[96] Holczer, K., Schmalbein, D. & Barker, P. (1989) *Bruker Report* **1**, 4-8.

[97] Hosler, J. P. & Yocum, C. F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 21-31.

[98] Huber, M., Lous, E. J., Isaacson, R. A., Feher, G., Gaul, D. & Schenck, C. C. (1990) in *Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria.* (Herausgeber: M. E. Michel-Beyerle), Springer Verlag, Berlin, 219-228.

[99] Huzisige, H. & Ke, B. (1993) *Photosynth. Res.* **38**, 185-209.

[100] Ingenhousz, J. (1779) in *Experiments upon vegetables, discovering their great power of purifying the common air in the sunshine, and of injuring it in the shade and at night.* Elmsley & Payne, London.

[101] Ivancich, A., Mattioli, T. A., Artz, K., Wang, S., Allen, J. P. & Williams, J. C. (1997) *Biochemistry* **36**, 3027-3036.

[102] Ivancich, A., Artz, K., Williams, J. C., Allen, J. P. & Mattioli, T. A. (1998) *Biochemistry* **37**, 11812-11820.

[103] Jennings, R. C., Zucchelli, G., Croce, R., Valkumas, L., Finzi, L. & Garlschi, F. M. (1997) *Photosyn. Res.* **52**, 245-253.

[104] Jia, Y., DiMagno, T. J., Chan, C.-K., Wang, Z., Du, M., Hanson, D. K., Schiffer, M., Norris, J. R., Fleming, G. R. & Popov, M. (1993) *J. Phys. Chem.* **194**, 419-432.

[105] Jordan, R. (1995) in *Redoxtitrationen von Elektronentransferkomponenten in den Photosystemen I und II*, Diplomarbeit am Max-Volmer-Institut, TU Berlin.

[106] Kamlowski, A., Zech, S. G., Fromme, P., Bittl, R., Lubitz, W., Witt, H.T. & Stehlik, D. (1998) *J. Phys. Chem.* B **120**, 8266-8277.

[107] Käß, H., Fromme, P., Witt, H. T. & Lubitz, W. (1994) *Biophys. J.* **66**, A228-235.

[108] Käß, H., Rautter, A., Zweygart, W., Struck, A., Scheer, H. & Lubitz, W. (1994) *J. Phys. Chem.* **98**, 54-363.

[109] Käß, H. (1995) *Die Struktur des primären Donators P700 in Photosystem I*, Doktorarbeit, TU Berlin.

[110] Von H. Käß programmierte Software zur Simulation der Hyperfeinwechselwirkungstensoren nach empirischer Vorgabe der hfc.

[111] Käß, H., Bittersmann-Weidlich, E., Andréasson, L.-E., Bönigk, B. & Lubitz, W. (1995) *Chem. Phys.* **194**, 419-432.

[112] Käß, H., Lubitz, W., Hartwig, G., Scheer, H., Noy, D. & Scherz, A. (1998) *Spectrochim. Acta A* 54, 1141-1156.

[113] Käß, H., Fromme, P., Witt, H. T. & Lubitz, W. (1999) in Vorbereitung.

[114] Keijzers, C. P., Reijerse, E. J. & Schmidt, J. (1989) *Pulsed EPR: A New Field of Applications*, North Holland, Amsterdam.

[115] Kevan, L. & Kispert, L. D. (1988) *Electron Spin Double Resonance Spectroscopy*, VCH, Weinheim.

[116] Kevan, L. & Bowman, M. K. (1990) *Modern Pulsed and Continuous-Wave Electron Spin Resonance*, Wiley, New York.

[117] Kirmaier, C. & Holten, D. (1993) in *The Photosyntheic Reaction Center* (Herausgeber: J. Deisenhofer und J. R. Norris), Academic Press, San Diego, Kalifornien, Band II, 49-70.

[118] Knoetzel, J. & Rensing, L. (1992) *J. Plant Physiol.* **136**, 271-279.

[119] Kok, B. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* **22**, 399-401.

[120] Kok, B. & Hoch, G. (1961) in *Light and Life* (Herausgeber: W. D. McElroy und B. Glass), John Hopkins Press, Baltimore, pp 397-416.

[121] Krabben, L., Käß, H., Schlodder, E., Kuhn, M., Lubitz, W., Xu, H., Bingham, S. E. & Webber, A. N. (1995) in *Photosynthesis: from light to Biosphere* (Herausgeber: P. Mathis), Vol. 2, pp 123-126, Kluwer Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.

