2 Ziele der Arbeit

Rhodopsin stellt aufgrund seiner Struktur und Funktionsweise ein Modell für eine Vielzahl ähnlicher Systeme dar. So können vom Verständnis der Sehpigmente, die, wie eingangs erwähnt, zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, weitreichende Schlüsse auf die Funktion anderer Rezeptoren gezogen werden[48,80]. G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermitteln die Einwirkung von so unterschiedlichen extrazellulären Signalen wie Licht, Geschmack und Geruch, peptidischen Hormonen und Neurotransmittern[2,80]. Diese Klasse von Rezeptoren ist dabei in Organismen identifiziert worden, die sich auf vollständig verschiedenen Stufen der Evolution befinden, z. B. bei Hefen oder dem Menschen. Nahezu alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren besitzen nachweisbare Übereinstimmungen in ihrer Primärsequenz und es wird postuliert, daß alle ein ähnliches topologisches Motiv besitzen[48,80,81]. Rhodopsin unterscheidet sich von übrigen G-Protein gekoppelten Rezeptoren nur insofern, daß der Ligand, welcher die Reaktion initiiert, bereits in Form des Retinals an das Protein gebunden ist. Die Verwendung von Rhodopsin zur Untersuchung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren besitzt den großen Vorteil, daß die Aktivierung dieses Systems instantan durch Licht erfolgen kann; im Gegensatz zu anderen Liganden-bindenden Rezeptoren, bei denen diffusive Prozesse den eigentlichen Vorgang der Rezeptoraktivierung überlagern können.[9]

Bacteriorhodopsin stellt aufgrund seiner vergleichbaren Struktur und auch dank seiner guten Verfügbarkeit ein Musterbeispiel für Membranproteine und insbesondere für biologische Protonentransportsysteme (aktive Pumpen) dar[12,39]. In gleicher Weise wie Rhodopsin zeichnet sich Bacteriorhodopsin dabei durch seine Photoaktivität aus. Obwohl Bacteriorhodopsin nicht zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört, lassen sich mit der Erforschung des bakteriellen Systems Vergleiche zu dieser Gruppe von Proteinen vornehmen[39].

Ein wesentlicher Gegenstand in der Erforschung der Sehpigmente und verwandter Chromoproteine wie dem Bacteriorhodopsin ist die Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und der "binding site" in den jeweiligen Proteinen. Die Studie der molekularen Aspekte wird dabei von zwei verschiedenen, sich einander ergänzenden Wegen aus beschritten: Zum einen hat sich mit der Entwicklung der Molekularbiologie die Möglichkeit zu gezielten Punktmutationen ergeben und zum anderen kann der native Chromophor

gegen synthetische, modifizierte retinalanaloge Verbindungen ausgetauscht werden. Damit ist einerseits die Proteinumgebung selbst und andererseits der Inhalt der Bindungstasche modifizierbar. Der Einfluß der Modifikationen zeigt sich in veränderten spektralen und spektroskopischen Eigenschaften der Pigmente und beeinflußt ebenfalls den zeitlichen Ablauf der Photocylcen. Damit ist es möglich, Rückschlüsse auf die Struktur und Funktionsweise der Proteine vorzunehmen.

2.1 Die Auswirkung von Substitutionsänderungen an der Position 9 des Chromophors

Bei früheren Untersuchungen der Pigmente Bacteriorhodopsin und Rhodopsin konnte festgestellt werden, daß die an Position 9 des Chromophors Retinal (**1**) vorhandene Methylgruppe einen wesentlichen Einfluß auf die Eigenschaft des jeweiligen Chromoproteins hat.

2.1.1 Stand der Forschung

Ein Fehlen dieser Methylgruppe (9-Demethylretinal, **2**) führt bei Bacteriorhodopsin im Vergleich zur nativen Verbindung bereits zu einer geringeren Geschwindigkeit der Inkorporation[31]. Das Absorptionsmaximum des analogen Chromoproteins weist zu Bacteriorhodopsin eine deutlich hypsochrome Lage auf (540 nm im Vergleich zu 558 nm, jeweils im dunkeladaptierten Zustand) und die prosthetische Gruppe nimmt in der Bindungstasche vermehrt die 13*Z*-Konfiguration ein[31]. Der Photoprozeß zeigt insbesondere ab dem Zeitpunkt ein abweichendes Verhalten, an dem die Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und dem Protein von Bedeutung sind. So ist die Entstehung des M-Intermediats signifikant verlangsamt[82] und der Übergang zum N-Intermediat, der im nativen System durch die Reprotonierung der Schiff-Base gekennzeichnet ist, zeigt ein kompliziertes Reaktionsschema[83,84]. Dieses Verhalten bedingt ebenfalls eine geringere Fähigkeit des analogen Chromoproteins, Protonen zu pumpen[31,85,86].

