

- [12] W. J. Belcher, M. Breede, P. J. Brothers, C. E. F. Rickard, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1133–1135; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, Nr. 8.
- [13] Verzerrungen diesen Typs aber nicht diesen Ausmaßes wurden bisher nur für bestimmte Porphyrine beschrieben, bei denen sterische Spannung durch periphere Substituenten eingeführt wurde. M. O. Senge, C. J. Medforth, T. P. Forsyth, D. A. Lee, M. M. Olmstead, W. Jentzen, R. K. Pandey, J. A. Shelnutt, K. M. Smith *Inorg. Chem.* **1997**, *36*, 1149–1163.
- [14] F. H. Carré, R. J.-P. Corriu, T. Deforth, W. E. Douglas, W. S. Siebert, W. Weinmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 654–656; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 652–654.

## Lichtinduzierte Strukturänderungen während der Primärprozesse der Photosynthese: direkte Verfolgung einer Enzymreaktion\*\*

Martina Huber\*

Eines der wichtigsten Ziele der Biochemie besteht darin, aufzuklären, wie enzymatische Reaktionen auf molekularer Ebene ablaufen. Da sich außerdem viele der von Enzymen katalysierten Reaktionen nicht oder nur schwer im Reagensglas reproduzieren lassen, besteht die Hoffnung, daß man hier „von der Natur lernen“ kann, daß sich also aus dem Studium von Enzymmechanismen Impulse für die organische Synthese ergeben.

Eine der grundsätzlichen Schwierigkeiten bei der Untersuchung des Mechanismus ist die, daß die Reaktionen im allgemeinen mit Konformationsänderungen des Enzyms (Proteins) einhergehen, detaillierte Strukturinformationen normalerweise aber nur über dessen Grundzustand erhalten werden, z. B. durch Röntgenstrukturanalyse oder in neuerer Zeit zunehmend auch durch NMR-Spektroskopie. Die Erfassung von möglichen Strukturänderungen ist schwieriger, denn oft können nur die Änderungen spektroskopischer Eigenschaften des Enzyms im Laufe der Reaktion als Anhaltspunkt hierfür verwendet werden. Ob daraus ein Modell für die Enzymreaktion auf molekularer Ebene abgeleitet werden kann, hängt stark von der Genauigkeit ab, mit der die spektroskopischen Daten interpretiert werden können. Strukturinformationen über aktive Zwischenstufen bei der Enzymreaktion würden einen viel direkteren Zugang zu den interessierenden Konformationsänderungen ermöglichen, sind aber experimentell deutlich schwieriger zu erhalten.

In einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppen von Feher und Rees<sup>[1]</sup> wird gezeigt, wie solche Strukturinformationen kristallographisch erhalten werden können. Gegenstand der Untersuchungen sind die Primärprozesse der Photosynthese, d. h. der Reaktionen, mit denen Pflanzen und einige Bakte-

rien hocheffizient Licht in elektrische und letztlich chemische Energie umwandeln.

In Photosynthese-Bakterien finden diese Reaktionen in einem Membranprotein, dem Reaktionszentrum (RC), statt (Abb. 1). Seine Aufgabe besteht darin, Elektronen und

