

Chemie des Sehprozesses

Zur Rolle von Thr94 und Wat2b bei der Protonierung des Retinalchromophors in Rhodopsin***Volker Buss,* Minoru Sugihara, Peter Entel und Jürgen Hafner*

Die außergewöhnliche Stabilität der protonierten Retinal-Schiff-Base im Rhodopsin, mit einem effektiven pK_S -Wert von möglicherweise über 16,^[1] und die Leichtigkeit, mit der

die Base nach Lichtanregung deprotoniert und damit eine der strukturellen Voraussetzungen für das Erreichen des Signalzustands herstellt,^[2] sind Gegenstand vielfältiger Untersuchungen. Unterschiedliche Modelle der Bindungsstelle des Chromophors, mit Glu113 als Gegenion und Wasser, das das Ionenpaar verbrückt und stabilisiert, wurden vorgeschlagen.^[3] Anhand der kürzlich veröffentlichten Röntgenstrukturanalyse des Proteins^[4,5] lässt sich die Bindungsstelle in atomarer Auflösung untersuchen sowie der Mechanismus verstehen, durch den der Protonierungszustand des Proteins entsprechend den Anforderungen des jeweiligen Zwischenzustands gesteuert wird.

Ausgehend von der Kristallstruktur haben wir das Protein mithilfe von Ab-initio-Quantentheorie untersucht. Demnach erzeugt die besondere Anordnung des Ionenpaars in der Bindungstasche ein Energieplateau, auf dem beide Zustände reversibel zugänglich sind: Entweder das Proton verknüpft mit der Schiff-Base oder mit dem Carboxylation. Die Feinabstimmung des Plateaus bewirken Thr94 und ein Wassermolekül (Wat2b), die nach unseren Ergebnissen gemeinsam mit Glu113 das komplexe Gegenion des Chromophors im Rhodopsin bilden.

Für die Beschreibung der Bindungsstelle haben wir die folgenden Komponenten berücksichtigt: den vollständigen Retinalchromophor mit dem kovalent verknüpften Lys296, Glu113 als Gegenion, Thr94, das eine Wasserstoffbrücke zu Glu113 bildet, und ein Wassermolekül. Die Startgeometrie wurde den hinterlegten Rhodopsinkoordinaten entnommen (PDB-Eintrag 1F88)^[4] und einer weiteren Strukturanalyse,^[5] derzufolge sich zwei Wassermoleküle in der Nähe der Bindungsstelle befinden (Wat2a und Wat2b). Die an den Peptidbindungen beteiligten Atome der Aminosäuren wurden, soweit nötig, mit Wasserstoff gesättigt; diese Atome waren auch die einzigen, die während der Energieminimierung und der Moleküldynamik (MD) festgehalten wurden, alle anderen waren ohne Randbedingungen frei beweglich. Die den Rechnungen zugrunde liegende Methode wurde bereits an anderer Stelle beschrieben.^[6] Im Wesentlichen handelt es sich um Ab-initio-MD-Simulationen auf der Basis von Dichtefunktionaltheorie unter Verwendung von ultraweichen Vanderbilt-Kresse-Pseudopotentialen^[7] in einer Entwicklung des Basissatzes in Form von ebenen Wellen.^[8]

Die Startgeometrie der Bindungsstelle wurde energieoptimiert und dann durch MD-Rechnung mit „simulated annealing“ über 200 fs und den oben genannten Randbedingungen simuliert. Die resultierende Struktur ist in Abbildung 1 dargestellt, zusammen mit einer Überlagerung der ursprünglichen 1F88-Konformation. Offensichtlich gibt es einen signifikanten Grad an Übereinstimmung zwischen der aus der Elektronendichte abgeleiteten experimentellen und der berechneten Struktur. Bemerkenswert ist das Wassermolekül, das sich zwar etwas verschoben hat, die Schiff-Base und das Gegenion aber nicht verbrückt, weil nicht ausreichend Platz zur Verfügung steht. Signifikante Unterschiede sind bei Thr94 festzustellen, das durch Rotation um die C_α - C_β -Bindung die Hydroxygruppe in Richtung des Carboxylatsauerstoffs orientiert, sowie beim Retinal, das infolge der fehlenden Wechselwirkungen mit der Proteintasche von N₁₆ bis C₆ planar wird. Wie wir an anderer Stelle gezeigt haben,^[9]

