

# ANGEWANDTE CHEMIE

101. Jahrgang 1989

Heft 7

Seite 849–998

## Eine strukturelle Grundlage für die Übertragung von Lichtenergie und Elektronen in der Biologie (Nobel-Vortrag)\*\*

Von Robert Huber \*

Für Christa

Es werden Aspekte der intramolekularen Übertragung von Lichtenergie und Elektronen bei drei Protein-Cofaktor-Komplexen behandelt, deren dreidimensionale Strukturen durch Röntgenkristallographie aufgeklärt wurden: Es sind dies lichtsammelnde Phycobilisome von Cyanobakterien, das Reaktionszentrum der Purpurbakterien und die blauen Multikupfer-Oxidasen. Für diese Systeme liegt eine Fülle von Beobachtungen über die Funktion vor, die es ermöglichen, spezifische Beziehungen zwischen Struktur und Funktion zu erkennen und allgemeine Schlüsse zur Übertragung von Lichtenergie und Elektronen in biologischen Systemen zu ziehen.

### Einleitung [\*\*\*]

Alles Leben auf der Erde hängt letztlich von der Sonne ab, deren Strahlungsenergie von den Pflanzen und anderen zur Photosynthese fähigen Organismen eingefangen wird. Sie nutzen das Sonnenlicht zur Synthese organischer Verbindun-

gen, die als Baustoffe oder Energiespeicher dienen. Dies wurde deutlich von *L. Boltzmann* ausgesprochen, der 1886 feststellte: „Dagegen herrscht zwischen Sonne und Erde eine kolossale Temperaturdifferenz; . . . Der in dem Streben nach größerer Wahrscheinlichkeit begründete Temperatureausgleich zwischen beiden Körpern dauert wegen ihrer enormen

[\*] Prof. Dr. R. Huber  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1989. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrages.

[\*\*\*] In diesem Beitrag verwendete Abkürzungen:

PBS Phycobilisome sind lichtsammelnde Organellen an der Außenseite der Thylakoidmembran der Cyanobakterien, die die Photosysteme I und II enthalten und zur Photosynthese unter Freisetzung von Sauerstoff fähig sind.

PE, PEC, PC, APC Phycoerythrin, Phycoerythrocyanin, Phycocyanin, Allophycocyanin sind Biliproteinkomponenten der PBS mit kovalent gebundenen Tetrapyrrol(Bilin)pigmenten.

PS I und II Photosysteme I und II in Chloroplasten und Cyanobakterien.

RBP Retinol-bindendes Protein.

BBP Bilin(Biliverdin IX $\gamma$ )-bindendes Protein aus *Pieris brassicae*.

*Rps. viridis*, *Rhodospseudomonas viridis*, Bakteriochlorophyll-b-enthaltendes Purpurbakterium mit Photosynthese ohne Sauerstofffreisetzung.

RC Reaktionszentrum.

C, H, L, M Die vier Untereinheiten des RC aus *Rps. viridis*: Die Cytochrom-c-Untereinheit (C) liegt auf der periplasmatischen Seite der

Membran und enthält vier Hämgruppen mit zwei Redoxpotentialen ( $C_{553}$ ,  $C_{558}$ ); die L- und M-Untereinheiten sind in die Membran eingebettet, durchdringen diese mit je fünf  $\alpha$ -Helices (als A, B, C, D, E bezeichnet) und binden die Cofaktoren Bakteriochlorophyll-b (BChl-b oder BC), Bakteriophäophytin-b (BPh-b oder BP), Menachinon-9 ( $Q_A$ ), Ubichinon-9 (UQ;  $Q_B$ ) und  $Fe^{2+}$  (die Indices P, A, M, L kennzeichnen Cofaktoren als Paar, accessorisch, und als Bestandteil der M- bzw. L-Untereinheit); die H-Untereinheit liegt auf der cytoplasmatischen Seite, und ihr N-terminales,  $\alpha$ -helicales Segment (H) durchdringt die Membran.

$P_{680}$ ,  $P_{960}$  Primäre Elektronendonoren des PS II bzw. des RC von *Rps. viridis* mit Angabe der langwelligen Absorptionsmaxima.

$P^*$ ,  $D^*$ ,  $A^*$  Elektronisch angeregte Zustände von P, D (Donor) und A (Acceptor).

LHC Lichtsammelsysteme (light harvesting complexes).

$LH_{a,b}$  Lichtsammelnde Protein-Farbstoff-Komplexe in Bakterien mit BChl-a, b.

Car Carotinoide.

Sor Soret-Banden von Chlorophyll und Bakteriochlorophyll.

PCY Plastocyanin, ein Elektronenüberträger im Photosynthesystem der Pflanzen.

LAC Laccase, eine Oxidase der Pflanzen und Pilze.

AO Ascorbat-Oxidase, eine Oxidase der Pflanzen.

CP Ceruloplasmin, eine Oxidase im Plasma der Säuger.

Entfernung und Größe Jahrmillionen. Die Zwischenformen, welche die Sonnenenergie annimmt, bis sie zur Erdtemperatur herabsinkt, können ziemlich unwahrscheinliche Energieformen sein, wir können den Wärmeübergang von der Sonne zur Erde leicht zu Arbeitsleistungen benützen, wie den vom Wasser des Dampfkessels zum Kühlwasser. ... Diesen Übergang möglichst auszunutzen, breiten die Pflanzen die unermeßliche Fläche ihrer Blätter aus und zwingen die Sonnenenergie in noch unerforschter Weise, ehe sie auf das Temperaturniveau der Erdoberfläche herabsinkt, chemische Synthesen auszuführen, von denen man in unseren Laboratorien noch keine Ahnung hat.“<sup>[1]</sup>

Heute sind viele der „ungeahnten Synthesen“ durch die biochemische Forschung aufgeklärt und die maßgeblichen Proteine und ihre katalytischen Funktionen bestimmt worden<sup>[2]</sup>.

Ich werde mich in meinem Vortrag auf Boltzmanns „unwahrscheinliche Zwischenformen der Energie“, nämlich die Elektronenanregungs- und Charge-Transfer-Zustände in heutiger Ausdrucksweise, die Strukturen der beteiligten biologischen Systeme und die Wechselwirkungen von Cofaktoren (Pigmenten und Metall-Ionen) und Proteinen konzentrieren. Ich werde einige Aspekte des photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rhodospseudomonas viridis* (siehe die später zitierten Originalarbeiten und kurze Übersichten<sup>[3–5]</sup>) und funktionell verwandter Systeme besprechen, deren Strukturen in meiner Arbeitsgruppe untersucht wurden: die lichtsammelnden Phycobilisome der Cyanobakterien und die Blauen Oxidasen. Eine Fülle von Struktur- und Funktionsdaten ist für diese drei Systeme verfügbar, die somit besonders geeignet sind, um allgemeine Prinzipien der Übertragung von Lichtenergie und Elektronen in biologischen Systemen zu erkennen. Es gibt tatsächlich nur sehr wenige für diesen Zweck hinlänglich genau bekannte Systeme<sup>[6]</sup>.

Wir bemühen uns mit guter Aussicht auf Erfolg um das Verständnis der physikalischen Prinzipien, die der Licht- und Elektronenleitung in biologischen Systemen zugrundeliegen, denn diese Prozesse scheinen einfacher erforschbar zu sein als andere biologische Reaktionen, an denen die Diffusion von Substraten und Produkten und intramolekulare Bewegungen beteiligt sind. Eine derartige Mobilität wurde bei vielen Proteinen festgestellt und als wesentlich für ihre Funktionen nachgewiesen<sup>[12, 13]</sup>. Theoretische Analysen dieser Reaktionen müssen Flexibilität und Lösungsmiteleinfluß in Betracht ziehen und lassen sich nur dann durchführen, wenn man die sehr vereinfachenden Näherungen der Moleküldynamik<sup>[14, 15]</sup> anwendet oder das System auf ein aktives Zentrum aus wenigen Resten beschränkt, so daß es mit quantenmechanischen Methoden behandelt werden kann.

Licht- und Elektronenübertragungsprozesse scheinen einer quantitativen theoretischen Behandlung eher zugänglich zu sein. Die Substrate sind masselos oder sehr klein und die Übertragungsprozesse, auf die ich mich konzentrieren möchte, verlaufen intramolekular und weit entfernt vom Lösungsmittel. Molekülbewegungen scheinen unwesentlich zu sein, wie die geringen Temperaturabhängigkeiten zeigen. Die

beim Energie- und Elektronentransport mitwirkenden Komponenten sind Cofaktoren, die in erster Näherung für eine theoretische Analyse ausreichen, was die Berechnungen beträchtlich vereinfacht.

## 1. Modelle für den Energie- und Elektronentransport

Zur Überprüfung von Theorien des Energie- und Elektronentransports sind Modellverbindungen unentbehrlich, die zwar nicht unbedingt genaue Nachbildungen der biologischen Strukturen sein müssen, aber ihnen doch möglichst nahe kommen sollen.

Försters Theorie der strahlungslosen Energieübertragung<sup>[16]</sup> behandelt sowohl die Fälle starker als auch sehr schwacher Kopplung. Starke Kopplung führt zu Spektren, die von denen der Einzelkomponenten stark abweichen. Beispiele sind konzentrierte Lösungen oder Kristalle einiger Farbstoffe und das in Abschnitt 3.1 behandelte Bakteriochlorophyllpaar (BC<sub>p</sub>). Die elektronische Anregung ist in diesen Fällen über mehrere Moleküle delokalisiert. Eine sehr schwache Kopplung bewirkt nur geringe oder keine Veränderungen der Absorptionsspektren, kann aber die Lumineszenzeigenschaften erheblich beeinflussen. Räumlich genau definierte Modelle für diesen Fall sind selten. Als Beispiele mögen die kontrolliert aufgebauten Farbstoffschichten von Kuhn und Frommherz et al. gelten<sup>[17, 18]</sup>, die, wenn auch mit Abweichungen, die allgemeine Gültigkeit von Försters Theorie belegen.

Synthetische Modelle für den Elektronentransport sind zahlreich und jüngst noch durch entsprechend modifizierte Proteine ergänzt worden<sup>[19–21]</sup>. Zusammenfassungen sind in Übersichtsartikeln zu finden (siehe z. B.<sup>[22–29]</sup>). Abbildung 1 zeigt die wesentlichen Bestandteile eines solchen Modells: Der Donor D (der Elektronen) und der Acceptor A können durch einen verbrückenden Liganden (B) verbunden sein, der eine anhängende („pendant“) Gruppe (P) enthalten möge. Das System ist in eine Matrix M eingebettet.

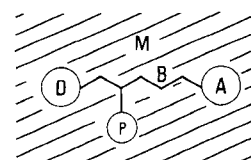


Abb. 1. Die Bestandteile des Elektronentransportmodells. D: Donor, A: Acceptor, B: Brücke, P: anhängende („pendant“) Gruppe, M: Matrix.

Durch Modelle mit Porphyrinen als Donoren und Chinonen als Acceptoren wird das Reaktionszentrum nachgebildet<sup>[30, 31]</sup>. Modelle mit Peptiden als verbrückenden Liganden<sup>[32]</sup> interessieren besonders im Zusammenhang mit den Blauen Oxidasen. Zu beachten ist auch der Einfluß der anhängenden Gruppen (P), die nicht unmittelbar im Elektronentransportweg liegen, im Hinblick auf den unbenutzten Elektronentransportweg des Reaktionszentrums und die Blauen Oxidasen. Natürlich sind die biologischen Systeme erheblich komplizierter als die synthetischen Modelle, da die Proteinmatrix sowohl inhomogen als auch individuell verschieden ist. Dennoch bilden Theorie und Modelle den Rah-

[\*] Die Strukturen der Reaktionszentren von *Rb. sphaeroides* und *Rps. viridis* sind sehr ähnlich [6–8]. Bei einem Lichtsammelprotein grüner Bakterien mit Bacteriochlorophyll-a kennt man zwar die Struktur [9], aber nicht die Funktion. Bei den Multihäm-Cytochromen [10, 11] ist das Vorhandensein oder die Bedeutung des intramolekularen Elektronentransfers unklar.

men, in welchem die Faktoren zu beschreiben sind, die den Transport von Anregungsenergie und Elektronen sowie konkurrierende Prozesse beherrschen.

### 1.1. Determinanten des Energie- und Elektronentransportes

Die wichtigsten Faktoren sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Sie können aus der Förster-Theorie und Varianten der

Tabelle 1. Geschwindigkeitsbestimmende Faktoren der Übertragung von Anregungsenergie und Elektronen.

Übertragung von Anregungsenergie $D^* + A \rightarrow D + A^*$ (sehr schwache Kopplung)	Abstand und Orientierung (Kopplung angeregter Zustände); spektrale Überlappung der Emission und Absorption von D und A; Brechungsindex des Mediums
Elektronenübertragung vom angeregten Zustand $D^* + A \rightarrow D^+ + A^-$ und vom Grundzustand $D^- + A \rightarrow D + A^-$	Abstand und Orientierung (Elektronenkopplung, Orbitalüberlappung); Änderung der Freien Energie ("Triebkraft"); Umlagerung von D und A; Orientierungspolarisation des Mediums

Marcus-Theorie<sup>[26]</sup> für die Übertragung von Anregungsenergie bzw. Elektronen abgeleitet werden. Diese theoretischen Verfahren wiederum lassen sich aus klassischen Betrachtungen oder *Fermis* Goldener Regel mit geeigneten Näherungen (siehe z. B.<sup>[33]</sup>) herleiten. Die Übertragung von Anregungsenergie und Elektronen hängt von der räumlichen Anordnung der Donoren und Acceptoren ab. Anregungsenergie kann über große Entfernungen übertragen werden, wenn die Übergangsdipolmomente günstig ausgerichtet sind. Für schnelle Elektronenübertragung müssen sich die Orbitale genügend überlappen. Elektronenübertragung über große Entfernungen erfordert deshalb eine Reihe eng benachbarter Überträger mit tiefliegenden unbesetzten Molekülorbitalen oder geeignete Brückenliganden zwischen Donor und Acceptor. Diese Liganden können aktiv am Übertragungsprozeß teilnehmen, und zwar über radikalische Zwischenzustände (chemischer Mechanismus) oder durch Resonanzphänomene, wobei sich das Elektron zu keiner Zeit gebunden am Liganden befindet<sup>[34]</sup>. Die spektrale Überlappung bei der Energieübertragung und die „Triebkraft“ (Potentialdifferenz) bei der Elektronenübertragung, die für die Übertragungsgeschwindigkeit wesentlich sind, werden vor allem durch die chemische Natur der Donoren und Acceptoren bestimmt und durch deren räumliche Anordnung beeinflusst. Die Umgruppierung der Atome von Donoren, Acceptoren und umgebendem Medium beim Elektronenübergang ist ein wichtiger Faktor, der sich aber in einem komplexen Proteinsystem selbst qualitativ nur schwer bestimmen läßt. Wir beobachten jedoch, daß das Protein im allgemeinen die Donoren und Acceptoren fest und starr bindet, so daß der Umgruppierungseffekt der Reaktanten klein ist. Polare Gruppen in der Umgebung können einen schnellen Elektronenübergang infolge ihrer Reorientierung verlangsamen. Allerdings beeinflusst eine polare Umgebung auch die Energiebilanz durch die Stabilisierung von Ionenpaaren ( $D^+ A^-$ ) oder durch die Erniedrigung von Aktivie-

rungs- und Tunnelbarrieren und kann somit „Triebkraft“ und Geschwindigkeit erhöhen. Die Energieübertragung hängt auch vom Medium ab; in Medien mit hohem Brechungsindex ist sie weniger günstig.

Konkurrenzprozesse zur erwünschten Übertragung von Energie und Elektronen aus angeregten Zuständen „lauern“ überall (Tabelle 2). Sie werden durch hohe Übertragungsge-

Tabelle 2. Mit der Übertragung von Anregungsenergie und Elektronen konkurrierende Prozesse.

Übertragung von Anregungsenergie $D^* + A \rightarrow D + A^*$ (sehr schwache Kopplung)	Strahlungslose Relaxation von $D^*$ durch Photoisomerisierung und andere Konformationsänderungen; Protonentransfer vom angeregten Zustand; Spinumkehr; chemische Reaktionen von $D^*$ , $A^*$ , $D^+$ , $A^-$ mit der Matrix; Fluoreszenzstrahlung von $D^*$
Elektronenübertragung vom angeregten Zustand $D^* + A \rightarrow D^+ + A^-$	Energieübertragung; die oben angeführten Prozesse; Rückreaktion in den Grundzustand D, A
und vom Grundzustand $D^- + A \rightarrow D + A^-$	–

schwindigkeiten und eine starre Konformation der Cofaktoren im Proteinverband meistens vermieden.

Ich werde diese Faktoren später im Zusammenhang mit den biologischen Strukturen besprechen.

## 2. Die Rolle der Cofaktoren

Die natürlich vorkommenden Aminosäuren sind für sichtbares Licht durchlässig und scheinen auch, mit Ausnahme von Tyrosin, als Einelektronenüberträger ungeeignet zu sein. Tyrosinradikale sind im Photosystem II als angeregte Zwischenzustände  $Z^*$  und Donoren  $D^*$  identifiziert worden, die an der Elektronenübertragung vom wasserspaltenden Mangan-Protein-Komplex zum photooxidierten  $P_{680}^+$  beteiligt sind (Übersichten siehe<sup>[35, 36]</sup>). Ihre Identifizierung wurde durch die Beobachtung erleichtert, daß Tyr L162 im bakteriellen Reaktionszentrum in der kürzesten Verbindung von Cytochrom zum Bakteriochlorophyllpaar ( $BC_{LP}$ ) liegt<sup>[37]</sup> (siehe Abschnitt 3.2.2.2 und Abb. 10c). Im bakteriellen System wird aber kein Tyrosinradikal erzeugt, da das Redoxpotential von  $P_{960}^+$  nicht ausreicht.

In biologischen Systemen dienen somit im allgemeinen Cofaktoren, d.h. Pigmente und Metall-Ionen, als Acceptoren für Lichtenergie und als redoxaktive Elemente.

Abbildung 2 ist eine Aufstellung der Pigmente und Metallcluster, die im folgenden besprochen werden: die Gallenfarbstoffe Phycocyanobilin und Biliverdin IX $\gamma$  in den Lichtsammelkomplexen, Bakteriochlorophyll-b, Bakteriophäophytin-b und die Chinone im Reaktionszentrum der Purpurbakterien sowie die Kupferzentren in den Blauen Oxidasen.

Während das allgemeine Verhalten der Protein-Pigment-Komplexe durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Cofaktoren bestimmt wird, übt der Proteinanteil einen entscheidenden Einfluß auf die spektralen Eigenschaften und die Redox Eigenschaften aus.

