

Das photosynthetische Reaktionszentrum des Purpurbakteriums *Rhodopseudomonas viridis* (Nobel-Vortrag) **

Von Johann Deisenhofer * und Hartmut Michel *

In unseren Vorträgen beschreiben wir zunächst die Geschichte und die Methoden der Kristallisation von Membranproteinen. Dann zeigen wir, wie die Struktur des photosynthetischen Reaktionszentrums aus dem Purpurbakterium *Rhodopseudomonas viridis* bestimmt wurde. Danach wird die Struktur dieses Membranprotein-Komplexes mit seiner Funktion als lichtgetriebene Elektronenpumpe über die photosynthetische Membran korreliert. Schließlich ziehen wir Rückschlüsse auf die Struktur des Reaktionszentrums des Photosystems II der Pflanze und diskutieren die spezifischen Gesichtspunkte der Membranprotein-Struktur. Die Abschnitte 1 (Kristallisation), 4 (Verwandtschaft mit dem Photosystem II und evolutionäre Aspekte) und 5 (Membranprotein-Struktur) wurden von H. M. im Vortrag präsentiert und verfaßt, die Abschnitte 2 (Strukturaufklärung) und 3 (Struktur und Funktion) von J. D. Wir wählen diese Anordnung, um dem Leser das Verständnis des Zusammenhangs zu erleichtern.

1. Kristallisation

1.1. Hintergründe

Wie so häufig bei neuen wissenschaftlichen Entwicklungen und technischen Erfindungen war es eine zufällige Beobachtung, die den Anstoß für die Experimente gab, die schließlich zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines photosynthetischen Reaktionszentrums führten: Im August 1978 beobachtete ich, daß lipidfreies Bakteriorhodopsin, nach der von Hoppe und Overath^[1] 1976 beschriebenen Methode hergestellt, bei Aufbewahrung im Tiefkühlschrank feste, vermutlich glasähnliche Aggregate bildete. Diese Aggregate werden in Abbildung 1A gezeigt. Von da an war ich überzeugt, daß es möglich sein sollte, nicht nur diese Festkörper, sondern auch dreidimensionale Kristalle herzustellen.

Die Verfügbarkeit wohlgeordneter dreidimensionaler Kristalle ist Voraussetzung für eine hochauflösende Röntgenstrukturanalyse. Sie war und ist noch immer – trotz der Fortschritte, die Henderson und Unwin^[2] 1975 durch Elektronenmikroskopie und Elektronenbeugung am Beispiel des Bakteriorhodopsins erzielten – die einzige Methode, um detaillierte Kenntnisse über die Struktur von großen biologischen Makromolekülen zu erhalten.

Zu dieser Zeit arbeitete ich an der Universität Würzburg als „post doc“ im Labor von Dieter Oesterhelt, der 1971 in Zusammenarbeit mit Walter Stoeckenius Bakteriorhodopsin entdeckt^[3] und 1972 vorgeschlagen hatte, daß Bakteriorhodopsin eine lichtgetriebene Protonenpumpe ist^[4]. Meine Absicht, wohlgeordnete dreidimensionale Kristalle des Bak-

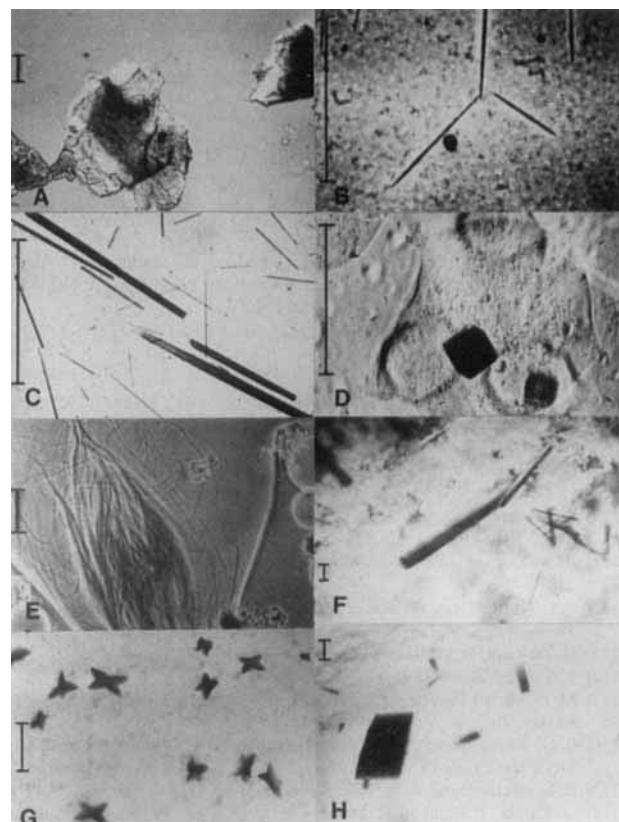


Abb. 1. Kristalle und Aggregate von Bakteriorhodopsin und dem photosynthetischen Reaktionszentrum aus *Rhodopseudomonas viridis*. A) „Glasähnliche“ Aggregate von Bakteriorhodopsin, wie sie bei Einfrieren von lipidfreiem Bakteriorhodopsin entstehen; B) aufgerollte Membran der zweidimensional-kristallinen orthorhombischen Form der Purpumembran (aus Michel et al. [7]); C) nadelähnliche Kristalle von Bakteriorhodopsin; Fällungsmittel: Natriumphosphat; D) würfelförmige Kristalle von Bakteriorhodopsin; Fällungsmittel: Ammoniumsulfat; E) filamentöse Aggregate von Bakteriorhodopsin und einige Würfel (Pfeile), Fällungsmittel: Ammoniumsulfat (aus Michel [4a]); F) hexagonale Säulen von Bakteriorhodopsin; Fällungsmittel: Ammoniumsulfat in Gegenwart von 3% Heptan-1,2,3-triol; G) innerhalb von zwei Tagen erhaltene sternförmige Kristalle des Reaktionszentrums; Ausgangsbedingungen: 1 mg Protein mL^{-1} , 3% Heptan-1,2,3-triol, 1.5 M Ammoniumsulfat. Dampfdiffusion gegen 3 M Ammoniumsulfat (aus Michel [4b]); H) innerhalb von drei Wochen erhaltene tetragonale Kristalle des Reaktionszentrums (Ausgangsbedingungen wie bei G), aber Dampfdiffusion gegen 2.4 M Ammoniumsulfat (aus Michel [4b]). Auf allen Photographien entspricht der eingezeichnete Balken 0.1 mm.

[*] Prof. Dr. J. Deisenhofer

Howard Hughes Medical Institute und Department of Biochemistry
University of Texas Southwestern Medical Center
5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75235 (USA)

Prof. Dr. H. Michel
Max-Planck-Institut für Biophysik
Heinrich-Hoffmann-Straße 7, D-6000 Frankfurt am Main 71

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

teriorhodopsins herzustellen, fand seine sofortige Unterstützung. Es stellte sich heraus, daß er bereits versucht hatte, modifiziertes Bakteriorhodopsin aus organischen Lösungsmitteln zu kristallisieren.

Bakteriorhodopsin, die Proteinkomponente der sogenannten Purpurnembran, ähnelt dem Sehpigment Rhodopsin und wirkt als Lichtenergiewandler. Es ist Teil eines einfachen „photosynthetischen“ Systems in Halobakterien. Bakteriorhodopsin ist ein integrales Membranprotein, das in der Purpurnembran zweidimensionale Kristalle bildet. Damals hielt man es allgemein für unmöglich, Membranproteine zu kristallisieren. Es gab, mit Ausnahme von Bakteriorhodopsin, keine Informationen über die dreidimensionale Struktur von Membranproteinen, die hätte helfen können, ihre vielfältigen Funktionen, z. B. als Carrier, Energieumwandler, Rezeptoren oder Kanäle, zu verstehen.

Als erstes versuchten wir, die negative Oberflächenladung der Purpurnembran durch Zugabe langketiger Amine zu verringern und durch Zusatz von etwas Triton X100, einem Detergens, eine Umordnung der Moleküle des durch das Detergens teilweise solubilisierten Bakteriorhodopsins zu erreichen. Dieses Vorgehen könnte ein Weg sein, die unten (siehe Abb. 3) beschriebenen Kristalle des Typs I zu gewinnen. Innerhalb von vier Wochen erhielten wir die in Abbildung 1 B gezeigten „Nadeln“. Elektronenmikroskopische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit *Richard Henderson* in Cambridge ergaben, daß die „Nadeln“ eine neue zweidimensional-kristalline Membranform von Bakteriorhodopsin waren. Bei dieser neuen Form sind die Membranen wie Tabakblätter in einer Zigarre aufgerollt und erzeugen so den Eindruck von Nadeln^[7].

1.2. Ein systematisches Vorgehen

Basierend auf den im folgenden beschriebenen grundsätzlichen Eigenschaften von Membranproteinen wurde eine neue Strategie entwickelt^[8]. Membranproteine sind in die elektrisch isolierenden Lipid-Doppelschichten eingebettet. Die Schwierigkeiten im Umgang mit Membranproteinen resultieren aus der amphipathischen Natur ihrer Oberfläche: Sie ist an den Stellen hydrophob, wo die Membranproteine Kontakt mit den Alkylketten der Lipide haben, und sie ist hydrophil, wo die Membranproteine Kontakt mit der wäßrigen Phase (an beiden Seiten der Membran) oder mit den polaren Kopfgruppen der Lipide haben (siehe Abb. 2). Daraus resultiert die Unlöslichkeit von Membranproteinen sowohl in wäßrigen Puffern als auch in organischen Lösungsmitteln mit niedriger Dielektrizitätskonstante. Um Membranproteine zu solubilisieren, muß ein Detergens zugegeben werden. Detergentien sind amphiphile Moleküle, die oberhalb einer bestimmten Konzentration Micellen bilden („critical micellar concentration“). Diese Detergens-Micellen nehmen die Membranproteine auf und schützen die hydrophoben Teile der Oberfläche des Membranproteins vor dem Kontakt mit Wasser. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung einer biologischen Membran und ihrer Solubilisierung mit einem Detergens. Anschließend muß das Membranprotein in der Detergens-Micelle durch chromatographische Methoden gereinigt werden.

Sobald das Protein isoliert und in großen Mengen verfügbar ist, kann man mit Kristallisationsversuchen beginnen.

Bei Membranproteinen, die in der Membran nur verankert sind, ist es am aussichtsreichsten, den Membrananker durch Proteasen zu entfernen; vielversprechend ist auch die Verwendung genetisch modifizierten Materials, bei welchem der

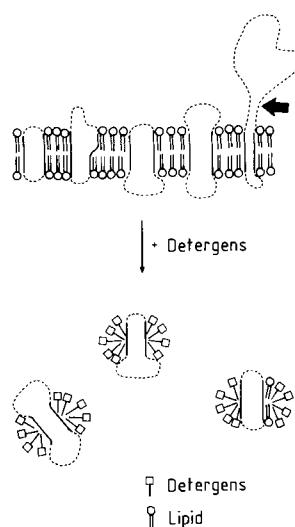


Abb. 2. Schematische Darstellung einer biologischen Membran, die aus einer Lipiddoppelschicht und darin eingebetteten Membranproteinen besteht (oben), und ihrer Solubilisierung durch Detergentien (unten). Polare Bereiche der Membranprotein-Oberfläche sind durch gestrichelte Linien angedeutet (modifiziert nach Michel [8]).

Teil des Gens, der für den Membrananker codiert, entfernt wurde. Es gibt bereits vier Beispiele für hochauflöste Strukturen der hydrophilen Domänen: Cytochrom b₅^[9], Haemagglutinin^[10] und Neuraminidase^[11] des Grippe-Virus sowie für menschliches Histokompatibilitätsantigen der Klasse I, HLA-A2^[12].

Es gibt zwei Möglichkeiten, aus wirklich integralen Membranproteinen echte dreidimensionale Kristalle zu erzeugen:

1) Man kann sich vorstellen, Stapel zweidimensionaler Kristalle von Membranproteinen aufzuschichten. Senkrecht zur Membran müssen hierbei die zweidimensionalen Kristalle während oder nach ihrer Entstehung bezüglich Translation, Rotation und Orientierung der Oberflächen geordnet werden. In den meisten Fällen könnten die Lipide in Form von Doppelschichten erhalten bleiben und die Hydrophobie der Intramembran-Oberfläche des Proteins kompensieren. Hydrophobe und polare Wechselwirkungen würden die Kristalle in der Membranebene stabilisieren, während in der dritten Dimension polare Wechselwirkungen überwiegen sollten (Abb. 3, links). Bei einer sinnvollen Kristallisations-

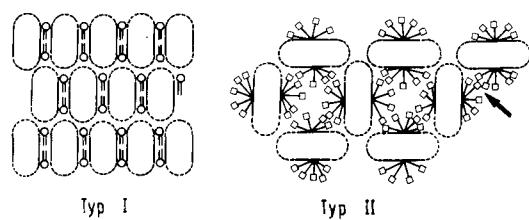


Abb. 3. Die beiden Grundtypen der Membranprotein-Kristalle. Typ I: Stapel aus Membranen, die zweidimensional-kristalline Membranproteine enthalten. Die zweidimensionalen Kristallgitter müssen auch in der dritten Dimension geordnet werden. Typ II: Ein kristallines Membranprotein, an dessen hydrophober Oberfläche Detergensmoleküle gebunden sind. Der polare Teil der Oberfläche des Membranproteins ist durch gestrichelte Linien angedeutet. Symbole für Lipide und Detergentien wie in Abb. 2 (aus Michel [8]).

methode müßte man beide Arten der Wechselwirkung gleichzeitig verstärken; dies erscheint jedoch schwierig.

2) Die Alternative ist die Kristallisation der Membranproteine in ihren Detergens-Micellen. Das Kristallgitter wird von den Membranproteinen über polare Wechselwirkungen zwischen den polaren Teilen der Oberfläche gebildet. Abbildung 3 zeigt rechts ein Beispiel für solch einen Kristall. Es wird sofort deutlich, daß Membranproteine mit großen, außerhalb der Membran liegenden Domänen diesen Typ von Kristall viel leichter bilden sollten als Membranproteine mit kleinen polaren Domänen. Die Größe der Detergens-Micellen spielt dabei eine entscheidende Rolle. Eine große Detergens-Micelle könnte den erforderlichen engen Kontakt zwischen den polaren Domänen der Oberflächen des Membranproteins verhindern. Eine Möglichkeit, eine kleine Detergens-Micelle zu erhalten, ist die Verwendung kleiner linearer Detergentien wie Octylglucopyranosid. Allerdings ist es eine allgemeine Erfahrung von Membran-Biochemikern, daß Membranproteine in Micellen, die von Detergentien mit kurzen Alkylketten gebildet werden, nicht sehr stabil sind. Eine Verlängerung der Alkylkette um eine Methylengruppe führt häufig zu einer Zunahme der Stabilität um den Faktor 2 oder 3. Deshalb muß hier ein Kompromiß gefunden werden.

Der Hauptvorteil der Typ-II-Kristalle ist, daß die gleichen Verfahren zur Übersättigung der Membranprotein-Lösung angewendet werden können wie bei löslichen Proteinen, nämlich Dampfdiffusion oder Dialyse mit Salzen oder Polymeren wie Polyethylenglycol als Fällungsmittel. Häufig bildet sich dabei eine viskose Detergensphase, die aus präzipitierten Detergens-Micellen zu bestehen scheint (siehe z. B.^[13]). Diese Phasentrennung ist ein schwerwiegendes Problem. Membranproteine reichern sich in der Detergens-Phase an und denaturieren darin häufig. Oft lösen sich schon gebildete Kristalle auch wieder auf.

Durch Octylglucopyranosid solubilisiertes Bakteriorhodopsin bildet, wenn Phosphat als Fällungsmittel verwendet wird, nadelähnliche Kristalle (Abb. 1C). Mit Ammoniumsulfat^[13] entstehen Würfel (Abb. 1D). Diese Würfel sind nicht sehr stabil und wandeln sich nach einigen Wochen in haariges, filamentöses Material (Abb. 1E) um^[4]; wahrscheinlich bildet Bakteriorhodopsin dabei wieder Membranen.

OmpF-Porin, ein Protein der Außenmembran des Darmbakteriums *Escherichia coli*, wurde – ebenfalls nach Solubilisierung mit Octylglucopyranosid – von *Garavito* und *Rosenbusch*^[14] kristallisiert. Wir erhielten Kenntnis von dieser Parallelentwicklung, als sich *D. Oesterhelt* und *J. P. Rosenbusch* 1979 in China trafen.

1.3. Die Verbesserung der Kristallisationsmethode

In meinen Augen beruhte das Ausbleiben eines endgültigen Erfolgs bei Bakteriorhodopsin darauf, daß die Detergens-Micellen immer noch zu groß waren. Kleinere Detergentien ließen sich jedoch wegen mangelnder Stabilität des Bakteriorhodopsins in Detergentien mit kürzeren Alkylketten oder kleineren polaren Kopfgruppen nicht verwenden. Die Zugabe kleinerer amphiphiler Moleküle war aus mehreren Gründen ein Ausweg^[4a, 8]: 1) Die kleinen Moleküle könnten Detergens-Moleküle, die zu groß sind, um sich

genau in das Kristallgitter des Proteins einzufügen, an bestimmten Stellen verdrängen. 2) Die zugesetzten amphiphilen Moleküle sind zu klein, um selbst Micellen zu bilden, werden jedoch in die Detergens-Micellen eingebaut. Diese gemischten Micellen sind kleiner als die reinen Detergens-Micellen und haben eine andere Krümmung der Oberfläche. Als Ergebnis könnten die Proteinmoleküle näher zusammenrücken. 3) Die polare Kopfgruppe der zugesetzten amphiphilen Moleküle ist kleiner als die des Detergens. Somit würde nur ein kleinerer Teil der polaren Oberfläche des Proteins vom polaren Teil der gemischten Amphiphil-Detergens-Micellen abgedeckt werden.

Ich überflog also die wichtigsten Chemikalienkataloge und bestellte nahezu alle Verbindungen, die polar am einen und hydrophob am anderen Ende waren. Zusätzlich synthetisierte ich ungefähr 20 amphiphile Verbindungen, hauptsächlich Alkylpolyole und Alkylamin-N-Oxide. Diese Verbindungen wurden unseren Ansätzen zur Kristallisation von Bakteriorhodopsin zugegeben. Einige der Substanzen bewirkten, daß wir hexagonale Säulen erhielten (siehe Abb. 1F), während ohne Additive Würfel (Abb. 1D) entstanden waren. Als effektivster Zusatz erwies sich Heptan-1,2,3-triol, doch hatte es eine leicht denaturierende Wirkung auf Bakteriorhodopsin. Die Beugungsqualität der Bakteriorhodopsin-Kristalle hatte sich verbessert: Mit Hilfe der Synchrotronstrahlung konnten *H. Bartunik*, *D. Oesterhelt* und ich gelegentlich eine Auflösung von 3 Å erreichen, jedoch nur in einer Richtung.

