

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

mit dem Titel

Kinetische, theoretische und strukturelle Charakterisierung des Cytochrom c-Photosystem I-Komplexes

von Diplom-Biologe

Adrian Kölsch

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Athina Zouni
2. Prof. Dr. Silke Leimkühler
3. Prof. Dr. Simone Reber

Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.2020

Abstract (Deutsch)

Photosystem I (PSI) aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* ist ein transmembraner Protein-Pigment-Superkomplex der photosynthetischen Elektronentransportkette. Er wandelt die Energie des Lichts in elektrische Energie mit einer Quanteneffizienz von nahezu 100 % um. Dazu überträgt PSI Elektronen von Plastocyanin bzw. Cytochrom c_6 (Cyt c_6) auf Ferredoxin. Die Struktur des PSI wurde bereits 2001 mit einer Auflösung von 2,5 Å beschrieben (Jordan et al. 2001). Es lässt sich zur Generierung von Photoströmen auf Elektrodenoberflächen assemblieren und zur Produktion von Biokraftstoffen mit Enzymen koppeln. Die elektrische Kontaktierung des PSI mit Elektrodenoberflächen kann durch Komplexierung mit dem mitochondrialen Cytochrom c aus Pferdeherz (Cyt c_{HH}) erhöht werden. Aufgrund der Nutzbarkeit dieses Proteinkomplexes sollte geklärt werden, wie PSI und Cyt c_{HH} wechselwirken und wie sich die Interaktion von der des nativen PSI-Cyt c_6 -Komplexes unterscheidet. Deshalb lag der Fokus meiner Arbeit darauf, die Bindung des Cyt c_6 und seines Analogons Cyt c_{HH} an PSI mit kinetischen, kalorimetrischen, theoretischen und strukturellen Methoden zu untersuchen.

Das Cyt c_6 bindet im reduzierten Zustand an PSI und verringert nach erfolgtem Elektronentransfer seine Affinität. Das Cyt c_{HH} bindet dagegen sowohl im reduzierten als auch im oxidierten Zustand an PSI. Mit Hilfe der kinetischen Messungen habe ich Bedingungen identifiziert, unter denen PSI mit dem jeweiligen Cytochrom c einen stabilen Komplex eingeht. Mit Hilfe eines *rigid-body dockings* wurden potenzielle Bindungsstellen der beiden Cytochrome berechnet. Für Cyt c_6 ergab sich eine spezifische Bindungsstelle, die eine gute Übereinstimmung mit den von mir gemessenen Kinetiken sowie mit weiteren Literaturdaten zeigt. Diese Bindungsstelle korreliert mit der veröffentlichten Kostruktur des bakteriellen Reaktionszentrums mit Cyt c_2 aus *Rhodobacter sphaeroides*. Demgegenüber sind mehrere Cyt c_{HH} -Bindungsstellen gleichmäßig über die luminale Seite von PSI verteilt. Trotz dieser vielen Bindungsstellen an PSI konnten Kokristalle aus PSI mit Cyt c_{HH} in einem 1 : 1-Verhältnis hergestellt werden. Die Kristallstruktur wurde mit einer Auflösung von 3,4 Å gelöst, jedoch konnte keine Elektronendichte des Cyt c_{HH} nachgewiesen werden. Um den PSI-Cyt c_6 -Komplex zu verifizieren, wurde eine Kryoelektronenmikroskopie(Kryo-EM)-Struktur analysiert. Die Kryo-EM-Struktur wurde mit einer Auflösung von 2,9 Å gelöst. Das Cyt c_6 ist zwar nicht eindeutig in der Dichte zu sehen, dennoch konnte ein luminal an PSI gebundenes Protein in der 3-D-Klassifizierung der Partikel nachgewiesen werden. Mit der Kryo-EM-Struktur wurden die flexible PSI-Untereinheit PsaK und fünf zuzügliche Kofaktoren gelöst. Zur Analyse des Elektronentransfers wurden in meiner Arbeit Datensätze von PSI ohne Cytochrom c mit der seriellen Femtosekunden-Kristallografie (SFX) aufgenommen. Die Auflösungen betragen 2,75 Å (oxidiert), 3,4 Å (reduziert, dunkeladaptiert) und 3,4 Å (100 ns nach Belichtung), und es wurde ein für SFX-Messungen geeignetes Protokoll zur Kokristallisation von PSI mit Cyt c_{HH} angefertigt. Die Unterschiede der gemessenen Strukturen werden bezüglich ihrer Funktionen diskutiert.

Abstract (English)

Photosystem I (PSI) from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* is a membrane-bound, multipigment protein supercomplex. It converts light to electrochemical energy with a quantum efficiency of almost 100%. It reduces the luminal proteins plastocyanin and cytochrome c_6 (Cyt c_6) to oxidize the stromal protein Ferredoxin. The structure of PSI has been solved in 2001 at a resolution of 2,5 Å (Jordan et al. 2001). PSI can be assembled on an electrode surface to produce photocurrents and the generated electrons can be used for the production of biofuels. The mitochondrial cytochrome c from horse heart (Cyt c_{HH}) binds strongly to both, PSI and the electrode surface, and can therefore be applied to improve the electrical coupling. Due to the practical use of the PSI-Cyt c complex, the aim of my thesis is to characterize the interaction of PSI with Cyt c_6 and the analog Cyt c_{HH} . To this end, the binding of both cytochromes to PSI was analyzed by kinetic, calorimetric, theory-based and structural methods.

Cyt c_6 binds to PSI while being reduced and decreases its affinity after transferring its electron. In contrast, Cyt c_{HH} binds to PSI in both oxidation states, reduced and oxidized, with identical affinity. By means of kinetic measurements, I identified conditions in which PSI forms a stable complex with either of the two cytochromes. The positions of the cytochrome binding sites at PSI were calculated by a rigid-body docking. For the calculation with Cyt c_6 , the majority of the potential binding sites are located at the luminal side of PSI, close to P₇₀₀. The theoretic properties of one of these binding sites are in good agreement with my own kinetic measurements and literature data. The position and orientation of Cyt c_6 in this theoretic binding site is almost identical to the localization of Cyt c_2 in cocrystals with the bacterial reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. The potential Cyt c_{HH} binding sites are uniformly distributed over the luminal surface of PSI. Still, cocrystals consisting of PSI and Cyt c_{HH} in a 1 : 1 ratio were produced. The crystal structure was solved to a resolution of 3,4 Å, however, no electron density corresponding to Cyt c_{HH} was found. To verify the PSI-Cyt c_6 complex, the two proteins were crosslinked and the structure was solved by cryo electron microscopy (cryo-EM) to a resolution of 2,9 Å. No density corresponding to Cyt c_6 is present in the cryo-EM reconstruction, but masked classification revealed 3D classes containing additional density at the luminal surface of PSI. The cryo-EM structure reveals density of five additional cofactors and the flexible subunit PsaK. For the analysis of electron transport processes, serial femtosecond crystallography (SFX) was used. Datasets were measured for PSI crystals without cytochromes at resolutions of 2,75 Å (oxidized), 3,4 Å (reduced, dark adapted) and 3,4 Å (100 ns after light flash). Additionally, a protocol for the production of PSI-Cyt c_{HH} cocrystals, suitable for the measurement by the SFX-method, was designed. With the crystal structure, the cryo-EM-structure and the SFX-structure, three high resolution structures from the same PSI-protein are now available. The differences between these structures are discussed in respect to their influence on the function of PSI.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Kölsch, A.**, Baumert, A., Radon, C., Bürger, J., Mielke, T., Lisdat, F., Zouni, A., Wendler, P. (2020). „Cryo-EM structure of the *Thermosynechococcus elongatus* photosystem I in the presence of cytochrome c_6 “. Zur Publikation eingereichtes Manuskript.
- Keable, S. **Kölsch, A.**, Simon, P., Lassalle, L., Chatterjee, R., Subramanian, S. K., Hussein, R., Ibrahim, M., Kim, I.-S., Fuller, F., Pham, C., Gul, S., Bogacz, I., Sutherlin, K., Bhowmick, A., Young, I. D., deLichtenberg, C., Chernev, P., Cheah, M., Tono, K., Owada, S., Hunter, M. S., Batyuk, A., Brewster, A., Sauter, N. K., Yachandra, V. K., Yano, J., Zouni, A., Kern, J. „Room temperature structure of cyanobacterial photosystem I“. Manuskript in Vorbereitung.
- Golub, M., **Kölsch, A.**, Hejazi, M., Lokstein, H., Feoktystov, A., Zouni, A., Pieper, J. „Solution structure of trimeric photosystem I by small angle neutron scattering“. Manuskript in Vorbereitung.
- Kölsch, A.**, Hejazi, M., Stieger, K. R., Feifel, S. C., Kern, J. F., Müh, F., Lisdat, F., Lokstein, H., Zouni, A. (2018). „Insights into the binding behavior of native and non-native cytochromes to photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 293, S. 9090–9100. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000953.
- Golub, M., Hejazi, M., **Kölsch, A.**, Lokstein, H., Wieland, D. C. F., Zouni, A., Pieper, J. (2017). „Solution structure of monomeric and trimeric photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* investigated by small-angle X-ray scattering“. In: *Photosynthesis Research* 133, 163–173. DOI: 10.1007/s11120-017-0342-6.
- Stieger, K. R., Ciornii, D., **Kölsch, A.**, Hejazi, M., Lokstein, H., Feifel, S. C., Zouni, A., Lisdat, F. (2016). „Engineering of supramolecular photoactive protein architectures: the defined co-assembly of photosystem I and cytochrome c using a nanoscaled DNA-matrix“. In: *Nanoscale* 8, S. 10695–10705. DOI: 10.1039/C6NR00097E.

Weitere Veröffentlichungen:

- Ciornii, D., **Kölsch, A.**, Zouni, A., Lisdat, F. (2019). „Exploiting new ways for a more efficient orientation and wiring of PSI to electrodes: A fullerene C70 approach“. In: *Electrochimica Acta* 299, S. 531–539. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.01.032.
- Ciornii, D., **Kölsch, A.**, Zouni, A., Lisdat, F. (2019). „A precursor-approach in constructing 3D ITO electrodes for the improved performance of photosystem I-cyt c photobioelectrodes“. In: *Nanoscale* 11, S. 2040–3364. DOI: 10.1039/C9NR04344F.

- Hatazaki, S., Sharma, D. K., Hirata, S., Nose, K., Iyoda, T., **Kölsch, A.**, Lokstein, H., Vacha, M. (2018). „Identification of short- and long-wavelength emitting chlorophylls in cyanobacterial photosystem I by plasmon-enhanced single-particle spectroscopy at room temperature“. In: *The Journal of Physical Chemistry Letters* 9, S. 6669–6675. DOI: 10.1021/acs.jpcclett.8b03064.
- Ciornii, D., Feifel S. C., Hejazi, M., **Kölsch, A.**, Lokstein, H., Zouni, A., Lisdat, F. (2017). „Construction of photobiocathodes using multi-walled carbon nanotubes and photosystem I“. In: *Physica Status Solidi (a)* 214, S. 1700017. DOI: 10.1002/pssa.201700017.
- Beck, C., Hertel, S., Rediger, A., Lehmann, R., Wiegard, A., **Kölsch, A.**, Heilmann, B., Georg, J., Hess, W. R., Axmann, I. M. (2014). „Daily expression pattern of protein-encoding genes and small noncoding RNAs in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 80, S. 5195–5206. DOI: 10.1128/AEM.01086-14.
- Kölsch, A.**, Hörnemann, J., Wengenroth, C., Hellmann, N. (2013). „Differential regulation of hexameric and dodecameric hemocyanin from *A. leptodactylus*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834, S. 1853–1859. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.02.037.

Abkürzungsverzeichnis

A_0, A_1, A_{Acc}	Elektronenakzeptoren in PSI. Siehe Abbildung 1.4
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
AFM	Rasterkraftmikroskop (<i>atomic force microscope</i>)
BCR	β -Carotin
Chl	Chlorophyll
CLA	Chlorophyll <i>a</i>
CLA'	C13-Epimer des Chlorophyll <i>a</i>
CTF	Kontrast Transfer Funktion
CV	Säulenvolumen
Cyt b_6/f	Cytochrom b_6/f -Komplex
Cyt c_{HH}	Cytochrom <i>c</i> aus Pferdeherz
Cyt c_6	Cytochrom c_6
d	Abstand
D, D_0	Diffusionskoeffizient, D bei einer Teilchenkonzentration von $0 \mu\text{M}$
DCPIP	2,6-Dichlorophenol-Indophenol
DDM	<i>N</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid (Detergenz)
DEAE	Diethylaminoethyl (funktionale Gruppe einer Chromatographiesäule)
DLS	Dynamische Lichtstreuung
E_{kin}	kinetische Energie
EM	Elektronenmikroskopie
EMDB	Electron Microscopy Data Bank (siehe www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb)
ESP	elektrostatische Potenzialdichte
η	Viskosität
ETC	Elektronentransportkette
F	Formfaktor
F_a	Faraday-Konstante
F^o	gemessener Strukturfaktor (<i>observed</i>)
F^c	berechneter Strukturfaktor (<i>calculated</i>)
FAD, FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fd	Ferredoxin
FDH	Formiatdehydrogenase
FSC	<i>fourier shell correlation</i>
ΔG	freie Enthalpie
ΔH	Enthalpie (Bindungsenthalpie)
I	Intensität

IsiA	<i>iron-stress-induced protein A</i> , CP43 homologes Antennenprotein
η	Viskosität
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie
K_A	Assoziationskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
k_B	Boltzmann-Konstante
k_{on}	kinetische Konstante der Assoziationsreaktion
k_{off}	kinetische Konstante der Dissoziationsreaktion
k_{cat}	Wechselzahl der Michaelis-Menten-Kinetik
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
Kryo-EM	Elektronenmikroskopische Messung unter tiefen Temperaturen
Kryo-XRD	Röntgenstrukturanalyse unter tiefen Temperaturen
λ	Wellenlänge
LHCI und LHCII	Lichtsammelkomplex I und II (<i>light harvesting complex</i>)
Lhca1-9	Untereinheiten des LHCI
LHG	1,2-Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerin
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MD	Moleküldynamik
MV	Methylviologen
MWCO	<i>Molecular Weight Cutoff</i>
NMR	Kernspinresonanz
NAD, NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDH-1	<i>NAD(P)H Dehydrogenase-like complex 1</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
P ₇₀₀	Reaktionszentrum des Photosystem I
PBS	Phycobilisomen
Pc	Plastocyanin
PCC	Pasteur Culture Collection
pD	Analoger Wert zu pH in D ₂ O-Lösung
Pd	Polydispersitätsindex
PDB	Protein Data Bank (siehe www.rcsb.org)
PEG	Polyethylenglycol
$\Delta\phi$	Phasenwinkel
Φ	elektrostatisches Potenzial
pI	isoelektrischer Punkt
POPG	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylglycerol, ein Membranlipid
PQ, PQH ₂	Plastoquinon, Plastoquinol
PsaA-PsaX	Untereinheiten des Photosystem I
PSI	Photosystem I
PSI _{mono}	Photosystem I-Monomer
PSI _{tri}	Photosystem I-Trimer
PSI _{tri} -Monomer	PSI-Monomer, das im PSI-Trimer vorliegt
PSII	Photosystem II
q	Streuvektor
Q	Wärmemenge
R_G	Gyrationsradius

R_H, R_{H0}	Hydrodynamischer Radius, R_H bei einer Teilchenkonzentration von 0
ρ	Elektronendichte, bzw. Ladungsdichte
SANS	Neutronenkleinwinkelstreuung
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung
SFX	serielle Femtosekunden-Kristallografie
<i>Synechocystis</i> sp.	hier ist <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 gemeint
t, τ	Zeit
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TFA	Trifluoressigsäure
θ	Winkel des gestreuten Strahls
Θ	Beladungsgrad
V	Volumen
XFEL	Röntgen-Freie-Elektronen-Laser
XRD	Röntgenstrukturanalyse (<i>X-ray diffraction</i>)
z	Ladung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cyanobakterien	1
1.2	Photosynthese	1
1.2.1	Die photosynthetische Elektronentransportkette	2
1.2.2	Lokalisation der Proteine	3
1.2.3	Cytochrom c_6 und Plastocyanin	5
1.3	Photosystem I	6
1.3.1	Aufbau des Photosystems I	7
1.3.2	Ladungstrennung und Elektronentransport	11
1.3.3	Elektronentransfer von Plastocyanin und Cytochrom c_6 auf Photosystem I	12
1.4	Strukturaufklärung des Photosystems I	16
1.4.1	Kleinwinkelstreuung	16
1.4.2	Röntgenbeugung am Kristall	17
1.4.3	Elektronenmikroskopie	18
1.4.4	Theoretische Analyse	20
1.5	Biotechnologische Anwendung des Photosystems I	21
1.6	Ziel der Arbeit	22
2	Material, Methoden und Theorie	24
2.1	Materialienliste	24
2.1.1	Puffer	24
2.1.2	Säulenmaterial	24
2.2	Proteinaufreinigung	25
2.2.1	Photosystem I	25
2.2.2	Cytochrom c	26
2.3	Gelelektrophorese	27
2.3.1	BN-PAGE	27
2.3.2	SDS-PAGE	27
2.3.3	Western Blot	28
2.4	Reduktionsraten	29
2.4.1	Sauerstoffreduktion	29
2.4.2	P ₇₀₀ -Reduktion	30
2.5	Massenspektrometrie	30
2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie	31
2.7	Dynamische Lichtstreuung	33
2.8	PSI _{tri} -Cyt c_{HH} -Komplexbildung in Lösung	35
2.9	Kleinwinkelstreuung	35
2.9.1	Röntgenkleinwinkelstreuung	37

2.9.2	Neutronenkleinwinkelstreuung	37
2.10	Kristallstrukturanalyse	38
2.10.1	Theorie: Kristallisation	38
2.10.2	Theorie: Das Beugungsbild	40
2.10.3	Durchführung: Screening von Kristallisationsbedingungen	43
2.10.4	Durchführung: Nachweis der Kokristalle	44
2.10.5	Durchführung: Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse	44
2.10.6	Durchführung: Mikrokristalle für die Strukturanalyse	45
2.10.7	Durchführung: PSI-Cyt c_{HH} -Mikrokristalle	46
2.11	Elektronenmikroskopie	46
2.11.1	Vorbereitung der Proben	47
2.11.2	Datenauswertung	48
2.12	Modellierung der Bindungsstelle	49
2.12.1	Theorie	49
2.12.2	Durchführung: <i>rigid-body docking</i>	51
2.12.3	Durchführung: Poisson-Boltzmann-Gleichung	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Isolation und Charakterisierung der Proteine	53
3.1.1	Photosystem I	53
3.1.2	Cytochrome	56
3.2	PSI-Cyt c -Interaktion	58
3.2.1	PSI-Reduktionsraten	58
3.2.2	Einfluss des Oxidationszustands	62
3.2.3	Theoretische Analyse des Elektronentransferkomplexes	65
3.3	Analyse der PSI-Struktur	68
3.3.1	PSI in Lösung (SAXS, SANS)	68
3.3.2	Komplexbildung in Lösung	70
3.3.3	Kristallisation des PSI _{tri}	71
3.3.4	PSI-Cyt c_{HH} -Komplexbildung im Kristall	75
3.3.5	Kristallstruktur bei Raumtemperatur (SFX)	78
3.3.6	Hochaufgelöste Struktur in Lösung (Kryo-EM)	84
3.3.7	Struktur des PSI-Cyt c_6 -Komplexes in Lösung	93
3.3.8	Geometrie des trimeren PSI	93
4	Diskussion	97
4.1	Bindung und Elektronentransfer von Cytochromen mit PSI	97
4.1.1	Ist die K_M eine K_D ?	97
4.1.2	Ionenstärke und pH	98
4.1.3	Oxidationszustand der Cytochrome	100
4.2	Die Cytochrom c -Bindungsstelle des Photosystems I	101
4.2.1	Unspezifische Bindungsstellen	101
4.2.2	Die spezifische Bindungsstelle des Komplexes	101
4.2.3	Komplexbildung für Strukturanalyse	103
4.2.4	Strukturanalyse der PSI-Cyt c -Bindungsstelle	104
4.3	PSI-Struktur	105
4.3.1	Vergleich der Methoden	105
4.3.2	Elektronentransport in PSI	107
4.3.3	PsaK bindet assoziierte Proteine	109
4.3.4	Exzitonentransfer von Antennenproteinen zu PSI	111

4.3.5	Asymmetrie im PSI-Trimer	112
4.3.6	Wassermoleküle in der PSI-Struktur	113
5	Ausblick	114

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Cyanobakterien

In der Schule lernen wir, dass die Luft, die wir atmen, aus 78 % Stickstoff, 21 % Sauerstoff, 1 % Argon und 0,04 % Kohlenstoffdioxid besteht. Doch vor 2,4 Milliarden Jahren gab es fast keinen Sauerstoff in der Erdatmosphäre. Mit Erscheinen der Cyanobakterien stieg die Sauerstoffkonzentration drastisch an und das Leben, wie wir es heute kennen, konnte entstehen. Heute sind Cyanobakterien eine große Gruppe mit 300 Gattungen und mehr als 4000 isolierten Stämmen (Shestakov und Karbysheva 2017; Maidak et al. 2001). Besonders bekannt sind *Synechocystis sp.* PCC 6803, welches sich durch eine natürliche Kompetenz für gentechnische Modifikationen eignet, und die Gattungen *Prochlorococcus* und *Synechococcus*, welche mit 10^{26} bis 10^{27} Zellen die bedeutsamsten Primärproduzenten der Erde sind (Flombaum et al. 2013). Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem Protein aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (*T. elongatus*), einem Cyanobakterium, das aus einer heißen Quelle in Beppu, Japan, isoliert wurde (Yamaoka et al. 1978). Entgegen seinem Gattungsnamen handelt es sich hierbei nicht um eine Kokke, sondern um ein Stäbchen, daher der Zusatz „*elongatus*“. Bis 2001 wurde *T. elongatus* in der Literatur als „thermophiler *Synechococcus elongatus*“ bezeichnet, wobei der Hinweis auf seine Thermophilie ihn eindeutig von seinen vielen mesophilen Namensvettern wie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 abgrenzte. Sein Genom wurde 2002 vollständig sequenziert. Er verfügt über ein zirkuläres, 2,6 Megabasenpaare langes Chromosom und keine Plasmide (Nakamura et al. 2002). Mit Hilfe von Elektroporation kann genetisches Material in die Zelle eingeschleust und ins Chromosom eingebaut werden (Nakamura et al. 2002).

1.2 Photosynthese

In der oxygenen Photosynthese werden Sauerstoff und Kohlenhydrate gebildet und Kohlenstoffdioxid verbraucht.



Man unterscheidet hierbei zwei Teilreaktionen, die in getrennten Kompartimenten erfolgen. In der Thylakoidmembran erfolgt die Lichtreaktion, in der Wasser zu Sauerstoff oxidiert wird. Durch die Oxidation des Wassers kann Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP^+) zu Dihyronicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) reduziert werden. Hierbei wird Adenosindiphosphat (ADP) mit

anorganischem Phosphat (P_i) zu Adenosintriphosphat (ATP) kondensiert. Die zweite Teilreaktion ist der Calvin-Benson-Zyklus, auch Dunkelreaktion genannt. Sie findet im Stroma der Chloroplasten bzw. in Carboxysomen im Cytoplasma der Cyanobakterien statt. Das NADPH und ATP, die in der Lichtreaktion gewonnen wurden, werden nun genutzt, um Kohlenstoffdioxid zu Kohlenhydraten zu reduzieren.

1.2.1 Die photosynthetische Elektronentransportkette

An diesen beiden Reaktionen ist eine große Anzahl von Proteinen beteiligt, die in Abbildung 1.1 dargestellt sind. Nach Belichtung gelangt Anregungsenergie über die Phycobilisomen (in Cyanobakterien und Rotalgen, PBS) bzw. Lichtsammelkomplex II (in Pflanzen und Grünalgen, LHCII) zu Photosystem II (PSII). PSII oxidiert daraufhin Wasser am Wasser oxidierenden Komplex (WOC) zu Sauerstoff und überträgt die vier Elektronen (e^-) sukzessiv über eine Elektronentransportkette auf den Kofaktor Q_B , ein an der cytoplasmatischen Seite von PSII gebundenes Plastochinon (PQ). Dieses PQ nimmt zwei Elektronen und zwei Protonen (H^+) auf und diffundiert als Plastohydrochinol (PQH_2) in die Thylakoidmembran. Ein ungebundenes PQ-Molekül kann daraufhin in der Q_B -Bindungstasche binden und die restlichen zwei Elektronen aufnehmen. Das PQH_2 bindet an der luminalen Seite des Cytochrom b_6/f -Komplexes (Cyt b_6/f) und wird durch einen luminalen Eisenschwefelcluster sowie ein Häm b oxidiert. Die beiden Protonen des PQH_2 werden dabei auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran abgegeben, von den Elektronen gelangt jedoch nur eines an luminalen Kofaktoren. Das andere Elektron wird erneut auf ein cytoplasmatisches PQ übertragen, das an der cytoplasmatischen Seite Protonen aufnimmt und anschließend als PQH_2 an der luminalen Seite des Cytochrom b_6/f -Komplexes abgibt. Durch diesen sogenannten Q-Zyklus werden zwei Protonen pro Elektron von der cytoplasmatischen auf die luminalen Seite übertragen. Die luminalen Kofaktoren des Cytochrom b_6/f -Komplexes reduzieren die löslichen Proteine Cytochrom c_6 (Cyt c_6) oder Plastocyanin (Pc). Cyt c_6 und Pc haben nahezu identische Redoxpotenziale und erfüllen die gleiche Funktion: den Elektronentransport vom Cytochrom b_6/f -Komplex auf Photosystem I (PSI). Wie in PSII wird auch in PSI das Elektron lichtabhängig über eine Elektronentransportkette auf die cytoplasmatische Seite transportiert. Dort wird das an PSI gebundene Ferredoxin (Fd) oder Flavodoxin reduziert, woraufhin es sich von PSI löst und an die Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) bindet. Die FNR verfügt über einen Flavin-Adenin-Dinukleotid(FAD)-Kofaktor, welcher durch das Elektron vom Fd zu einem Semichinon reduziert wird. Durch ein weiteres reduziertes Ferredoxin wird der Kofaktor zu einem FADH₂-Chinon reduziert. Die FNR verfügt somit über zwei Elektronen, die sie zur Reduktion von NADP⁺ zu NADPH nutzt. Die Redoxkette von der Oxidation des Wassers zur Reduktion von NADP⁺ bezeichnet man als linearen Elektronentransport. Alternativ kann über Ferredoxin auch ein zyklischer Elektronentransport stattfinden. Hierbei bindet Ferredoxin an den photosynthetischen Komplex I (*NAD(P)H Dehydrogenase-like complex 1*, NDH-1) und reduziert PQ zu PQH_2 (Schuller et al. 2019; Laughlin et al. 2019). Die Redoxkette läuft somit erneut über den Cytochrom b_6/f -Komplex, Cyt c_6 /Pc, PSI und zurück zu Ferredoxin. Neben NDH-1 kann der zyklische Elektronentransport auch über das *proton-gradient-regulation*-System PGR5/PGRL1 erfolgen (Strand und Kramer 2014). PGR5/PGRL1 scheint in Cyanobakterien eine untergeordnete Rolle zu spielen (Allahverdiyeva et al. 2013). Durch den zyklischen Elektronentransport gelangen weitere Protonen in das Thylakoidlumen. Der Protonengradient wird von der ATP-Synthase genutzt, um aus ADP mit anorganischem Phosphat ATP zu bilden. Die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase

(RuBisCO) nutzt das in der Lichtreaktion produzierte NADPH und ATP, um CO_2 zu reduzieren. In Cyanobakterien ist die RuBisCO in den Carboxysomen, in denen CO_2 angereichert wird, lokalisiert.

1.2.2 Lokalisation der Proteine

Wie in Abbildung 1.1 zu erkennen ist, ist die Mehrheit der photosynthetisch aktiven Proteine in und an der Thylakoidmembran lokalisiert. Die Thylakoidmembran grenzt das Thylakoidlumen vom Cytoplasma (in Cyanobakterien) oder dem Stroma (in Chloroplasten) ab. Das Thylakoidlumen ist ein durchgängiger, 4,7 bis 9,2 nm hoher Reaktionsraum (Kirchhoff et al. 2011). In den Chloroplasten der Pflanzen und Grünalgen sind die Thylakoidmembranen in zwei Reaktionsräume geteilt: die Grana und die Lamellen. In den Grana sind die Membranen übereinandergestapelt. Dort befindet sich PSII, das als Dimer (*core complex*, C_2) mit zwei stark gebundenen (S_2) und zwei mittelstark gebundenen (M_2) LHCII-Trimeren einen $\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2$ -Superkomplex bildet. Die stromale Oberfläche dieses Superkomplexes kann an die stromalen Oberflächen anderer $\text{C}_2\text{S}_2\text{M}_2$ -Superkomplexe binden (Chow et al. 1991). Ferner schirmen zweiwertige Kationen im Stroma negative Ladungen der Membranlipide ab (Staehelin 1976). Dies führt zu einer Interaktion der cytoplasmatischen Seite der Thylakoidmembranen und schlussendlich zur Bildung von Grana. In den Lamellen befinden sich PSI und die ATP-Synthase. PSI und PSII sind also räumlich voneinander getrennt. Der Cytochrom b_6/f -Komplex ist sowohl in Grana als auch in Lamellen anzutreffen. In Cyanobakterien liegt die Thylakoidmembran in mehreren lockeren Schichten entlang der Cytoplasmamembran. Die Thylakoidmembranen bilden hier keine Grana aus, aber dennoch gibt es eine räumliche Trennung der Proteinkomplexe (Casella et al. 2017). Die räumliche Trennung in Cyanobakterien ist abhängig von der jeweiligen Gattung; so sind in *Synechococcus elongatus* PCC 7942 PSI und ATP-Synthase in den peripheren Thylakoidmembranen lokalisiert, während in *Synechocystis* sp. PCC 6803 PSII in den peripheren Thylakoidmembranen lokalisiert ist (Sherman et al. 1994; Vermaas et al. 2008). Die Proteine können in der Membran geordnete Strukturen ausbilden. Es können Bereiche der Thylakoidmembran identifiziert werden, in denen PSI in einer semikristallinen Anordnung vorliegt (MacGregor-Chatwin et al. 2017; MacGregor-Chatwin et al. 2019). Ebenso können Bereiche nachgewiesen werden, in denen PSII semikristallin vorliegt (Folea et al. 2008). Die räumliche Trennung von PSI und PSII ist in Cyanobakterien allerdings nicht so präsent wie in Chloroplasten; so wurden in vielen Arbeiten beide Proteine im selben Membranabschnitt identifiziert (MacGregor-Chatwin et al. 2017; MacGregor-Chatwin et al. 2019).

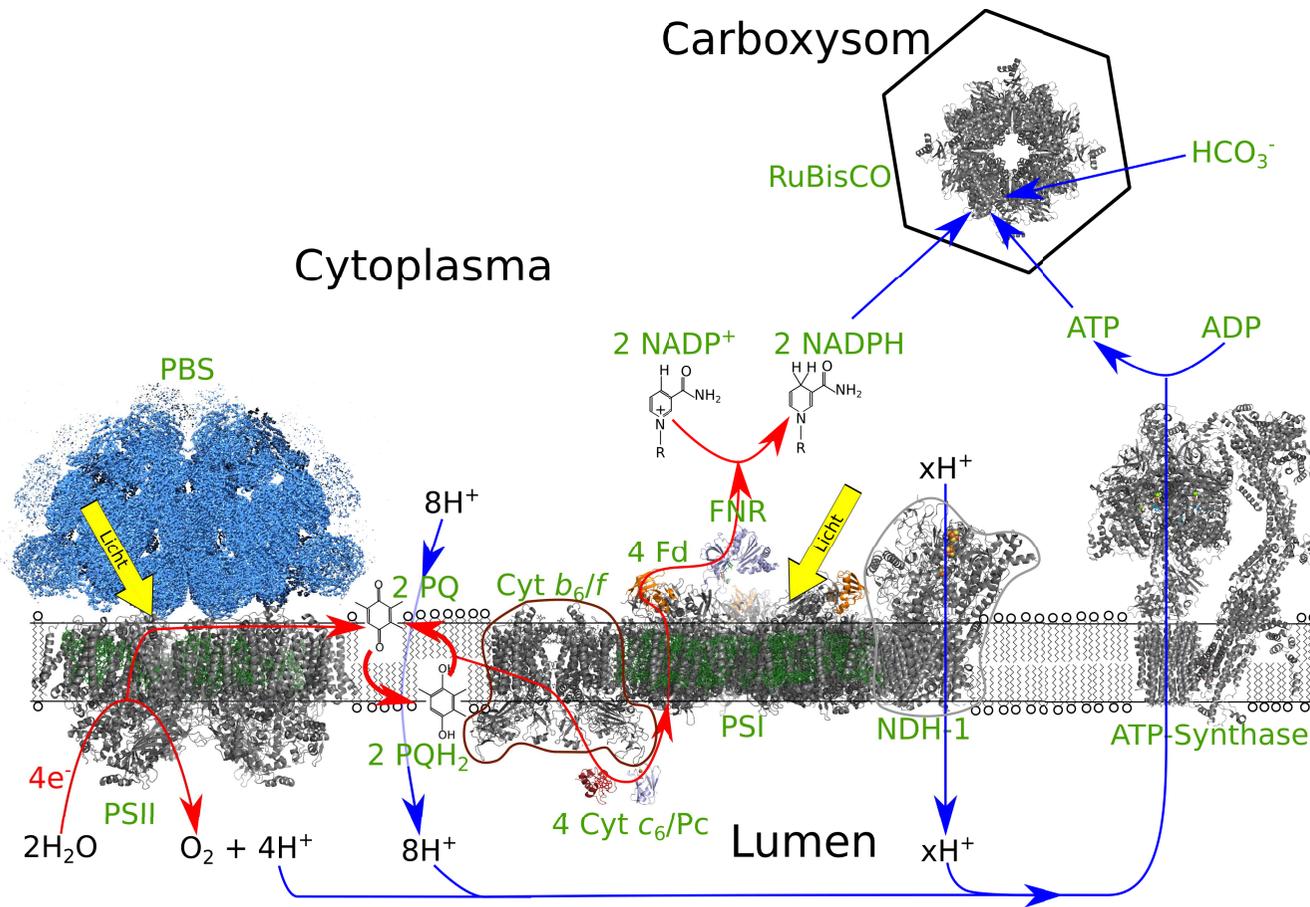


Abbildung 1.1: Photosynthese in Cyanobakterien. Rote Pfeile zeigen die vorliegenden Redoxreaktionen, blaue Pfeile zeigen sonstige Reaktionen. An den Reaktionen beteiligte Enzyme und Mediatoren sind mit ihren Abkürzungen grün beschriftet. Die Abkürzungen sind im Fließtext und im Abkürzungsverzeichnis ausgeschrieben. Die Stöchiometrie der Mediatoren, Elektronen und Protonen bezieht sich auf die Produktion von einem Molekül Sauerstoff. Da das Verhältnis von linearem zu zyklischem Elektronentransport variabel ist, ist keine Stöchiometrie für NDH-1 und ATP angegeben. Die Proteinkomplexe wurden mit PyMOL und Chimera (Schrödinger, LLC 2015; Pettersen et al. 2004) mit folgenden Strukturen erstellt: PBS: EMDB 6769 (gezeigt ist ein Längsschnitt durch das Protein in verkleinerter Darstellung), PSII: PDB 4pj0, Cyt b_6/f : PDB 4h44, Cyt c_6 : PDB 1c6s, Pc: PDB 1jxd, PSI mit Fd: PDB 5zf0, FNR: PDB 2b5o, NDH-1: PDB 6hum, ATP-Synthase: PDB 6rd4, RuBisCO: PDB 6hbc.

Eine räumliche Trennung zwischen den beiden Photosystemen erfolgt deshalb, da ansonsten die Anregungsenergie von PSII auf PSI übergehen würde. Man bezeichnet diesen Effekt als *exciton spilling* (Trissl und Wilhelm 1993). Andererseits ist es sinnvoll, die aufeinanderfolgenden Komplexe der Elektronentransportkette in räumliche Nähe zu bringen. In Abbildung 1.1 wurden die Proteinkomplexe gemäß bekannten Assoziationen dargestellt. PBS bzw. LHCII sind an PSII gebunden und können somit die Anregungsenergie auf PSII übertragen. Das Cytochrom b_6/f -Komplex-Dimer ist direkt an PSI gebunden, weshalb Cyt c_6 und Pc nicht über lange Strecken diffundieren müssen (Yadav et al. 2017). Fd bindet im oxidierten Zustand mit hoher Affinität an PSI und löst sich erst, wenn es reduziert wurde. Die Bindung von Fd an PSI konnte bereits über eine Kokristallstruktur gelöst werden (Kubota-Kawai et al. 2018). FNR ist ebenfalls an PSI gebunden (Marco et al. 2019), Fd muss daher nicht durch das großlumige Stroma oder Cytoplasma diffundieren. Durch die Bindung von NDH-1 an PSI kann ebenfalls eine schnelle Diffusion des Fd zum Zielprotein gewährleistet werden (Yadav et al. 2017). Diese Assoziationen sind jedoch nicht statisch, sondern können je nach Wachstumsbedingungen adaptiert werden. Eine bekannte Adaption ist der Zustandsübergang (*state transition*) der Lichtsammelkomplexe. Liegen viele PQ-Moleküle im reduzierten Zustand vor, so wird LHCII phosphoryliert und bindet an PSI (Pan et al. 2018). Auch die PBS der Cyanobakterien und Rotalgen können an PSI binden (Kaňa et al. 2012; Kaňa et al. 2014).

1.2.3 Cytochrom c_6 und Plastocyanin

In pflanzlichen Chloroplasten ist das kupferhaltige Protein Pc der Elektronendonator des PSI. Eukaryotische Algen und Cyanobakterien verfügen neben Pc auch über das Protein Cyt c_6 , dessen redoxaktiver Kofaktor eine eisenhaltige Häm c -Gruppe ist. In der Literatur findet sich für Cyt c_6 auch die Bezeichnung Cyt c_{553} , da es im reduzierten Zustand eine Absorption bei 553 nm aufweisen. Die Expression der beiden Proteine wird über die Verfügbarkeit von Kupfer reguliert (Merchant et al. 1991). Das Genom von *T. elongatus* enthält kein Gen für Pc, daher ist Cyt c_6 der einzige PSI-Elektronendonator in diesem Cyanobakterium (Nakamura et al. 2002).

Cytochrom c -Proteine können Redoxenzyme mit einer katalytischen Aktivität sein oder Redoxmediatoren, die Elektronen zwischen zwei Proteinen transferieren. Cytochrom c -Redoxmediatoren wie Cyt c_6 sind weit verbreitet und gehören zur Klasse I der Cytochrom c -Proteine. Sie kommen in allen Organismen, vom einzelligen Bakterium bis hin zum Menschen, vor. Neben PSI können sie auch Enzyme wie den Komplex IV (Cytochrom c -Oxidase) der Atmungskette oder die Nitritreduktase der im Boden lebenden Pseudomonaden reduzieren. Es handelt sich meist um lösliche Proteine, die aus einer einzigen Domäne bestehen. Eine Ausnahme stellen die extrazellulären Cytochrome der grampositiven Bakterien dar, die über einen Membrananker mit der Cytoplasmamembran verbunden sind (Bertini et al. 2006). In Abbildung 1.2 ist Cyt c_6 aus *T. elongatus* neben dem Cyt c_2 aus dem Purpurbakterium *Rhodospira rubra* und einem mitochondrialen Cytochrom c aus Pferdherz (*horse heart*, Cyt c_{HH}) dargestellt. Im Verlauf der Evolution divergierten die Cytochrome, sodass sie heute nur noch über eine geringe Sequenzidentität verfügen. Bereits innerhalb der Cyanobakterien sind nur wenige Aminosäureseitenketten an der Oberfläche der Proteine vergleichbar (Hervás et al. 2005). In Abbildung 1.2 lässt sich jedoch erkennen, dass drei α -Helices in allen Cytochromen konserviert sind. Ferner ist die Bindungstasche der Häm-Gruppe hoch konserviert. Die Häm c -Gruppe besteht aus einem hydrophoben Porphyrinring, der ein zentrales Eisenion ligiert. Der Porphyrin-

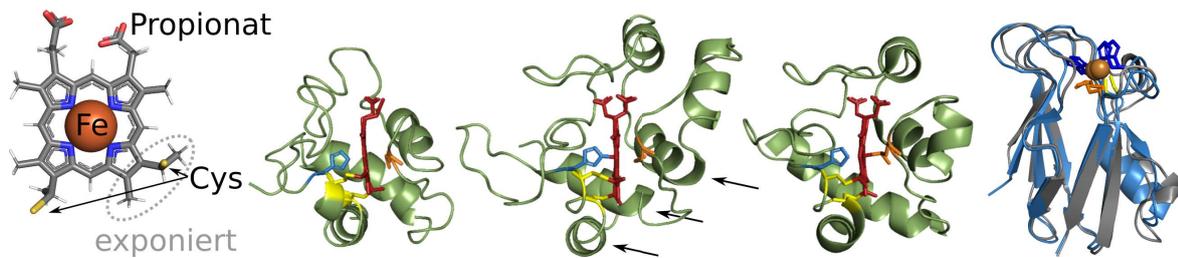


Abbildung 1.2: Vergleich von Cytochromen und Plastocyaninen. Dargestellt sind eine Häm *c*-Gruppe (links), drei Cytochrom *c*- (Mitte) und zwei Pc-Proteine (rechts). An der Häm-Gruppe sind die Thioetherbindungen zu den beiden Cysteinen (gelbe Atome), sowie der wasser-exponierte Bereich (gestrichelte Ellipse) kenntlich gemacht. Die Proteine sind von links nach rechts Cyt c_6 von *T. elongatus* (PDB-Code: 1c6s, Beißinger et al. 1998), Cyt c_2 von *Rhodobacter sphaeroides* (PDB-Code: 1c2n, Cordier et al. 1998), Cyt c_{HH} aus Pferdeherz (PDB-Code: 1hrc, Bushnell et al. 1990) und Plastocyanin aus *Synechocystis* sp. (hellblau, PDB-Code: 1jxd, Bertini et al. 2001) sowie aus Spinat (grau, PDB-Code: 1ag6, Xue et al. 1998). Die Strukturen der beiden Plastocyanine wurden übereinander gelegt, um zu verdeutlichen, dass sie nahezu identisch sind. Die Häm-Gruppe ist in rot und das Kupfer in orange hervorgehoben. Die Kofaktoren werden über Cysteine (gelb) Histidine (blau) und Methionin (orange) koordiniert. Die drei konservierten α -Helices der Cytochrome sind mit Pfeilen markiert.

ring ist mit zwei Propionsäuregruppen derivatisiert, die ihm eine negative Ladung verleihen (Kaszuba et al. 2013). Das zentrale Eisen wird über ein Methionin und ein Histidin ligiert. Außerdem sind zwei Cysteine über kovalente Thioether an die Häm *c*-Gruppe gebunden. Die beiden Cysteine und das Histidin sind in einem Cys-X-X-Cys-His-Sequenzmotiv konserviert. Neben diesen konservierten Aminosäureseitenketten ist die Bindungstasche überwiegend hydrophob. Zusammen mit einem wasserexponiertem Bereich der Häm *c*-Gruppe bildet die Bindungstasche eine hydrophobe Oberfläche aus. Die Oberfläche, die an die Häm *c*-Gruppe angrenzt, wird als *northern face* bezeichnet. Pc wird ausschließlich für den Elektronentransport vom Cytochrom b_6/f -Komplex zu PSI genutzt. Seine Struktur ist daher stärker konserviert als die des Cytochrom *c*. Das Proteinrückgrat ist zwischen cyanobakteriellem und pflanzlichem Pc nahezu identisch (Abbildung 1.2, rechts). Es besteht aus einer β -Fass-Struktur mit acht β -Faltblättern und einer α -Helix. Das redoxaktive Kupfer wird in einer tetrahedralen Anordnung von zwei Histidinen, einem Cystein und einem Methionin koordiniert. Bei dieser Art der Koordinierung spricht man von einem Typ-1-Kupferprotein (Hervás et al. 2003). Wie auch Cyt c_6 bildet Pc einen hydrophoben Bereich an der als *northern face* bezeichneten Oberfläche aus.

1.3 Photosystem I

PSI oxidiert Cyt c_6 oder Pc und reduziert mit Hilfe von Anregungsenergie Fd oder Flavodoxin. Es ist damit eines der beiden Reaktionszentren (RC) der oxygenen Photosynthese. Der terminale Elektronenakzeptor des PSI ist ein Eisen-Schwefel-Zentrum, somit ist PSI ein Typ-I-Reaktionszentrum. Demgegenüber zählt PSII durch seinen terminalen Elektronenakzeptor, Plastochinon, zu den Typ-II-RC. Neben PSI und PSII existieren auch bakterielle RC (bRC) vom Typ-I und Typ-II. Diese vier RC sind evolutiv bereits sehr früh divergiert, weshalb sie eine sehr geringe Sequenzhomologie haben. Sie alle bestehen jedoch aus zwei zentralen Untereinheiten, welche jeweils fünf

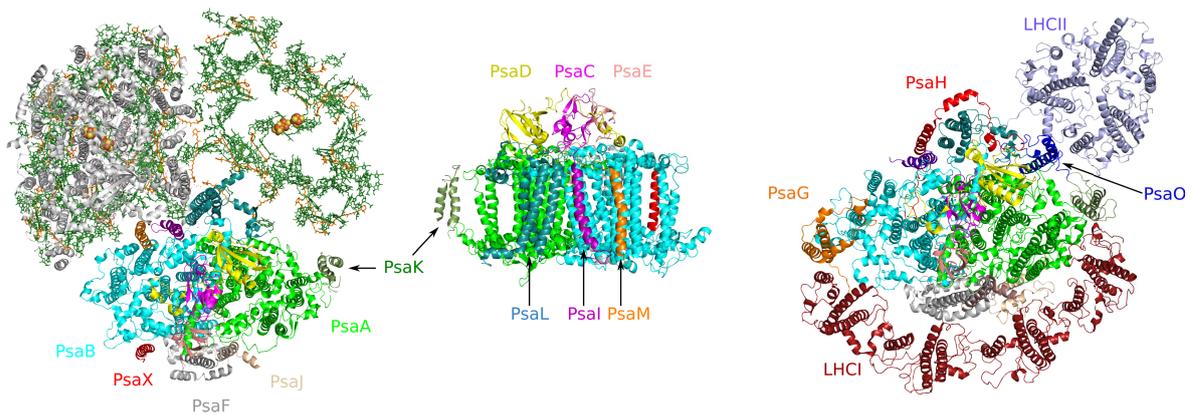


Abbildung 1.3: Trimeres PSI aus *T. elongatus* (links und Mitte) und monomeres PSI aus Mais (rechts). Die drei Monomere des links dargestellten cyanobakteriellen PSI-Trimers sind unterschiedlich hervorgehoben: ein Monomer ist mitsamt allen Kofaktoren gezeigt (Monomer links oben), in einem zweiten Monomer sind ausschließlich die Chlorophylle (grün), Carotinoide (orange) und Eisen-Schwefel-Zentren (orange-gelbe Kugeln) gezeigt (Monomer rechts oben) und im dritten Monomer wurden die zwölf Untereinheiten farblich abgetrennt (unten). Die Untereinheiten des pflanzlichen PSI sind nach dem gleichen Farbschema dargestellt. Zuzüglich sind LHCI (rot) und LHCI (lila) gezeigt. Links und rechts sind die cytoplasmatische Ansicht, und in der Mitte ist eine Ansicht aus der Membranebene (hierbei sind die Transmembranhelices gut zu erkennen). Es wurden die PDB-Strukturen 1jb0 (Jordan et al. 2001) und 5zji (Pan et al. 2018) verwendet.

konservierte Transmembranhelices beinhalten. Zwischen diesen Helices befinden sich die Kofaktoren der Ladungstrennung und der Elektronentransportkette (Fischer et al. 2016).

1.3.1 Aufbau des Photosystems I

Neben der Grundstruktur der Elektronentransportkette besteht PSI aus vielen weiteren Untereinheiten. Es ist ein membranintegroter Proteinkomplex, dessen Monomer eine Masse von etwa 350 kDa bis 500 kDa hat. Das eukaryotische PSI liegt stets als Monomer vor (Kouřil et al. 2005; Gardian et al. 2007). Cyanobakterielles PSI liegt dagegen als Mono-, Di-, Tri- oder gar Tetramer vor. Die häufigste Organisationsform ist das Trimer (Abbildung 1.3), z. B. in *T. elongatus*, *Synechocystis* sp. und *Synechococcus elongatus*. In intakten Membranen aller Cyanobakterien, die trimeres PSI (PSI_{tri}) ausbilden, ist in geringeren Mengen auch monomeres PSI (PSI_{mono}) zu finden. Das $\text{PSI}_{\text{tri}} : \text{PSI}_{\text{mono}}$ -Verhältnis ist abhängig von Wachstumsbedingungen wie der Lichtintensität und Temperatur (Majeed et al. 2012; Kłodawska et al. 2014). In Heterozysten bildenden Cyanobakterien ist die häufigste Organisationsform des PSI dagegen ein Dimer (Li et al. 2019). Diese Dimere können zu Tetrameren oligomerisieren (Watanabe et al. 2010; Li et al. 2019). Bisher ist noch nicht geklärt, wieso PSI in unterschiedlichen Oligomerisationsformen vorliegt. Ein Vorteil der höheren Oligomerisationsformen ist der Austausch der Anregungsenergie von einem Monomer zu einem benachbarten Monomer, wie er bereits für das Trimer von *T. elongatus* gemessen wurde (Baker et al. 2014). Ein PSI-Monomer besteht aus bis zu 14 Transmembranuntereinheiten und drei cytoplasmatischen (bzw. stromalen) Untereinheiten. In Eukaryoten findet sich auch eine luminale Untereinheit. Vorkommen und Lokalisation der Untereinheiten sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Etwa ein Viertel der Masse des Proteins sind Kofaktoren; in der Kristallstruktur von *T. elongatus* sind 96 Chlorophyll *a*-Moleküle, 22

Tabelle 1.1: Untereinheiten des Photosystems I.¹in Rotalgen, ²in Pflanzen, ³in Grünalgen, ⁴neigt dazu, von PSI zu dissoziieren

Untereinheit	Cyanobakterien	Eukaryoten	Lokalisation
PsaA	✓	✓	transmembran mit luminalen Schleifen
PsaB	✓	✓	transmembran mit luminalen Schleifen
PsaC	✓	✓	cytoplasmatisch (stromal)
PsaD	✓	✓	cytoplasmatisch (stromal)
PsaE	✓	✓	cytoplasmatisch (stromal)
PsaF	✓	✓	transmembran mit luminalen Helices
PsaG	✗	✓	transmembran
PsaH	✗	✓	transmembran mit stromaler Schleife
PsaI	✓	✓	transmembran
PsaJ	✓	✓	transmembran
PsaK	✓	✓	transmembran
PsaL	✓	✓	transmembran
PsaM	✓	✓ ¹	transmembran
PsaN	✗	✓ ^{2,4}	luminal mit membranständiger Schleife
PsaO	✗	✓ ⁴	transmembran
PsaR	✗	(✓) ⁴	transmembran
PsaX	✓	✗	transmembran
Lhca1–4	✗	✓	transmembran
Lhca5–9	✗	✓ ^{3,4}	transmembran

Carotinoide, zwei Phyllochinone, drei Eisen-Schwefel-Zentren ([4Fe-4S]-Zentren), vier Lipide und ein Calciumion beschrieben.

PsaA und **PsaB** sind die größten Untereinheiten von PSI. Die beiden Untereinheiten sind aus einem gemeinsamen Vorgängerprotein durch Genduplikation hervorgegangen. Die Strukturen sind sehr ähnlich, weshalb zwischen den beiden Untereinheiten eine pseudosymmetrische C2-Rotationsachse angelegt werden kann. Sie haben jeweils eine Proteinmasse von 83 kDa und laufen in der SDS-PAGE bei etwa 60 kDa. Sie sind membranständig mit elf Transmembranhelices. Hier sind die meisten Kofaktoren zu finden. Beide Untereinheiten beinhalten zusammen über etwa zwölf Lipide (da diese schwer zu bestimmen sind, kann die tatsächliche Anzahl abweichen), 80 bis 86 Chlorophyll *a*-Moleküle, ein C13-Epimer des Chlorophylls *a* (Chlorophyll *a'*), 12 bis 14 Carotinoide, zwei Phyllochinone (PQN) und ein [4Fe-4S]-Zentrum (F_X). Diese Kofaktoren bilden den transmembranen Teil der Elektronentransportkette (ETC) sowie einen Großteil der Antennenpigmente aus. PsaA und PsaB bilden luminal eine hydrophobe Oberfläche aus, an die Pc und Cyt *c*₆ binden und ihre Elektronen übertragen können. Zwei weitere Kofaktoren der ETC, die [4Fe-4S]-Zentren F_A und F_B, sind in PsaC lokalisiert. **PsaC**, **PsaD** und **PsaE** sind die drei cytoplasmatischen Untereinheiten von PSI. Sie bilden die Ferredoxin-Bindungsstelle aus (Kubota-Kawai et al. 2018).

Ebenfalls für die ETC von Bedeutung ist **PsaF**. Diese Transmembranuntereinheit liegt an der Außenseite des trimeren PSI und verfügt über zwei N-terminale, luminale Helices. In eukaryotischem PSI verfügen die luminalen Helices über mehrere positiv geladene Lysine, die mit einer negativ geladenen Oberfläche von Pc und Cyt *c*₆ interagieren können (Suga et al. 2019). PsaF bildet somit eine zweite Bindungsstelle für Pc und Cyt *c*₆ aus, die in Abschnitt 1.3.3 über ihre kinetischen Eigenschaften beschrieben wird. Demgegenüber sind die beiden N-terminalen Helices von cyanobakteriellem PsaF

verkürzt, weshalb dieses keine Bindungsstelle für Pc ausbilden kann (Hatanaka et al. 1993). Die Deletion der Untereinheit hat keinen Einfluss auf das Wachstum von Cyanobakterien unter Standardwachstumsbedingungen (Chitnis et al. 1991). Die in Pflanzen vorkommende luminale Untereinheit **PsaN** ist ebenfalls am Elektronentransfer beteiligt (Haldrup et al. 1999). Der Mechanismus ist jedoch noch unbekannt. Eine weitere Funktion des PsaF ist seine Interaktion mit assoziierten Proteinen. PsaF verfügt über ein bis zwei Chlorophyll *a*-Moleküle und ein bis zwei Carotinoide. Zusammen mit der randständigen Untereinheit **PsaJ** (zwei bis drei Chlorophyll *a*-Moleküle und zwei bis drei Carotinoide) und der luminalen Untereinheit **PsaN** (nur in Pflanzen, zwei Chlorophyll *a*-Moleküle) verfügt es über drei (in *T. elongatus*) bis sieben (in Pflanzen) Chlorophylle und vier Carotinoide. Über diese Kofaktoren kann Anregungsenergie vom Lichtsammelkomplex I (LHCI) zum eukaryotischen PSI übertragen werden. LHCI existiert nicht in Cyanobakterien, stattdessen können PsaF und PsaJ andere Proteine wie das chlorophyllhaltige Transmembranprotein IsiA (*iron-stress-induced protein A*) binden (Toporik et al. 2019). PsaF ist zwar die zentrale Untereinheit für die Bindung von Pc und die Assoziation mit Transmembranproteinen, führt aber keine der beiden Funktionen allein aus. Dies kann gut daran veranschaulicht werden, dass das *psaF*-Gen in Cyanophagen immer mit *psaJ* zu einem gemeinsamen *psaJF* fusioniert ist (Sharon et al. 2009; Sharon et al. 2011). Zwar gibt es auch Cyanophagen mit *psaJ*-Genen ohne ein *psaF*-Gen, aber eine Funktion von PsaJ ohne PsaF ist derzeit nicht bekannt. PsaJ wird in der Literatur als Stabilisator von PsaF bezeichnet (Jensen et al. 2007).

Auch **PsaK** und **PsaG** interagieren mit benachbarten Proteinen. Das *psaG*-Gen ist evolutiv durch Genduplikation des *psaK*-Gens entstanden (Kjaerulff et al. 1993). Einige Cyanobakterien verfügen über mehrere *psaK*-Gene, die abhängig von den Umweltbedingungen exprimiert werden. Dies führt dazu, dass in unterschiedlichen Strukturen von PSI desselben Organismus unterschiedliche PsaK-Untereinheiten vorliegen können, z. B. wurde für die Kristallstruktur von *Synechocystis* sp. (PDB-Code: 5oy0) *psaK1* und für die elektronenmikroskopische Struktur von PSI mit IsiA (PDB-Code: 6nwa) *psaK2* exprimiert. *T. elongatus* besitzt nur ein *psaK*-Gen. PsaG und PsaK sind wie PsaB und PsaA gemäß einer Pseudo-C2-Symmetrie an der Außenseite der beiden großen Untereinheiten lokalisiert (Abbildung 1.3, rechts). Durch die Rotationssymmetrie ist PsaG näher an LHCI als PsaK und kann Anregungsenergie in den PSI-Kern leiten. PsaK ist in eukaryotischem PSI dagegen an der Interaktion mit LHCII beteiligt (Pan et al. 2018). In cyanobakteriellem PSI kann PsaK wie PsaF und PsaJ an IsiA binden (Toporik et al. 2019).

Neben PsaK sind auch **PsaO**, **PsaH** und **PsaL** an der Bindung von LHCII beteiligt. Alle drei Untereinheiten binden über Wasserstoffbrücken und Salzbrücken an den N-Terminus einer LHCII-Untereinheit. Hervorzuheben ist hierbei PsaL. Damit sich LHCII von PSII während der *state transition* löst und an PSI bindet, wird LHCII an einem N-terminalen Threonin phosphoryliert. PsaL bindet an diese phosphorylierte Seitenkette über eine Salzbrücke und zwei Wasserstoffbrücken (Pan et al. 2018). Neben dem N-Terminus bindet PsaO über eine große Kontaktfläche an zwei der drei LHCII-Untereinheiten. Da LHCII nicht in Cyanobakterien existiert, ist es nicht verwunderlich, dass auch PsaO und PsaH nicht in diesen Organismen vorliegen. Stattdessen ist PsaL hier die Kontaktstelle der Monomere, die sich zu Dimeren, Trimeren und Tetrameren oligomerisieren. In den meisten Cyanobakterien liegt PSI als Trimer vor. Im trimeren PSI binden die Transmembranhelices der drei benachbarten PsaL-Untereinheiten aneinander. Zuzüglich bildet der C-Terminus von PsaL eine luminale α -Helix aus, die sich vom PSI-Monomer wegstreckt. Diese α -Helix interagiert mit PsaL,

PsaI, PsaA und PsaB benachbarter Monomere (Jordan et al. 2001). Zudem ist sie auch an der Komplexierung eines Calciumions, das zwei PsaL-Untereinheiten mit PsaA verbindet, beteiligt. In Heterozysten bildenden Cyanobakterien oligomerisiert das PSI zu Dimeren und Tetrameren. Hier ist der C-Terminus von PsaL verkürzt. Stattdessen ist eine cytoplasmatische Schleife des PsaL verlängert. Dies führt zu einer veränderten Assoziation der Monomere, die bisher nur mit geringer Auflösung untersucht wurde (Semchonok et al. 2016).

PsaI und **PsaM** sind kleine Transmembranuntereinheiten mit je einer α -Helix, die im trimeren PSI zwischen zwei Monomeren liegen. PsaI stabilisiert die Bindung von PsaL und PsaH an PSI (Plöckinger et al. 2016). Die Funktion von PsaM in Cyanobakterien ist noch nicht geklärt. Aufgrund seiner Lokalisation zwischen den Monomeren ist es denkbar, dass es für die Oligomerisierung notwendig ist. In *T. elongatus* bindet PsaM ein Chlorophyll *a*, das weit in den Monomer-Monomer-Zwischenraum hineinragt. In Rotalgen ist PsaM an der Bindung von LHCI-Untereinheiten beteiligt (Pi et al. 2018). Eine ebenfalls kleine Untereinheit, die nur aus einer Transmembranhelix besteht, ist **PsaX**. Diese kommt nur in manchen Cyanobakterien vor. In *T. elongatus* ist sie neben PsaF lokalisiert. In *Synechocystis* sp. ist sie dagegen nicht vorhanden. Ihre Funktion ist noch nicht geklärt.

In der Literatur finden sich weitere Proteine, die als Untereinheiten des PSI gelistet werden, darunter **PsaP** und **PsaR**. PsaP findet sich ausschließlich in Pflanzen und migriert in der Dichtegradientenzentrifugation mit PSI. Es handelt sich jedoch um ein phosphorylierbares Protein, das an der Regulation der Granathylakoide beteiligt ist. Das Protein wurde 2013 umbenannt und wird nun in der Literatur als CURT1 bezeichnet (Armbruster et al. 2013). PsaR wurde dagegen in einer pflanzlichen Kristallstruktur entdeckt (Amunts et al. 2010). Es ist ein α -helikales Protein, das als eine Verlängerung des LHCI-Gürtels neben PsaK lokalisiert ist. Bisher konnte diese α -Helix nur als Poly-Alanin-Rückgrat modelliert werden, weshalb eine Identifizierung des Proteins nicht erfolgte. PsaR wurde bisher in keiner anderen PSI-Struktur gefunden.

Im PSI der Grünalgen und Pflanzen sind vier Untereinheiten des **LHCI** in Form eines randständigen Gürtels fest an PSI gebunden und werden daher hier zu den PSI-Untereinheiten gezählt (Abbildung 1.3). LHCI dient dem PSI als Antenne, die Anregungsenergie aufnehmen kann und als Exzitonen zum PSI-Kern weiterleitet. Es setzt sich aus den LHCI-Untereinheiten Lhca1 bis Lhca4 zusammen, wobei Lhca1 mit Lhca4 und Lhca2 mit Lhca3 jeweils ein Dimer bilden. In Rot-, Braun- und Kieselalgen ist LHCI an anderen Bindungsstellen mit PSI assoziiert (Gardian et al. 2007). Neben dem LHCI-Gürtel können noch weitere LHCI-Untereinheiten, Lhca5 bis Lhca9, mit PSI assoziiert sein (Suga et al. 2019). In Grünalgen binden diese Untereinheiten als zweiter LHCI-Gürtel an den ersten Gürtel oder sie binden als Heterodimer zwischen PsaL und PsaG. Auch in Moosen kann ein zweiter LHCI-Gürtel gebildet werden. Hierfür ist neben den Lhca-Untereinheiten auch das Protein Lhcb9 notwendig (Iwai et al. 2015). In höheren Pflanzen wurden die Untereinheiten Lhca5 und Lhca6 ebenfalls gefunden, diese werden in der Regel jedoch nicht exprimiert (Busch und Hippler 2011). Das Proteinrückgrat der LHCI-Untereinheiten ist hoch konserviert. Sie binden neun bis zwölf Chlorophyll *a*-Moleküle, ein bis fünf Chlorophyll *b*-Moleküle und drei bis vier Carotinoide. In der Kristallstruktur des PSI aus der Erbse (*Pisum sativum*) wurden im LHCI-Gürtel 68 Pigmente identifiziert (Mazor et al. 2017).

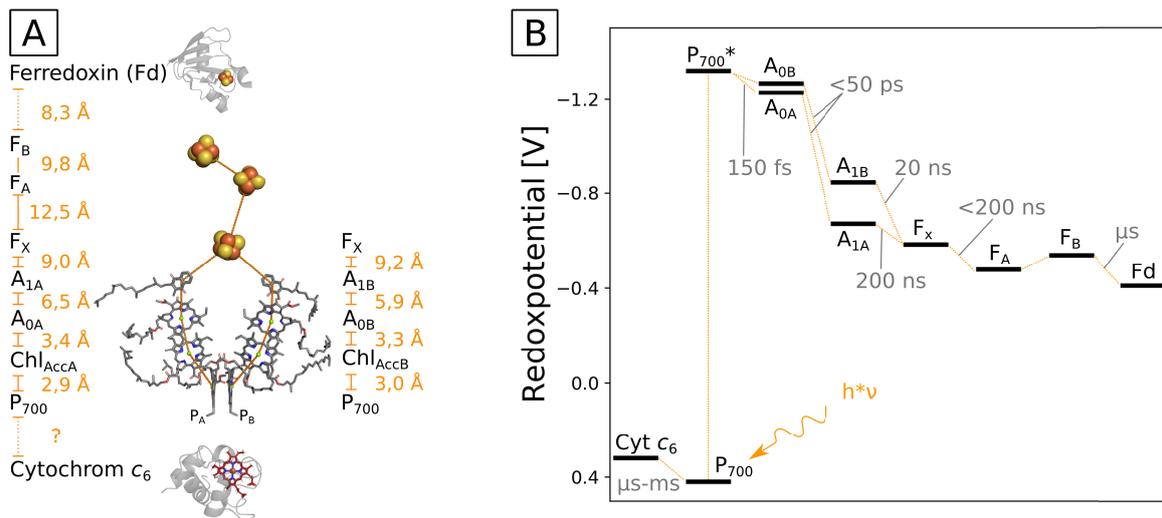


Abbildung 1.4: Kofaktoren der PSI-Elektronentransportkette mit Cyt c_6 und Ferredoxin. A: Kofaktoren beider Äste (Index A und B entsprechen dem jeweiligen Ast) mit Abständen (von Kante zu Kante gemessen, orange). Der Abstand von F_B zu Ferredoxin wurde der Kokristallstruktur (PDB-Code: 5zf0, Kubota-Kawai et al. 2018) entnommen, für Cyt c_6 (PDB-Code: 1c6s, Beißinger et al. 1998) gibt es keine Informationen über den Abstand. Ferredoxin und Cyt c_6 sind verkleinert dargestellt. B: Redoxpotenziale mitsamt Transferraten (grau). Für Chlorophyll_{Acc} sind keine Werte bekannt. Die Potenziale und Raten sind abhängig von den Messbedingungen und weichen je nach Publikation von den hier angegebenen Werten ab (Ptushenko et al. 2008; Kurashov et al. 2018). Die Raten des Elektronentransports von Cyt c_6 auf P_{700} sind in Abschnitt 1.3.3 erklärt.

1.3.2 Ladungstrennung und Elektronentransport

Die Anregungsenergie wird über die Antennenpigmente zum Zentrum des PSI zwischen PsaA und PsaB weitergeleitet. Dort tritt ein Effekt auf, der bereits 1956 beobachtet werden konnte: Belichtet man Chloroplasten oder Cyanobakterien, so ändert sich deren Absorption bei 700 nm (Kok 1956). Das dafür verantwortliche Pigment wurde P_{700} genannt. Dieses Pigment besteht überwiegend aus dem Chlorophyll a' (P_A , das von einem Histidin des PsaA koordiniert wird) und dem parallel dazu liegenden Chlorophyll a (P_B , das von einem Histidin des PsaB koordiniert wird). Solche parallelen, exzitonisch gekoppelten (Bakterio-)Chlorophylle finden sich auch in PSII und in bakteriellen Reaktionszentren. Diese beiden Chlorophylle werden in Anlehnung an das Bakteriochlorophyllpaar in bakteriellen Reaktionszentren als *special pair* bezeichnet. P_{700} geht von seinem Grundzustand mit einem Redoxpotenzial (P_{700}/P_{700}^+) von 420 mV in einen angeregten Zustand (P_{700}^*) mit -1300 mV über. Durch dieses sehr negative Redoxpotenzial kommt es zur Ladungstrennung, bei der P_{700} ein Elektron an die Elektronentransportkette abgibt. Die Elektronentransportkette besteht in PSI aus zwei Ästen: dem A-Ast, der mehrheitlich an PsaA gebunden ist, und dem B-Ast, der mehrheitlich an PsaB gebunden ist (Abbildung 1.4). Neben dem Chlorophyllpaar P_{700} bestehen die Äste aus jeweils einem akzessorischen Chlorophyll a (A_{Acc}), dem Kofaktor A_0 (ein Chlorophyll a) und dem Kofaktor A_1 (ein Phyllochinon). Der primäre Elektronentransfer zwischen den Kofaktoren erfolgt in einem Femtosekundenzeitraum und wurde daher noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass P_{700} der primäre Elektronendonator ist, der sein Elektron auf A_{Acc} und A_0 überträgt. Alternativ ist aber auch A_{Acc} als primärer Elektronendonator beschrieben worden, der A_0 reduziert und anschließend von P_{700} reduziert wird (Badshah et al. 2018). In beiden Fällen entsteht

ein stabiles $[P_{700}^+/A_0^-]$ -Intermediat. Der reduzierte Kofaktor A_0 reduziert daraufhin A_1 . Während in PSII und bakteriellen Reaktionszentren vom Typ II nur einer der beiden Äste Elektronen transferiert, sind in PSI beide Äste aktiv. Diese beiden Äste zeigen ebenfalls eine Asymmetrie: In beiden Ästen liegen geringe Unterschiede in den Abständen der Kofaktoren vor (Abbildung 1.4, A). Diese geringen Unterschiede können sich bereits auf die Elektronentransferraten auswirken, da die Rate exponentiell vom Abstand der beteiligten Atome abhängig ist (Moser et al. 1992). Tatsächlich weist der B-Ast höhere Elektronentransferraten und negativere Redoxpotenziale als der A-Ast auf (Abbildung 1.4, B). Allerdings werden über den A-Ast die meisten Elektronen von P_{700} zum Eisen-Schwefel-Zentrum F_X transferiert. Das Verhältnis der Aktivität von A-Ast zu B-Ast ist 1:1 bis 2:1 in Grünalgen und 4:1 bis 9:1 in Cyanobakterien (Santabarbara et al. 2010). Von F_X wird das Elektron auf F_A und anschließend auf F_B transferiert. F_A und F_B sind in PsaC lokalisiert. Das lösliche Eisen-Schwefel-Protein Ferredoxin bindet im oxidierten Zustand an PsaC. Das $[2Fe-2S]$ -Zentrum des Ferredoxins ist nun in einem Abstand von 8 \AA von F_B und kann das Elektron aufnehmen. Das oxidierte P_{700}^+ kann anschließend durch Cyt c_6 oder Pc reduziert werden. Das Redoxpotenzial von Cyt c_6 beträgt 320 mV und das des Ferredoxins -410 mV . Gemäß der Gleichung

$$\Delta G^0 = -z \cdot Fa \cdot \Delta E^0 \quad (1.1)$$

wird durch PSI eine Energie von $-70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ nutzbar gemacht. ΔG^0 ist die freie Enthalpie unter Standardbedingungen, z die Ladung, Fa die Faraday-Konstante und ΔE^0 das Redoxpotenzial unter Standardbedingungen.

1.3.3 Elektronentransfer von Plastocyanin und Cytochrom c_6 auf Photosystem I

Die Bindungsstelle von Ferredoxin an PSI wurde bereits sehr detailliert charakterisiert. Ferredoxin bindet im oxidierten Zustand an PSI mit einer Affinität im nanomolaren Bereich (Barth et al. 1998) und dissoziiert im reduzierten Zustand. Durch Substitution des Eisen-Schwefel-Zentrums gegen ein Gallium-Schwefel-Zentrum bindet Ferredoxin mit noch höherer Affinität und es kommt auch im reduzierten Zustand zu keiner Dissoziation (Mignéé et al. 2017). Ein solches Gallium-substituiertes Ferredoxin konnte bereits zur Lösung der Kokristallstruktur bei $4,2 \text{ \AA}$ genutzt werden (Kubota-Kawai et al. 2018). Auch die Bindung von Pc und Cyt c_6 an PSI ist bereits gut untersucht. Im Gegensatz zu Ferredoxin binden diese Proteine jedoch mit geringerer Affinität, weshalb noch keine Struktur des Komplexes existiert. Pc und Cyt c_6 binden im reduzierten Zustand an PSI und übertragen ihre Elektronen auf P_{700}^+ . Damit sich das oxidierte Pc von PSI löst, verringert sich dessen Affinität in pflanzlichen Thylakoiden um einen Faktor von 6 bis 24 (Drepper et al. 1996; Danielsen et al. 1999).

