

Protein-induzierte Farbverschiebung von Carotenoiden in β -Crustacyanin**

Ana P. Gamiz-Hernandez, Iva Neycheva Angelova, Robert Send, Dage Sundholm und Ville R. I. Kaila*

Abstract: Das Pigment β -Crustacyanin (β -CR) verursacht die Farbe des blauen Hummers. Wir zeigen mithilfe korrelierter Ab-initio-Rechnungen, wie die Proteinumgebung die Farbe der β -CR-Farbstoffe mittels elektrostatischer und sterischer Effekte bestimmt.

Die Farbe lichtabsorbierender Moleküle hängt von ihrer spezifischen chemischen Umgebung ab und ist essenziell, um die molekularen Mechanismen in photobiologischen Systemen zu verstehen.^[1] Die Genauigkeit quantenchemischer Methoden hat mittlerweile ein Niveau erreicht, das es ermöglicht, diese Mechanismen der Farbanpassung quantitativ zu betrachten.^[2]

Hier werden die Absorptionseigenschaften von Carotenoiden (CRTs) in β -Crustacyanin (β -CR) untersucht, dem Protein, das für die blaue Farbe von Hummern (*H. gamma-rus*) verantwortlich ist.^[3] Hummer verfärben sich rot, wenn sie gekocht werden, da β -CR denaturiert, wodurch der Farbstoff freigesetzt wird. Die Farbanpassung in β -CR beschäftigt die Wissenschaft seit mehr als einem halben Jahrhundert,^[3] doch die Ursache für diese große Protein-induzierte Farbverschiebung ist nach wie vor ungeklärt.^[4]

β -CR enthält zwei benachbarte Astaxanthin (AXT)-CRTs (Abbildung 1), die bei $\lambda = 580\text{--}590\text{ nm}$ ($2.10\text{--}2.14\text{ eV}$) absorbieren.^[4a,5] In organischen Lösungsmitteln absorbiert AXT bei $\lambda = 472\text{ nm}$ (2.63 eV).^[6] Wir zeigen erstmals mithilfe korrelierter Rechnungen, dass diese drastische Farbverschiebung aus Veränderungen der molekularen und elektronischen Struktur des Farbstoffs durch dessen Proteinumgebung resultiert.

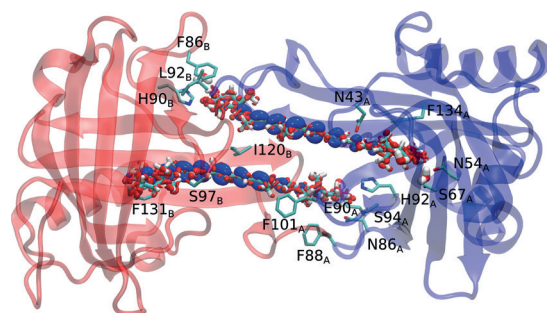


Abbildung 1. Die Struktur von β -CR und den beiden benachbarten AXT-Farbstoffen, die an der Anregung beteiligten Grenzorbitale und die wichtigsten an der Farbverschiebung beteiligten Proteinseitenketten.

Die Röntgenstruktur von β -CR wurde 2002 mit einer Auflösung von 3.2 \AA gelöst und zeigt, wie die beiden AXT-Moleküle durch nichtkovalente Bindungen und in einem Abstand von 7 \AA zueinander an die heterodimere Grenzfläche der Untereinheiten binden (Abbildung 1). Die CRT-Ringe befinden sich in einer Ebene mit den Polyenketten, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die π -Konjugation dadurch verbessert und der elektronische Grundzustand gestört wird.^[4a] Die AXTs binden durch Wasserstoffbrücken an Histidin-Seitenketten, was auf ein im Farbstoff induziertes Dipolmoment schließen lässt.^[7] Die Arbeiten zur Röntgenstruktur zeigen auch, dass die AXTs in ihrer Bindungstasche gekrümmt sind. Planarisierungs- und Polarisierungsmechanismen könnten einen weiteren Beitrag zu der drastischen Farbverschiebung leisten.^[4d]