Bei Einsatz im Rhodopsin führt der verringerte sterische Anspruch an Position 9 der Polyenkette einerseits zu einer unvollständigen Rekonstitution[87,88] und andererseits ebenfalls zu einer ausgeprägten Verschiebung des Absorptionsmaximums von 498 nm im nativen Pigment zu 464 nm in der analogen Verbindung[87-94]. Die Quantenausbeute des Photoprozesses scheint deutlich kleiner zu sein[95] und der Cyclus wird analog zu Bacteriorhodopsin ab dem Zeitpunkt am deutlichsten verändert, an dem der Chromophor

im nativen System seinen Einfluß auf die Struktur des Proteins ausübt[88,93]: Das Gleichgewicht zwischen den beiden Meta-Zuständen liegt signifikant auf der Seite des Meta-I-Intermediats, so daß der Gesamtprozeß deutlich verlängert wird[96]. Die analoge Verbindung ist zwar ebenfalls in der Lage, als inverser Agonist zu fungieren, die Wirkung als Agonist ist allerdings im Vergleich zum nativen Rhodopsin um ca. 75 % reduziert[89,91,94,97].

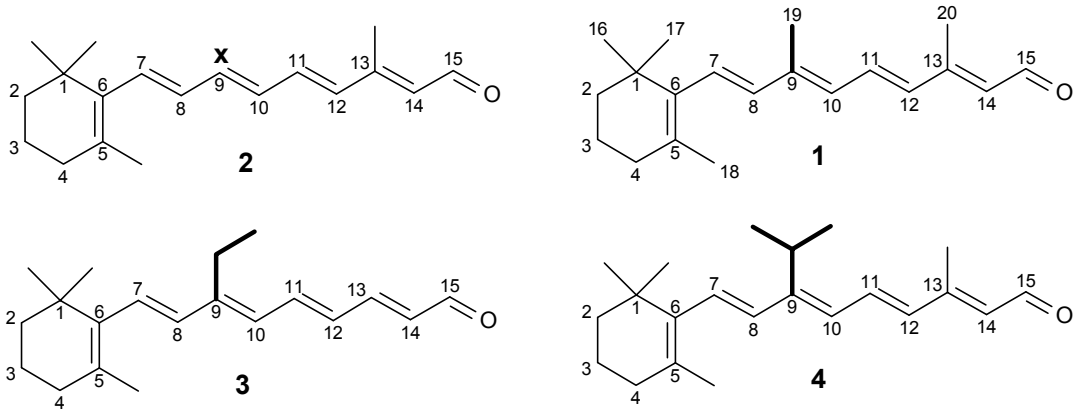


Abb. 2-1 Strukturen von Retinal (**1**) und der an Position 9 modifizierten Retinalderivate 9-Demethylretinal (**2**), 9-Ethylretinal (**3**) und 9-Isopropylretinal (**4**). Die relevanten Substituenten sind fett gezeichnet, die Substitution der Methylgruppe durch ein Proton ist durch "x" angedeutet.

Angesichts dieser starken Einflußnahme der 9-Methylgruppe des Retinals stellt sich die interessante Frage, welche Auswirkungen sich auf die Eigenschaften der Chromoproteine ergeben, wenn an gleicher Stelle der prosthetischen Gruppe im Vergleich zum nativen Chromophor **1** ein erhöhter sterischer Anspruch eingebracht wird. Eine homologe Reihe von Verbindungen, die eine Untersuchung dieses Aspekts ermöglicht, ist in Abb. 2-1 dargestellt[a]. Ausgehend von einem Proton an Position 9 (9-Demethylretinal, **2**) über die Methylgruppe beim nativen Chromophor steigt der sterische Anspruch mit einer zusätzlichen Methylengruppe bei 9-Ethylretinal (**3**) und zum 9-Isopropylretinal (**4**). Die Modifikationen sind dabei rein sterischer Natur, so daß eine Beeinflussung der Ergebnisse

[a] Die Bezifferung der Ringe und Polyenketten entspricht der Empfehlung der IUPAC-IUP Comission on Biochemical Nomenclature[123,229]. Demnach werden die Substituenten mit der Nummer des Kohlenstoffatoms bezeichnet, an das sie gebunden sind (z. B. 9-CH_3). Veränderungen gegenüber dem Substitutionsmuster von Retinal werden mit nor gekennzeichnet, so daß die Verbindung 9-Ethylretinal mit 19-nor-9-Ethylretinal bezeichnet werden müßte. Die verkürzten Bezeichnungen sind aber in der Literatur üblich und werden auch hier verwendet. Gleiches gilt für die Namen der Verbindungen, die entsprechend der WHO (World Health Organization) in Anlehnung an die Regeln der *Chemical Abstracts* zusammengestellt werden und hier im experimentellen Teil bzw. im Anhang (Substanzliste) aufgeführt sind.

durch elektronische Wechselwirkungen der Substituenten mit der Bindungstasche des jeweiligen Pigments ausgeschlossen sind.