Die Assoziation der Elektronendonoren Pc und Cyt c_6 mit PSI wird in der Regel mit Hilfe von Reduktionskinetiken bestimmt. Hierfür eignet sich einerseits die Sauerstoffreduktionskinetik. PSI wird durch reduziertes Pc oder Cyt c_6 reduziert. Durch kontinuierliche Belichtung wird PSI durchgehend oxidiert, wobei das sehr negative Redoxpotenzial des Eisen-Schwefel-Zentrums F_B ausreicht, um Sauerstoff zu reduzieren. Die Sauerstoffkonzentration wird an einer Clark-Elektrode gemessen und somit kann der gesamte Elektronentransfer von Pc und Cyt c_6 über PSI auf Sauerstoff ermittelt werden. Details zur Auswertung der Sauerstoffreduktionskinetik und zur Durchführung sind Abschnitt 2.4.1 (Material und Methoden) zu entnehmen. Eine andere Methode ist es, die Reduktionskinetik des P_{700} zu messen. Dabei wird die Eigenschaft des P_{700} genutzt,

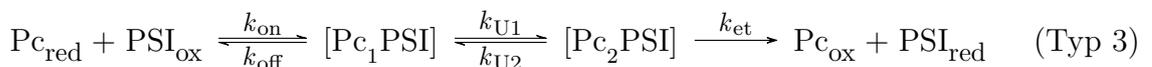
Licht im oxidierten und reduzierten Zustand mit unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten zu absorbieren. Durch einen intensiven Lichtstrahl wird P_{700} zur Ladungstrennung angeregt. Das Elektron wird an F_B durch einen künstlichen Elektronenakzeptor entfernt. Anschließend wird in einem Photometer zeitaufgelöst bestimmt, wie lange es dauert, bis P_{700}^+ durch den Elektronendonator wieder reduziert wird. Sind Pc oder Cyt c_6 bereits an PSI komplexiert, so erfolgt die Reduktion in einer schnellen Phase von wenigen Mikrosekunden (ca. 3 μ s). Die Reaktion ist in diesem Fall unabhängig von der Konzentration des Elektronendonors (Kinetik erster Ordnung). Muss der Elektronendonator dagegen zuerst zu PSI diffundieren, so liegt eine langsame Phase vor, bei der die Reduktion wenige Millisekunden benötigt. Die Kinetik ist in diesem Fall konzentrationsabhängig (Kinetik zweiter Ordnung). Die Reaktion von cyanobakteriellem Pc und Cyt c_6 mit PSI ist konzentrationsabhängig und erfolgt in der langsamen Phase gemäß dem Schema:



Dabei ist k_{on} die kinetische Konstante der Assoziation, Pc steht für Plastocyanin oder Cyt c_6 und red bzw. ox stehen für reduziert bzw. oxidiert. Nach diesem Schema bildet sich kein Komplex zwischen Pc oder Cyt c_6 und PSI aus (Hatanaka et al. 1993; Hervás et al. 1995). Der Elektronendonator reagiert mit PSI über eine Kollision. Ein Komplex aus beiden Proteinen ist so kurzlebig, dass er hier nicht bestimmt werden kann. Auch das in dieser Arbeit verwendete PSI aus *T. elongatus* reagiert mit Cyt c_6 nach der Kinetik des Typs 1. Die kinetische Konstante zweiter Ordnung enthält nur wenige Informationen, weshalb im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt die Reduktionsraten über die Sauerstoffreduktion bestimmt wurden. Ist jedoch eine schnelle Phase gegeben, so können mit der P_{700} -Reduktionskinetik weitere kinetische Konstanten ermittelt werden. Daher ist die P_{700} -Reduktionskinetik in der Literatur stärker verbreitet als die Sauerstoffreduktionskinetik. Im Cyanobakterium *Anabaena* sp. konnte die Bildung eines Komplexes aufgrund einer schnellen Phase mit der P_{700} -Reduktionskinetik beobachtet werden:



Dabei ist k_{off} die kinetische Konstante der Dissoziation und k_{et} die kinetische Konstante des Elektronentransfers. Noch deutlicher ist die schnelle Phase bei eukaryotischem PSI. Dort treten *in vitro* sowohl Reaktionen der ersten als auch der zweiten Ordnung gleichzeitig auf. Hier sind 30 % bis 75 % des PSI mit Pc oder Cyt c_6 komplexiert. *In vivo* kann bis zu 95 % des PSI mit Pc komplexiert sein (Haehnel et al. 1989; Danielsen et al. 1999). Da die schnelle und die langsame Phase weit auseinanderliegen, können sie gut getrennt aufgelöst werden. Dies ermöglicht es, die Proteininteraktion des eukaryotischen PSI genauer zu analysieren. Das reduzierte Pc oder Cyt c_6 bindet an das oxidierte PSI und bildet einen inaktiven Komplex. Daraufhin kommt es zu einer Umorientierung des Elektronendonors am PSI, wodurch sich ein aktiver Komplex bildet. In diesem aktiven Komplex kann PSI reduziert werden, wodurch der Komplex dissoziiert (Hervás et al. 1995):



Hierbei sind k_U die kinetischen Konstanten der Umorientierung und Pc_1/Pc_2 ist Plastocyanin, das vor der Umorientierung an Bindungsstelle 1 bzw. nach Umorientierung an der aktiven Bindungsstelle 2 lokalisiert ist. Durch Mutation des Pc oder Cyt c_6 kann

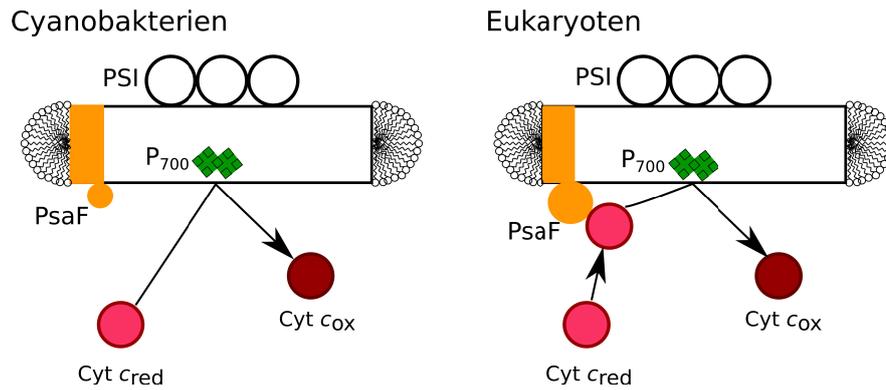


Abbildung 1.5: Schema der Bindung von Cyt c_6 an PSI in Cyanobakterien (links) und Eukaryoten (rechts). In Cyanobakterien diffundiert reduziertes Cyt c_6 oder Pc zu PSI, überträgt sein Elektron auf P₇₀₀ (grün) und löst sich im oxidierten Zustand wieder von PSI. Dies entspricht der Kinetik nach Typ 1. In Eukaryoten bindet Cyt c_6 oder Pc an zwei luminale Helices der Untereinheit PsaF (orange). Anschließend findet eine Umorientierung des Cyt c_6 am PSI statt, wodurch ein Elektronentransport zu P₇₀₀ ermöglicht wird. Dies entspricht der Kinetik nach Typ 3. Die Helices von PsaF sind in cyanobakteriellem PSI verkürzt und tragen nicht zur Bindung bei.

eine dieser drei Reaktionen in die jeweils anderen überführt werden (Díaz-Quintana et al. 2003). Die Umorientierung der Typ-3-Kinetik lässt sich durch die Untereinheit PsaF erklären (Abbildung 1.5). Wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, ist die luminale Helix von PsaF eine Bindungsstelle für Pc und Cyt c_6 , während P₇₀₀ zwischen PsaA und PsaB lokalisiert ist. Dort sind sechs bis neun Lysine lokalisiert, die Salzbrücken mit einer negativ geladenen Oberfläche des Elektronendonors bilden können. An dieser Stelle lassen sich die beiden Proteine chemisch quervernetzen (Wynn und Malkin 1988). Obwohl die große Anzahl geladener Seitenketten eine diffuse elektrostatische Interaktion vermuten lässt, ist die Bindungsstelle sehr genau definiert. Durch Mutationsanalysen in *Chlamydomonas reinhardtii* wurde festgestellt, dass die Lysine 16 bis 30 (nicht aber Lysin 12) der Helix mit Pc interagieren (Hippler et al. 1998). Mittels Elektronenmikroskopie wurde eine gering aufgelöste elektrostatische Potenzialdichte des Pc an PsaF identifiziert. Diese Dichte ist exakt an den Lysinen 16 bis 30 lokalisiert (Suga et al. 2019). Die positive Ladung des PsaF wirkt über große Entfernung auf das Pc. Sobald Pc PsaF erreicht, bildet Pc einen definierten *encounter*-Komplex [Pc₁PSI], der sich zum aktiven Komplex [Pc₂PSI] umorientieren kann (Hervás et al. 1992; Golbeck 2006). Die Unterschiede in der Kinetik zwischen eukaryotischem und cyanobakteriellem PSI lassen sich damit auch über PsaF erklären. Im cyanobakteriellen PSI fehlen diese Lysinseitenketten, sodass sich kein *encounter*-Komplex ausbilden kann. Die Deletion von cyanobakteriellem PsaF hat keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen oder auf die Aktivität der isolierten Proteine (Chitnis et al. 1991; Hatanaka et al. 1993; Mühlhoff und Chauvat 1996). Dennoch wird eine Beteiligung von PsaF an der Bindung von cyanobakteriellem Pc und Cyt c_6 bis heute nicht ausgeschlossen. So stellten Kubota-Kawai et al. fest, dass die luminale Helix von PsaF in Richtung P₇₀₀ verschoben ist, wenn oxidiertes Ferredoxin an PSI gebunden ist (Kubota-Kawai et al. 2018). Es wurde diskutiert, dass PsaF durch seine Beweglichkeit eine Rolle in der Bindung oder Orientierung des Elektronendonors erfüllen könnte.

Neben der elektrostatischen Bindungsstelle an PsaF wurde eine zweite elektrostatische Wechselwirkung identifiziert. Sowohl Pc als auch Cyt c_6 verfügen in der Nähe des Kupfers und der Häm-Gruppe einen Bereich mit geladenen Seitenketten. In *Chlamydo-*

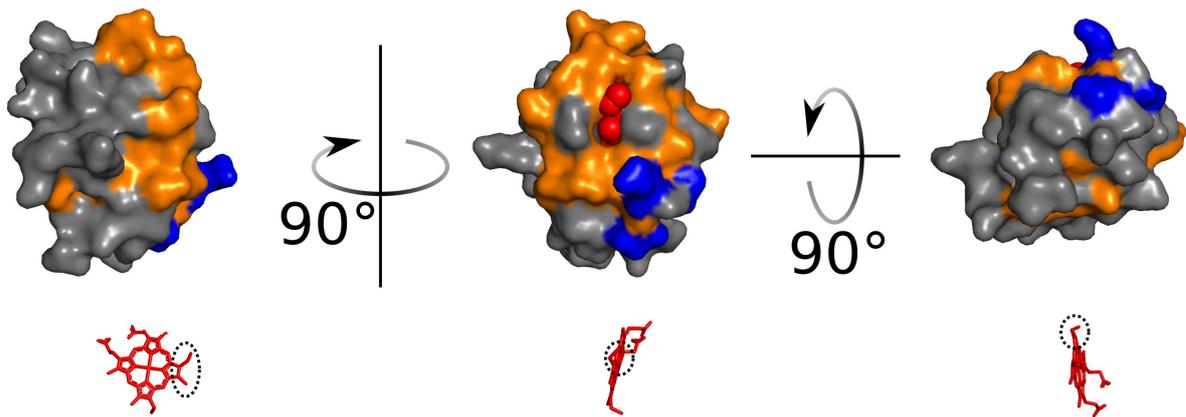


Abbildung 1.6: Oberfläche des Cyt c_6 in Cyanobakterien. Die Struktur des Cyt c_6 aus *T. elongatus* (PDB-Code: 1c6s, Beißinger et al. 1998) ist als Oberfläche (oben) mit der Orientierung der Häm-Gruppe (unten) dargestellt. Die orange gefärbte Oberfläche besteht aus Aminosäuren, die gemäß den NMR-Messungen von Diaz-Moreno et al. (2005) mit PSI interagieren. In blau ist das Lys-X-Arg-X-Lys-Motiv aus Cyt c_6 aus *Anabaena* sp. hervorgehoben. Hierbei ist zu beachten, dass für dieses Motiv nur Arg₆₄ in Cyt c_6 aus *T. elongatus* konserviert ist. Statt den beiden Lysinen liegen hier Ala₆₂ und Thr₆₆ vor. Der gepunktete Kreis verweist auf die wasserexponierte Seite der Häm-Gruppe, welche in der mittleren Ansicht auch als rote Sphären zu erkennen ist.

monas reinhardtii wurde eine Bindung von Asp₆₅ und Arg₆₆ des Cyt c_6 an Arg₆₂₃ und Asp₆₂₄ von PsaB modelliert (Sommer et al. 2006). Auch in cyanobakteriellem Pc und Cyt c_6 ist ein konserviertes Arginin in der Nähe des Kupfers und der Häm-Gruppe zu finden. In einem Kollisionsmechanismus, wie ihn die Typ-1-Kinetik beschreibt, führen geladene Seitenketten üblicherweise zu Abstoßungen (Crowley und Ubbink 2003). Eine repulsive Interaktion liegt zwischen negativ geladenen Seitenketten von Pc mit negativ geladenen Seitenketten von PsaB vor (Navarro et al. 2000). Demgegenüber scheint das Arginin in der Nähe des Kupferions eine attraktive Wirkung zu haben. Die Deletion dieses Arginins verlangsamt die Assoziation von Pc oder Cyt c_6 mit PSI (De la Cerda et al. 1999; Molina-Heredia et al. 2001). In Cyt c_6 aus *Anabaena* sp., das mit einer Typ-2-Kinetik mit PSI reagiert, beinhaltet die Oberfläche in der Nähe der Häm-Gruppe ein Lys-X-Arg-X-Lys-Motiv. Wird eine dieser drei positiv geladenen Seitenketten gegen eine negativ geladene Seitenkette ausgetauscht, so reagiert dieses Cyt c_6 gemäß einer Typ-1-Kinetik (Molina-Heredia et al. 1999). Bisher konnte die korrespondierende Oberfläche des cyanobakteriellen PSI nicht identifiziert werden.

Die bedeutendste Interaktion zwischen Pc oder Cyt c_6 mit PSI ist ebenfalls an der Oberfläche am Kupferion und an der Häm-Gruppe lokalisiert. Hier liegt eine hydrophobe Oberfläche vor, die an eine hydrophobe Oberfläche des PSI bindet. An der luminalen Seite von P₇₀₀ sind zwei parallele Tryptophane lokalisiert. In *T. elongatus* handelt es sich dabei um Trp₆₅₅ von PsaA (Trp_{A655}) und Trp₆₃₁ von PsaB (Trp_{B631}). Die Mutation eines dieser beiden Tryptophane zu Phenylalanin führt zu einem drastischen Aktivitätsverlust (Sommer et al. 2002; Sommer et al. 2004). Hierbei zeigt sich ein Unterschied in der Bindung des Pc und des Cyt c_6 . Die Bindung von Pc wird stärker durch die Mutation von Trp_{B631} beeinflusst als durch die Mutation von Trp_{A655}. Umgekehrt wird die Bindung von Cyt c_6 stärker durch die Mutation von Trp_{A655} beeinflusst als durch die Mutation von Trp_{B631}.

Neben kinetischen Messungen wurde die Interaktion des Cyt c_6 von *Anabaena* sp. auch mit Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) untersucht (Díaz-Moreno

et al. 2005). Dazu wurde das NMR-Spektrum von ^{15}N -markiertem Cyt c_6 in Lösung gemessen und mit dem Spektrum einer ^{14}N -PSI- ^{15}N -Cyt c_6 -Lösung verglichen. Der Unterschied in der chemischen Verschiebung beider Spektren (*chemical shift perturbation*) zeigt, welche Aminosäuren des Cyt c_6 an der Bindung beteiligt sind. Die damit ermittelte Bindungsoberfläche ist in Abbildung 1.6 gezeigt.

PSI kann neben seinem nativen Pc und Cyt c_6 auch nicht native Elektronendonoren binden. Das PSI eines beliebigen Cyanobakteriums kann Cyt c_6 aus verschiedenen anderen Cyanobakterien mit ähnlicher Kinetik binden (Hervás et al. 2005). Die kinetischen Konstanten der verschiedenen Cyt c_6 -Proteine liegen dabei in der gleichen Größenordnung und weichen nur durch den Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke voneinander ab. Neben den Elektronendonoren der Pflanzen und Cyanobakterien kann PSI aber auch Elektronen von anderen Cytochromen erhalten. Auch das mitochondriale Cytochrom c aus Pferdeherz (Cyt c_{HH}) ist in der Lage, P_{700}^+ zu reduzieren (Thor et al. 1999). Cyt c_{HH} zeigt sogar eine höhere Affinität zum bakteriellen Reaktionszentrum als dessen nativer Elektronendonator Cyt c_2 (Moser und Dutton 1988).

1.4 Strukturaufklärung des Photosystems I

In den vorangegangenen Unterkapiteln dieser Einleitung wurden viele Informationen genannt, die nur mit Hilfe der Strukturanalyse der Proteine ermittelt werden konnten. Im Folgenden soll gezeigt werden, welche Methoden der Strukturaufklärung bereits an Photosystemen genutzt wurden und welche Vorteile die jeweiligen Methoden haben. Die Methoden selbst sollen hier nur angerissen werden; eine detaillierte Beschreibung ist dem Kapitel „Material, Methoden und Theorie“ zu entnehmen.

1.4.1 Kleinwinkelstreuung

Eine niedrig aufgelöste Struktur kann mit Hilfe der Kleinwinkelstreuung gemessen werden. Je nach eingesetzter Strahlenquelle unterscheidet man die Röntgenkleinwinkelstreuung (*small-angle X-ray scattering*, SAXS) von der Neutronenkleinwinkelstreuung (*small-angle neutron scattering*, SANS). Der Name leitet sich davon ab, dass ein an der Probe gestreuter Strahl unter einem kleinen Winkel gemessen wird. Die Probe wird in Lösung gemessen, das Protein liegt damit in einer nativen Konformation vor. Die Konformation sowie flexible Bereiche eines Proteins können mit der Kleinwinkelstreuung bestimmt werden (Kikhney und Svergun 2015). Es ist keine aufwendige Probenvorbereitung nötig, sodass Konformationsänderungen durch die Änderung äußerer Faktoren gemessen werden können. So wurden z. B. der Einfluss von Phosphat auf die strukturelle Integrität von Phycobilisomen (Golub et al. 2017a) sowie der Einfluss der Temperatur auf die Struktur von Detergensmizellen (Triolo et al. 1982) bestimmt. Das Detergens ist sehr flexibel und kann mit hochauflösenden Methoden nicht gemessen werden. Mittels Kleinwinkelstreuung gelang es dagegen, die Struktur des Detergensgürtels um das trimere PSI aus *T. elongatus* zu analysieren (Le et al. 2014). Aufgrund der niedrigen Auflösung kann die Struktur jedoch nur in grober Näherung beschrieben werden. Um Informationen über die Lokalisation von Kofaktoren oder Sekundärstrukturen wie Proteinschleifen zu erhalten, sind hochauflösende Methoden notwendig.

1.4.2 Röntgenbeugung am Kristall

Die gängigste Methode zur Strukturbestimmung ist die Röntgenbeugung an einem Proteinkristall, die auch als Kristallstrukturanalyse bezeichnet wird. Das Prinzip dieser Methode ist ähnlich wie das der Kleinwinkelstreuung, nur dass das Protein nicht in Lösung vorliegt, sondern in einem hochgeordneten Kristall. Auch nutzt man hierbei große Winkel, die mit einer höheren Auflösung korrelieren. Ein Röntgenstrahl wird am Proteinkristall gebeugt, wodurch ein Beugungsmuster auf dem Detektor entsteht. Aus den Intensitäten der Reflexe lassen sich die Elektronendichten und somit die Atomkoordinaten berechnen. Die Strukturen des PSI aus *T. elongatus* und des PSI aus *Synechocystis* sp. konnten mit dieser Methode bei 2,5 Å gelöst werden (Jordan et al. 2001; Malavath et al. 2018). Das pflanzliche PSI aus Erbsenthylakoiden wurde mit einer Auflösung von 2,6 Å gelöst (Mazor et al. 2017). Mit diesen Strukturen ist es möglich, die in Abbildung 1.4 dargestellten Kofaktoren der Elektronentransportkette und ihre Abstände zu bestimmen. Die Lokalisation und Orientierung der Chlorophylle ermöglichen es, den Energietransfer der Anregungsenergie von den Antennenpigmenten zum P₇₀₀ zu berechnen (Mazor et al. 2017). Auch die Bindung des Ferredoxins konnte in einer Kokristallstruktur mit PSI_{tri} bei einer Auflösung von 4,2 Å ermittelt werden. Die Struktur des PSII wurde bisher aus den thermophilen Cyanobakterien *Thermosynechococcus vulcanus* und *T. elongatus* bei Auflösungen von 1,87 Å und 2,04 Å bestimmt (Tanaka et al. 2017; Umena et al. 2011; Kern et al. 2018). Für diese beiden Kristallstrukturen wurden unterschiedliche Röntgenbeugungsmethoden genutzt. Bei der von Tanaka et al. und Umena et al. genutzten Methode wurde ein Kristall in einem Kryoprotektivum in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend an einem Synchrotron gemessen. Dabei wird der Kristall über mehrere Minuten im Röntgenstrahl gedreht und währenddessen werden winkelabhängig viele Beugungsbilder aufgezeichnet. Dies ist die gängigste Methode der Röntgenbeugung am Kristall. Sie wird im Folgenden als Kryokristallstrukturanalyse bezeichnet. Trotz der tiefen Temperaturen treten im Kristall Strahlenschäden auf, die sich in der gemessenen Struktur manifestieren. Ein bekanntes Beispiel ist die Decarboxylierung an negativ geladenen Seitenketten. Die Methode von Kern et al. nutzt dagegen einen Röntgen-Freie-Elektronen-Laser (*X-ray free electron laser*, XFEL) als Strahlenquelle. Die Röntgenstrahlen entstehen hierbei aus einem gepulsten Laserstrahl, wobei die Länge der Pulse nur wenige Femtosekunden betragen. Diese Methode wird im Folgenden als serielle Femtosekunden-Kristallografie (SFX) bezeichnet. An einem Kristall wird hierbei ein einziges Beugungsbild über einen Femtosekundenpuls gemessen. Der Kristall wird durch den intensiven Strahl zerstört, wobei das Beugungsbild aufgrund des Femtosekundenzeitraums keine Strahlenschäden beinhaltet. Um die Kristallstruktur unter unterschiedlichen Orientierungen zu bestimmen, nutzt man viele Mikrokristalle in zufälligen Orientierungen und fügt die getrennt gemessenen Beugungsbilder zu einem Datensatz zusammen. Weitere Vorteile der SFX-Methode gegenüber der Kryokristallstrukturanalyse sind ebenfalls in Kern et al. beschrieben. Die Proteinstruktur kann bei Raumtemperatur gemessen werden. Zuzüglich wurde hier das PSII vor der Strukturmessung mit sättigenden Lichtblitzen angeregt, sodass strukturelle Änderungen am Wasser oxidierenden Komplex untersucht werden konnten. Auch an PSI wurden strukturelle Änderungen mittels SFX untersucht. Aquila et al. untersuchten PSI-Ferredoxin-Kokristalle vor und nach einem sättigenden Lichtstrahl. Hierbei dissoziierte jedoch der PSI-Ferredoxin-Komplex so schnell, dass keine strukturelle Information gewonnen werden konnte (Aquila et al. 2012). Wie bei jeder Methode gibt es auch in der Röntgenbeugung am Kristall einige Nachteile. Die Auflösung des Beugungsbilds ist abhängig von der Qualität des Kristalls. Die

Züchtung und Optimierung hochwertiger Kristalle sind sehr zeitaufwendig. Proteine können im Kristall in mehreren Konformeren vorliegen. Geringfügig abweichende Atomkoordinaten werden in Form eines B-Faktors angegeben. Bei größeren Abweichungen kann keine Elektronendichte für die betroffenen Atome berechnet werden. Dies führt dazu, dass sehr flexible Strukturen nicht sichtbar sind. Daher fehlen in den PSI-Kristallstrukturen von *T. elongatus* ein Großteil der Untereinheit PsaK, mehrere Proteinschleifen, die Mehrheit der Phytylgruppen der Chlorophylle sowie der Detergensgürtel. Auch können die Kristallkontakte bestimmte Konformationen des Proteins forcieren (Bartesaghi et al. 2014). Die an den Kristallkontakten beteiligten Untereinheiten können sich von Kristall zu Kristall unterscheiden. In PSI-Kristallen von *T. elongatus* sind die Kristallkontakte zwischen PsaE und der luminalen Helix von PsaF zu finden (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001). In Kokristallen aus PSI_{tri} mit Ferredoxin befinden sie sich zwischen der gesamten luminalen Oberfläche zweier PSI-Trimere sowie zwischen Ferredoxin, PsaD und der cytoplasmatischen Seite von PsaA und PsaK (PDB-Code: 5zf0, Kubota-Kawai et al. 2018). In Kristallen von PSI_{tri} aus *Synechocystis* sp. ist dagegen die luminalen Seite von PsaA, PsaB und PsaJ in Kontakt mit der cytoplasmatischen Seite von PsaA, PsaB, PsaD und PsaE (PDB-Code: 5oy0, Malavath et al. 2018). In der Struktur des pflanzlichen PSI aus der Erbse liegt jeweils ein Kristallkontakt zwischen PsaL und PsaF sowie zwischen PsaG und LHCI vor (PDB-Code: 5l8r, Mazor et al. 2017). Obgleich diese Strukturen unterschiedliche Kristallkontakte aufweisen, kann nicht geklärt werden, ob Unterschiede in den Strukturen auf diese Kontakte zurückzuführen sind, da es sich hierbei um Proteine unterschiedlicher Organismen handelt.

1.4.3 Elektronenmikroskopie

Seit 1975 ist auch die Elektronenmikroskopie eine gängige Methode zur Analyse von Proteinstrukturen (Henderson und Unwin 1975). Diese Methode war jedoch auf niedrige Auflösungen begrenzt, was ihr den Spitznamen *blobology* einbrachte. Durch einige Verbesserungen der Methode, insbesondere die Entwicklung direkter Elektronendetektoren, gelang es vor wenigen Jahren, hochaufgelöste Strukturen zu messen. Es kam zur *resolution revolution* (Kühlbrandt 2014), die derzeit zu einem exponentiellen Anstieg der hochaufgelösten elektronenmikroskopischen Strukturen führt (Abbildung 1.7) und 2017 mit dem Nobelpreis an Jacques Dubochet, Joachim Frank sowie Richard Henderson gewürdigt wurde. Für die Elektronenmikroskopie werden die Proteine in Lösung schockgefroren. Das Protein liegt nun in einer dünnen Schicht aus amorphem Eis und kann im Elektronenmikroskop direkt betrachtet werden. Für die dreidimensionale Struktur werden die Bilder von hunderttausenden Proteinen gemäß ihrer Orientierung klassifiziert und aufsummiert. Während ein Röntgenstrahl an den Elektronen gestreut wird, wird ein Elektronenstrahl an der Ladungsdichte der Probe gestreut. Die elektronenmikroskopische Dichte ist somit keine Elektronendichte, sondern eine elektrostatische Potenzialdichte (ESP-Dichte). Besondere Vorteile der Methode sind die geringe Probenmenge (1 µg Protein) und die einfache Probenpräparation. Die Proteinaufreinigung kann im kleinen Maßstab mit schonenden Methoden erfolgen, wodurch die Dissoziation von Proteinkomplexen ausbleibt. Yadav et al. gelang es, durch eine schonende Aufreinigungsmethode eine große Anzahl von Komplexen aus PSI und assoziierten Proteinen im Elektronenmikroskop zu charakterisieren (Yadav et al. 2017). Im pflanzlichen PSI konnten mittels Elektronenmikroskopie die leicht dissoziierbaren Untereinheiten PsaN und PsaO zum ersten Mal lokalisiert werden (Pi et al. 2018; Pan et al. 2018). Auch gelang es, die Bindungsstelle von Lichtsammelkomplexen, wie dem

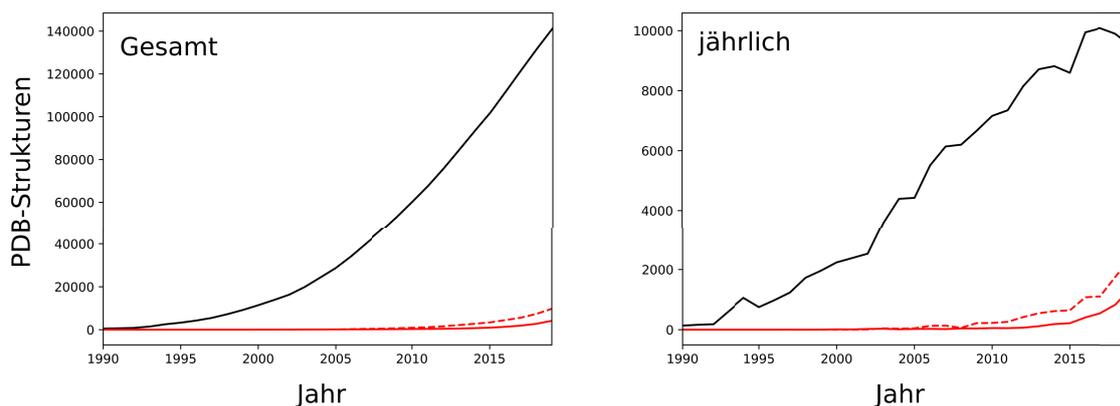


Abbildung 1.7: Statistik zur Veröffentlichung von hochaufgelösten Strukturen. Gezeigt ist die Summe aller in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegten Strukturen (links) und die pro Jahr hinterlegten Strukturen (rechts) bis 2019. Die Strukturen wurden mittels Röntgendiffraktion (schwarz) und Elektronenmikroskopie (rot) gemessen. Zuzüglich ist die Anzahl der in der elektronenmikroskopischen Datenbank (EMDB) hinterlegten Dichtekarten in gestrichelten Linien angegeben. Quellen: www.rcsb.org und www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb.

LHCII oder zuzüglich Untereinheiten des LHCI in PSI der Grünalgen, zu analysieren (Pan et al. 2018; Su et al. 2019; Suga et al. 2019). Die erste hochaufgelöste elektronenmikroskopische Struktur des cyanobakteriellen PSI ist eine Kostruktur mit 18 Untereinheiten des chlorophyllhaltigen Proteins IsiA (*iron-stress-induced protein A*, Toporik et al. 2019). Die Struktur des pflanzlichen PSII, dessen Kristallstruktur noch nicht bestimmt werden konnte, konnte nun mitsamt seinen LHCII-Antennenkomplexen als $C_2S_2M_2$ -Superkomplex gemessen werden (Su et al. 2017). Auch drei der in Abbildung 1.1 dargestellten Strukturen (Phycobilisomen, NADPH-Dehydrogenase und ATP-Synthase) wurden mittels Elektronenmikroskopie gelöst.

Alle hier zitierten Strukturen stammen von Proteinsuperkomplexen. Für Komplexe, die kleiner als 100 kDa sind, ist es schwierig, dem Protein in der Aufnahme eine Orientierung zuzuordnen, weshalb eine Klassifizierung und Lösung der Struktur oft nicht möglich ist. Wie auch in der Kristallstrukturanalyse am Synchrotron kommt es in der Elektronenmikroskopie zu Strahlenschäden (Bartesaghi et al. 2014). Die Auflösung der elektronenmikroskopischen Strukturen ist derzeit durch die Strahlenschäden begrenzt. Üblicherweise werden Strahlenintensitäten von $60 \text{ e}^- \cdot \text{\AA}^{-2}$ eingesetzt, um gute Signal-zu-Rausch-Verhältnisse zu erzeugen. Für eine maximale Auflösung werden jedoch weniger als $2 \text{ e}^- \cdot \text{\AA}^{-2}$ empfohlen (Hattne et al. 2018; Hebert 2019). Aktuell ist die Elektronenmikroskopie noch als eine Ergänzung zur Röntgenbeugung am Kristall zu sehen, aber aufgrund der einfachen Probenvorbereitung und des Fehlens störender Kristallkontakte wird sie zunehmend an Bedeutung gewinnen. Die vielen innerhalb von nur drei Jahren gemessenen Superkomplexe weisen darauf hin, dass diese Methode insbesondere für die Analyse von Kostrukturen von Vorteil ist.

1.4.4 Theoretische Analyse

Mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse und der Elektronenmikroskopie konnte eine Vielzahl von Kostrukturen gemessen werden. Oft sind die Bindungspartner jedoch so schwach oder beweglich aneinandergelagert, dass sie nicht strukturell charakterisiert werden können. Ein Beispiel hierfür ist das an PSI gebundene Pc, das nur als kleine,

undefinierte Dichte an PsaF sichtbar ist (Pan et al. 2018). Ist die Struktur beider Proteine bereits bekannt, kann die Bindungsstelle durch theoretische Methoden in Näherung beschrieben werden. Binden zwei Proteine aneinander, kann ihre Bindungsenergie mit thermodynamischen Gleichungen beschrieben werden (gängige Gleichungen sind im Methoden-Unterkapitel 2.12 angegeben). Ein in der Bindungsstelle gebundener Ligand sollte zu einer hohen Bindungsenergie führen. Dies bedeutet, dass bei einer großen Bindungsenergie eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Bindungsstelle vorliegt. Die theoretischen Methoden berechnen die Energie vieler potenzieller Bindungsstellen, um diese hochenergetischen Stellen zu identifizieren. Eine hierfür gängige Methode ist das *rigid-body docking*. Die beiden Strukturen werden aneinander positioniert und die Energie der Bindung wird ermittelt. Anschließend wird sukzessiv die Position oder Orientierung des einen Proteins relativ zum anderen verändert und erneut die Energie ermittelt. Nach mehreren tausend Berechnungen ist die Energie aller Positionen und Orientierungen bekannt. Das *rigid-body Docking* wurde bereits genutzt, um die Bindungsstelle des Pc und Cyt c_6 aus der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* an PSI zu beschreiben (Bernal-Bayard et al. 2015). Wie für ein eukaryotisches System zu erwarten, wurde die PSI-Untereinheit PsaF als wahrscheinlichste Bindungsstelle identifiziert. Wittenberg et al. nutzten diese Methode, um die Bindung des Ferredoxins an PSI zu analysieren (Wittenberg et al. 2013). Sie untersuchten ein heterologes Kokonstrukt, in dem Ferredoxin über eine Linkerdomäne an die PSI-Untereinheit PsaE fusioniert wurde. Um die optimale Länge des Linkers zu berechnen, wurde die Bindung des Ferredoxins an die cytoplasmatischen Untereinheiten simuliert. Anschließend wurde berechnet, wie groß die Linkerdomäne sein muss, damit Ferredoxin in die Bindungsstelle gelangen kann. Um Ressourcen zu sparen, werden die Proteine im *rigid-body docking* als rigide Strukturen betrachtet. Die Beweglichkeiten von Aminosäureseitenketten und Atomen des Proteinrückgrats werden nur in grober Näherung in der Berechnung berücksichtigt. Eine weitere Einsparung von Ressourcen ist es, Bereiche des Proteins, die voraussichtlich nicht an der Bindung beteiligt sind, zu verwerfen. Im Fall von Wittenberg et al. wurde PSI auf seine drei cytoplasmatischen Untereinheiten reduziert und der Beitrag der Transmembranuntereinheiten vernachlässigt. Detailliertere Informationen erhält man über eine Moleküldynamiksimulation. Für diese Methode legt man den Liganden in eine potenzielle Bindungsstelle und simuliert die Bewegung aller Atome der Bindungsstelle über mehrere Nanosekunden oder Mikrosekunden. Moleküldynamiksimulationen eignen sich, um die Interaktion eines kleinen Liganden an ein Protein zu beschreiben. Solche Liganden können Wassermoleküle sein. Für apo-PSII konnte gezeigt werden, dass nach Entfernen des Wasser oxidierenden Komplexes (WOC) zwei Wassermoleküle dafür sorgen, dass die WOC-Bindungstasche erhalten bleibt (Han et al. 2019). Die Photosysteme sind für solche Berechnungen in der Regel zu groß, daher werden sie als starre Körper beschrieben und nur der interessante Bereich um den WOC wird simuliert. Neben der Simulation kleiner Liganden konnte auch die Interaktion zwischen einem Photosystem und einem Koprotein simuliert werden. Um die Bindung des Ferredoxins an PSI mittels Moleküldynamik zu analysieren, wurde ein Supercomputer verwendet (Kapoor et al. 2018). Die Simulation wies darauf hin, dass Ferredoxin zwei unterschiedliche stabile Bindungen mit PSI eingehen kann.

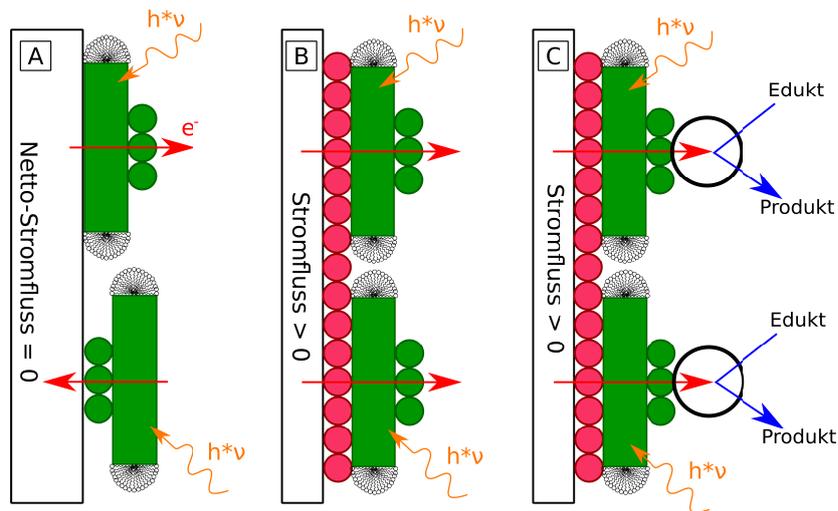


Abbildung 1.8: Nutzung von PSI auf Elektrodenoberflächen. In PSI (grün) wird durch Belichtung (oranjer Pfeil) ein Stromfluss erzeugt (roter Pfeil). Ist das PSI in unspezifischen Orientierungen auf der Elektrode assembliert, so ist kein Stromfluss messbar (Elektrode A). Bindet PSI dagegen mit seiner luminalen Seite an eine Schicht aus Cytochrom *c* (rosa), so summiert sich der Stromfluss aller Proteine auf (Elektrode B). Elektrode B konnte in der Arbeitsgruppe von Fred Lisdat an der Technischen Hochschule Wildau realisiert werden (Stieger et al. 2014; Stieger et al. 2016a). Durch Kopplung eines Enzyms (schwarzer Kreis) an Elektrode B ließe sich der Stromfluss für chemische Reaktionen nutzen (Elektrode C).

1.5 Biotechnologische Anwendung des Photosystems I

Strukturelle Informationen und die Kenntnis der Bindungsstellen verbessern das Verständnis der Stabilität der Bindung und des Mechanismus des Elektronentransports. Solche Informationen können genutzt werden, um die Proteine für biotechnologische Anwendungen nutzbar zu machen. Der Elektronentransport vom luminalen Cyt c_6 über PSI zum cytoplasmatischen Ferredoxin gleicht einem Stromfluss. Immobilisiert man PSI auf einer Elektrodenoberfläche, so kann dieser lichtinduzierte Stromfluss gemessen werden (Nguyen und Bruce 2014). PSI kann daher als Spannungsquelle eingesetzt werden. Um die Aktivität des PSI effizient zu nutzen, muss ein Kontakt zwischen der Elektrode und PSI bestehen und die Orientierung des PSI auf der Elektrode einheitlich sein (Feifel et al. 2015). Präzipitiert PSI dagegen ungeordnet auf der Elektrodenoberfläche, so kann die Elektrode sowohl mit der luminalen als auch mit der stromalen Seite in Kontakt sein, was einen Nettostromfluss von 0 ergibt (Abbildung 1.8). Um den Kontakt und die Orientierung zu optimieren, werden die Elektrodenoberflächen modifiziert. Ein interessanter Ansatz ist es, Cytochrome und Plastocyanine auf der Elektrodenoberfläche zu assemblieren und das PSI an diese Proteine binden zu lassen. Die Elektrochemie von Cytochromen und deren Interaktion mit Elektrodenoberflächen wurden bereits detailliert analysiert (Bianco und Haladjian 1994). Hierbei sticht vor allem Cytochrom *c* aus Pferdeherz (Cyt c_{HH}) heraus, das aufgrund seiner Verfügbarkeit und Stabilität ein gängiges Protein in der Elektrochemie ist (Allen et al. 1984). Cyt c_{HH} kann auf einer modifizierten Goldelektrode als homogene Schicht assembliert werden und Elektronen an PSI weiterleiten (Stieger et al. 2014). Der native Elektronendonator des PSI, Cyt c_6 , assembliert dagegen nur unzureichend auf modifizierten Goldelektroden, weshalb hierfür eine andere Strategie angewandt wurde. Eine Graphenelek-

trode wurde mit Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) modifiziert. Das Cyt c_6 aus der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* wurde mit einem Polyhistidin-Tag (His-Tag) exprimiert, welcher an die Ni-NTA-Elektrode bindet (Janna Olmos et al. 2017; Kiliszek et al. 2018). PSI kann an diese mit Cytochrom beschichteten Elektroden mit seiner luminalen Seite binden und einen Stromfluss induzieren. Anstatt Strom zu produzieren, kann das negative Redoxpotenzial des Eisen-Schwefel-Zentrums F_B genutzt werden, um nachfolgende Prozesse anzutreiben. Es wurden bereits unterschiedliche Ansätze realisiert, um die von PSI generierten Elektronen zur Produktion von molekularem Wasserstoff zu nutzen. Die Wasserstoffproduktion kann dabei über Katalysatoren wie Platin oder Cobaloxime erfolgen (Grimme et al. 2008; Utschig et al. 2011). Nutzt man statt eines synthetischen Katalysators dagegen Enzyme wie Hydrogenasen, so erreicht man zehnmal größere Raten der Wasserstoffproduktion (Kargul et al. 2012). Durch eine direkte Kopplung der Hydrogenase mit PSI erreicht man sogar Umsatzraten, die die natürliche Umsatzrate der Photosynthese übertreffen (Lubner et al. 2011). Durch die Hydrogenase wurde auch die Machbarkeit der Proteinkopplung von PSI mit nachgeschalteten Enzymen belegt. Neben der Hydrogenase ist die Kopplung weiterer Enzyme beabsichtigt. Ein solches weiteres Enzym wäre die Formiatdehydrogenase (FDH), die CO_2 zu Ameisensäure reduziert. Für die bisher durchgeführten Arbeiten stand PSI nicht in direktem Kontakt mit Elektroden. Es wurde stets ein löslicher Elektronendonator genutzt, wodurch die Reaktionen diffusionsabhängig abliefen. Um möglichst hohe Umsatzraten zu erreichen, sollten die Elektrode und die Proteine in direktem Kontakt zueinander sein. Hierfür kann die Koassemblierung des PSI mit Cytochromen auf der Elektrode genutzt werden. Es handelt sich dabei um ein komplexes System aus Elektrode, Cytochrom, PSI und nachgeschaltetem Enzym. Die Elektrode und jedes dieser Proteine haben unterschiedliche Anforderungen an die Zusammensetzung des Reaktionsmediums. Für die Reaktion ist daher die Kenntnis der optimalen Reaktionsbedingungen erforderlich. Auch ist eine Optimierung der Bindung zwischen den Proteinen notwendig.

1.6 Ziel der Arbeit

Photosystem I (PSI) ist in der biotechnologischen Anwendung von großem Interesse. Es ist ein sehr stabiles Protein mit einer Quantenausbeute von nahezu 100 % (Bressan et al. 2016). Das Verständnis von Elektronentransportprozessen zwischen Cytochrom c_6 (Cyt c_6) bzw. Plastocyanin (Pc) und PSI basiert auf spektroskopischen Messungen. Die Bindungsstelle der Proteine konnte bisher noch nicht strukturell gelöst werden. Ebenso sind Umlagerungsprozesse in PSI aufgrund von Elektronentransferprozessen noch nicht strukturell beschrieben worden. In eukaryotischem PSI binden Cyt c_6 und Pc zuerst an eine hochaffine Bindungsstelle von PsaF. Diese Bindungsstelle unterscheidet sich vom aktiven Elektronentransferkomplex (Hervás et al. 1992). Cyanobakterielles PSI bildet dagegen keine hochaffine Bindungsstelle aus (Hatanaka et al. 1993). Allerdings wurde aufgrund des Vorhandenseins von zwei Elektronendonoren in Cyanobakterien, Cyt c_6 und Pc, ein niedriger Selektionsdruck für die Bindungsstelle postuliert. Es wird angenommen, dass die Bindungsstelle in Cyanobakterien weniger gut definiert ist (Crowley und Ubbink 2003; Hervás et al. 2005). Das Genom von *T. elongatus* beinhaltet dagegen kein Gen für Pc; Cyt c_6 ist der einzige Elektronendonator. Vor dem Hintergrund der Nutzbarkeit von PSI beschäftigt sich meine Arbeit mit der Struktur von PSI und der Bindung seines Elektronendonors. Ziel ist es, die Kostruktur der beiden Proteine zu lösen. Hierzu wurden PSI und Cyt c_6 aus dem Modellorganismus *T. elongatus* analysiert. Auch die Bindung zwischen PSI und dem mitochondrialen Cytochrom c aus Pfer-

deherz (Cyt c_{HH}) wurde aufgrund dessen Rolle für biotechnologische Anwendungen charakterisiert.

Hierfür analysierte ich die Bindung des Cyt c_{HH} und des Cyt c_6 an PSI mit Hilfe von Reduktionskinetiken und mit isothermer Titrationskalorimetrie. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse für die Bindungseigenschaften stellten die Grundlage für die Analyse der jeweiligen Bindungsstelle dar. Durch eine theoretische Analyse bestehend aus *rigid-body docking* und elektrostatischen Berechnungen erstellte ich ein Bindungsmodell für beide Cytochrome. Dieses Bindungsmodell sollte durch strukturelle Methoden verifiziert werden. Daher untersuchte ich die Bildung des PSI-Cytochrom c -Komplexes mit Hilfe von Kleinwinkelstreuung. Um den PSI-Cyt c_{HH} -Komplex hochaufgelöst zu charakterisieren, wurde PSI mit Cyt c_{HH} kokristallisiert. Ferner wurde ein Protokoll erstellt, um Kokristalle an einem XFEL-Strahlengang zu messen. Die Elektronenmikroskopie erwies sich als geeignet, um die Bindungsstelle des PSI-Cyt c_6 -Komplexes zu analysieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Struktur des PSI mittels Röntgenstrukturanalyse unter tiefen Temperaturen (100 K), Röntgenstrukturanalyse bei Raumtemperatur und Strukturanalyse an einem Elektronenmikroskop gemessen. Unterschiede dieser PSI-Strukturen wurden in Bezug auf die Funktion des Proteins, insbesondere den Exzitonentransfer und den Elektronentransfer, analysiert.

Kapitel 2

Material, Methoden und Theorie

2.1 Materialienliste

Die verwendeten Chemikalien wurden von Applichem, Carl Roth, Merck, Sigma-Aldrich und Thermo Fisher Scientific mit mindestens *analytical grade* bezogen.

2.1.1 Puffer

BN-PAGE-Anodenpuffer	25 mM Imidazol, pH 7
BN-PAGE-Kathodenpuffer	50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,02 % Coomassie-Brilliantblau G250, pH 7
BN-PAGE-Solubilisierungspuffer	0,4 % <i>N</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM), 0,2 % Coomassie-Brilliantblau G250, 50 mM Imidazol, 50 mM NaCl, 2 mM 6-Aminohexansäure, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, pH 7
Cg _X -Puffer	5 mM MES, pH 6,0, 5 % Glycerin, 20 mM CaCl ₂ , 0,02 % DDM mit X mM MgSO ₄
Cyt <i>c</i> ₆ -Puffer	25 mM Tricin-NaOH, pH 8,0, 0,02 % DDM, 200 mM MgSO ₄
Cyt <i>c</i> _{HH} -Puffer	25 mM Tricin-NaOH, pH 8,0, 0,02 % DDM, 25 mM NaCl
DLS-Standardpuffer	25 mM Tricin pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,02 % DDM
G _X -Puffer	5 mM MES pH 6,0, 0,02 % DDM mit X mM MgSO ₄
MCM-Puffer	20 mM MES-NaOH, pH 6,0, 20 mM CaCl ₂ , 10 mM MgCl ₂
Ni-NTA-Bindepuffer	20 mM Imidazol, 20 mM Phosphat, 500 mM NaCl, pH 7,5
Ni-NTA-Elutionspuffer	250 mM Imidazol, 20 mM Phosphat, 500 mM NaCl, pH 7,5
SDS-PAGE-Laufpuffer	3 g · l ⁻¹ Tris, 14,4 g · l ⁻¹ Glycin und 0,1 % SDS

2.1.2 Säulenmaterial

Roti[®]garose-His/Ni Beads (Carl Roth), 5 ml bzw. 25 ml-Säule
His Trap[™] HP (GE Healthcare), 1 ml-Säule

Q-Sepharose™ fast flow (GE Healthcare), 200 ml-Säule
TOYOPEARL® DEAE-650S (Sigma-Aldrich), 10 ml bzw. 600 ml-Säule

2.2 Proteinaufreinigung

2.2.1 Photosystem I

Die Anzucht von *T. elongatus*, die Solubilisierung der Membranproteine und die Trennung der beiden Photosysteme erfolgten nach gängigen Protokollen (Kern et al. 2005). *T. elongatus* wurde in 301 eines modifizierten Castenholz-Mediums D in einem Photobioreaktor bei 48 °C angezogen (0,52 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,41 mM MgSO₄, 1 mM KNO₃, 8 mM NaNO₃, 1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM NaCl, 0,027 mM Eisen-EDTA, 6 mM NaHCO₃ und 0,35 mM CaCl₂; zu 301 Lösung wurde 1,5 ml der zehnfach konzentrierten Mikronährstofflösung zugegeben, wobei CoCl₂ durch 0,58 g · l⁻¹ Co(NO₃)₂ ersetzt wurde, Castenholz 1988). Der pH-Wert von 7,8 wurde durch Zugabe von CO₂ konstant gehalten. Die Zellen wurden nach der Ernte bei -80 °C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Inkubation mit Lysozym für 30 min bei 48 °C und anschließendes mechanisches Aufbrechen in einer Yeda-Pressen bei 3 MPa in MCM-Puffer (20 mM MES-NaOH, pH 6,0, 20 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂) mit 500 mM Mannitol. Das Zellysate wurde zweimal mit Hochsalzpuffer (300 mM CaCl₂, 150 mM MgCl₂, 20 mM MES-NaOH, pH 6) bei Raumtemperatur gewaschen, um Phycobilisomen von den unlöslichen Thylakoidmembranen abzutrennen. Für eine größere PSI_{mono}-Ausbeute erfolgte der Waschschriff bei 70 °C. Das gewaschene Lysat wurde anschließend in MCM-Puffer mit 5 % Glycerin auf eine Chlorophyllkonzentration von 1,7 mM homogenisiert. Die Membranproteine wurden mit 0,55 % (Standardbedingung) oder 2 % DDM (siehe Abschnitt 2.9.2) über 5 min solubilisiert und anschließend mit Cg₀-Puffer vermischt. Ungelöste Bestandteile wurden bei 4 °C für 30 min bei 48 000 rpm (Rotor 50.2 Ti, Beckman Coulter) abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Leitfähigkeit von 4,7 mS · cm⁻¹ eingestellt und auf eine DEAE-650S-Säule aufgetragen. Um PSI von PSII chromatografisch zu trennen, wurde mit Cg₀- und Cg₁₀₀-Puffer die MgSO₄-Konzentration erhöht. Hierbei eluierte PSI mit einer Leitfähigkeit von 7,5 mS · cm⁻¹. Mit einem zweiten chromatografischen Schriff wurde eine carotinoidhaltige Verunreinigung von PSI an einer Q-Sepharose-Säule abgetrennt. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen (CV) G₆₀-Puffer, der ungefähr der Leitfähigkeit der PSI-Probe entsprach, äquilibriert. Das Volumen der PSI-Probe betrug in der Regel 3 CV bis 5 CV. Die Säule wurde mit 2,5 CV G₉₀ gewaschen, hierbei eluierte PSI_{mono}. Anschließend wurde über 2 CV mittels eines linearen Gradienten bis G₁₅₀ erhöht und anschließend 2 CV konstant bei G₁₅₀ gehalten. PSI_{tri} begann ab einer Leitfähigkeit von 9,0 mS · cm⁻¹ zu eluieren (G₁₀₀) und erreichte die Peakelution bei 10,0 mS · cm⁻¹ bis 10,5 mS · cm⁻¹ (G₁₂₀). Die Position des Peaks ist abhängig von der Auftragsmenge. Das eluierte PSI wurde in einer Amicon®-Rührzelle (Millipore) an einer 100 000 MWCO Polyethersulfon-Membran (Biomax®, Millipore) auf ca. 10 ml ankonzentriert. Das konzentrierte PSI_{tri} wurde für 20 min bei 3000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde über 2 h durch langsames Hinzutropfen des 30-fachen Volumens an G₀-Puffer aus einer Bürette unter Rühren verdünnt. Die finale Leitfähigkeit sollte ≤ 1 mS · cm⁻¹ betragen. Bereits nach wenigen Stunden waren PSI_{tri}-Kristalle zu erkennen. Für eine maximale Ausbeute wurde der Kristallisationsansatz über zwei bis drei Tage inkubiert. Die Chlorophyllkonzentration des Überstands nach der Kristallisation sollte 10 µM

bis 30 μM betragen und im Absorptionsspektrum eine Peakposition von 679 nm bis 680 nm haben. Die Kristalle wurden bei 4 °C gelagert. Bei unzureichender Qualität des Proteins wurden die Kristalle in G₁₅₀-Puffer gelöst und erneut kristallisiert. Gründe für die erneute Umkristallisation waren: a) Beim Ankonzentrieren des PSI auf der Polyethersulfon-Membran kam es zur Bildung eines orangen Niederschlags oder beim anschließenden Abzentrifugieren zur Bildung eines carotinoidhaltigen Pellets; b) die Chlorophyllkonzentration des Kristallisationsüberstands betrug mehr als 30 μM ; c) das Absorptionsspektrum des PSI_{tri} wies nach Kristallisation eine Peakabsorption von ≤ 679 nm statt 680 nm auf.

Die Proteinkonzentration wurde im wässrigen Medium photometrisch bestimmt. Für Chlorophyll wurde ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon_{680\text{nm}} = 57,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und für P₇₀₀ $\varepsilon_{680\text{nm}} = 5,5 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ genutzt (Müh und Zouni 2005).

2.2.2 Cytochrom *c*

Cytochrom *c* aus Pferdeherz (Cyt *c*_{HH}) wurde von Sigma-Aldrich in $\geq 95\%$ und $\geq 99\%$ Reinheit bezogen. 99% Reinheit wurde zur Kokristallisation genutzt, 95% für alle anderen Messungen. Die Cyt *c*_{HH}-Konzentration wurde in Anwesenheit von 20 mM Natriumascorbat photometrisch mittels $\varepsilon_{550\text{nm}} = 29,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt (Van Gelder und Slater 1962).

Cyt *c*₆ aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde von Dr. Mahdi Hejazi zusammen mit dem Maturationsvektor pEC86 (Arslan et al. 1998) heterolog in *E. coli* BL-21 kloniert. Die Überexpression wurde mit 0,25 mM IPTG ab einer OD von 1 begonnen, und *E. coli*-Proteine wurden vor der Fällung des Cyt *c*₆ mit 50% Ammoniumsulfat-Sättigung (4 °C) abgetrennt. Nach Fällung unter 95% Ammoniumsulfat-Sättigung wurde Cyt *c*₆ gegen 5 mM Tricin-NaOH (pH 8) dialysiert und auf einer 10 ml-DEAE-Säule (TOYOPEARL[®]-650S) mit steigender NaCl-Konzentration eluiert.

Cyt *c*₆ aus *T. elongatus* wurde von Dr. Mahdi Hejazi heterolog in *E. coli* kloniert. Als Primer für das *tll1283*-Gen dienten 5'-CTCGAGGCCTGCCCAACCCTT-3' und 5'-GCTGCCCCATGGCCGCAGATCTCGCCAACGGC-3' mit Restriktionsschnittstellen für *Xho*I und *Nco*I (unterstrichen). Das Gen wurde in pJet1.2 kloniert und amplifiziert. Anschließend wurde es in den Expressionsvektor pET22b überführt und in einen *E. coli* BL21-Klon, der ebenfalls den pEC86-Maturationsvektor (Arslan et al. 1998) trug, kloniert. Für die Isolation des Cyt *c*₆ wurde *E. coli* bis zu einer OD von 0,8 bei 37 °C angezogen und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Zugabe von IPTG, wie in Arslan et al. beschrieben, erfolgte nicht. Das Protein wurde aus dem Periplasma extrahiert. Die Zellen wurden dazu abzentrifugiert (3500 g, 10 min, 4 °C, JLA-8.1000-Rotor; das Pellet muss rosa sein), pro Liter Kultur mit 50 ml 20% (w/w) Saccharose, 10 mM Tris (pH 8) und 1 mM EDTA für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Rühren inkubiert und anschließend für 10 min bei 12 000 g, 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde pro Liter Kultur in 50 ml eiskaltem 10 mM Tricin pH 8,0, 5 mM MgSO₄ aufgenommen, 10 min auf und ab pipettiert und anschließend abzentrifugiert (10 000 g, 10 min, 4 °C). Die durch EDTA destabilisierte Periplasmamembran platzte durch den osmotischen Schock und die periplasmatischen Proteine konnten aus dem Überstand isoliert werden. Der Überstand wurde 1 : 1 mit Ni-NTA-Bindepuffer (20 mM Imidazol, 20 mM Phosphat, 500 mM NaCl, pH 7,5) versetzt, auf eine 25 ml-Ni-NTA-Säule aufgetragen (Roti[®]garose-His/Ni, Carl Roth), mit 8 CV Ni-NTA-Bindepuffer gewaschen und über 6 CV mit einem linearen Gradienten zu Ni-NTA-Elutionspuffer (250 mM Imidazol, 20 mM Phosphat, 500 mM NaCl, pH 7,5)

eluiert. Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden vereinigt, mit 5 mM Natriumascorbat vollständig reduziert und gegen 1 mM Tricin-NaOH (pH 7,2) auf eine Leitfähigkeit von $0,3 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ bis $0,4 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ dialysiert. Das Protein wurde mittels 20 ml-DEAE-Säule (TOYOPEARL[®]-650S) weiter aufgereinigt. Die Säule wurde mit 25 mM Tricin-NaOH (pH 7,2) äquilibriert und nach Probenauftragung mit demselben Puffer für 10 CV gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem isokratischen Fluss bei 25 mM Tricin-NaOH (pH 7,2) mit 10 mM NaCl über 5 CV. Die Cyt c_6 -Konzentration wurde in Anwesenheit von 20 mM Natriumascorbat photometrisch mittels $\varepsilon_{553\text{nm}} = 25 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bestimmt (Hervás et al. 1994).

2.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde genutzt, um die Reinheit und die Untereinheitenzusammensetzung der isolierten Proteine zu charakterisieren. Die Methode beruht darauf, dass Proteine beim Durchqueren einer Gelmatrix der Größe nach aufgetrennt werden. Die Eigenladung der Proteine wird durch Natriumdodecylsulfat (siehe SDS-PAGE) bzw. Coomassie-Brilliantblau (siehe *blue-native*-PAGE) überdeckt, wodurch die Proteine in einem elektrischen Feld durch die Gelmatrix zur Anode wandern.

2.3.1 BN-PAGE

In der *blue-native*-PAGE (BN-PAGE) werden native Proteinkomplexe ihrer Größe nach aufgetrennt. Die einzelnen Proteinuntereinheiten dissoziieren hierbei nicht, sodass überprüft werden kann, ob das PSI als Monomer, Trimer oder höhere Oligomerisationszustände vorliegt. Es wurde ein Protokoll gemäß Wittig et al. (2006) genutzt. Alle Arbeiten erfolgten bei pH 7. Das Poly-Acrylamidgel wurde aus 25 mM Imidazol, 500 mM 6-Aminohexansäure und 8 % bis 4 % Acrylamid (Rotiphorese[™] Gel 30, Carl Roth, mit 37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid) als Schichtgradientengel mit vier Schichten hergestellt. Die Aminohexansäure stört elektrostatische Wechselwirkungen, die zur Proteinaggregation führen können und ist ein Proteaseinhibitor. Die Dichte der Gelschichten wurde mit 12 % (unterste Schicht) bis 0 % (oberste Schicht) Glycerin erhöht. Damit die Schichten während des Gießvorgangs nicht polymerisierten, wurde die Polymerisation mit nur 1/200 Volumen 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und 1/2000 Volumen Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. 2 µg Chl (PSI) wurde mit Solubilisierungspuffer (0,4 % DDM, 0,2 % Coomassie-Brilliantblau G250, 50 mM Imidazol, 50 mM NaCl, 2 mM 6-Aminohexansäure, 1 mM EDTA, 5 % Glycerin, pH 7) auf das Auftragsvolumen aufgefüllt und auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 4 °C in einer Mini-Protean[®]-Gelapparatur (Bio-Rad) mit getrenntem Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,02 % Coomassie-Brilliantblau G250, pH 7) und Anodenpuffer (25 mM Imidazol, pH 7) mit $17 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ (15 mA pro Gel).

2.3.2 SDS-PAGE

In der SDS-PAGE werden Proteine denaturiert und ihre Untereinheiten der Größe nach aufgetrennt. Für Membranproteine ist zu beachten, dass die Denaturierung schonend erfolgen muss, um die Bildung unlöslicher Aggregate zu vermeiden. Die SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Ulrich Lämmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Hierbei wird eine hohe Trennschärfe durch ein System aus einem Trenn- und einem Sammelgel mit unterschiedlichen pH-Werten realisiert. Der pH-Wert des Probenpuffers und des

Sammelmigel ist nur geringfügig höher als der isoelektrische Punkt (pI) des im Laufpuffer enthaltenen Glycins (pI = 6), weshalb dieses überwiegend als Zwitterion vorliegt. Legt man eine Spannung an das Gel an, wandern die in der Probe enthaltenen Bestandteile mit unterschiedlicher Geschwindigkeit: Die im Probenpuffer enthaltenen Chloridionen wandern am schnellsten und bilden eine negativ geladene Lauffront. Darauf folgen die durch SDS negativ geladenen Peptide. Zuletzt dringt das Glycin in das Gel ein. Diese drei Bestandteile bilden ein elektrisches Feld, das dem Feld der angelegten Spannung entgegengesetzt ist und damit die weiter eingedrungenen Peptide verlangsamt. Im Sammelgel staucht sich daher die Peptidbande, bis sie an das Trenngel gelangt. Sobald das Glycin das Trenngel (pH 8,8) erreicht, nimmt seine negative Ladung zu, wodurch das bremsende elektrische Feld aufgehoben wird. Die zuvor an einem Punkt gesammelten Peptide können nun aufgetrennt werden.

Das Trenngel bestand aus 10 % bis 15 % Acrylamid (RotiphoreseTM Gel 30, Carl Roth, mit 37,5 : 1 Acrylamid:Bisacrylamid), 375 mM Tris-HCl (pH 8,8) und 0,1 % SDS. Es wurde mit 1/100 Volumen 10 % APS und 1/1000 Volumen TEMED polymerisiert. Je nach Bedarf wurde das Trenngel in einer (einzelne Proteine) oder drei (PSI) Schichten gegossen und mit Wasser überschichtet. Das Sammelgel bestand aus 5 % Acrylamid, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS und wurde wie das Trenngel mit APS und TEMED polymerisiert. Die Proben wurden mit Probenpuffer (62,5 % Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 100 mM Dithiothreitol (DTT), 10 % Glycerin und 0,1 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95 °C (lösliche Proteine) oder für 2 h bei 40 °C (Membranproteine) denaturiert. Der Lauf erfolgte bei Raumtemperatur in einer Mini-Protean[®]-Gelapparatur (Bio-Rad) mit 23 mA · cm⁻² (20 mA pro Gel). Der Laufpuffer bestand aus 3 g · l⁻¹ Tris, 14,4 g · l⁻¹ Glycin und 0,1 % SDS.

2.3.3 Western Blot

Cyt c_{HH} wurde mittels Western Blot analysiert. Hierbei werden Proteinproben in einer SDS-PAGE getrennt und anschließend auf eine Membran geblottet. Ein auf der Membran geblottetes Protein kann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Das wie in Abschnitt 2.3.2 angefertigte SDS-Gel wurde mit Wasser gewaschen und in eine XCell-SureLockTM-Gelkammer für einen *wet blot* überführt. Geblottet wurde mit NuPAGE-Transferpuffer (Thermo Fisher Scientific) auf eine Nitrocellulosemembran für 2 h bei 30 V. Anhand eines vorgefärbten Proteinmarkers (Color Prestained Protein Standard, Broad Range, New England Biolabs) wurde die Vollständigkeit des Blots überprüft. Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver in TBST-Puffer für 1 h geblockt. Der α -Cyt c_{HH} -Antikörper (7H8.2C12, Maus, Abcam) wurde über Nacht 1 : 500 in TBST mit 5 % Milchpulver bei 4 °C gebunden. Als sekundärer Antikörper diente ein α -Maus-Antikörper (62-6520, Ziege, Invitrogen) mit gekoppelter Meerrettichperoxidase in 1:5000 Verdünnung. Die Membran wurde mit PierceTM ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) versehen und die Lumineszenz der gebundenen Peroxidase in einem ChemiDocTM Imaging System (Bio-Rad) quantifiziert. Die Auswertung erfolgte in ImageJ.

2.4 Reduktionsraten

2.4.1 Sauerstoffreduktion

Die Mehrheit der Reaktionsraten wurde über die Rate der Sauerstoffreduktion durch PSI an einer Clark-Elektrode gemessen. Die Elektrode besteht aus einer Platinkathode und einer Silberanode, die durch eine 3 M KCl-Lösung in Kontakt stehen. Die KCl-Lösung ist vom Reaktionsraum durch eine für Gase permeable Teflonmembran getrennt. Sauerstoff kann aus dem Reaktionsraum durch die Membran diffundieren und wird an der Platinkathode reduziert. Im Gegenzug wird das Silber der Anode oxidiert und fällt als AgCl aus. Der dabei fließende Strom ist das gemessene Signal, das mit bekannten Sauerstoffkonzentrationen geeicht wird. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 2.1 dargestellt: Der Elektronendonator Cyt c_{HH} , Cyt c_6 oder 2,6-Dichlorophenol-Indophenol (DCPIP) wird durch Natriumascorbat reduziert. Der Elektronendonator bindet an PSI und reduziert das Chlorophyll dimer P₇₀₀. Nach Belichtung wird P₇₀₀ oxidiert und das Elektron gelangt über die Elektronentransportkette zu dem terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum F_B, von dem es auf Methylviologen (MV) übertragen wird. MV reduziert den gelösten Sauerstoff. Aus der Änderung der Sauerstoffkonzentration wird die Reduktionsrate bestimmt.

Die Bindung des Cytochroms und die nachfolgenden Redoxreaktionen lassen sich mit der Michaelis-Menten-Theorie beschreiben (Michaelis und Menten 1913). Hierbei wird das Cytochrom als Substrat (S) und das Photosystem als Enzym (E) eingesetzt. Der reduzierte Sauerstoff stellt das Produkt (P) dar.



Die Reaktionsraten k_{on} und k_{off} sind die Assoziations- bzw. Dissoziationsrate des Enzym-Substrat-Komplexes. Die Wechselzahl k_{cat} beinhaltet alle Reaktionen vom Ladungstransfer zwischen Cytochrom und P₇₀₀ über die Ladungstrennung und die Reduktion des MV bis hin zur Reduktion des Sauerstoffs. Die Sauerstoffreduktionsrate war unabhängig von der Sauerstoff- und der MV-Konzentration. Durch Einsetzen unterschiedlicher Cytochromkonzentrationen lässt sich die Reduktionsrate mit der Michaelis-Menten-Gleichung auswerten:

$$v = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_{\text{M}} + [S]} \quad (2.1)$$

Dabei ist v die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei einer gegebenen Konzentration des Substrats [S], v_{max} die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion unter sättigender Substratkonzentration und K_{M} die Michaeliskonstante. Der Standardreaktionsansatz bestand aus 5 μg Chlorophyll $\cdot \text{ml}^{-1}$ (60 nM P₇₀₀), 16 μM Cyt c_{HH} , 2 mM Natriumascorbat, 300 μM Methylviologen, 0,02 % DDM, 25 mM Tricin-NaOH (pH 8,0) bei 20 °C. Die Messung erfolgte an einem Oxygraph⁺ (Hansatech). 200 μl bis 400 μl Reaktionslösung wurde im Dunkeln kontinuierlich gerührt (mit 60 % der Maximalleistung) und durch einen Deckel verschlossen. Die Messung wurde durch Belichtung gestartet (1000 μmol Lichtquanten $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und das Signal über 30 s oder so lange, bis die Sauerstoffkonzentration 30 μM erreichte, gemessen. Für die Bestimmung der PSI-Cytochrom-Affinität wurden mindestens zehn unterschiedliche Konzentrationen von Cyt c_{HH} bzw. Cyt c_6 als Substratkonzentrationen in die Michaelis-Menten-Gleichung eingesetzt und mit einem Levenberg-Marquardt-Algorithmus in MATLAB ausgewertet.

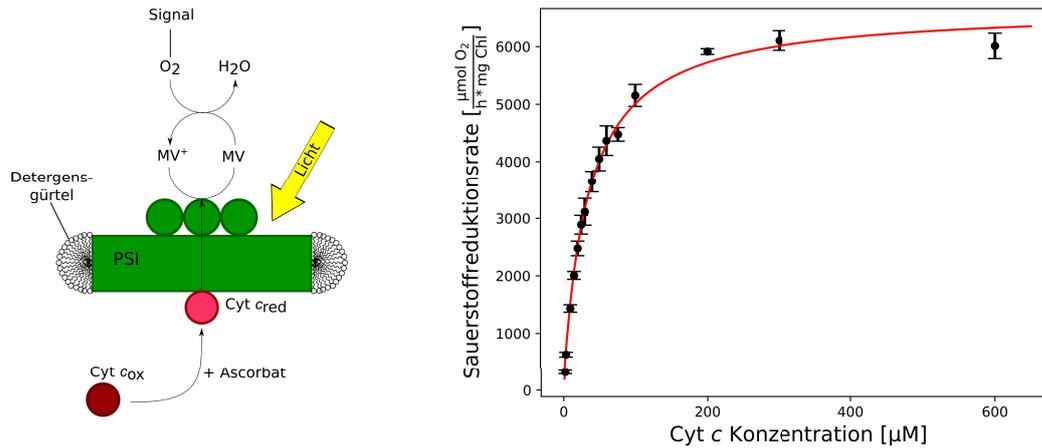


Abbildung 2.1: Reaktionsschema der Sauerstoffreduktion durch den PSI-Detergenskomplex (links) und Auswertung der Kinetik mit dem Michaelis-Menten-Modell (rechts).

