

Die schnellsten molekularen Vorgänge bei der Photosynthese von Bakteriorhodopsin

Wolfgang Zinth

Physik Department E11 der Technischen Universität,
D-8000 München

The primary photosynthetic reactions of bacteriorhodopsin are studied with femtosecond optical techniques. The experimental results indicate the following reaction pathway: After the absorption of a photon by the retinal chromophore, the first reactive motion proceeds on the excited state potential surface within 200 fs (2×10^{-13} s). Afterwards a second process leads with a time constant of 500 fs to the first groundstate photoproduct. During these extremely rapid reactions, the retinal isomerizes from the all-trans to the 13-cis configuration.

Die Energie für die Lebensvorgänge der höheren Organismen stammt von der Sonne. In Pflanzen, manchen Bakterien und in Blaualgen wird deren Strahlung über photosynthetische Prozesse in chemische Energie umgesetzt. Im Laufe der Evolution haben sich dazu in den photosynthetisch aktiven Zellen spezielle Photosysteme entwickelt. In ihnen wird ein kompliziert gebautes Molekül, das Chlorophyll, als funktionell wichtiger Farbstoff (in einigen chemischen Varianten) verwendet. Bei der Photosynthese mit Hilfe dieser chlorophyllhaltigen Systeme wird die Sonnenenergie durch eine extrem schnelle Ladungstrennung und einen anschließenden schnellen Transfer eines Elektrons fixiert. In weiteren Sekundärreaktionen erfolgt dann die chemische Speicherung der Energie z. B. in der Synthese von Adenosintriphosphat. In speziellen ökologischen Nischen konnten sich jedoch auch andere photosynthetische Organismen heranzubilden, die Einblicke in alternative Strategien zur Lichtenergieumwandlung erlauben. Interessante Vertreter sind dabei Halobakterien, die an extremen Standorten, zum Beispiel den Küstenstreifen Californiens, des Toten Meers oder in Salinen, leben. Die Photosynthese dieser Bakterien soll hier im folgenden behandelt werden.

Photosynthese in Halobakterien

Halobakterien haben die Form von Stäbchen mit einem Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ und einer Länge von ca. $5 \mu\text{m}$. Wichtige Stoffwechselfunktionen dieser Bakterien werden von Proteinen ausgeführt, die in der Zellmembran eingebaut sind [1 – 5]. Eine grobe schematische Darstellung zeigt Fig. 1a. Halobakterien besitzen die Fähigkeit, verschiedene Lichtfarben zu unterscheiden: Sie bewegen sich weg vom zellschädigenden blauen und ultravioletten Licht und hin zu grün/gelbem Licht. Letztere Eigenschaft erklärt sich aus dem Energiehaushalt des Halobakteriums. Den Halobakterien stehen zwei Energiequellen zur Verfügung: Unter normalen Bedingungen erzeugt die Atmungskette, die mit Hilfe von Sauerstoff organisches Substrat „verbrennt“, einen Protonengradienten über die Zellmembran. Leben die Bakterien in einer sauerstoffarmen Umgebung, tritt eine spezielle Art von Photosynthese als Energiequelle hinzu. Dabei wird vom Bakteriorhodopsin, einer lichtgetriebenen Protonenpumpe (maximale Aktivität für Licht im gelben Spektralbereich), ein Protonengradient zwischen dem Zellinneren und dem Zellaußenraum aufgebaut. Der Ausgleich dieses Protonengradienten wird für verschiedene lebenswichtige Prozesse im Halobakterium verwendet: zum Aufbau des Energiespeichers Adenosintriphosphat (ATP) mit dem Enzym ATP-Synthetase, zur