Die Vorhersage angeregter Zustände von CRTs ist besonders anspruchsvoll für quantenchemische Methoden,^[8] da lange Polyenketten zu Spin-Kontamination, Triplett-Instabilitäten und einem Multireferenzcharakter des Grundzustands neigen. Die bisherigen Untersuchungen im Rahmen der zeitabhängigen Dichtefunktionaltheorie konnten die Farbverschiebung von AXT in β -CR quantitativ nicht erklären.^[4a–c] In der vorliegenden Untersuchung auf kombiniertem Quantenmechanik/Klassische-Mechanik (QM/MM)-Niveau verwenden wir korrelierte Berechnungen vertikaler Anregungsenergien (VEEs) im Rahmen der algebraisch-diatomischen Korrektur bis zur zweiten Ordnung (ADC-(2))^[9] und zeigen, dass die Protein-induzierte Farbverschiebung von AXT in β -CR auf eine Destabilisierung des Grundzustands relativ zum angeregten Zustand zurückzuführen ist. Diese wird durch elektrostatische Polarisierung und sterische Einschränkung des Farbstoffs in der Bindungstasche

[*] Dr. A. P. Gamiz-Hernandez, Prof. Dr. V. R. I. Kaila
Department Chemie, Technische Universität München (TUM)
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: ville.kaila@ch.tum.de

I. N. Angelova, Dr. R. Send
BASF SE, Quantum Chemistry Group
GVM/M – B009, 67056 Ludwigshafen (Deutschland)

Prof. Dr. D. Sundholm
Department of Chemistry, University of Helsinki
A.I. Virtanens plats 1, 00014 Helsinki (Finnland)

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt von der Academy of Finland (Projekte 137460 und 266227), deren Computational Science Research Programme (LASTU/258258) sowie den Magnus-Ehrnrooth- (D.S.) und Jane-und-Aatos-Erkkö-Stiftungen (V.R.I.K.). Das Leibniz-Rechenzentrum (LRZ) und CSC – The Finnish IT Center for Science stellten Computerressourcen zur Verfügung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201501609> zu finden.

hervorgehoben. Die hier durchgeführten rechenaufwändigen Simulationen werden durch die Beschleunigung möglich, die mit der Näherung eines reduzierten virtuellen Raums (RVS) einhergeht.^[10]

Wir erhalten eine VEE von 2.34 eV ($\lambda = 530$ nm) für den ersten angeregten Zustand von AXT in β -CR und somit eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Absorptionsmaximum von 2.10–2.14 eV ($\lambda = 580$ –590 nm; Tabelle 1).^[4a,5,6] Die chemische Umgebung des zweiten CRT

Tabelle 1: VEEs von β -CR.^[a]

QM-Region	VEE [eV] Protein	VEE [eV] isoliert	VEE-Verschiebung [E_{el}/E_{str}]	Exp. [eV]
AXTA + AXTB	2.34	2.44	0.10/0.18	2.10–2.14 ^[b]
	2.40	2.50	0.10/0.12	
	3.10	2.85	0.25/0.59	
	3.15	2.92	0.23/0.52	
AXTA	2.33	2.47	0.14/0.15	–
	3.13	3.12	0.01/0.32	
AXTB	2.38	2.49	0.11/0.13	–
	3.08	2.86	0.22/0.58	
AXT opt.	ES1	2.62 (<i>s-cis</i>)		2.63 ^[c]
	ES2	3.44 (<i>s-cis</i>)		
	ES1	2.53 (<i>trans</i>)		
	ES2	3.33 (<i>trans</i>)		

[a] „Protein“, „isoliert“: VEEs von AXT, die mit und ohne Proteinumgebung mit der im Protein optimierten AXT-Struktur erhalten wurden. VEE-Verschiebung: elektrostatische (E_{el}) und sterische Beiträge (E_{str}) zur Farbverschiebung wie in den Hintergrundinformationen definiert. Exp.: experimentell erhaltenes Absorptionsmaximum von [b] β -CR und [c] AXT in *n*-Hexan.

(AXTB) bildet schwächere Wasserstoffbrücken zu den Proteinseitenketten, was sich in einer etwas höheren VEE von 2.40 eV ($\lambda = 517$ nm) zeigt. Ein schwach erlaubter, zweiter angeregter Zustand befindet sich bei 3.10–3.15 eV ($\lambda \approx 400$ nm). Wird der AXT-Farbstoff im Vakuum optimiert, zeigt sich eine Blauverschiebung der VEEs zu 2.53–2.62 eV, in guter Übereinstimmung mit den Anregungsenergien von 2.45–2.63 eV für AXT in *n*-Hexan (Tabelle 1).^[6] Basierend auf aktuellen Experimenten^[11] und Ensemble-gemittelten AXT-Spektren können wir zeigen, dass vibronische Effekte keine signifikante spektrale Verschiebung von AXT verursachen (Abbildung S6 der Hintergrundinformationen). Rechnungen in der Gasphase zeigen, dass das *s-cis*-Konformer von AXT um 4 kcal mol^{−1} stabiler ist als das *all-trans*-Konformer, das im Protein vorliegt, da eine Planarisierung der CRT-Ringe in die Polyenebene erzwungen wird (Abbildung 2 und Tabelle S5). In der Gasphasenstruktur beträgt der Torsionswinkel zwischen Ring und Polyenkette 38°. In der QM/MM-optimierten Proteinstruktur liegt der Torsionswinkel bei 170–180°. Dies stimmt qualitativ mit den experimentell gefundenen Torsionswinkeln isolierter CRTs^[12] und β -CRs von 43–53° bzw. 170–177° überein (Tabelle S1). Die Strukturveränderungen induzieren eine Rotverschiebung von 0.15 eV in den VEEs, da der Grundzustand stärker destabilisiert wird als der angeregte Zustand. Ein Scan um den Diederwinkel eines CRT-Rings zeigt, dass die Ringorientierung die Absorptionsbande um circa 0.1 eV rotverschiebt (Abbil-

