



UP 1: Trans-cis Isomerisierung in Bakteriorhodopsin: modifizierte Umgebung

Ultraschnelle Reaktionen und Wellenpaketdynamik in biologischen Molekülen im Licht der Chromophor-Protein Wechselwirkung

Steuerungsaspekt für Biologie und Molekülphysik

Reaktionskontrolle

Wellenpaketdynamik

Chromophor in Lösung
• verschiedene Grundzustands-Konformationen und Konfigurationen

Chromophor in der Bindungstasche
spezifische Wechselwirkung mit restriktiver Umgebung:
• unterdrückt konkurrierende Reaktionswege
• modifiziert die Potentialoberfläche
• stabilisiert den Chromophor in der Reaktion

Wellenpaketdynamik
• Bakteriorhodopsin (Zinth et al., Ye et al., Dexeimer et al.)
• Rhodopsin (Wang et al.)
• Bakteriellles Reaktionszentrum (Spörlein et al., Vos et al.)
• Haferphytochrom (Holzwarth)

Relevanz für Biologie und Reaktionskontrolle?

Information über die Reaktionsdynamik

Chromophor-Protein Wechselwirkungen:

- > **elektrostatische** Wechselwirkung:
 - Umorientierung der Proteinumgebung durch Chromophoranregung
 - Änderung der Potentialoberfläche
 - lokalisierte Kräfte auf die Ladungsverteilung im angeregten Zustand
- > **sterische** Wechselwirkung:
 - Ausbildung einer spezifischen Chromophorstruktur
 - sterische Hinderung der Chromophorbewegung

Von Garavelli et al. berechnete Isomerisierungsdynamik von $cis-C_{13}H_{25}NH_2^+$

Steuerung der Photoreaktion durch die Proteinumgebung:

Retinal-Bindungstasche der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin

Struktur von Bakteriorhodopsin wt nach Luecke et al.

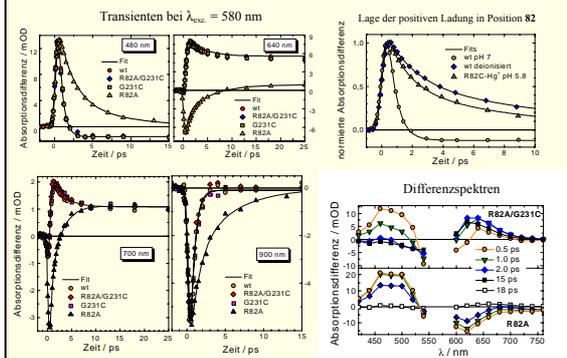
Isomerisierungsreaktion als Energie speichernder Schritt

Kinetisches Modell nach Zinth et al. und Mathies et al.

Zerfall des elektronisch angeregten Zustandes

Reaktionskatalyse durch geladene Aminosäuren (Song et al.)

Welche geladenen Aminosäuren sind essentiell für die Reaktionskatalyse?



Primärreaktion:

- > nur zwei Formen: purpurne Form und blaue Form
- > blaue Form: protonierte D85; purpurne Form D85
- > purpurne Form: Zerfallszeit 520 ± 50 fs (ESA)
- > blaue Form: Zerfallszeiten $1,7 \pm 0,3$ ps und $6,12$ ps (ESA)
- > die genaue Lage der positiven Ladung in Position 82 im Protein ist entscheidend für ihren Einfluss auf die Primärreaktion (R82C-Hg²⁺; kürzer)
- > R82A / G231C ist eine Revertante und weist in der Primärreaktion der purpurnen Form dieselben Eigenschaften auf wie wt (Zerfallszeit, Quantausbeute)
- > allosterischer Effekt in R82A / G231C, der die kritische Ladungsverteilung in der Bindungstasche wieder herstellt, wahrscheinlich D212 wegbewegt.
- > positive Ladung des Arginins ist **nicht essentiell** für die Reaktionskatalyse;
- > R82 wirkt nur über den Protonierungszustand der D85 auf die Primärreaktion
- > Die D212 ist wahrscheinlich **nicht essentiell** für die Reaktionskatalyse
- > Ist die D85⁺ die **einzigste** für die Primärreaktion **essentielle geladene Aminosäure**?
- > Die beiden Zerfallszeiten der **blauen Form** weisen deutlich unterschiedliche Variationsbreiten auf, die Reaktion, die zu einer Zerfallszeit von 1,7 ps führt, ist viel insensitiver gegenüber Punktmutationen als die andere
- > Aus dem elektronisch angeregten Zustand des N-Intermediats ergibt sich eine Zerfallszeit von $1,9 \pm 0,2$ ps (protonierter Chromophor, protonierte D85)
- > Die Zerfallszeit von $1,7 \pm 0,3$ ps in der blauen Form könnte zum elektronisch angeregten Zustand des 13-cis Chromophors gehören

Sets von Mutanten, pH Werte und Ionenkonzentrationen:

