

Gerichtete Manipulation des Photozyklus eines Flavoproteins**

Heike Staudt, Michael Georg Hoesl, Andreas Dreuw, Sascha Serdjukow, Dieter Oesterhelt, Nediljko Budisa, Josef Wachtveitl* 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.^[1] 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.^[2] Gebundenes Riboflavin ist in den Bindetaschen Sandwich-artig zwischen aromatischen Systemen ausgerichtet, wodurch minimales Binden über Wasserstoffbrücken durch starke Stapelwechselwirkungen kompensiert wird (Abbildung 1).

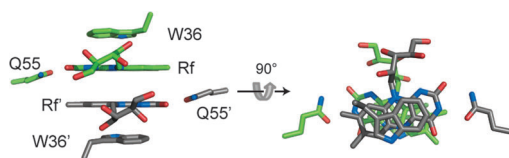


Abbildung 1. Sandwich-artiger Einbau von Flavinen. Dimere von Riboflavin (Rf) werden zwischen zwei Tryptophanen (W36) eingebaut und durch zwei Glutamine (Q55) zwischen zwei Protomeren antiparallel ausgerichtet.

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, τ_1),
- 2) Elektronrücktransfer mit einer Zeitkonstante von 0.9 ps (τ_2),
- 3) Relaxation mit 6 ps in einem zu (2) parallelen Prozess, charakterisiert durch einen Zwischenzustand, der bei 500 nm absorbiert (τ_3),
- 4) Protonentransfer von umgebendem Wasser, gekoppelt an den Elektronentransfer/-rücktransfer-Mechanismus.^[3]

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.^[4] Ausgehend vom Wert 7.42 eV für den Indolrest von Tryptophan wurden die Analoga 4-Aminotryptophan (4NH₂-W), 4-Fluorotryptophan (4F-W) und 4-Azatriptophan (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,^[1] Prof. Dr. J. Wachtveitl
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
Exzellenzcluster „Makromolekulare Komplexe“
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: wveitl@theochem.uni-frankfurt.de

Dr. M. G. Hoesl,^[1] 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“

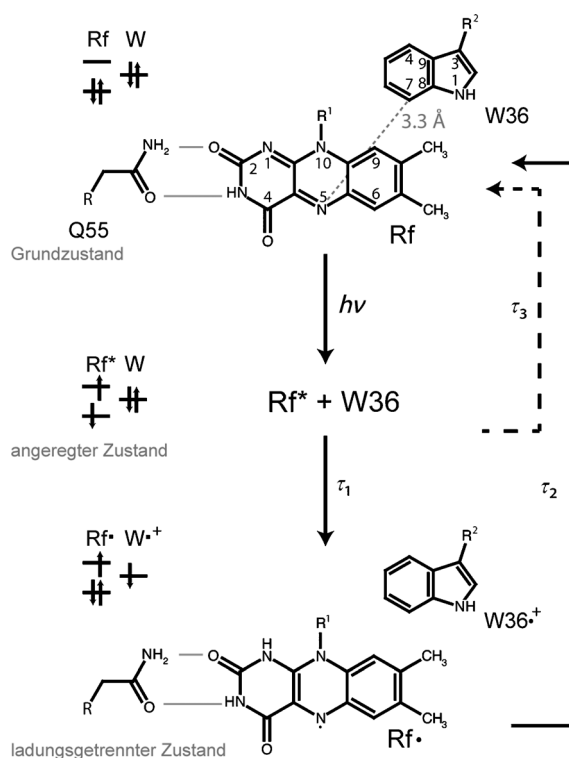
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 15, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
E-Mail: grininger@chemie.uni-frankfurt.de

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

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

[**] 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 Weyer-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.^[3] 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 τ_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),^[5] 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).^[1b] In der Folge haben wir die Dodecinanaloge kristallisiert und atomare Modelle bei 1.7 (4NH₂-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 4NH₂-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