Entsprechende Untersuchungen sind in der Literatur nur unvollständig vorzufinden. Im Zusammenhang mit Bacteriorhodopsin sind die Verbindungen 9-Ethylretinal (**3**) und 9-Isopropylretinal (**4**) nur einmal erwähnt[98]. Ziel dieser Studie von *Delaney et al.* war die Untersuchung der Reisomerisierung des Chromophors zum Ende des Photocyclus, vor allem hinsichtlich der Wechselwirkung zwischen der Aminosäure Lys93 der Bindungstasche und der 13-Methylgruppe des Chromophors. Die Mutation von Lys93 gegen ein Alanin bewirkt eine deutliche Verlangsamung der Isomerisierung, welche durch den Einsatz eines zwischen Position 11 und 13 überbrückten Retinalderivats wieder beschleunigt werden kann. Zur Untersuchung, inwiefern diese Beschleunigung auf einen vergrößerten sterischen Anspruch an Position 9 bei dem überbrückten Derivat zurückzuführen ist, haben die Autoren die beiden analogen Retinale **3** und **4** in die Mutante eingebaut und die entsprechenden Kinetiken gemessen; eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit konnte nicht festgestellt werden.

Weitere Studien mit diesen Substanzen in Bacteriorhodopsin sind nicht publiziert worden.

Die erste Rekonstitution von Rhodopsin mit 9-Ethylretinal (**3**) soll gemäß eines Übersichtsartikels[99] von *Kropf* vorgenommen worden sein. An entsprechender Stelle[92] findet sich allerdings kein Hinweis auf die Verbindung.

Ergebnisse aus der Untersuchung der Verbindung 9-Ethylretinal (**3**) als Chromophor in Rhodopsin finden sich bei *Han et al.*[100]. Es wird im Vergleich zum nativen System für die Enzymkaskade eine erhöhte Dunkelaktivität und nach der Belichtung eine auf 80 % reduzierte Funktion als Agonist registriert. Mit der zusätzlichen Methylgruppe verringert sich somit die deaktivierende Wirkung des Chromophors vor der Belichtung und führt anschließend zu einer Konformationsänderung, die für die Wechselwirkung mit dem Transducin weniger geeignet ist. In dieses Bild passen auch die an gleicher Stelle durchgeführten Versuche mit 9-n-Propylretinal, bei dem eine noch höhere Dunkel- und eine weiter verringerte Lichtaktivität beobachtet wird. Mutationen des Gly121 gegen größere Aminosäurereste lassen sich mit diesen Ergebnissen korrelieren, so daß auf eine direkte Wechselwirkung dieser Position mit der 9-Methylgruppe des Retinals geschlossen wurde.[79,101]

Studien von *Lewis et al.*[102], allerdings nicht mit dem 11*Z*-, sondern dem 9*Z*-Isomer[b] des 9-Ethylretinals (**3**), bezüglich des ersten Teils des Photocyclus zeigen eine Beeinflussung vor allem in den Gleichgewichten zwischen den Intermediaten Batho und BSI sowie dem Zerfall des Gleichgewichts in das Lumi-Intermediat.

Hinsichtlich der Verbindung 9-Isopropylretinal (**4**) wird in einem Übersichtsartikel von einer erfolgreichen Rekonstitution des Retinalderivats berichtet (Absorptionsmaximum 494 nm). Als Quelle werden unveröffentlichte Ergebnisse von *A. E. Asato*, *M. Denny* und *R. S. H. Liu* angegeben[103]. Darüber hinaus sind keine Untersuchungen mit dieser Verbindung in der Literatur vorzufinden.

2.1.2 Zielsetzung

Somit ergab sich das erste Ziel der vorliegenden Arbeit: Die Studie des Einflusses veränderten sterischen Anspruchs durch die Position 9 des Chromophors auf die Eigenschaften der Proteine Bacteriorhodopsin und Rhodopsin mit Hilfe der in Abb. 2-1 dargestellten Verbindungen **2**-**4**.

Der erste Teil der Arbeit bestand in der Synthese der Substanzen sowie der Isolierung der für die Inkorporation notwendigen Isomere, d. h., das all-*E*-Isomer für Bacteriorhodopsin und das 11*Z*-Isomer für Rhodopsin.

