1 Einleitung

Die Entwicklung und Existenz des Lebens auf der Erde ist untrennbar mit dem Licht der Sonne verbunden, insbesondere, da die Evolution von photosynthetischen Systemen initiiert wurde, in denen eine Umsetzung von Lichtenergie in chemische Energie vorgenommen wird. Darüber hinaus ermöglichte das Sonnenlicht die Entstehung von photosensitiven Systemen (Photorezeptoren), mit deren Hilfe sich die Organismen innerhalb ihres Lebensraums orientieren können.[1,2]

Die Konkurrenz innerhalb des Ökosystems nötigt die verschiedenen Arten, eine ökologische Nische zu besetzen, in der sie eine Überlegenheit über andere Organismen für ihre Erhaltung ausbilden können. Das Spektrum und die Intensität des Sonnenlichts in diesen Nischen unterliegt deutlichen Variationen, wie z. B. die Abnahme des Anteils roten Lichts mit zunehmender Wassertiefe[1]. Auf diese spektrale Verteilung haben die Organismen in der Evolution mit einer erstaunlichen Variation und Anpassung der photorelevanten Systeme reagiert. So sind Pflanzen in der Regel an einen Ort gebunden und auf die dort vorhandenen Bedingungen angewiesen. Zur Ausrichtung ihres photosynthetischen Apparats (Chlorophyll) auf die für ihn optimalen Lichtverhältnisse haben sie ein Photorezeptorsystem (Phytochrom) entwickelt, mit dem die Ermittlung von Intensität, Qualität sowie Richtung des vorhandenen Sonnenlichts ermöglicht wird[3-6]. Einzellige Grünalgen und Bakterien sind im Gegensatz zu den standortfesten Pflanzen in der Lage, sich in Kopplung mit motorischen Systemen (Flagellen) in Richtung günstiger Lichtverhältnisse zu bewegen (Phototaxis). Bei Tieren reduziert sich die Ausnutzung des Lichts auf den photosensorischen Bereich, der Informationsgehalt des Lichts wird für die Ortung, die Wahrnehmung der Gestalt und teilweise auch der Farbe von Objekten verwendet; dieses ist u. a. notwendig für die Suche von Nahrung oder der Flucht vor Feinden.[1]

Die Detektion optimaler Lichtverhältnisse beinhaltet aber auch die Vermeidung von schädigenden kurzen Wellenlängen oder zu hoher Intensitäten. Zu diesem Zweck verwenden Organismen sensorische Systeme, die die Detektion ensprechender Lichtbedingungen und ein Ausweichen ermöglichen (photophobes Verhalten). Alternativ wird schädigende Strahlung mit Hilfe von absorbierenden Substanzen (z. B. Carotinoiden) herausgefiltert. Darüber hinaus existieren Systeme, die eine Reparatur geschädigter Bestandteile des Organismus vornehmen können (z. B. die Photolyase).[1]

Die molekulare Grundlage für die Wechselwirkung der Organismen mit dem Licht wird durch Chromoproteine gebildet. Diese setzen sich aus zwei Bestandteilen zusammen: Zum einen aus der Proteinkomponente und zum anderen aus dem Chromophor, einer niedermolekularen Einheit. Die Kombination der beiden Verbindungen ist notwendig, weil die Peptidketten des Proteins alleine für sich keine relevante Lichtabsorption aufweisen. Diese Eigenschaft besitzt hingegen der Chromophor, so daß mit der Einbindung der "farbgebenden" Substanz in das Apoprotein ein photosensitives Molekül entsteht. Darüber hinaus gelingt es dem Protein über die spezifische Einwirkungen von Aminosäuren auf den Chromophor, dessen photochemische Eigenschaften zu modifizieren. Somit wird es möglich, daß die Chromoproteine über den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts mit diesem in Wechselwirkung treten können.[1]

Unter den Chromoproteinen findet sich eine Reihe von Strukturen, deren Gemeinsamkeit darin besteht, daß sie als Chromophor Retinal (Vitamin-A - Aldehyd) verwenden. Dazu gehören die Sehpigmente der höheren Tiere (Rhodopsin), die phototaktischen Pigmente niederer Lebewesen und das Purpurpigment Bacteriorhodopsin. Erstaunlich ist, daß diese Verbindungen trotz einer zusätzlich vorhandenen Übereinstimmung in der Proteinstruktur sowohl mit photosynthetischen als auch photosensorischen Aufgaben betraut sind.

1.1 Bacteriorhodopsin

Bacteriorhodopsin ist in der cytoplasmatischen Membran von Halobakterien (*Halobacterium salinarum*) lokalisiert. Halobakterien finden sich in ökologischen Nischen mit Extrembedingungen wie hohen Temperaturen und großen Salzkonzentrationen, so z. B. in den Salzseen von Utah oder dem Toten Meer. Optimale Wachstumsbedingungen liegen bei einer 3.5 bis 5 M Natriumchloridkonzentration. Sie sind sehr widerstandsfähig und sogar in der Lage, in reinem Salz zu überleben. In der Landschaft verursachen sie häufig eine auffällige Rot- bis Violettfärbung, die durch ihren hohen Gehalt von Carotinoiden hervorgerufen wird. Die Halobakterien sind stäbchenförmig mit einem Durchmesser von ca. 0.5 µm und einer Länge von 4 bis 10 µm. Einige Stämme besitzen Flagellen und sind damit beweglich[7]. Sie haben sich in der Evolution früh vom gemeinsamen Stammbaum der übrigen Bakterien (*Eukarya* und *Bacteria*) gelöst und zu einem eigenen Zweig entwickelt (*Archaea*)[8]. Unter aeroben Bedingungen verwenden sie Sauerstoff in der Atmung und der dabei erzeugte Protonengradient treibt die ATPase zur Synthese von ATP

an. Der Lebensraum der *Haloarchaea* ist infolge der großen Salzkonzentration und der hohen Temperatur allerdings durch Sauerstoffmangel geprägt. Wird die Energiegewinnung durch aerobe Bedingungen nicht mehr möglich, so schalten sie zu einem alternativen Weg der Photosynthese um. Es kommt zu einer verstärkten Produktion und Einlagerung des Proteins Bacteriorhodopsin in die cytoplasmatische Membran[7,9]. Unter Einwirkung von Licht fungiert Bacteriorhodopsin als Protonenpumpe, die Protonen von der cytosolischen Seite durch die Membran hindurch nach außen pumpt. In Folge entsteht zwischen dem Zellinneren und der Umgebung des Organismus ein Protonengradient, der vergleichbar mit dem durch die aerobe Reaktion aufgebaute, von der ATPase verwendet werden kann[2,8]. Somit wird Lichtenergie in chemische Energie umgesetzt[2]. Mit der Entdeckung dieses Prozesses[10] ist die hergebrachte Beschreibung der Photosynthese, dem Aufbau von Zuckern aus Kohlendioxid und Wasser mit Hilfe von Lichtenergie, zu erweitern und als ein Prozeß zu betrachten, bei dem der Zelle das Wachstum mit Licht als einziger Energiequelle möglich ist[8].

Die Membran der *Haloarchaea* enthält ebenfalls das Protein Halorhodopsin. Dieses transportiert zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts mit der Umgebung unter Lichteinwirkung Chloridionen ins Zellinnere. Wie oben erwähnt, sind Stämme der Halobakterien mit Hilfe von Flagellen beweglich. Die Detektion der Lichtverhältnisse wird durch sensorische Rhodopsine vorgenommen, die ebenfalls in der Membran des Organismus lokalisiert sind. Alle diese Membranproteine besitzen eine große Übereinstimmung in der Struktur und verwenden Retinal als Chromophor.[8,11-13]

1.1.1 Die Struktur von Bacteriorhodopsin

Die Primärsequenz von Bacteriorhodopsin (BR) wurde von *Khorana et al.*[14] und *Ovchinnikov et al.*[15] bestimmt. So ist Bacteriorhodopsin aus einer Peptidkette von 248 Aminosäuren aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 26 kD. Der Chromophor ist in Form einer protonierten Schiff-Base an das Lysin-216 gebunden.