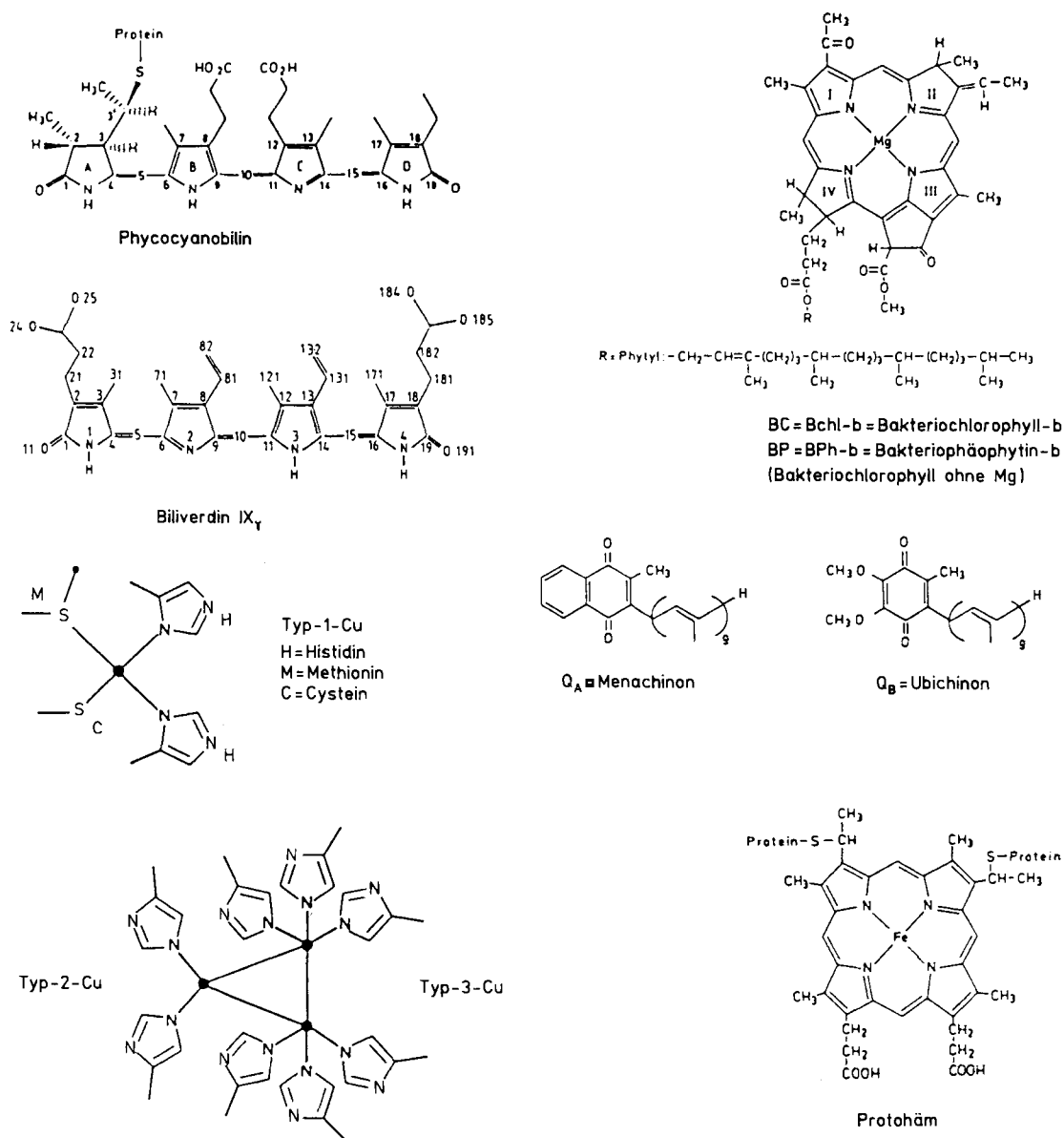


Abb. 2. Die Cofaktoren in Phycocyanin (PC), Bilin-bindendem Protein (BBP), Ascorbat-Oxidase (AO) und dem Reaktionszentrum (RC) der Purpurbakterien. Phycocyanobilin ist in Phycocyanin (PC) über Thioetherbindungen kovalent an das Protein gebunden. Biliverdin IX<sub>γ</sub> ist nichtkovalent mit dem Protein BBP verknüpft. Die Typ-1-, Typ-2- und Typ-3-Kupfer-Ionen sind durch Koordination mit den angegebenen Aminosäureresten mit dem Enzym AO verbunden. Vier Moleküle Bakteriochlorophyll-b (Bchl-b) und zwei Moleküle Bakteriophäophytin-b (BPh-b) sind an das Reaktionszentrum (RC) der Purpurbakterien gebunden. Ein Paar Bchl-b dient als primärer Elektronendonator, ein Menachinon-9 (Q<sub>M</sub>) als primärer und ein Ubichinon-9 (Q<sub>B</sub>) als sekundärer Elektronenacceptor. Die vier Hämgruppen sind durch Thioetherbindungen an Cytochrom c gebunden.

### 3. Die Rolle des Proteins

Für den Einfluß des Proteins auf die Eigenschaften der funktionellen Protein-Cofaktor-Komplexe gibt es eine Rangfolge, die in Tabelle 3 aufgeführt ist. Die genannten

Tabelle 3. Rangordnung der Protein-Cofaktor-Wechselwirkungen.

1. Einfluß auf Konfiguration und Konformation der Cofaktoren durch Art und Gestalt der Liganden (das Protein als *vielzähniger Ligand*)
2. Bestimmung der räumlichen Anordnung von Cofaktorgruppen (das Protein als *Gerüst*)
3. Das Protein als *Medium*
4. Vermittlung der Wechselwirkung mit anderen Komponenten im übergeordneten biologischen System

Wechselwirkungen unterscheiden sich in den verschiedenen Systemen und sollen jeweils dort beschrieben werden, ausgenommen Punkt 1, da Proteine in ihrer Wirkung als vielzählige Liganden Gemeinsamkeiten zeigen, die einem „rack-Mechanismus“ zugeschrieben werden können.

#### 3.1. Das Protein als vielzähniger Ligand

Der Begriff „rack-Mechanismus“ wurde von Lumry und Eyring<sup>[38]</sup> sowie Gray und Malmström<sup>[39]</sup> eingeführt, um ungewöhnliche Reaktivitäten, spektrale Eigenschaften und Redox Eigenschaften von Cofaktoren durch die Verzerrungen zu erklären, die vom Protein erzwungen werden.

Durch einen Vergleich isolierter und proteingebundener Gallenfarbstoffe läßt sich dieser Effekt demonstrieren. Iso-

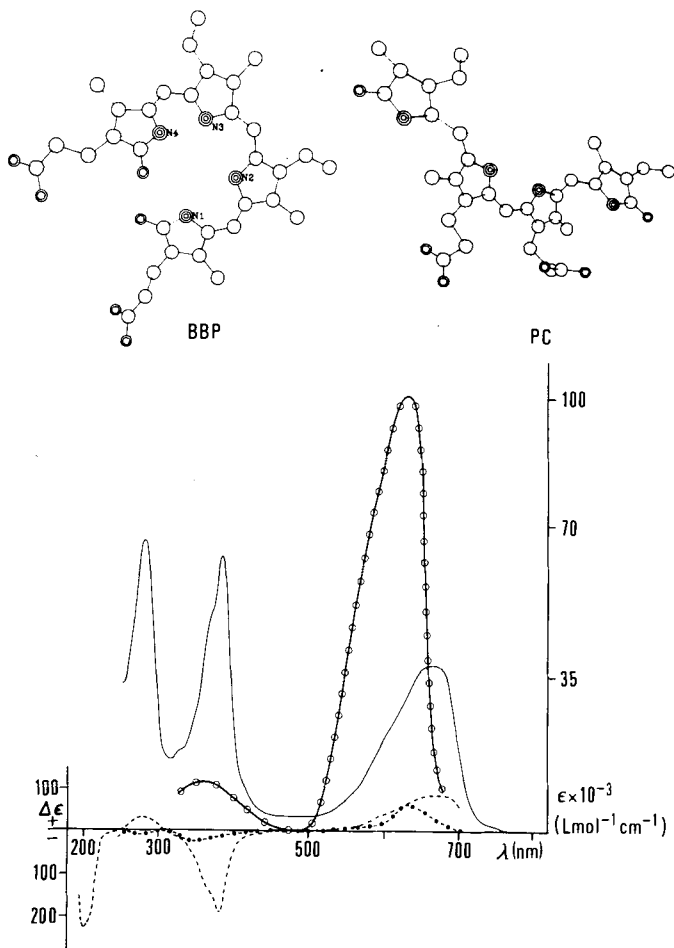


Abb. 3. Die Tetrapyrrolstrukturen der Cofaktoren Biliverdin IX $\gamma$  in BBP und Phycocyanobilin in PC und ihre optischen und Circular dichroismusspektren [42, 44]. Absorptions- (—) und CD-Spektrum (---) von BBP; Absorptions- (—○—) und CD-Spektrum (—●—) von PC.

lierte Gallenfarbstoffe bevorzugen in Lösung und im Kristall eine makrocyclische helicale Anordnung mit der Konfiguration *ZZZ* und der Konformation *syn,syn,syn* und zeigen eine schwache Absorption im sichtbaren Bereich sowie eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute<sup>[40–42]</sup>. Als Cofaktoren an lichtsammelndes Phycocyanin gebunden absorbieren und fluoreszieren sie jedoch sehr stark im Sichtbaren (Abb. 3). Die für die Lichtsammelfunktion unentbehrliche Auxochromie ist eine Folge der energetisch ungünstigen gestreckten Gestalt des Chromophors, dessen *ZZZ*-Konfiguration und *anti,syn,anti*-Konformation durch enge polare Wechselwirkung mit dem Protein stabilisiert wird<sup>[44–46]</sup> (Abb. 4). Besonders bemerkenswert ist ein an die zentralen Pyrrolstickstoffatome gebundener Asparaginsäurerest (hier A87), der bei allen Pigmentbindungsstellen erhalten ist. Er beeinflusst die Protonierung, die Ladung und die spektralen Eigenschaften des Tetrapyrrolysystems. Eine feste Bindung verhindert auch die Deexcitation durch Konformationsänderungen. Die in Abbildung 3 als repräsentativ für ein freies Pigment gezeigte Struktur von Phycocyanobilin ist tatsächlich in einem Bilin-bindenden Protein aus Insekten gefunden worden<sup>[41, 42]</sup>. Dieses Protein hat eine andere Funktion und bevorzugt die Konformere niedriger Energie. Die offenkettigen Tetrapyrrolbilane sind konformationell anpassungsfähig, eine Eigenschaft, die sie zu geeigneten Cofaktoren für unterschiedliche Zwecke macht.

Das cyclische Bakteriochlorophyll im Reaktionszentrum der Purpurbakterien ist zwar geometrisch weniger anpassungsfähig, reagiert aber auch auf die Umgebung durch Verbiegen und Verdrillen des Makrocyclus. Dies mag eine der Ursachen für die später zu besprechenden unterschiedlichen Elektronenübertragungseigenschaften der beiden Pigmentzweige im Reaktionszentrum sein (vgl. Abschnitt 3.2.2.2). Der tiefgreifende Einfluß des Proteins auf das Pigmentsy-

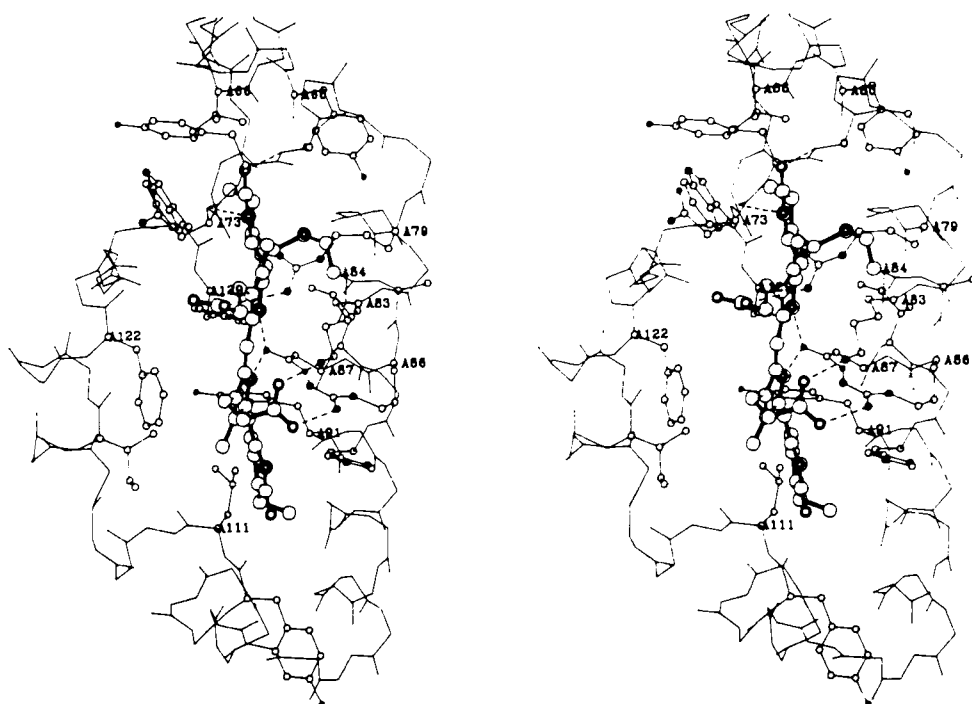


Abb. 4. Stereozeichnung des Phycocyanobilins A84 (dicke Bindungen) und seiner Proteinumgebung (dünne Bindungen). Alle polaren Gruppen des Bilins, ausgenommen jene des terminalen D-Pyrrolrings, sind durch Wasserstoff- und Salzbrücken an Proteingruppen gebunden [44].

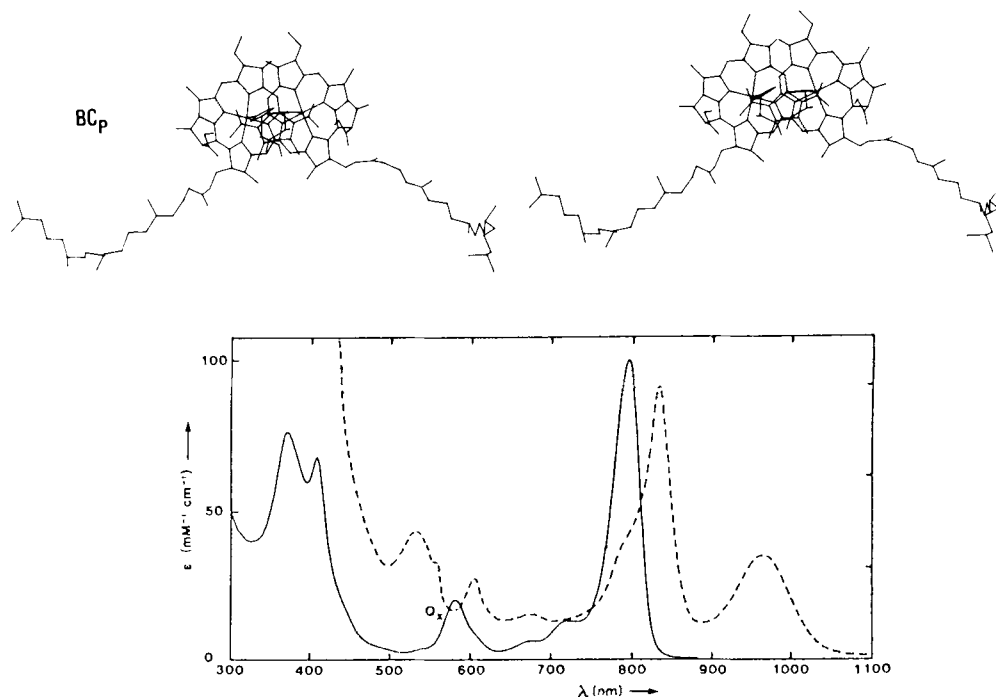


Abb. 5. Stereozzeichnung des Speziellen Paares  $BC_p$  im Reaktionszentrum [47], das die Hauptursache für die spektralen Änderungen und die langwellige Absorption des Reaktionszentrums von *Rps. viridis* (---) gegenüber dem Spektrum von Bacteriochlorophyll-b (BC) in Etherlösung (—) ist (Spektren nach [48]).

stem des Reaktionszentrums läßt sich aber besonders an dessen Absorptionsspektrum erkennen, das von den summierten Spektren der Einzelkomponenten abweicht (Abb. 5). Das Protein bindet ein Paar Bakteriochlorophyll-b-Moleküle ( $BC_p$ ) derart, daß es zu einer starken Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen über die Pyrrolringe I, die Acetylsubstituenten und die zentralen Mg-Ionen kommt<sup>[47]</sup>. Die Ausrichtung der Übergangsdipolmomente und die starke Annäherung bewirken eine excitonische Kopplung, die zum Teil die langwellige Absorptionsbande  $P_{960}$  erklärt<sup>[49]</sup>.

Noch stärker ist die Veränderung der optischen Spektren von blauen Kupferproteinen, wenn man sie mit denen von Kupfer(II)-Ionen in normaler tetragonaler Koordination vergleicht (Abb. 6). Das Redoxpotential ist ebenfalls erhöht, und zwar auf etwa 300–500 mV gegenüber 150 mV für  $Cu^{2+}(aq)$ <sup>[51]</sup>. Diese Effekte werden durch die verzerrte tetraedrische Koordination des Typ-1-Kupfers (eine gespannte Konformation, die den Kupfer(I)-Zustand stabilisiert) und einen Charge-Transfer-Übergang von einem als Ligand gebundenen Cystein- $S^- \rightarrow Cu^{2+}$  verursacht<sup>[39, 52]</sup>.

Die vorgestellten Beispiele zeigen, wie das Protein die Cofaktoren durch verschiedene Mechanismen beeinflusst: durch Stabilisierung instabiler Konformationen und gespannter Geometrien der Liganden sowie durch Bildung von Kontakten zwischen den Pigmenten, die zu starker elektronischer Wechselwirkung führen. In zweiter Stufe dient das Protein als Gerüst zur Fixierung von Systemen von Cofaktoren, zwischen denen Energie oder Elektronen übertragen werden.

### 3.2. Das Protein als Gerüst

#### 3.2.1. Lichtsammeln durch Phycobilisome

Die wenigen mit dem Reaktionszentrum verknüpften Pigmentmoleküle würden nur einen geringen Teil des Sonnenlichtes absorbieren. Darum sind die Reaktionszentren mit Lichtsammelsystemen (LHC) assoziiert, die in der photosynthetischen Membran liegen oder mit der photosynthetischen Membran verbundene Schichten oder antennenartige Orga-

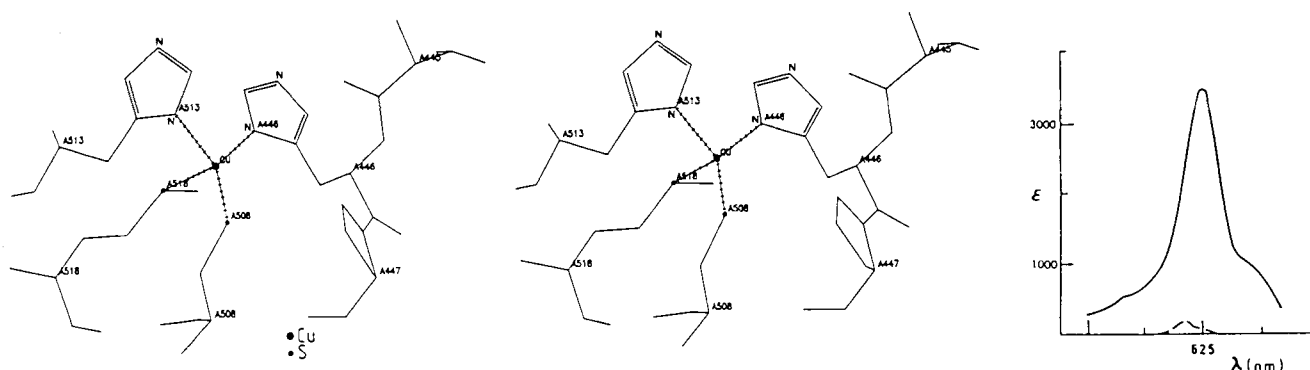


Abb. 6. Stereozzeichnung des Typ-1-Kupfers und seiner Liganden in der Ascorbat-Oxidase (AO). Das Kupfer ist mit His A 446, His A 513, Met A 518 und Cys A 508 koordiniert [50]. Das Absorptionsspektrum des „blauen“ Kupfers in den Kupferproteinen (—) wird mit dem Spektrum von normalem tetragonalem Kupfer (---) verglichen (Spektren nach [51]).

nellen bilden. Cyanobakterien enthalten Lichtsammelsysteme, die Phycobilisome (PBS), als Organellen an der Außenseite der Thylakoidmembran. Diese absorbieren Licht kürzerer Wellenlänge als die Photosysteme I und II und nutzen somit einen breiteren Spektralbereich des Sonnenlichts (Abb. 7). Die Phycobilisome sind aus Komponenten mit fein abgestimmten spektralen Eigenschaften zusammengesetzt, so daß die Lichtenergie entlang einem Energiegradienten zum Photosystem II geleitet wird.

### 3.2.1.1. Der Aufbau der Phycobilisome

Die Phycobilisome bestehen aus Biliproteinen und Linker-Polypeptiden. Biochemische und elektronenmikroskopische

ben ähnliche Strukturen mit acht  $\alpha$ -Helices (X,Y,A,B,E,F, G,H: siehe Abb. 13). A 84 und B 84 befinden sich in der Helix E und B 155 in der G-H-Schleife. Die  $\alpha$ -Helices X und Y bilden ein hervorstehendes antiparalleles Paar, das zum Aufbau der  $(\alpha\beta)$ -Einheit erforderlich ist.

Isoliertes Phycocyanin ergibt  $(\alpha\beta)_3$ -Trimere mit  $C_3$ -Symmetrie und  $(\alpha\beta)_6$ -Hexamere mit  $D_3$ -Symmetrie aus Kopf-Kopf-verbundenen Trimeren (Abb. 8). Der Kontakt zwischen den Trimeren wird ausschließlich von den  $\alpha$ -Untereinheiten vermittelt, die durch ein kompliziertes Netzwerk polarer Bindungen miteinander verknüpft sind. Die Stapelung der Hexamere kommt im Kristall (und in den nativen PBS-Stäbchen) durch die  $\beta$ -Untereinheiten zustande<sup>[44]</sup>.