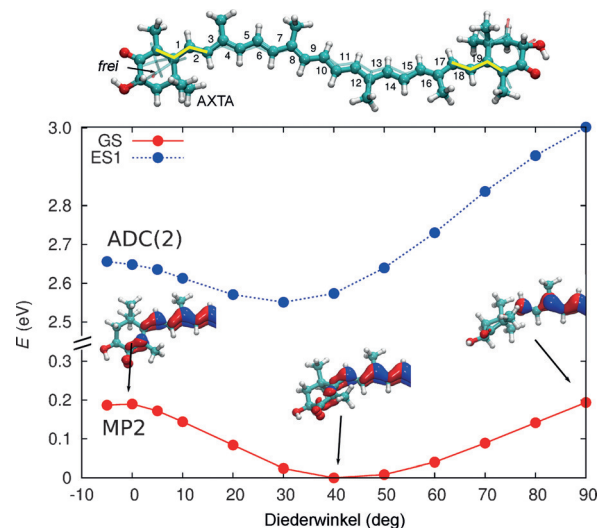


Abbildung 2. Relaxierter Scan um den abgebildeten Diederwinkel von AXT im Grundzustand (MP2/def2-TZVP) mit dazugehörigen VEEs (ADC(2)/def2-TZVP). Der Scan simuliert den sterischen Einfluss der Proteinumgebung. Die Planarisierung erweitert das π -Elektronensystem der konjugierten Polyenkette auf den Ring. GS = Grundzustand, ES1 = angeregter Zustand.

dung 2). Ein ähnlicher Farbanpassungseffekt wurde für das Sensorische Rhodopsin II vorgeschlagen, wobei der β -Iononring und die Retinylkette koplanar werden.^[13] Die Planarisierung führt außerdem zu einer ausgeprägteren Delokalisierung der π -Elektronen (Abbildung 2), wie schon in früheren Arbeiten angemerkt.^[4a]

Die Proteinumgebung bewirkt, in Übereinstimmung mit Experimenten,^[7b,14] eine elektrostatische Rotverschiebung von 0.10–0.25 eV für die VEEs der AXTs und erhöht das Dipolmoment des Grundzustands um wenige Debye. Die elektrostatischen Beiträge der Proteinumgebung zu den VEEs wurden charakterisiert, indem die VEEs nach systematischer Entfernung von Ladungsverteilungen nahegelegener Proteinseitenketten neu berechnet wurden (Abbildung 3, Tabelle S3). Diese Rechnungen vernachlässigen Effekte von Strukturrelaxationen, wodurch die tatsächlichen Farbverschiebungen unterschätzt werden können. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der elektrostatische Beitrag insgesamt eine Balance aus rot- und blauverschiebenden Beiträgen darstellt. Beispielsweise bewirkt Glu-90A bei AXTB eine Blauverschiebung von 0.2 eV, was wiederum von einer Rotverschiebung durch ein Wassermolekül aufgehoben wird. Die meisten Proteinseitenketten, die durch Wasserstoffbrücken mit AXT in Kontakt stehen, wirken leicht blauverschiebend.