In der Arbeitsgruppe von *Henderson et al.* gelang es 1990 erstmals mit Hilfe von kryomikroskopischer Untersuchungen, die Struktur von Bacteriorhodopsin in einer Auflösung von 3.5 Å zu erhalten[16]. In den letzten Jahren sind weitere Kristallstrukturen von Bacteriorhodopsin mit verbesserten Auflösungen bestimmt worden[17-22] (Ein Vergleich der verschiedenen Ergebnisse hat *Subramaniam*[23] vorgenommen). Wie anhand der Abb. 1-1A zu ersehen ist, bildet die Peptidkette des Proteins sieben α-Helices aus, die sich durch die

Phospholipiddoppelschicht der Membran ziehen. Das C-terminale Ende der Kette liegt dabei auf der cytosolischen und das N-terminale auf der extrazellulären Seite.

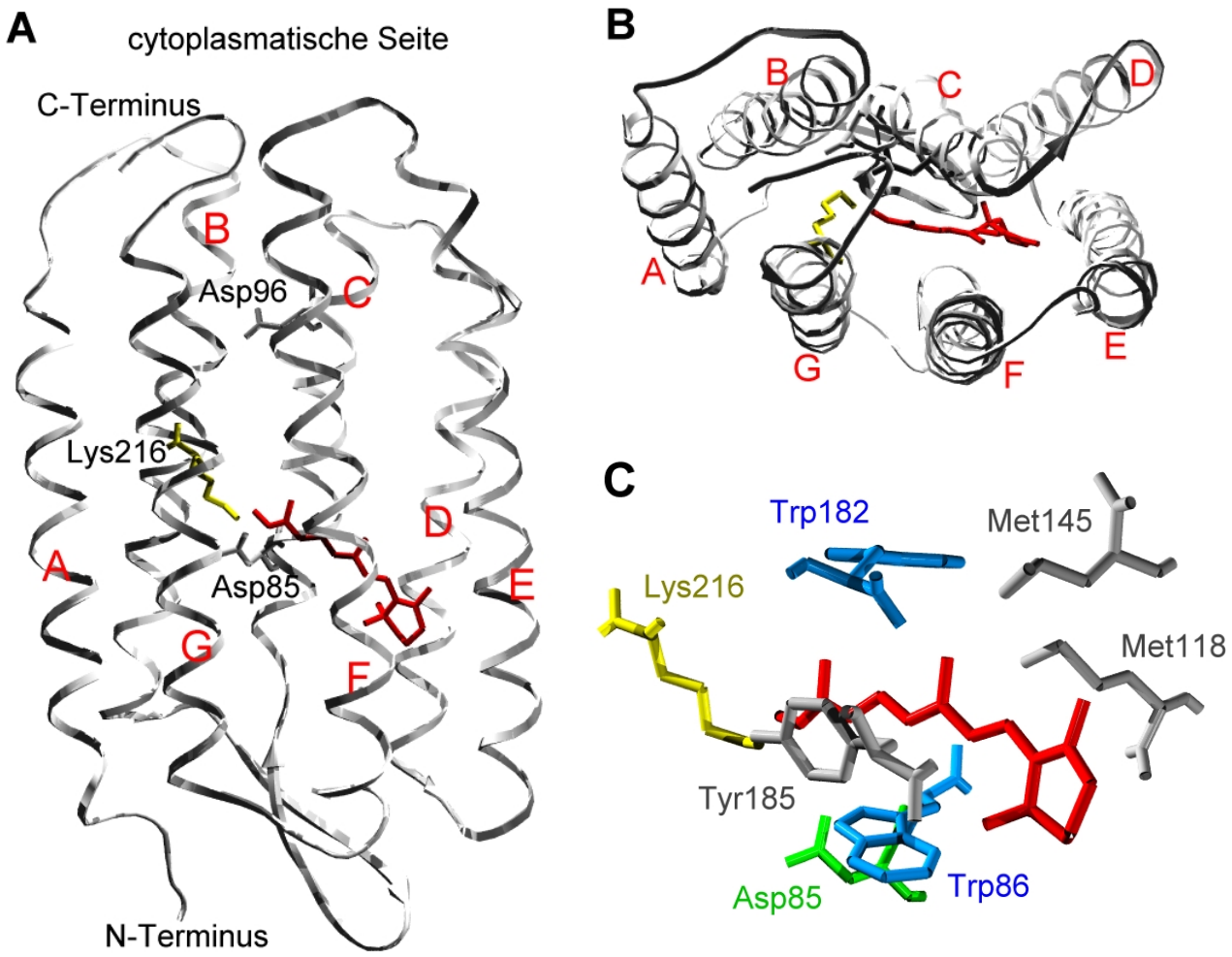

Abb. 1-1 Die Struktur von Bacteriorhodopsin: Sicht parallel zur Membran (A), der Kanal mit Blick von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite (B) und der Chromophor mit ausgewählten Aminosäuren der Bindungstasche (C). Die Helices werden mit A beginnend am N- hin zum C-terminalen Ende der Peptidkette mit Buchstaben bezeichnet. Die Darstellung basiert auf den Strukturdaten der Untereinheit A der Röntgenstrukturanalyse von *Essen et al.*[19] (Auflösung 2.9 Å, PDB-Eintrag 1brr).

Der Chromophor befindet sich nahezu in der Mitte des Proteins mit einem Winkel von ca. 20° zur Fläche der Membran und ist von sechs der sieben Helices umgeben; die Helix A liegt etwas außerhalb des Verbandes. Die Aminosäure Lys216, welche das Retinal kovalent an das Protein bindet, ist Teil der Helix G. Durch die Anordnung der Helices bildet sich ein Kanal, der durch die Anwesenheit des Retinals in eine extrazelluläre und eine cytoplasmatische Hälfte unterteilt wird (Abb. 1-1B)[24]. Als Gegenion der protonierten Schiff-Base fungiert eine komplexe negative Ladung, wobei eine wesentliche Rolle durch das deprotonierte Asp85 übernommen wird. Der Abstand von ca. 4 Å zwischen der Base und

dieser Aminosäure ist für eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu groß und somit nur über Wassermoleküle und unter Mitwirkung weiterer Aminosäuren denkbar, die sich in der Nähe befinden[25]. Darüber hinaus sind in den Röntgenstrukturen des Proteins weitere Wassermoleküle im Kanal vorzufinden, die zusammen mit den dort vorhandenen Aminosäuren ein ganzes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

Im Protein liegen nahezu 20 Aminosäuren im van der Waals Abstand zum Retinal[18], so daß dieses durch eine Bindungstasche in seiner Position gehalten wird[26] (Abb. 1-1C). Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren und dem Chromophor wird dessen Absorptionsverhalten deutlich beeinflußt. Eine Lösung von all-*E*-Retinal in Ethanol zeigt ein Absorptionsmaximum von 382 nm. Im Gegensatz dazu liegt das Maximum des Chromoproteins mit der gleichen Konfiguration des Retinals (Abb. 1-2) bei 568 nm. Eine der Schiff-Base vergleichbare Verbindung des Retinals, ein protoniertes Imin mit n-Butylamin, besitzt in methanolischer Lösung ein Absorptionsmaximum von 440 nm. Die im Vergleich zu diesem Wert bei den Pigmenten vorhandene bathochrome Verschiebung der Absorption wird als Opsin-shift bezeichnet[27]. Als Ursache für den Shift werden drei Punkte in Betracht gezogen, die in unterschiedlicher Ausprägung einen Beitrag leisten: Erstens die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der protonierten Schiff-Base und dem Gegenion, zweitens die 6*s-trans*-Konfiguration des Retinals in der Bindungstasche im Gegensatz zu der 6s-*cis*-Geometrie in Lösung und als dritter Punkt die Anwesenheit einer Proteingruppe, die als Dipol auf den Cyclohexenring einwirkt[26].