1.4. Der Wechsel zur klassischen Photosynthese

Enttäuscht darüber, daß der endgültige Durchbruch mit Bakteriorhodopsin nicht gelang, suchte ich nach aussichtsreicherem Membranprotein für die Kristallisation. Unsere Erfolglosigkeit dürfte zum Teil darauf beruhen, daß Bakteriorhodopsin keine großen Domänen außerhalb der Membran aufweist. Meine Wahl fiel auf die photosynthetischen Reaktionszentren der Purpurbakterien *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodopseudomonas viridis* sowie das Lichtsammler-Chlorophyll-a/b-Protein vom Spinat. Sie wurde von der Tatsache beeinflußt, daß diese Proteine (oder Protein-Komplexe) nach Literaturberichten in ihrer natürlichen Umgebung schon Teil zweidimensional-kristalliner Bereiche sind. Weiterhin war günstig, daß sie in großen Mengen zur Verfügung standen, leicht isoliert werden konnten, farbig waren und Farbänderungen eine mögliche Denaturierung angezeigt hätten.

Das *Rhodopseudomonas-viridis*-System lernte ich durch *Ernst Wehrli* von der ETH Zürich kennen, der die Ergebnisse elektronenmikroskopischer Untersuchungen während einer kleinen Tagung auf Burg Gemen im Juni 1979 (siehe^[15]) vorstellte. Im Dezember 1980 gab mir *Wehrli* einige isolierte photosynthetische Membranen. Zu dieser Zeit war ich bereits mit *Dieter Oesterhelt* an das Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Nähe von München umgezogen und gerade von einem Aufenthalt am MRC in Cambridge zurückgekehrt, wo ich mit *R. Henderson* Röntgenbeugungsversuche an den Bakteriorhodopsin-Kristallen durchgeführt hatte. Zur Isolierung der Reaktionszentren wurde ein von *Clayton* und *Clayton* 1978 publiziertes Verfahren, Chromatographie an Hydroxylapatit, verwendet^[16].

Ich versuchte, die isolierten Reaktionszentren zu kristallisieren, jedoch ohne Erfolg. Danach entwickelte ich eine neue Isolierungsmethode, wendete nur die Molekularsieb-Chromatographie an, versuchte es noch einmal und hatte sofort Erfolg^[4b]. Die Bedingungen stimmten nahezu mit denen überein, die sich bei Bakteriorhodopsin als optimal erwiesen hatten. Der einzige Unterschied war, daß *N,N*-Dimethyldodecylamin-*N*-oxid anstelle von Octylglucopyranosid (siehe Abb. 4) als Detergens verwendet werden konnte. In Gegenwart von 3% Heptan-1,2,3-triol (hochschmelzendes Isomer) und mit 1.5 bis 1.8 M Ammoniumsulfat als Fällungsmittel erhielten wir bei Dampfdiffusion gegen 2.5 bis 3 M Ammoniumsulfat innerhalb von zwei Tagen sternförmige Kristalle; innerhalb von drei Wochen entstanden gut ausgebildete tetragonale Säulen mit einer Länge bis zu 2 mm, wenn die Dampfdiffusion gegen 2.2 bis 2.4 M Ammoniumsulfat erfolgte (siehe Abb. 1G, H). Die viel kleinere polare Kopfgruppe von *N,N*-Dimethyldodecylamin-*N*-oxid ist dabei mit Sicherheit von Bedeutung. Unglücklicherweise wird Bakteriorhodopsin durch dieses Detergens denaturiert. *D. Oesterhelt* war großzügig genug, das Reaktionszentrum als mein Projekt anzuerkennen.

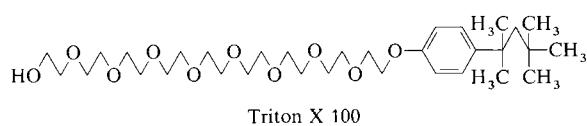
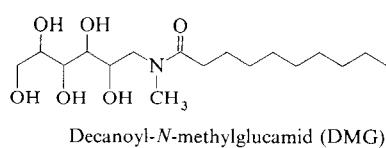
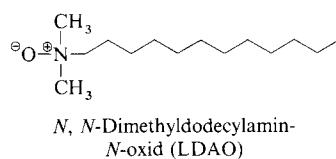
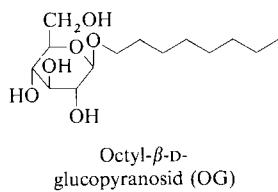


Abb. 4. Strukturformeln gängiger Detergentien: Octyl- β -D-glucopyranosid, *N,N*-Dimethyldodecylamin-*N*-oxid und Decanoyl-*N*-methylglucamid sind im Gegensatz zu Triton X100 für die Kristallisation von Membranproteinen geeignet.

Von Anfang an waren die Kristalle von exzellenter Qualität. Nach Optimierung des Isolierungsvorganges war eine kontinuierliche Versorgung mit Kristallen gewährleistet.

Nun konnte ich mit anfänglicher Hilfe von *Wolfram Bode* und *Robert Huber* damit beginnen, die Röntgendiffraktogramme zu sammeln. Abbildung 5 zeigt eine Rotationsaufnahme; ähn-

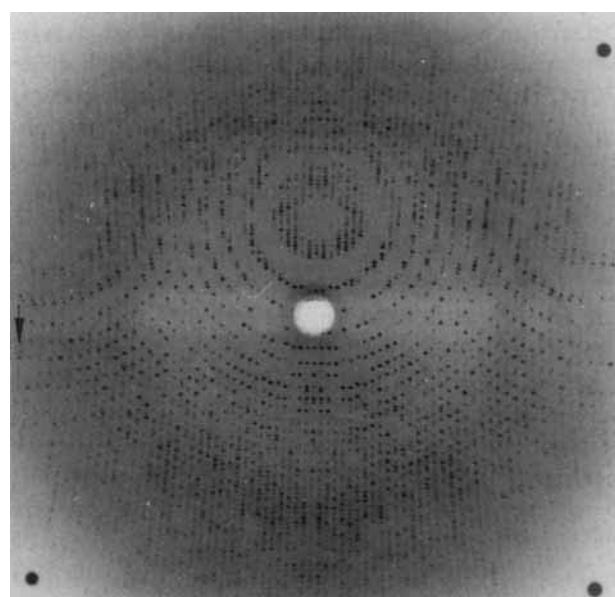


Abb. 5. Röntgenbeugungsmuster eines Einkristalls des Reaktionszentrums (1° Rotation). Belichtungszeit: 20 h, $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung, Abstand Kristall-Film: 100 mm. Der Pfeil zeigt eine Auflösung von 3,0 Å an (aus Michel [4b]).

liche Aufnahmen wurden für die Datensammlung verwendet.

2. Die Ermittlung der Struktur

Im Frühjahr 1982 schloß ich (*J. D.*) mich *H. M.* an, um mit ihm die dreidimensionale Struktur des Reaktionszentrums aufzuklären. Die tetragonalen Kristalle haben Kantenlängen der Elementarzellen von $a = b = 223.5 \text{ \AA}$, $c = 113.6 \text{ \AA}$ und die Symmetrie der Raumgruppe $P4_32_12$ ^[14, 17]. Wie sich herausstellte, enthält die asymmetrische Einheit ein Reaktionszentrum mit einem „Molekular“gewicht von 145 000 Dalton.

2.1. Sammlung der Röntgenreflex-Intensitäten

Zur Datensammlung verwendeten wir die Rotationsmethode mit einem Drehanoden-Röntgengenerator als Quelle und photographischen Filmen als Detektor^[17]. Die großen Elementarzellen der Kristalle des Reaktionszentrums in Verbindung mit der Auflösung des Beugungsmusters von maximal 2.9 Å begrenzten die Rotationsintervalle pro Belichtung auf 0.5°, so daß mehr als zwei Drittel der Reflexe auf allen verwendeten Filmen nur teilweise aufgenommen wurden. Die lange Lebensdauer der Kristalle im Röntgenstrahl bei ungefähr 0 °C und ihre räumliche Stabilität ermöglichten es aber, die partiellen Reflexe aus aufeinanderfolgenden Aufnahmen zu addieren, so daß ihre Bearbeitung kein ernsthaftes Problem darstellte. Es dauerte trotzdem ungefähr drei bis vier Monate, bis ein vollständiger Datensatz gesammelt war. Die Datenkollektion der Schweratomderivate wurde durch die Wahl des Rotationsintervalls von 0.6°

pro Aufnahme beschleunigt. Später wurde ein neuer Datensatz des nativen Proteins bei 2.3 Å Auflösung mit Rotationsintervallen von 0.4° von *Irmgard Sinning, Gerhard Schertler* und *H. M.* im Hamburger Synchrotron-Laboratorium (EMBL-Außenstelle, DESY) gesammelt. Bei dieser Art der Datensammlung ist die mühsamste und zeitaufwendigste Aufgabe die Bearbeitung der Filme. *Kunio Miki* und später *Otto Epp* gaben uns in dieser Phase wertvolle Unterstützung. Zur Filmauswertung benutzten wir die Computerprogramme FILME^[18, 19] und OSC^[20, 21], zur Skalierung und Vereinigung der Daten das Programm PROTEIN (Hauptautor: *W. Steigemann*).

2.2. Die Lösung des Phasenproblems

Um das Phasenproblem für die Kristallstruktur des Reaktionszentrums zu lösen, verwendeten wir die Methode des isomorphen Ersatzes mit Schweratomderivaten. Der experimentelle Teil wurde von *H. M.*, die Filmauswertung und Datenanalyse von mir mit Unterstützung von *Kunio Miki* und *Otto Epp* vorgenommen.

Zur Herstellung der Schweratomderivate wurden die Kristalle drei Tage lang in einer 1 mM Lösung der jeweiligen Schweratomverbindung in einem Mutterlaugen-ähnlichen „Soak-Puffer“ belassen. Einige Verbindungen wie K_2PtBr_4 , $K_2Pt(CN)_4$, $KHg(CN)_2$, K_2HgI_4 und $EuCl_3$ waren dafür nicht geeignet, da sie die Phasentrennung des Soak-Puffers in eine viskose Detergents-Phase und eine wässrige Phase induzierten. Zu Beginn der Experimente wurde festgestellt, daß bei Verwendung großer Schweratomverbindungen wie $(C_6H_5)_3PbNO_3$ oder C_6H_5HgCl keine Röntgenbeugung mehr auftrat, während die kleineren homologen Verbindungen $(CH_3)_3PbCl$ oder C_2H_5HgCl die Beugung auf eine Auflösung von 6 Å reduzierten. Nach zusätzlicher Reinigung des Reaktionszentrums vor der Kristallisation wurde die Beugungsqualität der Kristalle durch die kleinen Schweratomverbindungen nicht mehr beeinflußt. Eine Verbindung ($KAuCl_4$) bewirkte eine Verkürzung der c -Achse. Rotationsaufnahmen (1°), die einen großen Teil der 1.k.l-Gitterebene zeigten, wurden visuell auf Änderungen im Beugungsmuster hin überprüft. Für vielversprechende Kandidaten wurden Datensätze gesammelt und ausgewertet, die zu ca. 50% komplett waren.

Im Durchschnitt hatte jedes Schweratomderivat neun Schweratom-Bindungsstellen^[17]. Die stärker besetzten Bindungsstellen wurden mit dem automatischen Suchunterprogramm im PROTEIN-Programmpaket gefunden. Aus fünf verschiedenen Schweratomderivaten konnten wir die Phasen bei 3.0 Å Auflösung und eine Elektronendichtekarte berechnen^[17]. Phasen und Karte wurden durch „solvent flattening“ weiter verbessert^[22].

2.3. Modellbau

Die Interpretation der Elektronendichtekarten und die Modellkonstruktion erfolgten in drei Stufen: Als erstes wurden die prosthetischen Gruppen im Reaktionszentrum identifiziert. Wir fanden die vier Häm-Gruppen, die vier Bakteriochlorophyll-b-Moleküle, die beiden Bakteriophäophytin-b-Moleküle und ein Chinonmolekül^[17]. Als nächstes wur-

den die Polypeptidketten – außer in den aminoterminalen Regionen der L- und M-Untereinheiten und der Cytochrom-Untereinheit, deren Aminosäuresequenz zum Teil bekannt waren^[23] – vereinfacht als Polyalanin in das Computermodell eingebaut. Die bekannten Partialsequenzen konnten zur Unterscheidung der Untereinheiten benutzt werden. In diesem Stadium wurde gelegentlich die lokale Symmetrie der L- und M-Untereinheiten ausgenutzt. Nachdem schließlich die Gensequenzen der Untereinheiten des Reaktionszentrums bestimmt worden waren^[24–26], konnte das Modell der Protein-Untereinheiten vervollständigt werden. Die Sequenzinformation führte im großen und ganzen zu einer Verifikation des Modells, jedoch auch zu mehreren kleinen Korrekturen des Verlaufs der Polypeptidketten, da die Elektronendichte in der vorausgegangenen Stufe des Modellbaus nicht immer deutlich genug war, um die genaue Anzahl der Aminosäuren zu bestimmen.

Unser Werkzeug für den Modellbau waren interaktive Graphik-Bildschirme: ein Vector-General-3400-System (schwarz-weiß) und später ein Evans & Sutherland-PS-300-System (farbig). Für beide Systeme verwendeten wir *Alwyn Jones*' Programmpaket FRODO^[27]. Die Modellbibliothek dieses Pakets wurde um Bakteriochlorophyll-b, Bakteriophäophytin-b, Menachinon-7 und Ubichinon-1 erweitert. Häufigen Gebrauch machten wir von der Möglichkeit der „real-space“-Verfeinerung in FRODO, die einen korrekten Einbau von langen helicalen Strukturen in die Elektronendichte erlaubte.

2.4. Modellverfeinerung

Das Modell des Reaktionszentrums, bei dem noch die Hälfte der Seitenketten der Cytochrom-Untereinheit fehlte, hatte schon den recht niedrigen kristallographischen *R*-Faktor von 0.359 bei einer Auflösung von 2.9 Å ($R = \Sigma(|F_{obs}| - |F_{calc}|)/\Sigma|F_{obs}|$; F_{obs} und F_{calc} sind die gefundenen bzw. berechneten Strukturfaktoren). Die kristallographische Verfeinerung des Modells wurde bei einer Auflösung von 2.9 Å begonnen und bis zu einer Auflösung von 2.3 Å fortgeführt. Die für die Verfeinerung verwendeten Programmpakete waren PROTEIN, EREF^[28, 29], TNT^[30] und nochmals FRODO.

Durch die Verfeinerung wurde ein *R*-Faktor von 0.193 für 95 762 unabhängige Reflexe bei einer Auflösung von 2.3 Å erreicht; das verfeinerte Modell enthält 10 288 Nicht-Wasserstoff-Atome. Irrtümer im ursprünglichen Modell, wie zum Beispiel Peptidgruppen und Seitenketten mit falscher Orientierung, wurden beseitigt. Neu hinzugefügt wurden: ein teilweise geordnetes Carotinoidmolekül, ein Ubichinon in der teilweise besetzten Q_B -Bindungstasche, ein vollständiges Detergentsmolekül (LDAO, siehe Abb. 4), ein Kandidat für ein teilweise geordnetes LDAO oder ein ähnliches Molekül, sieben Kandidaten für negative Ionen und 201 geordnete Wassermoleküle. Als obere Grenze für den durchschnittlichen Fehler der Koordinaten wurde 0.26 Å ermittelt^[31]. Eine detaillierte Beschreibung der Verfeinerung und des verfeinerten Modells des photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rhodopseudomonas viridis* wird an anderer Stelle publiziert werden (*J. Deisenhofer, O. Epp, I. Sinning, H. Michel*, Manuskript in Vorbereitung).

3. Struktur und Funktion

3.1. Überblick über die Struktur

Das gesamte Reaktionszentrum von *Rhodopseudomonas viridis* ist in Abbildung 6 zu sehen. Das Reaktionszentrum ist ein Komplex aus vier Protein-Untereinheiten und 14 Cofaktoren. Die Protein-Untereinheiten werden mit H (heavy), M (medium), L (light) und Cytochrom bezeichnet; die Namen H, M und L wurden aufgrund der durch Elektrophorese bestimmten apparenten Molekulargewichte der Untereinheiten gewählt. Den Kern des Komplexes bilden die Untereinheiten L und M und die daran gebundenen Cofaktoren: vier Bakteriochlorophyll-b-Moleküle (BChl-b), zwei Bakteriophäophytin-b-Moleküle (BPh-b), ein Nicht-Häm-Eisenion, zwei Chinon- und ein Carotinoid-Molekül. Strukturelle Eigenschaften, z. B. die hydrophobe Natur der Proteinoberfläche, und funktionelle Überlegungen geben einen deutlichen Hinweis darauf, daß die Untereinheiten L und M die bakterielle Membran durchqueren. Dieser Aspekt der Struktur wird in Abschnitt 5 im Detail diskutiert. Jede der Untereinheiten L und M weist fünf durch die Membran reichende Polypeptidsegmente auf, die in helicaler Form vorliegen. Die Teile der Polypeptidketten, die die Transmembran-Helices

verbinden, bilden flache Oberflächen parallel zur Oberfläche der Membran.

Die H-Untereinheit steuert eine weitere die Membran durchquerende Helix bei. Ihr N-Terminus befindet sich nahe der periplasmatischen Membranoberfläche. Der C-terminale Teil der H-Untereinheit bildet eine globulare Domäne, die an den L-M-Komplex nahe der cytoplasmatischen Membranoberfläche gebunden ist. Auf der gegenüberliegenden Seite der Membran ist die Cytochrom-Untereinheit mit ihren vier kovalent gebundenen Häm-Gruppen an den L-M-Komplex gehaftet. Sowohl die Cytochrom-Untereinheit als auch die globuläre Domäne der H-Untereinheit haben Oberflächeneigenschaften, die typisch für wasserlösliche Proteine sind.

Die gesamte Länge des Reaktionszentrums von der Spitze des Cytochroms bis zur H-Untereinheit beträgt ungefähr 130 Å. Der zentrale Bereich hat einen elliptischen Querschnitt mit Achsen von 70 und 30 Å.