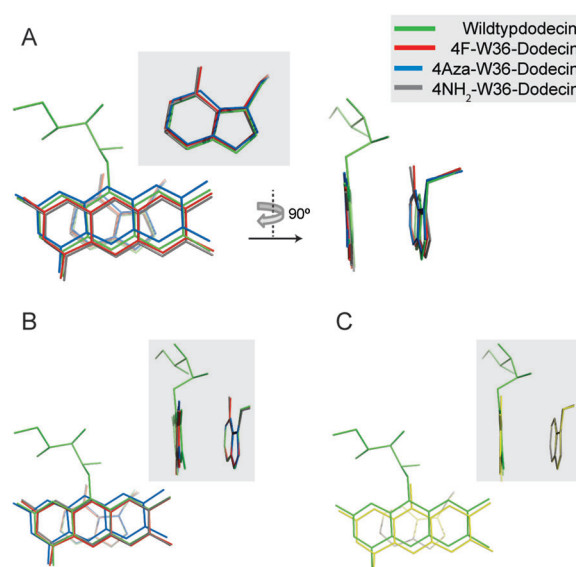


Abbildung 2. Überlagerung von W36 und Riboflavin in den nichtkanonischen Dodecinanaloge mit Wildtypdodecin. A, B) Strukturen wurden A) über ihr Cα-Rückgrat und B) über den Indolrest von W36 ausgerichtet. Riboflavine der nichtkanonischen Dodecine sind durch ihre aromatische Untereinheit (Isoalloxazin) 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 (4NH₂-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.^[2b]

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).^[3] Daraus lässt sich ableiten, dass die kleineren Änderungen in der Serie der betrachteten nichtkanonischen Dodecine ebenso keinen Einfluss nehmen und man mit den Dodecinanaloge 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 transients Absorptionsspektroskopie durchgeführt.^[3] Wie in Abbildung 3 A gezeigt, ändert sich das Muster an negativen (blau) und po-

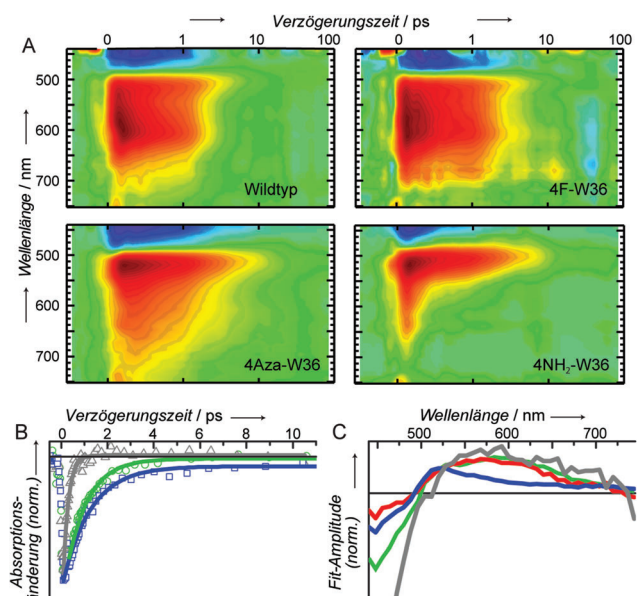


Abbildung 3. Transiente spektroskopische Charakterisierung des Wildtypdodecins und der nichtkanonischen Analoga. Daten in (B) und (C) sind im Farbcode der Abbildung 2 gezeigt. A) Anregung des Wildtypdodecins und der nichtkanonischen Analoga bei 388 nm mit Saphir Weißlicht zur Abtastung. Positive Absorptionsänderungen 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 4NH_2 -W36 Dodecin (grau). Daten für die ersten 10 ps können über einen exponentiellen Zerfall erster Ordnung beschrieben werden. C) Zerfallsassoziierte Spektren der Zeitkonstante τ_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 4NH_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,^[6] 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 τ_2 in Schema 1). Unimolekulare Wiederherstellungsraten wurden auf 0.2 , 1.2 bzw. 0.9 ps für 4NH_2 -W36, 4Aza-W36 und Wildtyp Dodecin angepasst (Abbildung 3B); folglich verkürzt der Aminosubstituent in 4NH_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 ladungsgeladenen Zustands auf einen ähnlichen Wert wie für Wildtypdodecin geschätzt werden (Abbildung 3A), was wegen der vergleichbaren Ionisierungspotentiale 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.^[3] Mit Ausnahme von 4NH_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 τ_2 für den Elektronen-Rücktransfer und ist dadurch eine passende Größe, um unseren Ansatz zur Manipulation von Elektronentransferraten zu evaluieren. τ_2 konnte auf 0.9 ps für Wildtypdodecin^[3] angepasst werden und verändert sich zu 0.8 für 4F-W36, 0.9 für 4Aza-W36 bzw. 0.13 für 4NH_2 -W36-Dodecin (Abbildung 3C). Dies deutet auf einen signifikant beschleunigten Elektronentransfer für 4NH_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 τ_2 impliziert auch eine im Wesentlichen unveränderte Photochemie in Wildtypdodecin und den nichtkanonischen Analoga (Abbildung 3C). Die Unterschiede in der Signatur für τ_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 4NH_2 -W36-Dodecins ist eine breite Absorptionsbande bei 650 nm (Abbildung 4). Diese erinnert an frühe Arbeiten am Flavoprotein D-Ami-