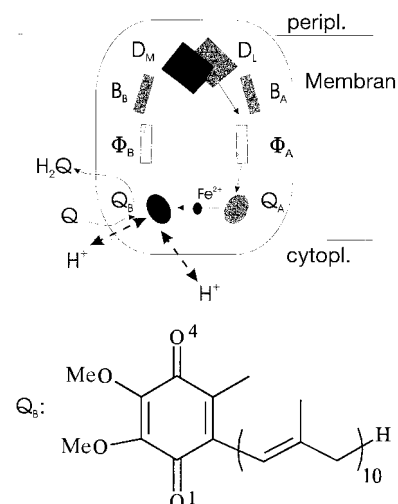


Abb. 1. Das Reaktionszentrum eines Photosynthese-Bakteriums (schematisch, in Anlehnung an die Struktur von *Rhodobacter sphaeroides*)<sup>[5]</sup> in der Photosynthese-Membran, die den periplasmatischen vom cytoplasmatischen Zellraum trennt. Als Cofaktoren für den Elektronentransfer fungieren der primäre Elektronendonator, der aus  $D_L$  und  $D_M$ , zwei Bakteriochlorophyll-*a* (BChl-*a*)-Molekülen in *R. sphaeroides*, besteht, die zusätzlichen BChl-*a*-Moleküle  $B_A$  und  $B_B$ , die Bakteriophäophytine  $\Phi_A$  und  $\Phi_B$  sowie die Chinone  $Q_A$  und  $Q_B$ . (Die Strukturformel von  $Q_B$ , Ubichinon 10, ist angegeben.) Bei der Zwei-Elektronen-Reduktion von  $Q_B$  müssen zusätzlich zwei Protonen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran aufgenommen werden. Die gestrichelten Pfeile symbolisieren Protonentransfer-Pfade über protonierbare Aminosäurereste und geordnete Wassermoleküle. Die genaue Lage der Pfade ist in Lit.<sup>[1]</sup> angegeben.

Protonen durch die Photosynthese-Membran zu pumpen und somit die Konzentrations- und Ladungsgradienten aufzubauen, deren elektrische Energie die Synthese energiereicher Zwischenprodukte in den „Dunkelreaktionen“ ermöglicht. Die Elektronen- und Protonentransfer-Prozesse im RC finden zwischen den Cofaktoren statt, deren Anordnung in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist.

[\*] Prof. Dr. M. Huber<sup>[+]</sup>  
Institute of Physics and Measurement Technology  
Linköping University  
S-58183 Linköping (Schweden)  
Fax: (+46) 13-13-7568  
E-mail: huber@ifm.liu.se

[+] Ständige Adresse:  
Institut für Organische Chemie der Freien Universität Takustraße 3,  
D-14195 Berlin  
Fax: (+49) 30-838-6046

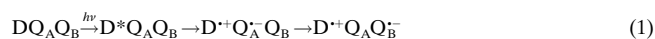
[\*\*] Ich danke G. Feher für die Einführung in das faszinierende Gebiet der RC-Forschung und für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildung 2 sowie H. Kurreck für hilfreiche Diskussionen.

In der Lit.<sup>[1]</sup> werden Strukturänderungen, die während der Primärprozesse der Photosynthese (Lichtreaktionen) auftreten, durch Tieftemperatur-Röntgenstrukturanalyse eines lichtinduzierten Intermediats untersucht. Dabei werden neue Erkenntnisse über den Mechanismus dieser hocheffizienten Umwandlung von Licht in elektrische Energie gewonnen, die helfen sollten, einige der derzeit kontrovers diskutierten Einzelheiten dieses Mechanismus zu klären. Da die Primärprozesse über einige Jahrzehnte intensiv von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht wurden,<sup>[2]</sup> können die Ergebnisse von Feher und Rees mit einer Fülle von spektroskopischen Daten und somit die direkte Methode (Röntgenstrukturanalyse) mit den eher indirekten spektroskopischen Verfahren verglichen werden.

In experimenteller Hinsicht ist die Arbeit bemerkenswert, da Membranproteine wie das RC wegen des Vorhandenseins hydrophiler und hydrophober Oberflächenbereiche zu den am schwersten zu kristallisierenden Proteinen gehören. Interessanterweise war das erste Membranprotein, dessen Röntgenstrukturanalyse gelang, ein bakterielles RC. Für diese Arbeit wurde Michel, Deisenhofer und Huber 1988 der Nobelpreis für Chemie verliehen,<sup>[3]</sup> und bis heute sind erst weniger als zehn Strukturen von Membranproteinen mit atomarer Genauigkeit bestimmt worden. Um das Intermediat abzufangen, mußte die Röntgenstrukturanalyse bei tiefer Temperatur<sup>[4]</sup> durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen ist die Auflösung der Struktur des Grundzustandes mit 2.2 Å deutlich besser als bei den bisher publizierten RC-Strukturen.<sup>[5]</sup> Deshalb konnte beispielsweise eine größere Zahl geordneter Wassermoleküle lokalisiert werden als in früheren Untersuchungen.<sup>[5]</sup> Diese Wassermoleküle könnten für den Transport von Protonen ins Proteininnere wichtig sein, der über Ketten von protonierbaren Aminosäureresten und Wassermolekülen zu verlaufen scheint, wobei die Protonen nach Art einer Eimerkette weitergereicht werden. Für die Untersuchung des lichtinduzierten Intermediats muß außerdem der überwiegende Teil der RCs in diesen angeregten Zustand überführt werden, da eine Überlagerung verschiedener Zustände die Kristallstrukturanalyse des Proteins unmöglich machen würde. Der von Feher und Rees erzielte Anteil dieses lichtinduzierten Ladungstrennungszustands liegt bei 90 %, er wurde durch kontinuierliche Bestrahlung der Kristalle mit Licht vor und während des Einfrierens erzielt.