[*] Prof. Dr. V. Buss
Institut für Chemie
Universität Duisburg-Essen
47048 Duisburg (Deutschland)
Fax: (+49) 203-379-2772
E-mail: theobuss@uni-duisburg.de

Dr. M. Sugihara, Prof. Dr. P. Entel
Institut für Theoretische Tieftemperaturphysik
Universität Duisburg-Essen
47048 Duisburg (Deutschland)
Prof. Dr. J. Hafner
Institut für Materialphysik
Universität Wien, 1090 Wien (Österreich)

[**] Diese Arbeit entstand innerhalb der Forschungsgruppe „Molecular Mechanisms of Retinal Protein Action“ der DFG und wurde durch das Graduiertenkolleg „Struktur und Dynamik heterogener Systeme“ an der Universität Duisburg unterstützt.

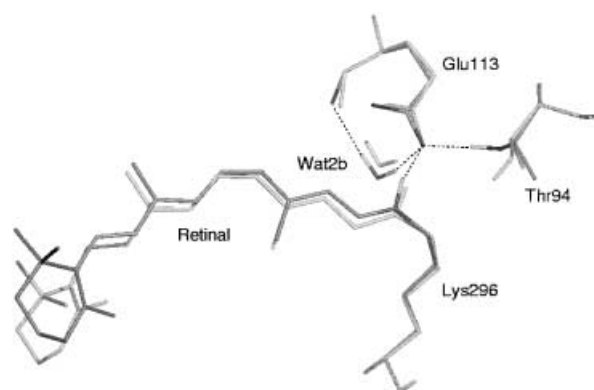


Abbildung 1. Energieoptimierte Geometrie (in Dunkelgrau) der 11-*cis*-Retinal-Schiff-Base, gebunden an Lys296, mit dem komplexen Gegenion aus Glu113, Thr94 und einem Wassermolekül (Wat2b); gestrichelte Linien: Wasserstoffbrücken. Die ursprüngliche 1F88-Konformation ist in Hellgrau als Überlagerung dargestellt.

wird die starke Verdrillung des Retinalchromophors erst durch die Wechselwirkung mit der Proteinumgebung verursacht.

Die endgültige Struktur enthält ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, das sich vom zentralen Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe zum Stickstoff der Schiff-Base (Abstand 2.60 Å), zur Hydroxygruppe des Threonins (2.67 Å) und zum Wassermolekül erstreckt (3.18 Å). Das Wasser bildet eine zweite Wasserstoffbrücke zum Peptidsauerstoff von Glu113 (3.04 Å). Das zweite Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe ist in diesem Modell nicht koordiniert, weil sich kein Ligand in der Nähe befindet.^[10] Der Abstand des Brückenwasserstoffs zum Stickstoff der Schiff-Base (1.10 Å) ist deutlich kleiner als der zum Sauerstoff der Carboxylatgruppe (1.51 Å); von daher, aber auch anhand der Analyse des Chromophors (Bindungslängen und Ladungsverteilung), schließen wir, dass der Chromophor in diesem Komplex protoniert ist.

