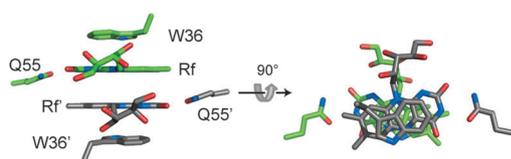


## Gerichtete Manipulation des Photozyklus eines Flavoproteins\*\*

Heike Staudt, Michael Georg Hoesl, Andreas Dreuw, Sascha Serdjukow, Dieter Oesterhelt, Nediljko Budisa, Josef Wachtveit\* und Martin Grininger\*

Kürzlich haben wir dem Riboflavin-bindenden Protein (RfBP) Dodecin aus *Halobacterium salinarum* die Funktion zugewiesen, freies Riboflavin aus dem Cytoplasma mit nanomolaren Dissoziationskonstanten zu binden und damit Riboflavin, die unmittelbare Vorstufe zur Biosynthese von FMN und FAD, bereitzustellen.<sup>[1]</sup> Um zellulären Schaden zu verhindern, wird das reaktive Riboflavin dabei durch tiefes Einbetten in die Dodecin-Bindetaschen von der Umgebung abgeschirmt und durch einen Mechanismus des schnellen Löschens von photoangeregten Zuständen neutralisiert.<sup>[2]</sup> Gebundenes Riboflavin ist in den Bindetaschen Sandwich-artig zwischen aromatischen Systemen ausgerichtet, wodurch minimales Binden über Wasserstoffbrücken durch starke Stapelwechselwirkungen kompensiert wird (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Sandwich-artiger Einbau von Flavinen. Dimere von Riboflavin (Rf) werden zwischen zwei Tryptophanen (W36) eingebaut und durch zwei Glutamine (Q55) zwischen zwei Protomeren antiparallel ausgerichtet.

Im Schlüsselschritt des Löschens des photoaktivierten Zustands des Riboflavins wird ein Elektron aus dem benachbarten Tryptophan W36 auf das angeregte Riboflavin übertragen, wobei ein ladungstrennter Zustand entsteht, der unmittelbar danach zum Grundzustand rekombiniert. Kürz-

lich war es uns möglich, die Zeitkonstanten der einzelnen Prozesse zu bestimmen (Schema 1):

- 1) Ladungstrennung schneller als die zeitliche Auflösung des Experiments ( $< 0.2$  ps,  $\tau_1$ ),
- 2) Elektronrücktransfer mit einer Zeitkonstante von 0.9 ps ( $\tau_2$ ),
- 3) Relaxation mit 6 ps in einem zu (2) parallelen Prozess, charakterisiert durch einen Zwischenzustand, der bei 500 nm absorbiert ( $\tau_3$ ),
- 4) Protonentransfer von umgebendem Wasser, gekoppelt an den Elektronentransfer/-rücktransfer-Mechanismus.<sup>[3]</sup>

Im Fall des Dodecins vereinen sich hochaufgelöste Röntgenstrukturdaten und eine tiefgreifende funktionelle Charakterisierung zu einem Modell außergewöhnlich gut definierter Struktur-Funktions-Beziehungen. Daher bietet dieses Flavoprotein ein exzellentes Modellsystem, um Elektronentransferraten durch rationales Proteindesign zu modulieren und dabei in einer manipulativen Weise einen Photozyklus zu studieren.

Dieser Ansatz sollte durch den Austausch des nativen W36 durch Analoga mit variierendem Ionisierungspotential und somit W36-Riboflavin-Paaren mit unterschiedlichen Redoxpotentialdifferenzen erreicht werden. Die Ionisierungspotentiale wurden quantenchemisch auf Basis der DFT/B3LYP/6-31G\*-Theorie in der Gasphase berechnet.<sup>[4]</sup> Ausgehend vom Wert 7.42 eV für den Indolrest von Tryptophan wurden die Analoga 4-Aminotryptophan (4NH<sub>2</sub>-W), 4-Fluorotryptophan (4F-W) und 4-Azatryptophan (4Aza-W) aufgrund der verschobenen Potentiale von 6.68, 7.49 bzw. 7.96 eV für Einbaustudien ausgewählt (siehe Hintergrundinformationen). Die Position C-4 des W36 wurde deshalb zur

[\*] Dr. H. Staudt,<sup>[1]</sup> Prof. Dr. J. Wachtveit  
Institut für Physikalische and Theoretische Chemie  
Exzellenzcluster „Makromolekulare Komplexe“  
Goethe-Universität Frankfurt  
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)  
E-Mail: wweilt@theochem.uni-frankfurt.de

