

## Ab-initio-Moleküldynamik

**Zuordnung der Protonierungsmuster von Wassernetzwerken in Bakteriorhodopsin mittels berechneter Infrarotspektren\*\****Roger Rousseau, Volker Kleinschmidt, Udo W. Schmitt und Dominik Marx\**

Bakteriorhodopsin (bR) ist der Prototyp einer lichtgetriebenen Ionenpumpe, die einen Photonenfluss in einen Protonengradienten durch Zellwände umwandelt.<sup>[1]</sup> Zurzeit entwickelt sich eine Vorstellung über den Ablauf des Photozyklus dieses Proteins auf atomarer Ebene.<sup>[2]</sup> Galt bisher die These, dass in erster Linie Aminosäureseitenketten für den vektoriellen Protonentransport und die Protonenfreisetzung verantwortlich sind, so häufen sich nun die Hinweise auf eine aktive Beteiligung von Wassernetzwerken<sup>[3–7]</sup> im Inneren von bR bei diesen Vorgängen. Ein starkes Indiz hierfür liefern die breiten Absorptionskontinua („Kontinuumsbanden“) im infraroten Bereich,<sup>[8,9]</sup> die auf polarisierbare Wasserstoffbrücken<sup>[10]</sup> in einem protonierten Wassernetzwerk<sup>[11,12]</sup> zurückgeführt werden. Änderungen der Kontinuumsabsorption zwischen 1800 und 1900 cm<sup>–1</sup> konnten mithilfe zeitaufgelöster FT-IR-Differenzspektroskopie verfolgt und mit der Kinetik der Protonenfreisetzung beim Übergang vom L- zum M-Zustand des Proteins in Verbindung gebracht werden. Der protonierte Wassercluster, der diese Kontinuumsbande verursacht, besteht aus einem H<sub>5</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>-Ion oder einem größeren Komplex,<sup>[8]</sup> der durch die in der Nähe vorhandenen Glu194- und Glu204-Reste stabilisiert wird; dies wird durch pK<sub>S</sub>-

[\*] Dr. R. Rousseau, Dipl.-Phys. V. Kleinschmidt, Dr. U. W. Schmitt, Prof. Dr. D. Marx  
Lehrstuhl für Theoretische Chemie  
Ruhr-Universität Bochum  
44780 Bochum (Deutschland)  
Fax: (+49) 234-321-4045  
E-mail: office@theochem.rub.de

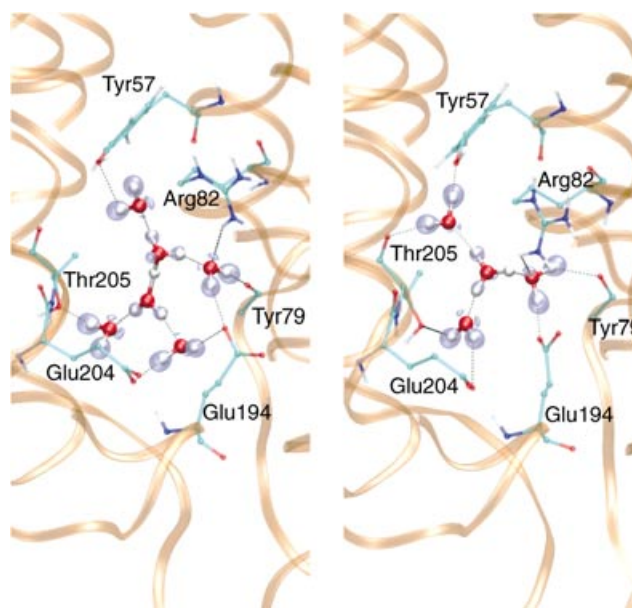
[\*\*] Wir danken Alessandro Laio und Ursula Röthlisberger für die Hilfe mit ihrer Schnittstellensoftware, Axel Kohlmeyer für technische Hilfe und Klaus Gerwert für fruchtbare Diskussionen. Die Simulationen wurden am BOVILAB@RUB (Bochum) und am NIC (Jülich) ausgeführt. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR 436) und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