[122] Krabben, L., Schlodder, E., Jordan, R., Carbonera, D., Webber, A. N., Hyeonmoo, L. & Lubitz, W. (1998) *Biochemistry* eingereicht.

[123] Krauss, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K. S., Witt, H. T. & Saenger, W. (1993) *Nature* **28**, 326-331.

[124] Kühlbrandt, W. & Wang, D. N. (1991) *Nature* **350**, 130-134.

[125] Kühlbrandt, W., Wang, D. N. & Fujiyoshi, Y. (1994) *Nature* **367**, 614-621.

[126] Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A. (1985) *Methods in Enzymology* **154**, 367-389.

[127] Krawczyk, S. & Ikegami, I. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 282-290.

[128] Kurreck, H., Bock, M., Bretz, N., Elsner, M., Kraus, H., Lubitz, W., Müller, F., Geisler, J. & Kroneck, P. M. H. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 737-46.

[129] Lagoutte, B., Setif, P. & Duranton, J. (1984) *FEBS Lett.* **174**, 24-29.

[130] Lancaster, C. R. D. & Michel, H. (1996) in *Reaction Centers from Photosynthetic Bacteria. Structure and Dynamics* (Herausgeber: M. E. Michel-Beyerle), Springer Verlag, Berlin, pp 23-35.

[131] Lee, H., Bingham, S. E. & Webber, A. N. (1998) in *Methods in Enzymology* (Herausgeber: McIntosh) **297**,

[132] Lendzian, F., Möbius, K., Plato, M., Smith, U. H., Thurnauer, M. C. & Lubitz, W. (1984) *Chem. Phys. Lett.* **111**, 583-588.

[133] Lendzian, F., Huber, M., Isaacson, R. A., Endeward, B., Plato, M., Bönigk, B., Möbius, K., Lubitz, W. & Feher, G. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 139-160.

[134] Liebl, U., Mockensturm-Wilson, M., Tost, J., Brune, D., Blankenship, R. & Vermaas, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7124-7128.

[135] Lin, X., Murchison, H. A., Nagarajan, V., Parson, W. W., Allen, J. P. & Williams, J. C. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10265-10269.

[136] Lozier, R. H. & Butler, W. L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **333**, 465-484.

[137] Lubitz, W. (1991) in *Chlorophylls* (Herausgeber: H. Scheer) CRC Press, Boca Raton, pp 903-944.

[138] Mac, M., Tang, X.-S., Diner, B., McCracken, J. & Babcock, G. T. (1996) *Biochemistry* **35**, 1328-13293.

[139] Mac, M., Bowly, N. R., Babcock, G. T. & McCracken, J. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13215-13223.

[140] Malkin, R. & Bearden, A. J. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 16-19.

[141] Marcus, R. A. (1965) *J. Chem. Phys.* **43**, 679-701.

[142] Marcus, R. A. & Sutin, N. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 265-323.

[143] Mathis, P. & Setif, P. (1981) *Israel J. Chem.* **21**, 316-320.

[144] Mathis, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1018**, 163-167.

[145] McDowell, L. M., Gaul, D., Kirmaier, C., Holten, D. & Schenck, C. (1991) *Biochemistry* **30**, 8315-8322.

[146] Mayer, J. R. (1845) in *Die organische Bewegung in ihrem Zusammenhang mit dem Stoffwechsel.* Heilbronn.

[147] Michel, H., Epp, O. & Deisenhofer, J. (1986) *EMBO J.* **5**, 2445-2451.

[148] Mims, W. B. (1972) *Phys. Rev.* **5**, 2409-2419.

[149] Mullet, J. E., Burke, J. J. & Arntzen, C. J. (1980) *Plant. Physiol.* **65**, 814-822.

[150] Müh, F., Williams, J. C., Allen, J. P. & Lubitz, W. (1998) *Biochemistry* **37**, 13066-13074.

[151] Mühlenhoff, U., Haehnel, W., Witt, H. T. & Herrmann, R. G. (1994) *Gene* **127**, 71-78.

[152] Nabedryk, E. (1996) in *Infrared spectroscopy of biomolecules* (Herausgeber: H. Mantsch und D. Chapman), Wily-Liss, New York.

[153] Nechusthai, R., Eden, A., Cohen, Y. & Klein, J. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction* (Herausgeber: Govindjee), Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 289-311.

[154] Newmann, S. M., Boyton, J. E., Gillham, N. W., Randolph-Anderson, B. L., Johnson, A. M. & Harris, E. H. (1990) *Genetics* **126**, 875-888.

