

## **Intramolekulare Proteindynamik untersucht mit zeitaufgelöster Fourier Transform Infrarot-Differenzspektroskopie**

**Klaus Gerwert**

Max-Planck-Institut für Ernährungsphysiologie, Rheinlanddamm 201, D-4600 Dortmund 1, Federal Republic of Germany

*Biophysical Chemistry / Intramolecular, Protein Dynamic / Spectroscopy, Infrared FTIR / Time resolved FTIR*

The intramolecular reactions of membrane proteins are investigated by the new developed time resolved FTIR difference spectroscopy technique. By this technique the kinetics of single groups in membrane proteins can be determined. As example the protonation kinetics of aspartic acids are shown. Simultaneously the absorbance change in the visible spectral region is measured at one wavelength. Thereby the IR-Absorbance changes can be correlated to changes in the visible spectral region. The technique is applied to the lightdriven proton pump bacteriorhodopsin and to crystals of the photosynthetic reaction center of *Rps. viridis*.

Struktur und Funktion von Membranproteinen auf einem atomaren Niveau zu bestimmen, stellt für die heutige naturwissenschaftliche Forschung eine Herausforderung dar.

Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse kann die Struktur von Proteinen, die sich hinreichend gut kristallisieren lassen, bis auf einem atomaren Niveau bestimmt werden. Bei der Strukturbestimmung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie benötigt man zwar keine Proteinkristalle, allerdings ist diese Methode auf kleinere Proteine beschränkt. Beide Methoden liefern ein Bild von der Struktur der Proteine im Grundzustand.

Mit unseren Arbeiten möchten wir dazu beitragen, das das „Funktionieren“ von Membranproteinen auf einem atomaren Niveau verstanden wird. Dabei interessieren uns besonders die Transduktionsmechanismen, mit denen Chromoproteine Lichtenergie in chemische Energie umwandeln.

Als Systeme für unsere Untersuchungen haben wir das Retinalprotein Bakteriorhodopsin [1] und das photosynthetische Reaktionszentrum von *Rps. viridis* (in Zusammenarbeit mit S. Buchanan und H. Michel, MPI Frankfurt) ausgewählt. Bakteriorhodopsin ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe [2]. Nach Lichtanregung wird ein Photozyklus (Abb. 1) mit verschiedenen Intermediaten durchlaufen, die sich durch die Lage der Absorptionsmaxima im sichtbaren Wellenlängenbereich unterscheiden. Angegeben sind ebenfalls die Übergangszeiten bei Raumtemperatur und die Temperaturen bei denen sich die einzelnen Zwischenstufen stabilisieren lassen. Der Zyklus ist vereinfacht gezeichnet. Mit der Aufklärung beschäftigen sich zur Zeit verschiedene Arbeitsgruppen. Während eines Photozyklus werden Protonen von der Innenseite der Membran auf die Außenseite gepumpt. Der Chromophor Retinal ist über eine protonierte Schiff'sche Base an das Lysin 216 des Proteins gebunden.

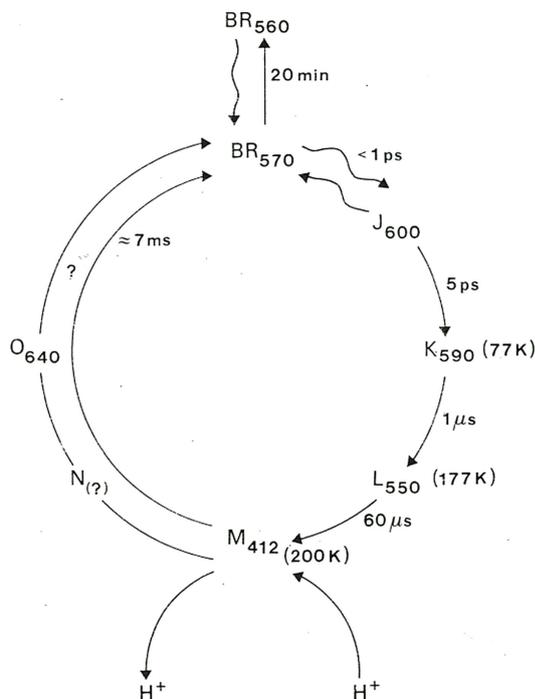


Abb. 1

Vereinfachter Photozyklus des Bakteriorhodopsins. Die Indices bezeichnen die Wellenlängen der Absorptionsmaxima

