

Kristallstruktur des Bacteriorhodopsins bei 2.5 Å Auflösung**

Ferdinand Hucho*

Wissenschaftliche Forschung findet exemplarisch statt. Modellhaft für einen größeren Problemkreis werden einzelne Themen mit einem Aufwand an Geist und Ressourcen untersucht, der Außenstehenden mitunter absurd erscheinen mag, der aber schließlich durch den Fortschritt gerechtfertigt ist, der sich aus dem dabei gewonnenen grundlegenden Verständnis ergibt: So entstehen Lehrbuchkapitel.

Auch die Biochemiker gehen so vor. Sie erforschen an bestimmten Molekülen Prinzipien des Lebens, die letztlich fast unbemerkt in unser Basiswissen aufgenommen werden. Hämoglobin beispielsweise ist ein solches Modellmolekül. Es ließ uns verstehen, wie eine molekulare Aktivität, die Aufnahme und Abgabe von Sauerstoff, reguliert wird, wie ein Proteinmolekül aufgebaut ist und wie Erbkrankheiten durch Punktmutationen verursacht werden. Das *lac*-Operon wurde zum Modell für die Genregulation, der Acetylcholinrezeptor zum Modell für signalverarbeitende Moleküle, die Glycogenphosphorylase zum Modell für ein Schlüsselenzym des Stoffwechsels.

Mit dem Bacteriorhodopsin (BR) läßt nun ein weiteres Modellmolekül – wieder einmal – aufhorchen (Abb. 1). Nach zwanzigjährigem vergeblichem Bemühen gelang nun die Herstellung hochgeordneter Kristalle und deren Röntgenstrukturanalyse bei ausreichend hoher Auflösung.^[1] Bacteriorhodopsin, eine „lichtgetriebene Protonenpumpe“, lebenswichtig für ein in warmen Salzlösungen lebendes Purpurbakterium, ein exotisches Molekül, wichtig für einen Nischenorganismus? Nicht nur die Pioniere unter den Forschern auf diesem Gebiet, etwa Oesterhelt und Stoeckenius,^[2] sehen das zweifellos nicht so. BR steht für Grundsätzliches:^[3] Wie kann Lichtenergie unmittelbar und sehr viel einfacher als bei Pflanzen in chemische Energie umgewandelt werden?^[4] Wie können Membranen zur Energiekonservierung genutzt werden? Wie kann aktiver Transport, d.h. Bewegung von Ionen oder Molekülen gegen einen Konzentrationsgradienten, funktionieren (die Biochemiker nennen diesen aktiven Bewegungsvorgang „Pumpen“)?

BR befindet sich in zweidimensional-kristalliner Anordnung in der Membran des halophilen Archaeobakteriums *Halobacterium salinarium*. Es durchspannt die Lipiddoppelschicht, die das salzärmere Innere des Bakteriums von seiner sauerstoffarmen, unwirtlichen Umgebung abschirmt, als hydrophobe, zu Helices gefaltete Proteinkette siebenmal. Eingebettet zwischen diesen sieben Helices, als Schiff-Base an einen Lysinrest (für die Experten: Lys216) gebunden, be-



Abb. 1. Bändermodell des Bacteriorhodopsin-Monomers. α -Helices sind in Rot, Schleifen (Loops) in Gelb und einzelne, für den Protonentransfer wichtige Seitenketten in Weiß dargestellt. Das Bündel aus sieben Transmembranhelices ist senkrecht zur Ebene der Zellmembran angeordnet. (Die Abbildung wurde freundlicherweise von Eva Pebay-Peyroula, IBS Grenoble, und Jurg Rosenbusch, Biozentrum Basel, zur Verfügung gestellt.)

findet sich der Chromophor Retinal (Abb. 2). Retinal, im Ruhezustand in der all-*trans*-Konformation, isomerisiert nach Aufnahme eines Photons zum 13-*cis*-Isomer. Die mit dieser Isomerisierung verbundene Bewegung überträgt sich auf das Protein, so daß die Carboxylatgruppe seines Aspartatrestes 85 das Proton der Schiff-Base aufnehmen, über ein Netz von Wassermolekülen an den Glutamatrest 204 und schließlich an die extrazelluläre Oberfläche der Zellmembran weitergeben kann. Nach der Aufnahme eines Protons aus dem Zellinnern und dessen Weitergabe über den Aspartatrest 96 an die Schiff-Base erfolgt die Re-Isomerisierung des Chromophors zum all-*trans*-Retinal und somit die Wiederherstellung des Ruhezustandes; ein cyclischer Prozeß also, der sich spektroskopisch verfolgen und durch die Zwischenzustände J, K, L, M, N und O (siehe Abb. 2) beschreiben läßt.