Eines der hervorstechenden Ergebnisse der Studie ist, daß die Primärprozesse mit einer drastischen Strukturänderung verbunden sind. Dies mag insofern überraschen, als es sich bei den Reaktionen um Elektronen- und Protonentransfer-Prozesse handelt, die man im allgemeinen nicht mit Strukturänderungen assoziiert.

Die Elektronentransfer(ET)-Reaktionen folgen auf die Lichtanregung des primären Elektronendonors D, eines Bakteriochlorophyll-Dimers, in den angeregten Singulettzustand (D\*). Der sequentielle ET endet mit der Reduktion der Chinone (Ubichinon 10 (UQ<sub>10</sub>) bei *Rhodobacter sphaeroides*, Abb. 1) Q<sub>A</sub> und Q<sub>B</sub> [Gl. (1)].



Im RC wird dieser ET durch einen zweiten Ladungstrennungsschritt vervollständigt, bei dem in einer ähnlichen Sequenz wie in Gleichung (1) ein zweites Elektron auf Q<sub>B</sub> übertragen wird. Durch die damit einhergehende Aufnahme von zwei Protonen wird Q<sub>B</sub> zum Hydrochinon H<sub>2</sub>Q<sub>B</sub> reduziert, das das RC verläßt und von einem anderen (oxidierten) UQ<sub>10</sub> ersetzt wird. Die für diesen Schritt benötigten Protonen werden auf der cytoplasmatischen Seite der Photosynthesemembran aufgenommen (Abb. 1). Dadurch wird ein Protonengradient über die Membran aufgebaut, der einen Teil der für die anschließenden Dunkelreaktionen benötigten Energie liefert.<sup>[6]</sup> Somit sind Reduktion und Protonierung von Q<sub>B</sub> der Prozeß, in dem die Umwandlung von elektrischer in chemische Energie durch die Kopplung des ET an die chemischen Folgereaktionen stattfindet.

Bei dem von Stowell et al.<sup>[1]</sup> untersuchten Intermediat handelt es sich um D<sup>•+</sup>Q<sub>A</sub>Q<sub>B</sub><sup>-</sup>. Die größten Strukturänderungen treten in der Umgebung von Q<sub>B</sub> auf. Von den diskutierten Fragen seien hier nur zwei herausgegriffen, und zwar die molekularen Ursachen für die physiologisch wichtigen Unterschiede in den Bindungsenergien der Redox- und Protonierungsstufen von Q<sub>B</sub> (Q<sub>B</sub>, Q<sub>B</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>Q<sub>B</sub>) sowie die Besonderheiten des Elektronentransfers von Q<sub>A</sub> nach Q<sub>B</sub>. Damit das RC optimal funktionieren kann, müssen die Stärken der Bindung des sekundären Chinons Q<sub>B</sub> an das Protein in der Reihenfolge H<sub>2</sub>Q<sub>B</sub> < Q<sub>B</sub> < Q<sub>B</sub><sup>-</sup> zunehmen. Die Stellung von H<sub>2</sub>Q<sub>B</sub> in dieser Reihe ergibt sich daraus, daß H<sub>2</sub>Q<sub>B</sub> nur bei schwacher Bindungsaffinität problemlos gegen oxidiertes UQ<sub>10</sub> ausgetauscht werden kann. Das Semichinon-Radikalanion Q<sub>B</sub><sup>-</sup> muß als reaktives Zwischenprodukt besonders fest gebunden sein, da sein vorzeitiger Austausch, abgesehen von unerwünschten und potentiell gefährlichen Nebenreaktionen, den Reaktionszyklus unterbrechen und damit die Effizienz der Gesamtreaktion verringern würde.

Die Übertragung des ersten Elektrons von Q<sub>A</sub> auf Q<sub>B</sub> [Gl. (1)], die bei Raumtemperatur innerhalb von Mikrosekunden abläuft, ist bei tieferen Temperaturen, d.h. unterhalb von 90 K, völlig blockiert. Werden RCs dagegen unter Belichtung eingefroren, ist die bei tiefer Temperatur gemessene ET-Geschwindigkeit deutlich größer. Dieser Befund wurde auf eine durch Licht hervorgerufene Strukturänderung des RCs zurückgeführt,<sup>[7]</sup> welche Bewegung hierfür verantwortlich ist, konnte jedoch nicht angegeben werden.