2.4.2 P₇₀₀-Reduktion

Die Reduktion des P₇₀₀⁺ wurde über den differentiellen Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{820\text{nm}} = 6,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Das P₇₀₀ wird durch einen intensiven Lichtblitz vollständig zu P₇₀₀⁺ oxidiert und die Kinetik der Rereduktion durch das Cytochrom wird gemessen. Die Rereduktion des cyanobakteriellen PSI erfolgt gemäß einer Kinetik zweiter Ordnung:

$$\frac{d[\text{P}_{700}^+]}{dt} = k_{\text{on}} \cdot [\text{Cyt}] \cdot [\text{P}_{700}^+]. \quad (2.2)$$

Hierbei ist t die Zeit und k_{on} die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung. Diese Differenzialgleichung beschreibt die Reduktion des P₇₀₀⁺, bis alles P₇₀₀ wieder reduziert vorliegt ($[\text{P}_{700}]_{\text{total}}$), vom Anfangszeitpunkt t_0 bis zum Zeitpunkt t . Durch Lösen der Differenzialgleichung in diesen Grenzen ergibt sich die einfache Exponentialfunktion

$$[\text{P}_{700}^+] = [\text{P}_{700}]_{\text{total}} \cdot e^{-k_{\text{on}} \cdot [\text{Cyt}] \cdot t}. \quad (2.3)$$

Um Sättigungseffekte zu vermeiden, wird $k_{\text{on}} \cdot [\text{Cyt}]$ zu einer beobachteten Konstante k_{obs} zusammengezogen und k_{on} aus der Steigung des linearen Bereichs von k_{obs} gegen $[\text{Cyt}]$ bestimmt.

Die Messung erfolgte an PSI_{tri} mit $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Chlorophyll mit $0,5 \mu\text{M}$ bis $50 \mu\text{M}$ Cyt c_{HH} bei Raumtemperatur. Cyt c_{HH} wurde in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7,5 oder pH 8,0) gemessen, Cyt c_6 in 25 mM Tricin (pH 8,0). Ferner waren 2 mM Natriumascorbat, $30 \mu\text{M}$ Methylviologen und $0,02 \%$ DDM enthalten. Die Küvette hatte eine Länge von 1 cm . Die Probe wurde zehnmals mit je einem Blitz einer Xe-Lampe von $15 \mu\text{s}$ Länge angeregt und über 4 s kontinuierlich mit monochromatischem Licht bei 826 nm gemessen. Die Messapparatur wurde von Dr. E. Schlodder (Technische Universität Berlin) bereitgestellt und ist in Witt et al. (2002) beschrieben.

2.5 Massenspektrometrie

Die Vollständigkeit der PSI-Untereinheiten sowie die Anwesenheit von Cyt c_{HH} in Kokristallen wurden mittels matrixunterstützter Laserdesorption/-ionisierung (*Matrix*

Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI) über Flugzeitanalyse (*Time Of Flight*, TOF) untersucht. Hierbei wird die Proteinprobe in Trifluoressigsäure (TFA) denaturiert und in eine Licht absorbierende Matrix eingebettet. Die Matrix wird mitsamt der Proteinprobe durch einen Laserpuls verdampft und ionisiert. An das Gas wird ein elektrisches Feld mit der Spannung U angelegt, das die Probe durch eine Ringanode in einen Flugzeitanalysator beschleunigt. Die kinetische Energie E_{kin} des Partikels ist abhängig von der Ladung z :

$$E_{\text{kin}} = z \cdot e \cdot U, \quad (2.4)$$

wobei e die Elementarladung ist. Partikel mit großer Masse m erfahren eine geringere Beschleunigung als Partikel mit geringer Masse und haben somit eine geringere Geschwindigkeit v :

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \iff v^2 = \frac{2 \cdot E_{\text{kin}}}{m}. \quad (2.5)$$

Der Flugzeitanalysator misst die Dauer t , die ein Partikel benötigt, um die Driftstrecke L zum Detektor zu durchqueren:

$$t = \frac{L}{v}. \quad (2.6)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 2.4 und 2.5 in Gleichung 2.6 ergibt sich eine Auftrennung der Partikel nach ihrer Masse pro Ladung (m/z):

$$t^2 = \frac{m}{z} \cdot \frac{L^2}{2 \cdot e \cdot U}. \quad (2.7)$$

Die Proben ($0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ bis $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Protein oder einzelne Kristalle) wurden mit 0,1 % TFA denaturiert. Als Matrix wurde Sinapinsäure genutzt (gesättigte Lösung in 40 % Acetonitril, 0,1 % TFA), da diese in Anwesenheit des PSI kristallisierte und ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis ergab. Bei der Auswertung war darauf zu achten, dass Sinapinsäure mit Peptiden kondensieren kann und somit Massen auftraten, die um ein ganzzahliges Vielfaches von $+206 \frac{m}{z}$ gegenüber den Peptidbanden verschoben waren. Je $1 \mu\text{l}$ der Probe wurde mit $1 \mu\text{l}$ der Matrixlösung auf der Zielplatte gemischt und luftgetrocknet. Die Messung erfolgte an einem Microflex-Spektrometer (Bruker) im linearen Positive-Ionen-Modus in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Fettke (Universität Potsdam). Die Daten wurden mit mMass ausgewertet (Niedermeyer und Strohaln 2012).

2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine Methode zur Bestimmung von Bindungsenergien zwischen einem Protein und seinem Liganden. Das Protein wird in eine Messzelle gegeben, während eine Referenzzelle mit Wasser befüllt wird. Mess- und Referenzzelle sind von einem Mantel umgeben, der 5°C kälter ist und den Zellen somit kontinuierlich Wärme entzieht. Das Kalorimeter heizt beide Zellen und bestimmt die Differenz der Heizleistung (dP) zwischen Mess- und Referenzzelle, die es aufwenden muss, um beide Zellen auf konstanter Temperatur zu halten. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 2.2 gezeigt. Wird ein Ligand in die Messzelle gegeben, so bindet er an das Protein. Diese Bindung kann Wärme freisetzen (exotherm) oder dem System entziehen (endotherm). Die Temperatur der Messlösung ändert sich und folglich ändert sich dP. Wird der Ligand in kleinen Schritten zum Protein titriert, erhält man für

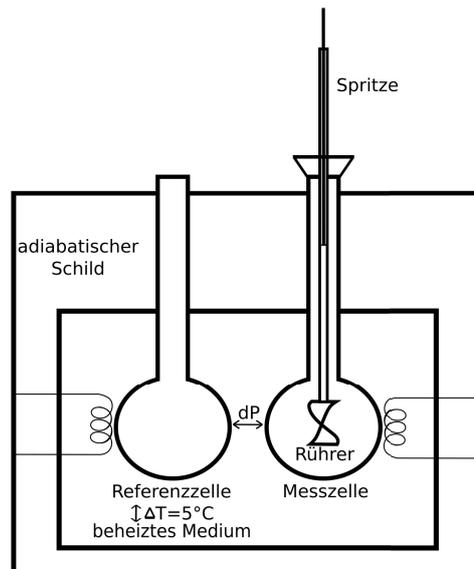


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des isothermen Titrationskalorimeters.

jeden Titrationsschritt eine dP -Bande, deren Fläche die freigesetzte Wärmemenge Q darstellt. Q setzt sich zusammen aus der Bindungsenthalpie ΔH , dem Zellvolumen zu Beginn der Messung V_0 , der Anzahl der Ligandenbindungsstellen pro Protein n , dem Beladungsgrad Θ und der im Messvolumen vorliegenden Proteinkonzentration $[M]_{\text{ges}}$.

$$Q = n \cdot \Theta \cdot [M]_{\text{ges}} \cdot \Delta H \cdot V_0, \quad (2.8)$$

wobei Θ die Information über die Affinität des Proteins zum Liganden beinhaltet:

$$K_A = \frac{\Theta}{(1 - \Theta) \cdot [L]}. \quad (2.9)$$

K_A ist die Assoziationskonstante und $[L]$ die Konzentration des ungebundenen Liganden. Während der Titration erhält man für jede Ligandenkonzentration die korrespondierende Wärmemenge Q_i . In der Praxis wird die Änderung der freigesetzten Wärmemenge ΔQ_i gegen das Verhältnis $\frac{[L]_{\text{ges}}}{[M]_{\text{ges}}}$ aufgetragen. Hierbei ist zu beachten, dass sich $[L]_{\text{ges}}$ und $[M]_{\text{ges}}$ durch das hinzutitrierte Volumen ändern. Ebenfalls wird aufgrund der Titration ein Teil der proteinhaltigen Lösung aus der Messzelle verdrängt bevor das verdrängte Protein mit dem neu hinzutitrierten Liganden binden kann. Unter Berücksichtigung der Verdünnung kann die aufgetragene Kurve mit der Gleichung

$$\Delta Q = Q_i + \frac{dV_i}{V_0} \cdot \frac{Q_i + Q_{i-1}}{2} - Q_{i-1} \quad (2.10)$$

beschrieben werden, wobei dV_i das aus der Messzelle verdrängte Volumen ist. Aus den Gleichungen 2.8 und 2.9 erhält man n , K_A und ΔH . Eine detaillierte Herleitung der Fitfunktion ist in der Bedienungsanleitung des Kalorimeters beschrieben (Malvern 2015).

Hat das Protein eine hohe Affinität zum Liganden, ergibt die Auftragung von ΔQ_i gegen das Verhältnis $\frac{[L]_{\text{ges}}}{[M]_{\text{ges}}}$ eine sigmoidale Kurve. Ihr Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht der Bindungsenthalpie ΔH , ihre Steigung der Assoziationskonstante K_A und ihr Wendepunkt der Anzahl der Bindungsstellen n entspricht. Für niedrigaffine

Systeme ist die Kurvenform nicht sigmoidal, weshalb der Schnittpunkt der Ordinatenachse und der Wendepunkt nicht abgelesen werden können. Die Kurvenform wird durch den C -Wert beschrieben, für den

$$C = n \cdot K_A \cdot [M]_{\text{ges}} \quad (2.11)$$

gilt. Um eine geeignete Kurve zu erhalten, kann man die Proteinkonzentration so einstellen, dass C im Bereich von 20 bis 50 liegt. Oft ist die Affinität des Proteins so gering, dass auch bei hoher Proteinkonzentration kein geeigneter C -Wert eingestellt werden kann. In diesem Fall ist es ratsam, einen Wert für die Anzahl der Bindungsstellen vorzugeben (z. B. $n = 1$), um gute Näherungen für ΔH und K_A zu erhalten. Die Messung erfolgte an einem MicroCal-VP-ITC-Kalorimeter (Malvern Panalytical) in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Dobbek (Humboldt-Universität zu Berlin) bei 20 °C. Um eine hohe Qualität der Proben sicherzustellen, wurde PSI frisch umkristallisiert. Die Kristalle wurden mit 0,02 % DDM in H₂O gewaschen, um die Bestandteile des Kristallisationspuffers zu entfernen. Anschließend wurden die Kristalle mit 25 mM Tricin-NaOH (pH 8,0), 100 mM NaCl und 0,02 % DDM gelöst und mit 25 mM Tricin-NaOH (pH 8,0), 10 mM NaCl und 0,02 % DDM auf eine Salzkonzentration von 25 mM NaCl verdünnt. Ungelöste Kristalle wurden für 5 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und anschließend durch eine 0,45 µm Membran filtriert. Die PSI-Konzentration wurde auf 30 µM P₇₀₀ eingestellt. Cyt c_{HH} lag als Pulver vor und konnte im selben Puffer auf 1 mM bis 3 mM gelöst werden. Cyt c_6 wurde in einem Zentrifugalkonzentrator (5000 MWCO) gegen 25 mM Tricin-NaOH (pH 8,0) mit 25 mM NaCl umgepuffert. Anschließend wurde 0,02 % DDM hinzugefügt. Alle Proteine lagen nach der Aufreinigung im oxidierten Zustand vor. Für die Messungen unter reduzierten Bedingungen wurde in alle Lösungen 5 mM Natriumascorbat zugegeben. Um eine Reoxidation von PSI zu vermeiden, wurde das Reduktionsmittel unter gedimmtem Licht hinzupipettiert und die Lösung im Dunkeln entgast. 2 ml PSI-Lösung wurde mit einer Einwegspritze mit langer Kanüle in die 1,45 ml-Messzelle überführt. Nach vollständigem Befüllen der Messzelle wurde durch stoßartiges Abpipettieren der restlichen Lösung verbliebene Luftblasen aus der Zelle entfernt. Überschüssige PSI-Lösung wurde anschließend abgenommen und für die nächste Messung aufbewahrt. Cyt c_{HH} und Cyt c_6 wurden nach Entgasung als Liganden in die ITC-Spritze überführt. Die häufig am Stempel verbliebene Luftblase wurde ebenfalls durch stoßartiges Auf- und Abpipettieren mit der Befüllspritze entfernt. Der Lauf wurde mit einer Referenzleistung von 18 µcal · s⁻¹ und einer Rührgeschwindigkeit von 300 rpm durchgeführt. Es wurden jeweils 5 µl Cytochromlösung in die Zelle titriert. Die erste Injektion wurde verworfen, da während der langen Äquilibrierungsphase des Kalorimeters Cytochrom aus der Spritze diffundiert und somit keine genaue Bestimmung der Wärmemenge möglich ist. Die freigesetzte Wärmemenge wurde mit NITPIC 1.1.5 berechnet (Scheuermann und Brautigam 2015; Mueller et al. 2012) und die Daten anschließend mit einer von Malvern Panalytical erweiterten Version von Origin 7 ausgewertet.

2.7 Dynamische Lichtstreuung

Mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) wird die Diffusionskonstante von Partikeln gemessen, aus der ein hydrodynamischer Radius (R_{H}) berechnet wird. Die Methode eignet sich, um die Homogenität und das Aggregationsverhalten von Proteinen zu charakterisieren. Die Probe wird mit einem Laserstrahl belichtet und die Intensität

des gestreuten Lichts unter einem Winkel θ analysiert. Die Intensität des Lichts, das an einem Teilchen gestreut wird, kann über die Formel

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{8 \cdot \pi^4 \cdot \alpha^2}{r^2 \cdot \lambda^4} \cdot (1 + \cos^2 \theta) \quad (2.12)$$

beschrieben werden. I_s und I_0 sind die Intensität des gestreuten bzw. des eingestrahnten Lichts, r der Abstand zwischen Probe und Detektor, α die Polarisierbarkeit des Teilchens und λ die Wellenlänge. In der statischen Lichtstreuung (SLS) wird das Signal über einen Zeitraum t gemittelt und unter verschiedenen Winkeln θ vermessen, um den Gyrationradius und die Molekülmasse zu bestimmen. In der DLS werden dagegen die Fluktuationen des Signals im Zeitraum t vermessen. Die Fluktuationen entstehen, da die Konzentration der Teilchen im Messvolumen aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung nicht konstant ist. Teilchen diffundieren in das Messvolumen und diffundieren wieder hinaus. Dieses Diffusionsverhalten kann mit einer Autokorrelation des zeitabhängigen Intensitätssignals zu einem Zeitpunkt t_i mit einem späteren Zeitpunkt $t_i + \tau$ beschrieben werden:

$$A(\tau) = \frac{1}{j \cdot \langle I_s \rangle^2} \sum_{i=0}^j I_s(t_i) \cdot I_s(t_i + \tau). \quad (2.13)$$

Für monodisperse Lösungen (nur eine Art von Partikel in der Probe) kann diese Autokorrelationsfunktion mit einer einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden, deren Abfall von der Diffusionskonstanten D und dem Streuvektor q abhängig ist:

$$A(\tau) = A(\tau_{\max}) + A(\tau_0) \cdot \exp(-2Dq^2\tau), \quad (2.14)$$

$$q = \frac{\sin(\theta) \cdot 4\pi \cdot n}{\lambda}, \quad (2.15)$$

wobei λ die Wellenlänge und n der Brechungsindex des Mediums ist. Gleichung 2.14 wird oft als *cumulant fit* bezeichnet. Sie lässt sich für polydisperse Proben um weitere Exponentialterme erweitern und wird dann als *regularization fit* bezeichnet. Der *cumulant fit* gibt seine Abweichung von den gemessenen Daten in Form einer Polydispersität (Pd) an. Partikel sind monodispers, wenn Pd < 10 % ist. Da PSI aufgrund seiner Größe ein sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zeigt, wurden Proben nur dann als monodispers angesehen, wenn die Pd < 5 % war. Da D eine schlecht nachvollziehbare Größe ist, gibt man üblicherweise den Radius einer hypothetischen Kugel an, die dieselben Diffusionseigenschaften aufweist wie das Protein. Dieser hydrodynamische Radius R_H ergibt sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung.

$$R_{H0} = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0}, \quad (2.16)$$

mit der Boltzmann-Konstante k_B , der Temperatur T und der Viskosität η . In Gleichung 2.16 sind statt D und R_H D_0 und R_{H0} angegeben. Es handelt sich um die konzentrationsunabhängige Diffusionskonstante bzw. den konzentrationsunabhängigen hydrodynamischen Radius. Da sich Proteine nicht wie ein ideales Gas verhalten, sondern miteinander interagieren, wirkt sich die Konzentration in der Regel auf ihre Diffusion aus. Um D_0 zu bestimmen, misst man D bei mehreren geringen Proteinkonzentrationen und extrapoliert diese Daten auf eine Konzentration von 0.

Die Messungen wurden an einem DynaPro NanoStar (Wyatt) mit einem 787 nm-Laser unter einem Winkel von 90° durchgeführt. Als Standardpuffer diente 25 mM Tricin (pH 8,0) mit 100 mM NaCl und 0,02 % DDM bei 20°C . Es wurden $2\ \mu\text{M}$ P₇₀₀ durch einen $0,45\ \mu\text{m}$ -Filter in eine $4\ \mu\text{l}$ -Einwegküvette filtriert. Die Küvette wurde für mindestens 2 min im DLS-Photometer temperiert. Zu jeder Probe wurden drei Messreihen mit je zehn Messungen über 5 s durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software DYNAMICS (Wyatt) mit Standardparametern. Als Brechungsindex (im Streuvektor q enthalten, siehe Gleichung 2.15) wurde 1,33 und als Viskosität $1,02\ \text{Pa} \cdot \text{s}$ eingesetzt. Für Kontrollen der Proben in D_2O (Unterkapitel 2.9) wurde eine Viskosität von $1,25\ \text{Pa} \cdot \text{s}$ genutzt (Hardy und Cottington 1949).

2.8 PSI_{tri} -Cyt c_{HH} -Komplexbildung in Lösung

Zur Bestimmung der Komplexbildung des PSI_{tri} mit Cyt c_{HH} in Lösung wurde $2,5\ \mu\text{M}$ PSI_{tri} mit $40\ \mu\text{M}$ Cyt c_{HH} in 5 mM Phosphatpuffer (pH 7 oder pH 8) oder 25 mM Tricin-NaOH (pH 8) mit 1 mM Natriumascorbat und 0,02 % DDM inkubiert. Für jeden Puffer wurden jeweils drei Ansätze durchgeführt: ohne Salz, mit 100 mM NaCl und mit 100 mM MgSO_4 . Die Ansätze wurden in einem Zentrifugalkonzentrator mit 100 000 MWCO-Membran (Microcon YM-100, Amicon) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Überstand mit dem jeweiligen Puffer und Salz um den Faktor 20 verdünnt und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde sechsmal wiederholt. Nach jedem Waschschrift wurde ein Aliquot des Überstands abgenommen und mittels MALDI-TOF analysiert (Unterkapitel 2.5).

2.9 Kleinwinkelstreuung

Die Kleinwinkelstreuung ist eine Methode zur Strukturanalyse bei niedrigen Auflösungen. Je nach eingesetzter Strahlenquelle unterscheidet man die Röntgenkleinwinkelstreuung (*small-angle X-ray scattering*, SAXS) von der Neutronenkleinwinkelstreuung (*small-angle neutron scattering*, SANS). Der Name leitet sich davon ab, dass ein an der Probe gestreuter Strahl unter einem kleinen Winkel θ gemessen wird. Der Detektor ist dafür weit von der Probe entfernt. Die Methode hat gegenüber der unter großen θ aufgenommenen, hochauflösenden Röntgendiffraktion der klassischen Kristallstrukturanalyse den Vorteil, dass die Probe in Lösung bei Raumtemperatur vermessen werden kann. Ein entscheidender Aspekt der Kleinwinkelstreuung ist, dass sich mit dieser Methode die Detergenshülle um Membranproteine analysieren lässt.

Die Grundlage der Methode ist die Streuung des Röntgen- oder Neutronenstrahls an Elektronen bzw. den Atomkernen. Die Streuung lässt sich mit dem Formfaktor des Proteins $F(q)$ beschreiben. Dieser Formfaktor ist die Amplitude des gestreuten Strahls unter dem Winkel θ :

$$F(q) = \int_{V_r} \Delta\rho(r) \cdot e^{-iqr} dV_r. \quad (2.17)$$

Dabei ist V das Volumen des Proteins, $\Delta\rho$ die Streulängendichte und q der Streuvektor (Gleichung 2.15). Die Energie einer Welle ist proportional zum Quadrat ihrer Amplitude. Im Fall komplexer Zahlen wird die Funktion $F(q)$ mit ihrem komplexen Konjugat $F^*(q)$ multipliziert:

$$I_s(q) = F(q) \cdot F^*(q). \quad (2.18)$$

Die Intensität des gestreuten Strahls I_s kann direkt gegen den Streuvektor q aufgetragen werden. Man erhält ein Muster aus Intensitätsmaxima und -minima, dessen Intensität exponentiell mit q abfällt. Aus Gleichung 2.18 und 2.17 ergibt sich

$$I_s(q) = \int_{V_r} \int_{V_{r'}} \Delta\rho(r) \cdot \Delta\rho(r') \cdot e^{-iq(r-r')} dV_r dV_{r'}. \quad (2.19)$$

Dabei sind r' und r identisch und werden nur durch die beiden Integrale unterschieden. Würde man die Integrale durch schrittweises Summieren lösen, dann wären die Summanden Kombinationen aus allen r_j mit allen r'_j ($r_1 \cdot r'_1 + r_1 \cdot r'_2 + r_1 \cdot r'_3 + \dots$). Dadurch lassen sich die Abstände aller Streuzentren mit einer Abstandsverteilungsfunktion $p(R)$ beschreiben. Da die gelösten Proteine in zufälligen Orientierungen vorliegen, ist die gemessene Intensität über alle Orientierungen gemittelt ($\langle e^{ix} \rangle_\Omega = \frac{\sin(x)}{x}$). Damit ergibt sich für die Intensität und die Abstandsverteilungsfunktion

$$I_s(q) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(R) \cdot \frac{\sin(qR)}{qR} dR, \quad (2.20)$$

$$p(R) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty qR \cdot I_s(q) \cdot \sin(qR) dq, \quad (2.21)$$

mit dem Abstand zwischen den Streuzentren R und dem maximalen Abstand zwischen zwei Streuzentren innerhalb des Proteins D_{\max} .

Aus Gleichung 2.20 lässt sich der Gyrationradius R_g berechnen. Der Gyrationradius ist der mittlere Abstand der Massenpunkte (z. B. Atome) um das Massenzentrum des Proteins. Er kann über die Verteilung der Streuzentren definiert werden:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{\max}} R^2 \cdot p(R) dR}{2 \int_0^{D_{\max}} p(R) dR}. \quad (2.22)$$

Zur Berechnung von R_g wird $\sin(qR)$ mit einer Maclaurin'schen Reihe angenähert. Für die Messung werden nur kleine q genutzt, damit können alle Glieder bis auf die ersten beiden vernachlässigt werden. Dies ermöglicht die Lösung von Gleichung 2.20.

$$\sin(qR) \approx qR - \frac{1}{6}(qR)^3 \quad (2.23)$$

$$I_s(q) = \overset{I_0}{\int_0^{D_{\max}} p(R) dR} - 4\pi \cdot \frac{q^2}{6} \int_0^{D_{\max}} R^2 p(R) dR \quad (2.24)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 2.22 und Umformen ergibt sich

$$\ln(I_s(q)) = I_0 \cdot \frac{-R_g^2}{3} \cdot q^2. \quad (2.25)$$

Bei einer Auftragung von $\ln(I_s)$ gegen q^2 lässt sich der Gyrationradius als Steigung ablesen.

Mit der Kleinwinkelstreuung kann die Struktur des Proteins nicht direkt berechnet werden. Zum Lösen der Struktur wird daher ein Modell erstellt und dessen theoretische Streuung mit der gemessenen Intensität verglichen. Dieses Modell besteht aus dicht gepackten Kugeln (*dummy atoms*), mit D_{\max} als maximalem Abstand. Die Positionen der Kugeln werden gegen die Intensitätskurve minimiert. Man erhält ein niedrig aufgelöstes Modell, das das gemessene Protein abbildet.

2.9.1 Röntgenkleinwinkelstreuung

Um den Detergensgürtel um PSI beschreiben zu können, wurden PSI-Monomere und -Trimere in 5 mM MES-NaOH (pH 6,0) mit 60 mM MgSO₄ und 0,02 % DDM umgepuffert. Dieser Puffer wurde genutzt, um die SAXS-Messungen mit vergangenen Messungen vergleichen zu können (Müh und Zouni 2008). Die Konzentration der Proteine betrug 15 μ M P₇₀₀ (Monomer, 5 g Protein \cdot l⁻¹) und 30 μ M P₇₀₀ (Trimer, 10 g Protein \cdot l⁻¹). Von beiden Proteinen wurde in jeweils zwei Schritten durch 1:1-Verdünnungen eine Verdünnungsreihe angefertigt.

Die Messungen und die Modellbildung wurden von Dr. M. Golub in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Pieper (Universität Tartu) im Helmholtz-Zentrum Geestach durchgeführt. Es wurde eine NanoStar-SAXS-Apparatur (Bruker AXS GmbH) mit Kupferanode und einer Wellenlänge von 1,54 Å verwendet. Die Probe befand sich in einer 2 mm-Glaskapillare, in 1,03 m Entfernung vom Vantec-2000-Detektor. Die Daten des zweidimensionalen Detektors wurden mit Fit2D (Hammersley et al. 1996) radial gemittelt und mit PRIMUS (Konarev et al. 2003) normalisiert, auf eine Proteinkonzentration von 0 extrapoliert und die Hintergrundstreuung abgezogen. Die p(R)-Funktion wurde anhand des Modells eines elliptischen Zylinders mit GNOM (Svergun 1992) erstellt. Es wurde dabei der Bereich $q < 0,01 \text{ \AA}^{-1}$ genutzt, um den Beitrag der Streuung der freien DDM-Mizellen zu vernachlässigen. DAMMIF (Franke und Svergun 2009) wurde eingesetzt, um ein Dummy-Atom-Modell zu erstellen und an die gemessenen Daten anzunähern. Basierend auf der PSI-Kristallstruktur (PDB-Code: 1jb0) wurde mit CRY SOL (Svergun et al. 1995) eine theoretische I(q)-q-Kurve für monomeres und trimeres PSI erstellt, um diese mit den gemessenen Daten vergleichen zu können.

2.9.2 Neutronenkleinwinkelstreuung

Zur Analyse des Detergensgürtels von PSI wurden Proben unterschiedlicher Isolationsmethoden analysiert: mit 0,55 % DDM und mit 2,0 % DDM isoliertes PSI-Trimer (siehe Abschnitt 2.2.1). Wie in Abschnitt 2.9.1 wurde ein Puffer verwendet, der mit vorangegangenen Messungen vergleichbar ist (5 mM MES-NaOH (pH bzw. pD 6,4) mit 50 mM MgSO₄ und 0,02 % DDM). Die Pufferkomponenten wurden für die Kontrastvariation jeweils in H₂O und D₂O (99,9 %, frisch geöffnet, Sigma-Aldrich) gelöst und Gemische aus 5 %, 18 % und 100 % D₂O erstellt. Der pD wurde mit einem auf H₂O geeichten pH-Meter mit dem Korrekturfaktor 0,4 in D₂O-Lösung eingestellt ($pD = pH_{app} + 0,4$). PSI-Kristalle wurden mit salzfreiem Puffer der jeweiligen D₂O-Konzentration gewaschen und anschließend im MgSO₄-haltigen Puffer gelöst.

Zur Analyse der Cyt *c*_{HH}- und Cyt *c*₆-Bindung wurden 0,55 % DDM-Isolationen von trimerem PSI genutzt. Die Puffer waren für eine hohe Löslichkeit des PSI und eine hohe Affinität zu den Cytochromen optimiert. Sie enthielten 25 mM Tricin-NaOH (pH/pD 8,0) mit 0,02 % DDM und 25 mM NaCl (Cyt *c*_{HH}-Puffer) bzw. 200 mM MgSO₄ (Cyt *c*₆-Puffer). Es wurden 5 % und 100 % D₂O eingesetzt. PSI wurde umkristallisiert und die Kristalle mit 0,02 % DDM in 5 % oder 100 % D₂O gewaschen und für Cyt *c*₆ in Cyt *c*₆-Puffer gelöst bzw. für Cyt *c*_{HH} in Puffer mit 100 mM NaCl gelöst und anschließend langsam auf 25 mM NaCl mit salzfreiem Puffer verdünnt. Die finale PSI-Konzentration betrug 30 μ M P₇₀₀. Cyt *c*_{HH} wurde als Pulver im finalen Puffer gelöst, Cyt *c*₆ wurde in einem Zentrifugalkonzentrator (5000 MWCO) umgepuffert. Die finalen Cytochromkonzentrationen waren 130 μ M (Cyt *c*_{HH}) bzw. 300 μ M (Cyt *c*₆). Die Messungen und die Modellbildung wurden von Dr. M. Golub und Prof. J. Pieper (Universität Tartu) am Heinz Maier-Leibnitz Zentrum in Garching durchgeführt. Es

wurde am KWS-1 mit einer Wellenlänge von 5 \AA und den Abständen 8 m und 20 m gemessen. Die Datenbearbeitung erfolgte mit QtiKWS, das für die KWS-1-Apparatur optimiert wurde. GNOM, DAMMIF und CRY SOL wurden wie in Abschnitt 2.9.1 angewandt.

2.10 Kristallstrukturanalyse

2.10.1 Theorie: Kristallisation

In der zuvor beschriebenen Kleinwinkelstreuung geht Information über die Proteinstruktur durch die unspezifische Orientierung der Proteine verloren. Mittels Kristallisation können die Proteine in eine definierte Position und Orientierung gebracht werden. Hierzu wird die Löslichkeit des Proteins durch ein geeignetes Kristallisationsmedium so verändert, dass sich die Proteine langsam aneinander anlagern. Es werden zwischen den Proteinen Kristallkontakte geknüpft, die sich durch den gesamten Kristall immer wieder wiederholen (Abbildung 2.3). Die kleinste sich durch Translation wiederholende Einheit wird als Einheitszelle bezeichnet. In der Regel liegen mehrere Proteine in unterschiedlichen Orientierungen in einer Einheitszelle. Die kleinste sich durch Translation und Rotation wiederholende Einheit wird als asymmetrische Einheit bezeichnet. Asymmetrische Einheit und Einheitszelle können sich von Kristall zu Kristall unterscheiden; so ist die asymmetrische Einheit von PSI aus *T. elongatus* (PDB-Code: 1jb0) ein Monomer, in *Synechocystis* sp. (PDB-Code: 5oy0) ein Trimer und im Kokristall mit Ferredoxin (PDB-Code: 5zf0) ein Hexamer.

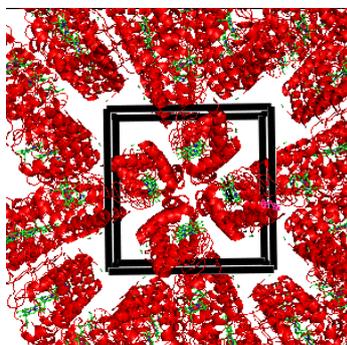


Abbildung 2.3: Aufbau eines Proteinkristalls am Beispiel des Cytochroms *c* aus Pferdeherz (PDB-Code: 1hrc). Das Cyt c_{HH} wiederholt sich im Kristall tausendmale in einer immer wiederkehrenden Anordnung. Vier Cyt c_{HH} -Proteine liegen in der schwarz markierten Einheitszelle, jeweils 90° gegeneinander rotiert. Die Orientierung lässt sich an der grün dargestellten Häm-Gruppe erkennen.

Die Kristallisation von Proteinen ist ein komplexer Vorgang, da sie von mehreren Faktoren unterbunden werden kann. Vor allem die Homogenität des Proteins ist eine Voraussetzung zur erfolgreichen Kristallisation. Ist eine PSI-Trimer-Lösung mit nur 1% an PSI-Monomeren verunreinigt, so können keine Kristalle erhalten werden. Ein anderer bedeutender Faktor ist die Wahl des Kristallisationsmediums. Für jedes Protein gibt es eine Reihe potenzieller Bedingungen, unter denen es kristallisieren kann. Meist kristallisiert man durch Zugabe eines Fällungsmittels wie Polyethylenglykol (PEG) oder durch eine hohe Ionenstärke. Für das PSI aus *T. elongatus* konnte jedoch bereits 2001 durch die Umkehrung des sogenannten Einsalzens Kristalle mit

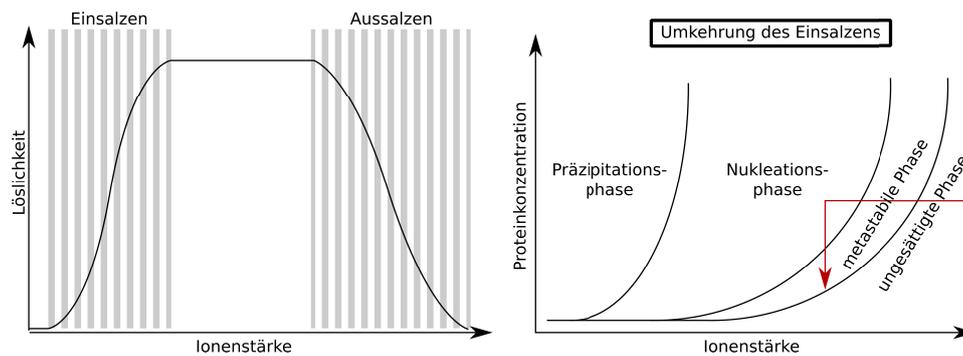


Abbildung 2.4: Löslichkeit eines Proteins in Abhängigkeit der Ionenstärke. Links: Bei niedrigen Ionenstärken sind Proteine unlöslich, und lösen sich zunehmend mit Erhöhung der Ionenstärke (Einsalzen). Bei hohen Ionenstärken nimmt die Löslichkeit wieder ab (Aussalzen). Rechts: Phasendiagramm der Kristallisation im Einsalzbereich. In dieser Arbeit wurden Kristalle hergestellt, indem die Ionenstärke durch Dialyse in die Nukleationsphase herabgesetzt wurde. Durch Bildung der Kristallisationskeime nahm die Proteinkonzentration ab, sodass diese in der metastabilen Phase wachsen konnten (roter Pfeil).

einer Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$ (Jordan et al. 2001) gewonnen werden (Abbildung 2.4). Unter niedrigen Ionenstärken kommt es zu Kristallkontakten zwischen geladenen Seitenketten in der Untereinheit PsaE und der luminalen Helix von PsaF. Kristallisiert man dagegen bei hohen Ionenstärken, werden abstoßende Wechselwirkungen gleich geladener Oberflächen abgeschirmt. Die Zugabe von PEG stört die Hydrathülle um das Protein, sodass sich spezifische Protein-Protein-Interaktionen bilden können. In der Proteinkristallisation unterscheidet man vier Phasen: die Präzipitationsphase, in der das Protein aggregiert, die Nukleationsphase, in der sich Kristallkeime bilden, die metastabile Phase, in der Kristalle wachsen können, und die ungesättigte Phase, in der sich Kristalle lösen. Um Kristalle zu erhalten, muss das Protein in die Nukleationsphase gebracht und nach erfolgreicher Keimbildung zum Wachsen in die metastabile Phase überführt werden. Oft sind die Nukleations- und die metastabile Phase sehr schmal. Geringe Abweichungen in der Konzentration der Fällungsmittel oder Ionenstärke können dazu führen, dass das Protein entweder löslich bleibt oder in Form von Aggregaten ausfällt. Daher empfiehlt es sich, Ionenstärke und Fällungsmittel langsam an die Nukleationsphase anzunähern. Die gängigste Methode hierfür ist die Dampfdiffusion, in der ein Tropfen Proteinlösung in der ungesättigten Phase als *sitting* oder *hanging drop* in einem geschlossenen Raum gegen eine Reservoirlösung mit hoher Fällungsmittelkonzentration äquilibriert wird. Der Proteintropfen verdunstet so lange, bis sein Dampfdruck dem der Reservoirlösung entspricht. Durch die entstehenden Kristallisationskeime nimmt die Proteinkonzentration ab und die Keime gelangen in die metastabile Phase, in der sie wachsen können. Diese Methode ist jedoch nicht geeignet, um Proteine im Einsalzbereich zu kristallisieren, daher wurde hier die Dialyse angewandt. Das Protein wird in der ungesättigten Phase in ein Dialysegefäß gegeben und gegen ein großes Volumen eines Mediums der Nukleationsphase dialysiert. Auch hier nimmt die Proteinkonzentration ab und die Kristalle können in der metastabilen Phase wachsen (Abbildung 2.4, roter Pfeil).

Innerhalb eines Kristalls können Fehler in der Periodizität auftreten. Besonders bei großen Membranproteinen kommen hohe Mosaizitäten oder gar Domänen mit unterschiedlicher Orientierung (*twinning*) häufig vor. Eine Methode, um diese Unebenheiten zu verhindern, ist das Beimpfen des Kristallisationsmediums mit Impfkristallen (*seeding*). Man erzeugt kleine Proteinkristalle, die aufgrund ihrer Optik bereits auf

eine hohe Periodizität schließen lassen. Die Kristalloberfläche wird durch Erhöhen der Ionenstärke (oder Herabsetzen der Konzentration des Fällungsmittels) leicht aufgelöst und anschließend werden die Kristalle in die metastabile Phase überführt, um sie zur gewünschten Größe wachsen zu lassen (Fromme und Witt 1998). Auf diese Weise wurden PSI-Kristalle mit einer Größe von 1,0 mm bis 1,5 mm hergestellt, welche bis zu einer Auflösung von 2,5 Å streuten (Jordan et al. 2001). Benötigt man kleine Kristalle für Experimente ($<100\ \mu\text{m}$), kann man bereits gewachsene Kristalle mechanisch zerkleinern, um sie anschließend als Impfkristalle einzusetzen. Eine weitere Möglichkeit, Kristalle zu optimieren, stellt das Dehydratisieren dar. Dem Kristall wird Wasser entzogen, wodurch die Proteine näher aneinanderrücken und eine größere Kontaktfläche erreichen, was sich positiv auf die Periodizität auswirkt. Die Einheitszelle wird bei diesem Vorgang kleiner. Die Dehydratisierung ist jedoch nicht immer erfolgreich; bei zu starker Dehydratisierung kann es sogar zu einem vollständigen Verlust der Beugungseigenschaften des Kristalls kommen. Durch Schockgefrieren induzierte Mosaizität kann durch das sogenannte *annealing* verringert werden. Hierbei wird ein tiefgefrorener Kristall aufgetaut und erneut schockgefroren.

Das Beugungsmuster des Proteinkristalls wird klassischerweise unter Kryobedingungen aufgenommen. Der Kristall wird in einem Kryoschutzmittel äquilibriert, auf einer Schlaufe aufgenommen und in einem Kryofluid (flüssiger Stickstoff oder flüssiges Propan) schockgefroren. Als Kryoschutzmittel eignen sich hochkonzentrierte hydrophile Verbindungen wie Glycerin, Saccharose oder PEG. Nach Schockgefrieren kann der Kristall auf einem Goniometer in einem Röntgenstrahl platziert und vermessen werden. Der Kristall wird mehrere Minuten im Röntgenstrahl gedreht, um die Beugungsbilder aller Orientierungen aufzunehmen. Hierfür sind große Kristalle notwendig, da diese weniger anfällig für Strahlenschäden sind und zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Beugungsbilds führen (Holton 2009). Im Gegensatz zum Röntgenstrahl eines Synchrotrons treten während der Messung an einem Röntgen-Freie-Elektronen-Laser (XFEL) keine Strahlenschäden auf und der intensive Strahl ist auf wenige Mikrometer fokussiert, weshalb hier auch kleine Kristalle gemessen werden können. Für jeden dieser Mikrokristalle wird ein Beugungsbild aufgenommen, wobei die Mikrokristalle im Strahl zufällig orientiert sind und somit auch Beugungsbilder unter unterschiedlichen Orientierungen aufgenommen werden.

2.10.2 Theorie: Das Beugungsbild

Der Kristall verhält sich im Röntgenstrahl wie ein Gitter, weshalb auf dem Detektor ein Beugungsbild entsteht. Dieses Beugungsbild konnte 1913 von William Henry und William Lawrence Bragg mit einer Totalreflexion der Strahlen erklärt werden (Bragg und Bragg 1913). In diesem Modell wird der Kristall durch Scharen paralleler Netzebenen beschrieben, wobei sich die Ebenen an den Einheitszellen aufspannen (Abbildung 2.5 A). In der Abbildung sind drei Netzebenenscharen dargestellt, tatsächlich können die Ebenen jedoch in allen Orientierungen vorliegen, weshalb im Kristall zehntausende bis hunderttausende Netzebenenscharen nachweisbar sind. Die Netzebenen werden durch die Miller'schen Indizes, h , k und l , beschrieben. In Abbildung 2.5 B ist dargestellt, wie ein Röntgenstrahl unter einem Winkel θ auf die Netzebenenschar ($\bar{1}1$) trifft. Alle an dieser Schar reflektierten Wellen interferieren und treffen am selben Punkt auf den Detektor. Aufgrund des Abstands d der Netzebenen müssen die Wellen unterschiedlich lange Wege zum Detektor zurücklegen und treffen dort mit unterschiedlicher

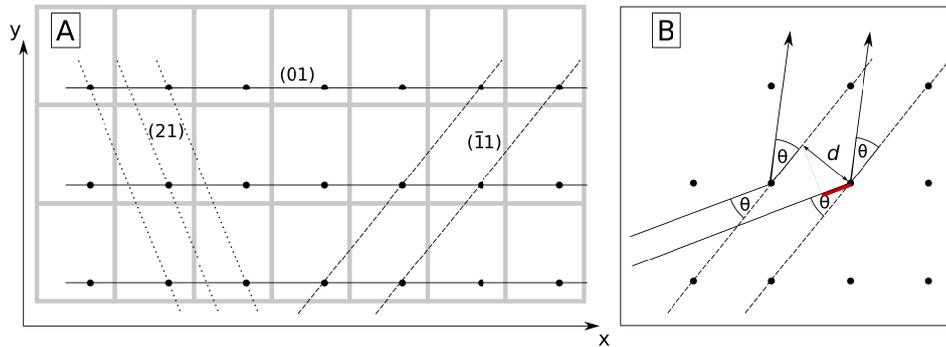


Abbildung 2.5: Netzebenen im Kristall und Totalreflexion an den Ebenen. A: In jeder Einheitszelle (grau) wird ein beliebiger Punkt gewählt. Auf diesen Punkten werden Netzebenen aufgespannt. B: Die Totalreflexion eines Röntgenstrahls an der Netzebene $(\bar{1}1)$. Der Strahl tritt von links unten unter dem Winkel θ auf die Netzebene und wird unter demselben Winkel nach oben rechts reflektiert. Der Abstand der Netzebenen d ist mit einem doppelseitigen Pfeil markiert. $d \cdot \sin(\theta)$ ist in rot dargestellt.

Phase $\Delta\phi$ auf, wobei (Abbildung 2.5 B, rote Linie)

$$\Delta\phi = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta). \quad (2.26)$$

Die Amplitude des interferierenden, gestreuten Strahls ergibt sich damit aus der Summe der an jeder Ebene reflektierten Wellen:

$$A(x, \Delta\phi)_{\text{sum}} = \sum_j A_j \cdot \cos(kx + j \cdot \Delta\phi). \quad (2.27)$$

$A(x, \Delta\phi)_{\text{sum}}$ ist die aufsummierte Amplitude der interferierenden Strahlen am Detektor, kx die Ortsfrequenz und A_j die Amplitude der einzelnen reflektierten Wellen. Als Gedankenexperiment kann man nun für $\Delta\phi$ und kx einen Wert vorgeben, z. B. $kx = 2\pi$ und $\Delta\phi = \pi$. Weiter nehmen wir an, dass alle reflektierten Wellen die gleiche Amplitude $A_j = A$ haben. Damit ergibt sich

$$A_{\text{sum}} = \sum_{j=1}^4 A \cdot \cos(2\pi + j \cdot \pi) = -A + A - A + A = 0. \quad (2.28)$$

Statt die Intensität des gestreuten Strahls aufzusummieren, wird im Kristall die Intensität durch negative Interferenz ausgelöscht. Nur für den Fall von $\Delta\phi = 2\pi$, wenn also die Phasenverschiebung einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge $n \cdot \lambda$ entspricht, tritt konstruktive Interferenz auf. Damit ergibt sich aus Gleichung 2.26 die Bragg-Gleichung

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta). \quad (2.29)$$

Nur diejenigen Netzebenenscharen, die Gleichung 2.29 erfüllen, führen zu einem Signal auf dem Detektor und jedem Signal kann eine Netzebenenschar zugeordnet werden. Beugungsmaxima werden bei der Indizierung mit den Miller'schen Indizes (h, k, l) der jeweiligen Netzebenenschar versehen. In Abbildung 2.5 wurden die Netzebenen an einem beliebigen Atom aufgespannt. Legt man sie stattdessen durch ein anderes Atom, ändern sich die Netzebenen nicht – die Position der Beugungsmaxima ist abhängig vom Aufbau der Einheitszelle, jedoch nicht von der Position der Atome. Um Informationen über die Position der Atome zu erhalten, muss die Interferenz des gestreuten Strahls

innerhalb einer Einheitszelle betrachtet werden. Analog zu Gleichung 2.27 ergibt sich der Strukturfaktor F_{hkl} an einem Beugungsmaximum des gestreuten Strahls durch Aufsummieren der an allen Atomen gestreuten Wellen. Die Amplitude der Wellen A_j wird durch den atomaren Formfaktor f_j ersetzt und die Phasenverschiebung $\Delta\phi$ durch die Koordinaten des Atoms (x_j, y_j, z_j) , welches mit den Miller'schen Indizes multipliziert wurde (hx_j, ky_j, lz_j) . Der Index j bezieht sich hierbei auf das j -te Atom. Für weitere Berechnungen ist es sinnvoll, die Welle mit einem komplexen Term i auf einer imaginären Achse zu beschreiben:

$$F_{\text{hkl}} = \sum_j \overset{\text{reeller Term}}{f_j \cdot \cos(2\pi(hx_j + ky_j + lz_j))} + i \cdot \overset{\text{imaginärer Term}}{f_j \cdot \sin(2\pi(hx_j + ky_j + lz_j))}. \quad (2.30)$$

Aus der Euler'schen Formel $\cos(x) + i \cdot \sin(x) = e^{ix}$ ergibt sich

$$F_{\text{hkl}} = \sum_j f_j \cdot e^{i \cdot 2\pi \cdot (hx_j + ky_j + lz_j)}. \quad (2.31)$$

Diese Gleichung stellt eine Fourier-Transformation dar. Eine Fourier-Transformation kann in ihre inverse Funktion zurücktransformiert werden. Da f_j von der Elektronendichte des Atoms abhängt, kann mit Hilfe der Fourier-Transformation die Elektronendichte ρ_e berechnet werden:

$$\rho_e(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{\text{hkl}} \cdot e^{-i \cdot 2\pi \cdot (hx + ky + lz)}. \quad (2.32)$$

V ist das Volumen der Einheitszelle. Aus den Atomkoordinaten ergibt sich somit die Elektronendichte und umgekehrt kann man die Atomkoordinaten aus der Elektronendichte berechnen. Hierzu muss F_{hkl} bekannt sein. F_{hkl} ist ein Vektor, der sich aus einer Amplitude und einer Phase zusammensetzt.

$$F_{\text{hkl}} = |F_{\text{hkl}}| \cdot e^{i\alpha_{\text{hkl}}}, \quad (2.33)$$

wobei α die Phase dieses Vektors ist. Gemessen wird jedoch nicht der Strukturfaktor F_{hkl} , sondern die Intensität des Beugungsmaximums I_{hkl} . Die Intensität einer Welle ist der Betrag der Amplitude zum Quadrat (vgl. Gleichung 2.18):

$$I_{\text{hkl}} = |F_{\text{hkl}}|^2. \quad (2.34)$$

Die Messung der Röntgenstreuung ergibt daher lediglich den Betrag des Strukturfaktors, nicht aber die Phaseninformation α_{hkl} . Die Elektronendichte berechnet sich somit aus

$$\rho_e(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \overset{\text{gemessener Wert}}{|F_{\text{hkl}}|} \cdot e^{-i \cdot 2\pi \cdot hx + ky + lz - \overset{\text{unbekannt}}{\alpha_{\text{hkl}}}}. \quad (2.35)$$

Um dieses Phasenproblem direkt zu lösen, kann man das Protein für anomale Streuung mit Schwermetallionen inkubieren. Die Schwermetalle binden an einzelne spezifische Bindungsstellen im Protein. Anschließend misst man die Intensitäten eines Kristalls mit Schwermetallionen und eines normalen Kristalls. Aus der Differenz der Strukturfaktoren beider Messungen erhält man den Strukturfaktor der Schwermetallionen. Da

es sich um wenige Atome handelt, kann man deren Positionen mit einer Patterson-Funktion berechnen. Mit den berechneten Phasen der Schwermetallionen können die Phasen der restlichen Atome angenähert werden. Diese Methode wird als *isomorphous replacement* bezeichnet und wurde 2001 für die Lösung der Kristallstruktur des PSI und des PSII aus *T. elongatus* angewandt (Jordan et al. 2001; Zouni et al. 2001). Anstelle des *isomorphous replacement* wird heutzutage die anomale Streuung (*multiwavelength anomalous dispersion*, MAD, und *single-wavelength anomalous diffraction*, SAD) des Proteinkristalls genutzt. Hier verzichtet man auf den Einsatz von Schwermetallen; stattdessen nutzt die Absorptionseigenschaften der im Protein vorhandenen Atome. Eine weitere Methode ist es, eine homologe Struktur des Proteins zu nutzen, um die Phasen anzunähern. Diese Methode wird als *molecular replacement* bezeichnet. Aus dem Proteinmodell wird über Gleichung 2.31 ein Strukturfaktor F^c berechnet (c steht für *calculated*), der mit dem gemessenen Strukturfaktor F^o verglichen wird (o steht für *observed*). Durch Rotation des Modells wird die Abweichung der beiden Struktur faktoren minimiert. Anschließend erfolgt eine Minimierung über Translation. Nun liegt ein Atommodell mitsamt berechneten Phasen vor, das ein ähnliches Beugungsmuster ergibt wie der gemessene Kristall. Die PSI-Struktur ist bereits bekannt, daher wurde in dieser Arbeit das *molecular replacement* angewandt. Das Atommodell wird durch ein *refinement* weiter verbessert. Die Phasen aus dem direkten Phasing oder dem *molecular replacement* werden genutzt, um eine Elektronendichte zu berechnen. Ein Proteinmodell wird in diese Elektronendichte gelegt und auf Abweichungen untersucht. Liegt ein Teil des Modells nicht in der Elektronendichte, kann dieser in die Elektronendichte hineingelegt werden; existiert dagegen keine Elektronendichte, kann der entsprechende Teil des Modells gelöscht werden. Nach Korrektur der Abweichungen berechnet man die Phasen mit dem neuen Modell und untersucht dieses erneut auf Abweichungen. Die Übereinstimmung von Modell und gemessenen Struktur faktoren wird mit zwei R-Faktoren, R_{work} und R_{free} , überprüft. Beide R-Faktoren berechnen sich auf dieselbe Weise:

$$R = \frac{\sum_{\text{hkl}} ||F_{\text{hkl}}^o| - |F_{\text{hkl}}^c||}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{hkl}}^o|}. \quad (2.36)$$

Der Datensatz mit allen F^o wird dazu in zwei Teildatensätze geteilt, wobei das Proteinmodell gegen 90 % der Daten optimiert (*refined*) wird. Dieser größere Teildatensatz wird mit R_{work} beschrieben. Die restlichen 10 % der Daten werden mit dem Proteinmodell, das gegen den anderen Teildatensatz optimiert wurde, mittels R_{free} verglichen. Mit R_{free} wird somit überprüft, ob das Modell korrekt an die Daten angenähert wurde oder ob Fehlinterpretationen vorliegen.

2.10.3 Durchführung: Screening von Kristallisationsbedingungen

Zur Kristallisation von PSI und zur Kokristallisation mit Cyt c_{HH} und Cyt c_6 wurden sowohl die Dialyse als auch die Dampfdiffusion angewandt. Hierbei wurden unterschiedliche Bedingungen überprüft, die nach der folgenden Anleitung angesetzt wurden. Die genaue Angabe der verwendeten Medien ist den entsprechenden Abschnitten der Ergebnisse genannt.

Mit der **Dialyse** sollte die Kristallisation im Einsalzbereich untersucht werden. PSI wurde frisch umkristallisiert und in 5 mM MES (pH 6,0) mit 60 mM MgSO_4 und 0,02 % DDM gelöst. PSI und Cyt c_{HH} bzw. Cyt c_6 wurden mit 0,5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) oder 1 mM Natriumascorbat in Dialyseknöpfchen (Dialysis Buttons,

Hampton Research) gegeben und mit einer 2000-MWCO-Zellulosemembran (Spectra Por 7, Carl Roth) verschlossen. Als Dialysepuffer diente 5 mM MES (pH 6,0) mit 0,02 % DDM und eine variable Konzentration von MgSO_4 , NaCl oder Na_2SO_4 . Für die Kristallisation unter reduzierten Bedingungen enthielt der Dialysepuffer 1 mM Natriumascorbat. Das Protein wurde gegen ein hundertfaches Volumen bei 4 °C oder 20 °C im Dunkeln ohne Rühren dialysiert. Der Dialysepuffer wurde jeweils nach ein bis zwei Tagen gegen einen Puffer mit niedrigerer Ionenstärke ausgetauscht, bis das Protein entweder kristallisierte oder eben aggregierte.

Die **Dampfdiffusion** diente der Untersuchung der Kristallisation im Aussalzbereich. Es wurden 96-Doppel-Well-Platten genutzt, jeweils mit einem Well PSI und einem Well PSI mit Cyt c_6 . PSI_{tri} (50 μM P700) wurde mit 10 mM Tricin-NaOH (pH 8,0) mit 50 mM NaCl und 0,02 % DDM mit oder ohne 50 μM bis 100 μM Cyt c_6 auf die Well-Platte aufgetragen und 1:1 mit dem Kristallisationsmedium aus dem Reservoir verdünnt. Die Kristallisation erfolgte bei 20 °C im Dunkeln. Das Reservoir enthielt 2,5 % bis 5,0 % PEG 1450, 2000 oder 4000 sowie entweder 5 mM Natriumascorbat als Reduktionsmittel oder 1 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) als Oxidationsmittel. Die im Reservoir enthaltenen Salze, NaCl, MgSO_4 und CaCl_2 , leiteten sich aus den Ergebnissen der kinetischen Messungen von Abschnitt 3.2.1 ab.

2.10.4 Durchführung: Nachweis der Kokristalle

PSI-Kristalle, die in Gegenwart von Cyt c_6 oder Cyt c_{HH} gewachsen waren, wurden einzeln im Kristallisationsmedium (G_X -Puffer) aufgenommen und abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde sechsmal durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde der cytochromhaltige Überstand über den Kristallen auf dieselbe Weise gewaschen. Das Pellet wurde in einem geringen Volumen 5 mM MES (pH 6,0) mit 20 mM MgSO_4 und 0,02 % DDM aufgenommen und wie in Unterkapitel 2.5 beschrieben mit MALDI-TOF analysiert. Es ist zu beachten, dass Cyt c_{HH} bei niedrigen Ionenstärken an der Dialysmembran haften bleibt. Die Membran wurde daher nach der Dialyse mit H_2O gespült, mit 5 mM Natriumascorbat inkubiert und die Cyt c_{HH} -Oberflächenkonzentration im Photometer bestimmt. Wenn der Verlust an Cyt c_{HH} größer als 5 % war, wurden die Kristalle nicht für weitere Messungen eingesetzt.

Zur Quantifizierung des Verhältnisses von Cyt c_{HH} zu PSI wurden alle Kristalle eines Ansatzes vereint und sechsmal gewaschen. Anschließend wurden die Kristalle in 5 mM MES (pH 6,0) mit 100 mM MgSO_4 und 0,02 % DDM gelöst und durch einen Zentrifugalkonzentrator mit 100 000 MWCO dreimal umgepuffert. Das PSI blieb über dem Filter, während das Cyt c_{HH} im Durchfluss zu finden war. Die Konzentration der Proteine wurde photometrisch bestimmt und das Verhältnis der Stoffmengen beider Proteine berechnet.

2.10.5 Durchführung: Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse

Für die am Synchrotron gemessenen PSI-Cyt c_{HH} -Kokristalle mit einer Auflösung von bis zu 3,3 Å wurden die Proteine mittels Dialyse (Abschnitt 2.10.3) bei 20 °C kristallisiert und die Kristalle anschließend mit *seeding* optimiert. 7,5 μM P700 und 37,5 μM Cyt c_{HH} wurden in einem 100 μl -Dialyseknöpfchen mit Dialysepuffer (5 mM MES, pH 6,0, 0,02 % DDM), 60 mM MgSO_4 und 0,5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) gemischt. Die Lösung wurde über Nacht gegen 10 ml Dialysepuffer mit 5 mM MgSO_4 mit einer 2000 MWCO Dialysmembran dialysiert (vgl. Abschnitt 2.10.3). Anschließend erfolgte eine Dialyse über Tag gegen 10 ml Dialysepuffer mit 3 mM MgSO_4 und danach eine Dialyse über ein bis drei Tage gegen einen Dialysepuffer mit 2 mM MgSO_4 .

Durch die schrittweise Dialyse wird die Wahrscheinlichkeit der Aggregatbildung verringert. Das Protein sollte so kurz wie möglich in den Dialyseknöpfchen verbleiben, da Cyt c_{HH} bei niedrigen Ionenstärken an der Dialysemembran bindet. Etwa zwei Drittel aller Ansätze bildeten somit Kristalle, wobei ein großer Teil hohl oder verwachsen war. Die Hälfte der Dialyseknöpfchen wurde nur bis 3 mM MgSO_4 dialysiert, sodass gleichzeitig eine PSI-Cyt c_{HH} -Lösung in 3 mM MgSO_4 und Kristalle in 2 mM MgSO_4 vorlagen. Die Kristalle wurden mit einer Pipette aus den Dialyseknöpfchen entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Entnahme der Lösungen aus den Dialyseknöpfchen empfiehlt es sich, die Dialysemembran mit einer gelben Pipettenspitze zu durchstechen. Die Kristalle wurden für 1 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand gegen 40 μl Dialysepuffer ohne MgSO_4 ausgetauscht. Die Kristalle wurden mit einer Teflonkugel (Seed Bead Kit, Hampton Research) für 2 min gevortext, wodurch sich kleine Kristallbruchstücke bildeten, die als *seeding*-Kristalle genutzt wurden. In der *seeding*-Lösung verbleibende große Kristalle wurden für 1 min im ruhenden Eppendorf-Reaktionsgefäß sedimentiert. 2 μl des Überstands wurden in einer 96-Well-Platte mit 40 μl der gegen 3 mM MgSO_4 dialysierten Proteinlösung gemischt. Über Nacht wuchsen Kristalle mit einer Größe von 200 μm mal 30 μm bis 800 μm mal 100 μm . Die Kristalle wurden sukzessive in Lösungen aus Dialysepuffer mit oder ohne 37,5 μM Cyt c_{HH} in steigender Saccharosekonzentration (Kryoprotektivum) von 0,25 M bis 1,75 M in 0,25 M-Schritten über je 5 min überführt. Es folgte eine Inkubation von mindestens 1 h in 1,75 M Saccharose, bevor die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Für PSI-Kristalle ohne Cyt c_{HH} wurde dasselbe Protokoll angewandt, statt gegen finale 2 mM und 3 mM MgSO_4 wurde das Protein jedoch gegen 5 mM MgSO_4 (in Anwesenheit von *seeding*-Kristallen) und 8 mM MgSO_4 (Proteinlösung für die finale Kristallisation) dialysiert. Die Kristalle wurden an den Strahlengängen MX 14.1 des Elektronenspeicherrings BESSY II am Helmholtz-Zentrum Berlin, 8.2.1 des Elektronenspeicherrings Advanced Light Source (ALS) in Berkeley, USA, und P11 des Elektronenspeicherrings PETRA III am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg vermessen. Die Diffraktionsbilder wurden mit XDSAPP indiziert (Krug et al. 2012). Das *molecular replacement* erfolgte mit Phaser-MR gegen die Kristallstruktur von PSI mit dem PDB-Code 1jb0 (McCoy et al. 2007). Das *refinement* wurde mit REFMAC5 und COOT durchgeführt (Murshudov et al. 2011; Emsley et al. 2010).

2.10.6 Durchführung: Mikrokristalle für die Strukturanalyse

Mikrokristalle für die serielle Femtosekunden-Kristallografie (SFX) an einem Röntgen-Freie-Elektronen-Laser (X-ray free electron laser, XFEL) wurden durch Verdünnen der Proteinlösung mit Puffer niedriger Ionenstärke hergestellt. PSI wurde in 5 mM MES pH 6,0, 50 mM Na_2SO_4 und 0,02 % DDM gelöst. Das Protein wurde auf 10 μM P700, 12 mM Na_2SO_4 , 5 mM MES pH 6,0 und 0,02 % DDM verdünnt. Die Kristalle wachsen innerhalb von 15 min bis 20 min auf eine Größe von 20 μm mal 60 μm bis 30 μm mal 60 μm . Das Wachstum wurde durch weitere Zugabe von Puffer mit niedriger Ionenstärke abgestoppt.

Die Messung erfolgte an der Linac Coherent Light Source (LCLS) des Stanford Linear Accelerator Centers (SLAC), am Spring-8 Angstrom Compact free electron Laser (SACLA) und am Pohang Accelerator Laboratory (PAL-XFEL) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. J. Yano und Dr. V. Yachandra. Am LCLS wurde ein vollständiger Datensatz mit oxidiertem PSI mit einer Auflösung von 2,75 Å gemessen. Am SACLA und PAL-XFEL wurden Datensätze mit reduziertem PSI mit

einer Auflösung von 3,4 Å gemessen. Ein vollständiger Datensatz wurde am SACLA von Kristallen, die 100 ns vor der Messung belichtet wurden, gemessen. Die Kristalle wurden aus einer Hamilton-Spritze mit akustischen Pulsen auf einen Film aufgetropft (Fuller et al. 2017). Die Daten wurden mit einer Frequenz von 10 Hz an einem Rayonix Detektor aufgenommen und mittels `cctbx.xfel`, einem Programmpaket speziell für XFEL Daten, ausgewertet. Das Modell wurde aus dem Kryokristallstruktur-Modell von PSI (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001) von Dr. Stephen Keable mit Hilfe des Programmpakets Phenix erstellt (Adams et al. 2010).

2.10.7 Durchführung: PSI-Cyt c_{HH} -Mikrokristalle

Zur Messung der Kostruktur von PSI mit Cyt c_{HH} an einer XFEL-Strahlenquelle wurden Mikrokristalle wie in Abschnitt 2.10.6 durch Verdünnen hergestellt. 60 μM PSI_{tri} , 37,5 μM Cyt c_{HH} , 40 mM Na_2SO_4 , 5 mM MES-NaOH (pH 6,0) und 0,02 % DDM PSI_{tri} wurden mit 37,5 mM Cyt c_{HH} , 5 mM MES-NaOH (pH 6,0) und 0,02 % DDM auf das achtfache Volumen verdünnt (final: 7,5 μM P_{700} , 37,5 μM Cyt c_{HH} , 5 mM Na_2SO_4 und 0,02 % DDM). Nach 30 min bis 45 min waren die Kristalle auf 40 μm gewachsen. Die Ausbeute ließ sich durch schrittweises Verdünnen mit 37,5 mM Cyt c_{HH} , 5 mM MES-NaOH und 0,02 % DDM erhöhen. Geeignete Schritte sind 3 min bis 10 min mit jeweils 10 % bis 20 % des Gesamtvolumens. Um PSI zu reduzieren, wurden die Kristalle in 5 mM Natriumascorbat, 5 mM MES-NaOH (pH 6) und 0,02 % DDM im Dunkeln inkubiert.

2.11 Elektronenmikroskopie

Mit heutigen Transmissionselektronenmikroskopen können Proteinstrukturen mit hoher Auflösung gemessen werden. Ein Elektronenmikroskop erzeugt einen Elektronenstrahl, der an der Probe gestreut wird. Da Elektronenstrahlen durch elektrische Spulen mit hoher Genauigkeit gebündelt werden können, wird hier im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse nicht der gestreute Strahl, sondern der transmittierte Strahl untersucht. Die elektrischen Spulen dienen, ähnlich einem Lichtmikroskop, als Linsen, über die ein vergrößertes Abbild der Probe auf einem Detektor sichtbar wird. Das Auflösungsvermögen d des Elektronenmikroskops wird über das Rayleigh-Kriterium beschrieben.

$$d = \frac{0,61\lambda}{n \cdot \sin(\alpha)}, \quad (2.37)$$

wobei λ die Wellenlänge und $n \cdot \sin(\alpha)$ die numerische Apertur ist. Führt man ein Grid mit tausenden Proteinen in den Strahl ein, so projiziert das Mikroskop diese mit einem geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf den Detektor. Biologische Proben streuen Elektronen ähnlich wie das sie umgebende Medium, daher sind sie ohne eine Kontrastverstärkung nur schwer zu charakterisieren. Um den Kontrast zu erhöhen, kann eine Negativfärbung aus Schwermetallsalzen in hoher Konzentration zur Lösung zugegeben und an der Luft getrocknet werden. Das gleichmäßig verteilte Schwermetall streut die Elektronen stärker als das darin eingebettete Protein, wodurch das Protein sichtbar wird. Die Auflösung ist mit dieser Methode jedoch begrenzt und das Protein verliert seine Hydrathülle. Um das Protein unter nativen Bedingungen zu vermessen, kann der Kontrast im Elektronenmikroskop durch eine Phasenplatte, die zu einer Interferenz zwischen gestreuten und transmittierten Strahlen führt, verstärkt werden (Khoshouei et al. 2017a). Phasenplatten in Elektronenmikroskopen sind jedoch noch nicht

gängig, daher wird in der Regel die Kontrastverstärkung durch Defokussieren der Probe erreicht (Erickson und Klug 1970). Durch Defokussieren tritt am gestreuten Strahl ebenfalls eine Phasenverschiebung auf, die im Unterfokus zu einer Kontrastverstärkung führt. Die Phasenverschiebung zwischen gestreutem und direktem Strahl wird mit der Kontrastübertragungsfunktion (*contrast transfer function*, CTF) beschrieben. Mit Hilfe dieser Funktion lässt sich der optimale Unterfokus einstellen (Scherzer-Fokus, Scherzer 1949). Die nun sichtbaren Partikel werden gemäß ihrer Orientierung auf dem Grid in 2-D-Klassen gruppiert. Fehlerhafte 2-D-Klassen werden von Hand aussortiert. Aus den 2-D-Klassen können die Partikel in 3-D-Klassen eingeordnet werden. Die unterschiedlichen 3-D-Klassen enthalten dabei unterschiedliche Partikel, z. B. kann eine Klasse das Protein mit einem Liganden beinhalten, während sich eine andere Klasse aus dem Protein ohne Ligand zusammensetzt. Aus den Partikeln einer Klasse kann die dreidimensionale Struktur des Proteins rekonstruiert werden. Die rekonstruierte Dichtekarte lässt sich wie die Elektronendichte der Röntgenstrukturanalyse über ihre Amplituden und Phasen beschreiben. Daher erfolgt die Modellierung des Proteins an die Dichte mit denselben Methoden wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben. Zu beachten ist allerdings, dass hier keine Elektronendichte, sondern eine elektrostatische Potenzialdichte (ESP) vorliegt, weshalb in Gleichung 2.31 atomare Formfaktoren f_j für Elektronenstreuung genutzt werden. Die Dichte der elektronenmikroskopischen Rekonstruktion wird im Folgenden als EM-Dichte bezeichnet. Zur Bestimmung der Auflösung der dreidimensionalen Rekonstruktion wird der Datensatz in zwei gleich große Teildatensätze geteilt und diese miteinander verglichen. Als Goldstandard wird die Auflösung angegeben, in der die *fourier shell correlation* (FSC) einen Wert von 0,143 einnimmt.

2.11.1 Vorbereitung der Proben

Die Analysen ohne Crosslinking erfolgten mit $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($0,15 \mu\text{M}$) PSI-Trimer mit und ohne $100 \mu\text{M}$ Cyt c_{HH} bzw. Cyt c_6 . Für Cyt c_{HH} wurde das PSI in 25 mM Tricin-NaOH (pH 8,0) mit 25 mM NaCl und 0,02 % DDM und für Cyt c_6 in 25 mM Tricin (pH 8,0) mit 200 mM MgSO_4 und 0,02 % DDM gelöst. Das Kohlefilm-Grid wurde bei 0,3 mbar für 30 s mittels Glimmentladung geladen. $3,5 \mu\text{l}$ Proteinlösung wurde auf das Grid aufgetragen, für 30 s inkubiert, getrocknet und anschließend zweimal mit 2 % Uranylacetat inkubiert und getrocknet. Für Kryopräparate wurde stattdessen $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ PSI auf Kohlefilm-Grids mit und ohne $2,4 \mu\text{m}$ großen Löchern an einem Vitrobot 45 s an der Luft inkubiert, für 2 s bzw. 4 s geblottet und anschließend in flüssigem Ethan schockgefroren.

Für die hochaufgelöste Struktur wurde Cyt c_6 an PSI mittels Quervernetzung kovalent gebunden. Die Reaktion von PSI_{tri} und Cyt c_6 ($10 \mu\text{M}$ P₇₀₀ und $100 \mu\text{M}$ Cyt c_6) erfolgte mit 5 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 10 mM N-Hydroxysuccinimid in 25 mM Tricin (pH 8,0), 25 mM NaCl, 0,02 % DDM mit 5 mM Natriumascorbat über 2 h im Dunkeln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Ammoniumacetat abgestoppt. Kovalent gebundene Komplexe wurden durch den His-Tag an Cyt c_6 an einer 1 ml-Ni-NTA-Säule isoliert (Bindepuffer: 20 mM Phosphat, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,5; Elutionspuffer: Bindepuffer mit 250 mM Imidazol). Freies Cyt c_6 sowie der Elutionspuffer wurden durch Umpuffern gegen 25 mM Tricin-NaOH (pH 8,0), 100 mM NaCl und 0,02 % DDM in einem Zentrifugalkonzentrator mit 100 000 MWCO entfernt. Da das PSI_{tri} stets an den Kohlefilm-Grids adhärierte und somit zu wenig Protein für die Auswertung in den Löchern vorlag, wurden Grids ohne Löcher für die hochaufgelöste Struktur verwendet.