Von allen photosynthetischen Reaktionszentren sind die der Purpurbakterien am besten charakterisiert (Übersichten: [32, 33]). Die meisten enthalten nur die drei Untereinheiten H, M und L; eine fest gebundene Cytochrom-Untereinheit wurde nur in wenigen anderen Bakterien gefunden. Ein Beispiel für ein Reaktionszentrum ohne gebundene Cyto-

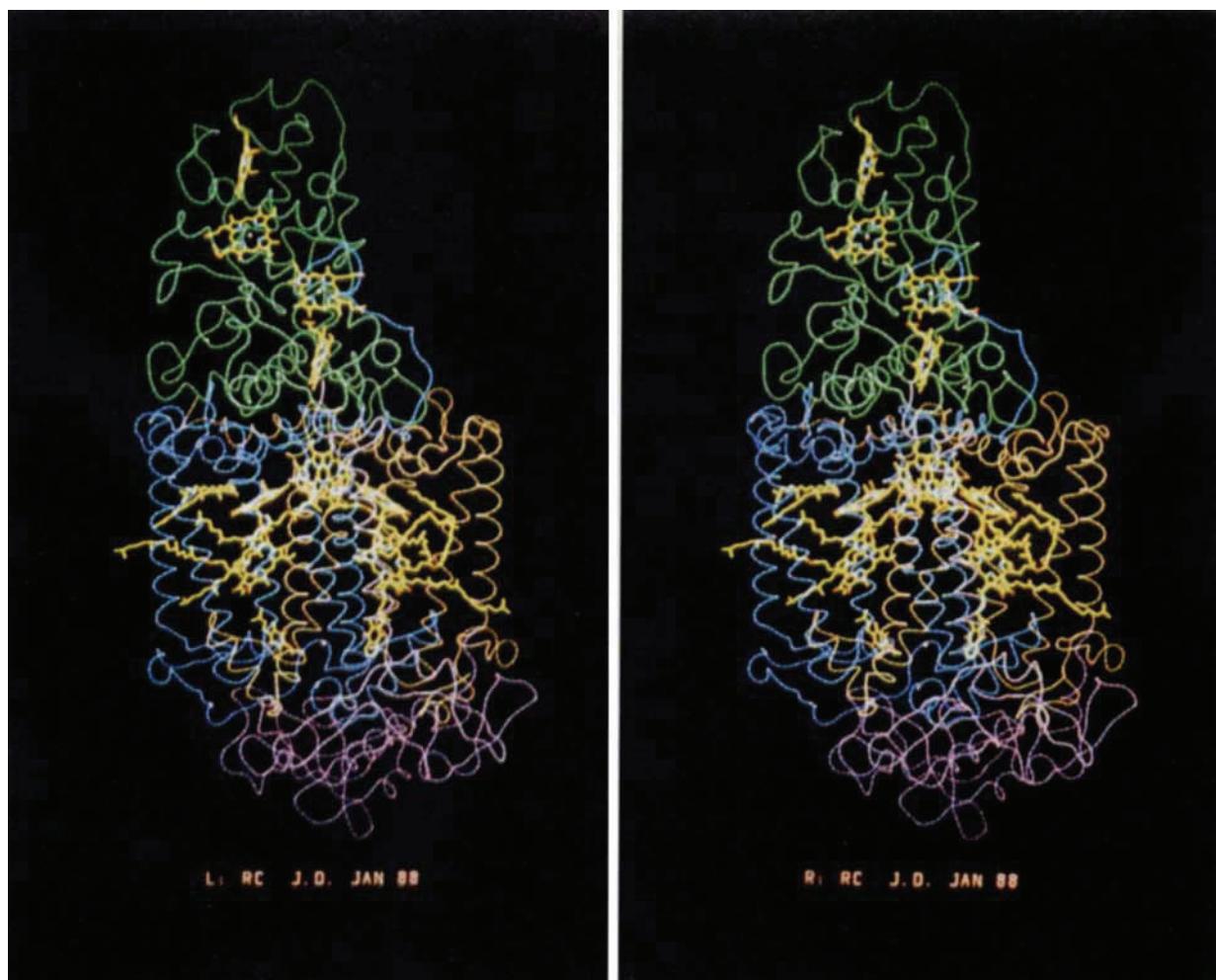


Abb. 6. Stereodarstellung des gesamten Reaktionszentrums von *Rhodopseudomonas viridis*. Die Proteinketten sind in geglätteter Form gezeichnet. Grün: Cytochrom, blau: M-Untereinheit, braun: L-Untereinheit, purpur: H-Untereinheit. Bei den Cofaktoren sind die Atome in kräftigen Farben wiedergegeben. Gelb: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, grün: Magnesium. Die geglätteten Modelle des Rückgrats der Polypeptidketten wurden nach einer Idee von Richard J. Feldman mit Hilfe von Marius G. Clore hergestellt.

chrom-Untereinheit ist das *Rhodobacter sphaeroides*, das ebenfalls kristallisiert wurde^[34, 35]; es stellte sich heraus, daß seine Struktur der des Reaktionszentrums von *Rhodopseudomonas viridis* sehr ähnlich ist^[36, 37].

3.2. Struktur der Untereinheiten

Die Faltung der Polypeptidketten der vier Untereinheiten des Reaktionszentrums wird in Abbildung 7 schematisch gezeigt. Wie oben bereits erwähnt, sind die hauptsächlichen Sekundärstrukturelemente in den Untereinheiten L und M (Abb. 7b bzw. 7c) die fünf Helices, die die Membran durchqueren. Ein Vergleich der Faltung der Polypeptidketten beider Untereinheiten zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung. Strukturell ähnliche Segmente schließen die Transmembran-Helices und einen großen Teil ihrer Verknüpfungen ein. Insgesamt können 216 α -Kohlenstoffatome der M-Untereinheit mit den entsprechenden α -Kohlenstoffatomen der L-Untereinheit so gut zur Deckung gebracht werden, daß die Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung nur 1.22 Å beträgt. Dies geschieht durch eine Rotation von ungefähr 180° um eine Achse, die senkrecht zur Membranoberfläche verläuft; wir nennen diese Achse die zentrale lokale Symmetriearchse. In Tabelle 1 sind die Helices beider Untereinheiten und in Tabelle 2 ihre strukturell ähnlichen Bereiche zusammengestellt. Neben den Transmembran-Heli-

Tabelle 1. Helicale Segmente der L- und M-Untereinheit.

Helix	Segment (Länge)	
	Untereinheit L	Untereinheit M
transmembran		
A	L33–L53 (21)	M52–M76 (25)
B	L84–L111 (28)	M111–M137 (27)
C	L116–L139 (24)	M143–M166 (24)
D	L171–198 (28)	M198–223 (26)
E	L226–249 (24)	M260–284 (25)
periplasmatisch		
–	–	M81–87 (7)
cd	L152–162 (11)	M179–190 (12)
ect	L259–267 (9)	M292–298 (7)
cytoplasmatisch		
–	–	M232–237 (6)
de	L209–220 (12)	M241–254 (14)

Tabelle 2. Regionen ähnlicher Polypeptidkettenfaltung in L- und M-Untereinheiten

Untereinheit M	Untereinheit L	Länge	
M 49–76	→	L 29–56	28
M 88–96	→	L 61–69	9
M 100–224	→	L 73–197	125
M 243–290	→	L 209–256	48
M 291–296	→	L 258–263	6

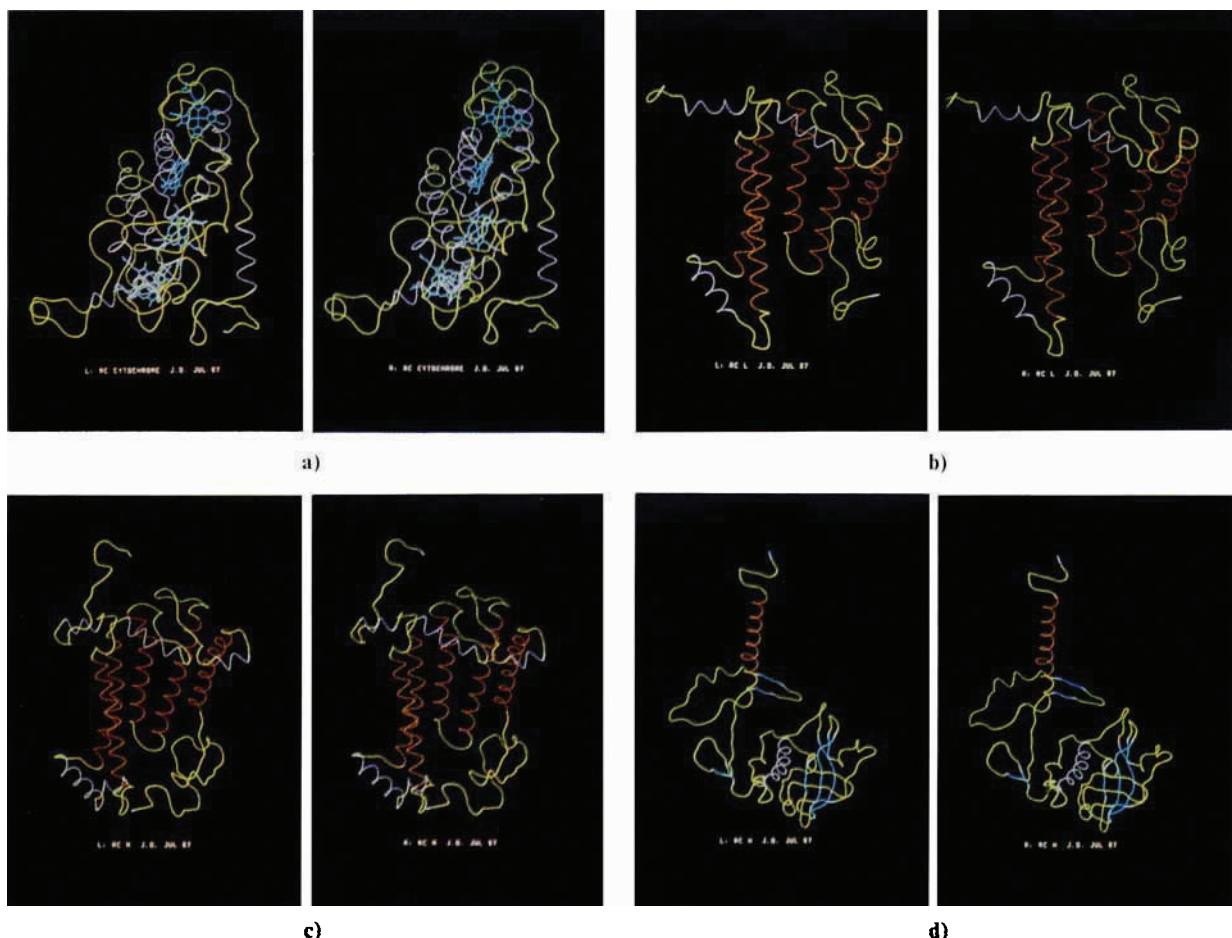


Abb. 7. Stereodarstellung der Kettenverläufe der Protein-Untereinheiten in geglätteter Form. Die Sekundärstruktur ist farblich gekennzeichnet. Gelb: keine klassifizierbare Sekundärstruktur, rot: Transmembran-Helices, purpur: andere Helices, blaugrün: antiparallele β -Faltblatt-Strukturen. a) Cytochrom (einschließlich der vier Häm-Gruppen); b) L-Untereinheit; c) M-Untereinheit; d) H-Untereinheit. Die N-Termini sind blaugrün, die C-Termini rot markiert.

ces (LA, LB, LC, LD, LE und MA, MB, MC, MD, ME) mit Längen zwischen 21 und 28 Resten gibt es kürzere Helices in den verbindenden Segmenten, besonders die Helix de (zwischen den Transmembran-Helices D und E) und die Helix cd. Die Untereinheit M (323 Reste) ist 50 Reste länger als L (273 Reste). Vergleicht man beide Untereinheiten, so weist M folgende Insertionen auf: am *N*-Terminus (20 Reste), im Verbindungsstück zwischen den Helices MA und MB (7 Reste), im Verbindungsstück zwischen MD und ME (7 Reste) und am *C*-Terminus (16 Reste). Die Insertionen an den *N*- und *C*-Termini bewirken, daß hauptsächlich die M-Untereinheit die Kontakte mit den peripheren Untereinheiten unterhält. Die Insertion zwischen MD und ME, die zu einer zusätzlichen, kurzen Helix führt (siehe Tabelle 1), ist für die verschiedenen Konformationen der Chinonbindungsstellen in L und M und für die Bindung des Nicht-Häm-Eisens von Bedeutung (siehe unten).

Die H-Untereinheit mit 258 Aminosäureresten kann in drei strukturelle Regionen mit unterschiedlichen Charakteristika unterteilt werden (Abb. 7d). Das *N*-terminale Segment, das mit Formylmethionin beginnt^[24], enthält die einzige Transmembran-Helix der Untereinheit H; diese Helix besteht aus 24 Resten (H12 bis H35). Nahe dem Ende der Transmembran-Helix weist die Sequenz sieben aufeinanderfolgende geladene Reste (H33 bis H39) auf. Die Reste H47 bis H53 sind im Kristall fehlgeordnet, so daß keine signifikante Elektronendichte für sie gefunden werden kann.

Anschließend an die fehlgeordnete Region verläuft die H-Untereinheit als gestreckte Kette entlang der Oberfläche des L-M-Komplexes und gewinnt offensichtlich aus diesem Kontakt strukturelle Stabilität. Die Oberflächenregion enthält eine kurze Helix und zwei doppelsträngige antiparallele β -Faltblatt-Strukturen.

Das dritte strukturelle Segment der H-Untereinheit, das ungefähr bei H105 beginnt, bildet eine globuläre Domäne. Diese Domäne enthält ein ausgedehntes System von antiparallelen und parallelen β -Faltblatt-Strukturen zwischen den Resten H134 und H203 sowie eine α -Helix (Reste H232 bis H248). Die β -Faltblatt-Region, die einzige größere im gesamten Reaktionszentrum, bildet eine Tasche mit stark hydrophoben inneren Wänden. Diese strukturelle Eigenschaft erinnert an Transportproteine wie das Retinol-bindende Protein^[38] und das Bilin-bindende Protein^[39]; jedoch ist hier die Strangtopologie anders. Bisher gibt es keinen Beweis für einen Liganden.

Cytochrome ist mit 336 Resten^[26] die größte Untereinheit im Reaktionszentrums-Komplex (Abb. 7a). Seine vier letzten Reste, C333 bis C336, sind fehlgeordnet. Ebenfalls fehlgeordnet ist der an den *N*-terminalen Cysteinrest gebundene Lipidrest^[40]. Die komplizierte Struktur des Cytochroms kann wie folgt zusammengefaßt werden: Es besteht aus einem *N*-terminalen Segment, zwei Paaren von Häm-Bindungssegmenten und einem beide Paare verbindenden Segment. Jedes Häm-Bindungssegment besteht aus einer Helix mit einer durchschnittlichen Länge von 17 Resten. Nach einer Richtungsänderung um rund 180° folgt die Aminosäuresequenz Cys-X-Y-Cys-His, wie sie typisch für c-Typ-Cytochrome ist. Die Häm-Gruppen sind mit den Cysteinresten über Thioetherbrücken verbunden. Diese Anordnung führt zu Häm-Ebenen parallel zur Helixachse. Die sechsten Liganden der Häm-Eisenatome sind in drei der vier Fälle Methioninreste der Helix. Das Eisen des Häm 4 hat Histidin C124,

das aus einem anderen Teil der Struktur stammt, als sechsten Liganden. Die beiden Paare von Häm-Bindungssegmenten, die Häm 1 und 2 bzw. 3 und 4 enthalten, stehen durch eine lokale zweizählige Symmetrie in Beziehung zueinander. Von jedem Paar gehorchen 65 Reste mit einer Abweichung von 0.93 Å (Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung) dieser lokalen Symmetrie zwischen den entsprechenden α -Kohlenstoffatomen. Die lokale Symmetrie des Cytochroms hat keinen Bezug zur zentralen lokalen Symmetrie.

3.3. Anordnung der Cofaktoren

Abbildung 8 zeigt die Anordnung der 14 Cofaktoren, die an die Protein-Untereinheiten des Reaktionszentrums gebunden sind. Die vier Häm-Gruppen des Cytochroms, die in der Reihenfolge ihrer Bindung an das Protein numeriert sind, bilden eine lineare Kette, die auf zwei dicht beieinander liegende Bakteriochlorophyll (BChl-b)-Moleküle zuläuft. Diese beiden Moleküle, das sogenannte „special pair“, sind der Ausgangspunkt zweier Äste von Cofaktoren, die jeweils aus einem weiteren BChl-b („accessory“-BChl-b), einem Bakteriophäophytin-b (BPh-b) und einem Chinon bestehen. Das Nicht-Häm-Eisen befindet sich zwischen den Chinonen. Die Ringsysteme der BChl-b-, BPh-b- und Chinon-Moleküle folgen annähernd der gleichen lokalen Symmetrie, die die L- und M-Ketten zeigen. Die Äste der Cofaktoren, ausgehend vom „special pair“ bis zu den BPh-b-Molekülen, können eindeutig der L- oder M-Untereinheit zugeordnet werden, so daß wir von einem L- und einem M-Ast sprechen. Dies ist die Grundlage für unsere Nomenklatur: BChl-b und BPh-b werden BCXY und BPX genannt, wobei X den Ast bezeichnet (L oder M) und Y für P („special pair“) oder A („accessory“) steht. Für die Chinone ist die Situation komplizierter, weil sich die Untereinheiten hier durchdringen und das Chinon am Ende des L-Zweiges in Wirklichkeit in einer Tasche der M-Untereinheit gebunden ist und umgekehrt. Deshalb ziehen wir es vor, sie als Q_A und Q_B zu bezeichnen. Q_A befindet sich am Ende des L-Zweiges; es ist ein Menachinon-9, und Q_B ist ein Ubichinon-9^[41]. Die lokale Symmetrie wird durch die Phytlyketten von BChl-b und BPh-b, durch die unterschiedliche chemische Natur und den unterschiedlichen Besetzungsgrad der Chinonbindungsstellen sowie die Präsenz eines Carotinoid-Moleküls in der Nähe des accessory-BChl-b-Moleküls im M-Zweig verletzt.