Während des Photozyklus wird die Schiff'sche Base im Intermediat M deprotoniert. Es wird angenommen, daß die Protonierungsänderung der Schiff'schen Base eine Schlüsselrolle für den Protonentranslations-Prozeß spielt. Von der Struktur ist bekannt, daß das Protein die Membran in sieben  $\alpha$ -Helices durchspannt.

Im Gegensatz zum Bakteriorhodopsin konnte das photosynthetische Reaktionszentrum von *Rhodospseudomonas viridis* so gut kristallisiert werden [3], daß dessen Struktur bis auf beinahe atomarem Niveau bestimmt werden konnte [4, 5]. Bei diesem Protein wird nach Lichtanregung der primäre Elektronendonator (Special Pair, P), bestehend aus zwei speziell angeordneten Chlorophyllmolekülen, oxidiert ( $P^+$ ) und die Elektronen über ein Bakteriopheophytin schließlich zu einem Quinon geleitet ( $Q_B^-$ ), das dann protoniert wird.

Um die intramolekularen Prozesse zu analysieren, benutzen wir spektroskopische Methoden, mit denen die Reaktionen einzelner Gruppen in dem Protein nicht-invasiv untersucht werden können. Die Messung der Absorptionsänderungen im sichtbaren Spektralbereich dienen dabei zur Kontrolle des Probenzustandes. Die Absorptionsänderungen im Infraroten Spektralbereich geben die Zustandsänderungen des Chromophors, der Proteinseitengruppen und des Proteingerüsts wieder.

Um aus der Gesamtabsorption des Proteins, die im wesentlichen durch die Absorptionsbanden des Proteingerüsts (Amid I, Amid II) bestimmt wird, die Banden der funktionell relevanten Gruppen zu selektieren, werden Differenzspektren zwischen den Ausgangszuständen ( $BR_{570}$ ) und Photointermediaten gebildet. In den Differenzspektren beobachtet man nur noch die Absorptionsbanden der sich lichtinduziert ändernden Molekülgruppen. Da also Absorptionsänderungen im Bereich  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  bei starker Hintergrundabsorption des Gesamtproteins und des Wassers gemessen werden müssen, kann nicht mehr mit dispersiven IR-Geräten gearbeitet werden, sondern es muß der Multiplexvorteil der FTIR-Methode ausgenutzt werden [6]. Der Multiplexvorteil besteht darin, daß alle Wellenzahlen gleichzeitig gemessen werden und dadurch eine sehr viel kürzere Meßzeit erreicht wird. Ein FTIR-Gerät ist nach dem Prinzip eines Michelson Interferometers aufgebaut. In Abhängigkeit von der Bewegung eines Spiegels erhält man ein sogenanntes Interferogramm. Dieses Interferogramm stellt die Fouriertransformierte des Einkanalpektrums dar. Mit Array Prozessoren werden Fouriertransformationen standardmäßig in weniger als einer Minute durchgeführt.

