

# Proteinkristallographie mit Freie-Elektronen-Lasern: Wasseroxidation in der Photosynthese\*\*

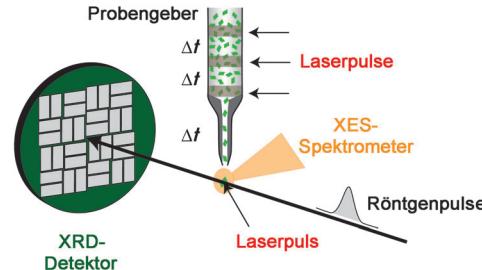
Hideaki Ogata und Wolfgang Lubitz\*

Freie-Elektronen-Laser · Nanokristalle · Photosystem II · Serielle Femtosekunden-Kristallographie

Im Jahr 2000 haben Neutze et al. postuliert, dass mithilfe eines sehr starken Femtosekundenröntgenpulses von einem Freie-Elektronen-Laser (XFEL) ein Beugungsmuster von Kristallen erhalten werden kann, bevor die Probe zerstört wird („diffraction before destruction“).<sup>[1]</sup> Dieses grundlegende Prinzip wurde erst vor kurzem experimentell bestätigt und eröffnet neue Möglichkeiten für das Studium makromolekularer Strukturen und ihrer Dynamiken.<sup>[2]</sup> Zurzeit sind zwei XFELs in Betrieb, das LCLS in Stanford, USA, und das SACLAs in Hyogo, Japan. Diese erzeugen extrem kurze Pulse von wenigen fs bis zu 100 fs mit einer Leuchtdichte von  $10^{12}$  Photonen pro Puls, die auf einen submikrometergroßen Punkt fokussiert sind; die Leuchtdichte ist somit  $10^{10}$ -fach höher als die der Synchrotrone der dritten Generation. Die minimalen Wellenlängen der Photonen betragen 0.05–0.15 nm, und die Frequenzen liegen bei 60 (SACLAs) und 120 (LCLS) Pulsen pro Sekunde.

Die Vorteile der XFEL-Kristallographie sind: 1) kein oder nur ein sehr geringer strahlungsinduzierter Schaden des Proteins, da die Datensammlung innerhalb von fs abgeschlossen ist; 2) es werden nur sehr kleine Kristalle benötigt, um ein Beugungsmuster zu erhalten; 3) die Datenaufnahme kann bei Raumtemperatur stattfinden, was von Vorteil für das Verständnis von Reaktionsmechanismen und Proteindynamiken ist; und 4) es werden zeitaufgelöste kristallographische Experimente möglich, die über die derzeitigen Laue-Beugungsexperimente hinausgehen.<sup>[2]</sup>

Der XFEL-Puls ist extrem stark, und die Kristalle müssen nach jeder Aufnahme ausgetauscht werden (Abbildung 1); daher wurden Techniken entwickelt, um Nanokristalle im Hochdurchsatzverfahren zu messen.<sup>[3]</sup> Eine ist die Injektion von Nanokristallen als Flüssigkeit oder Aerosol, z. B. – im Fall von Membranproteinen – als kubische Lipiddphase (LCP). Ein kompletter Datensatz wird dann durch „serielle“ Injektion und Messung von sehr vielen Kristallen erhalten. Wegen der zufälligen Orientierung der Kristalle und der unterschiedlichen Röntgenpulsintensitäten sind spezielle Detektoren und



**Abbildung 1.** PS-II-Kristalle werden über einen Probengeber zugeführt und mit verschiedenen Laserpulsen belichtet, um unterschiedliche katalytische Zustände zu generieren. Röntgenbeugungs(XRD)- und XES-Spektren können simultan aufgenommen werden.

eine aufwendige Datenauswertung erforderlich. Ein anderer Ansatz besteht darin, einen statischen Träger mit einem großen Kristall oder in einen Film eingebettete Mikrokristalle auf einer translatierenden Plattform zu nutzen. Mit der seriellen Femtosekunden-Röntgenkristallographie (SFX) können auch neue Strukturen aufgeklärt werden, wie erst kürzlich durch Phasenbestimmung mittels SAD (single-wavelength anomalous dispersion) gezeigt wurde.<sup>[4]</sup>