[155] Niels, C. B. (1929) in *Contribution to Marine Biology* Stanford University Press, Stanford, Kalifornien, pp 161-169.

[156] Norris, J. R., Uphaus, R. A., Crespi, H. L. & Katz, J. C. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 625-628.

[157] Norris, J. R., Druyan, M. E. & Katz, J. C. (1973) *J. Am. Soc.* **95**, 1680-1682.

[158] Olsen, J. M., Filmer, D., Radloff, R., Romano, C. & Sybesma, C. (1963) in *Bacterial Photosynthesis* (Herausgeber: H. Gest, A. SanPietro und L. P. Vernon), Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, pp 423-431.

[159] O'Mally, P. J. & Babcock, G. T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **31**, 243-257.

[160] Owens, T. G., Webb, S. P., Mets, L., Alberte, R. S. & Felming, G. R. (1989) *Biophys. Journal* **56**, 95-106.

[161] Pålsson, L.-O., Flemming, C., Gobets, B., van Grondelle, R., Dekker, J. & Schlodder, E. (1998) *Biophys. J.* **74**, 2611-2622.

[162] Picaud, A., Acker, S. & Duranton, J. (1982) *Photosynth. Res.* **3**, 203-213.

[163] Plato, M., Lubitz, W., Lendzian, F. & Möbius, K. (1988) *Israel J. Chem.* **28**, 109-119.

[164] Porra, R., Thompson, W. & Kriedemann, W. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384-394.

[165] Piestly, J. (1772) *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, **62**, 147-264.

[166] Prisner, T. F., McDermott, A. E., Un, S., Norris, J. R., Thurnauer, M. C. & Griffin, R. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9485-9488.

[167] Radmer, R. J. & Kok, B. (1977) in *Photosynthesis I, Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation* (Herausgeber: A. Trebst und M. Avron), Springer Verlag, Heidelberg.

[168] Rautter, J., Lendzian, F., Schulz, C., Fetsch, A., Kuhn, M., Lin, X., Williams, J. C., Allen, J. P. & Lubitz, W. (1995) *Biochemistry* **34**, 8130-8143.

[169] Rautter, J., (1995) *Die Asymmetrie der Elektronenstruktur des primären Donators in Reaktionszentren der bakteriellen Photosynthese: EPR- und ENDOR-Untersuchungen*, Doktorarbeit, TU Berlin.

[170] Redding, K., MacMillan, F., Leibl, W., Brettel, K., Haehnley, J., Rutherford, A. W., Breton, J. & Rochaix, J.-D. (1998) *EMBO Journal* **17**, 50-60.

[171] Reimers, J. R. & Hush, N. S. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1302-1308.

[172] Rigby, S. E., Nugent, J. H. A. & O'Mally, P. J. (1994) *Biochemistry* **33**, 10043-10050.

[173] Rigby, S. E., Evans, M. C. W. & Heathcote, P. (1996) *Biochemistry* **35**, 6651-6656.

[174] Rodday, S. M., Webber, A. N., Bingham, S. E. & Biggins, J. (1995) *Biochemistry* **34**, 6328-6334.

[175] Rögner, M., Nixon, P. J. & Diner, B. A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6189-6196.

[176] Rüppel, H. & Witt, H. T. (1970) in *Methods in Enzymology* (Herausgeber: S. P. Colowick und N. O. Kaplan), Academic Press, New York, **16**, 316-380.

[177] Rutherford, A. W. & Mullet, J. E. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **635**, 225-235.

[178] Salikhov, K. M., Kandrashkin, Y. E. & Salokhov, A. K. (1992) *Appl. Magn. Reson.* **3**, 199-216.

[179] Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, E. (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

[180] Schaffernicht, H. & Junge, W. (1981) *Photochem. Photobiol.* **34**, 223-232.

[181] Schaffernicht, H. & Junge, W. (1982) *Photochem. Photobiol.* **36**, 407-417.

[182] Scheer, H., Katz, J. J. & Norris, J. R. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 1372-1377.

[183] Schlodder, E., Falkenberg, K., Gergeleit, M. & Brettel, K. (1998) *Biochemistry* **37**, 9466-9476.

[184] Schubert, W.-D., Klukas, O., Krauss, N., Saenger, W., Fromme, P. & Witt, H. T. (1997) *J. Mol. Biol.* **272**, 741-769.