Probe	pH	λ_{max}/nm	τ_1/ps	τ_2/ps	A1	A2
wt	7.0	568	0.55(5)	-	1.0	-
wt	10.0	568	0.55(5)	-	1.0	-
R82A/G231C	7.0	567	0.57(5)	-	1.0	-
R82A/G231C	10.0	567	0.54(5)	-	1.0	-
G231C	7.0	568	0.57(5)	-	1.0	-
R82C	10.0	565	0.48(5)	4.8(1.0)	0.8(2)	0.17(2)
R82Q	10.0	560	0.43(5)	2.5(6)	0.8(2)	0.15(3)
R82A	10.0	562	0.51(5)	-	1.0	-

Probe	pH	λ_{max}/nm	τ_1/ps	τ_2/ps	A1	A2
R82A	7.0	600	1.7(2)	6.4(3)	0.66(5)	0.34(5)
R82A	5.8	600	1.7(3)	6.4(1.2)	0.64(9)	0.36(10)
R82C	7.0	585	1.8(2)	12.4(9)	0.57(3)	0.43(5)
R82C	5.8	590	1.5(2)	8.4(9)	0.38(5)	0.61(5)
R82C-Hg	5.8	585	1.8(2)	8.3(9)	0.55(4)	0.44(6)
wt	2.7	603	1.8(5)	12(3)	0.51(4)	0.49(4)
R82A/G231C	2.7	602	2.5(6)	21.8(7.3)	0.66(11)	0.34(9)
wt-BM	+5	602	1.8(3)	13.9(7.7)	0.55(2)	0.47(2)
wt-BM (Ca ²⁺)	+5	602	1.7(3)	13.6(4.6)	0.54(4)	0.46(5)
R82A/G231C-BM	+5	602	1.8(2)	12.4(8)	0.49(1)	0.51(1)

Zerfallszeiten τ_1 und Amplituden A_1 im Bereich des elektronisch angeregten Zustandes von purpurnen und blauen Formen; Anregung bei 580 nm; Salzkonzentration aller Proben 15 mM KCl, bis auf die deionisierten Proben (BM)

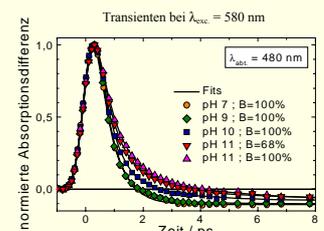
Vorhaben zur Reaktionssteuerung durch die Proteinumgebung:

- > **Mutanten** zur Klärung, ob die D212 essentiell für die Katalyse der Primärreaktion ist: z.B. R82Q / D212N, D85N / D212X und weitere D85N / XNZ - Mutanten
- > Reicht alleine die D85⁺ als geladene Aminosäure zur Reaktionssteuerung aus? Welche sterischen Einflüsse sind darüber hinaus notwendig (Mutanten)?
- > Strukturgestützte Rechnungen zur Identifizierung relevanter Parameter für die Primärreaktion (Prof. V. Bonačić-Koutecký TP C2)
- > Anisotropiemessungen zur Erweiterung der Datenbasis und der Analyse
- > Anregung weiterer Intermediate z.B. M, K und J
- > Genauere Charakterisierung der blauen Form und Ursprung ihrer biphasischen Dynamik und deren Abhängigkeit von der Proteinumgebung

Kooperationen:

- Prof. M. P. Heyn, U. Alexiev (FU Berlin)
- Prof. V. Bonačić-Koutecký TP C2

Anreicherung des N-Intermediats



Transienten von Bakteriorhodopsin wt bei verschiedenen pH-Werten und Hintergrundbeleuchtungen B; die konstante Hintergrundbeleuchtung sorgt für eine Akkumulation des N-Intermediates bei hohem pH.

S.L. Dexeimer, Q. Wang, L.A. Peteanu, W.T. Pollard, C.V. Shank and R.A. Mathies; Chem. Phys. Lett., **188**, 61, (1992)
 M. Garavelli, P. Celani, F. Bernardi, M.A. Robb and M. Olivucci, J. Am. Chem. Soc., **119**, 6891, (1997)
 K. Heyne, J. Herbst, B. Dominguez-Herradon, U. Alexiev and R. Diller, J. Phys. Chem. B, **104**, 6053, (2000)
 H. Luecke, H.T. Richter and J.K. Lanyi, Science, **280**, 1934, (1998)
 R.A. Mathies, C.H. Brito Cruz, T.W. Pollard and C.V. Shank; Science, **240**, 777, (1988)

M.C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kölling and D. Oesterheld; Chem. Phys. Lett., **117**, 1, (1985)
 L. Song, M.A. El Sayed and J.K. Lanyi; Science, **261**, 891, (1993)
 S. Spörlein, W. Zinth and J. Wachter; J. Phys. Chem. B **102**, 7492 (1998)
 M.H. Vos, C. Rischel, M.R. Jones and J.L. Martin; Biochemistry **39**, 8353 (2000)
 T. Ye, E. Gershgorin, N. Friedman, M. Ottolenghi, M. Sheves and S. Ruhman; Chem. Phys. Lett., **314**, 429, (1999)