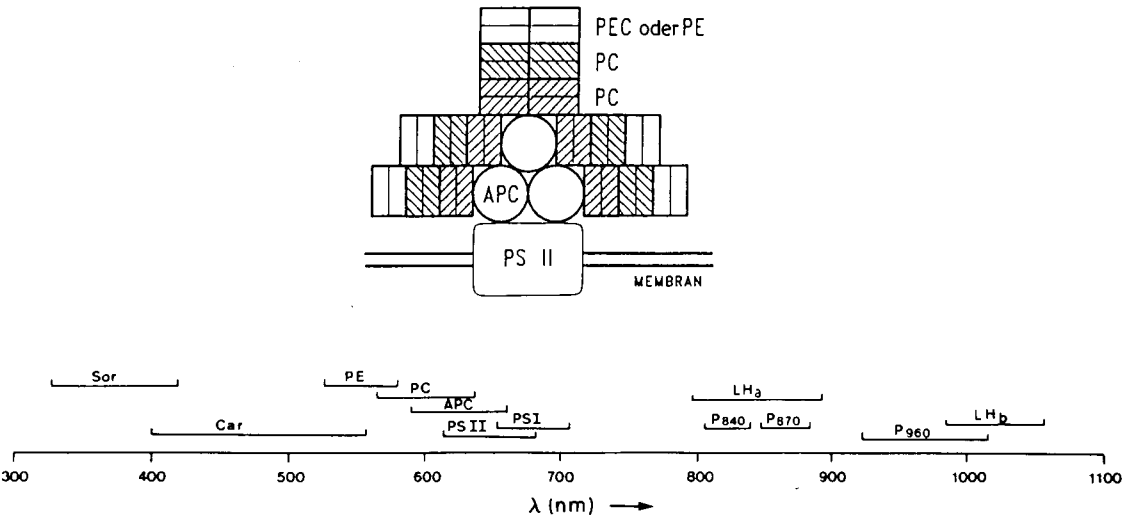


Abb. 7. Schematischer Aufbau eines typischen Phycobilisoms (PBS) mit der Anordnung der Komponenten und der mutmaßlichen räumlichen Beziehung zum Thylakoid und zum Photosystem II (PS II; Übersichten siehe [53, 54]). Die als PS II bezeichnete Komponente in der Abbildung soll das PS II und die Anheftungsstelle des PBS darstellen. Außerdem sind die Hauptabsorptionsbanden der photosynthetischen Protein-Cofaktor-Komplexe aus Organismen mit Photosynthese eingezeichnet. Die PBS-Komponenten absorbieren unterschiedlich, um einen breiten Spektralbereich abzudecken und den Energiefluß vom Phycoerythrocyanin (PEC)/Phycoerythrin (PE) über das Phycocyanin (PC) und Allophycocyanin (APC) zum PS II zu ermöglichen (Abkürzungen siehe Fußnote [\*\*\*] zur Einleitung).

Studien<sup>[54–57]</sup> führten zum Modell eines Phycobilisoms (PBS) mit halbkreisförmigem Querschnitt, das in Abbildung 7 dargestellt ist. PBS-Stäbchen sind aus Phycoerythrin (PE) oder Phycoerythrocyanin (PEC) und Phycocyanin (PC) zusammengesetzt, das mit einem inneren Kern aus Allophycocyanin (APC) verbunden ist. APC liegt an der photosynthetischen Membran und dicht beim Photosystem II (Übersicht siehe<sup>[53]</sup>). Die PC-Komponente besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteinuntereinheiten, die scheibenförmige  $(\alpha\beta)_6$ -Aggregate mit den Abmessungen  $120 \text{ \AA} \times 60 \text{ \AA}$  bilden (Übersichten siehe<sup>[58–63]</sup>).

Kristallographische Analysen haben ein detailliertes Bild der PC- und PEC-Komponenten ergeben<sup>[44–46, 64, 65]</sup>. Die Homologie in den Aminosäuresequenzen weist darauf hin, daß alle Komponenten ähnliche Strukturen haben.

### 3.2.1.2. Die Struktur des Phycocyanins

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des Phycocyanins (PC) (aus *Mastigocladus laminosus*) bestehen aus 162 bzw. 172 Aminosäureresten. Die Phycocyanobilinchromophore (vgl. Abb. 2) sind über Thioetherbindungen mit Cysteinresten in Position 84 beider Ketten (A 84, B 84) und Position 155 der  $\beta$ -Untereinheit (B 155) verknüpft<sup>[66]</sup>. Beide Untereinheiten ha-

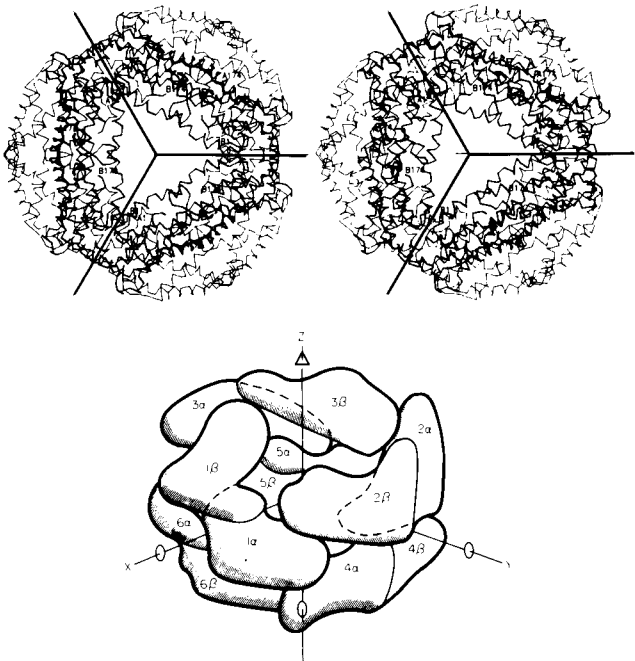


Abb. 8. Stereozzeichnung der Polypeptidkettenfaltung eines  $(\alpha\beta)_6$ -Hexamers von Phycocyanin (PC) in Richtung der Scheibenachse gesehen (oben). Das Schema (unten) zeigt die Packung der Untereinheiten des Hexamers in Seitenansicht.

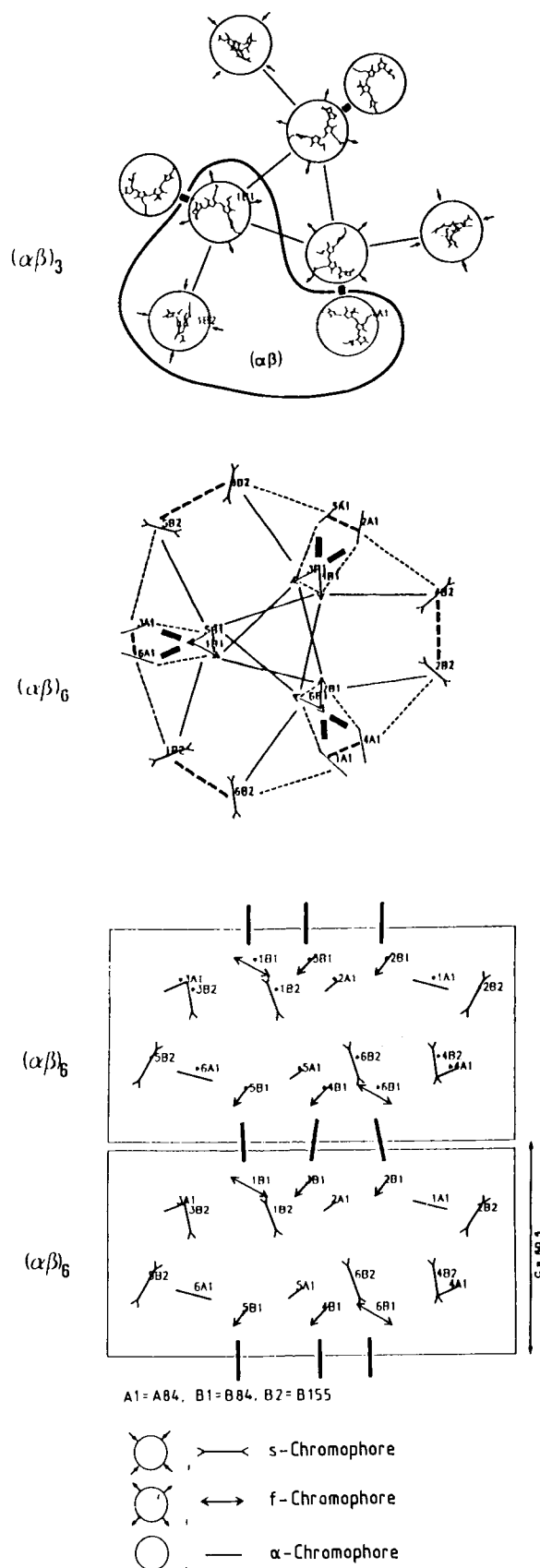
### 3.2.1.3. Die oligomeren Aggregate: Spektrale Eigenschaften und Energieübertragung

Die spektralen Eigenschaften der Biliproteine – Absorption und Fluoreszenzquantenausbeute – hängen vom Aggregationszustand ab. Das Absorptionsspektrum der  $(\alpha\beta)$ -Einheit von Phycocyanin gleicht den summierten Spektren ihrer Bestandteile; allerdings ist die Fluoreszenzquantenausbeute etwas erhöht. Die Trimerbildung führt zu Rotverschiebung sowie erhöhter Absorption und Fluoreszenzquantenausbeute<sup>[67, 68]</sup> (Übersicht siehe<sup>[60]</sup>). Bei den  $(\alpha\beta)_6$ -Komplexen ist die Fluoreszenz weiter verstärkt und das Absorptionsspektrum weiter verändert<sup>[69]</sup>.

Diese Beobachtungen können durch die Struktur der Aggregate erklärt werden. Die Bildung der  $(\alpha\beta)$ -Einheiten verändert die Umgebung der Chromophore nur geringfügig. Sie bleiben mit Abständen  $> 36 \text{ \AA}$  noch recht weit voneinander entfernt (Abb. 9a). Bei der Trimerbildung wird die Umgebung des Chromophors A84 entscheidend verändert, da ihm der Chromophor B84 einer symmetrisch verbundenen Einheit nahek kommt (Abb. 9a, oben). Im Hexamer (Abb. 9a, Mitte) erfolgt eine paarweise starke Wechselwirkung zwischen A84 und B155 der gestapelten Trimere. Außerdem werden mit zunehmender Größe der Aggregate die Molekülstrukturen immer starrer, wie an den Kristallen der trimeren und hexameren Aggregate zu erkennen ist<sup>[44, 46]</sup>. Diese Rigidität verhindert Deexcitation durch Isomerisierung und erhöht so die Quantenausbeute der Fluoreszenz.

Die Chromophore können in die Untergruppen der s- (sensibilisierenden) und f- (fluoreszierenden) Chromophore eingeteilt werden<sup>[70, 71]</sup>. Die s-Chromophore absorbieren an der langwelligen Flanke der Absorptionsbande und übertragen die Anregungsenergie schnell auf f-Chromophore. Dieser Übergang ist mit einer Depolarisation verbunden<sup>[72]</sup>. Bei der Anregung an der langwelligen Flanke (f-Chromophore) findet dagegen nur eine geringe Depolarisation statt. Offenbar wird die Anregung entlang von Stapeln ähnlich ausgerichteter f-Chromophore übertragen (Abb. 9a, unten)<sup>[73]</sup>. Die Zuordnung der Chromophore zu s und f gelang durch Spektroskopie an verschiedenen Aggregaten<sup>[68]</sup>, durch chemische Modifikation auf der Grundlage der Raumstruktur<sup>[74]</sup> und endgültig durch Messung des Lineardichroismus und der Fluoreszenzpolarisation an Einkristallen<sup>[75]</sup>. Demnach ist B155 der s-, B84 der f- und A84 der intermediäre Chromophor.

Die Lichtenergie wird sehr schnell innerhalb von 50 bis 100 ps von den Spitzen bis zum Zentrum der Phycobilisome übertragen (Übersichten siehe<sup>[60, 73, 76–80]</sup>). Die Übertragungszeiten sind um mehrere Größenordnungen kürzer als die Eigenfluoreszenzlebensdauern der isolierten Komponenten<sup>[67, 70]</sup>. Da die Abstände zwischen den Chromophoren innerhalb und zwischen den Hexameren zu groß für eine starke (excitonische) Kopplung sind, erfolgt die Energieübertragung durch induktive Resonanz. Ein Förster-Radius von etwa  $50 \text{ \AA}$  wurde von Grabowski und Gantl<sup>[81]</sup> vorgeschlagen. Die von Schirmer et al.<sup>[44]</sup> ermittelten Orientierungen und Abstände der Chromophore waren die Grundlage für die Berechnung der Energieübertragungsgeschwindigkeiten in Abbildung 9a. Sie zeigt die bevorzugten Energieübertragungswege in den  $(\alpha\beta)$ -Einheiten, den  $(\alpha\beta)_3$ -Trimeren, den  $(\alpha\beta)_6$ -Hexameren und den gestapelten Scheiben als Modell für native Antennenstäbchen. Danach sind die Chromo-



phore der ( $\alpha\beta$ )-Einheit nur sehr schwach miteinander gekoppelt. Dennoch findet eine gewisse Energieübertragung statt, vermutlich zwischen B155 und B84, wie Polarisationsmessungen zeigen<sup>[68, 82]</sup>. Die Trimerbildung führt zu einer starken Kopplung zwischen A 84 und B84, während B155 nur wenig beteiligt ist. Im Hexamer ergeben sich viele zusätzliche Übertragungswege; B155 ist nun wirkungsvoll gekoppelt. Die Hexamere sind offensichtlich die funktionellen Einheiten, da die Energie auf die zentralen f-Chromophore, die die Hexamerenstapel miteinander koppeln, konzentriert werden kann. Kinetische Studien<sup>[60, 68, 73, 83]</sup> haben das Bild des Energietransportes entlang der Stäbchen als eine Zufallsbewegung (begrenzt durch Einfang oder Diffusion) entlang einer eindimensionalen Anordnung von f-Chromophoren bestätigt. Sauer et al.<sup>[84]</sup> konnten die beobachteten Energieübertragungskinetiken in Phycocyanin-Aggregaten unter Verwendung der räumlichen Strukturen erfolgreich mit dem Förster-Mechanismus simulieren. Die Phycoerythrocyanin-

teine bestehen aus 336, 273, 323 bzw. 258 Aminosäureresten<sup>[43, 87, 89]</sup>. Das c-Typ-Cytochrom enthält vier Hämgruppen, die über Thioetherbindungen kovalent gebunden sind. Die Cofaktoren sind vier Bakteriochlorophyll-b ( $BC_{MP}$ ,  $BC_{LP}$ ,  $BC_{LA}$ ,  $BC_{MA}$ ), zwei Bakteriophäophytin-b ( $BP_M$ ,  $BP_L$ ), ein Menachinon-9 ( $Q_A$ ) und ein Eisen(II)-Ion, das am Elektronentransport beteiligt ist. Ein zweites Chinon (Ubichinon-9,  $UQ$ ,  $Q_B$ ), ebenfalls ein Bestandteil des funktionellen Komplexes, geht während der Aufarbeitung und Kristallisation des Reaktionszentrums teilweise verloren.

### 3.2.2.2. Die Anordnung der Chromophore und der Elektronentransport

Die Chromophore sind in L- und M-Zweigen angeordnet, die beim Bakteriochlorophyllpaar ( $BC_P$ ) zusammentreffen und über eine Achse angenähert zweizählige Symmetrie in

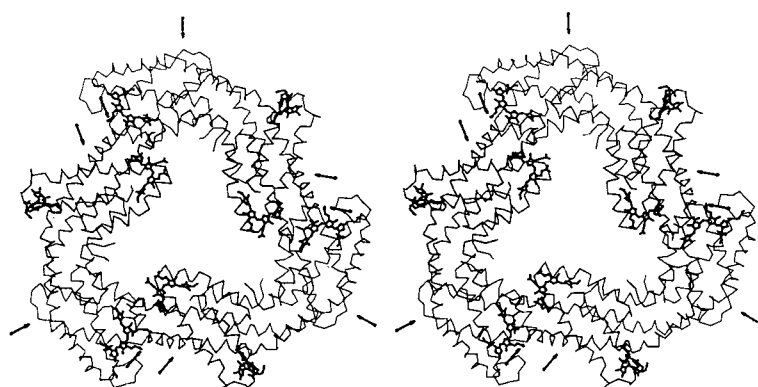


Abb. 9b. Modell des ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>-Trimers von Phycoerythrin (PE) auf der Grundlage der Struktur von Phycocyanin (PC). Die Lage der zusätzlichen Phycoerythrobiline ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Komponente an den Spitzen der Phycobilisom-Stäbchen ist Phycocyanin außerordentlich ähnlich<sup>[64, 65]</sup>. Ihr Chromophor für kurzwelliges Licht, A 84, liegt an der Peripherie (vgl. Abb. 10a) ebenso wie die zusätzlichen Chromophore von Phycoerythrin, das ebenfalls ein Bestandteil der Antennenspitzen ist (Abb. 9b).

Die Phycobilisomenstäbchen wirken als Lichtsammler und Energieverdichter von den äußeren zu den inneren Chromophoren hin, das heißt, als Trichter der Anregungsenergie, die von außen nach innen und von oben nach unten geleitet wird.

Die Linker-Polypeptide modulieren die funktionellen Eigenschaften der Aggregate. Es wird angenommen, daß einige dieser Proteine im zentralen Kanal der Hexamere liegen, wo sie B84 beeinflussen können.

### 3.2.2. Elektronentransport im Reaktionszentrum<sup>[\*]</sup>

#### 3.2.2.1. Der Aufbau des Reaktionszentrums<sup>[\*\*]</sup>

Das Reaktionszentrum von *Rps. viridis* besteht aus einem Komplex der vier Proteinuntereinheiten C, L, M, H und Cofaktoren. Die Anordnung zeigt Abbildung 10a. Die Pro-

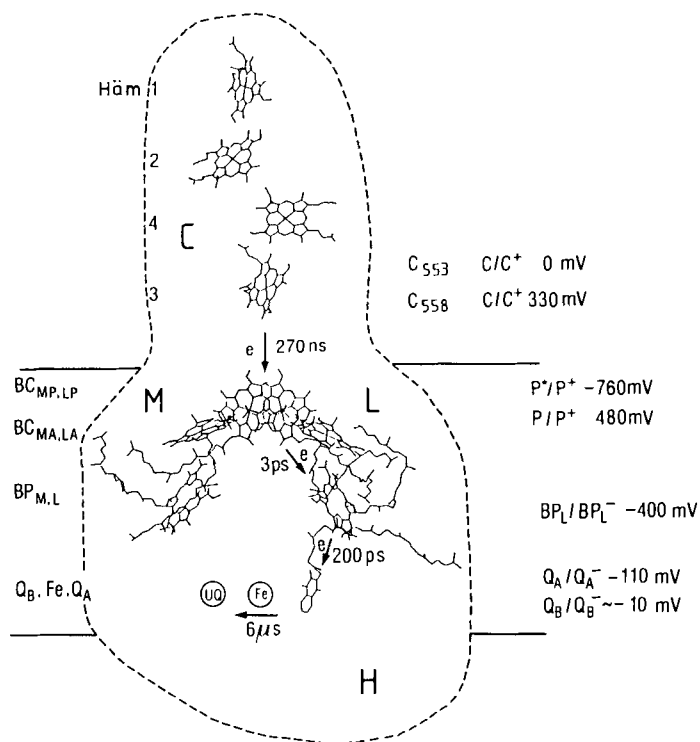


Abb. 10a. Das Strukturschema des Reaktionszentrums von *Rps. viridis* zeigt das System der Cofaktoren, den Umriß der Proteinuntereinheiten (C, L, M, H), die Halbwertszeiten der Elektronenübergänge und die Redoxpotentiale definierter Zwischenprodukte (Literaturzitate siehe Abschnitt 3.2.2.2; Abkürzungen siehe Fußnote [\*\*\*] zur Einleitung).

[\*] Einen Überblick zur Historie der Konzepte und Erkenntnisse über das Reaktionszentrum der Purpurbakterien gibt Parson [85].

[\*\*] Die elektronenmikroskopisch ermittelte Lage des Reaktionszentrums in der Thylakoidmembran von *Rps. viridis* wird von Stark et al. [86] beschrieben.

Beziehung stehen<sup>[47]</sup>. Diese Achse steht senkrecht auf der Membranebene.

Während viele optische Eigenschaften des Pigmentsystems auf der Grundlage der Raumstruktur recht gut verstanden werden<sup>[49]</sup>, trifft dies für den Elektronentransport nicht zu. Die Löschung der optischen Anregung des Bakteriochlorophyllpaares ( $BC_P$ ) erfolgt durch Elektronenübertragung zu Bakteriopheophytin ( $BP_L$ ) innerhalb von 3 ps und weiter zum primären Acceptor  $Q_A$  in etwa 200 ps. Der Transfer wird durch den Redoxpotentialgradienten zwischen  $P^*/P^+$  (etwa  $-760$  mV) und  $Q_A/Q_A^-$  (etwa  $-110$  mV) gesteuert. Das Redoxpotential von  $BP_L/BP_L^-$  liegt mit etwa  $-400$  mV dazwischen<sup>[90-99]</sup>. In Abbildung 10a sind diese Funktionsdaten zusammengefaßt. Allgemeine Faktoren, die die Übergangsgeschwindigkeit bestimmen, sind in Tabelle 1 zusammengestellt und werden hier für das Reaktionszentrum spezifiziert.