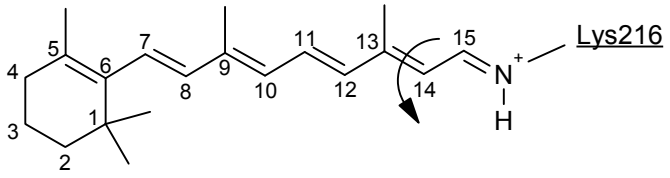

Abb. 1-2 Der Chromophor von Bacteriorhodopsin in der 6s-*trans*,15-*anti*,all-*E*-Konfiguration. Der Pfeil symbolisiert den Übergang zur 13*Z*-Geometrie (ebenfalls 15-*anti*).

1.1.2 Der Photocyclus

Bacteriorhodopsin wird durch eine Belichtung in den sogenannten lichtadaptierten Zustand (LA) überführt. Verbleibt das Protein im weiteren unter Ausschluß von Licht, so stellt sich thermodynamisch kontrolliert mit einer Halbwertszeit von ca. 80 min der dunkeladaptierte Zustand (DA) ein. Der Unterschied zwischen diesen beiden Zuständen besteht in der Isomerenverteilung des Chromophors in der Bindungstasche. Im Falle des dunkeladaptierten Proteins liegt das Retinal mit einem ungefähr gleichen Anteil des 13*Z*-

und all-*E*-Isomers vor. Mit der Belichtung nimmt der *Z*-Anteil ab und über 90 % der Verbindung liegen in der all-*E*-Form vor; das Absorptionsmaximum des Chromoproteins verschiebt sich dabei von ca. 560 (DA) zu 568 nm (LA)[28-34].

Der lichtadaptierte Zustand des Bacteriorhodopsins ist der Ausgangspunkt des Prozesses, mit dem das Protein seine Funktion als Protonenpumpe ausübt: Die Absorption eines Photons durch den Chromophor führt zu dessen Isomerisierung von der all-*E*- in die 13*Z*-Konfiguration. Nach dieser photochemischen Reaktion tritt eine thermodynamisch kontrollierte Abfolge von Intermediaten auf, bei der ein Proton aus dem Zellinneren nach außen transportiert wird. Im weiteren Verlauf reisomerisiert der Chromophor wieder in die all-*E*-Form und das Chromoprotein gelangt in seine Ausgangsform zurück, so daß eine erneute Reaktion stattfinden kann.

In den jeweiligen Schritten des Photocyclus finden unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Retinal und der Bindungstasche statt und die einzelnen Intermediate zeigen verschiedene Absorptionseigenschaften. Somit kann der Verlauf des Cyclus mittels UV/Vis-Spektroskopie beobachtet werden. Eine Messung der veränderten Wechselwirkungen ist ebenfalls mit Hilfe der IR- und Raman-Spektroskopie möglich. Der so eruierte molekulare Ablauf des Photocyclus und des Protonentransports ist in Teilen aufgeklärt, einige Punkte werden noch kontrovers diskutiert und bedürfen weiterer Untersuchungen. (Die entsprechenden Punkte werden in Übersichtsartikeln von *Mathies*[26], *Lanyi*[35-39] sowie *Oesterhelt*[8,24,25] behandelt. Eine Abhandlung über die historische Entwicklung des Photocyclus wurde kürzlich von Stoeckenius publiziert[40]. Röntgenstrukturen einzelner Intermediate des Photocyclus konnten inzwischen auch erhalten werden[37,41-43])

Ein Schema des Photocyclus, welches mit den verschiedensten experimentellen Daten am besten in Einklang zu bringen ist, stellt die Abb. 1-3 dar. Es beinhaltet sowohl irreversible Schritte als auch Gleichgewichtsreaktionen zwischen den Intermediaten[9]. Neben den aufgeführten sieben Zwischenstufen wird noch die Existenz weiterer Intermediate diskutiert[38].

$$BR \xrightarrow{h} (J) \rightarrow K \leftrightarrow L \leftrightarrow M_1 \rightarrow M_2 \leftrightarrow N \leftrightarrow O \rightarrow BR$$

Abb. 1-3 Allgemeines Schema des Photocyclus von Bacteriorhodopsin[9]. Die Intermediate werden in der Reihenfolge ihres Erscheinens mit Buchstaben gekennzeichnet. Das J-Intermediat steht in Klammern, da ungeklärt ist, ob es sich um ein Zwischenprodukt handelt oder nur um einen angeregten Zustand[25].

Eine vereinfachte Darstellung der gewonnenen Erkenntnisse ist in Abb. 1-4 wiedergegeben: Nach der photochemischen Reaktion liegt das Chromoprotein mit einer gespannten Konformation des Retinals als K-Intermediat vor. Dieses zeichnet sich durch eine zum Grundzustand deutlich bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums aus. Als Ursache für diese Verschiebung wird einerseits die verdrillte Konformation der Polyenkette und andererseits deren deutlich erhöhte Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Bindungstasche betrachtet. Im folgenden Schritt relaxiert die gespannte Geometrie und es entsteht das L-Intermediat, welches mit einem Absorptionsmaximum von 550 nm nur eine leichte Verschiebung zur Absorption des Ausgangszustands zeigt. Die Positionsveränderung der Schiff-Base im L-Zustand führt zu einer Unterbrechung des Netzwerkes aus Wasserstoffbrückenbindungen, so daß die getrennten Ladungen von Schiff-Base und Gegenion destabilisiert werden. Als Folge sinkt der pK_a-Wert der Schiff-Base, der entsprechende Wert von Asp85 steigt an und es liegt ein Protonierungsgleichgewicht zwischen diesen beiden Positionen vor. Dieser Zustand kann als eine Mischung aus L- und M_1-Zustand betrachtet werden, wobei die protonierte Schiff-Base (das L-Intermediat) dominiert.

Die Protonierung von Asp85 durch das Proton der Imin-Bindung ist mit der Abgabe eines Protons zur extrazellulären Seite des Chromoproteins verbunden; der Ursprung dieses Protons ist noch nicht genau geklärt. Möglich ist die Beteiligung der Aminosäuren Arg82, Glu204, Glu194 sowie von Wassermolekülen des Kanals.

Die Deprotonierung der Schiff-Base markiert den irreversiblen Übergang vom M_1- zum M_2-Intermediat, womit eine deutliche und gut detektierbare Blauverschiebung der Absorption verbunden ist (λ_{max} = 412 nm). Der genaue Ablauf der Reaktion ist noch strittig. Bei den ersten Studien des Photocyclus ist nur die Existenz eines M-Intermediats angenommen worden. Allerdings sind an diesem Punkt des Prozesses zwei Ereignisse notwendig, so daß vom Auftreten mindestens zweier Zustände ausgegangen werden muß: Auf der einen Seite eine Änderung in der Ausrichtung der Schiff-Base von der extrazellulären zur cytoplasmatischen Seite, dem sogenannten *switch*[24]. Nach diesem Schritt ist die Schiff-Base nicht mehr in der Lage, das Proton von Asp85 wieder zu übernehmen. Auf der anderen Seite muß zur notwendigen Reprotonierung der Schiff-Base durch das Asp96 eine Verringerung des pK_a-Werts dieser Aminosäure zum Zeitpunkt des M-Zustands erfolgen. Um dieses zu ermöglichen, wird davon ausgegangen, daß im cytoplasmatischen Teil des Chromoproteins eine deutliche Konformationsänderung erfolgt,

die dann die Erniedrigung des pK_a-Werts und die Etablierung eines Netzwerks zur Übertragung des Protons auf die Schiff-Base bewirkt. Das Netzwerk ist notwendig, da das Proton eine Distanz von ca. 9 Å überwinden muß.[24,36]