Das dynamische Verhalten des Systems wurde anhand mehrerer MD-Simulationen untersucht, deren Resultate in Abbildung 2 zusammengefasst sind. Dargestellt ist die Bewegung des verbrückenden Protons (in der Mitte) zwischen dem Stickstoff der Schiff-Base (unten) und dem Sauerstoff der Carboxylatgruppe (oben) als Funktion der Zeit. Die Struktur ist stabil gegen Deprotonierung des Chromophors: Wird die Simulation mit neutraler Schiff-Base und Carbonsäure gestartet, so deprotoniert die Carboxylgruppe, und das Proton bewegt sich anscheinend ohne Energiebarriere sofort zum Stickstoff. 200 fs nach Start der MD-Simulation des vollständigen Komplexes (schwarz) wurden drei parallele Simulationen gestartet. In der ersten war das Wassermolekül Wat2b entfernt (grün), in der zweiten Thr94 (blau) und in der dritten sowohl Wat2b als auch Thr94 (rot). Der Einfluss des Wassermoleküls auf die Stabilität des Komplexes ist praktisch zu vernachlässigen; die Gegenwart von Thr94 allein reicht für die Protonierung des Chromophors aus. Das Wassermolekül allein reicht demgegenüber nicht aus, um den Chromophor in protoniertem Zustand zu halten: Das verbrückende Proton schwingt mit großen, irregulären Amplituden. Dies und die

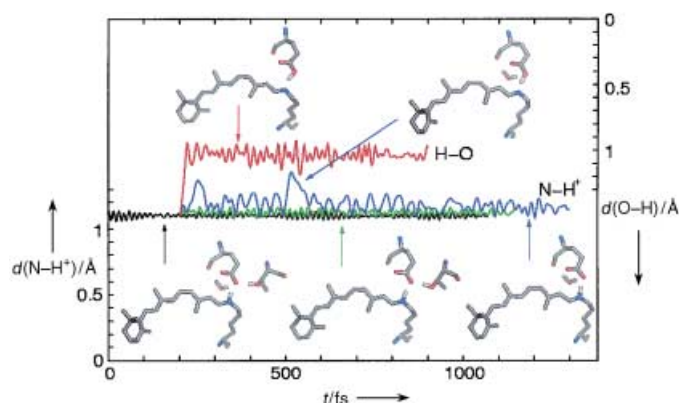


Abbildung 2. MD-Simulation der in Abbildung 1 dargestellten Struktur (schwarze Kurve) und nach Entfernen von Komponenten aus dem komplexen Gegenion: Thr94 (blau), Wat2b (grün), Thr94 + Wat2b (rot). Aufgetragen sind der N-H⁺-Abstand und der O-H-Abstand, je nachdem, welches der Zustand mit der kürzeren Bindung zum Proton ist. Pfeile und Strukturbilder entsprechen den unterschiedlichen Komplexen und ihren Protonierungszuständen.

reduzierte Frequenz der Schwingungen belegt, dass die Bindung zur Schiff-Base deutlich schwächer geworden ist. Ohne Wat2b und Thr94 deprotoniert der Chromophor sofort, und das Proton wird um mehr als 0.6 Å in Richtung des Glutamatsauerstoffs verschoben.

Ausschlaggebend für die Beweglichkeit des Protons ist die kurze Wasserstoffbrücke zwischen der Schiff-Base und dem Gegenion, die zudem die Stärke dieser Bindung verdeutlicht (Abbildung 3). Der berechnete Abstand zwischen dem Carb-

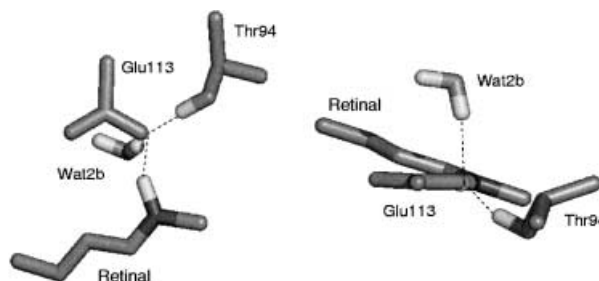


Abbildung 3. Nahbereich des Netzwerks aus Wasserstoffbrücken der protonierten Retinal-Schiff-Base und des komplexen Gegenions. Links: Aufsicht auf die Carboxylatgruppe von Glu113, rechts: Seitenansicht.