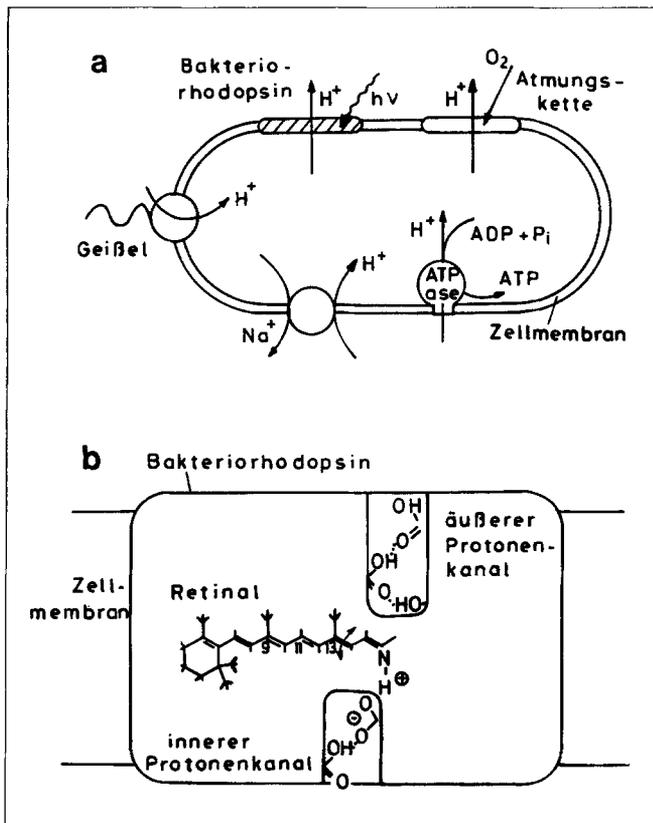


Fig. 1. a) Membranfunktionen des *Halobacterium halobium*. Dargestellt sind die Protonenpumpen Bakteriorhodopsin und Atmungskette und die durch einen Protonengradienten angetriebenen Systeme wie Natrium-Antiport, Geißelbewegung und ATP-Synthase. b) Darstellung der lichtgetriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin. Lichtabsorption verursacht in den primären Schritten eine Isomerisation des Retinal-Chromophors. Dadurch wird ein Proton aus dem äußeren Protonenleitungskanal in den Zellaußenraum gepumpt. In den nachfolgenden Reaktionen nimmt das Protein ein Proton aus dem Zellinnenraum auf und stellt so den Ausgangszustand wieder her

Aufrechterhaltung der Natriumkonzentration im Zellinneren und schließlich zur Bewegung des Bakteriums mit Hilfe von Geißeln.

In vielen Untersuchungen konnten in den letzten Jahren wichtige Informationen über die mikroskopischen Eigenschaften der Protonenpumpe Bakteriorhodopsin gefunden werden: Bakteriorhodopsin ist ein Membran-Protein, das 248 Aminosäuren und ein lichtabsorbierendes Farbstoffmolekül, ein Retinal, enthält. Die langgestreckte konjugierte Kette des Retinals liegt in der pumpaktiven Form des Bakteriorhodopsins in der all-trans-Konfiguration vor (siehe Fig. 1b). Es ist über eine Schiff'sche Base an ein Lysin der Aminosäuresequenz des Proteins gebunden. Nach Absorption von Licht laufen die folgenden molekularen Vorgänge im Bakteriorhodopsin ab [4–6]: Retinal wird sehr schnell um die 13-Bindung gedreht, d.h. isomerisiert. Dadurch wird die Umgebung des Protons an der

Schiff'schen Base geändert; anschließend erfolgt eine Deprotonierung der Schiff'schen Base (40 μs). Mit weiteren Isomerisationsbewegungen und einer Reptonierung der Schiff'schen Base wird anschließend in ca. 10 ms der Ausgangszustand wieder hergestellt.

Im Zuge dieses Photozyklus erfolgt der Transport eines Protons über das Membranprotein, den man sich folgendermaßen vorstellen kann: Das Retinalmolekül ist so in das Protein eingebaut, daß es in der Nähe von zwei Protonenleitungskanälen liegt, von denen einer mit dem Zellinneren, der andere mit dem Zellaußen verbunden ist. Durch die Isomerisierung des Retinals werden zunächst die Bindungsverhältnisse im nach außen orientierten Kanal so geändert, daß ein Proton an den Zellaußenraum abgegeben wird. Durch Rückbewegung der deprotonierten Retinal-Schiff's Base wird dann ein Proton im zellinneren Kanal zum Retinal transportiert und so der Ausgangszustand wieder hergestellt. Lichtenergie wird dabei über das Retinal an den Transport des Protons übertragen. Ein Teil der Energie liegt schließlich in Form eines Protonengradienten (zwischen Zellinnerem und Zellaußenem) gespeichert vor. Da einzelne Schritte dieses Photozyklus mit Änderungen des Absorptionsspektrums des Retinals (d.h. mit einer Änderung der Farbe des Bakteriorhodopsins) verknüpft sind, lassen sich die reaktiven Übergänge mit optischen Methoden beobachten.