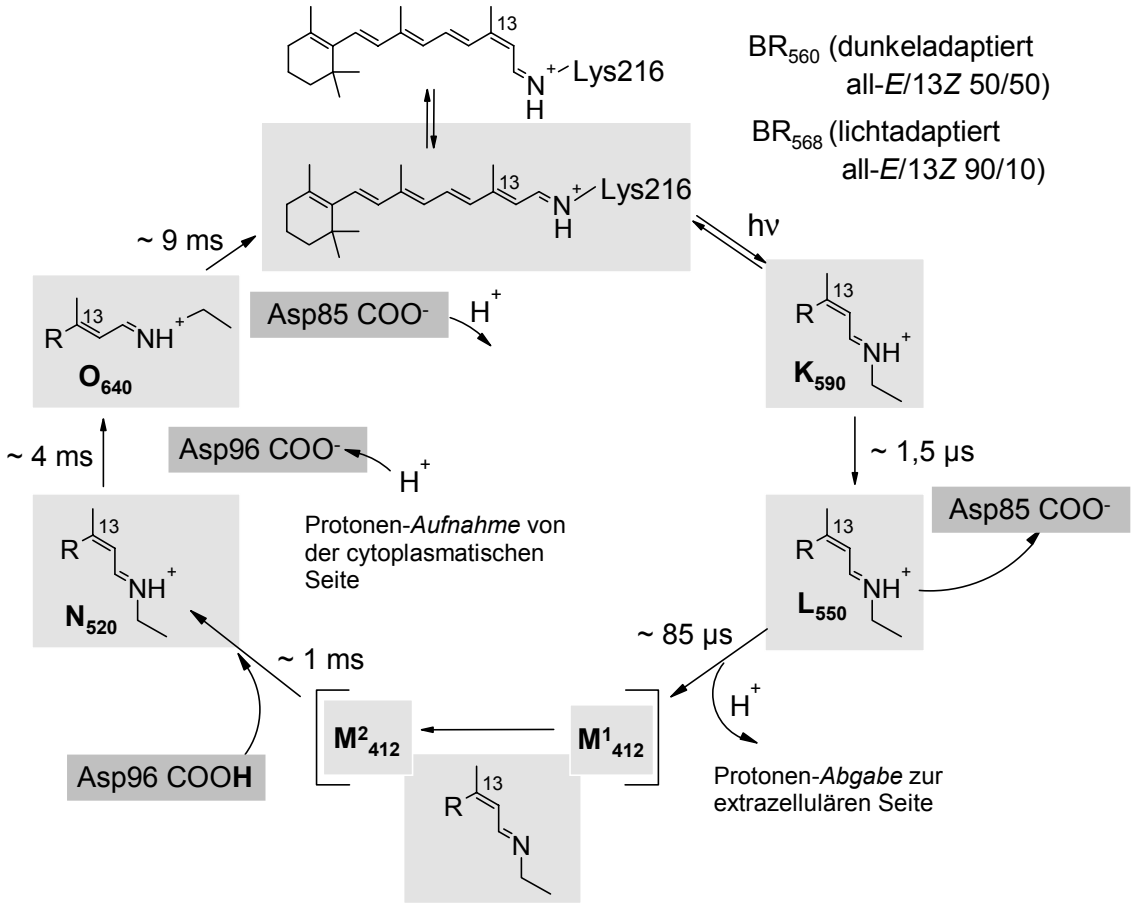

Abb. 1-4 Der Photocyclus von Bacteriorhodopsin. Die Bezeichnung der Intermediate erfolgt historisch begründet mit Buchstaben und die Absorptionsmaxima werden als Indices angehängt. Der Buchstabe R symbolisiert den nicht dargestellten Teil des Chromophors, die am Stickstoff befindlichen Bindungen deuten die Anbindung zum Protein über die Kohlenstoffkette der Aminosäure Lysin an. Die Klammer um die M-Intermediate weist auf den noch nicht geklärten Verlauf an dieser Stelle des Cyclus hin.

Der Transfer des Protons von Asp96 zur Schiff-Base stellt den Übergang vom M_2- zum N-Intermediat dar, wobei eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu größerer Wellenlänge stattfindet. Die Protonierung der Schiff-Base ermöglicht die Reisomerisierung des Chromophors in die all-*E*-Konfiguration und den Schritt vom N- zum O-Zustand. Damit verbunden ist der Anstieg des pK_a-Werts von Asp96, womit dessen Reprotonierung von der cytoplasmatischen Seite erfolgen kann. Die Wiederherstellung des Ausgangszustands nach dem O-Intermediat gelingt durch die Deprotonierung des Asp85, der Errichtung des ursprünglichen Netzwerks von Wasserstoffbrücken und der entsprechenden Konformationsänderung des Proteins.

Die Geschwindigkeiten der Reaktionen nehmen mit Fortschreiten des photoinduzierten Prozesses ab. Dieser Verlauf kann durch die unterschiedlichen Geometrieänderungen erklärt werden, die an den verschiedenen Stellen des Photocyclus vonstatten gehen. Zu Beginn des Photocyclus finden Änderungen in der Konformation des Chromophors statt, die schneller verlaufen können als die Konformationsänderungen des Proteins, die vor allem zum Ende des Photocyclus von Bedeutung sind.

Die Gesamtdauer des Photocyclus beträgt beim nativen Protein ca. 10 ms und ermöglicht somit den Transport von über 50 Protonen pro Sekunde. Das Bacteriorhodopsin kann diesen Cyclus bis zur Denaturierung mehr als eine Million mal durchschreiten und stellt damit ein erstaunlich effizientes System zur Energiegewinnung dar.

1.2 Rhodopsin

Die Augen der höheren Tiere bilden die Umwelt auf dem Hintergrund des Auges ab (Abb. 1-5), dort ist das Auge mit der Netzhaut, der Retina, ausgekleidet. Die Netzhaut besitzt eine Dicke von ca. 200 µm und enthält die Sehzellen (Photorezeptoren), die Stäbchen und Zapfen sowie die nachgeschalteten Nervenzellen[44]. Gelangen Photonen auf die Retina, so wird dieser Lichtreiz mit Hilfe der Photorezeptoren in ein elektrisches Signal umgewandelt und kann somit über die Nerven zum optischen Zentrum des Gehirns weitergeleitet und dort kognitiv verarbeitet werden. Während die Stäbchen nur das Hell-/Dunkelsehen ermöglichen, haben die Zapfen die Aufgabe der Farbunterscheidung. Für ihre Funktion benötigen die Zapfen allerdings eine höhere Lichtintensität als die Stäbchen und infolgedessen können unterhalb einer bestimmten Lichtmenge keine Farben mehr unterschieden werden[45] ("Nachts sind alle Katzen grau"). Die Stäbchen hingegen sind sehr empfindlich, so daß nur wenige Photonen detektiert werden können[46]. Das Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen ist bei verschiedenen Spezies unterschiedlich. Die menschliche Retina enthält beispielsweise zwanzig mal mehr Stäbchen als Zapfen, während Rinder nahezu ausschließlich nur Stäbchen besitzen und somit als farbenblind anzusehen sind[47]. Die Stäbchen setzen sich aus einem inneren und äußeren Segment zusammen. Das Innensegment beinhaltet den Zellkern und weitere Zellbestandteile wie die Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum. Dagegen besteht das äußere Segment der Stäbchen aus ca. 1000 Membranscheiben, die wie Münzen in einer Geldrolle übereinandergestapelt sind und durch Einstülpungen der Plasmamembran entstehen. In

jeder Scheibe ist Rhodopsin in einer hohen Konzentration in die Lipiddoppelschicht eingelagert (ca. 3.5 mM[48]).