[185] Schubert, W.-D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H. T., Fromme, P. & Krauss, N. (1998) *J. Mol. Biol.* **280**, 297-314.

[186] Schulz, C., Müh, F., Beyer, A., Jordan, R., Schlodder, E. & Lubitz, W. (1998) in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* (Herausgeber: G. Garab), Kluwer, Dordrecht, Niederlande, im Druck.

[187] Setif, P., Mathis, P. & Vänngård, T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 404-414.

[188] Setif, P. & Brettel, K. (1988) *Biochemistry* **32**, 7846-7854.

[189] Setif, P. & Bottin, P. (1989) *Biochemistry* **28**, 2689-2697.

[190] Setif, P. (1992) in *The Photosystems: Structure, Function & Molecular Biology* (Herausgeber: J. Barber), Elsevier New York, pp 471-499.

[191] Siefermann-Harms, D. (1984) *Photochem. Photobiol.* **40**, 507-512.

[192] Siekmann, I., Brettel, K., Bock, C., van der Est, A. & Stehlik, D. (1993) *Biochemistry* **32**, 4842-4847.

[193] Simpson, D. J. & Knoetzel, J. (1996) in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction* (Herausgeber: Govindjee), Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp 493-506.

[194] Sonoike, K. & Katoh, S. (1990) *Plant Cell Physiol.* **31**, 1079-1082.

[195] Sonoike, K. & Katoh, S. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **935**, 61-71.

[196] Spreitzer, R. J. & Mets, L. (1981) *Plant Physiol.* **67**, 565-569.

[197] Staehlin, L. A. & Staay, G. W. M. in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction* (Herausgeber: D. R. Ort und C. F. Yocum), Kluwer, Dordrecht, pp 11-30.

[198] Stehlik, D., Bock, C. H. & Petersen, J. (1989) *J. Phys. Chem.* **93**, 1612-1619.

[199] Stowell, M. H., Mcphillips, T. M., Rees, D. C., Soltis, S. M., Abresch, E. & Feher, G. (1997) *Science* **276**, 812-816.

[200] Stryer, L. (1990) *Biochemie*, Spektrum Verlagsgesellschaft, Heidelberg.

[201] Takahashi, Y., Goldschmidt-Clermont, M., Soen, S. Y., Franzen, L. G. & Rochaix, J.-D. (1991) *EMBO J.* 10 (8), 2033-2040.

[202] Tapie, P., Choquet, Y., Breton, J., Delepelaire, P. & Wollmann, F.-A. (1984) *Biochim. Biophys. Acts* **767**, 57-69.

[203] Thanner, R. (1990), Diplomarbeit, Universität Stuttgart.

[204] Vallon, O. M. & Bogorad, L. (1993) *Eur. J. Biochemistry* **214**, 907-915.

[205] Vermeglio, A. J., Breton, J. & Mathis, P. (1976) *J. Supramol. Struct.* **5**, 109-117.

[206] Vernon, L. P. (1971) in *Methods in Enzymology* (Herausgeber: A. SanPietro) **23 A**, pp 268-276, Academic Press, New York.

[207] de Vitry, C., Wollman, F.-A. & Delepelaire (1983) *C. R. Acad. Sci., Ser. 3* **297**, 277-280.

[208] Vrieze, J., Gast, A. J., & Hoff, A.J. (1996a) *J. Phys. Chem.* **100**, 9960-9967.

[209] Vrieze, J., Schenck, C. C. & Hoff, A.J. (1996b) *Biochim. Biophys. Acta* **1276**, 229-238.

[210] Warburg, O. (1919) *Biochem. Z* **100**, 230-270.

[211] Warburg, O. (1920) *Biochem. Z* **103**, 188-217.

[212] Watanabe, T. & Kobayashi, M. (1991) in *Chlorophylls* (Herausgeber: H. Scheer), CRC Press, Boca Raton, pp 287-303.

[213] Webber, A. N. & Malkin, R. (1990) *FEBS Lett.* **265**, 1-4.

[214] Webber, A. N., Gibbs, P. B., Ward, J. B. & Bingham, S. E. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12990-12995.

[215] Webber, A. N., Su, H., Bingham, S. E., Käß, H., Krabben, L., Kuhn, M., Jordan, R., Schlodder, E. & Lubitz, W. (1996) *Biochemistry* **5**, 12857-12863.

[216] Weil, J. A., Bolten, J. R. & Wertz, J. E. (1994) *Electron Paramagnetic Resonance* Wiley-Interscience, New York.