Berechnungen<sup>[11]</sup> gestützt. Eine weitere breite Kontinuumsbande wurde bei  $> 2700\text{ cm}^{-1}$  beobachtet. Diese wurde auf polarisierbare Wasserstoffbrücken zurückgeführt, die möglicherweise zu einem anderen Wasser(sub)netzwerk gehören.<sup>[9]</sup>

Mithilfe gemischt quantenmechanisch/klassischer (QM/MM) Car-Parrinello-Simulationen<sup>[13,14]</sup> in Verbindung mit einem realistischen Modell für bR (eingebettet in eine vollständig hydratisierte Palmitoylphosphatidylcholin(POPC)-Membran) haben wir nahe beim L→M-Übergang die IR-Spektren protonierter Wassernetzwerke berechnet. bR ist ein relativ einfaches, aber dennoch schwierig zu simulierendes Modellsystem, da die elektronische Struktur des Proteins bei mehreren wichtigen Schritten des Pumpzyklus explizit berücksichtigt werden muss. Aus diesem Grund gibt es über bR und verwandte prototypische G-Proteingekoppelte 7-Helixrezeptoren (z.B. Rhodopsin) nur wenige Arbeiten, in denen sowohl die Quantenmechanik als auch die Proteindynamik berücksichtigt werden (siehe z.B. Lit. [20–25], zit. Lit.). Als ersten Schritt zur Lösung dieser komplexen Aufgabe haben wir durch eine Kombination<sup>[13]</sup> aus quantenmechanischen (QM) und molekülmechanischen (MM) Rechnungen mithilfe der Programme CPMD und GROMOS<sup>[13,14]</sup> das protonierte Wassernetzwerk (QM-Teil) mit der Car-Parrinello-Moleküldynamik und die Biomatrix (MM-Teil) mit etablierten Kraftfeldern behandelt.

Leider ist die Zahl interner Wassermoleküle experimentell immer noch nicht eindeutig bestimmt worden;<sup>[4,6,12]</sup> nach bisherigen Erkenntnissen enthält die große hydrophile Tasche in der Nähe von Glu194, Glu204 und Arg82 vier bis fünf Wassermoleküle. Daher wurden bei der Simulation Wassernetzwerke eingebettet, die repräsentativ sind für zwei aus Gasphasenclustern<sup>[19]</sup> sowie von Überschussprotonen in Wasser<sup>[16,17]</sup> und Eis<sup>[18]</sup> gut bekannte Protonierungstopologien: den symmetrisch solvatisierten Zundel-Komplex  $\text{H}_5\text{O}_2^+(\text{H}_2\text{O})_4$  (ein zwischen zwei  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekülen „geteiltes Proton“)<sup>[19]</sup> und den Eigen-Komplex  $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_3$  (ein an einem  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül „lokalisiertes Proton“). Diese wurden in ein geeignetes bR-Wildtypintermediat<sup>[26]</sup> mit deprotonierter Schiff-Base und 13-*cis*,15-*anti*-Retinalkonfiguration integriert (siehe Abbildung 1). Die Anfangspositionen der Wassermoleküle basieren auf neueren kristallographischen Zuordnungen gemäß der Übersicht in Lit. [6]. Die Wassermoleküle wurden danach protoniert, und das bR-Monomer wurde anschließend in eine vollständig solvatisierte POPC-Membran eingefügt.<sup>[27]</sup>

Die von uns gewählte Methode ist relativ realitätsnah und ermöglicht nach einer Reihe von MM- und QM/MM-Relaxationsschritten sowie klassischer Voräquilibration auf der Nanosekundenzeitskala bei 300 K stabile Moleküldynamiksimulationen auf der Zeitskala von 10 ps. Die IR-Spektren können dann als Fourier-Transformierte der Dipol-Autokorrelationsfunktion berechnet werden, die direkt aus dem Gesamtdipolmoment des protonierten Netzwerks gewonnen wurde. Der zu erwartende Electron-spill-out-Effekt an der QM/MM-Schnittstelle, die über die Wasserstoffbrücken zwischen dem Solvatwasser des inneren  $\text{H}_5\text{O}_2^+$ - oder  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Komplexes und den Resten vermittelt wird, wird mithilfe eines renormierten Coulomb-Potentials behandelt, das in Lit. [13] für Wasserstoffbrücken-Bindungen eingeführt und