Dr. M. G. Hoesl,<sup>[1]</sup> Prof. Dr. N. Budisa  
AK Biokatalyse, Institut für Chemie, TU Berlin (Deutschland)

Prof. Dr. A. Dreuw  
Interdisziplinäres Zentrum für wissenschaftliches Rechnen  
Ruprecht-Karls Universität Heidelberg (Deutschland)

S. Serdjukow, Prof. Dr. D. Oesterhelt, Prof. Dr. M. Grininger  
Abteilung für Membranbiochemie  
MPI für Biochemie, Martinsried (Deutschland)

Prof. Dr. M. Grininger  
Aktuelle Adresse: Institut für Organische Chemie und Chemische  
Biologie, Buchmann Institut für Molekulare Lebenswissenschaften  
Exzellenzcluster „Makromolekulare Komplexe“

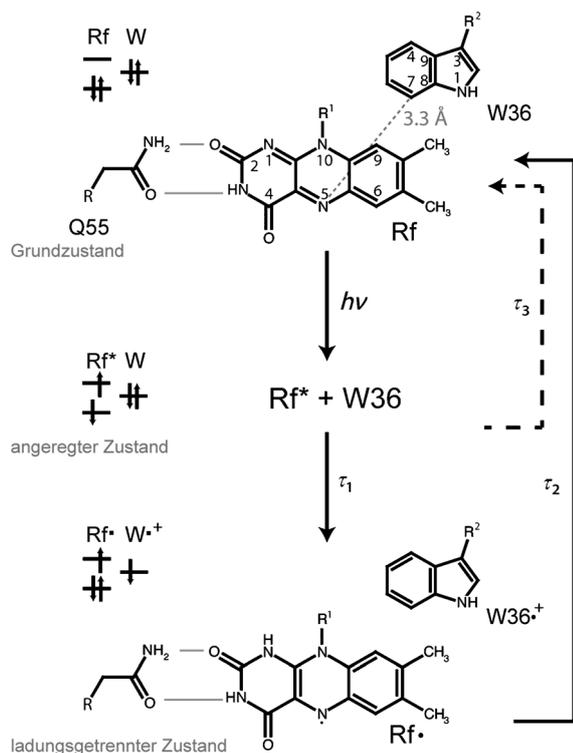
Goethe-Universität Frankfurt  
Max-von-Laue-Straße 15, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)  
E-Mail: grininger@chemie.uni-frankfurt.de

S. Serdjukow  
Aktuelle Adresse: Department Chemie und Pharmazie  
LMU München (Deutschland)

[†] H.S. und M.G.H. haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beitragen.

[\*\*] Wir danken den Beamline-Wissenschaftlern der ESRF für die Assistenz während der Datensammlung. Wir danken ebenfalls der Core-Facility des MPI für Biochemie, insbesondere Lissy Weyher-Stingl, für ESI-MS-Datensammlung an den nichtkanonischen Dodecinen. Diese Arbeit wurde von der Volkswagenstiftung (Lichtenberg-Professur an M.G.), von der DFG (SFB 807 an H.S. und J.W. sowie UniCat Cluster of Excellence der TU Berlin an N.B.) und dem BMBF (Biofuture Grant an N.B.) unterstützt.

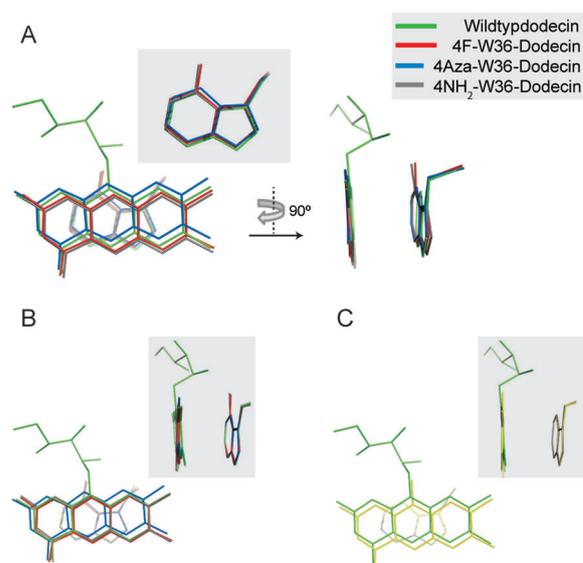
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Daten) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302334> zu finden.