2.11.2 Datenauswertung

Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder sowie die Generierung der EM-Dichte wurden von Herrn J. Bürger, Dr. C. Radon und Herrn A. Baumert in den Arbeitsgruppen von Dr. T. Mielke (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem) und Prof. P. Wendler (Universität Potsdam) durchgeführt. Die Rekonstruktion der EM-Dichte ist in der gemeinsamen Publikation Kölsch et al. (2020, eingereicht) beschrieben. Die Arbeitsschritte sind in Abbildung 1 im Anhang dargestellt. Es wurden drei EM-Dichten rekonstruiert: die Dichte eines Monomers in einem PSI-Trimer (PSI_{tri}-Monomer) bei einer Auflösung von 2,9 Å, die Dichte des PSI_{tri} mit C3-Symmetrie bei einer Auflösung von 3,0 Å und die Dichte des PSI_{tri} ohne Vorgabe der Symmetrie (C1-Trimer) bei einer Auflösung von 3,2 Å. Als Grundlage für das PSI_{mono}-Modell diente die Kristallstruktur von PSI (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001). Diese wurde in Chimera (Pettersen et al. 2004) in die 2,9 Å-EM-Dichte des Monomers gelegt und die Wassermoleküle wurden entfernt. Anschließend wurde ein *real-space refinement* im Programmpaket Phenix 1.15 mit den Parametern „minimization_global“, „rigid_body“, „local_grid_search“ und „adp“ durchgeführt (Afonine et al. 2013). Das generierte Modell wurde in COOT von Hand optimiert (Emsley et al. 2010). Hierbei wurden insbesondere fehlende Atome (z. B. Phytylreste von Chlorophyllen), Kofaktoren und Aminosäuren ergänzt. Die Schleife PsaK 44–50 war in der EM-Dichte nur unzureichend zu erkennen, weshalb mittels *phenix.map_to_structure_factors* aus der EM-Dichte eine Strukturfaktordatei erstellt wurde. Die Funktion „Map Sharpening/Blurring“ kann aus der Strukturfaktordatei eine geglättete EM-Dichte berechnen. Die Schleife war mit „Blur +90“ (finaler *map sharpening factor* von 20 Å²) als zusammenhängende Dichte zu erkennen. Alle darauffolgenden *refinement*-Schritte wurden an der nicht geglätteten EM-Dichte durchgeführt (*map sharpening factor* von –69 Å²). Es folgten mehrere Runden an *phenix.real_space_refine* und COOT. Hierbei wurden Parameter für die Koordinierung von Kofaktoren vorgegeben. Die Vorgabe von Parametern war notwendig, da *phenix* andernfalls sehr geringe Abstände als Stöße identifiziert hätte. Die Standardparameter konnten dagegen an den Chlorophyllen nicht eingehalten werden. Der Fehler dieser Parameter wurde mit 0,7 Å vorgegeben, sodass die sichtbaren EM-Dichte stärker gewichtet wurden als die Standardparameter. Anschließend wurden Wassermoleküle in leere EM-Dichten mittels der „find waters“-Funktion von COOT mit Abständen von 3,2 Å und $\text{rmsd} \geq 1$ (0,03 V) gesetzt. Diese sowie weitere unmodellierete EM-Dichten wurden von Hand überprüft. Es wurden alle Wassermoleküle entfernt, deren EM-Dichten durch andere Strukturen hätten zustande kommen können (z. B. alternative Konformere von Seitenketten) oder die keine eindeutigen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen konnten. Aus dem fertigen PSI_{mono}-Modell wurde ein Trimer generiert, das mittels *phenix.real_space_refine* an die 3,0 Å-Dichte des C3-Trimers und an die 3,2 Å-Dichte des C1-Trimers angepasst wurde.

2.12 Modellierung der Bindungsstelle

2.12.1 Theorie

Die Bindungsstelle eines Liganden an einem Protein kann computergestützt berechnet werden. Die Berechnungen basieren auf der bekannten Struktur von Protein und Ligand sowie auf deren freier Enthalpie. Die Bindung eines Liganden an das Protein ist eine Zustandsänderung, die zu einer Änderung der freien Enthalpie ΔG des Systems führt (vgl. isotherme Titrationskalorimetrie, Unterkapitel 2.6). Die freie Enthalpie ΔG wird

mit Hilfe von Kraftfeld(*force-field*-Parametern berechnet. Diese Parameter beschreiben die Interaktionen aller Atome des Systems über potenzielle Energien:

$$E_{\text{ele}} = \sum_{\text{jk}} \frac{z_j \cdot z_k}{\varepsilon r_{\text{jk}}}, \quad (2.38)$$

$$E_{\text{LJ}} = \sum_{\text{jk}} \left(\frac{r_{\text{jk}}^{\text{min}}}{r_{\text{jk}}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{\text{jk}}^{\text{min}}}{r_{\text{jk}}} \right)^6, \quad (2.39)$$

$$E_{\text{bond}} = K_b \cdot (b - b_0)^2, \quad (2.40)$$

$$E_{\text{angle}} = K_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2, \quad (2.41)$$

$$E_{\text{dihedral}} = K_\phi \cdot (1 + \cos(n\phi - \delta)), \quad (2.42)$$

wobei E_{ele} die elektrostatische Energie, E_{LJ} das Lennard-Jones-Potenzial, E_{bond} das Potenzial der Bindung, E_{angle} das Potenzial des Bindungswinkels und E_{dihedral} das Potenzial aus der sterischen Hinderung während einer Rotation ist. jk sind die nicht aneinandergelassenen Atompaaare, z die Partiaalladung eines Atoms, r_{jk} der Abstand zwischen zwei Atomen, ε das negativste Potenzial von E_{LJ} , $r_{\text{jk}}^{\text{min}}$ der Abstand, bei dem E_{LJ} minimal ist. b , θ und ϕ sind die Bindungslänge, der Bindungswinkel und der Rotationswinkel. K_b , K_θ und K_ϕ sind Konstanten, die die Stärke der Bindung bzw. des Winkels beschreiben. Die hier dargestellten Gleichungen können je nach gewähltem *force-field* geringfügig abweichen oder um weitere Gleichungen ergänzt werden.

Für kleine Moleküle kann man die Bindung über eine Moleküldynamik(MD)-Simulation analysieren. Die Moleküle werden zusammen mit einem expliziten oder impliziten Lösungsmittel in ein Volumen platzieren und können frei diffundieren. Die Moleküle nehmen durch die Gleichungen 2.40 bis 2.42 unterschiedliche Konformationen ein. Treffen sich die Moleküle, kann durch die Gleichungen 2.38 und 2.39 ein Komplex gebildet werden, der erst nach einem längeren Zeitraum wieder dissoziiert. Da Proteine über zehntausende Atome verfügen und langsam diffundieren, ist eine MD-Simulation nur begrenzt anwendbar. Für die Bindung eines kleinen Liganden an ein Protein werden während der Simulation oft Bereiche des Proteins konstant gehalten, während nur die Atome im aktiven Zentrum mobil bleiben. Untersucht man eine Protein-Protein-Interaktion, dann werden die Proteine als starre Körper in die Berechnungen eingesetzt. Statt einer ungerichteten Diffusion platziert man die Proteine gezielt aneinander und berechnet für diese Bindungsstelle die Bindungsenergie E_{Bindung} :

$$E_{\text{Bindung}} = E_{\text{Komplex}} - E_{\text{Protein}_1} - E_{\text{Protein}_2}. \quad (2.43)$$

Man spricht von einem *rigid-body docking*. Da die Berechnung der Bindungsenergie für jede Position der Proteine rechenaufwendig ist, wurden hier zuerst potenzielle Bindungsstellen durch Formkomplementarität (*shape complementarity*) und Elektrostatikkomplementarität bestimmt und anschließend die Bindungsenergie für die potenziellen Bindungsstellen berechnet. Für die Formkomplementarität f werden die Proteine auf ein Gitter gelegt. Befindet sich auf einem Gitterpunkt (l, m, n) die Proteinoberfläche des größeren Proteins, so erhält der Gitterpunkt einen positiven Wert. Befindet sich das Proteininnere des größeren Proteins auf dem Gitterpunkt, erhält dieser einen negativen Wert. Außerhalb des großen Proteins ist der Wert 0. Für das

kleinere Protein ist der Wert positiv, wenn auf dem Gitterpunkt das Proteininnere liegt, und 0, wenn das Protein nicht auf dem Punkt liegt:

$$f_{\text{gro\ss}}(l, m, n) = \begin{cases} 0 : & \text{au\ss}erhalb des Proteins \\ 1 : & \text{Oberfl\ae}che des Proteins \\ -15 : & \text{innerhalb des Proteins} \end{cases} \quad (2.44)$$

$$f_{\text{klein}}(l, m, n) = \begin{cases} 0 : & \text{au\ss}erhalb des Proteins \\ 1 : & \text{innerhalb des Proteins} \end{cases} \quad (2.45)$$

Das kleinere Protein wird durch das Gitter translatiert und f\u00fcr jede Translationskoordinate (α, β, γ) wird die Position des Proteininneren bestimmt. Durch Korrelation wird die relative Lage der beiden Proteine evaluiert.

$$f_{\text{Komplex}}(\alpha, \beta, \gamma) = \sum_{l=1}^N \sum_{m=1}^N \sum_{n=1}^N f_{\text{gro\ss}}(l, m, n) \cdot f_{\text{klein}}(l+\alpha, m+\beta, n+\gamma) \quad (2.46)$$

Diese Berechnung kann beschleunigt werden, indem die Korrelation der diskreten Fourier-Transformierten von $f_{\text{gro\ss}}$ und f_{klein} berechnet wird. Ist die Berechnung aller Translationen entlang des Gitters beendet, werden die drei besten Ergebnisse notiert, das kleine Protein um sein geometrisches Zentrum rotiert und erneut alle Translationen berechnet. Die Elektrostatikkomplementarit\u00e4t berechnet sich analog zur Formkomplementarit\u00e4t \u00fcber ein Gitter. F\u00fcr jeden Gitterpunkt wird ein Potenzial Φ berechnet, das durch die Ladungen q_k des gro\u00dfen Proteins verursacht wird.

$$\Phi(m, n, l) = \sum_k \frac{z_k}{\varepsilon(\mathbf{r}) \cdot r_k}, \quad (2.47)$$

$\varepsilon(\mathbf{r})$ ist eine abstandsabh\u00e4ngige Dielektrizit\u00e4tsfunktion und r_k der Abstand zwischen dem Gitterpunkt und der geladenen Gruppe. Innerhalb des gro\u00dfen Proteins ist $\Phi = 0$. Die Ladung des kleinen Proteins wird direkt auf die Gitterpunkte \u00fcbertragen. Das Potenzial des gro\u00dfen Proteins wird mit der Ladung des kleinen Proteins korreliert (Gleichung 2.46). Diese Berechnungen erlauben ein geringf\u00fcgiges \u00dcberlappen von Atomen, damit Konformations\u00e4nderungen der starren, ungebundenen Proteinstrukturen nicht ausgeschlossen werden.

Die \u00fcber Komplementarit\u00e4t erhaltenen potenziellen Bindungsstellen k\u00f6nnen nun f\u00fcr detailliertere Berechnungen eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden die Programme pyDock und Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) genutzt. pyDock beinhaltet die Gleichungen 2.38 und 2.39 sowie die Interaktion mit Wassermolek\u00fclen. Das in der Bindungsstelle an Aminos\u00e4ureseitenketten gebundene Wasser wird durch die Proteinbindung verdr\u00e4ngt, was zu einer Energie\u00e4nderung f\u00fchrt.

$$\Delta G_{\text{solv}} = \sum_j \sigma_j \cdot \text{ASA}_j, \quad (2.48)$$

wobei ASA_j die f\u00fcr Wasser zug\u00e4ngliche Oberfl\u00e4che (*accessible surface area*) und σ_j der atomare Solvationsparameter ist.

APBS nutzt dagegen die Poisson-Boltzmann-Gleichung zur Berechnung der elektrostatischen Energie, inklusive der Interaktion mit dem L\u00f6sungsmittel. Die Poisson-Boltzmann-Gleichung leitet sich von der Poisson-Gleichung her:

$$\nabla \nabla \Phi(\mathbf{r}) = -4\pi\rho(\mathbf{r}). \quad (2.49)$$

Dabei ist $\Phi(\mathbf{r})$ das elektrostatische Potenzial und $\rho(\mathbf{r})$ die Ladungsdichte. Die Poisson-Gleichung betrachtet Punktladungen im Vakuum. Die linke Seite der Gleichung lässt sich um eine abstandsabhängige Dielektrizitätsfunktion $\varepsilon(\mathbf{r})$ erweitern, um die abschirmende Wirkung des Proteins und des Mediums auf das elektrische Feld einzubeziehen. Da das Solvens nicht nur aus Wasser, sondern auch aus gelösten Ionen besteht, wird auf der rechten Seite der Gleichung eine Ladungsdichte für gelöste Ionen ergänzt. Die Ionen werden über eine Boltzmann-Statistik verteilt:

$$\nabla[\varepsilon(\mathbf{r})\nabla\Phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho(\mathbf{r}) - 4\pi\kappa^2\frac{k_{\text{B}}T}{e}\nu(\mathbf{r})\sinh\left(\frac{e\Phi(\mathbf{r})}{k_{\text{B}}T}\right). \quad (2.50)$$

Dabei ist κ^{-1} die Debye-Länge, k_{B} die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, e die Elementarladung und $\nu(\mathbf{r})$ eine Funktion, die im Solvens den Wert 1 und im Protein den Wert 0 annimmt. Unter der Annahme, dass $e\Phi(\mathbf{r})/(k_{\text{B}}T)$ sehr klein ist, kann die Gleichung linearisiert werden ($\sinh(x) \approx x$):

$$\nabla[\varepsilon(\mathbf{r})\nabla\Phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho(\mathbf{r}) - \kappa^2\nu(\mathbf{r})\Phi(\mathbf{r}). \quad (2.51)$$

Diese Gleichung wird ebenfalls auf einem Gitter gelöst, wobei die Änderung des elektrostatischen Potenzials durch die Potenziale benachbarter Gitterpunkte berechnet wird. Um die Gitterpunkte an der Grenze des Gitters zu berechnen, wird statt des Proteins ein sphärischer Körper mit einer Ladung, die der Ladung des Proteins entspricht, eingesetzt. Das Potenzial in großem Abstand vom Protein ist damit

$$\Phi(\mathbf{r}) = \frac{z}{4\pi\varepsilon(\mathbf{r})\mathbf{r}}e^{-\mathbf{r}\kappa}. \quad (2.52)$$

Da durch einen großen Abstand auch viele Gitterpunkte berechnet werden, setzt man zwei Gitter ein. Ein feines Gitter mit geringem Abstand der Gitterpunkte wird auf den zu analysierenden Bereich des Proteins gelegt. Ein grobes Gitter mit einem großen Abstand zwischen den Gitterpunkten wird genutzt, um das Potenzial auch weit außerhalb des Proteins zu charakterisieren. Das Potenzial an der Grenze des feinen Gitters wird durch die Gitterpunkte des groben Gitters definiert.

2.12.2 Durchführung: *rigid-body docking*

Für das *rigid-body docking* wurde die auf ein Monomer reduzierte Kristallstruktur des PSI aus *T. elongatus* (PDB-Code: 1jb0) mit der Kristallstruktur des Cyt c_{HH} (PDB-Code: 1hrc) bzw. mit der NMR-Struktur des Cyt c_6 aus *T. elongatus* (PDB-Code: 1c6s, state = 1) eingesetzt. Um die Häm-Gruppe der Cytochrome in die Berechnungen einfließen zu lassen, wurden Cyt c_{HH} und Cyt c_6 mittels tleap (Case et al. 2016) mit Standardparametern des AMBER-ff99SB-*force-fields* in Koordinaten(.crd)- und Parameter-Topologie(.top)-Dateien umgewandelt. Die potenziellen Bindungsstellen wurden mit FTDock 2.0 (Gabb et al. 1997) mit Standardparametern erstellt, wobei Koordinaten- und Topologiedateien mit dem Befehl „amber“ in der Eingabedatei vorgegeben wurden. Die erstellten 10 000 potenziellen Bindungsstellen aus FTDock enthielten auch Cytochrome, die im Transmembranbereich gebunden waren. Um diese zu entfernen, wurde mit dem CHARMM-Membrane-Builder (Jo et al. 2008) eine Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerid(POPG)-Membran an PSI erstellt und alle potenziellen Cytochrome, deren Abstand vom geometrischen Zentrum zur Membran geringer als der Gyrationradius war, entfernt. Die übrigen Bindungsstellen wurden zur Berechnung der Bindungsenergie in pyDock3 eingesetzt (Cheng et al. 2007). Die Ergebnisse, die vom Programm in Form einer Liste mit Energien und Rotationsmatrizes ausgegeben werden, wurden mit PyMOL (Schrödinger, LLC 2015) visualisiert.

2.12.3 Durchführung: Poisson-Boltzmann-Gleichung

Um die modellierten Komplexe mit gemessenen Werten vergleichen zu können, wurde an die NMR-Struktur von Cyt c_6 (PDB-Code: 1c6s) ein 6x-His-Tag mit zufälliger Orientierung angefügt. Die beiden anderen Proteinstrukturen (PDB-Code: 1jb0 bzw. 1hrc) wurden nicht weiter verändert. Die PDB-Formate wurden mit PDB2PQR 2.1 in das PQR-Format überführt (Dolinsky et al. 2004). Durch PROPKA3 floss der pH-Wert in die Partiaalladungen des Proteins ein (Olsson et al. 2011). Da PDB2PQR über keine Parameter für die Häm-Gruppe verfügt, wurden Radien und Partiaalladungen einer reduzierten Häm b -Gruppe nachträglich eingefügt. Mit APBS 1.4 (Baker et al. 2001) wurde die Poisson-Boltzmann-Gleichung auf die Proteine angewandt. Die Dielektrizitätskonstante des Proteins wurde auf 10 und die des Wassers auf 80,1 gesetzt. Die Temperatur betrug 293,15 K. Für die Ionenstärke wurden 0, 10 und 100 mM MgSO_4 mit Ladungen +2 und -2 sowie Ionenradien von 0,86 Å und 2,56 Å vorgegeben.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Isolation und Charakterisierung der Proteine

3.1.1 Photosystem I

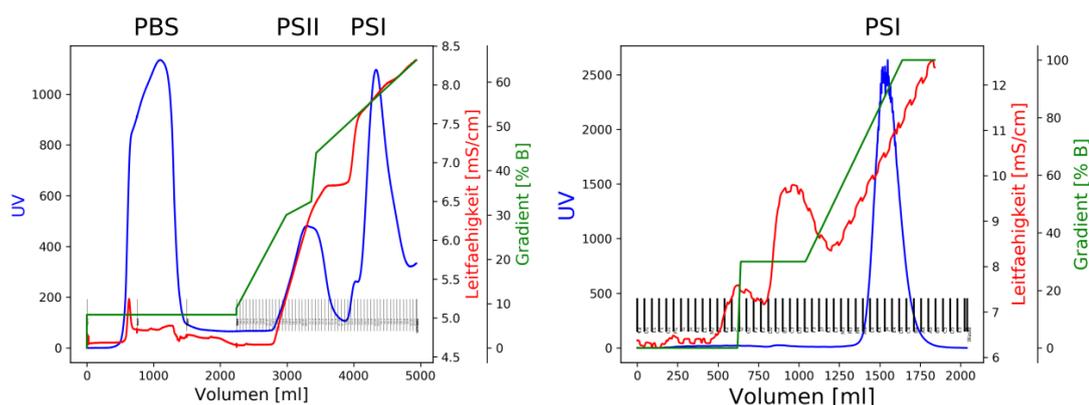


Abbildung 3.1: Chromatogramme der PSI Isolation an einer 600 ml-DEAE-Säule (links) und an einer 200 ml-Q-Sepharose-Säule (rechts). An dem schwachen Ionenaustauscher DEAE werden Phycobilisomen, PSII und PSI voneinander getrennt. Am starken Ionenaustauscher Q-Sepharose bleibt ein orangefarbiges Protein gebunden, weshalb nur PSI eluiert. Die UV-Absorption wurde bei 280 nm aufgenommen und ist in mAU angegeben.

Für die strukturellen Analysen sind eine hohe Reinheit und eine hohe Qualität der Proben erforderlich, daher wurden Verunreinigungen abgetrennt und die Proteine auf ihren Oligomerisationszustand und ihre Zusammensetzung analysiert. Photosystem I konnte in monomerer (PSI_{mono}) und trimerer (PSI_{tri}) Form aus *T. elongatus* isoliert werden. Das PSI wurde von PSII an einer DEAE-Säule getrennt und auf einer Q-Sepharose-Säule weiter aufgereinigt (Abbildung 3.1). An der Q-Sepharose fiel bei hohen Ionenstärken ein carotinoidhaltiges Protein aus. Je höher die Ionenstärke während des Waschens der Säule war, desto geringer war die Verunreinigung des PSI. Der Oligomerisationszustand des PSI wurde mittels BN-PAGE (Abbildung 3.2) und DLS kontrolliert. Der auf eine Proteinkonzentration von 0 extrapolierte hydrodynamische Radius $R_{\text{H}0}$ des PSI_{mono} beträgt 6,9 nm und der des PSI_{tri} 9,8 nm (Abbildung 3.3).

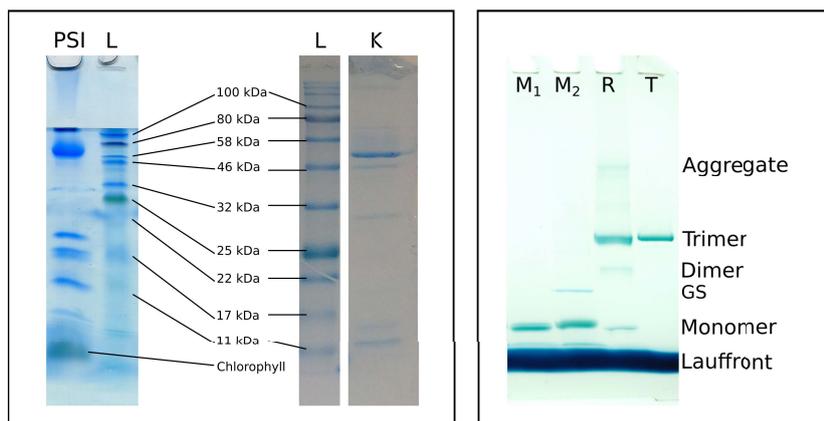


Abbildung 3.2: Polyacrylamidgelelektrophorese der PSI Isolation. Links: SDS-PAGE von PSI, dem carotinoidhaltigen Protein (K) und dem Größenmarker (L, Color Prestained Protein Standard von New England BioLabs). PsaA und PsaB haben identische Massen und laufen als eine gemeinsame Bande mit ca. 60 kDa. Eine Zuordnung der Untereinheiten über ihre Masse ist aufgrund des komplexen Laufverhaltens von Transmembranproteinen nicht möglich. Rechts: BN-PAGE von monomerem (M₁ und M₂) und trimerem (T) PSI. Die Referenz (R) ist ein durch Einfrieren und Auftauen partiell dissoziiertes PSI_{tri}. Die Banden sind aufgrund des Chlorophylls grün gefärbt. Nach Zugabe einer Entfärbelösung überwiegt die blaue Farbe des Coomassies, wodurch Verunreinigungen wie die Glutamin-Synthetase (GS, Kretzschmar 2019) in M₂ deutlicher sichtbar werden.

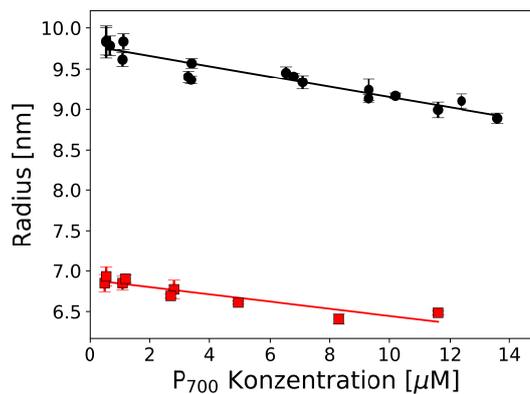


Abbildung 3.3: Hydrodynamischer Radius von PSI_{mono} (rot) und PSI_{tri} (schwarz). Die negative Steigung weist auf eine repulsive Interaktion der Proteine hin. Bei Konzentrationen oberhalb 15 μM (nicht dargestellt) bleibt der Radius konstant. Die Dynamische Lichtstreuung wurde mit drei unabhängigen Präparationen bei 20 °C in 25 mM Tricin (pH 8) mit 100 mM NaCl und 0,02 % DDM gemessen.

Geringe Verunreinigungen des PSI_{tri} konnten durch mehrfaches Umkristallisieren entfernt werden. Mittels SDS-PAGE konnte die Probe auf Verunreinigung durch das carotinoidhaltige Protein (51 kDa) untersucht werden (Abbildung 3.2). Die kleinen PSI-Untereinheiten wurden mittels Massenspektrometrie analysiert (Tabelle 3.1). Sowohl in PSI_{mono} als auch in PSI_{tri} konnten alle 12 Untereinheiten nachgewiesen werden. Die Aktivität des PSI_{mono} und des PSI_{tri} wurde mit Hilfe der Sauerstoffreduktionsrate bestimmt. Unter Standardbedingungen (25 mM Tricin, pH 8, 0,02 % DDM) zeigten beide Proteine identische Raten von jeweils 1400 μmol O₂ · h⁻¹ · mgChl⁻¹ bis 1600 μmol O₂ · h⁻¹ · mgChl⁻¹. Im Absorptionsspektrum beider Oligomerisationsformen ist die für PSI typische Absorptionsbande bei 680 nm zu erkennen (Abbildung 3.4).

Tabelle 3.1: Massenspektrometrische Analyse der PSI-Untereinheiten. PSI wurde denaturiert, mittels MALDI-TOF charakterisiert und mit den theoretischen Massen der Sequenz verglichen. Die posttranslationalen Modifikationen sind El-Mohsnawy et al. (2010) zu entnehmen. Die Standardabweichungen sind für 12 unabhängige Proteinpräparationen angegeben.

Untereinheit	theoretische Masse	gemessene Masse
PsaA	83183	–
PsaB	82913	–
PsaC	8800	8670 ± 3
PsaD	15370	15234 ± 10
PsaE	8389	8260 ± 3
PsaF	15113	15115 ± 7
PsaI	4166	4149 ± 2
PsaJ	4767	4796 ± 2
PsaK	8480	8391 ± 3
PsaL	16251	16122 ± 8
PsaM	3424	3423 ± 2
PsaX	4101	3969 ± 2

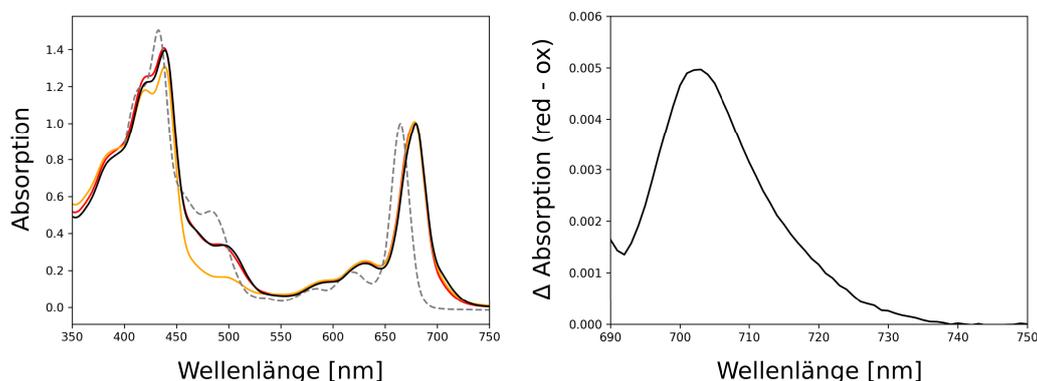


Abbildung 3.4: Absorptionsspektren der Photosysteme. Links: Absorptionsspektrum von PSI_{tri} (schwarz), PSI_{mono} (rot), PSII (grau, gestrichelt) und PSI_{tri}, das mit Natriumazid inkubiert wurde (orange). Rechts: Differentielle Extinktion des P₇₀₀ im reduzierten und oxidierten Zustand. PSI-Absorptionsspektren wurden in 25 mM Tricin (pH 8) mit 100 mM NaCl und 0,02% DDM gemessen. Für die differentielle Extinktion wurde jeweils ein Spektrum mit 20 mM Natriumascorbat und eines mit 5 mM Kaliumhexacyanoferrat gemessen und voneinander subtrahiert.

Im Gegensatz zu PSII weist PSI aufgrund seiner exzitonisch gekoppelten Chlorophylldimere und Chlorophylltrimere eine erhöhte Absorption bei 700 nm bis 720 nm auf. PSI_{mono} zeigt im Vergleich zu PSI_{tri} eine geringere Absorption bei 710 nm, was auf eine Änderung der Umgebung dieser Chlorophylle schließen lässt. Das aktive Zentrum, P₇₀₀, zeigt das für cyanobakterielles PSI typische Differenzspektrum mit einer Bande bei 704 nm (Abbildung 3.4).

PSI_{tri} wurde in dieser Arbeit kristallisiert und als Kristalle bei 4°C gelagert. Das kristallisierte Protein wurde nach einem Jahr gewaschen, neu umkristallisiert und erneut auf seine Eigenschaften überprüft. Es konnten keine Änderungen festgestellt

werden, was die Stabilität des Proteins in dieser Art der Lagerung verdeutlicht. Eine Lagerung in Anwesenheit von Natriumazid ist dagegen nicht geeignet, wie am Verlust der Carotinoidabsorption zu erkennen ist (Abbildung 3.4, 500 nm). Das PSI_{mono} , für das kein Kristallisationsprotokoll vorliegt, wurde daher in Anwesenheit von 10 % Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.2 Cytochrome

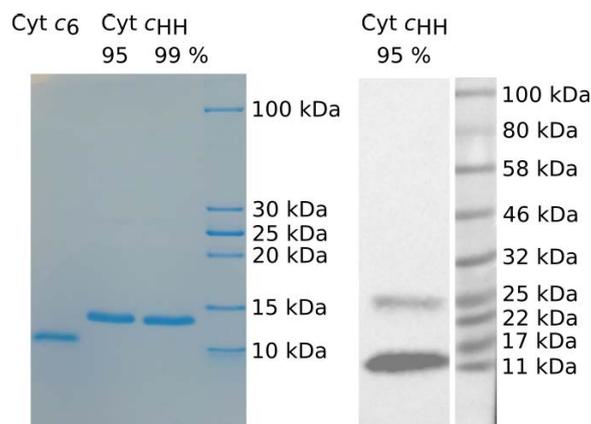


Abbildung 3.5: SDS-PAGE von Cyt c_{HH} und Cyt c_6 (links) und Western Blot von Cyt c_{HH} mit einem monoklonalen α -Cyt c -Antikörper (rechts). Cyt c_6 und Cyt c_{HH} haben eine sehr hohe Reinheit, lediglich bei stark beladenen Gelen ist eine zweite Bande bei 25 kDa in den Cyt c_{HH} -Proben zu erkennen. Diese zweite Bande lässt sich im Western Blot nachweisen.

Cyt c_{HH} wurde käuflich erworben und lag bereits in 95 % und 99 % Reinheit vor (Abbildung 3.5). Beide Reinheitsstufen ließen sich kristallisieren (0,2 M Na/K-Phosphatpuffer, pH 6,2–6,5 in gesättigtem Ammoniumsulfat, 1 Monat im *sitting drop*). Das Cyt c_{HH} zeigte in der Massenspektrometrie eine Masse von $12\,365 \pm 2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und ließ sich mit einem α -Cyt c_{HH} -Antikörper nachweisen (Abbildung 3.5). Sowohl im Western Blot als auch in der MALDI-TOF-Analyse war eine Bande mit doppelter Masse ($24\,722 \pm 10 \text{ m} \cdot \text{z}^{-1}$) zu erkennen. Das Protein doppelter Masse konnte durch Größenausschlusschromatografie isoliert werden und zerfiel nicht in Monomere. Dies lässt darauf schließen, dass es sich um ein stabiles, dimeres Cytochrom handelt, das womöglich während der harschen Isolationsmethode des Herstellers als Artefakt entsteht. In der 99 %igen Probe ist nur sehr wenig Dimer enthalten, weshalb diese für Kristallisationsexperimente genutzt wurde. Das Cyt c_6 wurde heterolog aus *E. coli* gewonnen. Es wurde chromatografisch über eine Ni-NTA-Säule mit anschließender DEAE-Säule aufgereinigt (Abbildung 3.6). Auf der DEAE-Säule waren mehrere Banden zu erkennen, die alle das typische Cyt c_6 -Absorptionsspektrum zeigten (Abbildung 3.7). Die vorderen Banden sind oxidiertes Cyt c_6 und die hinteren reduziertes Cyt c_6 . Die oxidierten Banden wurden mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Eine Bande wies die erwartete Masse von $10\,862 \pm 2 \text{ m} \cdot \text{z}^{-1}$ auf (Cyt c_6 mit His-Tag und kovalent gebundener Häm-Gruppe), während die andere Bande um $201 \text{ m} \cdot \text{z}^{-1}$ größer war. Beim Inserieren des Cyt c_6 -Gens in den Vektor kam es zu einer Duplikation der letzten beiden Aminosäuren (Methionin und Alanin) der Leadersequenz. Diese beiden Aminosäuren entsprechen genau der Massendifferenz der beiden Cyt c_6 -Proteine. Da diese beiden Aminosäuren der Schnittstelle entsprechen, konnte die Leadersequenz sowohl davor als auch danach geschnitten werden, weshalb zwei unter-

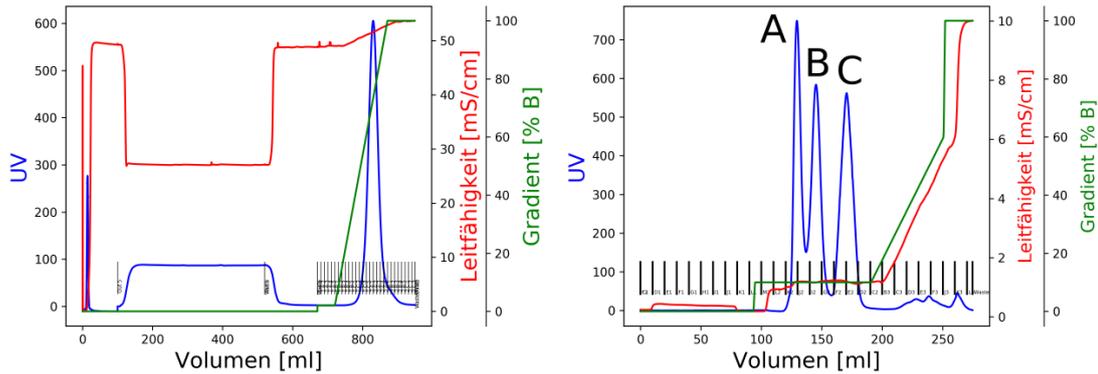


Abbildung 3.6: Chromatografische Aufreinigung des Cyt c_6 . Links: Der Periplasmaextrakt wurde 1:1 mit 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Phosphatpuffer pH 7,5 verdünnt und auf eine 25 ml-Ni-NTA-Agarose-Säule aufgetragen. Das Cyt c_6 bindet über seinen 6x-His-Tag und wird mit steigender Imidazolkonzentration eluiert. Rechts: Das Eluat der Ni-NTA-Aufreinigung wurde dialysiert, auf eine 10 ml-DEAE-Säule aufgetragen und mit einem isokratischen Fluss von 10 mM NaCl in 25 mM Tricin-NaOH (pH 7,2) eluiert. Es trennten sich drei Banden, wobei Bande A und B oxidiertes Cyt c_6 sind und C reduziertes. Bande A zeigt in der Massenspektrometrie die erwartete Masse, während Bande B um $201 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ größer ist. Die UV-Absorption wurde bei 280 nm aufgenommen und ist in mAU angegeben.

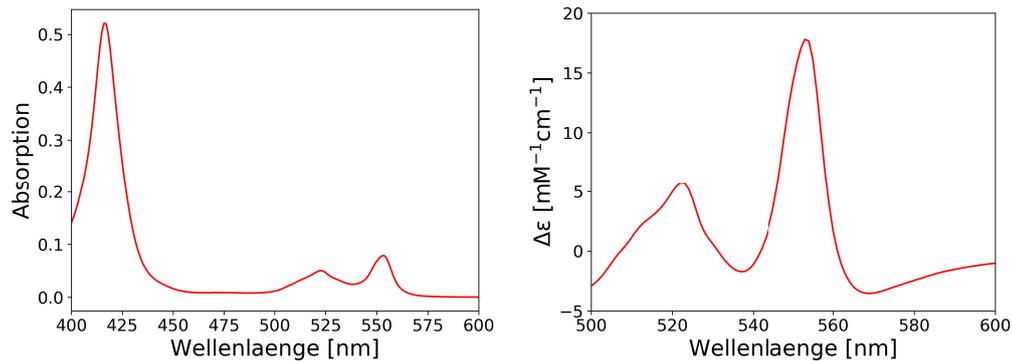


Abbildung 3.7: Reduziertes Absorptionsspektrum (links) und differentielles Redox-Spektrum (rechts) von Cyt c_6 . Das Absorptionsspektrum wurde in 10 mM Natriumascorbat und 25 mM Tricin (pH 8) aufgenommen. Für die Bestimmung des differentiellen Extinktionskoeffizienten wurde Cyt c_6 mit Ferricyanid oxidiert und dessen Absorptionsspektrum vom reduzierten Spektrum subtrahiert. Der differentielle Extinktionskoeffizient wurde auf Basis der reduzierten Absorption von $\epsilon_{553} = 25 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ berechnet.

schiedlich lange Peptide entstanden. Beide Cyt c_6 -Proteine zeigten mit PSI identische Reduktionraten, für die folgenden Experimente wurde jedoch das kürzere, native Cyt c_6 genutzt.

3.2 PSI-Cyt c -Interaktion

Während der Strukturanalyse des PSI stellte sich heraus, welche Methode zur Charakterisierung bestimmter Bereiche eines Proteins geeignet ist. Um die Bindungsstelle des Cytochroms an PSI zu messen, war es nun erforderlich, die Interaktion beider Proteine zu charakterisieren. Für eine erfolgreiche Kostrukturanalyse mussten Bedingungen gefunden werden, unter denen eine hohe Affinität zwischen PSI und den beiden

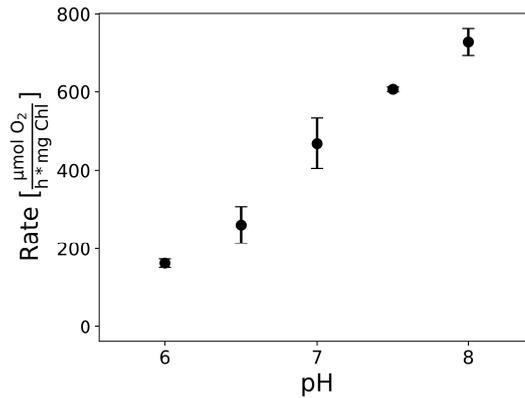


Abbildung 3.8: pH-Abhängigkeit der PSI_{tri} -Sauerstoffreduktion. PSI_{tri} mit $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Chlorophyll wurde mit $0,1 \text{ mM}$ DCPIP und 2 mM Natriumascorbat in 5 mM Phosphatpuffer im Standardreaktionsansatz ohne Cytochrom c gemessen. Standardabweichungen sind für drei unabhängige Messungen angegeben.

Cytochromen vorliegt. Daher wird im Folgenden die Komplexbildung durch kinetische und kalorimetrische Messungen beschrieben.

3.2.1 PSI-Reduktionsraten

Die Aktivität des PSI kann über seine Sauerstoffreduktionsrate beschrieben werden. Da für die Messung P_{700} reduziert werden muss, lässt sich auch die Interaktion mit dem Elektronendonator charakterisieren. Ein häufig eingesetzter, unspezifischer Elektronendonator ist DCPIP, mit dem die pH-Abhängigkeit der PSI_{tri} -Sauerstoffreduktion gezeigt werden konnte (Abbildung 3.8). Mit steigendem pH-Wert nahm die Reduktionsrate zu. Der physiologische pH-Bereich von 6 (luminal) bis 8 (stromal/cytoplasmatisch) wurde für die Charakterisierung der PSI_{tri} -Cytochrom-Bindung genutzt. Das Michaelis-Menten-Modell war geeignet, um die Daten zu analysieren, wobei $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ und $\text{Cyt } c_6$ das Substrat darstellen und alle Elektronentransferreaktionen in der Wechselzahl k_{cat} enthalten sind (Tabelle 3.2). Wie für DCPIP war auch mit $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ eine pH-Abhängigkeit zu erkennen. Die Michaelis-Menten-Konstante K_{M} nahm im pH-Bereich von 6 bis 8 von $12 \mu\text{M}$ auf $31 \mu\text{M}$ und k_{cat} von 7 s^{-1} auf 35 s^{-1} zu. Die Zunahme der Wechselzahl ist vergleichbar mit der Zunahme der Reduktionsrate mit DCPIP. Für pH 7,5 und 8,0 wurden zuzüglich die Reduktionskinetiken des P_{700} bestimmt (Abbildung 3.9). Die k_{on} zwischen P_{700}^+ und $\text{Cyt } c_{\text{HH}}^-$ nahm ebenfalls von $23 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ auf $31 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ zu. Niedrigere pH-Werte führten zu einer Aggregation des PSI_{tri} , weshalb keine stabile Absorption gemessen werden konnte. Die Art des verwendeten Puffers beeinflusst die Affinität; in Tricinpuffer war K_{M} bis zu sechsmal geringer als in Phosphatpuffer, während die Wechselzahl konstant blieb (Tabelle 3.2). Um die Ursache zu identifizieren, wurden fünf verschiedene Puffer bei einer $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ Konzentration von $16 \mu\text{M}$ getestet (Abbildung 3.10). Die Reduktionsrate nahm in allen getesteten Puffern linear mit der Konzentration ab. Die Rate war am höchsten in Tricin und Tris, gefolgt von HEPES und MOPS. Am geringsten war die Rate in Phosphatpuffer. Diese Reihenfolge korreliert mit der Ionenstärke der Puffer, weshalb der Einfluss der Ionenstärke im Folgenden näher beleuchtet werden soll. Die Reduktionsrate wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Salze NaCl , KCl , NH_4Cl , Na_2SO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 und MgSO_4 untersucht. Die Reduktionsrate von PSI_{tri} mit $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ nahm mit steigender Konzentration ab, wobei keines der eingesetzten Ionen einen spezifischen Effekt zeigte (Abbil-

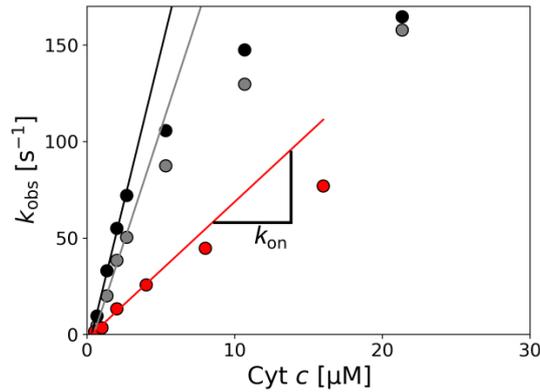


Abbildung 3.9: P_{700}^+ -Reduktionskinetik des PSI_{tri} durch $Cyt\ c_{HH}$ (schwarz und grau) und $Cyt\ c_6$ (rot). Die Reaktion mit $Cyt\ c_{HH}$ erfolgte in 5 mM Phosphatpuffer bei pH 7,5 (grau) und pH 8,0 (schwarz). Die Reaktion mit $Cyt\ c_6$ erfolgte in 25 mM Tricin (pH 8,0) mit 10 mM $MgSO_4$. Aus der zeitabhängigen Reduktion von P_{700}^+ wurde die beobachtete kinetische Konstante k_{obs} mit einer Exponentialfunktion bestimmt. Aus dem linearen Bereich der Steigung von k_{obs} gegen die Cytochrom-Konzentration ergibt sich die kinetische Konstante der Assoziation k_{on} .

dung 3.11). Zwar führten divalente Ionen bei gleicher Konzentration zu einer stärkeren Verringerung der Reduktionsrate als monovalente Ionen, dies ist jedoch auf die größere Ionenstärke divalenter Ionen zurückzuführen. Die Wechselzahl k_{cat} war bei der PSI_{tri} - $Cyt\ c_{HH}$ -Interaktion unabhängig von der Ionenstärke, weshalb die Änderung in der Reduktionsrate auf eine Änderung von K_M zurückzuführen ist (Tabelle 3.2). Eine Verringerung der Affinität durch erhöhte Ionenstärke lässt auf eine elektrostatische Wechselwirkung der PSI_{tri} - $Cyt\ c_{HH}$ -Interaktion schließen.

Der Einfluss der gelösten Ionen auf die PSI_{tri} - $Cyt\ c_6$ -Interaktion unterschied sich von dem der PSI_{tri} - $Cyt\ c_{HH}$ -Interaktion (Abbildung 3.11). Die Sauerstoffreduktionsrate von PSI_{tri} mit $Cyt\ c_6$ war bei niedrigen Ionenstärken größer in pH 6 als in pH 8. Mit zunehmender Ionenstärke nahm die Reduktionsrate bei pH 6 ab, während sie bei pH 8 zunahm. Auch zeigte sich hier ein spezifischer Einfluss der Art der verwendeten Ionen. Divalente Kationen hatten bei pH 8 im Bereich von 10 mM bis 1000 mM Ionenstärke einen größeren Effekt auf die Reduktionsrate als divalente Anionen oder monovalente Ionen. Mit $CaCl_2$ -Konzentrationen über 100 mM Ionenstärke verringerte sich die Reduktionsrate. Die Zunahme der Reduktionsrate basierte nicht nur auf einer Erhöhung der Affinität, sondern auch auf einer Erhöhung von k_{cat} (Tabelle 3.2). Die Affinität des PSI_{tri} für $Cyt\ c_6$ war unter niedrigen und mittleren Ionenstärken geringer als für $Cyt\ c_{HH}$. Auch die P_{700}^+ -Reduktionskinetik von PSI_{tri}^+ und $Cyt\ c_6^-$ war mit einer k_{on} von $0,5 \cdot 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$ bei pH 8 und 10 mM $MgSO_4$ geringer (Abbildung 3.9). Eine Erhöhung der Reduktionsrate mit zunehmender Ionenstärke konnte auch dann beobachtet werden, wenn PSI_{tri} mit $Cyt\ c_6$ aus dem mesophilen Cyanobakterium *Synechocystis* sp. reduziert wurde (Abbildung 3.12). Im Gegensatz zum nativen $Cyt\ c_6$ war die Reduktionsrate bei niedriger Ionenstärke in pH 6 geringer als in pH 8.

Tabelle 3.2: Sauerstoffreduktion von PSI_{tri} mit Cyt c_{HH} und Cyt c_6 . Die Messungen erfolgten in 5 mM Phosphatpuffer oder 25 mM Tricin-NaOH. Kinetische Konstanten wurden durch das Michaelis-Menten-Modell ermittelt. Die spezifische Konstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ist in $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ angegeben. Die Standardabweichungen stammen aus jeweils drei unabhängigen Messungen. Die Tabelle ist modifiziert nach Kölsch et al. (2018).

	Puffer	pH	K_{M} [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	$\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{M}}}$
Cyt c_{HH}	Phosphatpuffer	6,0	$11,5 \pm 2,8$	$7,1 \pm 1,3$	0,6
	Phosphatpuffer	6,5	$14,2 \pm 2,7$	$8,5 \pm 0,7$	0,6
	Phosphatpuffer	7,0	$22,8 \pm 2,8$	$20,3 \pm 1,0$	0,9
	Phosphatpuffer	7,5	$23,5 \pm 2,3$	$28,9 \pm 1,1$	1,2
	Tricin	7,5	$4,9 \pm 0,5$	$27,7 \pm 1,5$	5,7
	Phosphatpuffer	8,0	$30,5 \pm 3,0$	$34,9 \pm 3,1$	1,1
	Tricin	8,0	$5,0 \pm 0,7$	$34,3 \pm 1,9$	6,9
	Tricin + 25 mM NaCl	8,0	$10,8 \pm 1,7$	$34,8 \pm 1,4$	3,2
Cyt c_6	Tricin + 10 mM MgSO_4	8,0	$44,7 \pm 3,6$	$31,2 \pm 0,9$	0,7
	Tricin	8,0	290 ± 45	55 ± 9	0,2
	Tricin + 10 mM MgSO_4	8,0	65 ± 9	143 ± 11	2,2
	Tricin + 200 mM MgSO_4	8,0	$33,3 \pm 1,3$	159 ± 2	4,7

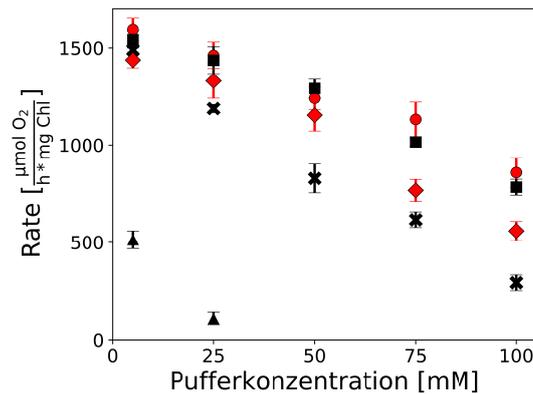


Abbildung 3.10: Einfluss der Pufferkonzentration auf die Sauerstoffreduktionsrate. PSI_{tri} ($5 \mu\text{g Chlorophyll} \cdot \text{ml}^{-1}$) und $16 \mu\text{M}$ Cyt c_{HH} wurden in Tricin- (rote Kreise), HEPES- (rote Rauten), Tris- (schwarze Rechtecke), MOPS- (schwarze Kreuze) und Phosphatpuffer (schwarze Dreiecke) bei pH 8,0 im Standardreaktionsansatz gemessen. Die Standardabweichungen stammen aus jeweils drei unabhängigen Messungen. Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen.

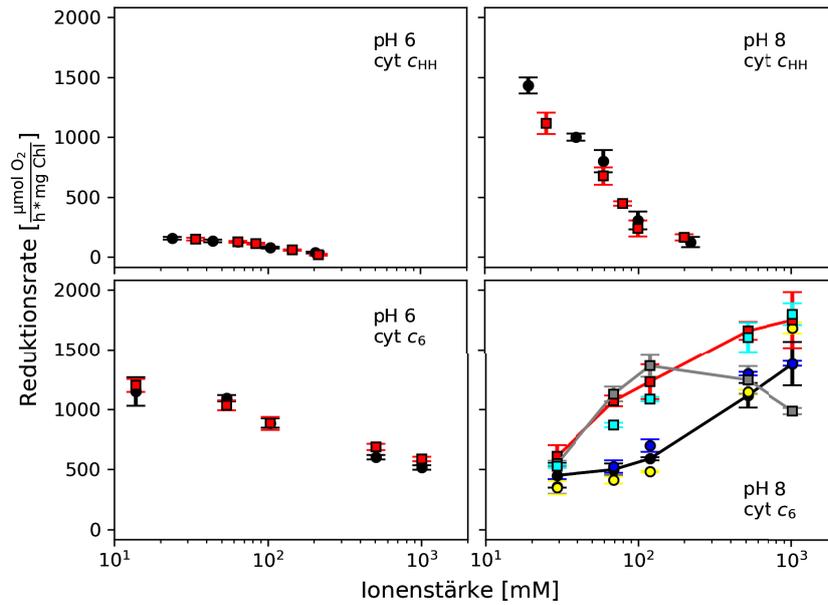


Abbildung 3.11: Sauerstoffreduktionsraten von PSI_{tri} mit $16 \mu\text{M}$ Cyt c_{HH} (oben) und Cyt c_6 (unten) bei pH 6 (links) und pH 8 (rechts) in Abhängigkeit der Ionenstärke. Monovalente Ionen sowie divalente Anionen sind als Kreise und divalente Kationen als Rechtecke dargestellt. Die eingesetzten Salze waren NaCl (schwarz) und MgCl_2 (rot). Für Cyt c_6 bei pH 8 wurde des Weiteren zwischen NH_4Cl (blau), Na_2SO_4 (gelb), CaCl_2 (grau) und MgSO_4 (Türkis) unterschieden. Zur besseren Übersicht wurden NaCl, MgCl_2 und CaCl_2 mit Linien hervorgehoben. Alle Messungen erfolgten in 25 mM Tricin-NaOH (pH 8) oder 5 mM MES-NaOH (pH 6) im Standardreaktionsansatz. Der Beitrag der Puffer zur Ionenstärke wurde mittels Henderson-Hasselbalch-Gleichung mit $\text{p}K_{\text{A}}$ 8,2 (Tricin) und 6,2 (MES) berechnet. Die Standardabweichungen stammen aus 3 bis 9 unabhängigen Messungen. Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen (modifiziert).

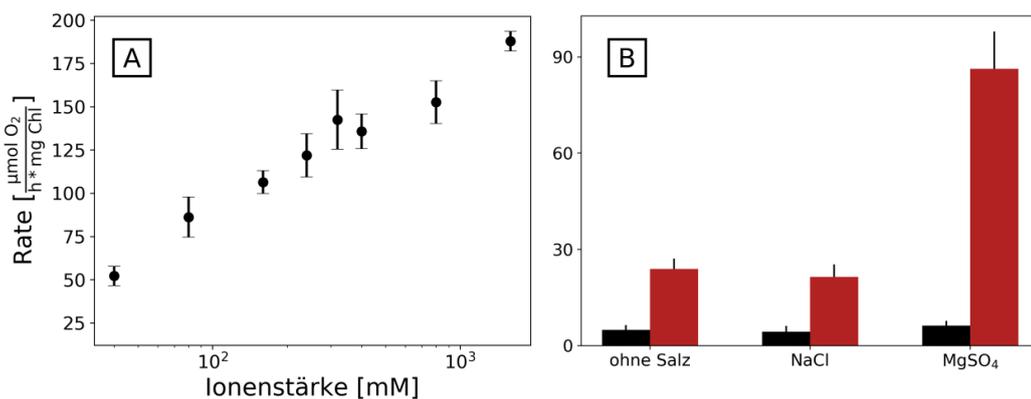


Abbildung 3.12: Sauerstoffreduktionsraten von PSI_{tri} aus *T. elongatus* mit $2 \mu\text{M}$ Cyt c_6 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. A: Abhängigkeit der Reduktionsrate von der Ionenstärke, gemessen mit MgSO_4 bei pH 8. B: Reduktionsraten ohne Salz oder mit 10 mM NaCl und 10 mM MgSO_4 in pH 6 (schwarz) und pH 8 (rot). Alle Messungen erfolgten in 25 mM Tricin-NaOH (pH 8) und MES-NaOH (pH 6) im Standardreaktionsansatz. Die Standardabweichung wurden aus drei unabhängigen Messungen berechnet.

3.2.2 Einfluss des Oxidationszustands

Während das Michaelis-Menten-Modell die PSI-Cytochrom-Bindung indirekt über die Redoxreaktion beschreibt, lassen sich Bindungsparameter auch direkt mittels isothermer Titrationskalorimetrie ermitteln. Die Proteine können somit in einem spezifischen Oxidationszustand analysiert werden. Diese Methode nutzt die Wärmeänderung des Systems, die während der Bindung der Proteine auftritt. Die Wärmeänderung ist sehr klein (im μJ -Bereich), weshalb hohe Proteinkonzentrationen erforderlich sind. Hohe Konzentrationen können zu Proteinaggregaten führen, die durch Dissoziation während der Titration ebenfalls eine Wärmeänderung induzieren. Um Aggregate des PSI_{tri} auszuschließen, wurde die Löslichkeit unter niedrigen Ionenstärken überprüft (Tabelle 3.3). 25 mM NaCl und 30 μM P_{700} ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) waren für eine Messung geeignet. Die Messung erfolgte unter reduzierten Bedingungen in Anwesenheit von Natriumascorbat oder unter oxidierten Bedingungen ohne Zugabe eines Oxidationsmittels.

Die Bindung von $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ an PSI_{tri} wies eine positive Enthalpie (ΔH) auf und war somit entropiegetrieben (Abbildung 3.13). Die Bindung war unabhängig vom Oxidationszustand der Proteine; oxidiertes und reduziertes $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ banden mit identischen Parametern (Tabelle 3.4). Aufgrund des geringen C-Wertes (Gleichung 2.11) konnte die Anzahl der Bindungsstellen nicht direkt aus den Daten ermittelt werden. Die Daten beider Oxidationszustände ließen sich jedoch nicht mit einer einzigen oder zwei $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ -Bindungsstellen pro P_{700} beschreiben (Abbildung 3.13, Residuen). Es musste ein Modell mit zwei unterschiedlichen Typen von Bindungsstellen angewandt werden. Für ein Modell mit zwei Typen von Bindungsstellen mit sechs freien Parametern musste aufgrund des geringen C-Wertes Variablen vorgegeben werden. Da gemäß der Reduktionsraten eine Bindungsstelle mit einer K_{M} von 11 μM vorlag, wurde $n_1 = 1$ und $K_{\text{D}_1} = 11 \mu\text{M}$ konstant gesetzt (Tabelle 3.4). Aus diesem Modell ergab sich für den zweiten Typ von Bindungsstellen $n_2 > 1$ mit sehr geringen Bindungsenthalpien. Dies weist darauf hin, dass der zweite Typ von Bindungsstellen eine undefinierbare Anzahl unspezifischer Bindungsstellen darstellt.

Die Bindung des nativen $\text{Cyt } c_6$ an PSI_{tri} unterschied sich von der des $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ (Abbildung 3.14). Die Bindungsenthalpie (ΔH) war negativ und somit exotherm. Des Weiteren lag hier eine Abhängigkeit vom Oxidationszustand der Proteine vor. Während im reduzierten Zustand eine Bindungskurve zu erkennen war, hob sich der oxidierte Zustand nicht von der Verdünnungswärme ab. Affinität und Bindungsenthalpie sind Tabelle 3.4 zu entnehmen. Aufgrund des geringen Verhältnisses zwischen Bindungsenthalpie und Verdünnungswärme sind diese Werte jedoch stark fehlerbehaftet. Da die Affinität von PSI_{tri} zu $\text{Cyt } c_6$ mit zweiwertigen Kationen zunahm, wurde die Messung in 200 mM MgSO_4 wiederholt. Unter diesen Bedingungen gelang es jedoch nicht, ein stabiles Messsignal zu erhalten (Abbildung 3.14).

Tabelle 3.3: Löslichkeit von PSI_{tri} in hoher Proteinkonzentration und niedriger Ionenstärke. PSI_{tri} wurde in 25 mM Tricin-NaOH (pH 8,0) mit 100 mM NaCl und 0,02 % DDM solubilisiert, anschließend auf 30 μM P_{700} und seine finale NaCl-Konzentration verdünnt und mittels DLS vermessen. Eine hohe Polydispersität (Pd) entsteht durch Aggregation, während eine monodisperse Lösung eine niedrige Pd ($\leq 10\%$) aufweist. Die Standardabweichungen stammen aus drei unabhängigen Messungen. Die Tabelle ist aus Kölsch et al. (2018) entnommen.

NaCl [mM]	R_{H} [nm]	Pd [%]
10	–	–
15	9,2	18 ± 3
20	9,1	10 ± 1
25	8,8	5 ± 1
30	8,8	5 ± 1
35	8,8	5 ± 1

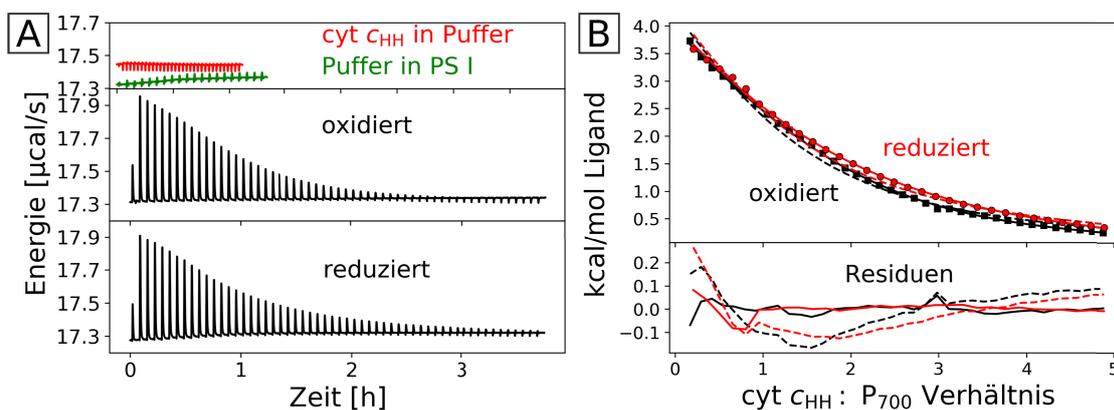


Abbildung 3.13: Isotherme Titrationskalorimetrie von PSI_{tri} mit $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$. A: Thermogramme der Hintergrundmessungen und PSI_{tri} - $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ -Titrationskurven unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen. B: Auswertung der integrierten Signale und Residuen. Es wurde ein Modell mit $n=1$ Bindungsstellen (gestrichelte Linie), bzw. mit $n=1,5$ Bindungsstellen (durchgezogene Linie) an die Daten angenähert. Die Parameter sind Tabelle 3.4 zu entnehmen. Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen (modifiziert).

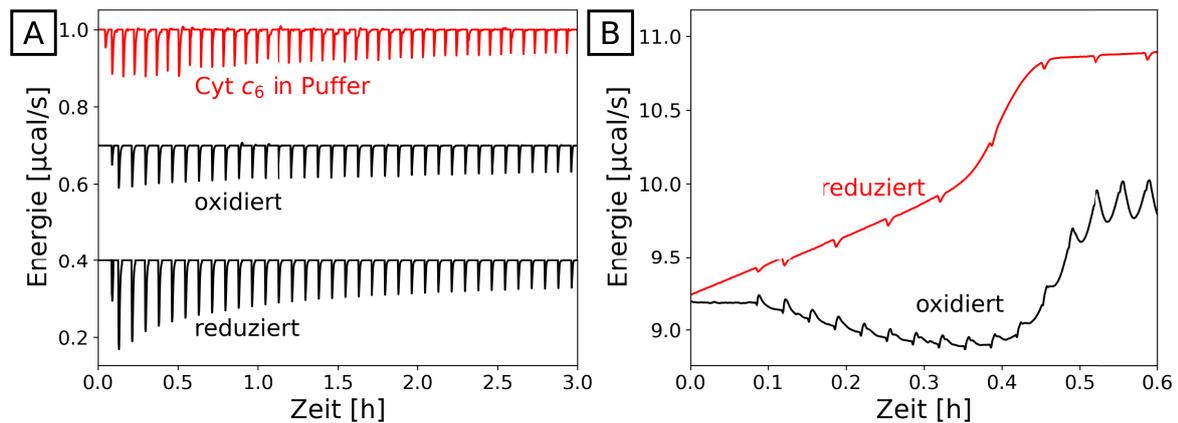


Abbildung 3.14: Isotherme Titrationskalorimetrie von PSI_{tri} mit $\text{Cyt } c_6$. A: Verdünnungswärme des $\text{Cyt } c_6$ (rot) und Bindungswärmen unter niedriger Ionenstärke (25 mM NaCl, schwarz). B: Exemplarische, nicht auswertbare Thermogramme der $\text{Cyt } c_6$ -Titration unter hoher Ionenstärke (200 mM MgSO_4). Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen (modifiziert).

Tabelle 3.4: Bindungsparameter aus der isothermen Titrationskalorimetrie. Die Daten wurden mit einem Modell mit ein oder zwei Typen von Bindungsstellen angenähert; n : Anzahl der Bindungsstellen, K_D : Dissoziationskonstante, ΔH : Bindungsenthalpie, *Konstanten aus den Sauerstoffreduktionsraten. Die Cytochrome wurden in $30 \mu\text{M}$ P_{700} ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ PSI_{tri}) unter Standardbedingungen mit 25 mM NaCl und mit (reduziert) oder ohne 5 mM Natriumascorbat (oxidiert) titriert. Die Standardabweichungen sind für drei unabhängige Messungen angegeben. Die Tabelle ist aus Kölsch et al. (2018) entnommen.

Modell	Cyt c_{HH} (ox)		Cyt c_{HH} (red)		Cyt c_6 (red)
	1	2	1	2	1
n_1	$1,5 \pm 0,1$	1^*	$1,5 \pm 0,2$	1^*	1^*
K_{D1} [μM]	$18,8 \pm 0,2$	11^*	$24,8 \pm 1,2$	11^*	21 ± 3
ΔH_1 [$\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$]	$5,3 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,4$	$-1,4 \pm 0,1$
n_2		$2,0 \pm 0,2$		$6,4 \pm 1,2$	
K_{D2} [μM]		$28,4 \pm 1,0$		$39,4 \pm 5,4$	
ΔH_2 [$\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$]		$-0,5 \pm 0,1$		$-0,2 \pm 0,1$	

3.2.3 Theoretische Analyse des Elektronentransferkomplexes

Die Struktur des PSI-Cytochrom-Komplexes konnte experimentell unter niedrigen Auflösungen rekonstruiert werden. Um Elektronentransportprozesse zu beschreiben, sind jedoch sehr hohe Auflösungen notwendig. Da zu Beginn dieser Arbeit bereits hochaufgelöste Strukturen sowohl für PSI als auch für die beiden Cytochrome Cyt c_{HH} und Cyt c_6 vorlagen (Jordan et al. 2001; Bushnell et al. 1990; Beifinger et al. 1998), wurde die Struktur des Komplexes mit theoretischen Methoden angenähert. Mittels *rigid-body docking* können die Position und die Orientierung der Proteine identifiziert werden, die thermodynamisch zu einer Bindung führen können. Diese potenziellen Bindungsstellen werden im Folgenden als Dockingstellen bezeichnet. Das *rigid-body docking* gibt für PSI mit den Cytochromen jeweils 10000 Dockingstellen aus, die in Abbildung 3.15 dargestellt sind. Für das *rigid-body docking* von PSI mit Cyt c_{HH} ergaben sich an der cytoplasmatischen Seite des PSI 107 Dockingstellen mit negativem ΔG von bis zu $-14,4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. An der luminalen Seite fanden sich dagegen 2520 Dockingstellen mit bis zu $-28,3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Bindung von Cyt c_{HH} an PSI erfolgt demnach bevorzugt an der luminalen Seite. Diese Dockingstellen sind über die gesamte luminalen Oberfläche des PSI verteilt. Jedoch gibt es, obwohl Cyt c_{HH} nicht der native Elektronendonator des PSI ist, in der Nähe von P₇₀₀ eine Verdichtung hochenergetischer Dockingstellen.

Das *rigid-body docking* mit Cyt c_6 ergab 1380 Dockingstellen mit negativem ΔG an der cytoplasmatischen Seite von bis zu $-20,7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ und 2119 luminalen Dockingstellen mit bis zu $-30,6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$. Auch die Cyt c_6 -Dockingstellen sind über die gesamte luminalen Oberfläche des PSI verteilt. Die Ballung hochenergetischer Cyt c_6 -Dockingstellen in der Nähe von P₇₀₀ ist stärker als die des Cyt c_{HH} .

Damit ein Elektronentransfer von Cytochrom c auf PSI erfolgen kann, muss die Häm-Gruppe in räumlicher Nähe zu P₇₀₀ sein. Aufgrund von Mutationsstudien ist bekannt, dass zwei luminal von P₇₀₀ lokalisierte Tryptophane, Trp_{A655} und Trp_{B631}, an der Bindung des Cytochroms c beteiligt sind (Sommer et al. 2002; Sommer et al. 2004). Von den 300 energiereichsten Dockingstellen des Cyt c_{HH} ($-28 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ bis $-15 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) wiesen 36 einen Abstand zwischen Kohlenstoffatomen der Häm-Gruppe und Trp_{A655} bzw. Trp_{B631} ($C_{\text{Häm}}-C_{\text{Trp}}$) von maximal 10 \AA auf. In Abschnitt 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Cyt c_{HH} von der Ionenstärke und dem pH-Wert abhängt. Die elektrostatische Bindungsenergie wurde daher mit der Poisson-Boltzmann-Gleichung unter pH 6 und pH 8 für verschiedene Ionenstärken neu berechnet (Abbildung 3.16). Bei 7 der 36 Dockingstellen änderte sich die Bindungsenergie entsprechend den gemessenen Werten: Die Energie war negativer bei pH 8 als bei pH 6 und wurde in beiden pH-Werten mit zunehmender Ionenstärke weniger negativ. Von diesen 7 Dockingstellen wies diejenige mit der negativsten Bindungsenergie zugleich den geringsten $C_{\text{Häm}}-C_{\text{Trp}}$ -Abstand ($4,5 \text{ \AA}$) auf (Abbildung 3.17). Der Abstand zwischen dem Eisenion der Häm-Gruppe und den Magnesiumionen des P₇₀₀ beträgt $24,3 \text{ \AA}$ und $24,9 \text{ \AA}$.

Von den 100 energiereichsten Dockingstellen des Cyt c_6 ($-31 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ bis $-15 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$) wiesen 25 einen $C_{\text{Häm}}-C_{\text{Trp}}$ -Abstand von maximal 10 \AA auf. Im Gegensatz zur Bindung des nicht nativen PSI-Cyt c_{HH} -Komplexes wurde die Bindung nativer PSI-Cyt c_6 -Komplexe bereits in vielen Organismen untersucht. Insbesondere die Daten einer NMR-Analyse der PSI-Cyt c_6 -Interaktion des nah verwandten Cyanobakteriums *Nostoc* sp. PCC 7119 konnten für die Identifikation der nativen Bindungsstelle genutzt werden (Díaz-Moreno et al. 2005). Durch die NMR-Perturbationsverschiebung (*NMR perturbation shift*) ist die an der Bindung beteiligte Oberfläche des Cyt c_6 bekannt. In 13 der 25 Dockingstellen war das Cyt c_6 so orientiert, dass die entsprechende

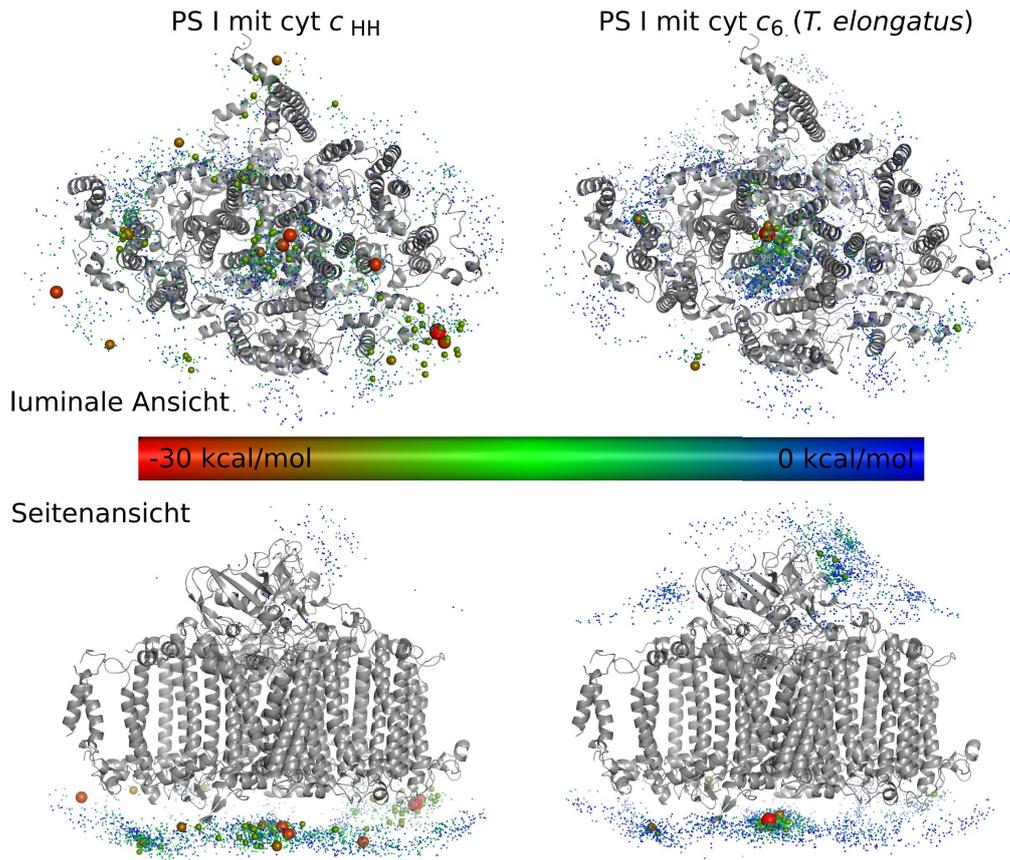


Abbildung 3.15: Verteilung der potenziellen Cyt c_{HH} - (links) und Cyt c_6 -Bindungsstellen an PSI. Cytochrom-Dockingstellen des *rigid-body dockings* sind als Kugeln dargestellt. Die mittels pyDock berechnete Bindungsenergie ist durch das Farbschema wiedergegeben. Dockingstellen mit Energien $< -20 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ sind mit einem vergrößerten Radius kenntlich gemacht. Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen (modifiziert).