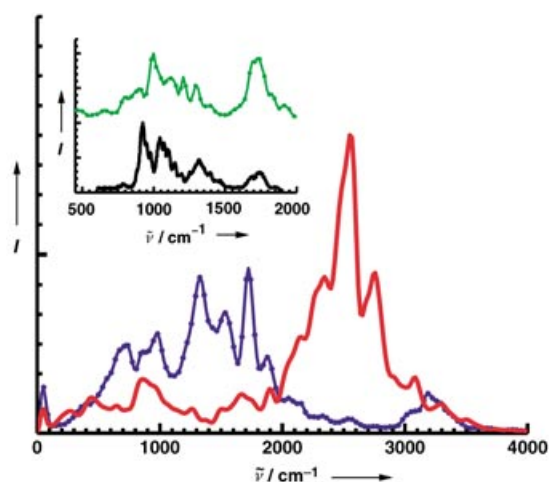


**Abbildung 1.** Repräsentative Momentaufnahmen protonierter Wassernetzwerke vom solvatisierten Zundel- (links) und Eigen-Typ (rechts) in bR bei 300 K. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die elektronische Struktur ist anhand der Elektronenlokalisierungsfunktion (ELF, blau) dargestellt (die ELF nimmt große Werte in Raumregionen mit ausgeprägter Elektronenpaarung an, z.B. in kovalenten OH-Bindungen oder freien Elektronenpaaren). Im Zundel-Netzwerk teilen sich zwei benachbarte Wassermoleküle das Überschussproton symmetrisch („symmetrisierte Wasserstoffbrücke“ im inneren  $\text{H}_5\text{O}_2^+$ -Komplex), wohingegen das Proton im Eigen-Netzwerk an einem Wassermolekül lokalisiert ist und somit einen inneren  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Komplex bildet, der seinerseits solvatisiert wird.

getestet wurde. Auf diese Weise können vollständig gekoppelte, anharmonische IR-Spektren von protonierten Wassernetzwerken in bR bei Raumtemperatur berechnet werden, ohne dass eine Reduktion der Dimensionalität dieses komplexen Systems nötig ist; die Lokalisierung der Netzwerke inklusive ihrer Wasserstoffbrücken-Bindungen zu benachbarten Resten ist das Ergebnis von MM- und QM/MM-Relaxationen.

Die Zuverlässigkeit dieser Methode, besonders in Hinblick auf anharmonische fluxionale Moden, wird in Abbildung 2 (Einschub) demonstriert: Hier wird das berechnete Spektrum eines isolierten  $\text{H}_5\text{O}_2^+$ -Gasphasenkomplexes<sup>[19]</sup> seinem kürzlich gemessenen Spektrum gegenübergestellt.<sup>[28]</sup> Für alle Berechnungen wurden das BLYP-Dichtefunktional, Pseudopotentiale nach Troullier-Martins, ein Abschneideparameter der ebenen Wellen von 70 Rydberg, eine endliche kubische Simulationszelle mit einer Kantenlänge von 30 a.u. und kompensierender Hintergrundladung, eine Temperatur von 300 K sowie 10 ps äquilibrierter Trajektorie verwendet (siehe Lit. [14,15] für weitere technische Details).

In den QM/MM-Simulationen des solvatisierten Zundel-Komplexes wurden Zwangsbedingungen für den Abstand zwischen den vier terminalen Wasserstoffatomen des inneren  $\text{H}_5\text{O}_2^+$ -Komplexes und den Sauerstoffatomen der solvatisierenden Wassermoleküle eingeführt, um die Wasserstoffbrücke möglichst symmetrisch zu halten. Beobachtet wurde die