Ein schneller Elektronentransport erfordert Überlappung der Molekülorbitale. Die Orbitalwechselwirkung nimmt exponentiell mit dem Abstand zwischen Donor und Acceptor ab und ist bei Abständen über etwa  $10 \text{ \AA}$  bereits sehr gering<sup>[129, 100]</sup>. Im Reaktionszentrum ist der Abstand zwischen  $BC_P$  und  $Q_A$  viel zu groß für einen schnellen direkten Elektronentransport; statt dessen nimmt das Elektron einen über  $BP_L$  führenden Weg.  $BP_L^-$  ist ein spektroskopisch und kinetisch gut charakterisiertes Zwischenprodukt. Obwohl es zwischen  $BC_P$  und  $BP_L$  liegt, ist  $BC_{LA}^-$  kein Zwischenprodukt, sondern wahrscheinlich durch einen „Superaustausch“-Mechanismus, der eine starke quantenmechanische Kopplung vermittelt, am Elektronentransport beteiligt<sup>([101], Überblick siehe [102])</sup>. Der Abstand zwischen  $BP_L$  und  $Q_A$  scheint groß für einen schnellen Transport zu sein. Tatsächlich wird im L-Zweig des Pigmentsystems diese Lücke durch die aromatische Seitenkette von Trp M250 überbrückt (Abb. 10b)<sup>[37, 88]</sup>, die eine Kopplung über geeignete Orbitale

durch die chemische Natur der Komponenten, geometrische Faktoren und die Umgebung (Lösungsmittelpolarität) bestimmt wird. Sie hängt vom Ionisationspotential des Donors im angeregten Zustand, von der Elektronenaffinität des Acceptors und von der Coulomb-Wechselwirkung des Radikalionenpaares ab. Letztere ist wahrscheinlich klein, da Donor und Acceptor ( $BC_P$  und  $Q_A$  im RC) weit voneinander entfernt sind. Der Einfluß der Umgebung bei der Stabilisierung des Radikalionenpaares durch Ionenwechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindungen kann erheblich sein.  $\Delta G$  ist ein wichtiger Faktor der Aktivierungsenergie des Elektronentransports. Ebenso wichtig ist die Umgruppierung der Reaktanten und der Umgebung, die mit der Ladungsentstehung an Donor und Acceptor einhergeht. Diese Änderungen sind im Reaktionszentrum wahrscheinlich klein, da die Bakteriochlorophyll-Makrocyclen ziemlich starr in das Protein eingebunden sind und die Ladung über das ausgedehnte aromatische Elektronensystem verteilt ist. Bewegliche dipolare Gruppen (Peptidgruppen und Seitenketten) können erheblich zur Energiebarriere des Elektronentransports beitragen. Andererseits stabilisiert eine Matrix mit hoher elektronischer Polarisierbarkeit die entstehende Ladung im Übergangszustand der Reaktion und vermindert die Aktivierungsenergie. Man kann sich auch vorstellen, daß die Potentialenergiebarriere für ein tunnelndes Elektron erniedrigt wird. Aromatische Verbindungen, die solche Eigenschaften haben, treten im Reaktionszentrum gehäuft in der Umgebung der Elektronenüberträger auf (siehe Trp M250).

Der Elektronentransport von  $P^*$  nach  $Q_A$  hat eine sehr geringe Aktivierungsenergie<sup>[91, 94, 96, 105-108]</sup> und findet selbst bei 1 K statt. Thermisch aktivierte Prozesse, Kernbewegungen und Stöße sind demnach für die ersten sehr schnellen Ladungstrennungsschritte ohne Bedeutung. Die Geschwindigkeit nimmt mit abnehmender Temperatur sogar geringfügig zu, entweder wegen einer Kontraktion der Pig-

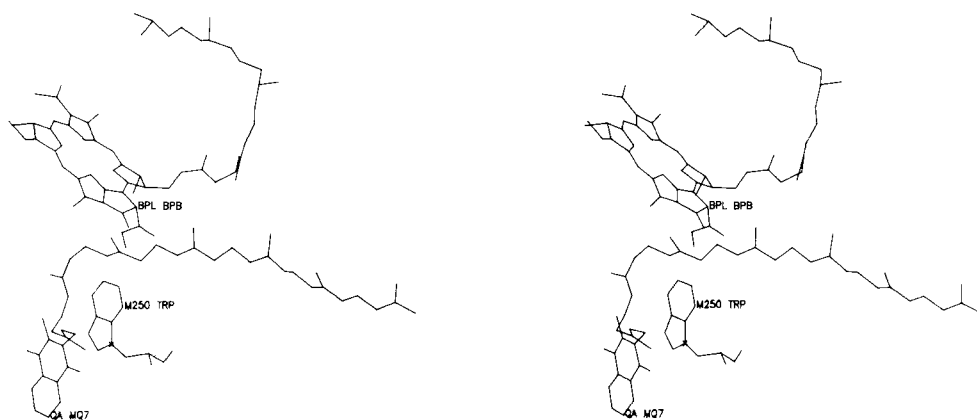


Abb. 10b. Stereoezeichnung der Anordnung von  $BP_L$ , Trp M250 und  $Q_A$  im L-Zweig des Pigmentsystems des Reaktionszentrums.

vermitteln könnte. Außerdem befindet sich die Isoprenoidseitenkette von  $Q_A$  nahe bei  $BP_L$ . Elektronentransport über lange verbindende Ketten durch Through-bond-Kopplung der Donor- und Acceptororbitale ist beobachtet worden<sup>[100, 103, 104]</sup>, doch liegen im Reaktionszentrum nur van-der-Waals-Kontakte vor.

Eine zweiter wichtiger Faktor für den Elektronentransport ist die Änderung der Freien Energie ( $\Delta G$ ), die

mentsysteme bei tiefer Temperatur oder wegen Veränderungen der Schwingungsniveaus, die zu einem günstigeren Franck-Condon-Faktor führen können.

Der Elektronentransport zwischen dem primären und dem sekundären Chinon-Acceptor  $Q_A$  bzw.  $Q_B$  unterscheidet sich erheblich von den vorhergehenden Prozessen, weil er viel langsamer ist (etwa  $6 \mu s$  bei pH 7 nach Carithers und Parson<sup>[91]</sup>) und eine beträchtliche Aktivierungsenergie von

etwa  $8 \text{ kcal mol}^{-1}$  hat. Bei *Rps. viridis* ist  $Q_A$  ein Menachinon-9 und  $Q_B$  ein Ubichinon-9, deren Redoxpotentiale in Lösung sich um etwa 100 mV unterscheiden. In anderen Purpurbakterien sind  $Q_A$  und  $Q_B$  Ubichinone. Die für einen effizienten Elektronentransport nötige Redoxpotentialdifferenz wird in diesen Fällen durch die asymmetrische Proteinmatrix erzeugt. Die Proteinmatrix ist auch für die ganz unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften von  $Q_A$  und  $Q_B$

Der Kreislauf des Elektronentransports schließt sich durch die Rückreduktion von  $BC_P^*$  durch Cytochrom c (Untereinheit C des Reaktionszentrums), wobei eine Entfernung von etwa 11 Å zwischen dem Pyrrolring I von Häm 3 und dem Pyrrolring III von  $BC_{LP}$  zu überbrücken ist. Die Übergangszeit beträgt 270 ns<sup>[95]</sup>; der Transfer ist also beträchtlich langsamer als die ersten Elektronentransferschritte. Das dazwischenliegende Tyr L 172 (Abb. 10c) könnte den Elek-

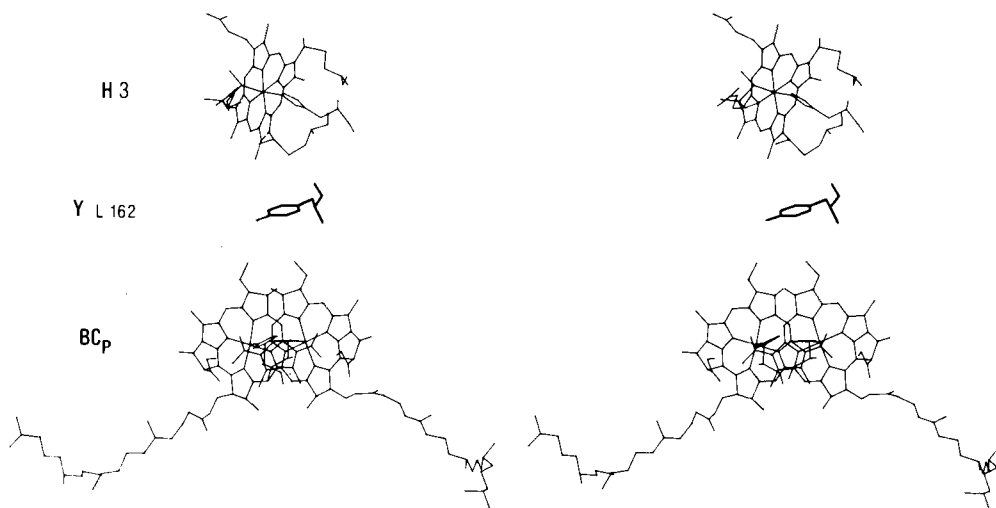


Abb. 10c. Stereoezeichnung des Häms 3 (H 3) in Cytochrom c, des Speziellen Paares  $BC_P$  und des dazwischenliegenden Restes Tyr L 162 (Y L 162) der L-Untereinheit [37]. Die His- und Met-Liganden des Eisens von H 3 und der His-Ligand des Magnesiumions von  $BC_P$  sind ebenfalls eingezeichnet.

maßgeblich.  $Q_A$  nimmt nur ein Elektron auf (es entsteht ein Semichinon-Anion), das in  $Q_B$  überführt wird, ehe der nächste Elektronentransport stattfinden kann.  $Q_B$  jedoch nimmt zwei Elektronen auf und wird unter Bildung eines Hydrochinons protoniert, das vom Reaktionszentrum abdiffundiert (Zweielektronen-Gatter<sup>[109]</sup>).  $Q_B$  liegt nahe bei Glu L 212, das einen Zugang zur H-Untereinheit ermöglicht und  $Q_B$  protonieren kann. Der Elektronentransport zwischen  $Q_A$  und  $Q_B$  findet in einer Umgebung statt, die sich erheblich von der Umgebung der Komponenten des primären Elektronentransports unterscheidet. Die Verbindungslinie zwischen  $Q_A$  und  $Q_B$  (auf die  $Q_B$ -Bindungsstelle wurde aus der Art der Bindung kompetitiver Inhibitoren und von Ubichinon-1 in *Rps.-viridis*-Kristallen geschlossen<sup>[37]</sup>) ist durch das Eisen und seine fünf koordinierenden Liganden – vier Histidinreste (M 217, M 264, L 190, L 230) und einen Glutaminsäurerest (M 232), – besetzt. His M 217 bildet eine Wasserstoffbrücke zu  $Q_A$ . His L 190 liegt nahe bei  $Q_B$ . Daß  $Q_A$  und  $Q_B$  etwa 15 Å voneinander entfernt sind, mag die Ursache des langsamen Transportes sein. Falls Elektronentransport und Protonierung gekoppelt sind, könnte damit die beobachtete pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Elektronentransports von  $Q_A$  nach  $Q_B$ <sup>[110]</sup> erklärt werden, und die für den Protonentransport erforderlichen Konformationsänderungen können die beobachtete Aktivierungsenergiebarriere verursachen. Die Funktion des geladenen Fe-His<sub>4</sub>-Glu-Komplexes wird bisher nur unzureichend verstanden, da der Elektronentransport von  $Q_A$  nach  $Q_B$  auch ohne Eisen stattfindet<sup>[111]</sup>; seine Rolle scheint vorwiegend struktureller Art zu sein.

tronentransport zu dem weit vom Donor entfernten Acceptor durch elektronische Kopplung erleichtern. Die biphasische Temperaturabhängigkeit weist auf einen komplizierteren Mechanismus hin, bei dem bei hohen Temperaturen Umgruppierungen eine Rolle spielen (Übersichten siehe<sup>[112, 113]</sup>).

Die besprochenen Faktoren, die die Geschwindigkeit günstig beeinflussen, sind eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für den Elektronentransport, der mit anderen Anregungslöschprozessen konkurriert, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind und nun für das Reaktionszentrum beschrieben werden.

Die Energieübertragung von  $P^*$  zurück zum Lichtsammelsystem oder auf andere Pigmente könnte durch Orientierung und Nähe begünstigt werden, ist aber energetisch ungünstig. Das Spezielle Paar  $BC_P$  absorbiert gewöhnlich (aber nicht bei *Rps. viridis*, bei dem die stärkste Absorption des Reaktionszentrums und des Lichtsammelsystems bei 960 bzw. 1020 nm liegt; siehe Abb. 7) bei größerer Wellenlänge als andere Pigmente des photosynthetischen Apparates und ist somit eine Falle für Lichtenergie. Die natürliche Lebensdauer des angeregten Singulettzustandes  $P^*$  beträgt etwa 20 ns<sup>[107, 114]</sup> und könnte als Abschätzung für die Zeiten anderer verlustreicher Löschprozesse dienen. Zweifellos ist der Elektronentransport viel schneller. Strahlungsloser Energieverlust von  $BC_P^*$  durch Isomerisierung und Konformationsänderungen ist unwahrscheinlich, da die cyclischen Pigmentsysteme durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen mit der Proteinmatrix verbunden sind.

Die Rückreaktion  $P^+ Q_A^-$  zu  $PQ_A$  hat eine günstige Triebkraft (Abb. 10a) und läuft temperaturunabhängig ab, ist

aber unter physiologischen Bedingungen langsam und bedeutungslos (Überblick siehe<sup>[94]</sup>). Die physikalische Grundlage ist äußerst interessant, aber bis jetzt noch rätselhaft. Sie mag mit einer Gatterfunktion von  $BP_L$  zusammenhängen, die dadurch zustandekommt, daß sein Redoxpotential negativer als das von  $Q_A$  ist, oder mit elektronischen Eigenschaften von  $P^+$ , die eine Ladungsrückübertragung behindern, und mit Konformationsänderungen, die durch den Elektronentransport ausgelöst werden.

Ganz offensichtlich zeigt sich der tiefgreifende Einfluß der Proteinmatrix auf den Elektronentransport im Reaktionszentrum durch die beobachtete Asymmetrie der Elektronenübertragung in den Pigmenten Bakteriochlorophyll-b (BC) und Bakteriophäophytin (BP), je nachdem, ob sie dem L- oder dem M-Zweig angehören. Nur der mit der L-Untereinheit enger verbundene Zweig ist aktiv. Eine Erklärung bietet vielleicht der Befund, daß die Proteinumgebung beider Zweige, obwohl sie durch homologe Proteine (L und M) gebildet wird, durch das zwischen  $BP_L$  und  $Q_A$  gelegene Trp M 250 und die zahlreichen Unterschiede in den  $Q_A^-$ - und  $Q_B^-$ -Bindungsstellen doch recht verschieden ist<sup>[37, 88]</sup>. Asymmetrie wird auch im Paar  $BC_p$  selbst infolge unterschiedlicher Verdrillungen und Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Ringsysteme und in der etwas unterschiedlichen räumlichen Anordnung von  $BC_A$  und BP beobachtet. Man vermutet, daß dadurch die Freisetzung von Elektronen in den L-Zweig erleichtert wird<sup>[115]</sup>. Der M-Zweig mag als anhängende („pendant“) Gruppe einen Einfluß haben.

Die Proteinmatrix dient auch dazu, die überschüssige Energie von etwa 650 mV<sup>[92]</sup> des angeregten Speziellen Paares  $P^*Q_A$  gegenüber dem Radikalionenpaar  $P^+Q_A^-$  abzuführen. Diese Prozesse sind wahrscheinlich sehr schnell.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der sehr schnelle Elektronentransport von  $BC_p^*$  zu  $Q_A$  zwischen eng benachbarten aromatischen Makrocyclen mit abgestimmten Redoxpotentialen stattfindet. Die Proteinmatrix, in die die Pigmente fest eingebettet sind, ist vorwiegend mit apolaren Aminosäureseitenketten mit einem hohen Anteil aromatischer Reste ausgekleidet. Der Weg der Elektronen ist von der Wasserphase weit entfernt.

### 3.2.3. Die Blauen Oxidasen

Oxidasen katalysieren die Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Einelektronenübertragungen von Substraten. Zur Reduktion eines Sauerstoffmoleküls zu zwei Molekülen Wasser sind vier Elektronen und vier Protonen erforderlich. Die Oxidasen benötigen Erkennungsstellen für beide Substrate sowie einen Speicher für Elektronen und/oder die Fähigkeit, reaktive, partiell reduzierte Sauerstoffzwischenprodukte zu stabilisieren<sup>[116–118]</sup>.

Klassifiziert werden die „Blauen“ Oxidasen nach den in ihnen enthaltenen drei Typen von Kupfer mit bestimmten spektroskopischen Eigenschaften: Typ-1- $Cu^{2+}$  bewirkt die tiefblaue Farbe dieser Proteine; Typ-2- $Cu^{2+}$  oder normales  $Cu^{2+}$  hat keine erkennbare optische Absorption; die Typ-1- und Typ-2-Kupfer(II)-Ionen sind paramagnetisch; Typ-3-Kupfer absorbiert stark bei etwa 330 nm und ist antiferromagnetisch durch Kopplung der Spins eines Kupfer(II)-Ionenpaares. Bei Reduktion verschwinden die charakteristischen optischen Spektren und Elektronenspinresonanzspektren.

Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften und Redox-eigenschaften der Blauen Oxidasen sind in mehreren neueren Übersichten ausführlich beschrieben (z. B. für Laccase<sup>[119]</sup>, Ascorbat-Oxidase<sup>[120]</sup>, Ceruloplasmin<sup>[121]</sup>). Zuerst wird das Typ-1- $Cu^{2+}$  durch Elektronenübertragung vom Substrat reduziert. Das Elektron wird weiter auf Typ-2- und Typ-3-Kupfer übertragen. Das zweite Substrat, der molekulare Sauerstoff, ist mit den Typ-3- und/oder Typ-2-Kupfer-Ionen verbunden.

#### 3.2.3.1. Ascorbat-Oxidase:

##### Aufbau und Anordnung der Kupferzentren

Ascorbat-Oxidase (AO) ist ein Polypeptid aus 553 Aminosäureresten, die zu drei eng verbundenen Domänen gefaltet sind<sup>[50]</sup>. Die Oxidase liegt in Lösung als Dimer vor; die funktionelle Einheit ist jedoch das Monomer. Ascorbat-Oxidase gehört zusammen mit Laccase und Ceruloplasmin zur Gruppe der Blauen Oxidasen<sup>[122]</sup>.

Strukturen von Kupferproteinen, die nur einen der verschiedenen Kupfertypen enthalten, sind bekannt: Plastocyanin hat ein „blaues“ Typ-1-Kupfer, das mit zwei Histidinresten und den Schwefelatomen eines Cysteins und Methionins in einer verzerrten tetraedrischen Koordination verbunden ist<sup>[123]</sup>. Cu-Zn-Superoxid-Dismutase enthält ein Typ-2-Kupfer, das vier Histidinliganden in leicht verzerrter quadratischer Koordination binden<sup>[124]</sup>. Hämocyanin von *Panulirus interruptus* enthält als Typ-3-Kupfer ein Paar von Kupfer-Ionen im Abstand von 3.4 Å mit sechs Histidinliganden<sup>[125]</sup>.

In der Domäne 3 der Ascorbat-Oxidase (siehe Abschnitt 4.4) findet man ein Kupfer-Ion in stark verzerrter tetraedrischer Koordination, die sich trigonal-pyramidale Geometrie nähert, mit den Liganden His, Cys, His, Met, wie bereits in Abbildung 6 zu sehen war. Es ähnelt dem blauen Typ-1-Kupfer des Plastocyanins. Zwischen den Domänen 1 und 3 der Ascorbat-Oxidase befindet sich eine dreikernige Kupfergruppe (Abb. 11 a). Vier (-His-X-His)-Aminosäuresequenzen liefern die acht Histidinliganden. Die dreikernige Kupfergruppe enthält ein Kupferpaar (Cu31, Cu32) mit je drei Histidinliganden (A 108, A 451, A 507; A 64, A 106, A 509), die ein trigonales Prisma bilden. Es ist das Typ-3-Kupferpaar; eine vergleichbare Anordnung liegt in Hämocyanin vor. Das verbleibende Kupfer (Cu2) hat zwei Histidinliganden (A 62, A 449) und ist ein Typ-2-Kupfer. Der dreikernige Kupfercluster ist die Bindungsstelle des molekularen Sauerstoffs; die Einzelheiten der Struktur, einschließlich der Anwesenheit exogener Liganden, müssen noch geklärt werden. Die räumliche Nachbarschaft der drei Kupfer-Ionen im Cluster läßt raschen Elektronenaustausch vermuten. Der Cluster dient als Elektronenspeicher und könnte als kooperativer Dreielektronendonator für das Sauerstoffmolekül wirken, um die O-O-Bindung irreversibel zu spalten.