Die Intermediate, zu denen die Differenz gebildet wird, werden bei der statischen Methode entweder bei tiefen Temperaturen (z. B.  $L_{550}$  bei  $-100^\circ\text{C}$ ) oder durch "steady state" Belichtung ( $M_{412}$ ) stabilisiert. Da sich aber nicht alle Intermediate in dieser Weise stabilisieren lassen, wurde die zeit aufgelöste FTIR-Differenzspektroskopie entwickelt [7, 8]. Bei dieser Methode werden die Interferogramme während des Ablaufs einer Reaktion sehr schnell hintereinander aufgenommen. Nach der Messung werden die Interferogramme Fourier-transformiert und dann Differenzen gebildet zwischen dem Referenzspektrum, das vor Anregung der Reaktion aufgenommen wurde, und den einzelnen Spektren, die während der Reaktion von den einzelnen Zwischenprodukten gemessen wurden. Anhand der Differenzspektren

kann man im Prinzip die Reaktionen der einzelnen Gruppen im Protein verfolgen. Die Kinetik einer interessierenden Gruppe im Protein kann man bestimmen, in dem die Amplitude der Absorptionsbande dieser Gruppe (z. B. die Carbonylbande bei einer Protonierung einer Carboxylgruppe) in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen wird.

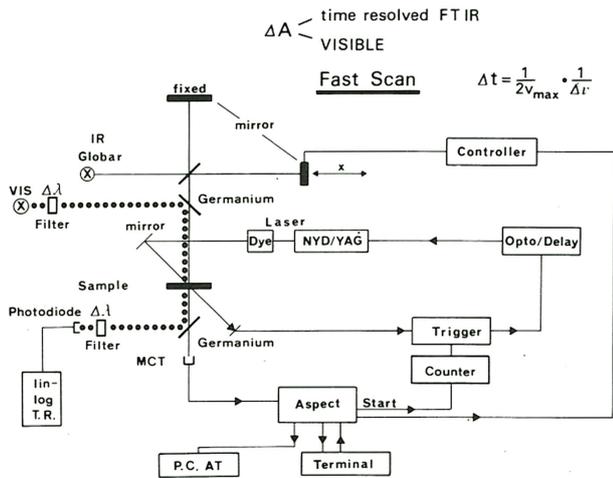


Abb. 2

Schema der Apparatur für zeitaufgelöste Messungen (siehe Text)

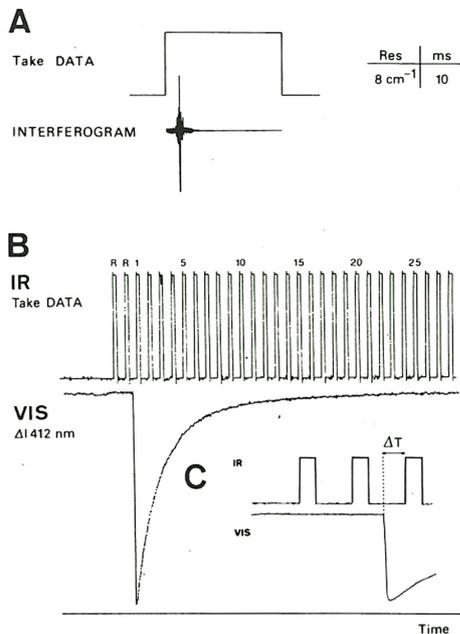


Abb. 3

A) Als Referenzsignal für die Aufnahme eines Interferogramms wird das "Take Data" benutzt. B) Zeigt das "Take Data" zusammen mit einer Transmissionsänderung bei 412 nm. Wenn das "Take Data" hoch ist, werden Interferogramme während der M und BR Reaktion aufgenommen. C) Über Variation der Delay Zeit  $\Delta T$  können die Zeiten, an denen Spektren aufgenommen werden, variiert werden