**Schema 1.** Photozyklus des Dodecins innerhalb eines funktionellen Paares aus W36 und Riboflavin. Riboflavin (Rf) ist im Abstand von 3.3 Å an W36 angelagert. Die Wasserstoffbrücke zu Q55 ist grau angezeigt. Ein beobachteter Deuterierungseffekt auf die Lebenszeit des angeregten Zustands lässt darauf schließen, dass ein Protonentransfer den Photozyklus  $h\nu \rightarrow \tau_1 \rightarrow \tau_2$  begleitet.<sup>[3]</sup> Dies findet auch in quantenchemischen Rechnungen Bestätigung, die Teil dieser Arbeit sind. Diese zeigen, dass sich Riboflavin durch Protonentransfer von benachbartem Wasser in seiner neutralen Form stabilisiert, und zwar unabhängig davon, ob Riboflavin in oxidierter Form oder als Semichinon vorliegt (siehe Hintergrundinformationen). Der Prozess, der durch eine Zeitkonstante von  $\tau_3$  beschrieben ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Molekülorbitaldiagramme sind beigelegt.

Derivatisierung herangezogen, weil röntgenkristallographische Analysen zeigen, dass eine Ausbuchtung in der Binde-tasche die nichtinvasive Modifizierung an dieser Position ermöglicht. Zur Präparation der nichtkanonischen W36-modifizierten Dodecine wurde die supplementationsbasierte Einbaumethode (SPI),<sup>[5]</sup> zusammen mit den etablierten Protokollen zur Reinigung und Faltung, verwendet (siehe Tabelle S1 und S2 und Abbildung S1–S3 in den Hintergrundinformationen; experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen).<sup>[1b]</sup> In der Folge haben wir die Dodecinanaloga kristallisiert und atomare Modelle bei 1.7 (4NH<sub>2</sub>-W36-Dodecin), 1.8 (4F-W36) und 2.0 Å (4Aza-W36) verfeinert (siehe Tabelle S3 in den Hintergrundinformationen; experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen).

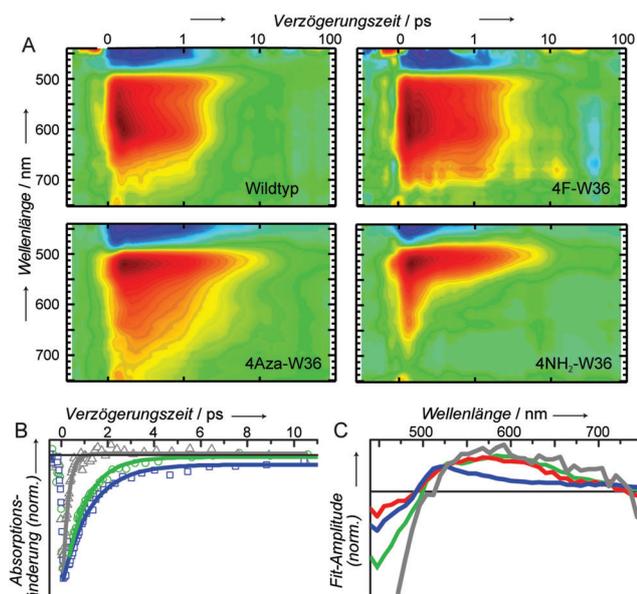
Die hochaufgelösten röntgenkristallographischen Daten zeigen, dass die Strukturen der nichtkanonischen Dodecine gegenüber dem nichtmodifizierten Wildtypdodecin im Wesentlichen unverändert sind. In 4F-W36- und 4NH<sub>2</sub>-W36-Dodecin findet Riboflavin jeweils eine etwas tiefere Position in der Bindetasche als im Wildtypdodecin, während bei 4Aza-W36-Dodecin das Riboflavin etwas weniger tief sitzt. In



**Abbildung 2.** Überlagerung von W36 und Riboflavin in den nichtkanonischen Dodecinanaloga mit Wildtypdodecin. A, B) Strukturen wurden A) über ihr C $\alpha$ -Rückgrat und B) über den Indolrest von W36 ausgerichtet. Riboflavine der nichtkanonischen Dodecine sind durch ihre aromatische Untereinheit (Isoalloxazin) repräsentiert (siehe auch Abbildung S4). In den W36-alignierten Strukturen sind die Riboflavin N-10 Atome vom entsprechenden Atom im Wildtypdodecin um 0.44 Å (4Aza-W36 Dodecin), 0.22 Å (4F-W36), und 0.19 Å (4NH<sub>2</sub>-W36) entfernt. (C) Überlagerung der W36-alignierten Dodecine mit Riboflavin (grün) und Lumiflavin (gelb) als Liganden. Lumiflavin N-10 ist um 0.52 Å von Riboflavin N-10 entfernt. Atomkoordinaten der Strukturen mit pdb Kennzeichen 2ccb und 2ccc wurden für Wildtypdodecin mit gebundenem Riboflavin bzw. Lumiflavin verwendet.<sup>[2b]</sup>