3.4. Überblick über die Funktion

Unser heutiges Verständnis der Funktion des Reaktionszentrums entwickelte sich durch Kombination der strukturellen Informationen mit den Ergebnissen anderer experimenteller Techniken, vor allem der Spektroskopie, wie sie in Übersichtsartikeln^[42–44] beschrieben werden. Abbildung 9 zeigt schematisch das Reaktionszentrum mit seinen Cofaktoren in der bakteriellen Membran. Das „special pair“ P (hier: BCLP) ist Ausgangspunkt für einen lichtgetriebenen Elektronentransfer durch die Membran. Durch Absorption eines Photons oder Energieübertragung von Lichtsammelkomplexen in der Membran gelangt P in einen angeregten Zustand P*. Von P* wird mit einer Zeitkonstante von 2.8 ps ein Elektron zum Bakteriophäophytin im L-Zweig (hier:

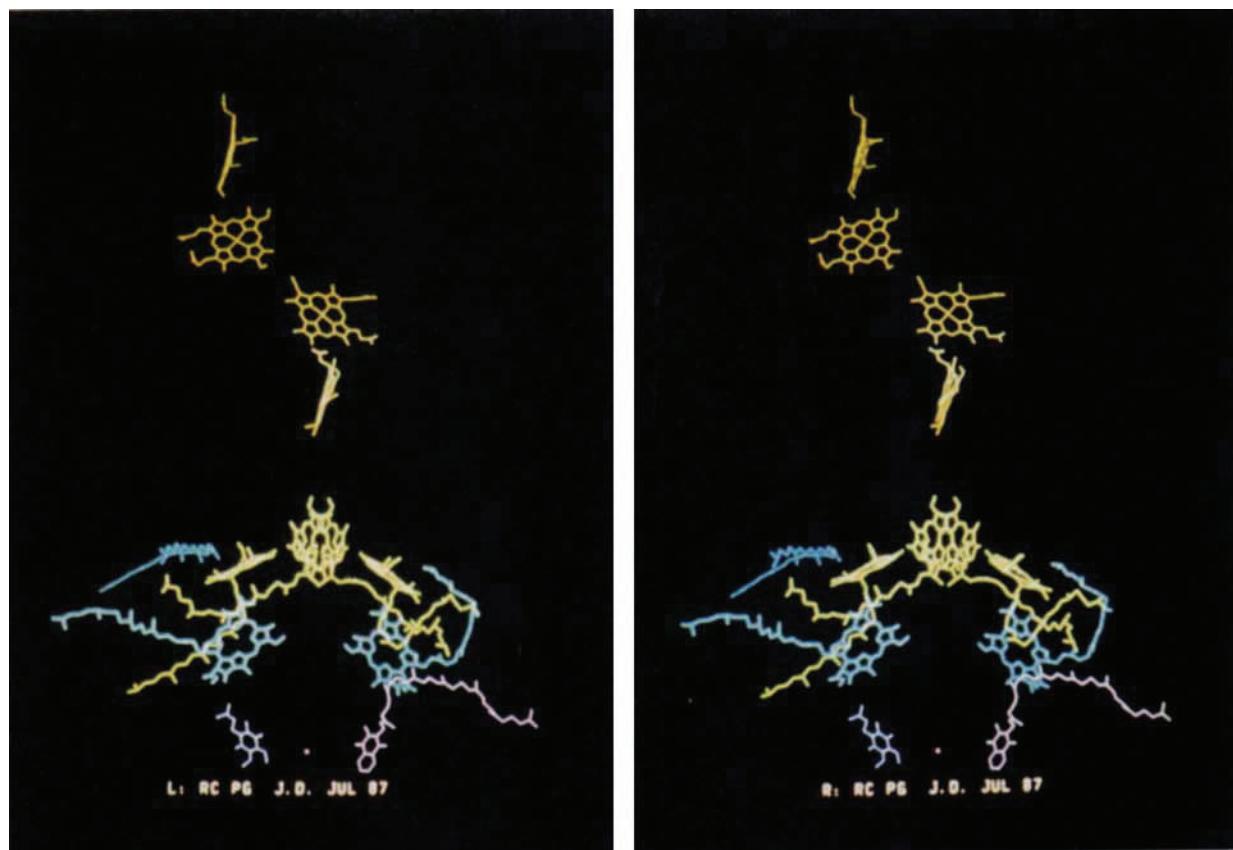


Abb. 8. Stereodarstellung der Cofaktoren. Braun: Häm-Gruppen, gelb: Bakteriochlorophyll-b, blaugrün: Bakteriophäophytin-b, blau: Carotinoid (Dihydro-neurosporin: *I. Sinning, H. Michel, unpublizierte Ergebnisse*), purpur: Chinone (rechts: Q_A , links: Q_B), roter Punkt: Nicht-Häm-Eisen.

BPL) übertragen^{45, 46}. Die Unterscheidung zwischen den beiden Bakteriophäophytin-Molekülen war möglich, weil sie Licht von etwas unterschiedlicher Wellenlänge absorbieren; außerdem konnten in Kenntnis der Kristallstruktur Linear-dichroismus-Absorptionsexperimente zur Differenzierung zwischen den beiden Chromophoren herangezogen werden⁴⁷⁻⁴⁹.

Von BPL wird das Elektron auf Q_A mit einer Zeitkonstante von ca. 200 ps übertragen. Zu diesem Zeitpunkt hat

das Elektron bereits den größten Teil der Membran durchquert. Diese beiden Schritte des Elektronentransfers laufen bei sehr niedrigen Temperaturen (ca. 1 K) sogar mit kürzeren Zeitkonstanten als bei Raumtemperatur ab^[50, 51].

Von Q_A nach Q_B bewegt sich das Elektron in etwa $100\ \mu\text{s}$. Das Nicht-Häm-Eisen scheint bei diesem Schritt keine wesentliche Rolle zu spielen^[52].

Q_b kann zwei Elektronen und anschließend zwei Protonen aufnehmen⁽⁵³⁾. Es dissoziiert als Q_bH_2 (hier: HQH) vom Reaktionszentrum ab, und die Q_b -Bindungsstelle wird aus dem Chinon-„Pool“ in der Membran wieder besetzt. Q_bH_2 wird durch den Cytochrom-b/c₁-Komplex wieder oxidiert. Hierbei gelangen Protonen und Elektronen wieder auf die periplasmatische Seite der Membran. Die Elektronen werden mit einem löslichen Cytochrom c₂ zum Cytochrom des Reaktionszentrums transportiert. Von dort wird das photo-oxidierte „special pair“ mit einer Zeitkonstante von ca. 270 μ s wieder reduziert. Diese Zeitkonstante steigt mit abnehmenden Temperaturen bis ca. 100 K und bleibt dann bei noch niedrigeren Temperaturen konstant. Der Gesamt-vorgang kann als lichtgetriebener cyclischer Elektronenfluß beschrieben werden, dessen Nettoeffekt die Erzeugung eines Protonengradienten über die Membran ist; dieser wird nach P. Mitchells chemiosmotischer Theorie benutzt, um Adeno-sintriphosphat zu synthetisieren.

Dem vollständigen Verständnis der Wirkungsweise des Reaktionszentrums steht immer noch eine Reihe ungelöster Probleme entgegen. Die oben beschriebenen Schritte des Elektronentransfers sowie ihre Geschwindigkeit und Temperaturabhängigkeit sind bis jetzt nicht theoretisch geklärt worden. Der erste Schritt – mit der Frage nach der Rolle des

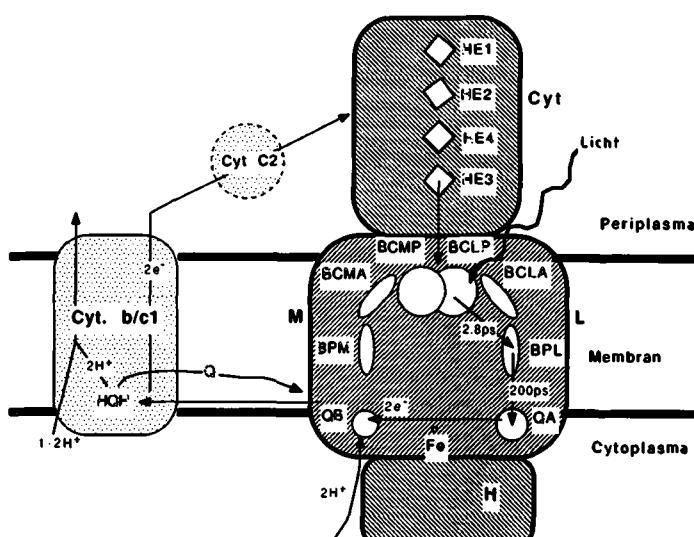


Abb. 9. Schematische Darstellung des Reaktionszentrums. Der lichtgetriebene cyclische Elektronenfluß ist eingezeichnet.

überbrückenden BCLA – ist Gegenstand einer faszinierenden Diskussion.

Eine der größten Überraschungen bei der Strukturanalyse war die Symmetrie des zentralen Bereichs des Reaktionszentrums. Sie warf die Frage auf, warum nur der L-Zweig der Cofaktoren gebraucht wird und welche Bedeutung der offensichtlich unbenutzte M-Zweig hat. Weitere offene Fragen beziehen sich auf den Elektronentransfer zwischen Q_A und Q_B , die Rolle des Nicht-Häm-Eisens und auf die Funktion von Q_B als Zwei-Elektronen- und Protonen-Acceptor. Schließlich sind die Funktion des Cytochroms wie auch Details des Elektronentransfers vom löslichen Cytochrom zum Cytochrom im Reaktionszentrum und innerhalb der vier Häm-Gruppen noch nicht völlig verstanden.

3.5. Struktur-Funktions-Beziehungen

Hier beschreibe ich die Anordnung der Cofaktoren und die Wechselwirkung mit ihrer Umgebung im Detail. Der Schwerpunkt soll bei Beobachtungen liegen, die noch offene Fragen bezüglich der Funktion betreffen.

Abbildung 10 zeigt das BChl-b-Ringsystem des „special pair“, des primären Elektronendonors der photosynthetischen Lichtreaktion. Schon vor längerer Zeit war aufgrund von ESR-Experimenten die Existenz eines „special pair“ postuliert worden^[54]. Die beiden Moleküle überlappen mit ihren Pyrrolringen I so, daß die Atome dieser Ringe einander verdecken, wenn man senkrecht auf die Ringebenen schaut. Durch diese Orientierung der Ringe kommen die Acetylgruppen den Mg^{2+} -Ionen sehr nahe; die Acetylgruppen sind jedoch keine Liganden der Mg^{2+} -Ionen. Die Pyrrolringe I beider BChl-b-Moleküle sind nahezu parallel und haben einen Abstand von ca. 3.2 Å. Die beiden Tetrapyrrolringe sind aber nicht coplanar; die Ebenen durch die Stickstoffatome der Pyrrolringe jedes BChl-b bilden einen Winkel von 11.3°.

Die BChl-b-Moleküle des „special pair“ zeigen eine fast perfekte zweizählige Symmetrie. Dies ist in Abbildung 11 zu erkennen, in der man entlang der zweizähligen Achse auf zentrale Teile des Reaktionszentrums schaut^[55]. Die BChl-b-Ringe des „special pair“ sind nahezu parallel zu dieser Symmetriearchse angeordnet. Abbildung 11 zeigt weitere Strukturelemente, die der zentralen lokalen zweizähligen Symmetrie gehorchen: die Histidin-Liganden der Mg^{2+} -Ionen des „special pair“ (L173, M200), die Ringe der „accessory“-BChl-b-Moleküle, die Wassermoleküle, die über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Histidin-Stickstoffatomen und den Ring-V-Carbonylgruppen der „accessory“-BChl-b-Moleküle gebunden sind, sowie die Trans-

membran-Helices der L- und M-Untereinheiten. Beispiele für Strukturelemente, die die zweizählige Symmetrie verletzen, sind das am „accessory“-BChl-b (BC_{MA}) befindliche

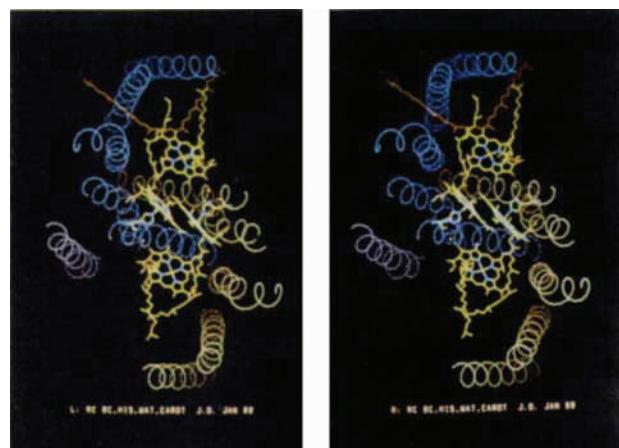


Abb. 11. Stereodarstellung eines Teils des Reaktionszentrums (Blick entlang der zentralen zweizähligen Achse): „special pair“ mit den Histidin-Liganden, „accessory“-Bakteriochlorophyll-b-Moleküle (BC_{LA} unten, BC_{MA} oben), zwei Wassermoleküle; die Transmembran-Helices der L-Untereinheit (braun), der M-Untereinheit (blau) und der H-Untereinheit (lila) sind in geglätteter Form dargestellt.

Carotinoid-Molekül, die Seitenketten der „accessory“-BChl-b-Moleküle sowie die Transmembran-Helix der H-Untereinheit. Eine subtilere Störung der Symmetrie ist die unterschiedliche Abweichung der beiden „special pair“-BChl-b-Ringsysteme von der Planarität. Der Tetrapyrrolring von BC_{MP} ist beträchtlich stärker deformiert als der von BC_{LP} , was eine ungleiche Ladungsverteilung zwischen den beiden BChl-b-Systemen des „special pair“ bewirken kann. Dies wiederum könnte eine der Ursachen für den Elektronentransfer in nur einer Richtung sein^[56].

Obwohl die Tetrapyrrolringe der BChl-b- und BPh-b-Moleküle des L- und M-Zweiges mit einer vergleichsweise geringen Abweichung zwischen den äquivalenten Positionen der Atome von 0.38 Å (Wurzel aus mittlerer quadratischer Abweichung) in einer einzigen Transformation durch Drehung ineinander überführt werden können, zeigt eine genauere Betrachtung doch erhebliche Abweichungen der lokalen Symmetrieroberung für das „special pair“, für die „accessory“-BChl-b- und für die BPh-b-Moleküle. Eine optimale Deckung nur der Tetrapyrrolringe wird beim „special pair“ durch Rotation um 179.7°, bei den „accessory“-BChl-b-

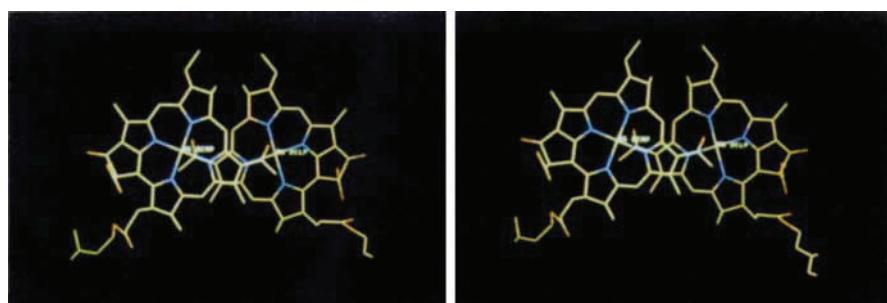


Abb. 10. Stereodarstellung des „special pair“ mit farbig markierten Atomen und Bindungen. Gelb: Kohlenstoff, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, grün: Magnesium.

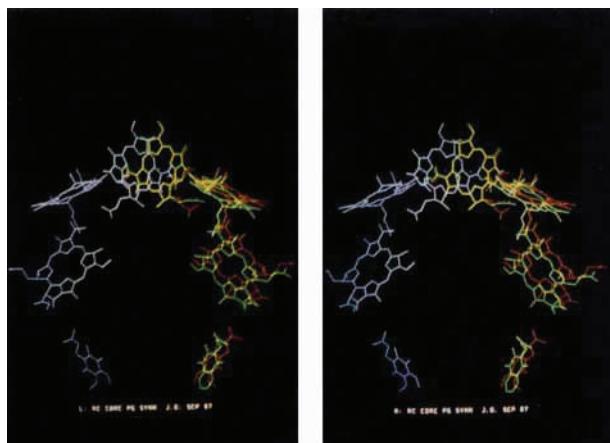


Abb. 12. Stereodarstellung der Cofaktoren des M-Zweiges (purpur) und des L-Zweiges (grün); die Phytyleketten sind zur besseren Übersicht weggelassen. Rot: Cofaktoren des M-Zweiges soweit gedreht, daß die Tetrapyrrolringe von BC_{MP} optimal mit denen von BC_{LP} zur Deckung kommen.

Molekülen durch Rotation um -175.8° und bei den BPh-b-Molekülen durch Rotation um -173.2° erreicht. Abbildung 12 zeigt diese Abweichungen von der zweizähligen Symmetrie; hier wurden die Cofaktoren des M-Zweiges so gedreht, daß die Überlagerung der Tetrapyrrolringe des „special pair“ optimal war. Selbstverständlich sind die Atomabstände und die Winkel zwischen den Ebenen wegen der nicht perfekten Symmetrie in den beiden Zweigen unterschiedlich. So ist zum Beispiel der geringste Abstand von Atomen, die an Doppelbindungen beteiligt sind, zwischen „special pair“ und BP_L um 0.7 \AA kürzer als der entsprechende Abstand zwischen „special pair“ und BP_M . Ein weiteres Beispiel sind die Winkel zwischen den Tetrapyrrolringen des „special pair“ und denen der „accessory“-BChl-b-Mole-

elektronischen Eigenschaften des L- und M-Zweiges beitragen. Das Ausmaß an Fehlordnung, definiert durch die Anzahl von Atomen ohne signifikante Elektronendichte, ist im M-Zweig größer als im L-Zweig. Die Phytyleketten von BC_{MA} und BP_M sind an ihren Enden teilweise fehlgeordnet; die von BC_{LA} und BP_L haben dagegen eine andere Konformation und sind wohlgeordnet. Die Anwesenheit des Carotinoids in der Nähe von BC_{MA} könnte zu diesem Unterschied bei den Phytyleketten beitragen, da sie gleichartige Anordnungen der Ketten auf beiden Seiten verhindert.

Ein Maß für die Rigidität der Struktur bieten die während der Strukturverfeinerung erhaltenen atomaren B -Werte. Diese sind im M-Zweig größer als im L-Zweig. Ein Beispiel hierfür ist der Tetrapyrrolring von BP_M mit einem mittleren B -Wert von 21.1 \AA^2 ; bei BP_L beträgt B nur 10.3 \AA^2 .

Hauptursache für die Asymmetrie sind die Unterschiede der Aminosäuresequenz zwischen L- und M-Protein-Untereinheiten, die ja die Pigmente binden. Ihre gesamte Sequenzhomologie beträgt nur 25%^[25]. Obwohl gewisse Schlüsselreste wie die Histidinreste als Liganden der Mg^{2+} -Ionen der BChl-b-Moleküle oder des Nicht-Häm-Eisens konsequent konserviert sind, unterscheiden sich doch die meisten Reste, die mit den Pigmenten wechselwirken, in den beiden Zweigen.