Ein weiterer Teil der Themenstellung war die Untersuchung der Substanzen hinsichtlich ihres Verhaltens bei der Inkorporation in die Proteine, der Licht-/Dunkeladaption bei Bacteriorhodopsin und der Photocyclen bei den jeweiligen Pigmenten. Zur Studie der vorgenommenen Modifikationen auf die Effektivität der Isomerisierung in Rhodopsin sollte darüber hinaus die Quantenausbeute der analogen Pigmente bestimmt werden. Ebenso war geplant, bei den analogen Bacteriorhodopsinen den jeweiligen pK_a-Wert der Schiff-Base und des Asp85 zu ermitteln. Damit kann eine Aussage über die veränderten Verhältnisse in der Bindungstasche des Proteins infolge der vorgenommenen Modifikationen gemacht werden.

---

[b] Die Bindungstasche von Rhodopsin toleriert neben dem 11*Z*-Isomer weitere Isomere, so auch das 9*Z*- und 9*Z*,13*Z*-Isomer[230]. Das Chromoprotein mit der 9*Z*-Konfiguration des Chromophors wird als Isorhodopsin-I und das mit der 9*Z*,13*Z*-Form entsprechend als Isorhodopsin-II bezeichnet. Die Belichtung der analogen Rhodopsine führt in beiden Fällen zu einer Isomerisierung des Chromophors in die all-*E*-Konfiguration. Es wird angenommen, daß das Batho-Produkt des Isorhodopsins-I identisch zu dem des Rhodopsins ist[231]. Andere Eigenschaften der Isorhodopsine zeigen sich aber von Rhodopsin verschieden, wie z. B. die Quantenausbeute und der Extinktionskoeffizient.

Das Derivat 9-Demethylretinal (**2**) wurde in die Planung miteinbezogen, um das bereits umfassendere Datenmaterial aus der Literatur zu vervollständigen. So wurden noch keine Ergebnisse aus der Untersuchung des Photocyclus von Bacteriorhodopsin mit Hilfe zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie publiziert. Alle Messungen sollten darüber hinaus auch mit Retinal als Chromophor durchgeführt werden, um einerseits eine Referenz zu den eigenen Ergebnissen und andererseits zu den bereits vorhandenen Kenntnissen über das native System in der Literatur zu erhalten.

2.2 Die intramolekulare Wechselwirkungen des Chromophors

Neben der *inter*molekularen Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein sind ebenfalls die *intra*molekularen Verhältnisse des Retinals in der Bindungstasche des Rhodopsins von großem Interesse.

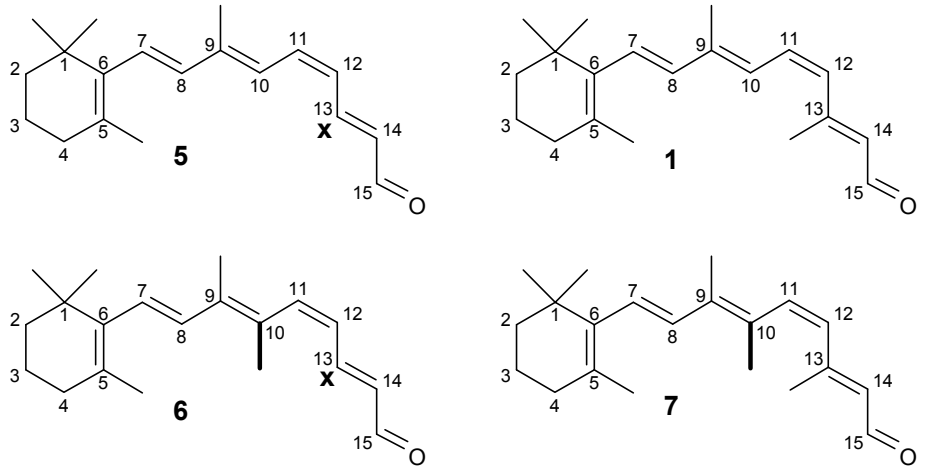


Abb. 2-2 Struktur des jeweiligen 11*Z*-Isomers von 13-Demethylretinal (**5**), Retinal (**1**), 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) und 10-Methylretinal (**7**). Die Modifikationen gegenüber Retinal sind mit einer stärkeren Strichstärke bzw. im Falle der Substitution einer Methylgruppe durch ein Proton mit "x" gekennzeichnet.

