

Ursprung der spektralen Verschiebung von Rhodopsin – es ist nicht die Bindungstasche**

Sivakumar Sekharan, Minoru Sugihara und Volker Buss*

Eines der grundlegenden und immer noch ungelösten Rätsel in der Chemie des Sehprozesses betrifft den Mechanismus, der die Absorption des Sehpigments reguliert. Rhodopsin, das Pigment der Stäbchenzellen, das das Dämmerungssehen im menschlichen Auge vermittelt, absorbiert bei 498 nm; die Absorptionsmaxima der drei Pigmente der Zäpfchen, die für das Farbensehen zuständig sind, liegen bei 425, 530 und 560 nm. Der Chromophor in allen vier Rezeptoren ist derselbe: die protonierte Schiff-Base des 11-cis-Retinals (pSb11). Die Spektren dieser Pigmente sind daher eine Funktion der Proteinumgebung, die der Chromophor „sieht“; mit anderen Worten, sie werden vom Protein bestimmt.^[1]

Es besteht allgemeine Übereinstimmung darin, dass drei Mechanismen bei der spektralen Verschiebung eine Rolle spielen: 1) Verformung des Chromophors als Folge sterischer Wechselwirkungen in der Bindungstasche des Proteins; 2) Wechselwirkung des Chromophors mit dem Gegenion, das dessen positive Ladung neutralisiert; 3) Wechselwirkung mit den polaren Resten anderer Aminosäuren in der Umgebung des Chromophors. Allerdings konnten diese Faktoren nicht quantitativ gewichtet werden, solange es keine realistischen Strukturen der Sehpigmente gab – eine Situation, die sich mit der ersten Röntgenstrukturanalyse von Rhodopsin geändert hat.^[2] Inzwischen wurde die Auflösung der Kristallstruktur auf 2.2 Å gesteigert,^[3] was die Untersuchung des Chromophors einschließlich seiner Umgebung mit quantenmechanischen Methoden hoher Qualität ermöglichte.^[4–7] Trotz wesentlicher Erkenntnisse, die diese Untersuchungen erbrachten, blieben grundsätzliche Fragen bisher unbeantwortet, insbesondere die, in welchem Ausmaß die geladenen und/oder polaren Aminosäuren der Bindungstasche das Absorptionsspektrum des Chromophors beeinflussen.

Kürzlich wurde der Absorptionsquerschnitt von pSb11 in der Gasphase durch Analyse der Fragmente photochemisch angeregter Molekülionen bestimmt.^[8] Ohne die Wechselwirkung mit der Proteinumgebung ist der Chromophor in der Gas- oder Vakuumphase maßgeschneidert für hochgenaue quantenmechanische Rechnungen. Er ist gleichzeitig ein

eindeutig definierter Referenzpunkt für die Analyse der spektralen Verschiebung von Rhodopsin. Mit einer durch Störungstheorie korrigierten CASSCF-Wellenfunktion (CASPT2) haben wir das experimentelle Absorptionsmaximum des isolierten Rhodopsinchromophors (610 nm) mit hoher Genauigkeit wiedergeben können.^[9] Auf der Grundlage derselben theoretischen Methode zeigen wir im Folgenden, dass die Summe der drei oben diskutierten Beiträge quantitativ zu der experimentell beobachteten spektralen Verschiebung des Chromophors vom Vakuum zum Rhodopsin führt. Mit Abstand den größten Beitrag zu dieser Verschiebung liefert das Gegenion, während die Rolle der polaren Aminosäurereste in der Proteintasche entgegen der landläufigen Meinung eher gering ist.