Im folgenden werde ich Details der Proteinumgebung der Pigmente auf dem Weg des Elektrons beschreiben und zusätzliche, für die Funktion möglicherweise entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Zweigen erörtern. Abbildung 13 ist eine „Nahaufnahme“ der direkt am ersten Schritt der lichtgetriebenen Elektronentransferreaktion beteiligten Strukturteile: Sie zeigt das „special pair“ (P), das „accessory“-BChl-b (BC_{LA}) und den ersten Elektronenacceptor (BP_L). Weiterhin sind einige Aminosäurereste, die in engem

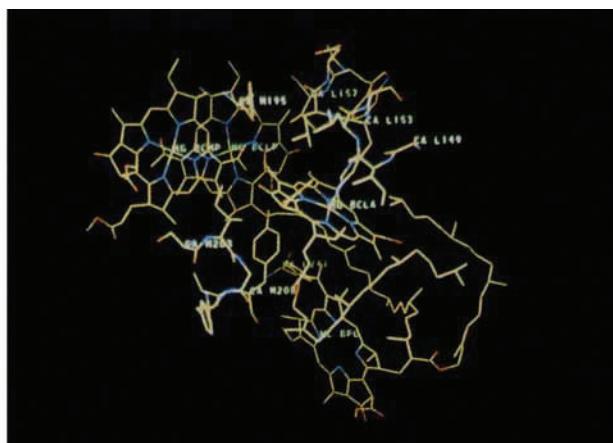
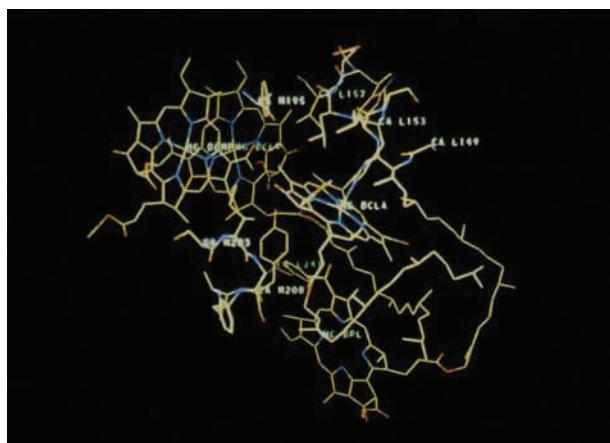


Abb. 13. Stereodarstellung des „special pair“, sowie von BC_{LA} , BP_L und ausgewählten Resten mit farbig markierten Atomen und Bindungen. Farben wie in Abb. 10.

küle: Für BP_L sind die Winkel um etwa 6° kleiner als für BP_M . Eine Folge dieser strukturellen Unterschiede sind Abweichungen der Überlappung der Orbitale, die wiederum in den beiden Zweigen unterschiedliche Elektronentransfer-Eigenschaften erwarten lassen. Dies könnte ein weiterer Beitrag zur „Unidirektionalität“ der Ladungstrennung im Reaktionszentrum sein.

Ein anderer Befund, der unterschiedliche Grad der strukturellen Ordnung, könnte ebenfalls zu den unterschiedlichen

Kontakt mit den Pigmenten stehen, abgebildet. BC_{LA} hat van-der-Waals-Kontakte sowohl mit dem „special pair“ als auch mit BP_L . Der kleinste Abstand zwischen den Tetrapyrrolringen des „special pair“ und BP_L beträgt 10 \AA (Atome von Doppelbindungen). Die Phytylekette von BC_{LP} liegt in einer von BC_{LA} und BP_L gebildeten Spalte; sie hat van-der-Waals-Kontakte mit beiden Tetrapyrrolringen.

Auf den ersten Blick suggeriert diese Pigmentanordnung einen Elektronenfluß von P über BC_{LA} nach BP_L . Versuche,

ein durch vorübergehende Reduktion verursachtes Bleichen der Absorptionsbande von BC_{LA} nachzuweisen, schlugen jedoch fehl. Mit ultraschnellen Lasersystemen durchgeführte spektroskopische Experimente zeigten, daß BP_L ohne Zwischenschritte von P^* reduziert wird^[45, 46, 50]. Dieses Ergebnis war Anlaß zu heftigen Diskussionen über den Mechanismus des Elektronentransfers von P zu BP_L sowie die Rolle von BC_{LA} in diesem Prozeß. Wie Abbildung 13 am Beispiel von Tyrosin M208 zeigt, scheint es plausibel zu sein, daß das Protein nicht nur die Aufgabe hat, als Gerüst die Pigmente zu fixieren, sondern daß es ebenso einen erheblichen Einfluß auf funktionelle Eigenschaften ausübt.

Abbildung 14 zeigt zahlreiche Protein-Pigment-Wechselwirkungen am „special pair“ selbst^[57]. Hierzu zählen auch Bindungen zwischen den N_e -Atomen von Histidin L173 und M200 und den Mg^{2+} -Ionen von BC_{LP} bzw. BC_{MP} . Beide Acetylgruppen des „special pair“ bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäureketten: BC_{LP} mit Histidin

Tryptophanreste stehen in direktem Kontakt mit den Tetrapyrrolringen des „special pair“. Tyrosin L162 befindet sich zwischen dem „special pair“ und der nächstgelegenen Häm-Gruppe (HE3) des Cytochroms; es könnte eine Rolle bei der Reduktion des photooxidierten „special pair“ (P^+) durch Cytochrom spielen^[57].

In Abbildung 15 ist der erste Elektronenacceptor BP_L in seiner Proteinumgebung wiedergegeben^[57]. Die BPh-b-Moleküle werden ausschließlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen in ihren Positionen fixiert. An der Stelle, an der man Histidin-Liganden der BChl-b-Moleküle erwarten würde, findet man bei BP_L Leucin M212 (siehe Abb. 15) und bei BP_M Methionin L184. BP_L bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein. Für eine davon, die zwischen der Ester-Carbonylgruppe des Rings V und Tryptophan L100 gelegene Wasserstoffbrücke, gibt es ein Äquivalent zwischen BP_M und Tryptophan M127. Die andere, die sich zwischen dem Keto-Carbonylsauerstoff des Rings V und Glut-

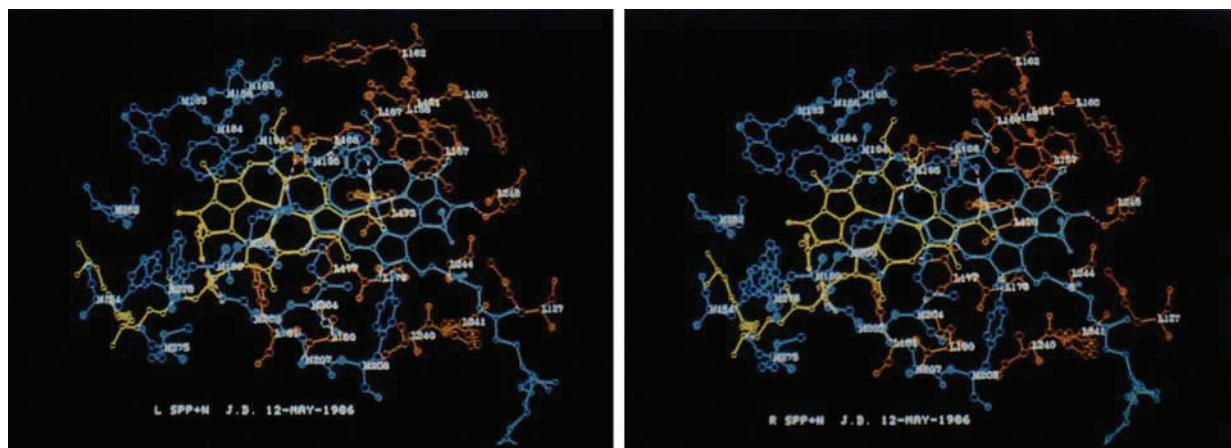


Abb. 14. Stereodarstellung des „special pair“ sowie seiner Proteinumgebung (aus Michel et al. [57]). Braunrot: Reste aus der L-Untereinheit, blau: Reste aus der M-Untereinheit, blaugrün: BC_{LP} , gelb: BC_{MP} . Wasserstoffbrückenbindungen sind purpur gezeichnet. Die Wasserstoffbrücke zwischen Serin M203 und BC_{MP} ist im verfeinerten Modell nicht mehr enthalten.

L168 und BC_{MP} mit Tyrosin M195. BC_{LP} enthält eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Rings V und der OH-Gruppe von Threonin L248; für BC_{MP} existiert keine äquivalente Wasserstoffbrücke.

Die Umgebung des „special pair“ ist reich an aromatischen Resten: fünf Phenylalanin-, drei Tyrosin- und drei

aminoäure L104 befindet, existiert ausschließlich im L-Zweig; der Glutaminsäure L104 entspricht im M-Zweig Valin M131. Glutaminsäure L104 ist in allen L-Untereinheiten der Reaktionszentren aus Purpurbakterien, deren Sequenz bisher bekannt ist, konserviert. Seine Position im Elektronentransferweg deutet stark auf eine Protonierung

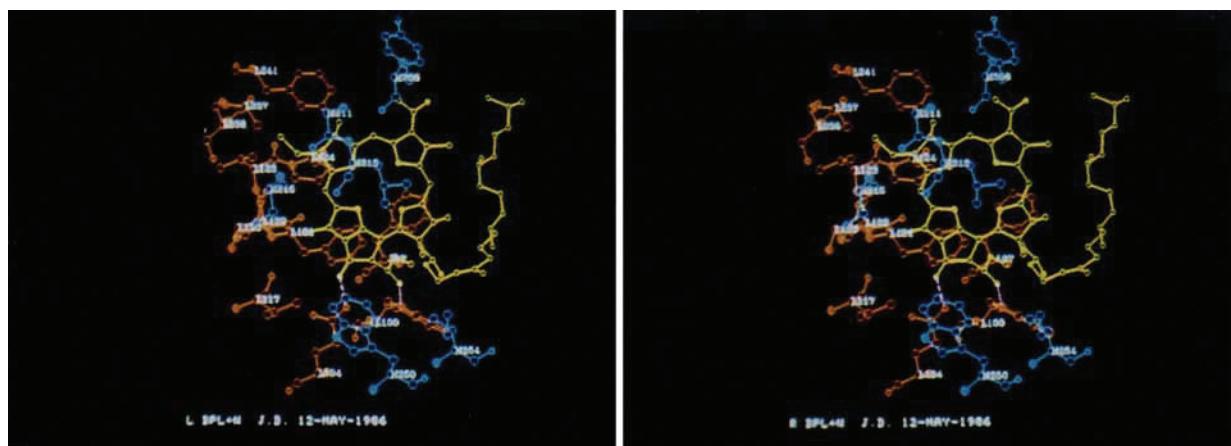


Abb. 15. Stereodarstellung von BP_L (gelb) und seiner Proteinumgebung; Farben wie in Abb. 14.

hin; die negative Ladung der ionisierten Glutaminsäure-Seitenkette würde sonst den Elektronentransfer zu BP_L energetisch äußerst ungünstig machen.

Wie beim „special pair“ findet man auch in der Nachbarschaft der BPh-b -Moleküle eine Reihe aromatischer Reste; ihre Anzahl ist in der Umgebung von BP_L größer als in der von BP_M . Tryptophan M250 ist ein besonders erwähnenswerter aromatischer Rest: Seine Seitenkette bildet eine Brücke zwischen BP_L und dem darauffolgenden Elektronenacceptor Q_A . Dem Tryptophan M250 entspricht im L-Zweig Phenylalanin L216, das wegen der kleineren Seitenkette keine Brückenfunktion zwischen BP_M und Q_B ausüben kann.

Die Umgebung der Chinon-Moleküle und des Nicht-Häm-Eisens^[57] ist in Abbildung 16 dargestellt; anstelle des Chinons wird hier jedoch das Herbizid Terbutryl in der Q_B -Bindungstasche gezeigt. Das Nicht-Häm-Eisen liegt in der Mitte der Abbildung zwischen den Bindungsstellen von Q_A und Q_B sehr nahe an der zentralen lokalen zweizähligen Symmetriechse. Es wird von fünf Proteinseitenketten gebunden: von vier Histidinresten (L190, L230, M217, M264) und Glutaminsäure M232, deren Carboxylatgruppe als zweizähniger Ligand fungiert. Die Liganden um das Eisen-Ion bilden ein verzerrtes Oktaeder; die axialen Liganden sind Histidin L230 und Histidin M264, die äquatorialen Liganden sind Histidin L190, Histidin M217 und Glutaminsäure M232.

Die Histidinreste L190 bzw. M217 tragen wesentlich zur Bindung von Q_B bzw. Q_A bei. Die Position des Eisens sowie seine Bindungen sowohl zur L- als auch zur M-Untereinheit legen nahe, daß es zur Stabilität der Struktur des Reaktionszentrums beiträgt. Überraschend ist die Tatsache, daß es beim Elektronentransfer zwischen den Chinonen anscheinend nur eine untergeordnete Rolle spielt^[58].

Die Kopfgruppe von Q_A ist in einer stark hydrophoben Tasche gebunden; seine Carbonyl-Sauerstoffatome bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den Peptid-NH-Gruppen von Alanin M258 und mit den N_δ -Atomen des am Eisen gebundenen Histidins M217. Wie oben schon erwähnt, bildet Tryptophan M250 einen Teil der Q_A -Bindungstasche; sein Indolring liegt mit einem Abstand von 3.1 Å nahezu parallel zur Kopfgruppe von Q_A . Die Isoprenoid-Seitenkette von Q_A liegt entlang der Oberfläche des L-M-Komplexes; die letzten drei Isoprenoid-Einheiten sind im Kristall fehlgeordnet. Die Q_A -Bindungstasche ist durch die globuläre Domäne der H-Untereinheit gut vom Cytoplasma abgeschirmt.

Die Q_B -Bindungsstelle ist in den Kristallen des Reaktionszentrums nur teilweise besetzt; deshalb ist das Modell für Q_B weniger zuverlässig als für die anderen oben diskutierten Teile des Strukturmodells. Trotzdem legen die kristallographischen Daten eine höchst plausible Anordnung der Q_B -Kopfgruppe in der Bindungstasche nahe; die Lage der Q_B -Seitenkette bleibt jedoch undefiniert. Anscheinend geht Q_B

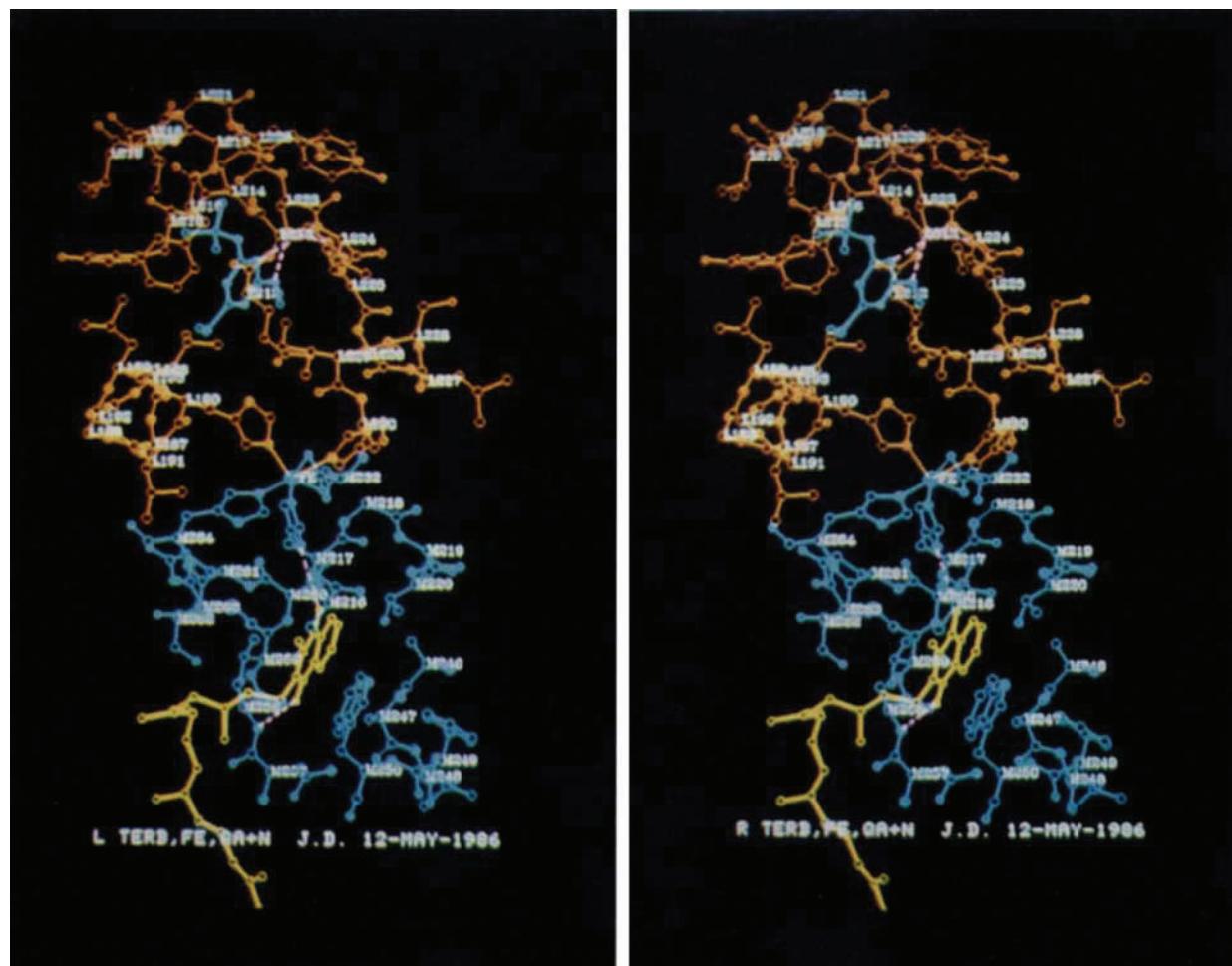


Abb. 16. Stereodarstellung des primären Chinons (Q_A), des Nicht-Häm-Eisens, des Herbizids Terbutryl (blaugrün) in der Q_B -Bindungstasche sowie der Proteinumgebung dieser Cofaktoren; sonstige Farben wie in Abb. 14 (aus Michel et al. [57]).

ähnlich wie Q_A mit seinen beiden Carbonyl-Sauerstoffatomen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein ein: eine mit dem N_δ -Atom des am Eisen gebundenen Histidins L190 und eine gegabelte Wasserstoffbrückenbindung zur OH-Gruppe von Serin L223 und zur NH-Gruppe von Glycin L225. Wie Tryptophan M250 bei Q_A , so bildet Phenylalanin L216 einen wesentlichen Teil der Q_B -Bindungstasche. Die Hauptunterschiede zwischen der Q_B - und der Q_A -Bindungstasche sind die größere Polarität der Q_B -Tasche und die Existenz von Wegen durch welche Protonen das Protein durchqueren und die Q_B -Region erreichen können. Der untere Teil der Q_B -Bindungstasche wird größtenteils von der Seitenkette von Glutaminsäure L212 gebildet. Protonen können aus dem Cytoplasma auf einem durch geladene oder polare Reste charakterisierten Weg zu Glutaminsäure L212 und von dort über einen bis jetzt unbekannten Mechanismus zum doppelt reduzierten Q_B^{2-} gelangen.

