

# Angewandte Chemie

Eine Zeitschrift der Gesellschaft Deutscher Chemiker



 WILEY-VCH

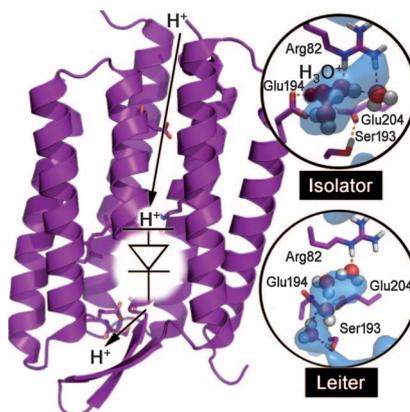
SONDERDRUCK

# Angewandte Chemie

Eine Zeitschrift der Gesellschaft Deutscher Chemiker

## Strukturbiologie

### Gerichteter Protonentransfer in Membranproteinen mittels protonierter proteingebundener Wassermoleküle: eine Protonendiode



In **Bakteriorhodopsin** ermöglicht eine Protonendiode einen gerichteten Protonentransfer über proteingebundene Wassermoleküle (siehe Bild). Dies konnte mit einer Kombination aus zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie, Röntgenkristallstrukturanalyse und Moleküldynamiksimulationen nachgewiesen werden. In flüssigem Wasser ist der Protonentransfer dagegen ungerichtet.

S. Wolf, E. Freier, M. Potschies,  
E. Hofmann, K. Gerwert\* — 7041–7046

**Stichwörter:** IR-Spektroskopie ·  
Membranproteine · Moleküldynamik ·  
Protonentransfer · Strukturbiologie

**2010 – 122/38**

# Gerichteter Protonentransfer in Membranproteinen mittels protonierter proteingebundener Wassermoleküle: eine Protonendiode\*\*

Steffen Wolf, Erik Freier, Meike Potschies, Eckhard Hofmann und Klaus Gerwert\*

Professor Manfred Eigen gewidmet

Die Schlüsselfunktion von energieumwandelnden Membranproteinen ist der Aufbau eines Protonengradienten durch gerichteten Protonentransfer. Die Rolle daran beteiligter proteingebundener Wassermoleküle ist bislang nicht völlig verstanden, da auch aktuelle Röntgenstrukturanalysen nur die Positionen von Sauerstoff-, nicht aber die von Wasserstoffatomen solcher Protein-Wasser-Komplexe ergaben. Hier zeigen wir nun mit sowohl atomarer als auch zeitlicher Auflösung, wie ein Membranprotein mittels proteingebundener Wassermoleküle einen gerichteten Protonentransfer vollführt, im Gegensatz zu zufälligem Protonentransfer in Wasser. Die Direktionalität wurde durch eine Kombination aus Röntgenstrukturanalyse, zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie und Moleküldynamik(MD)-Simulationen aufgeklärt.

Am Beispiel der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin konnten wir nachweisen, dass minutiös kontrollierte Konformationsänderungen von wenigen Aminosäureseitenketten die Positionen von vororientierten Wassermolekülen beeinflussen und den gerichteten Protonentransfer induzieren. Dieser Mechanismus funktioniert analog zu dem einer Diode aus der Elektronik: eine „Protonendiode“.

Gemäß der chemiosmotischen Theorie ist der Aufbau von Protonengradienten, z.B. durch Photosynthese<sup>[1]</sup> oder oxidative Phosphorylierung,<sup>[2–4]</sup> der Schlüsselschritt zur Energieproduktion in lebenden Zellen. ATPasen nutzen den entstehenden Gradienten für die Produktion von ATP, dem Treibstoff des Lebens. Im Gegensatz zu diesem gerichteten Protonentransfer in Proteinen ist der Protonentransfer in Wasser und Eis ein zufallsgesteuertes Ereignis.<sup>[5,6]</sup> Bakteriorhodopsin (bR), ein Protein aus der Familie mikrobieller Rhodopsine,<sup>[7,8]</sup> erzielt diesen gerichteten Protonentransfer durch lichtgetriebenes Protonenpumpen. Genau wie andere mikrobielle Rhodopsine besitzt bR ein Strukturmotiv aus sieben  $\alpha$ -helicalen Transmembranhelices und ein Retinalmolekül als Chromophor, das über eine protonierte Schiff-Base mit einer Lysin-Seitenkette an das Protein gebunden ist. Die Photoisomerisierung des Retinalmoleküls vom all-*trans*-Isomer im Proteingrundzustand (BR) zum 13-*cis*-Isomer startet einen Photozyklus, in dem bR eine Abfolge von Intermediaten namens J, K, L, M, N und O (Reihenfolge ihres zeitlichen Auftretens) durchläuft.<sup>[8]</sup>