Die Rechnungen wurden an drei pSb11-Modellsystemen durchgeführt, die sich von der mit SCC-DFTB^[10] verfeinerten, in Abbildung 1 dargestellten Geometrie der Bindungstasche des Rhodopsins bei 2.2 Å Auflösung ableiten und die in zunehmendem Maße den Einfluss des Proteins widerspiegeln. Ausgehend von der optimierten Vakuumstruktur von pSb11, die wir schon früher beschrieben haben,^[9] wurden zunächst die Änderungen in der Geometrie entsprechend der berechneten Rhodopsinstruktur berücksichtigt, was zu dem

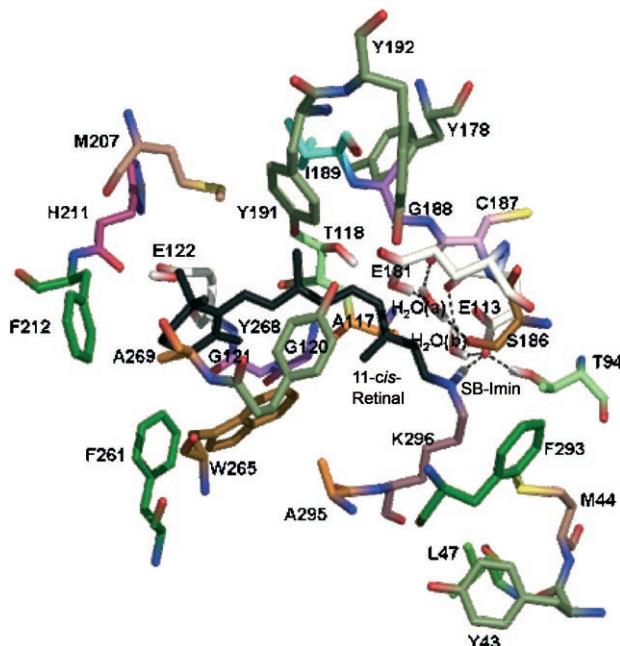


Abbildung 1. Mit SCC-DFTB optimierte Bindungstasche des Rhodopsins. Dargestellt sind neben dem Chromophor (in Schwarz) die 28 Aminosäuren innerhalb eines Abstands von 4.5 Å zum Chromophor sowie zwei Wassermoleküle in der Nähe des Gegenions E113.

[*] S. Sekharan, Dr. M. Sugihara, Prof. Dr. V. Buss

Fachbereiche Chemie und Physik
Universität Duisburg-Essen
Campus Duisburg, 47048 Duisburg (Deutschland)
Fax: (+44) 203-379-2772
E-Mail: volker.buss@uni-due.de

[**] Diese Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR480) finanziell unterstützt. Die Simulationen wurden am RRZK der Universität zu Köln durchgeführt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

verdrillten Chromophor pSb11_{dist} führte. Die Verknüpfung mit dem Gegenion E113 ergab das Ionenpaar pSb11_{ip}. Schließlich wurde die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und den polaren Aminosäuren der Proteintasche in Form quantenmechanisch berechneter partieller Punktladungen berücksichtigt. Das daraus resultierende System, pSb11_{pe}, steht für den in die Proteintasche eingebetteten 11-*cis*-Retinalchromophor.

Der Grund- (S_0) und die angeregten Zustände (S_1 und S_2) der drei Modellchromophore wurden mit Störungstheorie zweiter Ordnung (CASPT2)^[11] in einem atomaren Basissatz aus natürlichen Orbitalen (ANO) berechnet. Die Punktladungen wurden durch eine natürliche Populationsanalyse (NPA)^[12] der B3LYP/6-31G**-Wellenfunktion der gesamten Bindungstasche ermittelt. Einzelheiten sind unter *Methoden* beschrieben. Als Referenz ziehen wir auch die Daten für pSb11_{vac} aus einer früher veröffentlichten Arbeit heran.^[9]

Eine Zusammenfassung der berechneten spektralen Daten der vier Modellsysteme des Retinals gibt Tabelle 1. Der Vollständigkeit halber haben wir auch die Ergebnisse für den verbotenen S_2 -Zustand aufgeführt, aber hier diskutieren wir nur die Anregung von S_0 nach S_1 , die dem optisch erlaubten Übergang entspricht. Zunächst erinnern wir an die sehr gute Übereinstimmung des berechneten Absorptionsmaximums (606 nm) des Chromophors im Vakuum, pSb11_{vac}, mit dem experimentellen Wert. Die Übereinstimmung ist sicher kein Zufall. Mit demselben Satz von Parametern für die CASPT2-Rechnungen haben wir für mehrere geladene und elektrisch neutrale Retinalderivate, die in einem Wellenlängenbereich von 600 bis 350 nm absorbieren, eine ähnlich gute Übereinstimmung erzielt.^[9]

Tabelle 1: Mit CASPT2 berechnete Energien E , Oszillatorstärken f , die wichtigsten Konfigurationen mit Gewicht sowie Dipolmomente μ des Grundzustands S_0 und der angeregten Zustände S_1 und S_2 der Modellchromophore.