Aufgrund der 11*Z*-Konfiguration des Chromophors liegt eine sterische Wechselwirkung zwischen der Methylgruppe an Position 13 und dem Proton an Position 10 der Polyenkette vor. Inwiefern diese Wechselwirkung einen Beitrag zu der hohen Quantenausbeute des Rhodopsins von 0.67[68,104,105] leistet, ist nur unvollständig geklärt. Eine Beantwortung dieser Fragestellung könnte durch die Verwendung von Retinalderivaten erhalten werden, die zwischen den Positionen 10 und 13 eine systematische Änderung im Ausmaß der intramolekularen sterischen Wechselwirkungen besitzen. Diese Anforderung erfüllen die in Abb. 2-2 dargestellten Verbindungen: Bei 13-Demethylretinal (**5**) liegt in der 11*Z*-Form

zwischen der Position 10 und 13 nur eine Wechselwirkung von zwei Protonen vor. Bei der Verbindung 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) ist die 13-Methylgruppe des Retinals (**1**) zur Position 10 "verschoben" worden und die Pigmente sollten somit eine ähnliche Effektivität der Isomerisierung aufweisen. Die Verbindung 10-Methylretinal (**7**) besitzt von allen Substanzen die größte sterische Häufung und es wäre zu erwarten, daß der Isomerisierungsprozeß bei dieser Verbindung mit der höchsten Quantenausbeute verläuft.

Mit der Modifikation der Polyenkette bei diesen Retinalderivaten ist im Vergleich zum nativen System aber auch eine veränderte Wechselwirkung mit der Proteinumgebung zu berücksichtigen, die zu einer Beeinflussung der Studien des intramolekularen Aspekts führen könnte. In der Literatur sind bereits verschiedene Ergebnisse aus der Untersuchung der Retinalderivate **5** bis **7** vorzufinden.

2.2.1 Stand der Forschung

Das Retinalderivat 13-Demethylretinal (**5**) zählt unter den in Abb. 2-2 dargestellten Retinalderivaten zu den bestuntersuchten Chromophoren. Die Rekonstitution von Rhodopsin verläuft im Vergleich zu Retinal um den Faktor 10 langsamer[31,106] und dabei unvollständig (50 %[87]). Die in der Literatur angegebenen Werte für das Absorptionsmaximum von 13-Demethylretinal-Rhodopsin schwanken über einen Bereich von 495 bis 500 nm[31,70,87,90,92,93,106-109]. *Ebrey et al.* zeigten bei Untersuchung der PDE-Aktivität eine um den Faktor 2.5 erhöhte Dunkelaktivität des Pigments und eine um 10 % verringerte Aktivität als Agonist im Vergleich zu Rhodopsin. Die Isomerisierung des Chromophors in der Bindungstasche benötigt mit 400 fs doppelt so lange wie Retinal[110]. Im Photocyclus treten die von Retinal bekannten Intermediate auf, zeigen aber ein signifikant verschiedenes Absorptionsverhalten[93,111,112]. Die Kinetiken beim Übergang vom Lumi- zum Meta-I-Zustand werden durch das Retinalderivat beeinflußt, allerdings zeigen die FT-IR-Daten, daß die Meta-I- und Meta-II-Zustände mit denen von Retinal zu vergleichen sind[108,113]. Der Chromophor besitzt infolge der fehlenden Methylgruppe eine verringerte Wechselwirkung mit den Aminosäuren der Bindungstasche und eine verringerte Verdrillung der Polyenkette[70].

Kochendoerfer et al.[70] haben 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) in Rhodopsin mit Resonanz-Raman-Spektroskopie untersucht. Die Daten zeigen im Vergleich zu Rhodopsin eine zusätzliche Verdrillung der Polyenkette in der Nähe des Ringes, welche für eine Behinderung der Isomerisierung verantwortlich gemacht wird.

Der Einbau von 10-Methylretinal (**7**) in Opsin benötigt im Vergleich zu Retinal (**1**) die sechsfache Zeit[114] und erfolgt nur zu 83 %[115]. Das Absorptionsmaximum zeigt sich zu Rhodopsin geringfügig bathochrom verschoben bei 508 nm[114,115]. Das Batho-Intermediat besitzt im Vergleich zum nativen System eine deutlich erhöhte thermodynamische Stabilität und geht erst bei über 180 K in das Lumi-Intermediat über (Rhodopsin >130 K). Die Reaktion zum Meta-I-Zustand erfolgt analog zu Rhodopsin bei 220 K, welches aber bei 10-Methylretinal-Rhodopsin im weiteren erst bei Temperaturen von über 20 °C in einen Meta-II-Zustand übergeht. Dieses ist eventuell die Ursache für die auf ein Fünftel reduzierte Fähigkeit des analogen Pigments zur Aktivierung der Enzymkaskade[114].

Darüber hinaus ist bei der Verbindung wie im Falle von 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) eine stärkere Verdrillung der Polyenkette in der Bindungstasche des Proteins festzustellen[114,116].