Während des L-M-Übergangs wird die protonierte Schiff-Base ( $C=NH^+$ ), die zentrale Protonenbindestelle im Protein, deprotoniert und ihr Gegenion Asp85 protoniert (Schritt 1 in Abbildung 1a).<sup>[9]</sup> Der Protonierungsgrad von Asp85 bestimmt die Orientierung der Seitenkette von Arg82,<sup>[10]</sup> weil Asp85 durch die Protonierung neutralisiert wird und damit die Salzbrücke mit Arg82 bricht. Dessen Seitenkette bewegt sich daraufhin auf Glu194/Glu204 zu (Schritt 2 in Abbildung 1a). Diese Bewegung destabilisiert einen protonierten Wassercluster zwischen Arg82, Glu194 und Glu204 – die Protonenabgabegruppe (Schritt 3 in Abbildung 1a) –, und das darin gespeicherte Proton wird an das extrazelluläre Medium abgegeben.<sup>[11,12]</sup>

Die exakte Beschreibung der Protonenabgabegruppe ist dabei immer noch Gegenstand aktueller Diskussionen. Die Resultate von QM/MM-Simulationen mit einem Proton, den Wassermolekülen und unterschiedlich vielen angrenzenden Aminosäuren in der Quantenbox legen ein zwischen Glu194 und Glu204 geteiltes Proton,<sup>[13]</sup> ein Zundel-Kation aus zwei Wassermolekülen ( $H_5O_2^+$ )<sup>[14]</sup> oder ein asymmetrisches Eigenion aus vier Wassermolekülen ( $H_9O_4^+$ )<sup>[15]</sup> nahe. Durch Ein-

[\*] Dr. S. Wolf,<sup>[1]</sup> E. Freier,<sup>[1]</sup> Dr. M. Potschies,<sup>[5]</sup> Prof. Dr. E. Hofmann, Prof. Dr. K. Gerwert

Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum  
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)

Fax: (+49) 234-321-4238

E-Mail: gerwert@bph.rub.de

Homepage: <http://www.bph.rub.de>

Dr. S. Wolf,<sup>[1]</sup> Prof. Dr. K. Gerwert

Department of Biophysics

CAS–Max-Planck Partner Institute for Computational Biology

Shanghai Institutes for Biological Sciences

320 Yue Yang Rd. 200031 Shanghai (VR China)

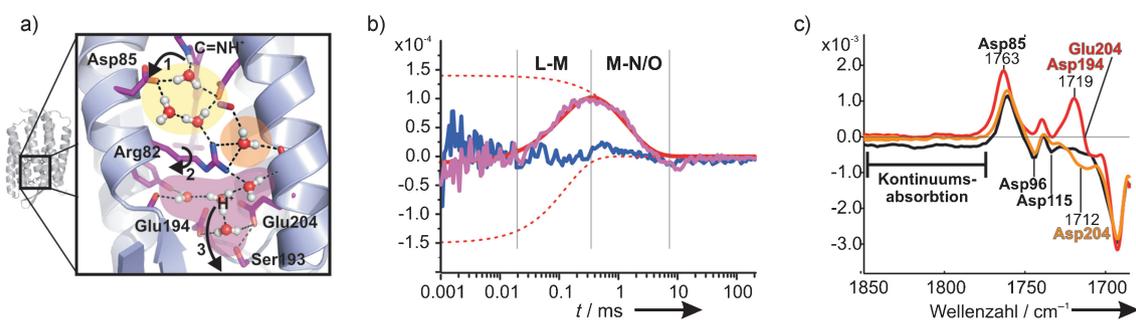
[†] Aktuelle Adresse:

Lehrstuhl für Biophysik, Universität Konstanz (Deutschland)

[‡] Diese Autoren trugen in gleichem Maß zu dieser Arbeit bei.

[\*\*] Wir danken Q. Cui, D. Bashford und J. Schlitter für hilfreiche Diskussionen, G. Smuda für die Herstellung der bR-Mutanten, dem NIC Jülich (Projektnummer hbo26) und dem RRZ Köln für die Bereitstellung von Rechenkapazität sowie dem Beamline-Personal der Swiss Light Source und der European Synchrotron Radiation Source für Hilfe bei der Datenaufnahme. Die Atomkoordinaten und Strukturdaten der beschriebenen Kristallstrukturen wurden in der Proteindatenbank unter den Zugriffsnummern 2WJK (E204D) und 2WJL (E194D) hinterlegt. – Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft [DFG GE-599/12-3] und die Research School der Ruhr-Universität unterstützt. Molekülabbildungen wurden mit PyMOL erstellt. Einzelbeiträge der Autoren: S.W.: MD-Simulationen, Strukturanalysen und Sequenzalignments; E.F.: FTIR-Messungen und Strukturanalysen; M.P. und E.H.: Proteinkristallisation und Lösen der Kristallstrukturen von E194D und E204D; K.G.: Planung und Leitung des Projekts; S.W., E.F. und K.G.: Verfassen des Manuskripts.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zur Proteinreinigung, FTIR-Messungen, Proteinkristallisation, Röntgenstrukturaufklärung und MD-Simulationen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001243> zu finden.