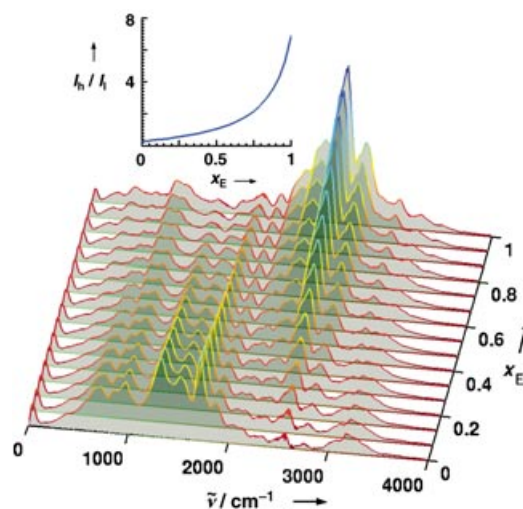
**Abbildung 2.** Berechnete IR-Spektren für Zundel- (blaue Linie mit Kreisen) und Eigen-Netzwerke (rote Linie) in bR. Einset: Berechnetes (grüne Linie mit Kreisen) und gemessenes<sup>[28]</sup> (schwarze Linie) IR-Spektrum von nacktem  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  in der Gasphase.

spontane Bildung von Wasserstoffbrücken durch die Wassermoleküle, z. B. zu Glu194, Glu204, Arg82 und Tyr57. Das asymmetrische Eigen-Netzwerk wurde nicht mit Zwangsbedingungen versehen und bildete Wasserstoffbrücken zu den gleichen Resten aus. Dieses Ergebnis (siehe Abbildung 1) ist in Einklang mit röntgenkristallographischen Untersuchungen,<sup>[3,5,6]</sup> denen zufolge wahrscheinlich mehrere Wassermoleküle innerhalb von bR vorliegen (einschließlich der hydrophilen Tasche bei Glu194, Glu204 und Arg82). Die berechneten Raumtemperatur-IR-Spektren dieser beiden protonierten Wassernetzwerke werden in Abbildung 2 gezeigt. Diese Spektren sind aufgrund der relativ kleinen Zeitskalen der QM/MM-Rechnungen repräsentativ für eine bestimmte bR-Konfiguration und sind nicht über großamplitudige Fluktuationen des Proteins gemittelt.

Interessanterweise zeigen die Spektren des Zundel- und des Eigen-Netzwerks in bR ein komplementäres Verhalten, wie man es auch bei den Spektren der Komplexe in der Gasphase beobachtet (abgesehen von den hochfrequenten OH-Streckschwingungen sowie von niederfrequenten Torsions- und Kippschwingungen): Für den Eigen-Komplex ist nur eine deutliche Resonanz zu beobachten, und zwar im Bereich zwischen 2000 und 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Diese kann durch Linearkombinationen von symmetrischen und antisymmetrischen Streckschwingungen der zentralen  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Einheit erklärt werden. Das Zundel-Netzwerk weist dagegen nur eine geringe spektrale Dichte im Bereich zwischen 2000 und 3000  $\text{cm}^{-1}$  auf, stattdessen aber eine breite Bande, die das gesamte Gebiet von ungefähr 500 bis 2000  $\text{cm}^{-1}$  abdeckt. Diese Bande stammt eindeutig von den großamplitudigen fluxionalen Schwingungen der zentralen, symmetrischen Wasserstoffbrücke des inneren Zundel-Komplexes und den Biegeschwingungen der beiden terminalen Wassermoleküle, die sich das zentrale „Zundel-Proton“ teilen (die Biegeschwingung führt im Falle des nackten Zundel-Kations  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  in der Gasphase zu einem isolierten Signal nahe 1700–1800  $\text{cm}^{-1}$ , siehe Einset in Abbildung 2); die in der ersten Solvatschale einge-

föhrten Zwangsbedingungen zur Stabilisierung der symmetrischen Wasserstoffbrücke im Inneren des solvatisierten Zundel-Komplexes beeinflussen das IR-Spektrum im hier relevanten Bereich nicht (dies wurde durch die Berechnung solcher Komplexe in der Gasphase mit und ohne Zwangsbedingungen abgeschätzt).