Einige Herbizide sind kompetitive Inhibitoren der Q_B -Bindung in Reaktionszentren von Purpurbakterien. Kristallographische Bindungsstudien mit dem Herbizid Terbutryn (siehe Abb. 16) und mit *o*-Phenanthrolin^[57, 59] zeigten die Bindung dieser Moleküle in der Q_B -Bindungstasche und lieferten die strukturelle Basis für das Verständnis der Mutationen, die zu herbizidresistenten *Rps.-viridis*-Stämmen führen^[60, 61]. Die Tatsache, daß Herbizide, die zur Hemmung des Reaktionszentrums vom Photosystem II grüner Pflanzen entwickelt worden waren, auch die Reaktionszentren der Purpurbakterien hemmen, ist einer der vielen Hinweise auf die enge strukturelle Verwandtschaft zwischen den beiden Arten photosynthetischer Reaktionszentren (siehe auch Abschnitt 4 und^[62]).

4. Die Verwandtschaft mit dem Photosystem II und evolutionäre Aspekte

4.1. Schlußfolgerungen im Hinblick auf die Struktur des Reaktionszentrums vom Photosystem II

Das erstaunlichste Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse war die Entdeckung der nahezu symmetrischen Anordnung des zentralen Teils des Reaktionszentrums, der aus den homologen L- und M-Untereinheiten zusammen mit den Pigmenten besteht. Der primäre Elektronendonator sowie das Nicht-Häm-Eisen(II) sind an der Grenzfläche zwischen beiden Untereinheiten zu finden. Beide Untereinheiten werden gebraucht, um das Reaktionszentrum aufzubauen.

Parallel zu unserer Röntgenstrukturanalyse wurden die folgenden Ergebnisse verfügbar, die eine enge Verwandtschaft zwischen den Reaktionszentren von Purpurbakterien und dem Photosystem II nahelegen:

1) Das Reaktionszentrum des Photosystems II der Pflanze enthält wie das Reaktionszentrum der Purpurbakterien zwei Phäophytin-Moleküle^[32, 63]. Nach Entfernung oder Vorreduktion der Chinone wird es möglich, ein Elektron in einem Phäophytin abzufangen^[64, 65]. 2) Beide Reaktionszentren enthalten einen magnetisch gekoppelten Q_A -Fe- Q_B -Komplex. 3) Die L-Untereinheit des Reaktionszentrums der Purpurbakterien und das D1-Protein (das Produkt des psbA-Gens; auch Q_B -Protein, 32 kD-Protein oder Herbizid-bindendes Protein genannt) binden das Herbizid Azoatrazin bei Photoaffinitätsmarkierung^[66, 67]. 4) Schwache, aber

signifikante Sequenzhomologien zwischen L- und M-Untereinheiten der Purpurbakterien^[25, 57, 68-70] und dem D1-^[71] und später auch dem D2-Protein^[72-75] des Photosystems II wurden entdeckt.

Die Bedeutung der Ergebnisse lag auf der Hand: Man mußte erwarten, daß das Reaktionszentrum des Photosystems II von Pflanzen und Algen von D1- und D2-Proteinen gebildet wird, wobei D1 der L-Untereinheit und D2 der M-Untereinheit entspricht. Dieser Vorschlag wichen von der allgemein akzeptierten Meinung ab^[76], daß nämlich das sogenannte CP47, ein Chlorophyll-bindendes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 47000, das Apoprotein des Reaktionszentrums von Photosystem II ist. Abbildung 17 vergleicht die Aminosäuresequenzen der L- und M-Untereinheiten von zwei Purpurbakterien mit denen der D1- bzw. D2-Proteine aus Spinatchloroplasten. Eine signifikante Sequenzhomologie beginnt mit dem Glycin-Glycin-Paar (L83, 84; M110, 111) am Beginn der zweiten Transmembran-Helix. Es sind hauptsächlich Aminosäuren von struktureller Bedeutung wie Glycin, Prolin und Arginin konserviert. Ein Teil der an der Bindung von Pigmenten und Cofaktoren beteiligten Aminosäuren sind ebenfalls konserviert: die Histidin-Liganden der Magnesium-Atome in den „special pair“-Chlorophyll-Molekülen (L173, M200) und des Nicht-Häm-Eisenatoms. In der L-Untereinheit und im D1-Protein findet man ein Phenylalanin (L216, D1-255) und ein Serin (L223, D1-264) in den entsprechenden Sequenzpositionen. Diese Reste sind an der Bindung von *s*-Triazin-Herbiziden wie Atrazin oder Terbutryn beteiligt. Wahrscheinlich wirken sie, indem sie mit dem sekundären Chinon Q_B um seine Bindungsstelle konkurrieren. Mutationen dieser Aminosäuren führen in Purpurbakterien, Pflanzen und Algen zu Herbizidresistenz. Die Phenylalaninreste L216 und D1-255 entsprechen den Tryptophanresten M250 und D2-254, die den entscheidenden Teil der Bindungsstellen des primären Chinons Q_A bilden (siehe Abschnitt 3.5).

Es gibt jedoch mehrere wesentliche Unterschiede zwischen dem Reaktionszentrum des Photosystems II und dem der Purpurbakterien: Die Aminosäuren, die an der Bindung der „accessory“-Bakteriochlorophyll-Moleküle in den Purpurbakterien beteiligt sind, und Glutaminsäure M232, ein zweizähniger Ligand des Nicht-Häm-Eisen-Ions, sind nicht konserviert. Außerdem gibt es keinen Hinweis, daß im Reaktionszentrum des Photosystems II ein Analogon zur H-Untereinheit existiert. Trotzdem muß der zentrale Teil des Reaktionszentrums vom Photosystem II dem von L- und M-Untereinheiten gebildeten Reaktionszentrum der Purpurbakterien insgesamt sehr ähnlich sein. Abbildung 18 zeigt die Helices, die wahrscheinlich die zentralen Teile des Reaktionszentrums der Purpurbakterien und des Photosystems II bilden, und die Positionen der Aminosäuren, die zwischen den L- und M-Untereinheiten sowie den D1- und D2-Proteinen konserviert sind. Die Identität von Aminosäuren, die spezifisch in den L-Untereinheiten und entsprechenden Positionen der D1-Proteine oder nur in den M-Untereinheiten und entsprechenden Positionen der D2-Proteine gefunden werden und an der Chinonbindung beteiligt sind, könnte das Ergebnis konvergenter Evolution sein. Ihre Positionen werden ebenfalls gezeigt.

Der photooxidierte primäre Elektronendonator (P^+) im Reaktionszentrum von *Rhodopseudomonas viridis* wird durch die Cytochrom-Untereinheit reduziert. An der Stelle,

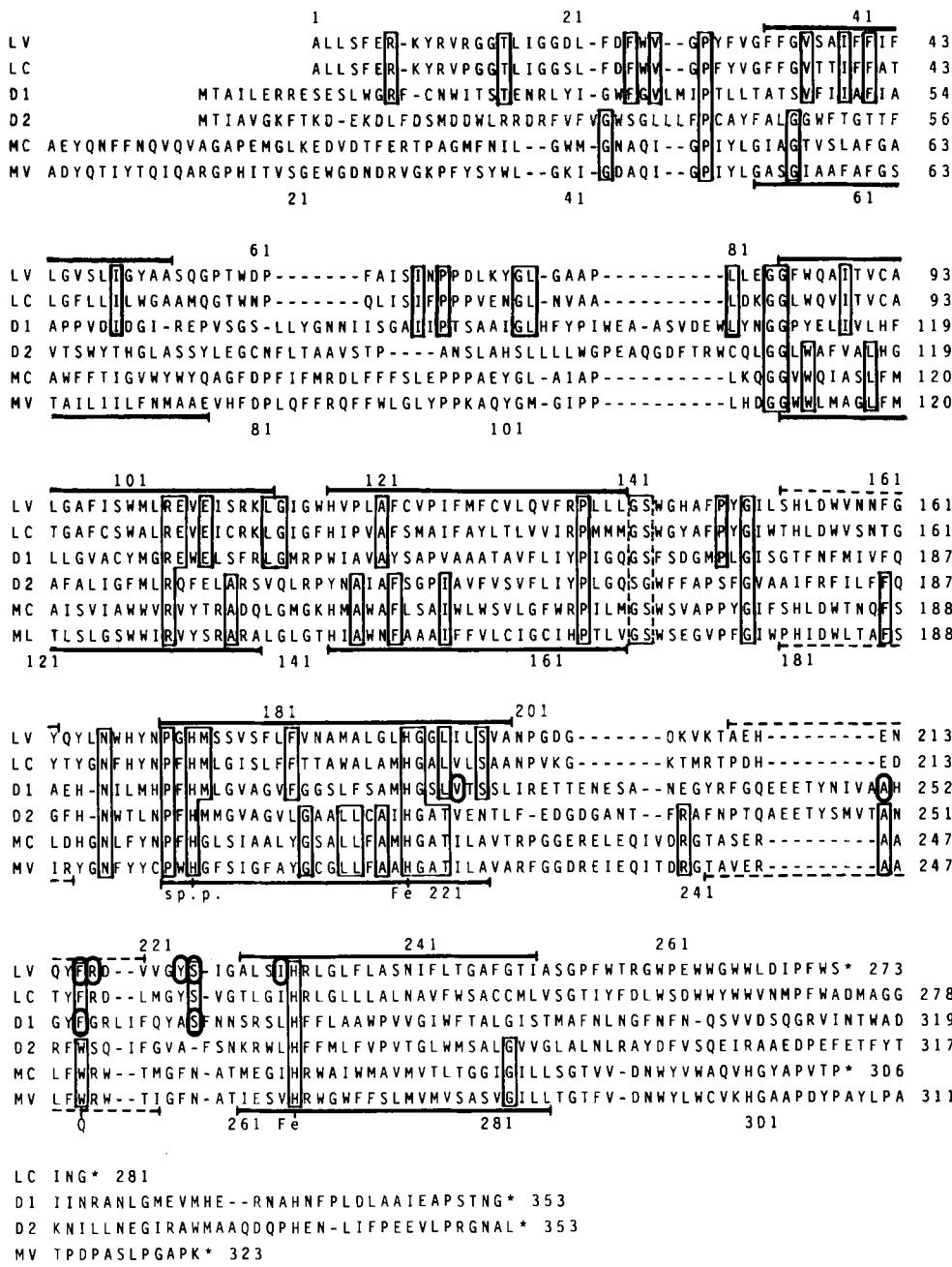


Abb. 17. Die Aminosäuresequenz der L- und M-Untereinheiten der Purpurbakterien *Rps. viridis* (LV, MV) [25] und *Rb. capsulatus* (LC, MC) [70] sowie des D1- und D2-Proteins. Aminosäuren, die allen sechs Untereinheiten gemeinsam sind oder die in den L-Untereinheiten und D1 oder den M-Untereinheiten und D2 übereinstimmen, sind eingerahmt. Die Position der Transmembran-Helices im Reaktionszentrum von *Rps. viridis* ist durch Balken über der Sequenz der L-Untereinheiten und unter der der M-Untereinheiten angedeutet. Die Position der kurzen α -Helices in den Verbindungsstücken der Transmembran-Helices C und D sowie D und E werden durch gestrichelte Linien markiert. Die Histidin-Liganden der „special pair“-Bakteriochlorophyll-Moleküle und des Nicht-Häm-Eisenatoms sind mit „sp.p.“ bzw. „Fe“ markiert. Kreise zeigen Aminosäuren an, die in Herbizid-resistenten Reaktionszentren von Purpurbakterien oder im Photosystem II mutiert sind (aus Michel und Deisenhofer [62]).

die der Cytochrom-Untereinheit äquivalent ist, müssen wir uns im Photosystem II die wasserlöslichen Proteine vorstellen, die am Mangan enthaltenden, Sauerstoff freisetzenden Komplex beteiligt sind. Der experimentelle Beweis für die Existenz eines ähnlichen zentralen Bereichs im Reaktionszentrum des Photosystems II ist die kürzlich gelungene Isolierung eines Komplexes aus Spinatchloroplasten, der aus den Proteinen D1 und D2 sowie Cytochrom b559 besteht und vier bis fünf Chlorophyll- sowie zwei Phäophytin-Moleküle enthält^[77]. Es wurde gezeigt, daß der Komplex lichtgetriebenen Elektronentransport zum Phäophytin katalysiert. Vor kurzem wurde von zwei Arbeitsgruppen nachgewiesen, daß ein Tyrosinrest der D1-Untereinheit in der dritten Transmembran-Helix ein zwischengeschalteter Elektronenüberträger zwischen dem primären Elektronendonator des Photosystems II und dem Sauerstoff entwickelnden Mangankomplex ist^[78-80]. Gegenwärtig wird darüber spekuliert, ob nicht auch der Mangankomplex an die D1- und D2-Proteine gebunden ist.

Durch die Arbeit am bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentrum haben sich auch die Ansichten über die Reaktionszentren des Photosystems II von Pflanzen und Algen geändert.

4.2. Evolutionäre Aspekte

Die oben beschriebenen Sequenzähnlichkeiten legen nahe, daß die Reaktionszentren der Purpurbakterien und des Photosystems II evolutionär miteinander verwandt sind. Ein gemeinsamer Vorfahre besaß ein völlig symmetrisches Reaktionszentrum mit zwei sich über die Membran erstreckenden elektronentransportierenden Pigmentzweigen. Dieses symmetrische Reaktionszentrum wurde von zwei durch ein Gen codierten Kopien derselben Protein-Untereinheit gebildet, was also ein Homodimer. Nach einer Genverdopplung und darauffolgenden Mutationen wurde die Bildung des asymmetrischen Dimers („Heterodimer“) und die Verwendung

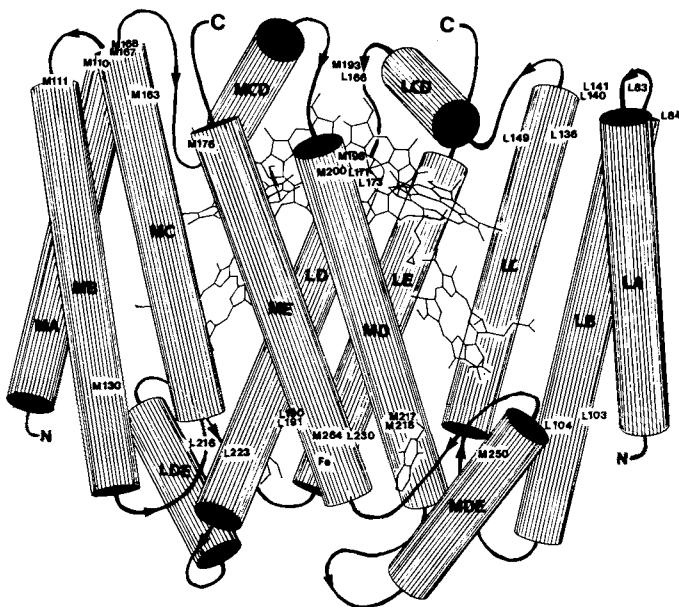


Abb. 18. Säulenmodell des zentralen Bereichs des Reaktionszentrums von *Rps. viridis*. Es werden nur Helices gezeigt, die wahrscheinlich im Reaktionszentrum des Photosystems II konserviert sind. Die Verbindungsstücke zwischen den Helices sind nur schematisch angedeutet. Die Transmembran-Helices der L-(M-)Untereinheit sind mit LA - LE (MA - ME) und die der größeren Helices in den Verbindungsstücken mit LCD (MCD) und LDE (MDE) gekennzeichnet. Die „special pair“-Bakteriochlorophyll-Moleküle befinden sich zwischen den L- und M-Untereinheiten (D- und E-Helices), die Bakteriophäophytin-Moleküle in der Nähe der C-Helices. Die Bindungsstelle für Q_B liegt zwischen den LDE- und LD-Helices. Die Positionen der Aminosäuren, die zwischen allen L- und M-Untereinheiten und den D1- und D2-Proteinen konserviert sind, wurden durch ihre Sequenznummern angedeutet, ebenso die Positionen der Aminosäuren, die an der Chinonbindung beteiligt und konserviert sind (aus Michel und Deisenhofer [62]).

nur eines der Pigmentzweige für den Elektronentransfer möglich. Es ist eine offene Frage, ob sich diese Genduplikation in der Evolution nur einmal ereignete (vor der Trennung der Vorfahren der Purpurbakterien und der Organismen, die das Photosystem II enthalten) oder zweimal, nach der Trennung in diese beiden Richtungen. Im letzteren Falle wären die spezifischen Übereinstimmungen der Sequenz zwischen L und D1 sowie zwischen M und D2 das Resultat konvergenter Evolution, wobei die Sequenzidentität der für die Struktur wichtigen Aminosäuren auf das ursprüngliche symmetrische Dimer zurückginge. Sequenzvergleiche fallen zugunsten der zweiten Möglichkeit aus (siehe^[81]): Die D1- und D2-Proteine haben wesentlich ähnlichere Sequenzen als die L- und M-Untereinheiten. Diese Beobachtung kann als Hinweis gewertet werden, daß die für die Trennung von D1- und D2-Proteinen maßgebliche Genduplikation später in der Evolution auftrat als die zu den L- und M-Untereinheiten führende. Andererseits hatten wahrscheinlich die D1- und D2-Proteine aufgrund der häufigeren und stärkeren Wechselwirkungen mit den benachbarten Proteinen weniger Freiheit zu mutieren als die L- und M-Untereinheiten. Sequenzvergleiche allein führen deshalb möglicherweise in die Irre.

Diese evolutionären Beziehungen deuten ferner darauf hin, daß es für ein Reaktionszentrum vorteilhaft sein muß, nur eine aktive Elektronentransportkette mit zwei hintereinander geschalteten Chinonen zu haben. Die Erklärung für den Gebrauch nur eines Zweiges könnte sehr trivial sein: z. B. könnte eine Asymmetrie in der Proteinumgebung eine Asymmetrie in der Verteilung der Elektronen im angeregten

Zustand verursachen und schließlich dazu führen, daß bei der Freisetzung des Elektrons eine Richtung bevorzugt wird. Diese existierende Polarität könnte so den ersten Elektronentransferschritt beschleunigen, konkurrierende Reaktionen minimieren und die Quantenausbeute des Elektronentransfers erhöhen.