2.2.2 Zielsetzung

Diese Resultate lassen im Vergleich zum nativen System auf veränderte Wechselwirkungen zwischen den modifizierten Chromophoren und den Aminosäuren der Bindungstasche des Proteins schließen. Die erfolgreiche Inkorporation der Derivate und das Auftreten der vom nativen Rhodopsin her bekannten Intermediate in den Photocyclen scheint die Interaktion aber nicht derart zu verändern, daß die Untersuchung des intramolekularen Aspektes nicht möglich sein sollte. Die im Rahmen der vorgenannten Studien erfolgten Bestimmungen der Quantenausbeuten bei den verschiedenen analogen Rhodopsinen variieren in ihren Ergebnissen sehr deutlich und lassen keine Korrelation mit der intramolekularen Wechselwirkung des Chromophors zu. So werden folgende Werte angegeben: 13-Demethylretinal-Rhodopsin ca. 0.3[106,107] und 0.47[70,110], 10-Methyl-13-demethylretinal-Rhodopsin 0.35[70] und 0.59[117] sowie 10-Methylretinal-Rhodopsin 0.32[115] und 0.55[114]. Eine Ursache für die Variation der Werte ist teilweise in systematischen Fehlern zu suchen. Das größte Manko liegt allerdings in den Bestimmungen der Extinktionskoeffizienten der analogen Chromoproteine, die zum Großteil nicht experimentell ermittelt, sondern nur abgeschätzt wurden; so differieren die verwendeten Werte der Koeffizienten bei den jeweiligen Pigmenten bis zu 30 %.

Vor allem eine Aufklärung dieses Sachverhalts war ein weiteres Ziel in der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Zu diesem Zweck mußten zuerst die in Abb. 2-2 dargestellten Retinalderivate 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) und 10-Methylretinal (**7**) synthetisiert

werden. Von der Verbindung 13-Demethylretinal (**5**) stand in der Arbeitsgruppe noch eine ausreichende Menge in Form einer Isomerenmischung zur Verfügung[118]. In die Isolierung der 11*Z*-Isomere für die Rekonstitution des Opsins war dann aber diese Verbindung miteinzubeziehen.

Für die Ermittlung der Extinktionskoeffizienten der Retinalderivate bzw. der entsprechenden Pigmente sollte dann ein probater Weg gefunden werden, um eine korrekte Bestimmung der Quantenausbeuten vornehmen zu können.

Für die Vervollständigung und z. T. Verifizierung der bereits vorhandenen Erkenntnisse über die Auswirkungen der bei den Retinalderivaten 13-Demethylretinal (**5**), 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) und 10-Methylretinal (**7**) vorgenommenen Modifikationen auf die Eigenschaften als Chromophore in Rhodopsin sollten desweiteren deren Verhalten bei der Inkorporation und zusätzlich die Photocyclen der entsprechenden Pigmente gemessen werden.

2.3 Die Bindungstasche von Bacteriorhodopsin um die Position 10 des Chromophors

Über die sterischen Gegebenheiten um die Position 10 des Chromophors in der "binding site" des Bacteriorhodopsins ist wenig bekannt. Die Inkorporation von 10-Methylretinal (**7**) in Bacterioopsin gelang *Schiffmiller et al.*[119]. Bei der Untersuchung des Photocyclus konnte keine Änderung der Absorption in einem Zeitbereich von 0.1 bis 1000 ms festgestellt werden. Ebensowenig wurde eine Fähigkeit der Verbindung zum Transport von Protonen beobachtet. Literaturdaten über ein analoges Bacteriorhodopsin mit 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) sind nicht vorzufinden.

Somit sollte im Rahmen dieser Arbeit mit den Verbindungen 10-Methyl-13-demethylretinal (**6**) und 10-Methylretinal (**7**) eine detaillierte Studie des intermolekularen Aspekts vorgenommen werden.

2.4 Synthese von ^{13}C-markierten Retinalen

Die Ermittlung der Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse erfolgt anhand von Kristallen, in denen sich die Proteine in einem festen Verband befinden. In ihrer nativen Umgebung dagegen befinden sich Membranproteine in einer Lipiddoppelschicht, in der sie in zwei Dimensionen relativ frei beweglich und nur geringen restriktiven Kräften

unterworfen sind. Diese Unterschiede in der Umgebung der Proteine können dazu führen, daß die aus der Strukturanalyse erhaltenen Daten die Verhältnisse in den Proteinen nicht korrekt wiedergeben. Mit der Verfeinerung der NMR-Techniken, insbesondere der Festkörper-Spektroskopie, ist auch die Messung von Proteinen möglich geworden, so daß eine ergänzende Methode zur Strukturanalyse vorliegt. Der Vorteil dieser Technik ist einerseits, daß als Proben keine geordneten Molekülverbände notwendig sind, so daß die Moleküle unter Bedingungen vermessen werden können, die den nativen ähnlicher sind als in einem Kristall. Auch ist die NMR-Spektroskopie in manchen Fällen mit einem höherem Auflösungsvermögen versehen. Ein Nachteil der NMR-Technik liegt allerdings darin, daß die Proteine oder darin enthaltene Moleküle für eine verwertbare Signalintensität an der zu untersuchenden Stelle mit Isotopen angereichert werden müssen.[120,121]