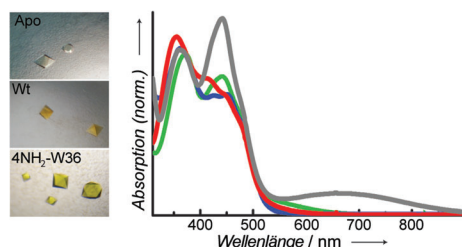


Abbildung 4. Statisches Absorptionsspektrum der Dodecine. Unterschiede bei 350 – 500 nm deuten auf Unterschiede in den $S_0 \rightarrow S_1$ - und $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergängen hin. 4NH_2 -W36-Dodecin zeigt eine zusätzliche langwellige Absorption durch die Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes, 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, 4NH_2 -W36: 4NH_2 -W36-Dodecin.

nosäure-Oxidase mit eingebauten Aminobenzoatliganden, in denen langwellige Absorptionen auf Grundlage der Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes erklärt wurden.^[7] Diese Interpretation findet Zustimmung im niedrigen Ionisierungspotential von 4NH_2 -W, wobei eine Abhängigkeit in der Geometrie des 4NH_2 -W36-Riboflavin-Paares bestehen

könnte. Die Induktion einer langwellig absorbierenden Charge-Transfer-Übergangsbande durch stabile Modifikation von Aminosäuren in enger Nähe zu Flavinliganden ist potentiell interessant, da sie die Flavinphotochemie der Rotlichtabsorption zugänglich machen könnte.

Im Wildtypdodecin findet der initiale Elektronenübergang von Tryptophan auf das angeregte Riboflavin in weniger als 0.2 ps statt (Zeitauflösung des Experiments), gefolgt von einer Ladungsrekombination mit einer Zeitkonstante von 0.9 ps. Wegen des hohen ΔG^0 -Werts von ungefähr -1.95 eV wird der Elektronen-Rücktransfer im Bereich der invertierten Marcus-Region angenommen (Abbildung 5).^[2b,8] Das

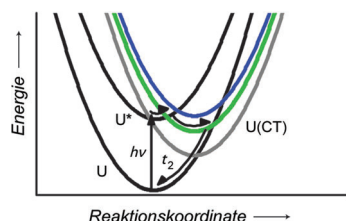


Abbildung 5. Potentiale der involvierten Zustände. Das Diagramm modelliert die Potentiale der Dodecine im Grundzustand (U) und im angeregten Zustand (U^*), dargestellt durch schwarze Linien. Potentiale der ladungsgetrennten Zustände ($U(CT)$) von Wildtyp-, 4Aza-W36- und $4NH_2$ -W36-Dodecin sind über das Ionisierungspotential von Riboflavin, W36 und der Differenz der Ionisierungsenergien zwischen Indol und der entsprechenden Derivate des Indols abgeschätzt. Die Reorganisationsenergie wurde auf 1 eV gesetzt. Die Ionisierungsenergie von 4F-Indol ist nahe an Indol und in diesem Schema nicht gezeigt.

höhere Ionisierungspotential von 4Aza-Indol führt dabei zu einem erhöhten Potential des ladungsgetrennten Zustands in 4Aza-W36-Dodecin. Dies äußert sich infolgedessen in einem höheren ΔG^0 -Wert für den Elektronen-Rücktransfer und führt so zu verlangsamten Reaktionsgeschwindigkeiten des Prozesses. Im Unterschied dazu ist der Elektronen-Rücktransfer in $4NH_2$ -W36-Dodecin entsprechend schneller als im Wildtypprotein (Abbildung 5). Auch diese Beobachtung bündelt sich auf Basis des geringeren Potentials des ladungsgetrennten Zustands und des erniedrigten ΔG^0 -Werts in das Marcus-Modell für das System ein.