Alles dies (und noch viel mehr) wußte man schon vor der jetzt veröffentlichten Röntgenstrukturanalyse.^[1] Ergebnisse von hochauflösender Elektronenmikroskopie,^[5] zeitaufgelöster FT-IR-Spektroskopie^[6], Neutronenbeugungsanalyse^[7] sowie von klassischen Methoden der Biochemie, Spektroskopie und Molekularbiologie haben sich in den vergangenen 25 Jahren zu einem detailreichen Bild zusammengefügt, das den Weg des Protons von innen nach außen nahezu Ångström für Ångström und Millisekunde für Millisekunde verfolgen läßt. Drei grundsätzliche Fragen drängen sich daher bei der Lektüre des Artikels in *Science* auf: 1) War das bisherige Bild von der lichtgetriebenen Protonenpumpe falsch, und müssen

[*] Prof. Dr. F. Hucho
Institut für Biochemie der Freien Universität
Thielallee 63, D-14195 Berlin
Fax: (+49)30-838-3753
E-mail: hucho@chemie.fu-berlin.de

[**] Der Autor dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 312) und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

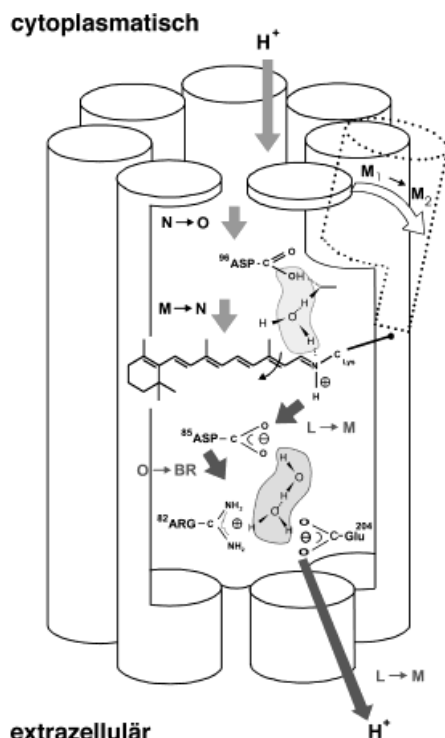


Abb. 2. Protonenpumpmodell des Bacteriorhodopsins. Nach der Isomerisierung des Retinals wird das Proton der Schiff-Base im $L \rightarrow M$ -Übergang an Asp85 abgegeben. Simultan wird ein weiteres Proton vom H-Brücken-Netz nach außen abgegeben. Die Schiff-Base wird von Asp96 in der $M \rightarrow N$ -Reaktion reprotoniert. Dabei spielen interne Wassermoleküle zwischen der Schiff-Base und Asp96 eine wichtige Rolle. Weiterhin ist die Bewegung einer Helix im $M_1 \rightarrow M_2$ -Schritt für die Richtung des Pumpvorgangs von Bedeutung. In der $N \rightarrow O$ -Reaktion wird das Asp96 reprotoniert, und das Retinal re-isomerisiert in die all-trans-Konfiguration. Schließlich wird in der $O \rightarrow BR$ -Reaktion das Asp85 deprotoniert und somit der Ausgangszustand wieder erreicht. (Mit freundlicher Genehmigung von Klaus Gewert, Bochum.)

wir es aufgrund der Kristallstruktur revidieren? 2) Was ist das prinzipiell Neue der jetzt veröffentlichten Struktur; was rechtfertigt also die stets etwas sensationelle Veröffentlichung in einem „High-impact-Journal“? 3) Ist dies nun der Schluß der BR-Forschung; wissen wir nun alles und können das Lehrbuchkapitel abschliessend schreiben?