ähnlicher Weise sind auch die Positionen des C-4-modifizierten W36 kaum verändert. Grundsätzlich korreliert ihre leicht veränderte Stellung sogar mit den Positionsänderungen der Riboflavine (Abbildung 2A; Abbildung S4 der Hintergrundinformationen). Wird die Überlagerung der Dodecine an den W36-Indolresten ausgerichtet, ist diese nur sehr geringe Abweichung der relativen Positionierung der photochemisch relevanten W36-Riboflavinpaare sehr deutlich zu erkennen. Dies offenbart klar den nichtinvasiven Charakter unseres Ansatzes (Abbildung 2B). Die Änderungen in den Positionen sind sogar weniger stark ausgeprägt, als dies für Wildtypdodecin bei Einbau der verschiedenen Flavine (Lumiflavin, FMN und FAD) der Fall ist. In einer früheren Arbeit, in der wir Wildtypdodecin mit den unterschiedlichen Flavinen charakterisiert haben, konnten wir feststellen, dass die Strukturvariation durch den Einbau verschiedener Flavine die spektralen Eigenschaften nicht beeinflusst (Abbildung 2C).<sup>[3]</sup> Daraus lässt sich ableiten, dass die kleineren Änderungen in der Serie der betrachteten nichtkanonischen Dodecine ebenso keinen Einfluss nehmen und man mit den Dodecinanaloga einen Satz hochisomorpher Proteine in Händen hält, die sich nur in den elektronischen Eigenschaften unterscheiden; konkret im Ionisierungspotential von W36.

Die Analyse der photochemischen Eigenschaften der nichtkanonischen Dodecine wurde mithilfe transientser Absorptionsspektroskopie durchgeführt.<sup>[3]</sup> Wie in Abbildung 3 A gezeigt, ändert sich das Muster an negativen (blau) und po-



**Abbildung 3.** Transiente spektroskopische Charakterisierung des Wildtypdodecins und der nichtkanonischen Analoga. Daten in (B) und (C) sind im Farbcode der Abbildung 2 gezeigt. A) Anregung des Wildtypdodecins und der nichtkanonischen Analoga bei 388 nm mit Saphir Weißlicht zur Abtastung. Positive Absorptionsänderungen sind in Rot und negative in Blau dargestellt. Die Zeitskala ist linear von  $-0.5$  bis  $1$  ps und logarithmisch für längere Zeiten. B) Transiente Absorptionsänderung bei  $456$  nm für Wildtyp-, 4Aza-W36 (blau) und  $4\text{NH}_2$ -W36 Dodecin (grau). Daten für die ersten  $10$  ps können über einen exponentiellen Zerfall erster Ordnung beschrieben werden. C) Zerfallsassozierte Spektren der Zeitkonstante  $\tau_2$  als Teil einer globalen Fit-Analyse von Wildtypdodecin und der nichtkanonischen Analoga (4F-W36-Dodecin in Rot). Spektren sind auf die Absorption bei  $388$  nm in den statischen Spektren normiert.

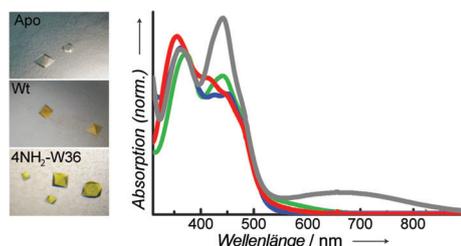
sitiven Absorptionsänderungen (rot) gegenüber dem des Wildtypdodecins signifikant. Auffällig sind insbesondere die Veränderungen aller nichtkanonischen Dodecine im negativen Signal bei kurzer Wellenlänge ( $450$  nm), die das Ausbleichen des Grundzustands (GB) beschreiben. Darüber hinaus findet im  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecin eine drastische Verkürzung des positiven Signals bei  $550$ – $700$  nm statt. Das positiv geladene Tryptophanradikal trägt zur Absorption um  $600$  nm bei,<sup>[6]</sup> und entsprechend behindern die geänderten spektroskopischen Eigenschaften der Tryptophanradikale durch Einführung der C-4-Modifikation die Interpretation der transienten Daten bei langen Wellenlängen.