In unseren Untersuchungen haben wir zeitaufgelöste optische Meßmethoden verwendet, um die primären Schritte der Photosynthese von Bakteriorhodopsin aufzuklären. Diese ersten Schritte sind von besonderem Interesse, da bei ihnen die wichtigen photophysikalischen und photochemischen Prozesse, wie Umwandlung von Lichtenergie in elektronische Anregung des Retinals und die anschließende Änderung der Retinalkonfiguration, stattfinden, die dann die Voraussetzung für die weiteren chemischen Reaktionen darstellen.

Methoden zur Untersuchung von extrem schnellen photochemischen Reaktionen

Im Zug der experimentellen Untersuchungen hat sich herausgestellt, daß der Primärschritt nach Lichtanregung von Bakteriorhodopsin auf der Zeitskala von 10⁻¹² s, d.h. von Pikosekunden, abläuft. Zeitaufgelöste Beobachtungen auf dieser Zeitskala sind nun mit den modernsten optischen Methoden möglich geworden [7]. Das Prinzip dieser neuen Meßverfahren sei anhand der Skizze im oberen Teil von Fig. 2 erläutert: Man verwendet Lichtimpulse, die kürzer sind als der zu untersuchende molekulare Vorgang. Ein erster Anregungsimpuls regt dabei die zu untersuchende Substanz an und erzeugt eine Änderung der Probenab-

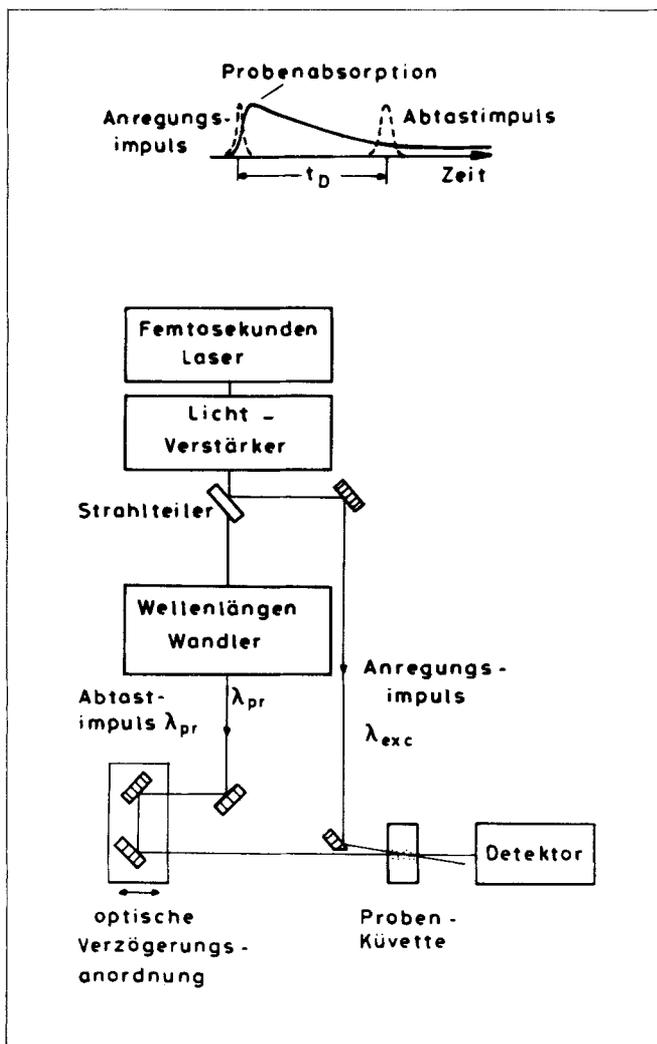


Fig. 2. Oben: Diagramm zum Meßprinzip, unten: Aufbau der Meßanordnung. In einem Femtosekundenlaser/Verstärker-System werden einzelne Lichtimpulse mit extrem kurzer Dauer (80 fs) erzeugt. Der Anregungsimpuls wird mit einem teilreflektierenden Spiegel (Strahlteiler) vom Ausgangsimpuls abgespalten und in die Probenküvette fokussiert. Der verbleibende Teil des Ausgangsimpulses durchläuft einen Wellenlängenwandler und eine optische Verzögerungsleitung, bevor er den angeregten Teil der Probe abtastet

sorption. Die geänderte Absorption wird dann von einem zweiten, um die Zeit t_D verzögerten kurzen Lichtimpuls abgetastet.