Oberfläche in Kontakt mit PSI war. Wie auch für Cyt c_{HH} wurde die Bindungsenergie dieser 13 Dockingstellen in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke neu berechnet (Abbildung 3.16). Die wahrscheinlichste Dockingstelle hat einen $C_{\text{Häm}}-C_{\text{Trp}}$ -Abstand von $2,5 \text{ \AA}$ und eine Bindungsenergie von $-15,5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Abbildung 3.17). Der Abstand zwischen dem Häm-Eisenion und den P_{700} -Magnesiumionen beträgt $21,4 \text{ \AA}$ bzw. $21,3 \text{ \AA}$. Die elektrostatische Bindungsenergie dieses Komplexes ist in pH 8 positiv, was auf eine Abstoßung geladener Seitenketten schließen lässt. Durch Erhöhen der Ionenstärke werden die sich abstoßenden geladenen Gruppen abgeschirmt, was zu einer Verringerung der positiven Energie und damit einer Erhöhung der Affinität führt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Zunahme der Affinität durch Erhöhen der Ionenstärke bei pH 8 (Abschnitt 3.2.1). In dieser Dockingstelle befindet sich Cyt c_6 nah an einer luminalen Schleife von PsaA. Die negativ geladene Aminosäure Asp₆₂₈ dieser Schleife ist $7,4 \text{ \AA}$ von der negativ geladenen Aminosäure Glu₃₄ des Cyt c_6 entfernt, was den Einfluss der Ionenstärke erklärt.

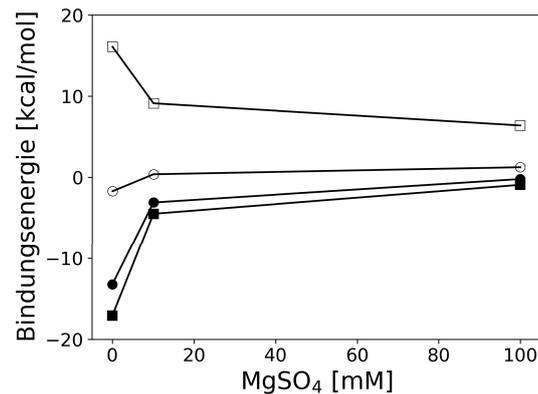


Abbildung 3.16: Neuberechnung der Bindungsenergie ausgewählter Dockingstellen (Abbildung 3.17). Die Bindung von Cyt c_{HH} (schwarz) und Cyt c₆ (weiß) an PSI wurde bei pH 6 (Kreise) und pH 8 (Quadrate) in Anwesenheit von 0, 10 und 100 mM MgSO₄ mit der Poisson-Boltzmann-Gleichung berechnet. Für Cyt c₆ wurde ein 6x-His-Tag mit zufälliger Orientierung in die Berechnung einbezogen. Die Proteindielektrizitätskonstante betrug 10 und die Temperatur 20 °C. Die Berechnung erfolgte in APBS 1.4 mit einem *amber-force-field*. Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen (modifiziert).

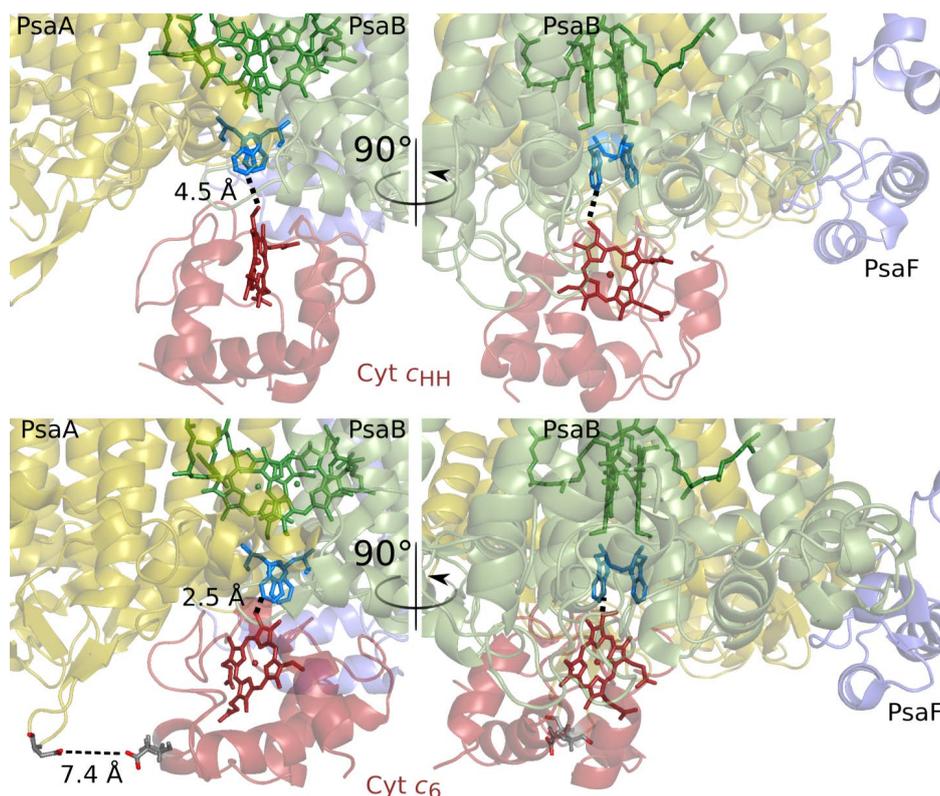


Abbildung 3.17: Modell der Cyt c_{HH} (oben) und Cyt c₆ (unten) Bindungsstelle an PSI. Gezeigt sind die Dockingstellen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit der spezifischen Cytochrom *c*-Bindungsstelle an PSI entsprechen. Die Häm-Gruppen beider Cytochrome wechselwirken mit den luminalen, hydrophoben Tryptophanen Trp_{A655} und Trp_{B631} (blau). Die kürzesten Abstände zwischen der Häm-Gruppe und den Tryptophanen ist eingezeichnet (gestrichelte Linie). Cyt c₆ interagiert nicht mit PsaF (lila) und ist in räumlicher Nähe zu einer luminalen Schleife von PsaA (gelb). Diese räumliche Nähe führt zu einer repulsiven Interaktion zwischen den Seitenketten Glu₃₄ (Cyt c₆) und Asp₆₂₈ (PsaA, gestrichelte Linie links unten). Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen (modifiziert).

Tabelle 3.5: Größe des PSI_{mono} und PSI_{tri} unter Annahme eines ellipsoiden Zylinders. Länge und Durchmesser sind in Abbildung 3.18 veranschaulicht.

	Monomer	Trimer
Länge [Å]	71 ± 5	71 ± 5
Durchmesser ₁ [Å]	100 ± 10	220 ± 10
Durchmesser ₂ [Å]	170 ± 10	220 ± 10

3.3 Analyse der PSI-Struktur

3.3.1 PSI in Lösung (SAXS, SANS)

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Komplexbildung aus PSI mit Cytochrom *c*. Hierzu sollte zunächst die Struktur des PSI im Detail analysiert werden. PSI wurde durch Zugabe des Detergens DDM solubilisiert, wobei sich ein Detergensgürtel um die hydrophobe Oberfläche des Proteins legte. Der Detergensgürtel kann mit der Kleinwinkelstreuung analysiert werden. Die Kleinwinkelstreuung wurde in Kooperation mit Prof. J. Pieper (Universität Tartu) gemessen. Aus der Kristallstruktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001) lassen sich für PSI_{mono} und PSI_{tri} Gyrationradien von 4,1 nm bzw. 6,8 nm berechnen. Die Gyrationradien aus dem Guinier-Plot der Röntgenkleinwinkelstreuung betragen dagegen 5,8 nm bzw. 7,8 nm. Dieser große Unterschied verdeutlicht die Bedeutung des Detergensgürtels für die Messung von Membranproteinen. Die Form eines Partikels kann durch das Verhältnis des Gyrationradius zum hydrodynamischen Radius abgeschätzt werden. Mit den hydrodynamischen Radien von 6,9 nm und 9,8 nm (Abschnitt 3.1.1) liegt ein Verhältnis von 0,84 bzw. 0,80 vor. Dies weicht signifikant von dem R_G/R_H -Verhältnis einer Kugel mit ideal verteilten Massen ab und weist für beide PSI-Formen auf eine elliptische Struktur hin. Aufgrund der bekannten diskusförmigen (gestauchten Zylinder) Struktur des PSI_{tri} wurden die gemessenen Kleinwinkelstreuungen mit einem Modell eines ellipsoiden Zylinders analysiert (Tabelle 3.5). Der Formfaktor eines ellipsoiden Zylinders wurde von Feigin und Svergun beschrieben (Feigin und Svergun 1987).

Das aus der Streuung simulierten Strukturmodelle des PSI_{mono} und des PSI_{tri} sind signifikant größer als die Kristallstruktur von Jordan et al. (PDB-Code: 1jb0). Eine Ergänzung der Kristallstruktur um eine ringförmige, 2 nm breite Monoschicht aus 1024 DDM-Molekülen (PSI_{mono}) bzw. 1472 DDM-Molekülen (PSI_{tri}) führte zu einer guten Übereinstimmung zwischen der theoretischen und der gemessenen Streuung (Abbildung 3.18).

Da sich die Streulängendichte des DDM von der des Proteins unterscheidet, lässt sich der Detergensgürtel auch durch Kontrastvariation mittels Neutronenkleinwinkelstreuung analysieren. Durch ein definiertes $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnis wird die Streulängendichte des Mediums mit der Streulängendichte der Detergensmoleküle abgeglichen. Das Detergens zeigt somit dieselbe Streuung wie der Hintergrund und kann vom Protein unterschieden werden; man spricht von einem Kontrast-Matching. DDM hat eine Streulängendichte von $0,65 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$, was einer D_2O -Konzentration von 18 % entspricht. Das DDM setzt sich jedoch aus einem hydrophilen Maltosid mit einer Streulänge von $1,5 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ und einem hydrophoben Dodecylrest mit $-0,2 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$ zusammen. Die Streulängendichte des Dodecylrestes entspricht einer D_2O -Konzentration von 5 %. In Abbildung 3.19 ist die Streuung des PSI_{tri} mit 5 % und 18 % D_2O gezeigt. Bis zu einem Streuvektor q von $0,08 \text{ \AA}^{-1}$ stimmten die Streu-

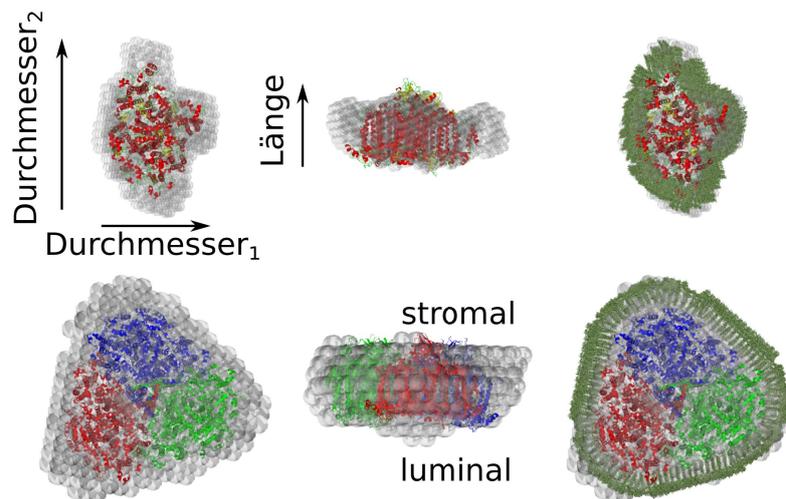


Abbildung 3.18: SAXS-Strukturmodell der PSI_{mono} (oben) und PSI_{tri} (unten) mit eingezeichneten Kristallstruktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001). In der luminalen Ansicht (links) und der Seitenansicht (Mitte) ist zu erkennen, dass das Modell (graue Kugeln) über die Kristallstruktur hinausgeht. Rechts ist die Kristallstruktur mit einer ringförmigen DDM-Monoschicht versehen, wodurch das Modell vollständig beschrieben werden kann. Durchmesser und Länge aus Tabelle 3.5 wurden schematisch eingezeichnet. Das Modell wurde mit DAMMIF erstellt und der Detergensgürtel wurde mit PyMOL um die Kristallstruktur gelegt (Franke und Svergun 2009; Schrödinger, LLC 2015). Die Abbildung wurde in modifizierter Form von Dr. M. Golub erstellt und in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht (Golub et al. 2017b).

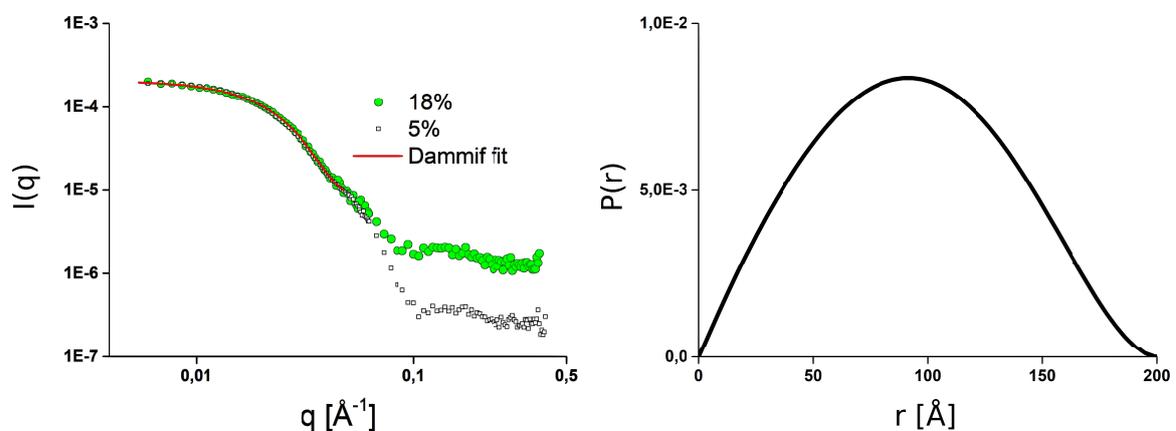


Abbildung 3.19: Kleinwinkelstreuung mit Kontrastvariation. PSI_{tri} -SANS-Daten wurden in 18% (grüne Kreise) und 5% (weiße Vierecke) D_2O aufgenommen (links). Beide Kontraste stimmen bis zu einem Streuvektor q von $0,08 \text{\AA}^{-1}$ überein und können mit identischer Abstandsverteilungsfunktion beschrieben werden (rechts). Die Abbildung wurde in modifizierter Form von Dr. M. Golub erstellt und wird in einer gemeinsamen Arbeit veröffentlicht (Golub et al. 2020, in Vorbereitung).

ungen überein. Eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Bereichen des Detergens ergab unter diesem Streuvektor keine Verbesserung der Struktur. Da der Kontrast zwischen Protein und 5% D_2O größer war als mit 18%, war 5% D_2O besser geeignet, um $q > 0,08 \text{\AA}^{-1}$ zu beschreiben. Es wurde ein Modell des PSI_{tri} ohne Detergensgürtel anhand dieser Streuungsdaten erstellt (Abbildung 3.20). Die Solubilisierung des PSI kann sich auf die Struktur von Photosystemen auswirken (Watanabe et al. 2009). Um den Einfluss des Detergens während der Isolation des PSI zu überprüfen, wurden SANS-

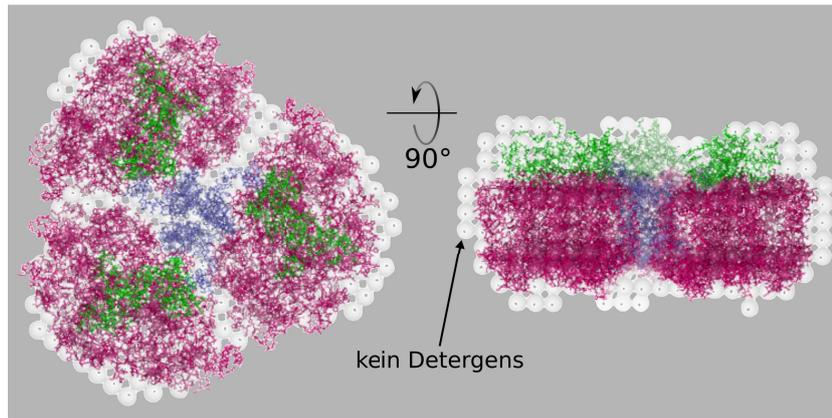


Abbildung 3.20: SANS-Strukturmodell (weiße Kugeln) des PSI_{tri} mit eingezeichneter Kristallstruktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001). Die Trimersierungsuntereinheit PsaL ist blau, die restlichen Transmembranuntereinheiten rot und die cytoplasmatischen Untereinheiten grün dargestellt. Im Gegensatz zum SAXS-Strukturmodell wurde der Beitrag des Detergensgürtels zum SANS-Strukturmodell durch die Kontrastvariation ausgeschlossen. Die Abbildung wurde in modifizierter Form von Dr. M Golub erstellt und wird in einer gemeinsamen Arbeit veröffentlicht (Golub et al. 2020, in Vorbereitung).

Messungen mit zwei Isolaten durchgeführt. Ein PSI_{tri} wurde unter Standardbedingungen isoliert (0,55% DDM), ein weiteres Isolat mit 2% DDM. Beide PSI -Trimere ergaben identische Streukurven und somit identische Strukturen.

3.3.2 Komplexbildung in Lösung

Wie in Abschnitt 3.2.1 gezeigt, haben PSI_{tri} und $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ eine hohe Affinität bei geringer Ionenstärke. Es wurde untersucht, ob dies auch zur Bildung eines stabilen Komplexes führt. PSI_{tri} und $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ wurden zusammen in niedriger und hoher Ionenstärke bei pH 7 und pH 8 inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung in einem Zentrifugalkonzentrator (MWCO 100 000) mit demselben Puffer gewaschen. Das 12 kDa große $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ wurde dabei von PSI_{tri} getrennt, es sei denn, es war an PSI gebunden. Bei Ionenstärken ≥ 200 mM war bereits nach zwei Waschschrritten kein $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ mehr im Überstand nachweisbar (Abbildung 3.21). In niedrigen Ionenstärken blieb das $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ dagegen auch nach sieben Waschschrritten noch im Überstand nachweisbar und musste daher an dem größeren PSI_{tri} gebunden sein. Aufgrund der Löslichkeit von PSI_{tri} konnte die Komplexbildung nicht bei pH 6 überprüft werden. Ein weiterer Nachweis der Komplexbildung wurde mittels Kleinwinkelstreuung durchgeführt. Hierzu wurden Bedingungen gewählt, in denen der K_{M} -Wert $10 \mu\text{M}$ ($\text{Cyt } c_{\text{HH}}$) bzw. $30 \mu\text{M}$ ($\text{Cyt } c_6$) betrug (Tabelle 3.2). Die Proteinkonzentrationen wurden so gewählt, dass 90% des PSI_{tri} mit Cytochrom c gesättigt war. Durch die Bindung des kleinen Cytochroms an das große PSI_{tri} war nur eine geringe Änderung der Streukurve zu erwarten. Daher wurde 5% D_2O , welches einen stärkeren Kontrast zum Protein als 18% D_2O aufweist, für diese Messung eingesetzt. Der Beitrag der freien Cytochrome zur Streukurve war aufgrund ihrer geringen Größe vernachlässigbar. Durch die Zugabe von $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ bzw. $\text{Cyt } c_6$ trat eine signifikante Verschiebung der Streukurve auf (Abbildung 3.22). Diese Verschiebung konnte durch ein PSI_{tri} , an dessen luminaler Seite ein $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ oder $\text{Cyt } c_6$ gebunden ist, beschrieben werden. Für eine genauere Lokalisation des Cytochroms reichte die Auflösung der Methode jedoch nicht aus.

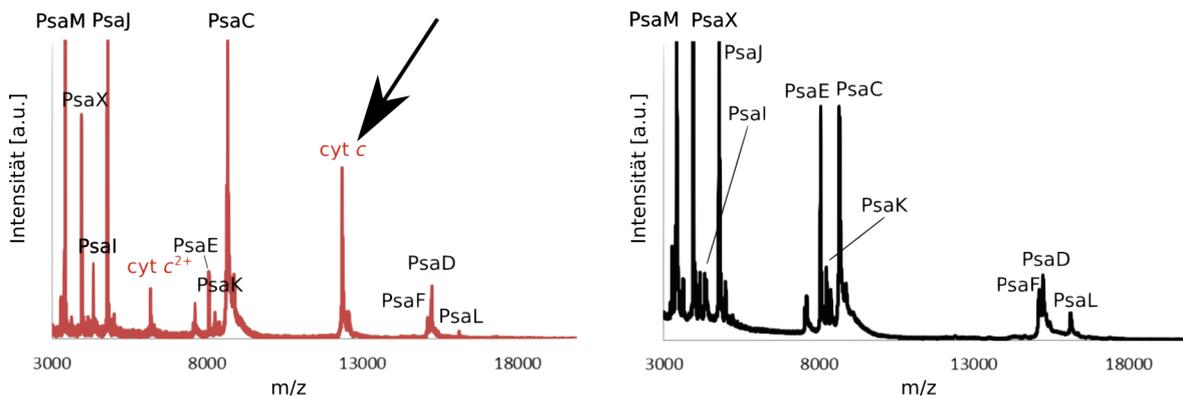


Abbildung 3.21: Massenspektrometrische Analyse der Komplexbildung von PSI_{tri} mit $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ in Lösung. PSI_{tri} wurde mit $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ in niedriger (links) und hoher (rechts) Ionenstärke in einem Zentrifugalkonzentrator (MWCO 100 000) filtriert. $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ war bei niedriger Ionenstärke im PSI -haltigen Überstand nachweisbar (siehe $12\,360\text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Für die hier dargestellten Messungen wurde die linke Probe siebenmal gewaschen und die rechte zweimal. Die Abbildung wurde Stieger et al. (2016) entnommen (modifiziert).

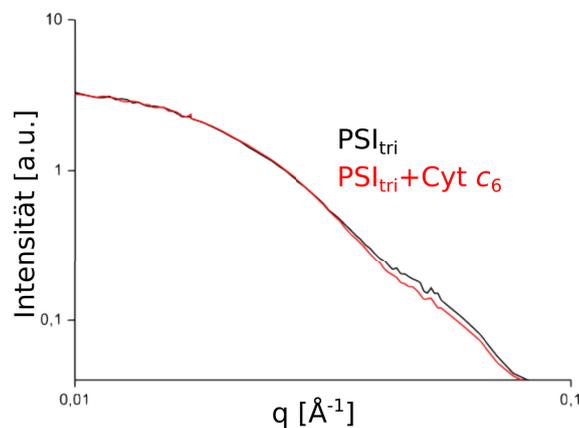


Abbildung 3.22: Kleinwinkelstreuung von PSI_{tri} mit $\text{Cyt } c_6$. Im Bereich von $q \approx 0,07\text{ \AA}^{-1}$ kommt es zu einer Verschiebung der Streukurve durch gebundenes $\text{Cyt } c_6$. Die Abbildung wurde in modifizierter Form von Dr. M Golub erstellt und wird in einer gemeinsamen Arbeit veröffentlicht (Golub et al. 2020, in Vorbereitung).

3.3.3 Kristallisation des PSI_{tri}

Die Proteinstrukturen mit den bisher höchsten Auflösungen konnten mittels Kristallstrukturanalyse gelöst werden. Im Kristall werden Kristallkontakte gebildet, die die Proteine stabilisieren. PSI_{tri} konnte bereits in den 1990er Jahren mittels Einsalzen kristallisiert werden (Krauß et al. 1993). Eine Kristallisation unter niedrigen Ionenstärken konnte im Rahmen meiner Arbeit reproduziert werden (Abbildung 3.23). Die niedrige Ionenstärke konnte durch eine Verdünnung der Lösung oder eine Dialyse erreicht werden. Die Dialyse einer $7,5\text{ }\mu\text{M}$ P_{700} -Lösung gegen 5 mM MES-NaOH ($\text{pH } 6$) mit 5 mM MgSO_4 und $0,02\%$ DDM eignete sich, um große Kristalle, die bis zu einer Auflösung von $3,5\text{ \AA}$ streuten, wachsen zu lassen. Auch bei moderater Salzkonzentration gelang es, PSI_{tri} zu kristallisieren (Abbildung 3.24). Mit diesen im *sitting drop* gewachsenen Kristallen konnten Auflösungen bis zu 8 \AA erreicht werden.

Die Herstellung von Makrokristallen ist in einigen Fällen schlecht reproduzierbar. Im Rahmen meiner Arbeit kristallisierte in den Dialysen mit niedriger Ionenstärke nur jeder zweite Ansatz, während in der anderen Hälfte der Ansätze das Protein in

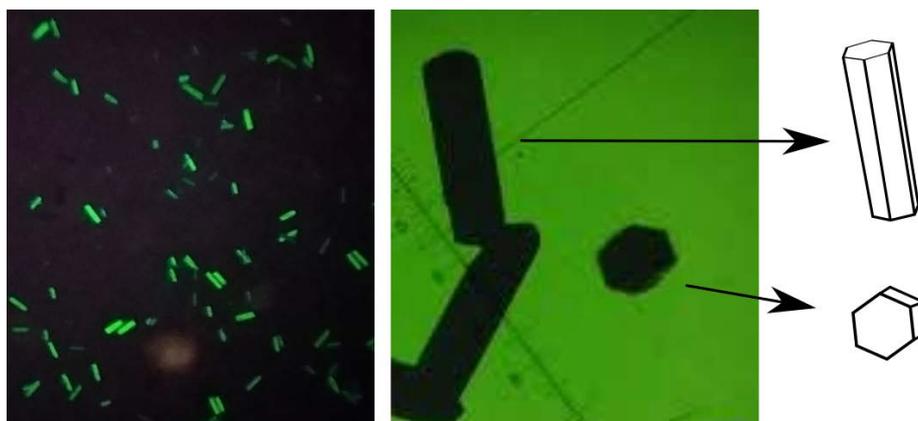


Abbildung 3.23: Habitus der unter niedrigen Ionenstärken gewachsenen PSI_{tri} Kristalle. Links sind Kristalle im Polarisationsmikroskop dargestellt ($60\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) und rechts ist die hexagonale Form der Kristalle zu erkennen. Alle unter diesen Bedingungen gewonnenen Kristalle sind nadelförmig. Auch der rechte hexagonale Kristall ist eine aufrechtstehende $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ große Nadel.

scheibenförmigen Aggregaten ausfiel. Auch waren die Kristalle oft verwachsen. Um zuverlässig Kristalle zu erhalten, wurden die Dialysekristalle daher mechanisch zerkleinert und als Keime in eine PSI_{tri} -Lösung gegeben. Zum Zerkleinern eignete sich das Seed Bead Kit von Hampton Research, in dem die Kristalle zusammen mit einem Teflonball in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf einem Vortexer rotiert wurden. Glasperlen beschädigten dagegen das PSI_{tri} , was sich an einer Änderung des Absorptionsspektrums erkennen ließ (Abbildung 3.25). Zwei Kristalle aus Dialyseansätzen wurden in $50\ \mu\text{l}$ $5\ \text{mM}$ MES (pH 6) mit $0,02\ \%$ DDM aufgenommen und mit dem Seed Bead Kit 2 min zerkleinert. Die Bruchstücke waren bis zu $50\ \mu\text{m}$ groß und konnten in einer auf $6\ \text{mM}$ bis $7\ \text{mM}$ MgSO_4 dialysierten PSI_{tri} -Lösung wachsen. Details zur Entwicklung eines *seeding*-Protokolls für PSI_{tri} sowie weitere Kristallisationsbedingungen sind der Bachelorarbeit von Frau C. Topas zu entnehmen (Topas 2018).

Für die Aufnahme eines Datensatzes an einem Synchrotron ist es aufgrund von Strahlenschäden notwendig, die Kristalle auf tiefe Temperaturen ($100\ \text{K}$) herunterzukühlen. Um dabei die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden, werden die Kristalle mit einem Kryoprotektivum versehen. Die Kryoprotektiva können jedoch einen negativen Einfluss auf die Kristalle haben; so lösten sich unter Niedrigsalz gewachsene PSI_{tri} -Kristalle z. B. nach Zugabe von Glycerin auf. Viele übliche Kryoprotektiva waren aufgrund der Beschaffenheit von PSI und der Kristalle nicht geeignet; so waren Lösungen wie DMSO schädlich für PSI und Lösungen mit erhöhter Ionenstärke lösten die Kristalle auf. Die Inkubation von Niedrigsalz- PSI_{tri} -Kristallen in langkettigen Polyethylenglykolen ($\leq 4000\ \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) führte dazu, dass sich die Kristalle bananenförmig verbogen, und auch mit kurzkettigem PEG konnte keine Beugung gemessen werden. Glukose und Trehalose führten zu einer verringerten Auflösung von $7\ \text{\AA}$ bis $10\ \text{\AA}$. Auch die von Dr. P. Jordan (Jordan et al. 2001) eingesetzte $40\ \%$ ige Saccharose wirkte sich negativ auf die Kristalle aus. Kleine Kristalle ($< 100\ \mu\text{m}$ in der langen Achse) lösten sich teilweise auf, während sehr große Kristalle ($> 1\ \text{mm}$ in der langen Achse) fehlerhafte Einheitszellen aufwiesen und nicht indizierbar waren. Um diesen Effekten entgegenzuwirken, wurde überprüft, ob auch geringere Saccharosekonzentrationen als Kryoprotektivum geeignet sind. Es wurden Beugungsbilder von Niedrigsalz- PSI_{tri} -Kristallen bei $2\ \text{M}$, $1,75\ \text{M}$, $1,5\ \text{M}$ und $1,25\ \text{M}$ Saccharose aufgenommen. $1,5\ \text{M}$ Saccharose ist bereits so hoch konzentriert, dass die Kristalle aufgrund ihrer geringeren Dichte zu

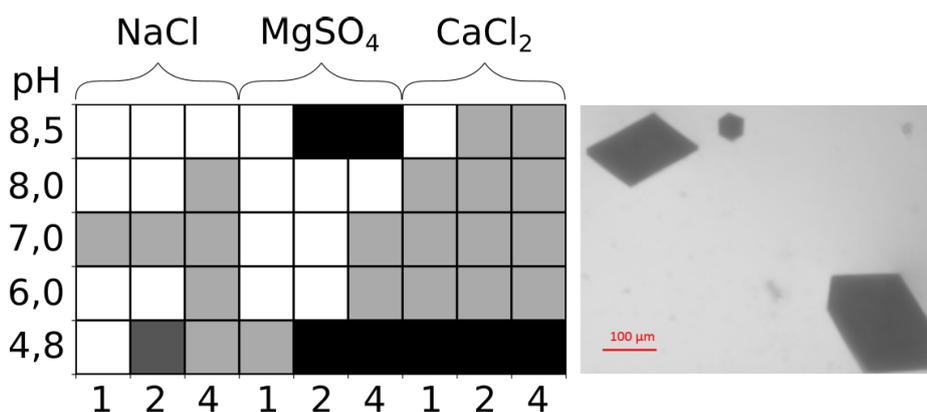


Abbildung 3.24: Kristallisationsbedingungen für PSI_{tri}. Der Farbcode zeigt die Kristallisierbarkeit: keine Kristallisation (weiß), Kristallisation bei 5 % PEG (hellgrau), 2,5 % PEG (dunkelgrau) und sowohl mit 2,5 % als auch mit 5 % PEG (schwarz). Das PSI_{tri} wurde mit drei unterschiedlichen PEG-Kettenlängen, 1450 g · mol⁻¹ (1), 2000 g · mol⁻¹ (2) und 4000 g · mol⁻¹ (4) und jeweils 50 mM des angegebenen Salzes im *sitting drop* kristallisiert. Als Puffer diente jeweils 100 mM Tris-HCl (pH 8,5), Tricin-NaOH (pH 8,0), PIPES-NaOH (pH 7,0), MES-NaOH (pH 6,0) oder Zitratpuffer (pH 4,8). Alle Ansätze wurden bei 20 °C mit 50 µM P₇₀₀ und 0,02 % DDM durchgeführt. Die Kristallisation wurde über einen Monat beobachtet, wobei sich die Kristalle nach spätestens drei Tagen bildeten. Rechts sind Kristalle bei 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) mit 50 mM CaCl₂, 5 % PEG 4000 und 0,02 % DDM nach drei Wochen Wachstum dargestellt.

schwimmen begannen. Ebenso ist die Viskosität so hoch, dass nach dem Aufnehmen der Kristalle oftmals viel überschüssige Lösung an der Schleife haften blieb, die das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verringerte. Diese hohe Konzentration war jedoch als Kryoprotektivum unzureichend, weshalb sich Eisringe bildeten und die Auflösung abnahm. Die Auflösung in der besten Orientierung von jeweils fünf Kristallen der Größen 300 µm × 60 µm bis 500 µm × 100 µm aus einem gemeinsamen Ansatz betrug (3,3 ± 0,2) Å (2 M Saccharose), (3,3 ± 0,3) Å (1,75 M), (6,5 ± 1,4) Å (1,5 M) bzw. >10 Å (1,25 M). Ein Beugungsbild für 1,75 M Saccharose ist in Abbildung 3.26 gezeigt. Alle PSI_{tri}-Kristalle zeigten eine hohe Mosaizität. Es wurde überprüft, ob diese Mosaizität durch Auftauen der eingefrorenen Kristalle (*macromolecular crystal annealing*) verringert werden kann. PSI_{tri}-Kristalle wurden in 1,75 M Saccharose, 5 mM MES-NaOH (pH 6,0) und 0,02 % DDM inkubiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Kristalle erneut in die Saccharoselösung überführt, für 10 s bis 5 min inkubiert und erneut schockgefroren. Alle auf diese Weise behandelten Kristalle zeigten kein Beugungsverhalten.

Da der Oxidationszustand von Cyt *c*₆, wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt wurde, einen Einfluss auf die PSI_{tri}-Cyt *c*₆-Bindung hat, wurde der Einfluss von reduzierenden und oxidierenden Agenzien auf die PSI_{tri}-Kristallisation untersucht. Für die unter niedriger Ionenstärke gewachsenen Kristalle wurde jeweils 1 mM Natriumascorbat oder Ferricyanid zum Dialysepuffer hinzugefügt. Diese geringe Konzentration zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum der Kristalle. PSI_{tri} kann an Luftsauerstoff oxidieren, weshalb in den *sitting-drop*-Ansätzen zu den kleinen Proteinvolumen eine erhöhte Konzentration von 10 mM Natriumascorbat zugegeben wurde. Auch hier zeigte die Zugabe der Redoxagenzien keinen Einfluss auf die Kristallisation. Alle reduzierten PSI_{tri}-Proben wurden im Dunkeln gelagert und unter grünem Licht betrachtet.

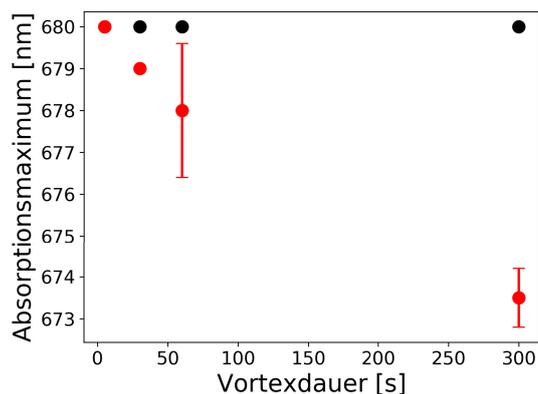


Abbildung 3.25: Einfluss von mechanischer Belastung auf das Absorptionsspektrum von PSI_{tri} . PSI_{tri} -Kristalle wurden mit dem Seed Bead Kit (schwarz) und $20 \mu\text{l}$ $0,2 \text{ mm}$ Glasperlen (rot) in 5 mM MES-NaOH (pH 6) und $0,02 \%$ DDM auf einem Vortexer rotiert. Die Proben wurden jeweils nach 30 s für 10 s auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Kristalllösung durch Zugabe von 150 mM MgSO_4 gelöst und das Absorptionsmaximum der Qy-Bande in einem Absorptionsspektrometer bestimmt. Durch den Einsatz von Glasperlen änderte sich das Absorptionsmaximum, was auf eine Beschädigung des PSI_{tri} schließen lässt. Die Standardabweichungen sind für drei unabhängige Kristallisationsansätze angegeben.

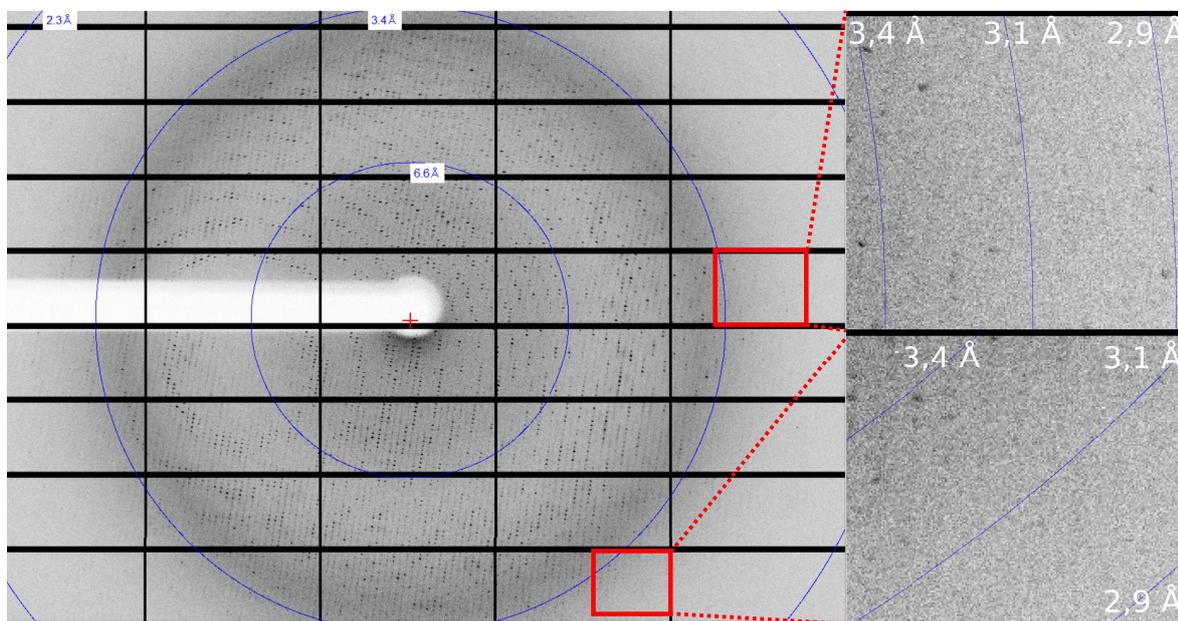


Abbildung 3.26: Röntgenbeugung an einem unter niedriger Ionenstärke gewachsenen PSI_{tri} -Kristall. Der Kristall wurde in $1,75 \text{ M}$ Saccharose inkubiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die rot markierten Bereiche sind rechts vergrößert dargestellt. Die Auflösung ist in blauen Linien eingezeichnet. $7,5 \mu\text{M}$ P_{700} wurde gegen 5 mM MES-NaOH (pH 6,0) mit 5 mM MgSO_4 und $0,02 \%$ DDM dialysiert. Die Kristalle wurden mit einem Seed Bead Kit zerkleinert und zu einer PSI_{tri} -Lösung mit $7,5 \mu\text{M}$ P_{700} , 7 mM MgSO_4 , 5 mM MES-NaOH (pH 6,0) und $0,02 \%$ DDM gegeben. Die über Nacht gewachsenen Kristalle hatten eine Größe von $500 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$.

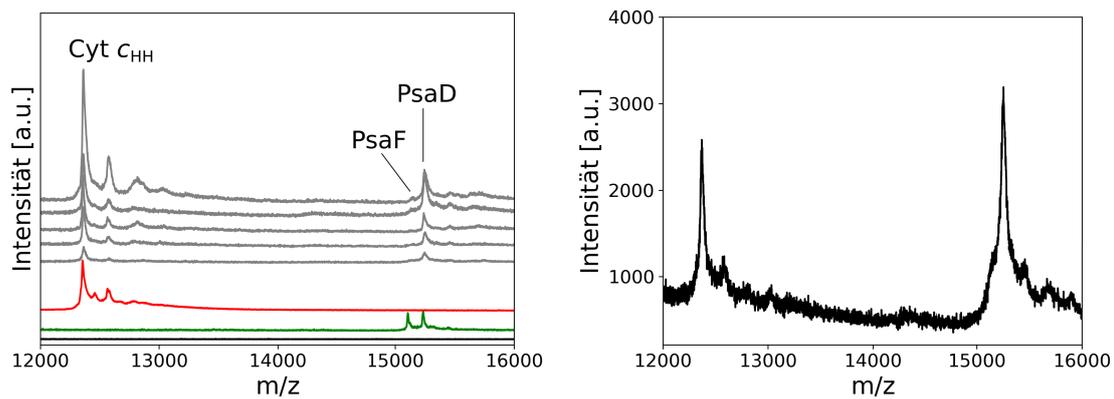


Abbildung 3.27: Ausschnitt einer Massenspektrometrischen Analyse der PSI_{tri} -Cyt c_{HH} -Kokristalle. Links: Einzelne Kokristalle aus unterschiedlichen Ansätzen wurden sechsmal gewaschen und mit MALDI-TOF gemessen (grau). Zum Vergleich sind Spektren des Cyt c_{HH} (rot, 95 %ige Reinheit) und PSI_{tri} (grün) gezeigt. Der Überstand des letzten Waschschriffs enthält weder PSI_{tri} noch Cyt c_{HH} (schwarz). Rechts: Ein PSI_{tri} -Cyt c_{HH} -Kokristall, der kein Cyt c_{HH} in der Kryolösung enthielt, wurde mittels Röntgenbeugung untersucht, anschließend gewaschen und mittels MALDI-TOF auf Cyt c_{HH} überprüft. Die Proteine wurden mit TFA denaturiert und mit Sinapinsäure versetzt. Cyt c_{HH} weist mehrere Banden auf, da es mit Sinapinsäure kondensierte.

3.3.4 PSI -Cyt c_{HH} -Komplexbildung im Kristall

Um die Bindung der Cytochrome an PSI_{tri} in hoher Auflösung zu charakterisieren, wurde die Kristallstrukturanalyse genutzt. Das PSI_{tri} und die Cytochrome konnten dazu gemeinsam kristallisiert werden. Alternativ konnte PSI_{tri} kristallisiert werden und anschließend konnte das kleine Cytochrom in die Kristalle diffundieren (*soaking*). Beide Methoden wurden mit PSI_{tri} und Cyt c_6 sowie Cyt c_{HH} getestet. PSI_{tri} und Cyt c_6 wurden gemeinsam mit den Bedingungen aus Abbildung 3.24 (Abschnitt 3.3.3) kristallisiert. Da oxidiertes Cyt c_6 nicht an PSI_{tri} bindet (Abschnitt 3.2.2), wurde 10 mM Natriumascorbat zugegeben. Bedingungen, die ohne Cyt c_6 zu einer erfolgreichen Kristallisation führten, wurden mit variablen Ionenstärken angewandt (50 mM bis 200 mM des jeweiligen Salzes). In einigen Bedingungen entstanden Kristalle, diese enthielten jedoch ausschließlich PSI_{tri} und kein Cyt c_6 . In PSI_{tri} -Kristallen, die mit Cyt c_6 -*soaking* behandelt wurden, lag nach dem Waschen der Kristalle kein Cyt c_6 vor.

Da sich der stabile PSI_{tri} -Cyt c_{HH} -Komplex unter Bedingungen bildete, unter denen sich PSI_{tri} kristallisieren ließ, wurde untersucht, ob sich PSI und Cyt c_{HH} unter diesen Bedingungen kokristallisieren lassen. PSI_{tri} wurde zusammen mit Cyt c_{HH} gegen niedrige Ionenstärke dialysiert. PSI_{tri} ohne Cyt c_{HH} bildete bei pH 6 und einer MgSO_4 -Konzentration von 5 mM (Leitfähigkeit von $1,0 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$) grüne Kristalle, während sich mit $37,5 \mu\text{M}$ Cyt c_{HH} grüne Kristalle ab einer MgSO_4 -Konzentration von 2 mM (Leitfähigkeit von $0,5 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$) bildeten. Die Leitfähigkeit des Dialysepuffers wurde dabei schrittweise verringert, da sich bei zu schneller Dialyse scheibenförmige Aggregate an der Dialysemembran bildeten. PSI_{tri} -Cyt c_{HH} -Kokristalle wurden mittels MALDI-TOF auf die enthaltenen Peptide untersucht. Cyt c_{HH} konnte in allen Kristallen nachgewiesen werden (Abbildung 3.27). Die Bindung des Cyt c_{HH} scheint spezifisch zu sein, da die scheibenförmigen PSI_{tri} -Aggregate kein Cytochrom enthielten. Auch das in der Lösung enthaltene Cyt c -Dimer (vgl. Abbildung 3.5) konnte nicht in den Kokristallen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Cyt c_6 führte das *soaking* hier zu einer

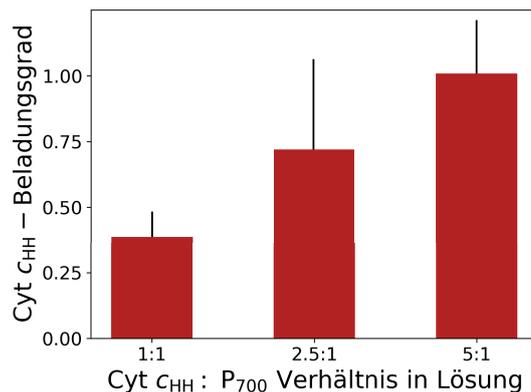


Abbildung 3.28: Beladungsgrad der Kokristalle in Abhängigkeit der Cyt c_{HH} -Konzentration in Lösung. Mehrere Kristalle eines Ansatzes wurden vereint, gewaschen und gelöst. Cyt c_{HH} wurde von PSI_{tri} getrennt, um die Verhältnisse der beiden Proteine photometrisch zu bestimmen. Die Standardabweichungen resultieren aus drei bis zwölf unabhängigen Messungen. Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen.

Bindung des Cyt c_{HH} in den PSI_{tri}-Kristallen. Die *soaking*-Kristalle streuten jedoch nur bis zu einer Auflösung von 10 Å. Die MALDI-TOF-Methode ist nicht quantitativ, weshalb aus diesen Kristallen nicht das Verhältnis aus PSI_{tri} und Cyt c_{HH} bestimmt werden konnte. Eine Quantifizierung erfolgte mittels Absorptionsspektroskopie anhand der Absorption bei 550 nm (Cyt c_{HH}) bzw. 680 nm (PSI_{tri}). Da PSI_{tri} aufgrund von 96 Chlorophyllen pro P₇₀₀ auch in der Grünücke noch stärker absorbiert als Cyt c_{HH} , wurden die beiden Proteine über einen Zentrifugalkonzentrator voneinander getrennt. Bei einem Verhältnis von 5 Cyt c_{HH} : 1 PSI_{tri} im Kristallisationsansatz stellte sich ein 1 : 1-Verhältnis im Kristall ein (Abbildung 3.28). Bei höheren Cyt c_{HH} -Konzentrationen konnte PSI_{tri} nicht kristallisiert werden.

Die Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von 3,4 Å. Die Einheitszelle der PSI_{tri}-Cyt c_{HH} -Kokristalle war identisch mit der Einheitszelle von PSI_{tri}-Kristallen. Die Struktur der PSI-Untereinheiten stimmten ebenfalls überein. Dem Cyt c_{HH} konnte keine Elektronendichte zugeordnet werden (Abbildung 3.29). Die Parameter der Beugungsanalyse sind Tabelle 3.6 zu entnehmen. Um auszuschließen, dass das Cyt c_{HH} während der Inkubation mit Kryoprotektivum aus dem Kristall dissoziierte, wurden die Kristalle nach der Beugungsanalyse gewaschen und mit MALDI-TOF überprüft, wobei das Cyt c_{HH} weiterhin nachweisbar war (Abbildung 3.27). Auch die Zugabe von Cyt c_{HH} zum Kryoprotektivum ergab keine zusätzliche Elektronendichte. Der Aufbau des PSI_{tri}-Cyt c_{HH} -Kokristalls ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Kristallkontakte liegen zwischen den Untereinheiten PsaF und PsaE vor. Zwischen den Trimeren befindet sich ein großes Volumen ohne Elektronendichte. Ein Teil dieses Volumens ist von Detergenmolekülen besetzt (vgl. Abbildung 3.18), während das nah an P₇₀₀ befindliche Volumen Raum für Cyt c_{HH} bietet (Abbildung 3.30, blaue Markierung). Das Cyt c_{HH} kann in diesem Volumen keine Kristallkontakte mit benachbarten Proteinen eingehen. Aufgrund von Dissoziations- und Assoziationsreaktionen können sich die Position und Orientierung aller Cyt c_{HH} -Proteine im Kristall unterscheiden, weshalb ihre Elektronendichte ähnlich einer flexiblen Schlaufe nicht berechnet werden kann. Die Elektronendichte flexibler Strukturen kann in einigen Fällen bei niedrigen Auflösungen visualisiert werden. Es wurde daher ein Datensatz mit einer Auflösung von 10 Å analysiert, jedoch konnte auch hier keine Elektronendichte für Cyt c_{HH} zugeordnet werden.

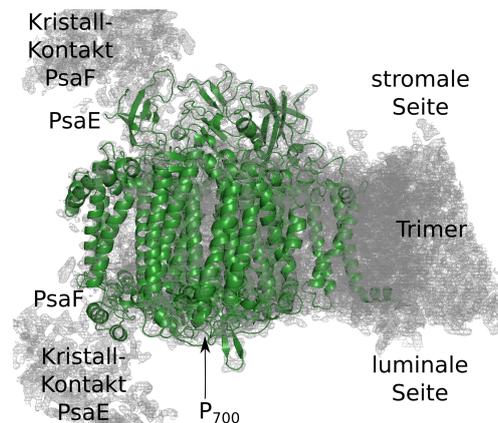


Abbildung 3.29: Elektronendichtekarte (grau) eines $\text{PSI}_{\text{tri}}\text{-Cyt } c_{\text{HH}}$ -Kokristalls mit 2σ bei einer Auflösung von $3,4\text{ \AA}$ und dem dazugehörigen Modell (grün). Kristallkontakte sind zwischen der cytoplasmatischen Untereinheit PsaE und den luminalen Helices der Transmembranuntereinheit PsaF ausgebildet. Die gesamte Elektronendichte kann dem PSI_{tri} zugeordnet werden, während keine Elektronendichte für $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ vorliegt. Um Elektronen übertragen zu können, muss $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ in der Nähe von P_{700} vorliegen (Pfeil). Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen (modifiziert).

Tabelle 3.6: Parameter der Kristallstrukturanalyse eines $\text{PSI}_{\text{tri}}\text{-Cyt } c_{\text{HH}}$ -Kokristalls. Entnommen aus Kölsch et al. (2018).

Parameter	Wert
Wellenlänge [\AA]	0,999
Raumgruppe	P6_3
Einheitszelle	
a, b, c [\AA]	281,4, 281,4, 165,6
α , β , γ [$^\circ$]	90, 90, 120
Auflösung [\AA]	47,36–3,42 (3,63–3,42)
B-Faktor (Wilson) [\AA^2]	83
B-Faktor (Mittel) [\AA^2]	86
I/σ_I	8,79 (1,75)
R_{meas}	0,42 (1,60)
Vollständigkeit [%]	99,2 (97,0)
Anzahl der Reflexionen	99 609
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	0,2611/0,3169
RMS Bindungslängen [\AA]	0,0162
RMS Bindungswinkel [$^\circ$]	5,8874

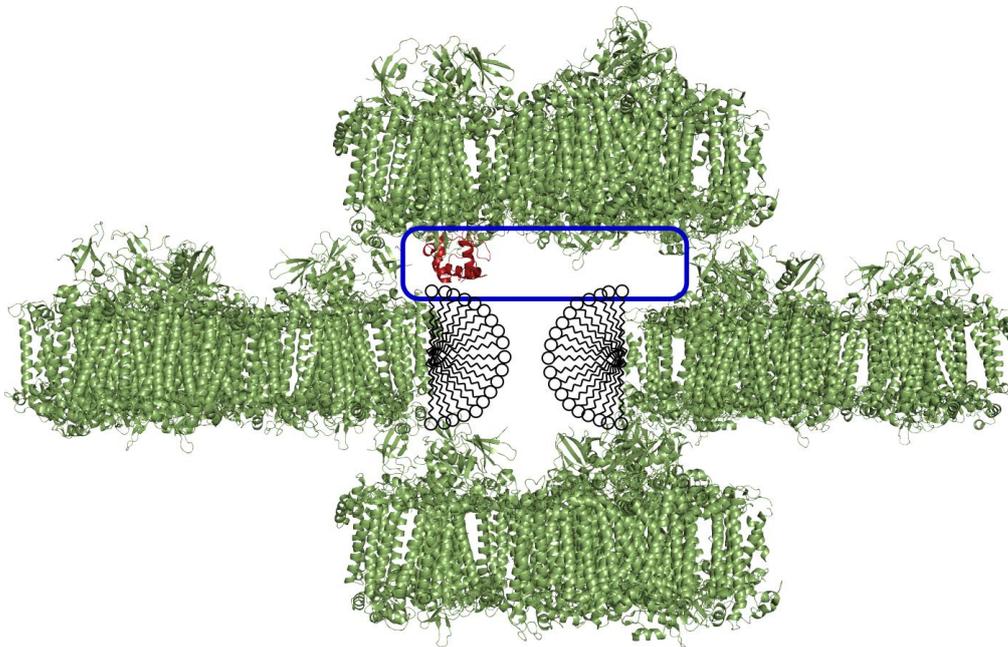


Abbildung 3.30: Darstellung des PSI_{tri}-Kristallgitters (grün) mit schematischem Detergensgürtel und zufällig positioniertem Cyt c_{HH} (rot). 78 % des Kristallvolumens wird von Detergens und Solvens eingenommen. In dem blau markierten Volumen könnte das Cyt c_{HH} lokalisiert sein. Aufgrund der Nähe zum Detergensgürtel befände sich ein gebundenes Cyt c_{HH} in einer sehr flexiblen Umgebung. Das Kristallgitter wurde mit dem symexp-Befehl in PyMOL mit PDB-Code: 1jb0 erstellt (Jordan et al. 2001; Schrödinger, LLC 2015). Die Abbildung wurde Kölsch et al. (2018) entnommen.

3.3.5 Kristallstruktur bei Raumtemperatur (SFX)

Während an Synchrotronstrahlung Makrokristalle tiefgefroren werden, um einen Kristall über 10 min bis 20 min im Strahl zu rotieren, hat es sich für die Messung an einem Röntgen-Freie-Elektronen-Laser (XFEL) etabliert, zehntausende Mikrokristalle mit zufälliger Orientierung nacheinander in den Strahl zu leiten. Das Beugungsbild wird innerhalb von Femtosekunden erstellt, wodurch die Kristallstruktur bei Raumtemperatur ohne Strahlenschäden berechnet werden kann. Diese Art der Messung wird im Folgenden als serielle Femtosekunden-Kritsallografie (SFX) bezeichnet. Die vielen Mikrokristalle ließen sich durch Verdünnen einer PSI_{tri} -Lösung mit einer Lösung niedriger Ionenstärke herstellen (Abbildung 3.31 A). Die Ionenstärke sollte dabei nicht zu gering sein, da die Kristalle sonst nicht größer als $5\ \mu\text{m}$ wurden oder gar verwachsen waren (Abbildung 3.31 C, unten). Die Mikrokristalle wuchsen innerhalb weniger Minuten zu Stäbchen, deren Länge etwa zwei- bis dreimal so groß war wie ihre Breite (Abbildung 3.31 C, oben). Nach spätestens 1 h Kristallwachstum wiesen sie hohle Enden auf. Um die gewünschte Größe zu erreichen, konnte das Wachstum durch Zugabe von salzfreiem Puffer abgestoppt werden. Mit Hilfe eines Phasendiagramms wurde überprüft, ob eine große Anzahl von Mikrokristallen auch durch ein *seeding*-Protokoll hergestellt werden konnte (Abbildung 3.31 A, grüne Punkte). Die zugegebenen Kristallisationskeime wuchsen hierbei ausschließlich zu langen, schmalen Nadeln. Um in den XFEL-Strahl zu gelangen, fließen die Kristalle durch eine meterlange Kanüle. Die langen Kristalle können die Kanüle verstopfen, während sie aufgrund ihrer geringen Breite mit einem geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis streuen. Daher wurden Mikrokristalle genutzt, die in der Nukleationsphase gewachsen waren (Abbildung 3.31 A, rot).

Erste Testmessungen am XFEL-Strahlengang der Linac Coherent Light Source (LCLS) erfolgten mit Kristallen aus $15\ \mu\text{M}$ P_{700} in $13\ \text{mM}$ Na_2SO_4 , die zwei Tage vor der Messzeit angesetzt und in $5\ \text{mM}$ MES-NaOH (pH 6,0) mit 0,02 % DDM gelagert wurden. Die Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von $3,5\ \text{\AA}$, jedoch mit verschmierten Beugungsreflexen. Um eine fehlerfreie Anordnung der Proteine im Kristall zu gewährleisten, wurde für die darauffolgende Messung darauf geachtet, die Kristalle am selben Tag frisch anzusetzen. Auch wurde für ein fehlerfreies Anlagern der Proteine das Kristallwachstum auf seine Geschwindigkeit überprüft (Abbildung 3.31 B). Je niedriger die Proteinkonzentration war, desto langsamer war das Kristallwachstum. Die Kristallisation war gut reproduzierbar, mit Ausnahme der niedrigen Proteinkonzentrationen, mit der die Mehrheit der Ansätze lediglich wenige hundert Kristalle ergaben. In einer zweiten Messung an der LCLS konnte mit Kristallen aus $10\ \mu\text{M}$ P_{700} in $12\ \text{mM}$ Na_2SO_4 ein Datensatz mit einer Auflösung von $2,75\ \text{\AA}$ innerhalb von 102 Minuten gemessen werden (Abbildung 3.32). Alle zwölf Untereinheiten des PSI konnten in der Elektronendichte identifiziert werden. Es wurden 96 Chlorophyll *a*-Moleküle, zwei Phyllochinone, drei Eisen-Schwefel-Zentren, 22 Carotinoide, sechs Lipide und zwei Calciumionen identifiziert. Drei dieser Kofaktoren sind nicht in der Kryokristallstruktur (Kryo-XRD) von 2001 enthalten (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001). Es handelte sich dabei um zwei Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerin(LHG)-Moleküle von PsaI und ein Calciumion von PsaB, welche auch in der elektronenmikroskopischen Struktur vorlagen (Abschnitt 3.3.6). Das zuzügliche Calciumion hob sich mit einer Dichte von $0,5\ \text{e}^- \cdot \text{\AA}^{-3}$ signifikant von den umgebenden Atomen ($0,25\ \text{e}^- \cdot \text{\AA}^{-3}$) ab. Zwischen der Kryo-XRD-Struktur und der SFX-Struktur ließen sich Abweichungen in den Rotameren der Aminosäureseitenketten nachweisen. Diese sind an den exponierten Oberflächen des Proteins lokalisiert. Eine Seitenkette mit einem abweichenden Rotamer

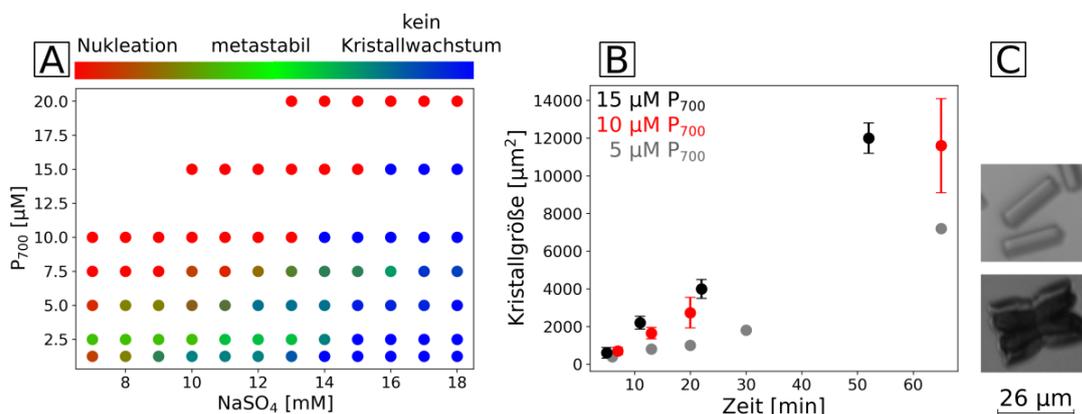


Abbildung 3.31: Kristallwachstum des PSI_{tri} in Lösungen geringer Ionenstärke. A: Für das Phasendiagramm wurde PSI_{tri} mit 5 mM MES-NaOH (pH 6,0) und 0,02 % DDM verdünnt und beobachtet unter welcher Na_2SO_4 -Konzentration Kristallwachstum zu beobachten war (rot). Für die Konzentrationen von 1,25 μM bis 7,5 μM P_{700} wurden zuzüglich Kristallisationskeime zur Lösung gegeben, um die metastabile Phase zu charakterisieren (grün). Die Mischfarben sind Mittelwerte aus Triplikaten, z. B. zeigt ein brauner Punkt an, dass in zwei Ansätzen Kristalle spontan wuchsen, während in einem anderen Ansatz das Wachstum erst durch Kristallisationskeime induziert wurde. B: Wachstumsgeschwindigkeit von Kristallen in der Nukleationsphase für 15 μM P_{700} in 13 mM Na_2SO_4 (schwarz), 10 μM P_{700} in 12 mM Na_2SO_4 (rot) und 5 μM P_{700} in 11 mM Na_2SO_4 (grau). Alle Messungen stellen Triplikate dar, wobei für 5 μM P_{700} nur ein Ansatz kristallisierte. Die Größe ist als Breite mal Länge angegeben. C: Entstandene Kristallformen bei moderaten Ionenstärken (oben, 12 mM Na_2SO_4) und niedrigen Ionenstärken (unten, 7 mM Na_2SO_4). Die Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

ist jedoch in der Umgebung der Elektronentransportkette lokalisiert. Es handelt sich um das Phe_{669} von PsaB , das in einem Abstand von 4 Å vom Phyllochinon $\text{A}_{1\text{B}}$ entfernt ist. In der Kryo-XRD-Struktur (Jordan et al. 2001) und in der kryoelektronenmikroskopischen Struktur (Kryo-EM-Struktur, Abschnitt 3.3.6) ist der aromatische Ring von Phe_{669} parallel zu den Ringen von $\text{A}_{1\text{B}}$. Hier ist Phe_{669} dagegen in einer T-förmigen Anordnung zu $\text{A}_{1\text{B}}$ (Abbildung 3.33). Außerdem ist der B-Faktor (Maß für die Beweglichkeit eines Atoms) von Phe_{669} gegenüber seiner Umgebung erhöht (75 Å² an Phe_{669} gegenüber 60 Å² an $\text{A}_{1\text{B}}$). Das Phe_{689} von PsaA , welches spiegelsymmetrisch zu Phe_{669} ist und mit $\text{A}_{1\text{A}}$ interagiert, ist in der SFX-Struktur dagegen identisch zu den Kryostrukturen. Weitere Informationen zu diesem Datensatz sind in Abschnitt 3.3.8 im Vergleich mit den anderen hier gemessenen PSI-Strukturen erläutert.

Alle bisher gemessenen Strukturen von PSI stammen aus oxidierten Proteinen. In der Zelle liegt PSI im dunkeladaptierten Zustand jedoch in reduzierter Form vor und wird durch Licht oxidiert. Um die Änderungen der Kofaktoren während des Elektronentransfers zu analysieren, wurden Datensätze von reduziertem PSI_{tri} am Spring-8 Angstrom Compact free electron Laser (SACLA) und am Pohang Accelerator Laboratory-XFEL (PAL-XFEL) bei Raumtemperatur gemessen. Das PSI_{tri} wurde dabei durch Natriumascorbat reduziert. Ein Datensatz erfolgte im dunkeladaptierten Zustand, ein weiterer wurde 100 ns nach Belichtung aufgenommen. Die beiden Datensätze streuten jeweils mit einer Auflösung von 3,4 Å. Die isomorphe Differenzdichte zwischen dem belichteten und dem dunkeladaptierten Datensatz weist auf eine Änderung an den Eisen-Schwefel-Zentren F_X und F_A hin (Abbildung 3.34). Dies ist auf eine Reduktion von F_X und F_A zurückzuführen. Die derzeitige Auflösung ist jedoch unzureichend, um

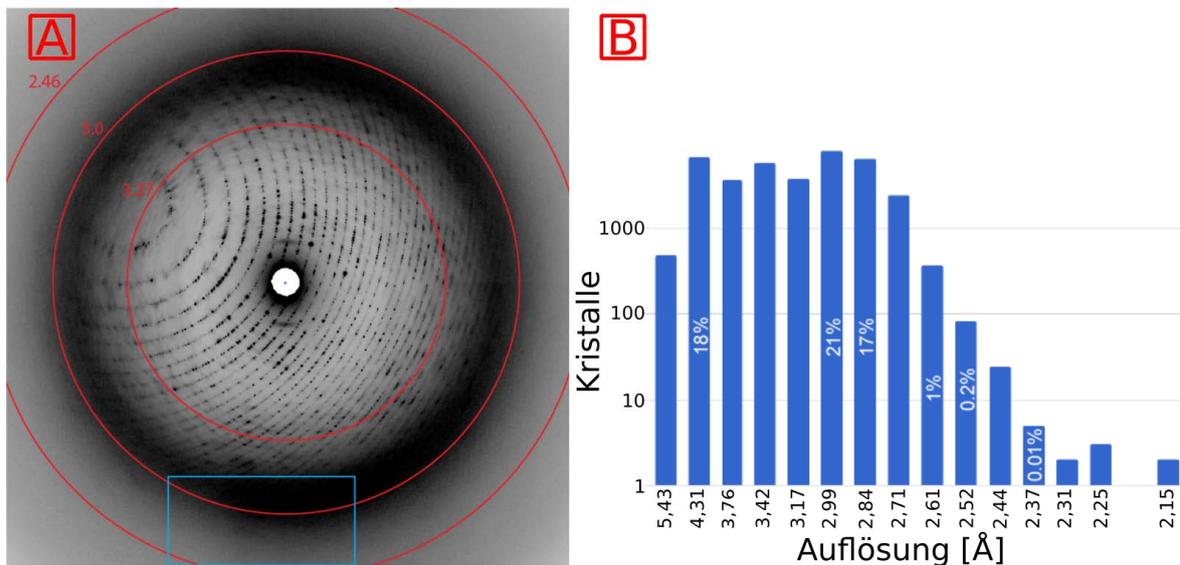


Abbildung 3.32: Röntgenbeugung von PSI_{tri} -Kristallen in einem XFEL-Strahlengang. A: Beugungsbild eines Kristalls. Die Auflösung ist in roten Linien angegeben. B: Statistik zur maximalen Auflösung aller Kristalle des Datensatzes.

Änderungen der Proteinstruktur zu identifizieren. Die Statistik zur Datenauswertung der SFX-Strukturen ist Tabelle 3.7 zu entnehmen. In dieser Tabelle fällt auf, dass der in Pohang gemessene Datensatz (PAL) eine kleinere Einheitszelle aufweist als die drei anderen SFX-Strukturen. Für die Messungen in Pohang wurde PSI tiefgefroren in einem *dry shipper* versandt, der aufgrund unbekannter Ursachen während des Transports aufgetaut und anschließend wieder mit flüssigem Stickstoff mitsamt enthaltenen Proben tiefgekühlt wurde. Ein Einfluss dieser nicht reproduzierbaren Bedingungen auf das Protein ist nicht auszuschließen.

Mittels SFX konnte eine PSI_{tri} -Kristallstruktur ohne $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ mit einer Auflösung von 2,75 Å erreicht werden. Im Rahmen meiner Arbeit ergab die Kryo-XRD-Struktur lediglich Auflösungen von 3,4 Å bis 4,0 Å. Auch Dr. P. Jordan, der sich im Rahmen seiner Dissertation viereinhalb Jahre lang auf die Kristallisation von PSI_{tri} fokussierte, konnte nur einen Kristall mit einer Auflösung von 2,5 Å erzeugen. Sein zweitbesten Kristall wies „nur noch“ eine Auflösung von 2,9 Å auf (Jordan 2001). Die höhere Auflösung der Raumtemperatur-Mikrokristalle spricht für eine bessere Qualität gegenüber den unter Kryobedingungen gemessenen Makrokristallen. Eine höhere Qualität der Kristalle und das Fehlen eines Kryoprotektivums könnten sich auch auf die Bindung des $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ in Kokristallen (Abschnitt 3.3.4) auswirken. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll zur Mikrokristallisation der PSI_{tri} - $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ -Kokristalle entwickelt. Die Kristalle wurden durch Verdünnen einer PSI_{tri} - und $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ -haltigen Lösung (0,02 % DDM und 5 mM MES, pH 6,0) mit $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$ -haltiger (37,5 μM) Lösung von 40 mM auf 5 mM Na_2SO_4 gezüchtet. Das Kristallwachstum wurde nach Erreichen der gewünschten Größe durch Verdünnen mit salzfreier Lösung (37,5 μM $\text{Cyt } c_{\text{HH}}$, 0,02 % DDM und 5 mM MES, pH 6,0) abgestoppt. 30 μm bis 60 μm große Kokristalle sind in Abbildung 3.35 gezeigt. Diese Kokristalle konnten bisher noch nicht an einer XFEL-Strahlenquelle vermessen werden.

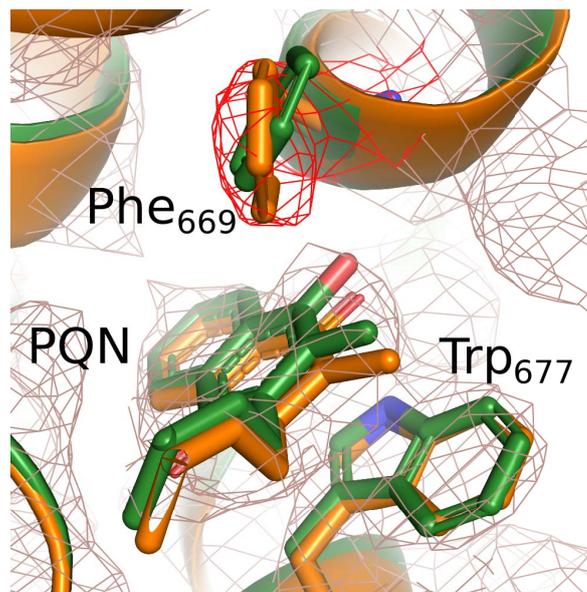


Abbildung 3.33: Orientierung von Phe₆₆₉ an Phyllochinon (PQN). Dargestellt sind die SFX-Struktur (orange) und die Kryo-XRD-Struktur (grün, Jordan et al. 2001) mit Elektronendichte ($2mF^o-DF^c$, $1,5\sigma$) der SFX-Struktur. Die Elektronendichte von Phe₆₆₉ ist in rot hervorgehoben, die restliche Dichte ist in braun dargestellt. Die Abbildung wird in modifizierter Form in Keable et al. (2020, in Vorbereitung) veröffentlicht.