#### 3.2.3.2. Intramolekularer Elektronentransport in Ascorbat-Oxidase

Vom Typ-1-Kupfer werden Elektronen auf die dreikernige Kupfergruppe übertragen. Der kürzeste Weg führt über Cys-A 508 und His-A 507 oder His-A 509. Das Segment (-His-X-His-) verbindet Elektronendonator und -acceptor und überbrückt dabei einen Abstand von 12 Å (Abb. 11 b). Der

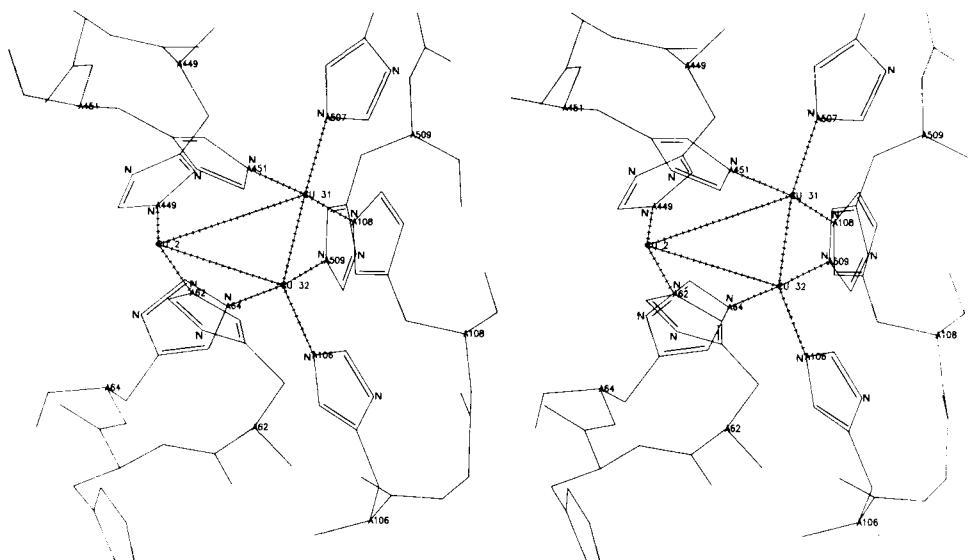


Abb. 11 a. Stereozeichnung der dreikernigen Kupfergruppe in Ascorbat-Oxidase. Die koordinativen Bindungen zwischen den Kupfer-Ionen und den Proteinresten sind gestrichelt dargestellt [50].

Cysteinschwefel und die Imidazolringe des verbrückenden Liganden haben tief liegende unbesetzte Molekülorbitale und könnten einen chemischen Mechanismus des Elektronentransports begünstigen, doch werden die dazwischeng liegenden aliphatischen Einheiten und Peptidketten kaum Radikale bilden und wohl durch Resonanz beteiligt sein. Die einem Cystein-S<sup>-</sup> → Cu<sup>2+</sup>-Charge-Transfer-Übergang zugeschriebene Absorption des „blauen“ Kupfers spricht für den vorgeschlagenen Elektronenübergangsweg.

Der mutmaßliche Weg der Elektronen verzweigt sich am C $\alpha$ -Atom von Cys-A 508. Modelle zeigten Nichtäquivalenz und einen schnelleren Elektronentransfer in der N-C-Richtung von Amidbindungen<sup>[31]</sup>. Das könnte auch für die Blauen Oxidasen gelten und einen bevorzugten Übergang nach A 507 begründen.

Die Redoxpotentialdifferenz zwischen Typ-1- und Typ-3-Kupfer beträgt bei Ascorbat-Oxidase  $-40$  mV. Leider sind

keine direkten Messungen der Elektronentransfergeschwindigkeit verfügbar. Die Wechselzahl der Ascorbat-Oxidase beträgt  $7.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  [126, 127] und zeigt, als untere Grenze genommen, einen ziemlich schnellen Transport an, trotz des großen Abstandes und der kleinen Triebkraft. Der Weg der Elektronen verläuft intramolekular und in großem Abstand von der Wasserphase.

Die charakteristische Verteilung der Redoxzentren als ein- und dreikernige Zentren in den Blauen Oxidasen mag auch in der komplexesten Oxidase, der Cytochrom-Oxidase (siehe das hypothetische Modell von *Holm et al.*<sup>[128]</sup>), und im wasserspaltenden Mangan-Protein-Komplex des Photosystems II vorliegen, der die Umkehrreaktion der Oxidasen ausführt. Für seinen (Mn)<sub>4</sub>-Cofaktor werden zwei zweikernige oder ein vierkerniges Metallzentrum angenommen<sup>[129]</sup>, aber ein- und dreikernige Anordnungen können nicht ausgeschlossen werden.

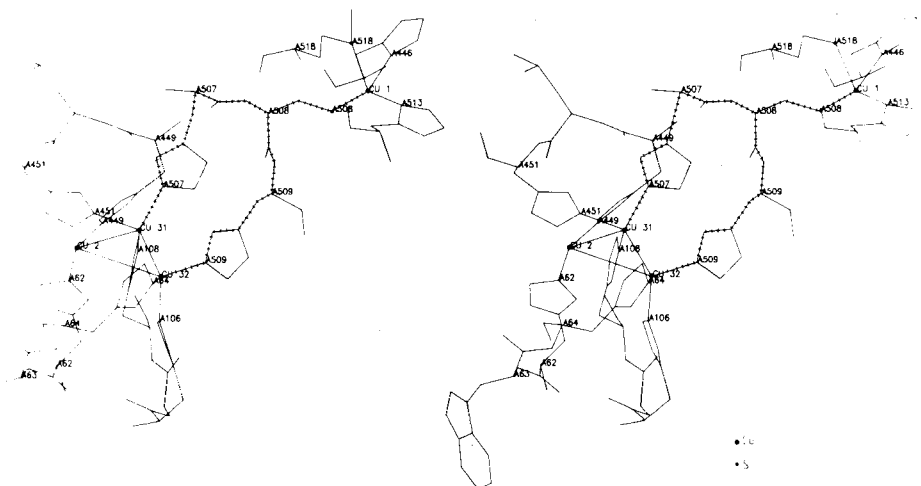


Abb. 11 b. Stereozeichnung des dreizähligen Peptidliganden (-His 507-Cys 508-His 509-) in Ascorbat-Oxidase zwischen dem Typ-1-Kupfer (Cu1) und der dreikernigen Gruppe (Cu31, Cu32, Cu2) [50].

### 3.3. Das Protein als Medium

Die Grenze zwischen Proteinen als Liganden und als Medium ist fließend. Die extreme mikroskopische Komplexität von Struktur, Polarität und Polarisierbarkeit der Proteine beeinflusst den Energie- und Elektronentransfer. Es gibt kein offensichtliches allgemeines Strukturmerkmal der besprochenen Proteinsysteme, außer daß ein hoher Anteil aromatischer Reste (besonders Tryptophan) die Elektronentransferwege im Reaktionszentrum der Purpurbakterien und in der Ascorbat-Oxidase säumt und diese Wege, weit entfernt vom umgebenden Wasser, innerhalb des Proteins und innerhalb der Kohlenwasserstoffphase der Membrandoppelschicht (beim Reaktionszentrum) verlaufen. Diese Einflüsse wurden in den Abschnitten 3.1 und 3.2.2.2 behandelt.

#### 4. Strukturbeziehungen und interne Verdoppelung

Alle vier im folgenden behandelten Proteinsysteme zeigen Wiederholungen von Strukturmotiven oder Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen mit bekannten Faltungsmustern. Dies ist eine ganz allgemeine Erscheinung und nicht auf energie- und elektronenübertragende Proteine beschränkt. Es ist auch nicht ungewöhnlich, daß diese Beziehungen anhand der Aminosäuresequenzen oft unerkant bleiben; dies spiegelt letztlich unsere Unkenntnis der Sequenz-Struktur-Beziehungen wider. Eine Untersuchung der Strukturbeziehungen

kann zur Klärung der Evolution und der Funktion von Proteinsystemen beitragen und ist darum hier angebracht.

#### 4.1. Retinol-bindendes und Bilin-bindendes Protein

Der einfachste Fall ist in Abbildung 12 gezeigt, wo Bilin-bindendes Protein (BBP)<sup>[42]</sup> mit Retinol-bindendem Protein (RBP)<sup>[130]</sup> verglichen wird. Für die untere Seite des  $\beta$ -Barrel ist die Strukturverwandtschaft offensichtlich, während sich der obere Teil mit den gebundenen Pigmenten Biliverdin bzw. Retinol erheblich unterscheidet. Das Molekül ist offensichtlich in Gerüst- und hochveränderliche Abschnitte unterteilt. Letztere bestimmen in Analogie zu den Immunglobulinen<sup>[131]</sup> die Bindungsspezifität. Diese Verwandtschaft läßt wie für RBP auch für BBP eine Carrierfunktion vermuten, obgleich BBP auch zur Pigmentierung bei Schmetterlingen dient.

## 4.2. Phycocyanin

Phycocyanin (PC) besteht im Proteinteil aus den beiden Polypeptidketten  $\alpha$  und  $\beta$ , die strukturell deutlich verwandt sind (Abb. 13, unten) und wahrscheinlich von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen.

Die  $\alpha$ -Untereinheit ist im G-H-Turn verkürzt und hat keinen s-Chromophor B155 (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Der Verlust oder Erwerb von Chromophoren während der Evolu-

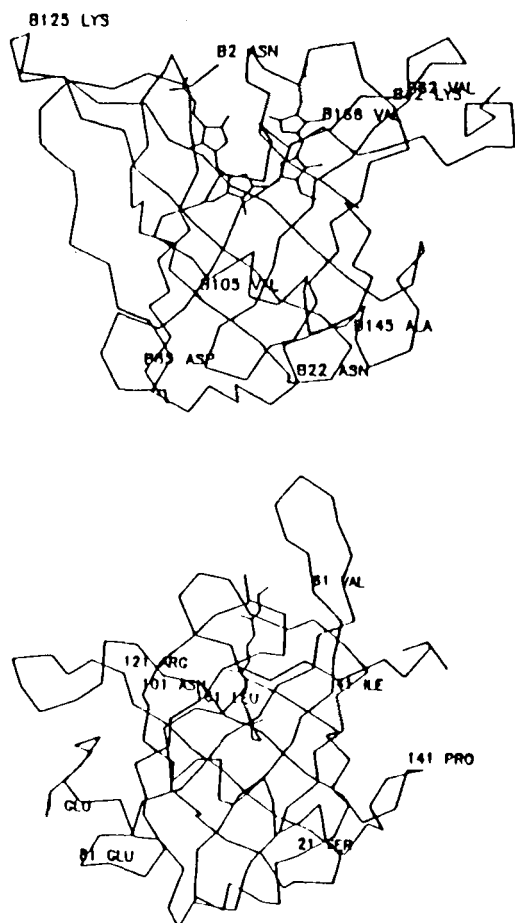


Abb. 12. Vergleich der Faltung der Polypeptidketten von Bilin-bindendem Protein (BBP) und Retinol-bindendem Protein (RBP) (mit gebundenen Cofaktoren).

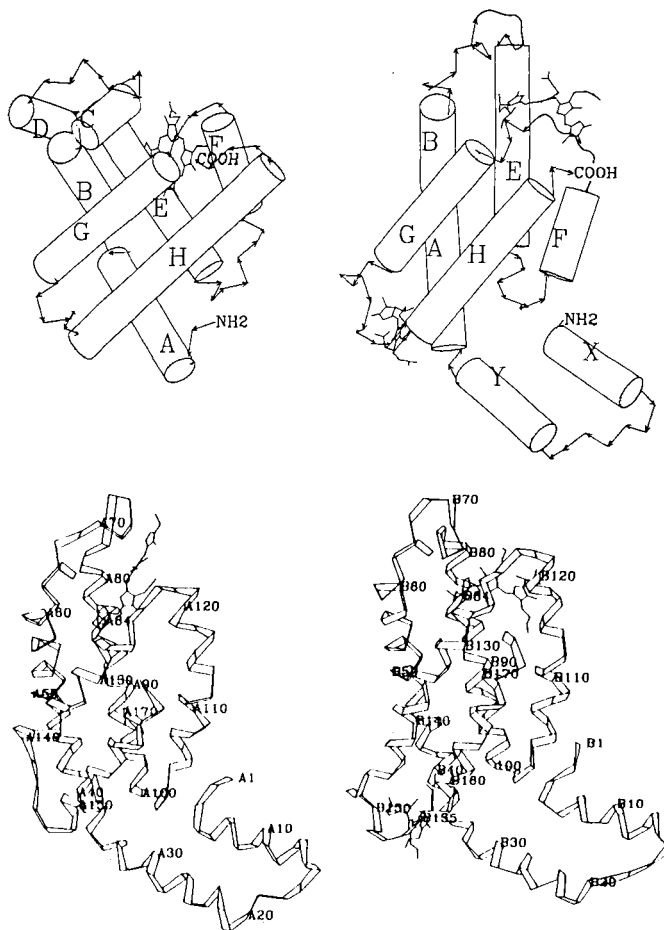


Abb. 13. Faltung der Polypeptidketten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von Phycocyanin [44] (unterer Teil, links und rechts) und Vergleich der Anordnung der  $\alpha$ -Helices in Myoglobin und Phycocyanin (oberer Teil, links und rechts).

tion mag weniger wichtig gewesen sein als die Differenzierung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die nichtäquivalente Plätze im  $(\alpha\beta)_3$ -Trimer einnehmen, so daß die homologen Chromophore A 84 und B 84 nichtäquivalent werden und B 84 an der Innenseite der Scheibe zu liegen kommt. Außerdem spielen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bei der Bildung des  $(\alpha\beta)_6$ -Hexamers sehr verschiedene Rollen, wie bereits Abbildung 8 zeigt. Symmetrische Hexamere mögen als Vorläufer existiert und auch Stapel gebildet haben, doch ohne die Differenzierung der Chromophore und insbesondere ohne die Nichtäquivalenz und enge Wechselwirkung von A 84 und B 84 im Trimer. Die funktionelle Vervollkommenheit hat wahrscheinlich die divergente Evolution der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten vorangetrieben.

Eine höchst überraschende Ähnlichkeit wurde zwischen den Untereinheiten von Phycocyanin und den Globinen entdeckt, wie aus Abbildung 13 (oben) hervorgeht. Die Faltung der Helices A bis H zeigt eine ähnliche Topologie. Die von den N-terminalen X,Y- $\alpha$ -Helices gebildete U-förmige Erweiterung von Phycocyanin ist unerläßlich für die Bildung der  $(\alpha\beta)$ -Unterstruktur. Der Vergleich der Aminosäuresequen-

### 4.3. Das Reaktionszentrum

Das Reaktionszentrum von *Rps. viridis* ist unsymmetrisch zur Membranebene angeordnet. Das ist bei einem Komplex, der einen quer zur Membran gerichteten Prozeß katalysiert, nicht überraschend. Es gibt jedoch bezüglich der L- und M-Untereinheiten und des Pigmentsystems eine Quasisymmetrie. Die strukturelle Ähnlichkeit und die Homologie der Aminosäuresequenzen der L- und M-Untereinheiten legen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung nahe. Diese Verwandtschaft erstreckt sich aufgrund der Sequenzhomologie und der Erhaltung der an der Bindung der Cofaktoren beteiligten Reste auch auf die Photosystem-II-Komponenten D1 und D2 (Übersichten siehe<sup>[132, 133]</sup>). Der mutmaßliche Vorläufer war ein symmetrisches Dimer mit identischen Elektronentransportwegen. Die Wechselwirkung mit der H-Untereinheit führt zu Asymmetrie. Es sei besonders auf die N-terminale membranüberspannende  $\alpha$ -Helix der H-Untereinheit (H) hingewiesen, die nahe bei der membranüberspannenden  $\alpha$ -Helix E der M-Untereinheit, dem L-Zweig des Pigmentsystems und  $Q_A$  liegt (Abb. 14). Die Verbesserung der

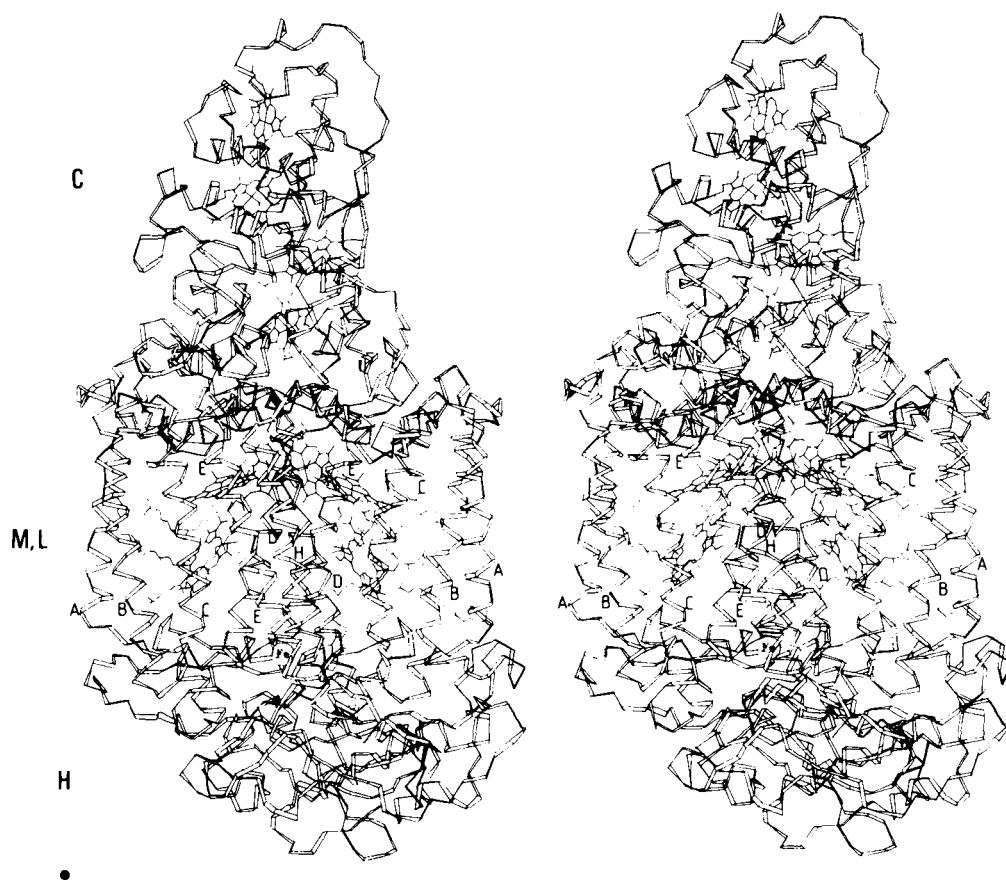


Abb. 14. Stereozeichnung des Reaktionszentrums von *Rps. viridis* (vollständiger Komplex aus Untereinheiten und Cofaktoren). Die membranüberspannenden  $\alpha$ -Helices der L- und M-Untereinheiten (A, B, C, D, E in sequentieller und A, B, C, E, D in räumlicher Folge) und der H-Untereinheit (H) sind bezeichnet [37] (vgl. Abb. 10 a).

zen anhand von Strukturüberlagerungen enthüllt einige Homologien, die auf eine divergente Evolution der Phycobilineproteine und der Globine hindeuten<sup>[44]</sup>. Es bleibt jedoch rätselhaft, welche Funktion ein Vorläufer von lichtsammelnden und sauerstoffbindenden Proteinen gehabt haben mag.

Wechselwirkung mit der H-Untereinheit, die eine Rolle bei der Elektronenübertragung von  $Q_A$  nach  $Q_B$  und bei der Protonierung von  $Q_B$  zu spielen scheint, mag die divergente Evolution der L- und M-Untereinheiten auf Kosten der Inaktivierung des M-Pigmentzweiges vorangetrieben haben.