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried sollten entsprechende NMR-Messungen durchgeführt werden. Ziel dieser Untersuchung war die Abstandsbestimmung der Position 14 des Chromophors mit der Aminosäure Trp86 in der Bindungstasche von Bacteriorhodopsin sowohl im lichtadaptierten als auch dunkeladaptierten Zustand des Proteins.

Da ein Bacteriorhodopsin produziert werden konnte, bei dem alle Tryptophane mit ^{13}C markiert waren, war es ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit, [14-^{13}C]- und [15-^{13}C]-Retinal (**1b** und **1c**[c]) zu synthetisieren.

[c] An Stellen, an denen eine Unterscheidung des unmarkierten Retinals von den markierten Verbindungen notwendig ist, wird die unmarkierte Substanz mit **1a** beziffert, ansonsten wird nur die verkürzte Bezeichnung **1** verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Darstellung der Ausgangssubstanzen

Die erste Totalsynthese von Vitamin-A gelang 1937 *Kuhn et al.*[122]. Seitdem ist eine Vielzahl von Wegen beschritten worden, um Retinal und darüber hinaus retinalanaloge Verbindungen zu synthetisieren. Zum Aufbau des Moleküls wurde dabei eine große Anzahl von Reaktionen verwendet, von denen viele zu den klassischen Reaktionen in der organischen Chemie gehören. Zu nennen sind z. B. die Aldolkondensation, die Reformatskii-, Knoevenagel-Doebner-, Grignard-, Wurtz- und Michael-Reaktion sowie die Wittig- und Wittig-Horner-Reaktion[123-125]. In jüngerer Zeit wurden ebenfalls die Stille-[126,127] und Suzuki-Reaktion[128-131] sowie die Still-Gennari[103,132] Variante der Wittig-Horner-Reaktion angewandt. Ziel dieser Synthesemethoden ist vor allem die gezielte Darstellung von Isomeren des Retinals oder seiner Derivate.

Der Aufbau der Verbindungen kann unter retrosynthetischen Aspekten geplant werden. Für die Unterteilung bietet sich vor allem die beim nativen Retinal aus 9 Kohlenstoffatomen bestehende Polyenkette an, die an jeder Stelle in Synthone zerlegbar ist. Den Ausgangspunkt des Molekülaufbaus bildet dabei das Synthon, welches den Ring und eventuell bereits einen Teil der Polyenkette enthält. Die Vervollständigung der Kette kann dann mit einem oder mehreren Synthonen erfolgen. Die den Synthonen entsprechenden Syntheseäquivalente stehen zumeist sowohl mit Donor- als auch Akzeptor-Funktionalität zur Verfügung[123] (Abb. 3-1).

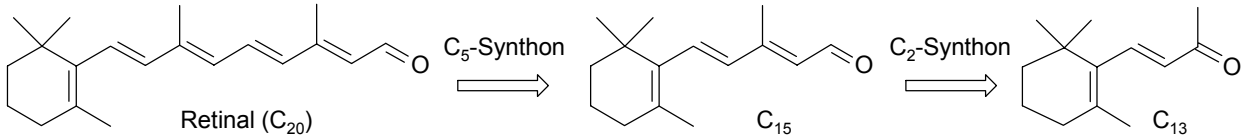
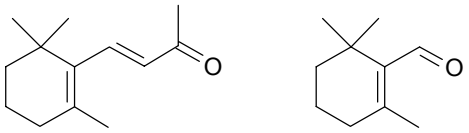


Abb. 3-1 Beispiel für die retrosynthetische Planung einer Retinalsynthese

Für die im Rahmen dieser Arbeit zu synthetisierenden retinalanalogen Substanzen befinden sich die Modifikationen gegenüber der Stammverbindung an den Positionen 9 und 10 und in einem Falle zusätzlich an der Position 13. Zentraler Punkt der Synthesen war somit jeweils die Darstellung des ersten Bausteins, der die gewünschten Modifikationen enthält. Die bedeutendste Verbindung für die Totalsynthese von Retinal stellt

β–Ionon (**8**) dar (Abb. 3-2). In dessen Struktur ist zum einen der vollständige Cyclohexenring mit den drei Methylsubstituenten und zum anderen bereits der erste Teil der Polyenkette enthalten. Zusätzlich liegt mit dem Keton eine funktionelle Gruppe vor, die mit gängigen Verfahren der Carbonylolefinierung eine Verlängerung der Polyenkette zugänglich macht.