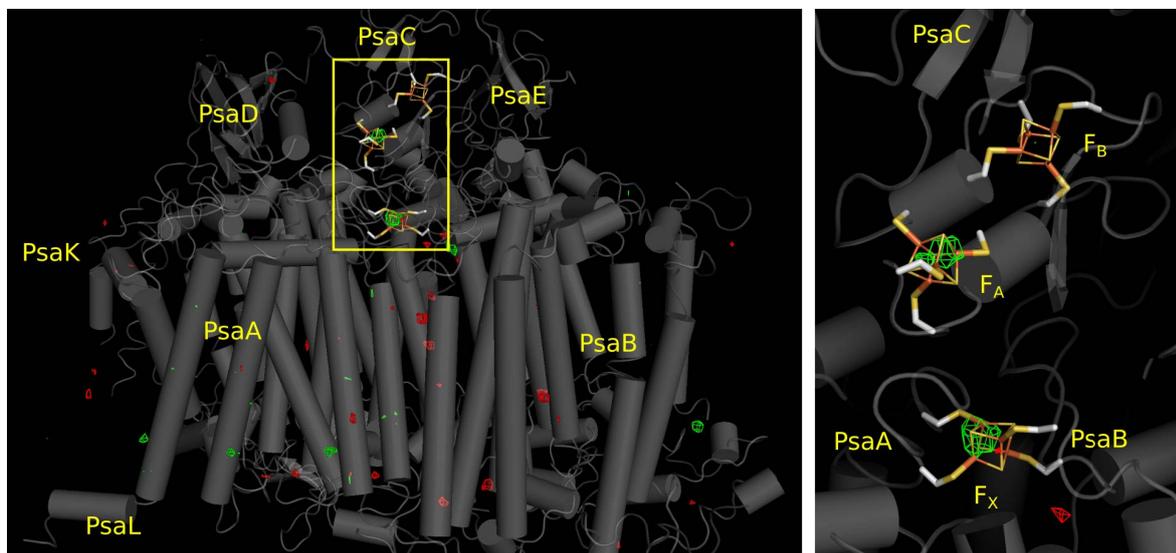


Abbildung 3.34: Änderung der PSI-Struktur nach Belichtung. Dargestellt ist die isomorphe Differenzdichte (F^o-F^o) zwischen dem belichteten Datensatz 4 (siehe Tabelle 3.7) und dem dunkeladaptierten Datensatz 2 bei $+4\sigma$ (grün) und -4σ (rot, links). Das gelbe Rechteck an den Eisen-Schwefel-Zentren ist rechts vergrößert. Die Differenzdichte zwischen den Datensätzen 4 und 2 wurde mit *phenix.fobs_minus_fobs_map* berechnet (Adams et al. 2010) und ist vergleichbar zur isomorphen Differenzdichte zwischen den Datensätzen 4 und 3, welche in Keable et al. (2020, in Vorbereitung) gezeigt wird.

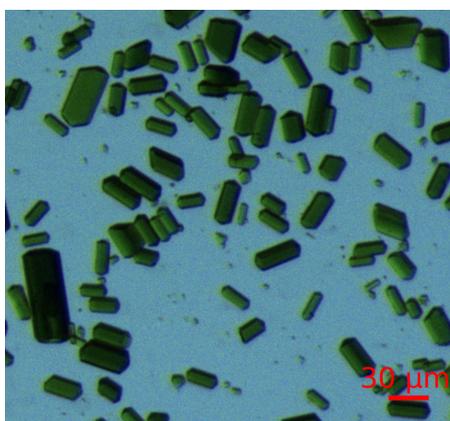


Abbildung 3.35: PSI_{tri}-Cyt_CHH-Mikrokristalle für die SFX-Strukturanalyse an XFEL-Strahlenquellen. PSI_{tri} wurde mit Cyt_CHH durch Verdünnen kokristallisiert. Nachdem die ersten Kristalle eine Größe von 60 μm erreichten (linker Kristall), wurde die Lösung für eine hohe Ausbeute schrittweise mit 37,5 μM Cyt_CHH, 5 mM MES-NaOH (pH 6) und 0,02% DDM verdünnt.

Tabelle 3.7: Parameter der Kristallstrukturanalyse mittels serieller Femtosekunden-Kritsallografie an einem Röntgen-Freie-Elektronen-Laser. Die Tabelle wurde Keable et al. (2020, in Vorbereitung) entnommen.

Datensatz	oxidiert (1)	reduziert (2)	reduziert (3)	belichtet (4)
Datenaufnahme				
Strahlengang	LCLS	PAL	SACLA	SACLA
Wellenlänge [Å]	1	1	1	1
Raumgruppe	P6 ₃	P6 ₃	P6 ₃	P6 ₃
Einheitszelle				
a [Å]	285,3	281,0	285,2	285,7
b [Å]	285,3	281,0	285,2	285,7
c [Å]	166,5	165,2	166,2	166,3
α [°]	90	90	90	90
β [°]	90	90	90	90
γ [°]	120	120	120	120
Auflösung [Å]	2,75	3,6	3,4	3,4
Anzahl der Reflexionen	199 435	101 883	105 571	105 760
Vollständigkeit [%]	97,6 (78,4)	98,7 (88,2)	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)
Multiplizität	467,2 (18,9)	31,6 (2,1)	97,2 (30,1)	60,0 (17,0)
CC _{1/2} [%]	14,3 (2,1)	97,3 (24,5)	92,5 (2,4)	90,3 (0,9)
I/ σ _I	36,2 (0,4)	17,1 (1,4)	9,4 (0,4)	7,0 (0,3)
Modellierung				
R _{work} [%]	25,5	26,2	27,1	24,9
R _{free} [%]	28,9	29,1	31,6	27,8
Atome	48 942	48 841	48 841	48 841
Wasserstoff	24 435	24 435	24 435	24 435
Protein	34 692	34 692	34 692	34 692
Liganden	14 250	14 149	14 149	14 149
B-Faktor (Wilson) [Å ²]	72,2	78,0	120,8	128,0
B-Faktor (Mittel) [Å ²]	98,2	84,9	129,0	138,1
RMS Abweichung				
Bindungslänge [Å]	0,005	0,003	0,003	0,003
Bindungswinkel [°]	0,79	0,69	0,72	0,71
Stöße (<i>clash score</i>)	10,0	9,6	10,6	6,8
Rotamerausreißer	0	0	0	0
Ramachandran-Plot [%]				
<i>favored</i>	91,56	92,28	92,20	92,37
<i>allowed</i>	8,26	7,58	8,66	7,49
<i>outliers</i>	0,18	0,14	0,14	0,14

3.3.6 Hocho aufgelöste Struktur in Lösung (Kryo-EM)

Im Gegensatz zur niedrig aufgelösten Kleinwinkelstreuung kann mittels Elektronenmikroskopie eine hocho aufgelöste Struktur gemessen werden. Die trimere Struktur von PSI_{tri} lies sich gut in einer Negativfärbung erkennen (Abbildung 3.36). Die PSI_{tri} -Partikel banden trotz Glimmentladung überwiegend mit der cytoplasmatischen Seite auf dem Kohlefilm, weshalb die Partikel in der Abbildung in der Aufsicht vorliegen. Da auch löchrige Gitter (*holey grids*) auf einem Kohlefilm basieren, bindet das PSI_{tri} auf dem Film und nur wenige Partikel liegen gelöst in den Löchern vor. Da das Ziel meiner Arbeit die Analyse der Kostruktur von PSI mit Cytochromen ist, wurde das PSI_{tri} mit 100 μM des jeweiligen Cytochroms versetzt und mit Uranylacetat negativ gefärbt. Die Probe wurde auf dem Kohlefilm getrocknet, weshalb es mit der hohen Cytochromkonzentration zu einer Aggregation kam. Auch in *holey grids* waren die Cytochrome in großer Anzahl in der Lösung zu finden, weshalb nicht sichergestellt werden konnte, dass am PSI_{tri} vorliegende Cyt c_{HH} - und Cyt c_6 -Proteine spezifisch gebunden waren. Eine Verringerung der Cytochromkonzentration sollte aufgrund des Bindungsgleichgewichts zu einem verringerten Sättigungsgrad führen. Um überschüssiges Cytochrom zu entfernen, kann PSI_{tri} mit Cytochromen unter Bedingungen mit hoher Affinität quervernetzt werden. Quervernetzen ist in der Elektronenmikroskopie eine übliche Methode, da die Proteine stabilisiert und somit höhere Auflösungen erreicht werden. Die theoretische Modellierung (Abschnitt 3.2.3) weist darauf hin, dass Cyt c_6 mit höherer Spezifität an PSI_{tri} bindet als Cyt c_{HH} ; daher wurden die Messungen mit Cyt c_6 durchgeführt. Für eine spezifische Bindung wurde die Reaktion unter reduzierenden Bedingungen (vgl. Abschnitt 3.2.2) mit Reaktionsmedien, in denen der K_{M} -Wert 10 μM (Cyt c_{HH}) bzw. 30 μM (Cyt c_6) betrug, durchgeführt. Es wurden die Quervernetzer Glutaraldehyd und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) genutzt. PSI_{tri} fiel durch Zugabe von Glutaraldehyd aus. Auch die Dichtegradientenzentrifugation geringer PSI_{tri} -Konzentrationen in einen steigenden Glutaraldehydgradienten (GraFix-Methode) führte zu einer starken Aggregation des PSI_{tri} . Das mit EDC quervernetzte PSI_{tri} war dagegen monodispers. Ebenso waren mit EDC inkubierte Lösungen aus PSI_{tri} und Cyt c_{HH} oder Cyt c_6 monodispers ($R_{\text{H}} = 9 \text{ nm}$ mit Polydispersitätsindex $\leq 10\%$). Durch das Quervernetzen von PSI_{tri} mit Cyt c_{HH} waren in der SDS-PAGE neue Banden mit Massen von 23 kDa und $\geq 80 \text{ kDa}$ zu finden, was für unterschiedlich gebundene Komplexe spricht (Abbildung 3.37). Quervernetzte Komplexe ließen sich an einem Anionenaustauscher nicht signifikant von PSI_{tri} -Komplexen ohne Cyt c_{HH} trennen. Da das hier verwendete Cyt c_6 über einen His-Tag verfügt, konnten quervernetzte PSI_{tri} -Cyt c_6 -Komplexe an einer Ni-NTA-Säule von freiem PSI_{tri} getrennt werden (Abbildung 3.38). Das freie PSI_{tri} band nicht an die Säule, während das quervernetzte PSI_{tri} zusammen mit dem freien Cyt c_6 eluierte. Das freie Cyt c_6 konnte anschließend über Filtration getrennt werden. Die höchste Ausbeute an quervernetztem PSI_{tri} (rechte PSI-Bande in Abbildung 3.38) wurde mit 100 mM NaCl bei 20 °C erreicht (15% bis 25% des eingesetzten PSI_{tri} , $K_{\text{M}} \geq 60 \mu\text{M}$). Eine Erhöhung der Ionenstärke (200 mM MgSO_4) oder eine Verringerung der Temperatur (4 °C) führten zu einer geringeren Ausbeute. Die quervernetzten PSI_{tri} -Cyt c_6 -Partikel waren monodispers mit einem hydrodynamischen Radius von 9 nm. Sie zeigten im Elektronenmikroskop mit Uranylacetatfärbung die typische Struktur des PSI_{tri} . Quervernetzte PSI_{tri} -Cyt c_6 -Partikel wurden auf Kohlefilm schockgefroren und vermessen. Die Prozessierung der Mikrografen und die Generierung der hocho aufgelösten EM-Dichten erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. P. Wendler (Universität Potsdam). In einem ersten Datensatz mit *holey grids* konnten 26 640 Partikel automa-

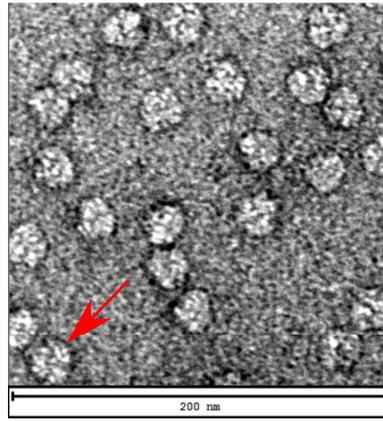


Abbildung 3.36: Elektronenmikroskopische Aufnahme von PSI_{tri} -Partikeln im Negativkontrast. Am Partikel links unten (Pfeil) ist die trimere Form des PSI_{tri} deutlich zu erkennen. $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ PSI_{tri} wurde für 30 s auf einem mit Glimmentladung behandeltem Kohlefilm inkubiert und zweimal mit 2 % Uranylacetat gefärbt.

tisch ausgewählt werden, von denen 4800 für die Erstellung einer 3-D-Rekonstruktion verwendet wurden. Dieser Datensatz ergab lediglich eine Auflösung von 23 \AA . Daher wurde ein Datensatz auf einem Kohlefilm-Grid erstellt. Die 3-D-Klassifizierung ergab eine Klasse mit 118 463 PSI_{tri} -Partikeln. Hierbei konnte eine EM-Dichte von $3,2 \text{ \AA}$ berechnet werden. Für das PSI_{tri} wurde dabei keine Symmetrie vorgegeben. Diese Rekonstruktion wird im Folgenden als C1-Trimer benannt. Um die Auflösung zu erhöhen, wurde eine Rekonstruktion mit Hilfe einer C3-Symmetrie erstellt. Mit C3 wird die dreizählige Rotationssymmetrie beschrieben, wobei hier das Protein identisch zu sich selbst ist, wenn man es um $360^\circ/3$ dreht. Hierbei wurde jedes Monomer im PSI_{tri} als identisch vorgegeben. Das auf diese Weise erstellte C3-Trimer hat eine Auflösung von $3,0 \text{ \AA}$. Eine dritte Rekonstruktion wurde erstellt, indem jedes Monomer im PSI_{tri} als unabhängiges Partikel ausgewertet wurde. Somit konnten dreimal so viele monomere Partikel zur Generierung der 3-D-Rekonstruktion genutzt werden. Ihre Auflösung beträgt $2,9 \text{ \AA}$. Sie wird im Folgenden als PSI_{tri} -Monomer bezeichnet. Die Angaben $2,9 \text{ \AA}$, $3,0 \text{ \AA}$ und $3,3 \text{ \AA}$ beziehen sich dabei auf die Auflösungen, bei denen die *fourier shell correlation* (FSC) $0,143$ beträgt. Die elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen weisen jedoch abweichende lokale Auflösungen auf, bei denen die höchste Auflösung in der Mitte des Proteins liegt (Abbildung 3.39). Das C3-Trimer ist daher gut geeignet, um Bereiche in der Mitte des Trimers zu analysieren, und das PSI_{tri} -Monomer kann genutzt werden, um die außen liegenden Untereinheiten zu charakterisieren.

Die EM-Dichten sind in Abbildung 3.39 dargestellt. Alle zwölf Untereinheiten des PSI sind zu erkennen. Die Rekonstruktion des PSI_{tri} -Monomers weist eine zuzügliche EM-Dichte an der Trimerisierungsoberfläche, insbesondere an der Trimerisierungsuntereinheit PsaL, auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich hier nicht um ein freies Monomer handelt. Die zuzügliche Dichte stammt von benachbarten Monomeren, die nicht vollständig maskiert wurden. Eine Dichte für Cyt c_6 konnte in diesen hochaufgelösten Rekonstruktionen jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Folgenden soll zuerst die hochaufgelöste Struktur des PSI erklärt werden. Eine nähere Untersuchung des gebundenen Cyt c_6 erfolgt in Abschnitt 3.3.7.

In der Kristallstruktur ist die asymmetrische Einheit ein PSI_{tri} -Monomer, weshalb alle Monomere im Trimer identisch sind. Auch im asymmetrischen C1-Trimer sind die drei Monomere sehr symmetrisch. Die drei Monomere des C1-Trimers unterscheiden sich um $0,26 \text{ \AA}$ (*root mean square deviation*), wobei die größten Abweichungen des

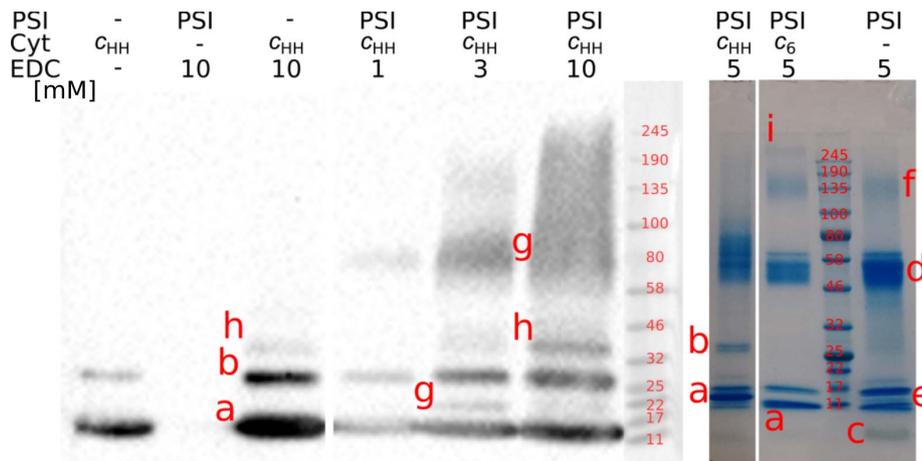


Abbildung 3.37: Western Blot (links) und SDS-PAGE (rechts) von PSI_{tri} nach Zugabe eines Carbodiimid-Quervernetzers (EDC, Angaben in mM). Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen α -Cyt *c*-Antikörper analysiert. a: freie Cytochrome, b: dimeres Cytochrom, c: Chlorophylle, d: PsaA und PsaB, e: kleine PSI-Untereinheiten, f: Aggregate aus PSI-Untereinheiten, g: an PSI gebundenes Cyt c_{HH} (22 kDa und ≥ 80 kDa), h: durch Quervernetzen entstandene Cyt c_{HH} -Aggregate (37 kDa), i: in PSI_{tri} mit Cyt c_6 entstehende Bande hoher molekularer Masse. Es wurden jeweils $10 \mu\text{M}$ P₇₀₀ und $10 \mu\text{M}$ Cytochrom mit 1 mM bis 10 mM EDC für 45 min in 25 mM Tricin (pH 8,0) mit 0,02 % DDM quervernetzt. Für Cyt c_6 wurde zuzüglich 100 mM NaCl und 5 mM Natriumascorbat zugegeben.

Proteinrückgrats ($1,5 \text{ \AA}$) in den Proteinschleifen mit der geringsten lokalen Auflösung (4 \AA) liegen. Es konnte kein Unterschied in der Kofaktorzusammensetzung der drei Monomere nachgewiesen werden. Der EM-Dichte des PSI_{tri} -Monomers wurden 97 Chlorophylle, zwei Phyllochinone, drei Eisen-Schwefel-Zentren, 24 Carotinoide, sechs Lipide und zwei Calciumionen zugeordnet. Sechs dieser Kofaktoren – ein Chlorophyll, zwei Carotinoide, zwei Lipide und ein Calciumion – waren in der Kryo-XRD-Struktur (Jordan et al. 2001) nicht identifiziert worden; ihre Lokalisierung ist in Abbildung 3.40 gezeigt. Die beiden Lipide und das Calciumion wurden auch in der SFX-Struktur nachgewiesen (Abschnitt 3.3.5). Das Calciumion wird von der Untereinheit PsaB durch die Seitenketten Asp₁₃₃, Glu₂₀₂ und His₂₀₅ koordiniert. Eine weitere Koordinierung kann durch Wassermoleküle erfolgen; diesen konnte hier jedoch keine EM-Dichte zugeordnet werden. Die beiden zuzüglichen Carotinoide sind in PsaA und PsaK an der membran zugewandten Seite lokalisiert. In beiden Fällen konnte nur eine Hälfte des Carotinoidmoleküls gelöst werden, die andere Hälfte ragt in die Membran hinein und ist daher sehr flexibel. Auch in der Kristallstruktur ist ein Carotinoidmolekül nur zur Hälfte modelliert: Carotinoid BCR₄₀₀₉ von PsaB ragt ebenfalls in die Membran hinein. Die fehlende Hälfte dieses Carotinoidmoleküls konnte hier vervollständigt werden. Eine erhöhte Flexibilität in der Membran zeigt sich auch bei Carotinoid BCR₄₀₀₅ von PsaB. Das membranständige Ende dieses Carotinoidmoleküls ist in der Kryo-XRD-Struktur im Vergleich zu den drei elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen unterschiedlich lokalisiert. Im Kontaktbereich der drei Monomere sind viele längliche EM-Dichten senkrecht in der Membranebene zu erkennen. Hierbei handelt es sich voraussichtlich um die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten von Lipiden und Detergensmolekülen. Die Kryo-XRD-Struktur (Jordan et al. 2001) benennt vier Lipide, hier konnten zwei weitere LHG-Moleküle anhand der zusammenhängenden Kohlenwasserstoffketten an PsaI identifiziert werden. Weitere EM-Dichten wiesen verzweigte Ketten auf, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich ebenfalls um weitere Lipide handelt. Eine Zuord-

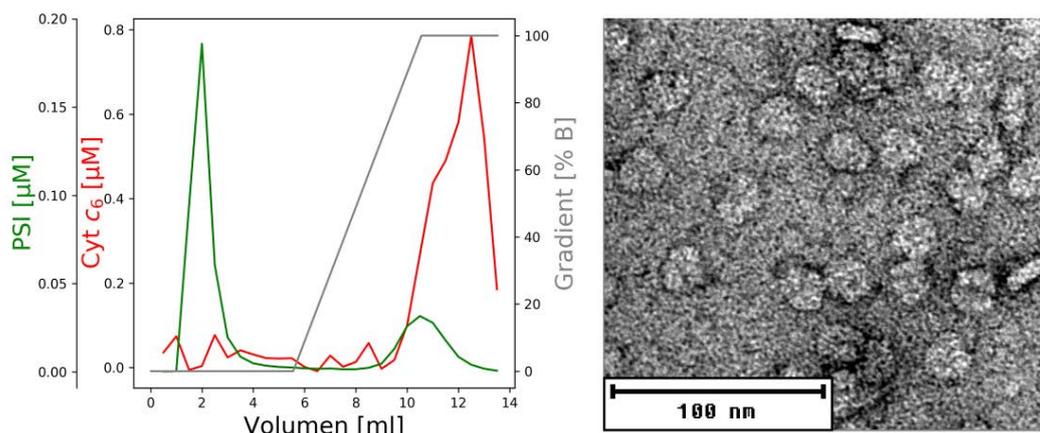


Abbildung 3.38: Isolation quervernetzter PSI_{tri} -Cyt c_6 -Partikel. Links: Chromatogramm einer 1 ml-Ni-NTA-Säule. Die Elution des PSI_{tri} (grün) und Cyt c_6 (rot) wurde anhand der Absorption von 553 nm und 680 nm in Anwesenheit von 5 mM Natriumascorbat bestimmt. PSI_{tri} ohne His-Tag eluierte nach 1 ml bis 3 ml, während kovalent an Cyt c_6 gebundenes PSI_{tri} nach 9 ml bis 12 ml eluierte. Ungebundenes Cyt c_6 eluierte nach 9 ml bis 14 ml. Rechts: elektronenmikroskopische Aufnahme der quervernetzten PSI_{tri} -Partikel nach Uranylacetatfärbung.

nung dieser EM-Dichten zu einem Kofaktor gelang aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der hydrophilen Kopfgruppen nicht. An der Untereinheit PsaF liegt eine planare EM-Dichte vor, deren Größe einem Porphyrinring entspricht. Dieser Dichte wurde ein Chlorophyll a -Molekül (CLA_{1304}) zugeordnet. Das Chlorophyll ist in einem Abstand von 4 Å über π -Stacking mit dem Aren eines Tyrosins (Tyr_{72}) gebunden. Neben der Ergänzung von Kofaktoren ermöglichten es die elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen, weitere kleinere Änderungen am PSI-Modell von *T. elongatus* durchzuführen. Der N-Terminus von PsaA wurde um drei Aminosäuren erweitert, eine Proteinschleife in PsaA wurde durch Ergänzung der Aminosäuren 263 bis 265 vervollständigt, die letzten drei Aminosäuren des C-Terminus von PsaB wurden vervollständigt, der C-Terminus von PsaE wurde um eine Aminosäure erweitert, der N-Terminus der Untereinheiten PsaI und PsaJ wurde jeweils um ein N-Formylmethionin ergänzt, der N-Terminus von PsaL wurde um eine Aminosäure erweitert und der C-Terminus von PsaX wurde um drei Aminosäuren ergänzt. Außerdem wurden in 23 Chlorophyll a -Molekülen die Phytyleste vervollständigt und in sechs weiteren Phytylesten wurden Atome ergänzt. Demgegenüber wurden zwei N-terminale Aminosäuren von PsaX sowie drei Phytyleste, welche im Modell der Kristallstruktur enthalten sind, nicht in den elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen gefunden. Ein deutlicher Unterschied in der Qualität der drei Kryo-EM-Strukturen gegenüber der Kryo-XRD-Struktur betrifft die Untereinheit PsaK. Diese liegt im Modell der Kryo-XRD-Struktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001) nur als zwei unvollständige Transmembranhelices mit Poly-Alanin-Rückgrat vor. In der Rekonstruktion des PSI_{tri} -Monomers kann sie dagegen nahezu vollständig beschrieben werden. PsaK ist eine Transmembranuntereinheit aus 83 Aminosäuren, welche zwei Transmembranhelices ausbildet. Sie befindet sich an der Außenseite des PSI_{tri} (vgl. Abbildung 1.3), weshalb sie am besten in die EM-Dichte des PSI_{tri} -Monomers modelliert werden konnte. Die lokale Auflösung beträgt hier 3,2 Å. Lediglich die ersten vier N-terminalen Aminosäuren sind nicht gelöst und 84 % der Aminosäuren konnten inklusive ihrer Seitenketten durch die EM-Dichte beschrieben werden. Auch die Schleife, die die beiden Helices verbindet

(Aminosäuren 32 bis 55), konnte somit modelliert werden. In dieser Schleife befindet sich die hydrophobe Sequenz Leu-Pro-Ile-Ala-Leu-Pro-Ala-Leu-Phe (Aminosäuren 43 bis 51). Diese hydrophobe Schleife streckt sich vom Protein weg in die Membranebene und wird durch eine Salzbrücke der Aminosäure Glu₅₂ mit Arg₃₁ stabilisiert (Abbildung 3.41).

17 Chlorophyll *a*-Moleküle weisen eine EM-Dichte auf, die sich vom Magnesiumion aus der Porphyrinebene herausstreckt. In der Kryo-XRD-Struktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001) sind an diesen Positionen Wassermoleküle zu finden, weshalb auch hier Wassermoleküle in die EM-Dichte modelliert wurden. In elektronenmikroskopischen Strukturen ist es unüblich, Wassermoleküle zu modellieren. Da die EM-Dichten der drei elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen jedoch sehr gut definiert sind und Bereiche mit hoher lokaler Auflösung vorliegen, wurden in meiner Arbeit Wassermoleküle modelliert. Die Wassermoleküle wurden automatisiert in unbesetzte EM-Dichten des PSI_{tri}-Monomers gelegt. Erstellte Wassermoleküle wurden aus Bereichen, in denen die Aminosäureseitenketten nicht eindeutig durch die EM-Dichte definiert waren, gelöscht. Um EM-Dichten des Wassers von Rauschen zu unterscheiden, wurden die Wassermoleküle des PSI_{tri}-Monomers in die Dichte des C3-Trimers gelegt. Alle Wassermoleküle, die nicht in beiden PSI-Rekonstruktionen vorlagen, wurden aus den Modellen entfernt. Auf diese Weise konnten 217 Wassermoleküle identifiziert werden. Um diese Wassermoleküle zu verifizieren, wurde die EM-Dichte des PSI_{tri}-Monomers und die des C3-Trimers in eine Ladungsdichte transformiert (Wang 2017). Auch in der Ladungsdichte konnten die Wassermoleküle nachgewiesen werden. Sie sind im Proteininneren oder in Vertiefungen an der Proteinoberfläche gebunden. Die Kristallstruktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001) weist mit 201 Wassermolekülen eine vergleichbare Anzahl auf. 99 dieser Wassermoleküle sind in der Kryo-XRD-Struktur und in der Kryo-EM-Struktur identisch lokalisiert (Abbildung 3.42). Besonders entlang der Elektronentransportkette stimmen die Positionen der Wassermoleküle zwischen beiden Strukturen überein. Dagegen unterscheidet sich die Bindung der Wassermoleküle an der cytoplasmatischen Oberfläche, an der die Ferredoxinbindungsstelle vorliegt.

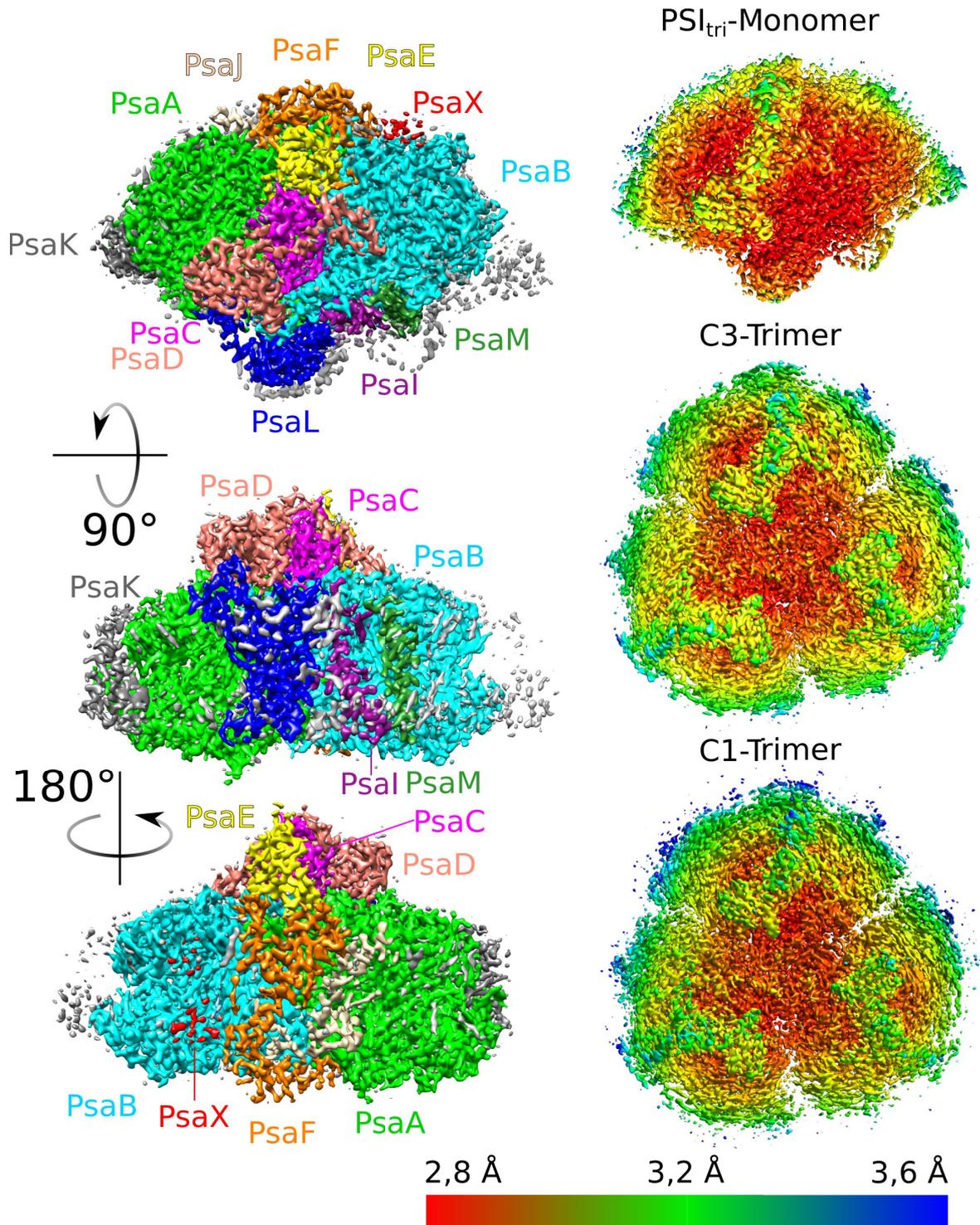


Abbildung 3.39: Elektronenmikroskopischen Rekonstruktion von PSI. Links: EM-Dichte des PSI_{tri}-Monomers mit farblicher Darstellung der Untereinheiten. Die Untereinheit PsaX (rot) ist in dieser Darstellung nur teilweise sichtbar, da sie eine geringere Dichte als die umgebenden Untereinheiten aufweist. Hellgraue Dichten (siehe Trimerisierungszone von PsaB bis PsaL) stammen von benachbarten Monomeren, welche nicht vollständig maskiert wurden. Rechts: lokale Auflösung der drei Rekonstruktionen. Das PSI_{tri}-Monomer und die beiden Trimere sind nicht im selben Maßstab dargestellt. Die Abbildung wird modifiziert in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

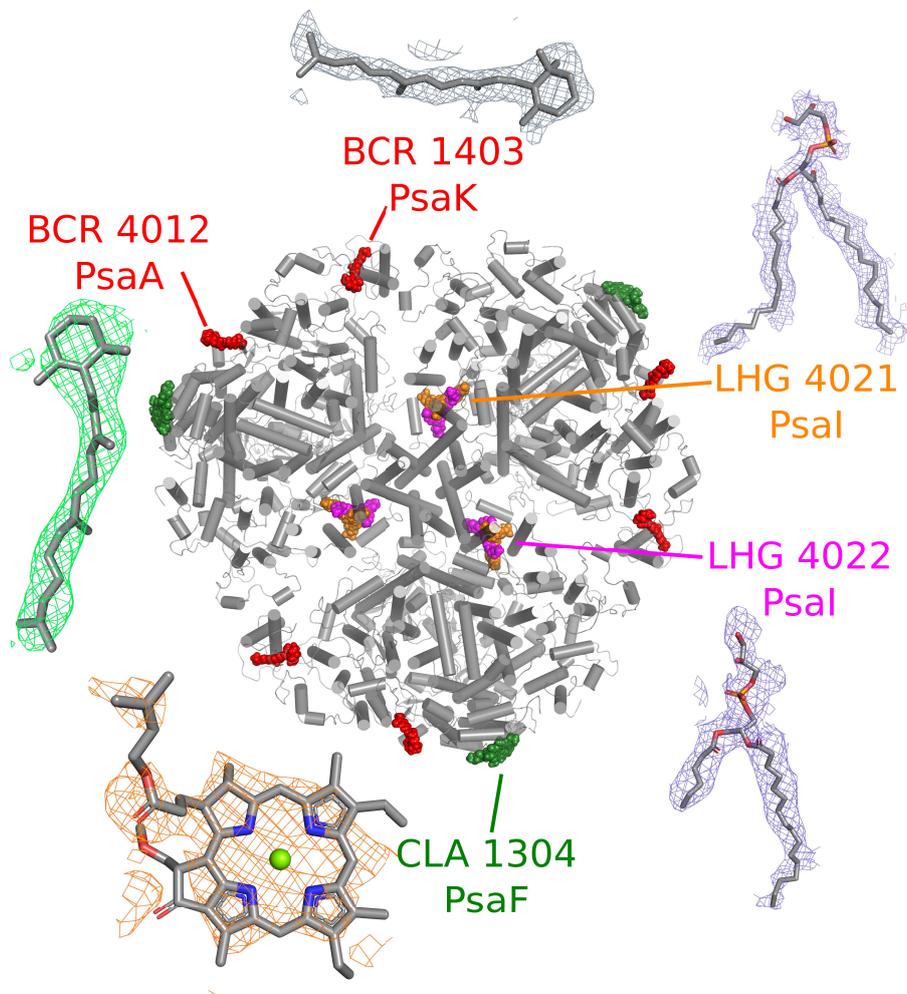


Abbildung 3.40: Zuzügliche Kofaktoren, die in der elektronenmikroskopischen Analyse nachgewiesen werden konnten. Die Lokalisierung ist anhand des PSI_{tri} dargestellt. Die EM-Dichten sind in den Farben ihrer jeweiligen Untereinheiten angegeben (Abbildung 3.39). Alle EM-Dichten wurden dem PSI_{tri} -Monomer mit 4σ (CLA_{1304}), $5,5\sigma$ (BCR_{4012}), 7σ (BCR_{1403}), 2σ (LHG_{4021}) und $1,5\sigma$ (LHG_{4022}) entnommen. Die Abbildung wird modifiziert in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

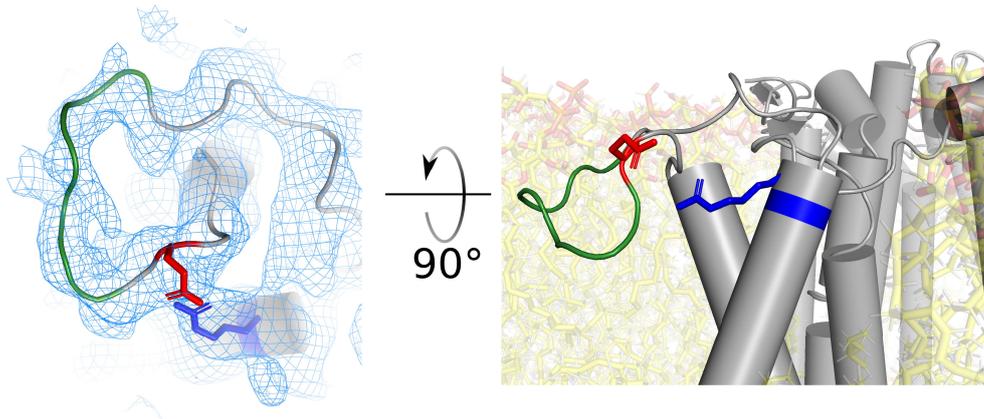


Abbildung 3.41: Hydrophobe Schleife (grün) der Untereinheit PsaK. Links: Cytoplasmatische Ansicht auf die EM-Dichte (blau) und das Modell des PSI_{tri} -Monomers. Rechts: Ansicht aus der Membranebene auf die Cytoplasmatische Seite von PsaK. Die Salzbrücke zwischen Arg₃₁ und Glu₅₂ ist in blau und rot dargestellt. Zur Veranschaulichung der Membranebene wurde eine Palmitoyl-oleoyl-Phosphatidylglycerid (POPG)-Membran (gelb) mittels CHARMM simuliert (Jo et al. 2008).

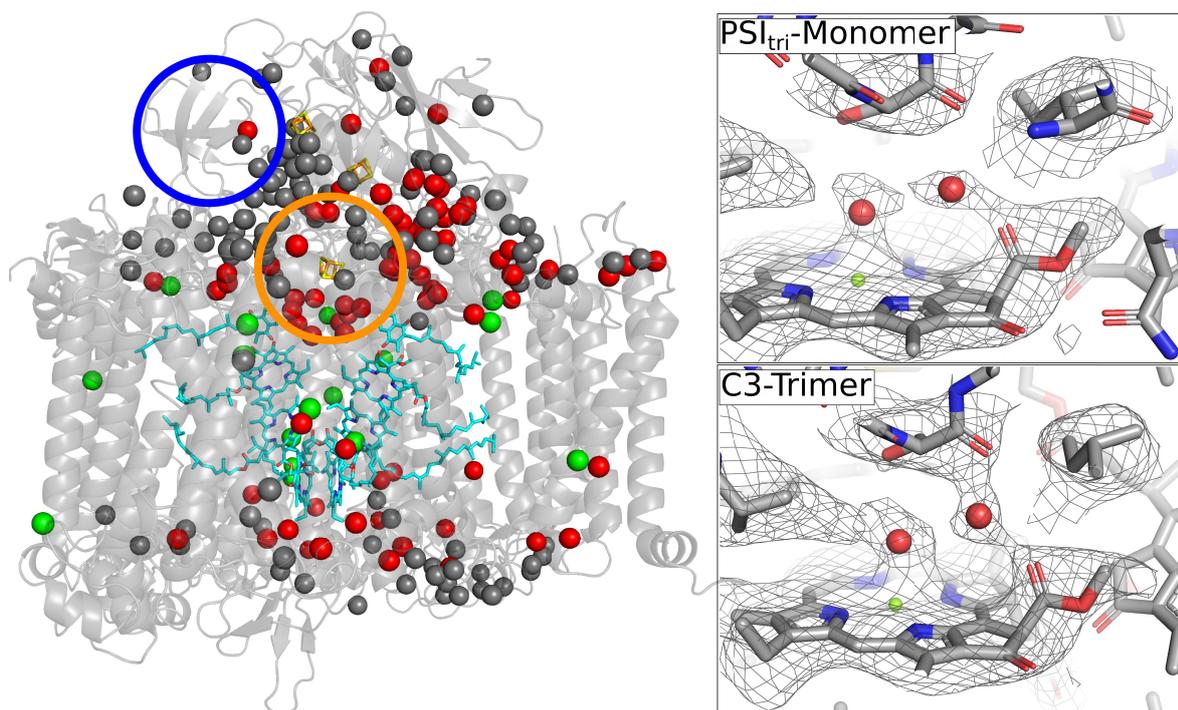


Abbildung 3.42: Wassermoleküle in der Kryo-EM-Struktur. Links ist eine Übersicht über das PSI_{tri} -Monomer gegeben. An Chlorophyllen koordinierte Wassermoleküle sind in grün, Wassermoleküle die identisch zur Kryo-XRD-Struktur (Jordan et al. 2001) in rot und neue Wassermoleküle in grau dargestellt. Der orange Kreis verdeutlicht die Wassermoleküle in 10 Å Abstand zum Eisen-Schwefel-Zentrum F_X und der blaue Kreis entspricht der Bindungsstelle für Ferredoxin. Rechts sind zwei ausgewählte Wassermoleküle an Chlorophyll CLA₁₁₂₄ von PsaA in der Kryo-EM-Struktur des PSI_{tri} -Monomers (oben, 8 σ) und des C3-Trimers (unten, 5 σ) gezeigt.

Tabelle 3.8: Elektronenmikroskopische Datenaufnahme und Modellierungsstatistik. Die Daten wurden Kölsch et al. (2020, eingereicht) entnommen.

	C1-Trimer	C3-Trimer	PSI _{tri} -Monomer
Datenaufnahme			
Vergrößerung	31 000		
Spannung [kV]	300		
Strahleneinwirkung [$e^- \cdot \text{Å}^{-2}$]	60		
Unterfokus [μm]	0,7–2,6		
Pixelgröße [Å]	0,628		
Anzahl Partikel			
initial	511 337		
final	188 384		
Auflösung			
FSC 0,143	3,16	2,98	2,85
<i>map sharpening B-factor</i> [Å^2]	–79	–96	–69
Modellierung			
Anzahl Atome	151 149	151 748	50 584
Wasserstoff	76 158	76 157	25 387
Protein	105 756	105 755	35 254
Ligand	45 393	45 993	15 330
B-Faktor [Å^2]			
Protein	5,8	6,5	19,9
Ligand	6,3	7,4	17,8
RMS Abweichung			
Bindungslänge [Å]	0,007	0,007	0,004
Bindungswinkel [$^\circ$]	1,581	1,089	0,631
MolProbity	2,38	1,95	1,59
Stöße (<i>clash score</i>)	6,5	6,4	5,0
Rotamerausreißer	4,75	1,42	0,05
Ramachandran-Plot [%]			
<i>favored</i>	91,24	92,08	95,35
<i>allowed</i>	8,76	7,92	4,65
<i>outliers</i>	0	0	0
Datenbank			
PDB-Code:	6TRD	6TRC	6TRA
EMDB-Code:	10559	10558	10557

3.3.7 Struktur des PSI-Cyt c_6 -Komplexes in Lösung

Obwohl Cyt c_6 an PSI_{tri} gebunden vorlag, war in diesen drei Rekonstruktionen keine EM-Dichte des Cyt c_6 nachweisbar. Es ist daher anzunehmen, dass das Cyt c_6 unspezifisch am PSI_{tri} band und, ähnlich wie der Detergensgürtel um das PSI_{tri}, nicht aufsummiert wurde. Um gezielt eine Dichte des Cyt c_6 nachzuweisen, wurde daher der gesamte Datensatz mit Suchmasken auf der luminalen Seite neu klassifiziert. Auch in diesen Klassifikationen wies die Mehrheit der Daten ($\geq 80\%$) keine Dichte für Cyt c_6 auf. Allerdings traten auch Klassen auf, die bis zu 6,6% der Daten beinhalteten und zuzügliche Dichten an der luminalen Seite aufwiesen. Eine solche Maske und ihre resultierende 3-D-Klasse ist in Abbildung 3.43 dargestellt. Aus dieser Klasse konnte eine niedrig aufgelöste EM-Dichte (8 Å) für ein PSI_{tri}-Monomer rekonstruiert werden (Abbildung 3.43, rechts). Diese EM-Dichte kann mit einem Komplex aus PSI mit einem in der Nähe von P₇₀₀ gebundenen Cyt c_6 beschrieben werden. Auch auf der cytoplasmatischen Seite von PSI konnten Klassen mit zuzüglicher Dichte durch Suchmasken erstellt werden (Abbildung 2 im Anhang). Das Cyt c_6 wurde demnach sowohl auf der luminalen als auch auf der cytoplasmatischen Seite mit dem PSI quervernetzt.

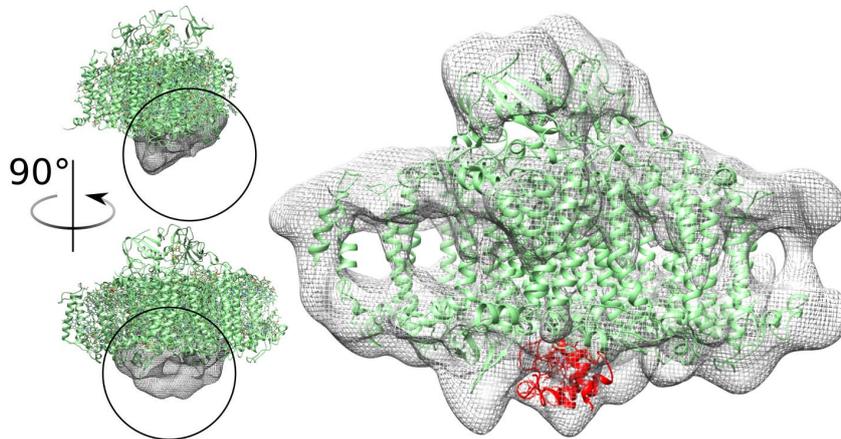


Abbildung 3.43: Spekulative elektronenmikroskopische Rekonstruktion des PSI-Cyt c_6 -Komplexes. Mit Hilfe einer luminalen Maske (schwarzer Kreis) wurde während der 3-D-Klassifikation nach zuzüglicher luminaler Dichte gesucht (links). Aus den resultierenden 3-D-Klassen können elektronenmikroskopische Rekonstruktionen mit einer niedrigen Auflösung erstellt werden. Hier ist eine Rekonstruktion mit einer Auflösung von 8 Å gezeigt, in die das Modell des PSI_{tri}-Monomers (grün) und des Cyt c_6 (rot) aus Abschnitt 3.2.3 eingefügt werden kann (rechts). Durch die luminalen Maske wird eine sehr genaue Suchvorgabe an den Datensatz angelegt, weshalb die Gefahr einer Fehlinterpretation besteht und diese Rekonstruktion nur als ein hypothetisches Modell anzusehen ist.

3.3.8 Geometrie des trimeren PSI

Die Struktur des trimeren PSI aus *T. elongatus* wurde bereits 2001 durch Kryokristallstrukturanalyse (Kryo-XRD) bei 2,5 Å gelöst (Jordan et al. 2001). In meiner Arbeit wurde die Struktur zuzüglich mittels Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) und serieller Femtosekunden-Kritsallografie (SFX) untersucht. Alle drei Strukturen stammen aus trimerem PSI desselben Organismus, der unter identischen Bedingungen kultiviert wurde. Trotzdem lassen sich mit diesen drei Messungen Unterschiede in Größe und Geometrie des PSI_{tri} erkennen. Aus den Modellen der hochaufgelösten Strukturen wurden Gyrationradien berechnet (Tabelle 3.9). Das Monomer innerhalb des

Tabelle 3.9: Gyrationradien der Trimere und der Monomere im Trimer von PSI, welche mit drei hochauflösenden Methoden analysiert wurden. Die Radien wurden mittels PyMOL anhand der Modelle ¹PSI_{tri}-Monomer der Kryo-EM, ²C3-Trimer der Kryo-EM, ³oxidierte Struktur der SFX und ⁴PDB-Code 1jb0 (Jordan et al. 2001) berechnet. Für die Berechnung der Gyrationradien wurden ausschließlich Atome genutzt, die in allen vier Strukturen vorkommen.

	Kryo-EM	SFX	Kryo-XRD
Radius PSI _{tri} -Monomer [Å]	41,3 ¹	41,3 ³	40,8 ⁴
Radius Trimer [Å]	68,3 ²	68,8 ³	68,2 ⁴

PSI-Trimern (PSI_{tri}-Monomer) weist unterschiedliche Gyrationradien auf. Das PSI_{tri}-Monomer der Kryo-XRD-Struktur ist kleiner als das der beiden anderen Strukturen. Legt man die drei Strukturen übereinander, sind die Unterschiede kaum zu erkennen. Die Expansion der Kryo-EM- und der SFX-Struktur gegenüber der Kryo-XRD-Struktur ist gleichmäßig über das Monomer verteilt, sodass sie nur an den distalen Untereinheiten sichtbar wird. Dagegen unterscheiden sich die Gyrationradien der Trimere der Kryo-EM- und der Kryo-XRD-Struktur nur geringfügig. Am größten ist der Gyrationradius des Trimers in der SFX-Struktur. Der Unterschied zwischen der SFX-Struktur und der Kryo-XRD-Struktur basiert auf einer Expansion des Proteins entlang der Membranebene. Diese Expansion korreliert mit der Größe der Einheitszelle, deren a- und b-Achsen, die parallel zur Membranebene liegen, von 281 Å in der Kryo-XRD-Struktur auf 285,3 Å in der SFX-Struktur zunehmen. Die von Jordan et al. (2001) gemessene Einheitszelle ließ sich im Rahmen dieser Arbeit bestätigen: Alle unter Kryobedingungen gemessenen PSI-Kristalle wiesen in der a- und der b-Achse eine Länge von 281 Å bis 282 Å auf. Auch die Kryo-EM-Struktur ist gegenüber der Kryo-XRD-Struktur entlang der Membranebene expandiert. Hierbei erfährt das Trimer jedoch nur eine geringe Expansion, stattdessen rücken die drei Monomere näher zusammen. Dieses Zusammenrücken führt auch zu einem geringeren Abstand von Kofaktoren zwischen benachbarten Monomeren. Dies ist insbesondere an der Kontaktstelle zwischen PsaK des einen Monomers und PsaB des benachbarten Monomers zu erkennen (Abbildung 3.44). Der Mg-Mg-Abstand zwischen Chlorophyll 1401 von PsaK und Chlorophyll 1212 von PsaB beträgt 20,0 Å in der Kryo-XRD-Struktur, 20,2 Å in der SFX-Struktur und nur 15,8 Å in der Kryo-EM-Struktur. Nicht nur die Größe und der Abstand der drei Monomere unterscheiden sich zwischen den drei hochaufgelösten Strukturen, sondern auch der Winkel, in dem sie zueinander liegen (Abbildung 3.45). In allen PSI_{tri}-Strukturen sind die drei Monomere zur cytoplasmatischen Seite hin gebogen. Diese Biegung ist in der Kryo-XRD-Struktur (8°) signifikant größer als in der Kryo-EM- (2°) oder der SFX-Struktur (4°). Auch diese Biegung wirkt sich auf die Abstände der Kofaktoren zwischen benachbarten Monomeren aus. In der Kryo-EM-Struktur, die am wenigsten gebogen ist, ist der durchschnittliche Abstand zwischen den luminalen Chlorophyllen 0,7 Å geringer als in der Kryo-XRD-Struktur. Die Abstände der Chlorophylle haben einen Einfluss auf die Kinetik des Exzitonenergieertransfers. Aber auch die Kofaktoren, die an der Ladungstrennung und dem Elektronentransfer beteiligt sind, weisen unterschiedliche Abstände auf (Tabelle 3.10). Während zwischen der SFX-Struktur und der Kryo-XRD-Struktur nur geringe Unterschiede in der Lokalisation und den Abständen der Kofaktoren der Elektronentransportkette vorliegen, sind die Abstände der Kofaktoren in der Kryo-EM-Struktur signifikant erhöht.

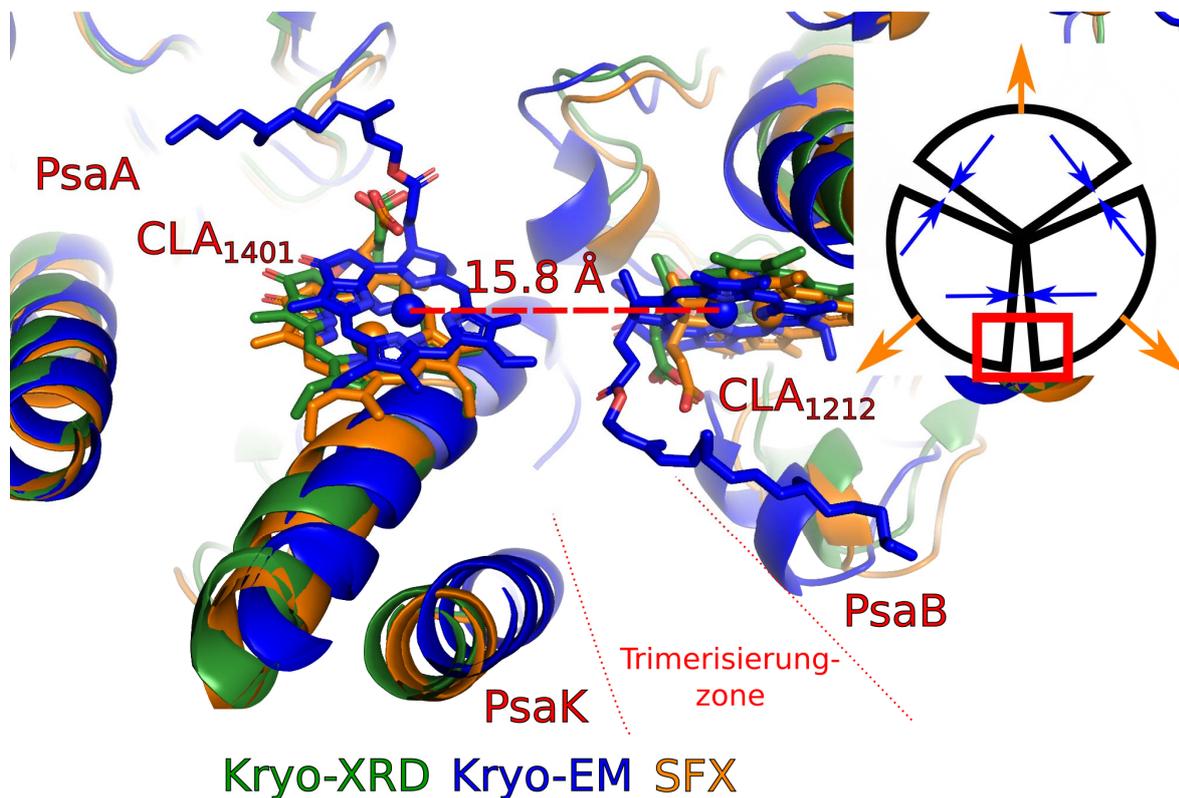


Abbildung 3.44: Expansion der PSI-Monomere und ihr Einfluss auf den Abstand von Kofaktoren. Der Kontaktbereich zwischen PsaK eines Monomers (links) und PsaB des benachbarten Monomers (rechts) ist für die Kryo-XRD- (grün, Jordan et al. 2001), die Kryo-EM- (blau, C3-Trimer) und die SFX-Struktur (orange) gezeigt. Die Untereinheiten PsaK und PsaB, inklusive ihrer Chlorophylle CLA₁₄₀₁ und CLA₁₂₁₂, sind in der Kryo-EM-Struktur signifikant näher zusammen als in den beiden Kristallstrukturen. Der betrachtete Ausschnitt ist im Schema des PSI_{tri} rechts oben als rotes Viereck hervorgehoben. Die Pfeile stellen schematisch die Expansion der Kryo-EM- (blau) und der SFX-Struktur (orange) gegenüber der Kryo-XRD-Struktur dar. Die Abbildung wird in modifizierter Form in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

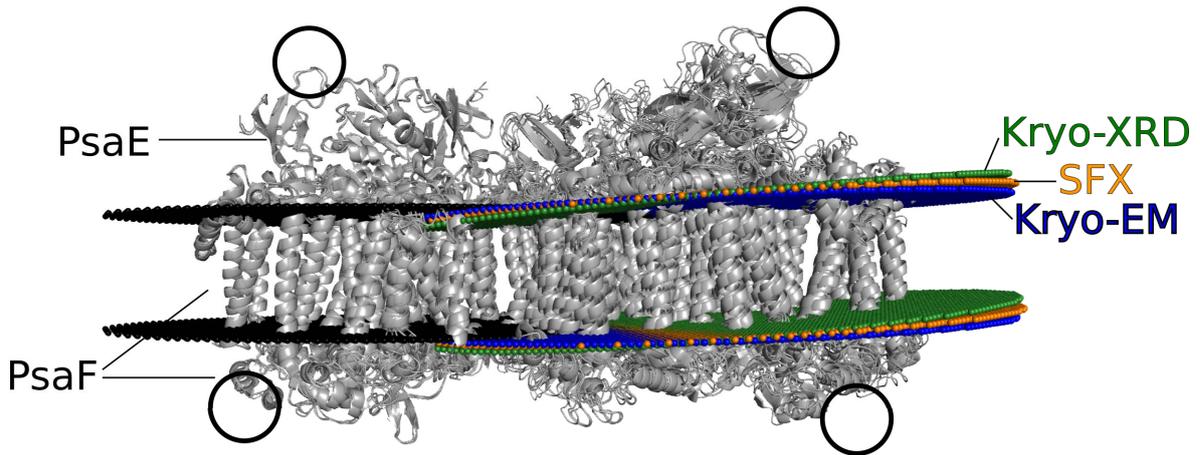


Abbildung 3.45: Unterschiedliche Winkel in der Membranebene der PSI-Trimere. Die Trimere der Kryo-EM-, der SFX- und der Kryo-XRD-Struktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001) wurden auf dem linken Monomer übereinandergelegt um den Winkel zum rechten Monomer zu verdeutlichen. Die Membranebene des linken Monomers ist in schwarz dargestellt und die des rechten Monomers in blau (Kryo-EM-Struktur), in orange (SFX-Struktur) und in grün (Kryo-XRD-Struktur). Die Kristallkontakte der Kryo-XRD- und der SFX-Struktur sind durch Kreise an PsaE und PsaF gekennzeichnet. Die Membran wurde über die Transmembranhelices mit Hilfe des PPM-Servers definiert (https://opm.phar.umich.edu/ppm_server, Lomize et al. 2011). Die Abbildung wird in modifizierter Form in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

Tabelle 3.10: Abstände der Kofaktoren der Elektronentransportkette. Die Abstände sind in Å angegeben und wurden jeweils von den geometrischen Zentren der Porphyrinringe, Naphthochinone und Eisen-Schwefel-Zentren berechnet. Unterschiede, die größer als 0,1 Å sind, werden durch Größer-als- oder Kleiner-als-Zeichen hervorgehoben.

¹PDB-Code: 1jb0 (Jordan et al. 2001)

²Abstände in der Kryo-EM-Struktur des PSI_{tri}-Monomers

Kofaktoren		Kryo-EM ²		Kryo-XRD ¹		SFX
P _A	A _{AccA}	12,21	>	11,89	>	11,76
A _{AccA}	A _{0A}	8,30	=	8,28	=	8,32
A _{0A}	A _{1A}	9,99	>	9,65	=	9,57
A _{1A}	F _X	13,35	>	13,21	<	13,43
∑A-Ast		43,85	>	43,04	=	43,08
P _B	A _{AccA}	12,24	>	12,14	=	12,14
A _{AccB}	A _{0B}	7,82	=	7,75	=	7,82
A _{0B}	A _{1B}	9,82	>	9,60	=	9,57
A _{1B}	F _X	13,05	=	13,08	<	13,21
∑B-Ast		42,92	>	42,57	<	42,75
F _X	F _A	15,15	>	14,96	<	15,22
F _A	F _B	12,31	=	12,28	>	12,03
∑F_X-F_B		27,46	>	27,23	=	27,25

Kapitel 4

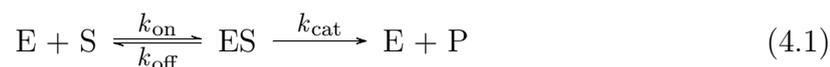
Diskussion

In vivo überträgt PSI aus *T. elongatus* Elektronen von Cyt c_6 auf Ferredoxin. Die Elektronen des Cyt c_6 werden dazu auf das oxidierte Chlorophyllpaar P₇₀₀ übertragen, welches lichtgetrieben eine Ladungstrennung durchführt. Der Schwerpunkt meiner Arbeit war es, die Bindung des Elektronendonors an PSI zu charakterisieren. Neben dem natürlichen Elektronendonator Cyt c_6 wurde das mitochondriale Analogon Cyt c_{HH} aus Pferdeherz genutzt. Die Bindung wurde mittels kinetischer, kalorimetrischer, theoretischer und struktureller Methoden analysiert. Für die strukturelle Charakterisierung wurden drei hochauflösende Methoden angewandt: die Kristallstrukturanalyse bei 100 K, die Kristallstrukturanalyse an einem XFEL-Strahlengang bei Raumtemperatur und die elektronenmikroskopische Analyse bei 90 K. Die Diskussion zu diesen Messungen gliedert sich in drei Unterkapitel: (1) die Bindungsstudien aus den kinetischen und kalorimetrischen Messungen, (2) die Analyse der Bindungsstelle der beiden Cytochrome an PSI und (3) Unterschiede in der PSI-Struktur, welche mit Hilfe der drei hochauflösenden Methoden nachgewiesen wurden.

4.1 Bindung und Elektronentransfer von Cytochromen mit PSI

4.1.1 Ist die K_M eine K_D ?

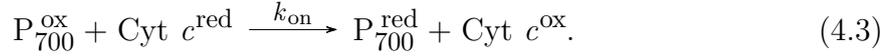
Die Interaktion von Cyt c_{HH} und Cyt c_6 mit PSI_{tri} wurde jeweils mittels Sauerstoffreduktionskinetiken untersucht. Zur Beschreibung des Einflusses von pH-Wert und Ionenstärke auf die Affinität wurde die Kinetik auf der Basis der Michaelis-Menten-Theorie ausgewertet (Michaelis und Menten 1913):



$$K_M = \frac{k_{\text{cat}} + k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (4.2)$$

Eine Annahme der Michaelis-Menten-Theorie ist ein Gleichgewicht zwischen Enzym (E), Substrat (S) und dem Enzym-Substrat-Komplex (ES) mit $k_{\text{off}} \gg k_{\text{cat}}$. Damit gilt näherungsweise $K_M = K_D$. Da k_{on} und k_{off} in einem Gleichgewicht stehen, können sie mit dieser Methode nicht separat bestimmt werden. Die Kinetik der ES-Assoziation kann jedoch mit P₇₀₀⁺-Reduktionskinetiken analysiert werden. In der gängigsten Methode wird P₇₀₀ durch einen Lichtblitz oxidiert und die Rereduktion

durch einen Elektronendonator zeitaufgelöst gemessen. Für cyanobakterielle Photosysteme gilt (Hervás et al. 1995)



P_{700}^+ -Reduktionskinetiken wurden in meiner Arbeit für ausgewählte Bedingungen gemessen. Für Cyt c_6 aus *T. elongatus* wurden bereits zuvor weitere Bedingungen mit unterschiedlichen Methoden untersucht (Hatanaka et al. 1993; Proux-Delrouyre et al. 2003; Nguyen et al. 2017). Die Reaktionsrate k_{on} setzt sich hierbei aus der diffusionsabhängigen Assoziation von PSI und Cyt sowie aus einem Elektronentransferprozess zusammen. Die diffusionsabhängige Assoziation ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, weshalb k_{on} aus der P_{700}^+ -Reduktionskinetik (Schema 4.3) mit k_{on} der Michaelis-Menten-Theorie (Gleichung 4.2) gleichgesetzt werden kann. Durch Einsetzen von k_{on} in Gleichung 4.2 lassen sich k_{off} und somit K_{D} bestimmen. Für niedrige Ionenstärken ist $k_{\text{off}} \gg k_{\text{cat}}$ erfüllt (Tabelle 4.1). Die Bindung von Cyt c_6 an PSI_{tri} dagegen erfolgt in Anwesenheit von Magnesiumsulfat mit $k_{\text{off}} \approx k_{\text{cat}}$. Wie von Briggs und Haldane gezeigt, behält in diesem Fall die Michaelis-Menten-Theorie ihre Gültigkeit, jedoch trägt k_{cat} signifikant zur K_{M} bei, weshalb K_{D} geringer als K_{M} ist (Briggs und Haldane 1925).

Tabelle 4.1: Vergleich der Dissoziationskonstante K_{D} und der Michaelis-Menten-Konstante K_{M} . Verglichen wurden Cyt c_{HH} in Phosphatpuffer bei pH 7,5 und pH 8,0 sowie Cyt c_6 in Tricinpuffer bei pH 8,0 ohne (−Mg) bzw. mit (+Mg) 10 mM MgSO_4 .

^aWert aus Hatanaka et al. (1993)

Cytochrom	Bedingung	k_{on} [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	k_{cat} [s^{-1}]	K_{M} [μM]	K_{D} [μM]
Cyt c_{HH}	pH 7,5	$2,3 \cdot 10^7$	510	29	23,5	22
Cyt c_{HH}	pH 8,0	$3,1 \cdot 10^7$	910	35	30,5	29
Cyt c_6	pH 8,0 (−Mg)	^a $1,7 \cdot 10^6$	440	55	290	260
Cyt c_6	pH 8,0 (+Mg)	$4,9 \cdot 10^6$	180	140	65	36

4.1.2 Ionenstärke und pH

Die Bindung der Redoxpartner wird durch äußere Faktoren beeinflusst. Insbesondere spielen Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert eine bedeutende Rolle. Da die Bindung von PSI_{tri} und Cyt c_6 diffusionsabhängig ist, nehmen Reaktionsraten mit zunehmender Temperatur zu. Oberhalb von 40 °C treten zusätzliche Effekte auf, die auf Konformationsänderungen der Proteine zurückzuführen sind (Nguyen et al. 2017). In dieser Arbeit wurden alle Messungen bei 20 °C durchgeführt, einer für Strukturanalysen gängigen Temperatur, in der PSI_{tri} kristallisierbar ist.

Der Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die Affinität der Bindungspartner ist nachvollziehbar, wenn man die Nettoladung der Proteine bei einem gegebenen pH-Wert betrachtet: Die luminal Seite des PSI ist negativ geladen (Abbildung 4.1). Cyt c_{HH} ist mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von 10,5 über alle hier genutzten pH-Werte positiv geladen. Cyt c_{HH} kann somit über elektrostatische Wechselwirkungen an die luminal Seite des PSI binden. Zusätzliche Ionen schirmen die Ladungen der Proteine ab, weshalb eine erhöhte Ionenstärke zu einer verringerten Affinität führt. Der pI des Cyt c_6 kann mit Hilfe des Programms „Compute pI“ von ExPASy aus der Proteinsequenz und der Annahme einer reduzierten Häm-Gruppe auf 5,5 geschätzt werden

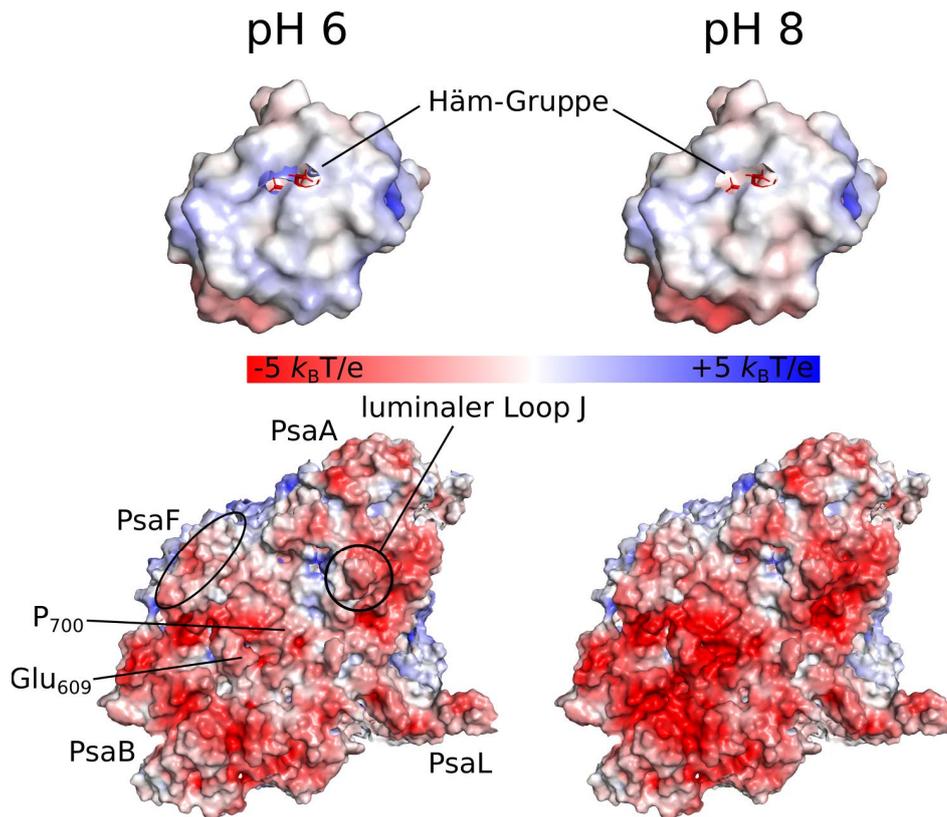


Abbildung 4.1: Oberflächenpotenzial von Cyt c_6 und von der luminalen Seite von PSI bei pH 6 (links) und pH 8 (rechts). Hydrophobe Atome der Häm-Gruppe des Cyt c_6 befinden sich an der Oberfläche des Proteins und sind als rote Linien dargestellt. Der His-Tag befindet sich auf der abgewandten Seite des Proteins und ist hier nicht zu sehen. Das Oberflächenpotenzial ist von -5 bis $+5 k_B T/e$ angegeben und wurde mit dem APBS Tool in PyMOL mit 20 mM Ionenstärke, 300 K und einer Dielektrizitätskonstante von 4 (Protein) bzw. 80 (Medium) berechnet. Für die Berechnung der pH-Werte wurden die Protonierungswahrscheinlichkeiten aus den Strukturen von PSI (PDB-Code: 1jb0) und Cyt c_6 (PDB-Code: 1c6s) mit tAPBS und Karlsberg2 (Kieseritzky und Knapp 2007; Rabenstein und Knapp 2001) herangezogen und in die Partialladungen der pqr-Dateien eingefügt.