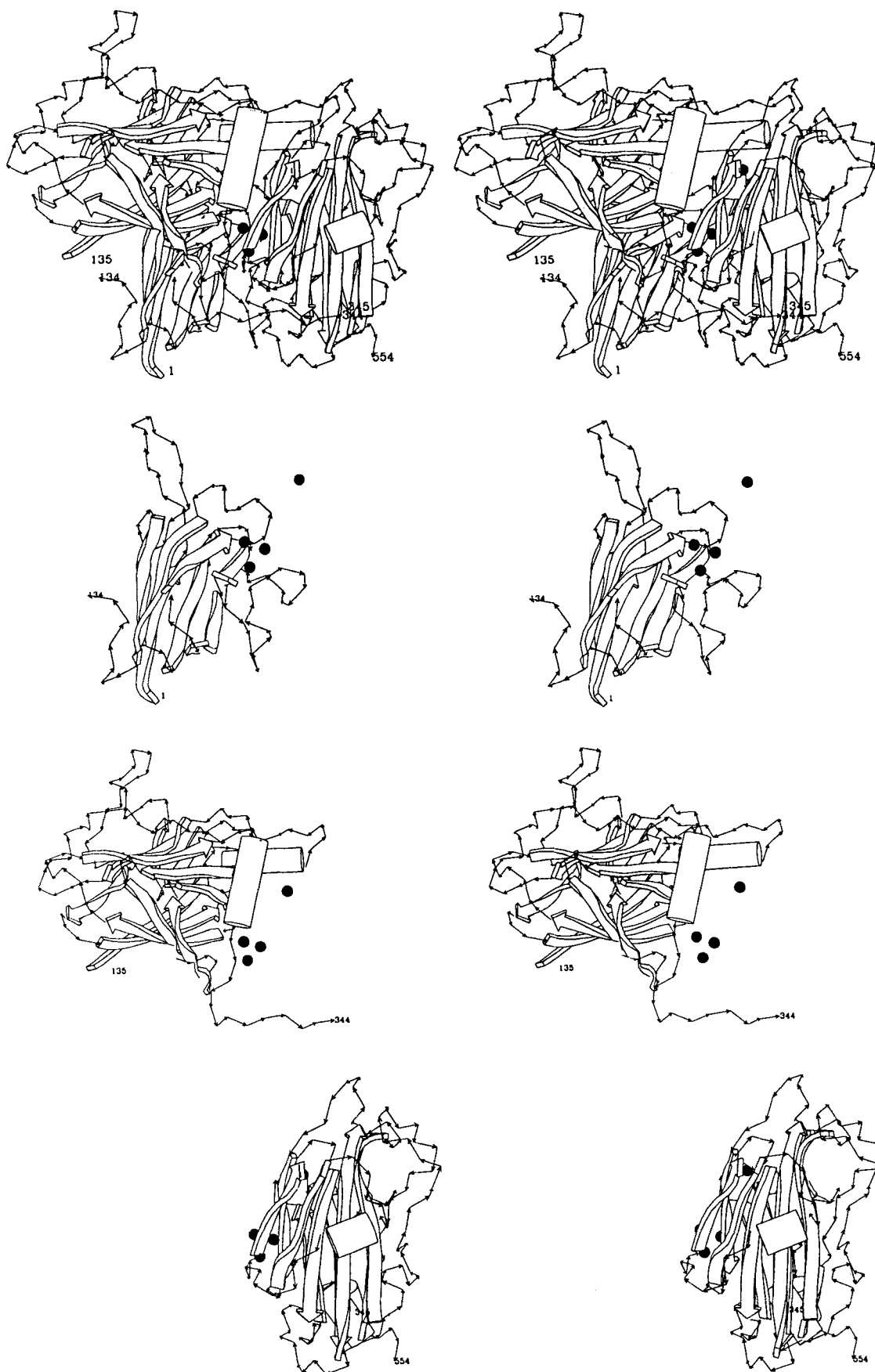


Abb. 15. Stereozeichnung der Faltung der Polypeptidkette der Ascorbat-Oxidase und Einzeldarstellung ihrer drei Domänen (von oben nach unten) [50].  $\beta$ -Stränge sind als Pfeile und  $\alpha$ -Helices als Zylinder dargestellt (mit dem Zeichenprogramm von Lesk und Hardman [134] angefertigt).

Der Elektronentransport von  $BC_p$  nach  $Q_A$  ist jedoch extrem schnell und nicht geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion. Die Erhaltung des M-Pigmentzweiges bei der Evolution mag in seiner Bedeutung als anhängende („pendant“) Gruppe für die Lichtsammlung und den Elektronentransport begründet sein. Es gibt auch strukturelle Gründe, da seine Deletion leeren Raum hinterließe.

Die Cytochrom-Untereinheit (C) trägt zur Asymmetrie des L-M-Komplexes bei und weist selbst eine innere Verdopplung auf<sup>[37]</sup>. Alle vier Hämgruppen sind durch ein Helix-Turn-Helix-Motiv verbunden, jedoch sind die Turns bei den Hämgruppen 1 und 3 kurz und bei den Hämgruppen 2 und 4 lang.

#### 4.4. Die Blauen Oxidasen

Genvervielfältigung und divergente Evolution sind an der Blauen Oxidase Ascorbat-Oxidase besonders klar erkennbar. Abbildung 15 zeigt die aus 553 Aminosäureresten bestehende Polypeptidkette, die drei eng verbundene Domänen ähnlicher Topologie bildet<sup>[50]</sup>. Obwohl sie nahezu doppelt so groß sind, ähneln diese Domänen dem einfachen kleinen Kupferprotein Plastocyanin (Abb. 16)<sup>[123]</sup>. In der Blauen

ein Typ-1-Kupfer enthält. Ein Homodimer aus plastocyanin-ähnlichen Molekülen könnte die zweimal vier Histidin-liganden für die dreikernige Kupfergruppe liefern und eine symmetrische Oxidase bilden. Aus diesem hypothetischen

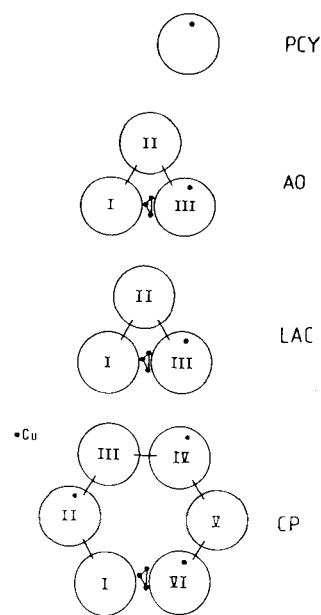


Abb. 17. Homologe Domänen in Plastocyanin (PCY), Ascorbat-Oxidase (AO), Laccase (LAC) und Ceruloplasmin (CP). Die ein- und dreikernigen Kupferzentren sind eingezeichnet.

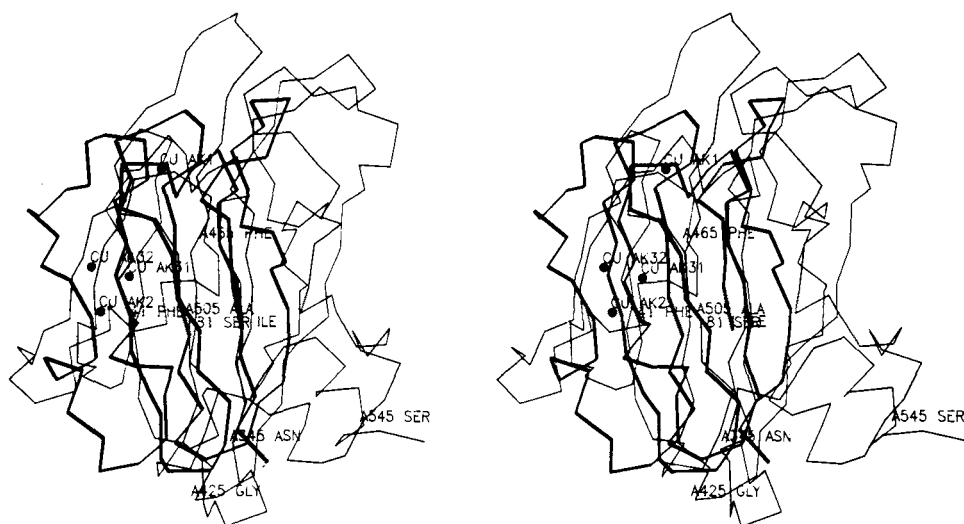


Abb. 16. Stereozzeichnung und Überlagerung der Domäne III von Ascorbat-Oxidase (feiner Strich) und Plastocyanin (starker Strich). Die dreikernige Kupfergruppe der Ascorbat-Oxidase liegt zwischen Domäne I (nicht gezeigt) und Domäne III verborgen.

Oxidase schließen die Domänen I und III die dreikernige Kupfergruppe in quasisymmetrischer Weise ein, aber nur die Domäne III enthält das Typ-1-Kupfer, den Elektronendonator für die dreikernige Gruppe. Ein möglicher Elektronentransportweg in der Domäne I ist nicht verwirklicht; dies erinnert an den M-Zweig des Pigments im Reaktionszentrum (vgl. Abschnitt 3.2.2.2). Ähnlich wie die H-Untereinheit im Reaktionszentrum führt die verbindende Domäne II in der Ascorbat-Oxidase zur Asymmetrie, die die Auseinanderentwicklung der Domänen I und III bewirkt haben mag.

Die Proteine Plastocyanin, Ascorbat-Oxidase, Laccase und Ceruloplasmin sind aufgrund von Strukturbeziehungen und Sequenzhomologien als Glieder einer Familie von Kupferproteinen anzusehen<sup>[50, 135–137]</sup>, deren Beziehungen in der Form eines Stammbaumes dargestellt werden können (Abb. 17). Das einfachste Molekül ist Plastocyanin, das nur

Vorläufer könnten sich die heutigen Blauen Oxidasen und Ceruloplasmin auf verschiedenen Wegen der Gen(Domänen)insertion und des Verlustes und/oder Erwerbs von Kupfer entwickelt haben. In beiden hat sich die Anordnung der N- und C-terminalen Domänen erhalten, die die funktionelle Kupfergruppe einschließen. Die DNA-Rekombinationstechnik bietet die Möglichkeiten, die hypothetische Vorläuferoxidase zu rekonstruieren. Daran wird zur Zeit gearbeitet.

#### 5. Allgemeine Folgerungen für die Membranproteine aus der Struktur des Reaktionszentrums

Die Strukturen der wasserlöslichen Proteine zeigen eine scheinbar unbegrenzte Mannigfaltigkeit, obwohl sie aus nur wenigen definierten Sekundärstrukturelementen wie Helices,

$\beta$ -Faltblättern und Turns zusammengesetzt und Domänen und wiederkehrende Struktur motive am Aufbau beteiligt sind. Die besprochenen Proteine boten genügend Beispiele dafür. Daß es nur eine begrenzte Zahl von Grundfaltungen zu geben scheint, kann auf der Entwicklung der Proteine aus einer begrenzten Zahl von Strukturen und/oder auf Beschränkungen bezüglich der Proteinstabilität und -faltungsgeschwindigkeit beruhen. Diese grundlegenden Faltungsmotive sind jedoch keine starren Bausteine, sondern passen sich

konnte. Vorher war nur die Struktur von Bakteriorhodopsin mit geringer Auflösung bekannt<sup>[139]</sup>. Beide haben einige Gemeinsamkeiten. Aus der Struktur des Reaktionszentrums lassen sich einige allgemeine Schlüsse für Membranproteine ziehen. Das Reaktionszentrum enthält 11 Helices, die die Membran durchdringen und mit 26 (H-Untereinheit) oder 24–30 Resten (L- und M-Untereinheit) die passende Länge haben. Die Aminosäuresequenzen dieser Abschnitte enthalten keine geladenen Reste (Abb. 18). Einige geladene Reste

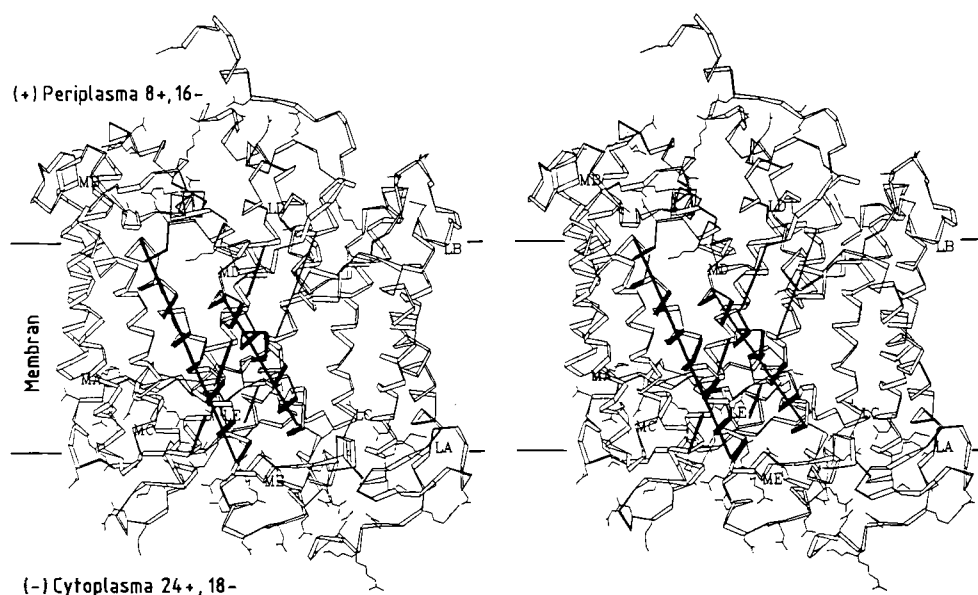


Abb. 18. Stereoeizug der Polypeptidketten der L- und M-Untereinheiten des Reaktionszentrums in Banddarstellung. Die N-Termini der membrandurchdringenden  $\alpha$ -Helices sind bezeichnet (mit vorangestelltem M und L); das tetrahelicale Motiv der D- und E- $\alpha$ -Helices ist durch Schattierung und Striche hervorgehoben. Die Seitenketten der geladenen Reste sind eingezeichnet. Asp, Glu und das Carboxyende werden als negativ und Lys, Arg und das Aminoende als positiv geladen gerechnet und jeweils für die cytoplasmatische und die periplasmatische Seite zusammengezählt [5, 37].

Sequenzänderungen, der Umgebung und der Assoziation mit anderen Strukturelementen an. Anpassungsfähigkeit und Plastizität (die nicht mit Flexibilität verwechselt werden darf) werden davon bestimmt, daß das Energieminimum für das gesamte Protein- und Lösungsmittelsystem und nicht für seine einzelnen Komponenten erreicht werden muß. Wasser ist ein guter Donor und Acceptor für Wasserstoffbrückenbindungen und daher fähig, an der Oberfläche liegende polare Peptidgruppen fast ebenso gut abzusättigen, wie es intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen vermögen (abgesehen von entropischen Effekten).

Membranproteine stehen mit dem inerten Kohlenwasserstoffteil der Phospholipiddoppelschicht in Verbindung und müssen ihre Wasserstoffbrückenbindungen intramolekular absättigen. Nur zwei Sekundärstrukturen erfüllen diese Bedingungen für die Polypeptidhauptketten, die  $\alpha$ -Helix und das  $\beta$ -Barrel. Für den Zusammenbau von  $\alpha$ -Helices sind Packungsregeln abgeleitet worden, die, wenn auch mit großer Streuung, bestimmte bevorzugte Winkel zwischen den Helixachsen vorhersagen. In ähnlicher Weise folgt die Anordnung der Stränge in  $\beta$ -Faltblättern und  $\beta$ -Barrels bestimmten Regeln<sup>[138]</sup>.

### 5.1. Die Struktur der membrangebundenen Teile des Reaktionszentrums

Das Reaktionszentrum war das erste Membranprotein, dessen Struktur mit atomarer Auflösung bestimmt werden

finden sich nahe den Enden der  $\alpha$ -Helices. Glycinreste stehen am Anfang und Ende fast aller  $\alpha$ -helicalen Abschnitte. Es ist von den löslichen Proteinen her gut bekannt, daß Glycinreste häufig in Turns und den flexiblen Bereichen von Proteinen auftreten<sup>[86]</sup>. Sie mögen für die Insertion in die Membran wichtig sein, indem sie strukturelle Umordnungen ermöglichen. Die Winkel zwischen den Achsen der miteinander in Kontakt stehenden  $\alpha$ -Helices des L- und M-Komplexes betragen 20 bis 30°, ein auch von den  $\alpha$ -Helices der löslichen Proteine bevorzugter Packungswinkelbereich. Es bestehen weitere Gemeinsamkeiten mit internen  $\alpha$ -Helices in großen globulären Proteinen, die auch durch das Fehlen geladener Reste und das bevorzugte Auftreten von Glycin und Prolin an den Enden charakterisiert sind<sup>[140, 141]</sup>. Darüber hinaus finden die D- und E- $\alpha$ -Helices der L- und M-Untereinheiten (Abb. 18) Gegenstücke in den löslichen Proteinen. Sie sind um die lokale zweizählige Achse miteinander verbunden und bilden den Kern des L-M-Bausteins, der das Eisen und das Bakteriochlorophyllpaar  $BC_p$  bindet. Die vier D- und E- $\alpha$ -Helices der L- und M-Untereinheiten sind als Bündel angeordnet, das durch das Eisen-Ion zusammengehalten wird und sich nach der cytoplasmatischen Seite hin öffnet, um das große Spezielle Paar  $BC_p$  aufzunehmen. Dieses Motiv ist in wasserlöslichen Elektronentransportproteinen recht häufig zu finden<sup>[142]</sup>. Ich will diese Betrachtungen später wieder aufnehmen und dann entsprechende Substrukturen löslicher Proteine als Modelle für porenbildende Membranproteine vorstellen.

## 5.2. Die Membraninsertion

Auch für unsere Ansichten über den Mechanismus der Insertion von Proteinen in die Phospholipiddoppelschicht ist die Struktur des Reaktionszentrums wichtig. Das Reaktionszentrum ist aus Bestandteilen zusammengesetzt, die bezüglich der Membran sehr unterschiedlich angeordnet sind. Die C-Untereinheit liegt auf der periplasmatischen Seite. Die H-Untereinheit ist in zwei Teile gefaltet: einen globulären Teil auf der cytoplasmatischen Seite und eine membranüberspannende  $\alpha$ -Helix. Die L- und M-Untereinheiten sind in die Phospholipiddoppelschicht integriert. Folglich muß Cytochrom (die C-Untereinheit) von ihrem intrazellulären Syntheseort aus vollständig durch die Membran befördert werden. Von den H-, L- und M-Untereinheiten sind die membrandurchdringenden  $\alpha$ -Helices in die Doppelschicht eingebettet. Nur der N-terminale Abschnitt von H sowie die auf der periplasmatischen Seite liegenden C-terminalen Teile und die Verbindungsstücke der  $\alpha$ -Helices von L und M (A-B, C-D) müssen durchgeschleust werden.

Es ist interessant festzustellen, daß, wie die Gensequenz zeigt<sup>[89]</sup>, nur das Gen des Cytochroms eine prokaryotische Signalsequenz aufweist. Der Durchtritt der großen hydrophilen C-Untereinheit mag ein kompliziertes Translokationssystem erfordern, das eine Signalsequenz benötigt, während sich H, L und M wohl infolge der Affinität der hydrophoben Segmente zu den Phospholipiden spontan in die Doppelschicht einlagern (Übersicht zu diesem und verwandten Problemen siehe<sup>[143]</sup>). Aber auch beim „einfachen“ Lösen müssen noch jene geladenen Reste durch die Membran geschleust werden, die auf der periplasmatischen Seite liegen<sup>[37, 88]</sup>. Die mit fortschreitendem Eindringen zunehmend günstiger werdende Wechselwirkung zwischen Protein und Lipid mag diesen Prozeß unterstützen. M und L haben beträchtlich mehr geladene Reste auf der cytoplasmatischen (41) als auf der periplasmatischen Seite (24), so daß die rich-

Die H-Untereinheit hat am C-Terminus der die Membran durchdringenden  $\alpha$ -Helix eine stark polare Aminosäuresequenz mit sieben aufeinanderfolgenden geladenen Resten (H 33–H 39)<sup>[37, 87]</sup>, die das Eindringen in die Membran wirkungsvoll verhindern mag. Entsprechend befinden sich drei bis elf geladene Reste in jedem der Verbindungssegmente der  $\alpha$ -Helices auf der cytoplasmatischen Seite der L- und M-Untereinheiten, die wohl den Durchtritt von  $\alpha$ -Helices und  $\alpha$ -helicalen Paaren aufhalten<sup>[144]</sup>. Als Alternative zur sequentiellen Insertion könnten die L- und M-Untereinheiten auch zusammen als Protein-Pigment-Komplexe in die Membran integriert werden, da sie durch Protein-Protein- und Protein-Cofaktor-Wechselwirkungen fest zusammengehalten werden.

## 5.3. Modelle für porenbildende Proteine

Es ist nicht von vornherein klar, ob die am Reaktionszentrum erkannten Strukturprinzipien auch für die  $\alpha$ -helicalen Proteine gelten, die „Poren“ oder „Kanäle“ bilden. Diese Proteine könnten im Prinzip recht komplizierte Strukturen innerhalb der Wasserkanäle annehmen<sup>[145]</sup>. Strukturuntersuchungen bei geringer Auflösung an Gap-Junction-Proteinen<sup>[146]</sup> weisen aber in diesem Fall auf eine einfache hexamere Anordnung der membrandurchdringenden  $\alpha$ -Helices hin, deren polare Seiten zum Wasserkanal gerichtet sind.