Die erste Struktur eines Proteinkristalls wurde 2011 bei einer Auflösung von 8.7 Å mit dem XFEL am LCLS gelöst. Die Autoren wählten das Photosystem I (PSI), das größte photosynthetische Membranprotein, das bis dahin mit Standardtechniken charakterisiert worden war.<sup>[5]</sup> Bislang wurden bereits mehr als 24 Strukturen mit XFELs gelöst (siehe Tabelle 1 in Lit. [6]). Die höchste Auflösung (1.8 Å) wurde für Thermolysin erhalten.<sup>[7]</sup> Mit der Kombination In-vivo-Kristallisation (in lebenden Zellen) und XFEL wurde die Struktur zweier anderer Proteine aufgeklärt. Im Folgenden möchten wir aktuelle spektroskopische und kristallographische Studien am Photosystem II (PSII) diskutieren.<sup>[7–10]</sup>

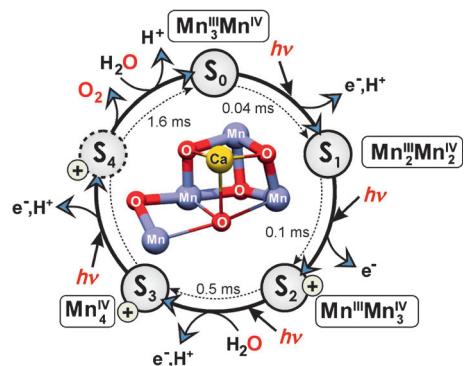
Die besonderen Eigenschaften der SFX machen diese Technik vor allem beim Studium von Intermediaten enzymatischer Reaktionen und Katalysemechanismen nützlich. Die lichtinduzierte Wasserspaltung, einer der wichtigsten biologischen Prozesse, wird von PSII durchgeführt, einem großen Membranproteinkomplex, der in allen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien vorkommt. Der Wasserspaltungs-Komplex (WOC, water oxidizing complex) hat eine hohe Umsatzfrequenz ( $500\text{ s}^{-1}$ ) und Umsatzzahl, die durch die Lebenszeit von PS II selbst (ca. 30 min unter Normallicht; es

[\*] Dr. H. Ogata, Prof. Dr. W. Lubitz  
Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion  
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)  
E-Mail: wolfgang.lubitz@cec.mpg.de  
Homepage: <http://www.cec.mpg.de>

[\*\*] Wir danken Dr. Nicholas Cox für anregende Diskussionen. Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt.

wird jedoch durch einen effizienten Reparaturmechanismus rasch wieder gebildet) limitiert sind.<sup>[11]</sup> 2001 wurde zum ersten Mal hoch aktives PS II kristallisiert und lieferte eine Struktur mit 3.8 Å Auflösung.<sup>[14]</sup> Dies war ein großer Erfolg, aber die Auflösung war zu gering, um genaue Informationen über den WOC zu enthalten.

Es dauerte weitere zehn Jahre, bis von den Gruppen von Shen und Kamiya<sup>[13]</sup> eine hochauflöste Struktur (1.9 Å) erhalten wurde. Diese zeigte, dass der WOC aus einem proteingebundenen  $Mn_4O_5Ca$ -Cluster besteht, dessen Struktur in Abbildung 2 zu sehen ist. Aus früheren Arbeiten ist



**Abbildung 2.** Der katalytische S-Zyklus des WOC von PS II<sup>[11]</sup> wird durch vier Lichtanregungen angetrieben. Die Elektronenabgabe und Protonenfreisetzung, der Eintritt des Substratwassers, die Übergangszeiten zwischen den Intermediaten und die transienten Oxidationszustände der Mn-Ionen sind gezeigt.<sup>[11,12]</sup> In der Mitte ist die Struktur des Mn-Clusters aus Lit. [13] abgebildet.

bekannt, dass der Cluster fünf Redoxzustände durchläuft,  $S_0$ – $S_4$ , wobei die Indices die Zahl der gespeicherten Oxidationsäquivalente angeben, die für das Spalten zweier Wassermoleküle in Protonen und  $O_2$  benötigt werden. Die lichtinduzierte Ladungstrennung im PS II ist über einen redoxaktiven Tyrosinrest mit dem Mn-Cluster gekoppelt. Zwei Wassermoleküle binden zu verschiedenen Zeiten an das aktive Zentrum und werden sukzessive deprotoniert (Abbildung 2), bis im letzten Schritt ( $S_4$ ) die O–O-Bindung gebildet und  $O_2$  freigesetzt wird.<sup>[11,12]</sup> Die Oxidationszustände der Mn-Ionen, Wasserbindung und Protonenfreisetzung im Zyklus wurden anhand spektroskopischer Daten vorgeschlagen.<sup>[11]</sup>