Der von uns verwendete Versuchsaufbau ist im unteren Teil von Fig. 2 schematisch wiedergegeben: In einem Femtosekundenlaser werden Lichtimpulse mit einer Dauer von $8 \cdot 10^{-14}$ s (80 fs) hergestellt. Der folgende Vergleich gibt einen Eindruck für die Kürze dieser Lichtimpulse: In einer Sekunde läuft Licht etwa von der Erde zum Mond, in 80 fs kommt Licht gerade 0,026 mm (Dicke einer Aluminiumfolie) weit. Der zunächst schwache Lichtimpuls aus dem Laser durchläuft einen Lichtverstärker [7]. Ein teildurchlässiger

Spiegel spaltet den verstärkten Lichtimpuls in zwei zeitlich synchronisierte Lichtimpulse auf. Der im Bild nach rechts laufende Impuls wird in die Probe (Lösung von Bakteriorhodopsin-Molekülen) fokussiert und regt dort die Photosyntheseschritte an. Die Wellenlänge des zweiten Lichtimpulses wird mit Hilfe nichtlinearer optischer Prozesse verändert, ohne daß dabei eine Verlängerung der Impulsdauer auftritt [7]. Dieser abtastende Lichtimpuls durchläuft zunächst eine optische Verzögerungsleitung. In dieser wird durch Verschieben eines Spiegelpaares der Abtastzeitpunkt relativ zum Anregungszeitpunkt verzögert und diese Zeitverzögerung im Femtosekundenbereich präzise eingestellt. Anschließend wird das angeregte Volumen der Probe abgetastet. Hinter der Probe mißt ein Photodetektor die transmittierte Energie des Abtastimpulses. So kann die zeitabhängige Transmission (oder Absorption) der Probe für verschiedene Verzögerungszeiten t_D bestimmt werden. In den Meßkurven trägt man dann die durch den Anregungsprozeß erzeugte Absorptionsänderung als Funktion der zeitlichen Verzögerung t_D auf. Mit dem vorgestellten Verfahren konnten schnelle Absorptionsänderungen mit einer Zeitauflösung untersucht werden, die besser war als 10^{-13} s (100 fs).

Welche Absorptionskinetiken beobachtet man zu Beginn der Photosynthese von Bakteriorhodopsin?

Ergebnisse von zeitaufgelösten Messungen an Bakteriorhodopsin sind in Fig. 3 für Abtastwellenlängen von $\lambda = 735$ nm und $\lambda = 850$ nm gezeigt [8]. Die Wellenlängen liegen im langwelligen Teil des Spektrums, wo ursprünglich keine Absorption von Bakteriorhodopsin mehr vorliegt. Man beobachtet trotzdem eine Absorptionsabnahme, d.h. der Abtastimpuls muß durch stimulierte Emission in der Probe verstärkt worden sein. Diese Lichtverstärkung, die ja in jedem Laser auftritt, kann nur gefunden werden, wenn sich die Moleküle der Probe in einem angeregten elektronischen Zustand befinden [7]. Wir beobachten also in unseren Messungen Änderungen im angeregten elektronischen Zustand S_1 des Bakteriorhodopsins. Bei der Wellenlänge $\lambda_{pr} = 735$ nm wird eine Verstärkungskinetik gefunden (Fig. 3a), die mit einer Zeitkonstanten $\tau = 200$ fs abfällt. Messungen bei größeren Wellenlängen zeigen einen langsameren Abfall der Verstärkung mit 500 fs (Fig. 3b für $\lambda = 850$ nm). In Übergangsbereichen beobachtet man einen biexponentiellen Abfall mit den beiden Zeitkonstanten 200 fs und 500 fs. Man kann aus diesen Beobachtungen ableiten, daß Bakteriorhodopsin nach optischer Anregung zwei unterschiedliche elektronisch angeregte Zustände einnimmt.