Zur ersten Frage: Grundsätzlich falsch war nichts. Aufatmend stellen wir fest, daß die „klassischen“ Messungen korrekt waren und ihre Interpretationen sowie die daraus abgeleiteten Modelle gültig sind. Kleinere Korrekturen sind an den Schleifen (Loops) erforderlich, die die sieben Transmembranhelices verbinden. Größere Probleme gibt es jedoch im Protonenkanal: Der Abstand zwischen Aspartat 85 und der Schiff-Base ist zu groß, um vom Proton in einem Schritt überwunden zu werden.

Zur zweiten Frage: Wem der Hinweis auf die Bestätigung unserer „klassischen“ biochemischen und biophysikalischen Methoden nicht reicht, der sei auf den methodischen Quantensprung dieser Analyse verwiesen: Erstmals konnten Mi-

krokristalle mit Ausmaßen von nur 20–40 μm bei nur 5 μm Dicke verwendet werden. Dies gelang durch eine neuartige Einrichtung zur Strahlfokussierung am Elektronensynchrotron in Grenoble.^[1] Der zweite methodische Durchbruch: Erstmals wurde ein Membranprotein unter Verwendung einer speziellen Lipidphase kristallisiert, die durch das Mischen von Lipiden und Wasser erhalten wird.^[8] Man hofft, daß mit dieser Methode das grundsätzliche Problem der Kristallisation von integralen Membranproteinen gelöst werden kann.

Zur letzten Frage: Geduld, der Abschluß des BR-Kapitels ist in Sicht; nicht, weil wir schon alles wissen, sondern weil wir nun endlich Informationen und Werkzeuge in der Hand haben, um die Wirkungsweise der Protonenpumpe wirklich zu verstehen. Wie erwähnt gibt es Probleme mit den Abständen, die das „gepumpte“ Proton zu überwinden hat. Hier fehlen Röntgenstrukturanalysen bei höherer Auflösung ($\leq 2 \text{ \AA}$), mit denen mehr Wassermoleküle, die als Protonenüberträger dienen könnten,^[9] genauer lokalisiert werden können (hoffentlich entziehen sie sich nicht dem Röntgenstrahl durch zu große Mobilität!). Es fehlen wohl auch Kristallstrukturen von gezielt geplanten Mutanten, die die Bedeutung einzelner Proteinseitenketten gerade für die Bindung dieser Wassermoleküle beweisen könnten. Und dann folgt die Endphase der BR-Forschung. Eine befriedigende Beschreibung des Pumpvorgangs umfaßt nicht nur den exakten Weg des Protons, sondern vor allem die energetischen Aspekte des Prozesses: Wie werden die Zwischenzustände erreicht? Wie werden die Aktivierungsenergiebarrieren überwunden, die die unterschiedlichen Zustände voneinander trennen? Es fehlt also die Moleküldynamik, die Berechnung der Mobilität und der Energie der beteiligten Strukturen. Die Röntgenstrukturanalyse liefert uns ein Standphoto, es fehlt nun der Film. Das Geheimnis der besonderen Aktivität von Biomakromolekülen liegt in deren Dynamik, und beim BR werden wir vielleicht erstmals den Zusammenhang zwischen Dynamik und Aktivität erkennen.

Stichwörter: Bacteriorhodopsin • Kristallstrukturanalyse • Membranproteine • Proteinstruktur • Protonentransfer

- [1] E. Pebay-Peyroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch, E. M. Landau, *Science* **1997**, 277, 1676–1681.
- [2] D. Oesterheld, W. Stoeckenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 2853–2857.
- [3] U. Haupt, J. Tittor, E. Bamberg, D. Oesterheld, *Biochemistry* **1997**, 36, 2–7.
- [4] D. Oesterheld, J. Tittor, E. Bamberg, *J. Bioenerg. Biomembr* **1992**, 24, 181–191.
- [5] N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin, R. Henderson, *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 393–421.
- [6] K. Gerwert, *Biospektrum* **1997**, 2, 34–39.
- [7] N. A. Dencher, D. Dresselhaus, G. Zaccai, G. Büldt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 7876–7879.
- [8] E. M. Landau, J. P. Rosenbusch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 14532–14535.
- [9] G. Papadopoulos, N. A. Dencher, G. Zaccai, G. Büldt, *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 15.