In Abb. 2 ist das Schema der Apparatur für zeitaufgelöste FTIR Messungen wiedergegeben. Man erkennt das Michelson Interferometer mit Lichtquelle (globalar), Strahlteiler, festem und beweglichem Spiegel. In Abhängigkeit von der Bewegung des Spiegels erhält man ein sogenanntes Inter-

ferogramm. Die Änderungen der Infrarot-Intensitäten in Abhängigkeit von der Bewegung des Spiegels werden mit einem MCT-Detektor (Quecksilber-Cadmium-Tellurid) aufgenommen und auf einem Aspect Compter gespeichert und Fourier-transformiert. Als Grundgerät dient ein Bruker IFS 88. Die Spiegelbewegung muß mit dem Laserblitz, der den Photozyklus in der Probe anregt, korreliert werden. Dazu dienen Counter, Trigger, und Delay Einheit. Simultan kann die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge im sichtbaren Spektralbereich gemessen werden. Der sichtbare Strahlengang wird über Germaniumfenster, die transparent für IR-Strahlung sind, ein- und ausgespiegelt. Die Wellenlänge wird über Interferenzfilter selektiert. Die Absorptionsänderungen im sichtbaren Spektralbereich werden auf einen Transientenrekorder mit logarithmischer Zeitachse gespeichert.

In Abb. 3 ist der Zeitverlauf einer Messung wiedergegeben. Als Referenzsignal für die Aufnahme eines Interferogramms dient das "Take Data" Signal (A). In (B) ist das "Take Data" Signal zusammen mit einer Transmissionsänderung im sichtbaren Spektralbereich bei 412 nm aufgetragen. Diese Transmissionsänderung reflektiert die M nach BR Reaktion in einer Bakteriorhodopsin-Probe. Zuerst werden zwei Referenzinterferogramme (R) im Dunkeln unmittelbar vor dem Laserblitz und anschließend 28 Interferogramme zu verschiedenen Zeiten einer solchen Reaktion aufgenommen. Durch Variation der Delayzeit  $\Delta T$  (C) können die einzelnen Zeiten, an denen Spektren aufgenommen werden, variiert werden. Die zeitliche Auflösung hängt von der gewünschten spektralen Auflösung ab und beträgt zur Zeit bei  $8 \text{ cm}^{-1}$  spektraler Auflösung 10 ms Zeitauflösung. In Abb. 4 sind die Differenzspektren, aufgenommen zu verschiedenen Zeiten bei einer M nach BR Reaktion, aufgetragen.

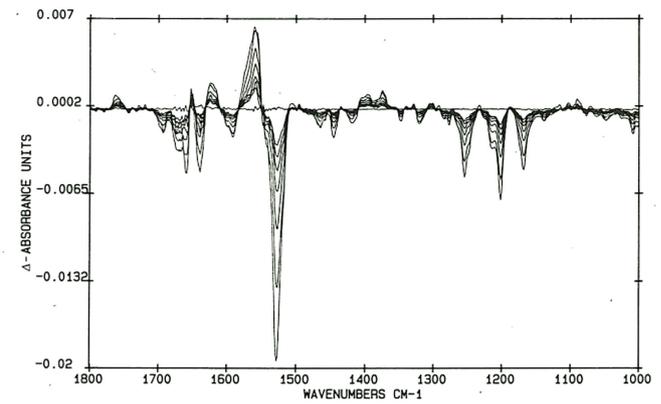


Abb. 4

Differenzspektren, aufgenommen zu verschiedenen Zeiten einer M nach BR Reaktion. Um den Prozeß zu verlangsamen, ist die Probe auf  $-5^\circ\text{C}$  gekühlt

In Abb. 5 sind die Amplituden der Banden bei  $1255 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1202 \text{ cm}^{-1}$  und  $1167 \text{ cm}^{-1}$  in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Diese Banden reflektieren C-C Streckschwingungen des Retinals im Grundzustand BR [9]. Wie erwartet, stimmen die Kinetiken gut überein. In Abb. 6 ist die Kinetik einer Carbonylbande bei  $1761 \text{ cm}^{-1}$  wiedergegeben. Diese Bande repräsentiert die Protonierung einer internen Asparaginsäure während des Photozyklus von Bakteriorhodopsin