Durch den Vergleich der Kristallstruktur im Dunkeln mit der im lichtinduzierten Ladungstrennungszustand D<sup>•+</sup>Q<sub>A</sub>Q<sub>B</sub><sup>-</sup> werden die mit der Reduktion von Q<sub>B</sub> einhergehenden Strukturänderungen ersichtlich. Die Positionen des Chinons in diesen Strukturen sind in Abbildung 2 dargestellt (Q<sub>B1</sub>: Position in der Dunkelstruktur, Q<sub>B2</sub>: Position im Ladungstrennungszustand). Sie unterscheiden sich durch eine Translation von Q<sub>B</sub> um 4.5 Å, die mit seiner Rotation von 180° um die Isoprenkette einhergeht. Die Unterschiede in den Wasserstoffbrückenbindungen von Q<sub>B1</sub> und Q<sub>B2</sub> sind klar erkennbar. Beim Übergang von Q<sub>B1</sub> zu Q<sub>B2</sub> nähert sich Q<sub>B</sub> deutlich dem Fe<sup>2+</sup>-Ion im RC, wodurch sich auch der Abstand zu Q<sub>A</sub> verringert. Diese Bewegung sollte den ET von Q<sub>A</sub> auf Q<sub>B</sub> begünstigen. Das von Feher und Rees vorgeschlagene Modell für die Q<sub>B</sub>-Reduktion stützt sich auf diese Bewegung: Um einen effizienten ET zu ermöglichen, muß Q<sub>B</sub> erst die Q<sub>B2</sub>-

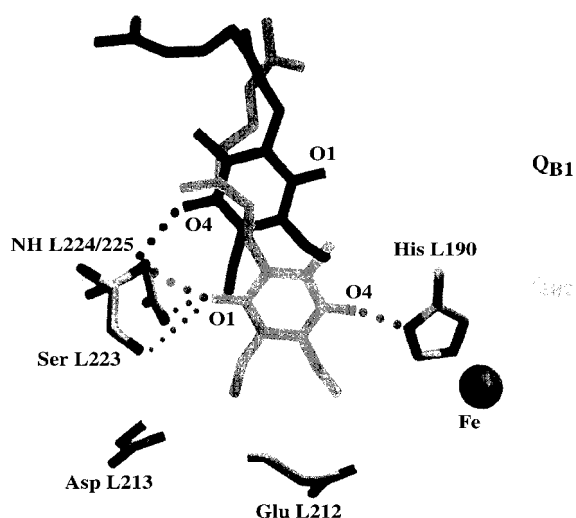


Abb. 2. Die unterschiedlichen Positionen des sekundären Chinons  $Q_B$  in den Strukturen im Dunkeln ( $Q_{B1}$ ) und im lichtinduzierten Ladungstrennungszustand ( $Q_{B2}$ ) des Reaktionszentrums. Ausgewählte Aminosäurereste des Proteins mit ihren Sequenznummern sind dargestellt (L steht für die Proteinuntereinheit L des RCs, das aus den Untereinheiten L, M und H zusammengesetzt ist). Wasserstoffbrückenbindungen werden durch gepunktete Linien symbolisiert. Das Chinon bewegt sich  $4.5 \text{ \AA}$  auf das  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion zu und dreht sich um  $180^\circ$  um seine Isoprenkette. In der Position  $Q_{B2}$  ist der Abstand zwischen  $Q_B$  und  $Q_A$  kleiner, so daß der Elektronentransfer von  $Q_A^+$  zu  $Q_B$  erleichtert ist (modifiziert entnommen aus Lit.<sup>[1]</sup>).

Position einnehmen. Dies erklärt, warum der ET-Schritt mit einer Aktivierungsbarriere verbunden ist und daher bei tiefer Temperatur nicht stattfindet: Die Ausgangsposition von  $Q_B$  ( $Q_{B1}$ ) ist für den ET ungünstig, und bei tiefer Temperatur ist die Bewegung von  $Q_B$  so stark gehemmt, daß es die  $Q_{B2}$ -Position nicht einnehmen kann.