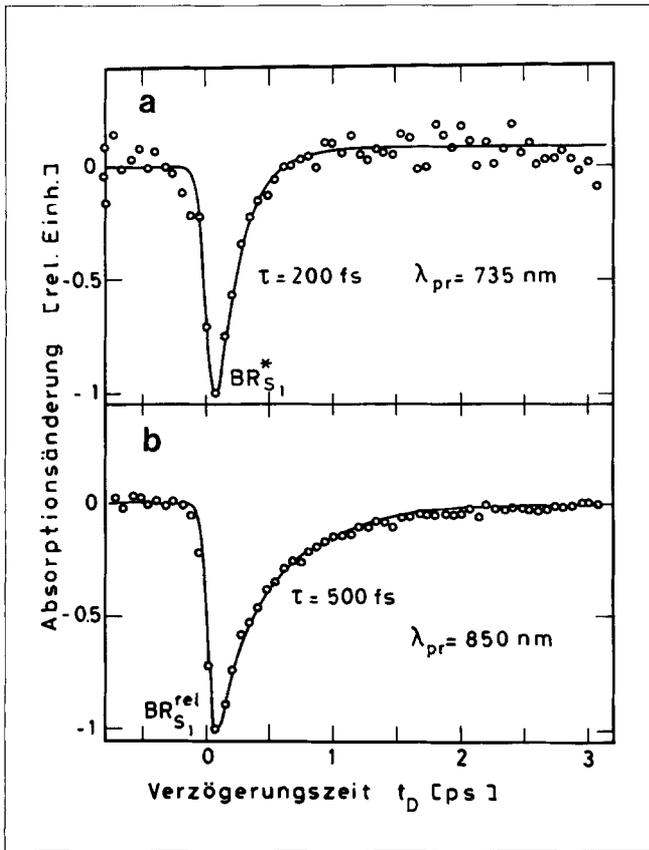


Fig. 3. Absorptionsänderung von Bakteriorhodopsin nach Anregung mit Femtosekunden-Lichtimpulsen. a) Bei einer Abtastwellenlänge $\lambda = 735$ nm beobachtet man eine Änderung der Probenabsorption mit einer Zeitkonstante von 200 fs. b) Im langwelligeren Bereich bei $\lambda = 850$ nm erfolgt der Rückgang der Absorptionsänderung mit einer Zeitkonstante von 500 fs

Überraschend ist außer dem Auftreten zweier angeregter Zustände deren kurze Lebensdauer, die auf eine extrem schnelle photochemische Reaktion hinweist. Zum Vergleich: In nichtreaktiven Farbstoffen werden etwa 100-fach längere S_1 -Lebensdauern gefunden.

Weitere Untersuchungen zeigen, daß mit der Zeitkonstante 500 fs das erste Grundzustands-Photoprodukt – genannt J – gebildet wird. Ein Beispiel für die nachfolgenden Pikosekundenreaktionen gibt eine Messung bei 660 nm (Fig. 4): Anschließend an eine Absorptionserniedrigung nahe am Zeitnullpunkt tritt bei dieser Wellenlänge eine Absorptionserhöhung auf. Dabei kann eine weitere Dynamik beobachtet werden: Mit der Zeitkonstante von 3 ps geht das kurzlebige Photoprodukt J in das langlebige Photoprodukt K über. Letzteres absorbiert hier ($\lambda = 660$ nm) schwächer als das Produkt J.

Die 3-ps-Reaktion $J \rightarrow K$ beendet die Primärreaktionen. Weitere dynamische Prozesse können erst auf einer sehr viel längeren Zeitskala (Mikrosekunden) be-

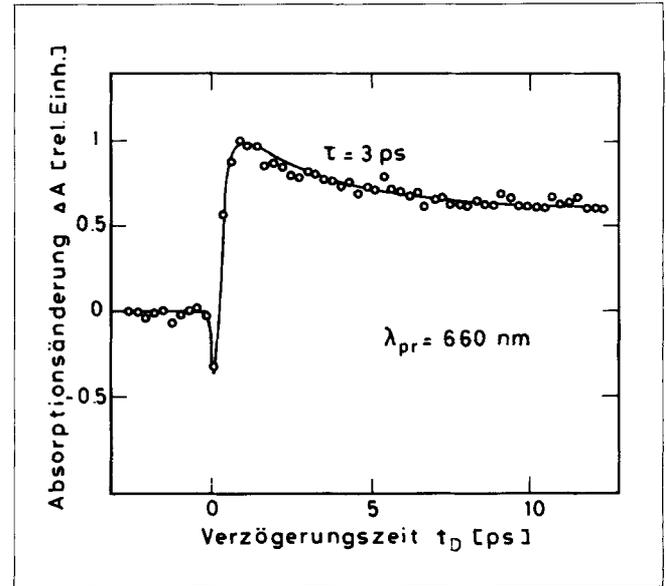
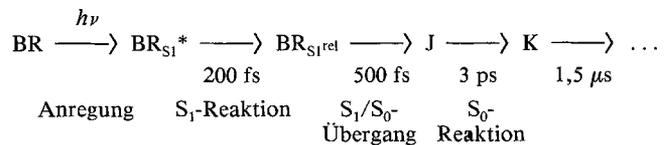