Durch die Verwendung von Dodecin, das spezifisch und fast unmerklich in der Aminosäure W36 chemisch modifiziert wurde, gelang es zu zeigen, dass Elektronentransferprozesse in Flavoproteinphotocyclen in selektiver und kontrollierter Weise verändert werden können. Dabei handelt es sich um ein System minimaler struktureller Störungen, dokumentiert durch hochaufgelöste Röntgenstrukturen. Dies ermöglicht

die Aufnahme transients spektroskopischer Daten, die vollends die Änderungen von Elektronentransferraten bestätigten, die durch quantenchemische Rechnungen vorhergesagt worden waren. In einem breiten Kontext legen wir eine Modellstudie über eine ideale Situation vor, in der das Wissen und die Methoden verschiedener Disziplinen integriert wurden, um in rationaler Weise einzelne Parameter in einem ansonsten ungestörten komplexen System zu manipulieren.

Eingegangen am 19. März 2013

Online veröffentlicht am 1. Juli 2013

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Elektronische Struktur · Flavine · Photochemie · Proteine

- [1] a) B. Bieger, L. O. Essen, D. Oesterhelt, *Structure* **2003**, *11*, 375–385; b) M. Grininger, K. Zeth, D. Oesterhelt, *J. Mol. Biol.* **2006**, *357*, 842–857; c) M. Grininger, H. Staudt, P. Johansson, J. Wachtveitl, D. Oesterhelt, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 13068–13076.
- [2] a) N. Mataga, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, F. Tanaka, N. Kido, M. Kitamura, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8917–8920; b) D. Zhong, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11867–11872.
- [3] H. Staudt, D. Oesterhelt, M. Grininger, J. Wachtveitl, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 17637–17644.
- [4] a) R. G. Parr, W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, **1989**; b) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652; c) Y. Shao, L. F. Molnar, Y. Jung, J. Kusmann, C. Ochsenfeld, S. T. Brown, A. T. B. Gilbert, L. V. Slipchenko, S. V. Levchenko, D. P. O'Neill, R. A. DiStasio, Jr., R. C. Lochan, T. Wang, G. J. O. Beran, N. A. Besley, J. M. Herbert, C. Y. Lin, T. Van Voorhis, S. H. Chien, A. Sodt, R. P. Steele, V. A. Rassolov, P. E. Maslen, P. P. Korambath, R. D. Adamson, B. Austin, J. Baker, E. F. C. Byrd, H. Dachsel, R. J. Doerksen, A. Dreuw, B. D. Dunietz, A. D. Dutoi, T. R. Furlani, S. R. Gwaltney, A. Heyden, S. Hirata, C.-P. Hsu, G. Kedziora, R. Z. Khallilulin, P. Klunzinger, A. M. Lee, M. S. Lee, W. Liang, I. Lotan, N. Nair, B. Peters, E. I. Proynov, P. A. Pieniazek, Y. M. Rhee, J. Ritchie, E. Rosta, C. D. Sherrill, A. C. Simmonett, J. E. Subotnik, H. L. Woodcock III, W. Zhang, A. T. Bell, A. K. Chakraborty, D. M. Chipman, F. J. Keil, A. Warshel, W. J. Hehre, H. F. Schaefer III, J. Kong, A. I. Krylov, P. M. W. Gill, M. Head-Gordon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3172–3191.
- [5] N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 788–796.
- [6] S. Solar, N. Getoff, P. S. Surdhar, D. A. Armstrong, A. Singh, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3639–3643.
- [7] a) V. Massey, H. Ganther, *Biochemistry* **1965**, *4*, 1161–1173; b) R. Miura, C. Setoyama, Y. Nishina, K. Shiga, H. Mizutani, I. Miyahara, K. Hirotsu, *J. Biochem.* **1997**, *122*, 825–833; c) J. H. Bae, M. Rubini, G. Jung, G. Wiegand, M. H. Seifert, M. K. Azim, J. S. Kim, A. Zumbusch, T. A. Holak, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 1071–1081.
- [8] R. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265–322.