Ein deutlicher Vorteil der heutigen Reaktionszentren liegt darin, daß die beiden Chinone hintereinander geschaltet sind und nur das nicht fest gebundene sekundäre Chinon, Q_B , ein Zwei-Elektronenüberträger ist. Betrachten wir die Situation der ursprümlichen symmetrischen Reaktionszentren genauer: Nach der ersten Anregung wird das Elektron zum Chinon am Ende des einen Pigmentzweiges transferiert. Das daraus entstehende Semichinon ist nicht stabil und verliert sein Elektron innerhalb von Sekunden. Nur wenn es ein zweites Elektron erhält, kann es protoniert werden und Energie in Form des Chinols speichern. Bei zwei gleichen parallelen Elektronentransferketten beträgt die Wahrscheinlichkeit, daß das zweite Elektron durch die gleiche Kette auf das gleiche Chinon wie das erste Elektron übertragen wird, nur 50%. Dieser Wert könnte durch eine mögliche elektrostatische Abstoßung durch das negativ geladene Semichinon-Anion noch verringert werden. Häufig dürfte deshalb die Absorption von zwei Photonen zur Bildung zweier Semichinon-Anionen am Ende der beiden parallelen Pigmentzweige im gleichen Reaktionszentrum führen – ohne Speicherung der Energie in stabiler Form! Ein Weg, der aus diesem Dilemma herausführt und der offensichtlich in den Reaktionszentren der Purpurbakterien und des Photosystems II verwirklicht ist, besteht im Hintereinanderschalten beider Chinone, begleitet von Mutationen, die Protonierung und Austausch nur für das letzte Chinon in der Elektronentransferkette zulassen. Durch dieses Hintereinanderschalten der beiden Chinone und das Differenzieren in Q_A und Q_B wird die Effizienz der Lichtenergiemwandlung, besonders bei Lichtmangel, beträchtlich gesteigert.

5. Das Reaktionszentrum als Membranprotein-Komplex

5.1. Der Membrananker der Cytochrom-Untereinheit

Die Röntgenstrukturanalyse zeigte, daß die L- und M-Untereinheiten beide fünf Transmembran-Helices enthalten und fest in die Membran integriert sind, während die H-Untereinheit durch eine Transmembran-Helix in der Membran verankert ist. Für die Cytochrom-Untereinheit ergab die Röntgenstrukturanalyse keinen Hinweis auf Strukturelemente in der Membran. Trotzdem verhielt es sich in der Hand der Biochemiker wie ein Membranprotein und aggrigierte leicht. Eine eigentümliche Beobachtung wurde bei der Proteinsequenzierung gemacht: Beim Edman-Abbau der isolierten Cytochrom-Untereinheit konnte nach dem ersten Schritt keine N-terminale Aminosäure identifiziert werden. Danach ließ sich das Protein normal weitersequenzieren; die erhaltene Sequenz begann mit der zweiten Aminosäure vom N-Terminus. K. A. Weyer konnte nun mit der Hilfe von F. Lottspeich eine modifizierte amino-terminale Aminosäure isolieren und ihre Struktur zusammen mit W. Schäfer massenspektrometrisch aufklären^[40, 82]. Abbildung 19 zeigt das

Ergebnis: Die *N*-terminale Aminosäure ist ein Cystein, das über eine Thioether-Brücke mit einem Glycerinrest verbun-

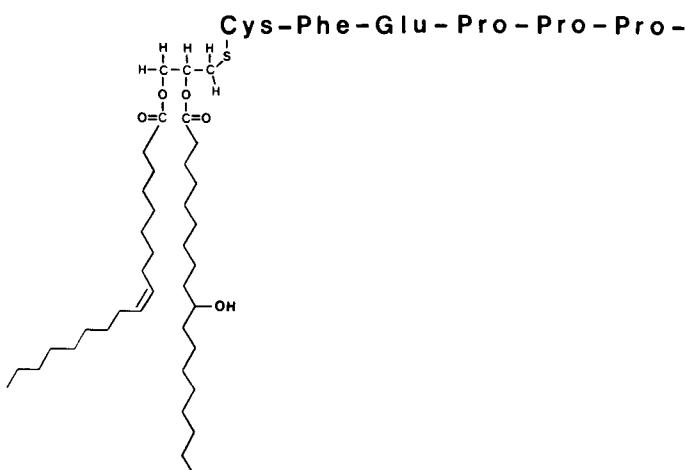


Abb. 19. Der *N*-Terminus der Cytochrome-b Untereinheit. Zwei Fettsäuren sind mit dem *N*-terminalen *S*-Glycerylcystein verestert. Die Fettsäuren sind ein Gemisch aus 18:OH (zwei Isomere) und 18:1 (drei Isomere) etwa im Verhältnis 1:1. In der Abbildung werden sie durch Ölsäure und 10-Hydroxystearinsäure repräsentiert (aus Weyer et al. [82]).

den ist. Zwei Fettsäuren sind mit den beiden restlichen OH-Gruppen des Glycerins verestert. Die Fettsäuren sind ein statistisches Gemisch aus einfach ungesättigten und einfach hydroxylierten C₁₈-Fettsäuren. Diese Experimente bewiesen eindeutig, daß die Cytochrome-b Untereinheit ebenfalls einen Membrananker hat, der jedoch einen lipidartigen und keinen proteinartigen Charakter hat. Dieser Membrananker ist dem der bakteriellen Lipoproteine sehr ähnlich (siehe z. B. [83, 84]). Die Cytochrome-b Untereinheit des Reaktionszentrums ist das erste Cytochrome-b-Molekül, von dem man weiß, daß es einen solchen Membrananker enthält.

5.2. Protein-Lipid-Wechselwirkung

Die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Protein findet an der Oberfläche der Proteine statt. Deshalb sollte eine genauere Betrachtung der Oberfläche des Proteinkomplexes sehr informativ sein. Zu diesem Zweck wird in Abbildung 20a ein Kalottenmodell des Reaktionszentrums gezeigt; Kohlenstoffatome an der Oberfläche des Reaktionszentrums sind als weiße Kugeln dargestellt. Senkrecht zur zentralen lokalen Symmetriechse ist eine zentrale Schicht zu

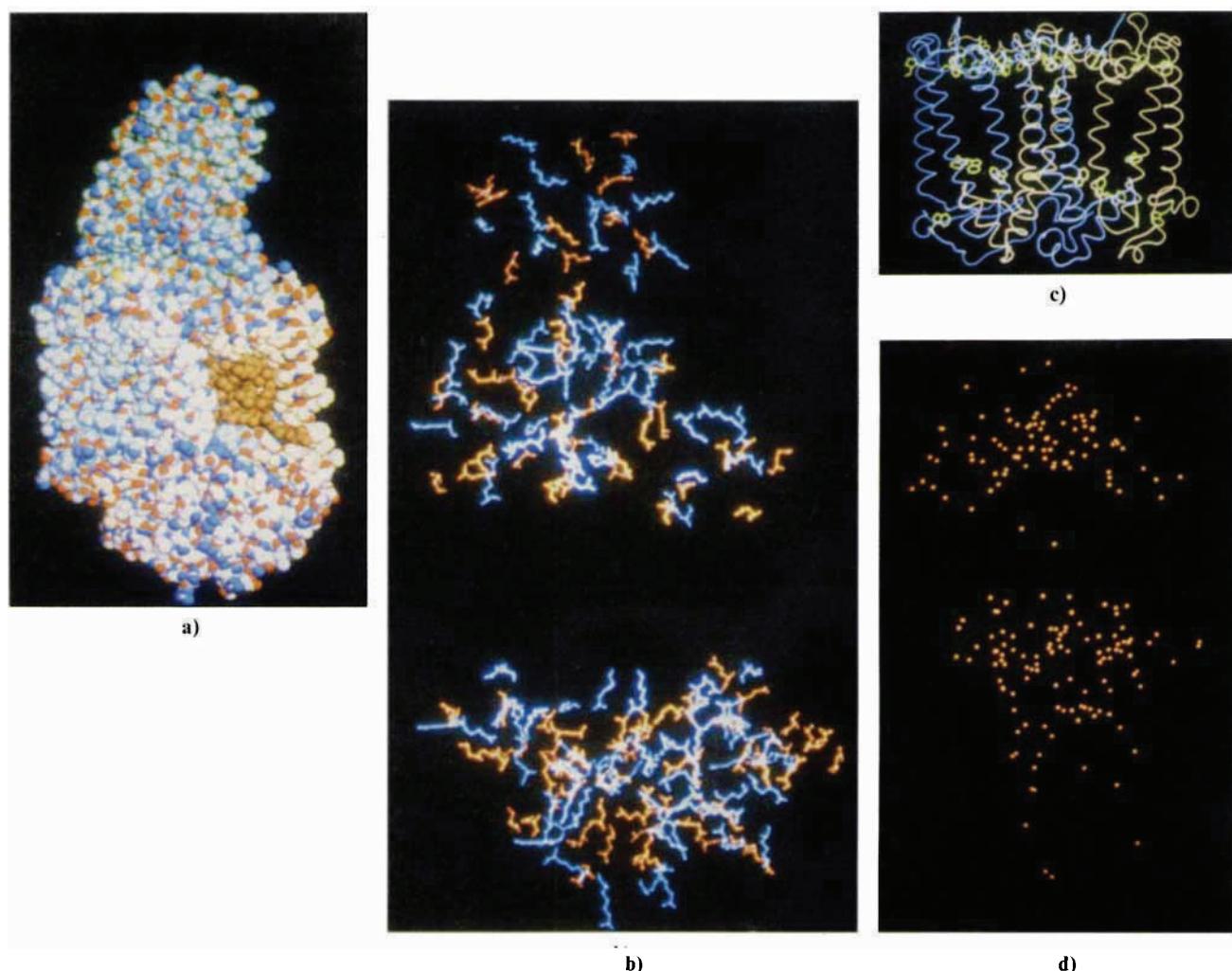


Abb. 20. a) Kalottenmodell des photosynthetischen Reaktionszentrums von *Rps. viridis*. Kohlenstoffatome sind weiß, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot und Schwefelatome gelb dargestellt. Die an der Proteinoberfläche sichtbaren Atome eines Bakteriophäophytin-Moleküls sind braun markiert. b) Verteilung der „geladenen“ Aminosäuren im photosynthetischen Reaktionszentrum. Die negativ geladenen Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) sind rot, die positiv geladenen Aminosäuren (Arginin, Lysin) blau dargestellt. c) Verteilung der Tryptophanreste (gelbgrün) in den L- (bräunlich) und M-Untereinheiten (blau). d) Verteilung der gebundenen Wassermoleküle im Reaktionszentrum. Die Blickrichtung auf das Reaktionszentrum und die L- und M-Untereinheiten verläuft parallel zur Membran.

erkennen, in der die Oberfläche des Proteins nahezu ausschließlich aus Kohlenstoffatomen besteht. Dort wird die Oberfläche des Proteins in der Hauptsache aus Seitenkettenatomen der Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Phenylalanin gebildet. Diese zentrale Schicht muß dem hydrophoben Teil der Proteinoberfläche, der in der Membran Kontakt mit den Alkanketten der Lipide hat, entsprechen. Nähert man sich dem cytoplasmatischen Rand dieser zentralen Schicht, so wird eine annähernd lineare Kette von (blauen) Stickstoffatomen an der Proteinoberfläche sichtbar. Diese Stickstoffatome sind Seitenkettenatome der basischen Aminosäuren Arginin und Histidin. Diese basischen Reste könnten dazu dienen, die Position des Reaktionszentrums senkrecht zur Membran durch spezifische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Phosphatgruppen der Lipide festzulegen.

Abbildung 21 zeigt den Prozentsatz der von Kohlenstoffatomen eingenommenen „zugänglichen Oberfläche“ als

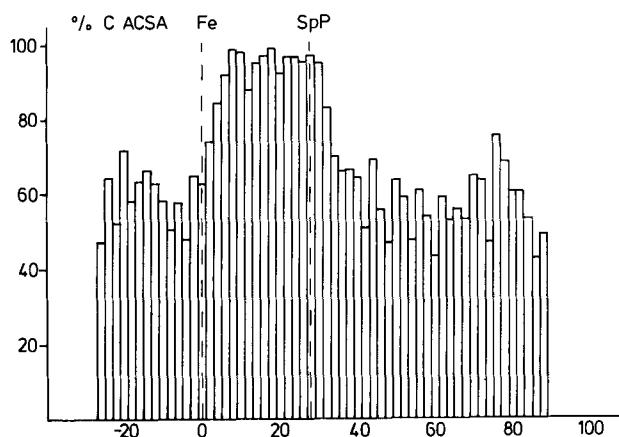


Abb. 21. Prozentsatz der mit Kohlenstoffatomen besetzten zugänglichen Oberfläche (ACSA). Er wurde für 3 Å dicke Schichten senkrecht zur nicht-kristallographischen zentralen lokalen zweizähligen Achse berechnet, die durch das Nicht-Häm-Eisenatom („Fe“) und das „special pair“ („SpP“) läuft.

Schichten senkrecht zur zentralen zweizähligen Rotationsachse. Diese zweizählige Rotationsachse verläuft angenähert durch das Nicht-Häm-Eisenatom in der Nähe der cytoplasmatischen Seite und durch die überlappenden Pyrrolringe der „special pair“-Bakteriochlorophyll-Moleküle nahe der periplasmatischen Seite der Membran. Abbildung 21 läßt zwei wichtige Schlußfolgerungen zu: 1) Der primäre Elektronendonator, das „special pair“, befindet sich im hydrophoben, nicht-polaren Teil der Membran, während das Nicht-Häm-Eisenatom sich bereits in einem Bereich befindet, wo die Proteinoberfläche polar ist, und sehr wahrscheinlich mit den polaren Kopfgruppen der Lipide wechselwirkt. 2) Die Dicke der hydrophoben Schicht senkrecht zur Membran beträgt nur 30 bis 31 Å. Dieser Wert ist kleiner als der, den man für eine aus C₁₈-Fettsäuren aufgebaute Lipid-Doppel-schicht erwarten würde.

5.3. Verteilung von Aminosäuren und gebundenen Wassermolekülen

Abbildung 20b zeigt die Verteilung der stark basischen Aminosäuren Arginin und Lysin und der stark sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure, die bei neu-

tralem pH elektrische Ladungen an den Enden ihrer Seitenketten tragen. Eine zentrale Schicht, in der keine dieser Aminosäuren auftritt, hat eine Dicke von etwa 25 Å und ist somit etwas dünner als der in Abbildungen 20a und 21 gezeigte hydrophobe Oberflächenbereich. Dieser Unterschied beruht auf zwei Argininresten und einem Glutaminsäurerest, die sich offensichtlich in einer hydrophoben Umgebung ohne Gegenladung befinden. Die positiven Ladungen der Arginin-Seitenketten scheinen von struktureller Bedeutung zu sein: Sie neutralisieren wahrscheinlich die negative Partialladung an den Carboxy-terminalen Enden der kurzen de-Helices, die die langen D- und E-Transmembran-Helices verbinden. Diese kurzen de-Helices dringen teilweise in die hydrophobe Schicht der Membran ein, und dort scheint eine positive Ladung nötig zu sein, damit sich die Richtung der Peptidketten ändern kann. Die Glutaminsäure (L104) ist vermutlich protoniert, somit neutral, und bildet eine Wasserstoffbrücke mit einem der Bakteriophäophytin-Moleküle (BP_L)^[57] (siehe auch Abschnitt 3.5).

Innerhalb der L- und M-Untereinheiten zeigen die Glutamat- und Aspartat- sowie die Lysin- und die Argininreste bezüglich der cytoplasmatischen und periplasmatischen Seiten eine interessante asymmetrische Verteilung. Wenn man die „Nettoladungen“ der Peptidketten auf der periplasmatischen Seite der Membran mit denen auf der cytoplasmatischen Seite vergleicht (unter der Annahme, daß alle Glutaminsäurereste, Asparaginsäurereste und Carboxy-Termini negativ, alle Argininreste, Lysinreste und Amino-Termini positiv geladen sind), stellt man fest, daß die cytoplasmatischen Enden der Transmembran-Helices und ihre jeweiligen Verbindungsteile fast immer weniger negativ geladen sind als ihre Gegenstücke auf der periplasmatischen Seite. Dieser Befund ist schematisch in Abbildung 22 dargestellt: Daraus

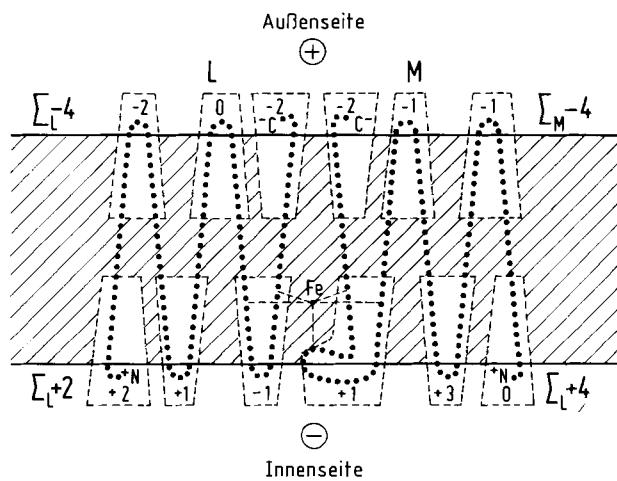


Abb. 22. Schematische Darstellung der Transmembran-Helices und ihrer Verbindungsstücke in den L- und M-Untereinheiten des Reaktionszentrums von *Rps. viridis* in der Membran zur Verdeutlichung der Nettoladungen an den Helixenden einschließlich der Verbindungsstücke. Die negative Ladung des Zelleninneren wird durch das Minus-Zeichen (unten), die positive Ladung des extrazellulären Mediums durch das Pluszeichen (oben) angezeigt (aus Michel und Deisenhofer [85]).

resultierend trägt der cytoplasmatische Teil der M-Untereinheit vier positive, der periplasmatische vier negative, der cytoplasmatische Teil der L-Untereinheit zwei positive und der periplasmatische vier negative Nettoladungen. Diese Ladungsasymmetrie wird noch stärker, wenn man das fest

gebundene Nicht-Häm-Eisenatom auf der cytoplasmatischen Seite und die vermutete Protonierung der Glutaminsäure L104 einbezieht. Somit sind diese Membranproteine starke elektrische Dipole. Dieses Ergebnis kann mit dem Befund korreliert werden, daß das Innere von Bakterien durch die Aktivität elektrogener Ionenpumpen der Zellmembran negativ geladen ist. Das bedeutet, daß die L- und M-Untereinheiten in der Membran in der energetisch günstigeren Richtung (bezüglich innen und außen) orientiert sind. Umgekehrt könnte die Kombination des von den Ionenpumpen verursachten elektrischen Felds über die Membran mit dem (auf der anisotropen Verteilung von negativ und positiv geladenen Aminosäuren beruhenden) elektrischen Dipol der Membranproteine einer der Faktoren sein, die die Orientierung der Membranproteine in der Membran bestimmen.