Struktur ^[a]	Zustand	$E^{[b,c]}$	f	Konfiguration ^[d]	$\mu^{[e]}$
pSb11 _{vac} ^[f]	S_0	−871.2306	—	(6a) ² (7a) ⁰ 75	22.75
	S_1	2.05 (606)	1.12	(6a) ¹ (7a) ¹ 61	6.70
	S_2	2.84 (436)	0.13	(6a) ⁰ (7a) ² 28	19.45
pSb11 _{dist}	S_0	−871.2185	—	(6a) ² (7a) ⁰ 74	16.41
	S_1	1.93 (643)	0.96	(6a) ¹ (7a) ¹ 60	11.42
	S_2	2.77 (447)	0.14	(6a) ⁰ (7a) ² 27	13.34
pSb11 _{ip}	S_0	−1060.0803	—	(6a) ² (7a) ⁰ 65	10.22
	S_1	2.55 (486)	0.82	(6a) ¹ (7a) ¹ 62	20.79
	S_2	2.93 (423)	0.00	(6a) ⁰ (7a) ² 29	10.03
pSb11 _{pe} ^[g]	S_0	−1060.7835	—	(6a) ² (7a) ⁰ 65	9.64
	S_1	2.47 (502)	0.79	(6a) ¹ (7a) ¹ 62	21.59
	S_2	2.89 (429)	0.00	(6a) ⁰ (7a) ² 29	9.64

[a] Siehe Abkürzungen im Text. [b] S_0 -Energien in atomaren Einheiten, S_1 - und S_2 -Energien (relativ zum Grundzustand S_0) in eV und (in Klammern) in nm. [c] Fett gedruckt: Wellenlänge der optischen Absorption (in nm). [d] Nur π -artige Orbitale sind berücksichtigt; Gewicht in %. [e] Dipolmomente in Debye. [f] Daten aus Lit. [9]. [g] Ladungen berechnet mit NPA. Ergebnisse auf der Grundlage von Mulliken- und CHARMM-Ladungen sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.

Die Bindung durch das Protein hat sterische Wechselwirkungen zur Folge, die sich vor allem in Form nichtplanarer Verdrillungen des Chromophors äußern. Besonders betroffen davon ist die C11=C12-Bindung, deren Diederwinkel von 8° in pSb11_{vac} auf 17° in pSb11_{dist} ansteigt. Die Summe der Verdrillungen insgesamt hat eine Rotverschiebung der Absorption um 37 nm zur Folge. Zusätzlich zu der spektralen Verschiebung nehmen die Oszillatorstärke sowie das Dipolmoment des Grundzustands ab, beides eine Folge der leicht komprimierten Geometrie des gebundenen Chromophors im Vergleich zu der völlig gestreckten Geometrie im isolierten Zustand. Sowohl in pSb11_{vac} wie auch in pSb11_{dist} ist das Dipolmoment im S_1 -Zustand deutlich geringer als im S_0 -Zustand, eine Folge der massiven Verschiebung negativer Ladung von der konjugierten Kette zum positiven Stickstoff bei der Anregung in den ionischen S_1 -Zustand.^[13]

Signifikante Veränderungen gehen mit der Verknüpfung des Chromophors mit dem Gegenion (pSb11_{ip}) einher: Die Energielücke von S_0 nach S_1 nimmt deutlich zu (um 0.62 eV), was die Absorption des Ionenpaares nach 486 nm verschiebt, also in die Nähe des Absorptionsmaximums von Rhodopsin bei 498 nm. Die Abnahme der Oszillatorstärke belegt, dass die Bewegung der Elektronen als Folge der Anregung noch stärker behindert ist. Dies ist einzusehen, muss doch im Ionenpaar die Ladung gegen das negativ geladene Gegenion verschoben werden. Diese Verschiebung ist auch der Grund für die Zunahme des Dipolmoments im S_1 -Zustand relativ zu S_0 , was wir schon früher diskutiert haben.^[14]