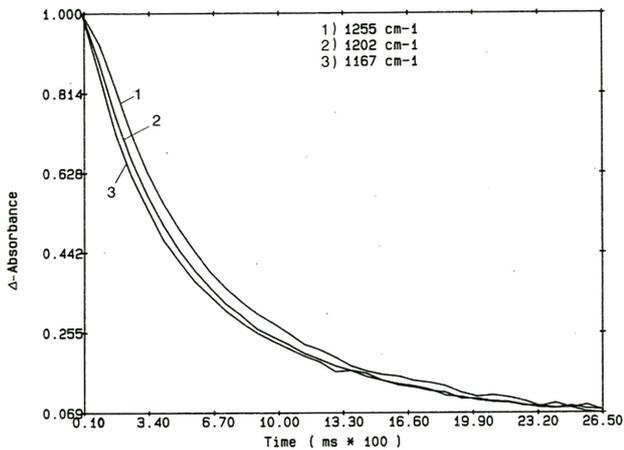


Abb. 5

Kinetik der  $C_{10}-C_{11}$  und  $C_{14}-C_{15}$  Streckschwingung des Retinals bei  $1167\text{ cm}^{-1}$  und  $1202\text{ cm}^{-1}$  und der  $C_{15}H$  Biegeschwingung bei  $1255\text{ cm}^{-1}$

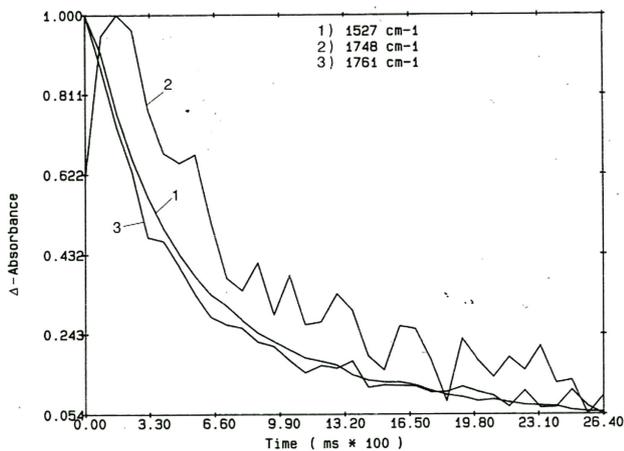


Abb. 6

Kinetik der Carbonylbanden von Asparaginsäuren bei  $1765\text{ cm}^{-1}$ ,  $1748\text{ cm}^{-1}$  und die Kinetik der  $C=C$  Bande des Retinals bei  $1527\text{ cm}^{-1}$

[10]. Man beobachtet die Kinetik der Deprotonierung dieser Gruppe während der M nach BR Reaktion. Die Deprotonierungskinetik stimmt sehr gut mit der Kinetik der  $C=C$  Bande des Retinals in BR bei  $1527\text{ cm}^{-1}$  überein, die ebenfalls in Abb. 6 wiedergegeben ist. Bei  $1748\text{ cm}^{-1}$  dagegen beobachtet man die Protonierungsänderung einer Carboxylgruppe, die zu einem späten Zeitbereich stattfindet. Gegenwärtig wird versucht, mit einem "global Fit" [11] die Kinetiken der verschiedenen Absorptionsbanden simultan auszuwerten.

Die Zuordnung der Infrarotbanden geschieht mit Hilfe von isopenmarkierten Proben. Die Chromophorbanden wurden mit isopenmarkierten Retinalen [12] und die Carbonylbanden mit  $4\text{-}^{13}\text{C}$ -Asp markierten Bakteriorhodopsinproben zugeordnet [10]. Um die Infrarotbanden einzelnen Aminosäuren des Proteins zuweisen zu können, werden zur Zeit Proben untersucht, bei denen einzelne Aminosäuren mutiert sind (z. B. Asp96  $\rightarrow$  Asn96) (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe D. Oesterhelt, MPI München).