Aus diesen beiden Positionen von  $Q_B$  erklären sich auch die unterschiedlichen Bindungsenergien der Protonierungs- und Redoxzustände von  $Q_B$  im RC. In der  $Q_{B1}$ -Position kann das Chinon nur eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Protein bilden, in der  $Q_{B2}$ -Position dagegen eine starke H-Brücke am O4- und vier schwache H-Brücken am O1-Atom (Abb. 2). Diese zusätzlichen Wechselwirkungen verankern  $Q_B^-$  fester im Protein als  $Q_B$ . Da das vollständig reduzierte  $\text{H}_2\text{Q}_B$  überhaupt keine Wasserstoffbrückenbindungen bilden kann, ist es am schwächsten gebunden und kann somit leicht durch ein anderes, oxidiertes  $Q_B$  ersetzt werden.

Die von Feher und Rees gefundenen erheblichen Bewegungen legen nahe, daß eine Interpretation des Mechanismus der Chinonreduktion lediglich auf der Basis der Grundzu-

standsstruktur problematisch sein muß. Ferner vermuten die Autoren, daß die bei früheren Untersuchungen aufgetretenen Unterschiede in der Position von  $Q_B$ <sup>[5, 8]</sup> auf dessen partielle Reduktion, z. B. durch Licht oder Röntgenstrahlung, zurückzuführen sein könnten. Da die Verschiebung des Chinons außerdem weit größer ist, als die Bewegungen, die durch Moleküldynamikrechnungen simuliert werden können, bleibt die experimentelle Untersuchung dieser Fragen mit der in Lit.<sup>[1]</sup> beschriebenen Technik unverzichtbar.

Über den Beitrag hinaus, den die Arbeit von Feher und Rees zum Verständnis der Primärprozesse der Photosynthese liefert, vermittelt sie auch eine Vorstellung davon, wie groß Strukturänderungen in redoxaktiven Proteinen sein können. Bemerkenswert ist auch, daß im RC die Affinität für das Chinonsubstrat der Funktion angepaßt wird, indem dieses zwischen unterschiedlichen Bindungsstellen wechselt, und nicht dadurch, daß konformative Änderungen des Proteins die Bindungsaffinität modulieren.

Letztlich besteht aber die besondere Faszination der Studie von Feher und Rees darin, daß hier ein Enzym während der Ausübung seiner Funktion „beobachtet“ werden kann, wobei sich herausstellt, daß auch ein so gut charakterisiertes Enzym wie das bakterielle RC noch durchaus für Überraschungen gut sein kann.

**Stichwörter:** Chinone • Elektronentransfer • Kristallstrukturanalyse • Photosynthese • Proteinstrukturen

- [1] M. H. B. Stowell, T. M. McPhillips, D. C. Rees, S. M. Soltis, E. Abresch, G. Feher, *Science* **1997**, 276, 812–816.
- [2] *The Photosynthetic Reaction Center*, Vol. 1 (Hrsg.: J. Deisenhofer, J. R. Norris), Academic Press, San Diego, **1993**.
- [3] R. Huber, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 849–871; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 848–869; J. Deisenhofer, H. Michel, *ibid.* **1989**, 101, 872–892 bzw. **1989**, 28, 829–847.
- [4] D. W. Rodgers in *Methods in Enzymology. Macromolecular Crystallography*, Vol. 276 (Hrsg.: C. W. Carter, R. M. Sweet), Academic Press, San Diego, **1997**, S. 183–203; H. D. Bellamy, R. P. Phizackerley, S. M. Soltis, H. Hope, *J. Appl. Crystallogr.* **1994**, 27, 967–970.
- [5] a) Übersicht: C. R. Lancaster, H. Michel, *Photosynth. Res.* **1996**, 48, 65–74; b) U. Ermler, G. Fritzsch, S. K. Buchanan, H. Michel, *Structure* **1994**, 2, 260–280; c) C.-H. Chang, O. El-Kabbani, D. Tiede, J. Norris, M. Schiffer, *Biochemistry* **1991**, 30, 5352–5360; c) T. O. Yeates, H. Komiya, A. Chirino, D. C. Rees, J. P. Allen, G. Feher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 7993–7997, zit. Lit.
- [6] P. Mitchell, *Science* **1979**, 206, 1148–1159.
- [7] D. Kleinfeld, M. Y. Okamura, G. Feher, *Biochemistry* **1984**, 23, 5780–5786.
- [8] B. Arnoux, J. F. Gaucher, A. Ducruix, F. Reiss-Husson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, 51, 368–379.