**Abbildung 1.** Mit zeitaufgelöster FTIR-Spektroskopie untersuchte Protonenabgabe in bR (für Einzelheiten siehe Text). a) Protonentransferschritte im L-M-Übergang. b) Zeitaufgelöste Änderung der IR-Extinktion (siehe Hintergrundinformationen) bei pH 7 (blau) und bei pH 5 (violett; transient geteiltes Proton zwischen Glu194 und Glu204 bei  $1706\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$ ). c) M-BR-Differenzspektrum von Wildtyp-bR (schwarz), E204D (orange) und E194D (rot).

führung anderer Aminosäureseitenketten in der Nähe der Abgabegruppe mit nachfolgenden zeitaufgelösten FTIR-spektroskopischen Messungen und H/D-Austauschexperimenten kamen wir zu dem Schluss, dass die Abgabegruppe sehr wahrscheinlich aus einem asymmetrischen Eigen-Ion besteht (Abbildung 1a, violett).<sup>[12]</sup> Die Glutamate 194 und 204 sind im Grundzustand eindeutig deprotoniert.<sup>[11]</sup> Dieses experimentelle Resultat wurde jüngst von Lórenz-Fonfría et al.<sup>[16]</sup> bestätigt. Nichtsdestotrotz muss die exakte Natur des protonierten Wasserclusters und des Abgabemechanismus noch bestimmt werden.

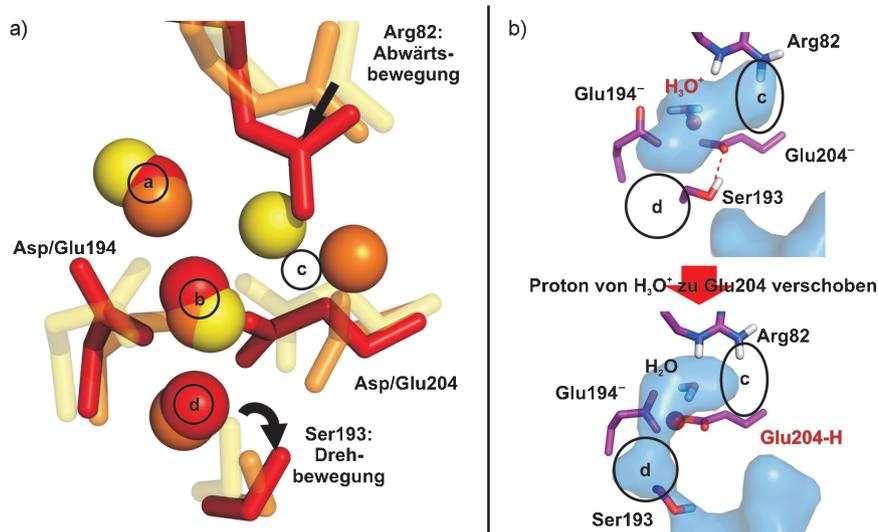
Die Positionen der Wassermolekül-Sauerstoffatome bestimmten wir röntgenstrukturanalytisch, und die Dynamik der entsprechenden Wasserstoffatome analysierten wir mithilfe der FTIR-Spektroskopie. Die Protonenabgabe an das extrazelluläre Solvens während des L-M-Übergangs ist bei pH 7 innerhalb von 60  $\mu\text{s}$  abgeschlossen.<sup>[11,17]</sup> Bei pH 5 ist die Protonenabgabe verzögert,<sup>[11,17]</sup> sodass wir ein zwischen Glu194 und Glu204 geteiltes Proton auflösen konnten ( $1706\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$ ), wie in Abbildung 1b und Abbildung 1 in den Hintergrundinformationen zu erkennen ist. Dies belegt eindeutig, dass ein zwischen Glu194 und Glu204 geteiltes Proton ein transientes Phänomen im Photozyklus ist, und bedeutet, dass die Simulationen von Phatak et al.<sup>[13]</sup> offensichtlich eine Zwischenstufe der Protonenabgabe im Photozyklus, nicht aber den Grundzustand wiedergeben. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Simulationen die Struktur des Photozyklus-Intermediats L nutzten<sup>[18]</sup> (PDB-ID 1UCQ) und nicht die des Grundzustands, denn die Resultate einer QM/MM-Simulation sind stark von dem als Basis dienenden 3D-Strukturmodell abhängig. Da in der verwendeten QM/MM-Methode dynamische Veränderungen nur bedingt zugelassen werden, ist dieser Ansatz besonders anfällig für eine falsche Wahl der Startstruktur.

Um einen detaillierteren Einblick in den Abgabemechanismus zu bekommen, ersetzten wir Glu194 und Glu204 durch die entsprechenden Aspartatreste. Überraschenderweise verschwand die Kontinuumsabsorption des protonierten Wasserclusters in E194D (Abbildung 1c, rot), was auf das Fehlen eines Wasserkations in der Abgabegruppe von E194D schließen lässt. Anstelle der Wassermoleküle wie im Wildtyp ist hier Glu204 im Grundzustand protoniert. Es deprotoniert im L-M-Übergang (negative Bande bei  $1712\text{ cm}^{-1}$  in Abbil-

dung 1c) und protoniert dabei Asp194<sup>[11]</sup> (positive Bande bei  $1719\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 1c). Der Abgabemechanismus ist in der E194D-Mutante also gegenüber dem im Wildtyp deutlich verändert. In der Mutante E204D dagegen zeigt die Kontinuumsbande nur eine Intensitätsverringerng. Der protonierte Wassercluster teilt sich das Proton mit Asp204, das im M-Intermediat deprotoniert wird<sup>[11]</sup> (negative Bande bei  $1712\text{ cm}^{-1}$  in Abbildung 1c).