Auf der Grundlage der Experimente mit Hilfe der statischen FTIR-Methode konnte ein Modell über die Transduktion der Lichtenergie in Protonentransferreaktionen entwickelt werden [9, 10, 14] (Abb. 7). Durch eine lichtinduzierte Isomerisierung des Chromophors wird die positive Chromophorladung weiter vom Gegenion getrennt. Wegen der Destabilisierung wandert die positive Ladung tiefer in die Polyenkette und erzeugt Ladungsänderungen im Innern des Proteins in  $K_{610}$ . In K-L Übergang versucht das Protein einen energisch günstigeren Zustand zu erzielen, in dem durch Deprotonierung einer internen Asparaginsäure die Chromophorladung wie im Ausgangsstand stabilisiert wird. Eine ungewöhnlich niedrige  $C_{14}-C_{15}$  Streckschwingung des Retinals in L zeigt, daß der Chromophor entweder um diese Bindung isomerisiert oder stark verdrillt ist [9]. Die Frage nach der Isomerisierung wird zur Zeit kontrovers diskutiert [9, 15, 16]. Aber auch bei einer Verdrillung um die  $C_{14}-C_{15}$ -Bindung erwartet man eine pK Erniedrigung. Diese pK Erniedrigung erklärt die Reprotonierung der Asparaginsäure Asp1 (niedriger pK) von dem Proton der Schiff'schen Base.

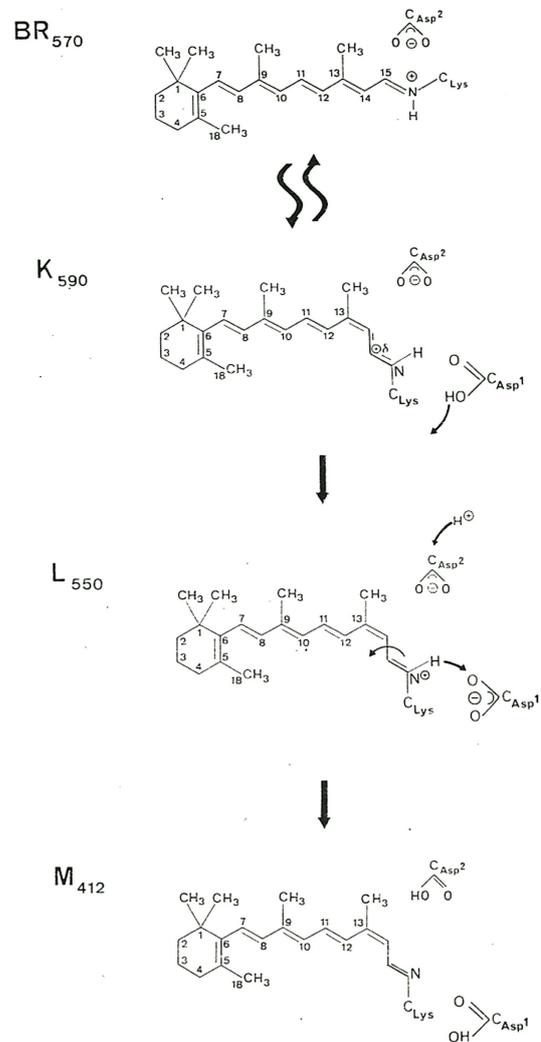


Abb. 7

Modell über lichtinduzierte intramolekulare Prozesse. Damit kann die Umsetzung der Lichtenergie in Protonentransferreaktionen beschrieben werden

Begleitend wird die Protonierung einer zweiten Asparaginsäure Asp2 beobachtet. Der Chromophor transportiert also lichtinduziert über eine Isomerisierungsreaktion Protonen zwischen zwei internen Asparaginsäuren (Abb. 8).