(Bjellqvist et al. 1993). Durch den in dieser Arbeit verwendeten His-Tag liegt der pI bei 6,5. Damit ist Cyt c_6 bei pH 8 negativ geladen, was zu einer Abstoßung von PSI führt. Eine erhöhte Ionenstärke schwächt die repulsive Interaktion durch Abschirmen der Ladungen ab und erhöht somit die Affinität. Im Thylakoidlumen liegt ein pH-Wert von ca. 6 vor (Kramer et al. 1999). Bei diesem pH-Wert hat Cyt c_6 eine Nettoladung von nahezu 0, trotzdem konnte ein Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung gemessen und berechnet werden. Der nicht native Bindungspartner Cyt c_6 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 hat einen identischen pI wie das native Cyt c_6 aus *T. elongatus* (Hervás et al. 2005). Auch hier tritt bei der Interaktion mit PSI_{tri} aus *T. elongatus* bei pH 8 eine Abschirmung repulsiver Wechselwirkungen durch erhöhte Ionenstärke auf. Dagegen ist bei pH 6, bei dem eine Nettoladung von 0 vorliegt, kein Einfluss der Ionenstärke zu erkennen. Dies zeigt, dass es sich bei der Betrachtung der Nettoladung um eine grobe Näherung handelt. Entscheidend ist die Verteilung der einzelnen geladenen Seitenketten im Protein. Das Cyt c_6 aus *T. elongatus* weist an der Oberfläche, an der die Häm-Gruppe liegt, auch bei pH 6 eine geringe positive Ladung auf und kann über elektrostatische Wechselwirkungen an PSI binden (Abbildung 4.1). Die Oberfläche mit geringer positiver Ladung entspricht der Bindungsstelle des Cyt c_6 ,

welche anhand von NMR-Messungen vorgeschlagen wurde (Díaz-Moreno et al. 2005). Cyt c_6 band an PSI_{tri} mit negativer Bindungsenthalpie, wodurch die freie Enthalpie negativ war. Die Bindung des Cyt c_{HH} erfolgte dagegen mit positiver Bindungsenthalpie. Eine negative Enthalpie, die für die Bindung notwendig ist, kann daher nur durch eine Erhöhung der Entropie erreicht werden. Entropiegetriebene Interaktionen werden in der Regel einem hydrophoben Effekt zugeschrieben, was die hier dargestellte Abhängigkeit von Ionenstärke und pH-Wert jedoch nicht erklärt. Es ist stattdessen anzunehmen, dass geordnete Wassermoleküle an geladene Aminosäureseitenketten gebunden sind (Kauzmann 1959; Pettigrew et al. 2003). In den Kristallstrukturen des Cyt c_{HH} (PDB-Code: 1crc und 1hrc) liegen 60 bis 120 Wassermoleküle auf der Oberfläche des Proteins vor (Bushnell et al. 1990; Sanishvili et al. 1995). Durch Bindung des Cytochroms an das PSI werden diese geordneten Wassermoleküle verdrängt und somit die Entropie erhöht.

4.1.3 Oxidationszustand der Cytochrome

Der Oxidationszustand hat einen signifikanten Einfluss auf die Bindung von Redoxpartnern. Redoxpartner müssen aneinanderbinden, das Elektron übertragen und anschließend dissoziieren. Blieben die Bindungspartner nach erfolgter Elektronenübertragung gebunden, käme es zu einer Produktinhibition und die Redoxmediatoren stünden nicht für nachfolgende Prozesse zur Verfügung. In biologischen Systemen ist daher die Affinität der Redoxpartner vor der Elektronenübertragung höher als nach erfolgter Reaktion. So binden Ferredoxin und Flavodoxin nur in ihrem oxidierten Zustand an PSI und dissoziieren, sobald das Elektron transferiert wurde. Aus diesem Grund wurde die 2018 veröffentlichte PSI-Ferredoxin-Kokristallstruktur mit einem Galliumsubstituierten Ferredoxin gemessen, das sich nicht reduzieren lässt (Kubota-Kawai et al. 2018). Kristalle, deren Proteine eine Redoxreaktion eingehen können, lösen sich dagegen nach Belichtung auf (Aquila et al. 2012). Auch auf der Donorseite des PSI ist der Oxidationszustand entscheidend. Pflanzliches reduziertes PC bindet an PSI mit höherer Affinität als oxidiertes (Drepper et al. 1996; Danielsen et al. 1999). Diese Eigenschaft konnte hier zum ersten Mal für ein cyanobakterielles System mit Cyt c_6 aus *T. elongatus* bestätigt werden.

Da nicht native Bindungskomplexe nicht der Evolution unterliegen, ist es nicht verwunderlich, dass Cyt c_{HH} ein abweichendes Verhalten zeigt. Cyt c_{HH} band an PSI im oxidierten und im reduzierten Zustand mit identischer Affinität. Eine solche fehlende Abhängigkeit vom Oxidationszustand konnte bereits für humanes Cyt c mit pflanzlichem Cyt bc_1 -Komplex gemessen werden (Moreno-Beltrán et al. 2015). Bakterielle Reaktionszentren aus *Rhodobacter sphaeroides* zeigen mit Cyt c_{HH} dagegen einen umgekehrten Effekt: Oxidiertes Cyt c_{HH} bindet mit höherer Affinität als reduziertes (Moser und Dutton 1988; Larson und Wraight 2000).

Die fehlende Abhängigkeit der Affinität vom Oxidationszustand lässt sich für elektrochemische Messungen nutzbar machen. So konnte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. F. Lisdat ein stabiler Komplex aus PSI und Cyt c_{HH} an Elektrodenoberflächen kontaktiert und Photoströme erzeugt werden, ohne dass es zu einer Dissoziation des Komplexes während der Reaktion kam (Stieger et al. 2016b; Ciornii Dmitri et al. 2017). Ebenso dissoziierten die in meiner Arbeit hergestellten Kokristalle aus PSI_{tri} und Cyt c_{HH} nicht durch Belichtung, was die Messung der strukturellen Änderung während des Elektronentransports ermöglicht.

4.2 Die Cytochrom *c*-Bindungsstelle des Photosystems I

Durch die kinetischen Messungen konnte der Einfluss von Ionenstärke und pH-Wert auf die PSI-Cytochrom-Bindung identifiziert werden. Diese Informationen wurden genutzt, um den Komplex aus PSI und Cytochrom über theoretische Methoden zu beschreiben und um stabile Komplexe für Strukturanalysen zu generieren. Neben dem spezifischen Komplex, durch den der Elektronentransfer erfolgt, konnte auch die Bildung unspezifischer Komplexe gemessen werden (Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3).

4.2.1 Unspezifische Bindungsstellen

Um unspezifische und spezifische Bindungsstellen beschreiben zu können, wurde ein *rigid-body docking* genutzt. Mit dieser theoretischen Methode wird das Cytochrom *c* relativ zu PSI unter verschiedenen Orientierungen durch den Raum translatiert. Zu jeder Orientierung und Translation wird eine Bindungsenergie berechnet und die 10 000 Bindungsstellen mit der negativsten Energie ausgegeben. Da die Elektrostatik einen großen Anteil der Bindungsenergie ausmacht, bindet das positiv geladene Cyt c_{HH} , wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, an die negativ geladene luminalen Oberfläche von PSI. Diese elektrostatische Interaktion führte dazu, dass mehrere Dockingstellen mit vergleichbarer Energie berechnet wurden. Auch mittels ITC wurden für Cyt c_{HH} mehrere Bindungsstellen mit Affinitäten in der gleichen Größenordnung nachgewiesen (Abschnitt 3.2.2). Diese unspezifischen Bindungsstellen sind demnach an der luminalen Seite von PSI lokalisiert. Sie sind aufgrund der Entfernung zu P_{700} voraussichtlich nicht am Elektronentransfer beteiligt. Demgegenüber erscheint die Bindung von Cyt c_6 an der luminalen Seite von PSI hochspezifisch. In großem Abstand zu P_{700} liegen nur vereinzelt Dockingstellen mit erhöhter Energie vor. Interessanterweise wurden für Cyt c_6 auch an der cytoplasmatischen Seite von PSI Dockingstellen berechnet, was durch die elektronenmikroskopische Analyse bestätigt werden konnte (Abschnitt 3.3.7). Da Cyt c_6 ausschließlich im Lumen vorkommt, spielen cytoplasmatische Bindungsstellen keine Rolle in der nativen Elektronenübertragung.

4.2.2 Die spezifische Bindungsstelle des Komplexes

Die Bindungsstelle, an der die Elektronenübertragung erfolgt, wurde über theoretische Methoden mit Hilfe von Daten aus der Literatur und eigenen Messungen beschrieben. Um fehlerhafte Einschränkungen zu vermeiden, wurden die Literaturdaten nur qualitativ als Suchkriterium vorgegeben. Somit wurde festgelegt, mit welcher Oberfläche das Cytochrom an PSI binden muss, nicht aber, welche Aminosäuren an der Bindung beteiligt sein müssen. Weitere Kriterien waren eine geringe Distanz zwischen der Oberfläche der hydrophoben Häm-Bindungstasche des Cytochroms zu den hydrophoben Aminosäuren Trp_{A655} und Trp_{B631} sowie der Abstand zwischen der Häm-Gruppe und P_{700} . Die modellierten Bindungsstellen für Cyt c_{HH} und Cyt c_6 unterscheiden sich (Abschnitt 3.2.3). Der Abstand der Häm-Gruppe zu P_{700} ist im Cyt c_6 -Modell geringer als der des Cyt c_{HH} -Modells. Demgegenüber weist das Cyt c_{HH} -Modell eine negativere freie Enthalpie auf. Dies korreliert mit der höheren Wechselzahl k_{cat} von Cyt c_6 und der höheren Affinität von Cyt c_{HH} . Die Bindung von Cyt c_6 an PSI wurde von vielen Arbeitsgruppen untersucht, deren Ergebnisse im Folgenden zur Verifizierung des hier bestimmten Strukturmodells herangezogen werden.

Die Untereinheit PsaF des cyanobakteriellen PSI ist nicht an der Bindung von Cyt c_6

und Pc beteiligt (Chitnis et al. 1991; Mühlenhoff und Chauvat 1996; Hippler et al. 1999). Auch in dem von mir erstellten Modell weist Cyt c_6 einen Abstand von über 20 Å zu den luminalen Helices der PSI-Untereinheit PsaF auf.

Die Affinität von PSI zu Cyt c_6 nahm bei pH 8 mit zunehmender Ionenstärke zu (Abbildung 3.11 in Abschnitt 3.2.1). Dies lässt sich mit den negativ geladenen Seitenketten Glu₃₄ von Cyt c_6 und Asp₆₂₈ der J-Schleife von PsaA erklären (Abbildung 3.17 in Abschnitt 3.2.3). Diese Seitenketten sind im Modell 7,4 Å voneinander entfernt und stoßen sich voneinander ab. Durch Erhöhen der Ionenstärke wird die negative Ladung abgeschirmt. Zusätzlich erlaubt die Anordnung der beiden geladenen Gruppen eine Koordinierung zweiwertiger Kationen. Der größere Effekt zweiwertiger Kationen gegenüber monovalenten Ionen lässt sich somit durch ein zwischen Glu₃₄ und Asp₆₂₈ gebundenes Ion erklären.

Da sich das kleine Protein Cyt c_6 gut heterolog herstellen lässt, konnten hierfür einige Punktmutationen analysiert werden. Insbesondere für Cyt c_6 aus den Cyanobakterien *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Nostoc* sp. PCC 7119 wurden die Bindungskinetiken nach Einfügen von Punktmutationen gemessen (Díaz-Quintana et al. 2003). Der Einfluss der Punktmutationen lässt sich mit dem von mir erstellten Modell für Cyt c_6 erklären. In allen Fällen, in denen k_{on} zunimmt, wurde eine negativ geladene Seitenkette gegen eine positiv geladene ausgetauscht und somit eine Bindung durch Erhöhung der Nettoladung des Cyt c_6 ermöglicht (vgl. Abschnitt 4.1.2). Mutationen, die zu einer Verringerung von k_{on} führen, betreffen Aminosäuren, die in meinem Modell an der Bindung zwischen PSI und Cyt c_6 beteiligt sind. Als Beispiel sei hier die konservierte Aminosäure Arg₆₄ genannt. Arg₆₄ bindet in meinem Modell in einer negativ geladenen Tasche, die von PsaB an Glu₆₀₉ ausgebildet wird (Abbildung 4.1 in Abschnitt 4.1.2). Durch Mutation von Arg₆₄ gegen eine negativ geladene Aminosäure verringert sich k_{on} um bis zu 90 % (Díaz-Quintana et al. 2003).

Auch Mutationen an PSI bestätigen das von mir erstellte Modell. Die hydrophobe Oberfläche der Häm-Bindungstasche von Cyt c_6 interagiert in meinem Modell mit den hydrophoben Aminosäuren Trp_{A655} und Trp_{B631}. Die Häm-Gruppe von Cyt c_6 ist dabei näher an Trp_{A655} als an Trp_{B631}. Dies passt zu dem Befund von Sommer et al., dass Trp_{A655} für die Bindung des Cyt c_6 essenziell ist, während Trp_{B631} für Pc benötigt wird (Sommer et al. 2002; Sommer et al. 2004).

Eine unerwartet gute Übereinstimmung wurde beim Vergleich meines PSI-Cyt c_6 -Modells mit einer homologen Struktur gefunden. Im Gegensatz zu pflanzlichen und cyanobakteriellen Photosystemen ist die Kokristallstruktur des bakteriellen Reaktionszentrums (bRC) aus *Rhodobacter sphaeroides* mit Cyt c_2 bekannt (Axelrod et al. 2002). bRC sind strukturell homolog zu den Photosystemen und zeigen z. B. eine nahezu identische Anordnung der Transmembranhelices (Fischer et al. 2016). Die bRC-Cyt c_2 -Struktur wurde mit dem PSI-Cyt c_6 -Modell verglichen. Der Abstand zwischen den Häm-Gruppen und P₇₀₀ bzw. P₈₇₀ stimmt in beiden Komplexen überein. Die Cytochrom-Bindungsstellen unterscheiden sich lediglich in einer geringen Rotation der Häm-Gruppen (Abbildung 4.2). Obwohl PSI und bRC nur eine geringe Sequenzidentität aufweisen, ist die Position der Kofaktoren ebenso hoch konserviert wie die Struktur der Transmembranhelices.

Die in diesem Abschnitt genannten Übereinstimmungen zwischen dem von mir bestimmten Modell, eigenen Messungen und Daten aus der Literatur weisen darauf hin, dass die Cyt c_6 -Bindungsstelle von PSI mittels *rigid-body docking* in guter Näherung beschrieben wurde.

Viele Seitenketten von Cyt c_6 haben einen Abstand von weniger als 3 Å zu Seiten-

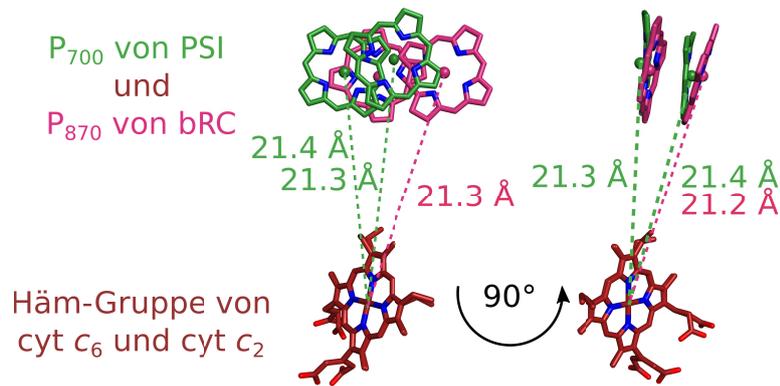


Abbildung 4.2: Vergleich der PSI-Cyt c_6 -Bindungsstelle mit der bRC-Cyt c_2 -Bindungsstelle aus *R. sphaeroides* (PDB-Code: 1l9b, Axelrod et al. 2002). Die Häm-Gruppen von Cyt c_6 und Cyt c_2 wurden übereinander gelegt und die relativen Positionen der aktiven Zentren P₇₀₀ und P₈₇₀ dargestellt. Die eingezeichneten Abstände wurden von den Eisenzentren zu den Mg²⁺-Ionen gemessen.

ketten von PSI. Bei Van-der-Waals-Radien von 1,7 Å bis 2,2 Å müssten die Abstände jedoch größer als 3,4 Å sein. Diese geringen Abstände beruhen darauf, dass im *rigid-body docking* die Proteine zwar als starre Körper simuliert werden, aber Konformationsänderungen und Rotamere von Aminosäureseitenketten berücksichtigt werden. In Cyt c_6 treten geringe Konformationsänderungen durch Bindung an PSI im Proteinrückgrat und sogar an der Häm-Gruppe auf (Ma et al. 2003; Díaz-Moreno et al. 2005; Díaz-Moreno et al. 2006). Um diese Konformationsänderungen zu bestimmen, sind strukturelle Methoden zur Lösung der Kostruktur nötig.

4.2.3 Komplexbildung für Strukturanalyse

Um die Kostruktur aus PSI und Cytochrom c zu messen, müssen die Bindungspartner stabil aneinandergebunden vorliegen. Die höchsten gemessenen K_M -Werte zwischen PSI und Cyt c_{HH} bzw. Cyt c_6 betragen 5 μM (Cyt c_{HH} , pH 8, niedrige Ionenstärke) bzw. 33 μM (Cyt c_6 , pH 8, hohe Ionenstärke). Es konnten somit höhere Affinitäten für Cyt c_{HH} als für Cyt c_6 erreicht werden. Da Cyt c_6 nach Transfer des Elektrons von PSI dissoziieren muss, ist wie in anderen transienten Komplexen die Affinität zugunsten einer hohen Reaktionsrate gering (Crowley und Ubbink 2003). Die höchsten gemessenen Wechselzahlen betragen 35 s⁻¹ (Cyt c_{HH} , pH 8) und 160 s⁻¹ (Cyt c_6 , pH 8, hohe Ionenstärke). Damit ergaben sich für beide Proteine katalytische Effizienzen ($k_{\text{cat}} \cdot K_M^{-1}$) in derselben Größenordnung.

Die Affinitäten des Cyt c_{HH} und Cyt c_6 sind vergleichbar mit den Affinitäten von Plastocyaninen und Cytochromen in Pflanzen, Algen und anderen Cyanobakterien (7 μM bis 125 μM , Drepper et al. 1996; Zygadlo et al. 2005; Bernal-Bayard et al. 2015; Thor et al. 1999). Für eine erfolgreiche Strukturanalyse eines Komplexes aus photosynthetischen Proteinen und Redoxmediatoren wurden Affinitäten von maximal 1 μM genutzt (Cyt c_2 mit Reaktionszentren: Adir et al. 1996; Tiede et al. 2000; Ferredoxin mit PSI_{tri}: Kubota-Kawai et al. 2018). Die in dieser Arbeit bestimmte Affinität für Cyt c_{HH} ist zwar etwas geringer, liegt aber in derselben Größenordnung. Tatsächlich bildeten Cyt c_{HH} und PSI_{tri} einen stabilen Komplex in Lösung aus (Abschnitt 3.3.2). Die Affinität des Cyt c_6 zu PSI_{tri} ist signifikant geringer, weshalb die Kokristallisation nicht gelang. Dennoch wurde mittels Kleinwinkelstreuung zum ersten Mal eine Bindung nachgewiesen (Abschnitt 3.3.2). Kovalent an PSI_{tri} gebundenes Cyt c_6 war in der 3-D-

Klassifizierung der elektronenmikroskopischen Analyse nachweisbar (Abschnitt 3.3.7).

4.2.4 Strukturanalyse der PSI-Cyt *c*-Bindungsstelle

Mit Hilfe der Kleinwinkelstreuung lässt sich nicht nur die Bindung zweier Proteine nachweisen, sondern dieser Komplex kann auch näher analysiert werden. Die Intensität des an einem Protein gestreuten Strahls verändert sich durch Bindung eines großen Liganden. Eine solche Messung gelang bereits mit dem bakteriellen Reaktionszentrum (bRC) und Cyt *c*₂ (Tiede et al. 2000). Die Position des Cyt *c*₂ konnte bis auf wenige Angström genau bestimmt werden. In meiner Arbeit konnte ebenso eine Bindung von Cyt *c*_{HH} und Cyt *c*₆ an PSI_{tri} gemessen werden. Das PSI_{tri} ist mit 1 MDa etwa 100-mal so groß ist wie die 10 kDa großen Cytochrome und weist mit 10 μM (Cyt *c*_{HH}) bzw. 30 μM (Cyt *c*₆) geringere Affinitäten als der bRC-Cyt *c*₂-Komplex auf (0,5 μM, Adir et al. 1996). Trotzdem erweist sich die Kleinwinkelstreuung als geeignet, um einen solchen Komplex aus einem großen und einem kleinen Protein zu messen. Die PSI-Bindungsstelle für Cyt *c*_{HH} und Cyt *c*₆ konnte mittels Kleinwinkelstreuung auf der luminalen Seite lokalisiert werden. Diese Methode ist jedoch nicht sensitiv genug, um die beiden komplexierten Proteine als separate Strukturen zu lösen, weshalb die Bindungsstelle nicht näher mit Kleinwinkelstreuung beschrieben werden konnte.

Zur Klärung der Bindungsstelle ist daher eine hochauflösende Methode notwendig. Die erfolgreiche Kokristallisation von PSI_{tri} mit Cyt *c*_{HH} ermöglichte die Messung einer hochaufgelösten Struktur. Jedoch konnte keine Elektronendichte für Cyt *c*_{HH} in der Struktur identifiziert werden. Dies ist möglicherweise auf unspezifische Bindungsstellen zurückzuführen, die mittels kalorimetrischer Messungen und der *rigid-body docking*-Simulationen nachgewiesen wurden (Abschnitte 3.2.2 und 3.2.3). Trotz eines P₇₀₀-Cyt *c*_{HH}-Verhältnisses von 1:1 im Kokristall ist damit nicht gewährleistet, dass alle Bindungsstellen gesättigt waren. Die Sättigung konnte in der Kleinwinkelstreuung durch Erhöhen der Cyt *c*_{HH}-Konzentration erreicht werden. Unter diesen Konzentrationen lösten sich die Kokristalle jedoch auf. Auch war Cyt *c*_{HH} nicht an Kristallkontakten beteiligt und lag voraussichtlich im Kristallisationsmedium bzw. am Detergengürtel in einer sehr flexiblen Umgebung vor. Die Flexibilität geht in der Kristallstruktur mit einer verringerten Auflösung einher. Eine Kokristallisation mit nicht nativem Cytochrom *c* führte auch in anderen Arbeiten zu fehlenden Elektronendichten (Poulos et al. 1987). Durch Verbesserung der Auflösung gelang es, die Elektronendichte des Cytochroms zu visualisieren (Pelletier und Kraut 1992). In den Kristallen von Poulos und Pelletier war das Cytochrom an der Bildung von Kristallkontakten beteiligt. Da dies in den PSI_{tri}-Cyt *c*_{HH}-Kristallen nicht der Fall war, ist ein Vergleich mit Shimada et al. (2016) interessant. In diesen Kokristallen aus Cytochrom *c* mit Cytochrom *c*-Oxidase war das Cytochrom *c* ebenfalls in einem flexiblen Volumen an der Cytochrom *c*-Oxidase gebunden. Erst bei einer Auflösung von 2 Å gelang es, das Cytochrom *c* zu identifizieren (Shimada et al. 2016). Eine verbesserte Auflösung der PSI_{tri}-Kristalle konnte mittels XFEL bei Raumtemperatur erreicht werden. Durch die Raumtemperaturmessung entfiel außerdem die Nutzung des Kryoprotektivums Saccharose, welches in der Lage war, PSI-Kristalle aufzulösen (Abschnitt 3.3.3). Ein Protokoll zur Messung von PSI_{tri}-Cyt *c*_{HH}-Kristallen an einem XFEL-Strahlengang wurde im Rahmen meiner Arbeit entwickelt.

Seit der *resolution revolution* (Kühlbrandt 2014) ist es für große Proteine ebenfalls möglich, hochaufgelöste Strukturen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) zu ermitteln. Um den PSI_{tri}-Cyt *c*₆-Komplex in Lösung zu messen, wurden die beiden Koproteine kovalent verbunden. Diese Quervernetzung erfolgte mit dem

Tabelle 4.2: Unterschiede in den Strukturanalysen. ¹Struktur aus Golub et al. (2020, in Vorbereitung), ²Struktur aus Kölsch et al. (2020, eingereicht), ³Struktur aus Keable et al. (2020, in Vorbereitung), ⁴Struktur aus Jordan et al. (2001).

	Auflösung	Temperatur	Lösung/Kristall	pH	Ionenstärke
SANS ¹		RT	in Lösung	6,4	200 mM
Kryo-EM ²	2,9 Å	90 K	in Lösung	8,0	100 mM
SFX ³	2,75 Å	RT	im Kristall	6,0	0 mM
Kryo-XRD ⁴	2,5 Å	100 K	im Kristall	6,4	0 mM

Aktivator EDC, der eine Peptidbindung zwischen positiv und negativ geladenen Aminosäureseitenketten induziert. Der mit EDC quervernetzte Komplex ist zwar aktiv, büßt aber einen Teil seiner Reduktionsrate ein (Lubner et al. 2011; Hippler et al. 1997). Um eine Aggregation oder gar eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden, wurde das Quervernetzen nur über einen kurzen Zeitraum mit geringen Konzentrationen von 5 mM EDC durchgeführt. Durch anschließende Aufreinigung der Lösung mit Hilfe des His-Tags von Cyt c_6 konnte sichergestellt werden, dass nur mit Cyt c_6 quervernetztes PSI_{tri} im TEM gemessen wurde (Abschnitt 3.3.6). Es wurden dabei lediglich 15 % bis 25 % der PSI-Trimere mit Cyt c_6 gebunden. Daher ist anzunehmen, dass an jedem der quervernetzten PSI-Trimere jeweils nur eine der drei Cyt c_6 -Bindungsstellen besetzt war. Für Liganden mit etwa 30 % Sättigung lassen sich in TEM-Strukturen EM-Dichte nachweisen (Xie et al. 2017; Wang et al. 2018). Auch in meiner Arbeit gelang es zum ersten Mal, eine Dichte in der Nähe von P₇₀₀ nachzuweisen (Abschnitt 3.3.7). Diese Dichte weist jedoch nur eine geringe Auflösung auf, sodass keine strukturellen Details herausgearbeitet werden konnten. Dies ist vergleichbar mit der vor Kurzem erschienenen Kostruktur des PSI_{mono} aus der Grünalge *Chlamydomonas* mit Pc bei einer Auflösung von 2,9 Å (Suga et al. 2019). Auch dort wurde eine EM-Dichte mit niedriger Auflösung identifiziert. Die Dichte ist an PsaF, der erwarteten Bindungsstelle für eukaryotisches Pc, lokalisiert. Sie umfasst etwa ein Zehntel der Größe des Pc und weist keine strukturellen Informationen auf. Weder meiner Arbeit noch in der Arbeit von Suga et al. gelang es, die Auflösung des Koproteins zu erhöhen.

4.3 PSI-Struktur

4.3.1 Vergleich der Methoden

Für die Charakterisierung der PSI-Cyt c -Bindungsstelle wurde die Struktur des PSI mit hochauflösenden Methoden charakterisiert. Eine Kryo-XRD-Struktur konnte bereits mittels Röntgenbeugung am Kristall bei 100 K mit einer Auflösung von 2,5 Å gelöst werden (Jordan et al. 2001). Im Rahmen meiner Arbeit wurden nun zwei weitere Strukturen ergänzt. Diese wurden mit SFX bei Raumtemperatur (RT) mit einer Auflösung von 2,75 Å und mit Kryo-EM bei 90 K mit einer Auflösung von 2,9 Å bestimmt. Diese Methoden ergaben vergleichbare Auflösungen, unterschieden sich aber in der Temperatur, dem Puffersystem und darin, ob das Protein in Lösung oder im Kristall vorlag (Tabelle 4.2). Sowohl PSI_{tri} als auch die Einheitszelle ist in der SFX-Struktur unter Raumtemperatur größer als in der Kryo-XRD-Struktur. Auch in Lösung ist ein Unterschied in der Größe der Proteine zu erkennen: Das PSI_{tri} der Neutronen-Kleinwinkelstruktur (5 % und 18 % D₂O) ist

größer als in der Kryo-XRD, während das PSI_{tri} der Kryo-EM (C1- und C3-Modell) dieselbe Ausdehnung wie die Kryo-XRD hat. Dieser Effekt wurde bereits in SFX- und Kryo-XRD-Messungen von PSII beobachtet (Young et al. 2016). Wie auch PSI kontrahiert das PSII entlang der Membranebene durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff, während orthogonal zur Membranebene keine Änderung der Größe vorliegt. Da die a- und b-Achsen der Einheitszelle von PSI_{tri} -Kristallen parallel zur Membranebene liegen, lässt sich die Kontraktion entlang der Membranebene auch anhand dieser Achsen erkennen. Die a- und b-Achsen verringerten sich durch Einfrieren von 285 Å auf 281 Å, während sich die c-Achse nur von 166 Å auf 165 Å verringerte (Tabellen 3.6 und 3.7). Auf der Basis der hier gemessenen Strukturen lässt sich die Temperatur als eine Ursache für die Kontraktion und Expansion der Membranproteine identifizieren. Young et al. postulierten, dass die Größenänderung durch Schockgefrieren auf einer verringerten Mobilität der Membranlipide zwischen den Monomeren basiere. In den drei elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen sind zwischen den PSI_{tri} -Monomeren längliche EM-Dichten zu erkennen, die auf Lipide und Detergens zurückzuführen sind (Abschnitt 3.3.6). Tatsächlich ist eine Verringerung der Einheitszelle von Kristallen durch Schockgefrieren ein häufig beobachtetes Phänomen, das auf der Dichteänderung des vitrifizierten Solvens beruht (Juers und Matthews 2001). Die Dichteänderung der Lipide und Detergensmoleküle würde den geringen Abstand der PSI_{tri} -Monomere in der Kryo-EM-Struktur (C1- und C3-Strukturen) erklären. Ferner kommt es auch innerhalb des PSI_{tri} -Monomers der Kryo-XRD-Struktur im Vergleich zur SFX-Struktur zu einer Kontraktion. Demgegenüber ist das PSI_{tri} -Monomer der Kryo-EM-Struktur nicht kontrahiert; es hat dieselbe Größe wie das PSI_{tri} -Monomer der SFX-Struktur. Ein solcher Effekt kann auch in anderen Strukturen nachgewiesen werden. Eine gute Datenlage liegt für die β -Galactosidase aus *E. coli* vor. Es handelt sich um das Enzym des *lac*-Operons, das Lactose in Glucose und Galactose spaltet und häufig in der Genetik eingesetzt wird. Hierzu gibt es bereits vier hochaufgelöste Kryo-EM-Strukturen (bis zu 1,9 Å Auflösung), 55 Kryo-XRD-Strukturen (bis zu 1,5 Å) und auch eine Raumtemperatur-XRD-Struktur (3,0 Å). Der Gyrationradius der Kryo-EM-Strukturen stimmt mit dem Gyrationradius der Raumtemperatur-XRD-Struktur überein, während ausgewählte Kryo-XRD-Strukturen um 0,2 Å bis 0,4 Å kleiner sind. Weshalb die beiden Kryostrukturen eine unterschiedliche Größe aufweisen, konnte hier nicht geklärt werden. Denkbar ist ein Unterschied in der Art des Einfrierens. Kristalle sind mehrere Mikrometer groß, werden in einem Kryoprotektivum inkubiert und sind während des Einfrierens von einem Flüssigkeitsfilm umgeben. Die Wärmeübertragung ist proportional zu $L^{3/2}$, weshalb zum vollständigen Einfrieren eines 1 mm großen Kristalls 0,1 s (flüssiges Propan) bis 0,2 s (flüssiger Stickstoff) vergeht (Kriminski et al. 2003). Große PSI_{tri} -Kristalle (ab ca. 1 mm) frieren daher so langsam ein, dass Fehler im Kristall auftreten und sich die gemessene Raumgruppe von $P6_3$ zu $P2_1$ verschiebt (Jordan 2001). Für die Elektronenmikroskopie wird die Proteinlösung ohne Kryoprotektivum dagegen in einem Vitrobot so geblottet, dass ein sehr dünner Wasserfilm, kaum dicker als das Protein selbst, vorliegt.

Auch der Winkel, in dem die drei PSI_{tri} -Monomere zueinander stehen, unterscheidet sich zwischen den hochaufgelösten Strukturen. Eine Ursache dieser Expansion könnten die Kristallkontakte sein. Kristallkontakte sind Oberflächen des Proteins, an denen dieses im Kristall mit benachbarten Proteinen interagiert. Durch die Bindung verschiebt sich das Proteinrückgrat der Kristallkontakte um bis zu 2 Å gegenüber der Struktur in Lösung (Bartesaghi et al. 2014). In den beiden Kristallstrukturen des PSI_{tri} interagiert die cytoplasmatische Untereinheit PsaE mit den luminalen Helices

der Untereinheit PsaF eines benachbarten PSI-Trimers. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung des Proteinrückgrats einer Schleife am Kristallkontakt um 1 Å. Diese Schleife wird durch die β -Faltblattstruktur von PsaE sowie durch eine Schleife der benachbarten Untereinheit PsaC stabilisiert, sodass sie sich nicht weiter bewegen kann. Daher drücken die beiden Trimere so gegeneinander, dass sich die PSI_{tri}-Monomere aus der Membranebene herausbewegen, was zu einem vergrößerten Winkel im PSI_{tri} führt.

4.3.2 Elektronentransport in PSI

Die unterschiedliche Größe der PSI_{tri}-Monomere wirkt sich auch auf die Abstände der Kofaktoren aus. Hierbei ist insbesondere der Abstand zwischen den Kofaktoren der Elektronentransportkette (ETC) von Bedeutung. Die ETC liegt orthogonal zur Membranebene und ist somit in den PSI-Kristallstrukturen von *T. elongatus* parallel zur c-Achse der Einheitszelle. Da sich die c-Achse zwischen der Kryo-XRD- und der SFX-Struktur nur geringfügig unterscheidet, sind auch die Abstände der ETC vergleichbar (Unterkapitel 3.10). Dagegen weisen die Abstände der Kryo-EM-Struktur Unterschiede von bis zu 0,3 Å zur Kryo-XRD-Struktur auf. Dies mag gering erscheinen, jedoch bewirkt eine solche Abstandsänderung eine Verlangsamung des Elektronentransfers um 36 % (Moser et al. 1992; Young et al. 2016). In der Literatur sind für die Kinetiken des Elektronentransfers von PSI unterschiedliche Werte zu finden (Ptushenko et al. 2008; Kurashov et al. 2018). Der in meiner Arbeit gefundene Einfluss der Präparationsmethode auf die Abstände der Kofaktoren könnte eine Ursache für diese unterschiedlichen kinetischen Konstanten sein.

Eine weitere Ursache für unterschiedliche Kinetiken ist in der Konformation von Phe₆₆₉ zu finden. Phe₆₆₉, das mit A_{1B} interagiert, nimmt in der SFX-Struktur eine andere Konformation als in den beiden Kryostrukturen von *T. elongatus* und in allen bekannten PSI-Kryostrukturen anderer Organismen ein (Abschnitt 3.3.5, Pan et al. 2018; Malavath et al. 2018; Suga et al. 2019; Zheng et al. 2019). In den Kryostrukturen ist der aromatische Ring dieses Phenylalanins parallel versetzt zum aromatischen Ring des A_{1B}, während er in der SFX-Struktur unter Raumtemperatur orthogonal in einer T-förmigen Orientierung liegen. Beide Konformationen sind energetisch sinnvoll (Hunter und Sanders 1990). Das Phe₆₆₉ kann zu Tyrosin mutiert werden, ohne dass es zu einem Verlust der Aktivität des PSI kommt (Est et al. 2005). Weder in der Konformation der Kryo-XRD-Struktur noch in der Konformation der SFX-Struktur könnte ein Phenylalanin gegen ein Tyrosin ausgetauscht werden, da die Hydroxygruppe des Tyrosins mit dem benachbarten Chlorophyll CLA₁₂₃₉ kollidieren würde. In der A_{1A}-Bindungstasche muss daher eine erhöhte Flexibilität gegeben sein, was durch den erhöhten B-Faktor des Phe₆₆₉ bestätigt wird. Am Phe₆₈₉, welches in PsaA an A_{1A} lokalisiert ist, konnten dagegen keine signifikanten Änderungen beobachtet werden. Interessanterweise leitet der B-Ast Elektronen von P₇₀₀ zum Eisen-Schwefel-Zentrum F_X in 20 ns, während für den Elektronentransport im A-Ast 200 ns benötigt werden. In den Kryostrukturen unterscheiden sich die Bindungstaschen der beiden Phyllochinone nur geringfügig. Dagegen unterscheidet sich die Bindungstasche des Phe₆₈₉ von PsaA signifikant von der des Phe₆₆₉ von PsaB (Abbildung 4.3). In PsaA interagiert das Phe₆₈₉ in einer T-förmigen π - π -Wechselwirkung (4 Å) mit einem benachbarten Phenylalanin, Phe₆₅₈. In PsaB ist anstelle des benachbarten Phenylalanins dagegen ein Threonin, Thr₆₆₅, zu finden. Die unterschiedlich großen Seitenketten in der Umgebung gehen auch mit einer Änderung der Abstände des Phe₆₈₉ und Phe₆₆₉ zum benachbarten Chlorophyll

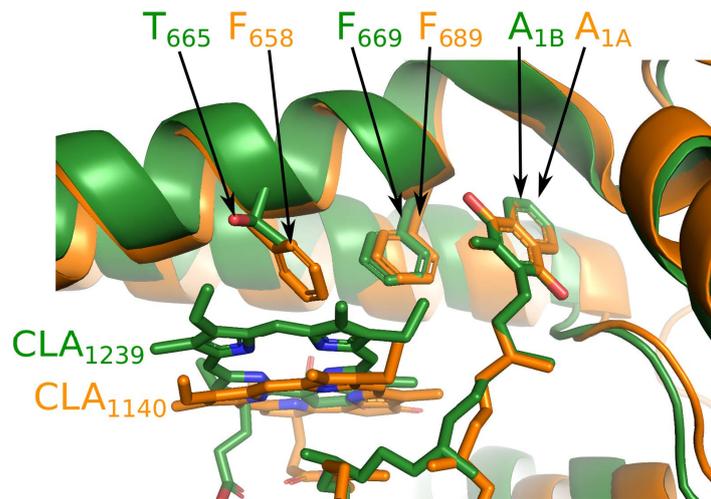


Abbildung 4.3: Bindungstasche des Phenylalanins Phe₆₈₉ in PsaA (orange) und Phe₆₆₉ in PsaB (grün). Die Phyllochinone von PsaA und PsaB der Kryokristallstruktur (PDB-Code: 1jb0, Jordan et al. 2001) wurden übereinander gelegt und signifikante Abweichungen in der Umgebung der Phenylalanine wurden hervorgehoben. In der SFX-Struktur ist Phe₆₆₉ gegenüber der hier gezeigten Struktur um 30° rotiert.

CLA₁₁₄₀ (PsaA, 5,0 Å) und CLA₁₂₃₉ (PsaB, 3,5 Å) einher. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungstaschen ist es nachvollziehbar, dass Phe₆₆₉ und Phe₆₈₉ unter Raumtemperatur unterschiedliche Konformationen einnehmen können. Durch Reduktion des Phyllochinons zu einem Semichinon ändert sich dessen π -Elektronensystem (Molčanov und Kojić-Prodić 2019). Berechnungen, die mit den Konformationen der Kryo-XRD-Struktur durchgeführt wurden, zeigten, dass das Phe₆₆₉ des B-Astes eine geringere Interaktion mit einem A₁-Semichinon eingeht als das Phe₆₈₉ des A-Astes (Lin und O'Malley 2011). Eine Konformationsänderung des Phenylalanins könnte zu einer Stabilisierung der Intermediate und somit zu einer Optimierung des Elektronentransports führen. Konformationsänderungen der A₁-Bindungstasche während des Elektronentransports wurden bereits auf der Basis von Elektron-Kern-Doppelresonanz(ENDOR)-Spektren vermutet (Rigby et al. 2002). In den oxidierten Kryo-EM- und Kryo-XRD-Strukturen liegt dagegen eine spezifische, niederenergetische Konformation vor. Konformationsänderungen treten durch das Kühlen auf tiefe Temperaturen häufig auf (Fraser et al. 2011). Auch in PSII waren im Vergleich einer Raumtemperaturstruktur mit unterschiedlichen Kryo-XRD-Strukturen Konformationsänderungen der Seitenketten zu erkennen (Young et al. 2016). In PSII traten diese Konformationsänderungen jedoch nicht an den Kofaktoren der Elektronentransportkette auf.

Um Konformationsänderungen während des Elektronentransports zu untersuchen, wurden SFX-Strukturen im dunkeladaptierten und im belichteten Zustand gemessen. Da reduktionsabhängige Konformationsänderungen von Seitenketten und Wassermolekülen zwischen den Kofaktoren A₁ und F_X erwartet wurden (Milanovsky et al. 2019), wurde die Belichtung so eingestellt, dass diese Kofaktoren reduziert wurden. Der sättigende Lichtblitz erfolgte 100 ns vor der Messung der Struktur. Die Elektronen werden hierbei zum größten Teil über den A-Ast (etwa 70 %, Makita und Hastings 2015) mit einer Halbwertszeit von 200 ns und zu einem geringeren Teil über den B-Ast (30 %) mit einer Halbwertszeit von 20 ns zum Eisen-Schwefel-Zentrum F_X transferiert (Kurashov et al. 2018, vgl. Abbildung 1.4). F_X reduziert das Eisen-Schwefel-Zentrum F_A mit einer Halbwertszeit von weniger als 200 ns. Zum Zeitpunkt 100 ns ist somit anzunehmen, dass sowohl F_X als auch A_{1A} partiell reduziert sind, während A_{1B} sowie die

Eisen-Schwefel-Zentren F_A und F_B vollständig oxidiert sind. Tatsächlich lag zu diesem Zeitpunkt eine signifikante F^o - F^o isomorphe Differenzdichte an F_X vor. Aktuell ist die Auflösung des belichteten Datensatzes noch zu gering (3,4 Å), um die Änderung an F_X zu beschreiben oder um Wassermoleküle zu identifizieren.

4.3.3 PsaK bindet assoziierte Proteine

In der Kristallstrukturanalyse können Atome, die an distalen Koordinaten der asymmetrischen Einheit liegen, oft nicht analysiert werden. Aus diesem Grund sind von der Untereinheit PsaK in der Kryo-XRD- und der SFX-Struktur nur Teile der beiden Transmembranhelices gelöst worden. In meiner Arbeit konnte mit Hilfe der Kryo-EM-Analyse die PSI-Untereinheit PsaK aus *T. elongatus* nahezu vollständig gelöst werden. Aus PSI-Strukturen anderer Organismen war die Untereinheit PsaK bereits vollständig charakterisiert. Sie besteht in allen Strukturen aus zwei Transmembranhelices, die durch eine lange, cytoplasmatische (oder stromale) Proteinschleife verbunden sind. Die Struktur dieser Schleife unterscheidet sich sehr. So interagiert sie im PSI_{mono} der Pflanzen und Grünalgen auf der distalen Seite von PsaK mit LHCI, während sie auf der proximalen Seite an der Bindung von LHCII beteiligt ist (Pan et al. 2018). Im PSI_{mono} der Rotalgen besteht die Schleife dagegen aus nur sechs Aminosäuren und ist nicht an der Bindung weiterer Proteine beteiligt. Diese Schleife konnte in der Kristallstruktur von PSI aus *T. elongatus* nicht gelöst werden. Erst 2018 gelang es diese Schleife für ein cyanobakterielles PSI_{tri} in *Synechocystis* sp. zu lösen (Malavath et al. 2018). Seit Oktober 2019 ist auch eine hochaufgelöste Struktur für das cyanobakterielle tetramere PSI aus *Anabaena* sp. (auch als *Nostoc* bekannt) mitsamt PsaK verfügbar (Zheng et al. 2019). Ebenso wurde im Jahr 2019 das PSI_{tri} von *Synechocystis* sp., das unter Eisenmangel exprimiert wurde, gelöst (Toporik et al. 2019). Hierbei wurde ein alternatives *psaK*-Gen, *psaK2*, exprimiert. Sowohl bei *Synechocystis* sp. als auch bei *Anabaena* sp. handelt es sich um mesophile Cyanobakterien. Die cytoplasmatischen Schleifen der beiden cyanobakteriellen Photosysteme enthalten hydrophobe, polare und geladene Aminosäuren. Diese sind im Cytoplasma lokalisiert und ragen distal aus dem PSI_{tri} heraus. In *Anabaena* sp. ragen drei Phenylalanine in die Membranebene hinein, während in *Synechocystis* sp. vier Aminosäuren mitsamt Proteinrückgrat in die Membran eindringen und über hydrophobe Interaktionen mit der Helix von PsaK sowie über eine β -Schleife stabilisiert werden. Auch die Schleife des PsaK aus *T. elongatus* ragt distal aus dem PSI_{tri} heraus. Dieser Bereich (Aminosäuren 43 bis 51) enthält im Gegensatz zu den beiden anderen cyanobakteriellen PSI ausschließlich hydrophobe Aminosäuren und dringt vollständig in die Membran ein. Die Schleife wird durch eine Salzbrücke von Glu₅₂ und dem helixständigen Arg₃₁ stabilisiert. Eine solche Salzbrücke liegt auch in der Untereinheit PsaK und der homologen Untereinheit PsaG des eukaryotischen PSI_{mono} vor. In den beiden anderen cyanobakteriellen Photosystemen sind die dazu notwendigen Aminosäuren nicht gegeben. Die Funktion dieser Schleife lässt sich an dem unter Eisenmangel exprimierten PSI erkennen. Neben der alternativen PsaK-Untereinheit liegt in dieser Struktur auch ein Ring aus 18 Untereinheiten des Proteins IsiA (*iron-stress-induced protein A*) vor. IsiA ist ein Antennenprotein mit 17 Chlorophyll *a*-Molekülen pro Untereinheit, das unter oxidativem Stress an die Untereinheiten PsaA, PsaB, PsaF und PsaJ sowie an die cytoplasmatische Schleife von PsaK bindet. Unter der Annahme, dass IsiA aus *T. elongatus* dieselbe Struktur wie IsiA aus *Synechocystis* sp. hat (75% Sequenzidentität und 19% konservative Aminosäuren), kann die PsaK-Schleife trotz veränderter Konformation ebenfalls dieses Antennenprotein binden. Um zu klären, weshalb sich die PsaK-Schleife zwischen den

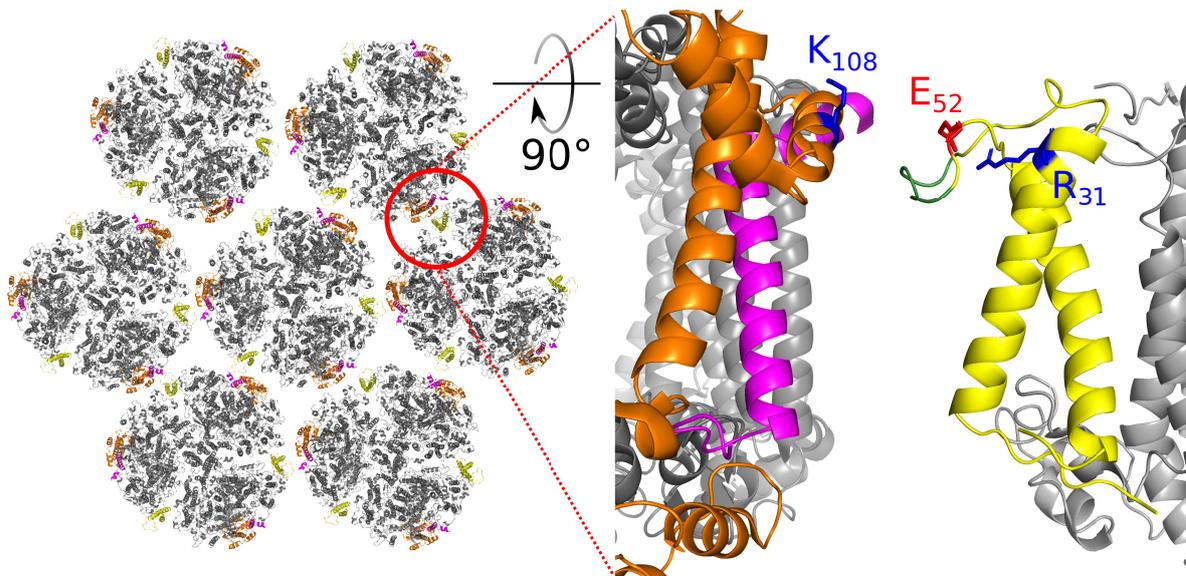


Abbildung 4.4: Modell der Trimer-Trimer-Interaktion in der Thylakoidmembran von *T. elongatus*. Das PSI_{tri} aus der Kryo-EM-Struktur (C3-Trimer) wurde in eine semikristalline, hexagonale Packung gelegt (links, Ansicht von der cytoplasmatischen Seite, basierend auf Messungen von MacGregor-Chatwin et al. (2017)). Eine exemplarische Trimer-Trimer-Kontaktstelle ist in der Membranebene dargestellt (rechts). PsaK (gelb), PsaF (orange) und PsaJ (magenta), sowie die hydrophobe Schleife von PsaK (grün), Glu₅₂ (rot), Arg₃₁ und Lys₁₀₈ (blau) sind farblich hervorgehoben. Genaue Abstände zwischen PsaK und PsaJF können nicht angegeben werden, da sie aufgrund der geringen Auflösung der AFM-Messungen zwischen allen Trimeren signifikant abweichen. Die Abbildung wird in modifizierter Form in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

beiden cyanobakteriellen PSI unterscheidet, lohnt es sich, weitere assoziierte Proteine zu betrachten. Eine Assoziation, an der PsaK beteiligt sein kann, wurde mittels rasterkraftmikroskopischen Messungen (AFM, *atomic force microscopy*) an Thylakoidmembranen gefunden (MacGregor-Chatwin et al. 2017). PSI_{tri} aus *T. elongatus* bildet in der Membran semikristalline Bereiche aus, in denen jedes PSI_{tri} von sechs weiteren PSI-Trimern umgeben ist (Abbildung 4.4). An einer Interaktionsstelle ist PsaK in räumlicher Nähe zu PsaJ und PsaF eines benachbarten PSI_{tri} . Hier kann die cytoplasmatische Schleife von PsaK unter die cytoplasmatischen Helices von PsaJ und PsaF greifen und somit eine große Kontaktfläche ausbilden. In der cytoplasmatischen Helix von PsaF befindet sich Lys₁₀₈, das keine Interaktionen mit benachbarten Aminosäuren eingeht. Durch die Bindung befindet sich Lys₁₀₈ von PsaF in räumlicher Nähe zu Glu₅₂ von PsaK und könnte somit die Bindung durch eine Salzbrücke weiter stabilisieren. In der Evolution hat das PsaK aus *T. elongatus* demnach die Eigenschaft entwickelt, sowohl IsiA als auch benachbarte PSI-Trimere binden zu können. Das PSI_{tri} aus *Synechocystis* sp. bildet unter Laborbedingungen keine solchen semikristallinen Bereiche aus (MacGregor-Chatwin et al. 2017), weshalb die Schleife von PsaK über eine andere Sequenz und eine andere Konformation verfügt. Eine fehlende Interaktion zwischen PsaK und PsaF bedeutet jedoch nicht, dass PSI-Trimere nicht miteinander interagieren können. *Synechocystis* sp. bildet Membranbereiche aus, in denen PSI_{tri} angereichert ist (Vermaas et al. 2008; MacGregor-Chatwin et al. 2017). Auch andere Cyanobakterien wie *Synechococcus* sp. PCC 7002 und *Prochlorococcus* sp. bilden semikristalline Bereiche aus, wobei sich die Packung von der in *T. elongatus* unterscheiden kann (MacGregor-Chatwin et al. 2017; MacGregor-Chatwin et al. 2019).

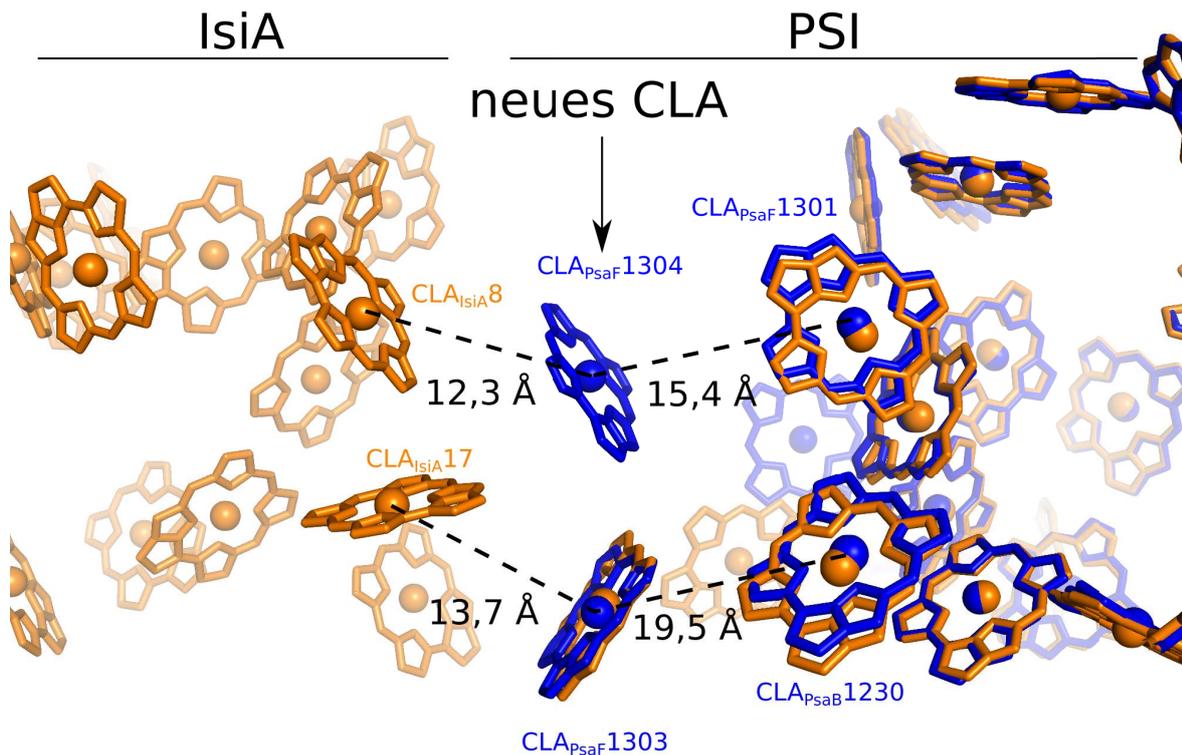


Abbildung 4.5: Abstände der Chlorophylle von *T. elongatus* in einem theoretischen PSI_{tri}-IsiA-Komplex. Chlorophylle des PSI_{tri}-IsiA-Komplexes aus *Synechocystis* sp. sind in orange dargestellt (Kryo-EM-Struktur aus Toporik et al. 2019, PDB-Code: 6nwa), Chlorophylle des PSI_{tri}-Monomers aus der elektronenmikroskopischen Analyse (Abschnitt 3.3.6) sind in blau dargestellt. Die Abbildung wird in modifizierter Form in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

Die PsaK-Schleife dieser beiden genannten Cyanobakterien enthält hydrophile und geladene Aminosäuren wie das PsaK aus *Synechocystis* sp.

4.3.4 Exzitonentransfer von Antennenproteinen zu PSI

In der Kryo-EM-Struktur und der SFX-Struktur konnten zusätzliche Kofaktoren identifiziert werden, die nicht in der Kryo-XRD-Struktur (Jordan et al. 2001) vorlagen. An der Untereinheit PsaF konnte in der Kryo-EM-Struktur eine planare EM-Dichte nachgewiesen werden. Dieser Dichte wurde ein neues Chlorophyll, CLA₁₃₀₄, zugeordnet. Es ist parallel zu Tyrosin Tyr₇₂ in einem Abstand von 4 Å lokalisiert. Tyr₇₂ ist eine hoch konservierte Seitenkette, deren Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrücke mit dem Proteinrückgrat von Phe₁₁₄ eingeht. Der Abstand von 4 Å weist auf eine Interaktion durch π - π -Wechselwirkungen hin. Es sind keine weiteren Bindungen des Porphyrinrings an das Protein zu erkennen, was für eine schwache Bindung des Chlorophylls spricht, die sich in der schwachen EM-Dichte des Kofaktors widerspiegelt. Dieses Chlorophyll könnte am Exzitonentransfer von assoziierten Proteinen zum PSI_{tri} beteiligt sein. In der IsiA-PSI_{tri}-Kostruktur aus *Synechocystis* sp. wurde der Exzitonentransfer diskutiert (Toporik et al. 2019). In diesem Komplex wird das Licht von Chlorophyllen auf der cytoplasmatischen Seite des Proteins IsiA absorbiert, als Exzitonen auf Chlorophylle an der luminalen Seite übertragen und von dort zum PSI_{tri} weitergeleitet. Hier sind besonders die luminalen Chlorophylle 14 und 17 (CLA_{IsiA},₁₄, CLA_{IsiA},₁₇) hervorzuheben, welche einen Mg-Mg-Abstand von weniger als 20 Å zu Chlorophyllen des PSI_{tri}

aufweisen. Da die Rate des Förster-Resonanzenergietransfers mit dem Abstand korreliert (proportional zu r^{-6}), wird der Mg-Mg-Abstand genutzt, um die Übertragung von Exzitonen abzuschätzen, wobei als Daumenregel ein Abstand von weniger als 20 Å für eine Übertragung notwendig ist. Der geringste Mg-Mg-Abstand zwischen IsiA und PSI ist mit 13,4 Å zwischen $CLA_{\text{IsiA},17}$ und $CLA_{\text{PsaF},1303}$ von PsaF zu finden (Abbildung 4.5). $CLA_{\text{IsiA},17}$ erhält dazu seine Exzitonen vom cytoplasmatischen $CLA_{\text{IsiA},8}$ des IsiA. Obwohl $CLA_{\text{PsaF},1303}$ einen sehr geringen Abstand zu den Chlorophyllen des IsiA aufweist, beträgt der geringste Mg-Mg-Abstand zu anderen Chlorophyllen des PSI_{tri} 19,5 Å (Abstand aus der SFX-Struktur). $CLA_{\text{PsaF},1304}$ grenzt auf der cytoplasmatischen Seite an $CLA_{\text{PsaF},1303}$ an. Der Mg-Mg-Abstand zum cytoplasmatischen $CLA_{\text{IsiA},8}$ beträgt 12,6 Å und zum cytoplasmatischen $CLA_{\text{PsaF},1301}$ 15,4 Å. Das in dieser Arbeit detektierte $CLA_{\text{PsaF},1304}$ ermöglicht somit einen zuzüglichen schnellen Exzitonentransfer von IsiA zum Reaktionszentrum. Die Existenz zuzüglicher Exzitonentransferwege ist nicht ungewöhnlich; so ist $CLA_{\text{PsaB},1233}$, das nicht in *Synechocystis* sp. vorkommt, in einem theoretischen Abstand von 13,4 Å zu $CLA_{\text{IsiA},14}$.

4.3.5 Asymmetrie im PSI-Trimer

In den Kristallstrukturen ist die asymmetrische Einheit des PSI_{tri} das PSI_{tri} -Monomer. Die elektronenmikroskopische C1-Struktur, die ohne Symmetrieparameter generiert wurde, weist geringe Unterschiede zwischen allen drei PSI_{tri} -Monomeren auf (RMSD = 0,26 Å). In *Synechocystis* sp. ist die asymmetrische Einheit der Kristallstruktur das PSI_{tri} (Malavath et al. 2018, Auflösung von 2,5 Å). Auch dort unterscheiden sich die PSI_{tri} -Monomere um 0,28 Å. Malavath et al. fiel auf, dass in den drei Monomeren unterschiedliche Kofaktoren lokalisiert sind. An denselben Koordinaten sind in den drei PSI_{tri} -Monomeren unterschiedliche Lipide und Carotinoide gebunden. Sowohl in der Struktur von Jordan et al. (2001, Auflösung von 2,5 Å) als auch in den Strukturen aus meiner Arbeit wurden die Carotinoide als β -Carotin modelliert. Eine nähere Unterscheidung unterschiedlicher Carotinoide war nicht möglich. Dagegen konnten die Lipide aufgrund ihrer deutlich unterschiedlichen hydrophilen Kopfgruppen auch in *T. elongatus* unterschieden werden. Neben den klar definierten Lipiden waren in den elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen von PSI aus *T. elongatus* viele weitere längliche EM-Dichten in der hydrophoben Membranebene zu erkennen. Diese konnten jedoch aufgrund der undefinierten hydrophilen Bereiche nicht identifiziert werden. Die hydrophilen Köpfe von Membranlipiden unterscheiden sich stark, während deren hydrophoben Kohlenwasserstoffketten sehr ähnlich aufgebaut sind. Dies lässt darauf schließen, dass auch in *T. elongatus* unterschiedliche Lipide an den drei PSI_{tri} -Monomeren gebunden sind, wobei die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten zu deutlichen EM-Dichten aufsummiert werden, die unterschiedlichen hydrophilen Köpfe jedoch nicht.

4.3.6 Wassermoleküle in der PSI-Struktur

In der EM-Dichte der elektronenmikroskopischen Messungen konnten zuzügliche Dichten nachgewiesen werden, die als Wassermoleküle modelliert wurden (Abschnitt 3.3.6). Die Modellierung von Wassermolekülen ist bereits bei einer Auflösung von 3,2 Å möglich (Khoshouei et al. 2017b). In elektronenmikroskopischen Strukturen ist es jedoch noch nicht üblich, Wassermoleküle zu modellieren. So wurde selbst in der kürzlich erschienenen PSI-Struktur aus *Anabaena* sp. mit einer

Auflösung von 2,37 Å (lokale Auflösung bis 2,0 Å) kein Wasser dargestellt. Dabei sind Wassermoleküle, die in der Nähe der ETC lokalisiert sind, sind über elektrostatische Wechselwirkungen am Elektronentransport beteiligt (Karyagina et al. 2007). Die in meiner Arbeit modellierten Wassermoleküle waren in zwei unterschiedlich erstellten EM-Dichten vorhanden (C3-Dichte und PSI_{tri}-Monomer-Dichte) und blieben auch während der Transformation der EM-Dichte in eine Ladungsdichte bestehen. Die modellierten Wassermoleküle zeigten eine gute Übereinstimmung zu Wassermolekülen aus der Kryo-XRD-Struktur (Jordan 2001). Wassermoleküle entlang der ETC, insbesondere zwischen den Phyllochinonen A₁ und dem Eisen-Schwefel-Zentrum F_X, sind hoch konserviert. Sie sind in der Kryo-XRD- und der Kryo-EM-Struktur von PSI aus *T. elongatus* nahezu identisch lokalisiert und können selbst in pflanzlichem PSI nachgewiesen werden (Mazor et al. 2017). Abweichungen treten dagegen an den hydrophilen Oberflächen des Proteins auf. In der Kryo-XRD-Struktur liegen keine Wassermoleküle an der Ferredoxinbindungsstelle vor, während diese Oberfläche in der Kryo-EM-Struktur mit Wassermolekülen gesättigt ist (Abbildung 3.42 in Abschnitt 3.3.6). Dies ist auf die unterschiedliche Ionenstärke und die unterschiedlichen pH-Werte der beiden Messungen zurückzuführen (Tabelle 4.2 in Abschnitt 4.3.1). In der PSI-Struktur aus *Synechocystis* sp., die mit 50 mM Essigsäure und 100 mM MgCl₂ bei pH 6,2 kristallisierte, ist die Ferredoxinbindungsstelle ebenfalls mit Wassermolekülen und Acetatmolekülen gesättigt. Selbst bei der Kristallisation desselben Proteins führen unterschiedliche Pufferzusammensetzungen zu abweichenden Positionen der gebundenen Wassermoleküle (Sanishvili et al. 1995).

Kapitel 5

Ausblick

Obwohl bereits 2002 Kokristalle aus PSI mit seinem Elektronenakzeptor Ferredoxin hergestellt werden konnten, gelang es erst 2018, eine Kostruktur der beiden Proteine mit einer Auflösung von 4,3 Å zu generieren (Fromme et al. 2002; Kubota-Kawai et al. 2018). Der lange Zeitraum verdeutlicht, wie schwierig es ist, Kostrukturen aus Superkomplexen mit löslichen Redoxmediatoren aufzuklären. In meiner Arbeit analysierte ich die Bindung des nativen Elektronendonors Cyt c_6 und des nicht nativen Elektronendonors Cyt c_{HH} an PSI. Durch theoretische Bindungsanalysen gelang es mir, Komplexe zwischen PSI und den beiden Cytochromen zu charakterisieren. Der theoretische Komplex aus PSI und Cyt c_6 stimmt mit der Kostruktur eines homologen Proteins überein (Axelrod et al. 2002). Die Bindung des Cyt c_6 an PSI wurde über 3-D-Klassifikationen in einer kryoelektronenmikroskopischen Analyse verifiziert und es konnten erfolgreich Kokristalle aus PSI und Cyt c_{HH} hergestellt werden. Die in meiner Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und generierten Protokolle dienen als Grundlage für weitere Untersuchungen von Kostrukturen.

Der Komplex aus Cyt c_{HH} oder Cyt c_6 und PSI lässt sich für biotechnologische Anwendungen nutzen (Kargul et al. 2012). Da sich Cyt c_6 nach erfolgtem Elektronentransfer von PSI löst, muss der Komplex stabilisiert werden. Eine solche Stabilisierung erfolgte bereits für einen Komplex aus Cyt c_6 , PSI und Hydrogenase mit Hilfe des Quervernetzers EDC und des Dithiol-Linkers 1,6-Hexandithiol (Lubner et al. 2011). Trotz Quervernetzung von Cyt c_6 mit PSI_{tri} gelang es in meiner Arbeit nicht den Komplex im Elektronenmikroskop hochaufgelöst zu untersuchen. Es zeigte sich, dass Cyt c_6 an unspezifischen Bindungsstellen gebunden vorlag. Um dies zu vermeiden, wäre es möglich, die theoretische Analyse des Komplexes um Protonierungswahrscheinlichkeiten und Konformationsänderungen der Seitenketten zu erweitern (Kieseritzky und Knapp 2007). Hiermit ließen sich Pufferbedingungen identifizieren, unter denen die Bindungsenergie unspezifischer Bindungsstellen geringer ist als die der spezifischen Bindungsstelle. Auch ist es sinnvoll für die Kostrukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie einen hohen Cyt c_6 -Beladungsgrad zu erreichen. Durch die Verwendung von PSI_{mono} statt PSI_{tri} kann sichergestellt werden, dass an jedem Reaktionszentrum ein Cyt c_6 gebunden vorliegt. Hierzu kann das in meiner Arbeit isolierte PSI_{mono} genutzt werden, da dieses eine hohe Qualität aufwies und bereits mit Kleinwinkelstreuung charakterisiert werden konnte.

In nachfolgenden Projekten soll PSI mit Enzymen wie der Formiatdehydrogenase (FDH) gekoppelt werden, um chemische Reaktionen durch Lichtenergie auf Elektrodenoberflächen zu realisieren. Es ist anzunehmen, dass beide gekoppelten Proteine sehr flexibel aneinanderbinden. Die elektronenmikroskopische Analyse erwies sich in meiner

Arbeit als geeignet, um flexible Bereiche wie die Untereinheit PsaK und zuzügliche Kofaktoren des PSI strukturell zu lösen. Im Gegensatz zu Cyt c_6 sind nachfolgende Enzyme wie die FDH groß genug, um sie in den Mikrografen zu identifizieren und sie korrekt zu orientieren, wodurch die Bindungsoberfläche strukturell gelöst werden kann.

Die elektronenmikroskopische Analyse eignet sich für die Analyse statischen Proteinen. Um dagegen zu verstehen, wie die Proteinumgebung die Direktionalität und den hocheffizienten Ladungstrennungs- und Stabilisierungsprozess der ETC von PSI steuert, ist eine zeitaufgelöste Analyse struktureller Veränderungen der Redoxkofaktoren notwendig. Hierfür kann der Elektronentransport mit der SFX-Methode durch Belichtung eines Kristalls gemessen werden. Im Rahmen meiner Arbeit wurden SFX-Strukturen von PSI bei Raumtemperatur gemessen. Dabei zeigte sich, dass Phe₆₆₉ im B-Ast der ETC flexibel ist, was eine der Ursachen für die schnellere Kinetik des B-Astes gegenüber dem A-Ast darstellen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, kann die strukturelle Änderung von Phe₆₆₉ während der Reduktion des B-Astes an einer XFEL-Strahlenquelle überprüft werden. Hierzu ist die Messung der Struktur 20 ns nach Belichtung nötig. Ein Protokoll zur Produktion der hierfür notwendigen Mikrokristalle wurde von mir entwickelt.

Die in meiner Arbeit erzielten Ergebnisse bilden die Grundlage für die nachfolgenden Forschungsprojekte, die zur Entwicklung einer neuen Generation von Biophotoelektroden führen sollen. Die effiziente Umwandlung von Lichtenergie in biochemische Rohstoffe rückt somit in greifbare Nähe.