Präzise Strukturdaten für die intermediären S-Zustände konnten bisher nicht unter physiologischen Bedingungen erhalten werden. Die Gründe hierfür sind: 1) PS-II-Kristalle sind bei Raumtemperatur im Röntgenstrahl nicht stabil; 2) die Präparation und kristallographische Charakterisierung bestimmter Intermediate ist anspruchsvoll, und 3) der  $Mn_4O_5Ca$ -Cluster wird durch die intensive Synchrotronstrahlung geschädigt,<sup>[15]</sup> sodass höhere S-Zustände kaum zugänglich sind. Viele dieser Hindernisse können durch den Einsatz von SFX-Techniken am LCLS in Stanford überwunden werden.<sup>[9]</sup> Die Kombination aus XRD und Laserblitzanregung ist besonders interessant, denn sie ermöglicht die Präparation und Untersuchung bestimmter S-Zustände im Katalyzyklus selbst bei Raumtemperatur. Kombiniert man XRD mit Röntgenemission (XES) an der Strahllinie, kann

man die Integrität des Mn-Clusters *in situ* während des SFX-Experiments bestimmen. Der Vergleich von  $S_1$ - und  $S_2$ -Zustand zeigte,<sup>[9]</sup> dass keine signifikanten Strukturänderungen stattfinden; aber diese Erkenntnis wurde durch die geringe Auflösung der Experimente (5.7 Å) limitiert.

Kürzlich erweiterten zwei unabhängige Studien<sup>[7,10]</sup> mit SFX an PS II diese Arbeit um die Detektion des  $S_3$ -Zustands und lieferten so eine Momentaufnahme des Katalysators direkt vor der O–O-Bindungsbildung. In der Studie von Kupitz et al. wurden Strukturunterschiede zwischen dem  $S_1$ - und dem putativen  $S_3$ -Zustand beobachtet, die als Bewegung des äußeren Mn-Atoms und zweier Proteinschleifen interpretiert wurden.<sup>[10]</sup> Diese Änderungen könnten aus dem Eintritt von Substratwasser in den Cluster beim Übergang  $S_2 \rightarrow S_3$  resultieren, eine These, die mit aktuellen spektroskopischen Arbeiten von Cox et al. korreliert.<sup>[12]</sup> Die Auflösung in dieser SFX-Studie ist allerdings immer noch gering (5.0 und 5.5 Å) und die S-Zustandsausbeuten wurden nicht quantifiziert.

In der zweiten aktuellen Studie haben Kern et al. SFX genutzt, um sowohl den  $S_3$ - als auch den  $S_0$ -Zustand des WOC zu untersuchen. Ihre Apparatur enthält zwei Laser zur Probenanregung und ermöglicht die gleichzeitige Detektion von XRD und XES. Damit konnte ein weiterer transienter Zustand im  $S_2$ – $S_3$ -Übergang beobachtet werden. Innerhalb der Auflösung von 4.5–5.2 Å konnten die Autoren aber keine Strukturänderungen am WOC im S-Zyklus detektieren. Diese Ergebnisse widersprechen denen von Kupitz et al.<sup>[10]</sup>

Beide Studien zeigen in beeindruckender Weise die Vorteile von SFX, nämlich dass Beugungsdaten nun auch für sehr kleine Kristalle und ohne Strahlungsschäden erhalten und dass Struktur und Dynamik selbst kurzlebiger Enzymzustände in Echtzeit bei Raumtemperatur bestimmt werden können. Trotz noch existierender Einschränkungen deutet die rapide Entwicklung dieser Techniken auf eine vielversprechende Zukunft der seriellen Femtosekunden-Röntgenkristallographie hin.

Eingegangen am 29. August 2014  
Online veröffentlicht am 10. Oktober 2014

- [1] R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert, J. Hajdu, *Nature* **2000**, *406*, 752.
- [2] R. Neutze, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2014**, *369*, 20130318.
- [3] G. K. Feld, M. Frank, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *27*, 69.
- [4] T. R. Barends et al., *Nature* **2014**, *505*, 244.
- [5] H. N. Chapman et al., *Nature* **2011**, *470*, 73.
- [6] M. R. Sawaya et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 12769.
- [7] J. Kern et al., *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4371.
- [8] J. Kern et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 9721.
- [9] J. Kern et al., *Science* **2013**, *340*, 491.
- [10] C. Kupitz et al., *Nature* **2014**, *513*, 261.
- [11] N. Cox, D. A. Pantazis, F. Neese, W. Lubitz, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1588.
- [12] N. Cox, M. Retegan, F. Neese, D. A. Pantazis, A. Boussac, W. Lubitz, *Science* **2014**, *345*, 804.
- [13] Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, N. Kamiya, *Nature* **2011**, *473*, 55.
- [14] A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, P. Orth, *Nature* **2001**, *409*, 739.
- [15] J. Yano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12047.