Der Befund, daß für lösliche Proteine erhaltene Regeln über Struktur und Anordnung von  $\alpha$ -Helices auch auf das Reaktionszentrum anwendbar sind, ermutigt uns, Modelle für Membranporen-bildende Proteine aus geeigneten Unterstrukturen löslicher Proteine abzuleiten. Ein brauchbares Modell scheint die bei hoher Auflösung im ikosaedrischen Multienzymkomplex Riboflavin-Synthase sichtbare pentahelicale Pore<sup>[147, 148]</sup> (Abb. 19) zu sein. Fünf amphiphile  $\alpha$ -

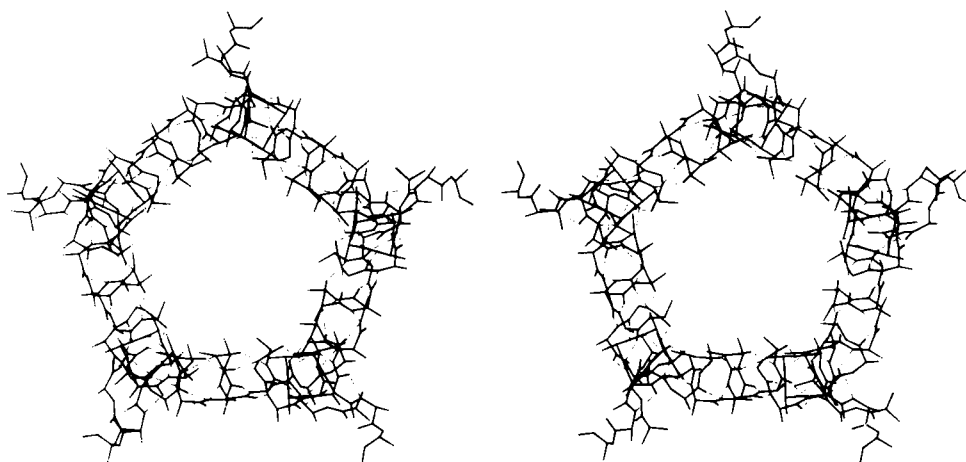


Abb. 19. Stereozzeichnung der pentahelicalen Pore in der Schweren Riboflavin-Synthase [148].

tige Einlagerung eine geringere Aktivierungsenergie erfordert. Die Nettoladungsverteilung des L-M-Komplexes ist unsymmetrisch mit sechs positiven Ladungen auf der cytoplasmatischen und acht negativen Ladungen auf der periplasmatischen Seite. Das intrazelluläre Membranpotential ist negativ, und somit ist die beobachtete Ausrichtung des L-M-Komplexes energetisch bevorzugt (Abb. 18).

Helices aus je 23 Resten liegen nahezu senkrecht zur Oberfläche der Proteinhülle. Diese „coiled coil“-Anordnung der  $\alpha$ -Helices ist rechtshändig gewunden und bildet eine Pore, die vermutlich für den Zufluß der Substrate und den Abfluß der Produkte dient. Die Helices liegen mit ihren apolaren Seiten am zentralen viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt des Proteins, das den Kohlenwasserstoffteil der Phospholipiddoppel-

schicht nachbildet, und richten die geladenen Reste in den Wasserkanal.

Das Modellieren von Membranproteinstrukturen kann auch auf die bakteriellen Porine<sup>[149]</sup> ausgedehnt werden. Sie bilden eine Klasse von Membranproteinen, bei denen  $\beta$ -Strukturen die äußere Membran durchdringen. Die in löslichen Proteinen beobachteten  $\beta$ -Barrels bestehen aus vier bis acht und mehr Strängen. Die untere Grenze wird durch die Verzerrung der regulären Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Eine obere Grenze mag die für stabile Proteindomänen mögliche Größe sein. Ein viersträngiges  $\beta$ -Barrel mit vier parallelen Strängen, stirnseitig verdoppelt mit  $D_4$ -Symmetrie, liegt im Ovomucoid-Octamer vor<sup>[150]</sup>. Die  $\beta$ -Stränge schmiegen sich an den hydrophoben Kern des Moleküls und richten ihre (kurzen) polaren Reste in den Kanal (der hier äußerst eng ist).

## 6. Einige Gedanken zur Zukunft der Proteinkristallographie

Dreißig Jahre nach der Aufklärung der ersten Proteinkristallstrukturen durch *Perutz* und *Kendrew* und nach stetiger Weiterentwicklung erfährt die Proteinkristallographie zur Zeit eine Revolution. Neuere technische und methodische Entwicklungen ermöglichen es, große funktionelle Protein-komplexe wie das Reaktionszentrum von *Rps. viridis*<sup>[37, 151]</sup>, große Virusstrukturen (es seien nur erwähnt<sup>[152–154]</sup>), Protein-DNA-Komplexe (es sei nur hingewiesen auf<sup>[155]</sup>) und Multienzymkomplexe wie Riboflavin-Synthase<sup>[148]</sup> zu studieren.

Die Bedeutung dieser Untersuchungen für das Verständnis der biologischen Funktionen ist ganz offensichtlich und hat das Interesse der wissenschaftlichen Gemeinschaft erregt.

Außerdem wurde erkannt, daß eine detaillierte Strukturinformation eine Vorbedingung für das rationale Design von Arzneimitteln und Proteinen ist. Zur Veranschaulichung wähle ich menschliche Leukocyten-Elastase, ein wichtiges pathogenes Agens. Auf der Grundlage ihrer dreidimensionalen Struktur (Abb. 20)<sup>[156]</sup> und der Kriterien für eine opti-

DNA-Rekombinationstechnik verändert. Andere, ähnlich bedeutende Proteine werden in gleicher Weise untersucht. Diesem Arbeitsgebiet kommen die leicht handhabbare Molekül-Modellier-Software (z. B. FRODO<sup>[157]</sup>) und die Hinterlegungsstelle für Strukturdaten, die Protein Data Bank<sup>[158]</sup>, besonders zugute.

Der Erfolg und die neuen technischen und methodischen Entwicklungen treiben die Proteinkristallographie weiter voran. Diese neuen Entwicklungen sind äußerst bemerkenswert: Flächenzähler zur automatischen Aufzeichnung der Streuintensitäten wurden gebaut. Starke Strahlungsquellen (Synchrotron) sind für schnelle Messungen verfügbar und ermöglichen nun die Verwendung sehr kleiner Kristalle oder strahlungsempfindlichen Materials. Die polychrome Strahlung wird benutzt, um mit Laue-Techniken Beugungsdatensätze innerhalb von Millisekunden zu erhalten<sup>[159]</sup>, und die Abstimbarkeit der Strahlung gestattet den optimalen Einsatz des anomalen Dispersionseffektes<sup>[160, 161]</sup>.

Verfeinerungsmethoden, die die kristallographischen Daten und die Konformationsenergie einbeziehen, liefern verbesserte Proteinmodelle. Es wurden Methoden entwickelt, mit denen sich große Proteinkomplexe durch die Mittelung interner Symmetrien analysieren lassen<sup>[162]</sup>. Diese Methoden führen von verschwommenen zu bemerkenswert klaren Bildern. Die vorherige Kenntnis einer Strukturbeziehung zu einem bekannten Protein kann mit großem Vorteil genutzt werden. Es ist nämlich möglich, eine unbekannte Kristallstruktur mit Hilfe eines bekannten Modells zu lösen, wenn man die von meinem Lehrer *W. Hoppe* entdeckte und benannte „Faltmolekül“-Methode anwendet, die zu einem sehr leistungsfähigen Werkzeug der Proteinkristallographie geworden ist.

Mit diesem letzten Abschnitt möchte ich *W. Hoppe* meine Reverenz erweisen. Er begründete 1957 die Patterson-Suchmethoden mit der Entdeckung, daß die Patterson-Funktion (die Fourier-Transformierte der Streuintensitäten) von Molekulkristallen in Summen intra- und intermolekularer Vektorsätze aufspaltbar ist<sup>[163]</sup>, aus denen Orientierung und Translation der Moleküle erhalten werden können, wenn deren Struktur angenähert bekannt ist (Abb. 21). *Hoppes* Methode wurde sorgfältig ausgearbeitet, der elektronischen

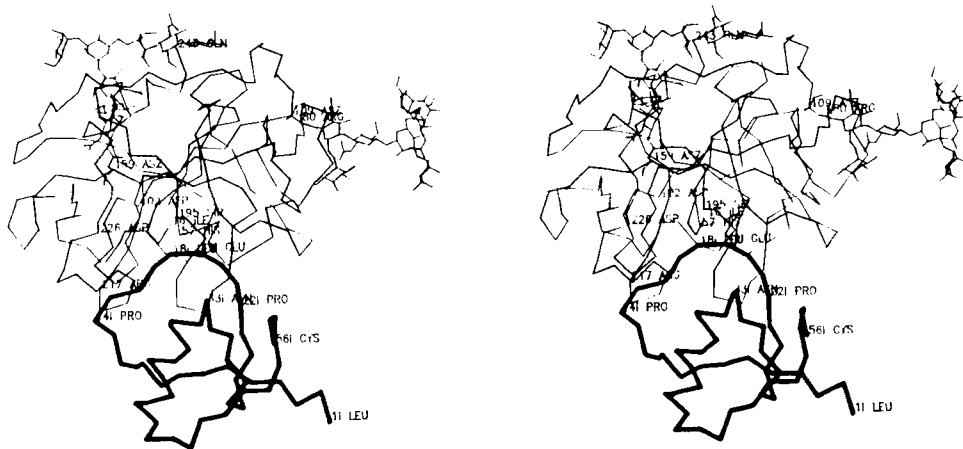


Abb. 20. Stereoeizenzung des Komplexes zwischen menschlicher Leukocyten-Elastase (feiner Strich) und Truthahn-Ovomucoid-Inhibitor (starker Strich) [156].

male stereochemische Anpassung werden nun in vielen wissenschaftlichen und kommerziellen Institutionen wirksame Inhibitoren synthetisiert oder natürliche Inhibitoren durch

Datenverarbeitung angepaßt und neu formuliert<sup>[8, 165, 166]</sup>. Sie ermöglichte einen abgekürzten Weg zur Kristallstruktur des Reaktionszentrums von *Rb. sphaeroides*, die anhand der

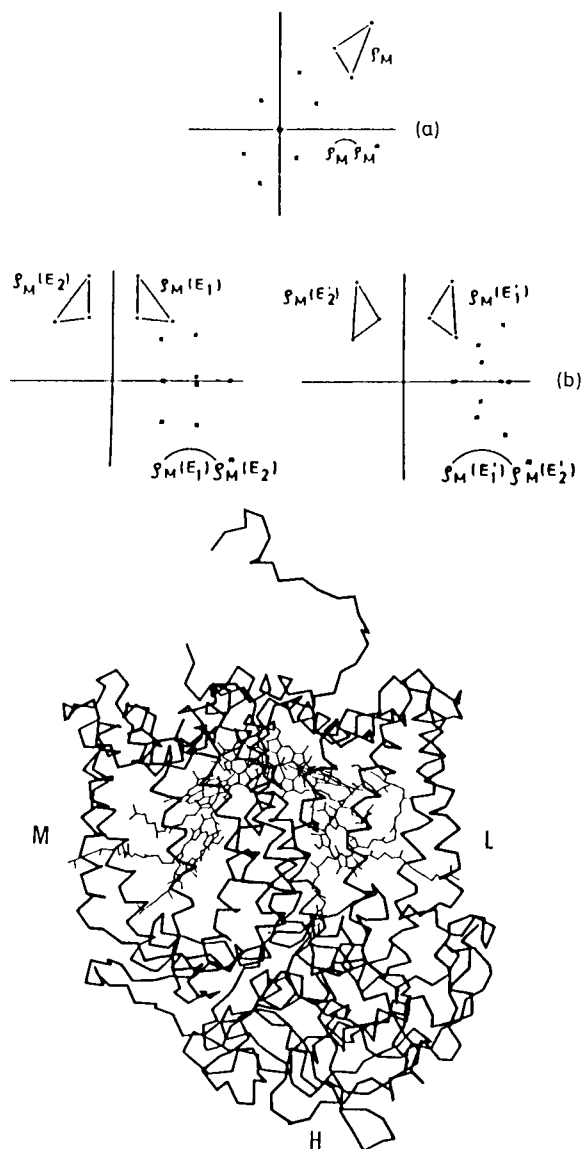


Abb. 21. Faltmolekül-Konstruktion. Oben:  $\rho_M \rho_M^*$  (a) und  $\rho_M(E_1) \rho_M^*(E_2)$  (b) sind die intra- bzw. intermolekularen Vektorsätze einer dreieckigen Struktur  $\rho_M$ . Ihre Summe stellt die Patterson-Funktion dar. Der intramolekulare Vektorsatz kann aus der Molekülstruktur konstruiert werden. Er liegt am Ursprung und ermöglicht die Bestimmung der Orientierung. Aus dem intermolekularen Vektorsatz kann die Translationskomponente bezüglich der Spiegelebene erhalten werden. In (b) werden die intermolekularen Vektorsätze, die zwei verschiedenen Orientierungen von  $\rho_M$  entsprechen, gezeigt [164]. Unten: Zeichnung der Hauptkette der M-, L- und H-Untereinheiten und der Cofaktoren, die als Suchmodell zur Lösung des Phasenproblems bei der Kristallstrukturbestimmung des Reaktionszentrums von *Rh. sphaeroides* diente. In die Rechnung wurden alle homologen Haupt- und Seitenkettenatome einbezogen [6].

Struktur des Reaktionszentrums von *Rps. viridis* und durch anschließende Verfeinerung gelöst wurde<sup>[6, 151]</sup>. Der molekulare Aufbau ist sehr ähnlich, obwohl dem Reaktionszentrum von *Rb. sphaeroides* das ständig gebundene Cytochrom fehlt. Die Strukturlösung wurde mit ähnlichen Methoden unabhängig bestätigt<sup>[7]</sup>. Mit der Faltmolekül-Methode lassen sich Orientierung und Lage eines Moleküls in der Einheitszelle bestimmen. Die genaue Molekülstruktur und ihre Abweichungen vom Vergleichsmodell müssen durch kristallographische Verfeinerung erarbeitet werden. Dazu haben in meiner Arbeitsgruppe *W. Steigemann* und *J. Deisenhofer* (in seiner Dissertation) eine Grundlage geschaffen<sup>[167, 168]</sup>.

Kürzlich haben NMR-Techniken (Kernmagnetische Resonanz) ihre Fähigkeit zur Bestimmung der Struktur kleiner

Proteine in Lösung erwiesen. In einem Fall hat ein genauer Vergleich der Strukturen im Kristall und in Lösung eine sehr gute Übereinstimmung gezeigt<sup>[169, 170]</sup>; es sind aber noch weitere Entwicklungen nötig, um die Methoden auch auf größere Moleküle anwenden zu können.

Die Proteinkristallographie ist das einzige Werkzeug zur detaillierten Aufklärung des Aufbaus der hier beschriebenen großen Proteinkomplexe und wird auch auf absehbare Zeit die einzige experimentelle Methode bleiben, die Atom-Atom- und Molekül-Molekül-Wechselwirkungen in atomarer Auflösung beschreiben kann. Sie ist die erfolgreiche analytische Methode, die *Emil Fischer* 1907 in seiner 9. Faraday Lecture ansprach, als er ausführte: „... the precise nature of the assimilation process ... will only be accomplished when biological research, aided by improved analytical methods, has succeeded in following the changes which take place in the actual chlorophyll granules.“<sup>[171]</sup>. Allerdings bleibt als ein letztes Ziel, das wir alle zu erreichen trachten, noch die Lösung des Faltungsproblems. Die wachsende Zahl bekannter Proteinstrukturen, die Herstellung von Proteinen mit Einzelrestaustausch durch DNA-Rekombinationstechnik und die Analyse dieser Produkte durch Proteinkristallographie haben uns diesem Ziel näher gebracht. Wir können den Beitrag bestimmter Reste zu Faltungsgeschwindigkeit, Struktur, Stabilität und Funktion untersuchen. Auch die theoretische Analyse der Proteinstrukturen ist vorangekommen (es seien nur *Levitt* und *Sharon* genannt<sup>[172]</sup>), doch ein Schlüssel für den Zusammenhang zwischen Sequenz und räumlicher Struktur ist nicht in Sicht<sup>[173]</sup>. Wie *Carl von Linné*, der vor 250 Jahren ein System der Pflanzen auf der Grundlage der Morphologie schuf (*Genera plantarum*, Leiden 1737), klassifizieren wir die Proteine nach ihrer Form und Struktur. Ob das zu einer Lösung des Faltungsproblems führen wird, ist nicht klar, aber es ist gewiß, daß das Ende der Proteinkristallographie nur durch sie selbst kommen wird.

## Danksagung

*J. Deisenhofers* und mein Interesse an Strukturuntersuchungen am photosynthetischen Reaktionszentrum von *Rps. viridis* wurde 1980 durch die Errichtung der Abteilung Oesterheld in Martinsried geweckt. *D. Oesterheld* brachte *H. Michel* mit, mit dem eine fruchtbare Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Kristallstruktur dieses großen Proteinkomplexes begann. Später waren auch andere Angehörige meiner Arbeitsgruppe, *O. Epp* und *K. Miki*, beteiligt. Wir hatten Enzyme, Proteasen und ihre natürlichen Inhibitoren sowie Immunglobuline untersucht und Methoden zur Verbesserung der Datensammlung, der Interpretation der Elektronendichtekarten und der kristallographischen Verfeinerung entwickelt. So waren die Werkzeuge bereit, um die Struktur des Reaktionszentrums zu lösen; es war damals und ist auch noch heute das größte unsymmetrische Protein, dessen Struktur bei atomarer Auflösung ermittelt wurde.

Der Augenblick des „heureka“ steht bei der Proteinkristallographie ganz am Ende, wenn man mit den Augen eines Entdeckers unbekannter Länder zum ersten Male ein neues Makromolekül sieht. Doch bis zu diesem Augenblick muß viel und zuweilen ermüdende Arbeit geleistet werden, und stets besteht die Möglichkeit eines Fehlschlages. Zutiefst dankbar bin ich meinen jetzigen und früheren Mitarbeitern

für ihre hingebungsvolle und beharrliche Arbeit über viele Jahre hin. Ich nenne hier jene, die an den Untersuchungen der lichtsammelnden Proteine der Cyanobakterien und der Blauen Oxidasen beteiligt waren: W. Bode, M. Düring, R. Ladenstein, A. Messerschmidt und T. Schirmer. Diese Projekte wurden gemeinsam mit Biochemikern aus der Schweiz (H. Zuber, W. Sidler), den USA (M. L. Hackert) und Italien (M. Bolognesi, A. Marchesini, A. Finazzi-Agro) durchgeführt.

Wissenschaftliche Arbeit bedarf eines anregenden Umfeldes, wie es vom Max-Planck-Institut für Biochemie zur Verfügung gestellt wurde, und sie bedarf ständiger finanzieller Unterstützung, die der Max-Planck-Gesellschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu verdanken ist.

Ich danke R. Engh, S. Knof, R. Ladenstein, M. Düring und E. Meyer für ihre hilfreichen Anmerkungen zu dieser Arbeit.