β-Ionon (**8**) β-Cyclocitral (**9**)

Abb. 3-2 Wichtige Ausgangssubstanzen für die Synthese von Retinal und retinalanalogen Verbindungen

Als Grundbaustein bietet sich desweiteren die Verbindung β-Cyclocitral (**9**) an (s. Abb. 3-2). Diese besitzt ebenfalls den vollständigen Cyclohexenring mit den Substituenten und eine funktionelle Aldehydgruppe. Der gegenüber β-Ionon (**8**) fehlende Teil der Polyenkette ermöglicht die Einführung der geplanten Modifikationen im Aufbau des konjugierten Systems mit der Wahl entsprechender Synthone.

Aufgrund der vergleichbaren Polyenkette bei den zu synthetisierenden Verbindungen war für eine effiziente Darstellung die Verwendung weniger Synthone im Aufbau der jeweiligen Polyenkette anzustreben. Diese Voraussetzung wird durch die Anwendung der Wittig-Horner-Reaktion erfüllt. Die entsprechenden Phosphonate können selbst über zwei Stufen mit bewährten Vorschriften aus kommerziell erhältlichen Substanzen in guten Ausbeuten dargestellt werden. Orientiert man sich an dem retrosynthetischen Schema in Abb. 3-1, so sind z. B. für die Darstellung der an Position 9 modifizierten Zielverbindungen insgesamt nur zwei Phosphonate für die Wittig-Horner-Reaktionen vonnöten, wenn der Grundbaustein bereits die geplanten Modifikationen enthält: Ein C_2-Phosphonat für die erste Kettenverlängerung und ein C_5-Phosphonat für die Vervollständigung der Kette.

Von großer Bedeutung für die Verwendung der Retinalderivate ist die Konfiguration der Polyenkette. Die meisten der Aufbaureaktionen, so auch die Wittig-Horner-Reaktion, verlaufen nicht stereospezifisch und nur bedingt stereoselektiv. Aus diesem Grund liegen bei den Endprodukten der Synthesen Mischungen von Isomeren vor. Für die geplanten Untersuchungen der Substanzen als prosthetische Gruppen im Protein Bacteriorhodopsin wird der Chromophor in der all-*E*-Konfiguration benötigt, während die aktive Geometrie des Chromophors in Rhodopsin die 11*Z*-Form ist. Somit sind für die Untersuchungen bereits zwei unterschiedliche Isomere vonnöten, womit eine gezielte Synthese von reinen

Isomeren nicht sinnvoll war. Zudem sind Retinal und die Retinalderivate photolabil, so daß die präparative Darstellung von reinen Isomeren wenig praktikabel ist.

Entsteht ein notwendiges Isomer nicht als Folge der Synthese, so kann dieses auf photochemischem Wege dargestellt werden[124] (s. auch Punkt 3.1.2.1). Allerdings sind von den beim Retinal 16 möglichen Isomeren nur ein Teil über Belichtung erhältlich, die Restlichen sind nur über stereokontrollierte Synthesen zu erreichen[132-135].

Nach der Darstellung der Retinalderivate war eine erste, allerdings unvollständige Auftrennung der Isomere im Rahmen der chromatographischen Reinigung des Rohprodukts möglich. In der Regel konnte somit ein Teil des all-*E*-Isomers in reiner Form erhalten werden. Die komplette Auftrennung und Charakterisierung der entstandenen Isomere war nur mittels analytischer bzw. präparativer HPLC in Kopplung mit anderen spektroskopischen Methoden möglich. Aus diesem Grund werden die spektroskopischen Daten der Verbindungen bzw. der Isomere der Verbindungen zusammen mit den der photochemisch hergestellten Isomere unter Punkt 3.1.2 aufgeführt und diskutiert.

Für die Identifizierung der Zwischen- und Endprodukte sowie die Charakterisierung der jeweiligen Isomere wurde in erster Linie die ^{1}H-NMR-Spektroskopie verwendet. Zusätzlich kamen die IR- und UV-Spektroskopie zum Einsatz. Von den Zwischenstufen wurden nur in Zweifelsfällen Massenspektren angefertigt, die molekularen Massen der Endprodukte der Synthesen, der Retinalderivate, wurden alle eindeutig mittels hochauflösender Massenspektren bestimmt.