Um die den abweichenden Mechanismen in den Mutanten E204D und E194D zugrundeliegenden Strukturänderungen aufzuklären, lösten wir die Kristallstrukturen beider Mutanten. Interessanterweise kann die im Photozyklus des Wildtyps auftauchende Abwärtsbewegung von Arg82 in den beiden Mutanten bereits im Grundzustand sequenziell beobachtet werden, wie in Abbildung 2 ersichtlich ist. In E204D (Abbildung 2a, orange) kann eine leichte Verschiebung der Guanidinium-Kopfgruppe in Richtung von Glu194/204 gegenüber der Position in der Wildtypstruktur<sup>[19]</sup> beobachtet werden. Diese Bewegung ist in E194D (Abbildung 2a, rot) noch weiter fortgeschritten, sodass durch die Bewegung von Arg82 ein Wassermolekül von Position c nach Position d verschoben wird. Die Wasserposition d liegt genau an der Schnittstelle zwischen dem proteininternen Wassercluster und der Proteinoberfläche und stellt eine transiente Verbindung zwischen proteininternen und -externen Wassermolekülen im Photozyklus her. In E204D führt die partielle Bewegung von Arg82 zu einer leichten Verschiebung von Position c hin zu Glu204 wie auch zu Position d. Wir gehen davon aus, dass diese Beobachtungen in den Strukturen der bR-Mutanten den Verschiebungen der Wasserpoptation von c nach d im Photozyklus des Wildtyps entsprechen.

Die Argininbewegung zu den Glutamatresten hin stört die den protonierten Wassercluster stabilisierende zweite Hydrathülle aus Aminosäureresten. Im Mechanismus für den Protonentransfer in Wasser und Eis wechselt die Struktur zwischen Eigen- ( $\text{H}_9\text{O}_4^+$ ) und Zundel-Ion ( $\text{H}_5\text{O}_2^+$ ).<sup>[6]</sup> Dabei ist nicht die sehr schnelle Fluktuation des Protons zwischen den Wassermolekülen, sondern das seltener auftretende Brechen einer Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül in der stabilisierenden zweiten Hydrathülle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Protonentransfers. In Wasser und Eis treten diese Wasserstoffbrückenfluktuationen zufällig und auf einer Pikosekunden-Zeitskala auf. Dies führt zu

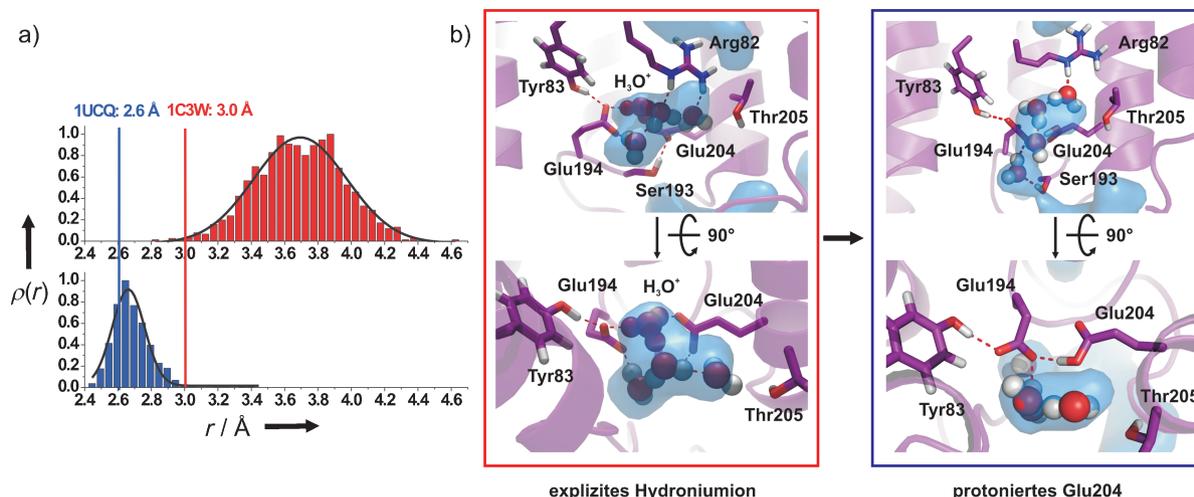


**Abbildung 2.** Öffnung der Protonenabgabegruppe (für Einzelheiten siehe Text). a) Kristallstrukturen von Wildtyp-bR (gelb, PDB-ID 1C3W,<sup>[19]</sup> 1.55 Å), der E204D-Mutante (orange, PDB-ID 2WJK, 2.30 Å) und der E194D-Mutante (rot, PDB-ID 2WJL, 2.15 Å). Positionen der Wassermolekül-Sauerstoffatome als Kugeln. b) In MD-Simulationen von Wassermolekülen dynamisch überstrichenes Aufenthaltsvolumen („Wasserdichte“)<sup>[20,21]</sup> als blaue Connolly-Oberfläche.