Fig. 4. Absorptionsänderung von Bakteriorhodopsin, gemessen bei 660 nm. Hier beobachtet man nach einer schnellen Absorptionserniedrigung am Zeitnullpunkt eine Absorptionserhöhung, die dem ersten Grundzustandsphotoprodukt J zuzuschreiben ist. Anschließend erfolgt mit einer Zeitkonstante von 3 ps ein Rückgang der Absorption. In dieser Reaktion geht das Photoprodukt J in ein zweites Photoprodukt K über

obachtet werden. Sie sind dann mit den Folgereaktionen wie der Deprotonierung der Schiff'schen Base, der Protonenleitung und den Rückreaktionen verknüpft.

Die molekularen Vorgänge der Primärschritte

Neben den vorgestellten Untersuchungen haben wir viele weitere Messungen an verschiedenen Abtastwellenlängen und unterschiedlichen Bakteriorhodopsin-Proben durchgeführt, die die nachstehende Abfolge der Primärprodukte eindeutig aufzeigen [6, 8 – 10]:



Die molekularen Vorgänge der Teilreaktionen werden im folgenden anhand eines Potentialflächendiagramms (Fig. 5) erläutert: Licht der Energie $h\nu$ regt Bakteriorhodopsin (BR) von der Grundzustands-Potentialfläche ohne Änderung der Kernkoordinaten (Franck-Condon-Prinzip) auf die Potentialfläche des elektronisch angeregten Zustands S_1 an (Zustand $BR_{S_1}^*$). Von hier aus führt eine schnelle Reaktion mit der Zeitkonstanten $\tau_1 = 200$ fs zum Minimum der Potentialfläche im angeregten elektronischen Zustand S_1

(Zustand $BR_{S_1}^{rel}$). Für diese Reaktion stehen etwa 15 % der Energie des anregenden Photons zur Verfügung. Dieser Energiebetrag ist ausreichend, um innerhalb der 200 fs den ersten Teil (Rotation um ca. 60°) einer Isomerisation um die 13-Bindung durchzuführen. Die bei dieser Bewegung freiwerdende kinetische Energie wird in die vielen anderen Freiheitsgrade des Retinalmoleküls dissipiert, so daß eine Rückbewegung längs der Reaktionskoordinate nicht mehr möglich ist. Aus dem relaxierten Zustand $BR_{S_1}^{rel}$ erfolgt dann der Übergang auf die Grundzustands-Potentialfläche. Hier wird nun der Rest der Isomerisationsbewegung ausgeführt, die zum Grundzustandsprodukt J führt. Es gibt verschiedene Hinweise dafür, daß bereits hier die Isomerisation des Retinalmoleküls abgeschlossen ist [9, 10]. In der anschließenden 3-ps-Reaktion bildet sich das zweite Grundzustandsprodukt K. Die spektralen Eigenschaften der beiden Zustände J und K sind sehr ähnlich. Aus diesem Grund kann man annehmen, daß während des J→K-Übergangs keine wesentlichen Änderungen der Retinalkonfiguration auftreten. Offensichtlich erfolgen in diesem Schritt Relaxationen, die zur Anpassung der Proteinumgebung an die geänderte Retinalkonfiguration führen. Nach 3 ps sind die

primären Reaktionen abgeschlossen. Erst nach etwa $1,5 \mu s$, d.h. mit einer um ca. sechs Größenordnungen geringeren Geschwindigkeit, laufen die weiteren Folgeprozesse ab.

Warum sind die Primärschritte so schnell?

Die ersten Reaktionen der Photosynthese von Bakteriorhodopsin erfolgen mit einer kaum vorstellbaren Geschwindigkeit. Innerhalb von 200 fs nach Absorption eines Photons hat das Retinal bereits eine neue Anordnung der Kernkoordinaten eingenommen, von der aus bereits nach weiteren 500 fs der Übergang in ein Grundzustandsprodukt stattgefunden hat. Nach weniger als einer Pikosekunde ist also der erste wesentliche Schritt der Photosynthese – die Isomerisation um die 13-Bindung des Retinals – beendet.

