

Enzymkatalyse „in neuem Licht“

Wolfgang Gärtner*

Enzymkatalyse · Laserspektroskopie · Oxidoreduktasen · Photochemie · Schwingungsspektroskopie

Enzyme sind dazu in der Lage, chemische Reaktionen mit überragender Effizienz unter äußerst milden Bedingungen ablaufen zu lassen. Besonderes wissenschaftliches Interesse finden dabei seit jeher Proteine, die entweder besonders komplexe (aus chemischer Sicht oft nahezu „unmögliche“) oder besonders schnelle Reaktionen ermöglichen, die nur noch durch die Diffusion kontrolliert sind. Mit einem dieser Enzyme haben sich Hunter et al. in einer kürzlich erschienenen Arbeit in *Nature* beschäftigt.^[1] Die Autoren interessierten sich insbesondere für die Frage, wodurch Enzyme reguliert werden: Ist die Konformationsänderung des aktiven Zentrums bei Eintritt eines Substrats in die aktive Tasche der Auslöser für die Reaktion oder bewirkt umgekehrt die beginnende chemische Reaktion (Änderungen der Elektrostatik oder Polarisierung von Bindungen) bei Annäherung des Substrats die Konformationsänderung des aktiven Zentrums?

Die Untersuchungen von Hunter et al. haben die NADPH:Protochlorophyllid (Pchlid)-Oxidoreduktase (POR) zum Inhalt. Dieses Enzym wurde bereits in den 1960er und 1970er Jahren intensiv untersucht^[2,3] (für eine aktuelle Übersicht siehe Lit. [4]). Im hier vorgestellten Fall wurde die POR aus *Thermosynechococcus elongatus* verwendet, für deren Struktur ein Homologiemodell der verwandten POR aus *Synechocystis*^[5] zugrunde gelegt wurde (Abbildung 1). Die POR ist ein Schlüsselenzym beim Aufbau des Photosyntheseapparats. Es vermittelt die lichtgetriebene Umwandlung der Chlorophyllvorstufe Protochlorophyllid in Chlorophyllid (Chlid) und legt damit die Grundlage für die Biosynthese der übrigen Photosynthesebausteine. Wegen dieser Funktion weist die POR alle Merkmale eines biologischen Photosensors auf. Die Notwendigkeit einer Lichtinduktion der POR-Enzymaktivität wurde bereits früh erkannt.^[2,3] In dauerbelichteten Präparaten findet man eine bemerkenswert hohe Quantenausbeute (0.85) für die Pchlid-Umwandlung. POR trägt als enzymatischen Cofaktor ein Molekül NADPH (Nicotinamidadenindinucleotidphosphat in reduzierter Form), das an der Hydrierung einer Doppelbindung (C17-C18) des eingelagerten Substrats Protochlorophyllid beteiligt ist. Die erste Reaktion besteht in der Übertragung eines Hydrids von NADPH auf C17, auf die *trans*-ständig eine Protonenaddition an C18 folgt. Diese wird – wie durch Mutagenese demonstriert – durch die phenolische

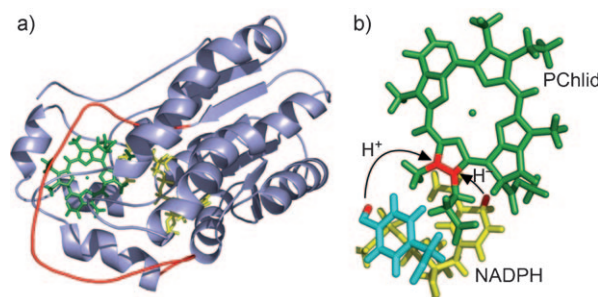


Abbildung 1. Homologiemodell der POR aus *Synechocystis* (links).^[5] POR enthält im Unterschied zu anderen Oxidoreduktasen einen 33 Aminosäuren langen Bereich (rot), der wahrscheinlich an der Bindung des Substrats Pchlid beteiligt ist. Rechts: detailliertes, dreidimensionales Modell der Anordnung von Pchlid (grün), NADPH (gelb, darunter positioniert) und dem Protonen übertragenden Tyrosinrest (cyan); die an der Reaktion teilnehmenden Positionen (Hydrid, Proton und C17-C18-Doppelbindung) sind in Rot dargestellt. Aus den Reaktionspfeilen wird die *trans*-Addition der beiden Wasserstoffatome deutlich.