oxylatsauerstoff und dem Stickstoff der Schiff-Base ist deutlich kleiner als die mittlere Länge einer NH⁺...O-Wasserstoffbrücke (2.74 Å gemäß einer Suche in der CSD mit 306 Einträgen)^[11a] und an der unteren Grenze des entsprechenden Abstands in Histidin-Carboxylat-Komplexen.^[11b] Außerdem ist die nahezu planare *syn*-Orientierung (Abweichung von der COO⁻-Ebene 3°) optimal für eine Wasserstoffbrücke zur Carboxylatgruppe.^[12] Ohne Wechselwirkung, d.h. in unendlicher Entfernung, ist das neutrale System Glutaminsäure/Schiff-Base um 86 kcal mol⁻¹ stabiler als das geladene Ionenpaar aus Glutamat und protonierter Schiff-Base. In der Geometrie des optimierten Komplexes ist diese hohe Ener-

giedifferenz auf $4.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ reduziert (B3LYP-6-311G**-Rechnungen; entsprechende 6-311G**-Hartree-Fock-Rechnungen: 86.5 bzw. $4.6 \text{ kcal mol}^{-1}$). Für die Feineinstellung der Wasserstoffbrücke sorgt die besondere Anordnung der verbleibenden zwei Protonendonoren an der Bindungsstelle, Wat2b und Thr94, die mit der protonierten Schiff-Base um die freien Elektronenpaare des Carboxylatsauerstoffs konkurrieren. Die Hydroxygruppe von Thr94 ist gegenüber Wat2b eindeutig im Vorteil, denn sie liegt mit 35° näher an der Ebene der Carboxylatgruppe als Wat2b (77°) und ist somit angenähert *anti*-orientiert. Hierin unterscheidet sie sich vom Wassermolekül, dessen Zugang zu den freien Elektronenpaaren der Carboxylatgruppe deutlich eingeschränkt ist. Als Konsequenz ist die Wasserstoffbrücke, die Thr94 zum Glutamat bildet, stärker und kürzer und somit besser in der Lage, die protonierte Schiff-Base zu stabilisieren, was auch in den MD-Rechnungen zum Ausdruck kommt.

Die Regulierung des Protonierungszustands des Retinalchromophors ist von entscheidender Bedeutung für den Sehvorgang. Protonierung überführt die sechs lokalisierten Doppelbindungen in ein delocalisiertes, hoch polarisierbares π -System, wie es für die Absorption bei langen Wellenlängen und die Regulierung des Absorptionsmaximums durch die Proteinumgebung erforderlich ist, wenn auch wahrscheinlich nicht für die Effizienz der Photoisomerisierung.^[13] Andererseits bildet die Deprotonierung des Chromophors nach der Lichtabsorption die Voraussetzung dafür, dass das Protein den aktivierten Zustand erreicht.^[14] Eine Deprotonierung der Retinal-Schiff-Base wurde auch mit einer Herabsetzung der Barriere der thermischen Isomerisierung des Chromophors in Verbindung gebracht. Dies sollte zu einer Verstärkung des Photorezeptorrauschens führen,^[15] ein Vorschlag, der von anderer Seite jedoch infrage gestellt wurde.^[16] Dass der korrekte Protonierungszustand der Schiff-Base bevorzugt unter Beteiligung von Thr94, und nicht von Wat2b eingestellt wird, beruht möglicherweise darauf, dass die Aminosäure räumlich fixiert und deshalb leichter zu kontrollieren ist als ein frei bewegliches Wassermolekül. Der stabilisierende Einfluss von Thr94 auf die Bindungsstelle des Chromophors ist im Zusammenhang mit Punktmutationen diskutiert worden, die zu angeborener stationärer Nachtblindheit (CSNB) führen.^[17]