[217] Wessels, J. S. C. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **65**, 561-564.

[218] Witt, I., Witt, H. T., Gerken, S., Saenger, W., Dekker, J. P. & Rögner, M. (1987) *FEBS Lett.* **221**, 260-264.

[219] Witt, H. T., Müller, A. & Rumberg, B. (1961) *Nature*, **191**, 967-969.

[220] Witt, H. T., Krauß, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P. & Saenger, W. (1992) in *Proc. Int. Cong. Photosynth., 9th* (Herausgeber: N. Murata), Kluwer, Dordrecht 1, pp 521-528.

[221] Wurmser, R. (1925) *Annales de physiologie et de physicochimique biologie* **1**, 47-63.

[222] Yang, F., Shen, G., Schluchter, W. M., Zybailov, B. L., Ganago, A. O., Vassiliev, I. R., Bryant, D. A. & Golbeck, J. H. (1998) *J. Phys. Chem. B* **102**, 8288-8299.

[223] Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) *Gene* **33**, 103-119.

[224] Zech, S. G., van der Est, A. J. & Bittl, R. (1997) *Biochemistry* **36**, 9774-9779.

[225] Zech, S. G. (1998) *Pulsed and Transient Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy on Light-Induced Radical Pairs in Photosynthetic Reaction Centers*, Doktorarbeit, TU Berlin.

[226] Zech, S. G. persönliche Mitteilung.

[227] An dieser Stelle wird auf die im Internet vorhandene Datenbank über Chlamydomonas verwiesen: //http:/probe.nalusda.gov:8300/cgi

Anhang

.1 Abkürzungen

ACC	*accesorry*-Chlorophyll(e), Kofaktoren im PSI
ADMR	Absorptionsdetektierte magnetische Resonanz
β-DM	n-dodecyl-β-D-Maltosid
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
BChl	Bakteriochlorophyll(e)
BPhe	Bakteriophäophytin(e)
CAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
Chl	Chlorophyll(e)
Chl *a/b*	Verhältnis von Chlorophyll *a* zu Chloropyll *b*
bRC	*bacterial reaction center(s)*
DEAE	di-Ethyl-amino-ethyl (Anionentauschergruppe)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethlyendiamintetraessigsäure
ESEEM	*electron-spin-echo envelope modulation*
ENDOR	*electron nuclear double resonance*
FTIR-Spektroskopie	Fourier-transformierte-Infrarot-Spektroskopie
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
hfc	*hyperfine coupling(s)*
HOMO	*highest occupied molecular orbital*
HSA	Hochsalzmedium mit Acetat

LHC-(I/II)	*light harvesting complex*(I/II)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mt	*mating type*
NADP, NADPH	oxidierte bzw. reduzierte Form
	von Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	*polymerase chain reaction*
Pheo	Phäophytin *a*
PsaA	Eine der beiden Haupt-Proteinuntereinheit des PSI-Komplexes,
	die P700 binden.
PsaB	Eine der beiden Haupt-Proteinuntereinheiten des PSI-Komplexes,
	die P700 binden.
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RF	Radiofrequenz
SDS	*sodium dodecylsulfat*
TAP	Tris-Acetat-Phosphat-Medium
TBS	Tris-*buffered saline*
TMPD	N, N, N, N-tetramethyl-*p*-phenylen-diamin-dihydrochlorid
Tricin	(N-tris[Hydroxymethyl]-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp (bezogen auf den nicht mutierten PSI-Komplex)
ZFS	*zero field splitting*

.2 Aminosäure-Code

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Danksagung

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Lubitz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für das interessante, sehr umfassende Themengebiet, das von der Molekularbiologie und Biochemie bis hin zur Biophysik reichte.

Dr. Petra Fromme möchte ich ganz herzlich dafür danken, daß sie sie sich von der großen Seitenzahl nicht davon abschrecken ließ, den Mitbericht zu übernehmen, und auch für die anregenden Diskussionen und die zahlreichen Ratschläge zur Präparation von PSI.

Ebenfalls danke ich Dr. Matthias Kuhn, der – in den ersten beiden Jahren meiner Tätigkeit – die Betreuung der molekularbiologischen und biochemischen Aspekte übernommen hatte.

Einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen der Arbeit leisteten die internationalen Kooperationspartner: „Many thanks to“ Prof. Dr. Andrew N. Webber und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe in der Arizona State University in Tempe (USA). Er hat das Projekt mitinitiiert und sowohl das *know how* zur Anzucht der Grünalgen als auch die untersuchten Mutanten zur Verfügung gestellt.