Hydroxygruppe eines in direkter Nachbarschaft positionierten Tyrosinrests ermöglicht.^[6] Dehydrogenasen wie die POR gehören zu den aktivsten Enzymen und beschleunigen den Umsatz gegenüber der unkatalysierten Reaktion in einigen Fällen um bis zu sieben Größenordnungen.^[1,7]

Interessanterweise ist der vorinkubierte Komplex aus NADPH, Pchlid und apo-POR im Dunkeln völlig stabil und benötigt Licht zur Aktivierung und zur Aufrechterhaltung der Reaktion, weshalb sich die POR hervorragend für die Untersuchung der obigen Fragestellung eignet. Die Autoren führen aus, dass sogar ein durch einmalige Belichtung aktiviertes, mit Substrat beladenes Enzym in diesem aktiven Zustand bis zu 19 h stabil bleibt und auch dann noch durch weitere Belichtung zur Katalyse gebracht werden kann. Bei einer genügend kurzen oder wenig intensiven Belichtung sollte es also möglich sein, auftretende Konformationsänderungen während der Reaktion zu detektieren und damit den Katalyseprozess in seine Einzelschritte zu zerlegen.

Die Detektion der Absorptionsänderungen bei Bestrahlung mit extrem schwachen, ultrakurzen Laserblitzen ($\lambda_{\text{exc}} = 475 \text{ nm}$; ca. 0.03 Photonen pro POR-Molekül bei einer Pulslänge von ca. 50 fs) lieferte in der Tat einen interessanten Befund (die Einstrahlung erfolgte in die Soret-Bande, die Detektion im Bereich der Q_y -Bande). Die geringe Lichtintensität machte Serien von Scans zur Akkumulation der Signale notwendig. Bei den Scans 1/2, 6–12 und 26–55 zeigten sich jeweils unterschiedliche Strukturen der hervorgerufenen

[*] W. Gärtner

Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim (Deutschland)
E-Mail: gaertner@mpi-muelheim.mpg.de

Absorptionsänderungen (Abbildung 2). Für jede Scan-Serie werden drei Zeitbereiche – einige ps, mehrere Hundert ps und ca. 5 ns – präsentiert. Grundsätzlich findet man nach etwa 1 ps eine durch die Laserblitze bewirkte Abnahme der In-

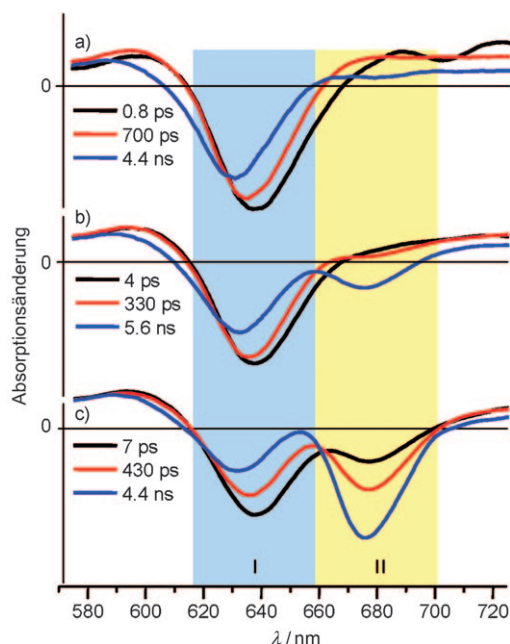


Abbildung 2. Verlauf der lichtinduzierten Absorptionsänderungen im Bereich der Q_y -Bande von Pchlid. Die beiden Bereiche der maximalen Änderungen sind blau und gelb hinterlegt. Gezeigt sind drei Serien von Scans zur Datenaufnahme: a) Scans 1 + 2, b) Scans 6–12, c) Scans 26–55. Bei jedem Scan wurde ein Zeitintervall von ca. 1 ps bis 5 ns aufgenommen. Für alle drei Serien sind exemplarisch die Absorptionsänderungen im Zeitbereich weniger ps (schwarze Kurven), einiger hundert ps (rote Kurven) und einiger ns (blaue Kurven) dargestellt.