Die Unterschiede in den VEEs wurden durch QM/MM-Rechnungen an Monomer- und Dimermodellen untersucht (Tabelle 1), um zu zeigen, ob die Farbverschiebung, wie experimentell vermutet, durch exzitatorische Kopplung der beiden Farbstoffe verursacht wird.^[7b,15] Die berechneten VEEs zeigen, dass die durch exzitatorische Kopplung verursachte Aufspaltung von 0.004–0.02 eV nur einen sehr geringen Einfluss auf die Farbverschiebung hat. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit semi-empirischen^[4d] und eingebetteten

Rechnungen^[4e] sowie experimentellen Arbeiten,^[11] widerspricht jedoch Übergangsdipolmoment-basierten Modellen, die eine exzitonische Kopplung von 0.49 eV ergeben.^[15]

Das für die Farbe des blauen Hummers verantwortliche Protein β -CR schafft es, die Farbe der beiden gebundenen CRTs von 2.6 eV in der Gasphase auf 2.3 eV im Proteinmodell zu reduzieren. Unsere Ergebnisse passen sehr gut zu den experimentellen Absorptionsmaxima von 2.6 und 2.1 eV für AXT in *n*-Hexan und in β -CR. Wir behandeln die 192 Atome des im Protein enthaltenen Farbstoffdimers auf quantenmechanischem Niveau und koppeln diese an eine MM-Proteinumgebung durch QM/MM-Ansätze. Durch die Größe der Farbstoffe enthalten die Rechnungen keine Polarisierungseffekte der Proteinumgebung, was den elektrostatischen Beitrag zur Farbverschiebung beeinflussen kann.^[16]

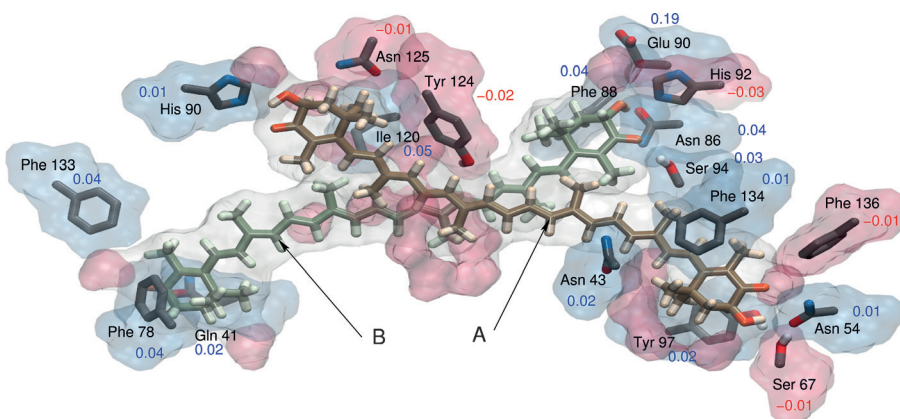


Abbildung 3. Rotverschiebende (in Rot) und blauverschiebende Aminosäurebeiträge (in Blau) zu den VEEs von AXTA und AXTB.

Die starke bathochrome Verschiebung der AXTs wird zu jeweils ca. 50 % (0.15–0.23 eV) durch elektrostatische Effekte und sterische Beiträge (0.15 eV) verursacht, die exzitonische Kopplung der beiden Farbstoffe hat jedoch nur einen untergeordneten Einfluss < 1 % (0.004–0.02 eV). Unsere Rechnungen geben einen ausführlichen Einblick in die photo-physikalischen Eigenschaften der CRTs und zeigen, wie die Proteinumgebung durch ausbalancierte Polarisations- und Planarisierungsbeiträge die drastische Farbverschiebung hervorrufen kann.^[4f]

Methoden

Das QM/MM-Modell von β -CR wurde basierend auf dem PDB-Code 1GKA aufgebaut.^[4a] Das System wurde 10 ns bei 310 K mit einer Integrationszeit von 1 fs unter Verwendung des CHARMM27-Kraftfelds klassisch relaxiert.^[17] Anschließend wurde die Struktur auf QM/MM-Niveau 0.5 ps relaxiert und optimiert. Die QM-Region enthält die beiden Farbstoffmoleküle ($N = 192$ Atome) auf B3LYP/def2-SVP-Niveau,^[18] das übrige System wurde auf MM-Niveau betrachtet. Die vertikalen Anregungsenergien wurden auf CC2^[19] und ADC(2)^[9]/def2-TZVP^[20]-Niveau mittels RVS-Näherung^[10a] berechnet, wobei virtuelle Orbitale mit Energien über 50 eV oberhalb des HOMO in der Korrelationsrechnung nicht berücksichtigt werden. Die Rechnungen wurden mit den Programmen CHARMM/Q-

Chem,^[21] NAMD2^[22] und TURBOMOLE 6.5^[23] durchgeführt. VMD wurde für Visualisierungen verwendet.^[24] Details zu den Methoden finden sich in den Hintergrundinformationen.