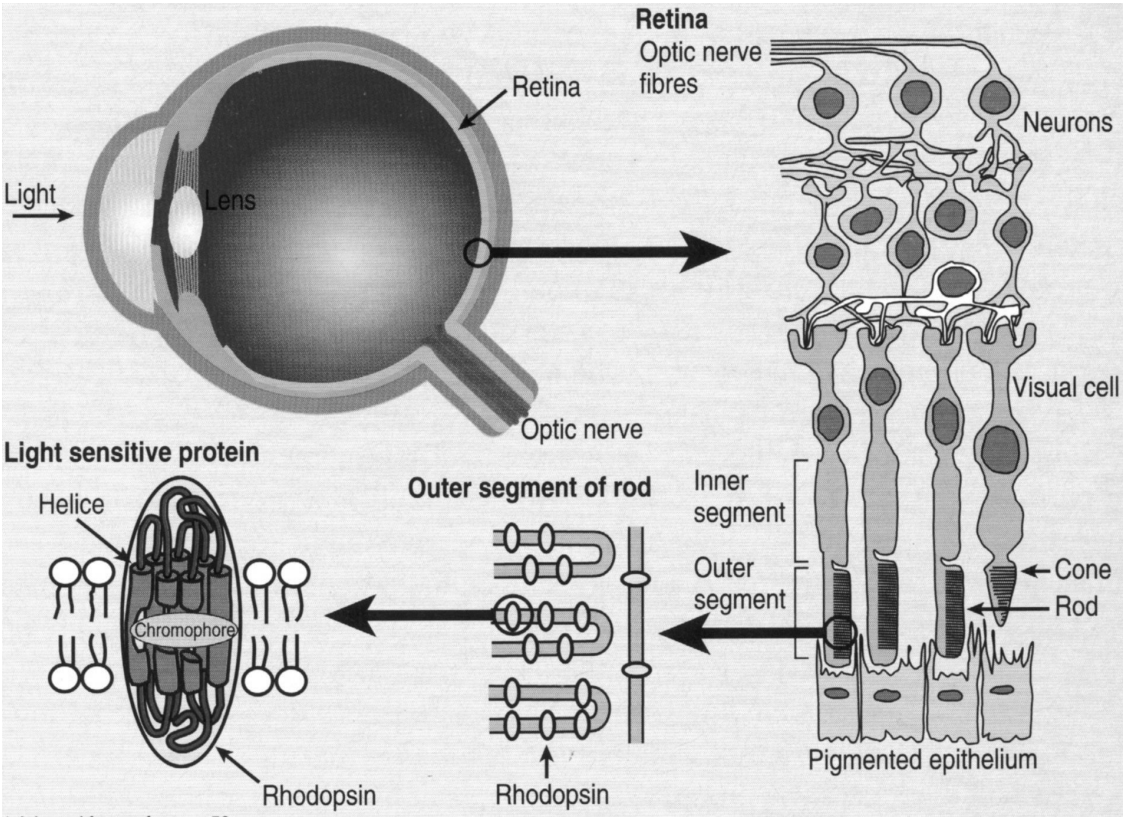

Abb. 1-5 Schematische Darstellung des Auges, des Aufbaus der Netzhaut aus Zapfen (Cones) und Stäbchen (Rods) sowie der Struktur von Rhodopsin (Abbildung nach *Kandori*[49])

1.2.1 Die Struktur von Rhodopsin

Wald entdeckte 1933, daß die Retina von Säugetieren Vitamin-A enthält[50]. *Hubbard* und *Wald*[51] wiesen nach, daß die aktive Konfiguration des Retinals in Rhodopsin die des 11*Z* -Isomers ist, welche bei Belichtung in die all-*E*-Konfiguration übergeht (Abb. 1-6). Die Anbindung des Chromophors an das Protein erwies sich als kovalent, in Form einer protonierten Schiff-Base mit einem Lysin-Rest[52].

Die Primärsequenz des Rinderopsins wurde später von *Hargrave et al.*[53] und *Ovchinnikov et al.*[54] bestimmt. Demnach besteht das Protein aus 348 Aminosäuren mit einer Gesamtmasse von ca. 40 kD und das Lysin für die Anbindung des Retinals befindet sich an Position 296.

Aufgrund der schlechten Kristallisierbarkeit von Membranproteinen wurde eine Kristallstruktur des Rhodopsins, allerdings mit schlechter Auflösung, erst 1995 von *Unger*

et al. publiziert[55]. In jüngster Zeit gelang es *Palczewski et al.*[56], eine Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 2.8 Å zu erhalten, anhand der viele zuvor gewonnene Erkenntnisse bestätigt werden[57-63].

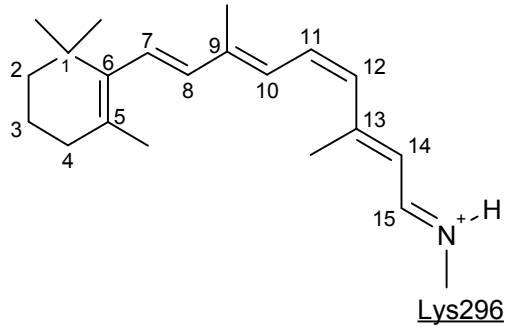

Abb. 1-6 Der Chromophor von Rhodopsin in der 6s-*cis*,11*Z*,12*s-trans*,15-*anti*-Konfiguration. Die Anbindung zum Protein ist durch Lys296 symbolisiert. Der Pfeil deutet den Übergang in die all-*E*-Geometrie an.

Wie in Abb. 1-7A zu ersehen, bildet die Peptidkette des Rhodopsins analog zu Bacteriorhodopsin sieben Helices aus, die sich senkrecht durch die Lipiddoppelschicht ziehen; eine achte Helix befindet sich außerhalb und parallel zur Membranoberfläche. Der N-terminale Teil des Proteins liegt innerhalb der Membranscheibe (intradiscal und nach der Definition extrazellulär). Der Chromophor befindet sich nahezu parallel zur Doppelschicht näher an der extrazellulären Seite und ist dabei von fünf Helices umgeben. Die Helices I und IV liegen etwas außerhalb des Verbandes, wobei sich zwischen der Helix IV und dem Chromophor die Helix III in einer deutlich gekippten Lage befindet (Abb. 1-7B). Das Retinal wird durch eine Bindungstasche von ca. 20 Aminosäuren in seiner Position gehalten (Abb. 1-7C). Das Trp265 befindet sich in Kontakt mit der 13-Methylgruppe und die Position der 9-Methylgruppe wird durch die Aminosäuren Thr118, Tyr268 und Ile189 bestimmt. Die Sauerstoffatome des Glu113, dem Gegenion der Schiff-Base, liegen 3.3 bzw. 3.5 Å von der Bindungsstelle entfernt. Eine direkte Wasserstoffbrücke über diese Distanz ist, wie auch im entsprechenden Fall bei Bacteriorhodopsin, nicht möglich. Die Gegenwart von Wassermolekülen ist aus der Röntgenstruktur nicht zu ersehen, wird aber nicht ausgeschlossen. Der Chromophor liegt innerhalb der Bindungstasche in der 6s-*cis*,11*Z*,12*s-trans*,15-anti-Konfiguration vor (s. Abb. 1-6). Interessant ist, daß das Retinal im Gegensatz zum bakteriellen Protein in der 6s-*cis*-Anordnung eingebunden ist und somit mit dieser Einfachbindung dieselbe Konformation einnimmt wie in Lösung.

Das Absorptionsmaximum des Rinderrhodopsins liegt bei 498 nm. Damit findet, wie bei Bacteriorhodopsin, durch die Aminosäuren der Bindungstasche eine Wechselwirkung mit dem Retinal statt, die zu einer bathochromen Verschiebung des Maximums führt; die geringere Größe des Opsin-shifts deutet dabei auf eine weniger ausgeprägte Interaktion

hin. Für die Verschiebung der Absorption werden bei Rhodopsin drei Aspekte verantwortlich gemacht: Erstens eine Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen der protonierten Schiff-Base und dem entsprechenden Bindungspartner, zweitens eine elektronische Wechselwirkung zwischen der Polyenkette des Chromophors und Aminosäuren mit geladenen oder polarisierenden Resten sowie drittens eine Planarisierung der Polyenkette durch die sterischen Gegebenheiten in der Bindungstasche[64].