In diesem Zusammenhang bedanke ich mich beim Deutschen Akademischen Austauschdienst, der mir ein Kurzzeitstipendium gewährte, so daß ich selber Gelegenheit hatte, im Labor von Andy Webber Mutanten zu generieren.

Die ADMR-Messungen und die T–S-Spektren der PSI-Präparationen hat freundlicherweise Dr. Donatella Carbonera aus Padua, Italien, aufgenommen. Vielen Dank dafür.

Am Max-Volmer-Institut erhielt ich ebenfalls Unterstützung bei den biophysikalischen Untersuchungen. Hier habe ich Stefan Zech zu danken, der die gepulsten und transienten EPR-Messungen am Radikalpaar aufgenommen und aus diesen Spektren mit der Unterstützung von Robert Bittl auch noch die Abstände und Orientierungen dieser beiden Moleküle berechnet hat.

Die Einweisung in die Grundlagen der EPR/ENDOR-Meßtechnik erfolgte – in einer auch für Biochemiker nachvollziehbaren Weise – durch Hanno Käß. Friedhelm Lendzian möchte ich an dieser Stelle dafür danken, daß er die Einführung in die ENDOR-Meßtechnik immer wieder auffrischte, wenn es nötig war, und mit wertvollem Rat zur Seite stand, wenn die Spektren zu interpretieren waren.

In die Geheimnisse der zeitaufgelösten optischen Spektroskopie wurde ich von Eberhard Schlodder eingeweiht. Er lieferte einen wesentlichen Beitrag bei der Interpretation aller optischen Spektren. Darüber hinaus stellte er mir alle in dieser Arbeit gezeigten optischen Spektren vom PSI aus *S. elongatus* zur Verfügung.

Ein herzlicher Dank geht an Rafael Jordan, der die Apparatur für die Redoxpotentialbestimmungen entwickelt hat, und mit mir zusammen auf Blitze und Signale wartete. Von ihm stammen auch einige der gezeigten Bilder, die ich für meine Zwecke modifizieren durfte. Er war auch jederzeit zur Stelle, wenn es Software-Probleme im Windows-Betriebssystem gab.

Eine unverzichtbare Hilfe bei der Präparation der PSI-Komplexe war Uwe Fink, der mit unermüdlichem Einsatz das PSI der Grünalgen „geputzt“ hat und sich dabei oft über eine nicht ausgereifte Chromatographieanlage ärgern mußte.

Ein herzlicher Dank geht an Heike Witt, die die ersten Versionen der vorgelegten Arbeit korrigiert hat und viele nützliche Anregungen für Verbesserungen gab.

Allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lubitz und den weiteren Beschäftigten des Max-Volmer-Instituts danke ich für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung.

Last but not least geht ein sehr liebevoller Dank an Angela, die dafür gesorgt hat, daß diese Arbeit den deutschen Rechtschreibregeln (vor der Reform 2000!) entspricht. Sie hat auf viele stilistische Mängel hingewiesen und abwechslungsreiche Formulierungen eingebracht.

Lebenslauf

Name	Ludwig Krabben
Geburtstag	11. August 1967
Geburtsort	Bocholt
Familienstand	ledig
Ausbildung	
September 1978 – Juni 1987	St. Josef Gymnasium, Bocholt
Juni 1987	Abitur
Oktober 1988 – Mai 1993	Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
Dezember 1992 – Mai 1993	Anfertigung der Diplomarbeit unter der Anleitung von Prof. W. Reutter im Institut für Physiologie und Biochemie an der Freien Universität Berlin. Thema: „Klonierung und Sequenzierung einer cDNA aus der Rattenleber, die für ein transferrin-ähnliches Protein kodiert.“
Mai 1993	Diplom in Biochemie
Tätigkeiten	
Juli 1987 – September 1988	Wehrdienst
Juni 1992 – Dezember 1992	Studentischer Mitarbeiter bei Prof. V. A. Erdmann am Institut für Biochemie an der Freien Universität Berlin. Arbeiten zur small cytoplasmic RNA.
Juni 1993 – Dezember 1993	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Dr. P. Westermann am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin. Isolierung und Charakterisierung von G-Proteinen.
Januar 1994 – Januar 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit Lehraufgaben im Rahmen der Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Lubitz am Max-Volmer-Institut der Technischen Universität Berlin.
seit Januar 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Oschkinat am Forschungsinstitut für molekulare Pharmakologie.