Eingegangen am 28. Januar 2003 [Z51034]

Stichwörter: Moleküldynamik · Protonierungen · Rhodopsin · Theoretische Chemie · Wasserstoffbrücken

- [4] K. Palczewski, T. Kumaska, T. Hori, C. A. Behnke, H. Moto-shima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyama, *Science* **2000**, 289, 739–745.
- [5] T. Okada, Y. Fujiyoshi, M. Silow, E. Navarro, E. M. Landau, Y. Shichida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5982–5987.
- [6] G. Kresse, J. Furthmüller, *Phys. Rev. B* **1996**, 54, 11 169–11 186.
- [7] D. Vanderbilt, *Phys. Rev. B* **1990**, 41, 7892–7895.
- [8] Für die MD-Rechnungen wurde eine periodische Simulationsbox verwendet ($28 \times 24 \times 24 \text{ \AA}^3$), um die Wechselwirkung mit Bildmolekülen auszuschließen, sowie ein k -Punkt (nur Γ -Punkt). Die Grenzenenergie der Basis aus ebenen Wellen wurde auf 396 eV gesetzt. Alle Rechnungen wurden in der verallgemeinerten Gradientennäherung ausgeführt, im mikrokanonischen Ensemble und mit Zeitschritten von 1 fs .
- [9] M. Sugihara, V. Buss, P. Entel, M. Elstner, T. Frauenheim, *Biochemistry* **2002**, 41, 15259–15266.
- [10] Gemäß der 1F88-Struktur bindet dieses zweite Sauerstoffatom über eine Wasserstoffbrücke an Cys187. Allerdings sind die strukturellen Änderungen, die der Einschluss dieser Aminosäure nach sich zieht, insignifikant. Die vier im Text aufgeführten Abstände betragen unter Berücksichtigung von Cys187: 2.63 , 2.66 , 3.15 und 3.04 \AA ; der Chromophor bleibt protoniert.
- [11] a) Y. Wie, A. C. de Dios, A. E. McDermott, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10389–10394; b) D. Braga, L. Maini, F. Grepioni, A. De Cian, O. Felix, J. Fischer, M. W. Hosseini, *New J. Chem.* **2000**, 24, 547–553.
- [12] a) M. R. Petersen, I. G. Csizmadia, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 1076–1079; b) J. P. Glusker, *Top. Curr. Chem.* **1998**, 198, 1–56.
- [13] K. Fahmy, T. P. Sakmar, *Biochemistry* **1993**, 32, 9165–9171.
- [14] T. Okada, O. P. Ernst, K. Palczewski, K. P. Hofmann, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 318–324.
- [15] R. B. Barlow, R. R. Birge, E. Kaplan, J. R. Tallent, *Nature* **1993**, 366, 64–66.
- [16] T. G. Ebrey, *Methods Enzymol.* **2000**, 315, 196–207.
- [17] a) N. al-Jandal, G. J. Farrar, A. S. Kiang, M. M. Humphries, N. Bannon, J. B. C. Findlay, P. Humphries, P. F. Kenna, *Hum. Mutat.* **1999**, 13, 75–81; b) P. Garriga, J. Manyosa, *FEBS Lett.* **2002**, 528, 17–22.

- [1] G. Steinberg, M. Ottolenghi, M. Sheves, *Biophys. J.* **1993**, 64, 1499–1502.
- [2] a) T. Sakmar, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1998**, 59, 1–34; b) M. Nakagawa, T. Iwasa, M. Kikkawa, M. Tsuda, T. Ebrey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6189–6192.
- [3] a) F. I. Harosi, C. Sandorfy, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 61, 510–517; b) M. Han, S. O. Smith, *Biochemistry* **1995**, 34, 1425–1432; c) Y. Gat, M. Sheves, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3772–3773; d) B. C. Hudson, R. R. Birge, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 2274–2281.