einem zufälligen und schnellen Protonentransfer. In Bakteriorhodopsin dagegen besteht die zweite Hydrathülle nicht wie in Wasser aus sich zufällig bewegendem Wassermolekülen, sondern aus konformativ fixierten Aminosäureseitenketten.<sup>[11]</sup> Diese Imitation der zweiten Hydrathülle im Protein durch Aminosäurereste bietet im Proteingrundzustand ein stabiles Gerüst für den protonierten Wassercluster.<sup>[12,22–24]</sup> Die Bewegung von Arg82, das Teil dieser „zweiten Hydrathülle“ ist, destabilisiert den protonierten Wassercluster in einer kontrollierten Bewegung, was den Protonentransfer induziert.<sup>[12]</sup> Die Abwärtsbewegung von Arg82 verschiebt den protonierten Wassercluster weiter zu Glu194/204. Dies könnte einen Übergang von einem asymmetrischen Eigen-

während der Protonenabgabe wie in einem Daumenkino zu beobachten (vgl. Abbildung 2).

Weiterhin analysierten wir den Zusammenhang zwischen der Protonierung der Glutamatreste und der Anordnung der internen Wassermoleküle in der Abgabegruppe mittels MD-Simulationen mit einem expliziten Hydroniumion und erhielten einen Abstand zwischen den Seitenketten-Sauerstoffatomen von Glu194 und Glu204 von 3.7 Å (Abbildung 3a, rote Graphen), der gut mit den 3.0 Å in der bR-Grundzustandskristallstruktur 1C3W übereinstimmt,<sup>[19]</sup> während die Simulationen von Phatak et al.<sup>[13]</sup> für ein protoniertes Wassermolekül einen Abstand von 5.3 Å ergeben hatten. Die Wasseranordnung entspricht einer trigonalen Pyramide wie in



**Abbildung 3.** MD-Simulationen der Grundzustandsstruktur 1QHJ mit explizitem Hydroniumion (rot) und des Modells „geteiltes Proton“ (blau); für Einzelheiten siehe Text. a) Abstände der Seitenketten-Sauerstoffatome von Glu194 und Glu204; Gauß-Verteilung der Abstände in Schwarz. b) Aufbau des Wasserclusters in der Protonenabgabegruppe während der MD-Simulation; Wasserdichte<sup>[20,21]</sup> (siehe Abbildung 2b) als blaue Oberfläche, Wassermoleküle/Hydroniumion als Kalottenmodelle (H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> in Rot).

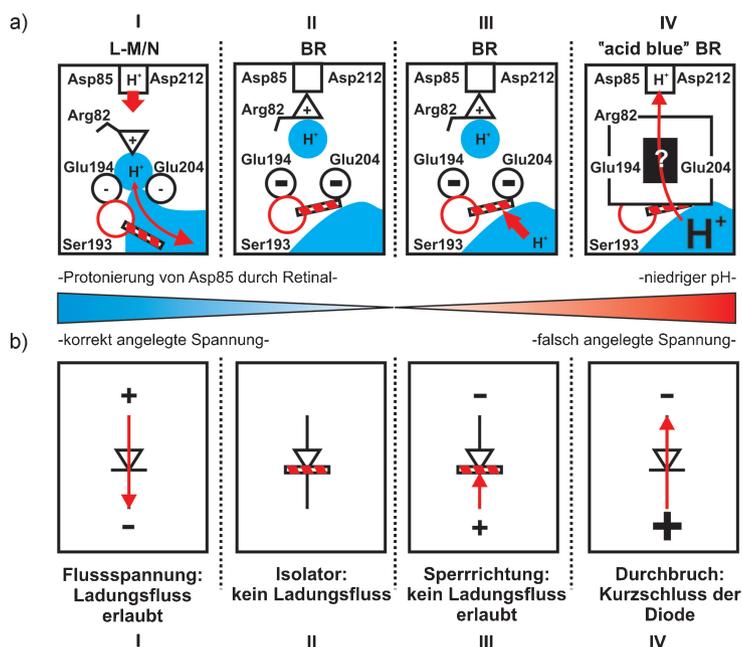
einem Eigen-Ion, in der das Hydroniumion an einer der Ecken sitzt (Abbildung 3b links) und dabei durch jeweils eine Wasserstoffbrücke mit Glu194 und Glu204 verbunden ist. Wir imitierten den Zustand eines zwischen Glu194 und Glu204 geteilten Protons und die damit verbundene Veränderung der Atomladungen von Glu204 qualitativ durch eine Einzelprotonierung von Glu204 aus dem expliziten  $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ion in der Abgabegruppe heraus. Nach erfolgter Protonierung in silico konnten wir eine Verschiebung von Wassermolekülen von c nach d und einen Bruch der Wasserstoffbrücke zwischen Ser193 und Glu204 beobachten (Abbildung 2b und Abbildung 2 in den Hintergrundinformationen). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Röntgenstrukturdaten der bR-Mutanten bezüglich der Verschiebung von Wassermolekülen und der Verlängerung der Ser193-Glu204-Wasserstoffbrücke überein. Der Bruch dieser Wasserstoffbrücke erlaubt es dem extrazellulären Wasser in direkten Wasserstoffbrückenkontakt mit den internen Wassermolekülen zu treten und stellt so einen Weg für den Protonentransfer in das extrazelluläre Medium dar.

Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, stimmt die in den MD-Simulationen beobachtete Umpositionierung der Wassermoleküle gut mit der „Daumenkino“-Anordnung der überlagerten bR-Mutantenstrukturen überein. Das protonierte Glu204 bildet eine stabile Wasserstoffbrücke mit Glu194 mit einem Abstand zwischen den Seitenketten-Sauerstoffatomen von 2.6 Å (Abbildung 3a, blauer Graph). Das Resultat der Simulation stimmt gut mit dem der Simulation von Phatak et al. mit einem geteilten Proton überein (Abbildung 2B und D in Lit. [13]: 2.8 bzw. 2.5 Å). Die Wassermoleküle bilden hierbei eine lineare Kette und können als eine Grotthuß-Leiterbahn ins extrazelluläre Wasser dienen (Abbildung 3b rechts). Interessanterweise erhielten Phatak et al. in ihren QM/MM-Berechnungen eine IR-Bande bei  $1750\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 3A in Lit. [13]), die im Rahmen der Genauigkeit ihrer Methode<sup>[25,26]</sup> gut mit unserem während des Photozyklus erscheinenden Signal bei  $1720\text{--}1706\text{ cm}^{-1}$  übereinstimmt. Wir möchten noch einmal darauf hinweisen, dass Phatak et al. eine Struktur des L-Intermediats (PDB-ID 1UCQ)<sup>[18]</sup> als Grundlage ihrer Simulationen verwendeten. Diese spiegeln also offensichtlich einen Zustand wieder, den wir hier während des Photozyklus beobachten. Ihre Schlussfolgerungen bezüglich eines geteilten Protons in der Abgabegruppe stimmen gut mit der transienten Protonierung im Intermediat, jedoch nicht mit dem Grundzustand überein, wie sie vorschlugen.

Zusammengefasst lässt sich der Protonenabgabemechanismus folgendermaßen beschreiben: Asp85 wird während des L-M-Übergangs protoniert und induziert dadurch die Abwärtsbewegung von Arg82. Die das Proton tragenden Wassermoleküle werden in Richtung Glu194/204 bewegt, was in einem transient von Glu194 und Glu204 geteilten Proton resultiert. Das Ser193/Glu204-Tor öffnet sich, interne und externe Wassermoleküle treten in Kontakt und bilden einen gerichteten Protonenabgabeweg. Der Rückfluss in die Abgabegruppe wird durch den niedrigen  $\text{pK}_s$ -Wert der Abga-

begruppe von 5.3 im M-Intermediat verhindert.<sup>[10]</sup> Übereinstimmend damit zeigten Lórenz-Fonfría und Kandori kürzlich, dass die Protonenabgabe im M-Intermediat ein irreversibler Schritt im bR-Photozyklus ist.<sup>[27]</sup>

Dieser Mechanismus zeigt deutliche Analogien zum gerichteten Ladungstransfer einer Diode in der Elektronik (Abbildung 4). Fall I ist der Durchlass bei angelegter Vor-

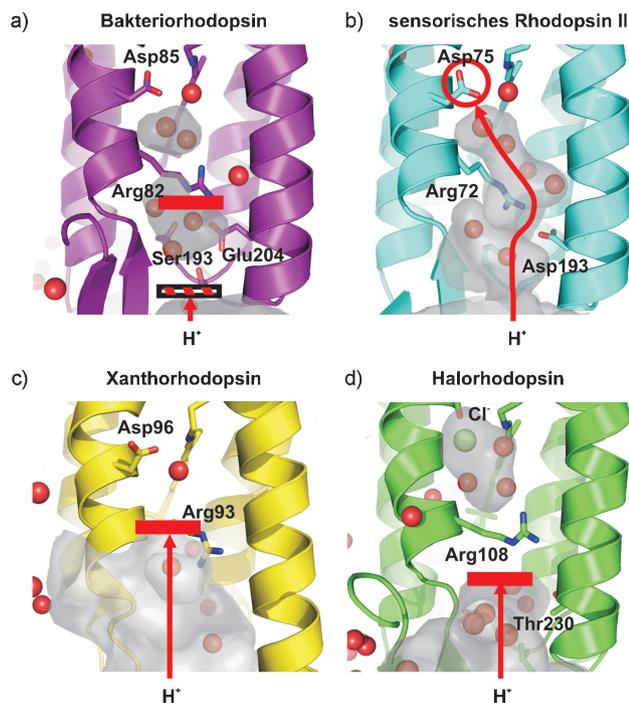


**Abbildung 4.** Der Protonenendienenmechanismus (a) verglichen mit den Vorgängen an einer Diode (b); für Einzelheiten siehe Text.