Die in Abbildung 20c gezeigte, bemerkenswert ungleichmäßige Verteilung der Aminosäure Tryptophan in den L- und M-Untereinheiten war nicht zu erwarten. Etwa zwei Drittel der Tryptophanreste befinden sich an den Enden der Transmembran-Helices und in den helixverbindenden Teilen auf der periplasmatischen Seite. Nur einige wenige Tryptophanreste sind in der hydrophoben Zone zu sehen, wo sie mit Pigmenten wechselwirken. Die restlichen Tryptophanreste befinden sich in der Übergangszone zwischen hydrophober und polarer Oberfläche oder dem polaren Teil der L- und M-Untereinheiten nahe der cytoplasmatischen hydrophoben Oberfläche. Die Indolringe der Tryptophanreste sind bevorzugt in Richtung des hydrophoben Bereichs der Membran orientiert.

In Abbildung 20d ist die Verteilung der gebundenen Wassermoleküle wiedergegeben, die durch Röntgenstrukturanalyse mit einiger Sicherheit identifizierbar waren. Davon sind nur fünf im hydrophoben Bereich der Membran zu finden. Eine genauere Betrachtung zeigt, daß ihnen vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Entstehung oder Aufrechterhaltung der Struktur zukommt. Abbildung 23 zeigt eines dieser

ist noch eine weitere Wasserstoffbrückenbindung mit einer Asparagin-Seitenkette. Wie groß der Beitrag dieser Wassermoleküle zur Stabilität der Struktur des Reaktionszentrums ist, muß noch geklärt werden.

5.4. Kristallpackung und Bindung von Detergentien

Wie in Abschnitt 1 beschrieben, erschien es als vorteilhafteste Strategie, das Reaktionszentrum innerhalb einer Detergens-Micelle zu kristallisieren. Nach diesem Konzept sollte sich das Kristallgitter des Reaktionszentrums durch polare Wechselwirkungen zwischen den polaren Oberflächendomänen des Reaktionszentrums bilden. Diese Erwartung bestätigte sich durch die Ergebnisse der Strukturanalyse: An der Kristallpackung sind hauptsächlich die polaren Oberflächen der Cytochrom-Untereinheit und der H-Untereinheit und nur in geringem Maße der polare Oberflächenteil der M-Untereinheit beteiligt.

Wie für Detergentien in einer Micelle zu erwarten, ist der größte Teil der Detergens-Moleküle kristallographisch nicht geordnet und deshalb in der Elektronendichtekarte, bis auf eine Ausnahme, nicht erkennbar: Die einzelne Transmembran-Helix der H-Untereinheit, zwei Transmembran-Helices der M-Untereinheit und ein Teil der Pigmente scheinen eine Tasche zu bilden, in der ein einzelnes Detergens-Molekül gebunden ist. Seine polare Kopfgruppe geht offensichtlich spezifische Wechselwirkungen mit dem Protein ein, das sich in der Nähe des cytoplasmatischen Endes des hydrophoben Oberflächenbereichs befindet. Die spezifische Bindung dieses einen Detergens-Moleküls könnte erklären, warum Kristalle des photosynthetischen Reaktionszentrums vom *Rhodopseudomonas viridis* nur mit *N,N*-Dimethyldodecylamin-N-oxid als Detergens und nicht mit Octylglucopyranosid oder ähnlichen Detergentien erhalten werden konnten.

In Zusammenarbeit mit *M. Roth* und *A. Bentley-Lewit* vom Institut Laue-Langevin in Grenoble konnten die Detergens-Micellen durch Neutronenbeugungsexperimente und H_2O/D_2O -Kontrastvariation sichtbar gemacht werden (*M. Roth, A. Bentley-Lewit, H. Michel, J. Deisenhofer, R. Huber und D. Oesterhelt, Manuscript eingereicht*). Ein relativ flacher, an eine monomolekulare Schicht erinnernder Ring aus Detergens-Molekülen, die den hydrophoben Oberflächenbereich des Reaktionszentrums umgeben, wurde erkennbar. Bereiche, in denen die Detergens-Micellen miteinander in Kontakt stehen, können ebenfalls beobachtet werden. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß attraktive Wechselwirkungen zwischen Detergens-Micellen ebenfalls zur Stabilität des Kristallgitters beitragen. Generell scheint die Strategie, Membranprotein innerhalb ihrer Detergens-Micellen zu kristallisieren^[8, 86], erfolgreich zu sein, doch war der Fortschritt bei der Kristallisation anderer Membranproteine unerwartet langsam. Nur von bakteriellen photosynthetischen Reaktionszentren und bakteriellen Porinen erhielt man gut beugende Kristalle. Die notwendige Feinabstimmung bezüglich der Größe der Detergens-Micellen, der Größe der polaren Kopfgruppe des Detergens und der Stabilität des Membranproteins ist immer noch eine sehr schwierige Aufgabe, die für jedes einzelne Membranprotein empirisch gelöst werden muß.

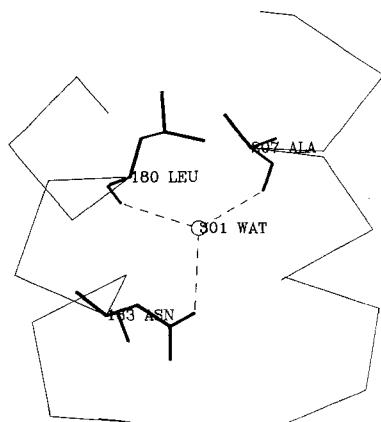


Abb. 23. Ein fest gebundenes Wasser-Molekül (301 WAT) im hydrophoben Bereich der Membran, das zwei Transmembran-Helices durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Peptid-Sauerstoffatomen von Leucin L180 und Alanin M207 verbindet. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung ist zur Seitenkette von Asparagin L183 möglich.

Wassermoleküle und die Wasserstoffbrückenbindungen, die es eingehen kann. Offensichtlich verknüpft es zwei Transmembran-Helices, eine aus der L-Untereinheit, die andere aus der M-Untereinheit, indem es mit zwei Peptid-Sauerstoffatomen Wasserstoffbrückenbindungen bildet. Möglich

Danksagung

Wir möchten uns von ganzen Herzen bei den Personen und Organisationen bedanken, die unsere Arbeit möglich und erfolgreich machten: Unsere Kollegen *Otto Epp, Heidi Grünberg, Friedrich Lottspeich, Kunio Miki, Wolfram Schäfer, Irmgard Sinning, Karl-Alois Weyer und Wolfgang Zinth* trugen wie erwähnt direkt zu den Arbeiten bei. *Dieter Oesterhelt* und *Robert Huber*, ihre Abteilungen und das gesamte Max-Planck-Institut für Biochemie stellten die notwendigen Einrichtungen zur Verfügung und schafften eine stimulierende und unterstützende Atmosphäre. Die von *Dieter Oesterhelt* gewährte Rückendeckung, besonders während den anfänglichen, frustrierenden Phasen, sowie die stabile Umgebung innerhalb der Max-Planck-Gesellschaft erlaubten es, ein Projekt von unbekannter Dauer und mit ungewissem Ausgang anzugehen. Finanziell wurde das Projekt durch den Sonderforschungsbereich 143 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Teilprojekt A 3 (*H.M.*) und Teilprojekt A 6 (*J.D.* und *H.M.*)) sowie durch die Max-Planck-Gesellschaft unterstützt.

Eingegangen am 27. Februar 1989 [A 726]
Übersetzt von *Christiane und Günther Ewald*,
Frankfurt am Main

- [1] M. Hoppe, P. Overath, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72** (1976) 1504–1511.
- [2] R. Henderson, P. N. T. Unwin, *Nature (London)* **257** (1975) 28–32.
- [3] H. Michel, D. Oesterhelt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 1283–1285.
- [4] a) H. Michel, *EMBO J.* **1** (1982) 1267–1271; b) *J. Mol. Biol.* **158** (1982) 567–572.
- [5] D. Oesterhelt, W. Stoeckenius, *Nature New Biol.* **233** (1971) 149–152.
- [6] D. Oesterhelt, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353** (1972) 1554–1555.
- [7] H. Michel, D. Oesterhelt, R. Henderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 338–342.
- [8] H. Michel, *Trends Biochem. Sci. Pers. Ed.* **8** (1983) 56–59.
- [9] F. S. Mathews, P. Argos, M. Levine, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **36** (1972) 387–397.
- [10] I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature (London)* **289** (1981) 366–373.
- [11] J. N. Varghese, W. G. Laver, P. M. Colman, *Nature (London)* **303** (1983) 35–40.
- [12] P. J. Björkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, D. C. Wiley, *Nature (London)* **329** (1987) 506–512.
- [13] M. Zulafia, K. Weckström, J. B. Hayter, V. Degeorgio, M. Corti, *J. Phys. Chem.* **89** (1985) 3411–3417.
- [14] R. M. Garavito, J. P. Rosenbusch, *J. Cell Biol.* **86** (1980) 327–329.
- [15] W. Baumeister, W. Vogell (Hrsg.): *Electron Microscopy at Molecular Dimensions*, Springer, Berlin 1980.
- [16] R. K. Clayton, B. J. Clayton, *Biochim. Biophys. Acta* **501** (1978) 478–487.
- [17] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *J. Mol. Biol.* **180** (1984) 385–398.
- [18] P. Schwager, K. Bartels, A. Jones, *J. Appl. Crystallogr.* **8** (1975) 275–280.
- [19] T. A. Jones, K. Bartels, P. Schwager in U. W. Arndt, A. J. Wonacott (Hrsg.): *The Rotation Method in Crystallography*, North Holland, Amsterdam 1977, S. 105–117.
- [20] M. G. Rossmann, *J. Appl. Crystallogr.* **12** (1979) 225–238.
- [21] M. F. Schmid, L. H. Weaver, M. A. Holmes, M. G. Gruetter, D. H. Ohlendorf, R. A. Reynolds, S. J. Remington, B. W. Mathews, *Acta Crystallogr. Sect. A* **37** (1981) 701–710.
- [22] B. C. Wang, *Meth. Enzymol.* **115** (1985) 90–112.
- [23] H. Michel, J. Deisenhofer, K. Miki, K. A. Weyer, F. Lottspeich in E. Quagliariello, F. Palmieri (Hrsg.): *Structure and Function of Membrane Proteins*, Elsevier, Amsterdam 1983, S. 191–197.
- [24] H. Michel, K. A. Weyer, H. Grünberg, F. Lottspeich, *EMBO J.* **4** (1985) 1667–1672.
- [25] H. Michel, K. A. Weyer, H. Grünberg, I. Dunger, D. Oesterhelt, F. Lottspeich, *EMBO J.* **5** (1986) 1144–1158.
- [26] K. A. Weyer, F. Lottspeich, H. Grünberg, F. Lang, D. Oesterhelt, H. Michel, *EMBO J.* **6** (1987) 2197–2202.
- [27] T. A. Jones, *J. Appl. Crystallogr.* **11** (1978) 268–272.
- [28] A. Jack, M. Levitt, *Acta Crystallogr. Sect. A* **34** (1978) 931–935.
- [29] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *Nature (London)* **318** (1985) 618–624.
- [30] D. E. Tronrud, L. F. Ten Eyck, B. W. Mathews, *Acta Crystallogr. Sect. A* **43** (1987) 489–501.
- [31] P. V. Luzzati, *Acta Crystallogr.* **5** (1952) 802–810.
- [32] G. Feher, M. Y. Okamura, in R. K. Clayton, W. R. Sistrom (Hrsg.): *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York 1978, S. 349–386.
- [33] M. Y. Okamura, G. Feher, W. Nelson in Govindjee (Hrsg.): *Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*, Vol. 1, Academic Press, New York 1982, S. 195–272.
- [34] J. P. Allen, G. Feher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (1984) 4795–4799.
- [35] C. H. Chang, M. Schiffer, D. Tiede, U. Smith, J. Norris, *J. Mol. Biol.* **186** (1985) 201–203.
- [36] 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.
- [37] C. H. Chang, D. Tiede, J. Tang, U. Smith, J. Norris, M. Schiffer, *FEBS Lett.* **205** (1986) 82–86.
- [38] M. E. Newcomer, T. A. Jones, J. Aqvist, J. Sundelin, U. Eriksson, I. Rask, P. A. Peterson, *EMBO J.* **3** (1984) 1451–1454.
- [39] R. Huber, M. Schneider, O. Epp, I. Mayr, A. Messerschmidt, J. Pflugrath, H. Kayser, *J. Mol. Biol.* **195** (1987) 423–434.
- [40] K. A. Weyer, W. Schäfer, F. Lottspeich, H. Michel, *Biochemistry* **26** (1987) 2909–2914.
- [41] P. Gast, T. J. Michalski, J. E. Hunt, J. R. Norris, *FEBS Lett.* **179** (1985) 325–328.
- [42] W. W. Parson, B. Ke in Govindjee (Hrsg.): *Photosynthesis: Energy Conversion by Plants and Bacteria*, Vol. 1, Academic Press, New York 1982, S. 331–384.
- [43] W. W. Parson, in J. Amesz (Hrsg.): *New Comprehensive Biochemistry: Photosynthesis*, Elsevier, Amsterdam 1987, S. 43–61.
- [44] C. Kirmaier, D. Holton, *Photosynth. Res.* **13** (1987) 225–260.
- [45] J. Breton, J. L. Martin, A. Migué, A. Antonetti, A. Orszag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 5121–5125.
- [46] G. R. Fleming, J. L. Martin, J. Breton, *Nature (London)* **333** (1988) 190–192.
- [47] W. Zinth, W. Kaiser, H. Michel, *Biochim. Biophys. Acta* **723** (1983) 128–131.
- [48] W. Zinth, E. W. Knapp, S. F. Fischer, W. Kaiser, J. Deisenhofer, H. Michel, *Chem. Phys. Lett.* **119** (1985) 1–4.
- [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] C. Kirmaier, D. Holten, W. W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta* **810** (1985) 49–61.
- [51] C. Kirmaier, D. Holten, W. W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta* **810** (1985) 33–48.
- [52] R. J. Debus, G. Feher, M. Y. Okamura, *Biochemistry* **25** (1986) 2276–2287.
- [53] S. M. Dracheva, L. A. Drachev, A. A. Konstantinov, A. Y. Semenov, V. P. Skulachev, A. M. Arutjunjan, V. A. Shuvalov, S. M. Zaberezhnaya, *Eur. J. Biochem.* **171** (1988) 253–264.
- [54] J. R. Norris, R. A. Uphaus, H. L. Crespi, J. J. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** (1971) 625–628.
- [55] J. Deisenhofer, H. Michel in J. Breton, A. Vermeglio (Hrsg.): *The Photosynthetic Bacterial Reaction Center Structure and Dynamics*, Plenum Press, New York 1988, S. 1–3.
- [56] M. E. Michel-Beyerle, M. Plato, J. Deisenhofer, H. Michel, M. Bixon, J. Jortner, *Biochim. Biophys. Acta* **932** (1988) 52–70.
- [57] H. Michel, O. Epp, J. Deisenhofer, *EMBO J.* **5** (1986) 2445–2451.
- [58] C. Kirmaier, D. Holten, R. J. Debus, G. Feher, M. Y. Okamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 6407–6411.
- [59] J. Deisenhofer, S. J. Remington, W. Steigemann, *Meth. Enzymol.* **115** (1985) 303–323.
- [60] I. Sinning, H. Michel, *Z. Naturforsch. C* **42** (1987) 751–754.
- [61] I. Sinning, H. Michel in J. Biggins (Hrsg.): *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 3, Martinus Nijhoff, Dordrecht 1987, III.11.771–III.11.773.
- [62] H. Michel, J. Deisenhofer, *Biochemistry* **27** (1988) 1–7.
- [63] T. Omata, M. Murata, K. Satoh, *Biochim. Biophys. Acta* **765** (1984) 403–405.
- [64] D. M. Tiede, R. C. Prince, G. H. Reed, P. L. Dutton, *FEBS Lett.* **65** (1976) 301–304.
- [65] V. H. Shuvalov, U. V. Klimov, *Biochim. Biophys. Acta* **440** (1976) 587–599.
- [66] C. de Vitry, B. Diner, *FEBS Lett.* **167** (1984) 327–331.
- [67] K. Pfister, K. E. Steinback, G. Gardner, C. J. Arntzen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981) 981–985.
- [68] J. C. Williams, L. A. Steiner, R. C. Ogden, M. I. Simon, G. Feher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) 6505–6509.
- [69] J. C. Williams, L. A. Steiner, G. Feher, M. I. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (1984) 7303–7307.
- [70] D. C. Youvan, E. J. Bylina, M. Alberti, H. Reusch, J. E. Hearst, *Cell (Cambridge, Mass.)* **37** (1984) 949–957.

- [71] G. Zurawski, H. Bohnert, P. R. Whitfield, W. Bottomley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 7699–7703.
- [72] J. Alt, J. Morris, I. Westhoff, R. G. Hermann, *Curr. Genet.* 8 (1984) 597–606.
- [73] K. Holschuh, W. Bottomley, P. R. Whitfield, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 8819–8834.
- [74] O. F. Rasmussen, G. Bookjans, B. M. Stummann, K. W. Henningen, *Plant Mol. Biol.* 3 (1984) 191–199.
- [75] J. D. Rochaix, M. Dron, M. Rahire, P. Maloe, *Plant Mol. Biol.* 3 (1984) 363–370.
- [76] H. Y. Nakatani, B. Ke, E. Dolan, C. J. Arntzen, *Biochim. Biophys. Acta* 765 (1984) 347–352.
- [77] O. Nanba, K. Satoh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 109–112.
- [78] R. J. Debus, B. A. Barry, G. T. Babcock, L. McIntosh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 427–430.
- [79] W. F. Vermaas, A. W. Rutherford, Ö. Hansson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8477–8481.
- [80] C. W. Hoganson, G. T. Babcock, *Biochemistry* 27 (1988) 5848–5855.
- [81] J. C. Williams, L. A. Steiner, G. Feher, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1 (1986) 312–325.
- [82] K. A. Weyer, W. Schäfer, F. Lottspeich in S. Papa, B. Chance, L. Ernster (Hrsg.): *Cytochrome Systems*, Plenum, New York 1987, S. 325–331.
- [83] A. P. Pugsley, C. Chapon, M. Schwartz, *J. Biol. Chem.* 256 (1986) 2194–2198.
- [84] F. Yu, S. Inouye, M. Inouye, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 2284–2288.
- [85] H. Michel, J. Deisenhofer, *Chem. Scr.* 27 B (1987) 173–180.
- [86] R. M. Garavito, Z. Markovic-Housley, J. A. Jenkins, *J. Crystal. Growth* 76 (1986) 701–709.
- [87] B. Lee, F. M. Richard, *J. Mol. Biol.* 55 (1971) 379–400.

WUT ZUR LÜ KE



**Fehlt schon wieder Ihre VCH-Zeitschrift?
Statt vor Wut zu kochen: Lückenlos
auf dem neuesten Stand sein.
Mit jedem Heft dabei –**

Das Abo bringt's

VCH
Verlagsgesellschaft

Tel. (06201) 602216, Postfach 101161, D-6940 Weinheim