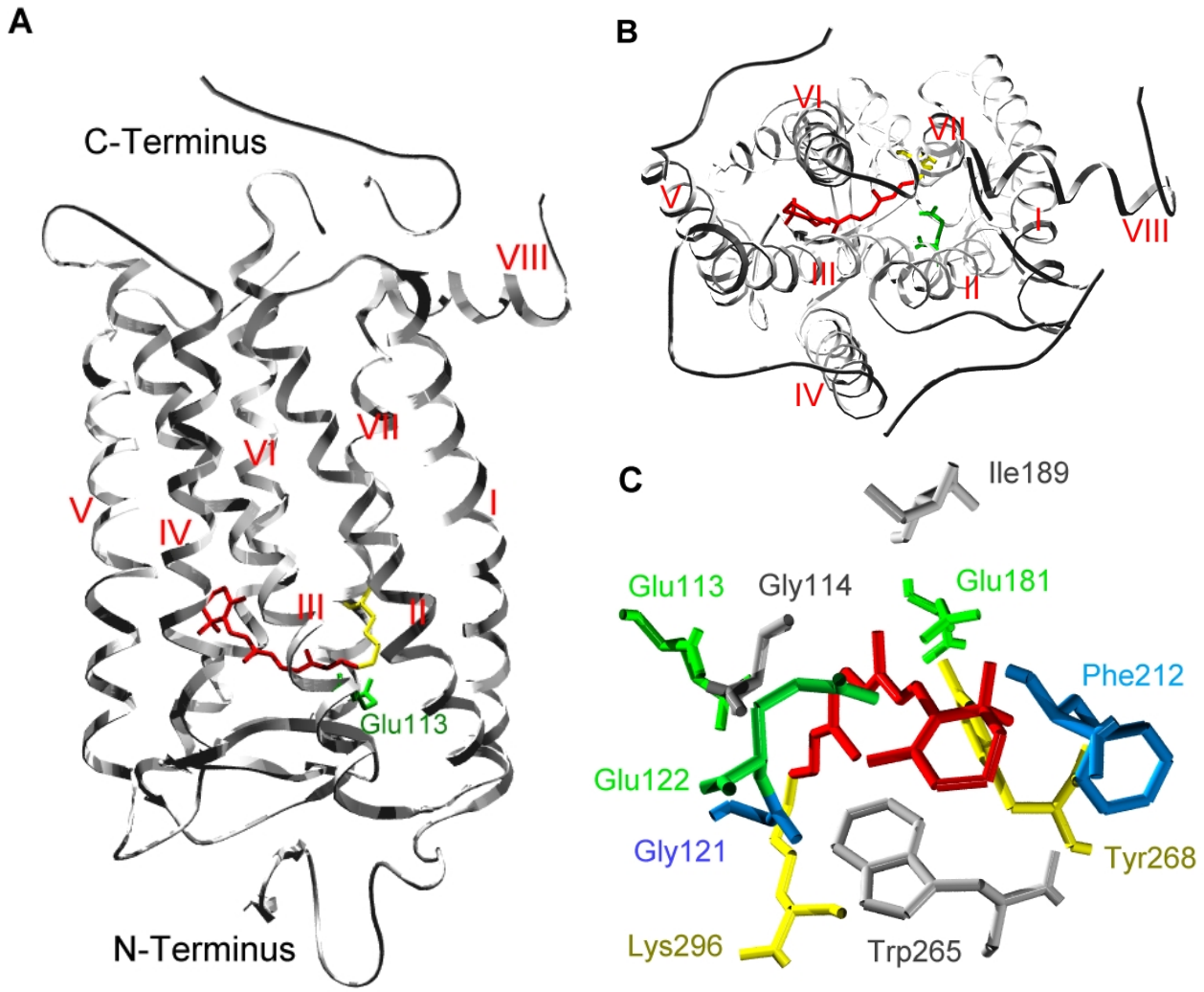

Abb. 1-7 Röntgenstruktur von Rhodopsin. Sicht auf die Helices parallel zur Lipiddoppelschicht (A), Blick von der cytoplasmatischen zur extrazellulären Seite (B) und Ansicht des Chromophors mit einem Teil der Aminosäuren, welche die Bindungstasche bilden (C). Zur Kennzeichnung der Helices werden römische Ziffern verwendet, wobei die erste nach dem N-Terminus gebildete Helix die Ziffer I trägt. Die abgebildete Struktur basiert auf den Daten der Kette A von *Palczewksi et al.*[56] (Auflösung 2.8 Å, PDB-Eintrag 1F88).

Eine wesentliche Rolle für den Opsin-shift spielt das bereits als Gegenion der Schiff-Base angesprochene Glu113. Der Austausch dieser Aminosäure gegen das analoge, aber ungeladene Glutamin bewirkt eine dramatische Verschiebung des Absorptionsmaximums

zu 380 nm[65]. Durch Substitution weiterer Aminosäuren der Bindungstasche entsteht ebenfalls eine Verschiebung der Absorption, das Ausmaß der vorgenannten Mutation wird aber nicht erreicht[48].

Bei den visuellen Systemen zeigt sich anhand der Verwendung des Opsin-shifts das effiziente Vorgehen der Natur in der Evolution: Die menschliche Retina enthält für die Farbunterscheidung drei verschiedene Zapfentypen, deren Rhodopsine eine große Homologie in ihren Primärsequenzen zeigen; so sind das rote und grüne Pigment des Menschen bis auf 15 Aminosäuren identisch. Trotzdem liegen die Absorptionsmaxima der Zapfen bei ca. 425, 530 und 560 nm und ermöglichen somit die Detektion des Lichts über einen breiten Wellenlängen- bzw. Farbbereich. Die Modifikation der Maxima wird nur durch die Variation der Bindungstasche vorgenommen. Der Ersatz von unpolaren Aminosäuren durch z. B. strukturell ähnliche, polare Gruppen führt zu einer Rotverschiebung der detektierbaren Wellenlänge[49,64].

1.2.2 Die Photoreaktion

Wie oben beschrieben, führt die Belichtung von Rhodopsin zu einer Isomerisierung des Chromophors von der 11*Z*- in die all-*E*-Geometrie. Analog zu Bacteriorhodopsin ist diese lichtinduzierte Konfigurationsänderung der Ausgangspunkt für eine Abfolge von weiteren, thermodynamisch kontrollierten Reaktionsschritten, in deren Folge das Protein seine Funktion ausübt. Der Prozeß führt hier zu einer Veränderung der Proteinstruktur, die von einem enzymatischen System in der Zelle erkannt und verstärkt wird. Es resultiert eine Erhöhung der Spannungsdifferenz zwischen dem Inneren der Sehzelle und dessen Umgebung, die eine veränderte Transmitterfreisetzung an der Synapse zu nachgeschalteten Zellen verursacht[44].