Weil unbeeinflusst vom Tryptophanradikal, bietet die Absorption um  $450$  nm einen direkten Zugang, um die elektronische Umgebung der Riboflavine zu analysieren. Entsprechend wurde die Wiederherstellung des GB bei  $456$  nm als Auslesesignal für den Elektronen-Rücktransfer vom Riboflavinsemichinon auf das positiv geladene Tryptophan verwendet (Prozess beschrieben mit  $\tau_2$  in Schema 1). Unimolekulare Wiederherstellungsraten wurden auf  $0.2$ ,  $1.2$  bzw.  $0.9$  ps für  $4\text{NH}_2$ -W36, 4Aza-W36 und Wildtyp Dodecin angepasst (Abbildung 3B); folglich verkürzt der Aminosubstituent in  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecin die Lebenszeit um den Faktor 4, während das gleiche Intermediat bei 4Aza-W36-Modifikation etwas länger lebt (Faktor 1.3). An die Daten des 4F-W36-

Dodecins gelang wegen eines zu geringen Signal-Rausch-Verhältnisses keine Anpassung, jedoch kann die Lebenszeit des ladungstrennten Zustands auf einen ähnlichen Wert wie für Wildtypdodecin geschätzt werden (Abbildung 3A), was wegen der vergleichbaren Ionierungspotentiale von 4F-W und Tryptophan auch zu erwarten ist.

Wie für Wildtypdodecin bereits in einer früheren Arbeit vorgenommen, wurde für die nichtkanonischen Dodecine eine globale Fit-Analyse der zeitaufgelösten Daten durchgeführt.<sup>[3]</sup> Mit Ausnahme von  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecin konnten vier Zeitkonstanten die dynamischen Prozesse hinreichend beschreiben (für eine genaue Analyse der transienten spektroskopischen Daten siehe Hintergrundinformationen). Wie kürzlich gezeigt, steht  $\tau_2$  für den Elektronen-Rücktransfer und ist dadurch eine passende Größe, um unseren Ansatz zur Manipulation von Elektronentransferraten zu evaluieren.  $\tau_2$  konnte auf  $0.9$  ps für Wildtypdodecin<sup>[3]</sup> angepasst werden und verändert sich zu  $0.8$  für 4F-W36,  $0.9$  für 4Aza-W36 bzw.  $0.13$  für  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecin (Abbildung 3C). Dies deutet auf einen signifikant beschleunigten Elektronentransfer für  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecin hin (Faktor 7) und stützt das Bild, das über die Analyse der unimolekularen Wiederherstellungsraten erhalten wurde (Abbildung 3B). Eine insgesamt sehr ähnliche Signatur für  $\tau_2$  impliziert auch eine im Wesentlichen unveränderte Photochemie in Wildtypdodecin und den nichtkanonischen Analoga (Abbildung 3C). Die Unterschiede in der Signatur für  $\tau_2$  lassen sich, wie bereits an anderer Stelle erwähnt, zudem mit den unterschiedlichen statischen spektralen Charakteristiken der positiv geladenen Tryptophanradikale im Bereich von  $550$ – $600$  nm in Einklang bringen.

Eine weitere Besonderheit des  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecins ist eine breite Absorptionsbande bei  $650$  nm (Abbildung 4). Diese erinnert an frühe Arbeiten am Flavoprotein D-Ami-



**Abbildung 4.** Statisches Absorptionsspektrum der Dodecine. Unterschiede bei  $350$ – $500$  nm deuten auf Unterschiede in den  $S_0 \rightarrow S_1$ - und  $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergängen hin.  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecin zeigt eine zusätzliche langwellige Absorption durch die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes, der zu einer Verfärbung ins Grünliche führt, wie aus der Abbildung der Proteinkristalle zu entnehmen ist. Die Kristalle liegen in ihrer Mutterlauge vor. Wt: Wildtypdodecin mit gebundenem Riboflavin, Apo: Wildtypapododecin,  $4\text{NH}_2$ -W36:  $4\text{NH}_2$ -W36-Dodecin.

nosäure-Oxidase mit eingebauten Aminobenzoatliganden, in denen langwellige Absorptionen auf Grundlage der Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes erklärt wurden.<sup>[7]</sup> Diese Interpretation findet Zustimmung im niedrigen Ionisierungspotential von  $4\text{NH}_2$ -W, wobei eine Abhängigkeit in der Geometrie des  $4\text{NH}_2$ -W36-Riboflavin-Paares bestehen