Wie ändert sich nun das Gesamtspektrum, das durch Überlagerung der beiden komplementären Spektren entsteht, wenn die Konzentrationen beider Netzwerktypen variiert werden? Ein solches Gesamtspektrum kann durch zeitaufgelöste FT-IR-Differenzspektroskopie<sup>[8,9]</sup> in einem Zeitfenster von etwa 20 ns bis hin zu Sekunden gemessen werden – in diesem großen Zeitfenster sind jedoch keine dynamischen QM/MM-Simulationen mehr möglich. Aus dem zusammengesetzten Gesamtspektrum in Abbildung 3 lassen



**Abbildung 3.** Konzentrationsabhängigkeit einer linearen Überlagerung der Zundel- und Eigen-Komplexe in bR als Funktion des Molensbruchs  $x_E$  des Beitrags vom Eigen-Typ. Einset:  $I_h/I_l$  in Abhängigkeit von  $x_E$ , wobei  $I_h$  und  $I_l$  die integrierten Gesamtintensitäten in den nieder- bzw. hochfrequenten Spektralbereichen 480–1950 bzw. 1950–3150  $\text{cm}^{-1}$  sind, die durch die Lage der isosbestischen Punkte definiert wurden.

sich drei wichtige isosbestische Punkte bei 480, 1950 und 3150  $\text{cm}^{-1}$  ablesen. Die relative Spektraldichte innerhalb der beiden so erhaltenen Bereiche kann integriert und als Funktion der Konzentration (z. B. des Eigen-Netzwerks) aufgetragen werden (siehe Abbildung 3, Einset). Das Ergebnis ist, dass die unteren bzw. oberen Frequenzbereiche eindeutig von Zundel- bzw. Eigen-Typ-Topologien dominiert werden.

Bei zeitaufgelösten Step-Scan-FT-IR-Experimenten beobachtete Veränderungen in der Kontinuumsbande zwischen 1800 und 1900  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[8]</sup> waren, basierend auf  $\text{pK}_s$ -Berechnungen,<sup>[11]</sup> mithilfe des Minimalmodells für ein protoniertes Wassernetzwerk (d. h. mit  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  selbst) erklärt worden. Diese Interpretation ist in Einklang mit der hier gemachten Beobachtung, dass spektrale Veränderungen bis ungefähr 2000  $\text{cm}^{-1}$  in erster Linie auf das solvatisierte Zundel-Netzwerk in bR zurückzuführen sind. Andererseits könnte die Gegenwart von zusätzlichen breiten Kontinua bei hohen Frequenzen auf eine vorübergehende Entstehung von lokalen

Protonierungsmustern vom Eigen-Typ (d.h. ein lokalisiertes Proton in Form eines  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Komplexes, der durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird) hindeuten. Darauf weisen die Änderungen im gesamten Frequenzbereich von 2100 bis 3150  $\text{cm}^{-1}$  hin (siehe Abbildung 3). Dies ist ein interessantes Ergebnis, das sicherlich einer weiteren experimentellen und theoretischen Klärung bedarf.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit Referenzsimulationen in der Gasphase legt zudem nahe, dass die spektralen Merkmale von an Resten gebundenen, protonierten Wasserstoffnetzwerken eher durch ihr lokales Protonierungsmuster und damit durch ihre Gesamttopologie als durch die genaue Lokalisierung im Protein bestimmt werden. Folglich sollte es bei einer Ausdehnung der experimentellen Zeitauflösung bis hinein in den Pikosekundenbereich sogar möglich sein, die Transformation zwischen den beiden Netzwerktopologien in situ zu verfolgen. Unsere Simulationen stützen in Kombination mit neueren IR- und Röntgenstruktur-Experimenten die These, dass protonierte Wasser(teil)netzwerke – insbesondere ein Wassercluster in der Nähe des extrazellulären Ausgangs – durch Speicherung und Abgabe eines Überschussprotons aktiv am vektoriellen Protonentransfer durch bR teilnehmen.

Eingegangen am 27. Januar 2004,  
veränderte Fassung am 7. April 2004 [Z53857]

**Stichwörter:** Biophysik · Dichtefunktionalrechnungen · Ionenkanäle · IR-Spektroskopie · Moleküldynamik · Protonentransport