tensität der Pchlid-Bande um 640 nm, die dann zu einem späteren, nicht mehr detektierten Zeitbereich in die Produktbande übergeht. Bei den Scans 1 und 2 tritt bei 0.8 ps zusammen mit dieser Intensitätsabnahme eine deutlich erkennbare, stimulierte Emission auf. Für alle drei Messreihen ergibt sich bei einer Verlängerung der Detektionszeit von wenigen ps auf 4–5 ns eine hypsochrome Verschiebung der Bande von 640 zu ca. 630 nm, was auf Strukturänderungen bereits in diesem engen Zeitrahmen schließen lässt. Die Auswertung der Scans 6–12 zeigt neben der bereits beobachteten Intensitätsabnahme der Pchlid-Bande für das größte Detektionsfenster (nun 5.6 ns) allerdings bereits die Emission einer zweiten Spezies mit Absorption um 675 nm, die in den Scans 26–55 sogar bestimmend wird. Werden aus diesen drei Messreihen jeweils separat die Quantenausbeute und die Bildungsgeschwindigkeit der aktiven Spezies I_{675}^* bestimmt, so findet man, dass beide zunehmen, je länger die Probe dem Anregungslicht ausgesetzt ist. Aus diesen EADS (evolution-associated difference spectra) entwickelten die Autoren mithilfe einer (modellbezogenen) Target-Analyse in Einklang mit den spektralen Veränderungen ein Drei-Zustands-Reaktionsschema, demzufolge sich das „aktive“ Pchlid durch Ap-

plikation der einzelnen Lichtblitze anhäuft, ein Konzentrationsmaximum durchläuft und schließlich in das Reaktionsprodukt Chlid übergeht. Das Modell umfasst mehrere Zwischenzustände, die von PChlid im angeregten Zustand durchlaufen werden.

Diese beobachtete Akkumulation der reaktiven Spezies durch aufeinander folgende Laserblitze ermöglicht die Anwendung einer (Rapid-Scan-)Schwingungsspektroskopie (FTIR), die Konformationsänderungen des Substrats und des Enzyms sichtbar macht: Jedem der drei Zustände des Modells, die sich aus der ps/ns-Detektion ergaben, lassen sich nun IR-Banden zuordnen, deren Intensität mit zunehmender Zahl an Laserblitzen ab- oder zunimmt. So lassen sich z. B. die Abnahme der C=O-Schwingungsintensitäten von NADPH und des PChlid-Moleküls und die entsprechende Zunahme dieser Intensitäten in den Produkten $NADP^+$ und Chlid dokumentieren. Zusätzlich erkennt man die Zunahme der C-C-Streckschwingungsintensität (und damit der Konzentration) des Produkts Chlid. Von Bedeutung ist auch die Veränderung der Amid-I- und Amid-II-Banden, die Gerüstschwingungen des Proteins zugeordnet werden, im jeweils gleichen Zeitbereich, in dem auch die beobachteten Substratveränderungen stattfinden. Damit werden die lichtinduzierten Änderungen des Substrats mit den Strukturveränderungen des Proteins in Beziehung gebracht.

Der Befund, dass für die Aufrechterhaltung einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit eine „Dauerbelichtung“ erforderlich ist, bildet die Grundlage für einen von den Autoren vorgeschlagenen Mechanismus der POR-Enzymaktivität: Die primäre Absorption eines Photons überführt das Protein in einen aktiven Zustand, aus dem heraus das Intermediat I_{675}^* gebildet wird. Bereits diese Lichtabsorption hat Veränderungen der elektronischen Eigenschaften und wahrscheinlich auch der Acidität der reaktiven Zentren zur Folge, wodurch der C17/C18-Bereich, die Seitengruppe des Tyrosins und das NADPH-Molekül in eine günstige Anordnung gebracht werden. Allerdings ermöglichen erst weitere Photonenabsorptionen die Weiterführung der Reaktion bis zur Produktbildung. Die damit einhergehenden Veränderungen auf molekularer Ebene sind noch nicht im Detail verstanden, die Autoren stellen allerdings fest, dass zunächst die (formale) Hydridübertragung erfolgt, für die möglicherweise diese weitere Lichtaktivierung notwendig ist. Erst im Anschluss, nach Akkumulation negativer Ladung an C18, wird die Protonenübertragung möglich. Beide Übertragungsprozesse sind sehr schnell und werden (gestützt durch quantenchemische Rechnungen) als Tunnelprozesse erklärt,^[8] wobei die hierfür notwendige Anordnung der Reaktionspartner zueinander im angeregten Zustand durch die Lichtabsorption möglich wird.