Eingegangen am 13. Januar 1989 [A 724]  
Übersetzt von Dr. Siegwald Knof, Martinsried

- [1] L. Boltzmann, Vortrag, gehalten in der feierlichen Sitzung der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften am 29. Mai 1886, in L. Boltzmann-Gesamtausgabe, Bd. 7, Akademische Druck- und Verlagsanstalt Vieweg, Wiesbaden 1919, S. 26–46.
- [2] M. Calvin, J. A. Bassham: *The Photosynthesis of Carbon Compounds*, Benjamin, New York 1962, S. 1–127.
- [3] J. Deisenhofer, H. Michel, R. Huber, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 10 (1985) 243–248.
- [4] J. Deisenhofer, R. Huber, H. Michel, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 34 (1986) 416–422.
- [5] J. Deisenhofer, R. Huber, H. Michel in G. D. Fasman (Hrsg.): *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Plenum, New York 1989, im Druck.
- [6] J. P. Allen, G. Feher, T. O. Yeates, D. C. Rees, J. Deisenhofer, H. Michel, R. Huber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 8589–8593.
- [7] C.-H. Chang, D. Tiede, J. Tang, U. Smith, J. Norris, M. Schiffer, *FEBS Lett.* 205 (1986) 82–86.
- [8] R. A. Crowther, D. M. Blow, *Acta Crystallogr.* 23 (1967) 544–548.
- [9] D. E. Tronrud, M. F. Schmid, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 443–454.
- [10] M. Pierrot, R. Haser, M. Frey, F. Payan, J.-P. Astier, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 14341–14348.
- [11] Y. Higuchi, M. Kusunoki, Y. Matsura, N. Yasuoka, M. Kakudo, *J. Mol. Biol.* 172 (1984) 109–139.
- [12] W. S. Bennet, R. Huber, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 15 (1984) 291–384.
- [13] R. Huber, *Angew. Chem.* 100 (1988) 79–89; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 79–88.
- [14] M. Karplus, J. A. McCammon, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 9 (1981) 293–349.
- [15] U. Burkert, N. L. Allinger: *Molecular Mechanics*, American Chemical Society Monograph, Washington 1982.
- [16] a) T. Förster, *Ann. Phys. (Leipzig)* 2 (1948) 55–75; b) T. Förster in M. Florkin, E. H. Stotz (Hrsg.): *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 22, Elsevier, Amsterdam 1967, S. 61–80.
- [17] H. Kuhn, *J. Chem. Phys.* 53 (1970) 101–108.
- [18] P. Frommherz, G. Reinbold, *Thin Solid Films* 160 (1988) 347–353.
- [19] S. L. Mayo, W. R. Ellis, R. J. Crutchley, H. B. Gray, *Science (Washington, DC)* 233 (1986) 948–952.
- [20] H. B. Gray, *Chem. Soc. Rev.* 15 (1986) 17–30.
- [21] J. L. McGoutry, S. E. Peterson-Kennedy, W. Y. Ruo, B. M. Hoffman, *Biochemistry* 26 (1987) 8302–8312.
- [22] H. Taube, E. S. Gould, *Acc. Chem. Res.* 2 (1969) 321–329.
- [23] J. J. Hopfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3640–3644.
- [24] W. A. Cramer, A. R. Crofts: *Electron and Proton Transport in Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*, Vol. 1, Academic Press, New York 1982, S. 387.
- [25] L. Ebersson, *Adv. Phys. Org. Chem.* 18 (1982) 79–185.
- [26] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* 811 (1985) 265–322.
- [27] K. V. Mikkelsen, M. A. Ratner, *Chem. Rev.* 87 (1987) 113–153.
- [28] P. Kebarle, S. Chowdhury, *Chem. Rev.* 87 (1987) 513–534.
- [29] G. McLendon, *Acc. Chem. Res.* 21 (1988) 160–167.
- [30] D. Gust, T. A. Moore, P. A. Lidell, G. A. Nemeth, L. R. Makings, A. L. Moore, D. Barrett, P. J. Pessiki, R. V. Bensasson, M. Rougée, C. Chachaty, F. C. De Schryver, M. Van der Anwaer, A. R. Holzwarth, J. S. Connolly, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 846–856.
- [31] J. A. Schmidt, A. R. McIntosh, A. C. Weedon, J. R. Bolton, J. S. Connolly, J. K. Hurley, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1733–1740.
- [32] S. Isied, A. Vassilian, R. Magnuson, H. Schwarz, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 7432–7438.
- [33] J. A. Barltrop, J. D. Coyle: *Principles of Photochemistry*, Wiley, Chichester 1978.
- [34] A. Hains, *Acc. Chem. Res.* 8 (1975) 264–272.
- [35] J. Barber, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 12 (1987) 321–326.
- [36] R. C. Prince, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 13 (1988) 286–288.
- [37] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *Nature (London)* 318 (1985) 618–624.
- [38] R. Lumry, H. Eyring, *J. Phys. Chem.* 58 (1954) 110–112.
- [39] H. B. Gray, B. G. Malmström, *Comments Inorg. Chem.* 2 (1983) 203–209.
- [40] C. Scharnagl, E. Köst-Reyes, S. Schneider, H.-P. Köst, H. Scheer, *Z. Naturforsch. C* 38 (1983) 951–959.
- [41] R. Huber, M. Schneider, O. Epp, I. Mayr, A. Messerschmidt, J. Pflug-rath, H. Kayser, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 423–434.
- [42] R. Huber, M. Schneider, I. Mayr, R. Müller, R. Deutzmann, F. Suter, H. Zuber, H. Falk, H. Kayser, *J. Mol. Biol.* 198 (1987) 499–513.
- [43] H. Michel, K. A. Weyer, H. Gruenberg, I. Dunger, D. Oesterhelt, F. Lottspeich, *EMBO J.* 5 (1986) 1149–1158.
- [44] T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 196 (1987) 677–695.
- [45] T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, W. Sidler, H. Zuber, *J. Mol. Biol.* 184 (1985) 257–277.
- [46] T. Schirmer, R. Huber, M. Schneider, W. Bode, M. Miller, M. L. Hackert, *J. Mol. Biol.* 188 (1986) 651–676.
- [47] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *J. Mol. Biol.* 180 (1984) 385–398.
- [48] W. W. Parson, A. Scherz, A. Warshel in M. E. Michel-Beyerle (Hrsg.): *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria*, Springer, Berlin 1985, S. 122–130.
- [49] E. W. Knapp, S. F. Fischer, W. Zinth, M. Sander, W. Kaiser, J. Deisenhofer, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 8463–8467.
- [50] A. Messerschmidt, A. Rossi, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, G. Gatti, A. Marchesini, T. Petruzzelli, A. Finazzi-Agro, *J. Mol. Biol.* 206 (1989) 513–530.
- [51] H. B. Gray, E. I. Solomon in T. G. Spiro (Hrsg.): *Copper Proteins*, Wiley, New York 1981, S. 1–39.
- [52] D. F. Blair, G. W. Campbell, J. R. Schoonover, S. I. Chan, H. B. Gray, B. G. Malmström, I. Pecht, B. F. Swanson, W. H. Woodneff, W. K. Cho, A. R. English, A. H. Fry, V. Lum, K. A. Norton, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5755–5766.
- [53] R. MacColl, D. Guard-Friar: *Phycobiliproteins*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1987, S. 157–173.
- [54] M. Nies, W. Wehrmeyer, *Arch. Microbiol.* 129 (1981) 374–379.
- [55] E. Mörschel, K.-P. Koller, W. Wehrmeyer, H. Schneider, *Cytobiologie* 16 (1977) 118–129.
- [56] D. A. Bryant, G. Guglielmi, N. Tandeau de Marsac, A.-M. Castets, G. Cohen-Bazire, *Arch. Microbiol.* 123 (1979) 113–127.
- [57] E. Gantt, C. A. Lipschultz, B. Zilinskas, *Biochim. Biophys. Acta* 430 (1976) 375–388.
- [58] H. Scheer in F. K. Fong (Hrsg.): *Light Reaction Path of Photosynthesis*, Springer, Berlin 1982, S. 7–45.
- [59] G. Cohen-Bazire, D. A. Bryant in N. G. Carr, B. Whitton (Hrsg.): *The Biology of Cyanobacteria*, Blackwell, London 1982, S. 143–189.
- [60] A. N. Glazer, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 14 (1985) 47–77.
- [61] B. A. Zilinskas, L. S. Greenwald, *Photosynth. Res.* 10 (1986) 7–35.
- [62] H. Zuber, *Photochem. Photobiol.* 42 (1985) 821–844.
- [63] H. Zuber, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 11 (1986) 414–419.
- [64] a) M. Duerring, W. Bode, R. Huber, *FEBS Lett.* 236 (1988) 167–170; b) M. Duerring, *Dissertation*, Technische Universität München 1989.
- [65] M. Duerring, W. Bode, R. Huber, R. Rumbeli, H. Zuber, in Vorbereitung.
- [66] G. Frank, W. Sidler, H. Widmer, H. Zuber, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359 (1978) 1491–1507.
- [67] A. N. Glazer, S. Fang, D. M. Brown, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 5679–5685.
- [68] M. Mimuro, P. Flüglistaller, R. Rumbeli, H. Zuber, *Biochim. Biophys. Acta* 848 (1986) 155–166.
- [69] D. J. Lundell, R. C. Williams, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 3580–3592.
- [70] F. W. J. Teale, R. E. Dale, *Biochem. J.* 116 (1970) 161–169.
- [71] B. Zickendraht-Wendelstadt, J. Friedrich, W. Rüdiger, *Photochem. Photobiol.* 31 (1980) 367–376.
- [72] P. Hefflerle, M. Nies, W. Wehrmeyer, S. Schneider, *Photobiophys. Photochem.* 5 (1983) 41–51.
- [73] T. Gillbro, Å. Sandström, V. Sundström, J. Wendler, A. R. Holzwarth, *Biochim. Biophys. Acta* 808 (1985) 52–65.
- [74] S. Siebzehrnühl, R. Fischer, H. Scheer, *Z. Naturforsch. C* 42 (1987) 258–262.
- [75] T. Schirmer, M. G. Vincent, *Biochim. Biophys. Acta* 893 (1987) 379–385.
- [76] G. Porter, C. J. Tredwell, G. F. W. Searle, J. Barber, *Biochim. Biophys. Acta* 501 (1978) 232–245.
- [77] G. F. W. Searle, J. Barber, G. Porter, C. J. Tredwell, *Biochim. Biophys. Acta* 501 (1978) 246–256.
- [78] J. Wendler, A. R. Holzwarth, W. Wehrmeyer, *Biochim. Biophys. Acta* 765 (1984) 58–67.

- [79] I. Yamazaki, M. Mimuro, T. Murao, T. Yamazaki, K. Yoshihara, Y. Fujita, *Photochem. Photobiol.* 39 (1984) 233–240.
- [80] A. R. Holzwarth, *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 707–725.
- [81] J. Grabowski, E. Gantt, *Photochem. Photobiol.* 28 (1978) 39–45.
- [82] S. C. Switalski, J. Sauer, *Photochem. Photobiol.* 40 (1984) 423–427.
- [83] A. R. Holzwarth in M. E. Michel-Beyerle (Hrsg.): *Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria*, Springer, Berlin 1985, S. 45–52.
- [84] K. Sauer, H. Scheer, P. Sauer, *Photochem. Photobiol.* 46 (1987) 427–440.
- [85] W. W. Parson in R. K. Clayton, W. R. Sistrom (Hrsg.): *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum, New York 1978, S. 317–322.
- [86] N. Stark, W. Kuhlbrandt, I. Wildhaber, E. Wehrli, K. Mühlethaler, *EMBO J.* 3 (1984) 777–783.
- [87] H. Michel, K. A. Weyer, H. Gruenberg, F. Lottspeich, *EMBO J.* 4 (1985) 1667–1672.
- [88] H. Michel, O. Epp, J. Deisenhofer, *EMBO J.* 5 (1986) 2445–2451.
- [89] K. A. Weyer, F. Lottspeich, H. Gruenberg, F. Lang, D. Oesterheld, H. Michel, *EMBO J.* 6 (1987) 2197–2202.
- [90] R. J. Cogdell, A. R. Crofts, *FEBS Lett.* 27 (1972) 176–178.
- [91] R. P. Carithers, W. W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta* 387 (1975) 194–211.
- [92] R. C. Prince, J. S. Leigh, P. L. Dutton, *Biochim. Biophys. Acta* 440 (1976) 622–636.
- [93] T. L. Netzel, P. M. Rentzepis, D. M. Tiede, R. C. Prince, P. L. Dutton, *Biochim. Biophys. Acta* 460 (1977) 467–479.
- [94] J. R. Bolton in R. K. Clayton, W. R. Sistrom (Hrsg.): *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum, New York 1978, S. 419–442.
- [95] D. Holten, M. W. Windsor, W. W. Parson, J. P. Thornber, *Biochim. Biophys. Acta* 501 (1978) 112–126.
- [96] N. W. Woodbury, M. Becker, D. Middendorf, W. W. Parson, *Biochemistry* 24 (1985) 7516–7521.
- [97] J. Breton, *Biochim. Biophys. Acta* 810 (1985) 235–245.
- [98] J. Breton, D. L. Farkas, W. W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta* 808 (1985) 421–427.
- [99] J. Breton, J.-L. Martin, A. Migus, A. Antonetti, A. Orszag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 5121–5125.
- [100] G. J. Kavarnos, N. J. Turro, *Chem. Rev.* 86 (1986) 401–449.
- [101] G. R. Fleming, J. L. Marti, J. Breton, *Nature (London)* 333 (1988) 190–192.
- [102] J. Barber, *Nature (London)* 333 (1988) 114.
- [103] P. Pasman, F. Rob, J. W. Verhoeven, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5127–5133.
- [104] T. A. Moore, D. Gust, P. Mathis, J.-C. Bialocq, C. Chachaty, R. V. Bensasson, E. J. Land, D. Doizi, P. A. Liddell, W. R. Lehman, G. A. Nemeth, A. L. Moore, *Nature (London)* 307 (1984) 630–632.
- [105] W. Arnold, R. D. Clayton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46 (1960) 769–776.
- [106] W. W. Parson, *Annu. Rev. Microbiol.* 28 (1974) 41–59.
- [107] W. W. Parson, R. J. Cogdell, *Biochim. Biophys. Acta* 416 (1975) 105–149.
- [108] a) C. Kirmaier, D. Holten, W. W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta* 810 (1985) 33–48; b) *ibid.* 810 (1985) 49–61.
- [109] C. A. Wraight in B. L. Trumpower (Hrsg.): *Function of Quinones in Energy Conserving Systems*, Academic Press, London 1982, S. 181–197.
- [110] D. Kleinfeld, M. Y. Okamura, G. Feher, *Biochim. Biophys. Acta* 809 (1985) 291–310.
- [111] R. J. Debus, G. Feher, M. Y. Okamura, *Biochemistry* 25 (1986) 2276–2287.
- [112] P. L. Dutton, R. C. Prince in R. K. Clayton, W. R. Sistrom (Hrsg.): *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum, New York 1978, S. 525–565.
- [113] D. DeVault, B. Chance, *Biophys. J.* 6 (1966) 825–847.
- [114] L. Slooten, *Biochim. Biophys. Acta* 256 (1972) 452–466.
- [115] M. E. Michel-Beyerle, M. Plato, J. Deisenhofer, H. Michel, M. Bixon, J. Jortner, *Biochim. Biophys. Acta* 932 (1988) 52–70.
- [116] B. G. Malmström: *New Trends in Bio-inorganic Chemistry*, Academic Press, New York 1978, S. 59–77.
- [117] B. G. Malmström, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 21–59.
- [118] O. Farver, I. Pecht in R. Lontie (Hrsg.): *Copper Proteins and Copper Enzymes, Vol. 1*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984, S. 183–214.
- [119] B. Reinhammar in R. Lontie (Hrsg.): *Copper Proteins and Copper Enzymes, Vol. 3*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984, S. 1–35.
- [120] B. Mondovi, L. Avigliano in R. Lontie (Hrsg.): *Copper Proteins and Copper Enzymes, Vol. 3*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984, S. 101–118.
- [121] L. Rydén in R. Lontie (Hrsg.): *Copper Proteins and Copper Enzymes, Vol. 3*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1984, S. 34–100.
- [122] R. Malkin, B. G. Malmström, *Adv. Enzymol.* 33 (1970) 177–243.
- [123] J. M. Guss, H. C. Freeman, *J. Mol. Biol.* 169 (1983) 521–563.
- [124] J. S. Richardson, K. A. Thomas, B. H. Rubin, D. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 1349–1353.
- [125] W. P. J. Gaykema, W. G. J. Hol, J. M. Verijken, N. M. Soeter, H. J. Bak, J. J. Beintema, *Nature (London)* 309 (1984) 23–29.
- [126] C. R. Dawson in J. Peisach, P. Aison, W. E. Blumberg (Hrsg.): *The Biochemistry of Copper*, Academic Press, New York 1966, S. 305–337.
- [127] B. Gerwin, S. R. Burstein, J. Westley, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 2005–2008.
- [128] L. Holm, M. Sarastre, M. Wikström, *EMBO J.* 6 (1987) 2819–2823.
- [129] G. T. Babcock in J. Ames (Hrsg.): *Oxygen-evolving Process in Photosynthesis*, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [130] E. M. Newcomer, T. A. Jones, J. Åqvist, J. Sundelin, U. Eriksson, I. Rask, P. A. Peterson, *EMBO J.* 3 (1984) 1451–1454.
- [131] R. Huber in P. Gronschi, F. R. Seiler (Hrsg.): *Behring-Institut Mitteilungen, Vol. 76*, Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg 1984, S. 1–14.
- [132] A. Trebst, *Z. Naturforsch. C41* (1986) 240–245.
- [133] H. Michel, J. Deisenhofer, *Biochemistry* 27 (1988) 1–7.
- [134] A. M. Lesk, K. D. Hardman, *Science (Washington, D.C.)* 216 (1982) 539–540.
- [135] J. Ohkawa, N. Okada, A. Shinmyo, M. Takano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988), eingereicht.
- [136] U. A. Germann, G. Müller, P. E. Hunziker, K. Lerch, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 885–896.
- [137] N. Takahashi, T. L. Ortel, F. W. Putnam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 390–394.
- [138] C. Chothia, *Annu. Rev. Biochem.* 53 (1984) 537–572.
- [139] R. Henderson, P. N. T. Unwin, *Nature (London)* 257 (1975) 28–32.
- [140] H. Loebermann, R. Tokuko, J. Deisenhofer, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 177 (1984) 531–556.
- [141] S. Remington, G. Wiegand, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 158 (1982) 111–152.
- [142] P. C. Weber, F. R. Salemme, *Nature (London)* 287 (1980) 82–84.
- [143] T. A. Rapoport, *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20 (1986) 73–137.
- [144] D. M. Engelman, T. A. Steitz, A. Goldman, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 15 (1986) 321–353.
- [145] H. F. Lodish, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 13 (1988) 332–334.
- [146] L. C. Milks, N. M. Kumar, R. Houghten, N. Unwin, N. B. Gilula, *EMBO J.* 7 (1988) 2967–2975.
- [147] G. D. Case, W. W. Parson, J. P. Thornber, *Biochim. Biophys. Acta* 223 (1970) 122–128.
- [148] R. Ladenstein, M. Schneider, R. Huber, H.-D. Bartunik, K. Wilson, K. Schott, A. Bacher, *J. Mol. Biol.* 203 (1988) 1045–1070.
- [149] B. Kleffell, R. M. Garavito, N. Baumeister, J. P. Rosenbusch, *EMBO J.* 4 (1985) 1589–1592.
- [150] E. Weber, E. Papamokos, W. Bode, R. Huber, F. Kato, M. Laskowski, *J. Mol. Biol.* 149 (1981) 109–123.
- [151] J. P. Allen, G. Feher, T. O. Yeates, H. Kemiya, D. C. Rees, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 6162–6166.
- [152] S. C. Harrison, A. J. Olson, C. E. Schutt, F. K. Winkler, G. Bricogne, *Nature (London)* 276 (1978) 368–373.
- [153] M. G. Rossmann, E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankenberger, J. P. Griffith, H.-J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser, R. R. Rueckert, B. Sherry, G. Vriend, *Nature (London)* 317 (1985) 145–153.
- [154] J. M. Hogle, M. Chow, D. J. Filman, *Science (Washington, D.C.)* 229 (1985) 1358–1365.
- [155] D. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, T. A. Steitz, *Nature (London)* 313 (1985) 762–766.
- [156] W. Bode, A. Wei, R. Huber, E. Meyer, P. Travis, S. Neumann, *EMBO J.* 5 (1986) 2453–2458.
- [157] A. T. Jones, *J. Appl. Crystallogr.* 11 (1978) 268–272.
- [158] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimonouchi, M. Tasumi, *J. Mol. Biol.* 112 (1977) 535–542.
- [159] J. Hajdu, K. R. Acharya, D. A. Stuart, D. Barford, L. Johnson, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* 13 (1988) 104–109.
- [160] W. A. Hendrickson, J. L. Smith, R. P. Phizackerly, E. A. Merritt, *Proteins* 4 (1988) 77–88.
- [161] J. M. Guss, E. A. Merritt, R. P. Phizackerly, B. Hedman, M. Murata, K. O. Hodgson, H. C. Freeman, *Science (Washington, D.C.)* 241 (1988) 806–811.
- [162] G. Bricogne, *Acta Crystallogr. Sect. A* 32 (1976) 832–847.
- [163] W. Hoppe, *Acta Crystallogr.* 10 (1957) 750–751.
- [164] R. Huber in P. Machin (Hrsg.): *Molecular Replacement*, Proceedings of the Daresbury Study Weekend, Daresbury Laboratory 1985, S. 58–61.
- [165] M. G. Rossmann, D. M. Blow, *Acta Crystallogr.* 15 (1962) 24–31.
- [166] R. Huber, *Acta Crystallogr.* 19 (1965) 353–356.
- [167] R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, J. Deisenhofer, W. Steigemann, *J. Mol. Biol.* 89 (1974) 70–101.
- [168] J. Deisenhofer, W. Steigemann, *Acta Crystallogr. Sect. B* 31 (1975) 238–280.
- [169] A. D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 377–382.
- [170] J. W. Pflugrath, G. Wiegand, R. Huber, L. Vertesy, *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 383–386.
- [171] E. Fischer, *J. Chem. Soc.* 91 (1907) 1749–1765.
- [172] M. Levitt, R. Sharon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 7557–7561.
- [173] R. Jaenicke in E.-L. Winnacker, R. Huber (Hrsg.): *39. Mosbacher Kolloquium*, Springer, Berlin 1988, S. 16–36.