Es drängt sich hier die Frage auf, warum die Primärreaktion der Photosynthese von Bakteriorhodopsin mit dieser extrem hohen Reaktionsgeschwindigkeit abläuft. Wir führen dies auf das ganz allgemein in der Photosynthese verwendete Reaktionsprinzip zurück. Die Wandlung von Lichtenergie erfolgt über einen angeregten elektronischen Zustand S_1 eines Farbstoffmoleküls. Außer dem gewünschten photosynthetischen Reaktionskanal treten Verlustprozesse auf (z.B. interne Konversion), die die Anregung schnell (innerhalb von $10^{-11} - 10^{-10} s$) in nutzlose Wärme dissipieren können. Dieser Verlust wird vermieden, wenn die reaktiven Prozesse bedeutend schneller ablaufen als die dissipativen Konkurrenzprozesse. Nur so kann die für ein Photosynthesesystem notwendige hohe Quantenausbeute erzielt werden.

Die in diesem Beitrag beschriebenen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. D. Oesterhelt, Prof. W. Kaiser und J. Döbler durchgeführt. Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Sonderforschungsbereich SFB 143, „Primärprozesse der bakteriellen Photosynthese“, gefördert.

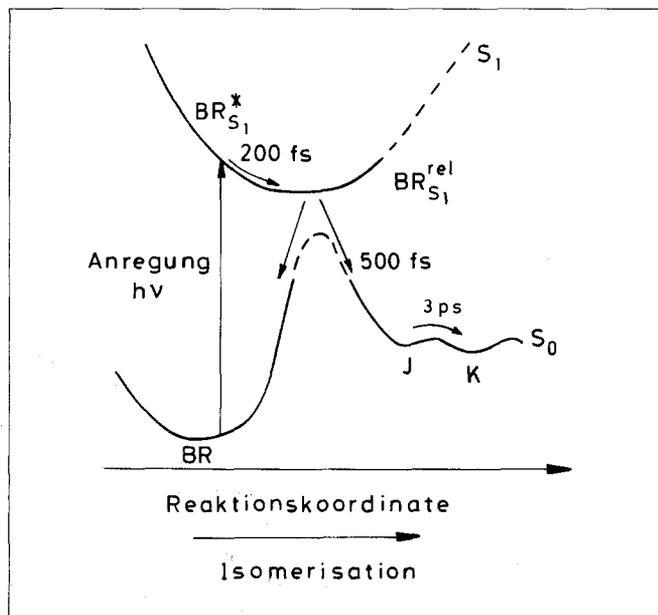


Fig. 5. Die Primärschritte der Photosynthese von Bakteriorhodopsin, dargestellt in einem Potentialflächendiagramm. Von der Grundzustandspotentialfläche S_0 führt das anregende Photon das System auf die Potentialfläche (S_1) des ersten elektronisch angeregten Zustandes (Zustand $BR_{S_1}^*$). In einer ersten reaktiven Bewegung erfolgt mit $\tau = 200$ fs der Übergang in den relaxierten Zustand $BR_{S_1}^{rel}$. Der Rest der Isomerisation erfolgt nach der Rückkehr auf die Grundzustandspotentialfläche (S_0) bei der Bildung des ersten Grundzustandsphotoproducts J. Nach 3 ps sind mit der Bildung des zweiten Grundzustandsprodukts K die Primärreaktionen des Bakteriorhodopsins abgeschlossen

1. Stoeckenius, W., in: The Photosynthetic Bacteria (R. K. Clayton, W. R. Sistrom, eds.). New York: Plenum 1978
2. Stoeckenius, W., Bogomolni, R. A.: Ann. Rev. Biochem. 52, 587 (1982)
3. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W.: Nature New Biol. 233, 149 (1971)
4. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2853 (1973)
5. Lanyi, J. K., in: New Comprehensive Biochemistry, p. 315 (L. Ernster, ed.). Amsterdam: Elsevier 1984
6. Polland, H. J., et al.: Biophys. J. 49, 651 (1986)
7. Kaiser, W. (ed.): Ultrashort Light Pulses and Applications. Heidelberg: Springer 1988; Herrmann, J., Wilhelmi, B.: Laser für ultrakurze Lichtimpulse. Berlin: Akademie-Verlag 1984
8. Döbler, J., et al.: in Vorbereitung
9. Nuss, M. C., et al.: Chem. Phys. Lett. 117, 1 (1985)
10. Polland, H. J., et al.: Biochim. Biophys. Acta 767, 635 (1984)