Der erste Schritt im Photocyclus zum Photo-Rhodopsin, die Isomerisierung des Chromophors, erfolgt mit einer erstaunlich hohen Geschwindigkeit und ist innerhalb von 200 fs abgeschlossen[66,67] (Abb. 1-8); die Quantenausbeute der Gesamtreaktion beträgt 0.67[68]. Im Vergleich dazu verläuft die Isomerisierung von 11*Z*-Retinal in n-Hexan nur mit einer Quantenausbeute von 0.20[69]. Dieser signifikante Unterschied ist auf die Geometrie des Retinals infolge des sterischen Zwangs der Bindungstasche zurückzuführen[70]. Das Photo-Rhodopsin besitzt analog zum K-Intermediat bei Bacteriorhodopsin zum Grundzustand eine deutlich bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums, somit sind wiederum stärkere sterische Wechselwirkungen des Retinals mit der Protein-

umgebung und eine stark gespannte Geometrie des Chromophors anzunehmen[71]. Der Übergang zum Bathoprodukt erfolgt innerhalb von Picosekunden und ist im Wesentlichen durch den Abbau der sterischen Spannung gekennzeichnet, wobei weiterhin eine zum Grundzustand rotverschobene Absorption des Intermediats vorliegt. Mit der Reaktion zum BSI-Rhodopsin, bei dem sich gemäß seines Namens - *blue shifted intermediate* - eine deutliche Blauverschiebung des Absorptionsmaximums einstellt, findet eine weitergehende Relaxation der prosthetischen Gruppe statt[71]. Das BSI-Rhodopsin blieb lange Zeit unerkannt und wurde erst über die Verwendung eines Retinalderivats als Chromophor entdeckt[72]. Eine Eigenschaft dieses Intermediats ist, daß es nicht bei tiefen Temperaturen abgefangen werden kann. Die thermodynamische Kontrolle der Reaktionen erlaubt es, den Photocyclus bei tiefen Temperaturen zu initiieren und mit schrittweiser Erhöhung der Temperatur nur Teilschritte des Cyclus zuzulassen, so daß einzelne Intermediate abgefangen werden.[71]

Beim Übergang vom BSI-Intermediat zum Lumi-Rhodopsin dominieren Konformationsänderungen des Proteins. Die Vorgänge im nachfolgenden Reaktionsschritt zum Meta-I-Rhodopsin sind noch nicht vollständig geklärt, ebenso wie das abgebildete Reaktionsschema nur einen Vorschlag darstellt; es werden verschiedene Möglichkeiten mit Parallel- sowie Gleichgewichtsreaktionen in Betracht gezogen[71].

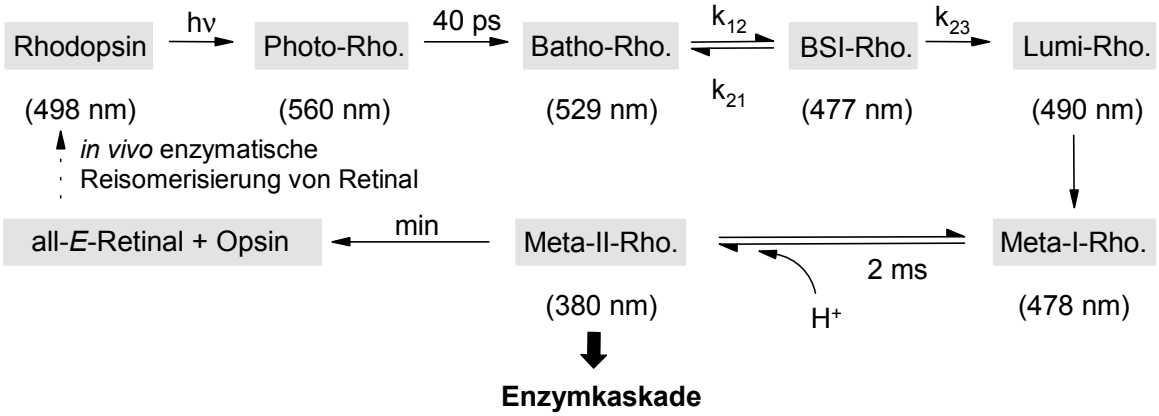

Abb. 1-8 Vereinfachter Photocyclus von Rhodopsin. Die Abkürzung Rho. symbolisiert Rhodopsin, die Wellenlängen in Klammern bezeichnen die Absorptionsmaxima der jeweiligen Intermediate.

Im nächsten Schritt der Reaktion (Umwandlung des Lumi-Rhodopsins) entsteht in einem Zeitbereich von Millisekunden ein Gleichgewicht zwischen dem Meta-I- und Meta-II-Rhodopsin. Ein deutlicher Hinweis auf diesen Übergang ist die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 478 nm beim Meta-I-Rhodopsin zu 380 nm beim Meta-II-Intermediat. Die Positionsveränderung des Chromophors führt zu einem Bruch der

Salzbrücke zwischen der Schiff-Base und deren Gegenion Glu113 und zu einer Verschiebung des Protons (Deprotonierung des Imins und im Gegenzug eine Protonierung des Glutamats). Zusätzlich wird ein Proton aus dem umgebenden Medium zur Protonierung des Glutamats an Position 134 aufgenommen, es kommt zum Bruch von Wasserstoffbrückenbindungen und zu einer Bewegung der transmembranen Helices, insbesondere der Helices I, II, III und IV. Im Meta-II-Zustand nimmt das Protein eine offenere Struktur ein und wird für das Eintreten von Wassermolekülen zugänglicher, so daß die Bindung zwischen Retinal und Protein hydrolysiert wird. Möglicherweise erfolgt der Bindungsbruch erst nach einem weiteren Reaktionsschritt über ein Meta-III-Intermediat. Auch Gleichgewichtsreaktionen zwischen verschiedenen Meta-II-Zuständen werden in Betracht gezogen und diskutiert.[71,73,74]

In vitro endet der Photoprozeß durch die Diffusion des Chromophors aus der Bindungstasche und es verbleiben Retinal in der all-*E*-Konfiguration und das Opsin; dieser Reaktionsschritt benötigt viele Sekunden bis Minuten. *In vivo* wird der Prozeß durch ein "Recycling" des Retinals zu einem Cyclus geschlossen. Die notwendige Reisomerisierung der Verbindung in die 11*Z*-Konfiguration erfolgt im Pigmentepithel, welches der Netzhaut unterlagert ist (siehe auch Abb. 1-5). Zusätzlich wird aktiver Chromophor durch die Biosynthese aus Vitamin-A bzw. dessen Ester zur Verfügung gestellt.[75-77]

1.2.3 Die Enzymkaskade[44,58,74,78]

Das Meta-II-Intermediat des Rhodopsins stellt die Konformation des Proteins dar, in der das infolge der Absorption eines Photons erhaltene Signal vom enzymatischen Verstärkersystem der Zelle erkannt und aufgenommen werden kann (Abb. 1-9); dabei ist die Deprotonierung der Schiff-Base eine für diese Wechselwirkung notwendige Reaktion.

Die Positionsänderung der Helices führt auch zu einer Konformationsänderung der verbindenden Peptidketten (Loops) auf der cytoplasmatischen Seite. Damit ist das Rhodopsin in der Lage, das Enzym Transducin zu aktivieren. Dieses besteht aus drei Untereinheiten (α, β und γ) und an die α-Untereinheit ist im inaktiven Zustand Guanosin-*di*phosphat (GDP) gebunden. Bei der Aktivierung durch das Rhodopsin wird das GDP durch GTP (Guanosin*tri*phosphat) ausgetauscht und der Tansducin-Komplex zerfällt in einen aktivierten T_{α}-GTP- (T*-) und einen $T_{\beta,\gamma}$-Teil. Das T* diffundiert entlang der Discmembran und aktiviert ein weiteres Enzym, die Phosphodiesterase (PDE), deren Quartärstruktur sich aus vier Untereinheiten zusammensetzt. Dabei werden die mit einer

katalytischen Aktivität versehenen Untereinheiten α und β von zwei inhibierenden γ-Einheiten getrennt und je eine γ-Untereinheit wird von einem T* übernommen. Der aktive Teil der PDE katalysiert die Hydrolyse von cyclischem GMP (cGMP) zu 5'-GMP. Das GMP ist für die Kontrolle der Ionenkanäle verantwortlich, die sich in der Membran des Außensegmentes befinden. Eine hohe cGMP-Konzentration hält diese Kanäle offen und es gelangen Na^+- und Ca^{2+}-Ionen in das Außensegment. Das Innensegment der Zelle besitzt aktive Pumpen, die im Gegensatz dazu positive Ionen aus der Zelle transportieren, so daß ein permanenter Ionenstrom vorhanden ist. Im Ruhezustand weist die Sehzelle ein negatives Potential zur äußeren Umgebung auf. Sinkt nun die cGMP-Konzentration durch die Anwesenheit der aktivierten PDE, so schließen sich die Kanäle im Außensegment, während die Pumpen im Innensegment weiterhin positive Ionen nach außen befördern. Die Verringerung der Anzahl positiver Ladungen im Außensegment läßt den Spannungswert weiter absinken (Hyperpolarisation), und die erhöhte Spannungsdifferenz veranlaßt die Ausschüttung eines Transmitters (Glutamat) zum nachgeschalteten Nervensystem (den bipolaren Zellen). Somit hat die Absorption eines Photons durch den Chromophor des Sehpigments Rhodopsin zu einem neuronalen Signal der Zelle geführt.