wärtsspannung: Die Protonenabgabe in M entspricht einer in Durchlassrichtung angelegten Spannung, die zu einem Stromfluss durch die Diode führt. Fall II und III: Ohne anliegende Spannung (II) oder bei einer kleinen in Sperrrichtung anliegenden Spannung (III) ist die Diode ein Isolator. Dies entspricht der Situation im bR-Grundzustand: Das Ser193/Glu204-Tor verhindert den Ladungsaustausch zwischen Proteininneren und -äußeren. Im Fall IV übersteigt die Spannung in Sperrrichtung die Durchbruchspannung; es kommt zu einem Stromfluss durch die Diode in entgegengesetzter Richtung zu Fall I. Analog wird bei einem  $\text{pH} < 2.5$  Asp85 aus dem extrazellulären Medium protoniert und bildet „acid blue“ bR.<sup>[28]</sup> Dieses bR absorbiert Photonen, ohne dabei Protonen zu pumpen.

Aufgrund dieser bemerkenswerten Ähnlichkeiten nennen wir das mechanistische Merkmal in bR nun „Protonendiode“. Dieses System schirmt Asp85 gegen äußere Einflüsse ab und stellt somit dessen deprotonierten Zustand im Grundzustand sicher. Dies sorgt für eine hohe Effizienz des Protonenpumpens, da ein im Grundzustand protoniertes Asp85 einen Verlust der absorbierten photonischen Energie bedeuten würde. Die Abmessungen dieser „Protonendiode“ liegt bei etwa 1.5 nm. bR enthält also einen Stromgleichrichter, der den Miniaturisierungsstand der heutigen Nanotechnologie deutlich übertrifft.

Die Proteinfamilie der mikrobiellen Rhodopsine verbindet eine hohe Strukturähnlichkeit mit einer großen Funktionsvielfalt. Kürzlich wurde gezeigt, dass eines ihrer Mitglieder, Proteorhodopsin, eine wichtige Rolle bei der Energieumwandlung im bakteriellen Meerwasserplankton übernimmt und einen Großteil des marinen Proteoms bildet.<sup>[7]</sup> Abbildung 5 zeigt einen Vergleich von proteininternen Was-



**Abbildung 5.** Wassergefüllte Kavitäten von bR-ähnlichen Proteinen und ihre Zugänglichkeit aus dem Proteinäußeren; Protein-Connolly-Oberfläche in Grau. a) Bakteriorhodopsin (PDB-ID 1C3W;<sup>[19]</sup> 1.55 Å), b) sensorisches Rhodopsin II (PDB-ID 1H68;<sup>[30]</sup> 2.1 Å), c) Xanthorhodopsin (PDB-ID 3DDL;<sup>[31]</sup> 1.9 Å), d) Halorhodopsin (PDB-ID 1E12;<sup>[32]</sup> 1.8 Å).

serkavitäten in den Kristallstrukturen von Bakteriorhodopsin<sup>[19]</sup> und den mikrobiellen Rhodopsinen sensorisches Rhodopsin (SR) II,<sup>[29]</sup> Xanthorhodopsin<sup>[30]</sup> und Halorhodopsin.<sup>[31]</sup> Während in bR extrazelluläres Wasser durch die Protonendiode an der extrazellulären Oberfläche vom Eintritt in das Proteininnere abgehalten wird, existiert in SR II eine direkte Wasserstoffbrückenverbindung von Wassermolekülen bis zum Gegenion der Schiff-Base (Asp75). In Halorhodopsin und Xanthorhodopsin kann Wasser bis zum Analogon von Arg82 in das Molekül eindringen. Nur Bakteriorhodopsin weist die beiden Glutamatreste und den Serinrest für die Protonendiode auf (Abbildung 4 in den Hintergrundinformationen). Dementsprechend hat das Gegenion der zentralen Protonenbindestelle einen  $pK_s$ -Wert von 2.5.<sup>[28]</sup> SR I und II, Proteorhodopsin und Xanthorhodopsin weisen einen deutlich höheren  $pK_s$ -Wert für das Gegenion auf (zwischen 5.6 und 7.5),<sup>[32–35]</sup> was auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer Protonierung aus dem externen Medium schließen lässt. Sensorische Rhodopsine können als Protonenpumpen arbeiten, wenn sie nicht an ihre Transducerproteine angekoppelt sind, wenn auch deutlich weniger effizient

als bR.<sup>[7]</sup> Xanthorhodopsin, eine Protonenpumpe wie bR, enthält einen zusätzlichen Carotinoidrest als Lichtsammelkomplex<sup>[30]</sup> und kann daher Sonnenlicht auf eine evolutionär unterschiedliche und viel effizientere Weise als bR nutzen. Proteorhodopsin wird von maritimen Organismen exprimiert, die einem Umgebungs-pH-Wert von 7.8 bis 8.0 ausgesetzt sind; Proteorhodopsin muss daher nicht sein Inneres gegen einen niedrigen externen pH-Wert abschirmen können.<sup>[36]</sup> Die Protonendiode scheint somit ein evolutionär optimiertes modulares Merkmal von bR zu sein, das der Steigerung der Effizienz der eigenen Protonenpumpaktivität und dem Schutz gegenüber extremen Umgebungsbedingungen dient.