- [1] U. Haupts, J. Tittor, D. Oesterheld, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 367–399.
- [2] W. Kühlbrand, *Nature* **2000**, 406, 569–570.
- [3] H. Luecke, B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailier, J. K. Lanyi, *Science* **1999**, 286 255–260; siehe auch R. B. Gennis, T. G. Ebrey, *Science* **1999**, 286, 252–253.
- [4] H. Kandori, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1460, 177–191.
- [5] N. A. Dencher, H. J. Sass, G. Büldt, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1460, 192–203.
- [6] H. Luecke, J. K. Lanyi, *Adv. Protein Chem.* **2003**, 63, 111–130.
- [7] J. Baudry, E. Tajkhorshid, F. Molnar, J. Phillips, K. Schulten, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 905–918.
- [8] R. Rammelsberg, G. Huhn, M. Lübken, K. Gerwert, *Biochemistry* **1998**, 37, 5001–5009.
- [9] J. Wang, M. A. El-Sayed, *Biophys. J.* **2001**, 80, 961–971.
- [10] G. Zundel, H. Metzger, *Z. Phys. Chem. (N. F. Frankfurt)* **1968**, 58, 225–245; G. Zundel, *Adv. Chem. Phys.* **2000**, 111, 1–217.
- [11] V. Z. Spassov, H. Luecke, K. Gerwert, D. Bashford, *J. Mol. Biol.* **2001**, 312, 203–219.
- [12] C. Kandt, J. Schlitter, K. Gerwert, *Biophys. J.* **2004**, 86, 705–717.
- [13] A. Laio, J. VandeVondele, U. Rothlisberger, *J. Chem. Phys.* **2002**, 116, 6941–6947.
- [14] D. Marx, J. Hutter in *Ab Initio Molecular Dynamics: Theory and Implementation in Modern Methods and Algorithms of Quantum Chemistry, Vol. 1* (Hrsg.: J. Grotendorst), NIC, FZ Jülich, **2000**, S.301–449; siehe [www.theochem.rub.de/go/cprev.html](http://www.theochem.rub.de/go/cprev.html); J. Hutter et al., CPMD, Max-Planck-Institut für Festkörperforschung Stuttgart und IBM Zürich, **1995–1999**; W. F. van Gunsteren et al., GROMOS96, BIOMOS b.v., ETH Zürich, **1996**.
- [15] R. Rousseau, V. Kleinschmidt, U. W. Schmitt, D. Marx, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 1848–1859.
- [16] D. Marx, M. E. Tuckerman, J. Hutter, M. Parrinello, *Nature* **1999**, 397, 601–604; siehe auch J. T. Hynes, *Nature* **1999**, 397, 565–567.
- [17] U. W. Schmitt, G. A. Voth, *J. Chem. Phys.* **1999**, 111, 9361–9381.
- [18] C. Kobayashi, S. Saito, I. Ohmine, *J. Chem. Phys.* **2000**, 113, 9090–9100; C. Kobayashi, S. Saito, I. Ohmine, *J. Chem. Phys.* **2001**, 114, 1440–1440.
- [19] M. E. Tuckerman, D. Marx, M. L. Klein, M. Parrinello, *Science* **1997**, 275, 817–820.
- [20] S. Hayashi, I. Ohmine, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 10678–10691.
- [21] A. Warshel, Z. T. Chu, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 9857–9871.
- [22] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten, *Biophys. J.* **2002**, 83, 1281–1297; S. Hayashi, E. Tajkhorshid, K. Schulten, *Biophys. J.* **2003**, 85, 1440–1449.
- [23] U. F. Röhrig, L. Guidoni, U. Rothlisberger, *Biochemistry* **2002**, 41, 10799–10809 und unveröffentlichte Ergebnisse.
- [24] Y.-S. Lee, M. Krauss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2225–2230.
- [25] M. Sugihara, V. Buss, P. Entel, J. Hafner, A. N. Bondar, M. Elstner, and T. Frauenheim, *Phase Transitions* **2004**, 77, 31–45.
- [26] A. Royant, K. Edmann, T. Ursby, E. Pebay-Peyroula, E. M. Landau, R. Neutze, *Nature* **2000**, 406, 645–648; siehe auch den Kommentar „e“ in Tabelle I in Lit. [6].
- [27] H. Heller, M. Schaefer, K. Schulten, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 8343–8360.
- [28] K. R. Asmis, N. L. Pivonka, G. Santambrogio, M. Brümmer, C. Kaposta, D. M. Neumark, L. Wöste, *Science* **2003**, 299, 1375–1377; zu beachten ist hierbei die Kontroverse um die Deutung des gemessenen Spektrums: J. Dai, Z. Baèic, X. Huang, S. Carter, J. M. Bowman, *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 6571–6580.