Die POR ist ein einzigartiges Modell für die Untersuchung katalytischer Prozesse in Enzymen, und die mit ihr erhaltenen Ergebnisse zeigen allgemeingültige Reaktionsprinzipien auf. Die Lichtaktivierung ermöglicht – im Unterschied zur diffusionslimitierten Zugabe von Substrat zu einem Enzym – einen unverzüglichen Reaktionsstart. Die weitere Abfolge der Katalyseschritte lässt sich aber erst mithilfe moderner spektroskopischer Methoden mit ultrakurzen Laserblitzen in ausreichender zeitlicher Auflösung verfolgen.

Auch für die POR ist damit der letzte Wunsch Goethes berechtigt: „Mehr Licht!“^[9]

Online veröffentlicht am 21. April 2009

- [1] O. A. Sytina, D. J. Heyes, C. N. Hunter, M. T. Alexandre, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle, M. L. Groot, *Nature* **2008**, 456, 1001–1004.
- [2] N. K. Boardman in *The Chlorophylls* (Hrsg.: L. P. Vernon, G. R. Seely), Academic Press, New York **1966**, S. 437–479.
- [3] W. T. Griffiths, *Biochem. J.* **1978**, 174, 681–692.

- [4] D. J. Heyes, C. N. Hunter, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 642–649.
- [5] H. E. Townley, R. B. Sessions, A. R. Clarke, T. R. Dafforn, W. T. Griffiths, *Proteins* **2001**, 44, 329–335.
- [6] H. M. Wilks, M. P. Timko, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 724–728.
- [7] S. J. Benkovic, S. Hammes-Schiffer, *Science* **2003**, 301, 1196–1202.
- [8] D. J. Heyes, M. Sakuma, S. P. de Visser, N. S. Scrutton, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 3762–3767.
- [9] J. W. von Goethe (kolportierte letzte Worte).





Erlebnis Wissenschaft

... für alle, die mehr wissen wollen

Zankl, H.

Irrwitziges aus der Wissenschaft

Von Leuchtkaninchen bis Dunkelbirnen

2008. 270 S. m. 30 Abb. Geb.
€ 24,90. ISBN 978-3527-32114-8

Augenzwinkernd erläutert Heinrich Zankl die bevorzugten Löwenfang-Methoden der Mathematiker, die unbestreitbaren Vorzüge des »Null-Hirn«-Managements und die faszinierenden Rituale des Volks der Nacirema. Neugierig auf mehr? Dann treten Sie ein ins Kuriositätenkabinett!

Synwoldt, C.

Mehr als Sonne, Wind und Wasser

Energie für eine neue Ära

2008. 232 S. m. 79 Abb. u. 18 Tab. Geb.
€ 24,90. ISBN 978-3527-40829-0

Kann Erdöl auf Dauer der Schmierstoff der Welt- und Energiewirtschaft sein? Was passiert, wenn die Vorräte zur Neige gehen? Christian Synwoldt

zeigt: die Energiewende ist heute schon möglich, die Schlüsseltechnologien stehen bereit. Der Autor präsentiert keine utopischen Visionen, sondern sofort umsetzbare Lösungen.

Glaser, R.

Heilende Magnete – strahlende Handys

Bioelektromagnetismus: Fakten und Legenden

2008. 360 S. m. 10 Abb. Geb.
€ 24,90. ISBN 978-3527-40753-8

Hat Wasser ein Gedächtnis? Schaden Handys der Gesundheit? Roland Glaser, Biophysiker und langjähriger Forscher auf dem Gebiet des Bio-magnetismus, gibt Antworten und schlägt eine Schneise durch das Dickicht von Fakten und Legenden.







*Der Euro-Preis gilt nur in Deutschland



WILEY-VCH

WILEY-VCH · Postfach 101161 · D-69451 Weinheim
Fax: +49 (0) 6201-60 6184 · service@wiley-vch.de
www.wiley-vch.de/erlebnis-wissenschaft