Fassen wir die Resultate abschließend zusammen: Der gerichtete Protonentransfer in bR mittels proteingebundener interner Wassermoleküle funktioniert ähnlich wie in einer elektronischen Diode. Wir nennen daher die Protonenabgabegruppe „Protonendiode“. Eine Bewegung von Arg82 auf Glu194/204 zu öffnet ein durch Ser193 und Glu204 gebildetes Tor zum Proteinäußeren hin. Externe und proteininterne Wassermoleküle treten in direkten Kontakt und vollführen einen gerichteten Grotthuß-Protonentransfer in das extrazelluläre Medium hinein. Da proteingebundene interne Wassermoleküle in vielen Membranproteinen gefunden und als Protonenbindestellen der entsprechenden Proteine diskutiert werden,<sup>[3,4]</sup> sind wir davon überzeugt, dass auch am gerichteten Protonentransfer in anderen Membranproteinen „Protonendioden“ beteiligt sein können. Damit können wir den von Manfred Eigen gefundenen Protonentransfermechanismus in Wasser und Eis<sup>[37]</sup> jetzt auf proteingebundenes Wasser übertragen.

Eingegangen am 1. März 2010,  
veränderte Fassung am 21. Mai 2010  
Online veröffentlicht am 2. August 2010

**Stichwörter:** IR-Spektroskopie · Membranproteine · Moleküldynamik · Protonentransfer · Strukturbiologie

- [1] K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, *Science* **2004**, 303, 1831.
- [2] S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, 376, 660.
- [3] M. Wikstrom, M. I. Verkhovsky, G. Hummer, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2003**, 1604, 61.
- [4] J. Xu, M. A. Sharpe, L. Qin, S. Ferguson-Miller, G. A. Voth, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2910.
- [5] P. Ball, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 74.
- [6] N. Agmon, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 244, 456.
- [7] J. L. Spudich, K.-H. Jung in *Handbook of Photosensory Receptors* (Hrsg.: W. R. Briggs, J. L. Spudich), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 1–24.
- [8] J. K. Lanyi, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 12, 210.
- [9] K. Gerwert, B. Hess, J. Soppa, D. Oesterhelt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 4943.
- [10] D. Bashford, K. Gerwert, *J. Mol. Biol.* **1992**, 224, 473.
- [11] F. Garczarek, L. S. Brown, J. K. Lanyi, K. Gerwert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3633.
- [12] F. Garczarek, K. Gerwert, *Nature* **2006**, 439, 109.
- [13] P. Phatak, N. Gosh, H. Yu, Q. Cui, M. Elstner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 19672.

- [14] R. Rousseau, V. Kleinschmidt, U. W. Schmitt, D. Marx, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4908; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4804.
- [15] G. Mathias, D. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 6980.
- [16] V. A. Lórenz-Fonfría, Y. Furutani, H. Kandori, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4071.
- [17] L. Zimányi, G. Váró, M. Chang, B. Ni, R. Needleman, J. K. Lanyi, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8535.
- [18] T. Kouyama, T. Nishikawa, T. Tokuhisa, H. Okumura, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 531.
- [19] H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler, J. K. Lanyi, *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 899.
- [20] S. Wolf, E. Freier, K. Gerwert, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2772.
- [21] C. Kandt, J. Schlitter, K. Gerwert, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 705.
- [22] D. Marx, *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1848.
- [23] S. Taraphder, G. Hummer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3931.
- [24] A. Shinobu, N. Agmon, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 7253.
- [25] N. Otte, M. Scholten, W. Thiel, *J. Chem. Phys. A* **2007**, *111*, 5751.
- [26] M. Gaus, C.-P. Chou, H. Witek, M. Elstner, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 11866.
- [27] V. A. Lórenz-Fonfría, H. Kandori, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5891.
- [28] S. P. Balashov, E. S. Imasheva, G. Govindjee, T. G. Ebrey, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 473.
- [29] A. Royant, P. Nollert, K. Edmani, R. Neutze, E. Landau, E. Pebay-Peyroula, J. Navarro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10131.
- [30] H. Luecke, B. Schobert, J. Stagno, E. S. Imasheva, J. M. Wang, S. P. Balashov, J. K. Lanyi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 16561.
- [31] M. Kolbe, H. Besir, L.-O. Essen, D. Oesterhelt, *Science* **2000**, *288*, 1390.
- [32] R. A. Bogomolni, W. Stoeckenius, I. Szundi, E. Perozo, K. D. Olson, J. L. Spudich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10188.
- [33] G. Schmies, B. Lüttenberg, I. Chizhov, M. Engelhard, A. Becker, E. Bamberg, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 967.
- [34] E. S. Imasheva, S. P. Balashov, J. M. Wang, J. K. Lanyi, *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1406.
- [35] A. K. Dioumaev, *Biochemistry* **2002**, *41*, 5348.
- [36] R. A. Krebs, U. Alexiev, R. Partha, A. M. DeVita, M. S. Braiman, *BMC Physiol.* **2002**, *2*, 5.
- [37] M. Eigen, *Angew. Chem.* **1963**, *75*, 489; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, *3*, 1.