Der größte Anteil an der berechneten Blauverschiebung ist auf die Destabilisierung des S_1 -Zustands in Gegenwart des Gegenions und die dadurch verursachte elektrostatische Abstoßung zurückzuführen. Es gibt noch einen weiteren Grund für die Blauverschiebung, nämlich die Zunahme der Doppelbindungsfixierung der konjugierten Kohlenstoffkette, eine Folge der Lokalisierung der positiven Ladung des Chromophors durch das Gegenion. Rechnungen an Modellretinalen haben allerdings gezeigt, dass dieser Effekt mit nicht mehr als 10% an der berechneten spektralen Verschiebung durch das Gegenion beteiligt ist.^[14]

Die spektrale Verschiebung wird durch die elektrostatische Wechselwirkung mit den Aminosäuren vervollständigt, die aus dem Chromophor-Gegenion-Komplex pSb11_{ip} den im Protein eingebetteten Chromophor pSb11_{pe} machen. Ein Blick auf Tabelle 1 zeigt, dass die Störung durch die Ladungen vergleichsweise klein ist. Die berechnete Verschiebung ist langwellig, um 0.08 eV oder 16 nm, und auch die Ladungsverteilung, ausgedrückt durch das permanente Dipolmoment, ändert sich nicht signifikant. Unter dem Strich bringt jedoch die Berücksichtigung der Ladungen das berechnete Absorptionsmaximum sehr nah an das experimentelle Maximum von Rhodopsin heran.

Die natürliche Populationsanalyse, die wir zur Berechnung der atomaren Partialladungen durchgeführt haben, basiert auf der Transformation der molekularen Wellenfunktion in natürliche Bindungssorbitale (NBOs). Sie wurde entwickelt, um eine molekulare Ladungsverteilung berechnen zu können, die von der Wahl des Basissatzes weitgehend unabhängig ist.^[12] Wir haben die spektralen Eigenschaften des eingebetteten Chromophors pSb11_{pe} auch mit Ladungen aus

einer konventionellen Mulliken-Populationsanalyse und mithilfe von CHARMM-Ladungen berechnet. Die Mulliken-Analyse geht, wie NPA, von einer für das System berechneten Wellenfunktion aus, CHARMM-Ladungen dagegen sind übertragbare Parameter. Die so berechneten Verschiebungen betragen +20 nm auf der Grundlage von Mulliken-Ladungen und -7 nm mit CHARMM-Ladungen. Der Einfluss der polaren Umgebung sollte sich besser durch quantenmechanisch abgeleitete Ladungen darstellen lassen als durch umgebungsunabhängige CHARMM-Ladungen. Mit einer absoluten Verschiebung, die in allen drei Fällen geringer als 0.1 eV ist, kann allerdings die Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und den neutralen Aminosäuren des Proteins als Ursprung der spektralen Verschiebung in Rhodopsin ausgeschlossen werden.

Eine Rotverschiebung durch die Ladungen der Proteintasche mit einem ähnlichen Ansatz wie dem hier beschriebenen (CASPT2 mit AMBER-Ladungen) wurde auch an anderer Stelle beschrieben.^[5] Allerdings ist die dort berechnete Verschiebung mit 0.53 eV im Vergleich zu unseren Werten viel zu groß. Nur weil die berechnete Absorption des Chromophors in der Gasphase (vergleichbar unserer pSb₁₁_{dist}-Struktur) sehr stark blauverschoben ist (gemessen an unseren Ergebnissen), kommt die berechnete Energiedifferenz S₀–S₁ in die Nähe des experimentellen Wertes.

Auf der Grundlage der besten verfügbaren Strukturdaten haben wir gezeigt, dass das Absorptionsspektrum von Rhodopsin ab initio und mit sehr guter Genauigkeit berechnet werden kann, wenn man eine qualitativ hochwertige quantenmechanische Methode verwendet. Wir haben ferner gezeigt, dass der mit Abstand größte Einfluss auf das Rhodopsinspektrum durch das Gegenion ausgeübt wird. Die Proteinumgebung bewirkt und stabilisiert die Chromophorverdrillung, die für die selektive und ultraschnelle Photoreaktion zum Bathorhodopsin notwendig ist. Wir schließen daraus, dass dies ihre primäre Funktion ist und dass die Spektralverschiebung durch die Bindungstasche nicht das Ziel ist, das die Evolution verfolgt hat.