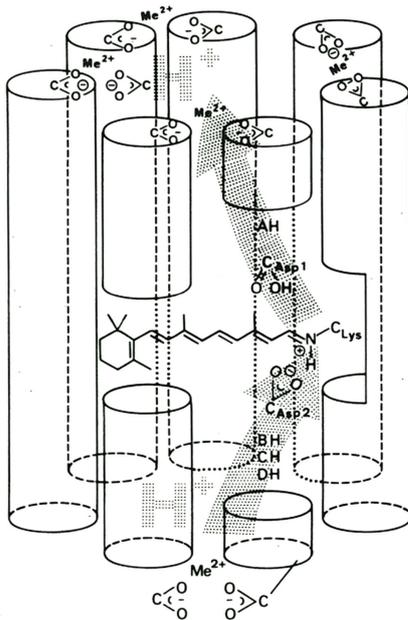


Abb. 8

Schema des Protonentransfers in Bakteriorhodopsin

Dieses Modell kann die Umsetzung der Lichtenergie in Protonentransferreaktionen beschreiben. In Zukunft wollen wir versuchen, den Protonentransfer von den Proteinoberflächen ins Innere des Proteins aufzuklären (Abb. 8). Dabei ist auch die Rolle von zweiwertigen Kationen, die auf der Membranaußenseite angebunden sind, von Interesse [18].

Daneben wurde begonnen, die lichtinduzierten intramolekularen Prozesse vom photosynthetischen Reaktionszentrum zu untersuchen. Dabei ist es zum ersten Mal gelungen,

von Proteinkristallen hochwertige lichtinduzierte Differenzspektren aufzunehmen [17].

### Literatur

- [1] D. Oesterhelt und W. Stoerkenius, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2853 (1974).
- [2] W. Stoerkenius und R. A. Bogomolni, Annu. Rev. Biochem. 52, 587 (1982).
- [3] H. Michel, J. Mol. Biol. 158, 567 (1982).
- [4] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber und M. Michel, J. Mol. Biol. 180, 395 (1984).
- [5] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber und M. Michel, Nature 318, 618 (1985).
- [6] P. R. Griffiths, Chemical-Infrared-Fourier-Transform Spectroscopy, J. Wiley 1975.
- [7] K. Gerwert und B. Hess, Mikrochemica Acta II, A/6.04 (1987).
- [8] M. S. Braiman, P. Ahl und K. J. Rothschild, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5221 (1987).
- [9] K. Gerwert und F. Siebert, EMBO J. 5, 805 (1986).
- [10] M. Engelhard, K. Gerwert, B. Hess, W. Kreutz und F. Siebert, Biochemistry 24, 400 (1985).
- [11] J. F. Nagle, L. A. Parodi und R. H. Lozier, Biophys. J. 38, 161 (1982).
- [12] K. Gerwert, F. Siebert, C. Winkel, H. Pardoen und J. Lugtenburg, in: Time-resolved vibrational spectroscopy, eds., Lauberau, Stockburger, Springer, Berlin, 259 (1985).
- [13] K. Gerwert und B. Hess, Initiation of lightinduced proton-transfer reaction in bacteriorhodopsin, in: Biophysical studies of retinal proteins, eds., Frauenfelder, Honig, Nakanishi, University of Illinois Press, 144 (1988).
- [14] K. Schulten und P. Tavan, Nature 272, 85 (1978).
- [15] S. O. Smith, I. Hornung, R. van der Steen, J. A. Pardoen, M. S. Braiman, J. Lugtenburg und R. Mathies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 967 (1986).
- [16] P. Tavan und K. Schulten, Biophys. J. 50, 81 (1986).
- [17] K. Gerwert, B. Hess, H. Michel und S. Buchanan, FEBS Lett. 232 (1988).
- [18] K. Gerwert, U. M. Ganter, F. Siebert und B. Hess, FEBS Lett. 39 (1987).

Presented at the Discussion Meeting of the Deutsche Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie "Mechanisms of Membrane Transport", Königstein/Taunus, March 21st to 23rd, 1988

E 6802