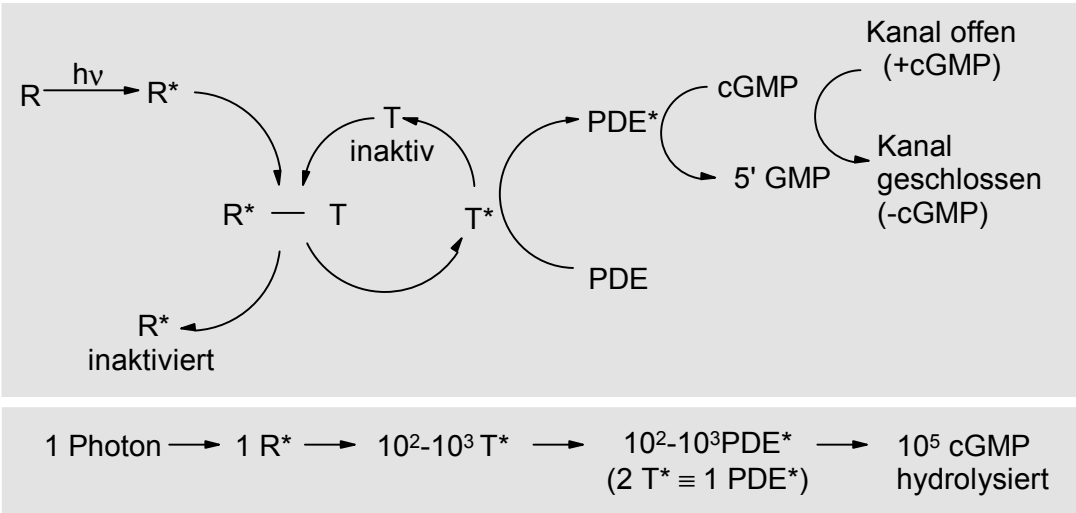

Abb. 1-9 Die von aktiviertem Rhodopsin initiierte Signalkaskade; Schema nach *Hargrave et al.*[58] (* = aktivierter Zustand, T = Transducin, PDE = Phosphodiesterase, GMP = Guanosinmonophosphat, cGMP = cyclisches GMP)

Erstaunlich ist das Ausmaß der Verstärkung des Signals in der Abfolge der Enzymreaktionen: Ein Molekül Rhodopsin im Meta-II-Zustand kann die Spaltung von bis zu 1000 Transducin-Moleküle initiieren. Zwei aktive Untereinheiten des Transducin entsprechen zwar nur jeweils einem PDE-Protein, aber dieses katalysiert selbst wiederum

die Hydrolyse hunderter cGMP-Moleküle. Aufgrund der lawinenartigen Abfolge von Reaktionen wird für diesen Prozeß auch die Bezeichnung Enzymkaskade verwendet.

Damit das Gesamtsystem für eine erneute Lichtdetektion zur Verfügung steht, müssen die jeweiligen Enzyme auch wieder deaktiviert werden: Das Protein Rhodopsinkinase konkurriert mit Transducin um die Anbindung an das aktivierte Rhodopsin, liegt aber im Vergleich zu diesem in einer geringeren Konzentration vor, so daß das Transducin vorwiegend aktiviert wird. Mit der Ankopplung der Kinase werden Serine am C-Terminus des Rhodopsins phosphoryliert, das somit deaktiviert wird. Die vollständige "Abschaltung" des Rhodopsins gelingt erst mit der Anbindung eines weiteren Proteins, des Arrestins.

Die α-Untereinheit des Transducin deaktiviert sich nach einer bestimmten Zeit selbst, indem das angebundene GTP durch eine endogene GTPase-Aktivität zu GDP gespalten wird. Damit kann sich die α-Untereinheit wiederum mit den beiden in der Aktivierung abgespaltenen β,γ-Untereinheiten verbinden. Weiterhin wird die durch Transducin gebundene γ-Untereinheit der PDE abgespalten und führt mit einer weiteren γ-Untereinheit zu einer Inaktivierung der α,β-Untereinheiten der PDE.

Die fortlaufende Produktion von cGMP durch das Protein Guanylylzyklase führt zu einem Konzentrationsanstieg des cGMP und der Öffnung der Ionenkanäle. Nach der teilweise bereits beschriebenen Regeneration des Rhodopsins befindet sich das Gesamtsystem wieder in seinem Ausgangszustand und ist für eine erneute Signaldetektion bereit.

Neben den genannten Punkten beinhaltet der Gesamtprozeß in der Sehzelle noch weitere Enzyme und Mechanismen für die Regeneration oder z. B. für die Adaption des Systems an verschiedene Lichtverhältnisse.

Aufgrund der Aktivierung des Transducins mittels GTP (und der Deaktivierung durch die Hydrolyse des GTP zu GDP) gehört das Enzym zu der großen Familie der GTP-bindenden oder G-Proteine. Alle G-Proteine bestehen wie Transducin aus 3 Untereinheiten, die mit α, β und γ bezeichnet werden und von denen jeweils eine unterschiedliche Anzahl verschiedener Arten existiert. Die α-Untereinheit des Transducins ist allerdings nur spezifisch in Sehzellen vorhanden.

Zusammenfassend hat der Chromophor Retinal im Rhodopsin mehrere Aufgaben: Zum einen stellt er die bereits erwähnte farbgebende Substanz des Proteins, den Chromophor, dar. Zum anderen sorgt er im Meta-II-Zustand des Rhodopsins infolge seiner Konstitution und all-*E*-Konfiguration als sterischer "Trigger" für die zur Aktivierung der Enzymkaskade

notwendigen Strukturveränderungen des Proteins. Zusätzlich führt die Einbindung des 11*Z*-Retinals zu einer Deaktivierung des Rhodopsins. Das Protein besitzt in Abwesenheit der prosthetischen Gruppe in einem geringem Maße die Fähigkeit zur Aktivierung der Enzymkaskade. Mit der Einbindung des Chromophors wird diese Fähigkeit unterbunden. Aus diesem Grund wird das all-*E*-Retinal als Agonist und 11*Z*-Retinal auch als inverser Agonist bezeichnet[57,79].

Führt man sich insgesamt vor Augen, daß die Retina eines menschlichen Auges ca. 100 Millionen Stäbchenzellen besitzt und jede dieser Zellen rund 50 Millionen Rhodopsinmoleküle enthält, von denen ein jedes ein starkes nachgeschaltetes Verstärkersystem in Gang setzen kann, so stellt sich ein erstaunlich effizientes Gesamtsystem zur visuellen Wahrnehmung der Umwelt dar. Einerseits macht dieses System das Sehen selbst unter so geringen Lichtverhältnissen wie einer sternklaren Nacht möglich. Andererseits besitzt das Auge auch eine Anpassungsfähigkeit an völlig umgekehrte Lichtverhältnisse wie z. B. auf einer von der Sonne bestrahlten Schneefläche, bei der die Lichtintensität milliardenfach höher ist als in der Nacht.