Literatur

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. und Zwart, P. H. (Feb. 2010). „PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution“. In: *Acta Crystallographica Section D* 66.2, S. 213–221. DOI: 10.1107/S0907444909052925.
- Adir, N., Axelrod, H. L., Beroza, P., Isaacson, R. A., Rongey, S. H., Okamura, M. Y. und Feher, G. (Jan. 1996). „Co-crystallization and Characterization of the Photosynthetic Reaction Center-Cytochrome c_2 Complex from *Rhodobacter sphaeroides*“. In: *Biochemistry* 35.8, S. 2535–2547. DOI: 10.1021/bi9522054.
- Afonine, P. V., Headd, J., Terwilliger, T. und Adams, P. (2013). „New tool: phenix.real_space_refine“. In: *Computational Crystallography Newsletter* 4, S. 43–44.
- Allahverdiyeva, Y., Mustila, H., Ermakova, M., Bersanini, L., Richaud, P., Ajlani, G., Battchikova, N., Cournac, L. und Aro, E.-M. (März 2013). „Flavodiiron proteins Flv1 and Flv3 enable cyanobacterial growth and photosynthesis under fluctuating light“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.10, S. 4111. DOI: 10.1073/pnas.1221194110.
- Allen, P. M., Allen, H., Hill, O. und Walton, N. J. (Okt. 1984). „Surface modifiers for the promotion of direct electrochemistry of cytochrome c “. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 178.1, S. 69–86. DOI: 10.1016/S0022-0728(84)80024-8.
- Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A. und Nelson, N. (Jan. 2010). „Structure Determination and Improved Model of Plant Photosystem I“. In: *Journal of Biological Chemistry* 285.5, S. 3478–3486. DOI: 10.1074/jbc.M109.072645.
- Aquila, A., Hunter, M. S., Doak, R. B., Kirian, R. A., Fromme, P., White, T. A., Andreasson, J., Arnlund, D., Bajt, S., Barends, T. R. M., Barthelmess, M., Bogan, M. J., Bostedt, C., Bottin, H., Bozek, J. D., Caleman, C., Coppola, N., Davidsson, J., DePonte, D. P., Elser, V., Epp, S. W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Frank, M., Fromme, R., Graafsma, H., Grotjohann, I., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C. Y., Hartmann, A., Hartmann, R., Hau-Riege, S., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Holton, J. M., Hömke, A., Johansson, L., Kimmel, N., Kassemeyer, S., Krasniqi, F., Kühnel, K.-U., Liang, M., Lomb, L., Malmerberg, E., Marchesini, S., Martin, A. V., Maia, F. R. N. C., Messerschmidt, M., Nass, K., Reich, C., Neutze, R., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schmidt, C., Schmidt, K. E., Schulz, J., Seibert, M. M., Shoeman, R. L., Sierra, R., Soltau, H., Starodub, D., Stellato, F., Stern, S., Strüder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wang, X., Williams, G. J., Weidenspointner, G., Weierstall, U., Wunderer, C., Barty, A., Spence, J. C. H. und Chapman, H. N. (Jan. 2012). „Time-resolved protein nano-

- crystallography using an X-ray free-electron laser“. In: *Opt. Express* 20.3, S. 2706–2716. DOI: 10.1364/OE.20.002706.
- Armbruster, U., Labs, M., Pribil, M., Viola, S., Xu, W., Scharfenberg, M., Hertle, A. P., Rojahn, U., Jensen, P. E., Rappaport, F., Joliot, P., Dörmann, P., Wanner, G. und Leister, D. (Juli 2013). „*Arabidopsis* CURVATURE THYLAKOID1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature“. In: *The Plant Cell* 25.7, S. 2661. DOI: 10.1105/tpc.113.113118.
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Künzler, P. und Thöny-Meyer, L. (Okt. 1998). „Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-Type Cytochrome Subunits of the *cbb₃* Oxidase in *Escherichia coli*“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 251.3, S. 744–747. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9549.
- Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Okamura, M. Y., Yeh, A. P., Rees, D. C. und Feher, G. (Mai 2002). „X-ray Structure Determination of the Cytochrome *c*₂: Reaction Center Electron Transfer Complex from *Rhodobacter sphaeroides*“. In: *Journal of Molecular Biology* 319.2, S. 501–515. DOI: 10.1016/S0022-2836(02)00168-7.
- Badshah, S. L., Sun, J., Mula, S., Gorka, M., Baker, P., Luthra, R., Lin, S., Est, A. v. d., Golbeck, J. H. und Redding, K. E. (2018). „Mutations in algal and cyanobacterial Photosystem I that independently affect the yield of initial charge separation in the two electron transfer cofactor branches“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859.1, S. 42–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.10.003>.
- Baker, D. R., Manocchi, A. K., Lamicq, M. L., Li, M., Nguyen, K., Sumner, J. J., Bruce, B. D. und Lundgren, C. A. (März 2014). „Comparative Photoactivity and Stability of Isolated Cyanobacterial Monomeric and Trimeric Photosystem I“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 118.10, S. 2703–2711. DOI: 10.1021/jp407948p.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. und McCammon, J. A. (Aug. 2001). „Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.18, S. 10037–10041. DOI: 10.1073/pnas.181342398.
- Bartesaghi, A., Matthies, D., Banerjee, S., Merk, A. und Subramaniam, S. (Aug. 2014). „Structure of beta-galactosidase at 3.2-Å resolution obtained by cryo-electron microscopy“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.32, S. 11709. DOI: 10.1073/pnas.1402809111.
- Barth, P., Lagoutte, B. und Sétif, P. (Nov. 1998). „Ferredoxin Reduction by Photosystem I from *Synechocystis* sp. PCC 6803: Toward an Understanding of the Respective Roles of Subunits PsaD and PsaE in Ferredoxin Binding“. In: *Biochemistry* 37.46, S. 16233–16241. DOI: 10.1021/bi981379t.
- Beißinger, M., Sticht, H., Sutter, M., Ejchart, A., Haehnel, W. und Rösch, P. (Jan. 1998). „Solution structure of cytochrome *c*₆ from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*“. In: *The EMBO Journal* 17.1, S. 27–36. DOI: 10.1093/emboj/17.1.27.
- Bernal-Bayard, P., Pallara, C., Carmen Castell, M., Molina-Heredia, F. P., Fernández-Recio, J., Hervás, M. und Navarro, J. A. (Dez. 2015). „Interaction of photosystem I from *Phaeodactylum tricornutum* with plastocyanins as compared with its native cytochrome *c*₆: Reunion with a lost donor“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847.12, S. 1549–1559. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.09.006.
- Bertini, I., Bryant, D. A., Ciurli, S., Dikiy, A., Fernández, C. O., Luchinat, C., Safarov, N., Vila, A. J. und Zhao, J. (Dez. 2001). „Backbone Dynamics of Plastocyanin in

- Both Oxidation States: Solution Structure of the Reduced Form and Comparison with the Oxidized State“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.50, S. 47217–47226. DOI: 10.1074/jbc.M100304200.
- Bertini, I., Cavallaro, G. und Rosato, A. (Jan. 2006). „Cytochrome c: Occurrence and Functions“. In: *Chemical Reviews* 106.1, S. 90–115. DOI: 10.1021/cr050241v.
- Bianco, P. und Haladjian, J. (Jan. 1994). „Recent progress in the electrochemistry of c-type cytochromes“. In: *Biochimie* 76.7, S. 605–613. DOI: 10.1016/0300-9084(94)90137-6.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-C., Frutiger, S. und Hochstrasser, D. (Jan. 1993). „The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences“. In: *ELECTROPHORESIS* 14.1, S. 1023–1031. DOI: 10.1002/elps.11501401163.
- Bragg, W. H. und Bragg, W. L. (1913). „The Reflection of X-rays by Crystals“. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* 88.605, S. 428–438. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspa.1913.0040>.
- Bressan, M., Dall’Osto, L., Bargigia, I., Alcocer, M. J. P., Viola, D., Cerullo, G., D’Andrea, C., Bassi, R. und Ballottari, M. (Aug. 2016). „LHCII can substitute for LHCI as an antenna for photosystem I but with reduced light-harvesting capacity“. In: *Nature Plants* 2.9, S. 16131. DOI: 10.1038/nplants.2016.131.
- Briggs, G. E. und Haldane, J. B. (1925). „A Note on the Kinetics of Enzyme Action“. In: *The Biochemical journal* 19.2, S. 338–339.
- Busch, A. und Hippler, M. (Aug. 2011). „The structure and function of eukaryotic photosystem I“. In: *Regulation of Electron Transport in Chloroplasts* 1807.8, S. 864–877. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.09.009.
- Bushnell, G. W., Louie, G. V. und Brayer, G. D. (Juli 1990). „High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c“. In: *Journal of Molecular Biology* 214.2, S. 585–595. DOI: 10.1016/0022-2836(90)90200-6.
- Case, D., Betz, R., Cerutti, D., Cheatham, T., Darden, I., Duke, R., Giese, T., Gohlke, H., Goetz, A., Homeyer, N., Izadi, S., Janowski, P., Kaus, J., Kovalenko, A., Lee, T., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Mermelstein, D., Merz, K., Monard, G., Nguyen, H., Nguyen, H., Omelyan, I., Onufriev, A., Roe, D., Roitberg, A., Sagui, C., Simmerling, C., Botello-Smith, W., Swails, J., Walker, R., Wang, J., Wolf, R., Wu, X., Xiao, L. und Kollman (2016). *AMBER 2016*.
- Casella, S., Huang, F., Mason, D., Zhao, G.-Y., Johnson, G. N., Mullineaux, C. W. und Liu, L.-N. (Nov. 2017). „Dissecting the Native Architecture and Dynamics of Cyanobacterial Photosynthetic Machinery“. In: *Molecular Plant* 10.11, S. 1434–1448. DOI: 10.1016/j.molp.2017.09.019.
- Castenholz, R. W. (Jan. 1988). „Culturing methods for cyanobacteria“. In: *Methods in Enzymology*. Bd. 167. Academic Press, S. 68–93. DOI: 10.1016/0076-6879(88)67006-6.
- Cheng, T. M.-K., Blundell, T. L. und Fernandez-Recio, J. (2007). „pyDock: Electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein–protein docking“. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 68.2, S. 503–515. DOI: 10.1002/prot.21419.
- Chitnis, P. R., Purvis, D. und Nelson, N. (Okt. 1991). „Molecular cloning and targeted mutagenesis of the gene *psaF* encoding subunit III of photosystem I from the cyano-

- bacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. "In: *Journal of Biological Chemistry* 266.30, S. 20146–20151.
- Chow, W. S., Miller, C. und Anderson, J. M. (März 1991). „Surface charges, the heterogeneous lateral distribution of the two photosystems, and thylakoid stacking“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1057.1, S. 69–77. DOI: 10.1016/S0005-2728(05)80085-4.
- Ciornii Dmitri, Feifel Sven Christian, Hejazi Mahdi, Kölsch Adrian, Lokstein Heiko, Zouni Athina und Lisdat Fred (Sep. 2017). „Construction of photobiocathodes using multi-walled carbon nanotubes and photosystem I“. In: *physica status solidi (a)* 214.9, S. 1700017. DOI: 10.1002/pssa.201700017.
- Cordier, F., Caffrey, M., Brutscher, B., Cusanovich, M. A., Marion, D. und Blackledge, M. (Aug. 1998). „Solution structure, rotational diffusion anisotropy and local backbone dynamics of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome c211Edited by P. E. Wright“. In: *Journal of Molecular Biology* 281.2, S. 341–361. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1950.
- Crowley, P. B. und Ubbink, M. (Okt. 2003). „Close Encounters of the Transient Kind: Protein Interactions in the Photosynthetic Redox Chain Investigated by NMR Spectroscopy“. In: *Accounts of Chemical Research* 36.10, S. 723–730. DOI: 10.1021/ar0200955.
- Danielsen, E., Scheller, H. V., Bauer, R., Hemmingsen, L., Bjerrum, M. J. und Hansson, Ö. (Aug. 1999). „Plastocyanin Binding to Photosystem I as a Function of the Charge State of the Metal Ion: Effect of Metal Site Conformation“. In: *Biochemistry* 38.35, S. 11531–11540. DOI: 10.1021/bi990869y.
- De la Cerda, B., Díaz-Quintana, A., Navarro, J. A., Hervás, M. und De la Rosa, M. A. (Mai 1999). „Site-directed Mutagenesis of Cytochrome *c*₆ from *Synechocystis* sp. PCC 6803: The heme protein possesses a negatively charged area that may be isofunctional with the acidic patch of plastocyanin“. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.19, S. 13292–13297. DOI: 10.1074/jbc.274.19.13292.
- Díaz-Moreno, I., Díaz-Quintana, A., Molina-Heredia, F. P., Nieto, P. M., Hansson, Ö., De la Rosa, M. A. und Karlsson, B. G. (März 2005). „NMR Analysis of the Transient Complex between Membrane Photosystem I and Soluble Cytochrome *c*₆“. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.9, S. 7925–7931. DOI: 10.1074/jbc.M412422200.
- Díaz-Moreno, I., Díaz-Quintana, A., Subías, G., Mairs, T., De la Rosa, M. A. und Díaz-Moreno, S. (Mai 2006). „Detecting transient protein–protein interactions by X-ray absorption spectroscopy: The cytochrome *c*₆-photosystem I complex“. In: *FEBS Letters* 580.13, S. 3023–3028. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.045.
- Díaz-Quintana, A., Navarro, J., Hervás, M., Molina-Heredia, F., De la Cerda, B. und De la Rosa, M. (Feb. 2003). „A comparative structural and functional analysis of cyanobacterial plastocyanin and cytochrome *c*₆ as alternative electron donors to Photosystem I“. English. In: *Photosynthesis Research* 75.2, S. 97–110. DOI: 10.1023/A:1022841513592.
- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. und Baker, N. A. (Juli 2004). „PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations“. In: *Nucleic Acids Research* 32.suppl_2, W665–W667. DOI: 10.1093/nar/gkh381.
- Drepper, F., Hippler, M., Nitschke, W. und Haehnel, W. (Jan. 1996). „Binding Dynamics and Electron Transfer between Plastocyanin and Photosystem I“. In: *Biochemistry* 35.4, S. 1282–1295. DOI: 10.1021/bi951471e.

- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. und Cowtan, K. (2010). „Features and development of Coot“. In: *Acta Crystallographica Section D* 66.4, S. 486–501.
- Erickson, H. P. und Klug, A. (Nov. 1970). „The Fourier Transform of an Electron Micrograph: Effects of Defocussing and Aberrations, and Implications for the Use of Underfocus Contrast Enhancement“. In: *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 74.11, S. 1129–1137. DOI: 10.1002/bbpc.19700741109.
- Est, A. van der, Kandrashkin, Y., Shen, G. und Golbeck, J. (2005). „Alteration of phenylalanine PsaB F669 slows electron transfer in the PsaA branch of PS I“. In: *Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives*.
- Feifel, S. C., Lokstein, H., Hejazi, M., Zouni, A. und Lisdat, F. (Sep. 2015). „Unidirectional Photocurrent of Photosystem I on π -System-Modified Graphene Electrodes: Nanobionic Approaches for the Construction of Photobiohybrid Systems“. In: *Langmuir* 31.38, S. 10590–10598. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01625.
- Feigin, L. und Svergun, D. (1987). *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. Plenum Press, New York.
- Fischer, W. W., Hemp, J. und Johnson, J. E. (Juni 2016). „Evolution of Oxygenic Photosynthesis“. In: *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 44.1, S. 647–683. DOI: 10.1146/annurev-earth-060313-054810.
- Flombaum, P., Gallegos, J. L., Gordillo, R. A., Rincón, J., Zabala, L. L., Jiao, N., Karl, D. M., Li, W. K. W., Lomas, M. W., Veneziano, D., Vera, C. S., Vrugt, J. A. und Martiny, A. C. (Juni 2013). „Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.24, S. 9824. DOI: 10.1073/pnas.1307701110.
- Folea, I. M., Zhang, P., Aro, E.-M. und Boekema, E. J. (Mai 2008). „Domain organization of photosystem II in membranes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 investigated by electron microscopy“. In: *FEBS Letters* 582.12, S. 1749–1754. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.04.044.
- Franke, D. und Svergun, D. I. (Apr. 2009). „DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering“. In: *Journal of Applied Crystallography* 42.2, S. 342–346. DOI: 10.1107/S0021889809000338.
- Fraser, J. S., Bedem, H. van den, Samelson, A. J., Lang, P. T., Holton, J. M., Echols, N. und Alber, T. (Sep. 2011). „Accessing protein conformational ensembles using room-temperature X-ray crystallography“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.39, S. 16247. DOI: 10.1073/pnas.1111325108.
- Fromme, P., Bottin, H., Krauss, N. und Sétif, P. (Okt. 2002). „Crystallization and Electron Paramagnetic Resonance Characterization of the Complex of Photosystem I with its Natural Electron Acceptor Ferredoxin“. In: *Biophysical Journal* 83.4, S. 1760–1773. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)73942-8.
- Fromme, P. und Witt, H. T. (Juni 1998). „Improved isolation and crystallization of photosystem I for structural analysis“. In: *10th European Bioenergetics Conference* 1365.1–2, S. 175–184. DOI: 10.1016/S0005-2728(98)00059-0.
- Fuller, F. D., Gul, S., Chatterjee, R., Burgie, E. S., Young, I. D., Lebrette, H., Srinivas, V., Brewster, A. S., Michels-Clark, T., Clinger, J. A., Andi, B., Ibrahim, M., Pastor, E., Lichtenberg, C. de, Hussein, R., Pollock, C. J., Zhang, M., Stan, C. A., Kroll, T., Fransson, T., Weninger, C., Kubin, M., Aller, P., Lassalle, L., Bräuer, P., Miller, M. D., Amin, M., Koroidov, S., Roessler, C. G., Allaire, M., Sierra, R. G., Docker, P. T., Glowina, J. M., Nelson, S., Koglin, J. E., Zhu, D., Chollet, M., Song, S., Lemke, H., Liang, M., Sokaras, D., Alonso-Mori, R., Zouni, A., Messinger, J., Bergmann, U., Boal, A. K., Bollinger Jr, J. M., Krebs, C., Högbom, M., Phillips Jr,

- G. N., Vierstra, R. D., Sauter, N. K., Orville, A. M., Kern, J., Yachandra, V. K. und Yano, J. (Feb. 2017). „Drop-on-demand sample delivery for studying biocatalysts in action at X-ray free-electron lasers“. In: *Nature Methods* 14, S. 443.
- Gabb, H. A., Jackson, R. M. und Sternberg, M. J. (Sep. 1997). „Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information1“. In: *Journal of Molecular Biology* 272.1, S. 106–120. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1203.
- Gardian, Z., Bumba, L., Schrofel, A., Herbstova, M., Nebesarova, J. und Vacha, F. (Juni 2007). „Organisation of Photosystem I and Photosystem II in red alga *Cyanidium caldarium*: Encounter of cyanobacterial and higher plant concepts“. In: *Structure and Function of Photosystems* 1767.6, S. 725–731. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.01.021.
- Golbeck, J. H. (2006). *Photosystem I - The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*. Springer Netherlands.
- Golub, M., Combet, S., Wieland, D., Soloviov, D., Kuklin, A., Lokstein, H., Schmitt, F.-J., Olliges, R., Hecht, M., Eckert, H.-J. und Pieper, J. (Apr. 2017a). „Solution structure and excitation energy transfer in phycobiliproteins of *Acaryochloris marina* investigated by small angle scattering“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1858.4, S. 318–324. DOI: 10.1016/j.bbabi.2017.01.010.
- Golub, M., Hejazi, M., Kölsch, A., Lokstein, H., Wieland, D. C. F., Zouni, A. und Pieper, J. (2017b). „Solution structure of monomeric and trimeric photosystem I of *Thermosynechococcus elongatus* investigated by small-angle X-ray scattering“. In: *Photosynthesis Research* 133, S. 163–173. DOI: 10.1007/s11120-017-0342-6.
- Grimme, R. A., Lubner, C. E., Bryant, D. A. und Golbeck, J. H. (Mai 2008). „Photosystem I/Molecular Wire/Metal Nanoparticle Bioconjugates for the Photocatalytic Production of H₂“. In: *Journal of the American Chemical Society* 130.20, S. 6308–6309. DOI: 10.1021/ja800923y.
- Haehnel, W., Ratajczak, R. und Robenek, H. (Apr. 1989). „Lateral distribution and diffusion of plastocyanin in chloroplast thylakoids“. In: *The Journal of Cell Biology* 108.4, S. 1397–1405.
- Haldrup, A., Naver, H. und Scheller, H. V. (März 1999). „The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem“. In: *The Plant Journal* 17.6, S. 689–698. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00419.x.
- Hammersley, A. P., Svensson, S. O., Hanfland, M., Fitch, A. N. und Hausermann, D. (1996). „Two-dimensional detector software: From real detector to idealised image or two-theta scan“. In: *High Pressure Research* 14.4-6, S. 235–248. DOI: 10.1080/08957959608201408.
- Han, R., Rempfer, K., Zhang, M., Dobbek, H., Zouni, A., Dau, H. und Luber, S. (Aug. 2019). „Investigating the Structure and Dynamics of Apo-Photosystem II“. In: *ChemCatChem* 11.16, S. 4072–4080. DOI: 10.1002/cctc.201900351.
- Hardy, R. C. und Cottington, R. L. (Juni 1949). „Viscosity of deuterium oxide and water in the range 5 to 125 C“. en. In: *Journal of Research of the National Bureau of Standards* 42.6, S. 573. DOI: 10.6028/jres.042.049.
- Hatanaka, H., Sonoike, K., Hirano, M. und Katoh, S. (Feb. 1993). „Small subunits of Photosystem I reaction center complexes from *Synechococcus elongatus*. Is the psaF gene product required for oxidation of cytochrome *c*-553?“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1141.1, S. 45–51. DOI: 10.1016/0005-2728(93)90187-K.

- Hattne, J., Shi, D., Glynn, C., Zee, C.-T., Gallagher-Jones, M., Martynowycz, M. W., Rodriguez, J. A. und Gonen, T. (Mai 2018). „Analysis of Global and Site-Specific Radiation Damage in Cryo-EM“. In: *Structure* 26.5, 759–766.e4. DOI: 10.1016/j.str.2018.03.021.
- Hebert, H. (Okt. 2019). „CryoEM: a crystals to single particles round-trip“. In: *Current Opinion in Structural Biology* 58, S. 59–67. DOI: 10.1016/j.sbi.2019.05.008.
- Henderson, R. und Unwin, P. N. T. (Sep. 1975). „Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy“. In: *Nature* 257.5521, S. 28–32. DOI: 10.1038/257028a0.
- Hervás, M., De La Rosa, M. und Tollin, G. (1992). „A comparative laser-flash absorption spectroscopy study of algal plastocyanin and cytochrome *c*₅₅₂ photooxidation by photosystem I particles from spinach“. In: *European Journal of Biochemistry* 203.1-2, S. 115–120. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19835.x.
- Hervás, M., Díaz-Quintana, A., Kerfeld, C., Krogmann, D., De la Rosa, M. und Navarro, J. (März 2005). „Cyanobacterial Photosystem I lacks specificity in its interaction with cytochrome *c*₆ electron donors“. English. In: *Photosynthesis Research* 83.3, S. 329–333. DOI: 10.1007/s11120-005-1002-9.
- Hervás, M., Navarro, J. A., Diaz, A., Bottin, H. und De la Rosa, M. A. (Sep. 1995). „Laser-Flash Kinetic Analysis of the Fast Electron Transfer from Plastocyanin and Cytochrome *c*₆ to Photosystem I. Experimental Evidence on the Evolution of the Reaction Mechanism“. In: *Biochemistry* 34.36, S. 11321–11326. DOI: 10.1021/bi00036a004.
- Hervás, M., Navarro, J. A. und De la Rosa, M. A. (Okt. 2003). „Electron Transfer between Membrane Complexes and Soluble Proteins in Photosynthesis“. In: *Accounts of Chemical Research* 36.10, S. 798–805. DOI: 10.1021/ar020084b.
- Hervás, M., Ortega, J. M., Navarro, J. A., De la Rosa, M. A. und Bottin, H. (1994). „Laser flash kinetic analysis of *Synechocystis* PCC 6803 cytochrome *c*₆ and plastocyanin oxidation by Photosystem I“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1184.2–3, S. 235–241. DOI: 10.1016/0005-2728(94)90228-3.
- Hippler, M., Drepper, F., Farah, J. und Rochaix, J.-D. (Mai 1997). „Fast Electron Transfer from Cytochrome *c*₆ and Plastocyanin to Photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* Requires PsaF“. In: *Biochemistry* 36.21, S. 6343–6349. DOI: 10.1021/bi970082c.
- Hippler, M., Drepper, F., Haehnel, W. und Rochaix, J.-D. (Juni 1998). „The N-terminal domain of PsaF: Precise recognition site for binding and fast electron transfer from cytochrome *c*₆ and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.13, S. 7339. DOI: 10.1073/pnas.95.13.7339.
- Hippler, M., Drepper, F., Rochaix, J.-D. und Mühlenhoff, U. (Feb. 1999). „Insertion of the N-terminal Part of PsaF from *Chlamydomonas reinhardtii* into Photosystem I from *Synechococcus elongatus* Enables Efficient Binding of Algal Plastocyanin and Cytochrome *c*₆“. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.7, S. 4180–4188. DOI: 10.1074/jbc.274.7.4180.
- Holton, J. M. (März 2009). „A beginner’s guide to radiation damage“. eng. In: *Journal of synchrotron radiation* 16.Pt 2, S. 133–142. DOI: 10.1107/S0909049509004361.
- Hunter, C. A. und Sanders, J. K. M. (Juli 1990). „The nature of pi-pi interactions“. In: *Journal of the American Chemical Society* 112.14, S. 5525–5534. DOI: 10.1021/ja00170a016.

- Iwai, M., Yokono, M., Kono, M., Noguchi, K., Akimoto, S. und Nakano, A. (Jan. 2015). „Light-harvesting complex Lhcb9 confers a green alga-type photosystem I supercomplex to the moss *Physcomitrella patens*“. In: *Nature Plants* 1.2, S. 14008. DOI: 10.1038/nplants.2014.8.
- Janna Olmos, J. D., Becquet, P., Gront, D., Sar, J., Dabrowski, A., Gawlik, G., Teodorczyk, M., Pawlak, D. und Kargul, J. (2017). „Biofunctionalisation of p-doped silicon with cytochrome c553 minimises charge recombination and enhances photovoltaic performance of the all-solid-state photosystem I-based biophotocathode“. In: *RSC Advances* 7.75, S. 47854–47866. DOI: 10.1039/C7RA10895H.
- Jensen, P. E., Bassi, R., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C. und Scheller, H. V. (Mai 2007). „Structure, function and regulation of plant photosystem I“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1767.5, S. 335–352. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.03.004.
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G. und Im, W. (2008). „CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM“. In: *Journal of Computational Chemistry* 29.11, S. 1859–1865. DOI: 10.1002/jcc.20945.
- Jordan, P. (2001). „Röntgenstrukturanalyse des trimeren Photosystems I aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* bei 2,5 Å Auflösung“. Diss. Freie Universität Berlin.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W. und Krauß, N. (Juni 2001). „Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution“. In: *Nature* 411.6840, S. 909–917. DOI: 10.1038/35082000.
- Juers, D. H. und Matthews, B. W. (Aug. 2001). „Reversible lattice repacking illustrates the temperature dependence of macromolecular interactions“. Edited by P.E. Wright“. In: *Journal of Molecular Biology* 311.4, S. 851–862. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4891.
- Kaňa, R., Kotabová, E., Komárek, O., Šedivá, B., Papageorgiou, G. C., Govindjee und Prášil, O. (2012). „The slow S to M fluorescence rise in cyanobacteria is due to a state 2 to state 1 transition“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817.8, S. 1237–1247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.024>.
- Kaňa, R., Kotabová, E., Lukeš, M., Papáček, Š., Matono, C., Liu, L.-N., Prášil, O. und Mullineaux, C. W. (Aug. 2014). „Phycobilisome Mobility and Its Role in the Regulation of Light Harvesting in Red Algae“. In: *Plant Physiology* 165.4, S. 1618. DOI: 10.1104/pp.114.236075.
- Kapoor, K., Cashman, D. J., Nientimp, L., Bruce, B. D. und Baudry, J. (Jan. 2018). „Binding Mechanisms of Electron Transport Proteins with Cyanobacterial Photosystem I: An Integrated Computational and Experimental Model“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 122.3, S. 1026–1036. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b08307.
- Kargul, J., Janna Olmos, J. D. und Krupnik, T. (Nov. 2012). „Structure and function of photosystem I and its application in biomimetic solar-to-fuel systems“. In: *Perspectives in Experimental Plant Biology* 169.16, S. 1639–1653. DOI: 10.1016/j.jplph.2012.05.018.
- Karyagina, I., Pushkar, Y., Stehlik, D., Est, A. van der, Ishikita, H., Knapp, E.-W., Jagannathan, B., Agalarov, R. und Golbeck, J. H. (Sep. 2007). „Contributions of the Protein Environment to the Midpoint Potentials of the A1 Phylloquinones and the FX Iron-Sulfur Cluster in Photosystem I“. In: *Biochemistry* 46.38, S. 10804–10816. DOI: 10.1021/bi700846z.

- Kaszuba, K., Postila, P. A., Cramariuc, O., Sarewicz, M., Osyczka, A., Vattulainen, I. und Róg, T. (Apr. 2013). „Parameterization of the prosthetic redox centers of the bacterial cytochrome *bc*₁ complex for atomistic molecular dynamics simulations“. In: *Theoretical Chemistry Accounts* 132.6, S. 1370. DOI: 10.1007/s00214-013-1370-8.
- Kauzmann, W. (1959). „Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation“. In: *Advances in Protein Chemistry*. Hrsg. von M. A. C.B. Anfinsen Kenneth Bailey and John T. Edsall. Bd. Volume 14. Academic Press, S. 1–63.
- Kern, J., Loll, B., Lüneberg, C., DiFiore, D., Biesiadka, J., Irrgang, K.-D. und Zouni, A. (Jan. 2005). „Purification, characterisation and crystallisation of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706.1–2, S. 147–157. DOI: 10.1016/j.bbabi.2004.10.007.
- Kern, J., Chatterjee, R., Young, I. D., Fuller, F. D., Lassalle, L., Ibrahim, M., Gul, S., Fransson, T., Brewster, A. S., Alonso-Mori, R., Hussein, R., Zhang, M., Douthit, L., Lichtenberg, C. de, Cheah, M. H., Shevela, D., Wersig, J., Seuffert, I., Sokaras, D., Pastor, E., Weninger, C., Kroll, T., Sierra, R. G., Aller, P., Butryn, A., Orville, A. M., Liang, M., Batyuk, A., Koglin, J. E., Carbajo, S., Boutet, S., Moriarty, N. W., Holton, J. M., Dobbek, H., Adams, P. D., Bergmann, U., Sauter, N. K., Zouni, A., Messinger, J., Yano, J. und Yachandra, V. K. (Nov. 2018). „Structures of the intermediates of Kok’s photosynthetic water oxidation clock“. In: *Nature* 563.7731, S. 421–425. DOI: 10.1038/s41586-018-0681-2.
- Khoshouei, M., Danev, R., Plitzko, J. M. und Baumeister, W. (Aug. 2017a). „Revisiting the Structure of Hemoglobin and Myoglobin with Cryo-Electron Microscopy“. In: *John Kendrew’s 100th Anniversary Special Edition* 429.17, S. 2611–2618. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.07.004.
- Khoshouei, M., Radjainia, M., Baumeister, W. und Danev, R. (Juni 2017b). „Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate“. In: *Nature Communications* 8.1, S. 16099. DOI: 10.1038/ncomms16099.
- Kieseritzky, G. und Knapp, E.-W. (Dez. 2007). „Optimizing pKA computation in proteins with pH adapted conformations“. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 71.3, S. 1335–1348. DOI: 10.1002/prot.21820.
- Kikhney, A. G. und Svergun, D. I. (Sep. 2015). „A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins“. In: *FEBS Letters* 589.19PartA, S. 2570–2577. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.08.027.
- Kiliszek, M., Harputlu, E., Szalkowski, M., Kowalska, D., Unlu, C. G., Haniewicz, P., Abram, M., Wiwatowski, K., Niedziółka-Jönsson, J., Maćkowski, S., Ocakoglu, K. und Kargul, J. (2018). „Orientation of photosystem I on graphene through cytochrome *c553* leads to improvement in photocurrent generation“. In: *Journal of Materials Chemistry A* 6.38, S. 18615–18626. DOI: 10.1039/C8TA02420K.
- Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstova, M., Tsabari, O., Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E. und Reich, Z. (Dez. 2011). „Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen“. en. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.50, S. 20248–20253. DOI: 10.1073/pnas.1104141109.
- Kjaerulff, S., Andersen, B., Nielsen, V. S., Møller, B. L. und Okkels, J. S. (Sep. 1993). „The PSI-K subunit of photosystem I from barley (*Hordeum vulgare* L.). Evidence for a gene duplication of an ancestral PSI-G/K gene.“ In: *Journal of Biological Chemistry* 268.25, S. 18912–18916.

- Kłodawska, K., Kovács, L., Várkonyi, Z., Kis, M., Sozer, Ö., Laczkó-Dobos, H., Kóbori, O., Domonkos, I., Strzałka, K., Gombos, Z. und Malec, P. (Dez. 2014). „Elevated Growth Temperature Can Enhance Photosystem I Trimer Formation and Affects Xanthophyll Biosynthesis in Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 Cells“. In: *Plant and Cell Physiology* 56.3, S. 558–571. DOI: 10.1093/pcp/pcu199.
- Kok, B. (Nov. 1956). „On the reversible absorption change at 705 m μ in photosynthetic organisms“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 22.2, S. 399–401. DOI: 10.1016/0006-3002(56)90172-X.
- Kölsch, A., Hejazi, M., Stieger, K. R., Feifel, S. C., Kern, J. F., Müh, F., Lisdat, F., Lokstein, H. und Zouni, A. (Apr. 2018). „Insights into the binding behavior of native and non-native cytochromes to Photosystem I from *Thermosynechococcus elongatus*“. In: *Journal of Biological Chemistry*. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000953.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. und Svergun, D. I. (Okt. 2003). „PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis“. In: *Journal of Applied Crystallography* 36.5, S. 1277–1282. DOI: 10.1107/S0021889803012779.
- Kouřil, R., Oosterwijk, N. van, Yakushevskaya, A. E. und Boekema, E. J. (2005). „Photosystem I: a search for green plant trimers“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 4.12, S. 1091–1094. DOI: 10.1039/B505519A.
- Kramer, D. M., Sacksteder, C. A. und Cruz, J. A. (1999). „How acidic is the lumen?“ In: *Photosynthesis Research* 60.2, S. 151–163. DOI: 10.1023/A:1006212014787.
- Krauß, N., Hinrichs, W., Witt, I., Fromme, P., Pritzkow, W., Dauter, Z., Betzel, C., Wilson, K. S., Witt, H. T. und Saenger, W. (1993). „Three-dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Å resolution“. In: *Nature* 361, S. 326–331.
- Kretzschmar, M. (2019). *Isolation, Reinigung und Kristallisation von Photosystem I aus *Thermosynechococcus elongatus* mit dem Detergens C12E8*. Bachelorarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kriminski, S., Kazmierczak, M. und Thorne, R. E. (Apr. 2003). „Heat transfer from protein crystals: implications for flash-cooling and X-ray beam heating“. In: *Acta Crystallographica Section D* 59.4, S. 697–708. DOI: 10.1107/S0907444903002713.
- Krug, M., Weiss, M. S., Heinemann, U. und Mueller, U. (2012). „XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS“. In: *Journal of Applied Crystallography* 45.3, S. 568–572.
- Kubota-Kawai, H., Mutoh, R., Shinmura, K., Sétif, P., Nowaczyk, M. M., Rögner, M., Ikegami, T., Tanaka, H. und Kurisu, G. (Apr. 2018). „X-ray structure of an asymmetrical trimeric ferredoxin–photosystem I complex“. In: *Nature Plants* 4.4, S. 218–224. DOI: 10.1038/s41477-018-0130-0.
- Kühlbrandt, W. (März 2014). „The Resolution Revolution“. In: *Science* 343.6178, S. 1443. DOI: 10.1126/science.1251652.
- Kurashov, V., Gorke, M., Milanovsky, G. E., Johnson, T. W., Cherepanov, D. A., Semenov, A. Y. und Golbeck, J. H. (Dez. 2018). „Critical evaluation of electron transfer kinetics in P700–FA/FB, P700–FX, and P700–A1 Photosystem I core complexes in liquid and in trehalose glass“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859.12, S. 1288–1301. DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.09.367.
- Laemmli, U. K. (Aug. 1970). „Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4“. In: *Nature* 227.5259, S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

- Larson, J. W. und Wraight, C. A. (Dez. 2000). „Preferential Binding of Equine Ferricytochrome c to the Bacterial Photosynthetic Reaction Center from *Rhodospira rubra*“. In: *Biochemistry* 39.48, S. 14822–14830. DOI: 10.1021/bi0012991.
- Laughlin, T. G., Bayne, A. N., Trempe, J.-F., Savage, D. F. und Davies, K. M. (Feb. 2019). „Structure of the complex I-like molecule NDH of oxygenic photosynthesis“. In: *Nature* 566.7744, S. 411–414. DOI: 10.1038/s41586-019-0921-0.
- Le, R. K., Harris, B. J., Iwuchukwu, I. J., Bruce, B. D., Cheng, X., Qian, S., Heller, W. T., O’Neill, H. und Frymier, P. D. (Mai 2014). „Analysis of the solution structure of *Thermosynechococcus elongatus* photosystem I in n-dodecyl- β -D-maltoside using small-angle neutron scattering and molecular dynamics simulation“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 550–551, S. 50–57. DOI: 10.1016/j.abb.2014.04.005.
- Li, M., CALTEAU, A., Semchonok, D. A., Witt, T. A., Nguyen, J. T., Sassoon, N., Boekema, E. J., Whitelegge, J., Gugger, M. und Bruce, B. (Jan. 2019). „Physiological and Evolutionary Implications of Tetrameric Photosystem I in Cyanobacteria“. In: *bioRxiv*, S. 544353. DOI: 10.1101/544353.
- Lin, T.-J. und O’Malley, P. J. (Juli 2011). „Binding Site Influence on the Electronic Structure and Electron Paramagnetic Resonance Properties of the Phylloquinone Free Radical of Photosystem I“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 115.29, S. 9311–9319. DOI: 10.1021/jp203484w.
- Lomize, M. A., Pogozheva, I. D., Joo, H., Mosberg, H. I. und Lomize, A. L. (Sep. 2011). „OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes“. In: *Nucleic Acids Research* 40.D1, S. D370–D376. DOI: 10.1093/nar/gkr703.
- Lubner, C. E., Applegate, A. M., Knörzer, P., Ganago, A., Bryant, D. A., Happe, T. und Golbeck, J. H. (Dez. 2011). „Solar hydrogen-producing bionanodevice outperforms natural photosynthesis“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.52, S. 20988–20991. DOI: 10.1073/pnas.1114660108.
- Ma, L., Hass, M. A. S., Vierick, N., Kristensen, S. M., Ulstrup, J. und Led, J. J. (Jan. 2003). „Backbone Dynamics of Reduced Plastocyanin from the Cyanobacterium *Anabaena variabilis*: Regions Involved in Electron Transfer Have Enhanced Mobility,“ in: *Biochemistry* 42.2, S. 320–330. DOI: 10.1021/bi020553h.
- MacGregor-Chatwin, C., Jackson, P. J., Sener, M., Chidgey, J. W., Hitchcock, A., Qian, P., Mayneord, G. E., Johnson, M. P., Luthey-Schulten, Z., Dickman, M. J., Scanlan, D. J. und Hunter, C. N. (Juli 2019). „Membrane organization of photosystem I complexes in the most abundant phototroph on Earth“. In: *Nature Plants*. DOI: 10.1038/s41477-019-0475-z.
- MacGregor-Chatwin, C., Sener, M., Barnett, S. F., Hitchcock, A., Barnhart-Dailey, M. C., Maghlaoui, K., Barber, J., Timlin, J. A., Schulten, K. und Hunter, C. N. (März 2017). „Lateral segregation of photosystem I in cyanobacterial thylakoids“. In: *The Plant Cell*. DOI: 10.1105/tpc.17.00071.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker Jr, C. T., Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M. und Tiedje, J. M. (Jan. 2001). „The RDP-II (Ribosomal Database Project)“. eng. In: *Nucleic acids research* 29.1, S. 173–174. DOI: 10.1093/nar/29.1.173.
- Majeed, W., Zhang, Y., Xue, Y., Ranade, S., Blue, R. N., Wang, Q. und He, Q. (Sep. 2012). „RpaA Regulates the Accumulation of Monomeric Photosystem I and PsbA under High Light Conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803“. In: *PLOS ONE* 7.9, e45139. DOI: 10.1371/journal.pone.0045139.

- Makita, H. und Hastings, G. (Juni 2015). „Directionality of electron transfer in cyanobacterial photosystem I at 298 and 77K“. In: *FEBS Letters* 589.13, S. 1412–1417. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.04.048.
- Malavath, T., Caspy, I., Netzer-El, S. Y., Klaiman, D. und Nelson, N. (Feb. 2018). „Structure and function of wild-type and subunit-depleted photosystem I in *Synechocystis*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.02.002.
- Malvern (2015). *MicroCal ITC-ORIGIN Analysis Software User Manual MAN0567*.
- Marco, P., Elman, T. und Yacoby, I. (2019). „Binding of ferredoxin NADP⁺ oxidoreductase (FNR) to plant photosystem I“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1860.9, S. 689–698. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.07.007>.
- Mazor, Y., Borovikova, A., Caspy, I. und Nelson, N. (März 2017). „Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution“. In: *Nature Plants* 3, S. 17014.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. und Read, R. J. (Aug. 2007). „Phaser crystallographic software“. In: *Journal of Applied Crystallography* 40.4, S. 658–674. DOI: 10.1107/S0021889807021206.
- Merchant, S., Hill, K. und Howe, G. (Juni 1991). „Dynamic interplay between two copper-titrating components in the transcriptional regulation of cyt c6.“ In: *The EMBO Journal* 10.6, S. 1383–1389.
- Michaelis, L. und Menten, M. (1913). „Die Kinetik der Invertinwirkung“. In: *Biochemische Zeitschrift* 49, S. 333–369.
- Mignée, C., Mutoh, R., Krieger-Liszkay, A., Kurisu, G. und Sétif, P. (Dez. 2017). „Gallium ferredoxin as a tool to study the effects of ferredoxin binding to photosystem I without ferredoxin reduction“. In: *Photosynthesis Research* 134.3, S. 251–263. DOI: 10.1007/s11120-016-0332-0.
- Milanovsky, G., Gupta, O., Petrova, A., Mamedov, M., Gorka, M., Cherepanov, D., Golbeck, J. H. und Semenov, A. (2019). „Multiple pathways of charge recombination revealed by the temperature dependence of electron transfer kinetics in cyanobacterial photosystem I“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1860.8, S. 601–610. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.06.008>.
- El-Mohsnawy, E., Kopczak, M. J., Schlodder, E., Nowaczyk, M., Meyer, H. E., Warscheid, B., Karapetyan, N. V. und Rögner, M. (Apr. 2010). „Structure and Function of Intact Photosystem 1 Monomers from the Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*“. In: *Biochemistry* 49.23, S. 4740–4751. DOI: 10.1021/bi901807p.
- Molčanov, K. und Kojić-Prodić, B. (März 2019). „Towards understanding π -stacking interactions between non-aromatic rings“. In: *IUCrJ* 6.2, S. 156–166. DOI: 10.1107/S2052252519000186.
- Molina-Heredia, F. P., Díaz-Quintana, A., Hervás, M., Navarro, J. A. und De la Rosa, M. A. (Nov. 1999). „Site-directed Mutagenesis of Cytochrome c₆ from *Anabaena* Species PCC 7119: Identification of surface residues of the Hemeprotein involved in Photosystem I reduction“. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.47, S. 33565–33570. DOI: 10.1074/jbc.274.47.33565.
- Molina-Heredia, F. P., Hervás, M., Navarro, J. A. und De la Rosa, M. A. (Jan. 2001). „A Single Arginyl Residue in Plastocyanin and in Cytochrome c₆ from the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7119 Is Required for Efficient Reduction of Photosystem

- I“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.1, S. 601–605. DOI: 10.1074/jbc.M007081200.
- Moreno-Beltrán, B., Díaz-Moreno, I., González-Arzola, K., Guerra-Castellano, A., Velázquez-Campoy, A., De la Rosa, M. A. und Díaz-Quintana, A. (2015). „Respiratory complexes III and IV can each bind two molecules of cytochrome c at low ionic strength“. In: *FEBS Letters* 589.4, S. 476–483. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.01.004.
- Moser, C. C. und Dutton, P. L. (Apr. 1988). „Cytochrome c and c₂ binding dynamics and electron transfer with photosynthetic reaction center protein and other integral membrane redox proteins“. In: *Biochemistry* 27.7, S. 2450–2461. DOI: 10.1021/bi00407a031.
- Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S. und Dutton, P. L. (Feb. 1992). „Nature of biological electron transfer“. In: *Nature* 355.6363, S. 796–802. DOI: 10.1038/355796a0.
- Mueller, U., Darowski, N., Fuchs, M. R., Forster, R., Hellmig, M., Paithankar, K. S., Puhlinger, S., Steffien, M., Zocher, G. und Weiss, M. S. (2012). „Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin“. In: *Journal of Synchrotron Radiation* 19.3, S. 442–449.
- Müh, F. und Zouni, A. (Juni 2005). „Extinction coefficients and critical solubilisation concentrations of photosystems I and II from *Thermosynechococcus elongatus*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1708.2, S. 219–228. DOI: 10.1016/j.bbabi.2005.03.005.
- Müh, F. und Zouni, A. (Okt. 2008). „Micelle formation in the presence of photosystem I“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778.10, S. 2298–2307. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.05.016.
- Mühlenhoff, U. und Chauvat, F. (1996). „Gene transfer and manipulation in the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*“. In: *Molecular and General Genetics MGG* 252.1, S. 93–100. DOI: 10.1007/BF02173209.
- Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. und Vagin, A. A. (2011). „REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures“. In: *Acta Crystallographica Section D* 67.4, S. 355–367.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. und Tabata, S. (Jan. 2002). „Complete Genome Structure of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1“. In: *DNA Research* 9.4, S. 123–130. DOI: 10.1093/dnares/9.4.123.
- Navarro, J. A., Hervás, M., Sun, J., De la Cerda, B., Chitnis, P. R. und De la Rosa, M. A. (2000). „Negatively charged residues in the H loop of PsaB subunit in Photosystem I from *Synechocystis* sp. PCC 6803 appear to be responsible for electrostatic repulsions with plastocyanin“. In: *Photosynthesis Research* 65.1, S. 63–68. DOI: 10.1023/A:1006404621724.
- Nguyen, K. und Bruce, B. D. (Sep. 2014). „Growing green electricity: Progress and strategies for use of Photosystem I for sustainable photovoltaic energy conversion“. In: *Photosynthesis Research for Sustainability: Keys to Produce Clean Energy* 1837.9, S. 1553–1566. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.12.013.
- Nguyen, K., Vaughn, M., Frymier, P. und Bruce, B. D. (2017). „In vitro kinetics of P700⁺ reduction of *Thermosynechococcus elongatus* trimeric Photosystem I

- complexes by recombinant cytochrome c_6 using a Joliot-type LED spectrophotometer“. In: *Photosynthesis Research* 131.1, S. 79–91. DOI: 10.1007/s11120-016-0300-8.
- Niedermeyer, T. H. J. und Strohal, M. (Sep. 2012). „mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra“. In: *PLOS ONE* 7.9, e44913. DOI: 10.1371/journal.pone.0044913.
- Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. und Jensen, J. H. (Feb. 2011). „PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions“. In: *Journal of Chemical Theory and Computation* 7.2, S. 525–537. DOI: 10.1021/ct100578z.
- Pan, X., Ma, J., Su, X., Cao, P., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X. und Li, M. (Juni 2018). „Structure of the maize photosystem I supercomplex with light-harvesting complexes I and II“. In: *Science* 360.6393, S. 1109. DOI: 10.1126/science.aat1156.
- Pelletier, H. und Kraut, J. (Dez. 1992). „Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c “. In: *Science* 258.5089, S. 1748–1755. DOI: 10.1126/science.1334573.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. und Ferrin, T. E. (2004). „UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis“. In: *Journal of Computational Chemistry* 25.13, S. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
- Pettigrew, G., Goodhew, C., Cooper, A., Nutley, M., Jumel, K. und Harding, S. (2003). „The Electron Transfer Complexes of Cytochrome c Peroxidase from *Paracoccus denitrificans*“. In: *Biochemistry* 42.7, S. 2046–2055.
- Pi, X., Tian, L., Dai, H.-E., Qin, X., Cheng, L., Kuang, T., Sui, S.-F. und Shen, J.-R. (Apr. 2018). „Unique organization of photosystem I–light-harvesting supercomplex revealed by cryo-EM from a red alga“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.17, S. 4423. DOI: 10.1073/pnas.1722482115.
- Plöchl, M., Torabi, S., Rantala, M., Tikkanen, M., Suorsa, M., Jensen, P.-E., Aro, E. M. und Meurer, J. (Sep. 2016). „The Low Molecular Weight Protein PsaI Stabilizes the Light-Harvesting Complex II Docking Site of Photosystem I“. In: *Plant Physiology* 172.1, S. 450. DOI: 10.1104/pp.16.00647.
- Poulos, T. L., Sheriff, S. und Howard, A. J. (Okt. 1987). „Cocrystals of yeast cytochrome c peroxidase and horse heart cytochrome c “. In: *Journal of Biological Chemistry* 262.29, S. 13881–13884.
- Proux-Delrouyre, V., Demaille, C., Leibl, W., Sétif, P., Bottin, H. und Bourdillon, C. (Nov. 2003). „Electrocatalytic Investigation of Light-Induced Electron Transfer between Cytochrome c_6 and Photosystem I“. In: *Journal of the American Chemical Society* 125.45, S. 13686–13692. DOI: 10.1021/ja0363819.
- Ptushenko, V. V., Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I. und Semenov, A. Y. (Mai 2008). „Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I“. In: *Photosynthesis Research* 97.1, S. 55. DOI: 10.1007/s11120-008-9309-y.
- Rabenstein, B. und Knapp, E.-W. (März 2001). „Calculated pH-Dependent Population and Protonation of Carbon-Monoxide-Myoglobin Conformers“. In: *Biophysical Journal* 80.3, S. 1141–1150. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76091-2.
- Rigby, S. E., Muhiuddin, I. P., Evans, M. C., Purton, S. und Heathcote, P. (Okt. 2002). „Photoaccumulation of the PsaB phyllosemiquinone in Photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1556.1, S. 13–20. DOI: 10.1016/S0005-2728(02)00281-5.

- Sanishvili, R., Volz, K., Westbrook, E. und Margoliash, E. (Juli 1995). „The low ionic strength crystal structure of horse cytochrome c at 2.1 Å resolution and comparison with its high ionic strength counterpart“. In: *Structure* 3.7, S. 707–716. DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00205-2.
- Santabarbara, S., Kuprov, I., Poluektov, O., Casal, A., Russell, C. A., Purton, S. und Evans, M. C. W. (Nov. 2010). „Directionality of Electron-Transfer Reactions in Photosystem I of Prokaryotes: Universality of the Bidirectional Electron-Transfer Model“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 114.46, S. 15158–15171. DOI: 10.1021/jp1044018.
- Scherzer, O. (Jan. 1949). „The Theoretical Resolution Limit of the Electron Microscope“. In: *Journal of Applied Physics* 20.1, S. 20–29. DOI: 10.1063/1.1698233.
- Scheuermann, T. H. und Brautigam, C. A. (Apr. 2015). „High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: New features of NITPIC“. In: *Methods* 76, S. 87–98. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.11.024.
- Schrödinger, LLC (Nov. 2015). „The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8“.
- Schuller, J. M., Birrell, J. A., Tanaka, H., Konuma, T., Wulfhorst, H., Cox, N., Schuller, S. K., Thiemann, J., Lubitz, W., Sétif, P., Ikegami, T., Engel, B. D., Kurisu, G. und Nowaczyk, M. M. (Jan. 2019). „Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer“. In: *Science* 363.6424, S. 257. DOI: 10.1126/science.aau3613.
- Semchonok, D. A., Li, M., Bruce, B. D., Oostergetel, G. T. und Boekema, E. J. (Sep. 2016). „Cryo-EM structure of a tetrameric cyanobacterial photosystem I complex reveals novel subunit interactions“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857.9, S. 1619–1626. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.06.012.
- Sharon, I., Alperovitch, A., Rohwer, F., Haynes, M., Glaser, F., Atamna-Ismaeel, N., Pinter, R. Y., Partensky, F., Koonin, E. V., Wolf, Y. I., Nelson, N. und Béjà, O. (Aug. 2009). „Photosystem I gene cassettes are present in marine virus genomes“. In: *Nature* 461, S. 258.
- Sharon, I., Battchikova, N., Aro, E.-M., Giglione, C., Meinel, T., Glaser, F., Pinter, R. Y., Breitbart, M., Rohwer, F. und Béjà, O. (Feb. 2011). „Comparative metagenomics of microbial traits within oceanic viral communities“. In: *The ISME Journal* 5, S. 1178.
- Sherman, D. M., Troyan, T. A. und Sherman, L. A. (Sep. 1994). „Localization of Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Radial Asymmetry in the Photosynthetic Complexes)“. In: *Plant Physiology* 106.1, S. 251. DOI: 10.1104/pp.106.1.251.
- Shestakov, S. V. und Karbysheva, E. A. (Juli 2017). „The origin and evolution of cyanobacteria“. In: *Biology Bulletin Reviews* 7.4, S. 259–272. DOI: 10.1134/S2079086417040090.
- Shimada, S., Shinzawa-Itoh, K., Baba, J., Aoe, S., Shimada, A., Yamashita, E., Kang, J., Tateno, M., Yoshikawa, S. und Tsukihara, T. (Dez. 2016). „Complex structure of cytochrome *c*–cytochrome *c* oxidase reveals a novel protein–protein interaction mode“. In: *The EMBO Journal*. DOI: 10.15252/embj.201695021.
- Sommer, F., Drepper, F., Haehnel, W. und Hippler, M. (Mai 2004). „The Hydrophobic Recognition Site Formed by Residues PsaA-Trp⁶⁵¹ and PsaB-Trp⁶²⁷ of Photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* Confers Distinct Selectivity for Binding of Plastocyanin and Cytochrome *c*₆“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.19, S. 20009–20017. DOI: 10.1074/jbc.M313986200.

- Sommer, F., Drepper, F., Haehnel, W. und Hippler, M. (Nov. 2006). „Identification of Precise Electrostatic Recognition Sites between Cytochrome *c*₆ and the Photosystem I Subunit PsaF Using Mass Spectrometry“. In: *Journal of Biological Chemistry* 281.46, S. 35097–35103. DOI: 10.1074/jbc.M607384200.
- Sommer, F., Drepper, F. und Hippler, M. (Feb. 2002). „The Luminal Helix I of PsaB Is Essential for Recognition of Plastocyanin or Cytochrome *c*₆ and Fast Electron Transfer to Photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.8, S. 6573–6581. DOI: 10.1074/jbc.M110633200.
- Staehelin, L. A. (Okt. 1976). „Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes in vitro.“ In: *The Journal of Cell Biology* 71.1, S. 136. DOI: 10.1083/jcb.71.1.136.
- Stieger, K. R., Feifel, S. C., Lokstein, H., Hejazi, M., Zouni, A. und Lisdat, F. (2016a). „Biohybrid architectures for efficient light-to-current conversion based on photosystem I within scalable 3D mesoporous electrodes“. In: *Journal of Materials Chemistry A* 4.43, S. 17009–17017. DOI: 10.1039/C6TA07141D.
- Stieger, K. R., Ciornii, D., Kölsch, A., Hejazi, M., Lokstein, H., Feifel, S. C., Zouni, A. und Lisdat, F. (2016b). „Engineering of supramolecular photoactive protein architectures: the defined co-assembly of photosystem I and cytochrome *c* using a nanoscaled DNA-matrix“. In: *Nanoscale* 8.20, S. 10695–10705. DOI: 10.1039/C6NR00097E.
- Stieger, K. R., Feifel, S. C., Lokstein, H. und Lisdat, F. (2014). „Advanced unidirectional photocurrent generation via cytochrome *c* as reaction partner for directed assembly of photosystem I“. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 16.29, S. 15667–15674. DOI: 10.1039/C4CP00935E.
- Strand, D. D. und Kramer, D. M. (2014). „Control of Non-Photochemical Exciton Quenching by the Proton Circuit of Photosynthesis“. In: *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Hrsg. von B. Demmig-Adams, G. Garab, W. Adams III und Govindjee. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 387–408. DOI: 10.1007/978-94-017-9032-1_18.
- Su, X., Ma, J., Pan, X., Zhao, X., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X. und Li, M. (März 2019). „Antenna arrangement and energy transfer pathways of a green algal photosystem-I-LHCI supercomplex“. In: *Nature Plants* 5.3, S. 273–281. DOI: 10.1038/s41477-019-0380-5.
- Su, X., Ma, J., Wei, X., Cao, P., Zhu, D., Chang, W., Liu, Z., Zhang, X. und Li, M. (Aug. 2017). „Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex“. In: *Science* 357.6353, S. 815. DOI: 10.1126/science.aan0327.
- Suga, M., Ozawa, S.-I., Yoshida-Motomura, K., Akita, F., Miyazaki, N. und Takahashi, Y. (Juni 2019). „Structure of the green algal photosystem I supercomplex with a decameric light-harvesting complex I“. In: *Nature Plants* 5.6, S. 626–636. DOI: 10.1038/s41477-019-0438-4.
- Svergun, D., Barberato, C. und Koch, M. H. J. (Dez. 1995). „CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates“. In: *Journal of Applied Crystallography* 28.6, S. 768–773. DOI: 10.1107/S0021889895007047.
- Svergun, D. I. (Aug. 1992). „Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria“. In: *Journal of Applied Crystallography* 25.4, S. 495–503. DOI: 10.1107/S0021889892001663.

- Tanaka, A., Fukushima, Y. und Kamiya, N. (Feb. 2017). „Two Different Structures of the Oxygen-Evolving Complex in the Same Polypeptide Frameworks of Photosystem II“. In: *Journal of the American Chemical Society* 139.5, S. 1718–1721. DOI: 10.1021/jacs.6b09666.
- Thor, J. J. van, Geerlings, T. H., Matthijs, H. C. P. und Hellingwerf, K. J. (Sep. 1999). „Kinetic Evidence for the PsaE-Dependent Transient Ternary Complex Photosystem I/Ferredoxin/Ferredoxin:NADP⁺ Reductase in a Cyanobacterium“. In: *Biochemistry* 38.39, S. 12735–12746. DOI: 10.1021/bi9903502.
- Tiede, D. M., Littrell, K., Marone, P. A., Zhang, R. und Thiyagarajan, P. (2000). „Solution structure of a biological bimolecular electron transfer complex: characterization of the photosynthetic reaction center-cytochrome c2 protein complex by small angle neutron scattering“. In: *Journal of Applied Crystallography* 33.3 Part 1, S. 560–564.
- Topas, C. (2018). *Entwicklung eines Mikroseedling Protokolls für Photosystem I: In Richtung Anwendung der fs-XFEL Methode*. Bachelorarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Toporik, H., Li, J., Williams, D., Chiu, P.-L. und Mazor, Y. (Juni 2019). „The structure of the stress-induced photosystem I–IsiA antenna supercomplex“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 26.6, S. 443–449. DOI: 10.1038/s41594-019-0228-8.
- Triolo, R., Magid, L. J., Johnson, J. S. und Child, H. R. (Sep. 1982). „Small-angle neutron scattering from aqueous micellar solutions of a nonionic surfactant as a function of temperature“. In: *The Journal of Physical Chemistry* 86.19, S. 3689–3695. DOI: 10.1021/j100216a004.
- Trissl, H.-W. und Wilhelm, C. (Nov. 1993). „Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks?“ In: *Trends in Biochemical Sciences* 18.11, S. 415–419. DOI: 10.1016/0968-0004(93)90136-B.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R. und Kamiya, N. (Mai 2011). „Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å“. In: *Nature* 473.7345, S. 55–60. DOI: 10.1038/nature09913.
- Utschig, L. M., Silver, S. C., Mulfort, K. L. und Tiede, D. M. (Okt. 2011). „Nature-Driven Photochemistry for Catalytic Solar Hydrogen Production: A Photosystem I–Transition Metal Catalyst Hybrid“. In: *Journal of the American Chemical Society* 133.41, S. 16334–16337. DOI: 10.1021/ja206012r.
- Van Gelder, B. und Slater, E. (Apr. 1962). „The extinction coefficient of cytochrome c“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 58.3, S. 593–595. DOI: 10.1016/0006-3002(62)90073-2.
- Vermaas, W. F. J., Timlin, J. A., Jones, H. D. T., Sinclair, M. B., Nieman, L. T., Hamad, S. W., Melgaard, D. K. und Haaland, D. M. (März 2008). „In vivo hyperspectral confocal fluorescence imaging to determine pigment localization and distribution in cyanobacterial cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.10, S. 4050. DOI: 10.1073/pnas.0708090105.
- Wang, J. (Aug. 2017). „Experimental charge density from electron microscopic maps“. In: *Protein Science* 26.8, S. 1619–1626. DOI: 10.1002/pro.3198.
- Wang, J., Reiss, K., Brudvig, G. W. und Batista, V. S. (Okt. 2018). „Reduced Occupancy of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II Detected in Cryo-Electron Microscopy Maps“. In: *Biochemistry* 57.41, S. 5925–5929. DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00609.

- Watanabe, M., Iwai, M., Narikawa, R. und Ikeuchi, M. (Aug. 2009). „Is the Photosystem II Complex a Monomer or a Dimer?“ In: *Plant and Cell Physiology* 50.9, S. 1674–1680. DOI: 10.1093/pcp/pcp112.
- Watanabe, M., Kubota, H., Wada, H., Narikawa, R. und Ikeuchi, M. (Nov. 2010). „Novel Supercomplex Organization of Photosystem I in *Anabaena* and *Cyanophora paradoxa*“. In: *Plant and Cell Physiology* 52.1, S. 162–168. DOI: 10.1093/pcp/pcq183.
- Witt, H., Schlodder, E., Teutloff, C., Niklas, J., Bordignon, E., Carbonera, D., Kohler, S., Labahn, A. und Lubitz, W. (Juli 2002). „Hydrogen Bonding to P700: Site-Directed Mutagenesis of Threonine A739 of Photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*“. In: *Biochemistry* 41.27, S. 8557–8569. DOI: 10.1021/bi025822i.
- Wittenberg, G., Sheffler, W., Darchi, D., Baker, D. und Noy, D. (2013). „Accelerated electron transport from photosystem I to redox partners by covalently linked ferredoxin“. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15.45, S. 19608–19614. DOI: 10.1039/C3CP53264J.
- Wittig, I., Braun, H.-P. und Schagger, H. (Juni 2006). „Blue native PAGE“. In: *Nature Protocols* 1.1, S. 418–428. DOI: 10.1038/nprot.2006.62.
- Wynn, R. M. und Malkin, R. (Aug. 1988). „Interaction of plastocyanin with photosystem I: a chemical cross-linking study of the polypeptide that binds plastocyanin“. In: *Biochemistry* 27.16, S. 5863–5869. DOI: 10.1021/bi00416a007.
- Xie, Q., Spear, J. M., Noble, A. J., Sousa, D. R., Meyer, N. L., Davulcu, O., Zhang, F., Linhardt, R. J., Stagg, S. M. und Chapman, M. S. (Juni 2017). „The 2.8 Å Electron Microscopy Structure of Adeno-Associated Virus-DJ Bound by a Heparinoid Pentasaccharide“. In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 5, S. 1–12. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.02.004.
- Xue, Y., Okvist, M., Hansson, O. und Young, S. (Okt. 1998). „Crystal structure of spinach plastocyanin at 1.7 Å resolution“. eng. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 7.10, S. 2099–2105. DOI: 10.1002/pro.5560071006.
- Yadav, K. S., Semchonok, D. A., Nosek, L., Kouřil, R., Fucile, G., Boekema, E. J. und Eichacker, L. A. (Jan. 2017). „Supercomplexes of plant photosystem I with cytochrome b6f, light-harvesting complex II and NDH“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1858.1, S. 12–20. DOI: 10.1016/j.bbabi.2016.10.006.
- Yamaoka, T., Satoh, K. und Katoh, S. (Sep. 1978). „Photosynthetic activities of a thermophilic blue-green alga“. In: *Plant and Cell Physiology* 19.6, S. 943–954. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a075684.
- Young, I. D., Ibrahim, M., Chatterjee, R., Gul, S., Fuller, F. D., Koroidov, S., Brewster, A. S., Tran, R., Alonso-Mori, R., Kroll, T., Michels-Clark, T., Laksmono, H., Sierra, R. G., Stan, C. A., Hussein, R., Zhang, M., Douthit, L., Kubin, M., Lichtenberg, C. de, Vo Pham, L., Nilsson, H., Cheah, M. H., Shevela, D., Saracini, C., Bean, M. A., Seuffert, I., Sokaras, D., Weng, T.-C., Pastor, E., Weninger, C., Fransson, T., Lassalle, L., Bräuer, P., Aller, P., Docker, P. T., Andi, B., Orville, A. M., Glowina, J. M., Nelson, S., Sikorski, M., Zhu, D., Hunter, M. S., Lane, T. J., Aquila, A., Koglin, J. E., Robinson, J., Liang, M., Boutet, S., Lyubimov, A. Y., Uervirojnangkoorn, M., Moriarty, N. W., Liebschner, D., Afonine, P. V., Waterman, D. G., Evans, G., Wernet, P., Dobbek, H., Weis, W. I., Brunger, A. T., Zwart, P. H., Adams, P. D., Zouni, A., Messinger, J., Bergmann, U., Sauter, N. K., Kern, J., Yachandra, V. K. und Yano, J. (Nov. 2016). „Structure of photosystem II and substrate binding at room temperature“. In: *Nature* 540, S. 453.

- Zheng, L., Li, Y., Li, X., Zhong, Q., Li, N., Zhang, K., Zhang, Y., Chu, H., Ma, C., Li, G., Zhao, J. und Gao, N. (Okt. 2019). „Structural and functional insights into the tetrameric photosystem I from heterocyst-forming cyanobacteria“. In: *Nature Plants* 5.10, S. 1087–1097. DOI: 10.1038/s41477-019-0525-6.
- Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. und Orth, P. (Feb. 2001). „Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution“. In: *Nature* 409.6821, S. 739–743. DOI: 10.1038/35055589.
- Zygodlo, A., Jensen, P. E., Leister, D. und Scheller, H. V. (Juni 2005). „Photosystem I lacking the PSI-G subunit has a higher affinity for plastocyanin and is sensitive to photodamage“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1708.2, S. 154–163. DOI: 10.1016/j.bbabi.2005.02.003.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad.

Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin vom 5. März 2015. Weiterhin erkläre ich, dass die Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Datum

Unterschrift

Anhang

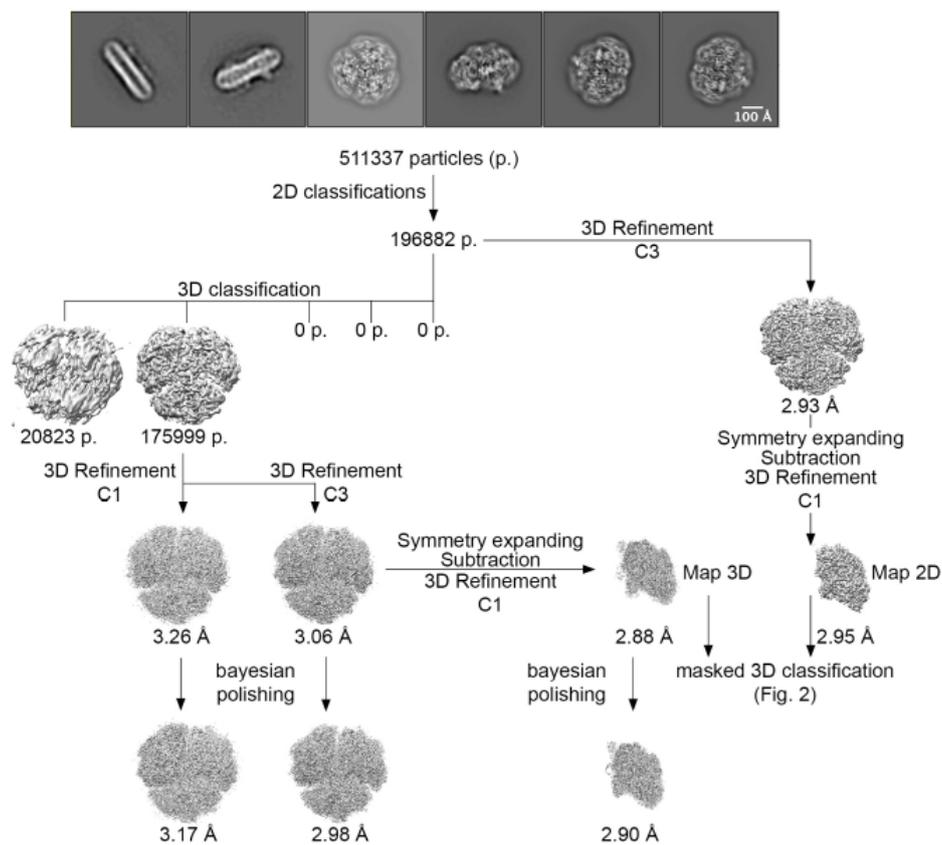


Abbildung 1: Arbeitsschritte zum Erstellen der elektronenmikroskopischen Rekonstruktionen. Für das PSI_{tri}-Monomer wurden zwei Rekonstruktionen erstellt, eine nach einer 3-D-Klassifikation (Map 2D) und eine ohne vorangegangene 3-D-Klassifikation (Map 2D). Das in meiner Arbeit beschriebene PSI_{tri}-Monomer basiert auf Map 3D. Mit Hilfe von Map 2D wurde untersucht, ob durch die 3-D-Klassifizierung PSI-Partikel mit gebundenem Cyt c₆ aussortiert wurden (Abbildung 2 im Anhang). Die Abbildung wurde von Herrn A. Baumert und Dr. C. Radon erstellt und in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

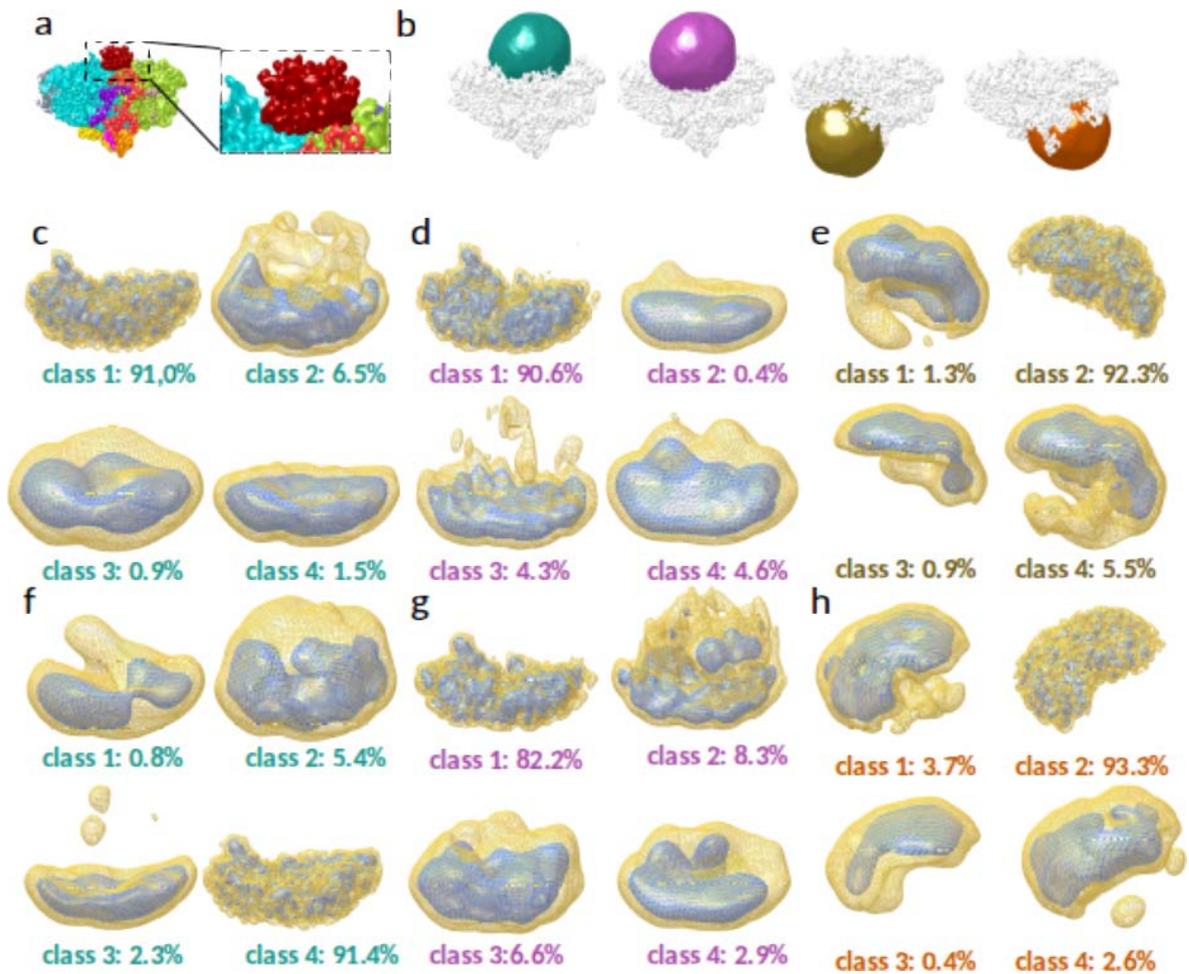


Abbildung 2: Fokussierte 3-D-Klassifizierung zur Identifikation von gebundenen Cyt c_6 -Proteinen. Theoretisches Modell des PSI mit gebundenem Cyt c_6 (a), vier Masken auf der luminalen und cytoplasmatischen Seite des PSI (b) und EM-Klassen bei 5σ (grau) bzw. 20σ (gelb, c-h). Die Klassifizierungen basieren auf den Rekonstruktionen zu Map 3D (c-f, siehe Abbildung 1 im Anhang) und Map 2D (g,h). Die Abbildung wurde von Herrn A. Baumert und Dr. C. Radon erstellt und in Kölsch et al. (2020, eingereicht) veröffentlicht.

Ich hatte eine schöne Zeit.
Ihr habt es zu einer schönen Zeit gemacht.
Danke