Methoden

Für die Rechnungen wurde das mit SCC-DFTB optimierte Modell der Bindungstasche von Rhodopsin verwendet, das auf der Grundlage von Kette B der mit 2.2 Å aufgelösten Kristallstruktur erzeugt wurde (PDB-Code 1U19) und das im Detail beschrieben wurde.^[3] Die unterschiedlichen pSb₁₁-Strukturen wurden daraus durch Entfernen der gesamten Proteinhülle (pSb_{dist}) und Verknüpfung mit dem Gegenion als Formiat-Ion (pSb_{ip}) erhalten. Für pSb_{11pe} wurde mit Gaussian^[15] die Wellenfunktion der vollständigen Bindungstasche einschließlich des Chromophors berechnet (DFT-B3LYP in einer 6-31G**-Basis), mit der anschließend eine natürliche Populationsana-

lyse durchgeführt wurde. Die kartesischen Koordinaten der Bindungstasche und die verwendeten NPA-Ladungen können den Hintergrundinformationen entnommen werden.

Die Rechnungen zur elektronischen Struktur des Chromophors einschließlich seines Gegenions (CASPT2) wurden mit der Molcas^[16] durchgeführt. Die Basis war ein Satz von natürlichen atomaren Orbitalen (ANO)^[17] mit einer 4s3p1d-Kontraktion für die schweren Elemente und 2s für Wasserstoff. Der aktive Raum, (12/12), umfasste alle π-artigen Orbitale und Elektronen. Der Level-Shift betrug einheitlich 0.3 au. Übergangsdipolmomente wurden im Geschwindigkeitsformalismus berechnet und für die Oszillatorstärken mit CASPT2-Energien kombiniert.

Eingegangen am 12. August 2006
Online veröffentlicht am 22. November 2006

Stichwörter: Ab-initio-Rechnungen · Absorption · Rhodopsin · Sehpigmente · Spektralverschiebung

- [1] T. P. Sakmar, S. T. Menon, E. P. Martin, E. S. Awad, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, *31*, 443–484.
- [2] K. Palczewski, T. Kumakura, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, *289*, 739–745.
- [3] T. Okada, M. Sugihara, A. N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, V. Buss, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571–583.
- [4] N. Ferre, M. Olivucci, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6868–6869.
- [5] T. Andruniow, N. Ferre, M. Olivucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17908–17913.
- [6] K. Fujimoto, J. Hasegawa, S. Hayashi, S. Kato, H. Nakatsuji, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *414*, 239–242.
- [7] M. Schreiber, M. Sugihara, T. Okada, V. Buss, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4380–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4274–4277.
- [8] L. H. Andersen, I. B. Nielsen, M. B. Kristensen, M. O. A. Ghazaly, S. Haake, M. Brondsted Nielsen, M. A. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12347–12350.
- [9] S. Sekharan, O. Weingart, V. Buss, *Biophys. J.* **2006**, *91*, L7–L9.
- [10] M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, T. Frauenheim, S. Suhai, G. Seifert, *Phys. Rev. B* **1998**, *58*, 7260–7268.
- [11] K. Andersson, P.-A. Malmqvist, B. O. Roos, A. J. Sadley, K. Wolinski, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 5483–5488.
- [12] A. R. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 735–746.
- [13] P. Tavan, K. Schulten, *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 6602–6608.
- [14] J. Hufen, M. Sugihara, V. Buss, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 20419–20426.
- [15] M. J. Frisch et al., Gaussian **2003**, Revision B.04, Gaussian Inc., Pittsburgh.
- [16] M. P. Fuelscher et al., Molcas **2004**, Version 6.2, University of Lund, Schweden.
- [17] K. Pierloot, B. Dumez, P. O. Roos, B. O. Roos, *Theor. Chim. Acta* **1995**, *90*, 87–114.