Stichwörter: Biochromophore · Computerchemie · Crustacyanin · Farbstoffe/Pigmente · Quantenchemie

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11564–11566
Angew. Chem. **2015**, *127*, 11726–11729

- [1] a) T. Andruniow, N. Ferre, M. Olivucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17908–17913; b) J. Neugebauer, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 3148–3173; c) M. N. Ryazantsev, A. Altun, K. Morokuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5520–5523; d) X. Zhou, D. Sundholm, T. Wesolowski, V. R. I. Kaila, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2723–2726.
- [2] a) M. Hoffmann, M. Wanko, P. Strodel, P. H. König, T. Frauenheim, K. Schulten, W. Thiel, E. Tajkhorshid, M. Elstner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10808–10818; b) O. Valsson, C. Filippi, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1275–1292; c) S. Gozem, F. Melaccio, R. Lindh, A. I. Krylov, A. A. Granovsky, C. Angeli, M. Olivucci, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 4495–4506.
- [3] G. Wald, N. Nathanson, W. P. Jencks, E. Tarr, *Biol. Bull.* **1948**, *95*, 249–250.
- [4] a) M. Ciani, P. J. Rizkallah, A. Olczak, J. Raftery, N. E. Chayen, P. F. Zagalsky, J. R. Helliwell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 9795–9800; b) B. Durbec, L. A. Eriksson, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 4190–4198; c) B. Durbec, L. A. Eriksson, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 4053–4071; d) A. Strambi, B. Durbec, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5311–5317; e) J. Neugebauer, J. Veldstra, F. Buda, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 3216–3225; f) A. Fin, A. Vargas Jentzsch, N. Sakai, S. Matile, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12736–12739; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12908–12911; g) G. Bartalucci, J. Coppin, S. Fisher, G. Hall, J. R. Helliwell, M. Helliwell, S. Liaaen-Jensen, *Acta Crystallogr. Sect. B* **2007**, *63*, 328–337.
- [5] R. P. Ilagan, R. L. Christensen, T. W. Chapp, G. N. Gibson, T. Pascher, T. Polívka, H. A. Frank, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 3120–3127.
- [6] M. Buchwald, W. P. Jencks, *Biochemistry* **1968**, *7*, 834–843.
- [7] a) R. J. Weesie, R. Verel, F. J. H. M. Jansen, G. Britton, J. Lugtenburg, H. J. M. de Groot, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 2085–2090; b) G. Britton et al., *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 2075–2084; c) S. Krawczyk, G. Britton, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2001**, *1544*, 301–310.
- [8] J. B. L. Martins, J. A. Durães, M. J. A. Sales, A. F. A. Vilela, G. M. Silva, R. Gargano, *Int. J. Quantum Chem.* **2009**, *109*, 739–745.
- [9] a) J. Schirmer, *Phys. Rev. A* **1982**, *26*, 2395–2416; b) C. Hättig, F. Weigend, *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 5154–5161.
- [10] a) R. Send, V. R. I. Kaila, D. Sundholm, *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 214114; b) V. R. I. Kaila, B. Send, D. Sundholm, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 4491–4495.
- [11] N. Christensson, K. Židek, N. C. M. Magdaong, A. M. LaFountain, H. A. Frank, D. Zigmantas, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11209–11219.
- [12] Siehe Lit. [4g].

- [13] H. Luecke, B. Schobert, J. K. Lanyi, E. N. Spudich, J. L. Spudich, *Science* **2001**, 293, 1499–1503.
- [14] V. R. Salares, N. M. Young, H. J. Bernstein, P. R. Carey, *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 576, 176–191.
- [15] A. A. C. van Wijk, A. Spaans, N. Uzunbajakava, C. Otto, H. J. M. de Groot, J. Lugtenburg, F. Buda, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1438–1445.
- [16] R. Send, C. M. Suomivuori, V. R. I. Kaila, D. Sundholm, *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119, 2933–2945.
- [17] A. D. MacKerell, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 3586–3616.
- [18] a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648–5652; b) C. T. Lee, W. T. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785–789; c) A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1992**, 97, 2571–2577.
- [19] O. Christiansen, H. Koch, P. Jørgensen, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 243, 409–418.
- [20] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7, 3297–3305.
- [21] a) Y. Shao, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 3172–3191; b) H. L. Woodcock, M. Hodošček, A. T. B. Gilbert, P. M. W. Gill, H. F. Schaefer, B. R. Brooks, *J. Comput. Chem.* **2007**, 28, 1485–1502; c) B. R. Brooks, *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 1545–1614.
- [22] J. C. Phillips, *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1781–1802.
- [23] R. Ahlrichs, M. Bär, M. Häser, H. Horn, C. Kölmel, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 162, 165–169.
- [24] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graphics* **1996**, 14, 33–38.

Eingegangen am 23. Februar 2015,
veränderte Fassung am 7. April 2015
Online veröffentlicht am 21. Juli 2015